

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32409

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22800059

研究課題名（和文）光線力学的細胞膜微小酸化による細胞内物質導入技術の開発

研究課題名（英文）Development of the cytoplasmic molecular delivery by the photodynamic treatment inducing the mild oxidation of the plasma membrane

研究代表者

宮本 裕一（MIYAMOTO YUICHI）

埼玉医科大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：00313718

研究成果の概要（和文）：癌の根治的療法として確立されている光線力学的療法（Photodynamic therapy:PDT）は、細胞膜あるいは細胞内小器官を酸化傷害させることで抗腫瘍効果を得ている。本研究では、細胞死を誘導することのない PDT の実施条件を検索、細胞膜の微小酸化を誘起することで、(1)細胞内への巨大分子の導入が可能かどうか、(2)抗癌剤の増強効果が得られるかどうかを検討した。その結果、本研究にて適用した PDT は、HeLa 細胞の生存力を維持したまま、分子量 10 kDa 程度の巨大分子の導入が可能であること、および Bleomycin の細胞傷害効果を増強させ得ることを実証した。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) established as a curative treatment for the cancer has acquired anticancer efficacy by producing reactive oxygen species on the plasma membrane or the cytoplasmic organelle. In this study, I employed PDT inducing no remarkable cell injury and investigate whether the PDT (1) can deliver the macro molecule to the cell, (2) can enhance the cytotoxic effect of the anticancer drug. As the results, the PDT would transfer a molecule of 10 kDa or less through the plasma membrane of the HeLa cells and enhance the cytotoxic effects of Bleomycin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,020,000	306,000	1,326,000
平成 23 年度	1,120,000	336,000	1,456,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,140,000	642,000	2,782,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：生物・生体工学、ナノバイオ、細胞・組織、光線力学的治療

1. 研究開始当初の背景

近年、物理的因子（電気、応力波、超音波等）を利用した細胞内物質導入法が複数報告されており、培養細胞や動物組織を対象に一定の成果を挙げている。

物理的因子による細胞内への分子導入は、(1)その作用を局所に限定できる、(2)適用す

る物理量の変更が容易である、(3)他の手法との併用が可能等の利点があることから、臨床的にもそのニーズが高いと推察される。

光線力学的治療（Photodynamic therapy/treatment:PDT）は、光感受性色素（主にポルフィリン類似物質が多用される）を癌細胞に局在させ、これをレーザー光で励起、周囲の酸

素分子にエネルギー移乗することで癌細胞を酸化壊死させるメカニズムに基づくものである。

PDT は表在性早期癌の根治的療法として、その良好な臨床成績を背景に発展してきた経緯を有するが、1999年、ノルウェーの研究者らが、エンドサイトーシスによって細胞内のライゾゾームに取り込まれた巨大分子をライゾゾーム膜の光線力学的な酸化破壊によって細胞内にリリースする手法が報告され、PDT を細胞内への物質導入に用いる試みもなされている。しかしながら、本手法は、導入物質のエンドサイトーシスによる取り込みとライゾゾームへの移行が前提であり、遺伝子や抗癌剤の取り込みにおいて大きな問題となっている第一の障壁、細胞膜の透過性を積極的に亢進させるものではない。

これに対して本研究にて提案する手法は、あくまでも直接的に細胞膜透過性の亢進をはかることで、巨大分子の導入を促すものであり、細胞の能動的な取り込みという、言わば「細胞まかせ」の現象を待つものではない。研究代表者はこれまでに(1)PDT におけるレーザー光の照射モード(連続照射 or パルスの照射)および光感受性色素の接触プロトコルによって細胞傷害効果を制御できること、(2)ナノ秒パルス波レーザー光励起の PDT により、ヒト子宮頸癌由来培養細胞の細胞膜表面に細胞の Viability を保ったまま、複数の孔を形成できること、(3)さらに当該細胞群の最大 7%が分子量 71.6kDa の FITC-dextran (FITC-D)分子を取り込むことを明らかにしてきた。

これらの所見から、研究代表者は「ある条件下におけるパルス波レーザー光励起 PDT は、細胞膜の一時的な膜損傷(孔形成)を起し、その損傷部位(孔形成部位)は巨大分子の導入のパスとなる。細胞内に分子が導入されるメカニズムは、損傷部位を通しての拡散によるのではないか」という仮説を持つに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、上記にて言及したこれまでの研究成果を踏まえ、(1) PDT を利用した細胞内への物質導入技術の提案、(2) 細胞膜透過性が低いゆえに、十分な制癌効果を発揮できず、深刻な副作用を惹起することで知られる Bleomycin の抗癌剤の抗腫瘍効果が、PDT の細胞膜透過性亢進作用により、増強され得ることを実証することにある。

3. 研究の方法

(1) PDT による細胞内への物質導入

①PDT 条件の検討：細胞を死に至らしめることなく、細胞膜のみを微小酸化させるためには、光感受性色素およびその接触プロトコル、そしてレーザー光の照射量の適切な選定

が必要である。ここでは、光感受性色素に最も臨床実績が豊富な Photofrin®を採用、その適用濃度を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 固定とし、レーザー光の照射量をコントロールすることで、著しい細胞傷害効果を有しない PDT 条件を、XTT viability assay (XTT assay) を用いて検討した。照射パワー密度は 50 mW/cm^2 一定とし、照射量のみ 1, 3, 5 J/cm^2 と変化させた。レーザー光源には Spectra Physics 社製波長可変レーザー MOPO-710 (波長 630 nm, 繰返し周波数 10 Hz, パルス半値全幅 7-9 ns)

②PDT による細胞内への物質導入とその形態評価：①にて検索した条件の PDT を、HeLa 細胞に適用し、細胞外物質の細胞内への導入を試みた。導入物質には細胞膜不透過性の Propidium Iodide (PI, 分子量 670 Da)、Texas Red-Dextran (TR-D, 分子量 10 kDa) を用いた。HeLa 細胞の生存力の確認は Calcein-AM を同時に染色し、緑色蛍光を呈する細胞を生細胞と判断した。当該細胞群の観察には、AquaCosmos /1 分子蛍光イメージングシステム(浜松ホトニクス社製)を用いた。

(2) PDT による Bleomycin (BLM) の細胞傷害効果の増強作用の評価

①XTT assay による BLM の適用濃度の検討：HeLa 細胞培養液に BLM を添加することで、BLM そのものの細胞傷害効果を評価した。BLM 濃度は、0.5 μM , 5 μM , 50 μM , 100 μM の 5 群を設定した。②PDT 併用時における BLM の細胞傷害効果：適用する PDT と BLM の濃度は(1) ①および(2)①の結果に基づき決定した(照射パワー密度 50 mW/cm^2 , 照射量 1 J/cm^2 , BLM 濃度 10 μM)。細胞傷害効果の評価は XTT assay によって行い、PDT 実施後、8 時間後における細胞傷害効果を評価した。

4. 研究成果

(1) PDT による細胞内への物質導入

①PDT 条件の検討：臨床にて用いられる 1/10~1/100 程度の照射量(1 J/cm^2 , 3 J/cm^2 , 5 J/cm^2) を適用し、PDT 実施後の細胞傷害効果の経時変化を比較した(図 1)。照射量 1 J/cm^2 および 3 J/cm^2 の群においては、照射から 24 時間経過した後でも 60%以上細胞の生存力が維持されていた。本結果を踏まえ、本研究にて用いる PDT の照射量は 3 J/cm^2 以下とした。

また、いずれの群においても、照射直後から 6 時間後までは、PDT を実施した群の方が、Control 群よりも生存力が高くなる傾向が見られた。このことは、PDT を実施した場合でも、その適用条件が著しく低い場合、一時的ではあるが、低出力レーザー治療(Low-level laser therapy: LLLT)にて示される細胞活性化効果が認められることを意味する。

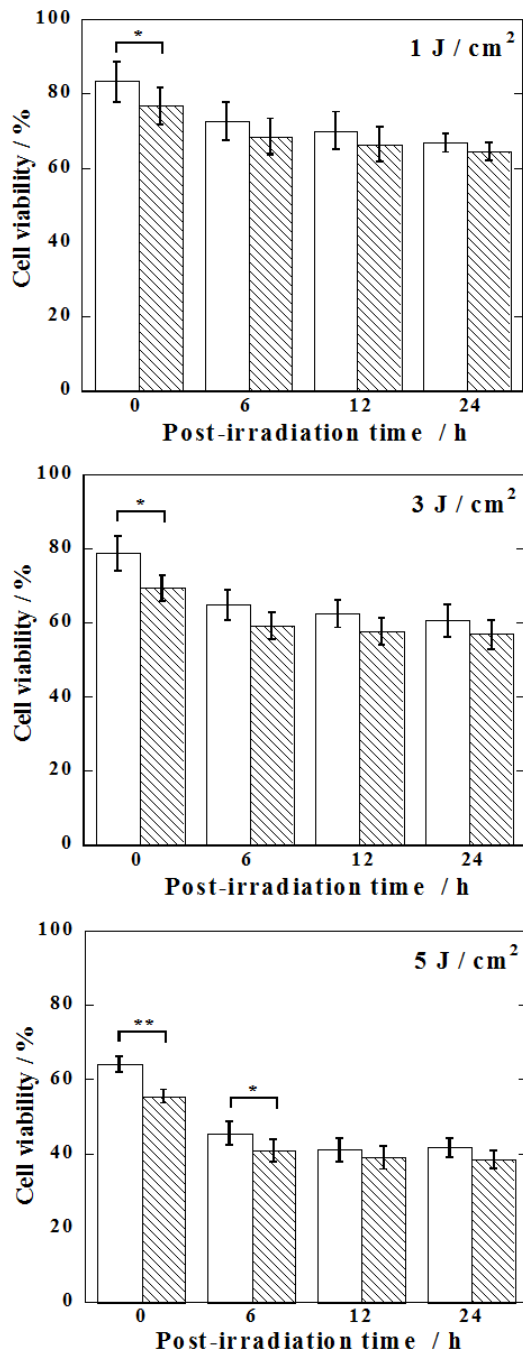


図1 PDT実施後の細胞生存力の経時変化

②PDTによる細胞内への物質導入とその形態評価：図2は導入物質としてPIを、図3はTR-Dを用いた蛍光顕微鏡像である。

図2において、緑色矢印で示した細胞群は、Calcein由来の蛍光を呈しており、生存力が維持されている細胞と思われる。赤色矢印で示した細胞群は、核酸とインターカレートしたPI由来の蛍光を呈していると思われる、細胞膜が破壊された死細胞と考えられる。白色矢印で示された細胞群は、緑色および赤色蛍光の両方を呈しており、生存力が維持された状態で、PIが導入された細胞と考えられる。

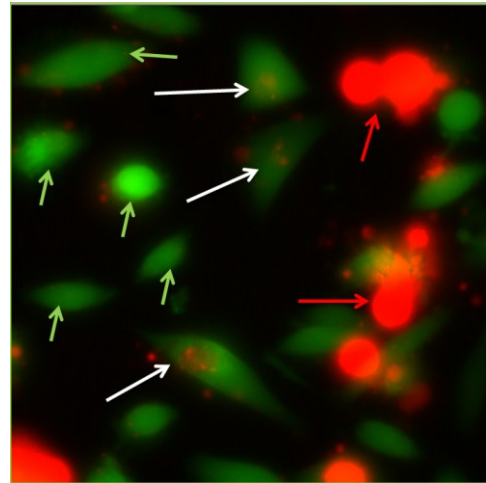


図2 PDTによるPropidium Iodide (PI:分子量670Da)のHeLa細胞内への導入
緑矢印:生細胞(非導入細胞)、赤矢印:死細胞、白矢印:生細胞(PI導入細胞群)

図3において、橙色の蛍光を呈している細胞群(白矢印で示す細胞群)は、同時にCalcein由来の緑色蛍光も認められることから、生細胞へのTR-Dの導入がなされたものと思われる。このことから、本PDTにより、10kDa程度の分子量の物質は、細胞内への導入が可能であるものと考えられる。

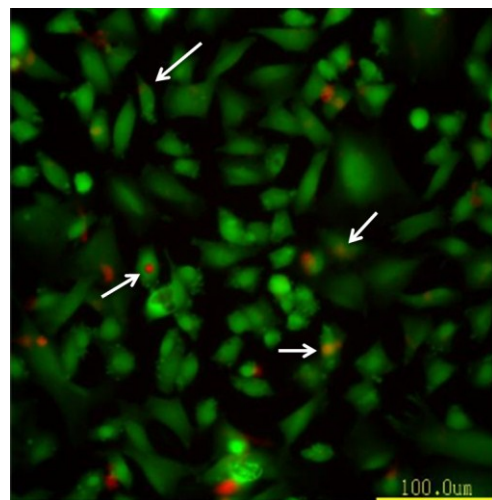


図3 PDTによるTexas Red-Dextran(TR-D:分子量10kDa)のHeLa細胞への導入
白矢印:生細胞(TR-D導入細胞群)

(2)PDTによるBleomycin (BLM)の細胞傷害効果の増強作用の評価

①XTT assayによるBLMの適用濃度の検討：BLM濃度0.5 μMおよび5 μMの群では、その接触後、24時間を経過しても細胞生存力にあまり変化はなく、Controlを100%とした細胞傷害効果は20%以下であった。一方、BLM濃度50 μMおよび100 μMの群では、接触直後

から細胞生存力は40%以下まで低下し、接触から24時間後における細胞傷害効果は85%以上であった(図4)。

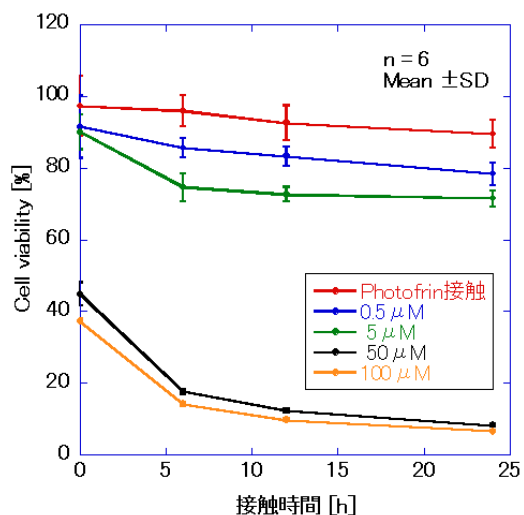


図4 BLMの細胞傷害効果

②PDT併用時におけるBLMの細胞傷害効果：適用するBLMの濃度は、上記の結果を踏まえ、10μMとした。図5は各実験群の細胞傷害効果をBLMの接触から8時間後に比較したものである。縦軸の細胞生存力は、Controlを100%として規格化したものである。レーザー光照射のみ、PDTのみの群はいずれも90%以上細胞生存力が維持されており、またBLM(10μM)のみの接触群でも、80%以上細胞生存力を有していた。これに対してBLM(10μM)に上記条件のPDTを併用すると、細胞生存力は60%以下に低下した。すなわち、BLM接触細胞群に対してPDTを併用することで、その細胞傷害効果は増強され得ることが実証された。

図5 PDTによるBLMの細胞傷害効果の増強

以上の結果からPDTにより、(1)生細胞内への物質導入が可能である、(2)細胞膜不透過性の抗癌剤の増強効果が認められることが明らかとなった。今後、フローサイトメトリー等の定量的なデータを得ていくことで、各種物質の導入効率の算出、さらには細胞膜の脂質酸化割合を求め、任意物質の導入に必要なPDT条件を提示することも可能と考えられる。

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1件)

Yuichi Miyamoto, Daisuke Nishikiori, Fumika Hagino, Masayoshi Wakita, Ichiro Tanabe, Masahiro Toida, Effect of 630-nm pulsed laser irradiation of HeLa

cells in Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Laser Therapy*, 査読有、Vol.20、No.2、2011、pp.135-138

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・准教授

研究者番号：00313718