

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08391

研究課題名(和文) 癌微小環境における免疫病態関連細胞を標的とした新規光線力学療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel photodynamic therapy targeting immunopathology-related cells in the cancer microenvironment

研究代表者

片岡 洋望 (Kataoka, Hiromi)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授

研究者番号：40381785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：M2様腫瘍関連マクロファージ(M2-TAM)や、がん細胞に高発現するマンノース受容体を標的とした光感受性薬剤、マンノース結合-クロリンe6(M-chlorin e6)を合成し、PDT効果を検討したところ、がん細胞表面のcalreticulinの発現を増強し、TAMの貪食能を増強した。PDTと抗PD-1抗体の併用は、非照射側腫瘍のがん微小環境へのCD8陽性T細胞の浸潤、granzymeBの発現を増強し抗腫瘍効果を増強した。PDTはDAMPsの活性化により癌免疫を誘導し、癌免疫療法を増強する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小環境中のM2様腫瘍関連マクロファージを標的としたPDTは、がん細胞のみを標的とした従来のPDTよりも強力で、がん微小環境でのM2-TAMの役割が別の角度から明らかにされた。さらに、PDTがDAMPsの誘導を介して抗癌免疫を活性化する事が明らかとなった。現在、PDTと免疫チェックポイント阻害剤(抗PD1抗体)の併用療法の医師主導治験がわが国で開始されようとしているが、その基礎的なデータとして意義深い結果となった。今後は、単なる低侵襲ながんの局所治療としてのPDTという概念のみではなく、免疫原性細胞死誘導を介した抗癌免疫誘導効果を応用したさまざまながん医療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a photosensitizer, mannose-conjugated-chlorin e6 (M-chlorin e6), which targets mannose receptors highly expressed on M2-like tumor-associated macrophages (M2-TAMs) and cancer cells, and examined its PDT effect. PDT combined with anti-PD-1 antibody enhanced the anti-tumor effect by enhancing the infiltration of CD8-positive T cells into the cancer microenvironment and the expression of granzyme B in non-irradiated tumors. PDT induces cancer immunity by activating DAMPs and may enhance cancer immunotherapy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：光線力学療法 癌微小環境 腫瘍関連マクロファージ 免疫チェックポイント阻害剤 癌免疫

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎える本邦において、癌の低侵襲性治療である光線力学療法（PDT）が注目されている。PDTは光感受性物質を投与し、癌組織に集積後、特定波長の光線を照射し、光化学反応により一重項酸素などの活性酸素種の惹起により癌細胞を破壊する治療法で、周囲の正常組織に対するダメージが少ない低侵襲な癌治療法である。副作用も少なくかつ安価で、癌種を選ばず幅広い癌に有効である。現在、本邦では第1世代のPorfimer sodiumが食道癌、胃癌、肺癌、子宮頸癌に、第2世代のTalaporfin sodium（TS）が肺癌、脳腫瘍、化学放射線療法後再発食道癌に保険適用となっている。再発食道癌に対するTS-PDTの問題点としてTSの腫瘍集積性、選択性、抗腫瘍効果の弱さがあげられる。

光感受性薬剤のがん細胞選択的集積を目的として様々な戦略が試みられているが、われわれは究極の生体適合性分子である「糖、グルコース」を光感受性物質のクロリンに連結した薬剤の開発を行ってきた。グルコースを連結したクロリン（Gクロリン）やクロリンe6を使用したPDTは、癌細胞への優れた選択性、特異性を可能にした癌細胞標的感光医薬で、TS-PDTに比べて優れた抗腫瘍効果を発揮した。

癌組織間質に存在する腫瘍関連マクロファージ（Tumor associated macrophage: TAM）は、癌細胞の増殖、浸潤、転移、腫瘍血管新生の促進、制御性T細胞（Treg）の誘導による腫瘍免疫抑制などに重要な役割を果たしている。TAM表面のマノース受容体に注目し、これまでの糖鎖工学技術を応用しマノース連結クロリン（Mクロリン）の合成に成功した。MクロリンPDTは癌細胞自身とTAMに優れた殺細胞効果を示し、マウス皮下腫瘍移植モデルでは、GクロリンPDTよりも優れた抗腫瘍効果を示した。

さらに最近の研究によるとPDTは、活性酸素惹起による直接的な癌細胞障害のみではなく、calreticulin, high-mobility group box 1（HMGB1）などのdamage-associated molecular patterns（DAMPs）を介した免疫原性細胞死の惹起による樹状細胞の活性化を介した抗癌免疫の活性化が重要な役割を果たしていることが、明らかになりつつある。

2. 研究の目的

本研究では、Mクロリン連結クロリンe6を用いたPDTのDAMPs誘導能、TAMの貪食能に対する効果を検討し、癌微小環境でのTAMの意義について検討する。さらに、現在保険承認されているtalaporfin sodiumを用いたPDTによるDAMPs誘導能の検討を行い、がん免疫誘導の可能性を検討する。さらにはPDTと免疫チェックポイント阻害剤（抗PD-1抗体）との併用効果を検討する。具体的には、光線照射側のみではなく、光線非照射側腫瘍に対する縮小効果、CD4、CD8陽性T細胞の浸潤促進能力の検討、パーフォリン、グランザイムBなどのT細胞から腫瘍への攻撃分子の検討を行い、PDTの非光線照射側腫瘍に対する腫瘍縮小効果（apscopal効果）を多方面から検討する。

以上の検討から、PDTの抗癌免疫増強効果、そのメカニズムを明らかにし、臨床試験に向けての基礎的エビデンスを確立する。

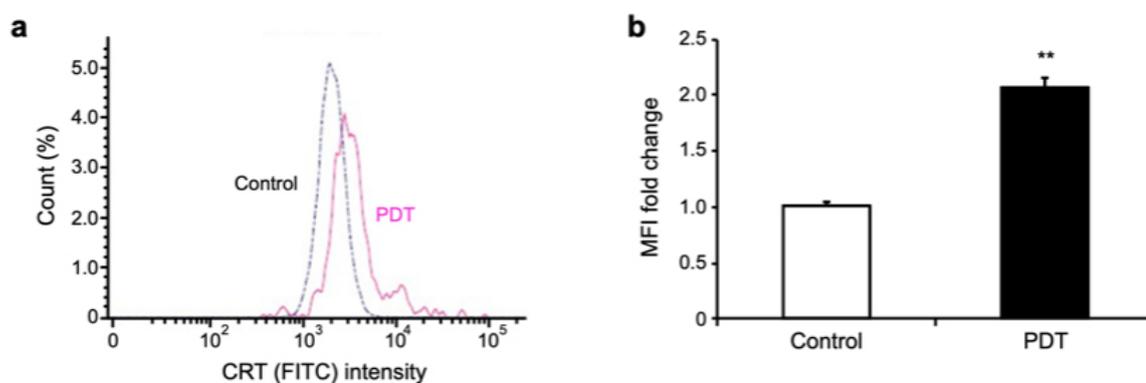
3. 研究の方法

- 1) 腫瘍微小環境中の TAM を標的とし、TAM の細胞表面に発現するマンノース受容体に注目し、今回はさらに抗腫瘍効果が高いと推測されるクロリン e6 にマンノースを連結したマンノース連結クロリン e6 (M-クロリン e6) を合成し、これを用いた PDT による Calreticulin(CRT) の誘導、マクロファージの貪食能への効果につき検討する。具体的には、マウスのマクロファージである RAW264.7 細胞とマウス大腸癌細胞株 CT26 を共培養し、M-クロリン e6 を用いた PDT を行い、RAW264.7 細胞による貪食能を *in vitro* で検討する。
- 2) 保険承認薬の talaporfin sodium により PDT を MC38 マウス大腸癌細胞に対して *in vitro* で施行し、ATP, HMGB1 などの DAMPs の腫瘍細胞からの放出を ELISA にて検討する。C57BL/6 (6-8 週齢) マウスの背側皮下両側に MC38 細胞を皮下移植した syngeneic mouse モデルを作成し、PDT と抗 PD-1 抗体の併用効果を、光線照射側腫瘍、非照射側腫瘍で検討する。

4. 研究成果

- 1) M クロリン連結クロリン e6 による PDT により、DAMPs の一つである Calreticulin(CRT) の発現が増加した。図 1 a は、PDT1 時間後の細胞表面の CRT 発現を flow cytometry での検討結果。図 1b は、CRT の relative mean fluorescence intensity (MFI)。

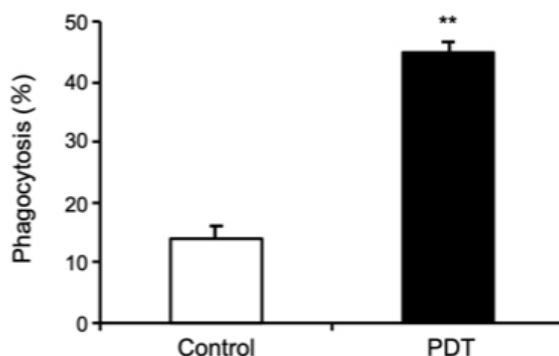
図 1



** : $p < 0.01$

- 2) RAW264.7 細胞と CT26 の共培養系に対する PDT 後の共焦点レーザー顕微鏡による検討により、PDT はマクロファージの貪食能を亢進した (図 2)。

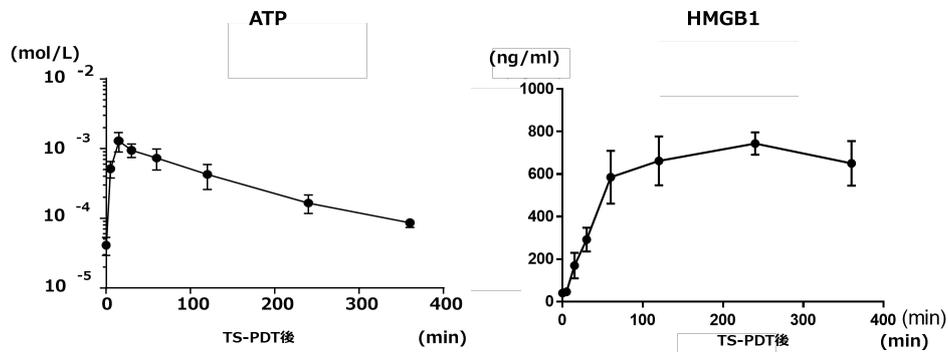
図 2



** : $p < 0.01$

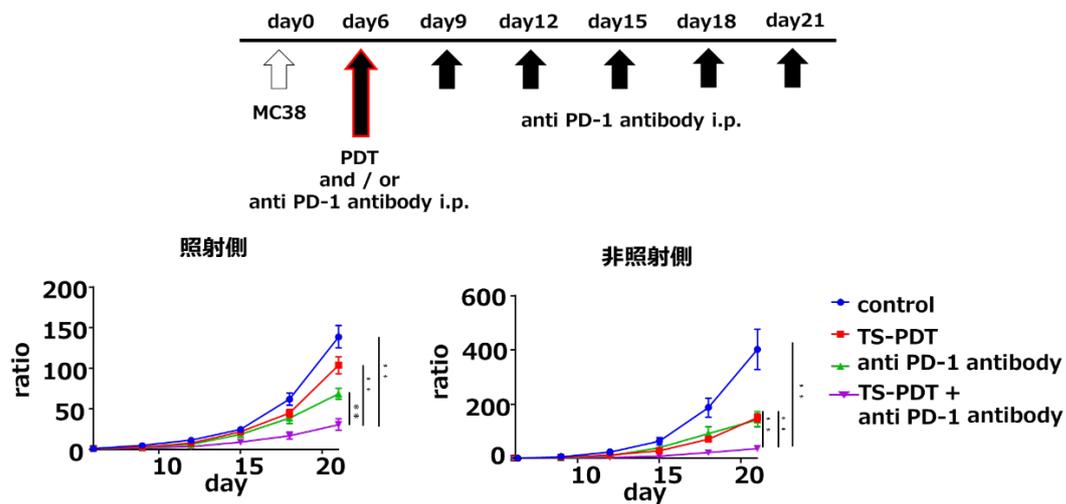
3) MC38 細胞に対して talaporfin を用いた PDT を施行し、DAMPs である ATP, HMGB1 の細胞からの放出を検討した。細胞外の ATP, HMGB1 の濃度は ELISA にて測定した (図 3)。

図 3



4) C57BL/6 (6-8 週齢) マウスの背側皮下両側に MC38 細胞を皮下移植した syngeneic mouse モデルを作成し、尾静脈から talaporfin sodium を静脈注射し、PDT を施行した。また、抗 PD-1 抗体薬を併用し、PDT への併用効果を検討した。TS-PDT と PD-1 抗体の併用は、光線照射側のみならず光線非照射側の腫瘍に対しても、併用による強力な腫瘍縮小効果を発揮した (図 4)。

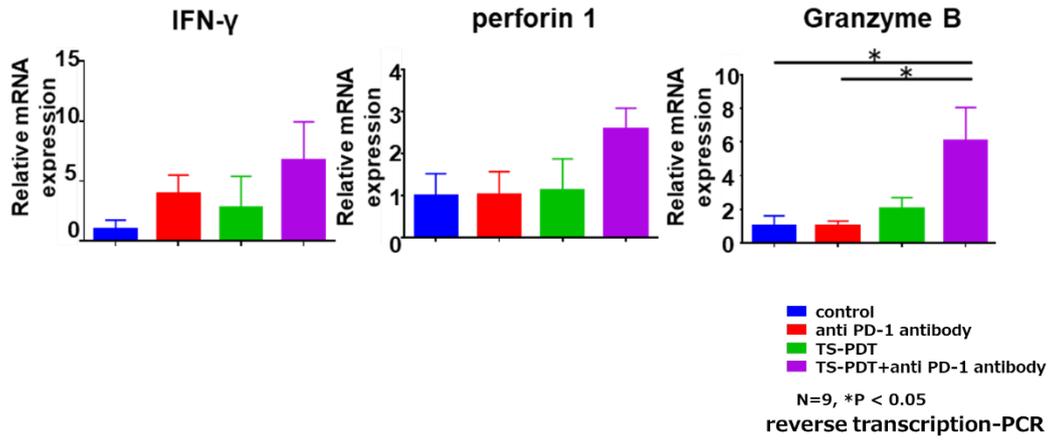
図 4



5) syngeneic mouse モデルの腫瘍組織の検討により、PDT と抗 PD-1 抗体の併用によって、光線照射側のみならず非光線照射側の腫瘍組織内にも CD4, CD8 陽性 T 細胞の浸潤が促進され、抗腫瘍効果を発揮する GranzymeB などの細胞傷害性分子が有意に併用群で誘導されていた (図 5)。

☒ 5

非照射側腫瘍



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sasaki M, Tanaka M, Ichikawa H, Suzuki T, Nishie H, Ozeki K, Shimura T, Kubota E, Tanida S, Kataoka H.	4. 巻 16 (4)
2. 論文標題 5-aminolaevulinic acid (5-ALA) accumulates in GIST-T1 cells and photodynamic diagnosis using 5-ALA identifies gastrointestinal stromal tumors (GISTs) in xenograft tumor models	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0249650
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0249650. eCollection 2021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Soyama T, Sakuragi A, Oishi D, Kimura Y, Aoki H, Nomoto A, Yano S, Nishie H, Kataoka H, Aoyama M.	4. 巻 14(2)
2. 論文標題 Photodynamic therapy exploiting the anti-tumor activity of mannose-conjugated chlorin e6 reduced M2-like tumor-associated macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transl Oncol .	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.101005.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka H, Nishie H, Tanaka M, Sasaki M, Nomoto A, Osaki T, Okamoto Y, Yano S.	4. 巻 18;10(4):841
2. 論文標題 Potential of Photodynamic Therapy Based on Sugar-Conjugated Photosensitizers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Med.	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm10040841.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka M, Sasaki M, Suzuki T, Nishie H, Kataoka H.	4. 巻 5:539
2. 論文標題 Combination of talaporfin photodynamic therapy and Poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) inhibitor in gastric cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.12.073.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki T, Tanaka M, Sasaki M, Ichikawa H, Nishie H, Kataoka H.	4. 巻 12(9):2369
2. 論文標題 Vascular Shutdown by Photodynamic Therapy Using Talaporfin Sodium.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12092369.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narumi A, Rachi R, Yamazaki H, Kawaguchi S, Kikuchi M, Konno H, Osaki T, Okamoto Y, Shen X, Kakuchi T, Kataoka H, Nomoto A, Yoshimura T, Yano S.	4. 巻 8;6(10)
2. 論文標題 Maltotriose-Chlorin e6 Conjugate Linked via Tetraethyleneglycol as an Advanced Photosensitizer for Photodynamic Therapy. Synthesis and Antitumor Activities against Canine and Mouse Mammary Carcinoma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Omega .	6. 最初と最後の頁 7023-7033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c06316.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sasaki M, Tanaka M, Kojima Y, Nishie H, Shimura T, Kubota E, Kataoka H.	4. 巻 28
2. 論文標題 Anti-tumor immunity enhancement by photodynamic therapy with talaporfin sodium and antiprogrammed death 1 antibody	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics	6. 最初と最後の頁 118-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.12.009.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kimura Y, Aoki H, Soyama T, Sakuragi A, Otsuka Y, Nomoto A, Yano S, Nishie H, Kataoka H, Aoyama M.	4. 巻 39
2. 論文標題 Photodynamic therapy using mannose-conjugated chlorin e6 increases cell surface calreticulin in cancer cells and promotes macrophage phagocytosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-022-01674-3	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kataoka H, Nishie H, Tanaka M, Nomoto A, Yano S, Osaki T, Okamoto Y.
2. 発表標題 Excellent antitumor effects of photodynamic therapy with a novel glucose conjugated chlorin e6.
3. 学会等名 PACIFICHEM 2021. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槿子, 田中 守, 志村貴也, 久保田英嗣, 片岡洋望
2. 発表標題 S3-4 光線力学療法による免疫原性細胞死誘導メカニズムの解明と癌免疫療法への応用.
3. 学会等名 第32回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大崎智弘, 野元昭宏, 矢野重信, 田中 守, 片岡洋望, 岡本芳晴
2. 発表標題 S7-3 獣医療における新規グルコース連結クロリンを用いたPDT.
3. 学会等名 第31回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槿子, 田中 守, 小島悠輝, 西江裕忠, 片岡洋望
2. 発表標題 光線力学療法による免疫原性細胞死誘導および抗PD-1抗体との治療相乗効果の検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槇子, 田中 守, 片岡洋望
2. 発表標題 WS10-6. Talaporfin sodiumを用いた光線力学的療法と抗PD-L1抗体による治療相乗効果の検討
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木槇子, 田中 守, 片岡洋望.
2. 発表標題 当院における食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するタラポルフィンナトリウムを用いた光線力学的療法の成績
3. 学会等名 第63回日本消化器内視鏡学会東海支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木槇子, 田中 守, 西江裕忠, 片岡洋望.
2. 発表標題 Talaporfin sodiumを用いた光線力学療法と抗PD-L1抗体による治療相乗効果の検討
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会総会 (LASER WEEK IN KOCHI)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋望, 田中 守, 西江裕忠, 佐々木槇子, 大崎智弘, 岡本芳晴, 野元明宏, 矢野重信.
2. 発表標題 消化器病変のレーザー内視鏡診断と治療. S9-3 糖連結光感受性薬剤を用いた光線力学療法の前臨床試験
3. 学会等名 第41回日本レーザー医学会総会 (LASER WEEK IN KOCHI)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋望
2. 発表標題 教育講演 3. 光線力学療法 of 現状と近未来.
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋望
2. 発表標題 教育講演 ポストピロリ時代の上部消化管疾患の診断と治療.
3. 学会等名 日本消化器病学会東海支部例会第132回例会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 片岡洋望, 佐々木槇子, 田中 守
2. 発表標題 PD-1光線力学療法による癌免疫増強効果. パネルディスカッション PDTは遠隔転移を抑制するか?
3. 学会等名 第43回日本レーザー医学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木槇子, 田中 守, 小島悠揮, 西江裕忠, 片岡洋望
2. 発表標題 タラポルフィンナトリウムを用いた光線力学療法による癌免疫誘導の解析と免疫チェックポイント阻害剤併用による相乗効果の検討
3. 学会等名 第32回日本光線力学学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木槇子, 田中 守, 片岡洋望
2. 発表標題 光線力学療法による癌免疫誘導と免疫チェックポイント阻害薬併用による相乗効果
3. 学会等名 第19回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2022年～2023年

1. 発表者名 Sasaki M, Tanaka M, Kojima Y, Nishie H, Shimura T, Kubota E, Kataoka H.
2. 発表標題 Potentiality and future prospects of photodynamic therapy as cancer immunity therapy
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 グリコシル化クロリンe6誘導体, または, その薬学的に許容される塩, 医薬組成物, 標的を破壊する方法, および, グリコシル化クロリンe6誘導体, またはその薬学的に許容される塩の製造方法.	発明者 矢野重信, 片岡洋望, 西江裕忠, 城卓志, 福本圭介, 仲	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、第7003057号	取得年 2022年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	矢野 重信 (Yano Shigenobu) (60011186)	奈良女子大学・大和・紀伊半島学研究所・協力研究員 (14602)	
研究分担者	野元 昭宏 (Nomoto Akihiro) (60405347)	大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授 (24403)	

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