

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461045

研究課題名(和文)臨床実用を目指した癌幹細胞標的光線力学的療法の基礎研究

研究課題名(英文)Molecular basis for clinical cancer stem cell targeted photodynamic therapy

研究代表者

磯本 一 (Isomoto, Hajime)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90322304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：タラポルフィンナトリウムによる光線力学的治療：PDTの対象となり得る化学放射線療法後の再発性食道癌を想定して、癌幹細胞の性質を持つ扁平上皮細胞株を見つけだし、基礎実験を行った。CD44vの発現が高い幹細胞様性質を持つ癌においては、シスチントランスポーター；グルタチオンを標的とした治療法として、酸化ストレス抵抗性を標的とした癌幹細胞に対する治療戦略が基盤となり得る。この目的でスルファサラジンを追加してMTS Assay及びグルタチオン生合成活性を測定した。グルタチオン合成阻害剤を追加した場合、MTS Assayを行なったがPDTの効果の増強はほとんど認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We performed cellular experiments to explore molecular basis for squamous cell carcinoma stem cell based photodynamic therapy (PDT) using talaporphin sodium. The cells with higher levels of CD44 variant are to be targeted via cystine transporter-glutathione in which cells are to be resistant to oxidative stress. For this aim, we performed MTS and glutathione-generation assay in the setting of PDT under sulphasarazopirine (SASP) administration. The results showed SASP had nominal additional effects on PDT.

研究分野：消化器内科

キーワード：光線力学療法

1. 研究開始当初の背景

日本人の食道癌の組織型は 90%以上が扁平上皮癌であり、飲酒・喫煙が 2 大危険因子とされる。食道癌に対する根治治療の主体は外科手術であるが、化学放射線治療は臓器温存が可能な非外科的治療である。一方、食道癌の遺残または再発症例には確立された標準治療がなく、特に粘膜下層浸潤癌では光線力学的治療 (PhotoDynamic Therapy, PDT) が適応となる。PDT は腫瘍親和性光感受性物質とレーザー光によって引き起こされる光化学反応を利用して活性酸素を発生させ腫瘍組織を破壊する治療法である。光感受性物質タラポルフィン (レザフィリン) は遮光期間が 2 週程度ですみ、安価かつ携帯性もある小型の半導体レーザー装置で治療ができるメリットがある。食道癌化学放射線療法後の局所遺残再発例に対するレザフィリン・PDT レーザを用いた光線力学的療法の多施設共同臨床試験、我々も参画した。抗癌剤や放射線治療後に治療抵抗性を持つ癌幹細胞が生き残ることが再発の一因とされ、癌幹細胞を標的とした再発性食道癌療法の確立も望まれる。癌幹細胞ではグルタチオンによって抗酸化システムがあり治療抵抗性の要因となる。CD44 のスプライスバリエント (CD44v) が、シスチントランスポーター (xCT) を細胞表面に安定化してシスチン取り込みとグルタチオン合成を高めていることが明らかになった。

2. 研究の目的

再発性食道癌に対して、癌幹細胞を標的とした光線力学的治療 (Photodynamic therapy; PDT) を開発する。特に、化学 (放射線) 治療後局所に再発した食道表在癌を想定し、レザフィリンによる PDT と癌幹細胞特異的分子 (CD44variant) を標的とする薬剤との併用治療法を考案した。臨床試験へと展開するための研究基盤を確立するため、主に細胞株モデルにおける腫瘍制御効果と作用機序の解明を課題とする。

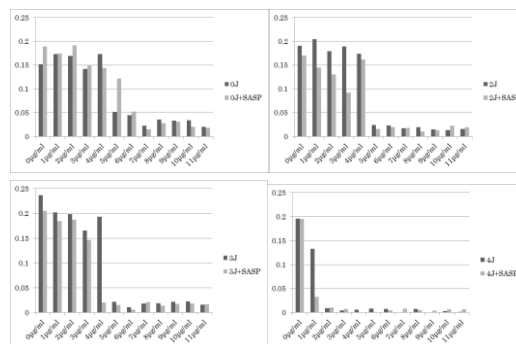
3. 研究の方法

扁平上皮癌細胞株の CD44v の発現性をスクリーニングし、CD44 低発現株、高発現株、及び CD44v 発現株を検出する。in vitro におけるレザフィリン-PDT の評価系を確立し、CD44 低発現株、高発現株、CD44v 発現株における治療効果を調べる。レザフィリン-PDT と CD44v~xCT~グルタチオンの発現を制御する薬剤 (スルファサラジン等) の併用効果による PDT 実験を行う。

4. 研究成果

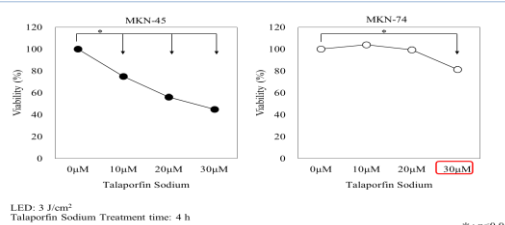
タラポルフィンナトリウムによる光線力学的治療: PDT の対象となり得る化学放射線療法後の再発性食道癌を想定して、癌幹細胞の性質を持つ扁平上皮細胞株を見つけだし、基礎実験を行った。既報より癌幹細胞の性質を示す扁平上皮細胞株として、OSC-19 に追加して HSC-2 及び HSC-4 を用いた。Western Blot で HSC-2 は CD44 variant を強く発現してい

たが、HSC-4 は発現を認めなかった。タラポルフィンナトリウム濃度は 0~10 μM の範囲で、レーザーは 0~5J の範囲で照射し、MTS Assay による細胞生存率を確認したところ、いずれの細胞においても効果が得られた。OSC-19 と同じく、癌幹細胞性質を持つと思われる HSC-2 及び HSC-4 細胞もタラポルフィンナトリウムによる PDT に感受性が高い可能性がある。CD44v の発現が高い幹細胞様性質を持つ癌においては、CD44v~シスチントランスポーター~グルタチオンを標的とした治療法として、酸化ストレス抵抗性を標的とした癌幹細胞に対する治療戦略が基盤となり得る。この目的で Pimozide を HSC-2 及び HSC-4 細胞に添加して MTS Assay を行ったが、PDT の効果を増強する効果は認められなかった。他の PDT 効果を増感させる薬剤としてグルタチオン合成阻害剤、及びスルファサラジン (SASP) の有効成分であるアミノサリチル酸を添加して MTS Assay 及びグルタチオン合成活性を測定した。グルタチオン合成阻害剤を添加した場合、MTS Assay を行なったが PDT の効果の増強はほとんど認められなかった。



このことより、グルタチオンに依存しない PDT 抵抗性機構の存在が予想された。また別の癌細胞株 MKN-45 及び MKN-74 細胞に対して MTS Assay を行なったところ、MKN-74 細胞において PDT 抵抗性が認められた。

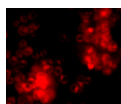
Effect of Talaporfin Sodium Concentration.



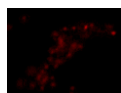
Real-time PCR 及び Western Blotting で、MKN-74 細胞の CD44v の発現が低いことが確認されたことから、CD44v~グルタチオンに依存しない PDT 抵抗性機構の存在が裏付けられた。過酸化水素に対する抵抗性は既報の通り CD44v 発現量に依存することが OSC-19、HSC-2 及び HSC-4 細胞を用いた MTS Assay で確認されており、この酸化ストレスに対する

応答性の違いはPDTで発生する活性酸素は一重項酸素であり、過酸化水素とは異なる活性酸素種であることに起因すると推測される。しかしタラポルフィンの濃度を10 μ Mから30 μ Mに上げることによって、またLED照射を3Jから6Jに上げることによって治療効果が認められた。またタラポルフィンの投与時間を4hから24hまで延長することによっても治療効果が認められた。この際、投与時間4hでのタラポルフィン取り込み量が少ないことが確認できた。

MKN45

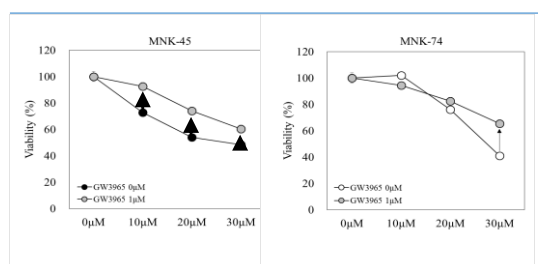
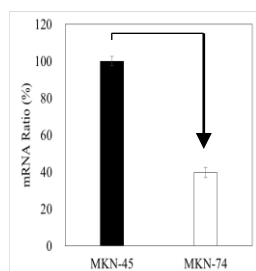
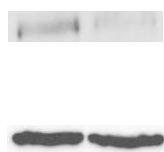


MKN74



さらに低比重リポタンパク質受容体 LDL-R の発現量をウェスタンブロットティング及び real-time PCR で確認したところ、いずれも LDL-R 低発現であった。さらに LDL-R の発現を低下させる試薬 GW3965 を添加し LDL-R の発現量を低下させた条件下で PDT を行い MTS Assay で評価したところ、いずれにおいても PDT 抵抗性の誘導が認められ、LDL-R の発現量と PDT 抵抗性の関連が確認できた。今後 LDL-R 発現量を上昇させる試薬を用い、PDT の効果を増強しかつスタチンの抗腫瘍効果を併用することで有用ながん治療となり得る可能性を検討する予定である。

LDL-R, Actin



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 4 件)

- ① Yano T, Kasai H, Horimatsu T, Yoshimura K, Teramukai S, Morita S, Tada H, Yamamoto Y, Kataoka H, Kakushima N, Ishihara R, Isomoto H, Muto M. A multicenter phase II study of salvage photodynamic therapy using talaporfin sodium (ME2906) and a diode laser (PNL6405EPG) for local failure after chemoradiotherapy or radiotherapy for esophageal cancer. *Oncotarget* 2017;8(13):22135-22144(査読有り).
- ② Isomoto H, Nanashima A, Senoo T, Ogiwara K, Hashisako M, Ohnita K, Yamaguchi N, Kunizaki M, Hidaka S, Fukuda H, Ishii H, Matsushima K, Minami H, Akazawa Y, Takeshima F, Fukuoka J, Nagayasu T, Nakao K. In vivo fluorescence navigation of gastric and upper gastrointestinal tumors by 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic diagnosis with a laser-equipped video image endoscope. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2015;12(2):201-8. (査読有り)
- ③ 池淵 雄一郎, 磯本 二. 化学放射線療法または放射線療法後の局所遺残再発食道癌患者に対する光線力学的療法(PDT)の有用性. *鳥取医学雑誌* 2016;44(3-4):66-70(2016.12) (査読無し)

[学会発表] (計 4 件)

- ① Kurumi H, Ogihara K, Isomoto H. The molecular basis of Laser-based PhotoDynamic Endoscopic Diagnosis (LPDED) for gastric tumors. DDW 2017. 2017年5月9日. マコーミックプレイス (シカゴ・米国)
- ② 菓 裕貴, 荻原久美, 磯本 二. 胃癌に対するレーザー光線力学的内視鏡診断の分子基盤. 13 回日本消化管学会総会. 2017年2月17日. 名古屋国際会議場(名古屋市)
- ③ 大仁田 賢, 磯本 二, 中尾 一彦. 上部(ESD/EMR) 超高齢者の早期胃癌に対する内視鏡治療 ESDとPDTを中心に. 87回日本消化器内視鏡学会総会. 2014年5月12日. 福岡国際会議場 (福岡市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯本 一 (ISOMOTO, Hajime)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：90322304

(2) 研究分担者

七島 篤志 (NANASHIMA, Atsushi)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：60380838