

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16822

研究課題名(和文) 光線力学療法における talaporfin sodium の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of genes associated with susceptibility to talaporfin sodium using the CRISPR/cas9 system.

研究代表者

和田 秀之 (Wada, Hideyuki)

北海道大学・医学研究院・客員研究員

研究者番号：00789406

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、癌診断および治療を行う光線力学療法が各癌領域で注目されている。癌に特異的に取り込まれる光感受性物質にレーザー光をあて光感受性物質を励起させることで癌細胞を発光させ、癌を視覚的に検出し診断に応用する。さらに励起時、細胞毒性が強い活性酸素が発生し、細胞死を引き起こすことで癌治療を行うことが可能になる。しかしながら、talaporfin sodiumの細胞動態は未だ不明な部分が多く、メカニズムの解明には至っていない。本研究では、CRISPR/cas9システムを用いてtalaporfin sodiumの感受性関連遺伝子の同定を行い、同定遺伝子と薬物動態との関連について解析することである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道癌は、5年生存率が約37%と予後の悪い癌であり、治療方法は内視鏡治療、外科治療、化学療法、放射線療法がある。表在食道癌においても20%で再発をきたし5年生存率では70%と、ほかの消化器癌よりも低い。光線力学療法は食道癌の治療の一つとして期待され、臨床応用の拡大が望まれる治療方法と考える。しかしながら、talaporfin sodiumのメカニズムが不明な面が多く、光線力学療法後にも再発をきたす症例があり治療方法としての検討・解析が不十分である。よって、本治療方法の臨床応用の拡大のためtalaporfin sodiumの分子メカニズムを解明は、食道癌治療にとって急務である。

研究成果の概要(英文)：In recent years, photodynamic therapy, which uses the accumulation of light-sensitive substances in cancer cells for cancer diagnosis and treatment, has attracted attention in various cancer fields. By shining a laser beam on a light-sensitive substance that is taken up specifically by cancer cells, the light-sensitive substance is excited, causing the cancer cells to emit light, which is then used to visually detect and diagnose the cancer. Furthermore, upon excitation, highly cytotoxic reactive oxygen species are generated, causing cell death and enabling cancer treatment. However, the cellular dynamics of talaporfin sodium is still largely unknown and the molecular mechanism has yet to be elucidated. The aim of this study is to identify genes associated with sensitivity to talaporfin sodium using the CRISPR/cas9 system, a gene editing technology, and to analyse the relationship between the identified genes and pharmacokinetics.

研究分野：光線力学的診断治療

キーワード：光線力学療法 Talaporfin sodium PDT

1. 研究開始当初の背景

近年、光感受性物質が癌細胞に集積することを利用して、癌診断および治療を行う光線力学療法が各癌領域で注目されている。癌に特異的に取り込まれる光感受性物質にレーザー光をあて光感受性物質を励起させることで癌細胞を発光させ、癌を視覚的に検出し診断に応用する。さらに励起時、細胞毒性が強い活性酸素が発生し、細胞死を引き起こすことで癌治療を行うことが可能になる。消化器癌治療においては、2015年に化学放射線療法後、局所進行再発食道癌に対する治療として talaporfin sodium を用いた光線力学療法が保険収載となり、再発食道癌の救済治療として期待されている。

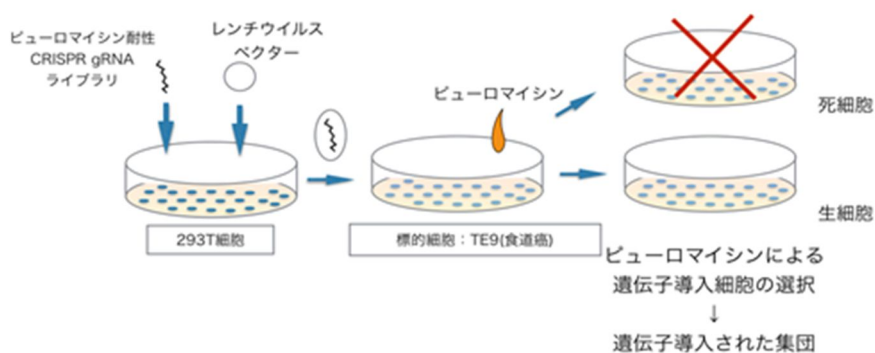
2. 研究の目的

本研究では、遺伝子編集技術である CRISPR/cas9 システムを用いて talaporfin sodium の感受性関連遺伝子の同定を行い、同定遺伝子と薬物動態との関連について解析することを目的とする。

3. 研究の方法

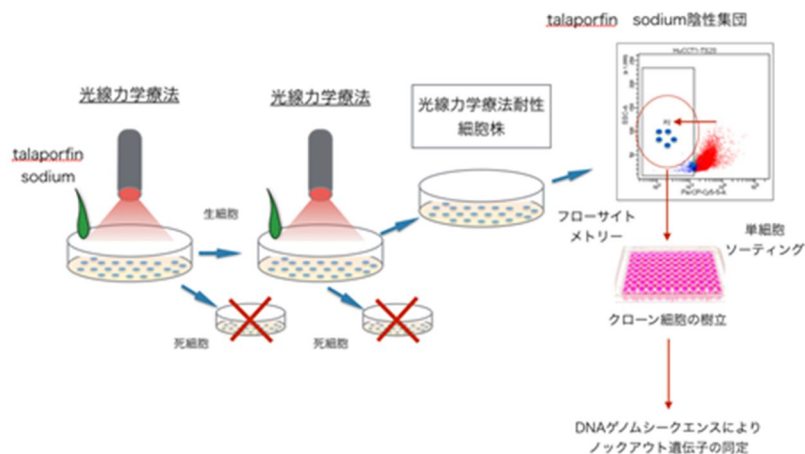
(1) CRISPR-Cas9 システムを用いた gRNA ライブラリ安定発現株の作成により、ランダムな遺伝子ノックアウトを行う。

レンチウイルスベクターに組み込まれたピューロマイシン耐性 CRISPR gRNA ラブラリを標的細胞である食道癌細胞株 TE9 に導入する。ピューロマイシンの投与により、ピューロマイシン耐性の遺伝子が導入された安定発現株を作成する。



(2) gRNA ライブラリ安定発現株における、光線力学療法耐性集団を濃縮する。

耐性集団における talaporfin sodium の取り込み低下細胞の検出し、シングルセルソーティングによる gRNA ライブラリ安定発現かつ光線力学療法耐性のクローン細胞を樹立する。

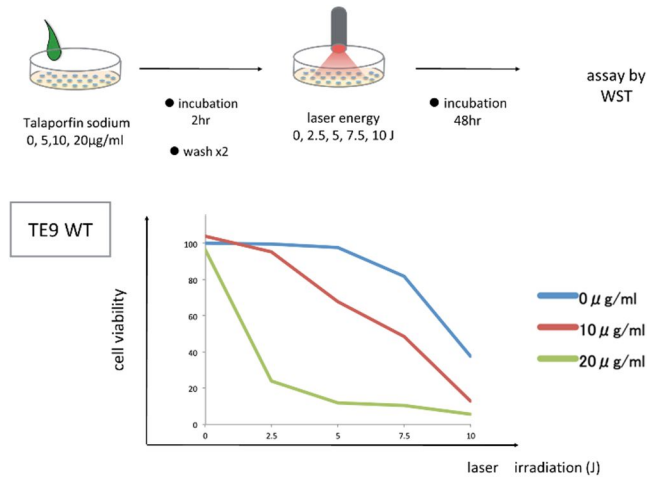


(3) 同定遺伝子の癌細胞発現レベルと光線力学療法の効果の関連を検討する。

(1), (2) で得られた遺伝子の機能解析を行う。各種癌細胞における、遺伝子発現レベルと talaporfin sodium の細胞内取り込み、光線力学療法の治療効果の関係について検討する。

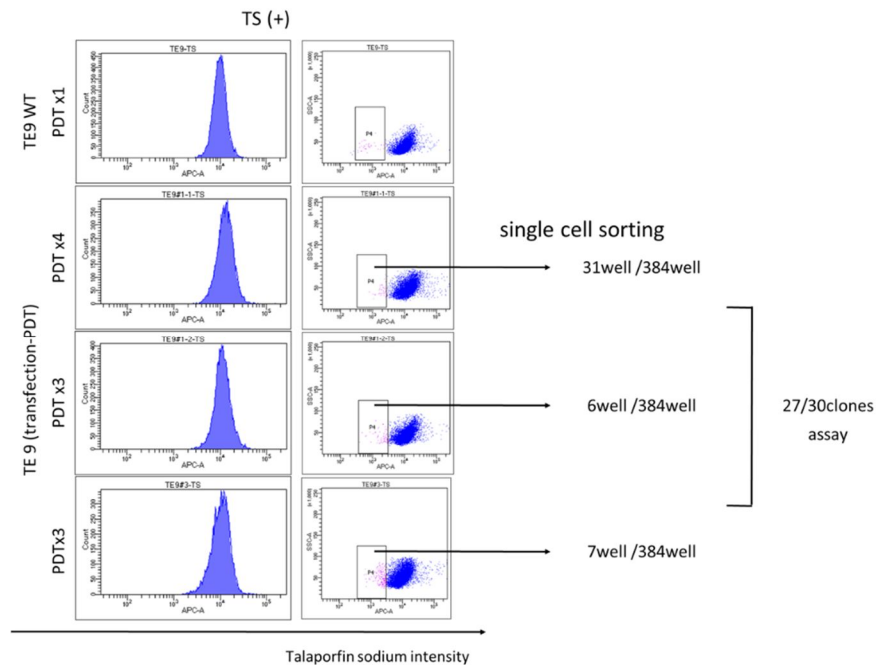
4. 研究成果

(1) レンチウイルスベクターに組み込まれたピューロマイシン耐性 CRISPR gRNA ラブラリを標的細胞である食道癌細胞株 TE9 に導入した。ピューロマイシンによるセクションにより、ランダムにヒトゲノムの何らかの遺伝子がノックアウトされる事が期待される安定発現株を作成した。



(2) (1)で得られた gRNA ライブラリ安定発現株に対し、talaporfin sodium の投与、レーザー照射を行い、光線力学療法を施行した。talaporfin sodium 濃度 20 μg/ml, レーザー強度 15mW/cm² 2.5J で光線力学療法を行うと 48 時間後には約 90%が細胞死を起こし、10%程度の細胞が生細胞として残存した。これらを 7~10 日程度再培養し、増殖した培養細胞に、同様の工程で 2 回光線力学療法を繰り返した。最終的に残存した細胞は光線力学療法耐性の濃縮細胞と仮定した。

(3) (2)で作成した光線力学療法耐性の濃縮細胞に talaporfin sodium を取り込ませ、フローサイトメトリーで蛍光陰性細胞をシングルセルソーティングし、30 のクローン細胞を樹立した。



(4) (3)で樹立したクローン細胞に対し、talaporfin sodium を取り込ませフローサイトメトリーを用いて蛍光強度が低いクローン株の検出を試みたが、今回樹立したクローン株はいずれもネガティブコントロール細胞と同様の蛍光を呈しており、目的とした talaporfin sodium の取り込みが低いクローン細胞の樹立には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------