光線力学的治療による抗腫瘍効果のメカニズム

臼田 実男¹, 一ノ瀬 修二¹, 石角 太一郎¹, 平田 剛史¹, 井上 達哉¹,
大谷 圭志¹, 今井 健太郎¹, 久保田 光博¹, 角田 佳彦¹, 筒井 英光¹,
山田 公人¹, 古川 欣也², 奥仲 哲弥³, 加藤 治文¹

¹東京医科大学 外科学第1講座(呼吸器甲状腺外科) (〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1)

²東京医科大学 霞ヶ浦病院呼吸器外科 (〒300-0395 茨城県稲敷郡阿見町中央3-20-1)

³国際医療福祉大学 山王病院呼吸器センター (〒107-0052 東京都港区赤坂8-10-6)

The Mechanism of Action of Photodynamic Therapy

Jitsuo USUDA,¹ Shuji ICHINOSE,¹ Taichiro ISHIZUMI,¹ Takeshi HIRATA,¹ Tatsuya INOUE,¹
Keishi OHTANI,¹ Kentaro IMAI,¹ Mitsuhiro KUBOTA,¹ Yoshihiko TSUNODA,¹
Hidemitsu TSUTSUI,¹ Kimihito YAMADA,¹ Kinya FURUKAWA,¹
Tetsuya OKUNAKA,³ and Harufumi KATO¹

¹Department of Thoracic Surgery, Tokyo Medical University, 6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 160-0023

²Dept. of Thoracic Surgery, Tokyo Medical University Kasumigaoka Hospital, 3-20-1 Chuo, Amimachi, Inashiki-gun, Ibaraki 300-0395

³Respiratory Disease Center, Sanno Hospital, International University of Health and Welfare, 8-10-6 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052

(Received March 20, 2007)

Photodynamic therapy (PDT), one of the treatment modalities for cancer, uses a photosensitizer and laser irradiation to induce the production of reactive oxygen species in cancers cells. In Japan, the United States, and many other countries, PDT is widely used as a treatment option for solid cancers. In the therapeutic guidelines for lung cancer established in 2002 by the Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare based on the principle of evidence-based medicine, PDT is the recommended treatment modality for centrally located early stage lung cancer. It has been reported that PDT rapidly induce apoptosis, inflammatory reaction, tumor specific and/or nonspecific immune reaction and damages the microvasculature of the tumor bed. The mechanism of action of PDT is unique and is not well known. In this paper, we discuss the mechanism of the induction of apoptosis or necrosis following PDT.

Key Words: PDT, Apoptosis, BCl-2

1. はじめに

光線力学的治療(Photodynamic therapy: PDT)は、腫瘍親和性光感受性物質と低出力レーザー照射により光線力学的反応を引き起こし、発生される一重項酸素などの活性酸素により抗腫瘍効果を有する治療法である。本邦では、早期肺癌、早期食道癌、胃癌、早期子宮頸癌に対して保険適応となっている。人口構造の高齢化が加速中、低侵襲、臓器機能を温存し、QOLを損ねることなく効果的に治療可能であるPDTは、大いに期待される治療である。また、最近では腫瘍だけでなく、滲出型加齢性黄斑変性症といった悪性疾患以外に対しても保険適応となり、その需要は急激に増加している。海外では上記疾患以外に前立腺癌、皮膚科領域の腫瘍、脳腫瘍、頭頸部癌、脱毛などに対する治療も施行され、良好な成績をお

さめている。このPDTの作用機序については、使用する光感受性物質の種類、レーザー照射量、タイミングなどによって異なっていることが明らかになっている。本稿では、PDTの作用機序については、現在明らかになっているメカニズムについて解説する。

2. 光線力学的反応

光線力学的治療とは、ポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織、新生血管への特異的な集積性と光の励起(低出力レーザー)により発生する一重項酸素の強い細胞破壊効果を利用した治療法である¹⁾。正常組織に大きな障害を与えることがなく、低エネルギーで病変部を選択的に治療することができ、レーザー光照射により様々な病変に対して治療可能である。腫瘍親和性光感受性物質が光線に暴露さ

れると光エネルギーを吸収し、励起状態(一重項状態)に転位するが、これが基底状態に遷移する際のエネルギー転換の結果生ずる活性酸素が細胞を変性、壊死に陥らせると考えられている²⁾。実際には、光感受性物質は静脈投与後、腫瘍組織に集積し、赤色光線(630 nmあるいは664 nm)により励起され、光線力学的反応により抗腫瘍効果を生ずる。光感受性物質フォトフリン®は、630 nmに吸収スペクトルを有するため、厚生労働省からはエキシマ・ダイレーザー、YAG-OPOレーザーが認可され、レザフィリン®は664 nmのレーザー光を発するPDレーザー(ダイオードレーザー)が認可されている。抗腫瘍効果のメカニズムとして、一重項酸素などの発生にともない①直接抗腫瘍効果を引き起こす、②免疫学的応答など2次的、間接的な様々なシグナル伝達による抗腫瘍効果、③腫瘍へ流入する微小血管障害などが考えられている³⁾。

3. 光感受性物質の局在

PDTの抗腫瘍効果のメカニズム解析で重要なことは、腫瘍親和性光感受性物質の局在がどこにあるのかということである。光感受性物質が結合する部位から数nmの範囲において、一重項酸素による直接的な影響があり、その範囲がPDTの標的と考えられている。我々はミトコンドリアをターゲットとする光感受性物質かあるいはそうではないかという新たな分類の方法で、その光感受性物質によるPDTのメカニズム解析を行った。以前から、Oleinickらはphthalocyanine(Pc)4という光感受性物質は、細胞のミトコンドリア外膜を中心に、小胞体やゴルジ体などにも分布することを示してきた³⁾。MitoTracker Greenの蛍光パターンとPc 4の蛍光パターンが一部重なりあうが、完全にはoverlapしないからである。我々もPc 4-PDTはミトコンドリア外膜の障害から、ミトコンドリア外膜の膜電位の低下、ミトコンドリアの膨化、ミトコンドリアからcytochrome cの放出をきたし、細胞をアポトーシスへ導くことを報告してきた。

現在、我が国では厚生労働省より認可されている光感受性物質は、3種類ある。早期肺癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌に対してはポルフィマーナトリウム(フォトフリン®, Photofrin; PHE)が、早期肺癌のみに対してレザフィリン®が、滲出性加齢性黄斑変性症に対してはビスダイン®が認可されている⁴⁾。フォトフリン®の至適投与量は、2 mg/kgで緩徐に静脈投与する。腫瘍組織には、正常組織のおよそ4倍取り込まれ、かつ48時間以上停滞する特性を有しているため、静脈投与48時間後にレーザーを照射する。このフォトフリン®は、組織透過性の比較的高い630 nmの赤色光線で励起され光線力学反応が生ずる。レザフィリン®は、第2世代光感受性物質といわれ、腫瘍集積性にすぐれ、最大の問題であった日光過敏症がより軽度で、組織透過性のよりよい長波長側でのレーザー励起可能で、クロリン環を有し、水溶性で664 nmに吸収域がある。このレザフィリン®は、1997年10月から2000年3月まで全国10施設において臨床第II相試験が施行され、2003年10月に厚生労働省より認可を受け、2004年6月に薬価収載

された^{4,5)}。レザフィリン®は、日光過敏症が軽度で、40 mg/cm²を静脈投与後3~6時間でレーザー照射を施行するために、将来的にはPDTを外来で施行することも可能である。

我々は、フォトフリン®, レザフィリン®の細胞内局在について、蛍光顕微鏡により観察した(Fig. 1)。

フォトフリン®は、ミトコンドリア外膜だけでなく、核膜周囲、ライソゾームなどに集積した。一方、レザフィリン®はライソゾームなどを中心に局在していた(Fig. 2)。こうした細胞内局在の違いから、その標的分子、作用機序の違いがあることが推測された。

4. Bcl-2蛋白はPDTの分子標的因子か?

我々は、Pc 4-PDTがアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2にダメージをあたえることを報告してきた⁶⁾。このBcl-2のphotodamageという現象は、レーザー照射直後にみとめられること、カスパーゼなどの酵素反応により分解されるものでもなく、staurosporineのような典型的なアポトーシス誘導薬剤の処理でもみとめられない現象であった。我々は、Bcl-2をダメージする機序、アポトーシス誘導機序について、Bcl-2のさまざまな変異体を構築することによって検討した。

5. Bcl-2変異体に対するダメージの有無

Bcl-2 familyはアポトーシスを促進するものと、抑制するものから成る。アポトーシス促進するものにBax, Bakがあり、アポトーシスを抑制するものにBcl-2, Bcl-x1などがある。これらの1-4 α -helicalのBcl-2相同性領域(Bcl-2 homology (BH) domains)は共通だが、最初の連続配列や空間配列のわずかな違いによって、促進か抑制かの別に分れる(6)。Bcl-2は4つのBH領域を有し、Bcl-2 familyのC末端部位はミトコンドリア外膜、小胞体等の細胞内外膜に固定するために必要な疎水性のアミノ酸から成る。またBcl-2はC末端に膜貫通領域の19個のアミノ酸部位を持ち、これらC末端の22個のアミノ酸部位が欠損しているものは細胞膜への吸着が出来ないことが報告されている。様々な種類の239個のアミノ酸をコードするBcl-2遺伝子の変異体を構築し、PDTがどのようにBcl-2をダメージし、どのようなメカニズムでphotodamageがおこるか検討した。

Bcl-2遺伝子欠損した変異体を作成し、高発現ベクターpcDNA/His/Maxに導入した。DU-145細胞にwild-type Bcl-2, mutant-Bcl-2遺伝子を導入し、24時間後にLD90の条件でPDTを施行した。PDT直後に蛋白を回収し、pcDNA/His/Max内にコードするXpressというタグに対する抗体でWestern blotを施行した。

この結果から、Bcl-2のphotodamageは、蛋白が全く消えてしまうのではなく、光線力学的反応により何らかの蛋白とcross-linkingを生じ、巨大分子になっていることが推察された。また、C末端の膜貫通ドメインやBH1, BH2間に存在する別の膜貫通領域が、Bcl-2のphotodamageに必要であることが明らかになった。

Fig. 1 Localization of Photofrin® in MCF-7c3 cells. MCF-7c3 cells were loaded with 0.63 $\mu\text{g/ml}$ photofrin_ for 3 hours (A, B, C) and MCF-7c3 cells were loaded with 100 nM MitoTracker Green. Image of A is conventional white light microscopical findings. The image of Photofrin® displayed diffuse and punctate pattern (B).

Fig. 2 Localization of Laserphyrin in MCF-7c3 cells. MCF-7c3 cells were loaded with 1.75 $\mu\text{g/ml}$ Laserphyrin® for 3 hours (A, B, C) and MCF-7c3 cells were loaded with 100 nM MitoTracker Green. Image of A is conventional white light microscopical findings. The image of Laserphyrin® displayed diffuse and punctate pattern (B).

次に、Bcl-2遺伝子、Bcl-2変異遺伝子をpEGFPベクターに組み替え、PDT前後で、Bcl-2の局在の変化などについて共焦点顕微鏡で観察した (GFP: green fluorescent protein; 蛍光蛋白)。DU-145細胞にpEGFP-Bcl-2を一過性に導入し、同じ細胞をPDT前からPDT直後まで観察した。GFP-Bcl-2の局在は、ミトコンドリアだけでなく核周囲、ERなどに分布していた。PDT直後の観察でも、GFP-Bcl-2の局在はほとんど変化せず、同じ位置にとどまっていた。また、GFPの蛍光の減弱もみとめなかった。このことは、Bcl-2のphotodamageは、Bcl-2蛋白がPDTにより消失したのではないという証明である。

PDTにより、アポトーシス抑制蛋白への影響は、Bcl-2以外にBcl-xLにもphotodamageの現象はみとめられた。しかし、アポトーシス促進蛋白であるBax, Bakなどには全く影響をおよぼさなかった。Baxは、活性化されるとN-末端領域が翼を広げるように3次元構造が変化し、ミトコンドリアへ遊走すると考えられている。そこで、PDT後のBcl-2の3次元変化をBax抗体(clone 6A7, アミノ酸12-24を認識)を使用して免疫沈降法により検討した⁷⁾。PDT後、Baxの発現量に変化はみとめられなかったが、活性化されミトコンドリアへ遊走することが示唆された。また、Bcl-2過剰発現により、Baxの活性化は抑制化されることも明らかに、PDTによるアポトーシス誘導には、Bcl-2のphotodamageによるBcl-2蛋白のアポトーシス抑制能の喪失

が大きく影響を及ぼしていることが示唆された。さらに、Bcl-2, Bax発現量の相対的な割合というものが、Bcl-2のphotodamageによりアポトーシスが誘導されるかを左右していると考えられた。

6. アポトーシスカネクローシスカ

フォトフリン®-PDTでは、Pc 4-PDTのようにPDTの条件、光感受性物質の濃度依存的にBcl-2のphotodamageがみとめられた (Fig. 3)。しかし、Kesselらの報告にもあるように、主にlysosomeを標的とするレザフィリン®-PDTでは、LD₉₀ (lethal dose 90: 90%の細胞が死に至る条件、1.75 $\mu\text{g/ml}$ のレザフィリン®を3時間接触させ、3 J/cm²のレーザー照射)以上の強い条件でもBcl-2のダメージはみとめなかった (Fig. 4)。このように、光感受性物質の細胞内での局在が、抗腫瘍効果のメカニズムと密接に関与していると考えられる。また、我々は、乳癌細胞株MCF-7に安定してpro-caspase-3を発現させたMCF-7c3細胞を用いて、LD90の条件でPDT施行後のアポトーシスの有無を蛍光顕微鏡により検討した。フォトフリン®-PDTでは、PDT施行6時間後には典型的なアポトーシスを約58%以上と認め、24時間後には90%以上の細胞が、アポトーシスを呈した (Fig. 5)。一方、レザフィリン®-PDTは、24時間後でも典型的なアポトーシスはみとめなかった (Fig. 6)。このことは、in

*vitro*レベルで、フォトフリン®とレザフィリン®とは抗腫瘍効果において異なる作用機序を有していると考えられた。

7. PDTによるLysosomal damage

レザフィリン®と構造式が類似しているATX-s10は、今後の臨床応用が大変期待されている第2世代光感受性物質

の1つである。この薬剤の細胞内局在は、レザフィリン®と似て、ライソゾームに主に集積していたため、Bcl-2のphotodamageという点でも、レザフィリン®と同様に認めなかった。しかし、LD₉₀という条件で*in vitro*において形態学的に典型的なアポトーシス像をヘキスト染色で観察できた。フォトフリン®との違いは、アポトーシスを誘導するのに要する時間が遅く、ATX-s10はフォトフリン®, レザ

Fig. 3 Photodamage to Bcl-2 in MCF-7c3 cells by Photofrin®-PDT. MCF-7c3 cell were transiently transfected with pcDNA/HisMax expression vector conataininig wild-type Bcl-2, pcDNA/HisMax-Bcl-2. Twenty hours after the transfection, the cells were treated with 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 and 2.0 μg/ml Photofrin® for 3 hours and then irradiated with laser (630 nm, 3 J/cm²). Immediately (T_{0h}), or 1 hour (T_{1h}) after PDT, cells were collected, washed and lysed. An aliquot (20 μg) of the whole cell lysate was separated by SDS-PAGE. The Bcl-2 level was examined on western blot analysis using a mouse monoclonal anti-Xpress antibody.

Fig. 4 No Photodamage to Bcl-2 in MCF-7c3 cells by Laserphyrin®-PDT. MCF-7c3 cell were transiently transfected with pcDNA/HisMax expression vector conataininig wild-type Bcl-2, pcDNA/HisMax-Bcl-2. Twenty hours after the transfection, the cells were treated with 0.63, 1.0, 1.25, 1.75 and 2.5 μg/ml Photofrin® for 3 hours and then irradiated with laser (664 nm, 3 J/cm²). Immediately (T_{0h}), or 1 hour (T_{1h}) after PDT, cells were collected, washed and lysed. An aliquot (20 μg) of the whole cell lysate was separated by SDS-PAGE. The Bcl-2 level was examined on western blot analysis using a mouse monoclonal anti-Xpress antibody.

Fig. 5 Photofrin®-PDT induced morphologically typical apoptosis. MCF-7c3 cells were treated with 0.63 μg/ml Photofrin® for 3 hours and then irradiated with laser light (630 nm, 3 J/cm²), producing 90 % killing of MCF-7c3 cells, as determined by clonogenic assay. Before PDT, 6 or 24 hours after PDT, cells were collected and fixed. After fixation, cells were stained with Hoechst 33342. At least 200 cells were counted from each samples, and the yield of apoptosis was expressed as a percentage of the total population.

Fig. 6 Laserphyrin®-PDT did not induce morphologically typical apoptosis. MCF-7c3 cells were treated with 1.75 μg/ml Laserphyrin® for 3 hours and then irradiated with laser light (664 nm, 3 J/cm²), producing 90 % killing of MCF-7c3 cells, as determined by clonogenic assay. Before PDT, 6 or 24 hours after PDT, cells were collected and fixed. After fixation, cells were stained with Hoechst 33342. At least 200 cells were counted from each samples, and the yield of apoptosis was expressed as a percentage of the total population.

フィリン®と異なる作用機序で抗腫瘍効果を呈することが考えられた⁸⁾。我々は、ライソゾームより放出されるcathepsinについて注目した。すなわち、ATX-s10-PDTはライソゾームを標的として作用し、ライソゾームよりproteaseの1種であるcathepsinを放出し、ミトコンドリアを介してcaspaseを活性化し、最終的にcytochrome cを放出し典型的なアポトーシスを誘導すると仮説した。そこで、MCF-7c3細胞にLD90の条件でATX-s10-PDTを施行したところ6時間後には、アポトーシスの割合は、約6%、12時間後に18%、24時間後に88%だった。この条件で、MCF-7c3細胞にcathepsin inhibitorを添加してPDTを施行したところ、ATX-s10によるアポトーシス誘導は抑制された (Fig. 7A, B)。この結果から、ATX-s10によるアポトーシス誘導は、ライソゾームを介したcathepsinの放出が大切であり、そのシグナル伝達がミトコンドリア経路を活性化することが示唆された。フォトリン®-PDTのように直接ミトコンドリア経路を活性化することによりアポトーシスを誘導する作用機序とは、異なるためにATX-s10-PDTによるアポトーシスはフォトリン®よりも遅れて誘導されることが示唆された⁸⁾。

8. 免疫学的な影響による抗腫瘍効果

PDTによるoxidative stress, 炎症性変化などによりさまざまな炎症性サイトカインの抗腫瘍効果への関与が報告されている。これらについては、HendersonやGollnickらが報告しているように、PDTの抗腫瘍効果の中でも重要な役割をはたしている。我々は、マウスのルイス肺癌細胞株LLCにレザフィリン®-PDTを施行したところ、IL-2, IL-6, TNF- α のmRNAが増加した。これらのサイトカインの発現と抗腫瘍効果との関係を明らかにするために、我々は、LLC細胞に各種サイトカインを過剰に発現させた細胞LLC/IL-2, LLC/IL-6, LLC/IFN- γ , LLC/TNF- α を使用してレザフィリン®-PDTを施行した。コロニーアッセイにより*in vitro*で感受性試験をしたところ、LLC/IL-6細胞は親株LLCに比して耐性を示した⁹⁾。さらに、ヌードマウスに上記細胞株を移植し、レザフィリン®-PDTを施行し、感受性試験を*in vivo*で施行した。LLC/IL-6細胞は、親株や他のサイトカインを過剰発現した細胞株に比して、有意に再発しやすかった。これらのことから、PDTにより誘導されるIL-6は、PDTの抗腫瘍効果に対してnegativeに作用することが明らかになった。

9. 血管ダメージによる抗腫瘍効果

PDTにより腫瘍へ流入する微小血管障害が障害され、腫瘍血管を閉塞し抗腫瘍効果を引き起こすことが知られている¹⁻³⁾。臨床的にも、腫瘍病巣に対してPDT終了直後から、腫瘍が白色を帯びて虚血性変化を呈していることが観察される。このPDTによる微小血管障害は、vascular endothelial growth factor(VEGF)の発現を誘導することが知られている¹⁰⁾。VEGFの発現誘導は、かえって新生血管を誘導することになり、再発を助長するのではないかと考

Fig. 7 Inhibition of cathepsin can protect against ATX-s10-induced apoptosis. (A) MCF-7c3 cells were treated with 6 μ g/ml ATX-s10 and 100 μ M CA-074Me or 200 μ M zFA-fmk or 100 μ M Pepstatin A for 3 hours, and then were photoirradiated with a diode laser (670 nm, 6 J/cm²). After PDT, cells were washed and then treated with CA-074Me or M zFA-fmk or Pepstatin. Twenty-four hours after PDT, cells were washed, collected, fixed and then stained with Hoechst 33342. At least 200 cells were counted from each sample, the yield of apoptotic cells was expressed as a percentage of the total population. (B) The morphologically typical apoptosis.

えられるため、PDTによる微小血管障害と新生血管の増生のバランスが重要と考えられている。LLC/IL-2腫瘍をマウスに移植し、レザフィリン®-PDTを施行したところ、親株LLC移植腫瘍よりも統計学的に有意に再発を助長することが明らかになった。IL-2過剰発現しているLLC/IL-6腫瘍ではVEGFがPDTにより誘導され、VEGF発現が再発に大きく関与していることが明らかになった。

PDTによる抗腫瘍効果には、微小血管障害と新生血管の増生のバランスが特に大切であることが明らかになった。

参考文献

- 1) H. Kato, J. Usuda, T. Okunka, K. Furukawa, H. Honda, N. Sakaniwa, Y. Suga, T. Hirata, K. Ohtani, T. Inoue, S. Maehara, M. Kubota, K. Yamada, and H. Tsutsui: *Lasers Med Surg.* **38** (2006) 371.
- 2) T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, and Q. Peng: *J. Natl. Cancer Inst.* **90** (1998) 889.
- 3) N. L. Oleinick, R. L. Morris, and I. Belichenko: *Photochem Photobiol Sci.* **1** (2001) 1.
- 4) J. Usuda, H. Kato, T. Okunaka, K. Furukawa, H. Tsutsui, K. Yamada, Y. Suga, and H. Honda: *J. Thorac. Oncol.* **1** (2006) 489.
- 5) H. Kato, K. Furukawa, M. Sato, T. Okunaka, Y. Kusunoki, M. Kawahara, M. Fukuoka, T. Miyazawa, T. Yana, K. Matsui, T. Shiraishi, and H. Horinouchi: *Lung Cancer* **42** (2003) 103.
- 6) J. Usuda, S. M. Chiu, E. S. Murphy, M. Lam, A. N. Nieminen, and N. L. Oleinick: *J Biol Chem* **278** (2003) 2021.
- 7) J. Usuda, K. Azizuddin, S. M. Chiu, and N. L. Oleinick: *Photochem. Photobiol.* **78** (2003) 1.
- 8) S. Ichinose, J. Usuda, T. Hirata, T. Inoue, K. Ohtani, S. Maehara, M. Kubota, K. Imai, Y. Tsunoda, H. Tsutsui, K. Furukawa, T. Okunaka, N. L. Oleinick, and H. Kato: *Int. J. Oncol.* **29** (2006) 349.
- 9) J. Usuda, T. Okunaka, K. Furukawa, A. Tsuchida, Y. Kuroiwa, Y. Ohe, N. Saijo, N. Nishio, and H. Kato: *Int. J. Cancer* **93** (2001) 475.
- 10) C. J. Gomer, A. Ferrario, M. Luna, N. Rucker, and S. Wong: *Lasers Surg. Med.* **38** (2006) 516.