総説**REVIEW ARTICLE****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**片岡 洋望^{1,2}，林 則之¹，田中 守¹，矢野 重信³，城 卓志¹¹ 名古屋市立大学 大学院医学研究科 消化器・代謝内科学² 名古屋市立大学 大学院医学研究科 内視鏡部³ 奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科

(平成 25 年 5 月 24 日受理，平成 25 年 6 月 25 日掲載決定)

Development of Novel Photodynamic Therapy & Diagnosis by using Sugar Chain Conjugated ChlorinHiromi Kataoka^{1,2}, Noriyuki Hayashi¹, Mamoru Tanaka¹, Shigenobu Yano³, Takashi Joh¹¹Departments of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences²Division of Endoscopy, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences³Graduate School of Materials Science, Nara Institute of Science and Technology

(Received May 24, 2012, Accepted June 25, 2013)

要 旨

正常細胞に比し癌細胞が糖を取り込む事象は Warburg 効果として知られ，現在，癌の高感度診断として普及しているポジトロン断層法検査などに利用されている。糖鎖連結クロリンは優れた腫瘍細胞集積性を示し，第二世代の光感受性物質である Talaporfin sodium の 20 から 50 倍の光線力学的治療 (Photodynamic therapy; PDT) による殺細胞効果を示した。優れた腫瘍選択性を利用した光線力学的診断への臨床応用も期待される。今後の PDT の開発研究につき展望を述べた。

キーワード：光線力学的治療，光線力学的診断，Warburg 効果，クロリン

Abstract

The fact that cancer cells uptake glucose so much compared with normal cells has been known as Warburg's effect and this phenomenon is utilized for fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET) which is widely used as a high sensitivity diagnostic method of cancer. Sugar chain conjugated chlorin specifically accumulated to the cancer cells and photodynamic therapy (PDT) with the irradiation of 660 nm induced 20-50 times more cytotoxicity compared to the second generation photosensitizer, talaporfin. Clinical application of photodynamic diagnosis using sugar chain conjugated chlorin is expected by utilizing its excellent tumor selectivity. We summarized future prospects of development research of PDT.

Key words：photodynamic therapy (PDT), photodynamic diagnosis (PDD), Warburg effect, chlorin

1. はじめに

ポルフィリンなどの腫瘍親和性光感受性物質が腫瘍組織や腫瘍血管に特異的に集積する特性を利用し、光感受性物質の集積した腫瘍組織に特定波長の光線を照射し一重項酸素などの活性酸素の惹起で腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法が光線力学的治療 (Photodynamic therapy; PDT) である。腫瘍周囲の正常組織へのダメージが少ない低侵襲性治療として高齢化社会を迎えるわが国で今後発展が期待されている。本邦では第一世代の Porfimer sodium と第二世代の Talaporfin sodium の 2 種類の光感受性物質を使用した PDT が保険適用になっている。現在、第二世代の Talaporfin sodium の臨床試験、治験が消化器領域の癌治療でも進行中であるが¹⁻²⁾、第一世代の Porfimer sodium に比べ、(1) 術後の暗所滞在時間の短縮、遮光程度の軽減、(2) レーザー機器の小型化、価格の低下、などの点において Talaporfin sodium による PDT の方がすぐれており、今後臨床現場に広く普及する可能性が高いと思われる。しかし、腫瘍細胞特異性など改善すべき課題も残されていると考えられる。

今後、より治療効果の優れた PDT を開発するためには、(1) 光感受性物質の腫瘍細胞選択性、集積性をより高め、正常組織への侵襲を最小限にすること、(2) 至適波長をなるべく長波長領域にして、深部の腫瘍細胞まで治療可能にすること、(3) 体内からの薬剤の排出速度を高めて、術後の暗所滞在時間をできる限り短縮すること、などが重要と考えられる。

われわれは腫瘍集積のための機能素子として究極の生体適合性分子であるグルコースを光感受性蛍光物質クロリンに連結させ、高い腫瘍細胞指向性を可能にしたグルコース連結クロリンを開発し、臨床応用を目指して共同開発研究を行っている³⁻⁵⁾。本稿では近年我々が開発研究を行っているグルコース連結クロリンによる次世代 PDT の開発研究を中心に解説する。

2. Warburg 効果

ドイツの生理学者、医師である Otto Heinrich Warburg は、癌細胞が正常細胞に比べて多量の glucose を取り込み消費すること、癌細胞は嫌氣的解糖系を使用してエネルギーを生産することを 1956 年に Science 誌に報告した⁶⁾。Warburg 自身は、呼吸酵素 (チトクローム) の発見で 1931 年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。グルコース 1 分子から産生されるアデノシン三リン酸 (Adenosine triphosphate; ATP) 産生効率からみると、好氣的にミトコンドリアのクエン酸 (Tricarboxylic acid; TCA) サイクルを使用した場合は、ATP 36 分子が産生されるのに対し、嫌氣的解糖系ではわずかに 2 分子が産生されるのみで、解糖系のエネルギー産生は TCA サイクルに比べて著しく効率が悪い⁷⁾。癌細胞は効率の悪い解糖系で ATP を産生するため、より多くのグルコースを取り込むことにより解糖系を高回転させて、細胞に必要なエネルギーを産生している。

固形癌は一般に低酸素下にあるとされ、また低酸素であるほど悪性度、つまり増殖能が高いと言われている。低酸素状況で誘導されてくる低酸素誘導因子 (Hypoxia induced factor 1; HIF-1) もグルコースの取り込みを活性化

Fig.1 Hypoxia is a common condition found in a wide range of solid tumors. Hypoxia increases tumor glycolysis and decreases oxidative phosphorylation through activating hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Glucose is transported into the cytoplasm by glucose transporters (GLUT). In the cytosol, glucose is metabolized by series of glycolytic enzymes. Glycolysis generates only 2 ATPs, on the other hand, the tricarboxylic acids (TCA) cycle and oxidative phosphorylation generates 36 ATPs (Fig.1 is a quotation and modification of Ref⁷⁾).

し、ピルビン酸のミトコンドリア内への取り込みを抑制することにより TCA サイクルを抑制し、嫌氣的解糖系を促進する方向に働く (Fig.1)^{8,9)}。

癌細胞が多くのグルコースを細胞内に取り込む事象は、¹⁸F-fluorodeoxy glucose の癌組織への取り込みを観察するポジトロン断層法検査に応用され、現在、癌の高感度診断法として広く臨床現場で使用されている¹⁰⁾。

3. グルコース連結クロリンによる抗腫瘍細胞効果

Warburg 効果と PET のエビデンスを背景に、究極の生体適合性分子である糖を光感受性蛍光物質クロリンに連結させ高い腫瘍細胞指向性を目指した糖鎖連結クロリンを開発した (Fig.2a)。

Hela 細胞での検討では、クロリン単体に比べ、グルコース連結クロリン (Glucose conjugated chlorin; G-chlorin)、ガラクトース連結クロリン (Galactose conjugated chlorin; Gal-chlorin) の圧倒的な PDT 殺細胞効果が明らかになった。さらに低濃度クロリンによる検討では、Gal-chlorin よりも G-chlorin の方がより優れた殺細胞効果を示したことから (Fig.2b)³⁻⁵⁾、以後は G-chlorin を中心にした次世代

Fig.2 (a) Molecular structures of glucose conjugated chlorin and galactose conjugated chlorin. (b) *In vitro* PDT examination for HeLa cells, glucose conjugated chlorin (G-chlorin) and galactose conjugated chlorin (Gal-chlorin) expressed significantly stronger cell survival inhibition than chlorin alone in the concentration of 0.5 μM. Furthermore, G-chlorin expressed significantly stronger cell survival inhibition than Gal-chlorin in the concentration of 0.09 μM. From these findings, we judge that G-chlorin is the best photosensitizer for PDT (Fig.2 is a quotation and modification of Ref. 4, Fig.2).

PDTの開発研究を行うこととなった。

フッ化クロリンの吸収波長は654 nmと赤色可視光線のなかでも比較的長波長であることから、血液中のヘモグロビンによる吸収の影響も受けにくく、また、フッ化ポルフィリンに比べて長波長であることから、組織深部まで殺細胞効果を発揮すると考えられる (Fig.3)。

胃癌細胞株 MKN28, MKN45 と大腸癌細胞株 HT29, HCT116 に対する光感受性物質の細胞内取り込み能を検討した。Talaporphin sodium, グルコース連結クロリン (G-chlorin) とともに 1 μM を投与し、経時的に FACS により FL-4 で薬剤からの蛍光を測定した。Talaporphin sodium に比して有意に G-chlorin の方が細胞内への取り込みが良好であった (Fig.4)。FACS 解析で Annexin V によるアポトーシスを評価すると、経時的にグルコース連結クロリン (G-chlorin) の細胞内への取り込みとともに、癌細胞のアポトーシスが誘導されていることが観察された (Fig.5)。

胃癌、大腸癌細胞株を用いた *in vitro* の PDT 効果の検

Fig.3 UV-vis spectra of fluorinated porphyrin (blue line) and fluorinated chlorin (red line) in CHCl_3 .

Fig.4 The comparison of absorption between G-chlorin and Talaporphin in gastric cancer cell lines and colon cancer cell lines. One μM of Talaporphin and G-chlorin were administered and the time course analysis of FL-4 which reflects intracellular uptake of photosensitizers was performed by FACS. Accumulation of G-chlorin in cancer cells is significantly larger than that of Talaporphin.

Fig.5 FACS analysis revealed that G-chlorin accumulation induced apoptosis in time and dose-dependent manner.

	IC ₅₀ [μM]			
	胃癌細胞		大腸癌細胞	
	MKN28	MKN45	HT29	HCT116
Talaporfin	12.7	18.6	25.8	12.9
G-chlorin	0.56	0.48	0.52	0.35
IC ₅₀ 比	22.7	38.8	49.6	36.9

(IC₅₀:50%細胞発育阻害濃度)

Fig.6 IC₅₀ of Talaporfin and G-chlorin PDT for gastric cancer cells and colon cancer cells *in vitro*. IC₅₀ of Talaporfin was about 20 to 50 times of IC₅₀ of G-chlorin (Fig.6 is a quotation and modification of Ref. 11, Table1).

討では、第二世代の Talaporfin sodium に比して約 20 倍から 50 倍の殺細胞効果を示した (Fig.6). グルコース連結クロリン (G-chlorin) による強力な殺細胞効果は、腫瘍細胞への集積性の向上によると考えられた。ヌードマウス皮下移植腫瘍における *in vivo* の PDT 試験においても、Talaporfin sodium に比してグルコース連結クロリンが有意に強力な腫瘍縮小効果をめした^{11,12)}。

4. 光線力学的診断法 (PDD) への応用

腫瘍細胞に特異的に取り込まれた光感受性物質に PDT の時とは異なる波長の光線を照射することにより、光感受性物質から励起される光を高感度に受像する、腫瘍の高感度診断法が、光線力学診断法 (Photodynamic diagnosis: PDD) である。PDD においては 5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid; 5-ALA) が一部の癌種で臨床応用への試みがなされている^{13,14)}。5-ALA は腫瘍細胞内でプロトポルフィリン IX (Protoporphyrin IX; PpIX) に変換されるが、腫瘍細胞内では PPIX をヘムに変換する鉄付加酵素 (Ferrochelatase) 活性が低いと分解されず腫瘍細胞内に蓄積し、400-410 nm の青色光線照射により、腫瘍細胞全体は赤色蛍光を発する。

われわれは大腸癌細胞株をヌードマウスの皮下に移植した xenograft モデルを用い、尾静脈よりグルコース連結クロリンを静注後に、青色光線を照射し、グルコース連結クロリンの腫瘍集積による PDD 効果を検討した。Fig.7 に示すごとく、グルコース連結クロリンが集積した皮下腫瘍は赤色の蛍光を発することが皮膚表面からも確認された。腹腔内播種モデルにおける播種性癌病巣においてもグルコース連結クロリンによる同様の PDD 効果を確認しており、現在、早期消化管癌診断への臨床応用に向けて検討を進めている。

5. 次世代癌治療としての PDT 開発の展望

分子生物学的手法により 1980 年代ごろから、様々ながん遺伝子、癌抑制遺伝子が次々と発見され、(1) がん化には数千の点突然変異、遺伝子転座、遺伝子増幅、遺伝子欠失が関与すること、(2) がん関連遺伝子の変異は、数十種類の主要なシグナル伝達経路に影響を及ぼすこと、などが明らかになってきた。近年、臨床現場に分子標的薬が続々と導入されている一方で、個々のシグナル分子を

Fig.7 Photodynamic diagnosis (PDD) by using G-chlorin of xenograft model. Blue light irradiation induced excitation of red fluorescence in subcutaneous tumor (white arrow).

標的としても、根治を目指した癌治療には結びつかないのではないかという疑問も生じている¹⁵⁻¹⁶⁾。癌細胞の代謝に関しては、多くの遺伝子変異を受けシグナル伝達経路が影響を受けているが、代謝の変化はすべての癌細胞にほぼ共通であることが判明している。すなわち、嫌氣的解糖系の亢進と TCA サイクル (酸化的リン酸化) の抑制、この代謝の変化はすべての癌細胞にほぼ共通である。以上のような背景から、癌細胞への糖の取り込みを利用した本治療法は、癌細胞の根源的な変化に着目した治療法であり、実際、多臓器由来の癌細胞株に対しても、癌種を選ばず優れた殺細胞効果を発揮する (未発表データ)。今後は消化管癌のみならず、膀胱癌、子宮頸癌、皮膚癌など消化管同様に光線照射のアプローチが容易な癌も対象に臨床応用を目指し開発研究を推進する予定である。

臨床応用を目指した新規光感受性物質の開発目標として

1. 腫瘍細胞特異性、選択性の高い物質 (腫瘍細胞と正常細胞の薬剤クリアランス比が高い物質) → 癌のピンポイント攻撃、低侵襲性治療の実現。
 2. 体外への排出速度の速い物質 → 光過敏などの副作用の低減、暗所滞在の短縮化。
 3. 組織深部まで到達可能な長波長領域で反応する物質 → PDT 治療域の拡大、遠赤外線、赤外線になれば体内全体の癌治療が可能。
 4. 製造コストが安価で大量合成が可能な物質 → 医療コストの削減。
 5. 水溶性に優れる物質 → 薬剤投与の利便性の向上。
- などが重要と考えられる。

腫瘍血管は通常の血管と比較して透過性が著しく亢進しており、高分子物質が漏れ出やすくなっている。さらに癌組織ではリンパ管の発達が不完全のため、漏れ出た高分子物質がそのまま癌組織に留まりやすい傾向にあり、これらの現象は Enhanced permeability and retention (EPR) 効果として知られている¹⁷⁾。このような EPR 効果を期待してリポソームや高分子ミセルなどのドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system; DDS) を応用した新規の光感受性物質も有望と考えられ、われわれの開発した光感受性物質への応用も検討している^{18,19)}。

照射光線の特異波長がさらに長くなり赤外線レベルになれば、発熱の問題は出てくるものの、PDT の治療範囲が内視鏡下の局所治療の概念から体内全体の癌に対する治療に応用範囲が広がるものと推測され、今後の PDT 技術の発展が大いに期待される²⁰⁾。

6. おわりに

最近、我々が進めている糖鎖連結光感受性物質による次世代光線力学的治療法研究につき概説した。多様な癌種に共通な Warburg 効果を利用した本治療法は、多種多様な癌に対して有効で、今後、臨床応用に向けた開発が大いに期待される。今後も photonics の技術革新や DDS などの開発により、さらに低侵襲で切れ味のよい PDT 治療法が開発されることを期待したい。

謝辞

本研究の推進にあたり、岡山理科大学自然科学研究所の赤司治夫教授、研究室の方々、名古屋市立大学大学院医学研究科 加齢・環境皮膚科学教室の森田明理教授によるご指導、ご協力に感謝申し上げます。

本稿で紹介した研究の一部は主に以下の支援を得て行われた。2012, 2013 年度橋渡し研究加速ネットワークプログラム A, 2011-2013 年度文部科学省科学研究費基盤研究 (C), 2013-2015 年度文部科学省科学研究費基盤研究 (B), 2009-2014 年度 JSPS 日独二国間共同研究, 2010-2015 年度 JST 分子イメージング研究戦略推進プログラム, 2011 年度, 2012-2013 年独立行政法人科学技術振興機構 研究成果最適展開支援プログラム フィービリティスタディステージ 探索タイプ, 2009 年度, 2011 年公益財団法人 内視鏡医学研究振興財団研究助成。研究助成に厚く感謝申し上げます。

利益相反の開示

利益相反なし。

参考文献

- 1) T. Horimatsu, M. Muto, Y. Yoda, T. Yano, Y. Ezoe, S. Miyamoto, T. Chiba: Tissue damage in the canine normal esophagus by photoactivation with talaporfin sodium (laserphyrin): a preclinical study. *PLoS ONE*, 7(6): e38308, 2012.
- 2) T. Yano, M. Muto, K. Yoshimura, M. Niimi, Y. Ezoe, Y. Yoda, Y. Yamamoto, H. Nishisaki, K. Higashino, H. Iishi: Phase I study of photodynamic therapy using talaporfin sodium and diode laser for local failure after chemoradiotherapy for esophageal cancer. *Radiat. Oncol.*, 23(7), 113-120, 2012.
- 3) S. Hirohara, M. Obata, H. Alitomo, K. Sharyo, T. Ando, S. Yano, M. Tanihara: Synthesis and photocytotoxicity of S-glucosylated 5, 10, 15, 20-Tetrakis (tetrafluorophenyl)porphyrin metal complexes as efficient $^1\text{O}_2$ -generating glycoconjugates. *Bioconjug. Chem.*, 20; 20 (5), 944-952, 2009.
- 4) S. Hirohara, M. Obata, H. Alitomo, K. Sharyo, T. Ando, M. Tanihara, S. Yano: Synthesis, Photophysical Properties and Sugar-Dependent *In Vitro* Photocytotoxicity of Pyrrolidine-Fused Chlorins bearing S-Glycosides. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 97, 22-33, 2009.
- 5) S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh: Current states and future views in photodynamic therapy. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 12 (1), 46-67, 2011.
- 6) O. Warburg: On the origin of cancer cells. *Science*, 123: 309-314, 1956.
- 7) 合田亘人, 鈴木智大, 金井麻衣: HIFが制御するエネルギー代謝—分子メカニズムとその破綻に起因する疾患. *実験医学*, 30 (8): 1252-1257, 2012.
- 8) X. Lu, Y. Kang: Hypoxia and hypoxia-inducible factors: master regulators of metastasis. *Clin Cancer Res.*, 16(24): 5928-5935, 2010.
- 9) J.B. Wenger, S.Y. Chun, D.T. Dang, H. Luesch, L.H. Dang: Combination therapy targeting cancer metabolism. *Med. Hypotheses*, 76(2): 169-172, 2011.
- 10) Y. Nakamoto, K. Togashi, T. Kaneta, H. Fukuda, K. Nakajima, K. Kitajima, K. Murakami, H. Fujii, M. Satake, U. Tateishi, K. Kubota, M. Senda: Clinical value of whole-body FDG-PET for recurrent gastric cancer: a multicenter study. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 39(5): 297-302, 2009.
- 11) M. Tanaka, H. Kataoka, M. Mabuchi, S. Sakuma, S. Takahashi, R. Tujii, H. Akashi, H. Ohi, S. Yano, A. Morita, T. Joh: Anticancer effects of novel photodynamic therapy with glycoconjugated chlorin for gastric and colon cancer. *Anticancer Res.*, 31(3): 763-769, 2011.
- 12) 片岡洋望, 田中 守, 城 卓志: Main Topics 消化器領域におけるPDTの現状と将来展望. *Medical Photonics*, 11: 23-29, 2012.
- 13) E. Endlicher, R. Knuechel, T. Hauser, R.M. Szeimies, J. Schölmerich, H. Messmann: Endoscopic fluorescence detection of low and high grade dysplasia in Barrett's oesophagus using systemic or local 5-aminolaevulinic acid sensitisation. *Gut.*, 48(3): 314-319, 2001.
- 14) K. Watanabe, N. Hida, Y. Ajioka, K. Hori, N. Kamata, M. Sogawa, H. Yamagami, K. Tominaga, T. Watanabe, Y. Fujiwara, T. Matsumoto, T. Arakawa: Photodynamic diagnosis of endoscopically invisible flat dysplasia in patients with ulcerative colitis by visualization using local 5-aminolevulinic acid-induced photosensitization. *Gastrointest. Endosc.*, 71(6): 1094-1096, 2010.
- 15) 曾我朋義: がんの代謝研究の最前線—Warburgを超えて. *実験医学*, 30(15): 2346-56, 2012.
- 16) R.A. Cairns, I.S. Harris, T.W. Mak: Regulation of cancer cell metabolism. *Nat. Rev. Cancer.*, 11(2): 85-95, 2011.
- 17) Y. Matsumura, H. Maeda: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.*, 46: 6387-6392, 1986.
- 18) C.S. Jin, G. Zheng: Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. *Lasers Surg. Med.*, 43(7): 734-748, 2011.
- 19) 西山伸宏, 片岡一則: 診断—治療—体型DDS技術に基づく新しい抗がん医療. *実験医学*, 30(7): 1146-1152, 2012.
- 20) M. Mitsunaga, M. Ogawa, N. Kosaka, L.T. Rosenblum, P.L. Choyke, H. Kobayashi: Cancer cell-selective *in vivo* near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat. Med.*, 17(12): 1685-1691, 2011.

著者紹介

片岡 洋望 (Hiromi Kataoka)

1989 年, 名古屋市立大学医学部 卒業。
2000 年, 名古屋市立大学大学院医学研究科 修了。2001 年～2003 年, カナダ・Calgary 大学 (Department of Molecular Biology) 留学。2009 年, 名古屋市立大学大学院医学研究科 消化器・代謝内科, 内視鏡部 准教授, 現在に至る。