

2023年度TIA連携プログラム探索推進事業「かけはし」 調査研究報告書（公開版）

【研究題目】

低酸素化環境に適応したがん細胞を標的とした光線力学的治療へ～作用機序の解明と輸送分子の開発～

Toward Photodynamic Therapy Targeting Cancer Cells Adapted to Hypoxic Environments - Elucidation of Mechanism of Action and Development of Transport Molecules

【整理番号】 TK23-040

【代表機関】 筑波大学

【調査研究代表者（氏名）】 百武 篤也

【TIA内連携機関：連携機関代表者】 川上 亘作

【TIA外連携機関】 NIMS 機能性材料研究拠点

【報告書作成者】 百武 篤也

【報告書作成年月日】 2024/4/22

【連携推進（具体的な連携推進活動内容とその活動の効果等）】

1. 連携推進活動内容「低酸素環境下の光線力学療法（PDT）効果を強化するナノマテリアル開発」に向けた会議

開催日時：2023/3/14 15:30

開催場所：NIMS 千現研究本館居室棟 4F セミナー室

出席者：百武篤也（筑波大学）、川上亘作（NIMS）、山崎智彦（NIMS）

会議目的：光線力学療法に役立つナノマテリアルの開発を推進するための具体的な連携推進活動内容の決定と、その活動による効果の確認。

研究分担の確定：

百武：新規光増感剤の合成を含めた基礎研究と開発。

川上：光増感剤を薬剤送達するためのナノマテリアルの応用研究。

山崎：光増感剤および光増感剤含有ナノマテリアルのPDT効果の評価。

共同研究の計画：

光線力学療法におけるナノマテリアルの新たな応用を目指し、3者間での共同研究計画を立案した。研究開発のための資金調達に関する情報共有と戦略策定を行った。

2. 活動の効果

研究分担の明確化：各参加者の専門知識を活かした効率的な研究推進が可能となった。

共同研究の効果：複数の研究機関が協力することで、資金調達の機会の増加と研究開発の加速が期待される状況となった。

定期的な進捗報告：進捗状況の透明性が確保され、課題が早期に発見されるようになった。また、研究の方向性の迅速な修正が可能となった。

【調査研究内容（実験等中心に背景・課題と実行された課題解決の内容と結果）】

背景・課題：

光線力学療法（Photodynamic therapy, PDT）は、光でがん細胞を変性・壊死させる治療法であり、副作用が少なく薬剤耐性に対する効果が高いため、注目を集めている。PDTでは、光増感剤によって活性酸素種（Reactive oxygen species, ROS）が発生し、がん細胞を攻撃するが、ROSの原料として、がん組織内の酸素が必要であることが課題となっている。

ヒト固形腫瘍では、がん細胞の増殖速度と血管の形成速度とのアンバランスの結果、血流不足による「低酸素領域」が生じ、酸素が不足した領域では、光増感剤を励起しても、ROSの生成が不十分となり、治療効果が低下してしまう。そのため、PDTの分野では、低酸素領域のがん組織に対抗する戦略が求められている。

このような状況下で申請者らは、先行研究すなわち、天然型光増感剤であるPheophorbide a (Phed a) が無酸素下でも効率的に二重鎖DNAを切断できることに注目し、Phed aを低酸素領域のがん治療に利用できる可能性があると考えた。そこで、申請者らは、がんと深い関わりがあるとされるグアニン四重鎖DNAの存在下で、Phed aに赤色光（波長680 nm）を照射する実験を行ったところ、酸素の有無に関わらず、Phed aはグアニン四重鎖DNAをほぼ完全に切断することを発見した（未発表）。すなわち、Phed aを赤色光で励起することで、活性酸素を介さずに、二重鎖DNAだけでなく四重鎖DNAも破壊できることが明らかになった。

以上のように、Phed aの溶存酸素に依存しないDNA光切断能は特筆すべきである一方、Phed aおよびPhed a誘導体の水中での挙動については未解明な点が多く残されている。また、DNAを無酸素下で切断するPhed aの反応活性種についても解明には至っていない。また、Phed aの細胞内への送達手段も確立されておらず、脂質ナノ粒子等を用いたドラッグデリバリーシステムの検討も必要である。さらに低酸素環境下でのPhed aの光細胞毒性効果についての報告例もない。

課題解決の内容と結果：

1. 光増感剤 Phed a の水中での光物理特性及び反応中間体の解明について

初めに、Phed aの水中での光照射による反応活性種の解明を試みた。ラジカル捕捉剤である5,5-ジメチルピロリン-N-オキシド（DMPO）の存在下で、Phed aとPyro aを照射した際のESRスペクトルの変化を追跡した。空気下では680 nmの光を照射すると、DMPO-ヒドロキシラジカル付加体であるDMPO-OHのシグナル強度が増加し、両系でヒドロキシラジカルが生成していることが示された。アルゴン雰囲気下ではDMPO-OHシグナルは観測されず、どちらの光増感剤も酸素がない状態でヒドロキシラジカルを生成しないことが示された。

同じ条件下でalpha-(4-ピリジル-1-オキシド)-N-tert-ブチルニトロン（POBN）をラジカル捕捉剤として使用したところ、Phed aとPyro aの照射では空気雰囲気下でヒドロキシラジカルの発生を示すPOBN-OHシグナルが検出された。しかし、アルゴン雰囲気下ではPOBN-OHシグナルは観測されず、両光増感剤は溶存酸素がない条件下ではヒドロキシラジカルを発生しないことが再確認された。

Phed aラジカルを直接検出する試みとして、ラジカル捕捉剤なしでPhed aをアルゴン下で照射したところ、 $g=2.0008$ の新しいESRシグナルが出現した。光を消すとこのシグナルは消え、照射のオン・オフを繰り返すことで、シグナルが照射中にのみ現れることが確認された。このシグナルはPhed a非存在下では観察されなかったため、Phed aラジカルによるものであると考えられる。

2. 光増感剤 Phed a 及び PPIX のアルキル誘導体の合成

Phed a 及び PPIX の末端をセチルアルコールでエステル化した化合物が合成された。各化合物の構造及び純度は¹H-NMR 及びマススペクトルで確認された。また、エステル化による光増感剤の基本的な光物理特性に大きな変化は見られず、PDT 効果が維持されていることが確認された。これにより、各光増感剤のリポソームへの取り込み、細胞内への運搬及び低酸素環境下での光細胞毒性の評価が可能となった。

3. 光増感剤 Phed a 及び PPIX のアルキル誘導体の脂質ナノ粒子への取り込み

PPIX の末端をセチルアルコールでエステル化した化合物の脂質ナノ粒子への取り込み実験が行われた。ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) および DPPC とコレステロールで構成される脂質ナノ粒子へ、薄膜法による取り込みを試みたが、予想に反して化合物の取り込み量は脂質に対して 0.1%以下であり、ほとんど観測されなかった。

4. 低酸素環境下での光細胞毒性効果

PPIX 及び Phed a を用いたがん細胞に対する低酸素環境下での光細胞毒性効果についての研究が現在進行中である。ヒト肺癌由来の細胞株である A549 細胞を用いて、それぞれの光増感剤を培地中に終濃度 5 μ M と加えた際の細胞生存率を ATP 量を指標として求めた結果、O₂ 濃度 20%下では光照射により生存率が大きく低下することが示された。現在、3%O₂ 濃度下での光照射条件を検討中である。

【今後の活動予定】

1. 光増感剤の改良と新規合成に関して

現在の Phed a 及び PPIX のアルキル誘導体の研究結果を基に、より高い光細胞毒性を有する新しい光増感剤の開発を試みる。異なるアルキル鎖の長さや構造を有する誘導体の合成が進められ、それらの光物理特性及び光生物学的活性の詳細な調査が行われる予定である。

2. 光細胞毒性メカニズム

低酸素環境下での光細胞毒性効果のメカニズムに関するさらなる理解を深めるため、細胞レベルでの反応機構の解析を行う。特に、光増感剤が細胞内でどのように振る舞うか、及び細胞死に至る詳細な経路に注目して研究が展開される。

3. 脂質ナノ粒子の改良

PPIX の末端をセチルアルコールでエステル化した化合物の脂質ナノ粒子への取り込み効率が低いことが確認されたため、ナノ粒子の構造や組成の最適化による取り込み効率の向上が図られる。さらに、異なる種類の脂質を用いたナノ粒子の開発も検討される。

【SDGs17 目標について、調査研究成果について、貢献ができると思われる項目があれば、最大3つまで☑をご記載下さい。】

研究成果に関連する SDGs 目標がある。

関連する SDGs 目標は無い

1 <input type="checkbox"/> 貧困をなくそう	2 <input type="checkbox"/> 飢餓をゼロに
3 <input type="checkbox"/> すべての人に健康と福祉	4 <input type="checkbox"/> 質の高い教育をみんなに
5 <input type="checkbox"/> ジェンダー平等を実現しよう	6 <input type="checkbox"/> 安全な水とトイレを世界中に
7 <input type="checkbox"/> エネルギーをみんなに、そしてクリーンに	8 <input type="checkbox"/> 働きがいも経済成長も
9 <input checked="" type="checkbox"/> 産業と技術革新の基盤を作ろう	10 <input type="checkbox"/> 人や国の不平等をなくそう
11 <input type="checkbox"/> 住み続けられるまちづくりを	12 <input type="checkbox"/> つくる責任、つかう責任
13 <input type="checkbox"/> 気候変動に具体的な対策を	14 <input type="checkbox"/> 海の豊かさを守ろう
15 <input type="checkbox"/> 陸の豊かさを守ろう	16 <input type="checkbox"/> 平和と公正をすべての人に
17 <input type="checkbox"/> パートナーシップで目標を達成しよう	

以上