

成人 T 細胞白血病に対する光線力学療法を指向した光感受性物質の創製

新地 浩之

鹿児島大学学術研究院理工学域工学系化学生命工学プログラム

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-40

TEL: 099-285-7843

要旨

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型感染に起因する血液がんであり、特に九州・沖縄地方で罹患率が高い。進行が速く予後不良であるにもかかわらず、根治的治療法は確立されておらず、新たな治療戦略の開発が求められている。本研究では、ATL に対する光線力学療法の確立を目指し、標的細胞に選択的に結合する光感受性物質の開発に取り組んだ。まず、光感受性物質としてのテトラフェニルポルフィリン (TPP) および親水化剤としてのポリエチレングリコール (PEG) を共固定化した金ナノ粒子 (TPP-PEG-GNPs) を調製した。この TPP-PEG-GNPs の ATL 細胞株に対する光毒性を評価した結果、TPP 単独に比べて高い光毒性を示し、優れた光感受性物質となることが示唆された。一方、ATL 細胞への選択的送達を目的とした一本鎖抗体 (scFv) の共固定化を検討したところ、scFv の固定化に必要なリンカーの最適化が必要であることが示された。今後、リンカー設計の最適化を進め、TPP と scFv を共固定化した GNPs が調製できれば、ATL に対する新たな光線力学療法の開発につながると期待される。

1. 緒言

成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-I) の感染に起因する血液がんである¹⁾。発症までに 30 年以上の潜伏期間があり、生涯発症率は 2~5%程度とされる。しかし、ATL を発症すると急速に症状が進行し、多くの患者が 2 年以内に死亡する。日本では年間約 1,000 人が ATL で死亡している。HTLV-I キャリア (HTLV-I 感染歴のある ATL 未発症者) は、日本やカリブ海諸島、中央アフリカなどに偏在しており、世界全体で 500~2,000 万人、日本国内では約 100 万人と推定されている。特に国内では、鹿児島・宮崎・長崎・沖縄県の 4 県にキャリアの約 3 分の 1 が集中しており、世界的に最も地域集積性が高いことが知られている。

ATL の治療は、造血幹細胞移植や化学療法が中心となるが、造血幹細胞移植は患者への身体的負担が大きく、化学療法は薬剤耐性の問題がある。そのため、根治的治療法は確立されておらず、新たな治療戦略の開発が求められている。本研究は、ATL に対

する新たな治療戦略として光線力学療法 (PDT) を開発することを目的とする。PDT は、光感受性物質への光照射によって生じる活性酸素種 (ROS) により標的がん細胞を死滅させる低侵襲の治療法である^{2,3)}。化学療法とは作用機序が全く異なり、薬剤耐性が生じない点も特長である。現在、PDT は早期肺がんや表在型食道がんなどに保険適用されており、その有効性が臨床的に認められている。一方、PDT の光感受性物質 (レザフィリンやフォトフリンなど) は、固形腫瘍組織への集積性が認められるものの、血液がん細胞には集積しにくい。したがって、ATL に対する PDT を開発するためには、ATL 細胞に選択的に集積する光感受性物質が必要である。我々はこれまでに、ATL 患者由来の細胞株に選択的に結合する一本鎖抗体 (scFv) の開発に成功している⁴⁾。本研究では、この scFv を活用し、金ナノ粒子 (GNPs) 表面に低分子光感受性物質および scFv を共固定化した PDT ツールの開発に取り組んだ。

2. 結果と考察

2.1 ATL 細胞選択的に結合する光感受性物質のデザイン

本研究で開発する光感受性物質のデザインを Fig.1 に示す。低分子光感受性物質 (PS) としてテトラフェニルポルフィリン (TPP) を選択し、チオクト酸を有するリンカーを介して GNP 表面に固定化した。また、ATL 細胞株結合性 scFv の固定化にはニッケル-ニトリロ三酢酸 (Ni-NTA) を用い、scFv に導入されたヒスチジン (His) タグとの結合を介して GNP 表面に固定化することを検討した。さらに、ナノ粒子の親水性を向上させ、細胞との非特異的な結合を抑制するため、チオクト酸を介してポリエチレングリコール (PEG) を GNP 表面に共固定化した。

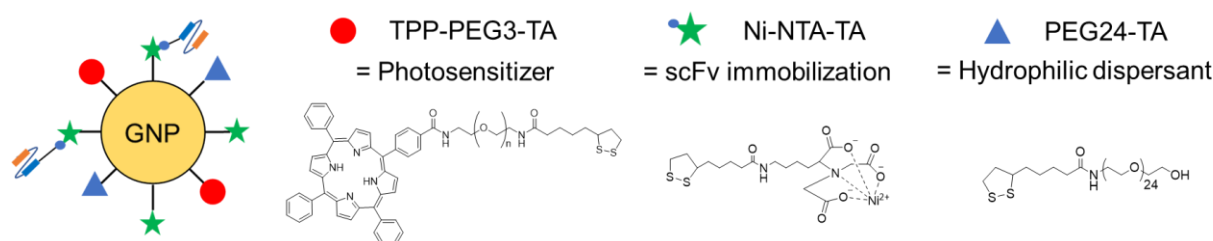


Fig. 1 Illustration of TPP-PEG-GNPs.

2.2 TPP 誘導体と PEG 誘導体を共固定化した GNPs (TPP-PEG-GNPs) の調製

TPP-PEG-GNPs は、既報⁵⁾を参考に調製した。TPP 誘導体として、鎖長 3 の PEG (PEG3) を介してチオクト酸を導入した TPP-PEG3-TA を使用した。また、PEG 誘導体として、鎖長 24 の PEG (PEG24) にチオクト酸を導入した PEG24-TA を使用した。まず、塩化金 (III) ナトリウムを水素化ホウ素ナトリウムで還元して GNPs を合成した。次に、TPP-PEG3-TA および PEG24-TA の混合溶液を加えて GNP 表面に固定化した。その後、透析 (分画分子量: 50,000) により精製した。得られた TPP-PEG-GNPs を MALDI-TOF MS で解析した結果、TPP-PEG3-TA および PEG24-TA の分子イオンピークが検出され、これらの化合物が GNP 表面に固定化されたことを定性的に確認した (Fig. 2A)。さら

に、動的光散乱（DLS）法により、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中での TPP-PEG-GNPs の流体力学的粒径を測定した。その結果、平均粒径は約 17 nm であり、水分散性の高い GNPs が得られたことが示唆された（Fig. 2B）。

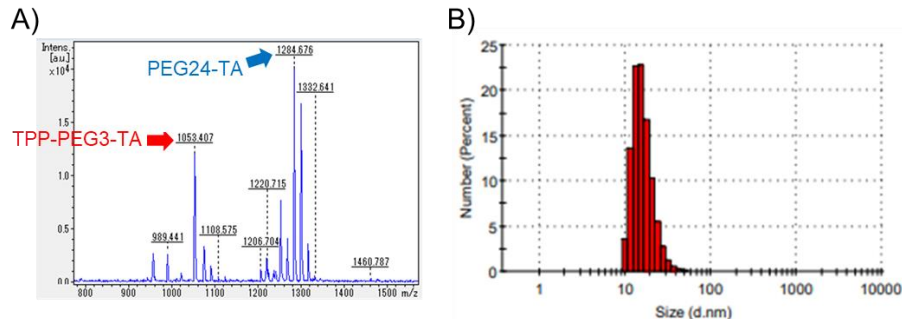


Fig. 2 Characterization of TPP-PEG-GNPs. (A) MALDI-TOF MS spectrum of TPP-PEG-GNPs. B) Hydrodynamic diameter of TPP-PEG-GNPs measured by dynamic light scattering in phosphate-buffered saline. The average diameter was 17 ± 5 nm.)

2.3 TPP-PEG-GNPs の ROS 産生能

TPP-PEG-GNPs の ROS 産生能を評価した。ROS 検出試薬である Aminophenyl Fluorescein (APF) の存在下で、サンプル溶液に青色 LED を 1 時間照射し、ROS と反応して APF から遊離するフルオレセインの蛍光強度を測定することで、ROS 産生能を評価した。その結果、TPP-PEG-GNPs は光照射により ROS を産生した。一方、対照として用いた TPP を固定化していない PEG-GNPs では、ほとんど ROS が産生されなかった。これにより、GNPs 表面に固定化された TPP によって ROS が産生されたことが示唆された（Fig. 3）。また、TPP から産生された ROS が GNPs に吸収され、有効な ROS の産生量が低下することが懸念されたが、TPP 誘導体と PEG-GNPs を単純に混合した場合と比較しても ROS 産生能に差はなかった。これらの結果から、TPP 誘導体の GNPs への固定化は、ROS 産生能に影響を及ぼさないことが示された。

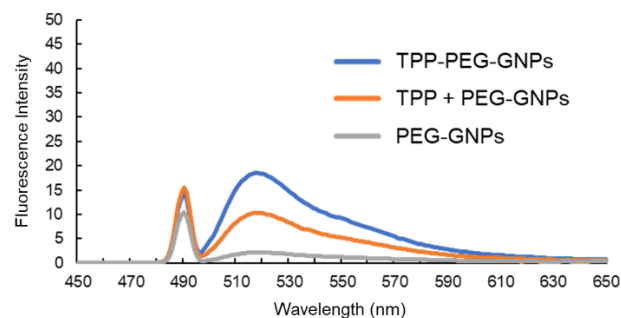


Fig. 3 ROS production induced by TPP-PEG-GNPs. (Sample solutions were irradiated with blue LED for 1 hour in the presence of APF. Fluorescence spectra were then measured with an excitation wavelength of 490 nm.)

2.4 TPP-PEG-GNPs の光照射に伴う細胞毒性評価

TPP-PEG-GNPs への光照射に伴う細胞毒性を MTT アッセイで評価した。ATL 患者由来細胞株である S1T 細胞に、TPP-PEG-GNPs、PEG-GNPs、または TPP-PEG3-TA 単体をそれぞれ加え、青色 LED を 1 時間照射した。その後、さらに 24 時間培養して、MTT アッセイを行った。その結果、TPP-PEG-GNPs および TPP-PEG3-TA 単体はいずれも光毒性を示し、TPP-PEG-GNPs は TPP-PEG3-TA と比較して、より強い光毒性を示した。一方、光照射しなかった細胞では、ほとんど細胞毒性は認められなかった (Fig. 4)。以上の結果から、TPP-PEG-GNPs は光照射により細胞死を誘導することが示唆された。この理由として、GNPs に固定化することで TPP の水分散性が向上し、より多くの細胞に対して PDT 効果を及ぼした可能性が考えられる。

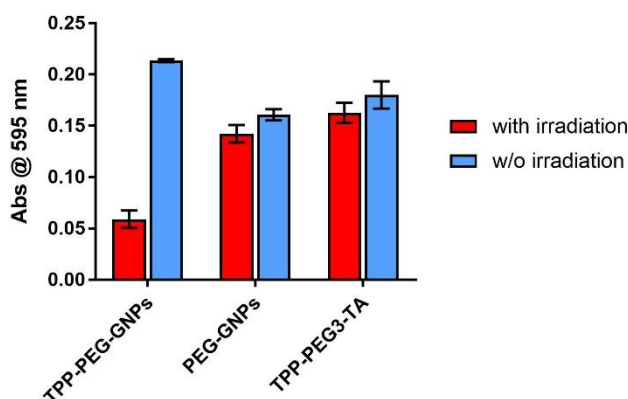


Fig. 4 Phototoxicity of TPP-PEG-GNPs against S1T cells. (S1T cells were irradiated with blue LEDs in the presence of 0.63 μ M TPP-PEG-GNPs, PEG-GNPs, or TPP-PEG3-TA. The cells were then incubated for 24 hours and subjected to the MTT assay. Data represent the mean $\pm$ standard deviation of three technical replicates).

2.5 scFv-TPP-GNPs の調製

TPP-PEG-GNPs が優れた光毒性を示すことが明らかになったため、既報⁶⁾を参考に scFv と TPP を共固定化した GNPs の調製を試みた。まず、TPP-PEG-GNPs に Ni-NTA-TA を共固定化した TPP-Ni-NTA-PEG-GNPs を調製した。DLS 法により PBS 中での流体力学的粒径を測定したところ、粒径は約 14 nm であった。これは、TPP-PEG-GNPs と同程度であり、Ni-NTA-TA の共固定化は、水分散性に影響しないことが示唆された。

次に、TPP-Ni-NTA-PEG-GNPs 上の Ni-NTA に scFv の固定化を試みた。GNPs に対して 1 当量の scFv 溶液を添加し、超遠心分離後、GNPs を含む沈殿画分と上清画分に分離して、SDS-PAGE で固定化の有無を解析した。その結果、scFv のほとんどが上清に存在し、Ni-NTA-TA の固定化の有無にかかわらず GNPs 表面への固定化はほとんど認められなかった。この結果から、Ni-NTA-TA の分子サイズが親水化剤として用いた PEG24-TA に比べて小さいため、scFv の固定化が阻害されたことが示唆された。したがって、scFv の固定化には、PEG24 による立体障害を回避できる十分な長さのリンカーを有する NTA 誘導体が必要であると考えられる。

3 結論

本研究では、ATL に対する PDT の開発を目的として、光感受性物質となる TPP および scFv を共固定化した GNPs の調製を検討した。得られた TPP-PEG-GNPs を用いて ATL 細胞株である SIT 細胞に対する光毒性を評価した結果、TPP-PEG3-TA 単独よりも高い光毒性を示し、優れた光感受性物質になることが示唆された。一方、ATL 細胞への送達を担う scFv の固定化については、Ni-NTA の固定化に用いるリンカーの再設計が必要であることが明らかとなった。今後、デザインの最適化を進め、TPP と scFv を共固定化した GNPs が調製できれば、ATL に対する新たな治療法の開発につながると期待できる。

4 謝辞

本研究課題を遂行するにあたり、研究助成を頂いた公益財団法人サンケイ科学振興財団に心から感謝申し上げます。

5 引用文献

- 1) Ancély F.S., Daria R. Q.A., Leticia F.T., Maurício S.B., Leticia L., Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. *Cancer Metastasis Rev.* (2019), 5, 25
- 2) Adrienne A.P., Janine C.K.H., Adult T Cell Leukemia-Lymphoma (ATL): State of the Art. *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2018), 13, 300–307.
- 3) José F.A., Mario O., Pablo R. V., Luís R. C., José M.L.H., Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers* (2021), 13, 4447.
- 4) Muchima K., Todaka T., Shinchi H., Sato A., Tazoe A., Aramaki R., Kakitsubata Y., Yokoyama R., Arima N., Baba M., Wakao M., Ito Y., Suda Y., *J. Biochem.* (2018), 163(4), 281–291.
- 5) Shinchi H., Yamaguchi T., Moroishi T., Yuki M., Wakao M., Cottam H.B., Hayashi T., Carson D.A., Suda Y., Gold Nanoparticles Coimmobilized with Small Molecule Toll-Like Receptor 7 Ligand and alpha-Mannose as Adjuvants. *Bioconjugate. Chem.* (2019), 30, 2811–2821.
- 6) Tateo S., Shinchi H., Matsumoto H., Nagata N., Hashimoto M., Wakao M., Suda Y., Optimized immobilization of single chain variable fragment antibody onto non-toxic fluorescent nanoparticles for efficient preparation of a bioprobe. *Colloids Surf. B* (2023), 224, 113192.

Study on the development of a photosensitizer for photodynamic therapy against adult T-cell leukemia

Hiroyuki Shinci

Graduate school of Science and Engineering, Kagoshima University,
1-21-40 Korimoto, Kagoshima, 890-0065
TEL: +81-99-285-7843

Summary

Adult T-cell leukaemia (ATL) is a haematological malignancy caused by infection with human T-cell leukaemia virus type I, with a particularly high incidence in the Kyushu and Okinawa regions of Japan. Despite its aggressive progression and poor prognosis, no effective curative treatments have been established. Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic approach that utilize photosensitizers to generate reactive oxygen species upon light irradiation, leading to selective cell death. In this study, we aimed to develop an effective photosensitizer for PDT targeting ATL cells. Initially, we prepared gold nanoparticles (GNPs) co-immobilized with tetra-phenylporphyrin (TPP) as a photosensitizer and polyethylene glycol (PEG)

as a hydrophilic agent. The phototoxicity of the resulting TPP-PEG-GNPs was evaluated against ATL cell lines. TPP-PEG-GNPs induced enhanced ROS production and cytotoxicity compared to unconjugated TPP, highlighting their potential as photosensitizers for PDT. Furthermore, we investigated the immobilization of a single-chain variable fragment (scFv) antibody to achieve selective delivery of the nanoparticles to ATL cells. However, optimization of the linker design was found to be necessary for efficient scFv immobilization. Once the linker design is optimized, scFv-immobilized TPP-PEG-GNPs may serve as an effective photosensitizer for the development of novel PDT strategies against ATL.