

令和 4 年 4 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16751

研究課題名（和文）PDT増感に対するNO関連メディエーターの役割解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of nitric oxide-related mediators for the enhancement of photodynamic therapy

研究代表者

伊藤 紘（Ito, Hiromu）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：80793934

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：光線力学療法（Photodynamic therapy: PDT）は光増感剤のがん細胞特異的集積現象と患部への低出力レーザー照射を組み合わせたがん治療法である。PDT用光増感剤ポルフィリンのがん細胞への集積には、がん細胞における活性酸素種の高産生とそれに伴うシグナル伝達に関わっていることをこれまで報告してきた。本研究では活性酸素種に加え、活性酸素との反応で生じる高反応性窒素化合物がマクロファージ細胞におけるポルフィリンの細胞内輸送を増強することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、腫瘍組織に付随するマクロファージが報告され、腫瘍の悪性化に関わることを明らかになってきた。また、本研究では活性化したマクロファージ細胞が高反応性の窒素化合物を産生し、細胞内へのポルフィリン集積を増加させることが明らかにされた。従って、腫瘍の悪性化に関わるマクロファージをPDTによって減少させることで、予後の改善もしくは腫瘍に対する治療効果の向上が期待される。PDT自体は侵襲性が低く施行による副作用も少ないことから、本研究成果はがん患者に対する新たなアジュバント療法の先駆けとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment which is combined with accumulation of photosensitizer in cancer tissue and low-power laser irradiation. It is reported that porphyrin compounds, which is used as a photosensitizer for PDT, accumulate in cancer cells specifically and the accumulation mechanism is related to the highly generated reactive oxygen species in cancer cells. In this study, it is clarified that not only reactive oxygen species but also highly reactive nitrogen species, which is subsequently generated by reactive oxygen species, enhanced intracellular porphyrin transportation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：活性酸素種 活性窒素種 一酸化窒素 光線力学療法 ポルフィリン

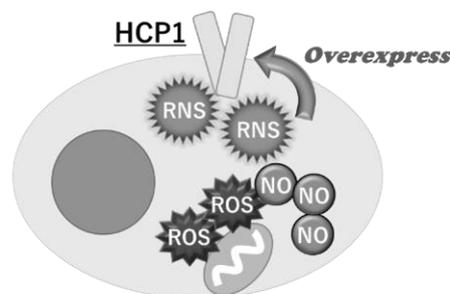
### 1. 研究開始当初の背景

がん治療は大きく分けて手術、放射線、抗がん剤およびこれらの併用が行われている。手術は治療法の第一選択となりやすいが、症例によって適応可否が大きく分かれるほか、宗教や年齢などの要因によっても適応されない場合がある。また、放射線や抗がん剤は正常組織に対する副作用によって、患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) を低下させる可能性がある。特に、放射線治療はコンピューター制御による照射範囲の絞り込みや粒子線を用いた治療により、高い治療効果と少ない副作用の両立が可能になりつつあるが、抗がん剤治療においては副作用を完全に無くするのは難しい状況である。一方で、現代社会においては高齢者人口の増加が著しく、それに伴って血栓症の患者数も増加している。従って抗血栓薬服用者数も増加しており、これらの患者は手術中の大量出血が治療の懸念材料となる。以上の社会的背景から、患者に対する侵襲性の低いがん治療法の開発が求められている。

光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) とは、がん細胞特異的に集積した光増感剤に特定波長の低出力レーザーを照射することで活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の一つである一重項酸素を発生させ、がん細胞死を誘発する治療法である。PDT 用光増感剤としてよく使われているポルフィリン骨格を有する化合物は、がん細胞への集積効率が良いことで知られている。しかし、一方でポルフィリンのがん細胞特異的な集積メカニズムは完全には解明されていなかった。申請者らはこれまでに、血液中の酸素運搬を担うヘムの輸送を行うタンパクとして発見された HCP1 が、ヘムだけではなくポルフィリンも輸送すること、HCP1 の発現機構には細胞内における活性酸素産生を介したシグナル伝達が関与していることを明らかにしてきた。一方で、がん細胞においては反応性の窒素化合物である一酸化窒素 (Nitric Oxide: NO) の産生も盛んに起こっており、がん細胞における様々なシグナル伝達に関与していることが明らかになってきた。さらに、NO はがん細胞内で盛んに産生される ROS の一種であるスーパーオキシドとの反応で、さらなる反応性活性種であるペルオキシナイトライトを生成する。一方で、多くの腫瘍組織においては腫瘍随伴マクロファージと呼ばれるマクロファージが集簇しており、NO に関連したシグナル伝達によって腫瘍の悪性化をサポートしていることが近年明らかになってきた。ところが、これら NO 関連分子によるポルフィリンの細胞内輸送およびその後の PDT 効果への関与については明らかにされてきておらず、ポルフィリン輸送の分子メカニズムおよび PDT によるがん治療効果のさらなる効率化を考える上では PDT に対する NO とそれに付随する反応性窒素化合物 (Reactive Nitrogen Species: RNS) の関連性の解明が必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では、NO および NO と ROS の反応によって生成するさらなる反応性活性種ペルオキシナイトライトが、HCP1 の発現制御とその後の細胞内ポルフィリン輸送に与える影響について検討することを目的とする (図 1)。これまでに取り組んできた HCP1 の発現に対する ROS の影響に加え、NO とその後の反応物である RNS の関連性について明らかにする。



活性窒素 (RNS ← ROS+NO) が HCP1 の発現を上昇??

ポルフィリン取り込み増強?

図 1 本研究の目的

### 3. 研究の方法

マウス由来マクロファージ細胞 RAW264 にリポ多糖 (LPS) を作用させることで誘導型 NO 合成酵素 (inducible NO synthase: iNOS) の発現を亢進させ、細胞からの NO 産生を誘導した。また、細胞への X 線照射は細胞内活性酸素、特にミトコンドリアから産生されるスーパーオキシドの産生量を増加させることが知られている。従って、LPS を作用させて NO 産生量を増加させたマクロファージ細胞に X 線を照射することで、NO とスーパーオキシドの反応によって生成するペルオキシナイトライトの産生を誘導した。また、ペルオキシナイトライトを産生する条件においてポルフィリンを細胞に曝露し、細胞内ポルフィリン集積量の変化を計測したほか、HCP1 の発現量をウエスタンブロッティングによって検討した。

### 4. 研究成果

RAW264 細胞へ LPS (1 µg/mL) を 24 時間曝露し、NO 産生量変化を蛍光試薬 DAF-FM DA を用いた顕微鏡観察によって検討したところ、蛍光強度の増加が観測された。また、LPS 処理後の細胞からタンパクを抽出し、iNOS の発現をウエスタンブロッティングによって確認したと

ころ、LPS 処理による iNOS の発現上昇が確認された (図 2, 引用文献 1)。また、細胞への X 線照射 (1 Gy/min, 20 Gy) を行った後に細胞から産生される活性酸素の産生量を蛍光試薬 HPF によって計測した。X 線照射後 1, 2, 4 時間後に HPF をそれぞれ曝露したところ、X 線照射後時間が経つに従って蛍光量の増大が確認された。また、照射後 24 時間経過後においては 4 時間経過時点の蛍光量に比べて減少していた。従って、以降の LPS 処理と X 線照射によるペルオキシナイトライト産生実験では、X 線を照射した 4 時間後にそれぞれアッセイ実験を行った。LPS 処理および X 線照射後のペルオキシナイトライト産生量を測定したところ、未処理群、LPS 単独処理群および X 線単独処理群に比べて有意に産生量が増加していた。また、細胞へのポルフィリン集積実験においても、LPS+X 線処理を行った細胞では他の群に比べて有意にポルフィリン集積量が亢進していた

(図 3, 引用文献 1)。加えて、ウエスタンブロッティングによる HCP1 発現量解析においても、LPS+X 線照射群では有意な発現量の増大が確認された (図 4, 引用文献 1)。一方で、細胞内ポルフィリン集積および HCP1 発現量解析において、LPS 単独処理群、つまり NO 産生増大群での増加傾向が確認された。ここで、HCP1 の発現制御には低酸素環境が関与しているとの報告がなされている。低酸素環境においては低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor: HIF) の発現が安定化し、新たなシグナル伝達経路を介してタンパクの発現制御を行うことが知られている。一方で NO は、通常酸素濃度下において HIF のタイプの中の一つである HIF-1 $\alpha$  の分解に関わるプロリン水酸化酵素の活性低下を招き、HIF-1 の安定化を誘導する。従って、LPS 処理による NO 産生増強によって HIF-1 $\alpha$  が安定化された結果、HCP1 の発現上昇が誘導され、ポルフィリン取り込みが増加傾向に転じたものと思われる。

マクロファージ細胞におけるポルフィリン集積の上昇は、臨床においてはその後の PDT による腫瘍随伴マクロファージの細胞死誘導を介して腫瘍細胞本体の弱体化につながる可能性がある。本研究の実施は培養細胞での検討に留まったが、将来的な臨床応用に向けた知見獲得のためには動物を用いた事前検討が必須であることから、実際のレーザー照射による治療効果の検討も含めた動物実験への展開を今後思考していく。

【引用文献】

1. Hiromu Ito, Peroxynitrite Production Induced by LPS and X-ray Treatment Enhances Cellular Incorporation of Porphyrin in Mouse RAW264 Macrophages, Appl. Sci. 2021, 11(8), 3503.

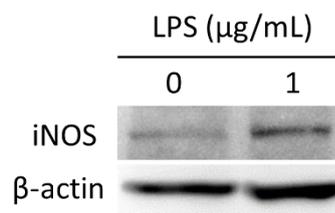


図 2 iNOS の発現解析

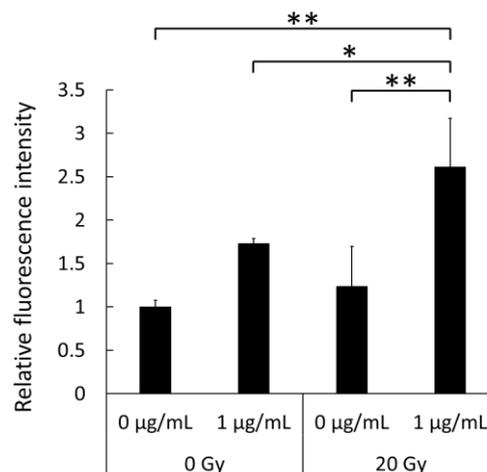


図 3 細胞内ポルフィリン集積解析

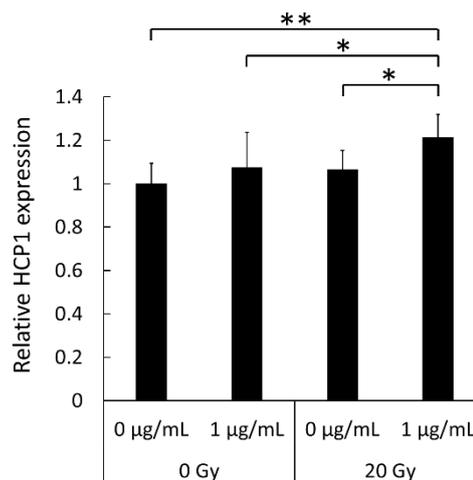
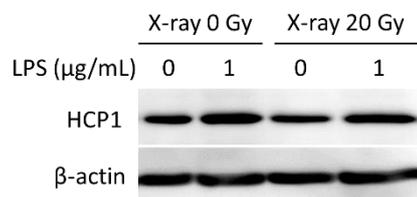


図 4 HCP1 発現解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Hiromu	4. 巻 11
2. 論文標題 Peroxynitrite Production Induced by LPS and X-ray Treatment Enhances Cellular Incorporation of Porphyrin in Mouse RAW264 Macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Applied Sciences	6. 最初と最後の頁 3503 ~ 3503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/app11083503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 紘
2. 発表標題 ペルオキシナイトライトはマクロファージ細胞においてポルフィリンの取り込みを増強する
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------