

## 総 説

## 光線力学療法による細胞死メカニズムの細胞生物学的研究

嶋田 修, 井上 秀範<sup>1)</sup>, 吉井 新平<sup>1)</sup>,  
多田 祐輔<sup>1)</sup>, 熱海 佐保子

山梨医科大学 解剖学第2教室, <sup>1)</sup>外科学第2教室

要 旨: 近年, 光線力学療法の有効性が認められ, 種々の悪性腫瘍への適応が検討されてきている。しかしながら, この光線力学療法の殺細胞作用機序に関する細胞レベルでの研究は, いまだ多くの点が不明のままである。そこで我々は, 本治療法で用いられる光感受性腫瘍親和性物質を培養腫瘍細胞に投与し, 主として免疫蛍光抗体法と電子顕微鏡法を用いた形態学的アプローチによる, 細胞死誘発作用機序の解明を試みた。光感受性腫瘍親和性物質投与後, アクロレインを用いて急速に固定された細胞の電子顕微鏡観察によって, 特にミトコンドリアのクリスタ構造と粗面小胞体囊の構造に変化がみられた。これらの構造変化は, 用量依存的かつ経時的な変化であり, 光照射後 30 分で, 細胞死が誘発された。誘発されたこれらの細胞死に, アポトーシスを思わせる所見は確認できなかった。ミトコンドリアと粗面小胞体などの細胞質細胞小器官は細胞内膜構造を有しており, この内膜の膜蛋白を介して, 細胞骨格であるアクチンフィラメント, 中間径フィラメント, 微小管と結合している。そこで,  $\beta$ チューブリン, 非筋型アクチン, サイトケラチン, ピメンチンに特異的な抗体を用いて, 微小管, アクチンフィラメント, 中間径フィラメントの分布の変化を観察したところ, 特にアクチンフィラメントに大きな変化が認められた。通常の 1/10 の濃度である光感受性腫瘍親和性物質投与後, さらにアクチンフィラメント細胞骨格毒であるサイトカラシン B を 0.1  $\mu$ g/m<sup>2</sup>追加投与し, ハロゲン光下に置いたところ, 通常では殺細胞効果がほとんど期待できないような低濃度の光感受性腫瘍親和性物質濃度でも, 十分な殺腫瘍細胞効果が得られた。これらの細胞生物学的研究は, 光感受性腫瘍親和性物質の殺腫瘍細胞作用メカニズムの解明につながり, 効果的でより安全な癌治療への道をつなぐものと期待される。

キーワード 腫瘍, 光線力学療法, 電子顕微鏡, 免疫蛍光抗体法, アクチンフィラメント

## 1. はじめに

1979年 Dougherty ら<sup>1)</sup> はヘマトポルフィリン系光感受性腫瘍親和性物質を投与し, レーザー光を照射することで, 皮膚および皮下組織の悪性腫瘍治療における有効性を証明した。以降, 種々の研究が積み重ねられ, 我が国においても,

1996年, ヘマトポルフィリン系光感受性腫瘍親和性物質であるフォトフリン (Photofrin: 日本ワイスレダリー社) が, 悪性腫瘍の光線力学療法として保険適応に至るまでになった<sup>2-5)</sup>。同時に, 光ファイバー挿入による内視鏡学の進歩が, 治療可能な範囲を格段に広げ, 数多くのこうした光線力学療法に応用され, 体表面の腫瘍<sup>6)</sup>のみならず, 肺<sup>5,7,8)</sup>, 気管支<sup>8)</sup>, 食道, 胃, 子宮, 卵巣<sup>9)</sup>, 前立腺<sup>10)</sup>, 膀胱<sup>11,12)</sup>, 大腸, 口腔, 鼻腔<sup>13)</sup>, 中枢<sup>14,15)</sup>などの種々の腫瘍<sup>16)</sup>や

〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東 1110

受付: 2002年2月28日

受理: 2002年4月8日

過形成の他, 動脈硬化<sup>17,18)</sup>, 種々の眼疾患<sup>19-22)</sup> などへの応用をも可能にしつつある。

同時に種々の光感受性腫瘍親和性物質の開発研究も急速に進歩しつつあり, 以前より広く研究されてきたアミノレブリン酸<sup>23,24)</sup> (細胞内でポルフィリンに変化する), verteporfin<sup>20,25)</sup>, benzoporphyrin<sup>6,26)</sup>, hematoporphyrin<sup>27)</sup> 等のポルフィリン系<sup>28)</sup> やその関連物質を始め, クロリン系の bacteriochlorin<sup>21)</sup>, meta-tetra (hydrophilic) chlorin<sup>29)</sup>, chlorin e6<sup>30)</sup>, ATX-S10 (Na)<sup>31-33)</sup>, さらに, motexatin lutetium<sup>17)</sup>, calphostin C<sup>12)</sup>, purpurin<sup>34)</sup>, aluminum phthalocyanine tetrasulfonate<sup>35)</sup>, フェオフォルバイド a<sup>7,36-38)</sup> などが研究されてきている。その中において, 我々のグループは, フェオフォルバイド a の水溶性ナトリウム塩の作製に成功している。しかしながら, フォトフリン<sup>39)</sup> を始め, フェオフォルバイド a 等の光感受性腫瘍親和性物質の殺腫瘍細胞メカニズムは, いまだに多くの点が不明である<sup>23,24,26,33,41,42)</sup>。

そこで我々は, ヘマトポルフィリン系の光感受性物質であるフォトフリン, 並びに, フェオフォルバイド a を, 腫瘍細胞株である RERF-LC-AI 細胞 (ヒト肺扁平上皮癌由来), RT4 細胞 (ヒト膀胱癌由来) および MDCK 細胞に投与し, これらの殺腫瘍細胞効果過程を観察するために, 主として免疫蛍光抗体法と電子顕微鏡法による形態学的アプローチを試みた。ここで

得られた形態学的結果と, 従来までに報告された研究結果とを比較し総説する。

## 2. 殺腫瘍細胞効果

3種の培養細胞 (RERF-LC-AI 細胞, RT4 細胞, MDCK 細胞) においてフォトフリン, フェオフォルバイド a の殺細胞効果を観察, 比較した (表 1, 表 2)。それぞれの細胞は 96 ウェルマイクロプレートに各ウェルあたり  $5 \times 10^3$  個まき, 10 ~ 20 % 胎児牛血清添加 MEM 培養液の中で 48 時間培養した。フォトフリンは 0.5 m mole/L, フェオフォルバイド a は 0.05 m mole/L という濃度に細胞を 4 時間暴露させ, その後, 1 立方センチメートルあたり約 5.3J のハロゲン光下に細胞を 5 分置いた。この光照射 1 時間後, 暗室にて各ウェルに MTT assay 試験を行い, さらに暗室にて DMSO 添加 pipetting 後, 直ちに 570 nm の吸光度のもと, マイクロプレートリーダーで生細胞数をカウントした。この条件においてフォトフリンとフェオフォルバイドの殺細胞効果は, ほぼ同じ程度となった。照射後 1 時間, RERF-LC-AI 細胞には, 約 80 ~ 90 % 程度の殺細胞効果がみられることを確認した。一方, MDCK 細胞には約 70 ~ 80 % 程度の殺細胞効果がみられた。また, RT4 細胞においては約 10 % 程度の殺細胞効果しかみられなかった。興味深いことに, これら 3 種の異なる

表 1. 各腫瘍細胞におけるフォトフリン処理 + 光照射後の腫瘍細胞生存率 (%) の比較

	RERF-LC-AI 細胞	RT4 細胞	MDCK 細胞
光感受性物質投与 (-) + 光照射 (-)	100	100	100
光感受性物質投与 (-) + 光照射 (+)	125 ± 36	116 ± 29	107 ± 23
光感受性物質投与 (+) + 光照射 (-)	95 ± 26	107 ± 21	92 ± 13
光感受性物質投与 (+) + 光照射 (+)	18 ± 3	93 ± 17	28 ± 4

実験は 5 回行い, それぞれの実験で各群あたり 192 ウェルのサンプルを用意し, カウントした生存細胞数を平均した。細胞数に実験間のばらつきが極めて大きかったため, 5 回それぞれの実験におけるコントロールとなる光感受性腫瘍親和性物質投与 (-) + 光照射 (-) 群の生存細胞数の平均を, 各々 100 (%) として, 各実験群の生存細胞数との比を求め, その平均値をそれぞれ算出した。数値は平均 ± 標準偏差。

表2. 各腫瘍細胞におけるフェオフォルバイド a 処理 + 光照射後の腫瘍細胞生存率 (%) の比較

	RERF-LC-AI 細胞	RT4 細胞	MDCK 細胞
光感受性物質投与 (-) + 光照射 (-)	100	100	100
光感受性物質投与 (-) + 光照射 (+)	130 ± 29	129 ± 33	111 ± 8
光感受性物質投与 (+) + 光照射 (-)	113 ± 19	99 ± 15	101 ± 17
光感受性物質投与 (+) + 光照射 (+)	12 ± 3	87 ± 21	23 ± 6

上皮性腫瘍細胞において、フェオフォルバイド a がフォトフリンに比べ 10 倍希釈されているにもかかわらず、いずれも同程度の殺細胞効果を得た結果で、フェオフォルバイドがフォトフリンより、より効果的な殺腫瘍細胞効果を示した。また、フォトフリン、フェオフォルバイド a をこの濃度で 4 時間処理した後、光を照射することなく、そのまま培養液を 3 回洗浄交換した細胞は、再び増殖を始め、いずれも翌日には confluent に成り、この時点で光感受性腫瘍親和性物質無処理の細胞群との相違は認められなくなった。

なお、フェオフォルバイド処理の濃度、時間、光照射量と RERF-LC-AI 細胞生存率との関連の詳細は、共同研究者の井上らによって完成されており、現在、この詳細を記述した論文を投稿中である。ここで、RERF-LC-AI 細胞、RT4 細胞、MDCK 細胞らの細胞死をもたらすフォトフリン、並びに、フェオフォルバイドの有効濃度は異なっていた。細胞の種類により、殺腫瘍細胞効果をもたらす光感受性腫瘍親和性物質の有効濃度が異なることは、フォトフリンを扱う研究者にとってはもともと知られていたことである。今回、我々の実験系においては RERF-LC-AI 細胞が、フォトフリン、フェオフォルバイドの両者に対し最も感受性が高く、RT4 細胞の感受性は低いことがわかった。しかし、光感受性腫瘍親和性物質に対する感受性が、細胞の種類によって大きく異なっているにもかかわらず、フェオフォルバイドがフォトフリンよりも、共通して、より低濃度で効果的に異なる細胞種

の殺腫瘍細胞効果を示し、光をあてない限り、いずれの細胞も十分な回復、生存をみたことから、現在一般的に使用されているフォトフリンよりも、多種の悪性腫瘍の光線力学治療にフェオフォルバイド a が有効に使用できる可能性を示唆しているものと思われる。

### 3. 電子顕微鏡観察

光感受性腫瘍親和性物質投与後、光を照射した細胞は直ちに暗所に戻し、その後、1 分、3 分、5 分、10 分、15 分、30 分、60 分、120 分、360 分と経時的に固定した。固定液は 5 % アクロレイン in 0.1M PBS にて 5 分処理後、通常の 2 % パラフォルムアルデヒド + 2.5 % グルタルアルデヒドで 30 分、さらに 1 % オスミウムにて 120 分の追加固定を行なった。今回は化学固定液の中では最も組織浸透の早い固定液である、アクロレインを用いた。実際に、いくつかの培養細胞において、この固定法では、化学固定時に通常見られる細胞の外形の変化や細胞突起の収縮が認められず、細胞突起部の細胞膜の位置が急速凍結置換法と同じであることと、固定の影響であるアクチンフィラメントの収縮がほとんど見られないことを確認している<sup>43,44</sup>。固定された細胞は、その後アルコール、プロピレンオキシドを介してエポキシに包埋し、通常の薄切薄片を作製し、ウラン、鉛の二重染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。

RERF-LC-AI 細胞と MDCK 細胞において、フォトフリン処理、光照射後 1 分で、粗面小胞体



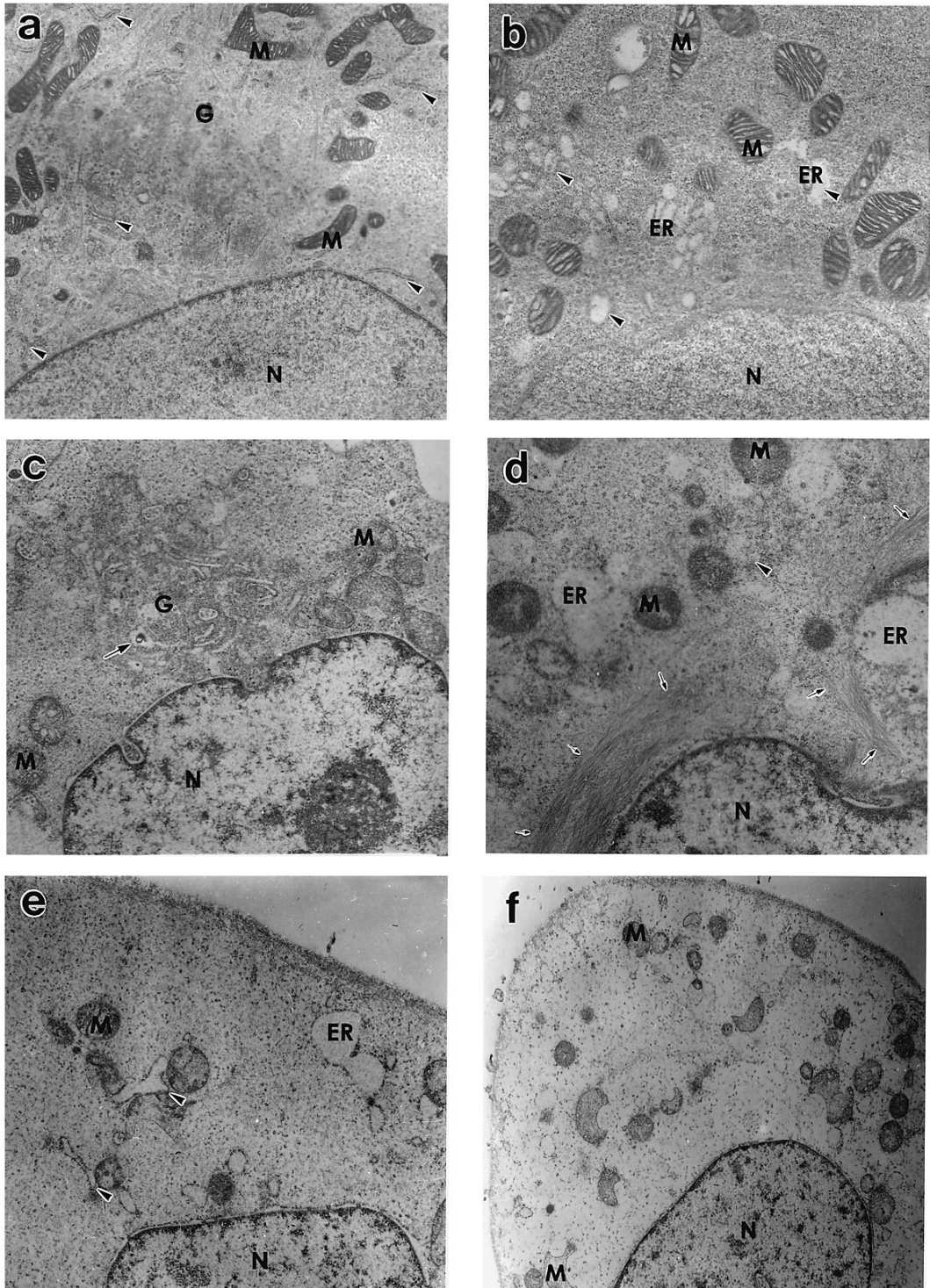


図1. 光感受性腫瘍親和性物質（フォトフリン）処理 + 光照射後，細胞死に至る超微形態変化。

## 図1 説明文

- a : 照射直前の RERF-LC-AI 細胞。粗面小胞体嚢 (矢頭) は扁平で、この狭い内腔には、電子密度の高い内容物がつまっている。ミトコンドリア (M) は典型的なクリスタ型ミトコンドリアを有する。G ; ゴルジ野, N ; 核
- b : 照射後 5 分の RERF-LC-AI 細胞。粗面小胞体嚢の拡張 (矢頭) と内腔の電子密度の低下がみられる。まだ、ミトコンドリア (M) のクリスタ構造は良く保たれている。ER ; 粗面小胞体, N ; 核
- c : 照射後 10 分の RERF-LC-AI 細胞。細胞質ミトコンドリア (M) の形状自身が円形になり、内膜で形成されていたクリスタ構造は層板状から細管状や粒子状の構造に置き換わる傾向が見られる。電子密度の高い物質 (大きな矢) が、しばしばゴルジ装置 (G) の層板内腔に認められる。N ; 核
- d : 照射後 15 分の RERF-LC-AI 細胞。核周辺領域にアクチンフィラメントの凝集塊 (小さな矢) がしばしば出現する。粗面小胞体嚢 (ER) の拡張は、よりはっきりとしたものとなり、粗面小胞体で囲まれる腔が四方へ拡張し円形になる像がみられる。リボゾームの配列は不規則になる。ミトコンドリア構造 (M) の変形は、より顕著になる。N ; 核
- e : 照射後 30 分の RERF-LC-AI 細胞。粗面小胞体嚢 (ER) は拡張し、粗面小胞体膜上のリボゾームの分布はきわめて不規則になる。粗面小胞体嚢の内腔の電子密度は減少し、拡張した小胞体の膜が、ミトコンドリア外膜と直接融合するような所見 (矢頭) がみられる。N ; 核
- f : 照射後 60 分の RERF-LC-AI 細胞。大きく変形したミトコンドリア (M)、粗面小胞体やゴルジ装置等の細胞小器官の細胞膜は、いたるところで分断され境界がわからない。細胞質基質は流し失し、細胞質が全体的に明るくなってしまふ。しかしながら、細胞質の変化に比べると、核 (N) はその核膜内膜を含め、構造上、大きな変化がみられない。

嚢の内腔の軽度拡張が認められた。この時点では、他の細胞小器官や核の変化は認められなかった。照射後 5 分で、粗面小胞体嚢の拡張はよりはっきりとしたものとなり、粗面小胞体で囲まれる腔の四方への拡張が、著明になってきた (図 1b)。同時に、一部のミトコンドリアのクリスタ構造に変形が認められ始めた。照射後 15 分、細胞質内のミトコンドリアの形状自身が円形になり、内膜で形成されていたクリスタ構造は層板状から細管状、粒子状の構造に置き換わる傾向が強く見られた (図 1c, 1d)。RERF-LC-AI 細胞と MDCK 細胞のそれぞれの細胞質には、正常細胞ではもともと長軸に細長い、典型的なクリスタ型ミトコンドリアを有していた (図 1a) が、このミトコンドリア内膜の形状が変化し、あたかもステロイド分泌細胞に見られるような、細管型ミトコンドリア類似の形状を示した。さらに一部のミトコンドリアにおいて、外膜の一部が不規則に突出し、ミトコンドリア内膜と外膜とで形成される腔が拡張してしまう所見が見られた。また、粗面小胞体嚢は顕著に拡張し、粗面小胞体膜上のリボゾームの分布は不規則になった。粗面小胞体嚢の内腔内容物の電子密度は減少し、拡張した小胞体の膜が、前述したミトコンドリア外膜と直接融合するよう

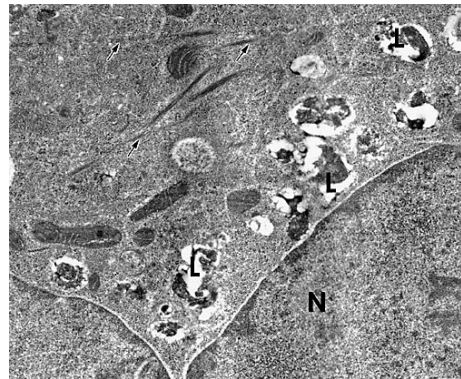


図2. 光感受性腫瘍親和性物質 (フェオフォルバイト a) 処理 + 照射 30 分後の RT4 細胞。RT4 細胞は、フォトリンおよびフェオフォルバイトの両方の光感受性腫瘍親和性物質に対し、ともにより強い抵抗性を示した細胞である。照射後、生き残った細胞の細胞質に多数の二次ライソゾーム (L) の所見がみられる。ライソゾームには電子密度の高い物質が詰まっており、こうした細胞には、ミトコンドリアや粗面小胞体の変化は軽度である。また、正常細胞で見られるストレスファイバーとは、まったく異なるアクチンフィラメント束 (矢) が、しばしば細胞質に出現する。N ; 核

な所見がみられた。この時点で、ゴルジ装置 (ゴルジ体) の構造に、変化が見られるようになった。ゴルジ層板の配列が不規則になり、ト



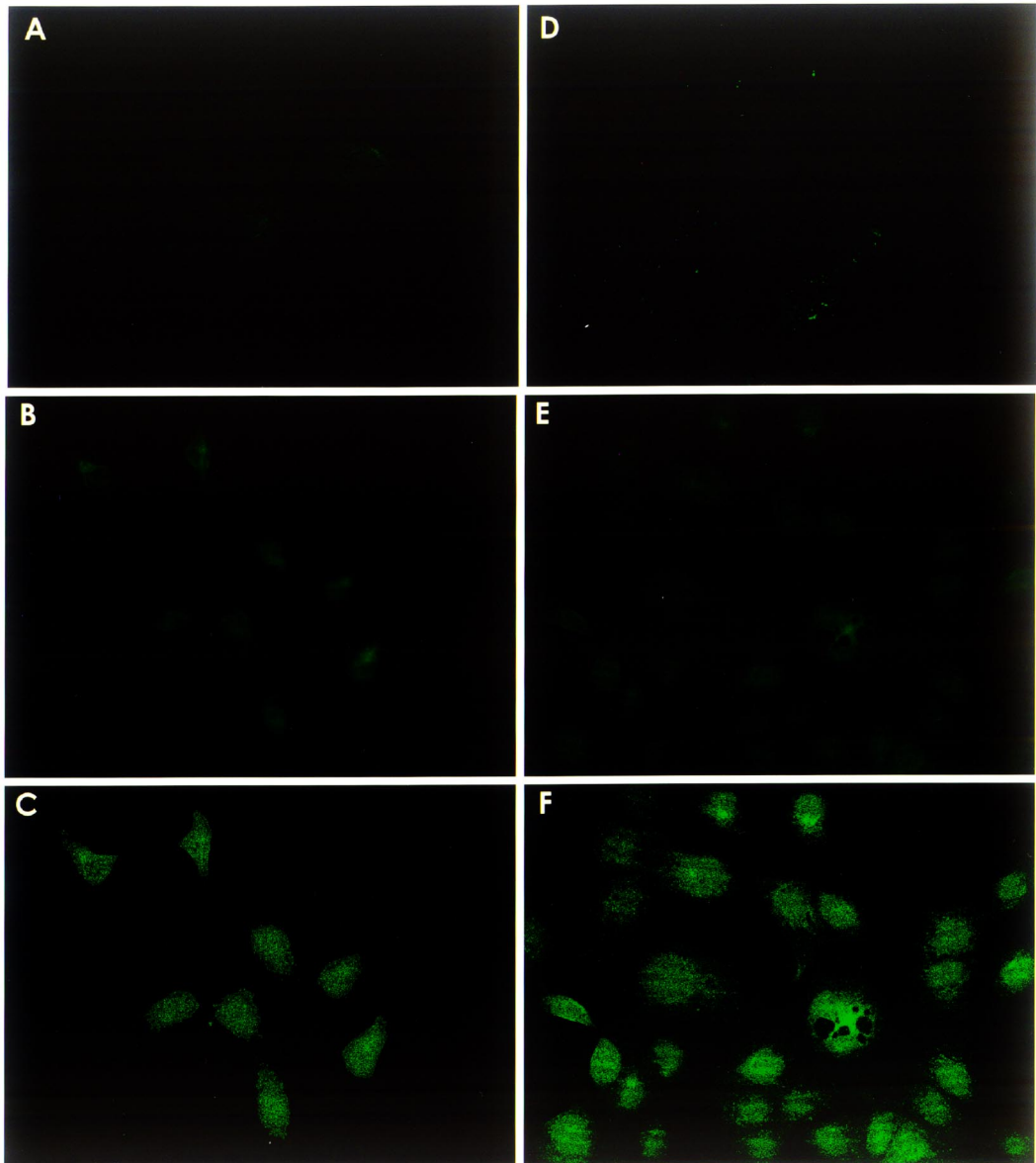


図3. 光感受性腫瘍親和性物質(フェオフォルバイト a) 処理 + 光照射前(A,D)と照射30分後(B,E)のRERF-LC-AI細胞における抗 Fas 抗体(A,B)と抗 caspase-3 抗体(D,E)による免疫蛍光抗体法。

A,B,C: 細胞は80% confluentにて、固定後、通常の免疫蛍光抗体法を行ない、二次抗体のラベルにはFITCを用いた。抗 Fas 蛍光抗体染色後、蛍光顕微鏡による観察で、照射30分後の細胞(B)のいくつかに極めて弱い励起光がみられる。我々はこれらの細胞を Fas 陰性と判断しているが、そのまま CCD カメラの感度を約  $5 \times 10$  倍あげると、あたかも免疫陽性であるように30%程度の細胞が浮き出してくる(C)。図Bと図Cは同一の撮影範囲。これは、一次抗体に抗原 Fas をあらかじめ添加しても消えない、非特異的な反応産物であることが確認されている。しかし、細胞浮遊後、フローサイトメトリーにかけたところ、線の引き方によってはあたかも Fas 陽性として検出される。実際に、この実験の細胞では、あえて疑陽性ラインで線引きをしたところ、フローサイトメトリーで31%の細胞が Fas 蛋白陽性になったというデータを得た。

ランスゴルジネットワークを予想させるライソゾームの分解産物である電子密度の高い構造（図 1c の矢）が、ゴルジ装置のシス側のゴルジ層板内腔にいくつか認められた。しかしながら、全体として、ゴルジ装置の構造変化は、ミトコンドリアや粗面小胞体の構造変化に比べるとはるかに少なく、ゴルジ装置自体の基本構造はかなり保たれていた（図 1c）。

拡張した粗面小胞体の内腔は、拡張したまま核膜外膜（核膜嚢外葉）とつながるようになり、核膜嚢に 1 つの大きな腔を核膜内膜（核膜嚢内葉）と外膜との間に形成するものも見られた。照射後 30 分、細胞形質膜の破壊が見られるようになった。細胞質の基質が細胞外に直接漏れ出す所見とともに、細胞死の所見が多数みられた。拡張した粗面小胞体膜が、ミトコンドリア外膜と直接融合する所見はより顕著であった（図 1e）。膨化した粗面小胞体が細胞質の全体に広がり、変形したミトコンドリア基質がミトコンドリア内膜と外膜との腔内にこぼれているような所見も見られた。しかしながら、細胞の核は細胞死の最後まで、核膜の内膜とともに構造上変化がみられなかった。照射後 60 分、細胞死の所見が多く見られ、上述した細胞小器官を中心とした細胞質構造の変化と、細胞死の直前まで構造上の変化の見られない核や核膜内膜を確認した。この照射後 60 分の所見（図 1f）が、細胞死へと向かう細胞変化のみられた最長の時間であり、以降の観察では、生き残った細胞の細胞増殖像が頻繁にみられ、光照射により誘導された細胞死はみられなくなった。

RT4 細胞は、我々の用いたフォトリソゾームおよびフェオフォルバドに、より強い抵抗性を示した細胞である。この細胞の約 10 % にも、上述した RERF-LC-AI 細胞や MDCK 細胞と、ほとんど同一の所見とそれに伴う細胞死をみた。光照射後、生き残った細胞の細胞質には多数の二次ライソゾームの所見がみられた（図 2）。ライソゾームには電子密度の高い物質が詰まっており、こうした細胞には、ミトコンドリアや粗面小胞体の変化が比較的軽度であった。光照射の有無にかかわらず、RT4 細胞は、もともと比較的多くの発達したライソゾームがみられる細胞である。このように、ライソゾームが発達し、ライソゾーム活性の高い腫瘍細胞では、同じ治療をおこなううえで、より高濃度の光感受性腫瘍親和性物質が必要であることが予想された。癌治療において、光線力学療法と抗癌剤との併用が考えられるが、併用する際には、光感受性腫瘍親和性物質の適応濃度を定めるにあたって、抗癌剤使用による腫瘍細胞のライソゾーム活性が上昇してしまう可能性があることを考慮する必要性を示した。また、細胞種により、光線力学療法の効果の違いがあることが経験として知られていたが、その理由の 1 つが、細胞のライソゾーム活性の差に基づいたものであることの可能性を示唆した。

上述した結果のうち、フェオフォルバド a によって引き起こされた RERF-LC-AI 細胞の形態変化の詳細は、現在、執筆中である。

### 図 3 説明文

D,E,F: 抗 caspase-3 蛍光抗体染色後、蛍光顕微鏡による観察で、照射 30 分後の細胞 (E) のいくつかに極めて弱い励起光がみられる。我々はこれらの細胞を caspase 陰性と判断しているが、そのまま CCD カメラの感度を約  $5 \times 10$  倍あげると、あたかも免疫陽性であるように 50 ~ 70 % 程度の細胞が浮き出てくる (F)。図 E と図 F は同一の撮影範囲。これは、一次抗体に抗原を添加しても消えない、非特異的な反応産物であることが確認されている。しかし、細胞浮遊後、フローサイトメトリーにかけたところ、線の引き方によってはあたかも caspase-3 陽性として検出された。細胞死ネクロシス過程におけるこのような「疑陽性」の傾向は、抗 Fas 抗体よりも抗 caspase 抗体がより顕著で、市販された 5 種の caspase 抗体のすべてにみられた。実際に、この実験の細胞では、あえて疑陽性ラインで線引きをしたところ、フローサイトメトリーで 62 % の細胞が caspase-3 陽性になったというデータを得た。

#### 4. アポトーシスとの関連

最近, 光線力学治療の殺細胞作用メカニズムに, アポトーシスとの関連がトピック的に大きく注目されてきている<sup>25,45,46</sup>。これは, 光感受性腫瘍親和性物質の投与と同時にアポトーシスを誘発することで, より効果的に腫瘍細胞を死滅させようとする治療を想定させるものである。これらのアポトーシス所見は, 光照射後, 一部の種類の細胞において Fas 蛋白や caspase の上昇を, 蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーで確認したことに基づく。さらに, 組織において tunnel 法<sup>47</sup>でアポトーシス自身を, 直接観察した報告もある。しかしながら, 我々の観察ではアポトーシスを積極的に肯定する形態学的所見は, どうしても確認できなかった。細胞死は, 使った2種の光感受性腫瘍親和性物質において, 観察した3種の細胞のいずれとも, 細胞質, 特に細胞小器官である粗面小胞体とミトコンドリアの変化に基づく細胞死であり, ネクローシスに分類された。そこで, 我々はこの矛盾の理由を調べるため, 抗 Fas 抗体, 抗 caspase-3 抗体, tunnel 法でアポトーシス陽性所見を調べた。通常の方法で, 免疫蛍光抗体染色や tunnel 染色を行ない蛍光強度を調べると, 細胞死にともない, 一部の細胞は非特異的に強度の強い方向にある程度のレベルでシフトすることがわかった(図3)。この1つの可能性として, ネクローシスなどの細胞死や細胞のダメージによって, 細胞内の酵素や蛋白が非特異的に遊離したり, 細胞の傷害や変成に基づき活性化された蛋白分解酵素により, 細胞内でアポトーシスとは関係のない蛋白が分解されることで, 結果として非特異的反応産物が検出される可能性もあるのではないかということも考えに入れた。染色はあまり強くないが, 陽性, 陰性の境界ラインを決める線の引き方によっては, 本来は疑陽性としたものも, アポトーシス陽性として認識されるのではないだろうかと思った。本学の浜田らも, アポトーシスの証明には多面的アプローチの必要性を論じており<sup>48</sup>, 我々の

見解と一致する。今回の細胞死において調べた「疑陽性」の出現頻度は複数の市販されている抗 caspase 抗体がいずれの細胞でも非常に高かった。一方, tunnel 法での陽性所見は検出されなかった(図3)。

今までに報告された光線力学療法に用いられた光感受性腫瘍親和性物質による細胞のアポトーシス所見は, 照射部位から離れているものも多数あり, 用量依存性ではないということである。これは, 用量依存性, ライソゾーム活性依存性である, 我々が観察した細胞死とは, まったく別の細胞死のメカニズムが別に存在している可能性を示唆している。いずれにせよ, 細胞死のメカニズムがアポトーシスか, 細胞質細胞小器官の障害によるものか, 両者とも関与しているのかは, 今後の光線力学療法自体の発展に直接的に大きな意味付けを持つと思われるので, 我々もより慎重に検討し, 報告したい。現在, アポトーシスが報告された同種の細胞を準備し, 電子顕微鏡と生化学的手法で観察中である。確かに多数の Fas, caspase 疑陽性細胞が検出されたが, DNA ladder や電子顕微鏡によるアポトーシス所見は, 現在のところ確認できていない。

#### 5. 細胞骨格との関連

観察した光感受性腫瘍親和性物質は, その後の光照射によって, ミトコンドリアおよび粗面小胞体の細胞質細胞小器官に特徴のある構造変化を, 用量依存的, 経時的に引き起こした。これらの細胞小器官は, 細胞内膜構造を有するという共通の特徴があり, この細胞内膜の複数の膜蛋白を介して, 細胞質の細胞骨格であるアクチンフィラメント, 中間径フィラメント, 微小管と結合していることが知られている<sup>49-55</sup>。ミトコンドリアや粗面小胞体の構造の維持, 保持, 機能, 移動に強く関与しているこれらの細胞骨格は, 我々の観察してきた, 細胞死過程における細胞小器官の構造変化を説明する上で, 引き金になりうるかもしれない。そこで,  $\beta$ チュー



ブリン、非筋型アクチン、サイトケラチン、ビメンチンに特異的な抗体を用いて、蛍光抗体法により、微小管、アクチンフィラメント、中間径フィラメントの分布の変化を観察したところ、特にアクチンフィラメントに大きな変化が認められた(図4)。

アクチンフィラメントの変化は、特に RERF-LC-AI 細胞と MDCK 細胞をフェオフォルバイド a 処理、光照射したものがもっとも顕著であった。この変化は極めて迅速で、まだ、ほとんど粗面小胞体囊の内腔の拡張がみられない光照射直後の顕微鏡所見で、細胞質内に不規則なアクチンフィラメントの乱れが生じはじめていた。照射後1分の顕微鏡所見において、小さなアクチンフィラメントの凝集像が、細胞質のところどころに認められた。照射後10分では、特に核周辺領域に大きなアクチンフィラメントの凝集塊が束となって見られるなど、細胞内アクチンフィラメントネットワークの再構築がしばしば観察された(図4、図5)。これらアクチンフィラメントの変化は、観察した3種の細胞において、量的な違いはあるようだが、フィラメント構造の変化の基本パターンは良く似ていた。

そこで、フェオフォルバイド a を投与3時間後、さらにアクチンフィラメント細胞骨格毒のサイトカラシン B を  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  という少量追加投与し、1時間後、ハロゲン光下に置いたところ、通常では殺細胞効果が期待できない、 $1/10$  濃度である  $5 \mu\text{M}/\text{L}$  という低濃度のフェオフォルバイド a でも十分な殺腫瘍細胞効果が得られることがわかった(表3)。これらの結果は、細胞骨格のアクチンフィラメントが、光感受性腫瘍親和性物質の殺腫瘍細胞作用機序に、何らかの役割を果たしている可能性を示唆するものと思われる。また、腫瘍細胞の種類、性質などの違いは、細胞骨格の組成や量的な違いと相関するものが多く、細胞骨格の状態や組成によって腫瘍とまわりの正常細胞とを選択することも可能である。そこで、光感受性腫瘍親和性物質とこうした細胞骨格毒とを組み合わせ

た光線力学療法を用いることで、より腫瘍細胞に特異的、選択的に作用させることを根拠とした光線力学的治療が可能になるかもしれない。まだ、予備実験の段階であり、さらに適切な条件設定を現在検討中であるが、あらかじめ目的とする腫瘍細胞の細胞骨格、特にアクチンフィラ

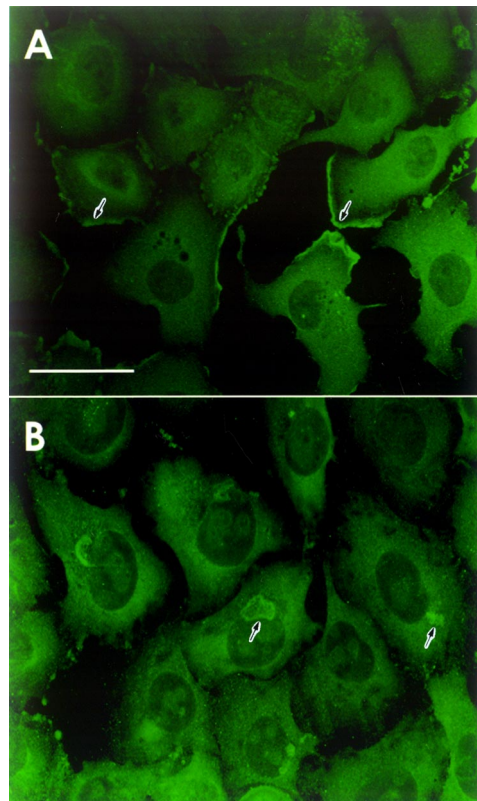


図4. 光感受性腫瘍親和性物質(フェオフォルバイド a)処理 + 光照射前(A)と照射後(B)の抗非筋型アクチン抗体による免疫蛍光抗体法。RERF-LC-AI 細胞において、光感受性腫瘍親和性物質投与前や光照射前の細胞質には、細胞膜周辺領域に、アクチンの集積(矢)がみられる(A)。光照射後、核の近傍領域に新たなアクチンフィラメントの集積(矢)が出現するようになる(B)。このとき、照射前に細胞膜周辺に存在していたアクチンは消失傾向である。この光照射後にみられた新たなアクチンフィラメントの集積構造(図B)は、ファロイジンによる染色でも同様であったことから、直接、filamentous actinのネットワーク構造の変化がもたらされたものであると思われる。



図5. 光感受性腫瘍親和性物質(フェオフォルバイト a) 処理 + 光照射 15 分後の RERF-LC-AI 細胞。核周辺領域の細胞質に、新たなアクチンフィラメントの集積束(矢)が観察される。この新しいアクチンフィラメントのネットワーク構造の再構築は、光照射直後から観察されるが、細胞死の時点で、細胞質から完全に消失する。M ; ミトコンドリア, N ; 核

表3. サイトカラシン B 処理の有無による光線力学療法の腫瘍細胞生存率(%)への影響

フェオフォルバイト(-) + サイトカラシン B(-) + 光照射(-)	100
1/10 濃度フェオフォルバイト(+) + サイトカラシン B(-) + 光照射(+)	82 ± 15
1/10 濃度フェオフォルバイト(-) + サイトカラシン B(+) + 光照射(+)	79 ± 17
1/10 濃度フェオフォルバイト(+) + サイトカラシン B(+) + 光照射(+)	3 ± 1
通常濃度フェオフォルバイト(+) + サイトカラシン B(-) + 光照射(+)	12 ± 3

メントの発達の程度を観察しておくことで、光線力学療法による治療効果の予想が適切にできる可能性もあるのではないかと期待している。細胞骨格に注目することで、より殺細胞効果が強く、正常細胞へのダメージの少ない光線力学療法への道が、将来、開かれるかもしれない。

## 6. おわりに

光線力学療法は、特に悪性腫瘍を中心とした治療法の1つとして、優れた治療法となる可能性を持つ。さらに、近年の内視鏡学のめざましい進歩は、光線力学療法の応用範囲を飛躍的に広げてきた。現時点における光線力学療法の保険適応は、表在性の早期癌などに限られている。しかしながら、早期癌のみならず、様々な理由から手術ができない患者や手術リスクの大きい患者、患者のQOLを高めるという目的においてもこの光線力学療法が、実用的な治療法になることを期待している。そのためには、現在までに提唱されている様々な光感受性腫瘍親和性物質を用いた光線力学療法の殺細胞作用機序メカニズムを明らかにし、先人の多数のすぐれた研究<sup>6,12,25,29,30,33,39,46,56,57</sup>をさらに発展させ、細胞レベルで解明することが重要であると思う。わずかではあるが、我々の細胞生物学的、解剖学的アプローチは、下記のような光線力学療法的作用機序の一端を明らかにした。

多種の上皮性腫瘍細胞において、フェオフ

オルバイド a は、市販されているフォトフリンよりもより効果的に殺腫瘍細胞効果を見ること。

フェオフォルバイド a とフォトフリンの殺細胞効果作用機序に、粗面小胞体とミトコンドリアを主とする細胞質細胞小器官が関与していること。

光線力学療法の作用機序に、細胞骨格のアクチンフィラメントが関与していること。

光感受性腫瘍親和性物質と細胞骨格毒との組み合わせを用いることで、光線力学療法の相加、相乗作用が期待できること。

光線力学療法において、腫瘍細胞のライソゾーム活性状態が殺細胞効果と関連していること。

目的とする腫瘍細胞の細胞骨格とライソゾームの形態を調べることで、光線力学療法治療効果予想ができる可能性のあること。

細胞骨格や粗面小胞体、ミトコンドリアの状態がまわりの正常細胞と腫瘍細胞とで差が見られる性質の腫瘍なら、今後、選択的治療が可能になるかもしれないこと。

以上述べた観点は、いずれも調べた一部の細胞で得られた結果に過ぎず、光線力学療法による殺腫瘍細胞効果として一般化するには、いまだ不十分な点を多数残している。本研究の当初の目的である、光感受性腫瘍親和性物質の殺腫瘍細胞作用機序の解明という本来の目的の解決までには、我々の研究は、まだまだ遠いレベルにあるのかもしれない。しかしながら、こうした細胞生物学的、解剖学的研究手法は、光線力学療法作用機序解明のために有効なアプローチ手段となりうる可能性があることは、確認できたと思う。今後とも、光感受性腫瘍親和性物質作用機序の解明を続け、今後の治療に役立てられないものか、本研究を続けていきたい。

## 文 献

- 1) Dougherty TJ, Lawrence G, Kaufman JH, Boyle D, Weishaupt KR, *et al.*: Photoradiation in the treatment of recurrent breast varcinoma. *J Natl Cancer Inst*, **62**: 231-237, 1979.
- 2) 平野達, 鈴木健司: PDT用エキシマダイレーザ- . 日本レーザー医学会誌, **16**: 29-35, 1995 .
- 3) 加藤治文, 奥仲哲弥, 小中千守: 肺癌に対する光線力学療法 . 日外会誌, **98** : 36-40, 1997 .
- 4) Dougherty TJ, Cooper MT, Mang TS: Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving photofrin. *Laser Surg Med*, **10**: 485-488, 1990.
- 5) Furuse K, Fukuoka M, Kato H, Horai T, Kubota K, *et al.*: A prospective phase II study on Photodynamic therapy with Photofrin II for centrally located early stage lung cancer. *J Clin Oncol*, **11**: 1852-1857, 1993.
- 6) Gonzalez S, Vibhagool C, Sherwood M, Flotte TJ, Kollias N: The phototoxicity of photodynamic therapy may be suppressed or enhanced by modulation of the cutaneous vasculature. *J Photochem Photobiol B-Biology*, **57**(2-3): 142-148, 2000.
- 7) Nishiwaki Y, Nakamura S, Sakaguchi S: New method of photosensitizer accumulation for photodynamic therapy in an experimental liver tumor. *Laser in Surgery and Med* **9**: 254-263, 1989.
- 8) 加藤治文, 河手典彦, 高橋秀暢, 奥仲哲弥, 小中千守: 肺-気管支癌の光化学治療 . 治療学, **26** : 482-487, 1992 .
- 9) Homung R, Fehr MK, Monti-Frayne J, Krasieva TB, Tromberg BJ, *et al.*: Highly selective targeting of ovarian cancer with the photosensitizer PEG-m-THPC in a rat model. *Photochem Photobiol*, **70**(4): 624-629, 1999.
- 10) Chakrabarti P, Orihuela E, Egger N, Neal DE Jr, Gangula R, *et al.*: Delta-aminolevulinic acid-mediated photosensitization of prostate cell lines: implication for photodynamic therapy of prostate cancer. *Prostate*, **36**(4): 211-218, 1998.
- 11) Seidl J, Rauch J, Krieg RC, Appel S, Baumgartner R, *et al.*: Optimization of differential photodynamic effectiveness between normal and tumor urothelial cells using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX as sensitizer. *Int J Cancer*, **92**(5): 671-677, 2001.
- 12) Beck TP, Kirsh EJ, Chmura SJ, Kovar DA, Chung T, *et al.*: In vitro evaluation of calphostin C as a novel agent for photodynamic therapy of bladder cancer. *Urology*, **54**(3): 573-577, 1999.
- 13) Yow CM, Mak NK, Szeto S, Chen JY, Lee YL, *et al.*: Photocytotoxic and DNA damaging effect of temoporfin (mTHPC) and merocyanine 540 (MC540) on nasopharyngeal carcinoma cell. *Toxicol Let*, **115**(1): 53-61, 2000.
- 14) Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Wallace VP, Hirschberg H: Photodynamic therapy of human



- glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol*, **72**(1): 128-134, 2000.
- 15) Lilge L, Portnoy M, Wilson BC: Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. *Brit J Cancer*, **83**(8): 1110-1117, 2000.
  - 16) Gomes ER, Cruz T, Lopes CF, Carvalho AP, Duarte CB: Photosensitization of lymphoblastoid cells with phthalocyanines at different saturating incubation times. *Cell Biol Toxicol*, **15**(4): 249-260, 1999.
  - 17) Chen Z, Woodburn KW, Shi C, Adelman DC, Rogers C, *et al.*: Photodynamic therapy with motexatin lutetium induces redox-sensitive apoptosis of vascular cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology*, **21**(5): 759-764, 2001.
  - 18) Usui M, Asahara T, Naitoh Y, Katoh T, Ibukiyama C: Photodynamic therapy for the prevention of intimal hyperplasia in balloon-injured rabbit arteries. *Japanese Circulation Journal*, **63**(5): 387-393, 1999.
  - 19) Blumenkranz MS, Woodburn KW, Qing F, Verdooner S, Kessel D, *et al.*: Lutetium texaphyrin (Lu-Tex): a potential new agent for ocular fundus angiography and photodynamic therapy. *Am J Ophthalmol*, **129**(3): 353-362, 2000.
  - 20) Schnurrbusch UE, Welt K, Horn LC, Wiedemann P, Wolf S: Histological findings of surgically excised choroidal neovascular membranes after photodynamic therapy. *Brit J Ophthalmol*, **85**(9): 1086-1091, 2001.
  - 21) Van Tenten Y, Schuitmaker HJ, De Wolt A, Willekens B, Vrensen GF, *et al.*: The effect of photodynamic therapy with bacteriochlorin a on lens epithelial cells in a capsular bag model. *Exp Eye Res*, **72**(1): 41-48, 2001.
  - 22) Obata A, Gohto Y, Kaneda K, Nakajima S, Takemura T, *et al.*: Selective occlusion of choroidal neovascularization by photodynamic therapy with a water-soluble photosensitizer, ATX-S10. *Lasers in Surgery & Med*, **24**(3): 209-222, 1999.
  - 23) Sharfaei S, Viau G, Lui H, Bouffard D, Bissonnette R: Systemic photodynamic therapy with aminolaevulinic acid delays the appearance of ultraviolet-induced skin tumours in mice. *Brit J Dermatol*, **144**(6): 1207-1214, 2001.
  - 24) Pahernik SA, Botzlar A, Hillemanns P, Dellian M, Kirschstein M, *et al.*: Pharmacokinetics and selectivity of aminolevulinic acid-induced porphyrin synthesis inpatients with cervical intra-epithelial neoplasia. *Int J Cancer*, **78**(3): 310-314, 1999.
  - 25) Granville DJ, Cassidy BA, Ruehlmann DO, Choy JC, Brenner C. *et al.*: Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol*, **159**(1): 305-311, 2001.
  - 26) Andrejevic BS, Ballini JP, van den Bergh H, Fontollet C, *et al.*: Time-dependent biodistribution of tetra (m-hydroxyphenyl) chlorin and benzoporphyrin derivative monoacid ring A in the hamster model: comparative fluorescence microscopy study. *Photochem Photobiol*, **71**(3): 333-340, 2000.
  - 27) Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM: The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst*, **26**: 1-11, 1961.
  - 28) 中島 進, 竹内 健: Porfimer Sodium (Photofrin: PFI) の腫瘍親和性に関する基礎的考察. *J New Remedies & Clinics*, **48**: 26-37, 1999.
  - 29) Bourdon O, Mosqueira V, Legrand P, Blais J: A comparative study of the cellular uptake, localization and phototoxicity of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin encapsulated in surface-modified submicronic oil/water carriers in HT29 tumor cells. *J Photochem Photobiol B-Biology*, **55**(2-3): 164-171, 2000.
  - 30) Bisland SK, Singh D, Garipey J: Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vehicles. *Bioconjugate Chem*, **10**(6): 982-992, 1999.
  - 31) 中島 進, 林 秀雄, 阪田 功, 竹村 健: Type I型光反応を有する新しいフォトセンシタライザー ATX-S10. *医学の歩み*, **164**(3): 187-188, 1993.
  - 32) Gohto T, Obana A, Kaneda K, Nakajima S, Takemura T *et al.*: Accumulation of photosensitizer ATX-S10 (Na) in experimental corneal neovascularization. *Jpn J Ophthalmol*, **44**(4): 384-353, 2000.
  - 33) Mori M, Kuroda T, Obana A, Sakata I, Hirano T, *et al.*: In vitro plasma protein binding and cellular uptake of ATX-S10 (Na), a hydrophobic chlorin photosensitizer. *Jpn J Cancer Res*, **91**(8): 845-852, 2000.
  - 34) Frazier DL, Barnhill MA, Vodinh T, Legendre AM, Overholt BF: Comparative pharmacokinetics of the photosensitizer tin-etiopurpurin in dogs and rats. *J Vet Pharmed Therap*, **15**: 275-281, 1992.
  - 35) Ben-Hur E, Rosenthal I: Photohemolysis of human erythrocytes induced by aluminum phthalocyanine tetrasulfonate. *Cancer Lett*, **30**: 321-327, 1986.
  - 36) 木村修一: フェオフォルバイド・蛋白質・核酸・酵素, **33**: 2803-2811, 1988.
  - 37) 小林正美, 小宮山真: 色素による核酸の光切断. *日本臨床*, **53**: 1519-1526, 1995.
  - 38) 山下幸高, 森安史典, 玉田 尚, 川崎俊彦, 小

- 野成樹, 木村 達, ほか: 光感受性物質フェオホーバイド a を用いた光線力学治療の基礎的検討. 日癌学会誌, **25**: 1123-1128, 1990.
- 39) 中島 進, 林 秀雄, 前田富興, 久保良彦, 鮫島夏樹, ほか: ポルフィリン誘導体の腫瘍組織集積性と LDL レセプター. *Oncologia*, **24**(6): 73-80, 1991.
- 40) 田中行弘, 西垣 進, 真木俊夫, 嶋村保洋, 直井家寿太: 光過敏症皮膚炎をおこしたクロレラ錠に対する生物-化学試験について. 食品衛生研究, **28**: 753-759, 1978.
- 41) 市岡 稔, 小山隆子, 細谷英雄, 遠藤 寛: 担癌マウスに投与した光増感剤, pheophorbide a および 10-hydroxypheophorbide a の臓器内分布. 日本レーザー医学会誌, **10**: 15-18, 1989.
- 42) 小林正美, 仲里正孝, 大工園則雄, 小宮山真: 光増感色素フェオフォーバイド a による DNA の光切断. 日本レーザー医学会誌, **13**: 37-41, 1992.
- 43) Shimada O, Tosaka-Shimada H: Morphological analysis of growth hormone release from rat somatotrophs into blood vessels by immunogold electron microscopy. *Endocrinology*, **125**: 2677-2682, 1989.
- 44) Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Yasuda T, Kishi K, *et al.*: Detection of deoxyribonuclease I along the secretory pathway in Paneth Cells of human small intestine. *J Histochem Cytochem*, **46**: 833-840, 1998.
- 45) Ahmad N, Gupta S, Feyes DK, Mukhtar H: Involvement of Fas (Apo-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J Invest Dermatol*, **115**(6): 1041-1046, 2000.
- 46) LaMuraglia GM, Schiereck J, Heckenkamp J, Nigri G, Waterman P, *et al.*: Photodynamic therapy induces apoptosis in intimal hyperplastic arteries. *Am J Pathol* **157**(3): 867-875, 2000.
- 47) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, **119**: 493-501, 1992.
- 48) 長澤晃樹, 浜田良樹: 臓器別アポトーシス証明法. 渡辺慶一, 小路武彦, 大槻勝紀編. 骨 - 関節. 南江堂, 東京: 239-245, 2000.
- 49) Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Atsumi S: Rearrangements of actin cytoskeleton during infection with *Escherichia coli* O157 in macrophages. *Cell Struc Func*, **24**: 237-246, 1999.
- 50) Shimada O, Ishikawa H, Tosaka-Shimada H, Atsumi S: Exocytotic secretion of toxins from macrophages infected with *Escherichia coli* O157. *Cell Struc Func*, **24**: 247-253, 1999.
- 51) Bray D, Health J, Moss D: The membrane-associated "cortex" of animal cells: its structure and mechanical properties. *J Cell Sci Suppl*, **4**: 71-88, 1986.
- 52) Cano ML, Cassimeris L, Fechheimer M, Zigmond SH: Mechanisms responsible for F-actin stabilization after lysis of polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*, **116**: 1123-1134, 1992.
- 53) Hartwig JH, Shevlin P: The architecture of actin filaments and the ultrastructural localization of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages. *J Cell Biol*, **103**: 1007-1020, 1986.
- 54) Kom ED: Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. *Physiol Rev*, **62**: 672-737, 1982.
- 55) Pollard TD, Cooper JA: Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*, **55**: 987-1035, 1986.
- 56) Macdonald JJ, Morgan J, Bellnier DA, Paszkiewicz GM, Whitaker JE, *et al.*: Subcellular localization patterns and their relationship to photodynamic activity of pyropheophorbide-a derivatives. *Photochem Photobiol*, **70**(5): 789-797, 1999.
- 57) Spikes JD, Bommer JC: Photobleaching of mono-L-asparthl chlorin e6 (Npe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem Photobiol*, **58**: 346-350, 1993.