

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790006

研究課題名(和文) 光線力学的療法における癌細胞死滅メカニズムの解明

研究課題名(英文) Detection of the reactive oxygen species generated from the photo-irradiation of protoporphyrin IX

研究代表者

松村 有里子 (Matsumura, Yuriko)

東京工業大学・生命理工学研究科・特任講師

研究者番号：10439507

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光感受性物質であるPpIXに光照射を行うと、照射光強度および照射時間依存的に一重項酸素(1O_2)が生成するとともに、スーパーオキシドアニオンラジカルおよび $\cdot CH_n$ も生成する事を明らかにした。 $\cdot CH_n$ はPpIXが 1O_2 の酸化作用を受けて生成する事が推察された。ALA共存下で内因的PpIXを蓄積した細胞に光照射を行うと、ヒドロキシルラジカルが生成する事が明らかとなった。以上より光照射時における腫瘍組織死滅に係る活性酸素種として一重項酸素が主原因では無い可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, it was clarified that the super oxide anion radical and carbon radicals were generated with the irradiation of LED light to the Protoporphyrin IX as the photo-sensitizer in addition to the singlet oxygen. It is suggested that the carbon radicals were generated from the oxidation of PpIX by the singlet oxygen. Hydroxyl radicals were generated from the LED irradiation to the cells which contain the endogenous PpIX induced by 5-aminolevulinic acid (ALA).

研究分野：医歯薬学

キーワード：光線力学的療法 活性酸素 一重項酸素

1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の1位は悪性腫瘍(癌)であり、その治療法として光線力学的療法(PDT: Photodynamic Therapy)に関する研究が活発に行われている。PDTでは光感受性物質またはその前駆体を投与した後、腫瘍組織に光感受性物質を集積させ、可視光レーザーを照射して腫瘍組織を死滅させる治療法である。特にヘムの生合成過程で生成されるプロトポルフィリン IX (PpIX)が光感受性物質として有用であり、その前駆体である5-アミノレブリン酸(ALA)を投与すると PpIX は腫瘍組織より癌細胞内に効率的に蓄積される事から、ALA を前駆体として用いる ALA-PDT に注目が集まっている。これまでに ALA-PDT の光線力学的効果をも高めるために、一重項酸素(1O_2)を発生させる機能を有する光感受性物質の開発に関する研究やレーザー光源に関する研究が活発に行われ多くのレビューが報告されている。しかし、PDTにおける腫瘍組織死滅の詳細なメカニズムは未だ明らかにされておらず、さらなる PDT 効果促進には腫瘍組織の死滅メカニズムを明らかにする必要がある。光感受性物質から発生する 1O_2 が腫瘍組織死滅の中心的な役割を担っている事が示唆されている事から、近年2つのグループで 1O_2 の検出に関する研究が行われている。Wilson B.C.らは 1270 nm での 1O_2 からの化学発光をモニタリングすることで PDT における 1O_2 産生を検討しているが、発光効率が悪くその寿命も短いため高感度の検出器が必要であることを問題点として挙げている。Chen Q.らは、活性酸素を特異的に検出する化学発光プローブを用いて *in vivo* での 1O_2 のモニタリングを行っているが、PDT における光感受性物質も発光するため 1O_2 の定量的な検討が困難であることを問題点として挙げている。

2. 研究の目的

本研究では光感受性物質である PpIX から Type I で発生する活性酸素(HO^{\cdot} 、 $O_2^{\cdot-}$ 、 HOO^{\cdot})と Type II で発生する 1O_2 が癌細胞に与える影響について、スピントラップ剤を用いた ESR-スピントラッピング法により検討を行うことを目的とした。具体的には、(1) PpIX を光感受性物質として用いて照射により発生する活性酸素の定性・定量分析を行い、各経路で発生する活性酸素種の特定およびその定量を行い、(2) 癌細胞を用いた ALA-PDT において照射により発生する 1O_2 と活性酸素の定量を行うとともに光線力学的効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Type I で発生する活性酸素に対するスピントラップ剤として5,5-ジメチル-1-ピロリン-N-オキシド (DMPO; ラボテック)を 1O_2 に対するスピントラップ剤として 2,2,5,5-テトラメチル-3-ピロリン-3-カルボキシアミド

(TPC; aldrich)を用い、光感受性物質には PpIX(Frontier)を用いた。溶媒には PBS(-)緩衝液を用いた。ESR (JES-FA100(JEOL))測定条件を下記に示す。・Power: 1 (TPC) or (DMPO) 4 mW、Magnetic field: 330.500 - 340.500 mT、Sweep time: 2 min、Modulation width: 0.1 mT、Time constant: 0.1 sec。各スピン濃度は TEMPOL を基準物質として算出した。光照射には市販の LED を用いた。

(2) ガン細胞には HeLa 細胞および A549 細胞を、正常細胞にはヒト皮膚繊維芽細胞(HDF)用いて、ALA(コスモ ALA)共存下で培養した細胞を PBS 緩衝液中に分散し、スピントラップ剤を添加して1分間 405 nm LED を照射した後、ESR 測定を行った。細胞内に蓄積された PpIX 含量は蛍光測定(RF-5300PC; Shimadzu)により算出した。

4. 研究成果

(1) PpIX の最終濃度を $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 、照射光強度 60 mW cm^{-2} で1分間照射したときの TPC スピニアダクトの ESR スペクトルとスピニアダクト濃度の TPC 濃度依存性を図1に示す。 1O_2 アダクト由来の ESR シグナルを観測し、その hyperfine coupling constant (hfcc) は $a_N = a_H = 1.61 \text{ mT}$, $g = 2.0061$ であった。また、スピニアダクトの構造は、LC-MS-IT-TOF 分析により同定した。TPC スピニアダクト濃度はスピントラップ剤の濃度が高くなるとともに増加し、スピニアダクト濃度が飽和する現象は認められなかった。

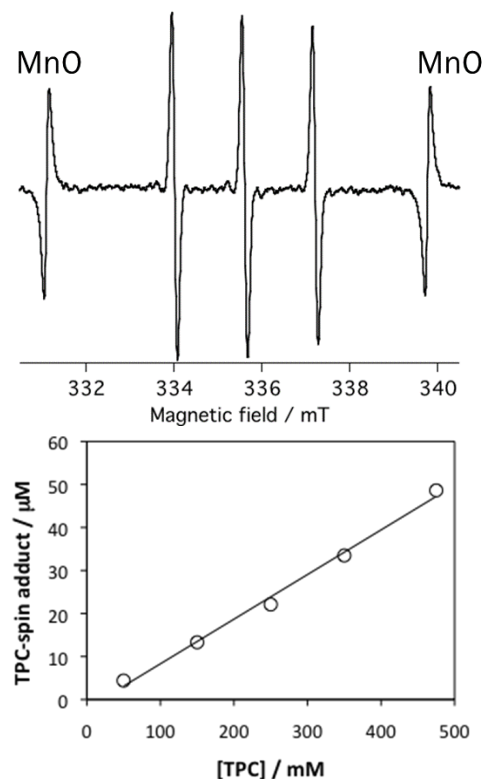


図1. TPC-スピニアダクトの ESR スペクトル(上)と TPC-スピニアダクトの TPC 濃度依存性(下)。

$^1\text{O}_2$ の消去剤としてよく知られている L-ヒスチジンおよびアジ化ナトリウムの TPC スピニアダクト濃度への影響を図2に示す。いずれの消去剤に対しても濃度依存的にスピニアダクト濃度は減少した。

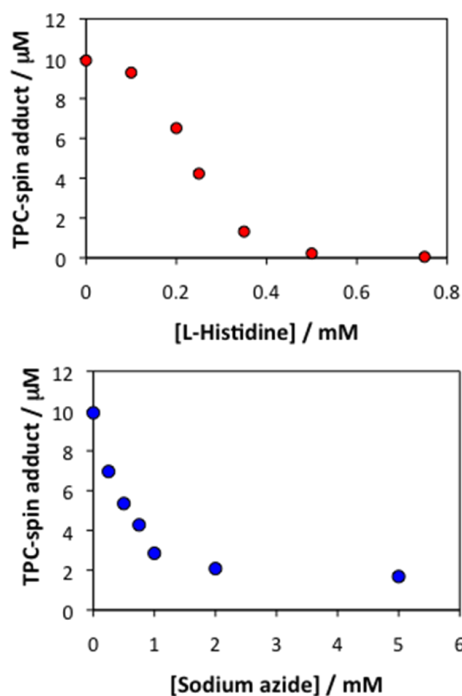


図2 . TPC スピニアダクトへの $^1\text{O}_2$ 消去剤の影響 [PpIX] = $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 、[TPC]=100mM .

また、アルゴンガス雰囲気下では ESR シグナルは観測されなかった。以上より、PpIX への照射により $^1\text{O}_2$ が生成しており、溶存酸素由来であることが確認された。スピニアダクト濃度は PpIX 濃度および LED 照射光強度と 1 次の相関関係があり (図3) その傾きより PpIX $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ あたり $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ の $^1\text{O}_2$ が、LED 照射光強度 10mWcm^{-2} あたり $25 \mu\text{mol dm}^{-3}$ の $^1\text{O}_2$ 産生が増強されることが明らかとなった。

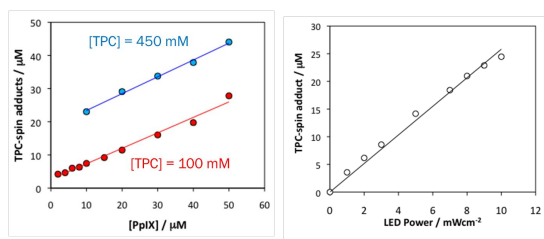


図3 . TPC スピニアダクトへの PpIX 濃度 (左) および LED 照射光強度 (右) の影響

DMPO をスピントラップ剤として用いると、図4に示す ESR スペクトルが観測され、照射により DMPO-CHn (hfcc: $a_N = 1.58 \text{mT}$, $a_H = 2.27 \text{mT}$, $g = 2.0059$) と DMPO-OH (hfcc: $a_N = a_H = 1.49 \text{mT}$, $g = 2.0061$) が生成していることがわかった。照射直後と 46 分後の差スペクトルから、スーパーオキシドアニオンラジカルの存在が明らかとなった。

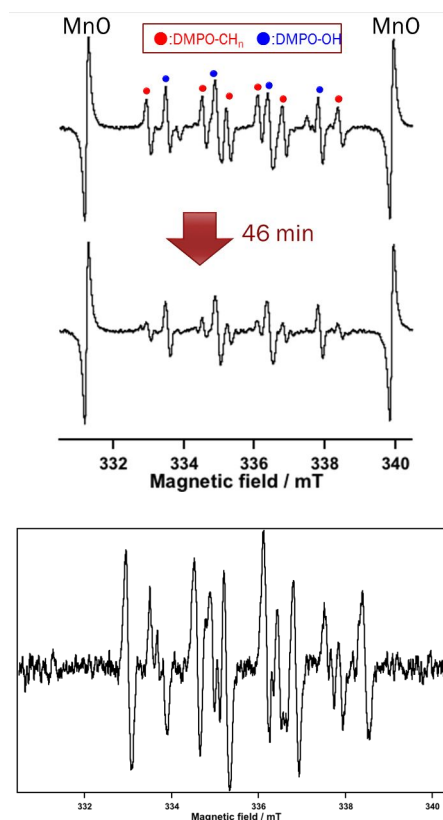


図4 . DMPO-スピニアダクトの ESR スペクトル (上) 照射直後と 46 分後の差スペクトル (下)

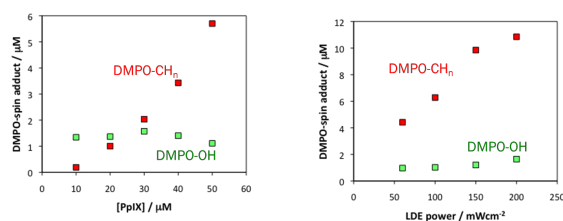


図5 . DMPO スピニアダクトへの PpIX 濃度 (左) および LED 照射光強度 (右) の影響

DMPO-OH 濃度は PpIX 濃度または LED 照射時間を変化しても $1 \mu\text{mol dm}^{-3}$ でほぼ一定であったのに対し、DMPO-CHn 濃度は PpIX 濃度が高くなるほど、また LED 照射時間が長くなるほど増加し、PpIX $10 \mu\text{mol dm}^{-3}$ あたり $1.5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ 、LED 照射光強度 100mWcm^{-2} あたり $5 \mu\text{mol dm}^{-3}$ であった。また、 $^1\text{O}_2$ 消去剤である L-ヒスチジン共存下では濃度依存的に DMPO-CHn の生成が抑制されたことから、 $^1\text{O}_2$ の酸化作用により PpIX 由来の炭素ラジカルが生成したものと解釈できる。

物質の運搬の役割を担うアルブミンおよび細胞膜の構成成分であるリノール酸共存下において TPC スピニアダクトおよび DMPO-CHn が消失することから (Data not shown)、腫瘍組織死滅に係る活性酸素種として $^1\text{O}_2$ が主原因では無い可能性が示唆される。

(2) ALA 共存下で細胞培養を行うことで内因的 PpIX を蓄積した細胞にスピントラップ剤を添加して光照射を行ったときに観測される ESR スペクトルを図 6 に示す。いずれの細胞を用いても TPC スピンアダクトのシグナルの増加は観測されなかったが、DMPO-OH のシグナルが観測された。

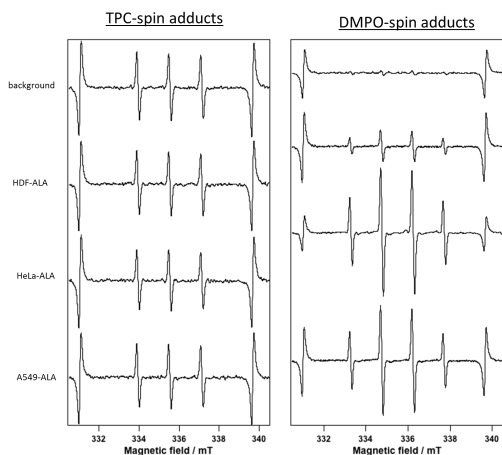


図 6 . 内因的 PpIX を蓄積した細胞への光照射により得られる ESR スペクトル。Background : 正常細胞にスピントラップ剤添加後光照射

ガン細胞より正常細胞の方が内因的 PpIX 蓄積量が低いことから、単位 PpIX 濃度あたりの DMPO-OH 濃度を算出すると、生成する DMPO-OH 濃度はガン細胞のほうが正常細胞より優位に高かった(図 7)。このことは細胞の特性が ALA 共存下で培養することにより変化している可能性を示唆するものであり、正常細胞よりガン細胞のほうがその影響を受けやすいものと考えられる。

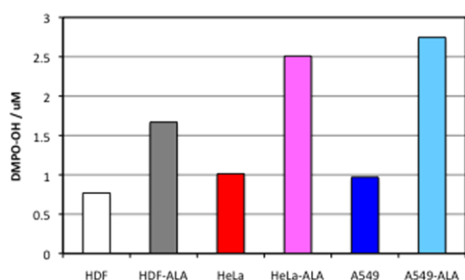


図 7 . ALA 共存下で培養した細胞に光照射した際に生じる単位 PpIX 濃度あたりの DMPO-OH 濃度

以上の結果より PpIX に光照射を行うと、照射光強度および照射時間依存的に $^1\text{O}_2$ が生成するとともに、スーパーオキシドアニオンラジカルおよび $\cdot\text{CH}_n$ も生成する事が明らかとなった。これらの活性酸素は、物質の運搬の役割を担うアルブミンおよび細胞膜の構成成分であるリノール酸共存下で抑制された。ALA 共存下で内因的 PpIX を蓄積した細

胞に光照射を行うと、ヒドロキシルラジカルが生成する事が明らかとなった。以上より光照射時における腫瘍組織死滅に係る活性酸素種として一重項酸素が主要原因では無い可能性が示唆された。今後、本研究の成果を応用して *in vitro* での検討を行うことで活性酸素と細胞死の関係について検討を行っていく。

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 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

1 . 松村有里子 . ESR-スピントラッピング法を用いた活性酸素計測 . 第 1 回 OCU 物質科学フロンティアシンポジウム . 2015 年 1 月 9 日 , 大阪市立大学 (大阪)

2 . 松村有里子 , 岩澤篤郎ら . ALA 共存下で培養したガン細胞から生成する活性酸素の研究 . 第 4 回ポルフィリン ALA 学会 . 2014 年 4 月 26 日 , ニチイ学館・神戸ポートアイランドセンター (兵庫)

3 . 松村有里子 , 岩澤篤郎ら . 5-アミノレブリン酸の培養細胞に及ぼす影響について . 第 18 回 ESR フォーラム研究会 . 2014 年 7 月 26 日 , 名古屋大学 (愛知)

4 . Matsumura Y , Iwasawa A, et al. Analysis of the reactive oxygen species generated by the near ultraviolet LED light irradiation. 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International, 2014/3/23, Kyoto(Japan)

5 . Matsumura Y , Iwasawa A, et al. Detection of the reactive oxygen species generated from the photo-irradiation of protoporphyrin IX. 1st International ALA and Porphyrin Symposium, 2013/10/28, Manama (Bahrain)

6 . Matsumura Y , Iwasawa A, et al. Detection of the reactive oxygen species generated from the photo-irradiation of the photosensitizer used in the photodynamic therapy. 19th International SPACC Symposium, 2012/8/4, Hokkaido(Japan)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

松村 有里子 (Matsumura Yuriko)
東京工業大学大学院 生命理工学研究
科・特任講師
研究者番号：10439507

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：