

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01296

研究課題名(和文) 光線力学的酸化処置による抗がん剤耐性獲得細胞の耐性低減化に関する研究

研究課題名(英文) Reduction of acquired resistance to anti cancer drug in cultured cells through photodynamic therapy

研究代表者

宮本 裕一 (Miyamoto, Yuichi)

埼玉医科大学・保健医療学部・教授

研究者番号：00313718

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、P-gpを過剰発現するタイプの抗がん剤耐性獲得細胞の耐性低減に対するPDTの有効性を、光増感剤にPhotofrin(Ph)を用いて検討した。

Phと細胞との接触は、血清含有培地(Ph細胞内拡散モデル)またはPBS(Ph細胞膜局在モデル)にPhを懸濁、インキュベーションすることで行い、これら二種類のモデルを適用したPaclitaxel(TXL)耐性獲得HeLa細胞について、PDTによる耐性低減効果を比較検討した。Ph細胞内拡散モデルに対するPDTは、顕著なTXL耐性の低減効果を示さなかったが、Ph細胞膜局在モデルでは、薬剤排出能の低下を認め、TXL耐性の低減化がなされた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we evaluated the potential of PDT to reduce acquired resistance to anticancer agents in cell types over-expressing P-glycoprotein (P-gp), a membrane-bound drug efflux transporter. Photofrin(PF) was used as the photosensitizing agent. Irradiation was performed in the range of 0.5-3.0 J/cm<sup>2</sup>, which did not lead to any significant cytotoxic effect. The contact between PF and target cells was facilitated by adding PF in (1) a serum-containing culture medium (Protocol 1), and (2) phos-phate-buffered saline (Protocol 2). HeLa cells were incubated in these two culture media. A comparative assessment was employed to evaluate the capacity of PDT to reduce acquired resistance to paclitaxel (TXL) in these cells. Although there was no significant reduction in TXL resistance by PDT in Protocol 1, a decrease in drug efflux activity was obtained in Protocol 2, indicating a reduction in TXL resistance.

研究分野：医用生体工学

キーワード：生体制御・治療 光線力学療法

## 1. 研究開始当初の背景

Paclitaxel (TXL) は、卵巣がん、非小細胞肺癌、乳がん、胃がん、子宮体がんに適応が認められる植物アルカロイドに分類される抗がん剤であり、その継続的な暴露によって、対象細胞に薬剤排出トランスポーター、P-glycoprotein (P-gp) を誘導する[1]。P-gp は、ABC トランスポータースーパーファミリーに属する細胞膜上に存在するタンパク質であり、ATP 結合領域に ATP が結合、加水分解して得られるエネルギーを利用して TXL を能動的に排出するが、TXL 以外にも化学構造や作用機序の異なる多種多様な薬剤や化学物質を細胞外へと排出する性質を持つ[2, 3]。すなわち、広範な基質選択性を有する典型的な多剤排出トランスポーターであり、複数の基質を能動的に排出するその機能は、多剤耐性を示す主たる要因と考えられている[4]。

P-gp の過剰発現は、多くのがんに対する予後不良に密接に関係しており、このタンパクの発現を如何に抑制するかが、がん治療領域において大きな課題となっている[5]。たとえば、Sugimoto らは、阻害剤を P-gp の基質結合部位に競合的に結合させることで排出を阻害することを[6]、Roy らは抗がん剤を高分子ミセルに包含した上で使用することで P-gp の発現を抑制することが可能であることを報告している[7]。

光線力学的治療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は、レーザーによる癌治療法の一つであり、身体に対して侵襲の少ない、表在性早期がんの根治的療法として確立されている[8]。PDT はがん患者にあらかじめ腫瘍親和性の光感受性物質を投与し、それが病巣部に蓄積したのを見計らい、レーザー光の照射によりこれを励起、活性酸素種を誘起する光化学反応を介して、がんを酸化壊死させる方法である。近年、PDT は表在性早期がんの根治を意図するばかりではなく、悪性脳腫瘍摘出術における支援[9]、眼科領域での加齢黄斑変性症に対しても[10]、その適応を拡大している。PDT は患者の QOL を考慮した低侵襲治療法の代表的な存在であり、その安全性も高く、他の治療法とのコンビネーションも可能であるという利点もあり、さらなる応用範囲の拡大の期待が高まっている[11]。このような背景を踏まえ、著者もまた PDT の新たな可能性を探るという観点から研究を進めており、(1) 低出力赤色レーザー光励起 PDT による一時的な細胞増殖の活性化、(2) PDT 併用によるプレオマイシンの細胞傷害作用の増強効果を報告してきた[12, 13]。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上記の研究において見出してきた、著しい細胞死を誘導しないレベルの PDT が、細胞の機能制御という側面を有することに着目、特に細胞膜上にキートとなるタンパクが存在する TXL 耐性獲得細胞の耐性低減に対し、PDT が有効であるのかどうかを検

討することにある。

## 3. 研究の方法

### (1) 試薬および試料

試料はヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞を使用した。各培地は 10%牛胎児血清と 1%抗生物質を加えた Ham's F-10 培地を、HeLa/TXL 細胞には Ham's F-10 培地に TXL を加えたものを使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub>-95% air の環境下に培養した。光感受性物質の細胞への接触やリンス時には Phosphate buffered saline (-) (PBS(-)) を用いた。XTT viability assay には XTT 試薬 Cell Counting Kit-8 (株同仁化学研究所) を、P-gp の蛍光抗体には 10 Test® CD243 (P-glycoprotein)-PE (BECKMAN COULTER, 以下、10 Test®) を使用した。

### (2) HeLa/TXL 細胞の作製と耐性の評価

HeLa/TXL 細胞は、Takara らの報告に基づいて作製した[14]。HeLa 細胞を TXL 濃度 10 nM に調製した培地にて 2 ヶ月間培養、さらに TXL 濃度を 20 nM に調製した培地にて 1 ヶ月間培養した。その後の HeLa/TXL 細胞の継代培養にも当該培地を用いた。TXL に対する耐性の評価は、XTT viability assay による細胞生存率を指標とした。XTT viability assay は、テトラゾリウム塩の還元により生細胞数を解析する発色検出法であり、細胞内ミトコンドリアの脱水素酵素の働きによって生じる水溶性ホルマザン量が、生存細胞数に良い相関を示すことから、培養細胞の生存率の評価に汎用されている[15]。ここでは、TXL の濃度を 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM, 10 μM と段階的に高め、各 TXL 濃度における細胞生存率を XTT viability assay によって測定した。

HeLa 細胞および HeLa/TXL 細胞を 96-well フラットボトムプレート (IWAKI, 3860-096) の各 well に  $5.0 \times 10^4$  cells/100 μl の密度にて播種し、24 時間インキュベートした後、各 well の培地を通常培地あるいは上記の各濃度に調製した TXL 含有培地に置換、48 時間インキュベートした。培地の置換から 48 時間後、各 well に XTT 試薬を 10 μl 添加、遮光して 2 時間培養した後、マイクロプレートリーダー (Bio-Rad 社, iMark) にて吸光度を測定した。この結果に基づき、HeLa および HeLa/TXL 細胞それぞれの細胞増殖阻害曲線を作成、50%増殖阻害濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を算出し、HeLa/TXL 細胞および HeLa 細胞それぞれの IC<sub>50</sub> 値から、作製した HeLa/TXL 細胞の TXL に対する耐性の程度を評価した。

### (3) P-gp 発現量の相対評価

HeLa/TXL 細胞の P-gp が過剰発現状態にあることを確認するため、10 Test® を用いたフローサイトメトリーによって、HeLa 細胞の P-gp 発現量との比較を行った。10 Test® は、PE (Phycoerythrin) にて蛍光標識された抗 CD243 (P-gp) 抗体であり、P-gp の細胞外エピトープを認識して結合する。そのため、各細胞の PE 由来の蛍光をフローサイトメーターによって測定し、ヒストグラムを得ることで、

HeLa細胞とHeLa/TXL細胞それぞれのP-gpの発現量を相対的に比較することができる。HeLa細胞およびHeLa/TXL細胞を96wellプレートに $5.0 \times 10^4$  cells/wellにて播種、24時間培養した後、10 TEST<sup>®</sup>を添加し、室温で20分間負荷した。その後トリプシン処理によりプレートから細胞を剥離して回収、遠心処理した後、フローサイトメーター(MILLIPORE社, Guava Easy Cyte Plus)にて10 Test<sup>®</sup>陽性細胞数を測定した。

#### (4) 励起レーザー光の照射方法

PDTに用いる励起レーザー光源には、小型ダイオードレーザー(TOPTICA Photonics社, IBEAM-SMART-640-S, 640 nm, 150 mW)を採用、レーザー光の照射パワー密度は $5 \text{ mW/cm}^2$ 、総照射量は $0.5 - 3.0 \text{ J/cm}^2$ の範囲とした。

#### (5) 光感受性物質の接触プロトコール

光感受性物質にはPhotofrin<sup>®</sup>(ファイザー株式会社, フォトフリン<sup>®</sup> 75 mg 静注用X以下, PFとする)を用いた。

PDTによる細胞傷害部位は、光感受性物質の分布部位に依存するため[16,17]、細胞膜上にP-gpが過剰発現することで、薬剤耐性を獲得しているHeLa/TXL細胞の耐性低減をPDTにて図るためには、細胞質内よりも細胞膜上において効率的に光酸化作用を生じさせることが有効と考えられる。そこで本研究では、PFの細胞内分布が異なる細胞を比較検討するという意図から、以下の二種類の光感受性物質の接触方法、PFを培地に懸濁したPF含有培地を作製、これを通常培地と置換し、15分間インキュベーションすることで細胞に接触させる手順(以下、「プロトコール1」とする)、PFをPBS(-)に懸濁したPF含有PBS(-)を作製、これを通常培地と置換し、15分間インキュベーションすることで細胞に接触させる手順(以下、「プロトコール2」とする)を設定することで、細胞におけるPFの分布状態が、PDTによる耐性低減に与える影響を検討した。

#### (6) HeLa細胞およびHeLa/TXL細胞の細胞傷害効果に与えるTXLとPDTの影響評価

各細胞群の細胞傷害効果の評価は、XTT viability assayにて行った。

HeLa細胞およびHeLa/TXL細胞を96-wellプレートの各wellに $5 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{l}$ で播種し、24時間インキュベートした。プロトコール1の場合、各wellの培地をPF含有培地(PF濃度:  $10 \mu\text{g/ml}$ )へと置換、15分間接触させた。プロトコール2の場合、各wellの培地をPF含有PBS(-)(PF濃度:  $10 \mu\text{g/ml}$ )へと置換、15分間接触させた。その後、これを取り除き、PBS(-)を用いてリンスを行い、通常培地あるいはTXL含有培地(TXL濃度:  $10 \text{ nM}$ )に置換し、PDTを行った。実験群は、

HeLa細胞、TXL含有培地を負荷したHeLa細胞(HeLa+TXL ( $10 \text{ nM}$ )), HeLa/TXL細胞、TXL含有培地を負荷したHeLa/TXL細胞(HeLa/TXL+TXL ( $10 \text{ nM}$ ))の計4群とし、一つの実験群あたり、4-6のwell数にて構

成した( $n = 4-6$ )。PDT実施から48時間経過後、各wellにXTT試薬を $10 \mu\text{l}$ 添加し、遮光して2時間培養後、マイクロプレートリーダー(Bio-Rad社, iMark)にて吸光度を測定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) HeLa/TXL細胞の耐性度とP-gp発現量の相対的評価

HeLa細胞の50%増殖阻害濃度は $7.8 \text{ nM}$ であったのに対して、HeLa/TXL細胞のそれは $79.4 \text{ nM}$ であった。相対的なTXL耐性度を算出すると $10.2$ となり、Takaraらの結果とほぼ同等な値が得られたものと考えた[14]。10 Test<sup>®</sup>を用いたP-gpの半定量評価において、HeLa細胞の蛍光強度は $25.8$ 、HeLa/TXL細胞では、 $107.8$ となり、HeLa/TXL細胞の蛍光強度は、HeLa細胞のそれよりも約 $4.2$ 倍高く、HeLa/TXL細胞のP-gpの過剰発現状態を反映するものとなった。これは統計学的にも有意であった( $p < 0.0001$ , Student-t)。

##### (2) 培地による細胞へのPF接触モデル(プロトコール1)の細胞傷害効果

HeLa細胞にPDTのみを実施した群では、照射量 $3.0 \text{ J/cm}^2$ における細胞生存率は44%にて維持されていた。TXL濃度 $10 \text{ nM}$ に調製された培地におけるHeLa細胞では、照射量 $0.5 \text{ J/cm}^2$ までは、TXLのみを負荷したものと同等の50%程度の細胞生存率を維持していたが、 $1.0 \text{ J/cm}^2$ では25%、 $3.0 \text{ J/cm}^2$ では10%まで低下した。つまり $1.0 \text{ J/cm}^2$ 以上の照射量では、PDTによるTXLの増強効果が重畳されるものと思われる。HeLa/TXL細胞に対しては、いずれの照射量においても、細胞生存率が80%以上維持されており、またTXL濃度 $10 \text{ nM}$ に調製された培地下においても、この傾向にほとんど変化はなく、照射量 $3.0 \text{ J/cm}^2$ 時においても77%の細胞生存率が確保されていた。

##### (3) PBS(-)による細胞へのPF接触モデル(プロトコール2)の細胞傷害効果

HeLa細胞の細胞生存率は、照射量 $3.0 \text{ J/cm}^2$ において、22%程度まで低下し、プロトコール1適用時と比較して、細胞傷害効果が比較的強く出る結果となった。TXL濃度 $10 \text{ nM}$ に調製された培地下におけるHeLa細胞では、照射量 $0.5 - 1.0 \text{ J/cm}^2$ までは約50%前後の細胞生存率を維持していたが、 $3.0 \text{ J/cm}^2$ では19%まで低下した。

HeLa/TXL細胞では、いずれの照射量においても80%以上の細胞生存率が確保されていた。これらの数値はプロトコール1適用時の細胞生存率と同等であり、統計学的にも有意差は生じなかった。一方、TXL濃度 $10 \text{ nM}$ に調製された培地下では、照射量 $3.0 \text{ J/cm}^2$ において、細胞生存率が46%まで低下した(\* $p < 0.01$  vs プロトコール2によるPF接触モデルHeLa/TXL( $3.0 \text{ J/cm}^2$ ), プロトコール2によるPF接触モデルHeLa/TXL+TXL( $10 \text{ nM}$ ) ( $0 \text{ J/cm}^2$ : PDTなし))。

本研究の結果では、細胞膜上のPFが比較

的高濃度であったと考えられるプロトコール2を適用したHeLa/TXL細胞にTXL(10 nM)を負荷,さらに3.0 J/cm<sup>2</sup>の光照射を行った群において,プロトコール1のそれよりも,細胞生存率の低下が有意であった.このことは,薬剤耐性獲得細胞の耐性低減をPDTによって実現するためには,細胞のどの部位に耐性に関与する物質が存在するかを見極め,それに光感受性物質の分布特性を合わせるかたちで適用しないと効果が得られないことを意味する.言い換えれば,今回効果の得られなかったプロトコール1を適用したPF分布モデルであっても,細胞内に耐性に関与する物質,メタロチオネンやグルタチオンが存在するシスプラチン耐性獲得細胞であれば,耐性の低減を示唆する結果が得られたのかもしれない.

本研究では,抗がん剤耐性獲得細胞の耐性を担うキー物質が,対象細胞のどの部位にあるのかを見極め,その上で適切な条件のPDTを併用することで,抗がん剤耐性獲得細胞の耐性を低減し得る可能性を示した.PDTは,低侵襲であり,また長年の治療実績から重篤な副作用がないことが明らかな治療法であり,その優位性を考慮すれば,薬剤耐性解消のための支援技術として検討の価値があるものと考ええる.

#### 参考文献

- Horwitz SB, Cohen D, Rao S, Ringel I, Shen HJ, Yang CP: Taxol: mechanisms of action and re-sistance. In: Proceedings of the Second National Cancer Institute Workshop on Taxol and Taxus. J Natl Cancer Inst Monogr. 15, pp. 55-61, 1993.
- 千熊雅彦,佐藤卓史,米田誠治: 次世代白金抗がん薬開発の現状. 薬学雑誌. 128(3) pp. 307-316, 2008.
- Naito S, Yokomizo A, Koga H: Mechanisms of drug resistance in chemotherapy for urogenital carcinoma. Int J. Urol. 6: pp. 427-439, 1999.
- Kerr ID, Jones PM, George AM: Multidrug efflux pumps: The structures of prokaryotic ATP-binding cassette transporter efflux pumps and implications for our understanding of eu-karyotic P-glycoproteins and homologues. FEBS J. 277: pp. 550-563, 2010.
- Gottesman MM, Fojo T, Bates SE: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat. Rev. Cancer 2: 48-58, 2002.
- Sugimoto Y, Tsukahara S, Ishikawa E, Mitsuhashi J: Breast cancer resistance protein: molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. Cancer Sci. 96(8): 457-465, 2005
- Roy A, Murakami M, Ernsting MJ, Hoang B, Undzys E, Li SD: Carboxymethylcellulose-based and docetaxel-loaded nanoparticles circumvent P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. Mol Pharm. 11(8): 2592-2599, 2014.
- 奥仲哲弥,加藤治文: 光線力学的治療法によるがん治療. レーザー研究. 24, pp. 860-865, 1996.
- 正宗 賢,岡本 淳,吉光喜太郎,掘瀬友貴,小西良幸,前田真法,田村学,丸山隆志,伊関 洋,生田聡子,村垣善浩: 脳神経外科領域における医療技術の動向. 映像情報 Medical. 48(1): pp. 16-20, 2016.
- 尾花明: 加齢黄斑変性症に対する光線力学的療法の応用. 日本レーザー医学会誌. 27, pp. 32-35, 2006
- 奥仲哲弥: PDT 適応拡大への課題. 日本レーザー医学会誌. 30(1): pp. 68-70, 2009.
- Miyamoto Y, Nishikiori D, Hagino F, Wakita M, Tanabe I, Toida M: Effect of 630-nm pulsed laser irradiation on the proliferation of HeLa cells in Photofrin®-mediated photodynamic therapy. La-ser Therapy. 20(2): pp. 135-138, 2011.
- Nishikiori D, Miyamoto Y: Enhancement of the cytotoxic effects of bleomycin with permeabilization of the plasma membrane by Photo-frin-mediated photodynamic therapy in vitro. IFMBE Proceedings. 43: pp. 711-713, 2013.
- Takara K, Obata Y, Yoshikawa E, Kitada N, Sa-kaeda T, Ohnishi N, Yokoyama T: Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to cisplatin or paclitaxel. Cancer Chemother Pharmacol. 58: pp. 785-793, 2006.
- Scudiero DA, Shoemaker RH, Paull KD, Monks A, Tierney S, Nofziger TH, Currens MJ, Seniff D, Boyd MR: Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Res. 48(17): pp. 4827-4833, 1988.
- Gaullier JM, Gèze M, Santus R, Sa e Melo T, Mazière JC, Bazin M, Morlière P, Dubertret L: Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. Photochem Photobiol. 62(1): pp.114-122, 1995.

17. Kessel D: Site of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. Photochem Photobiol. 44(4): pp. 489-493, 1986.

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

- [1] Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Tajima H: Effects of Photofrin-mediated photodynamic treatment on sensitivity to cisplatin in HeLa cells and the resistant subline. IFMBE Proceedings 61:13-15, 2017 (査読有)  
[https://doi.org/10.1007/978-981-10-4220-1\\_3](https://doi.org/10.1007/978-981-10-4220-1_3)
- [2] 宮本裕一: 光線力学的処置による Paclitaxel 耐性獲得 HeLa 細胞の耐性低減. 生体医工学 54(6):245-252, 2016(査読有)  
<https://doi.org/10.11239/jsmbe.54.245>

[学会発表](計 1 件)

- [1] Miyamoto Y, Yamaguchi Y, Tajima H: Effects of Photofrin-mediated photodynamic treatment on sensitivity to cisplatin in HeLa cells and the resistant subline. ICBME2016, Singapore, 2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 裕一 (MIYAMOTO YUICHI)  
埼玉医科大学・保健医療学部・教授  
研究者番号: 00313718