

酸化ストレスと免疫原性細胞死の 関係理解に基づくがん治療法の開発

金子 真 大*

Cancer Treatment Based on an Understanding of the Relationship between Oxidative Stress and Immunogenic Cell Death

Masahiro KANEKO*

Rational molecular design guidelines are needed for the high-efficiency induction of immunogenic cell death (ICD). We employed cell-penetrating redox phospholipid polymers to elicit oxidative stress in cancer cells. This study aimed to systematically examine how the site and nature of oxidative stress generation relate to ICD-associated markers. We synthesized a redox phospholipid polymer (PMFT) incorporating a mitochondria-targeting moiety (TPP) and evaluated its subcellular localization, oxidative-stress-inducing capability, and anticancer activity in mouse colon cancer CT26 cells, along with cell-surface calreticulin (CRT) exposure as an ICD marker.

1. 研究背景

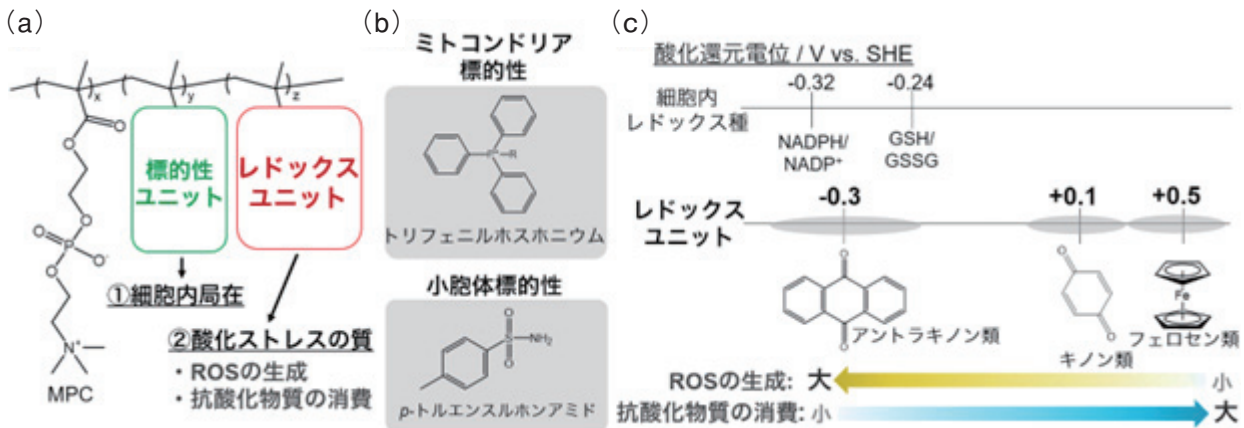


図1 (a) 本研究で用いるレドックスポリマーの構造式. (b) 標的性ユニットの構造式. (c) レドックスユニットの構造式.

がんはその強固な代謝・増殖活性に起因して細胞内の活性酸素種（ROS）レベルが増大しており、正常細胞に比べ酸化ストレスに対して脆弱である。したがって、酸化ストレスを誘導するレドックス分子は新たな抗がん剤候補となる。さらに、酸化ストレスを誘導する抗がん剤の一部は、免疫系に認識されやすい様式の細胞死（免疫原性細胞死；ICD）を誘導しうる。ICDを起こしたがん細胞は、ダメージ関連分子パターン（DAMPs）とよばれる分子群を放出し、抗腫瘍免疫を惹起する。ICDの誘導は、原発がんのみならず残存がん細胞や転移がんの根絶が期待できるため、がん治療の強力な武器となる。しかし、どのような薬剤が効果的にICDを誘導できるかは未解明である。我々は、細胞膜透過型のレドックスポリマーを開発し、細胞内のレドックスバランスを制御する技術を独自に開発してきた¹⁻³⁾。このポリマーは、高い親水性と細胞親和性をもつ2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine (MPC) ユニットと、レドックスユニットにより構成される。ポリマーは単純拡散により細胞膜を透過し、細胞内の分子と電子授受することで酸化ストレスを誘導する。本研究では、レドックスポリマーの分子設計に基づき系統的に酸化ストレスを誘導することで（図1）酸化ストレスとICDの関係を明らかにすることを目指した。

2026年3月1日 受理

* 豊田理研スカラー

名古屋大学大学院工学研究科化学システム工学専攻

2. 実験方法

フリーラジカル重合によって、MPCとvinyl ferrocene (VF) を重合することでpoly(MPC-co-VF) (PMF), MPCとVFと4-vinylbenzyl(triphenyl)phosphonium chloride (VTPP) を重合することでpoly(MPC-co-VF-VTPP) (PMFT) を合成した。また、フルオレセインにより蛍光標識されたPMFおよびPMFTを合成した。ポリマーの細胞内局在観察のため、マウス結腸癌CT26細胞培地に蛍光標識されたポリマーを添加し、1時間後に共焦点顕微鏡による細胞観察をおこなったCT26細胞の培地にポリマーを添加し、1時間後に蛍光ROSプローブを用いて細胞内ROSレベルをフローサイトメトリーによって評価した。さらに、CT26細胞の培地にポリマーを種々の濃度で添加し、24時間後の細胞生存率を測定した。さらに、ポリマー添加24時間後に、フローサイトメトリーにより、アポトーシスアッセイとカルレティキュリン (CRT) 露出量を評価した。

3. 結果と考察

本研究では、レドックスユニットとしてVF、標的性ユニットとしてミトコンドリア指向性を有するVTPPを用いて、PMFおよびPMFTを合成した。蛍光標識したポリマーを用いてCT26細胞内の細胞内局在特性を観察したところ、PMFは細胞内全体に分布していたのに対して、PMFTは主に細胞質に存在する傾向が認められた (図2)。MitoTrackerを用いてミトコンドリアとの共局在性を検討したところ、PMFTではmerge画像において、共局在を示す黄色い領域がより顕著に認められた。さらに、画像解析により、Pearsonの相関係数を算出したところ、PMFTはPMFよりも有意に高い値を示した ($p < 0.001$)。この結果は、VTPPユニットの導入により、レドックスポリマーにミトコンドリア指向性が付与されたことを示している。

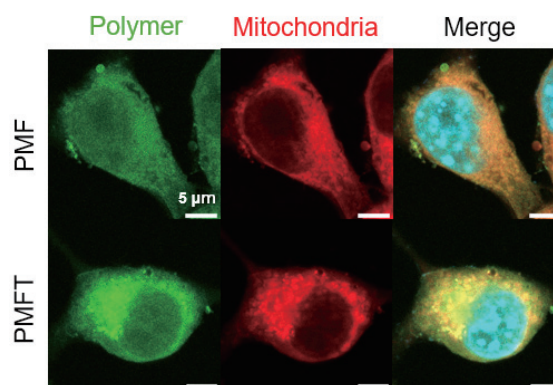


図2 CT26細胞の共焦点顕微鏡画像。

次いで、ポリマー添加後の細胞内ROSレベルを評価したところ、PMFTを添加した細胞はPMFを添加した細胞に比べて高いROSレベルを示した。また、PMFTを添加した系では、より大きく細胞生存率が低下する傾向が認められ、アポトーシスが惹起された細胞の割合が増加していた。さらに、ICDマーカーとして細胞外に露出したCRTの発現量を評価したところ、ポリマーの添加によりCRTレベルが増加し、PMFTではその増加がより顕著であった。以上の結果は、レドックスポリマーへのミトコンドリア指向性の付与により、抗がん活性のみならずICDの誘導機能が增强されることを示唆している。

4. 今後の展望

本研究では、細胞膜透過性レドックスポリマーにミトコンドリア指向性ユニット (VTPP) を導入することで、細胞内局在制御、ROS誘導能、細胞死誘導、ならびにICDマーカーのCRT露出の増強が起ころうることを示した。今後はまず、ICD誘導の妥当性をさらに検証するため、CRT露出に加えて、他のICDマーカーであるATP、HMGB1の放出などを評価する必要がある。また、レドックスユニットをフェロセンからキノン類等に変更したり、標的性ユニットを小胞体標的性ユニットに置換したりすることで、がん細胞に対して様々な酸化ストレスを誘導できるポリマー群の構築を目指す。

REFERENCES

- 1) M. Kaneko, *et al.*, *Biomacromolecules.*, **20** (2019) 4447.
- 2) M. Kaneko, *et al.*, *ACS Macro Lett.*, **10** (2021) 926.
- 3) M. Kaneko, *et al.*, *Cancer Sci.*, **113** (2022) 3558