

令和元年6月14日現在

機関番号：23903

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07008

研究課題名(和文) Gemcitabine耐性膵癌に対する新規光線力学療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of photodynamic therapy with a novel photosensitizer for gemcitabine resistant pancreatic cancer

研究代表者

加藤 晃久 (Kato, Akihisa)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・臨床研究医

研究者番号：10803489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学療法(PDT)は低侵襲な癌治療法の一つで、これまで我々はより高い腫瘍選択性と抗腫瘍効果を有する光感受性物質であるオリゴ糖連結クロリン(0クロリン)を開発してきた。今回 Gemcitabine(GEM)耐性膵癌に対する0クロリン-PDT効果について基礎的な検討を行った。樹立したGEM耐性膵癌細胞株に対して新規0クロリン-PDT効果はin vitroで現行薬に比べ約11 - 16倍の効果を認め、またマウス膵癌腹膜播種モデルでは0クロリンの癌への高い集積性を認めたが、PDT効果については対照群と有意差は認めなかった。GEM耐性膵癌に対するPDTの有用性については更なる検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は高い腫瘍細胞選択性を可能にしたオリゴ糖連結クロリンを開発し、次世代のPDTとして期待される。この技術はWarburg効果としてFDG-PET検査にも応用されているように、癌細胞に普遍的な糖の取り込みを応用しているので、新規糖鎖連結光感受性物質はほぼすべての癌に応用が可能であり、実臨床において問題となるGEM耐性の膵癌などに対しても非常に有用な抗癌治療法である。そこで本研究では、GEMが無効となり腹膜播種病変が出現した際、現在の医療では治療選択肢が何もない中で、積極的かつ低侵襲な腹膜播種巣に対する治療としての一つの治療選択を提案することを目的としている。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) has gained considerable attention as an alternative to management of cancer. We synthesized oligosaccharide-conjugated chlorin (0-chlorin) to improve cancer selectivity as well as antitumor effect, and investigated its effect for Gemcitabine(GEM) resistant pancreatic cancer. After establishment of GEM resistant pancreatic cancer cell lines, we showed the cytotoxic effects were about 11 - 16 times higher than those of Talaporfin, which is clinically used. We additionally established experimental peritoneal disseminated xenograft mouse models of GEM resistant pancreatic cancer cells and demonstrated the high cancer selectivity of 0-chlorin in in vivo model. However, 0-chlorin PDT did not suppress tumor growth of peritoneal disseminated tumor in mice compared with the Talaporfin group. Therefore, further studies are needed to establish the usefulness of this novel PDT for GEM resistant pancreatic cancer.

研究分野：胆膵領域

キーワード：膵癌 光線力学療法 PDT

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は早期発見が難しく、5年生存率も癌の中で最も低い。切除不能進行膵癌は化学療法または放射線化学療法が主な治療法となるが、gemcitabine (GEM) をはじめとした化学療法を行っても膵癌の予後を改善するには至っていない。腹膜播種を有する場合はその奏効率は低く、また GEM に耐性となり腹膜播種病変が出現した場合、何も有効な治療選択肢がないケースも少なくない。そのような症例に低侵襲な腹膜播種病変に対する局所療法が可能となれば、腹水の減少、QOL の改善、さらには予後延長にもつながる可能性があると考えられ、新たな治療選択として期待されている。

(2) 光線力学療法(PDT)は低侵襲な局所癌治療として注目されているが、現行の光感受性物質であるタラポルフィンナトリウム (TS) は細胞選択性が乏しく、次世代の光感受性物質の開発が望まれる。当施設では<sup>18</sup>F-FDG-PET-CT 検査に応用されている癌細胞が高効率にグルコースを取り込む事象 (Warburg 効果) に着目し、腫瘍集積のための機能素子としてグルコースを光感受性物質クロリンに連結させ、高い腫瘍細胞指向性を可能にしたグルコース連結クロリンを開発し、胃癌、大腸癌細胞株や皮下移植腫瘍マウスモデルを用いて優れた抗腫瘍効果を示すことを明らかにしてきた。さらに最近臨床応用を目指すために水溶性を克服したオリゴ糖連結クロリン (O クロリン) の開発にも成功し、この O クロリンについて我々は腹膜播種を有する膵癌に対する O クロリン-PDT の治療開発のため基礎的検討を行い、その有用性につき報告してきた。

#### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、実臨床で遭遇することの多い GEM 耐性となった腹膜播種を有する症例に対して、腹水の減少、QOL の改善や予後延長にもつながる可能性がある腹膜播種病変に対する低侵襲な局所療法の提案の基礎的検討として、臨床応用に適した水溶性 O クロリン-PDT 効果について、GEM 耐性膵癌細胞株やその膵癌腹膜播種マウスモデルを用いて検討する。

(2) GEM 耐性に関連する遺伝子変化と PDT による抗腫瘍効果との関連性についても検討し、今後積極的かつ低侵襲な腹膜播種巣に対する治療としての一つの治療選択を提案することを目的とする。

#### 3. 研究の方法

新規開発した水溶性 O クロリンを用いた PDT による GEM 耐性膵癌への抗腫瘍効果を明らかにするために、以下の方法を計画した。

1) GEM に感受性のある膵癌細胞株に Luciferase 遺伝子を導入後、GEM 耐性膵癌細胞株を樹立する。

2) 樹立した GEM 耐性株に対して、新規 O クロリン-PDT による殺細胞効果について *in vitro* で評価する。

3) マウス膵癌腹膜播種モデルを作成後、O クロリンを腹腔内へ直接投与することによる O クロリンの癌組織および臓器別集積性をスペクトロメーターで評価する。また一定時間後に腹壁表面から照射し、PDT による抗腫瘍効果を *In Vivo* Imaging System により経時的に定量測定して腫瘍縮小効果を検討する。

4) cDNA マイクロアレイ解析により、包括的ゲノム情報から GEM 耐性株において変化した遺伝子を抽出する。着目した遺伝子変化と PDT による抗腫瘍効果についての関係性を検討する。

#### 4. 研究成果

1) まず Luciferase 遺伝子導入膵癌細胞株を作成するために AsPC1 細胞株に Luciferase と GFP の配列を含んだプラスミドをレンチウイルスを用いて遺伝子導入を行った。さらに限界希釈法にて単一クローニングを図り、GFP の発現の強い細胞を選択後、培養を続けた。そのようにして作成した細胞株から抽出したタンパクで Western blotting 法を用いて Luciferase が確実に導入されていることを確認した。

2) その Luciferase 導入 AsPC1 細胞の GEM 耐性株を樹立するために、 $0.1 \mu\text{M}$  の低濃度から暴露を開始し、徐々に濃度を上げていき、約 5 カ月間かけて最終的に  $100 \mu\text{M}$  の GEM の中でも生存・増殖を示す GEM 耐性株の樹立が可能であった。その細胞株は細胞形態的にも元の GEM 暴露前の細胞と著しい変化は示さなかった。

3) GEM 耐性膵癌細胞株の GEM に対する 50%細胞発育阻害濃度 ( $IC_{50}$ ) を計測すると、「計測不能」との結果であり、また GEM 暴露前の元の Luciferase 導入 AsPC1 細胞に対する  $IC_{50}$  は、 $4.14 \mu\text{M}$  であった。

4) 樹立した GEM 耐性膵癌細胞株に対する TS、0 クロリンを暴露後に 660 nm の赤色 LED 光線を照射し、 $IC_{50}$  につき比較検討した。元の AsPC1 細胞株に対して、0 クロリンによる PDT 殺細胞効果は現行薬である TS に比べ 11.3 倍の効果が認められ、同様に GEM 耐性膵癌細胞株に対しても 0 クロリンは 16.4 倍の殺細胞効果を示した。

5) GEM 耐性細胞をヌードマウスの腹腔内移植から 2 週後に、TS や 0 クロリンを腹腔内に直接投与し、4 時間後に開腹し観察した。0 クロリン投与のマウスにおいては、通常白色光では観察されづらい腫瘍巣においても 405nm の波長の光線下では赤く光って観察された。各臓器への薬剤の集積をスペクトロメーターで定量化すると、0 クロリンでは癌への高い集積性を持っていることが確認された。

6) Day-7 にヌードマウスの腹腔内に GEM 耐性膵癌細胞を移植後、day0 と day7 に PDT を施行した。実験終了まで皮膚の変化を含め有害事象は生じず、また体重も各群で差異は認めなかった。しかし Day0、7 と 14 にそれぞれ *In vivo* imaging system で腫瘍量を定量化したが、対照群を含め各群間で有意な差は認めなかった。

7) 樹立した GEM 耐性膵癌細胞株と元の AsPC1 細胞株の両方から、total RNA を抽出し TORAY に包括的ゲノム情報解析を外部委託した。GEM 耐性株において変化した遺伝子を抽出し、着目した遺伝子変化と PDT による抗腫瘍効果についての関係性の検討を予定している。

以上が研究成果であり、低侵襲な腹膜播種巣に対する治療として提案できる一つの治療選択肢である 0 クロリン-PDT の有効性は、*In vitro* において GEM 耐性膵癌に対して有効性が示されたが、*In vivo* では違った結果となった。光の当て方に工夫を要するのか、または生体内での何らかの因子が PDT 効果の妨げとなっているのか更なる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Nishie H, Kataoka H, Yano S, Yamaguchi H, Nomoto A, Tanaka M, **Kato A**, Shimura T, Mizoshita T, Kubota E, Tanida S, Joh T. Excellent Antitumor Effects for Gastrointestinal Cancers Using Photodynamic Therapy with a Novel Glucose Conjugated Chlorin e6. 査読有. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018 Feb 19;496(4):1204-1209.

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Kato Akihisa, Naitoh Itaru, Hayashi Kazuki, Miyabe Katsuyuki, Yoshida Michihiro, Hori Yasuki, Natsume Makoto, Jinno Naruomi, Naiki-Ito Aya, Takahashi Satoru, Joh Takashi. Class III  $\alpha$ -tubulin expression is predictive of response to *nab*-paclitaxel and gemcitabine in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. Digestive Disease Week 2018. June 3, 2018 Washington,DC.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。