

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17491

研究課題名(和文)食道癌に対するポルフィゾーム及びベルテポルフィンを用いた光線力学的治療の基盤研究

研究課題名(英文) Basic research of photodynamic therapies with porphyrin and verteporfin for esophageal cancer

研究代表者

斧山 巧 (ONOYAMA, TAKUMI)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60817831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：食道癌細胞株KYSE30(高分化型)、KYSE70(低分化型)、KYSE170(中分化型)において、光感受性物質であるPorphyrinがミトコンドリア内に取り込まれることを確認した。Porphyrinによる660nmの赤色光を用いた光線力学療法(PDT)により、細胞障害性を発揮する一重項酸素が、Porphyrinの局在部において発生し、照射を施行しなかったControl群に対し、PDT群にのみアポトーシスが誘導され、腫瘍細胞数の減少が、Porphyrin濃度依存的に認められた(EC50はKYSE30：5.73 μ M、KYSE70：5.58 μ M、KYSE170：4.98 μ M)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いずれの食道癌細胞株において光感受性物質であるPorphyrinがミトコンドリア内に取り込まれること、PorphyrinによるPDTにより、腫瘍細胞においてアポトーシスが誘導され、腫瘍細胞数の減少が、Porphyrin濃度依存的に認められたことから、Porphyrinを用いたPDTは食道癌に対して有効であると考えられる。今後in vivoでの実験系を行っていく必要性はあるが、新たな食道癌の治療方法として期待できるものとする。特に、手術や化学療法などの標準的治療が難しい高齢者などの治療に期待される。

研究成果の概要(英文)：The in vitro experiment revealed that Porphyrin, one of the photosensitizers, was incorporated into mitochondria in esophageal cancer cell lines KYSE30 (well-differentiated type), KYSE70 (poorly-differentiated type), and KYSE170 (moderately-differentiated type). Photodynamic therapy (PDT) with 660 nm red light-induced apoptosis was only in the PDT group compared with the control group without irradiation, and the number of tumor cells reduced by cytotoxic singlet oxygen in the localized area of Porphyrin in a Porphyrin concentration-dependent manner (50% effective concentration: KYSE30, 5.73 μ M; KYSE70, 5.58 μ M; KYSE170, 4.98 μ M).

研究分野：消化器

キーワード：食道癌 光線力学療法 ポルフィゾーム ベルテポルフィン

1. 研究開始当初の背景

食道扁平癌は早期であれば内視鏡切除で根治できるが、進行期では外科手術または化学放射線治療が必要である。前者は根治可能であるが侵襲が大きく手術関連死も少なくない。化学放射線治療では食道での局所再発が問題となっており、病変を制御できないと予後不良となる。放射線或いは化学放射線治療後の再発・遺残食道扁平上皮癌に対する半導体レーザーを用いた光線力学的治療は医師主導治験から保険適応となっており、タラポルフィンナトリウムはその唯一の適応薬剤であるが、遮光期間や腫瘍選択性に課題が残されている。(1)タラポルフィンナトリウムが腫瘍へ集積する6時間後に内視鏡下に近赤外光(664nm)を照射すると活性酸素種を発生し抗腫瘍効果を発揮するものであるが、腫瘍選択性に難点があり、治療中は照射部位を確認できないため、周囲粘膜にもレーザーが照射され粘膜傷害を来し、結果狭窄を惹起すること、(2)治療時間は2時間を超える症例があり、また光線過敏症を防止するため遮光期間は2週間に及び患者の生活の質(QOL)が低下することが課題として挙げられていた。(1)の課題解決として、ポルフィゾーム(タラポルフィンナトリウム重合体)は、ナノ粒子の特性として腫瘍へ集積する特性:EPR(enhanced permeability and retention)効果により腫瘍に取り込まれ、腫瘍選択性に優れている。同じ波長域の近赤外光の照射によりPDTを可能する一方で、青色光(狭帯域光と同じ410nm前後)を照射すると光線力学的診断(photodynamic diagnosis)が可能となる。すなわち、随時腫瘍部位を確認しながらPDTの照射が可能であることが期待された。当初、ポルフィゾームによるPDTについては、カナダで頭頸部癌(同じ扁平上皮癌)での治験が始まっていたが、食道扁平上皮癌に対しては欧米での罹患率が低く、治験や臨床試験の対象疾患となっておらず、基礎研究の報告は認めていなかった。(2)の照射時間と遮光期間の問題点については、同じ光感受性物質で、既に加齢黄斑変性症への治療適応があるベルテポルフィリンをPDTへdrug repositioningすることで解決できる可能性があった。同薬剤投与後からの治療開始までの時間は30分以内とタラポルフィンナトリウムに比べ短く、遮光時間も短く済む(1日程度)など利点が多いと考えられた。欧米では膵臓癌のPDTに応用されており(Br J Cancer 2014)、我々の胃癌細胞を用いた先行研究では、加齢黄斑変性症の際の血中濃度よりはるかに低い濃度で極めて高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになっていた。食道癌への臨床実用は例がなくdrug-repositioningの観点からも新たな癌治療戦略として意義のあるものになる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

ポルフィゾーム及びベルテポルフィンを光感受性物質とし、食道癌扁平上皮癌細胞に対するPDTの基礎実験、安全性試験を行うことを目的とした。すなわち、食道扁平上皮癌の培養細胞に対してポルフィゾーム、ベルテポルフィンを撒布し、PDTによる殺腫瘍効果の検証や、至適濃度、PDTエネルギー密度などを細胞株に対する検討で算出して、ヌードマウス皮下移植モデルで検証することとした。

3. 研究の方法

ヒト食道扁平上皮癌細胞株を用い、ポルフィゾーム及びベルテポルフィン投与後に試作した実験用LED装置(670nm/690nm/410nmを随時照射できる)から近赤外領域光を照射し、ポルフィゾーム及びベルテポルフィンによるPDTの抗腫瘍効果(MTSアッセイ、アポトーシス)をタラポルフィンナトリウムと対比検証する。IC-50を参考に至適投与量を、また至適照射エネルギーを算出し次のrodent modelに移行する。すなわち食道扁平上皮癌皮下移植モデル(ヌードマウス)における抗腫瘍効果を、同様にタラポルフィンナトリウムを対照として、腫瘍サイズの変化、腫瘍壊死評価(HE標本)、apoptosisの誘導効果(TUNNEL染色)、細胞増殖活性(Ki67染色)など主に免疫組織学的解析法を用いて比較実験を行う。ルシフェラーゼを遺伝子導入している細胞から形成される腫瘍はルシフェリン皮下投与後にIVISイメージングシステムによりモニター可能であり、試作した実験用LED装置から410nmの青紫光で照射した際の腫瘍からの赤色蛍光との相対性対比し、腫瘍の存在部位や未治療部を可視化しながら治療を行うTheranosticsが可能かどうかを検討する。一方、ベルテポルフィンは、単独でも腫瘍増殖作用を有するYAP(Yes-Associated-Protein)の核内移行を阻害することで抗腫瘍効果を発揮することが知られており、細胞染色でのYAP局在性の確認やウェスタンブロット等で細胞各画での発現量を解析しPDT治療効果への影響を検討する。

4. 研究成果

食道癌細胞株に対し光感受性物質であるポルフィゾームとLED光源を用いて光線力学的療法をin vitroで実施し、ポルフィゾームの用量設定や薬物動態を評価及び確認する実験系を中心に

行った。食道癌細胞株は高分化型である KYSE30、低分化型である KYSE70、中分化型である KYSE170 を用いた。各細胞株に対して、それぞれポルフィゾーム撒布後、細胞内にポルフィゾームが取り込まれること、並びに取り込まれたポルフィゾームがミトコンドリアに局在することを蛍光染色にて確認し得た。このミトコンドリアへの局在は他の光感受性物質であるベルテポルフィンと同様であった。各細胞株に対してポルフィゾームを様々な濃度で撒布し 1 時間後 660 nm の赤色光を照射できる LED 光源を用いて 10 J/cm² のエネルギー量で光照射を行い、照射 24 時間後、クリスタルバイオレットにより生存した腫瘍細胞を染色した。その結果、ポルフィゾーム濃度依存的な腫瘍細胞数の減少が認められた。さらにクリスタルバイオレットをメタノールにより可溶化した上でプレートリーダーを用いて数値化し EC50 を求めたところ、それぞれ、KYSE30 : 5.73 μM、KYSE70 : 5.58 μM、KYSE170 : 4.98 μM で、細胞株間での有意差は認められず、いずれの細胞株に対しても有効な治療効果を示した。また、光線力学的療法においては活性酸素種である一重項酸素が発生することで腫瘍細胞に対し細胞障害性を発揮するが、本実験系においてもその一重項酸素の発生を確認し得たと共にその発生の局在がポルフィゾームの局在と一致することも同時に確認し得た。また各細胞株ともに、Control 群に対しポルフィゾーム + 光照射を行った群においてのみアポトーシスが誘導されていることを、Hoechst 染色において蛍光が増強したこと、すなわちクロマチン凝縮が観察できたことにより確認し得た。以上のようにポルフィゾームを用いた光線力学的療法は食道癌細胞株に対して非常に有効であり、新たな食道癌の治療方法として期待できると考えられた。今後、in vivo や、ベルテポルフィンでの検証を行っていく方針である。

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
---------	---------