原著

ORIGINAL ARTICLE

抗腫瘍効果を持つ非ウイルスベクターを用いた
薬剤耐性前立腺がん細胞に対する高効率な光線力学療法

山内 将哉¹, 本多 典広^{1,2}, 間 久直¹, 立川 将士^{3,4},
中村 浩之³, 金田 安史⁵, 栗津 邦男^{1,6,7}

¹ 大阪大学 大学院 工学研究科

² 大阪大学 未来戦略機構

³ 東京工業大学 資源化学研究所

⁴ 学習院大学 理学部 生命科学科

⁵ 大阪大学 大学院 医学系研究科

⁶ 大阪大学 国際医工情報センター

⁷ 大阪大学 大学院 生命機能研究科

(平成 26 年 11 月 7 日受理, 平成 27 年 2 月 24 日掲載決定)

Effective Photodynamic Therapy to Drug-Resistant Prostate Cancer Cells
Utilizing Non-Viral Antitumor Vector

Masaya Yamauchi¹, Norihiro Honda^{1,2}, Hisanao Hazama¹, Shoji Tachikawa^{3,4},
Hiroyuki Nakamura³, Yasufumi Kaneda⁵, Kunio Awazu^{1,6,7}

¹ Graduate School of Engineering, Osaka University

² Institute for Academic Initiatives, Osaka University

³ Synthetic Organic Division, Chemical Resources Laboratory, Tokyo Institute of Technology

⁴ Department of Life Science, Faculty of Science, Gakushuin University

⁵ Graduate School of Medicine, Osaka University

⁶ Global Center for Medical Engineering and Informatics, Osaka University

⁷ Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University

(Received November 7, 2014, Accepted February 24, 2015)

要 旨

抗がん剤に耐性を持つ進行前立腺がんの治療は難しく, 新たな治療法が求められている. 光線力学療法(photodynamic therapy; PDT) は光と光感受性薬剤を用いた治療法であり, その低侵襲性から進行前立腺がんの新規治療法として期待できる. 我々の研究グループは, 進行前立腺がんへの効果的な PDT を実現するために, 薬剤輸送効果を持ち, 前立腺がんに対して抗腫瘍効果を発揮することが知られている非ウイルスベクター (hemagglutinating virus of Japan envelope; HVJ-E) に光感受性薬剤である protoporphyrin IX 脂質 (PpIX 脂質) を封入し, 新規光感受性薬剤 [porphyrus envelope] を開発した. 本検討では, porphyrus envelope を用いてホルモン拮抗性ヒト前立腺がん細胞株 PC-3 に対して, PDT の治療効果, および HVJ-E 由来の抗腫瘍効果の評価を行った. その結果, porphyrus envelope は約 1/30 の投与濃度で PpIX 脂質単体と同等の PDT 効果を有し, 更に光照射を行わない場合においても, HVJ-E 由来の抗腫瘍効果により直

接的な殺細胞効果を有することが確認された。

キーワード：抗がん剤耐性前立腺がん、ドラッグデリバリー、光線力学療法、センダイウイルス

Abstract

There is an urgent need to develop an efficient strategy for treatment of drug-resistant prostate cancer. Photodynamic therapy (PDT), which is laser therapy using photosensitizer, is expected as a novel therapy for it because of its less invasiveness. Our group focused on non-virus vector (hemagglutinating virus of Japan envelope; HVJ-E) combined with protoporphyrin IX lipid. It has confirmed that HVJ-E has the ability of drug delivery and induction of cancer specific cell death. Porphyrus envelope which is HVJ-E containing PpIX lipid was developed as a novel photosensitizer. In this study, PDT effect and antitumor effect of Porphyrus envelope to hormone-antagonistic human prostate cancer cells (PC-3) were evaluated. In the result, PDT using Porphyrus envelope to PC-3 was very effective, and it was expected a novel therapy for drug-resistant prostate cancer.

Key words : drug-resistant prostate cancer, drug delivery, photodynamic therapy, sendai virus

1. 緒言

前立腺がんとは男性固有の器官である前立腺に発生するがんのことである。高齢になるほどかかり易く、患者のほとんどが55歳以上であるのが特徴であり¹⁾、近い将来日本において男性がん死亡者数の上位となることが予想されている。早期がんに対しては、手術による前立腺全摘出が一般的であり、奏効率も高い。一方、進行がんの場合は、ホルモン剤や抗がん剤による治療が行われることが一般的である。しかし、薬剤による治療は一過性のものである場合が多く、経時的に薬剤耐性が向上するケースが非常に多い。薬剤耐性を備えた前立腺がんは治療が難しく、現時点では有効な治療法は存在しない。薬剤の投与間隔を長くする間欠療法や、投与薬剤を切り替える交代療法が検討されているが、根本的な解決には至っていないのが現状である。

このような問題を解決する新たな選択肢として光線力学療法 (photodynamic therapy; PDT) が挙げられる。PDTとは腫瘍組織や新生血管に選択的に集積する光感受性薬剤を投与し、それをレーザー光で励起することで活性酸素を生じさせ、活性酸素の持つ高い殺細胞効果により腫瘍組織を選択的に治療する低侵襲な治療法である。また、PDTを行うことで免疫系が活性化され、抗腫瘍効果が得られることも報告されている²⁾。PDTはその低侵襲性から高齢患者の多い前立腺がん治療に適しており、薬剤耐性を備えた進行前立腺がんに対する有効な治療法として期待できる。また、他の治療法との併用や複数回の治療も可能であるため、コンバインドセラピーとしての可能性も期待できる。しかし、現状のPDTには大きな課題が2つ存在する。1つ目は、光線過敏症の予防に伴う入院期間である。光感受性薬剤のがん選択性は完全ではないため、PDT施術後数週間は皮膚や肝臓に光感受性薬剤が残留する。そのため、PDT施術後は一定期間、薄暗い病室での生活を余儀なくされる^{3,4)}。2つ目はPDTにより治療可能ながんに限られるということである。PDTによる治療効果は光と光感受性薬剤の双方が必要である。そのため、光の届かない深部に存在するがんや、薬剤の集積が不十分ながんは十分な治療効果を期待できず、また治療効果の厳密な制御も難しい。抗がん剤耐性を持つような進行がんにPDTを行う場合、上記課題の克服は必須であると考えられる。

腫瘍への集積の選択性を向上させるためには光感受性薬剤そのものが持つ腫瘍親和性だけでは不十分なため、薬剤輸送システム (drug delivery system; DDS) を用いた選択的薬剤投与法が盛んに研究されている^{5,6)}。腫瘍の血管透過性亢進を利用した enhanced permeability and retention (EPR) 効果による DDS や腫瘍特異的な抗原抗体反応を利用した DDS など様々な戦略が存在し、多くの場合において良好な治療成績を収めている。我々は、非ウイルスベクターである hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) の DDS への利用に着目した。HVJ-E は、紫外線照射によりリボ核酸 (ribonucleic acid; RNA) を破壊し複製能力を失わせた不活化センダイウイルス粒子である。HVJ-E は表面に HN タンパクと F タンパクを有し、膜融合により細胞に内封分子を輸送することが可能である^{7,8)}。HVJ-E による DDS の大きな利点としては、エンドサイトーシスを経由せず直接細胞質に薬剤を導入できること、そして従来の薬剤投与と比較して迅速に薬剤を集積させることができること、という2点が挙げられる。さらに、近年の研究では HVJ-E 自体が、がん免疫療法の薬剤として強い効力を持つことが発見された⁹⁾。HVJ-E 内の RNA は紫外線により破壊されているが、その断片は通常のウイルス RNA と同様に細胞内の retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) によって認識され、ケモカインやサイトカインを産生させる。また HVJ-E は樹状細胞の成熟化や IL-6 の産生を促進する。これらによって、NK 細胞や細胞傷害性 T 細胞の活性化、制御性 T 細胞の抑制を促進し、抗腫瘍免疫を活性化させる⁹⁾。一方、RIG-I からのシグナル経路は、ヒト癌細胞において、アポトーシス関連遺伝子の Noxa や TRAIL を誘導し、癌細胞選択的なアポトーシスを誘導する¹⁰⁻¹¹⁾。Balb/c マウスに移植されたマウス大腸がん細胞 CT26 に HVJ-E を投与した例では、60-80% の腫瘍が消失したと報告されている⁹⁾。以上の特長から HVJ-E による DDS は、前立腺がんに対する PDT において非常に有効であると考えられる。

我々は、光感受性物質として脂質化した protoporphyrin IX (PpIX 脂質) を HVJ-E 封入し、新規光感受性薬剤

「prophyrus envelope」を開発した。HVJ-E の DDS 機能による効率的な PDT 作用と HVJ-E の抗腫瘍効果による、複合的な治療をコンセプトとする。先行研究において porphyrus envelope を用いて、ホルモン拮抗性前立腺がん細胞に対して PDT を行い、5-アミノレブリン酸 (5-ALA)、および PpIX 脂質単体と比較して良好な PDT 効果を確認した¹²⁾。しかし、光を照射しない場合において、prophyrus envelope は細胞死を誘導せず、HVJ-E 由来の抗腫瘍効果 (直接作用によるがん特異的細胞死) は確認されなかった。HVJ-E 単体の場合、同濃度の投与でも抗腫瘍効果が確認されているため、PpIX 脂質の封入により porphyrus envelope に何らかの変性が起きていると考えられる。Porphyrus envelope による PDT 効果を向上させるためには、この現象の原因を究明するとともに、調製法、および投与方法の更なる改善が必要であると考えられる。

2. 目的

本研究は、HVJ-E の DDS 機能と抗腫瘍効果を応用した porphyrus envelope を開発し、抗がん剤耐性前立腺がんに対する効果的な PDT の確立を目的とする。本論文では、治療効果の向上のため、PpIX 脂質の封入量を低下させた porphyrus envelope を調製し、その PDT 効果、および抗腫瘍効果の評価を行った。

3. 対象と方法

3.1 細胞培養

本研究では、抗がん剤耐性を持つ前立腺がんのモデルとしてホルモン拮抗性ヒト前立腺がん細胞株 PC-3 を用いた。PC-3 はホルモン剤に対する感受性が無く、非常に悪性度の高い前立腺がん細胞である。PC-3 の培養には、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's modified eagle medium; D-MEM, D6046, Sigma-Aldrich) に 10% の牛胎児血清 (fetal bovine serum; FBS, S1820, Biowest)、および 5 mL の抗生物質 (penicillin-streptomycin mixed solution, P4458, Sigma-Aldrich) を加えたものを用いた。

3.2 光感受性薬剤

HVJ-E へ封入する光感受性薬剤として本研究では PpIX 脂質を選択した。PpIX 脂質とは、5-ALA を前駆体とする光感受性薬剤である PpIX に脂質鎖を付加した化合物である¹³⁾。Fig.1 に示すように、PpIX 脂質は HVJ-E のエンベロープを構成する脂質とよく似た構造を持つため、HVJ-E と PpIX 脂質を混合して遠心分離を行うだけで、簡便に封入が可能であるという長所を持つ。更に、PpIX は生体内に一般的に存在する化合物であるため、

細胞毒性が低く、安価である。

HVJ 懸濁液 6400 HAU/mL を、直径 3.5 cm のシャーレに 1 mL 分注した。なお、HAU は hemagglutination unit の略であり、HVJ-E の持つ HN タンパクの活性度合を示す¹⁴⁾。UV 照射装置 (XL-1500 UV Cross Linker, Spectro-Linker Co.) を用いて 99 mJ/cm² の紫外線を照射し、HVJ 内のウイルス RNA の断片化を行うことで不活化し HVJ-E を作製した¹⁰⁾。遠心分離 (20000 g, 4℃, 10 min) を行い、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate-buffered saline; D-PBS, D8537, Sigma-Aldrich) を用いて再懸濁し、これを HVJ-E 懸濁液とした。800 HAU/152 μ L の HVJ-E に対し、D-PBS を用いて濃度 125 μ M に調製した PpIX 脂質を 22 μ L 加え、37℃で 5 min 加温した。遠心分離 (20000 g, 10 min) により PpIX 脂質を HVJ-E に挿入し、得られた沈殿を porphyrus envelope とした¹²⁾。なお、この調製条件における PpIX 脂質の封入量は 2.2 pmol/HAU であり、封入量を変動させる場合は、添加する PpIX 脂質濃度を増減させることによって調製した。

3.3 PpIX 脂質、または porphyrus envelope を用いた PDT 効果の比較

D-PBS を用いて濃度 10% (v/v) に調整したポリエリジン (P4707, Sigma-Aldrich) を用いてコーティングした 96 ウェルプレートに細胞数濃度 50000 cells/mL の PC-3 を 100 μ L/well ずつ播種した。24 h 後に培地中に含まれる濃度が 0-30 μ M となるよう希釈した PpIX 脂質溶液を各ウェルに 40 μ L ずつ加えた。また、培地中に含まれる PpIX 脂質濃度が 0-1.1 μ M となるように希釈した porphyrus envelope (封入量: 2.2, および 0.35 pmol/HAU) を各ウェルに 40 μ L ずつ加えた。3 h 後、各ウェルに加えた薬剤溶液を無血清の培地に交換し、照射パワー密度 100 mW/cm² に設定した波長 405 nm の半導体レーザー (VLM500, Sumitomo electric industries, Ltd) を 60 s 照射した。本実験は細胞系での検討であり、組織内のように吸収・散乱による光の減衰を考慮する必要がないため、PpIX の吸収が波長 630 nm 前後と比べて 20 倍近く高い波長 405 nm 選択した。照射後、有血清の培地に交換し、インキュベーター内に静置した。24, および 48 h 後、生細胞数測定試薬 SF (07553, Nacalai Tesque) を 10 μ L ずつ加え、1 h 後に、吸光マイクロプレートリーダー (VersaMAX, Molecular Devices) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定した。薬剤を投与せず光照射のみを行った細胞群の吸光度をコントロールとし、各ウェルの吸光度との比をとることで細胞生存率を評価した。

3.4 HVJ-E、および porphyrus envelope の抗腫瘍効果の評価

D-PBS を用いて濃度 10% (v/v) に調整したポリエリジン (P4707, Sigma-Aldrich) を用いてコーティングした 96 ウェルプレートに 50000 cells/mL の PC-3 を 100 μ L/well ずつ播種した。24 h 後に無血清、あるいは有血清の培地を用いて、HVJ-E、および porphyrus envelope を濃度 32 HAU/mL に調節し、各ウェルに 30 μ L ずつ加え

Fig.1 Structural formula of PpIX lipid.

た. 3 h 後, 無血清の培地を用いて薬剤投与した細胞群のみ, 各ウェルに加えた薬剤を有血清の培地に交換した. 24, および 48 h 後, 生細胞数測定試薬 SF (07553, Nacalai Tesque) を 10 μ L ずつ加え, 1 h 後に, 吸光マイクロプレートリーダー (VersaMAX, Molecular Devices) を用いて波長 450 nm の吸光度を測定し, 細胞生存率を評価した. 何も投与しなかった細胞群の吸光度をコントロールとし, 各ウェルの吸光度との比をとることで細胞生存率を評価した.

3.5 HA assay 法による HVJ-E, および porphyrus envelope の膜融合能の評価

PpIX 脂質の封入量が HVJ-E の膜融合能にどのような影響を与えるのか検討するため, PpIX 脂質の封入量を変化させた porphyrus envelope の膜融合能を評価した.

HVJ 懸濁液 6400 HAU/mL に 99 mJ/cm² の紫外線を照射し, HVJ-E とした. また, 同様の手順で生成した HVJ-E に対し, 単位 HVJ-E あたりの PpIX 脂質量が 0, 0.04, 0.35, 0.7, 1.4, 2.2, および 17.6 pmol/HAU となるよう PpIX 脂質を封入し, porphyrus envelope とした. これらの porphyrus envelope の膜融合能の力価を Hemagglutination (HA) assay 法により評価した^{15,16}. 具体的な手法を以下に示す. 鶏保存血液 10 mL を遠心分離し, 赤血球のみを回収した後, D-PBS を用いて再懸濁した. 同様の手順を 3 回繰り返し, 赤血球を十分に洗浄した後, 最終濃度が 0.5wt% となるよう D-PBS を用いて赤血球を希釈した. 緩衝塩類溶液 (Balanced salt solution; BSS) を用いて最大 13323 倍まで段階希釈した HVJ-E, および porphyrus envelope を 50 μ L ずつ 96 ウェルプレートに分注し, 更に 0.5wt% の赤血球懸濁液を 50 μ L ずつ添加した. 冷蔵庫内に 24 h 静置した後, 各ウェルにおける赤血球の沈降の有無を確認した. 赤血球の沈降が認められない最も低濃度の HVJ-E, あるいは porphyrus envelope の力価を 1 HAU/mL と定義し, 希釈倍率を乗じることで, HVJ-E, および porphyrus envelope の力価を算出した.

4. 結果

データ間の有意差検定には student's t-test (分散未知, 対応なし, 両側検定) を用いた. P 値が 0.05 以下で有意差有りとした.

4.1 PpIX 脂質, または porphyrus envelope を用いた PDT 効果の比較

Fig.2 に PpIX 脂質, または porphyrus envelope を投与し, レーザー照射を行った後の細胞生存率を示す. いずれの条件においても投与濃度の増加に伴って細胞生存率が低下しており, PDT による細胞死が確認された. それぞれの条件における半数阻害濃度 (half maximal inhibitory concentration; IC₅₀) を算出したところ, PpIX 脂質では $1.20 \pm 0.07 \mu$ M であり, porphyrus envelope (封入量 2.2 pmol/HAU) では $0.04 \pm 0.01 \mu$ M, porphyrus envelope (封入量 0.35 pmol/HAU) では $0.006 \pm 0.002 \mu$ M であった (Fig.3).

Fig.2 Survival rate of PC-3 cells after PDT. The error bar shows a standard deviation. (a) PpIX lipid, (b) porphyrus envelope (amount of enclosed PpIX lipid in HVJ-E: 2.2 pmol/HAU).

Fig.3 50% inhibitant concentration of porphyrus envelope (PE) and PpIX lipid 24 h after laser irradiation. The error bar shows a standard deviation. The data of porphyrus envelope whose enclosure rate was 35 pmol/HAU was quoted from reference 12.

4.2 HVJ-E, または porphyrus envelope の抗腫瘍効果の評価

Fig.4 (a) に HVJ-E, または porphyrus envelope へ 3 h 浸漬させ, 培地交換を行い 24, および 48 h インキュベートした後の PC-3 の生存率を示す. レーザー照射を行わなくても HVJ-E を投与した細胞群のみ有意な細胞生存率の低下が確認され, HVJ-E 由来の抗腫瘍効果が確認された. 一方, porphyrus envelope 投与群においては, 細胞生存率のわずかな低下しか見られず, HVJ-E 由来の抗腫瘍効果が低減していることが確認された. また, Fig.4

(b) に HVJ-E, porphyrus envelope へ 24 h, および 48 h 浸漬させた後の細胞生存率を示す。これらの条件では, HVJ-E, porphyrus envelope のいずれにおいても有意な細胞生存率の低下が見られており, HVJ-E 由来の抗腫瘍効果が確認された。

Fig.4 Survival rate of PC-3 cells after HVJ-E or porphyrus envelope (amount of enclosed PpIX lipid in HVJ-E: 2.2 pmol/HAU) administration without laser irradiation. The error bar shows a standard deviation. (a) 24 and 48 h incubated after 3 h immersion in HVJ-E or porphyrus envelope (It is the same condition of PDT experiment). (b) 24 and 48 h incubated with HVJ-E or porphyrus envelope.

4.3 HVJ-E, および porphyrus envelope の膜融合能の評価

Fig.5 に各 PpIX 脂質添加濃度に対する porphyrus envelope の膜融合能の力価を示す。PpIX 脂質の添加濃度が高くなるにつれて膜融合能の力価の低下が確認されており, PpIX 脂質を多く封入するほど, HVJ-E の膜融合能が低下することが確認された。

Fig.5 The titer of membrane fusion of each porphyrus envelope. The error bar shows a standard deviation.

5. 考察

5.1 Porphyrus envelope の PDT 効果

Porphyrus envelope の IC_{50} は PDT の 24 h 後 で $0.04 \pm 0.01 \mu M$ であり, PpIX 脂質単体と比較して約 1/30 の濃度で同等の PDT 効果を得られることが確認された。照射を行わない場合, porphyrus envelope への 3 h の投与では, Fig.4 (b) に示すように細胞生存率の有意な低下は投与 48 h 後のみに確認され, PDT 効果改善の主な理由は HVJ-E による薬剤集積量の向上であると考えられる。また, porphyrus envelope による PpIX 脂質の誘導は膜融合を介するため, HVJ-E の表面に挿入された PpIX 脂質は膜融合の際に細胞膜に局在すると考えられる。細胞膜に光感受性薬剤が局在する場合, 細胞質に存在するよりも PDT 効果が高くなることが報告されており¹⁷⁾, PpIX 脂質の局在の違いも寄与している可能性がある。そのため, 今後 porphyrus envelope の細胞内局在や PDT 後の細胞死のメカニズムを詳しく分析することで治療機序を明らかにする必要がある。また, Fig.3 に示すように porphyrus envelope 間でもその PpIX 脂質の封入量に応じて IC_{50} の値は大幅に変化した。この理由として, PpIX 脂質封入量の低減に伴う膜融合能の向上が考えられる。先行研究においては, 1 粒子の HVJ-E に多量の (44 pmol/HAU) PpIX 脂質を封入していた。しかし, Fig.5 に示すように, PpIX 脂質添加濃度の向上に伴い膜融合能が低下することが確認されており, 44 pmol/HAU の PpIX 脂質を封入した場合, 本論文での評価方法では, 膜融合能をほぼ示さないことが明らかにされた。一方, 今回使用した porphyrus envelope の PpIX 脂質の封入量は 2.2 pmol/HAU であり, HVJ-E と比較して劣るものの, 約 900 HAU/mL の膜融合の力価を持つことが確認された。この膜融合能の違いにより, 薬剤輸送効率が大幅に改善され, PDT 治療効果の向上に繋がったと考えられる。実際に, PpIX 脂質封入量を 0.35 pmol/HAU まで低下させた場合においても, IC_{50} が $6 \pm 2 \text{ nM}$ となり, 膜融合能の改善に応じて PDT 効果の改善が確認された。単純に IC_{50} の値のみを考慮した場合, PpIX 脂質封入量を 0.35 pmol/HAU の porphyrus

envelope の PpIX 脂質の導入効率は、PpIX 脂質単体と比較して約 30 倍、5-ALA による PpIX の導入¹²⁾と比較して約 5250 倍高いと考えられる。

今回の検討では、PpIX の吸光の大きい波長 405 nm のレーザーを用い、高い PDT 効果を得ることに成功したが、今後 *in vivo* における検討を行う際は光侵達深さを考慮し、より長波長の光源も検討していく必要がある。

5.2 Porphyrus envelope の抗腫瘍効果について

HVJ-E の直接作用によるがん特異的細胞死、つまり抗腫瘍効果は HVJ-E、あるいは porphyrus envelope 内に含まれる RNA 断片が細胞内の RIG-I に認識されることで誘導される。そのため、抗腫瘍効果を効率良く誘導するためには、できるだけ多くの HVJ-E、あるいは porphyrus envelope がターゲットに融合する必要がある。今回の検討では薬剤への浸漬時間 3 h、および 24 h のいずれにおいても porphyrus envelope による抗腫瘍効果は HVJ-E と比較して劣っていたが、これは porphyrus envelope の膜融合能がオリジナルの HVJ-E よりも劣っていたためだと考えられる。PpIX 脂質の封入量を 0.7 pmol/HAU まで低下させたところ、投与 24 h 後の細胞生存率は約 65% まで低下し、2.2 pmol/HAU のものと比較して有意差が確認された ($P < 0.05$)。また、浸漬時間を 3 h から 24 h に延ばした場合に、いずれの薬剤においても抗腫瘍効果が向上したのは、RNA 断片の取り込み量が向上したためと考えられる。HVJ-E による膜融合は 37°C で投与を行った場合、投与後数十秒で迅速に起こるが、細胞表面のシアル酸の数が限られているため、投与した HVJ-E、あるいは porphyrus envelope の全てが一度に融合するわけではなく、細胞表面のシアル酸が再度発現するまで次の融合は起きない。そのため、ターゲットの近傍に HVJ-E、あるいは porphyrus envelope がある程度の時間維持されることが、抗腫瘍効果の効率的な誘導に必要なと考えられる。

5.3 porphyrus envelope の膜融合能について

Porphyrus envelope の膜融合能は PpIX 脂質添加濃度の向上に伴って低下することが確認され、その膜融合能が治療効果に大きな影響を与えることが確認された。PpIX 脂質の封入による膜融合能の低下の原因として、HVJ-E の構造変化が考えられる。PpIX 脂質はその構造から HVJ-E の膜に挿入する様にして封入されていると予想される。そのため、PpIX 脂質の封入量を増加させた場合、HVJ-E 表面の PpIX 脂質量が増大し、融合に関わる膜タンパクの作用を阻害している可能性がある。今回の結果からオリジナルの HVJ-E と有意差なく膜融合能を発揮させるためには、PpIX 脂質の封入量を 0.7 pmol/HAU 以下まで低下させることが必要であると考えられる。1 粒子あたりの HVJ-E に含まれる PpIX 脂質の分子数は低下するが、膜融合能と抗腫瘍効果が向上するため、結果として治療効果は PpIX 脂質濃度を 0.7 pmol/HAU 以上としたものよりも高くなったと考えられる。

6. 結論

今回の検討では、PpIX 脂質の封入量を低減させた porphyrus envelope を調製し、その PDT 効果、および抗腫瘍効果を評価した。その結果、低封入量の porphyrus envelope は高封入量のものと比較して、非常に高い PDT 効果を持つことが確認された。また、投与条件を工夫することで、オリジナルの HVJ-E には劣るもののレーザー照射なしでの抗腫瘍効果も誘導可能であることが確認された。porphyrus envelope の PDT 効果、および抗腫瘍効果には膜融合能が大きく関与することが判明し、PpIX 脂質添加濃度を 2.2 pmol/HAU よりも低下させることで、さらに治療効果が改善されることが示唆された。今後は、*in vivo* 系における porphyrus envelope の有効性を検討するため、より長波長の光源を用いて、小動物のがんに対する PDT を検討する予定である。

利益相反について

本原著論文の発表に際し、開示すべき利益相反はない。

参考文献

- 1) T. Matsuda, T. Marugame, K.I. Kamo, K. Katanoda, W. Ajiki, T. Sobue, The Japan Cancer Surveillance Research Group: Cancer Incidence and Incidence Rates in Japan in 2006: Based on Data from 15 Population-based Cancer Registries in the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) Project. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 42: 139-147, 2012.
- 2) A.P. Castano, P. Mroz, M.R. Hamblin: Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 6(7): 535-545, 2006.
- 3) 注射用レザフィリン添付文書, 独立行政法人 医薬品医療機器総合機構ホームページ, (http://www.info.pmda.go.jp/go/pack/4299404D1028_1_05/)
- 4) フォトフリン静注用添付文書, イーファーマホームページ, (<http://www.e-pharma.jp/allHtml/4299/4299403D1031.htm>)
- 5) A.S. Derycke, P.A. de Witte: Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56(1): 17-30, 2004.
- 6) C.F. van Nostrum: Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 56: 9-16, 2004.
- 7) Y. Kaneda: New vector innovation for drug delivery: development of fusogenic non-viral particles. *Curr. Drug Targets*, 4(8): 599-602, 2003.
- 8) Y. Kaneda, T. Nakajima, T. Nishikawa, S. Yamamoto, H. Ikegami, N. Suzuki, H. Nakamura, R. Morishita, H. Kotani: Hemagglutinating virus of Japan (HVJ) envelope vector as a versatile gene delivery system. *Mol. Ther.*, 6(2): 219-226, 2002.
- 9) M. Kurooka, Y. Kaneda: Inactivated Sendai Virus Particles Eradicate Tumors by Inducing Immune Responses through Blocking Regulatory T Cells. *Cancer Res.*, 67(1): 227-236, 2007.
- 10) T. Matsushima-Miyagi, K. Hatano, M. Nomura, L. Li-Wen, T. Nishikawa, K. Saga, T. Shimbo, Y. Kaneda: TRAIL and Noxa are selectively up-regulated in prostate cancer cells downstream of the RIG-I/MAVS signaling pathway by non-replicating Sendai virus particles. *Clin. Cancer Res.*, 18: 6271-6283, 2012.
- 11) Y. Kawaguchi, Y. Miyamoto, T. Inoue, Y. Kaneda: Efficient eradication of hormone-resistant human prostate cancers by inactivated Sendai virus particle. *Int. J. Cancer*, 124: 2478-2487, 2009.

- 12) M. Yamauchi, N. Honda, H. Hazama, S. Tachikawa, H. Nakamura, Y. Kaneda, K. Awazu: A novel photodynamic therapy for drug-resistant prostate cancer cells using porphyrin envelope as a novel photosensitizer. *Photodiagnosis and Photodyn. Ther.*, 11(1): 48-54, 2014.
- 13) S. Tachikawa, M.E. El-Zaria, R. Inomata, S. Sato, H. Nakamura: Synthesis of protoporphyrin-lipids and biological evaluation of micelles and liposomes. *Bioorg. Med. Chem.*, 22(17): 4745-4751, 2014.
- 14) G.L. Miller: Improved measurement of influenza virus hemagglutinin titer. *J. Immunol.*, 95(2): 336-344, 1965.
- 15) Y. Kimura, Y. Ito, K. Shimokata, Y. Nishiyama, I. Nagata: Temperature-sensitive virus derived from BHK cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *J. Virol.*, 15(1): 55-63, 1975.
- 16) G.K. Hirst: The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. *J. Exp. Med.*, 75(1): 49-64, 1942.
- 17) J. Kim, O.A. Santosa, J.H. Parka: Selective photosensitizer delivery into plasma membrane for effective photodynamic therapy. *J. Control. Release*, 191: 98-104, 2014.

著者紹介

山内 将哉 (Masaya Yamauchi)

2009年3月, 大阪大学工学部環境・エネルギー工学科卒業。2015年3月, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻博士前期課程修了。

本多 典広 (Norihito Honda)

2008年3月, 筑波大学第三学群卒業。2012年4月, 日本学術振興会 特別研究員 (DC2)。2013年3月, 大阪大学大学院工学研究科博士後期課程修了, 博士 (工学)。2013年4月, 大阪大学 未来戦略機構 特任助教。専門は生体組織光学 (Tissue Optics) を基礎としたレーザーと生体との相互作用の解析。レーザー治療手技の有効性・安全性の解析。日本レーザー医学会 (編集委員会 幹事), 日本光線力学学会, レーザー学会, SPIE 各会員。環境システム計測制御学会 論文賞, 平成21年度日本レーザー医学会総会賞 各受賞。

間 久直 (Hisanao Hazama)

1996年3月, 静岡大学工学部光電機械工学科卒業。1998年3月, 東京理科大学大学院理工学研究科電気工学専攻修士課程修了。2001年3月, 同専攻博士後期課程修了, 博士 (工学)。2001年4月, 川崎重工業株式会社技術研究所。2006年6月, 大阪大学大学院工学研究科環境・エネルギー工学専攻, 特任研究員。2009年6月, 同研究科附属高度人材育成センター, 助教。2014年4月, 同研究科環境・エネルギー工学専攻, 講師。2015年4月, 同専攻, 准教授。【学会】日本レーザー医学会 (評議員), 日本レーザー歯学会 (編集委員会査読委員), 日本レーザー治療学会 (評議員), 日本光線力学学会, 応用物理学会, 電気学会, レーザー学会, 日本質量分析学会, The American Society for Mass Spectrometry。

立川 将士 (Shoji Tachikawa)

東京工業大学 特別研究学生 (学習院大学所属)。

中村 浩之 (Hiroyuki Nakamura)

1991年3月, 東北大学理学部化学科卒業。1993年3月, 東北大学大学院理学研究科化学専攻博士前期課程修了。1993年4月, 日本学術振興会特別研究員。1995年2月, 東北大学大学院理学研究科化学専攻 博士後期課程2年中退。1995年3月, 東北大学大学院理学研究科化学専攻 助手。1995年4月, 九州大学有機化学基礎研究センター 助手。1996年9月, 博士 (理学) 取得 (東北大学)。1997年4月, 東北大学大学院理学研究科化学専攻 助手。1999年3月, 日本化学会進歩賞 受賞。2000年4月～2001年4月, 文部省在外派遣研究員 (米国 Pittsburgh 大学・D.P. Curran 教授)。2002年4月, 学習院大学理学部化学科 助教授。2006年4月～2013年8月, 同 教授。2007年7月, がん分子標的治療学会奨励賞 受賞。2013年9月～現在, 東京工業大学資源化学研究所 教授。所属学会は日本化学会, 日本薬学会, 有機合成化学協会, 日本中性子捕捉療法学会, がん分子標的治療学会等。

金田 安史 (Yasufumi Kaneda)

1980年3月, 大阪大学医学部卒業。1984年3月, 大阪大学大学院医学研究科修了, 医学博士。1984年4月, 大阪大学細胞工学センター研究生 (谷口奨学生)。1984年11月, 大阪大学細胞工学センター 助手。1992年4月, 大阪大学細胞生体工学センター 助手。1992年8月大阪大学細胞生体工学センター 助教授。1998年7月, 大阪大学医学部 教授 (遺伝子治療学)。1999年4月, 大阪大学大学院医学系研究科 教授 (遺伝子治療学)。2013年4月, 大阪大学大学院医学系研究科・研究科長, 医学部長。専門は生体組織への遺伝子導入と遺伝子発現, 遺伝子治療。所属学会はアメリカ遺伝子細胞治療学会, 日本分子生物学会, 日本再生医療学会, 日本癌学会, 日本遺伝子治療学会。

栗津 邦男 (Kunio Awazu)

1984年3月, 神戸大学大学院工学研究科修士課程修了。1996年4月, 博士 (工学) 神戸大学。1997年3月, 博士 (医学) 順天堂大学。2000年5月, 大阪大学大学院工学研究科 客員教授。2005年4月, 同 教授 (環境・エネルギー工学専攻量子エネルギー工学講座量子ビーム応用工学領域)。2011年10月, 大阪大学大学院生命機能研究科 兼任。2015年4月, 大阪大学国際医工情報センター 兼任。【専門】生体組織光学, 光生物学, レーザー医療機器のレギュラトリーサイエンス。【学会】日本レーザー医学会 (副理事長・編集委員会 委員長・医用レーザー機器開発推進委員会 委員長), 日本レーザー歯学会 (理事), レーザー学会 (諮問員), 日本光線力学学会 (幹事), 日本レーザー治療学会 (理事), 日本レーザー獣医学研究会 (副会長), 日本生体医工学学会, SPIE 等。