

新規光線力学的療法の High-Mobility Group Box-1 (HMGB1) と Calreticulin (CRT) を介した腫瘍抑制効果の解析

名古屋市立大学大学院医学研究科
消化器・代謝内科学 臨床研究医 田中 守

名古屋市立大学大学院医学研究科
消化器・代謝内科学 准教授 片岡 洋望

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科, 客員教授 矢野 重信

【目的】光線力学的療法 (Photodynamic Therapy, PDT) は、光感受性物質が選択的に集積した腫瘍組織にレーザー光を照射し腫瘍細胞を選択的に破壊する治療法である。我々は、癌細胞が糖を取り込む性質を利用した光感受性物質である糖鎖連結クロリンを開発し、その高い腫瘍選択性と殺細胞効果を確認している。今回我々は、抗原ペプチドと MHC 分子との結合を促進させる Calreticulin (CRT), Toll-like receptor 4 を活性化させる High-Mobility Group Box-1 (HMGB1) の発現に注目し、糖鎖連結クロリンによる新規光線力学的療法の腫瘍免疫増強メカニズムの検討を行った。

【方法】

(1) 光線力学的療法では一般に光感受性物質が特定波長光線により励起され、細胞内に細胞死を誘導するとされている。糖鎖連結クロリン, レザフィリン®を投与後、660nm の赤色半導体レーザーを 16 J/cm² 照射し、reactive oxygen species (ROS) detection reagent (carboxy-H₂ DCFDA), Caspase-3 FITC, PI でラベルし FACS Calibur にて活性酸素の誘導, アポトーシス, ネクローシスを検討した。

(2) 正常免疫マウス (BALB/c), ヌードマウス (nu/nu BALB/c) 背部皮下に CT26 を移植し、皮下腫瘍移植モデルを作成し、移植皮下腫瘍が成長した時点で糖鎖連結クロリンを静脈投与 4 時間後に 660nm の赤色半導体レーザーを 40 J/cm² 照射し、腫瘍体積の経時的変化を測

定し、免疫の有無により腫瘍縮小効果を比較した。

(3) 低濃度の糖鎖連結クロリンを投与後、660nmの赤色半導体レーザーを16 J/cm²照射し24時間後のアポトーシスを誘導したCT26細胞を免疫原として正常免疫マウスに皮下投与し(左側腹部)、癌抗原によるCTLを介した細胞性免疫誘導を惹起させ、その7日後に未処理のCT26細胞を反対側の右側腹部に移植した。その後約30日間にわたりTumor-free mice (%)を検討することにより、腫瘍免疫増強効果を測定した。

(4) 糖鎖連結クロリンによるPDT処理した細胞のCRTとHMGB1を、各々の抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、その発現を蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。

(5) CRT small interfering RNA (siRNA CRT)、HMGB1 small interfering RNA (siRNA HMGB1)により、CRTもしくはHMGB1をknockdownしたCT26の細胞株を作成した。それらの細胞株にPDT処理を行い免疫原とし、腫瘍免疫増強効果を評価した。

【結果】

(1) 細胞内への取り込みは、投与後経時的に上昇した。糖鎖連結クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い細胞内への取り込みを認めた。また、アポトーシス・活性酸素の誘導に関しても糖鎖連結クロリンはレザフィリンに比べ有意に高い誘導能があることを確認した。これより糖鎖連結クロリンによるPDTが活性酸素を発生させアポトーシスを誘導させることを確認した。

(2) 免疫不全マウスに比べ、正常免疫マウスにおいてより強い腫瘍縮小効果をみとめた。これより糖鎖連結クロリンによるPDTと免疫の関与が示唆された。

(3) 未処理のCT26細胞を投与した群に比べ、PDT処理をした細胞を投与した群において高いTumor-free mice (%)を認め、腫瘍免疫増強効果を確認した。

(4) 糖鎖連結クロリンによるPDT処理した細胞よりCRTとHMGB1の発現を共焦点レーザー顕微鏡下で確認した。

(5) siRNA CRT、siRNA HMGB1により、CRTもしくはHMGB1をknockdownすることにより腫瘍免疫増強効果の消失を確認した。

【結論】糖鎖連結クロリンを用いたPDTにより傷害された癌細胞がCRT・HMGB1の発現を介して抗腫瘍免疫を活性化している可能性が考えられた。

上記の実験結果は、「公益財団法人愛知県がん研究振興会（英文の場合はAichi Cancer Research Foundation）の助成による」旨を添え、2014/11/13に第25回日本消化器癌発生学会総会にて発表した。今後さらにデータを追加し英文誌に報告予定である。