

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：16201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670094

研究課題名(和文)PI3Kを標的とする新規抗がん剤を用いた光線力学療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel photodynamic therapy for tumors using a photosensitizing PI3K inhibitor.

研究代表者

荒木 伸一 (Araki, Nobukazu)

香川大学・医学部・教授

研究者番号：10202748

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)：新規抗がん剤として開発されたPI3K阻害剤XL147を、前立腺がん培養細胞に青色波長の光を照射するとがん細胞表面にブレップが形成され著しい細胞傷害をもたらされることがわかった。この細胞傷害効果の程度は、XL147の濃度と青色光の強さに依存する。活性酸素(ROS)蛍光検出薬での観察で、XL147存在下での光照射により細胞内にROSが産生されることが確認され、この細胞傷害はROSによるものと考えられる。青色光の照射量を低減することで、がん細胞にアポトーシス誘導することもできた。これらのことから、XL147はがん治療の光線力学療法の新規光感作剤として有望であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：When we examined the effect of XL147, a PI3K inhibitor on PC3 prostate cancer cells under a fluorescence microscope, we found that XL147-treated cells are rapidly injured by blue light irradiation. The cancer cells treated with 0.2-2 μ M XL147 showed cell surface blebbing and cytoplasmic vacuolation and died within 15 min of the irradiation. The extent of cell injury was dependent on the dose of XL147 and the light power of the irradiation. These findings suggest that XL147 might act as a photosensitizing reagent in photodynamic therapy (PDT) for cancer. Using a fluorescent probe to identify reactive oxygen species (ROS), significantly increased ROS production was observed in the XL147-treated cells during blue light irradiation. Taken together, it is conceivable that XL147, which is preferentially accumulated in cancer cells, could be photosensitized by blue light to produce ROS to kill cancer cells. This study will open up new possibilities for PDT using anticancer drugs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：光線力学療法 PI3K阻害剤 がん細胞 顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法は、がん細胞に集積しやすい薬剤を体内に投与し、レーザー光線を照射することでその薬剤から発生するフリーラジカル分子によりがん細胞を死滅させるという新しい治療法である。光線力学療法は、低い光エネルギーでがん組織を選択的に治療することが可能で、従来の化学療法や放射線治療に比し正常組織への侵襲性が低いという利点がある。しかし、現在、光線力学療法に用いることができる光感受性物質の数は限られており、新たな光感受性物質の開発が望まれている。新規PI3K阻害剤XL147(別名pilaralisib, SAR245408)を蛍光ライブセルイメージングで使用していたところ、細胞に青色光照射をした時に急速な細胞傷害がおきることを見出した。このXL147は、Class I PI3Kを多く発現するがん細胞に対し選択的に働く抗がん剤として開発されたものであり、抗がん剤としての効果と光線力学療法の効果の両方を合わせもつ薬剤としての利用が期待できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、光線力学療法でのXL147の光感受性物質としての利用を見据え、がん細胞傷害の薬剤濃度依存性と光強度の関係、がん細胞と非がん細胞への影響の違い、光照射XL147の効果の標的分子同定、細胞死メカニズムを明らかにすることであり、既存の抗がん剤を光線力学療法のための新たな光感受性物質とする新たながん治療戦略の基盤を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 各種がん細胞におけるXL147光照射の効果と非がん細胞への影響

上皮系がん細胞としてヒト重層扁平上皮癌A431細胞、ヒト前立腺がんPC3細胞、DU145細胞、ヒト膀胱がん由来253J細胞、マウス白血病由来マクロファージRAW264細胞、非腫瘍細胞としてマウス腹腔マクロファージを用いた。イメージング用カバースリップの上に細胞を培養し、共焦点レーザー顕微鏡または我々が最近開発したoptogenetics用自動蛍光顕微鏡(Araki et al., 2014, Microscopy)でライブセルイメージングを行い光刺激照射と画像取得を行った。XL147(Active Biochemicals Co.)は10 mMでDMSOに溶解し、細胞には1 nM-1 μMの濃度で添加した。XL147添加10分後に顕微鏡視野全体または一部の細胞に波長約430 nmの青色光を照射しながらタイムラプスで位相差顕微鏡画像を取得し、細胞の形態変化を動画解析した。XL147の光感作は、蛍光顕微鏡の励起

光源を用い23-138 mW/cm²のパワーで、15秒間隔のタイムラプス撮影の各インターバル間に10秒間(0.23-1.38 J/cm²)、繰り返し照射した。

XL147光照射の効果は、顕微鏡同一視野内で青色光を当てている細胞と当てていない細胞での形態変化比較、細胞死指示薬Ethidium homodimer 1 (EthD-1)によるDNA染色性の差異によって評価した。また、がん細胞に対する傷害効果の特異性を確認するため、がん細胞と非がん細胞で青色光の強さ、時間XL147濃度に対する感受性、抵抗性をライブセルイメージングでの細胞形態変化で評価した。

(2) XL147光照射の効果の標的分子同定

XL147は、Class I PI3Kのp110αサブユニットに結合する特異的阻害剤であり、Class I PI3キナーゼを高発現するがん細胞に対して奏功するといわれている。光照射XL147によるがん細胞殺傷効果もPI3KをターゲットとしPI3キナーゼ高発現細胞に特異的であるかを確認するため、XL147と競合的にp110αサブユニットに結合する阻害剤LY294002やwortmanninを前処理で細胞に加え、XL147の光照射によるがん細胞傷害効果が軽減されるかどうかを確かめた。

(3) XL147光照射による細胞傷害メカニズムの解析

XL147存在下での光照射でがん細胞は数分程度で細胞死に至るが、照射からの効果が表れるまでの時間が短いことから、これまでの光線力学療法に使われているポルフィリン系薬剤と同様にXL147が光と反応しフリーラジカルを生成し、活性酸素などによる脂質過酸化、機能タンパク質の酸化により細胞に傷害を与えることが考えられる。この仮説を証明するために、細胞内での活性酸素生成や脂質過酸化反応を生きた細胞内で可視化できる蛍光試薬(Total ROS/Superoxide Detection Kit, Enzo Life Sciences)により蛍光ライブセルイメージング、蛍光強度定量解析を行った。コントロールとして、XL147を添加せず光照射だけでどの程度のROS生成反応が見られるかを測定した。

(4) XL147光照射によるアポトーシス誘導

XL147への弱い光照射によってがん細胞にアポトーシスを誘導できるか否かを検証するため、細胞を格子パターン印刷したカバースリップ上に培養し、1 μM XL147存在下で総量6.2 J/cm²の照射を行い、6-24時間の培養後、Annexin V-Cy3, SYTOX-greenによりアポトーシス、ネクロシスの判別染色を施した。光照射した部位の目印として、カバースリップ

板上の格子パターンをガイドとし、同一部位の観察、撮影を行った。

4. 研究成果

(1) 光感作 XL147 は濃度依存性、光強度依存性にかん細胞へ傷害を与える

扁平上皮がん細胞 (A431 細胞)、前立腺がん細胞 (PC-3 細胞、DU145 細胞)、膀胱がん細胞 (253J 細胞)、白血病由来マクロファージ (RAW264)、正常マウス腹腔マクロファージを用いて、*in vitro* で XL147 処理後に光刺激蛍光顕微鏡でライブ観察を行い、光照射をした細胞の傷害を位相差顕微鏡による形態変化、細胞表面のブレップ形成を指標にして評価した。XL147 存在下で特定の細胞に光を当てると、どの種類のがん細胞においても、照射 2~15 分で細胞表面にコブのようなブレップが形成され、ついで細胞内に空胞化が起き細胞死に至った (図 1)。

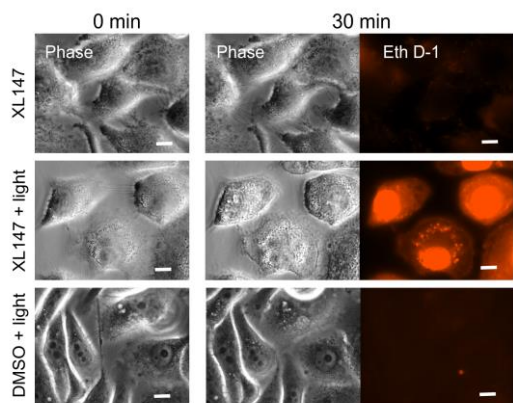


図 1. XL147 存在下での光照射で PC3 細胞に細胞傷害・細胞死が見られる. (Int J Cancer, 139; 2016)

XL147 存在下でも光を当てていない場合や 0.1%DMSO 存在下で光を当てた場合は細胞には傷害が認められず、XL147 による細胞傷害は光依存性があることが確認された (図 1)。A431 細胞、PC3 細胞、RAW264 細胞で特に感受性が高く早期にブレップ形成が認められ、逆に正常マウスの腹腔マクロファージでは同程度の XL147 光照射でブレップ形成が認められなかった。

照射光の波長は 430 nm, 470 nm, 530 nm の三つで一定の強度で比較したところ、430 nm が、最も短時間でブレップを形成した。また、ブレップ形成までの時間や細胞傷害の程度は、照射光の強度にも依存した。

XL147 濃度は、0.2–2 μ M の範囲で濃度を上げるとブレップ形成が起きるまでの時間が短縮する傾向が見られた。XL147 なし (DMSO だけ) の場合は、同程度の強度の光照射でブレップ形成、細胞傷害は認められなかった。以上の結果から、XL147 は、照射する光の波長及び強さ依存性にかん細胞を傷害することができることが証明された (図 2)。

PC3 細胞が比較的早期に顕著なブレップ形成を示し指標として評価しやすいため、以降の研究では主に PC3 細胞を用いて行った。

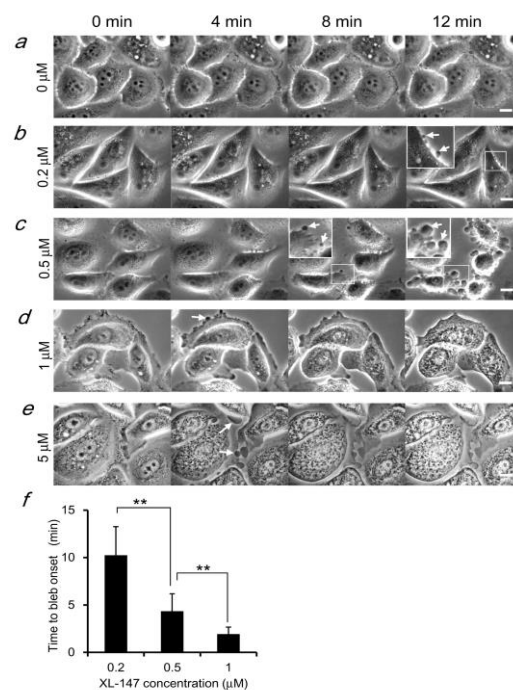


図 2. XL147 光照射による PC3 細胞への細胞傷害の濃度依存性. (Int J Cancer, 139; 2016)

(2) 光感作 XL147 の細胞傷害効果は、競合する他の PI3K 阻害剤により軽減する

PC3 細胞のブレップ出現時間を指標として、光感作 XL147 の細胞傷害効果が競合する他の PI3K 阻害剤の前処理により影響を受けるか否かを検討した。Class I PI3K の p110 subunit に結合することでその活性を阻害する LY294002 (10 μ M) または wortmannin (100 nM) を先に添加し、10 分後に 0.5 μ M XL147 を加え、430 nm で光照射を行った。コントロールの 0.1%DMSO 前処理にくらべ LY294002, wortmannin 処理の細胞はいずれもブレップ出現時間が 2 倍以上に伸び、細胞傷害が有意に軽減された (図 3)。このことは、XL147 が PI3K の p110 subunit に結合することでがん細胞内に蓄積し、光感作されることで細胞傷害をもたらすことを示唆している。

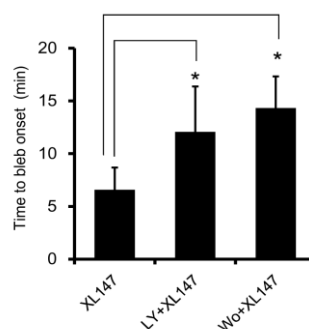


図 3. LY294002, wortmannin 前処理によブレップ出現時間は遅くなる. (Int J Cancer, 139; 2016)

(3) XL147 は光感作により活性酸素を産生することで細胞傷害を起こす

光線力学療法の光感作剤は、活性酸素 (ROS) を産生することで細胞を傷害する。そこで XL147 も光感作により細胞内で活性酸素を産生していることを証明する必要がある。XL147 存在下と DMSO のみで照射を行い Total ROS/Superoxide Detection Kit を用いて細胞内での ROS の生成をリアルタイムで可視化した。その結果、XL147 存在下で照射するとブレップ出現より早く ROS 生成を示す蛍光が検出され、時間と共に強くなった。DMSO のみでの照射では ROS 産生はわずかであり、定量的に蛍光強度を比較しても XL147 の照射で有意に ROS 生成が高くなることが証明された (図 4)。

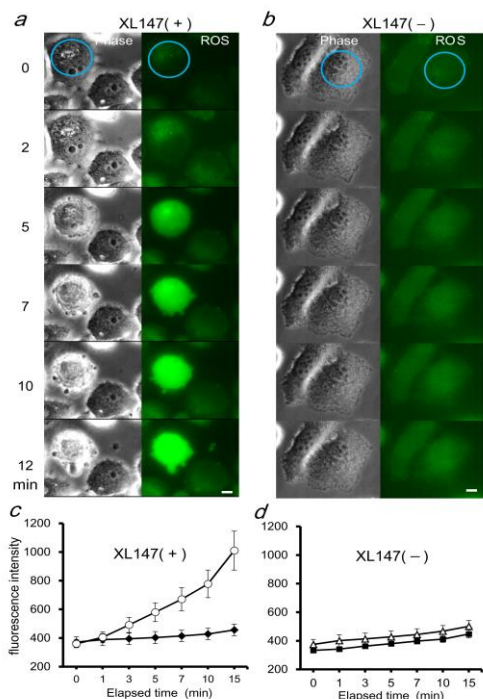


図 4. XL147 照射による ROS 産生 (Int J Cancer 139, 2016)

(4) XL147 を弱い光で照射することでがん細胞にアポトーシスを誘導する

臨床的にがんの治療法として光線力学療法を用いる場合、がん細胞にアポトーシスを誘導して死滅させることが望ましい。XL147 に照射する光のパワーを減らして弱い細胞傷害を与え、後にアポトーシスを誘導することができるかどうかを検証した。430 nm 光を 78 mW/cm² で 2 分間 (6.2 J/cm²) だけ照射した後、6 時間で Annexin V-Cy3 に染まるアポトーシス初期と思われる細胞が観察された。20 時間後では Annexin V-Cy3 陽性細胞と SYTOX-green に染まる死んだ細胞もみられた。XL147 非存在下での照射では、Annexin V-Cy3 陽性細胞も SYTOX-green 陽性細胞もほとんど認められなかった (図 5)。

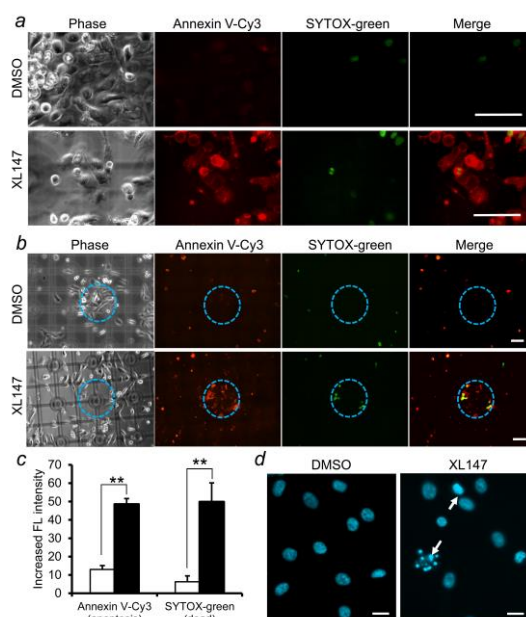


図 5. XL147 照射によるアポトーシス誘導 (Int J Cancer 139, 2016)

以上の結果から、新規抗がん剤として開発された PI3K 阻害剤 XL147 は、がん細胞に集積して青色光で照射することにより ROS を産生しがん細胞を傷害・死滅させることができることが明らかとなった。XL147 の濃度や光のパワーを下げることでがん細胞に弱い傷害を与え、後にアポトーシスを誘導も可能であり、光線力学療法の光感作剤として有望である。今後、担癌マウス等を用いた生体での効果を検証する必要がある。

XL147 は、従来の光線力学療法の光感作剤とは化学的に全く異なるもので、抗がん剤がこのような効果を示すということは非常に興味深く、今後の新たな光感作剤の開発、応用にも大きな影響を与えるであろう。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Hayashida Y, Ikeda Y, Sawada K, Kawai K, Kato T, Takehi Y, Araki N.: Invention of a novel photodynamic therapy for tumors using a photosensitizing PI3K inhibitor. Int J Cancer 139(3):700-11, 2016. doi: 0.1002/ijc.30097. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 荒木伸一、林田有史、池田結香、沢田光一、川合克久、加藤琢磨、笈善行: 新規 PI3K 阻害剤 XL147 を用いた光線力学療法 (photodynamic therapy) の発案. 第 121 回日本解剖学会全国学術総会. 2016 年 3 月 28 日 ~ 3 月 30 日、ビッグパレット福島 (福島県・郡山市)

2. 林田有史、池田結香、沢田光一、川合克

久、加藤琢磨、笈善行、荒木伸一：
Development of a novel photodynamic
therapy for tumors using a
photosensitizing PI3K inhibitor. 第67回
西日本泌尿器学会総会. 2015年11月5日～
11月7日、福岡国際会議場（福岡県・福岡市）

〔その他〕

研究室公式 Facebook

<https://www.facebook.com/%E9%A6%99%E5%B7%9D%E5%A4%A7%E5%AD%A6%E5%8C%BB%E5%AD%A6%E9%83%A8%E7%B5%84%E7%B9%94%E7%B4%B0%E8%83%9E%E7%94%9F%E7%89%A9%E5%AD%A6%E8%AC%9B%E5%BA%A7-445770155536606/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 伸一 (ARAKI, Nobukazu)
香川大学・医学部・教授
研究者番号：10202748

(2) 研究分担者

江上 洋平 (EGAMI, Youhei)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80432780

(3) 研究分担者

川合 克久 (KAWAI, Katsuhisa)
香川大学・医学部・助教
研究者番号：80534510

(4) 研究分担者

林田 有史 (HAYASHIDA, Yushi)
香川大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30615034