

抗腫瘍効果を有する新規光感受性薬剤の開発と 抗がん剤耐性前立腺がん細胞に対する光線力学療法への応用

大阪大学 大学院 工学研究科

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

山内 将 哉

栗津研究室

1. 緒言

前立腺がん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。高脂肪の食事が原因の一つと考えられており、日本でも食事の欧米化に伴い近年患者数が急増している¹⁾。また、前立腺がんは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る²⁾。このような要因から近い将来、日本においても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主流であり、治癒率も高い。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。しかし、薬剤による治療効果は一過性である場合が多く、経時的に薬剤耐性が付くケースが非常に多い。薬剤耐性がついた前立腺がんは治療が難しく、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治療法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性のある光感受性薬剤を投与し、それをレーザー励起することで活性酸素を生じさせ、活性酸素の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。PDT はその低侵襲性から、高齢者を初めとする高リスクの患者に治療が行える。さらに、光感受性薬剤の腫瘍選択性から、排尿障害や性機能障害のリスクが少ないと考えられる。以上の様な特徴から、ホルモン剤や抗がん剤の効果のない前立腺がんに対する延命治療に非常に効果的であると考えられる。また、進行がん以外の前立腺がんに対しても各種療法との併用が可能であり、複数回の治療も可能であるため、他の治療法の効果を増強することも可能であると考えられる。

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。2つ目は PDT により治療可能ながんは限られていることである。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、上記の課題の克服は必須であると考えられる。

薬剤の腫瘍集積性の向上の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、本研究では非ウイルスベクターである hemagglutinating virus of Japan envelope (HVJ-E) 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ドイウイルス粒子である (図 1)。

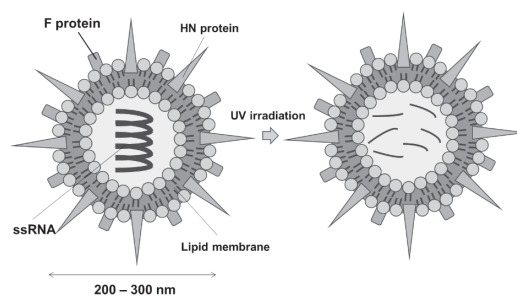


図 1 Schematic structure of HVJ-E (inactivate Sendai virus envelope).

本来、安全かつ高効率な遺伝子治療用ベクターとして開発されてきた HVJ-E であるが、最近では RNA、タンパク、薬物においても効率的なデリバリーが可能であることが判明し、新しい DDS 用キャリアとして体系的に研究されている^{3,4)}。HVJ-E による DDS は、エンベロープ表面に存在する HN タンパクと F タン

バクによるものである。HVJ-E による DDS の大きな利点は、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、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。また局所注射で用いるため、皮膚や肝臓などに光感受性薬剤が集積せず、光線過敏症の予防を考慮しなくても良い。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⁵⁾。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-1 (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⁵⁾。一方、RIG-1 からのシグナル経路は、ヒトがん細胞において、アポトーシス関連遺伝子の Noxa や TRAIL を誘導し、癌細胞選択的な殺細胞効果を誘導する^{6,7)}。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⁵⁾。

以上の特長から HVJ-E による DDS を前立腺がんに対する PDT に応用した場合、多角的な治療メカニズムを持つコンバインドセラピーが可能である。本研究では、薬剤耐性を持つ前立腺がんの治療を目指し、HVJ-E を応用した新規光感受性薬剤の開発を目的とする。本稿では、HVJ-E を応用した新規光感受性薬剤の調製条件、およびその有効性について検討した結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 細胞培養

本検討では、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 は抗がん剤の 1 種である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。

2.2 光感受性薬剤

HVJ-E に封入する光感受性薬剤としてプロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX; PpIX) を用いた。PpIX は生体由来の化合物で、生体適合性が高く、代謝速度が速いことが特徴の光感受性薬剤であり、臨床

では前駆体である 5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid; 5-ALA) を体内で代謝させることにより用いられている。本検討では、HVJ-E を損傷させず、簡便に封入するため図 2 に示すように脂質鎖を付加した PpIX (PpIX 脂質) を用いた。

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封入が可能である。PpIX 脂質を封入した HVJ-E を「porphyrus envelope」と名付け、これを新規光感受性薬剤とした。また、比較対象として PpIX 脂質、および 5-ALA を使用した。

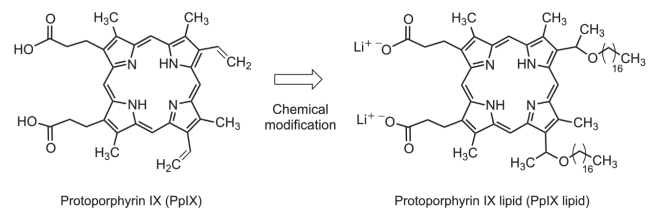


図 2 Schematic structure of PpIX and PpIX lipid.

2.3 Porphyrus envelope による細胞への PpIX 導入と PDT 効果の確認

調製した porphyrus envelope が細胞内に取り込まれ、PDT 効果を誘導することを確認するため、porphyrus envelope を投与した PC-3 の蛍光観察、およびレーザー照射実験を行った。

培養プレートに播種し、24 h 培養した PC-3 に 5-ALA、PpIX 脂質、あるいは porphyrus envelope を含む培地を加え、各光感受性薬剤を取り込ませた。その後、一度培地を用いて洗浄し、蛍光観察を行う細胞群はパラホルムアルデヒドを用いて固定処理を行い、スライドガラスにマウントした。これらのサンプルの PpIX 由来の蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡 (Eclipse Ti, Nikon) を用いて観察した。一方、PDT を行う細胞群は、波長 405 nm の半導体レーザー (VLM500、住友電工) を平均パワー密度 100 mW/cm² で 60 s 照射後、24 h 培養し、生細胞数測定試薬 SF (07553-44, Nacalai Tesque) を用いて生存率を評価した。なお、細胞生存率算出時のコントロールは無治療の細胞群を用いた。

3. 実験結果・考察

まず、porphyrus envelope の吸光スペクトルを図 3 に示す。波長 405、510、540、570 および 630 nm 付近に PpIX 特有の吸収ピークが確認され、HVJ-E に PpIX 脂質が封入されていることが確認できた。

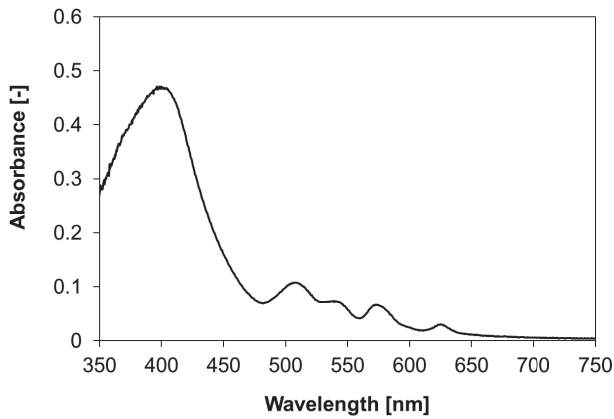


図3 Absorption spectrum of porphyrus envelope dissolved in PBS.

次に、共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した、PC-3細胞の蛍光画像を図4に示す。青色の蛍光がDAPIで染色された細胞核を示し、赤色の蛍光が各薬剤により導入されたPpIXの蛍光を示す。各条件におけるいずれの細胞においても赤い蛍光が観察され、porphyrus envelopeを用いた場合でもPpIXが導入されていることが確認された。また、各薬剤により導入されたPpIXの蛍光は核内には集積しておらず、細胞質に導入されていることが確認された。

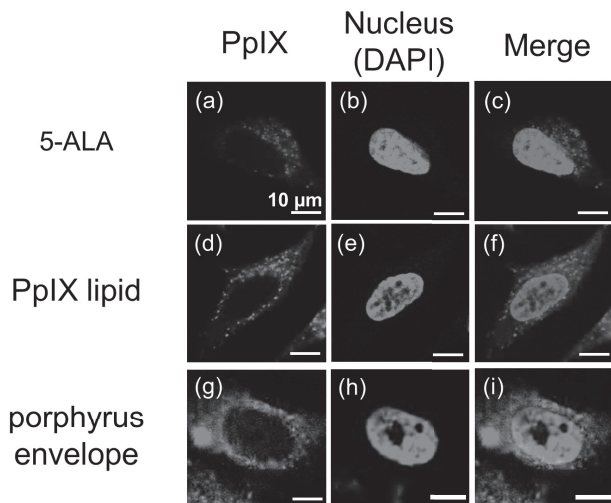


図4 Fluorescence microscope images of PC-3 cells treated with 5-ALA, PpIX lipid, or porphyrus envelope. Red fluorescence was observed from each photosensitizer localized within cells [(a): PpIX induced by 5-ALA; (d): PpIX lipid; (g): porphyrus envelope], and blue fluorescence from nuclei stained with DAPI [(b), (e), (h)].

図5にPDT後の細胞生存率より算出した、細胞数を半減させるために必要な各薬剤の濃度 (half maximal inhibitory concentration; IC_{50})を示す。なお、この実験における薬剤取り込み時間は全て3 hである。いずれの薬剤を用いた場合においても、一定の濃度以上でPDTによる殺細胞効果が確認されており、PC-3に対してPDTが有効であることが確認された。

また、Porphyrus envelopeの IC_{50} の値は、5-ALAと比較して約36000倍、PpIX脂質と比較して約200倍低く、porphyrus envelopeを用いたPDTは5-ALA、あるいはPpIX脂質を用いたPDTよりも効率的にがんを治療できる可能性が示唆された。最後に図6に投与時間と細胞生存率の関係を示す。Before PDTの群はporphyrus envelopeの浸漬後すぐのPC-3細胞の生存率を、After PDTの群は浸漬後に光照射を行い、24 h培養したPC-3細胞の生存率を示す。まず、Before PDT群の生存率は、浸漬時間が長くなるにしたがって減少しており、これはHVJ-E由来の殺細胞効果を誘導されていることを示している。一方、After PDT群は、Beforeと比較していずれも生存率が低下しており、投与後48 h後まで細胞内にPpIX脂質が細胞内に残存し、PDT効果を誘導できることが確認された。この結果から、porphyrus envelopeはHVJ-E由来の膜融合能によるドラッグデリバリーシステム、およびがん細胞に対する殺細胞効果を両立できていることが確認され、図5に示すように、従来の光感受性薬剤と比較して低濃度でも高い治療効果を示したと考えられる。

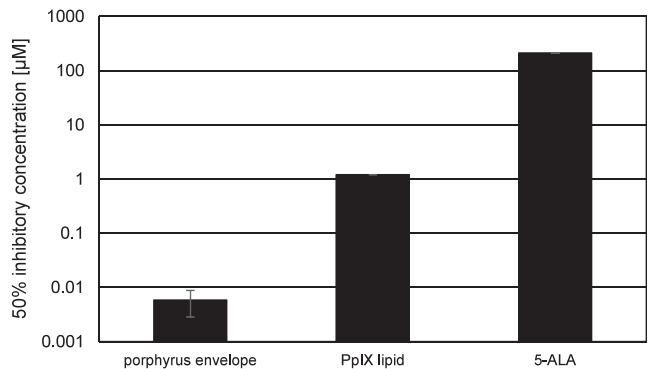


図5 Half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of each photosensitizer.

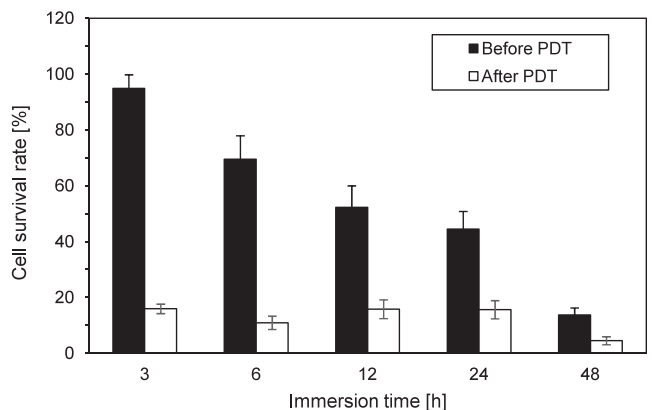


図6 The cell survival rate of PC-3 after porphyrus envelope treatment and laser irradiation.

4. 結言

本研究では、現在課題となっている抗がん剤耐性を持つ前立腺がんの治療を目指し、抗がん作用を持つベクターである HVJ-E を応用した新規光感受性薬剤「porphyrus envelope」を開発し、その有効性を検討した。治療メカニズムの解明や生体内で応用する場合の治療 dose の決定などいくつか課題があるものの、porphyrus envelope を用いた PDT はその治療効果の高さや選択性から、抗がん剤耐性を持つ前立腺がんに対する画期的な治療法と言える。

< 謝辞 >

本研究は、大阪大学大学院 医学系研究科、および東京工業大学 資源化学研究所と共同で実施されました。直接ご指導いただきました、金田安史教授、および中村浩之教授に厚く御礼申し上げます。また、研究にご協力いただいた関係者各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 伊藤晴夫: 改訂版 前立腺がんのすべて 基礎から実施治療まで. メジカルビュー社, 2004
- 2) T. Matsuda, T. Marugame, K.I. Kamo, K. Katanoda, W. Ajiki, T. Sobue and 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. Japanese Journal of Clinical Oncology, 42, 139-47, 2012.

- 3) 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.
- 4) M. Ito, S. Yamamoto, K. Nimura, K. Hiraoka, K. Tamai, Y. Kaneda: Rad51 siRNA delivered by HVJ envelope vector enhances the anti-cancer effect of cisplatin. J. Gene. Med., 7 (8), 1044-1052, 2005.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.



シスメックス株式会社

総合職コースで入社。大学院で身につけた知識と経験を基に、医療機器の開発に従事する予定。

(環境・エネルギー 平成 25 年卒 27 年修士)