



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1474号
学位記番号	第1060号
氏名	林 則之
授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日
学位論文の題名	<p>A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages (癌細胞と腫瘍会合性マクロファージを標的とした新規光線力学的治療法の検討)</p> <p>Molecular Cancer Therapeutics, 14(2): 452-460, 2015</p>
論文審査担当者	<p>主査： 高橋 智 副査： 森田 明理, 城 卓志</p>

.....
【研究目的】

光感受性物質が集積した癌組織に特定波長のレーザー光を照射し、癌細胞選択的細胞死を誘導する治療法が光線力学療法 (PDT) である。癌細胞は嫌氣的解糖系を主な代謝経路とし多くのグルコースを取り込むことが知られ (Warburg 効果), この現象は PET-CT に応用されている。これまで我々は、光感受性物質のクロリン 1 分子にグルコース 4 分子を結合させたグルコース連結クロリン (G クロリン) が、きわめて高い癌細胞選択性、殺細胞効果を有することを報告してきた。最近、癌間質に存在する腫瘍会合性マクロファージ (Tumor associated macrophage: TAM) が、癌細胞の増殖、浸潤、腫瘍血管新生、転移の促進などに重要な役割を持つ事が報告され、癌治療の重要な標的と認識されつつある。TAM は M2 マクロファージに分類されマンノース受容体を発現していることから、我々はクロリン 1 分子にマンノースを 4 分子結合させたマンノース連結クロリン (M クロリン) を合成し、抗腫瘍効果の検討を行った。

【方法】

1. ヒト胃癌細胞株 MKN28, MKN45, ヒト大腸癌細胞株 HT29, HCT116, マウス大腸癌細胞株 CT26 に光感受性物質クロリン, G クロリン, M クロリンを投与し, 24 時間後に 660 nm の赤色光線を 13.9 J/cm² 照射し, 50%殺細胞濃度を比較検討した。
2. CT26 細胞に 0.2 μM の光感受性物質クロリン, G クロリン, M クロリンを投与し, 24 時間後に赤色光線を照射し 1, 4, 8, 12 時間後のアポトーシス誘導効果を Caspase 3/7 Assay を用いて検討した。
3. 共焦点レーザー顕微鏡にて M クロリンと G クロリンのミトコンドリア, リソソーム, ゴルジ体, 小胞体への細胞内局在を検討した。
4. THP-1 (単球細胞) に PMA, IFN γ, LPS にて刺激を与え M1 マクロファージ, PMA, IL4, IL13 を投与し M2 マクロファージに分化誘導を行い, CD68, CD206, TNF α の発現を定量的 RT-PCR にて確認した。M1, M2 マクロファージに各光感受性物質を投与し, 24 時間後に 5.6J/cm² 照射し, PDT 効果を検討した。
5. BALB/c マウスに CT26 の皮下腫瘍モデル (Allograft model) を作成し, 6.25μmol/kg のクロリン, G クロリン, M クロリンを腹腔内投与し, 24 時間後に赤色光線 13.9 J/cm² を照射した。1 週間後に再度 PDT を行い抗腫瘍効果を比較検討した。
6. Allograft model に 6.25μmol/kg のクロリン, G クロリン, M クロリンを腹腔内投与し, 24 時間後に赤色光線 13.9 J/cm² を照射した。その 3 日後に腫瘍を取り出し, マクロファージのマーカーの抗 F4/80 抗体と、TAM のマーカーの抗 CD206 抗体による免疫染色により腫瘍間質の TAM に対する PDT 効果を検討した。

【結果】

1. 癌細胞に対する M クロリンの PDT 効果は G クロリンとほぼ同等で、クロリン単体に比し約 10-40 倍の殺細胞効果を示した。
2. M クロリン, G クロリンはクロリン単体に比較し有意に強力なアポトーシス誘導効果を示した。
3. M クロリンは小胞体, リソソームに, G クロリンはミトコンドリアに集積する傾向を示した。
4. THP-1 より分化誘導された M1, M2 マクロファージは THP-1 より CD68 を多く発現し, M1

マクロファージは $\text{TNF}\alpha$ を多く、M2 マクロファージはマンノースレセプター (CD206) を分化前よりも多く発現しており、刺激によって分化されたことを確認した。M1 マクロファージに対する PDT 効果はクロリン、G クロリン、M クロリンとも同等の殺細胞効果であったが、M2 マクロファージに対しては、M クロリン PDT がクロリン、G クロリンと比べて有意な殺細胞効果を示した。

5. Allograft model に対する M クロリン PDT は、コントロール、クロリン、G クロリンに比し強力な腫瘍縮小効果を示した ($P < 0.05$)。

6. 免疫組織化学の検討では、M クロリンはコントロール、クロリン、G クロリンに比べて腫瘍組織間質の TAM の浸潤を有意に抑制した ($P < 0.001$)。

【考察】

マンノースレセプターが多く発現している TAM を標的として M クロリンを開発した。開発当初は癌細胞には効果を示さないと想定していたが、*in vitro* では癌細胞に対して G クロリンと同様にクロリンより強力な殺細胞効果を示すことが確認された。また TAM にも M クロリン PDT は強い殺細胞効果を示した。

癌治療のターゲットとして癌組織間質の非腫瘍細胞が注目されている。しかし、現状ではこれらの細胞に対する選択的な治療的アプローチは困難である。ワクチンやペプチドなどを用いた TAM に対しての治療の報告がある。これらの治療は全身に対して効果を示すので、TAM 以外の全身の M2 マクロファージにも影響があると推測される。そのため易感染性などの副作用が懸念される。我々が行った M クロリン PDT は、光線照射部位にしか効果を示さないことから、TAM を選択的に死滅させる効果があると考えられ、既存の治療よりも副作用が少ないと思われる。

【結論】

M クロリン PDT は癌細胞のみならず癌間質の TAM に強力な殺細胞効果を示し、これまで検討してきた糖鎖連結光感受性物質の中で最も強力な *in vivo* での抗腫瘍効果を示した。低侵襲な次世代 PDT 候補として期待される。

.....

論文審査の結果の要旨

【背景と目的】光線力学療法 (PDT)とは、光感受性物質を体内に投与し癌組織に集積させ、特定波長のレーザー光を照射することによって、活性酸素を発生させ癌細胞選択的細胞死を誘導する治療法である。PET-CTにも応用されている Warburg 効果は、癌細胞は嫌氣的解糖系を主な代謝経路とし多くのグルコースを取り込むこととして知られている。今までに、光感受性物質のクロリン1分子にグルコース4分子を結合させたグルコース連結クロリン (Gクロリン) が、きわめて高い癌細胞選択性、殺細胞効果を有することを報告している。癌治療においては、癌間質に注目が集まり、その中に存在する腫瘍会合性Mφ (Tumor associated macrophage: TAM) が、癌細胞の増殖、浸潤、腫瘍血管新生、転移の促進などに重要な役割を持つ事が報告され、TAMが多いほど予後が悪いとする報告が多くされている。TAMはM2Mφに分類されマンノース受容体を発現していることから、クロリン1分子にマンノースを4分子結合させたマンノース連結クロリン (Mクロリン) を合成し、癌細胞とTAMに対する効果の基礎的検討を行った。

【方法】癌細胞に対する実験では、ヒト胃癌細胞株 MKN28, MKN45, ヒト大腸癌細胞株 HT29, HCT116, マウス大腸癌細胞株 CT26 に光感受性物質クロリン, Gクロリン, Mクロリンを投与し、24時間後に660 nmの赤色光線を13.9 J/cm²照射し、50%殺細胞濃度を比較検討した。また、CT26細胞に0.2 μMの3種類の光感受性物質を投与し、赤色光線を照射した1, 4, 8, 12時間後のアポトーシス誘導効果をCaspase 3/7 Assayを用いて検討した。腫瘍細胞内への取り込みの検討では、共焦点レーザー顕微鏡を用いてMクロリンとGクロリンの自家蛍光を利用して、ミトコンドリア, リソソーム, ゴルジ体, 小胞体への細胞内局在を検討した。TAMに対する検討では、THP-1 (単球細胞) にPMA, IFN γ , LPSにて刺激を与えM1Mφ, PMA, IL4, IL13を投与しM2Mφに分化誘導を行い、定量的RT-PCRを用いてCD68, CD206の発現を調べ、分化できたかを確認した。M1, M2Mφに各光感受性物質を投与し、24時間後に5.6 J/cm²照射し、PDTによる殺細胞効果を検討した。In vivoの実験では、BALB/cマウスにCT26の皮下腫瘍モデル (Allograft model) を作成し、クロリン, Gクロリン, Mクロリンを6.25 μmol/kg腹腔内投与し、赤色光線13.9 J/cm²を24時間後に照射した。1週間後に再度PDTを行い抗腫瘍効果を比較検討した。またTAMへの検討を行うためにAllograft modelにクロリン, Gクロリン, Mクロリンを6.25 μmol/kg腹腔内投与し、24時間後に赤色光線13.9 J/cm²を照射した。その3日後に腫瘍を取り出し、Mφのマーカーの抗F4/80抗体と、TAMのマーカーの抗CD206抗体による免疫染色を行った。免疫染色により腫瘍間質のTAMに対するMクロリンPDT効果を検討した。

【結果および考察】胃癌・大腸癌細胞に対するMクロリンのPDT効果はクロリンより約10-40倍の殺細胞効果を示し、Gクロリンとほぼ同等であった。アポトーシス誘導効果は、Mクロリン, Gクロリンはクロリンと比較して有意に強力な効果を示した。また、Mクロリンは小胞体, リソソームに、Gクロリンはミトコンドリアに多く集積する傾向を示した。THP-1より分化誘導したM1, M2Mφに対するPDT効果は、M1Mφではクロリン, Gクロリン, Mクロリンとも同等の殺細胞効果で有意差を認めなかったのに対し、M2Mφでは、Mクロリンがクロリン, Gクロリンと比較して有意な殺細胞効果が観察された。Allograft modelに対するMクロリンPDTは、コントロール, クロリン, Gクロリンと比べて強力な腫瘍縮小効果を示した。免疫組織学的検討では、Mクロリンはコントロール, クロリン, Gクロリンに比べて腫瘍組織間質におけるTAM浸潤を有意に抑制し、TAMとMφ全体との割合を検討するとMクロリンはTAMに対して選択的に効果を示していると考えられた。Mクロリンは開発当初はTAMを標的として開発し、癌細胞には効果を示さないと想定していたが、予想に反してin vitroでは癌細胞に対してGクロリンと同様に強力な殺細胞効果を示した。またTAMに対してもMクロリンPDTは強い殺細胞効果を示した。以上の結果、MクロリンPDTは低侵襲な次世代PDT候補の1つとなりうると考えられた。

【審査の内容】主査の高橋からは、正常細胞におけるマンノースレプター^①の発現について、allograft modelの腫瘍内におけるアポトーシス, 血管新生について検討しているのかなど10項目、第一副査の森田教授からは、以前の論文ではクロリンとGクロリンで腫瘍増殖に対する効果に差が見られていたのに対し今回は見られていない理由は何か、Mクロリンの樹状細胞に対する効果について検討しているのかなど7項目、さらに第二副査の城教授からは、炎症性腸疾患 (IBD)の成因や内視鏡診断・治療法、PDTのIBD治療への応用についての質問があった。これらの質問に対して学位申請者はおおむね満足のできる回答が得られ、学位論文の内容を十分に理解し、専門領域に関する知識も十分持ち得ているものと判断した。本研究は、マンノース連結クロリンを用いたPDTが癌細胞とTAMの両者を標的とすることにより既存のPDTに比較してより効果の高いことを明らかにし、胃癌・大腸癌に対する新たな治療法となりうる可能性を示した。よって、本論文の筆頭著者は博士 (医学) の学位を授与されるに相応しいと判断した。