

光感受性物質 photofrin と laserphyrin による 光線力学的治療における標的因子の解析

平 田 剛 史¹⁾ 白 田 実 男¹⁾ 一ノ瀬 修 二¹⁾
井 上 達 哉¹⁾ 大 谷 圭 司¹⁾ 前 原 幸 夫¹⁾
久保田 光 博¹⁾ 今 井 健 太 郎¹⁾ 角 田 佳 彦¹⁾
黒 岩 ゆかり¹⁾ 山 田 公 人¹⁾ 筒 井 英 光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一講座

²⁾ 東京医科大学霞ヶ浦病院呼吸器外科

³⁾ 国際医療福祉大学山王病院呼吸器センター

【要旨】 本研究は、photofrin と laserphyrin による光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) の標的因子・抗腫瘍効果のメカニズムを明らかにすることを目的とした。我々は、従来構築したアポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 の様々な遺伝子変異株を細胞に遺伝子導入して、PDT 後の Bcl-2 の photodamage やアポトーシス、抗腫瘍効果に与える影響などについて検討した。Photofrin-PDT は、Bcl-2 蛋白を photodamage することによって、アポトーシスを誘導・抗腫瘍効果を発揮することが明らかになった。一方、laserphyrin-PDT では Bcl-2 の photodamage は観察されず、Bcl-2 の発現が抗腫瘍効果に耐性を示すことが明らかになった。

はじめに

光線力学的治療 (photodynamic therapy: 以下 PDT と略す) 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集積性と、光励起により発生する一重項酸素の殺細胞効果を利用したものであり、光化学的反応で病変部の選択的治療が可能となる¹⁾²⁾。1978 年に PDT の臨床試験が初めて Dougherty ら³⁾ によって行われてから、photofrin-PDT は様々な固形腫瘍に適応された。その後、米国の Food and Drug Administration (FDA) によって、進行食道癌、早期肺癌、末期肺癌に認可され、PDT の効力拡大と適応範囲を広げるために、第二世代光増感剤の治療効力が注目されてきている⁴⁾。現在、本邦では早期肺癌に対して

photofrin と laserphyrin の 2 種類の光感受性物質が保険適応されており、photofrin は疎水性光増感剤でミトコンドリアに、laserphyrin は親水性光増感剤でライソゾームに局在すると言われている⁵⁻⁸⁾。Laserphyrin-PDT の臨床第 II 相試験が中心型肺門部早期肺癌に対して施行され、完全寛解 (complete remission: 以下 CR と略す) は 84.6% であり photofrin と同程度であった⁹⁾。Laserphyrin は従来使用されていた photofrin に比べて、光線過敏症が軽度であり、使用する半導体レーザーが小型であり、メンテナンスも容易であることから、今後さらなる普及が期待されている。Laserphyrin は平成 16 年 6 月に薬価収載され、現在早期肺癌にのみ保険適応されているが、今後進行肺癌・その他の固形癌に対して適応の拡大が望まれている。その

2006 年 1 月 13 日受付、2006 年 2 月 21 日受理

キーワード: 光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT)、フォトフィリン、レザフィリン、アポトーシス、Bcl-2
(別冊請求先: 〒160-0023 東京都新宿区西新宿 6-7-1 東京医科大学外科学第一講座 白田 実男)

ためにも photofrin と laserphyrin による PDT が標的とする因子および抗腫瘍効果の機序を解明することが重要である。

我々は phthalocyanine (以下 Pc4 と略す) という光感受性物質による PDT が、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 を photodamage することによって、アポトーシスを誘導し、抗腫瘍効果に大きな役割を有することを報告してきた¹⁰⁻¹³⁾。Bcl-2 の属する Bcl-2 family には、アポトーシスを促進するものと抑制するものが知られており、アポトーシスを促進するものとしては Bax、Bak が、アポトーシスを抑制するものとしては Bcl-2、Bcl-x_L が知られている。これらの Bcl-2 相同性領域 (Bcl-2 homology domains: 以下 BH domains と略す) は共通であるが、最初の連続配列や空間配列のわずかな違いによって、アポトーシスの促進作用または抑制作用に分類される。Bcl-2 はこれら 4 つの BH 領域を有しており、Bcl-2 family の C 末端部位は特定の核膜、小胞体、ミトコンドリア外膜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なる。Bcl-2 は、C 末端に膜貫通領域の 19 個のアミノ酸部位を持っており、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¹⁴⁻¹⁶⁾。近年、白田ら¹²⁾¹³⁾ は Pc4-PDT において、Bcl-2 変異体の特異的構造変異と Pc4-PDT におけるそれらの細胞内局在や薬剤感受性について報告しており、PDT の photodamage には Pc4 の膜貫通のためのトランスメンブレン領域に加えて、イオンチャンネルを形成するために膜に挿入される疎水中心性 α ラセン体 ($\alpha 5, 6$) の二つを含む Bcl-2 の BH1 と BH2 の間の領域が必要であることが明らかになった。このことより、野生型 Bcl-2 や Bcl-2 変異体を過剰発現する遺伝子導入細胞を用いることによって、PDT によって誘導されたアポトーシスの Bcl-2 の役割を明らかにするため、Bcl-2 の photodamage とアポトーシス感受性との相関性を追跡した¹³⁾。

本研究では、photofrin と laserphyrin の PDT による抗腫瘍効果の機序を解明するために、標的因子としての Bcl-2 および Bcl-2 の発現による抗腫瘍効果、さらにはアポトーシス誘導への関与について検討した。

研究材料および方法

1. 細胞培養

ヒト乳癌 MCF-7 細胞株 (Case Western Reserve University の Dr. Oleinick NL の御好意より提供を受

けた) は、pro-caspase-3 遺伝子を安定導入した MCF-7c3 細胞株を使用した¹⁰⁻¹³⁾。10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培養液にて、5%CO₂、37°C で保温加湿された培養器で維持した。Green fluorescent protein (GFP) をそれぞれコードしたプラスミドベクター-pEGFP (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を安定発現させた MCF-7c3-GFP 細胞、pEGFP の C 末端領域にヒト BCL-2 遺伝子を導入した MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株も同様に、以前報告されているように樹立し、10% 牛胎児血清を含む RPMI 1640 培養液にて、5%CO₂、37°C で保温加湿した培養器で維持した¹³⁾。

2. 光感受性薬剤

Photofrin (Wyeth Japan K.K., Tokyo, Japan) は疎水性のヘマトポルフィリン誘導体で腫瘍親和性が高く、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を生ずる。中心型早期肺癌に対する photofrin とエキシマ・ダイ・レーザーを用いた第 II 相臨床試験では、CR は 84.8% であった¹⁷⁾。

Laserphyrin (Meiji Seika, Tokyo, Japan) は、分子量 799.69 の第 2 世代光感受性物質といわれ、クロリン環を有した水溶性であり、664 nm に吸収域がある⁸⁾⁹⁾。Laserphyrin は photofrin 以上に腫瘍親和性に優れ、組織透過性のより効率的である長波長側 (664 nm) でのレーザー励起が可能である。

3. レーザー装置

Photofrin に対して 630 nm の連続赤色光を発する励起用レーザー装置として、YAG-OPO (Hamamatsu Photonics K.K., Hamamatsu, Japan) を光源として使用した。Laserphyrin は 664 nm の連続赤色光を発するダイオード・レーザー (Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan) を使用した⁹⁾。

4. 蛍光顕微鏡検査法

蛍光画像は 405 nm の励起キセノン光および photofrin のための 600 nm 以上の検出波長と laserphyrin のための 630 nm の検出波長を用いて、高速冷却 CCD カメラ (Panasonic Model BD900: Matsushita Electric Industrial Co., Osaka, Japan) と高速励起光波長による蛍光画像転送処理システムを備えた倒立型蛍光顕微鏡 (DIAPHOT TMD-EF2: Nikon, Tokyo, Japan) を使用して撮影した。生体下の GFP 細胞を用いた蛍光画像のために、細胞を 35 mm ディッシュに置き、37°C、45 分間で 100 nM の LysoTracker Blue (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) または 100 nM の MytoTracker Green (Santa Cruz Biotech-

nology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) をディッシュに添加し、30分間保温した¹²⁾¹³⁾。LysoTracker Blue の蛍光画像は、He-Ne レーザーの 543 nm の励起光と 560 nm のロングパス・フィルタを用いて収集された。また MytoTracker Green の蛍光画像は、516 nm のロングパス・フィルタと、490 nm の励起光を使用して収集された。

5. Photofrin と laserphyrin の MCF-7c3 細胞株内局在の観察

細胞を 35 mm ディッシュ上に置き、24 時間培養器で恒温した。Photofrin と laserphyrin は FBS 無添加培養液の 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で MCF-7c3 細胞株と接触させた。次に LysoTracker Blue または MytoTracker Green をディッシュ内の培養液へ添加し恒温した。微分干渉フィルターを通して MCF-7c3 細胞株の photofrin あるいは laserphyrin の蛍光局在を観察した。

6. Lipofection による DNA 導入法

MCF-7c3 細胞株に pcDNA/His/Max-Bcl-2、pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (33-54)、pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (153-179)、pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (210-239) のプラスミド遺伝子 (Case Western Reserve University の Dr. Oleinick NL の御好意より提供を受けた)、各々 2 μg を lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を利用して遺伝子導入した¹¹⁻¹³⁾。

7. Western Blot 解析

細胞を 1500 回 7 分で遠心分離し、氷冷 PBS 溶液で 2 回洗浄した。細胞ペレットを 30 分間氷上に置いた後、溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5、120 mM NaCl、1% Triton X-100、0.2% sodium dodecyl sulfate: 以下 SDS と略す、0.5% deoxycholate、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 100 mM NaF) にて恒温して超音波溶解処理した¹⁰⁻¹³⁾。細胞溶解させたアルコール溶液 (20 μg) を、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分離し、ポリビニルデン・ジフルオロドメメンブレンへ転写させた。メンブレンを最適濃度で 1 時間、マウス・モノクローナル抗 Xpress 抗体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、マウス・モノクローナル抗アクチン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) とハムスター・モノクローナル抗ヒト Bcl-2 抗体 (Pharmingen, San Diego, CA, USA) の各々で保温させた。次に 0.1% (vol/vol) Triton X-100 を加えた PBS 溶液で水洗後、ペルオキシダーゼで活性化させた抗マウスおよび抗ハムスター免疫グロブリン G に

て、メンブレンを室温で 1 時間恒温した。メンブレンを洗浄後、化学蛍光検出試薬 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA) を用いた western blot 法で展開した。この分析によって、laserphyrin あるいは photofrin-PDT の、各々の Bcl-2 変異体に対する光化学反応効果が観察された。実験は独立して、少なくとも 3 回繰り返された。

8. アポトーシスの核染色分析

MCF-7c3 細胞株、MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株に photofrin または laserphyrin を 3 時間接触させ、それからレーザー照射 (3 J/cm^2) によって PDT を施行した。photofrin-PDT は、photofrin 0.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーザー照射 3 J/cm^2 (150 mW) で、laserphyrin-PDT は、laserphyrin 1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、レーザー照射 3 J/cm^2 (150 mW) で PDT を施行した。(この条件は、コロニーアッセイ法から得られた 90% 殺細胞効果を有する LD₉₀ である。)

PDT 施行前、PDT 施行 6 時間および 24 時間後に細胞を採取し 1% ホルマリンで固定後、細胞を Hoechst33342 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) で染色した。各々のサンプルから 200 個以上の細胞を計数し、アポトーシス細胞の割合を百分率で示した¹¹⁻¹³⁾。

9. コロニーアッセイ法による抗腫瘍効果感受性試験

MCF-7c3-GFP 細胞株、MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株を photofrin、laserphyrin のそれぞれ 0、0.31、0.63、1.25、1.75、2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で 3 時間接触後、3 J/cm^2 のレーザー照射により PDT を施行した。PDT 後直ちに細胞をトリプシン処理し、細胞を洗浄しカウント後に、25 cm^2 のディッシュに 50~150 のコロニーを形成するように細胞を播いた。10~14 日後に、0.1% crystal violet in 20% ethanol で染色し、コロニー数をカウントした。未治療の MCF-7c3 細胞のコロニー形成率は、約 30~40% であり、この値 (plating efficiency) を基準にコロニー形成がどれくらい PDT により抑制されるかを検討した¹³⁾。

結 果

1. Photofrin または laserphyrin の細胞内局在について

PDT の抗腫瘍効果のメカニズムを解析するには、光感受性物質の局在が非常に大切である¹⁷⁾。Photofrin は主にミトコンドリア外膜を障害すると言われており、Fig. 1 のように MCF-7c3 細胞株の photofrin の局

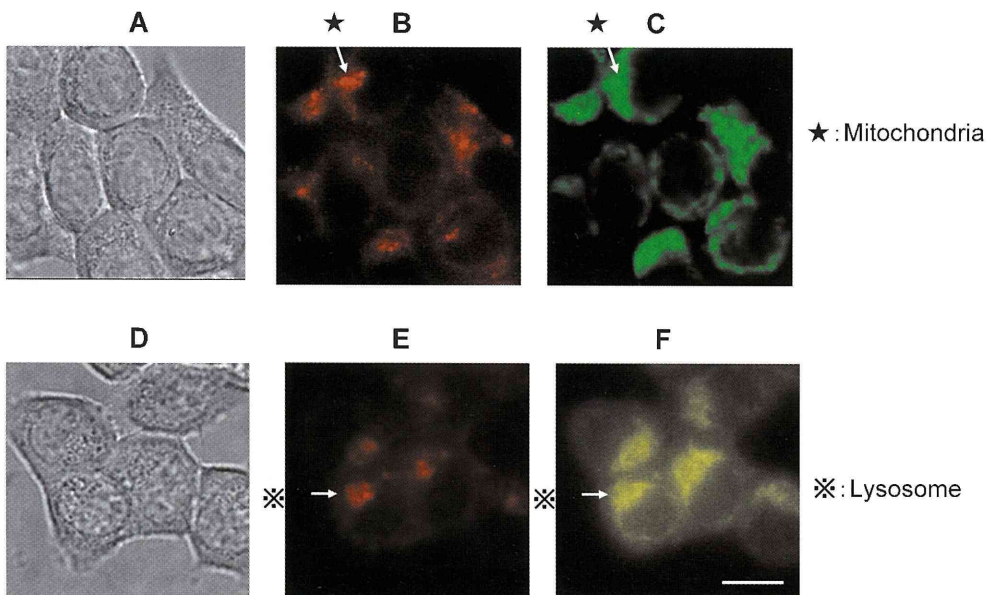


Fig. 1 Localization of photofrin and laserphyrin in MCF-7c3 cells. MCF-7c3 cells were loaded with 0.63 $\mu\text{g/ml}$ photofrin for 3 hours (A, B, C) and MCF-7c3 cells were loaded with 100 nm MitoTracker Green. Images of A and D are conventional white light microscopical findings. The images of photofrin displayed diffuse and punctate patterns (B). The kinds of pattern did not completely co-localize when cells were loaded with MitoTracker Green (C). The sign (★) showed the localization of mitochondria. MCF-7c3 cells were loaded with 1.75 $\mu\text{g/ml}$ laserphyrin for 3 hours (D, E, F) and MCF-7c3 cells were loaded with 100 nm LysoTracker Blue. The images of laserphyrin displayed some punctate and some diffuse patterns (E). The kinds of pattern did not completely co-localize when cells were loaded with LysoTracker Blue (F). The sign (※) showed the localization of lysosome. Scale bar, 5 μm .

在を蛍光顕微鏡で観察した¹⁷⁾。MitoTracker Green の局在とほぼ一致したが、完全な一致には至らなかった。すなわち photofrin の局在は、ミトコンドリアだけではなく、小胞体 (endoplasmic reticulum: ER)、ゴルジ複合体や他の細胞内オルガネラにも局在していると

推察された。また laserphyrin の局在は、ライソソームに分布していると言われているが、ほぼ LysoTracker Blue と蛍光は一致したが、完全な一致には至らなかった (Fig. 1)。

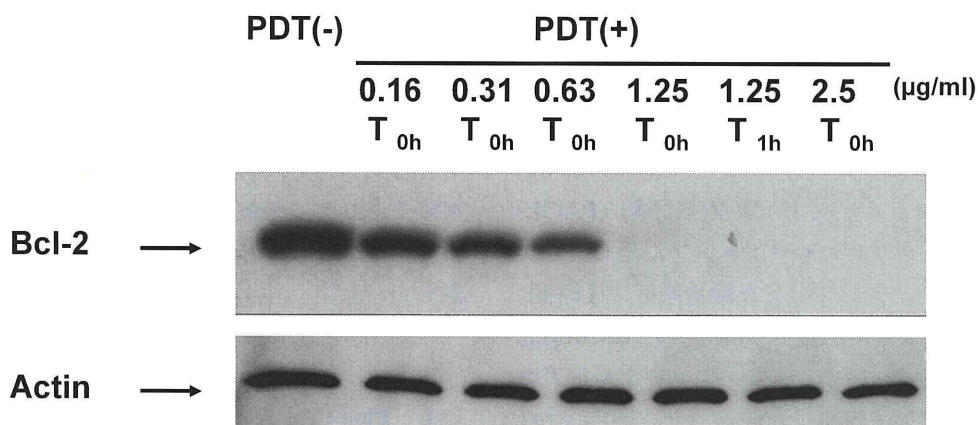


Fig. 2A Photodamage to Bcl-2 in MCF-7c3 cells by photofrin-PDT. MCF-7c3 cells were transiently transfected with PcDNA/HisMax expression vector containing wild-type Bcl-2, pcDNA/His/Max-Bcl-2. Twenty hours after transfection, the cells were treated with 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 and 2.0 $\mu\text{g/ml}$ photofrin for 3 hours and then irradiated with laser (630 nm, 3 J/cm^2). 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 blots using a mouse monoclonal anti-Xpress antibody. The membrane was probed with anti-actin as control.

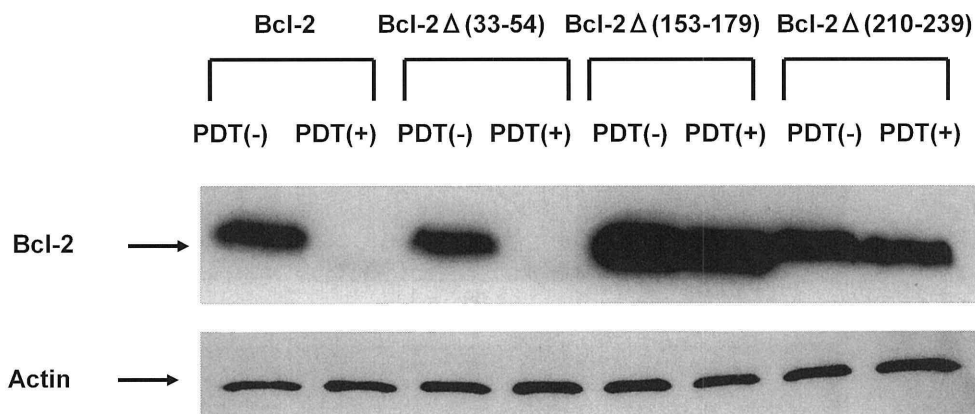


Fig. 2B Photodamage to mutant Bcl-2 in MCF-7c3 cells by photofrin-PDT. MCF-7c3 cells were transiently transfected with pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (33-54) or pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (153-179) or pcDNA/His/Max-Bcl-2 Δ (210-239). Twenty hours after transfection, the cells were treated with 0.63 μ g/ml photofrin for 3 hours and then irradiated with laser (630 nm, 3 J/cm²) producing 90% killing of MCF-7c3 cells. Immediately after PDT, cells were collected, washed and lysed. An aliquot (20 μ g) of the whole cell lysate was separated by SDS-PAGE. The mutant Bcl-2 level was examined on Western blots using a mouse monoclonal anti-Xpress antibody. The membrane was reprobbed with anti-actin as control.

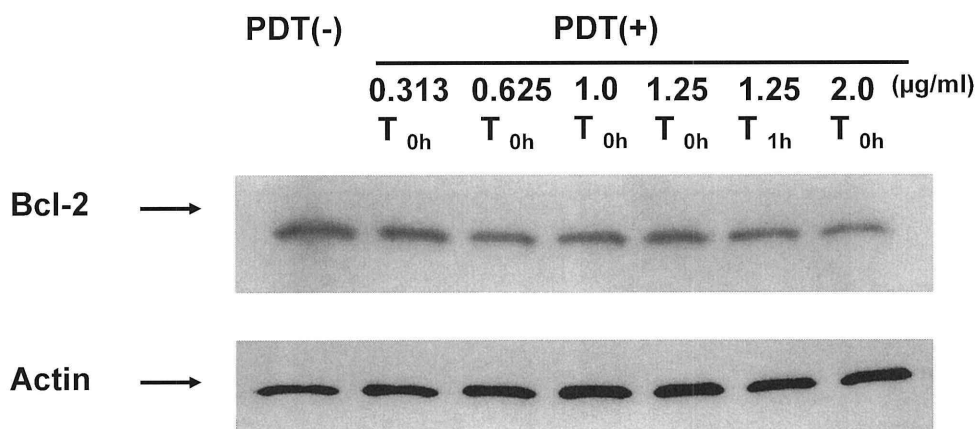


Fig. 3 Photodamage to Bcl-2 in MCF-7c3 cells by laserphyrin-PDT. MCF-7c3 cells were transiently transfected with PcDNA/HisMax expression vector containing wild-type Bcl-2, pcDNA/His/Max-Bcl-2. Twenty hours after transfection, the cells were treated with 0.63, 1.0, 1.25, 1.75 and 2.5 μ g/ml laserphyrin 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 μ g) of the whole cell lysate was separated by SDS-PAGE. The Bcl-2 level was examined on Western blots using a mouse monoclonal anti-Xpress antibody. The membrane was reprobbed with anti-actin as control. Scale bar, 10 μ m.

2. Photofrin-PDTによるBcl-2のphotodamageについて

我々は、ミトコンドリアをターゲットとする Pc4-PDT が、アポトーシス抑制蛋白である Bcl-2 をレーザー照射直後にダメージして、そのアポトーシスの誘導を容易にするということを報告してきた¹⁰⁻¹³)。そこで我々は、ヒト Bcl-2 (239 個のアミノ酸) を発現ベクター-pcDNA4/HisMax を用いて、MCF-7c3 細胞株へリポフェクション法により一過性に遺伝子導入させた¹²)。ここで使用したベクターである pcDNA4/His-

Max は、ヒスチジン、Xpress の 2 種のタグを有しており、細胞内で発現した Bcl-2 蛋白は抗 Xpress 抗体で認識可能である¹²)。

MCF-7c3 細胞株へ pcDNA4/HisMax-Bcl-2 を導入し、20 時間後に各種濃度の photofrin と接触させ、さらに 3 時間後に 3 J/cm² (150 mW) のレーザー照射を施行した。その後直ちに細胞から蛋白を回収し、抗 Xpress 抗体を使用して Western blot 法により、Bcl-2 蛋白の photodamage について検討した (Fig. 2A)。PDT 施行前の Bcl-2 蛋白の発現に比べて、photofrin は

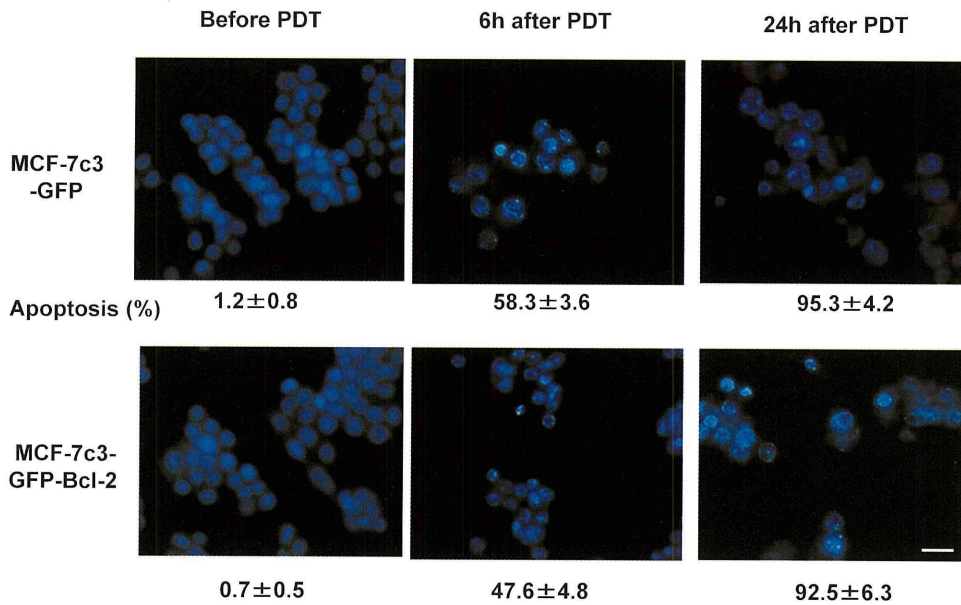


Fig. 4A Photofrin-PDT induced morphologically typical apoptosis. MCF-7c3-GFP cells and MCF-7c3-GFP-Bcl-2 cells were treated with 0.63 $\mu\text{g/ml}$ photofrin for 3 hours and then irradiated with laser light (630 nm, 3 J/cm²), producing 90% killing of MCF-7c3 cells, as determined by clonogenic assay. Before PDT, or 6 hours 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 apoptotic cells was expressed as a percentage of the total population. Scale bar, 10 μm .

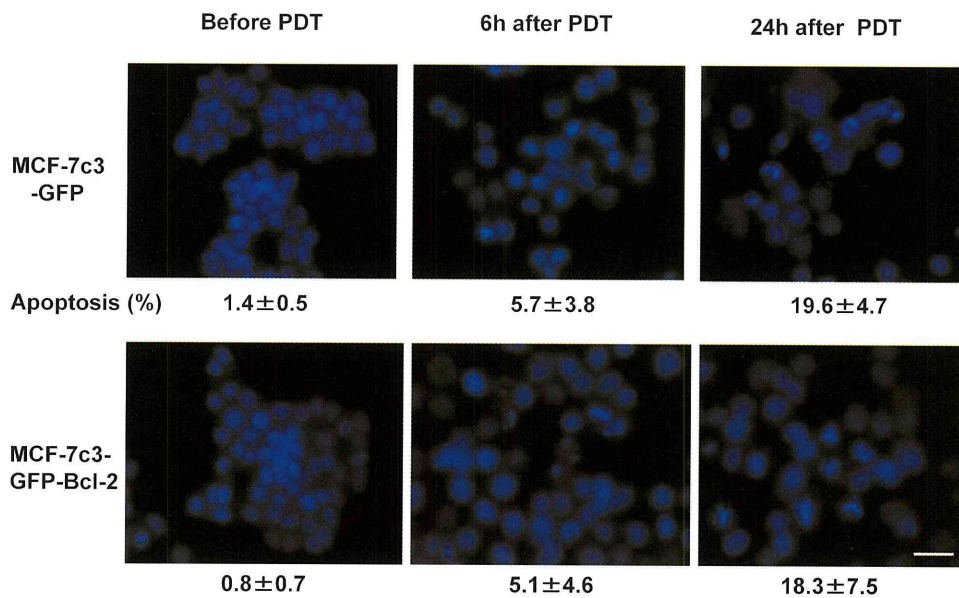


Fig. 4B Laserphyrin-PDT did not induce morphologically typical apoptosis. MCF-7c3-GFP cells and MCF-7c3-GFP-Bcl-2 cells were treated with 1.75 $\mu\text{g/ml}$ laserphyrin for 3 hours and then irradiated with laser light (664 nm, 3 J/cm²), producing 90% killing of MCF-7c3 cells, as determined by clonogenic assay. Before PDT, or 6 hours 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 apoptotic cells was expressed as a percentage of the total population.

0.16、0.31、0.63 $\mu\text{g/ml}$ と濃度依存的に増加するにつれて Bcl-2 蛋白発現量が減少し、1.25、2.5 $\mu\text{g/ml}$ の条件では完全に Bcl-2 蛋白は消失してしまった。これらは以前報告した Pc 4-PDT による Bcl-2 の photodamage

と同様の結果を認め、photofrin-PDT は Pc4-PDT と同じように Bcl-2 蛋白を標的とすることが示唆された¹⁰⁾¹²⁾。

次に、Bcl-2 のどの領域が photofrin-PDT による

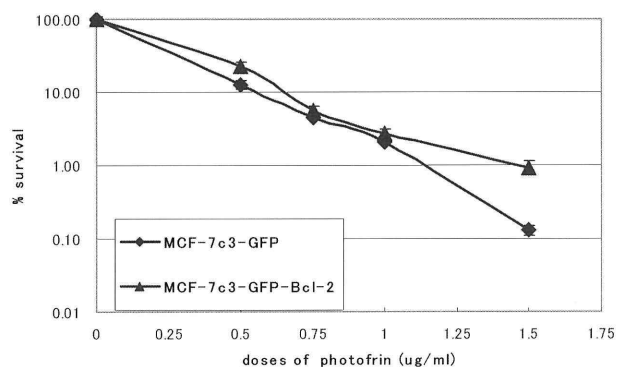


Fig. 5A Loss of clonogenicity of MCF-7c3-GFP cells and MCF-7c3-GFP-Bcl-2 cells as a result of photofrin-PDT.

Exponentially growing cultures of each cell line were treated with 0.16, 0.31, 0.63, 1.25 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ photofrin for 3 hours and then irradiated with laser (630 nm, 3 J/cm²). Immediately after PDT, cells were trypsinized, collected, diluted and plated at appropriate concentrations. We compared PDT-treated cells and untreated cells of the same cell line with regard to plating efficiency. Each datum is the mean \pm standard deviation for result from three independent experiments.

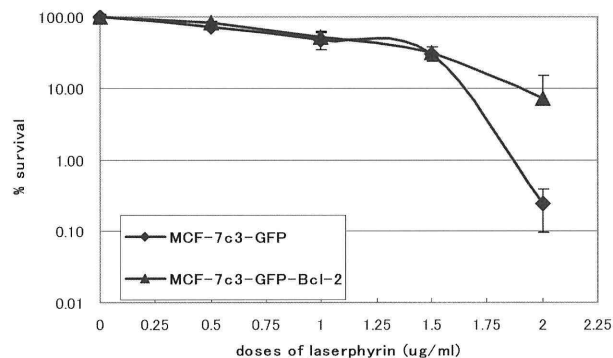


Fig. 5B Loss of clonogenicity of MCF-7c3-GFP cells and MCF-7c3-GFP-Bcl-2 cells as a result of laserphyrin-PDT.

Exponentially growing cultures of each cell line were treated with 0.31, 0.63, 1.25, 1.75 and 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ laserphyrin, for 3 hours and then irradiated with laser (664 nm, 3 J/cm²). Immediately after PDT, cells were trypsinized, collected, diluted and plated at appropriate concentrations. We compared PDT-treated cells and untreated cells of the same cell line with regard to plating efficiency. Each datum is the mean \pm standard deviation for result from three independent experiments.

photodamage に重要であるかを、Bcl-2 遺伝子変異体を同様の方法で MCF-7c3 細胞株に遺伝子導入して検討した。Fig. 2B で示したように、Bcl-2 Δ (33-54) 蛋白は Bcl-2 蛋白と同様に photodamage された。Bcl-2 の 34 番目のアミノ酸であるアスパラギン酸 (Asp) は、caspase により切断される部位であることが知られている¹²⁾。また、Bcl-2 の BH1 (136-155aa) と BH2 (187-202aa) の間の領域と C 末端領域の 219-237 アミノ酸がコードする領域は、膜貫通ドメインであるが、その 2 カ所の膜貫通ドメインをそれぞれ欠損した Bcl-2 Δ (153-179)、Bcl-2 Δ (210-239) の蛋白では photodamage を認められなかった。このことより、photofrin-PDT による Bcl-2 の photodamage には、膜貫通ドメインが必要であることが示された。

3. Laserphyrin-PDT による Bcl-2 の photodamage について

次に laserphyrin-PDT について、同様に MCF-7c3 細胞に Bcl-2 遺伝子を一過性に lipofection 法で過剰発現させた後に、laserphyrin-PDT を施行した。

Fig. 3 のように Western blot 法により、抗 Xpress 抗体で Bcl-2 の photodamage について検討したが、Bcl-2 の photodamage は認めなかった。コロニーアッセイにより算出した LD90 は、laserphyrin 濃度が 1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のときであったが、この条件よりさらに厳しい条件、すなわち 2.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ においても Bcl-2 の photodamage

を認めなかった。このことより、Bcl-2 は laserphyrin-PDT の標的ではないことを示していると考えられた。

4. Photofrin-PDT によるアポトーシス誘導

Photofrin-PDT によるアポトーシス誘導の有無について検討した。使用した細胞は、MCF-7c3 細胞株に pEGFP vector (Clontech, Palo Alto, CA, USA) のみを安定発現した MCF-7c3-GFP 細胞株と Bcl-2 蛋白を過剰発現した MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株である。MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株は、protein kinase C (PKC) inhibitor である staurosporine (STS) によるアポトーシスに対しては耐性であった¹³⁾。

MCF-7c3-GFP 細胞株に LD90 の条件で photofrin-PDT を施行し、ヘキスト染色により核形態をモニターし、典型的なアポトーシスを呈した細胞をカウントした (Fig. 4A)。PDT 施行 6 時間後では約 50% 以上のアポトーシス細胞を認め、24 時間後では 90% 以上のアポトーシス細胞を認めた。さらに、Bcl-2 蛋白が安定して過剰発現している MCF-7c3-GFP-Bcl-2 細胞株に対しても MCF-7c3-GFP 細胞株に対するのと同じ条件で PDT を施行した所、PDT 施行 6 時間後には約 45% 以上のアポトーシス細胞を認め、24 時間後には 90% 以上で、親株 MCF-7c3 細胞株と同様に典型的アポトーシスを認めた (Fig. 4A)。Photofrin-PDT では、24 時間後に親株 MCF-7c3 細胞株では 95.3 \pm 4.2%、Bcl-

2の過剰発現したMCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株では、 $92.5 \pm 6.3\%$ のアポトーシス細胞を呈し、両方の細胞間には統計学的に有意差を認めなかった (P 値: 0.4119)。

5. Laserphyrin-PDTによるアポトーシス誘導

Laserphyrin-PDTによるアポトーシス誘導能についても同様にLD90の条件で施行し、その後ヘキスト染色を行った (Fig. 4B)。MCF-7c3-GFP細胞株、MCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株ともに、PDT施行6時間後では典型的核形態を示すアポトーシス像は数%であったが、24時間後には約20%の細胞が典型的核形態を示すアポトーシス像を認めた (Fig. 4B)。Photofrin-PDT、laserphyrin-PDTの各々による24時間後のアポトーシス細胞の割合は、MCF-7c3-GFP細胞株に対しては、 $95.3 \pm 4.2\%$ と $19.6 \pm 4.7\%$ で有意差を認め (P 値: 0.008)、MCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株に対しても、 $92.5 \pm 6.3\%$ と $18.3 \pm 7.5\%$ で有意差を認めた (P 値: 0.009)。このことよりlaserphyrin-PDTの抗腫瘍効果は、photofrin-PDTと異なり、典型的なアポトーシス誘導能をあまり持たないことが示された。

6. Photofrin-PDT、laserphyrin-PDTによる抗腫瘍効果に関する感受性試験

コロニーアッセイ法により、各種濃度のphotofrinあるいはlaserphyrinをMCF-7c3細胞株、MCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株に接触させてPDTを施行し、10~14日後のコロニー数をカウントすることにより感受性試験を施行した。Photofrin-PDTでは、MCF-7c3-GFP細胞株、MCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株ともにLD₉₀の条件はほぼ等しい値であり、Bcl-2過剰発現細胞株MCF-7c3-GFP-Bcl-2に対しても耐性を示さず、線量修飾係数 (dose-modifying factor) は1.10であった¹³⁾ (Fig. 5A)。一方、Fig. 5Bで示すようにlaserphyrin-PDTでは、LD₉₀の条件でMCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞株はdose-modifying factorは1.35であり、親株MCF-7c3-GFP細胞株に比較して耐性であった。これらのことから、Bcl-2が過剰発現している腫瘍には、laserphyrin-PDTよりもphotofrin-PDTが好ましいことが示唆された。

考 察

PDTの抗腫瘍効果のメカニズムとしては、①一重項酸素発生による直接的な作用 ②これらによって引き起こされる免疫応答などによる間接的な作用 ③血管内皮細胞の障害による腫瘍血管の閉塞 (vascular shut down effect) の3つのメカニズムが考えら

れている¹⁸⁻²⁰⁾。これらPDTによって引き起こされるアポトーシスという現象に注目し、Oleinickら¹⁷⁾はそのメカニズムについて様々な報告をしている。現在、米国で行われている臨床試験の第2世代光感受性物質Pc4を用いて、アポトーシスの誘導メカニズム解析を行い、これらの標的因子がアポトーシス抑制蛋白であるBcl-2であることが解明され、Bcl-2遺伝子変異体を作成することにより、PDTのphotodamageが放射線や抗癌剤には認められない特異な現象であること、さらにphotodamageはBcl-2蛋白がクロスリンク現象をおこし、巨大な分子量の蛋白に変化することなどが次々と解明されてきた¹⁰⁾¹²⁾。そしてphotodamageされたBcl-2蛋白がアポトーシス抑制機能を喪失することが判明した¹³⁾。

肺癌だけでなく多くの固形癌ではBcl-2の発現が高く、アポトーシスへの誘導を妨げ、難治性である原因と言われている¹³⁾。PDTが特異的にこのBcl-2をphotodamageすることによって、アポトーシスを起こしやすくすることより、これらを抗癌剤や分子標的治療薬と併用し、今後進行癌に対する治療への拡大として大変重要である。そこで本研究では、現在、早期肺癌に用いられているphotofrin、laserphyrinによるPDTの適応拡大、さらにはオーダーメイド治療の一環として、Bcl-2の発現量により使い分けが可能かどうかについて検討を行った。

Fig. 2Aのようにphotofrin-PDTはphotofrinの濃度を上昇させていくと、MCF-7c3細胞中に過剰発現したBcl-2の蛋白は、濃度依存的にphotodamageを受けた。さらに、Fig. 2BのようにBcl-2変異蛋白であるBcl-2Δ (33-54)蛋白も同様にphotodamageを受けたことは、Bcl-2の34番目のアミノ酸であるAspの部位がcaspaseにより切断される部位であることから、photofrin-PDTによるphotodamageは、caspaseによるものではないことを示している。このことは、以前我々が報告したPc4-PDTと同様の結果であり、またphotofrin-PDTによるphotodamageには、Bcl-2のC末端領域とBH2とBH1の間の領域の膜貫通ドメインが必要であることもPc4-PDTと同様の結果であった。ミトコンドリアを標的因子とするPc4-PDTとphotofrin-PDTでは同様の現象が認められたが、Bcl-2過剰発現細胞に対する感受性が異なる。すなわちPc4-PDTは、Bcl-2が過剰発現したMCF-7c3-GFP-Bcl-2細胞は、親株MCF-7c3-GFP細胞に比較してコロニーアッセイ法で耐性を示した。しかし本研究は、感受性

試験ではほぼ同等の感受性を有し、さらに Fig. 4A で示せたように、親株の photofrin-PDT による LD₉₀ の条件では、MCF-7c3-GFP-Bcl-2 も 6 時間後に 40% 以上の細胞がアポトーシスを呈した。このことは、photofrin-PDT は Bcl-2 蛋白を標的とし、それを photodamage することによりアポトーシスを誘導させ、Bcl-2 過剰発現細胞に対して十分に抗腫瘍効果を発揮することを意味している。実際、PDT による photodamage により、PDT が Bcl-2 過剰発現細胞に対して耐性または感受性になる報告などがあり複雑である²¹⁾²²⁾。また、Bcl-2 のアンチセンスを用いた実験では、PDT により感受性が増感するなどの報告もあり、PDT と Bcl-2 の発現、Bcl-2 の photodamage との関係は非常に大切である²³⁾。Photofrin-PDT により障害された Bcl-2 蛋白が、本当にアポトーシス抑制機能を喪失したかどうかは不明であり、今後、fusion protein の作成などを行って更に検討する必要がある。

Laserphyrin-PDT では、Kessel ら²⁴⁾²⁵⁾ が報告したような Bcl-2 の photodamage を認めなかった。また Vantieghem ら²⁶⁾ が報告しているように、hypericin という別の光感受性物質でも photodamage を認めなかったことから、Bcl-2 の photodamage には光感受性物質の局在が最も関与していると考えられる。Laserphyrin はライソゾームだけに集積しているわけではなかったが、ミトコンドリア、特に Bcl-2 蛋白の局在とは異なる部位、あるいは離れた部位の蛋白や脂質などに結合すると推察される (Fig. 1)。また laserphyrin-PDT は Bcl-2 を障害しないばかりでなく、Bcl-2 過剰発現細胞に対して耐性を示したことから、明らかに photofrin とは異なる作用機作を有することが理解された (Fig. 3, 5B)。しかし PDT の抗腫瘍効果は、本研究のように *in vitro* の直接的な殺細胞効果だけではなく、血管のダメージにより vascular shut down 効果などがあるため、実際に臨床で使用する上で laserphyrin-PDT の抗腫瘍効果が低いということではないと思われる。LD₉₀ の条件で PDT を施行したときに、24 時間後、典型的なアポトーシスの頻度は低いが、結果的に細胞はコロニーを形成せず死滅した。このことは、laserphyrin がライソゾームを介して cathepsin を放出し、経時的に caspase を活性化して典型的なアポトーシスを誘導する為かもしれない²⁵⁾。

Laserphyrin は、photofrin の欠点とされてきた光線過敏症が非常に軽度であるため、早期肺癌以外の使用にも大変期待されている薬剤である。本研究では、

photofrin と laserphyrin を実際の臨床の場合において使用する場合に、Bcl-2 発現が低い腫瘍には laserphyrin を使用し、高い腫瘍に対しては photofrin を使用するなどの、将来のオーダーメイド治療の一助になるものとする。

文 献

- 1) Dougherty TJ, Grindey GB, Fiel R, Weishaupt KR: Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J Natl Cancer Inst* **55**: 115-121, 1975
- 2) Nelson JS, Wright WH, Berns MW: Histopathological comparison of the effects of hematoporphyrin derivative on two different murine tumors using computer-enhanced digital video fluorescence microscopy. *Cancer Res* **45**: 5781-5786, 1985
- 3) Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH: Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **62**: 231-237, 1978
- 4) Fisher AMR, Mulphree AL, Gomer CJ: Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* **17**: 2-32, 1996
- 5) Zaidi SI, Oleinick NL, Zaim MT, Mukhtar H: Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem Photobiol* **58**: 771-776, 1993
- 6) Woodburn KW, Fan Q, Miles DR, Kessel D, Luo Y, Young SW: Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model. *Photochem Photobiol* **65**: 422-426, 1997
- 7) Noodt BB, Berg K, Stokke Q, Peng Q, Nesland JM: Different apoptotic pathways are induced from various intracellular sites by tetraphenylporphyrins and lights. *Br J Cancer* **79**: 72-81, 1999
- 8) Kessel D, Luo Y, Mathieu P, Reiners Jr JJ: Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. *Photochem Photobiol* **65**: 410-415, 2000
- 9) Kato H, Furukawa K, Sato M, Okunaka T, Kusunoki Y, Kawahara M, Fukuoka M, Miyazawa T, Yana T, Matsui K, Shiraishi T, Horinouchi H: Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorine e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **42**: 103-111, 2003
- 10) Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL: Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* **20**: 3420-3427, 2001
- 11) Usuda J, Chiu SM, Azizuddin K, Xue LY, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL: Promotion of

- photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein Smac/DIABLO: Dependence on Bax. *Photochem Photobiol* **76**: 217-223, 2002
- 12) Usuda J, Chiu SM, Murphy ES, Lam M, Nieminen AL, Oleinick NL: Domain-dependent photodamage to Bcl-2: A membrane anchorage region is needed to form the target phthalocyanine. *J Biol Chem* **278**: 2021-2029, 2003
- 13) Usuda J, Azizuddin K, Chiu SM, Oleinick NL: Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **78**: 1-8, 2003
- 14) Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC: Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5113-5118, 1997
- 15) Matsuyama S, Schendel SL, Xie Z, Reed JC: Cyto-protection by Bcl-2 requires the pore-forming alpha 5 and 6 helices. *J Biol Chem* **273**: 30995-31001, 1998
- 16) Kroemer G, Reed JC: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**: 513-519, 2000
- 17) Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I: The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* **1**: 1-21, 2001
- 18) Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, Moan J, Peng Q: Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* **90**: 889-905, 1998
- 19) Gomer CJ: Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* **54**: 1093-1107, 1991
- 20) Henderson BW, Dougherty TJ: How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* **55**: 145-157, 1992
- 21) He J, Agarwal ML, Larkin HE, Friedman LR, Xue LY, Oleinick NL: The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene Bcl-2. *Photochem Photobiol* **64**: 845-852, 1996
- 22) Kim HR, Luo CY, Kessel D: Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after Bcl-2 transfection. *Cancer Res* **59**: 3429-3432, 1999
- 23) Srivastava M, Ahmad N, Gupta S, Mukhtar H: Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *J Biol Chem* **276**: 15481-15488, 2001
- 24) Kessel D, Castelli M: Evidence that Bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* **20**: 318-322, 2001
- 25) Reiners JJ, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D: Release of cytochrome c and activation of prpcaspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* **9**: 934-944, 2002
- 26) Vantighem A, Xu Y, Assefa Z, Piette J, Vandenhede JR, Merlevede W, de Witte PAM, Agostinis P: Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* **277**: 37718-37731, 2002

Molecular determinants of photofrin-PDT and laserphyrin-PDT

Takeshi HIRATA¹⁾, Jitsuo USUDA¹⁾, Shuji ICHINOSE¹⁾
Tatsuya INOUE¹⁾, Keishi OHTANI¹⁾, Sachio MAEHARA¹⁾
Mitsuhiro KUBOTA¹⁾, Kentarou IMAI¹⁾, Yoshihiko TSUNODA¹⁾
Yukari KUROIWA¹⁾, Kimito YAMADA¹⁾, Hidemitsu TSUTSUI¹⁾
Kinya FURUKAWA¹⁾²⁾, Tetsuya OKUNAKA¹⁾³⁾, Harubumi KATO¹⁾

¹⁾First Department of Surgery, Tokyo Medical University

²⁾Respiratory Medicine, Tokyo Medical University Kasumigaura Hospital

³⁾Respiratory Disease Center Sanno Hospital, International University of Health and Welfare

Abstract

It is very important to elucidate the mechanism of action and identify molecular determinants, in order to increase the number of clinical applications and develop new photosensitizers. We have previously reported that photodynamic therapy (PDT) using some photosensitizers, such as phthalocyanine 4(Pc4) damages anti-apoptotic protein Bcl-2, and that Bcl-2 is a molecular target of PDT. We examined the molecular targets of photofrin-PDT and laserphyrin-PDT, by evaluating the photodamage of Bcl-2. We found that Bcl-2 was a molecular determinant of photofrin-PDT but not laserphyrin-PDT. Our results show that laserphyrin-PDT does not damage Bcl-2, and Bcl-2 overexpressing cells are resistant to PDT. Photofrin-PDT damages Bcl-2 and induces apoptosis earlier than laserphyrin-PDT. We conclude that photofrin-PDT damages different molecular targets from laserphyrin-PDT. Many advanced cancer cells have elevated amounts of Bcl-2 protein and we hypothesize that in most situations, Bcl-2 photodamage eliminates the normal protection against cell death. In this paper, we evaluated the role of photodamage to Bcl-2 in regulating the fate of cancer cells after PDT using photofrin and laserphyrin, and we discuss the target molecules and new clinical applications.

〈Key words〉 photodynamic therapy (PDT), photofrin, laserphyrin, apoptosis, Bcl-2
