

# 論 文 概 要

○論文題目：

Reactive oxygen species induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs enhance the effects of photodynamic therapy in gastric cancer cells

(非ステロイド性抗炎症薬によって惹起された活性酸素種が  
光線力学療法効果を増強する)

○指導教員：

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 兵頭 一之介 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科疾患制御医学専攻

(氏 名) 伊藤 紘

## <目的>

光線力学療法 (Photodynamic Therapy : PDT) とは、腫瘍部位に集積させた光増感剤に特定波長の光を照射することによって活性酸素の一種である一重項酸素を発生させ、腫瘍組織の細胞を死滅させる治療法である。PDT 用の光増感剤としてポルフィリン骨格を有する化合物が従来使用されてきた。ポルフィリンを用いた PDT は外科的な組織の切除を伴わないために高齢者や抗血小板薬服用患者に対しても適用可能であり、これらの患者に対する精神的および肉体的負担を軽減することが可能である。しかしながら、ポルフィリンの腫瘍特異的集積現象における機序解明は十分に行われていない。PDT のさらなる効率化のためにはポルフィリン集積のメカニズム解明が急務である。

この現象を解明する上で、筑波大学消化器内科では heme carrier protein 1 (HCP1) というタンパクに着目して研究を行ってきた。HCP1 はヘムを輸送するタンパクとして発見された。ヘムはポルフィリンと構造が相同であるためポルフィリンも HCP1 によって輸送されると推察し、検討した結果 HCP1 過剰発現細胞ではポルフィリンの集積量が増加し、一方で HCP1 ノックダウン細胞では集積量が減少したことからポルフィリンも HCP1 によって輸送されることが明らかにされた。しかしながら HCP1 の発現機序についての詳細は不明であった。

HCP1 の発現には低酸素環境が重要な役割を果たしているとの報告があり、さらに低酸素環境においてはミトコンドリアから産生される活性酸素種 (mitROS) の産生量が増加するとされていることから HCP1 の発現機構に mitROS が関与していることが推察された。ラット由来正常胃粘膜細胞 RGM1 とそのがん様変異細胞 RGK1、さらに RGK1 に mitROS 特異的消去能力を有する酵素であるマンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) を過剰発現させた RGK MnSOD 細胞を用いて、細胞内 mitROS 濃度による HCP1 の発現量およびそれに伴う PDT 効果について比較検討を行った。一般的に、がん細胞ではミトコンドリア変異によって電子伝達系が阻害され活性酸素の産生量が正常細胞に比べて多いことが報告されている。また MnSOD はミトコンドリア選択的に発現が誘導されることから mitROS の特異的消去が可能であり、RGK MnSOD 細胞における活性酸素産生量は RGK1 細胞に比べて減少していることが明らかとなっている。

ウエスタンブロッティング法による HCP1 発現量の比較では、RGM1 に比べて RGK1 で発現量の亢進が見られ RGK MnSOD では発現が抑制されていた。さらに PDT 効果も MnSOD の過剰発現によって抑制されていたことから、mitROS による HCP1 発現亢進が PDT 効果を増強させていることが示唆された。従って、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害し mitROS 産生を誘導するような薬剤を事前投与することによってさらなる PDT 効果の向上が期待された。このような薬剤について、筑波大学消化器内科では非ステロイド性抗炎症薬の一つであるインドメタシン (IND) が mitROS 産生を誘導することを報告してきた。従って本博士論文では、IND の事前投与が PDT 効果を増強させるか否かについて *in vitro* において検討を行った。

## <対象と方法>

RGM1、RGK1、RGK MnSOD と遺伝子導入ベクターのみを組み込んだ RGK 細胞 (RGK vector) を用いた。

- 1) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間曝露し、細胞内活性酸素を電子スピン共鳴装置 (ESR) によって測定した。
- 2) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養後の HCP1 の発現量を免疫染色法によって確認した。
- 3) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養した。その後 20  $\mu$ M ヘマトポルフィリン (HP) を 6 時間曝露し細胞内ポルフィリン蛍光量をプレートリーダーによって測定した。
- 4) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養した後 20  $\mu$ M ヘマトポルフィリン (HP) を 6 時間曝露した。エキシマダイレーザーを用いて細胞にレーザー照射 (630 nm, 1 J/cm<sup>2</sup>) を行った後さらに 24 時間培養した。細胞生存率を WST-8 によって評価した。

## <結果>

IND 前処理によって RGK1 および RGK vector で細胞内 ROS による ESR シグナル強度の増加を認めた。また、IND 前処理によって HCP1 発現量のがん細胞特異的に増強され、RGK MnSOD では IND による変化は見られなかった。それに伴って HP 集積量、PDT 効果も RGK1、RGK vector 細胞で増強が確認された。

## <考察>

ESR による生細胞内活性酸素量測定により、IND はがん特異的な ROS 産生を誘導することが示唆された。また MnSOD の過剰発現が ESR シグナル増強を抑制したことから産生された ROS はミトコンドリア由来であることが考えられる。一方、正常細胞においては ROS 産生増加が見られなかった。これは、IND 投与による外因的ストレスに対して正常細胞が防御機構を誘発した結果であると思われる。実際に既往研究では、IND 投与が RGM1 において MnSOD の発現を誘導している。がん細胞は、恒常的な ROS 産生などのストレスに対して既に防御機構が亢進した状態にある。従って、さらなるストレスに対応できず ROS 産生量が上昇したものと考えられる。

IND 投与によって HCP1 発現が亢進したことから、IND による mitROS 産生量の増加が HCP1 の発現に寄与したものと考えられる。それに伴い、ポルフィリンの集積および PDT 効果が増強されたと示唆される。

## <結論>

インドメタシンはがん特異的なミトコンドリア由来活性酸素種の産生を増加させ、ポルフィリン輸送タンパク HCP1 の発現を亢進させること、がん特異的なポルフィリンの集積および PDT 効果を増強させることがラット胃粘膜細胞を用いた検討により示唆された。