

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650268

研究課題名(和文) 光線力学的細胞膜酸化による多剤排出トランスポーターの機能破壊

研究課題名(英文) Destruction of the multidrug efflux transporter on the plasma membrane by photodynamic treatment

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円、(間接経費) 600,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法(PDT)は、細胞を酸化傷害させることで抗腫瘍効果を得る。本研究では、抗がん剤耐性獲得HeLa細胞に対し、顕著な細胞傷害性を持たないPDTを適用し、その獲得耐性を低減し得るかどうかを検討した。

その結果、PDTの併用により、パクリタキセル耐性HeLa細胞に対するパクリタキセルの細胞傷害性は変化がなかったが、シスプラチン耐性HeLa細胞に対するシスプラチンの細胞傷害性は高まる傾向が見られた。このことから細胞内において、タンパクやペプチドが抗がん剤を結合することで解毒化をはかる耐性機構を有する抗がん剤耐性細胞の場合、その耐性の低減には、PDTの適用が有効であることが示唆された。

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 can reduce the degree of the resistance of cisplatin- or paclitaxel-resistant HeLa cells.

As the results, the cytotoxicity of paclitaxel for the paclitaxel-resistant HeLa cells was unchanged, whereas, the cytotoxicity of cisplatin for the cisplatin-resistant HeLa cells seems to increase. These findings suggest that the PDT is effective item for the reducing resistance of the anticancer drug-resistant cells possessing the cytoplasmic detoxification mechanism such as Glutathione(GSH) or metallothionein(MT) detoxification pathway.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・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

癌化学療法で認められる薬剤耐性化は、その副作用と並ぶ本療法の大きな課題であり、一般には末期癌、再発癌に見られる抗癌剤の耐性化として知られている。癌細胞がある一つの抗癌剤に対して耐性を獲得すると、同時に化学構造の異なる、あるいは作用機序の異なる抗癌剤に対しても耐性を示すことが多く、この問題をさらに深刻なものにしている。癌細胞の多剤耐性化機構は、多くの研究者らが段階的に明らかにしてきているが、その細胞膜に存在する多剤排出性膜輸送たんぱく質(多剤排出トランスポーター)が大きな役割を担っているとされている[1]。抗癌剤の多くは、細胞内に入るか細胞膜に極めて近い領域で必要十分な濃度が確保されることで、その効果を発揮するが、当該トランスポーターは、抗癌剤分子を能動的に排出し、細胞内の抗癌剤濃度を下げてしまう。さらに厄介な点は糖やアミノ酸等、癌細胞自身に必要な物質を誤って排出することはなく、非常に優れた基質認識機構を備えていることである。こうした特殊な機構への対抗策として、薬学的な観点では、多剤排出トランスポーターの基質となって排出を阻害する物質が[2]、材料科学的な観点では、抗癌剤を高分子ミセルで包含し、細胞内へ入ってから、これを放出するという、抗癌剤を癌細胞に認識させない手法が提案されている[3]。

本研究は、これら既存の対抗策とは全く異なり、「多剤排出トランスポーターを直接破壊する」という極めてシンプルな発想に基づくものであり、その手段として光線力学的酸化処置を用いるものである。研究代表者は2004年、パルス波レーザー光を用いた光線力学的処置(PDT)によって、癌細胞の細胞膜を光酸化させ、その細胞内に巨大分子を導入したことを踏まえ[4]、昨年度から比較的低いレベルのPDT(PDTのみでは細胞死が誘導できないレベル)による抗癌剤の導入促進効果を検討してきた(平成22年~平成23年度科研費研究活動スタート支援)[5]。その結果、PDTによる細胞膜の脂質酸化量の増加と抗癌剤で誘導される死細胞との間に高い相関があることに気づき、本PDTによる細胞膜の損傷は、リン脂質ばかりではなく、細胞膜上の機能たんぱく質の傷害にも有効ではないかと考えた。

2. 研究の目的

癌化学療法における最も深刻な問題の一つに抗癌剤が効かなくなる現象、すなわち癌細胞の薬剤耐性化が挙げられる。癌細胞の薬剤耐性化のメカニズムは、その細胞膜上に発現する多剤排出性膜輸送たんぱく質(多剤排出トランスポーター)が、薬剤を能動的に細胞内や細胞膜から排出してしまうことによる。研究代表者は以前、レーザー光を用いた光線力学的な細胞膜の微小酸化に伴う損傷によって、細胞外から細胞内へ巨大分子が導入できることを報告している。本研究では、抗癌剤

耐性獲得癌細胞に見られる多剤排出トランスポーターを光線力学的処置により、酸化せしめることで、その排出機能を奪い、耐性獲得癌細胞の抗癌剤に対する耐性レベルを減少させ得ることを実証し、癌化学療法の新しい支援技術として提案することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)シスプラチン(CDDP)およびパクリタキセル(TXL)耐性 HeLa 細胞の確立

対象細胞には、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用い、10%FBS と抗生物質を含む Ham 's F-10 培地(コスモ・バイオ社)により、37℃, 5%CO₂ にて培養した。各抗癌剤耐性 HeLa 細胞(以下、HeLa/CDDP および HeLa/TXL とする)の作成手順は、Takara らの方法に従った[6]。

(2)PDT による細胞傷害効果の評価

PDT による細胞傷害効果を惹起しない条件を検索するため、細胞増殖活性を指標として以下の実験を行った。HeLa 細胞を 96-well プレートに 5.0×10^4 cells/well にて播種、24 時間培養した後、PDT 実施群の培養液を Photofrin® 溶液(10 µg/ml)へと置換し、15 分間培養した。培養液にて 1 回洗浄の後、培養液に置換、96 well plate の下方より、波長 637 nm、パワー密度 5 mW/cm² 連続派レーザー光を照射した。照射量は 0.01 J/cm², 0.05 J/cm², 0.1 J/cm², 0.5 J/cm², 1 J/cm², 5 J/cm² とした。細胞傷害効果の評価は XTT viability assay (Cell Counting Kit-8, 同仁化学研究所)によった。

(3)PDT による HeLa/CDDP 細胞の耐性低減

対象試料は全て上記(2)と同様の手順で準備されたものを採用し、適用した CDDP 濃度は(1)で確立された CDDP 耐性 HeLa 細胞(HeLa/CDDP)の IC50 値を考慮し、10 µM とした。PDT は、照射量 0.5 - 3.0 J/cm² の範囲で行った。実験群は HeLa (通常培養された HeLa 細胞), HeLa-PDT (通常培養された HeLa 細胞に PDT のみを実施), HeLa/CDDP (CDDP 耐性 HeLa 細胞), HeLa-CDDP (通常培養された HeLa 細胞に CDDP を適用), HeLa-PDT-CDDP (通常培養された HeLa 細胞に PDT を実施後、CDDP を適用), HeLa/CDDP-CDDP (CDDP 耐性 HeLa 細胞に CDDP を適用), HeLa/CDDP-PDT-CDDP (CDDP 耐性 HeLa 細胞に PDT を実施後、CDDP を適用)の計 7 群を対象に行い、PDT 実施群における CDDP の負荷は、PDT 実施後に CDDP 含有培地に置換することで行った。

(4) PDT による HeLa/TXL 細胞の耐性低減

対象試料は全て上記(2)と同様の手順で準備されたものを採用し、適用した TXL 濃度は(1)で確立された TXL 耐性 HeLa 細胞(HeLa/TXL)の IC50 値を考慮し、10 nM とした。PDT は、照射量 0.5 - 3.0 J/cm² の範囲で行った。実験群は HeLa (通常培養された HeLa 細胞), HeLa-PDT (通常培養された HeLa 細胞に PDT のみを実施), HeLa/TXL (TXL 耐性

HeLa 細胞), HeLa-TXL(通常培養された HeLa 細胞に TXL を適用), HeLa-PDT-TXL(通常培養された HeLa 細胞に PDT を実施後、TXL を適用), HeLa/TXL-TXL(TXL 耐性 HeLa 細胞に TXL を適用), HeLa/TXL-PDT-TXL(TXL 耐性 HeLa 細胞に PDT を実施後、TXL を適用) の計 7 群を対象に行い、PDT 実施群における TXL の負荷は、PDT 実施後に TXL 含有培地に置換することで行った。

4. 研究成果

(1) シスプラチン(CDDP)およびパクリタキセル(TXL)耐性 HeLa 細胞の確立

図 1 に CDDP 接触から 48 時間経過した後の HeLa および HeLa/CDDP の増殖阻害曲線を示す。HeLa 細胞、HeLa/CDDP 細胞の IC50 値は、それぞれ 12.5 μM 、25.3 μM と算出され、HeLa/CDDP 細胞は、約 2 倍の CDDP 耐性を有することが明らかとなった。この値は前述の Takara らの報告とほぼ一致し、HeLa/CDDP 細胞として差支えないものと判断した。

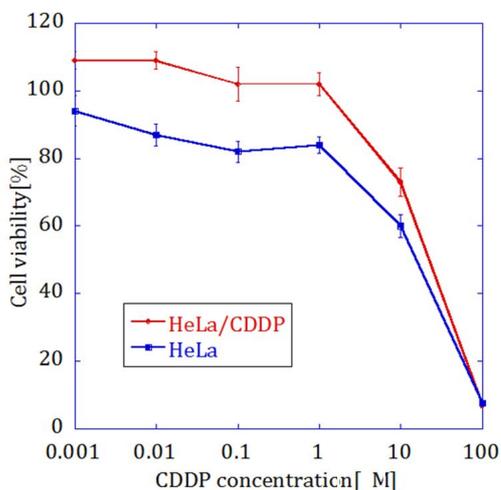


図 1 HeLa 及び HeLa/CDDP の増殖阻害曲線

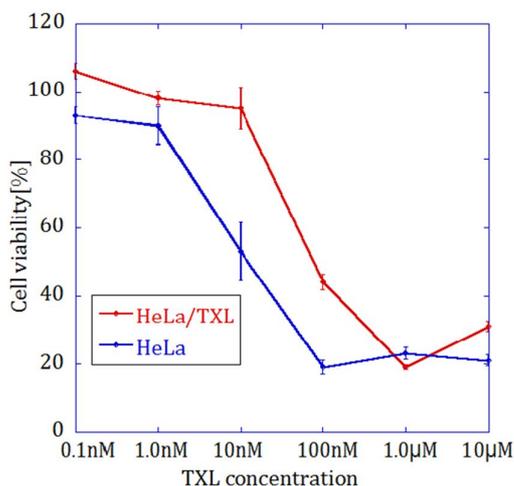


図 2 HeLa 及び HeLa/TXL の増殖阻害曲線

図 2 に TXL 接触から 48 時間経過した後の HeLa および HeLa/TXL の増殖阻害曲線を示す。

HeLa 細胞、HeLa/TXL 細胞の IC50 値は、それぞれ 7.8 nM、79.4 nM と算出され、HeLa/TXL 細胞は、約 10 倍の TXL 耐性を有することが明らかとなった。前述の Takara らの報告とおおよそ一致しており、HeLa/TXL として差支えないものと判断した。

(2) PDT による細胞傷害効果の評価

PDT 実施後、72 時間における HeLa 細胞の細胞生存力の照射量依存性を評価した結果、0.01 - 3 J/cm² を照射した実験群の細胞生存力は 95% 以上確保されていた。一方、照射量 5 J/cm² になると細胞生存力は 90% まで低下する結果となった。本実験結果から、耐性低減をはかるために適用する PDT の照射量は、0.5-3.0 J/cm² とした。

(3) PDT による HeLa/CDDP 細胞の耐性低減

表 1 に各実験群における細胞生存力を示す。各数値は、通常培養された HeLa 細胞の細胞生存力で規格化しており、PDT 実施後 48 時間における細胞生存力を示している。HeLa - PDT 群と HeLa/CDDP-PDT 群間の細胞生存力の差は、CDDP の負荷の有無によるものと思われる。HeLa-PDT-CDDP 群と HeLa/CDDP-PDT-CDDP 群の細胞生存力がほぼ同じ値となったことは、CDDP 耐性 HeLa 細胞の耐性が低減されたことを意味している。細胞質内における CDDP の解毒化機構に PDT が何らかの影響を与えたことを示唆しており、今後の詳細な検討が必要であろう。

表 1 各実験群間の細胞生存力の比較

照射量 [J/cm ²]	細胞生存力 [%]		
	HeLa-PDT	HeLa-PDT -CDDP	HeLa/CDDP -PDT-CDDP
0.5	83±3	65±3	64±4
1.0	75±2	56±5	47±4
3.0	45±7	27±5	28±3

(4) PDT による HeLa/TXL 細胞の耐性低減

図 3 に PDT 実施後 TXL を負荷、さらに 48 時間経過した後における HeLa/TXL 細胞の細胞生存力を照射量ごとに示したものである。PDT 実施後、TXL を負荷しているにも関わらず、細胞生存力は全ての照射量において 80% 以上確保されており、PDT の効果も TXL の効果も認められないという結果であった。このことは、本条件における PDT は、HeLa/TXL 細胞の耐性低減に何ら影響を与えないことと同時に、本耐性 HeLa 細胞は、光増感剤の排出をも促してしまうことを示唆しており、多剤排出トランスポーターが亢進状態にある抗癌剤耐性細胞に対しては、PDT が効果的に作用しない可能性も考えられる。ただし、今回の条件は、PDT 実施中に光増感剤が存在しないこと、PDT 実施後に TXL を負荷していること等、限られた条件のみの評価であるため、今後さらなる諸条件の検索が必要である。

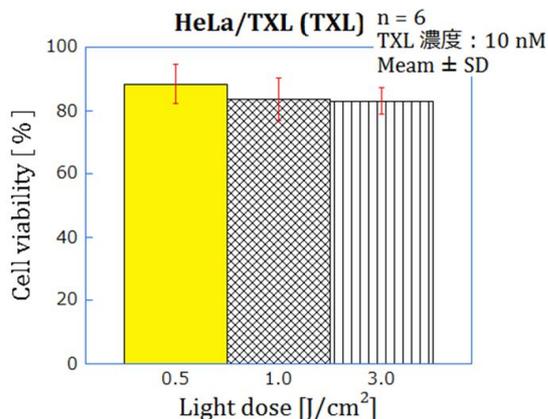


図3 PDT実施後のHeLa/TXL細胞群の細胞生存力(照射量依存性)

参考文献

- [1] Pérez-Tomás R: Multidrug resistance: retrospect and prospects in anti-cancer drug treatment. *Curr Med Chem.* (13) 1859-1876, 2006
- [2] Sugimoto Y et al: Breast cancer resistance protein: Molecular target for anticancer drug resistance and pharmacokinetics/pharmacodynamics. *Cancer Sci.* (96) 457-465, 2005
- [3] Murakami M et al: Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-media subcellular targeting. *Sci. Transl. Med.* (3) 64 64ra2 1-11, 2011
- [4] Miyamoto Y et al: Cytoplasmic molecular delivery by hematoporphyrin derivative-based photodynamic treatment using high-intensity pulsed laser irradiation. *Chem Lett.* (33) 240-241, 2004
- [5] Miyamoto Y et al: Effect of 630-nm pulsed laser irradiation on the proliferation of HeLa cells in Photofrin-mediated photodynamic therapy. *Laser therapy* (20) 135-138, 2011
- [6] Takara K et al.: Molecular changes to HeLa cells on continuous exposure to cisplatin or paclitaxel. *Cancer Chemother. Pharmacol.*(58) 785-793, 2006

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)

- (1) Daisuke Nishikiori, Yuichi Miyamoto, Enhancement of the cytotoxic effects of bleomycin with permeabilization of the plasma membrane by Photo-

frin-mediated photodynamic therapy in vitro. *IFMBE Proceedings*, 査読有, Vol. 43, 2013, pp. 711-713

〔学会発表〕(計3件)

- (1) Daisuke Nishikiori, Yuichi Miyamoto, Enhancement of the cytotoxic effects of bleomycin with permeabilization of the plasma membrane by Photofrin-mediated photodynamic therapy in vitro. The 15th International Conference on Biomedical Engineering, 2013年12月4-7日, シンガポール国立大学, シンガポール
- (2) 加藤隆太郎, 宮本裕一, Photodynamic therapyによる細胞内物質導入法の検討、第5回智のシンポジウム 文明・文化と科学技術、2012年12月2日、東京大学
- (3) 加藤麻衣子, 宮本裕一, Photodynamic treatmentによるBleomycinの細胞傷害効果の増強、第5回智のシンポジウム 文明・文化と科学技術、2012年12月2日、東京大学

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