



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1561号
学位記番号	第1116号
氏名	西江 裕忠
授与年月日	平成 29年 3月 24日
学位論文の題名	<p>A next-generation bifunctional photosensitizer with improved water-solubility for photodynamic therapy and diagnosis (水溶性を向上させた二機能性次世代光感受性物質による光線力学的治療および診断の検討)</p> <p>Oncotarget. 2016 Nov 8;7(45):74259-74268</p>
論文審査担当者	主査： 森田 明理 副査： 高橋 智, 城 卓志

論文内容の要旨

【研究目的】

光感受性物質は特定波長の光線照射により蛍光や細胞毒性のある活性酸素種 (ROS) を産生する性質がある。ROS により悪性腫瘍や一部の良性疾患を治療する方法は光線力学的治療 (PDT) として確立している。一方、光線力学的診断 (PDD) は蛍光を用いて腫瘍と正常組織を鑑別する。我々は正常細胞に比べ癌細胞が多く糖を取り込む性質 (Warburg 効果) を応用し、糖鎖連結光感受性物質による優れた腫瘍集積性、殺細胞効果を報告してきた。グルコース連結クロリン (G クロリン) は従来薬よりも高い抗腫瘍効果を示し、マンノース連結クロリンでは腫瘍関連マクロファージを抑制することでさらに高い腫瘍効果を示した。しかしこれらの薬剤は非水溶性であった。現在本邦で用いられている第二世代光感受性物質であるタラポルフィンナトリウム (TS) は従来薬に比べ水溶性、体外排泄が良好だが未だ標準治療とは言えない。また PDD に関しては 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) 以外の薬剤の報告はほとんど見られない。今回我々は水溶性を高めたオリゴ糖連結クロリン (O クロリン) を共同開発し、腫瘍選択性・抗腫瘍効果を検討し PDT および PDD に使用可能な二機能性光感受性物質としての有用性を検討した。

【方法】

1. O クロリンを合成し水溶性を G クロリンと比較することで視認確認した。
2. フローサイトメトリー (Ex405nm/Em680nm) を用いて、O クロリンおよび TS の胃癌細胞株 (MKN45) および大腸癌細胞株 (HT29) への取り込みを評価した。
3. O クロリンの細胞内局在の探索目的で、MKN45 をオルガネラ特異的蛍光プローブでラベルし共焦点レーザー顕微鏡で解析した。
 4. TS, 5-ALA, O クロリンの MKN45, 食道癌細胞株 (OE21, KYSE30), HT29 への取り込みを、各試薬 $5 \mu\text{mol/L}$, 5mmol/L , $5 \mu\text{mol/L}$ となるように投与し Ex405nm or 420nm, Em635nm or 650nm の条件下に蛍光プレートリーダーで蛍光を測定、比較した。
5. MKN45, OE21, KYSE30, HT29 を使用し、TS または O クロリンを投与 4 時間後に 660 nm 赤色光線を 16J/cm^2 照射し、IC50 (50%殺細胞濃度) を比較検討した
6. BALB/c nu/nu マウスを用いて MKN45 皮下腫瘍 Xenograft モデルを作成し、TS, 5-ALA, O クロリンを投与 4 時間後に屠殺、解剖し腫瘍を含む各種臓器を摘出し白色光, 405nm および 420nm 照射下に蛍光を観測した。
7. 同様の Xenograft モデルを用いて薬剤投与なしのコントロール, $0.625 \mu\text{mol/kg}$ の TS または $6.25 \mu\text{mol/kg}$ の O クロリンを尾静脈より投与し 4 時間後に 664nm 赤色光, 15J/cm^2 の半導体レーザー照射を行い 2 週間経過観察した。

【結果】

1. 光感受性物質であるクロリンに 4 分子のオリゴ糖が結合している O クロリンを開発した。O クロリン水溶液は G クロリンと比較すると透明度が高く、水溶性に優れていることが確認できた。
2. TS と比較し O クロリンの癌細胞への取り込みは約 17 倍から 39 倍と高い腫瘍集積性を呈した。
3. 細胞内小器官と O クロリンの蛍光を比較したところ、O クロリンはミトコンドリア、小胞体への取り込みは乏しく主にライソゾームへの集積が見られた。
4. O-クロリンは、どの波長での励起・蛍光測定においても TS, 5-ALA よりも非常に強い蛍光を示し各種癌細胞株への取り込みが優れていることが確認された。
5. O クロリンを用いた PDT は、TS に比較して各種癌細胞に対して約 10 倍から 60 倍の強力な殺細胞効果を示した。

6. 至適波長照射下観察では O クロリンは TS, 5-ALA と比較し腫瘍で強い蛍光を示し明瞭に識別が可能であった.

7. *In vivo* での PDT 効果の検討では O クロリンは TS の 1/10 量の使用でも強力に腫瘍増殖を抑制した.

【考察】

高い腫瘍集積性と抗腫瘍効果を持つ糖鎖連結クロリンの水溶性を改良するため O クロリンを開発した. O クロリンの優れた水溶性は従来の糖鎖連結クロリンに比較し糖鎖を増やすことにより得られたと考えられる. 水溶性を向上させることにより G クロリンと同等の抗腫瘍効果を, TS と同等の水溶性を得ることが可能となった. また O クロリンは腫瘍集積性が高いため少量の薬剤使用にても強力な PDT 効果が得られ, TS と比較し投与量の減量が可能となり有害事象も減らす可能性が示唆された. さらに腫瘍への取り込みが高いことにより現在実臨床での PDD に主に用いられている 5-ALA よりも高い腫瘍識別能が認められた.

【結論】

PDD と PDT 双方に優れた効果を示す可能性のある O クロリンは一剤で診断, 治療を行える可能性を秘め, 有望な次世代 “二機能性” 光感受性物質であると考えられる.

.....
.....
.....

論文審査の結果の要旨

レーザー光照射と光感受性物質を用いた高感度な診断 (Photodynamic Diagnosis: PDD) と低侵襲な治療 (Photodynamic therapy: PDT) は、様々な癌種において臨床応用が広がりつつある。本邦では第二世代の光感受性物質 Talaporfin sodium (TS) を用いた PDT が、一方 PDD に関しては 5-ALA が臨床使用されている。しかし、その PDT および PDD 効果は更なる改良の余地がある。正常細胞に比較し癌細胞が多く糖を取り込む性質 (Warburg 効果) を応用し、グルコース連結クロリン (G クロリン) など、糖鎖を光感受性物質に連結することにより優れた腫瘍集積性、殺細胞効果が示されてきた。しかし従来の糖鎖連結光感受性物質は非水溶性であった。水溶性を高めたオリゴ糖連結クロリン (O クロリン) が共同開発され、その腫瘍選択性および抗腫瘍効果が検証され、PDT と PDD 両者に応用が可能な二機能性光感受性物質としての有用性が検討された。

【方法】 O クロリンの水溶性を比較検証し、フローサイトメトリーを用いて薬剤の取り込みを評価した。共焦点顕微鏡を用いて O クロリンの細胞内局在を検討し、マイクロプレートリーダーを使用して TS、5-ALA、O クロリンの取り込み・蛍光の比較を行った。TS と O クロリンの PDT 効果を検討するため各種癌細胞株を使用して IC50 の比較を行った。ヒト胃癌細胞株を使用した Xenograft model を用いて TS、5-ALA、O クロリンを投与し腫瘍を含めた各種臓器の蛍光を測定することにより *in vivo* での PDD 効果を比較した。同様の Xenograft model を使用し *in vivo* での PDT 効果を検証した。

【結果】 O クロリンは G クロリンよりも水溶性に優れていた。TS と比較し O クロリンは高い細胞内への取り込みが認められた。O クロリンは主にライソゾームへ集積していた。O クロリンは TS、5-ALA よりも強い蛍光を発生し各種癌細胞株への取り込みが優れていた。O クロリン PDT は TS と比較し高い殺細胞効果を示した。至適波長照射下観察で O クロリンは各種臓器と比較し腫瘍で強い蛍光を示した。*In vivo* においても O クロリン PDT は TS と比較し強力な抗腫瘍効果を示した。

【考察】 O クロリンは水溶性を向上させたことにより容易に全身投与が可能となった。また O クロリンは腫瘍集積性が高いため少量の薬剤でも強力な PDT 効果が得られ、TS と比較し投与量減量が可能となり有害事象も減らす可能性が示唆された。さらに腫瘍への取り込みが高いことにより現在 PDD 薬剤として主に用いられている 5-ALA よりも高い腫瘍識別能が認められた。

【結語】 腫瘍集積性と抗腫瘍効果に優れた O クロリンは、単剤で診断および治療の可能性を得る二機能性光感受性物質の有望な候補と考えられる。

【審査の内容】 約 20 分間の論文内容プレゼンテーション後に、主査の森田教授からは、PDT に用いられる光増感剤が水溶性である必要性は何か、など 7 項目、第一副査の高橋教授からは、O クロリンが細胞内へ取り込まれる機序など 12 項目の質問がなされた。城教授からは食道癌の治療法や新規光感受性物質の開発状況など 2 項目の質問がなされた。おおむね満足できる回答があり、学位論文の主旨を十分理解していると考えられた。本研究は水溶性を高めた新規の糖鎖連結光感受性物質を用いることにより PDD および PDT に使用可能とし得ることを報告した。今後の臨床応用が期待できる意義ある知見と考えられた。よって本論文の著者には博士 (医学) の学位を授与するに値すると判断した

論文審査担当者 主査 森田 明理 副査 高橋 智 城 卓志