

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590923

研究課題名(和文)胃癌，GISTに対する糖鎖連結クロリンを用いた新規光線力学的治療法の開発

研究課題名(英文)Development of novel PDT with glucose-conjugated chlorin for gastric cancer and GIST

研究代表者

片岡 洋望 (Kataoka, Hiromi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40381785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Photodynamic therapy (PDT)は光感受性物質を静脈注射し，選択的に集積した腫瘍に特定波長の光線を照射し，活性酸素の惹起により腫瘍を破壊する治療方法である．今回，GIST細胞がグルコースを特異的に取り込む事象を応用し，グルコースを光感受性物質クロリンに連結したグルコース連結クロリン(G-クロリン)による新規PDTにつき検討した．グルコース受容体GLUT1，GLUT3，GLUT4は繊維芽細胞(WI-38)よりGISTで発現が高く，G-クロリンの取り込み，アポトーシス誘導能も高かった．Xenograftによる検討でも，有意にG-クロリンPDTは腫瘍増殖を抑制した．

研究成果の概要(英文)：Except for surgical resection, no effective treatment strategies have been established for gastrointestinal stromal tumors (GISTs). Photodynamic therapy (PDT) consists of intravenous administration of a photosensitizer, activated by a specific wavelength of light, which produces reactive oxygen species that directly kill tumor cells. We analyzed the efficacy of PDT using a newly developed photosensitizer, glucose-conjugated chlorin (G-chlorin) for the GIST treatment. In vitro, the expression of the glucose transporters GLUT1, GLUT3, and GLUT4, the cellular uptake of G-chlorin, and apoptosis mediated by PDT with G-chlorin were significantly higher in GIST-T1 than in WI-38 cells. In vivo, G-chlorin accumulation was higher in xenograft tumors of GIST-T1 cells than in the adjacent normal tissue, and tumor growth was significantly suppressed following PDT.

研究分野：消化器内科学

科研費の分科・細目：上部消化管

キーワード：PDT 胃癌 GIST

## 1. 研究開始当初の背景

消化管間質腫瘍 (GIST) は、消化管で最も頻度の高い間葉系腫瘍である。

GISTで直径2cm以上のものは一般的には外科的に切除されるが、直径2cm未満のものは、経過観察される。特に小さなGISTに対する有効で安全な治療法の開発が望まれる。

光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) は、従来の癌治療に勝るいくつかの利点がある。PDTとは、光感受性物質を担癌患者さんに静脈投与し、癌細胞に選択的、特異的に集積した時点で、特定波長の光線を照射し活性酸素種 (ROS) を惹起させ、癌細胞を死滅させる治療法である。活性酸素が腫瘍部位のみで惹起されるため、PDTは比較的非侵襲的な癌治療法である。

この研究において、我々はグルコース4分子を光感受性物質クロリンに連結したグルコース連結クロリン (G-クロリン) を開発した。

癌、GISTなどの腫瘍細胞は、正常細胞と比較し、グルコースを細胞内に大量に取り込む事象が Warburg 効果として知られているが、この事象は今日、癌の高感度診断法であるポジトロンエミッショントモグラフィ (PET-CT) で広く臨床応用されている。PET-CTでGISTは癌と同様に、強陽性になることから、我々は、G-クロリンによる新規PDTが、GIST治療に有用ではないかと考え、本研究を開始した。

我々の先行研究において、G-クロリンが一重項酸素を経てプログラム細胞死 (アポトーシス) を誘発することが可能で、現在我が国で第2世代のPDT薬剤として知られているタラポルフィンの約30倍-50倍の細胞毒性を発揮することを報告してきた。

## 2. 研究の目的

G-クロリンを用いた新規PDTによるGISTに対する殺細胞効果、およびその詳細なメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) G-クロリンの合成

クロリン、G-クロリンは、京都大学と岡山理科大学の研究室において合成され提供された。

GIST-T1細胞株は、樹立者の田口博士より供与された。GIST細胞に類似した紡錘形細胞である正常細胞としてWI-38細胞 (ヒト胎生期繊維芽細胞) を用いた。

### (2) グルコーストランスポーターの発現

抗 GLUT1、抗 GLUT3、抗 GLUT4 (サンタクルス Biotechnology 社 CA.) 抗体を用いてウエス

タンブロット法を施行し、各蛋白発現を検出した。内部標準としてアクチン抗体 (Abcam) を用いた。

mRNAの発現はリアルタイム逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) で、GLUT1、GLUT3、GLUT4のmRNA発現を半定量した。内部標準としてGADPHを用いた。

用いたPCRプライマーを以下に示す

GLUT1(Hs00892681\_m1)

GLUT3(Hs00359840\_m1)

GLUT4(Hs00168966\_m1)

GADPH(Hs99999905\_m1)

TaqMan Gene Expression Assays

ABI 7500 Fast Real-Time PCR システム (アプライドバイオシステム)

### (3) グルコース、クロリン、G-クロリンの細胞内への取り込み

単一生細胞へのD-グルコース取り込みをモニターするための広く使われている蛍光トレーサーである2-(N-[7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl]アミノ)-2-デオキシ-D-グルコース (2-NBDG) (ペプチド研究所、日本国大阪) を用いて、グルコースの取り込みの指標とした。2-NBDG、クロリン、G-クロリン投与後0、15、30、60、120または240分後に細胞を回収し、FACSCalibur フロー・サイトメーター (BD Biosciences、米国ニュージャージー州) を用いて細胞内への取り込みを測定した。

### (4) アポトーシスアッセイ

FITC 標識カスパーゼ-3抗体 (BD Biosciences) を用いてカスパーゼ3の発現をFACSCanto II Analyzer (BD Biosciences) を使用して解析した。

### (5) 共焦点レーザー顕微鏡を用いた薬剤の細胞内局在の検討

薬剤の細胞内局在の検討は、クロリン (1M)、G-クロリン (1M) を4時間細胞と反応させ、細胞内小器官 (ミトコンドリア、ゴルジ体、ER、リソソーム) に特異的な蛍光プローブ (インビトロゲン) を用いて共焦点レーザー顕微鏡 (ニコン A1 コンフォーカル・システム; ニコン Instech 社) で観察した。データはNIS要素画像診断ソフトウェア (ニコン) を使用して分析した。505-530 ナノメートルと650 ナノメートルの帯域通過放出フィルタを使用した。

### (6) *in vitro* PDT 殺細胞効果の検討

培養GIST-T1、WI-38細胞を、クロリン、G-クロリンで4時間刺激後、660 ナノメートルの赤色可視光線をLED照射し (OptoCode 社)、照射後24時間後に細胞生存率をWST-8細胞増殖解析 (Dojindo、日本国熊本県) によって測定された。

(7) in vivo PDT 殺細胞効果の検討

ヌードマウス (BALB/c Slc-nu/nu) (生後 6-8 週間目, 雌, 体重: 20-25g) (日本 SLC: 京都) を用いて異種移植腫瘍モデルを作成した。5 × 10<sup>6</sup> の GIST-T1 細胞を 200 μL マウス背部皮下移植し作成した。動物実験に関しては事前に実験計画書を名古屋市立大学実験動物教育センターに提出し許可を得て, 名古屋市立大学のガイドラインに従って施行した。マウスに尾静脈より 1.25 μmol/kg の用量で, クロリン, G-クロリンを尾静脈注射し投与した。

注射の 4 時間後に, 腫瘍部に 40J/cm<sup>2</sup> の 660 ナノメートルの LED 照射 (OptoCode 社) を施行した (照射強度: 49mW/cm<sup>2</sup>)。照射は腫瘍接種の後 10, 17, 24 と 31 日に, 合計 4 回施行した。

腫瘍成長はノギスで腫瘍容積を計量することによってモニターした。

(8) G-クロリンの腫瘍内取り込み

分光吸光度装置 VLD-M1 分光計 (M&M 社, 東京) を使用し, 405 ± 1 ナノメートルのピーク波長を腫瘍部および周辺の正常皮膚に照射し, 励起波長を測定し, クロリン, G-クロリンの集積を分光計とそのアクセサソフト (BW-仕様 V3.24; B&W TEK 社 (米国) で解析した。

統計解析は統計パッケージ R (バージョン 2.4.1 (www.r-project.org/)) を使用して行った。

すべての解析において P 値 < 0.05 を統計的に有意と判断した。

4. 研究成果

(1) GIST-T1 細胞における c-KIT 発現

GIST 診断に用いられる c-KIT 発現につき検討した。図 1 に示すごとく, c-KIT は GIST 細胞にのみ強発現していたが, WI38 細胞には発現していなかった。

図 1



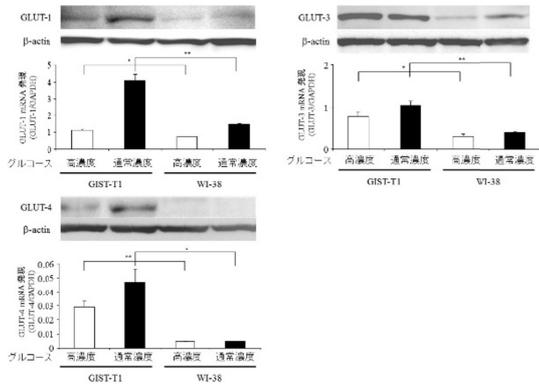
(2) GLUT1, GLUT3, GLUT4 発現は細胞外グルコース濃度の上昇により抑制される

ウエスタンブロットと RT-PCR を用いて

GIST-T1 細胞と WI-38 細胞における, GLUT1, GLUT3, GLUT4 の発現を検討した。高グルコース培養液での培養において GLUT1, GLUT3, GLUT4 の発現はタンパクレベル, mRNA レベルともに GIST-T1 と WI-38 細胞において抑制された。

GIST-T1 細胞は, WI-38 細胞に比べて, 有意に高い GLUT1, GLUT3, GLUT4 の発現を呈した (図 2)。

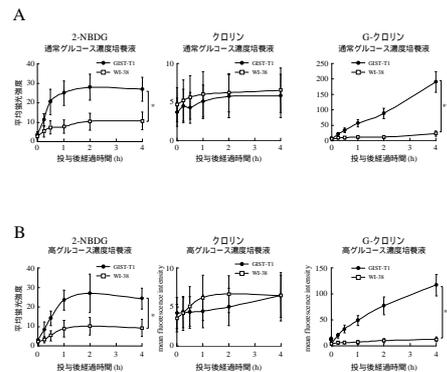
図 2



(3) GIST-T1 細胞は WI38 細胞に比し, 有意に多くのグルコース, G-クロリンを細胞内に取り込む

図 3A: 通常のグルコース濃度培養液条件下, 図 3B: 高グルコース濃度培養条件下で示すように, 2-NBDG と G-クロリンの細胞内への取り込みは, GIST-T1 細胞の方が, WI-38 細胞よりも有意に高かった。一方, クロリンの取

図 3



り込みの明らかな差は, GIST-T1 と WI-38 細胞の間にはなかった。

これらの結果は, クロリンにグルコースを連結することが, GIST 細胞への特異性と選択性をもたらしていることを示した。

我々は GIST-T1 細胞をグルコース (-) の培養液中での培養を試みたが, GIST-T1 細胞は 1 週間以上の培養は不可能であった。

(4) G-クロリンは細胞内のミトコンドリアと小胞体に主に取り込まれる

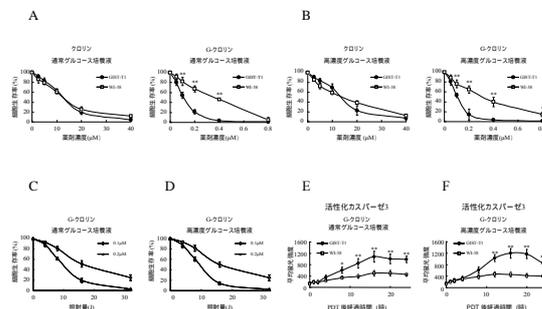
前述のごとく, ミトコンドリア, リソソーム, ゴルジ体または小胞体にラベルをつけるために, MitoTracker グリーン, LysoTracker

グリーン, NBD C6-セラミド・グリーン, ER-Tracker グリーンを使用した。共焦点レーザー顕微鏡観察で, G-クロリンは MitoTracker と ER-Tracker と共存した。細胞内では主にミトコンドリアと小胞体に局在することが明らかとなった。

(5) G-クロリンによる PDT はクロリン PDT に比べ, 強力なアポトーシスを誘導し GIST 細胞の細胞死を誘導する

図 4A, 4B に示すごとく, 通常グルコース培養液中においても, 高グルコース培養液中においても, G-クロリンはクロリンに比して, 強力な GIST 殺細胞効果を示した。照射量を変化させても同様な殺細胞効果が認められた (図 4C, D)。活性化カスパーゼ産生量を検討すると, 培養液中のグルコース濃度に関係なく, G-クロリンは GIST 細胞にカスパーゼ 3 の活性化を誘導し, 細胞死を誘導した (図 4E, F)。

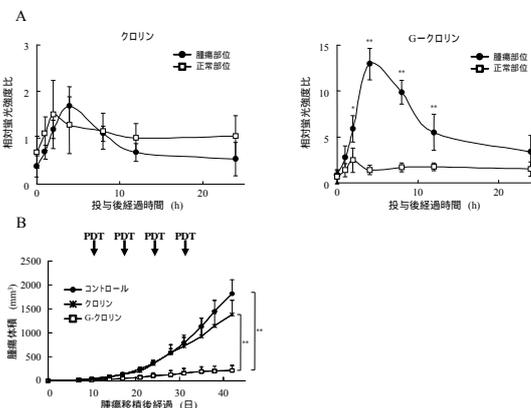
図 4



(6) 移植腫瘍モデルにおいても G-クロリンは腫瘍細胞に集積する

GIST-T1 皮下移植マウスの尾静脈より G-クロリン, クロリンを投与し, VLD-M1 分光光度計によって腫瘍部, 腫瘍周辺の正常組織部位での薬剤の集積を半定量した。図 5A に示すごとく, クロリンに比べて G-クロリンは移植腫瘍部位に投与後 4 - 8 時間後をピークに有意に多く集積した。

図 5



(7) GIST 移植腫瘍モデルにおいても G-クロリン PDT は強力な殺細胞効果を発揮する

ヌードマウス皮下移植モデルに対して, マウスの尾静脈からクロリンまたは G-クロリン

を 1.25 μ モル/kg の用量で投与し, 4 時間後に 40J/cm<sup>2</sup> で 660 ナノメートルの赤色可視光線 LED を照射した。PDT 照射は 7 日毎に 4 サイクル繰り返した

図 5B に示すごとく G-クロリン PDT は有意に腫瘍増殖を抑制した (P < 0.01)。PDT による明らかな副作用 (例えば下痢および/または重量減少 (示されないデータ)) は認められなかった。

本研究において, G-クロリンが GIST-T1 細胞の GLUT1, 3, 4 などの受容体を介して細胞内に特異的に取り込まれ, 赤色可視光線 (660nm) の照射によって高効率にアポトーシスを誘導し, 細胞死を誘導することを明らかにした。今後, 高齢化社会が訪れる本邦において, 外科的治療以外に有効な治療法のない GIST に対する, 低侵襲で有効な新規治療法として臨床応用が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 7 件)

Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Ohi H, Moriwaki K, Akashi H, Taguchi T, Hayashi N, Hamano S, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Joh T. Antitumor effects in gastrointestinal stromal tumors using photodynamic therapy with a novel glucose-conjugated chlorin. *Mol Cancer Ther.* 2014, 767-75, doi: 10.1158/1535-7163. 査読有。

Tanaka M, Kataoka H, Yano S, Ohi H, Kawamoto K, Shibahara T, Mizoshita T, Mori Y, Tanida S, Kamiya T, Joh T. Anti-cancer effects of newly developed chemotherapeutic agent, glycoconjugated palladium (II) complex, against cisplatin-resistant gastric cancer cells. *BMC Cancer*, May 14;13:237, 2014, 41-47, doi: 10.1186/1471-2407-13-237. 査読有。

Ebi M, Shimura T, Nishiwaki H, Tanaka M, Tsukamoto H, Ozeki K, Sawada T, Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida S, Kataoka H, Joh T. Management of systolic blood pressure after endoscopic submucosal dissection is crucial for prevention of postgastric bleeding. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 26(5), 2014, 504-9, doi: 10.1097/MEG.000000000000072. 査読有。

Tanaka M, Kataoka H, Joh T. Neurofibroma of the Esophagus Complicating Von Recklinghausen's Neurofibromatosis. *Am J Gastroenterology* 108(12), 2013, 1935-6,

doi: 10.1038/ajg.2013.297. 査読有 .  
Kataoka H, Mizuno K, Hayashi N,  
Tanaka M, Nishiwaki H, Ebi M,  
Mizoshita T, Mori Y, Kubota E, Tanida  
S, Kamiya T, Joh T. Diagnostic utility  
of small-caliber and conventional  
endoscopes for gastric cancer and  
analysis of endoscopic false-negative  
gastric cancers. World J Gastrointest  
Endosc. 16;5(9), 2013, 440-5, doi:  
10.4253/wjge.v5.i9.440. 査読有 .  
片岡洋望 . 消化器癌に対する光線力学療  
法の現状と展望 . 明日の臨床 . Vol. 25,  
(1), 41-47, 2013 年 . 査読なし .  
片岡洋望, 林 則之, 田中 守, 矢野重  
信, 城 卓志 . 糖鎖連結光感受性物質を  
用いた新規光線力学治療法 , 診断法の開  
発 . 日本レーザー医学会誌 . 113-7, 第  
34 巻第 2 号 , 2013 年 . 査読有 .

[学会発表](計 6 件)

林 則之, 片岡洋望, 田中 守, 矢野重  
信, 城 卓志 . 間質腫瘍関連マクロファ  
ージを標的とした新規光線力学的治療の  
検討 . 第 10 回日本消化管学会総会学術集  
会 . 2014.2.14-2.15, 福島 .  
林則之, 片岡洋望, 田中 守, 林 香月,  
矢野重信, 城 卓志 . 癌間質腫瘍関連マ  
クロファージを標的とした新規光線力学  
的治療の基礎的検討 . 第 34 回日本レー  
ザー医学会総会 . 2013.11.9-11.10, 東京 .  
M. Tanaka, H. Kataoka, S. Yano, T. Joh.  
ANTITUMOR EFFECTS OF NOVEL  
PHOTODYNAMIC THERAPY WITH GLUCOSE  
CONJUGATED CHLORIN FOR GIST. 21st  
United European Gastroenterology Week.  
2013.10.12-16, Berlin, Germany.  
田中 守, 片岡洋望, 濱野真吾, 海老正  
秀, 溝下 勤, 森 義徳, 久保田英嗣,  
矢野重信, 城 卓志 . 糖鎖連結クロリン  
による新規光線力学的治療の腫瘍免疫増  
強効果 . 第 7 2 回日本癌学会学術総会 .  
2013.10.3-10.5, 横浜 .  
田中 守, 片岡洋望, 濱野 真吾, 溝下  
勤, 森 義徳, 久保田英嗣, 城 卓志 .  
GIST に対する糖鎖結光感受性物質を用い  
た新規光線力学的治療効果の基礎的検討 .  
第 24 回日本消化器癌発生学会 .  
2013.9.5-9.6, 金沢 .  
Kataoka H, Tanaka M, Yano S, Kubota  
E, Joh T. New photodynamic therapy  
using glucose conjugated chlorin for  
gastrointestinal cancer. 10th  
INTERNATIONAL GASTRIC CANCER CONGRESS.  
2013.6.19-6.22, Verona, Italy.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称 : 光線力学療法のための新規糖鎖連結  
光感受性物質  
発明者 : 光線力学療法のための新規糖鎖連  
結光感受性物質  
権利者 : 名古屋市立大学  
種類 : 特願 2013-161518  
番号 : 特願 2013-161518  
出願年月日 : 2013 年 8 月 2 日  
国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 洋望 (KATAOKA Hiromi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教  
授  
研究者番号 : 40381785

(2) 研究分担者

矢野 重信 (YANO Shigenobu)  
奈良先端科学技術大学院大学・物質創成科  
学研究科・教授  
研究者番号 : 60011186

城 卓志 (JOH Takashi)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号 : 30231369

田中 守 (TANAKA Mamoru)  
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 : 80617861

鈴木 周五 (SUZUKI Shuugo)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員  
研究者番号 : 60363933