

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	腫瘍深部モデルにおけるアミノレブリン酸を用いた光線力学療法の評価
Title(English)	Evaluation of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy under deep-seated tumor model
著者(和文)	中山沢
Author(English)	Taku Nakayama
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11967号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小倉 俊一郎,小島 英理,中村 浩之,西山 伸宏,堤 浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11967号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

令和2年度 博士論文

腫瘍深部モデルにおけるアミノレブリン酸を用いた
光線力学療法の評価

東京工業大学大学院

生命理工学院

生命理工学コース

中山 沢

指導教員

小倉 俊一郎 准教授

目次

略語一覧

第1章 序論	1
1-1 がんの光線力学療法	2
1-2 ALA を用いたがんの光線力学診断・治療法	9
1-3 ポルフィリン・ヘム生合成経路	14
1-3-1 ペプチドトランスポーターPEPT1	16
1-3-2 ABC トランスポーターABCB6	17
1-3-3 ABC トランスポーターABCG2	18
1-4 腫瘍深部の環境	19
1-5 休眠がん細胞	21
1-6 3次元培養の手法および特徴	23
1-7 細胞周期とがんの増殖	26
1-8 本研究の目的	28
第2章 3次元培養スフェロイドおよび高密度2次元培養におけるがんの休眠性	30
2-1 緒言	31
2-2 実験方法	32
2-3 結果と考察	37
2-3-1 がん細胞スフェロイドの形成	37
2-3-2 休眠性の評価	43
2-3-3 休眠がん細胞における抗がん剤の細胞毒性評価	50
2-4 結言	53
第3章 休眠がん細胞における PpIX 蓄積および ALA-PDT 効果の評価	55
3-1 緒言	56
3-2 実験方法	57
3-3 結果と考察	60
3-3-1 休眠がん細胞における PpIX 蓄積の評価	60
3-3-2 休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の評価	64
3-3-3 休眠がん細胞におけるトランスポーターの発現解析	66
3-3-4 非休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の亢進	70
3-4 結言	75
第4章 ALA 添加後の光照射が種々の遺伝子発現応答に与える影響	78
4-1 緒言	79

4-2	実験方法	81
4-3	結果と考察	87
4-3-1	ALA 添加後の光照射による細胞生存率評価	87
4-3-2	ALA 添加後の細胞内へム蓄積とへム応答性遺伝子の発現変化	90
4-3-3	ALA 添加後の光照射による ROS の発生	92
4-3-4	ALA 添加後の光照射による遺伝子発現変化	96
4-4	結言	99
第5章	ALA 添加後の低用量光照射ががん細胞増殖に与える影響	100
5-1	緒言	101
5-2	実験方法	103
5-3	結果と考察	107
5-3-1	ALA 添加後の光照射による細胞生存率評価	107
5-3-2	ALA 添加後の光照射による遺伝子発現変化	111
5-3-3	ALA 添加後の光照射によるがん細胞増殖抑制	115
5-3-4	ALA 添加後の光照射による細胞周期関連遺伝子の発現変化	117
5-4	結言	122
第6章	総括	124
6-1	結論	125
6-2	本研究の展望と課題	129
	参考文献	132
	研究業績目録	151
	謝辞	156

略語一覽

ABC, ATP-binding cassette

ABCP, ABC placenta

ALA, 5-aminolevulinic acid

ALAD, 5-aminolevulinate dehydratase

ALAS, 5-aminolevulinate synthase

ARF, alternate reading frame

ATM, ataxia telangiectasia mutated

ATR, AT-and Rad3-related

BBB, blood-brain barrier

BCRP, breast cancer resistance protein

CP, coproporphyrin

CPOX, coproporphyrinogen oxidase

DMEM, Dulbecco's modified Eagle medium

DMF, N,N-dimethyl formamide

DNAPK, DNA-dependent protein kinase

DTT, dithiothreitol

EGFP, enhanced green fluorescent protein

ERK, extracellular signal-regulated kinase

FDA, the U.S. food and drug administration

FECH, ferrochelatase

FT, flat type

FTC, fumitremorgin C

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

CHX, cycloheximide

HMBS, hydroxymethylbilane synthase

HO-1, heme oxygenase-1

HpD, hematoporphyrin derivatives

HPLC, high performance liquid chromatography

HRP, horseradish peroxidase

LED, light-emitting diode

MDM2, murine double minute 2

MDR, multi-drug resistance

MRP, multi-drug resistance associated protein

MTT, 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

MTX, methotrexate

MXR, mitoxantrone resistance protein

PBG, porphobilinogen

PBS, phosphate-buffered saline

PDD, photodynamic diagnosis

PDT, photodynamic therapy

PEPT1, peptide transporter 1

PI, propidium iodide

PK, protein kinase

PpIX, protoporphyrin IX

PPOX, protoporphyrinogen oxidase

PPT, papillary pedunculated type

PVDF, polyvinylidene difluoride

QOL, quality of life

qRT-PCR, quantitative real-time PCR

ROS, reactive oxygen species

RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction

RPMI, roswell park memorial institute medium

SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

SLC, solute carrier

SUMO, small ubiquitin-like modifier

TBS, Tris-buffered saline

TTBS, TBS with 0.05% (v/v) Tween 20

TURBT, transurethral resection of the bladder tumor

UP, uroporphyrin

UROD, uroporphyrinogen III decarboxylase

UROS, uroporphyrinogen III synthase;

WHO, world health organization

第1章

序論

- 1-1 がんの光線力学療法
- 1-2 ALA を用いたがんの光線力学診断・治療法
- 1-3 ポルフィリン・ヘム生合成経路
 - 1-3-1 ペプチドトランスポーターPEPT1
 - 1-3-2 ABC トランスポーターABCB6
 - 1-3-3 ABC トランスポーターABCG2
- 1-4 腫瘍深部の環境
- 1-5 休眠がん細胞
- 1-6 3次元培養の手法および特徴
- 1-7 細胞周期とがんの増殖
- 1-8 本研究の目的

1-1 がんの光線力学療法

世界保健機構(WHO)の附属機関である国際がん研究機関(IARC)が発表した 2014 年世界がん報告によると、2018 年の新規がん罹患患者数は 1808 万人、死亡者数は 956 万人であった。がんは、2011 年に世界の死亡原因第一位となって以来、罹患数および死亡数は増加傾向にあり、2030 年までに罹患数は 2160 万人、死亡数は 1300 万人に達すると予測されている。我が国においても、1981 年以来がんは死亡原因第一位であり、その死亡数は年間 35 万人に上る。また、罹患数は 80 万人に上り、生涯リスクを考えると日本人の 2 人に 1 人はがんに罹る計算である。このような状況の中で、がんの治療法は外科療法、放射線療法、化学療法の三大療法を中心に進化を遂げており、現在では早期がんのほとんどは治癒可能となった。しかしながら、進行がんや再発・転移がんの治療は困難なままである。一方で、副作用や患者の生活の質(QOL)などの面でも多くの課題が残っているため、さらなる研究開発が必要とされており、新たな診断法・治療法が期待されている。

がんとは腫瘍細胞が際限なく増殖を続け、周辺の正常組織に浸潤し、腫瘍の原発巣から遠隔した組織に転移することで、人を死に至らしめる疾患として定義される。これまで臨床的にがんは 100 種類以上に分類されており、原発組織の形態などからそれぞれのがんの性質が区別されてきた[1]。近年では、原発した正常組織に特異的な性質を多く保持しつつ無秩序化した組織として、がんを理解しようとする考え方が脚光を浴びている。がん幹細胞仮説はこの考え方から派生したものであり、腫瘍細胞が無限の増殖能を獲得したごく僅かながん幹細胞を取り巻き、階層的な構造を成して進展すると捉える[2,3]。新しい治療に対する個々のがん細胞の多様な応答を調べることによって、がん幹細胞を死滅させる有望な治療法の確立をもたらすことが期待される。

近年、がんの新しい治療法の一つとして光線力学療法(Photodynamic therapy, PDT)が注目されている(Fig. 1-1)。PDT は組織や細胞に取り込まれた光増感剤に光照射を行うことによって細胞死を誘導する治療法である。光増感剤の多くはポルフィリン骨格を有しており、重篤な副作用は認められず、早期がんに対して高い臨床成績が報告されている。PDT に用

いるポルフィリンは生体に由来する化合物と人工的に合成された化合物が存在し、腫瘍組織における可視光の照射を通じて、細胞傷害性活性酸素(ROS)である一重項酸素などを発生させる[4,5]。効率よく ROS を発生し、腫瘍組織を破壊するために適切な酸素濃度も必要と考えられている[6]。1960年にLipsonらによって、ヘマトポルフィリンの静脈注射が手術中に腫瘍部位を可視化することが報告されて以来、ポルフィリンの腫瘍選択性を最適化するために、様々な光増感剤が設計・開発されてきた。もともと古典的な光増感剤であるヘマトポルフィリン誘導体(HpD)は、ヘマトポルフィリンと酢酸、硫酸によって合成されており、モノマーやダイマー、オリゴマーなど数種類のポルフィリンの混合物であることが示されている[7]。これまでに世界的で広く臨床上使用されている光増感剤である Photofrin[®]は、HpD を HPLC やゲル濾過で部分的に生成したものである[8]。PDT の標準的なプロトコルでは、光増感剤を患者に静脈注射した後、腫瘍に蓄積したポルフィリンを標的に光照射を行うことで病巣部を治療する[9]。HpD の腫瘍選択性は、正常組織と腫瘍組織における吸収・分布・代謝・排泄などの特性に違いに基づくと同時に、治療標的となる腫瘍組織にのみ光照射を加えることで達成されることが考えられている(Fig. 1-2)。光照射で励起された光増感剤は、腫瘍組織内で光化学反応に伴い発生する ROS によって、腫瘍細胞の細胞死を引き起こす。数週間後に壊死した腫瘍組織を取り除くことで治療が終わり、予後を経過観察することが一般的である。

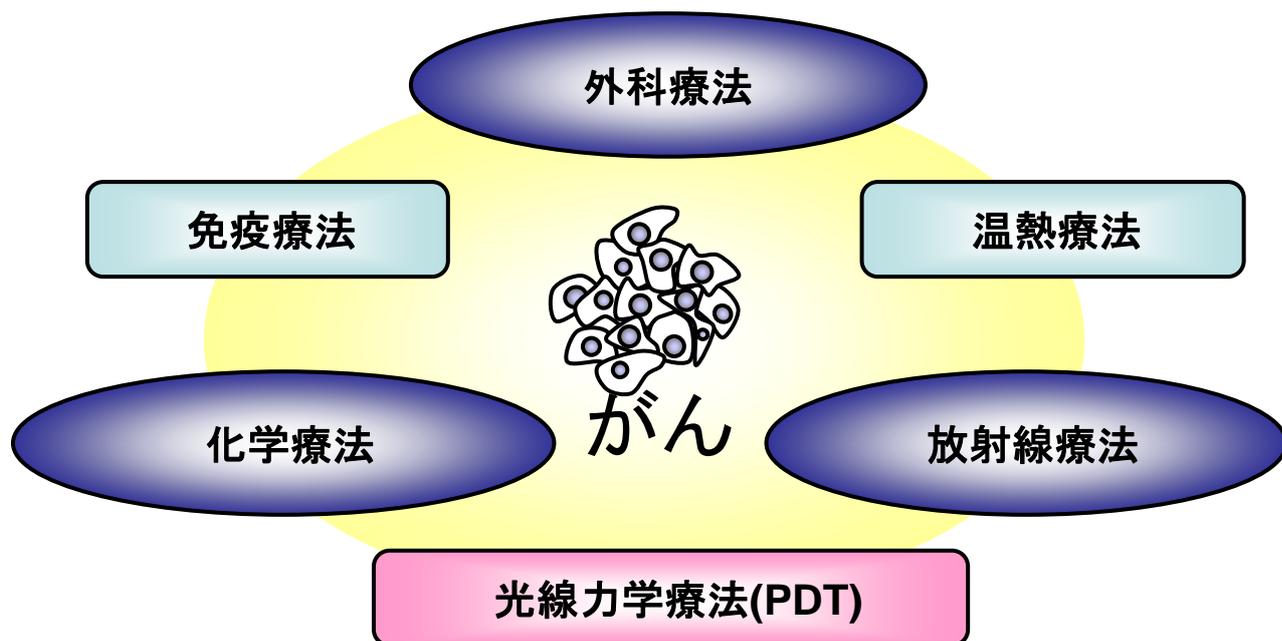


Fig. 1-1 がんの三大療法と代替療法

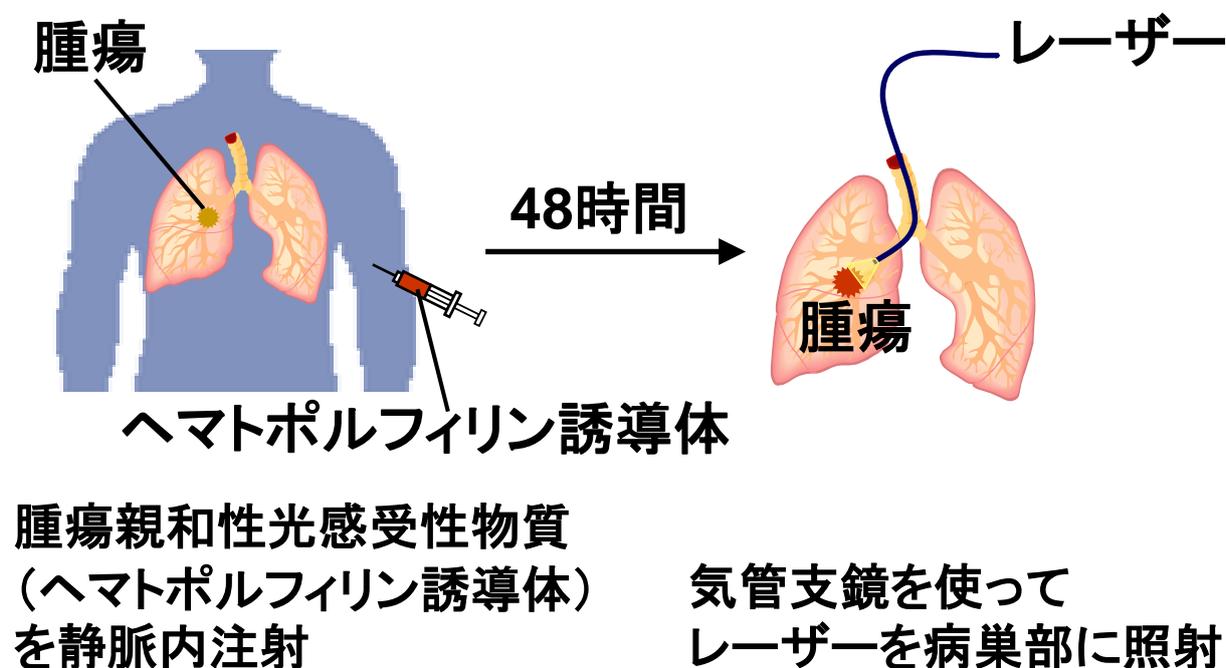
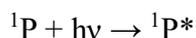
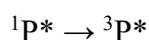


Fig. 1-2 肺がんに対する HpD を用いた PDT の適用例

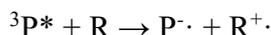
PDT で利用するポルフィリンの光化学反応は、一連の光酸化反応であると考えられている(Fig. 1-3)。波長 400 – 600 nm の可視光線を吸収した光増感剤(ポルフィリン)は、励起一重項状態($^1P^*$)へと活性化される。



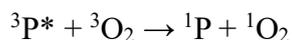
寿命の短い励起一重項状態($^1P^*$)のポルフィリンは、一部が蛍光を発して基底状態(1P)へに戻る一方で、比較的安定に存在する励起三重項状態($^3P^*$)へと項間交差によって遷移する [10]。



その後、励起三重項状態は 2 種類の反応を介して ROS を発生する。励起三重項状態のポルフィリンは、細胞膜や脂質、タンパク質など生体高分子(R)に直接電子を受け渡し、ラジカル種を生成する。これらのラジカル種は酸素分子と反応し過酸化物が生成される(タイプ I 反応)。



タイプ I 反応とは別に、励起三重項($^3P^*$)は溶存酸素と直接エネルギー交換を起こし、一重項酸素を生成する(タイプ II 反応)。一重項酸素は脂質やタンパク質、核酸など、多くの生体分子と反応する細胞傷害性 ROS である[10–13](Fig. 1-4)。



多くの PDT 用光増感剤は一重項酸素を効率よく生成し、タイプ II 反応が PDT の細胞や組織の環境に損傷を引き起こす主要な分子機構として考えられている[5,13]。

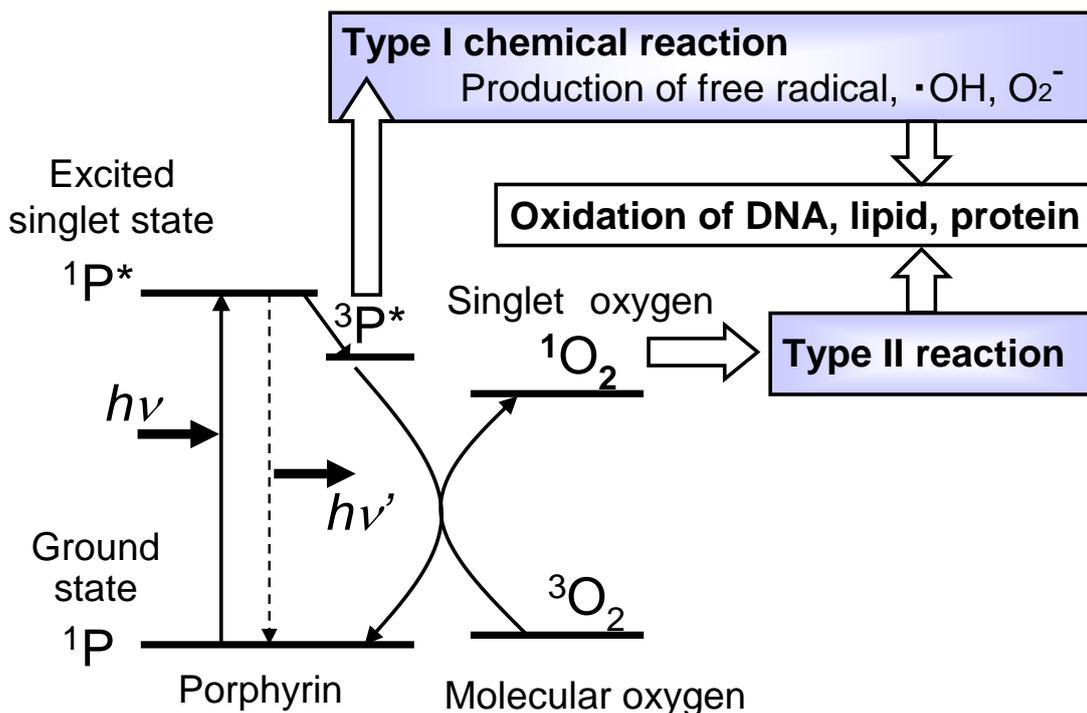


Fig. 1-3 PDTにおける光化学反応を介したROSの発生原理

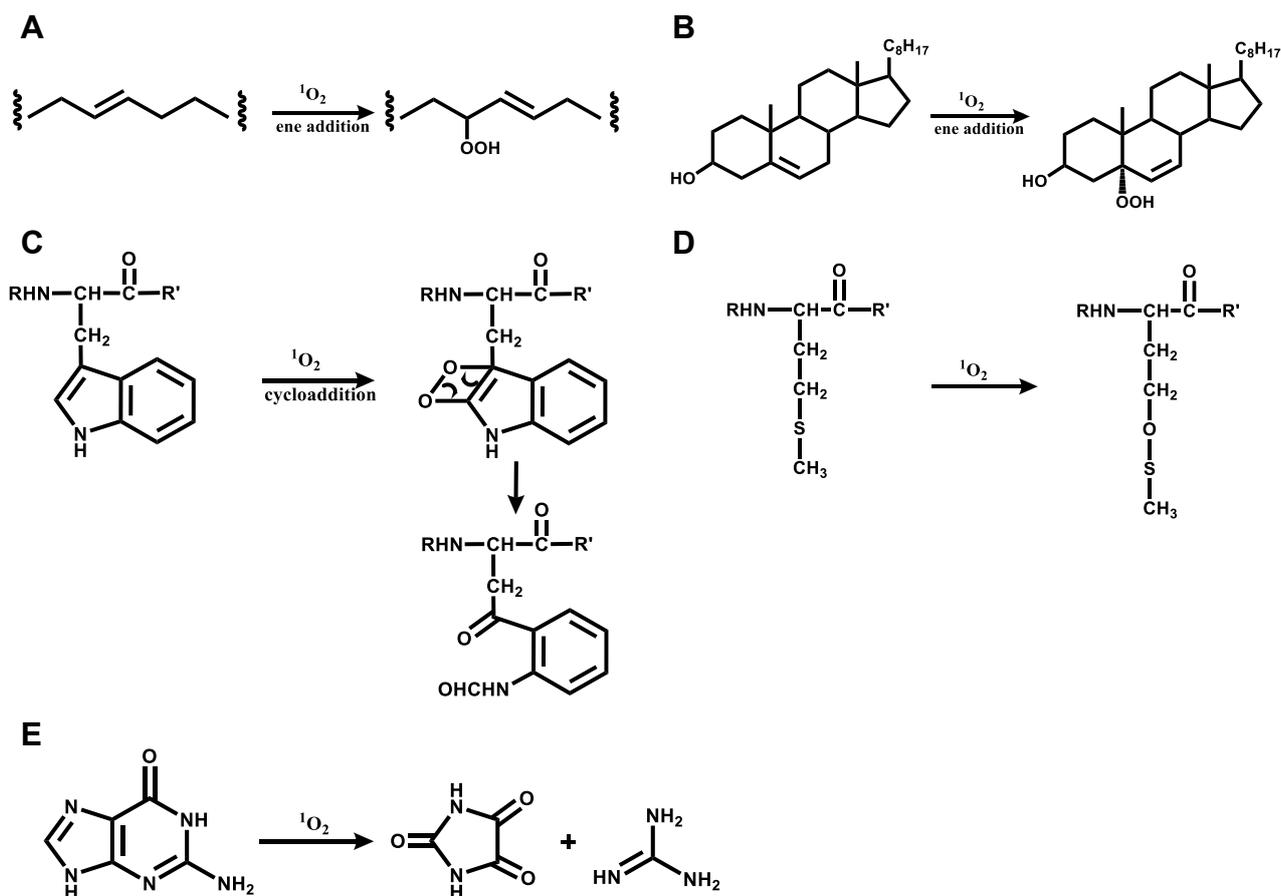


Fig. 1-4 一重項酸素と生体分子の反応

(A)不飽和脂肪酸 (B)コレステロール (C)トリプトファン (D)メチオニン(E)グアニン

Photofrin[®] (HpD)は日本において、早期肺がん・早期胃がん・子宮頸がん・表在性食道がんの治療薬として認可されており、世界的にも広く使用されている[5]。しかしながら、PDTには治療に使用する赤色光の組織透過性が十分でない点や、正常な皮膚にも増感剤が留まることで治療後、数週間にわたり皮膚に光傷害を生じる副作用が起りやすい問題点がある。近年開発された Laserphyrin[®] (Talaporfin Sodium)や Visudyne[®] (Verteporfin)と言った第2世代の光増感剤は化学的に単一の化合物であり、ヘモグロビンの吸収帯である 576 nm を避けるために、より長波長の光を効率よく吸収することが出来る様に設計されている(Fig. 1-5)。

Laserphyrin[®] (Talaporfin Sodium, mono-l-aspartyl chlorine e6: NPe6)は 664 nm に主な吸収帯を有する分子量 799.69 の親水性光増感剤である[14]。Chlorine e6 の骨格にアスパラギン酸の側鎖を有する Laserphyrin[®]は、日本で世界に先駆けて承認された光増感剤であり、Photofrin[®] (porfimer sodium)に比べ光過敏症状を呈する副作用が低減されている。そのため、Photofrin[®]を用いる PDT に比べ、入院期間を短縮化できる点で臨床上期待されているが、現在のところ、認可されている適用疾患は早期肺がんのみとなっている。

Visudyne[®] (Verteporfin)は加齢黄斑変性疾患の PDT 治療薬として開発され、がんの治療薬としての認可は受けていないが、眼科領域で広く標準的に用いられている。Visudyne[®] は投与後すぐに排泄されることが知られており、24 時間以上に及ぶ光過敏症状は引き起こさない[6]。今後はがん治療薬としての開発が期待されている。

First Generation

Photofrin®

Hematoporphyrin derivative

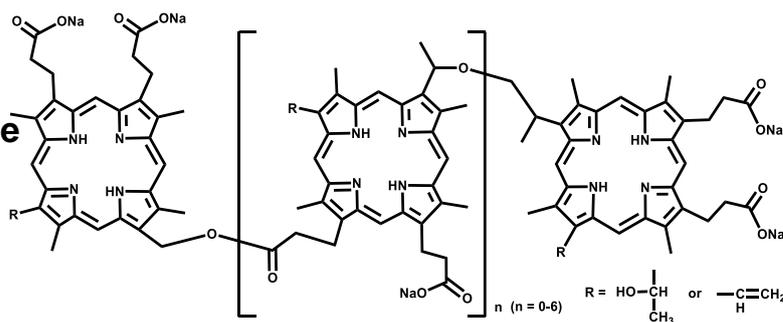
630 nm

early lung cancer

early gastric cancer

cervical cancer

superficial esophagus cancer



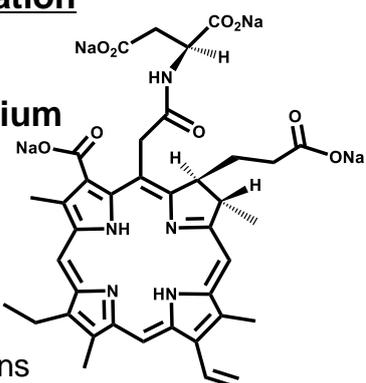
Second Generation

Laserphyrin®

Talaporphin Sodium

664 nm

early lung cancer
solid tumor
from diverse origins



Visudyne®

Verteporphin

690 nm

Age-related
Macular Degeneration

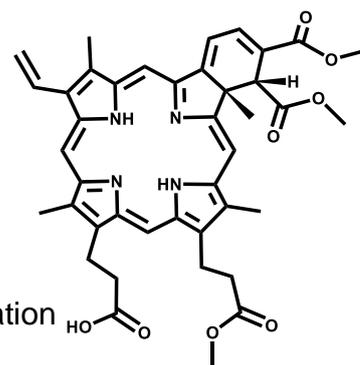


Fig. 1-5 日本において承認されている PDT 薬の構造式

1-2 ALA を用いたがんの光線力学診断・治療法

5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid, ALA)を用いた光線力学診断(ALA-based photodynamic diagnosis, ALA-PDD)は注目されている新規診断法の1つである。ポルフィリン前駆体である光増感作用を持たないアミノレブリン酸(ALA)が、プロドラッグとして臨床的に用いられるようになった。ALA の投与は腫瘍において、内在性のプロトポルフィリン IX (PpIX)の生合成、蓄積を促進する(Fig. 1-6)。従来の光増感剤は静脈内注射による投与経路しか選択することが出来なかったが、ALA は経口投与や局所塗布など患者の身体的負担が少ない点も利点として挙げられる。このことから、欧米で ALA は特に皮膚がんの治療において、広く認可されて一般的な治療薬となっている[15]。ALA そのものは光増感作用を有していないが、内在性の光増感剤である PpIX は腫瘍組織に選択的に蓄積する強力な光増感剤である。ALA 投与後の腫瘍選択的な PpIX 蓄積は、脳・食道・膀胱・子宮・皮膚など多くの組織において認められる[15]。ALA は 1999 年に米国食品医薬品局(FDA)によって、黒色腫を除く皮膚がんの治療薬として認可されている。日本においては 2013 年に脳腫瘍の術中蛍光診断用体内診断薬として、2017 年に膀胱がんの術中蛍光診断用体内診断薬として薬事承認され、臨床現場において活用されている。

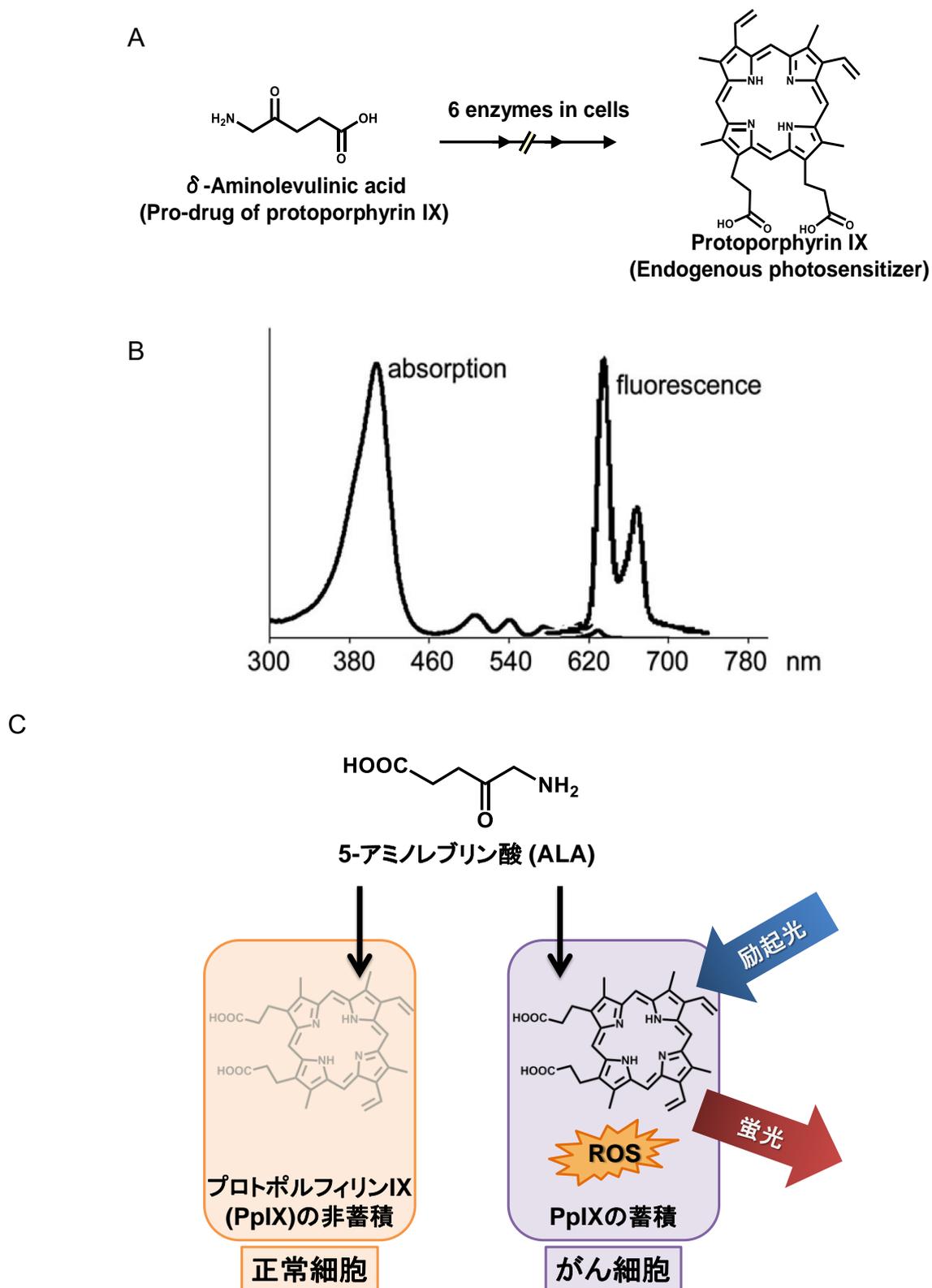


Fig. 1-6 正常細胞およびがん細胞での ALA 代謝

(A) ALA から生合成される PpIX の構造, (B)DMSO 中における PpIX の吸収および蛍光スペクトル (励起波長 420 nm)[16], (C)ALA が正常細胞およびがん細胞に与える影響

例えば、最も悪性度が高い脳腫瘍である悪性神経膠芽腫(Glioblastoma, GBM)の患者の生存期間中央値(MST)は、わずか16ヶ月程度である[17]。GBM患者におけるMSTは、手術の際の腫瘍切除率と強く相関することが示されている。Kelesらは残存腫瘍の大きさと予後の関係を107例のGBM患者で調べており、手術後にCTやMRIで腫瘍が認められなくなった患者のMSTは93週間であった。一方で、残存腫瘍の大きさが 10 cm^3 以下、 $10\text{ cm}^3 \sim 20\text{ cm}^3$ 、 20 cm^3 以上の患者のMSTはそれぞれ68.7、49.0、50.8週間であった[18]。また、別の報告においてほぼ全ての腫瘍を切除した際の5年生存率は45.8%である一方、50%の腫瘍しか切除できなかった際の5年生存率は17.5%であった[19,20]。このことから、腫瘍の切除率はMSTのみならず5年生存率にも影響を与えたと考えられる。これらのことから、手術の際にできるだけ多くのGBMを摘出することおよび残存腫瘍の大きさを 10 cm^3 以下に抑えることが重要であると言える。しかし、悪性脳腫瘍の手術においてこれを達成することは、術後の後遺症との兼ね合いより困難である。脳腫瘍の手術の際には、隣接した正常組織まで切除すると術後に片麻痺や言語障害などの重篤な後遺症が残る恐れがある。悪性脳腫瘍は周囲の正常脳組織に浸潤するため正常組織との境界が曖昧であり、正常組織を切除する危険を冒せないため、境界領域のがんを全切除できないことが大きな原因である。そこで、ALA-PDDが注目されている。ALAは分子量が131.13の低分子であるため、脳と血液との間の物質交換を制限する機構である血液脳関門を通過することができる。加えて、ALAの代謝物であるPpIXが腫瘍特異性のある蛍光物質であるため、GBMの術中診断に適している。ALA-PDDを用いた脳腫瘍の手術の際の画像がFig. 1-7である[21]。白色光下では正常組織と腫瘍の境界が曖昧であるがPpIXの蛍光を観察することで腫瘍の識別が容易になり、切除後に腫瘍の取り残しがあることも確認できる。実際に、Stummerらの報告では、40%だった脳腫瘍の切除率がALA-PDDを併用することによって78%まで増加しており、これによって51週間だったMSTが101週間まで延長している[22,23]。脳腫瘍患者にALAを経口投与した場合、脳腫瘍のグレードが上がるにつれて腫瘍へのポルフィリンの蓄積量が増加することが報告されている[24]。このことから、ALAを用いたが

ん診断は悪性度の高いがんにも有効であると考えられる。GBM 患者に対する PDD 薬として、ヨーロッパでは 2007 年に ALA 塩酸塩(GliolanTM)が認可されており、日本においても 2013 年に ALA 塩酸塩(ALAGLIOTM)が認可された。

さらに、腫瘍特異的に蓄積する PpIX は可視光照射を行うことで、細胞傷害性活性酸素種(ROS)である一重項酸素などを発生させる[4-6,25]。ROS の発生により、がん細胞のアポトーシスやネクローシスを誘導することができる。この性質を利用して、がん治療を行う手法が光線力学療法(ALA-based photodynamic therapy, ALA-PDT)である。本治療法は、副作用が比較的軽微で早期がんに対して高い臨床成績が報告されている。ALA-PDD と ALA-PDT では照射する可視光の波長が異なる。ALA-PDD を行う際は、PpIX の発光が強く認められる青色を照射し、赤色の蛍光を検出する。しかし、波長が短い青色の光は散乱しやすく、組織への透過能が低い。そこで、ALA-PDT を行う際は、組織への透過能がより高い赤色光を使用する。なお、PDT 薬としての ALA は日本において未認可であり、早い認可が望まれている。

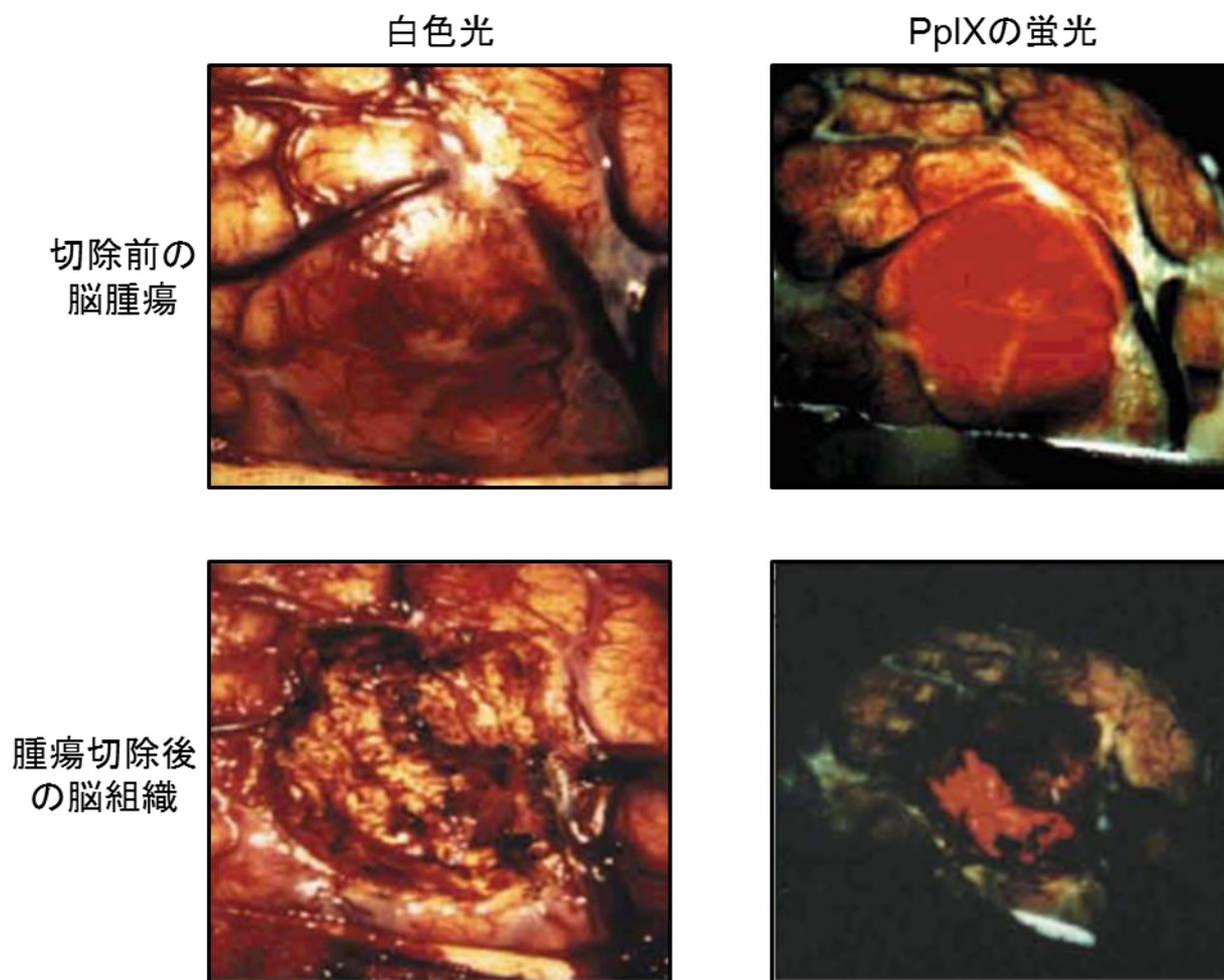


Fig. 1-7 脳腫瘍における ALA-PDD (柏葉脳神経外科病院 金子先生より)

1-3 ポルフィリン・ヘム生合成経路

ALA は生体内に存在するアミノ酸の一種であり、ポルフィリン・ヘムの前駆体である。ヘムは様々なタンパク質の補欠分子族として働く生体にとって必須な物質であり、ヘモグロビンやミオグロビンによる酸素の貯蔵と運搬・ミトコンドリア内複合体による酸素呼吸等に関与する。哺乳類細胞内のポルフィリン・ヘム生合成は8つのヘム生合成酵素、2つのヘム代謝酵素、および2つの ATP-binding cassette (ABC) トランスポーターによって制御されている[26–28] (Fig. 1-8)。ポルフィリン・ヘム生合成はミトコンドリア内での ALA の合成から開始される。ALA は ALA synthase 1 (ALAS1) によってスクシニル CoA とグリシンから合成される。次に、ALA がミトコンドリア内から細胞質へと輸送され、2分子の ALA が ALA dehydratase (ALAD) によって縮合し Porphobilinogen が生成する。その後、4分子の Porphobilinogen が PBG deaminase (PBGD) によって縮合し、直鎖上の Hydroxymethylbilane となる。Hydroxymethylbilane は Uroporphyrinogen III synthase (UROS) によってテトラピロール骨格を有する Uroporphyrinogen III (UPgenIII) に合成されたのち、Uroporphyrinogen decarboxylase (UROD) によって Coproporphyrinogen III (CPgenIII) へと代謝される。以降のヘムまでの生合成反応は再びミトコンドリア内で行われる。CPgenIII は主にミトコンドリア外膜に発現している ABC トランスポーター ABCB6 によって細胞質からミトコンドリアへ輸送されたのち、Coproporphyrinogen III oxidase (CPOX) により Protoporphyrinogen IX となる。Protoporphyrinogen IX は、Protoporphyrinogen oxidase (PPOX) によって Protoporphyrin IX (PpIX) へと代謝される。最後に PpIX は Ferrochelatase (FECH) によって2価の鉄イオンを配位されることでヘムになる。合成されたヘムは、ミトコンドリア内膜および外膜に貫通して発現している FLVCR によって細胞質に輸送され、ヘモグロビン、ミオグロビン、シトクロム P450 等の様々なタンパク質に組み込まれる。ポルフィリン生合成経路においては、ALAS1 による ALA の生合成が律速である[29,30]。タンパク質と結合していない遊離のヘムは、ラジカルの発生を促進し細胞毒性を引き起こす。そのため、遊離のヘムは Heme oxygenase 1 (HO-1) によって代謝されて Biliverdin となり、

Biliverdin reductase (BVR)によって速やかに Bilirubin、一酸化炭素、および2価鉄に代謝される[26]。外因的に投与された ALA はペプチドトランスポーターである PEPT1 や PEPT2 によって細胞内へと取り込まれ、律速過程である ALAS を経ずにヘム合成経路によって PpIX まで代謝される。正常細胞では合成された PpIX は速やかにヘムへと代謝されるが、がん細胞においてはヘムへと代謝されずに PpIX が細胞内に蓄積する。その原因として、2価の鉄イオンを PpIX に挿入する FECH の活性低下やミトコンドリア内の鉄イオン量の減少が一因として報告されている[31–33]。なお、生体内に ALA の代謝経路があることから、生体外より過剰量を投与しても正常組織における中毒症状は生じづらいと考えられる。このことは、ALA を用いたがん診断・がん治療が安全である理由の1つと言える。当研究室の知見および他の報告から、ALA 添加後の PpIX 蓄積量は、PEPT1 と ABCB6 の発現亢進および ABCG2 の発現低下と強い相関を示すことが明らかになっている[34–38]。

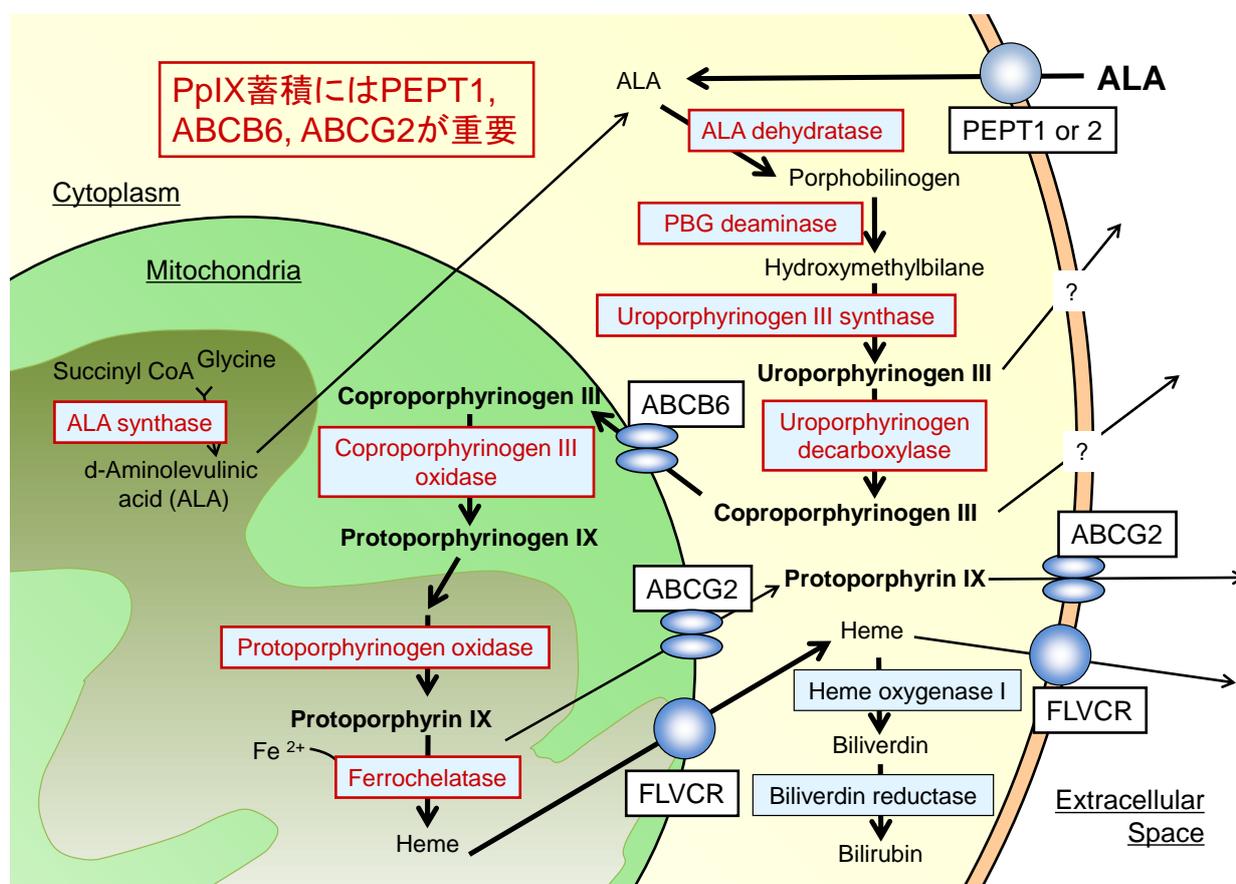


Fig. 1-8 ポルフィリン・ヘム合成経路

1-3-1 ペプチドトランスポーターPEPT1

ペプチドトランスポーターPEPT1 (SLC15A1)は、小腸上皮細胞の刷子縁膜[39]で発見されて、腎近位尿細管 S1 領域[40]、胆管上皮細胞の頂端膜[41]にも発現している。PEPT1 は広範な基質特異性を示し、 β -ラクタム系抗生物質であるアミノセファロスポリン類の多くや、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、ペプチド分解酵素阻害薬などの膜間輸送を担うことが報告されている[42]。PEPT1 と相同性の高い PEPT2 (SLC15A2)も同様な基質特異性を有しており、基質中のペプチド結合は必ずしも必要でなく、分子内距離 500-630 ピコメートルで荷電した NH₂ および COOH が対になっている単純な炭素鎖を持つ化合物を基質として認識して輸送する[43]。PEPT1 や PEPT2 を介した ALA の輸送は放射性標識された ALA を用いた電気生理学的実験によって詳細に調べられた結果[44]、ペプチドトランスポーターを介した ALA の取り込みは内在性の光増感剤である PpIX の蓄積をもたらすことが示唆された。PEPT1 だけでなく PEPT2 もまた ALA の細胞内への取り込みを行うことが出来るが、PEPT2 の輸送活性(V_{max})は PEPT1 よりかなり低いことが示されている。また最近になって、プロトン共役アミノ酸トランスポーターである PAT1 (SLC36A1)も ALA の細胞内への取り込みに関与することが報告された。PAT1 の ALA に対する親和性は PEPT1 よりも低い、V_{max} は同程度である[45]。PAT1 は正常組織において発現が認められることから、PAT1 の阻害薬と ALA を併用することで、ALA 投与における PpIX 蓄積の腫瘍特異性を向上させることが期待されている[46]。

1-3-2 ABC トランスポーター ABCB6

ABC トランスポーターは ATP の加水分解エネルギーを用いて能動的な輸送を行う膜輸送体である。ABC トランスポーターは ATP 結合ドメイン(NBD)および膜貫通ドメインから構成されており、NBD 中では Walker A、Walker B、signature モチーフが高度に保存されている。ヒトには 48 種類の ABC トランスポーターが存在することが知られており、一部は薬剤耐性に関わる薬物トランスポーターとして知られている。ポルフィリン・ヘムの生合成には少なくとも ABCG2、ABCB6 の 2 つの ABC トランスポーターが関与している。

ABCB6 は 2006 年にミトコンドリアの外膜に局在し、CPIII および CPgenIII を基質として認識することが示されたトランスポーターである[47]。神経膠腫のグレードが上がるにつれて ABCB6 の発現量が増加し、ABCB6 の発現量と PpIX 蓄積量には正の相関がみられることが報告されている[48]。In vitro の実験系においても ABCB6 の発現抑制によってがん細胞内で合成される PpIX 量が減少することおよび ABCB6 の過剰発現によって PpIX の蓄積量が増加することが示されており[48]、ABCB6 はポルフィリン・ヘム生合成にとって重要な遺伝子の一つであると考えられる。しかし、ABCB6 はミトコンドリアだけではなく、細胞膜やゴルジ体、リソソーム等に発現しているという報告もなされており、ABCB6 の局在については未だ議論の余地がある[49-51]。ABCB6 には 104 kDa の ABCB6-H、79 kDa の ABCB6-L の 2 つのアイソフォームが存在し、ABCB6-H は主に細胞膜に、ABCB6-L は主にミトコンドリアに局在しているという報告がある[49]。そのため、細胞膜に発現した ABCB6-H がポルフィリンの排出に関わっている可能性が考えられる。

また、ABCB6 は遺伝子プロファイリングの結果、薬剤耐性に関わっていることも示唆されている[52,53]。実際に、亜ヒ酸塩またはシスプラチン耐性を獲得したマウス細胞株およびヒト細胞株において ABCB6 の mRNA およびタンパク質発現量が上昇すること[54]、肝がんになると ABCB6 の発現量が増加することが示されており[55]、ABCB6 が薬剤耐性に関わっていることが示唆される。以上より、ABCB6 はミトコンドリア外膜のみならず、細胞膜にも局在していることが示唆されており、薬剤を排出している可能性が考えられる。

1-3-3 ABC トランスポーター ABCG2

ABC トランスポーターの一種であるヒト ABCG2 は、1998 年に抗癌剤アントラサイクリン耐性の乳癌細胞株、ミトキサントロン耐性のヒト大腸癌細胞株などから発見、クローニングされ、抗癌剤耐性を癌細胞に賦与する薬物排出トランスポーターとして同定された[56–58]。正常組織において、ABCG2 は胎盤、脳、小腸、肝臓、腎臓、精巣などに発現しており、ATP の加水分解エネルギー依存的に生体異物や薬物を能動的に排出して生体内への取り込みを制限することによって生体防御に寄与している。特に、小腸や大腸上皮に発現する ABCG2 は、経口投与された薬物などの吸収を制御し、生体異物の体内侵入を阻止している[59]。

これまで ABCG2 は抗癌剤を細胞外へと排出することで、癌細胞が抗癌剤に抵抗性を示す因子として広く研究がなされており、ABCG2 の基質特異性は広範に渡り、非常に多くの化合物と相互作用することが明らかになっている[42,60,61]。一方で近年になって、ABCG2 が生理的に細胞内のポルフィリンを輸送し、光酸素障害を回避することを示唆する重要な報告がなされた。すなわち、ABCG2 のオルソログである *Abcg2* を欠損したマウスは、赤血球中の PpIX レベルが通常約 10 倍に増加し、餌に含まれるフェオフォルバイド a の増加に伴ってポルフィリン症に酷似する皮膚の光線過敏症を発症した[38,60]。フェオフォルバイド a は、植物性クロロフィル a の分解物で、ポルフィリンと類似骨格を持つ光増感物質である。ヒトにおいても遺伝子多型や化合物による ABCG2 のポルフィリン化合物の輸送能低下が、*Abcg2* 欠損マウスに見られるようなポルフィリンホメオスターシスの破綻を招き、光線過敏症のリスクを高めることが示唆された。

さらに、造血細胞の分化においても ABCG2 が重要な役割を持つことが示唆されている。これらの知見から ABCG2 は細胞内ポルフィリンの恒常性維持という重要な生理的役割を担うことが示唆された[26,62]。さらに Robey らによって、ABCG2 を介した光増感剤の輸送阻害は PDT の治療効果を向上させる報告もなされた[37]。このことから ABCG2 の発現は ALA-PDT における治療効果の指標となる可能性がある[46]。

1-4 腫瘍深部の環境

一般的に正常組織は血管が規則正しく等間隔に並んでいる。具体的には、太い幹となる血管があり、それから枝分かれするように一定の間隔を保つように血管が走行する[63]。そのため、組織を構成する細胞間の環境が比較的均一に保たれている。一方で、腫瘍組織の血管配置は不均一であり、太さの統一性も保たれていないことが多い(Fig. 1-9)[63]。その結果、細胞密度、栄養濃度、酸素濃度、老廃物濃度、pHなどの勾配が生じ、個々の異なった性質を持つ微小環境を構築することが知られている[64]。腫瘍の表面は正常組織と接しており、血管からの距離が比較的一定となるため、微小環境は腫瘍表面より腫瘍深部において顕著な差が生じるものであると考えられている。

これらの微小環境はポルフィリン代謝にも影響を及ぼすことが知られており、特に酸素濃度はがん細胞におけるALA投与後のPpIX代謝に顕著な影響を与えることが、我々の研究グループで明らかとなった。通常酸素環境下においては、ALAはPpIXおよびHemeまで代謝され、一部のPpIXの蓄積が細胞内で認められる。しかし、低酸素環境下では、ポルフィリンの中間代謝物が多量に細胞外へと排出され、Coproporphyrin IIIとして細胞外において検出される。その結果、細胞内のPpIX蓄積はほとんど認められない[65]。本例のように、微小環境はALAを用いた光線力学診断・光線力学治療に大きく影響を及ぼす可能性があるが、モデル構築の煩雑性や現象の複雑性などが課題となり、研究報告が少ないことも事実である。

腫瘍深部は細胞密度が高く、その一部にがん幹細胞や後述する休眠がん細胞を内包していると考えられている[66]。同時に、腫瘍表面からの距離に比例して照射光は減衰するため、それぞれの要素を分離して実験系を構築し、評価する必要がある。しかしながら、細胞密度、休眠がん細胞、照射光の減衰がALA-PDTに及ぼす影響を調査した報告はほとんど存在しない。

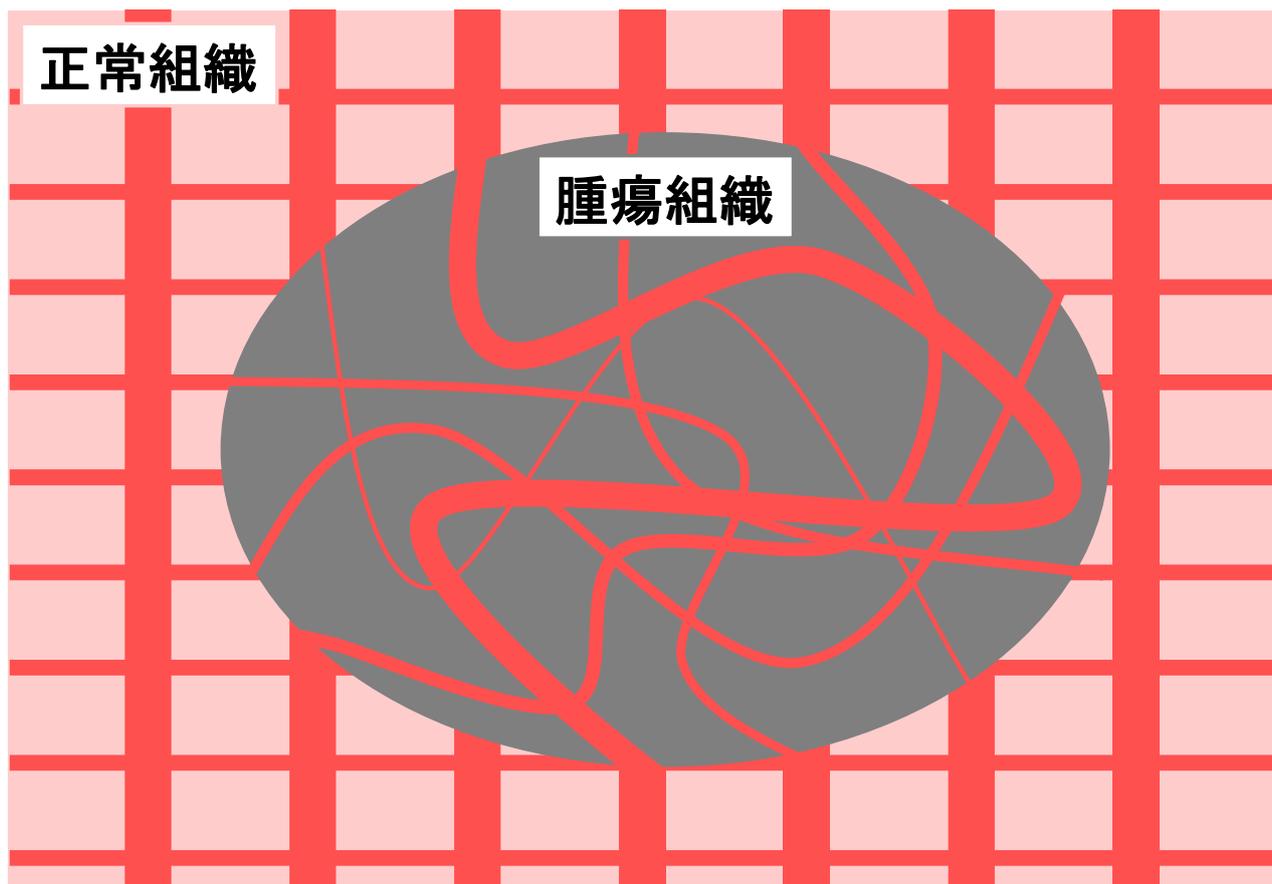


Fig. 1-9 腫瘍組織内の血管走行の概念図

1-5 休眠がん細胞

適切な治療を受けることで腫瘍が確認されなくなったにも関わらず、がん患者は数十年後といった長い期間後に同じ疾患にみまわれることがある。この現象をがんの再発と言う。再発の原因として、外科療法で取りきれていなかった目に見えない小さながんが再び成長して現れたり、化学療法や放射線療法に抵抗性をもった一部のがん細胞が再び成長したりすることが挙げられる。特に後者の治療抵抗性をもったがん細胞と休眠がん細胞(Dormant cancer cells)は密接な関係があると報告されている[67,68]。休眠がん細胞は腫瘍内の微小環境などの影響によって、細胞増殖が抑制されたがん細胞である。化学療法や放射線療法の多くは、がん細胞における速い細胞増殖を治療標的としているため、細胞増殖が抑制されている休眠がん細胞に対しては十分な効果を発揮することができない(Fig. 1-10)[69,70]。また、休眠がん細胞は周囲の環境が変化することで再増殖し、新たな腫瘍を形成する能力がある[70–72]。がんの再発と強く関係しているため、休眠がん細胞に関する研究が加速的に進められている。しかしながら、現時点において細胞が休眠状態に移行するメカニズムは未解明のままである。一方で、休眠がん細胞の特徴は明らかになりつつある。井上らは休眠がん細胞の特徴を、No proliferation, No death, Metabolic suppression, Recovery to active status の4つで定義している(Table. 1-1) [73,74]。本定義は、同じく細胞増殖が抑制された状態である細胞老化と休眠がん細胞とを区別をすることができる。

In vitro の実験系において、休眠がん細胞を作成することは以下の2つの理由より難易度が高く、休眠がん細胞に関する研究の障害となっている。1つ目の理由として、*in vitro* で用いるがん細胞株の性質が挙げられる。*In vitro* における実験を遂行しやすくするために、細胞株を樹立する際に細胞増殖の活発な細胞が選択されている[75]。休眠がん細胞の特徴は細胞増殖が抑制されていることであるため、生体より摘出した組織より細胞株を樹立する過程で休眠がん細胞が省かれている可能性が高い。2つ目の理由として、*in vitro* の実験系では腫瘍の微小環境を構築することが難しいことが挙げられる。生体内の腫瘍では、血管配置の不均一性により酸素濃度・栄養濃度も不均一であることや高細胞密度によって、

個々の微小環境が構築される。これらの微小環境の一部に休眠がん細胞が存在すると考えられるが、*in vitro* においては微小環境を再現することが難しい[76,77]。以上のことから、休眠がん細胞に関する研究報告は少なく、ポルフィリン代謝に関する研究もほとんど報告されていない。

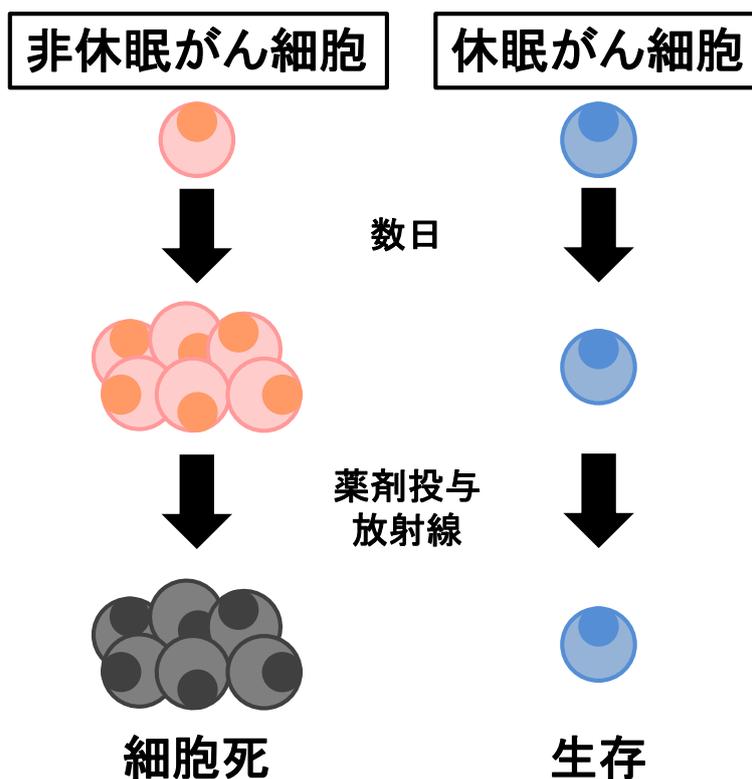


Fig. 1-10 休眠がん細胞における薬剤耐性

Table. 1-1 休眠がん細胞の特徴

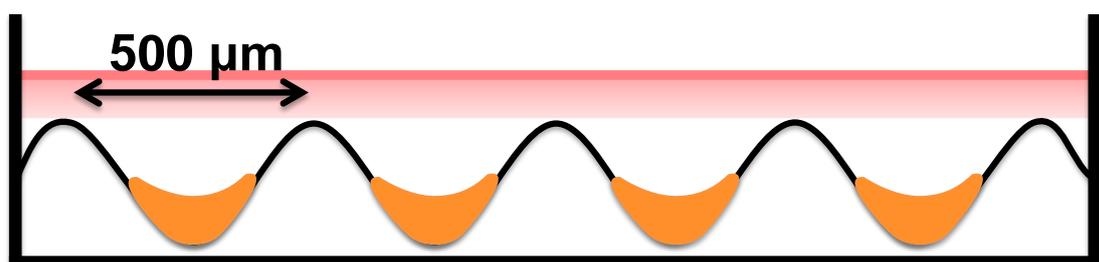
休眠がん細胞の4つの特徴	検証方法
1. No proliferation	セルカウント、BrdUの陽性率測定など
2. No death	PI染色など
3. Metabolic suppression	pS6の発現解析、ATP量の定量など
4. Recovery to active status	再増殖評価、再活性後の代謝活性測定など

1-6 3次元培養の手法および特徴

生体内の腫瘍は高密度な3次元構造であり、腫瘍を構成するがん細胞は様々な微小環境下に存在するだけでなく、周囲の細胞と相互作用をしている。しかし、一般的な *in vitro* の実験系では細胞を2次元培養するため、細胞密度が低くなるとともに、組織特有の形質も失われる[76,77]。そのため、*in vitro* と *in vivo* の実験系においては、しばしば異なる実験結果が得られ、研究をすすめる上で大きな課題となっている。「実験系の構築がしやすいこと」が *in vitro* 実験系の特長であるため、*in vitro* でありながら生体内の条件を反映した新たな実験系が待ち望まれている。近年では、これを満たす実験手法として3次元培養法が注目されている。3次元培養されたがん細胞塊は、がん細胞スフェロイドと呼ばれる。がん細胞スフェロイドは *in vitro* であるにも関わらず、高密度であるため、生体内の腫瘍に存在する微小環境を構築することができる。微小環境の構築により、細胞増殖が抑制されるという報告があり、休眠がん細胞の存在が示唆されている[76,78,79]。

3次元培養の手法に関して多くのものが報告されている。有名なものとしては、マトリゲル培養、スピナーフラスコ培養、ハンギングドロップ培養が挙げられる[76]。しかし、これらの手法は培地交換を行うことが不可能であったり、形成されるスフェロイドの大きさが不均一であったりと、いくつかの課題点がある。本研究では、スフェロイド形成の培養用容器である EZSPHERE[®]を用いた。EZSPHERE[®]の底面は凹凸があり、直径 35-mm の dish に 2,300 個程度の微細孔が存在する(Fig. 1-11)。EZSPHERE[®]に細胞を播種すると、細胞が微細孔の底に沈むことで塊となり、スフェロイドが形成される。Fig. 1-12 は EZSPHERE[®]を用いてがん細胞スフェロイドを作成した様子である。それぞれの穴に1つずつのスフェロイドが形成されていることが確認できる。EZSPHERE[®]は他の3次元培養法と比べて、4つの長所がある。1つ目に、スフェロイドの大きさが均一である。従って、細胞の播種数を変えることによって、複数の大きさのスフェロイドを形成することができる。2つ目に球状ではなく平たいスフェロイドを構築できる。通常スフェロイド内の細胞は培地より 100 μm 以上離れると、十分な酸素・栄養を獲得することができなくなり、細

胞死が誘導されることが知られている。そのため、大きな球状のスフェロイドの断面はドーナツ型となり、中心部は空洞となる[80]。EZSPHERE®を用いて作成したスフェロイドは平たく厚みが100 μm以下であるため、低酸素・低栄養の影響を最小化することが可能である(Fig. 2-2)。3つ目に、短期間でスフェロイドを形成することが可能である。最も有名な3次元培養法であるマトリゲル培養法は、スフェロイドを形成するまでに2週間以上を要するが、EZSPHERE®はわずか4日間の培養でスフェロイドを形成することができる。4つ目に、全量の培地交換を行うことが可能である。前に挙げた3手法はどれも全量の培地交換を行うことができなく、染色後の洗浄を行うことが困難である。そのため、EZSPHERE®を用いて形成したスフェロイドは共焦点レーザー顕微鏡を用いた生細胞観察に適している。



2,300個のmicrowell / 35-mm dish

Fig. 1-11 EZSPHERE®の模式図

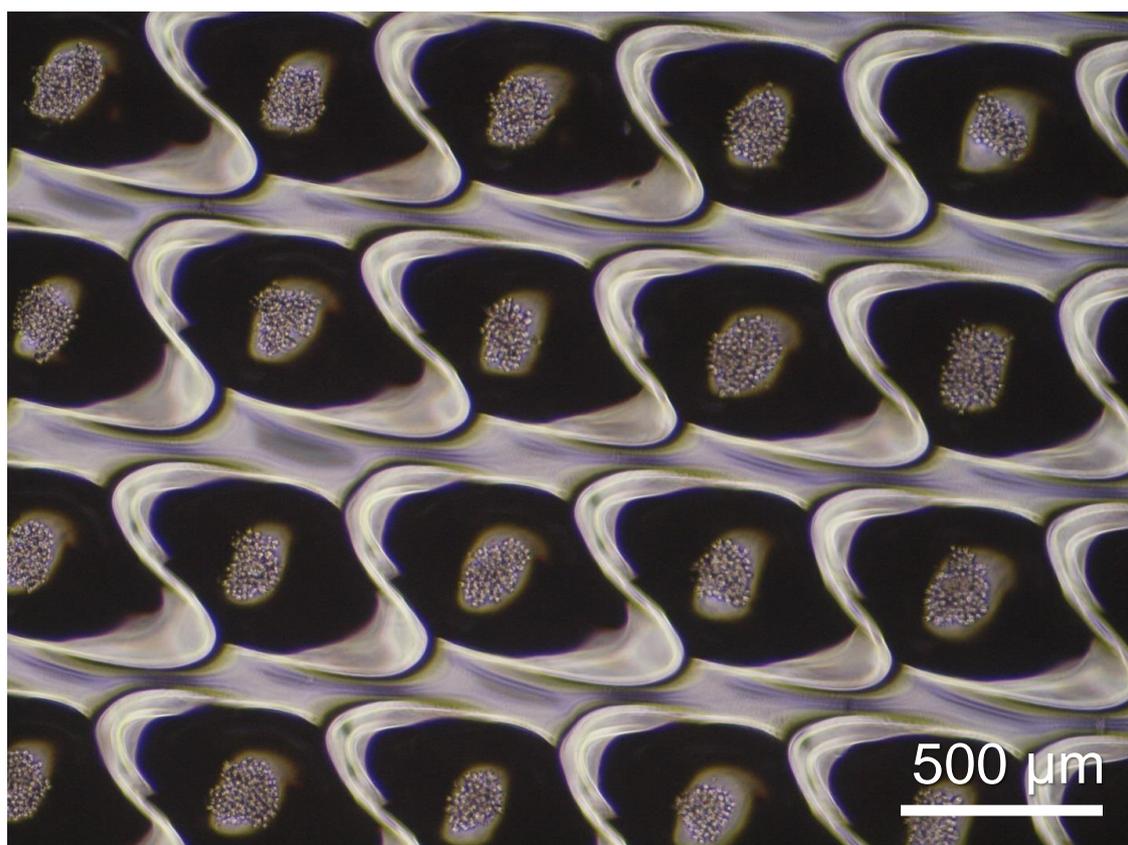


Fig. 1-12 EZSPHERE®におけるスフェロイドの形成

1-7 細胞周期とがんの増殖

正常細胞と比較したとき、がん細胞ではいくつかのきわめて特徴的な機能変化が起こっている。それらの中でも古くから研究されている細胞周期と増殖能の変化について述べる。

細胞周期は細胞が計画的に分裂・増殖を行うための仕組みである。真核生物の細胞周期は基本的に4つの期 (phase) からなり、それぞれ G_1 期・S 期・ G_2 期・M 期と呼称される (Fig. 1-13)。 G_1 期は DNA 複製のための準備期間であり、細胞小器官や DNA の複製に必要なタンパク質が合成され、また細胞の肥大化が起こる。 G_1 期と S 期の間には G_1/S チェックポイントがあり、DNA 複製の準備ができていないか、主に DNA が損傷していないかが判定され、これをクリアすると S 期へ移行できる[81-83]。S 期では DNA の複製が行われる。DNA の複製段階では DNA の損傷が起こりやすいため、S 期の終わりにその修復が行われる[83]。 G_2 期は有糸分裂を行うための準備期間であり、そのために必要なタンパク質が合成される。 G_2 期と M 期の間には G_2/M チェックポイントがあり、有糸分裂の準備ができていると判断されれば M 期へ移行する[81,83]。M 期では有糸分裂と細胞分裂が行われる。1 対の DNA が細胞の両極に分配され、つづいて細胞が分裂する。細胞はこの4期を何度も繰り返すことで増殖していく。細胞周期1周にかかる時間は生物種によっても異なる上に、個体中の組織によっても異なる。ただ、一般的にヒトの体細胞は24時間で細胞周期を1周し、1回の分裂を行う。また、細胞周期の”停止期”と呼ばれる G_0 期は細胞周期が止まっている段階である。 G_1 期の細胞が増殖しないという選択をしたとき、細胞は G_0 期に入る。 G_0 期の細胞は周囲からの刺激等により増殖が促されたとき、 G_1 期にもどる。

正常細胞では細胞周期が厳密に制御されており、適切なときに適切な速さで細胞増殖が起こる。一方で、がん細胞ではチェックポイントが働かなくなっていることが多く[82-84]、細胞が無尽蔵に増殖する。このような無限増殖能は、がんの主要な特徴のひとつである。それゆえに、多くの抗がん剤は増殖を強制的に停止させることによってがんを細胞死へと追い込むように設計されている。

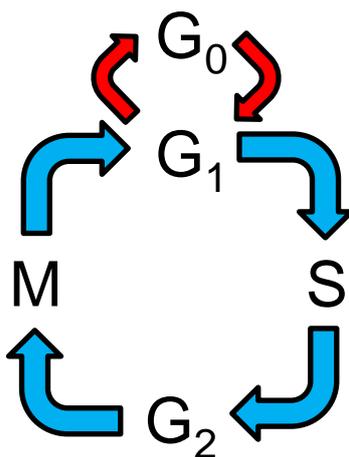


Fig. 1-13 細胞周期

分裂している細胞は青矢印の4状態を遷移し続けている。G₀期は休止期であり、分裂をしていない細胞がG₀期にとどまり続ける。

1-8 本研究の目的

上述のように、PDT はがんの三大療法として確立している外科手術、化学療法、放射線療法に比べて、侵襲性が低く患部の正常な機能を温存する。そのため、患者の身体的負担が軽く、QOL を維持する上で PDT は有用な代替療法である。近年、新しい PDT 薬として着目されているアミノレブリン酸(ALA)は、腫瘍におけるポルフィリン蓄積の特異性が高く光過敏症状の副作用も起こさないため、臨床応用が普及しつつある。ALA によって誘導される腫瘍特異的な PpIX 蓄積を用いたがん診断(ALA-PDD)やがん治療(ALA-PDT)は画期的であり、医療現場においても注目されている。その一方で、生体の腫瘍における PpIX の蓄積メカニズムに関しては未だ明らかになっていない事象も多い。がん細胞を用いた *in vitro* 実験系として平面の2次元培養が一般的に用いられているが、2次元培養したがん細胞と生体の腫瘍では形質面において多くの乖離が認められている。腫瘍深部は腫瘍表面と比較して細胞密度が高いため、一部の細胞が休眠状態にあることが予想される。また、照射光の減衰が生じるが、一般的な *in vitro* の2次元培養ではそれらを含めて評価することが難しい。本研究では、特に下記の2点に着目して、2次元培養ならびに3次元培養を用いて新規の評価系を構築し、ALA-PDT の評価を行った。

1点目は、腫瘍深部に存在すると示唆されている休眠がん細胞に対する ALA-PDT の評価である。がん患者は適切な治療を受けたにも関わらず、数十年後にがんを再発することがあり、その一因として休眠がん細胞の存在が報告されている。生体の腫瘍と比較して、通常の2次元培養のがん細胞の増殖速度は極めて速いが、その理由として2次元培養では休眠がん細胞がほとんど存在しないことが挙げられている[85]。しかし、休眠がん細胞は、*in vitro* 実験系において作成することが容易ではなく、ポルフィリン代謝や ALA-PDT による殺細胞効果に関する報告がほとんどない。近年では、3次元培養したがん細胞スフェロイドを含む高密度培養環境下において細胞増殖が抑制されるという報告があり、高密度培養を休眠がん細胞のモデルとして利用できる可能性が示唆されている[76,78,79]。このことから、本研究の第2章および第3章では3次元培養を含む高密度培養によって休眠がん細胞

胞のモデルを構築し、ALA-PDT の評価を行うことを目的とした。

2点目は、ALA 投与後の低用量の光照射環境下における細胞の遺伝子解析および増殖増殖評価である。腫瘍内では照射光が距離に応じて減衰するため、腫瘍深部では腫瘍表面と比較して低用量の光照射環境になることが想定される。しかしながら、低用量の光照射ががん細胞に及ぼす影響を調査した報告はほとんどなく、腫瘍深部における照射光減衰の影響は未解明のままであった。本研究の第4章および第5章では2次元培養に対して、低用量の光照射モデルを構築し、ALA 投与後の低用量の光照射が細胞の遺伝子発現ならびに増殖速度に及ぼす影響を評価することを目的とした。

以上のことにより、ALA-PDT を実臨床で使用する際に課題となる2項目である休眠がん細胞への影響ならびに照射光の減衰に対する基礎的な知見の獲得を本研究の目的とした。

第2章

3次元培養スフェロイドおよび 高密度2次元培養におけるがんの休眠性

2-1 緒言

2-2 実験方法

2-3 結果と考察

2-3-1 がん細胞スフェロイドの形成

2-3-2 休眠性の評価

2-3-3 休眠がん細胞における抗がん剤の細胞毒性評価

2-4 結言

2-1 諸言

がん再発の一因として、化学療法や放射線療法に抵抗性をもったがん細胞が再び成長することが挙げられる。休眠がん細胞は、このような抵抗性のあるがん細胞の一種であり、がん再発と強い関係があると報告されている[67,70,72]。がん細胞が休眠状態に移行するメカニズムは未解明のままであるが、休眠がん細胞の特徴は明らかになりつつある。休眠がん細胞はNo proliferation, No death, Metabolic suppression, Recovery to active statusの4つで定義される(Table. 1-1)[74,86]。一方で、*in vitro*において休眠がん細胞を作成することが難しく、モデルの開発が望まれている。

3次元培養法は2次元培養法と比べて細胞密度が高い培養法である。そのため、*in vitro*でありながら、*in vivo*の特徴である微小環境を構築することができる[72,87]。3次元培養法では細胞増殖が抑制されるため、休眠がん細胞の特徴の1つであるNo proliferationを満たすことが報告されている[72,88]。しかし、これらの報告は細胞の形質変化の原因や他の3つの特徴に関しては言及していない。

本章では、形質変化の原因が細胞密度であると仮定し、細胞密度と休眠性の相関を検証した。細胞密度を2次元培養法において5段階、3次元培養法において3段階を構築し、上記の4つの定義への適合を詳細に検証した。さらには、休眠がん細胞における一般的な抗がん剤の細胞毒性評価を行った。

2-2 実験方法

試薬

RPMI-1640 培地、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (ABAM)、Protease inhibitor cocktail は Nacalai Tesque (京都)から購入した。ウシ胎児血清(FBS)は Invitrogen (Carlsbad, CA)から購入した。その他、すべての試薬は分析グレードのものを使用した。

細胞培養

ヒト前立腺がん由来細胞株である PC-3 細胞は井上啓史博士(高知大学、高知)から供与された。細胞は 10%の非働化 FBS、ABAM を添加した RPMI-1640 培地で 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。

3次元培養系および2次元培養系の構築

3次元培養には、スフェロイド形成の培養用容器である EZSPHERE[®] (AGC Techno Glass Co., Ltd., 東京)を用いた。EZSPHERE[®]は 6-well plate の標準規格品である Cat. 4810-900 (マイクロウェルサイズ: 口径 400-500 μm、深さ 100-200 μm)を使用した。培地は各 well に 3 ml ずつ添加した。細胞は、S500 スフェロイドに対して 5.00×10^5 個、S250 スフェロイドに対して 2.50×10^5 個、S125 スフェロイドに対して 1.25×10^5 個をそれぞれに播種した。インキュベーター内で 2 日間静置して培養したあとに、1 ml の培地交換を行った。さらに 2 日間の培養を行うことで、各 well に 2,300 個のスフェロイドを形成させた。本実験で用いたスフェロイドの培養期間は全て 4 日間である。

2次元培養には、EZSPHERE[®]と well の直径が同一であり、底面が平面な 6-well plate もしくは 35-mm dish を用いた。培地は各 well に 3 ml ずつ添加した。細胞数は最も少ない条件から順に、 0.1×10^5 個、 0.2×10^5 個、 0.4×10^5 個、 0.8×10^5 個、 1.6×10^5 個ずつ播種した。3次元培養と同様に、播種 2 日後に 1 ml の培地交換を行い、培養期間は 4 日間で統一した。

Western blotting を用いたタンパク質の発現解析

タンパク質発現解析のために、所定の処理を行った各細胞から細胞溶解液を以下の手順で調製した[89]。細胞を PBS (-) で洗浄後、Lysis buffer A (+) [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM N-methylmaleimide, 1 mM DTT, 1% (v / v), 1% (v / v) Triton X-100, and Protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, 京都)] で処理した。サンプルは 27G の注射針を用いて 10 回、ホモジナイズを行った。1,000 × g、4°C、10 分間遠心分離を行って得られた上清を細胞溶解液として回収し、以後の実験に使用した。

サンプルは SDS-PAGE サンプルバッファーで処理した。その後、サンプル中のタンパク質溶液は 7.5% もしくは 15% のポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE によって分離した。分離したタンパク質は Immobilon-P PVDF membrane (Millipore Corp., MA) に転写後、5% (w / v) スキムミルクを溶解した TTBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% (v / v) Tween 20] で、1 時間以上室温でブロッキングした。1 次抗体には、抗ヒト Ki-67 抗体 (ab15580, 1:1000 dilution; Abcam, Cambridge, Great Britain)、抗ヒト p21 抗体 (sc-397, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, United States)、抗ヒト Actin 抗体 (691001, 1:500 dilution, MP Biomedicals, Santa Ana, United States) をそれぞれ使用した。2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合した抗マウス IgG 抗体および抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を 3,000 倍希釈で使用した。HRP の基質である Western Lightning Chemiluminescent Reagent Plus (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) もしくは Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (TaKaRa Bio, 滋賀) を用いて化学発光によってタンパク質を検出した。発光は Lumino Imaging Analyzer LAS-4000 mini (GE Healthcare UK, Amersham Place, England) で検出した。

トリパンブルー染色による細胞生存率測定

トリパンブルー (Nacalai Tesque, 京都) を PBS (-) で 0.5% (w / v) 溶解させてトリパンブルー水溶液を作成した。細胞は培養上清を含め回収し、トリパンブルー水溶液に 1 : 1 の

割合で懸濁した。血球計算盤に滴下して、顕微鏡において染色されずに白く見える細胞を生細胞、青く染色された細胞を死細胞とした (Fig. 2-1)。

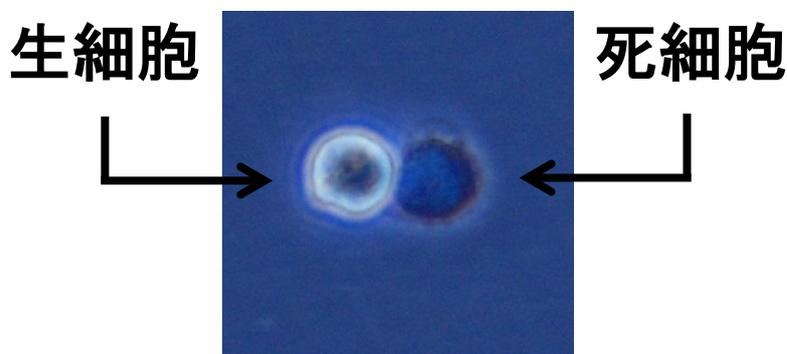


Fig. 2-1 トリパンプルー染色による細胞の生死判定

RT-PCR による mRNA の発現解析

培養細胞からの Total RNA 抽出には NucleoSpin® RNA II (MACHERY-NAGEL, Düren, Mannheim, Germany) を使用した。抽出した Total RNA を鋳型に、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio, 滋賀) を使用して、1 μ g の完全長 1 本鎖 cDNA を逆転写反応によって合成した。ヒト VEGF およびヒト ACTB に対して特異的なプライマー配列を添加し、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® mini (TaKaRa Bio, 滋賀) で 35 サイクルの PCR 反応を行った。反応後のサンプルは、5% (w/v) アガロース含有ゲルで電気泳動を行い、0.003% (v/v) 臭化エチジウムブロマイド水溶液で DNA を染色した。染色後のゲルは、FAS III (TOYOBO, 大阪) で UV 照射下において撮影を行った。

核染色によるスフェロイドの 3 次元構造解析

EZSPHERE® で形成したスフェロイドの 3 次元構造を調査するために、Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, St. Louis, United States) による核染色を行った。培養 4 日後のスフェロイド

に、1 μM の Hoechst 含有培地を加えて、20 分間インキュベーター内で培養した[90]。培養後に PBS (-) で 3 回 wash を行い、HBSS (+) を 3 ml 添加して、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。正立共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss SAS, Jena, Germany) を用い、倍率 40 倍の水浸レンズ、励起波長 405 nm、検出波長 440-500 nm、レーザー強度 2.0%、ピンホールサイズ 1AU の条件で、Z 軸に対して 2 μm おきに断面を取得した。取得した画像は LSM780 に付属している解析ソフト ZEN を用いて解析を行った。

2-NBDG による糖代謝の解析

2-NBDG は Funakoshi Co., Ltd. (東京) より購入した。FBS およびグルコース含有の培地で 3 日間培養した細胞の上清を取り除き、FBS およびグルコース非含有の培地で 24 時間さらに培養した。その後、100 μM の 2-NBDG を添加し、インキュベーター内で 25 分培養した。培養後に PBS (-) で 3 回 wash を行い、HBSS (+) を 3 ml 添加して、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。正立共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss SAS, Jena, Germany) を用い、倍率 40 倍の水浸レンズ、励起波長 458 nm、検出波長 500-600 nm、レーザー強度 2.0%、ピンホールサイズ 1AU の条件で断面を取得した。取得した画像は LSM780 に付属している解析ソフト ZEN を用いて解析を行った。

ブロモデオキシウリジン (BrdU) 免疫染色による細胞増殖評価

BrdU 陽性率を測定するために、5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche Ltd., Mannheim, Germany) を用いた。実験は添付されたマニュアルに沿って実行した。免疫染色後のサンプルは、正立共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss SAS, Jena, Germany) を用いて陽性もしくは陰性の解析を行った。倍率 20 倍の対物レンズ、励起波長 488 nm、検出波長 493-630 nm、レーザー強度 2.0%、ピンホールサイズ 1AU の条件で断面を取得した。取得した画像は LSM780 に付属している解析ソフト ZEN を用いて解析を行った。

スフェロイドの再増殖評価

4.2×10^3 cells / cm²で4日間培養した2次元培養および4日間培養したS500スフェロイドを用いた。4日間培養後の細胞数はほぼ同じであった。それらを改めて 4.2×10^3 cells / cm²で2次元培養した。その後、11日間にわたって生細胞数をトリパンブルー染色によって測定した。

シスプラチン(CDDP)および5-フルオロウラシル(5-FU)の細胞毒性評価

CDDPはTokyo Chemical Industry Co., Ltd. (東京)より、5-FUはNacalai Tesque (京都)よりそれぞれ購入した。 3.6×10^3 cells / cm²、 7.1×10^3 cells / cm²、 14×10^3 cells / cm²の細胞密度にそれぞれ薬剤を添加し、72時間培養した。その後、下記のMTT法にて細胞生存率を測定した。MTT試薬 (5 mg / ml)を培養液に添加後、4時間培養した。その後、培養液と同量の10% (w / v) SDSを加え一晩培養した。MTT代謝物であるホルマザンは測定波長570 nm、基準波長655 nmにおける吸光度をMultiskan FC吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA)により測定した。薬剤非添加群の吸光度を分母に、薬剤添加群の吸光度を分子として計算し、100分率で表したものを細胞生存率[%]と定義した。

2-3 結果と考察

2-3-1 がん細胞スフェロイドの形成

がん細胞の3次元培養体であるがん細胞スフェロイドを形成するために、スフェロイド形成の培養用容器であるEZSPHERE[®]を用いた。5.0 × 10⁵個のPC-3細胞を35mmのEZSPHERE[®]に播種し、4日間培養することによってがん細胞スフェロイドを形成した。1つの培養皿に2,300個のスフェロイドが形成され、それらの平均直径は、189 ± 30.1 μmであった(Fig. 2-2(a))。細胞の播種数を減らすことで、培養4日後にEZSPHERE[®]とほぼ同じ細胞数が存在するように調整した2次元培養体と比較すると、スフェロイドの細胞密度の高さが際立った(Fig. 2-2(a))。さらに、スフェロイドの全体像を得るためにHoechstを用いて核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にてZ軸断面を取得した。形成されたスフェロイドはXY断面においては円状、XZ断面もしくはYZ断面においては緩やかな三日月状であった(Fig. 2-2(b))。このことから、スフェロイドの全体像はお椀型であると示唆された。また、スフェロイドのZ軸方向における最大の厚みはおよそ80 μmであることが分かった。一般的に、スフェロイドは直径が200 μmを超えると中心が低酸素領域になると報告されている[79]。しかし、本実験で形成したスフェロイドは中心部または底面においても十分な酸素を獲得できることが示唆された。同様に、EZSPHERE[®]に播種する細胞数を減らすことにより、最も大きいスフェロイドであるS500に加えてS250、S125の合計3段階の大きさのスフェロイドを形成した(Fig. 2-2(c))。スフェロイドにおける細胞密度は大きさ依存적であると考えられるため、S500が最も高く、S125が最も低いと予想される。なお、EZSPHERE[®]は専ら正常な幹細胞の研究に使用されており、本研究はがん細胞スフェロイドの形成に用いた初めての報告である[89,91,92]。

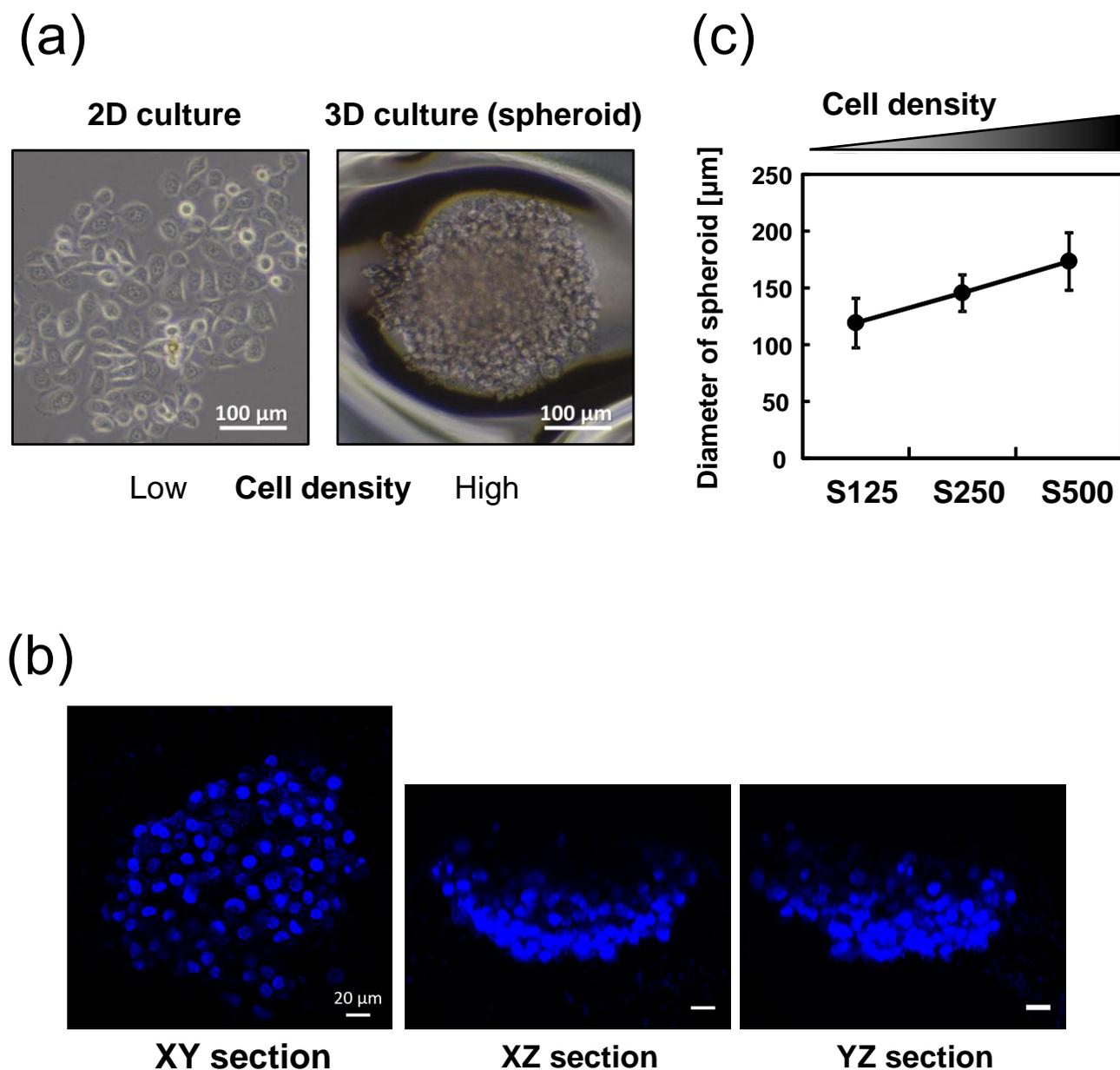


Fig. 2-2 EZSPHERE®におけるPC-3 がん細胞スフェロイドの形成

スフェロイドに関してはPC-3 細胞をEZSPHERE®で培養した。2次元培養に関しては 4.2×10^3 cells / cm²で播種した。どちらも4日間培養した。

(a) 2次元培養およびS500スフェロイドの位相差顕微鏡写真

(2次元培養： 4.2×10^3 cells / cm², 3次元培養：S500. Scale bar, 100 μm.)

(b) S500スフェロイドの核染色下における共焦点レーザー顕微鏡写真

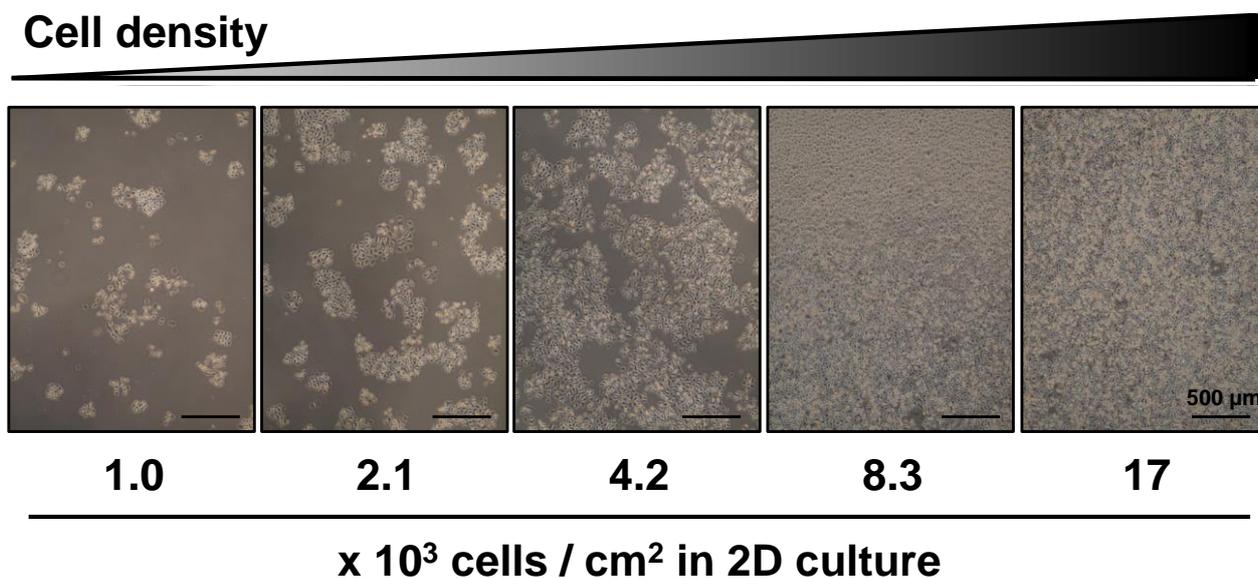
(Hoechst 33342, 1 μM. Scale bar, 20 μm.)

(c) 形成したスフェロイドの直径

(S125: 1.25×10^5 , S250: 2.50×10^5 , S500: 5.00×10^5 cells / 35-mm dish. n > 40.)

続いて、2次元培養においても異なる細胞密度環境を構築するために、様々な細胞播種数の下で細胞を培養した。なお、細胞の培養期間はスフェロイドと同じである4日間に統一し、培養容器はEZSPHERE®と同じ大きさである35-mmの平面皿を用いた。培養4日後に位相差顕微鏡にて細胞密度を確認したところ、播種数依存的に細胞密度が高くなった(Fig. 2-3(a))。Bradford法によるタンパク質定量の結果からも、このことが確かめられた(Fig. 2-3(b))。最も大きいスフェロイドであるS500よりも高密度な2次元培養を行った方が、タンパク質量の増加が認められた。このことから、EZSPHERE®に存在する細胞数は2次元培養と比較して顕著に多くないことが示唆された。従って、細胞数が多すぎることによって培地が劣化し、そのために細胞の形質変化が生じる可能性は低い。

(a)



(b)

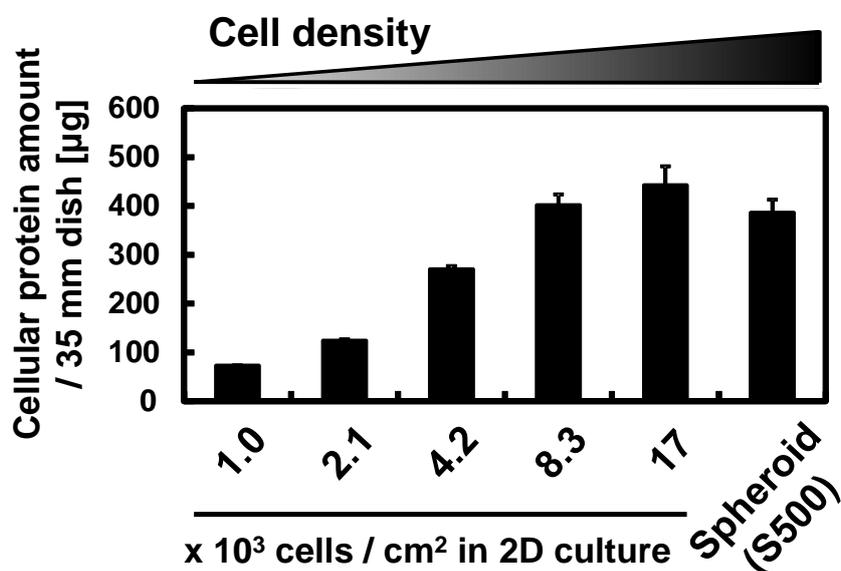


Fig. 2-3 2次元培養における異なる細胞密度環境の構築

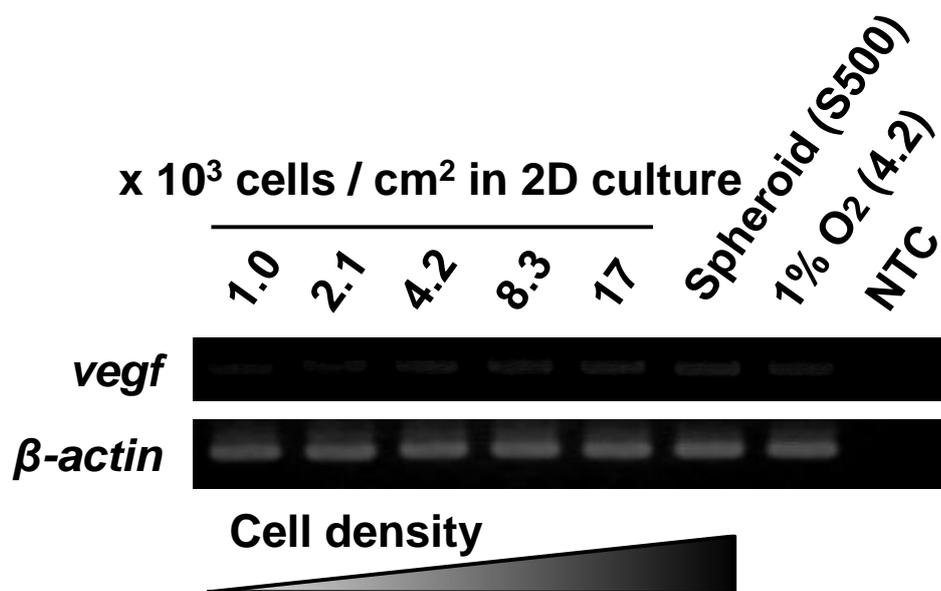
それぞれの播種数においては4日間培養後、0.1 MのNaOH水溶液を用いて細胞を溶解して細胞内のタンパク質を回収した。

(a) 位相差顕微鏡写真 (Scale bar, 500 μm .)

(b) タンパク質定量 (Bradford法, $n = 3$.)

EZSPHERE®を用いて形成したがん細胞スフェロイドと他の手法で形成したスフェロイドの形質の共通性を検証するために、*vegf*の発現を mRNA レベルで検証した。*vegf*は血管新生を誘導する遺伝子であり、スフェロイドでは亢進することが報告されている[72]。*vegf*の発現は細胞密度依存的に亢進し、S500 スフェロイドにおいて最大となった(Fig. 2-4(a))。このことから、EZSPHERE®を用いて形成したスフェロイドは他の報告と同じ形質を示すことが示唆された。さらに、低酸素環境下で誘導される転写因子である HIF-1 α および HIF-2 α (HIF: Hypoxia Inducible Factor)の発現をタンパク質レベルで解析したところ、S500 スフェロイドではどちらの発現も認められなかった(Fig. 2-4(b))。このことから、スフェロイド内に低酸素応答をする細胞がほとんど存在しないことが改めて確かめられた。

(a)



(b)

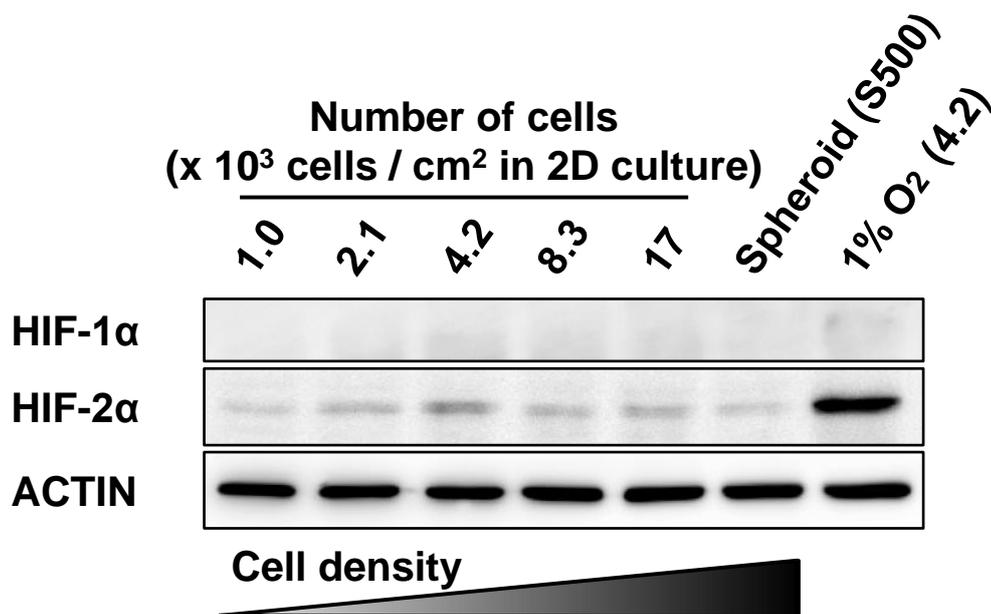


Fig. 2-4 スフェロイドにおける *vegf* および HIF の発現解析

それぞれの播種数で4日間培養した後、mRNAを回収した。低酸素条件のものは、1% O₂で24時間培養した。

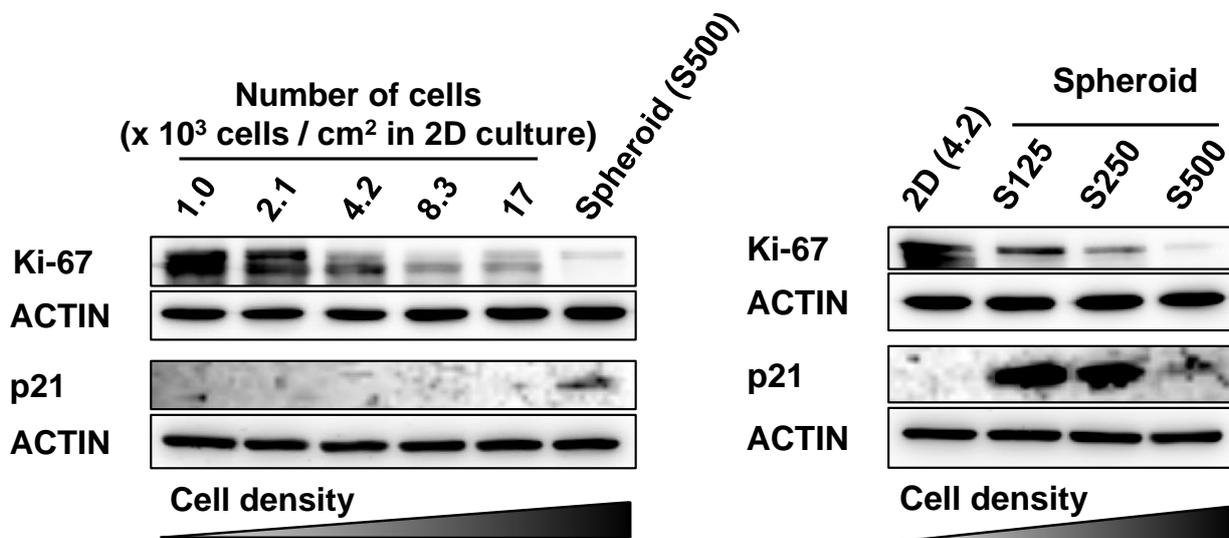
(a) *vegf* の mRNA 発現解析 (RT-PCR)

(b) HIF のタンパク質発現解析 (Western blotting)

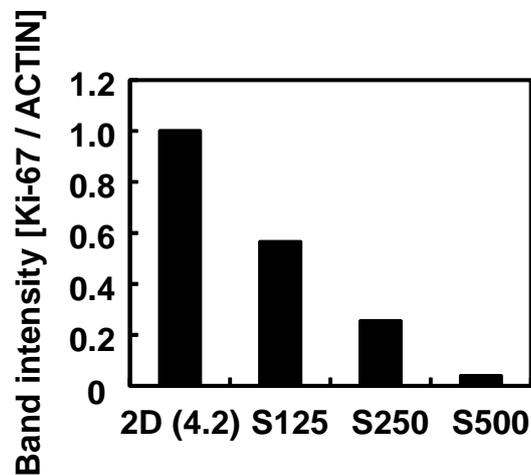
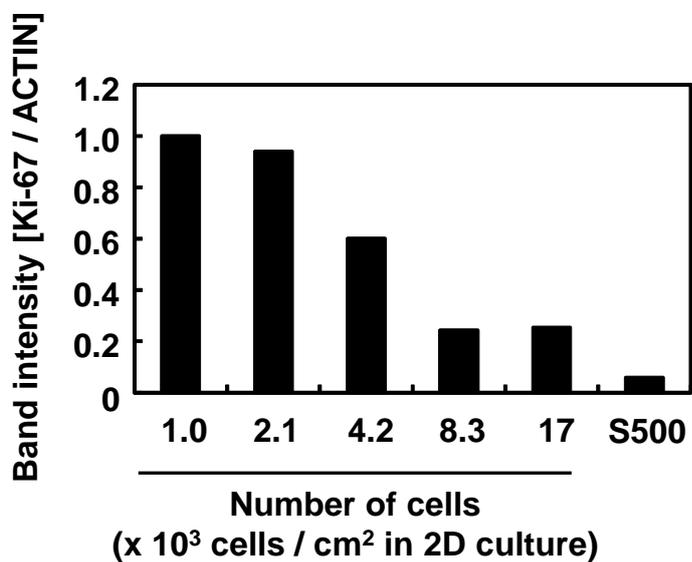
2-3-2 休眠性の評価

休眠がん細胞の特徴である No proliferation, No death, Metabolic suppression, Recovery to active status の4項目をそれぞれ検証した。1つ目の特徴である No proliferation を調査するために、Ki-67 および p21 の遺伝子発現解析とブロモデオキシウリジン(BrdU)染色を行った。Ki-67 は G0 期以外で発現するタンパク質であり、この性質を利用して細胞増殖マーカーとして用いられている[93]。p21 は Rb のリン酸化を阻害することにより、細胞周期が G1 期から S 期へ移行することを抑制するタンパク質である[94]。BrdU はチミジンのアナログであり、S 期において新たに合成された DNA に組み込まれる。このことから、BrdU の陽性率は細胞増殖の活発度合を示す指標として用いられている。2次元培養およびスフェロイドにおいて Ki-67 の発現は、細胞密度依存的に低下した(Fig. 2-5(a)(b))。一方で、p21 の発現はスフェロイドにおいてのみ認められ、2次元培養においては認められなかった(Fig. 2-5(a))。さらに、BrdU の陽性率は2次元培養において細胞密度依存的に低下した(Fig. 2-5(c)(d))。以上のことから、3次元培養したスフェロイドおよび高密度な2次元培養において、細胞増殖が抑制されることが示唆された。つまり、休眠がん細胞の特徴である No proliferation を満たしたと言える。

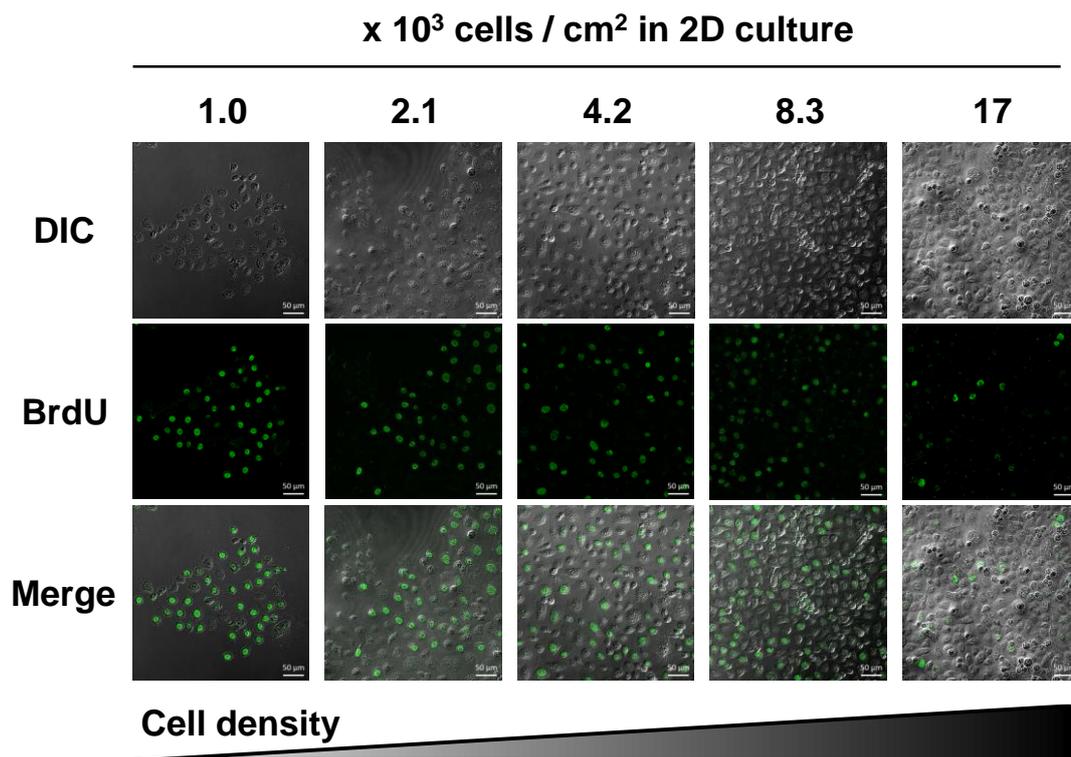
(a)



(b)



(c)



(d)

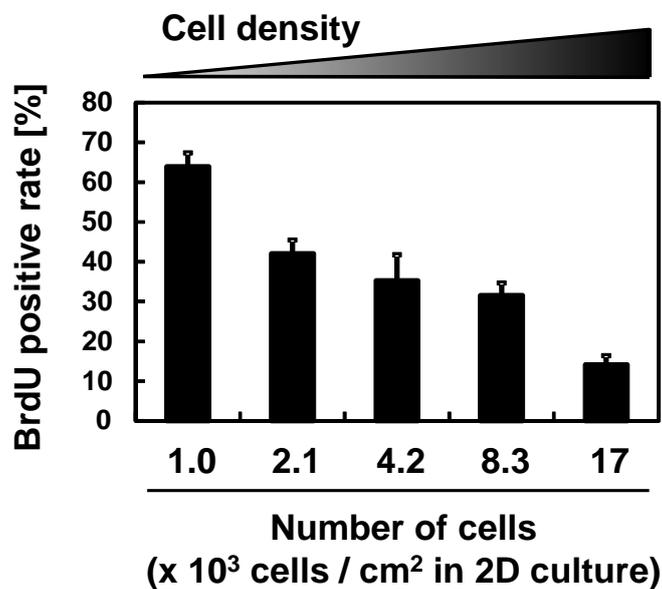


Fig. 2-5 スフェロイドおよび高密度な2次元培養における細胞増殖の評価

それぞれの播種数で4日間培養した後、測定した。

(a) Ki-67 および p21 のタンパク質発現解析 (Western blotting)

(b) Ki-67 および p21 のバンド強度

(c) 異なる細胞密度下における BrdU 免疫染色 (Scale bar, 50 μm.)

(d) 異なる細胞密度下における BrdU 陽生率 (n = 3. Over 400 cells were counted.)

続いて、休眠がん細胞の2つ目の特徴である No death を調査した。細胞の生存率を測定するために、トリパンプルー染色を用いた。トリパンプルーは、死細胞のみを青く染色する試薬である。このことから、顕微鏡観察において生細胞は染色されないため白く、死細胞は青く観測される。異なる大きさのスフェロイドである S125, S250, S500 をそれぞれ形成し、ピペッティングによってスフェロイドを分解後にトリパンプルー染色を行った。その結果、全てのスフェロイドにおいて2次元培養と比較して顕著な細胞死は認められなかった (Fig. 2-6)。このことから、スフェロイドにおいて細胞死はほとんど生じておらず、休眠がん細胞の特徴である No death を満たすことが示唆された。

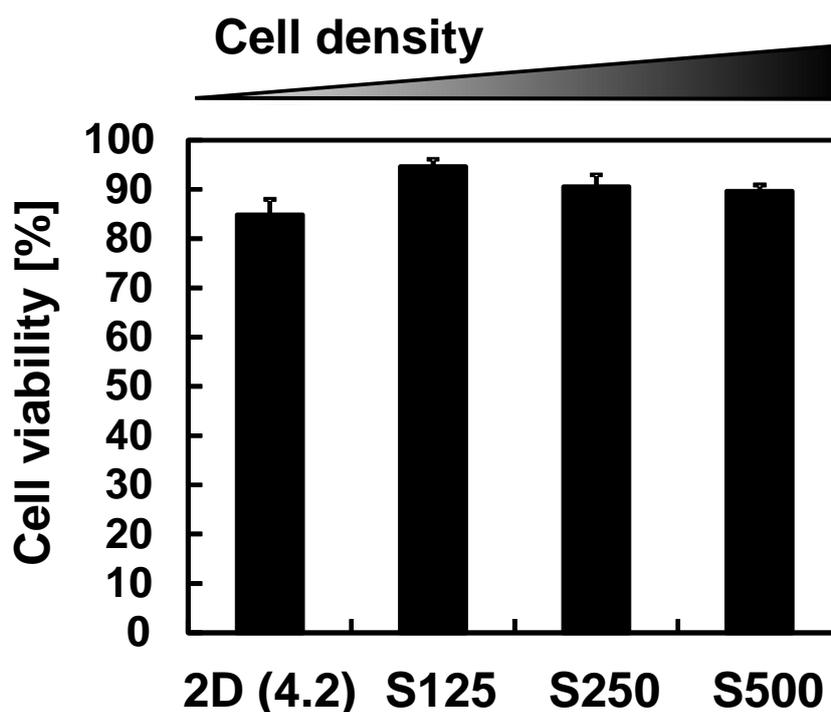
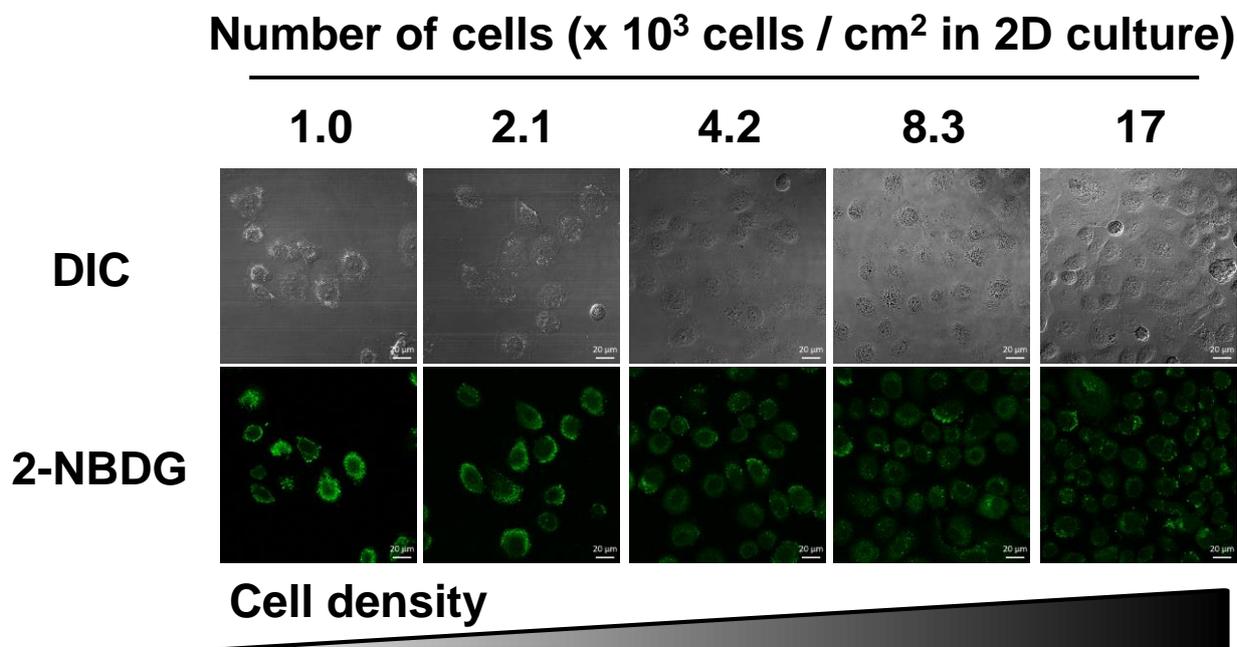


Fig. 2-6 スフェロイドにおける細胞生存率 (トリパンプルー染色)

それぞれの播種数で4日間培養した。2次元培養はトリプシンを用いて細胞を回収し、スフェロイドはピペッティングによって細胞を回収した。(n = 3.)

引き続き、休眠がん細胞の3つ目の特徴である **Metabolic suppression** を調査した。代謝の抑制を測定するために、2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG)の細胞内取り込み量を評価した。2-NBDGはグルコースに蛍光分子が結合した試薬であり、グルコースと同様の機構で細胞内に取り込まれる。そのため、2-NBDGの細胞内取り込み量は糖代謝の活発度や細胞の生死判定に用いられる。2次元培養およびスフェロイドにおいて2-NBDGの取り込み量を共焦点レーザー顕微鏡で測定した。その結果、どちらにおいても細胞密度依存的に取り込み量が減少した (Fig. 2-7)。また、特にスフェロイドにおいては顕著に取り込みが抑制されていた。このことは、細胞密度依存的に糖代謝が抑制された結果であると考えられる。さらに、3次元培養スフェロイドおよび高密度な2次元培養は、休眠がん細胞の特徴である **Metabolic suppression** を満たすことが示唆された。

(a)



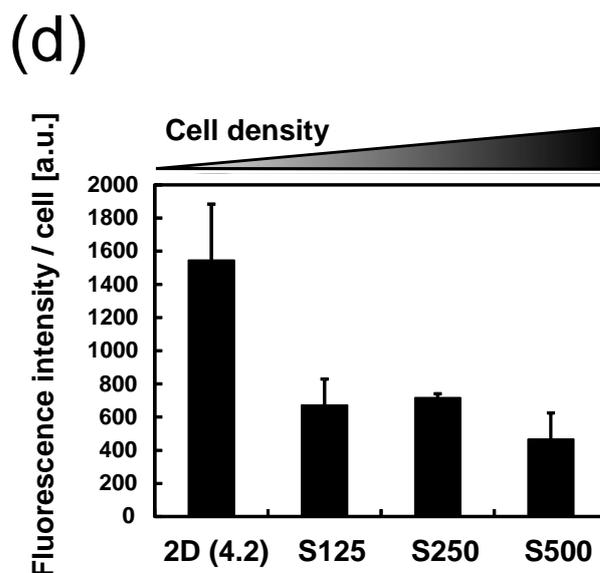
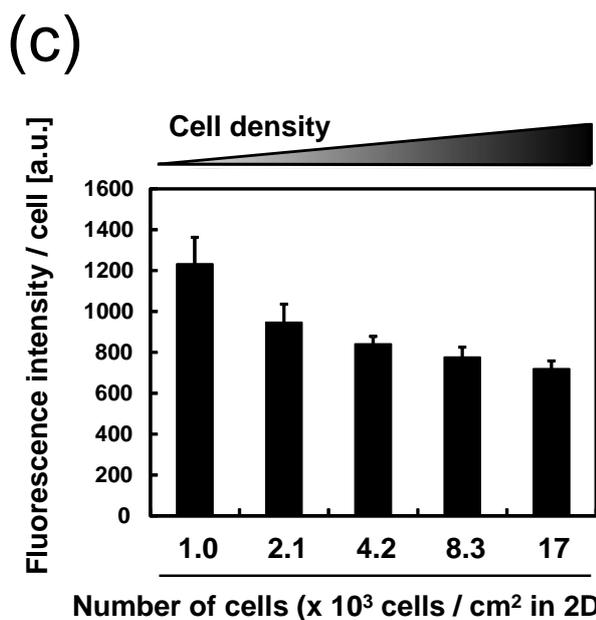
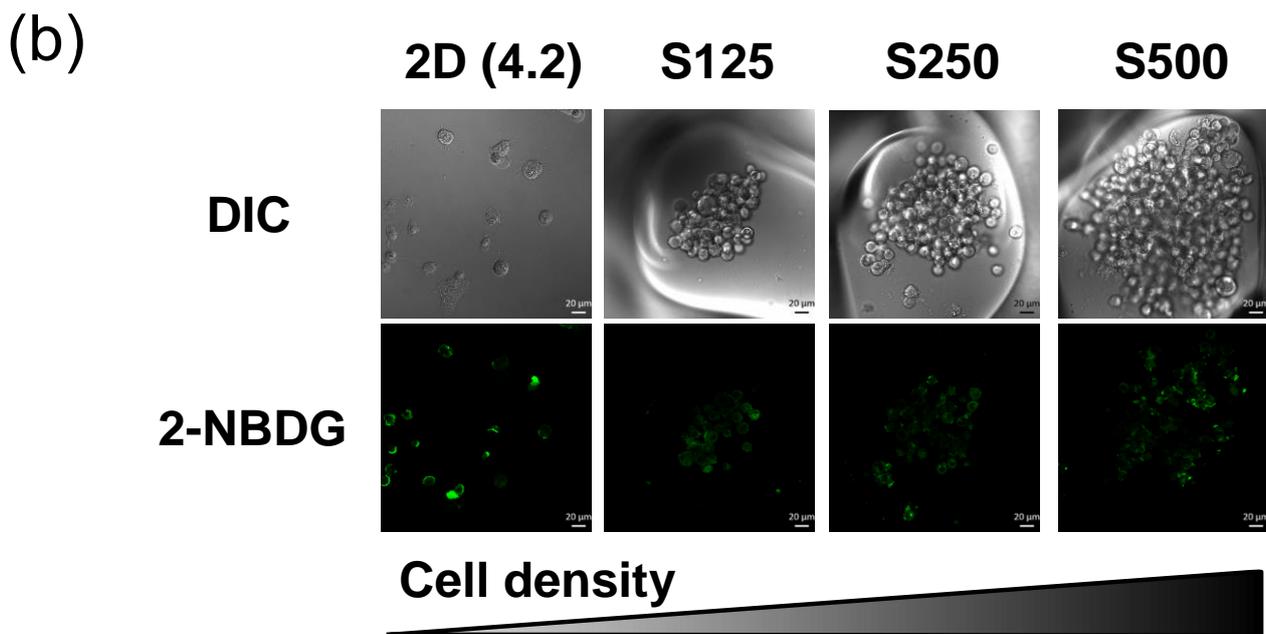


Fig. 2-7 スフェロイドおよび高密度な2次元培養における2-NBDG取り込み評価

FBS およびグルコース非含有の培地で24時間培養後に、100 μM の2-NBDGを添加し、25分培養した。共焦点レーザー顕微鏡を用いて測定した。(Scale bar, 20 μm .)

- (a) 2次元培養における2-NBDGの取り込み
- (b) スフェロイドにおける2-NBDGの取り込み
- (c) 2次元培養における2-NBDGの輝度解析 ($n = 3$.)
- (d) スフェロイドにおける2-NBDGの輝度解析 ($n = 3$.)

最後に、休眠がん細胞の4つ目の特徴である **Recovery to active status** を調査した。再活性化を測定するために、最も大きいスフェロイドである S500 をピペッティングによって分解し、2次元培養下における再増殖を評価した。S500 形成後に2次元培養された細胞は、2次元培養された細胞よりも増殖が少し遅れたものの、最終的には同程度の細胞数まで増殖した (Fig. 2-8)。また、細胞増殖の最高速度を示すグラフの傾きは、2次元培養と3次元培養とでは大きな差がなかった。このことは、細胞増殖が抑制された状態から活発に細胞増殖を行う状態に変化したことを示す。つまり、休眠がん細胞の特徴である **Recovery to active status** を満たすことが示唆された。以上の4項目の検証から、高密度な培養環境においてがん細胞が休眠状態に移行することが示された。このため以降の実験では、スフェロイドを含む高密度培養を休眠がん細胞のモデルとして使用した。

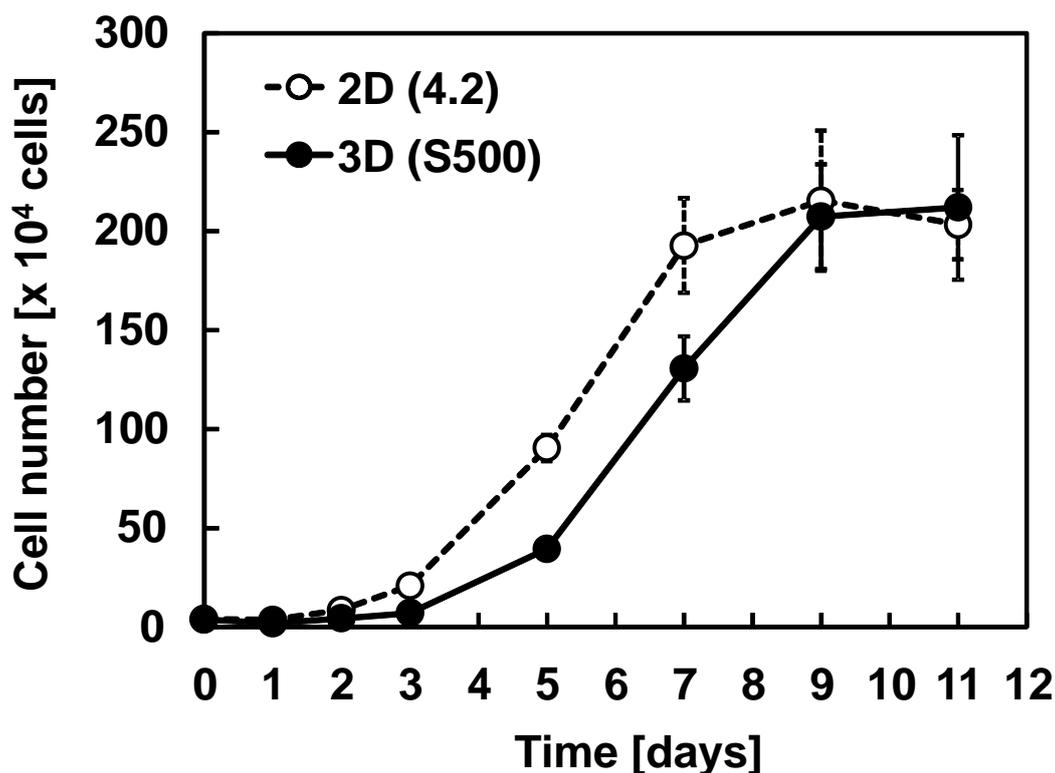


Fig. 2-8 S500 スフェロイドの再増殖評価 (セルカウント)

4.2×10^3 cells / cm² で培養した 2 次元培養および S500 スフェロイドを用いた。4 日間培養後の細胞数がほぼ同じであることを確認し、 4.2×10^3 cells / cm² で 2 次元培養した。その後、11 日間にわたって細胞数をトリパンブルー染色によって測定した。(n = 3.)

2-3-3 休眠がん細胞における抗がん剤の細胞毒性評価

休眠がん細胞に対する一般的な抗がん剤(DNA合成を阻害する薬剤)の効能を調査するために、シスプラチン(CDDP)および5-フルオロウラシル(5-FU)を用いた。CDDPは2本鎖DNAのグアニン同士を架橋することで、DNA複製を阻害する薬剤である[95]。一方で、5-FUはチミジル酸シンターゼを阻害することでチミジンの合成を抑制し、DNA合成を阻害する薬剤である[96]。これら2つの薬剤はともに細胞周期のS期で作用する薬剤であるため、細胞増殖が抑制された休眠がん細胞においては、効果が現れにくいと予想される。2次元培養の異なる細胞密度下において薬剤をそれぞれ72時間添加し、MTT法にて細胞生存率を測定した。全ての濃度のCDDPにおいて、細胞密度依存的に殺細胞効果が低下した(Fig. 2-9(a))。特に、6.25 μM ではその差が顕著であった(Fig. 2-9(b)(c))。同様に、5-FU 50 μM においても細胞密度依存的な殺細胞効果の低下が認められた(Fig. 2-10)。細胞密度が高い環境下では休眠がん細胞の割合も高いと考えられるため、休眠がん細胞に対して一般的な抗がん剤の効果が現れにくいことが明らかとなった。

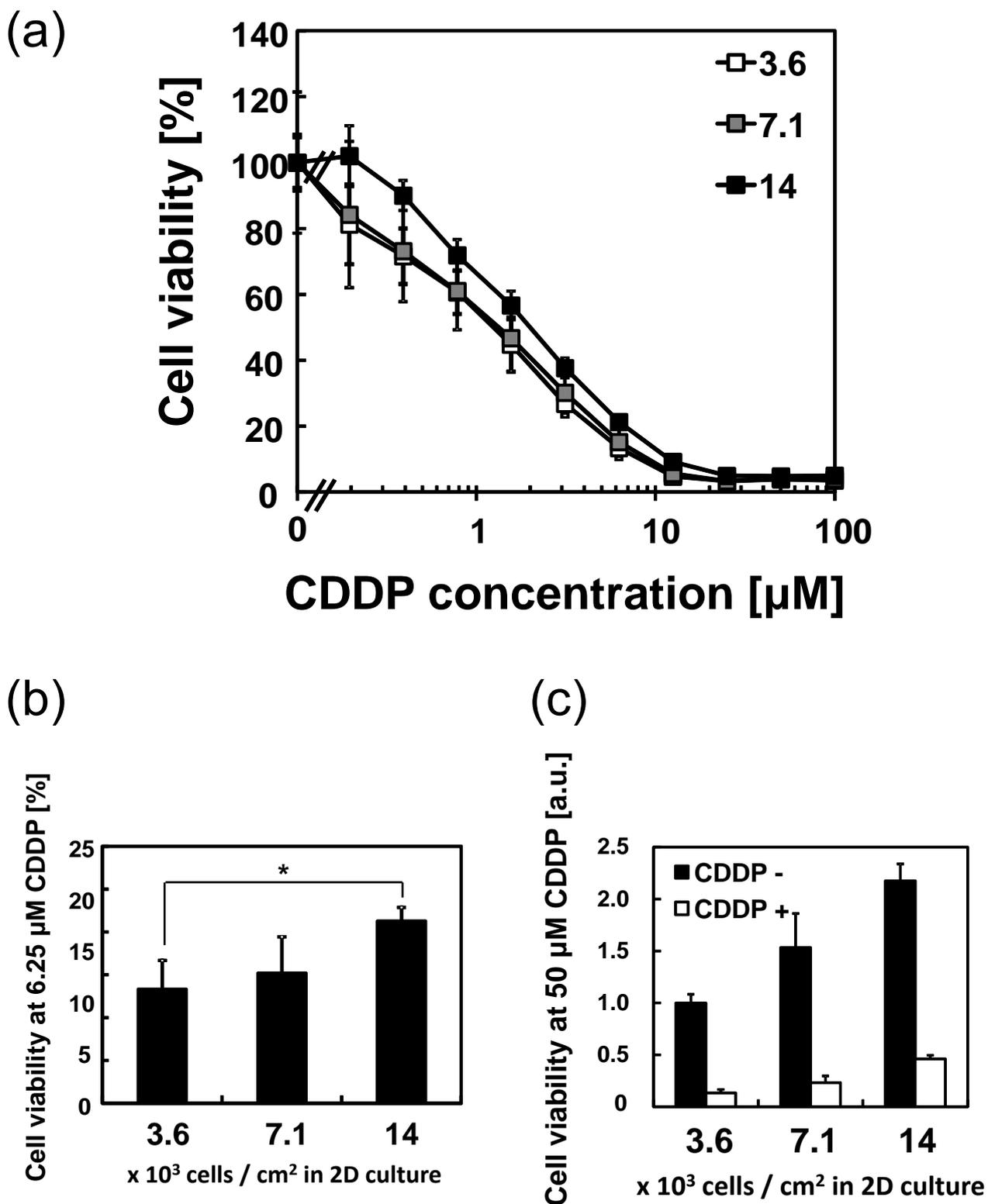


Fig. 2-9 2次元培養におけるCDDPの細胞毒性評価 (MTT法)

薬剤添加72時間後に細胞生存率を測定した。

(a) 全濃度における細胞生存率 (n = 6.)

(b) 6.25 μM における細胞生存率 (計算値[%], * ; p < 0.001. n = 6.)

(c) 6.25 μM における細胞生存率 (n = 6.)

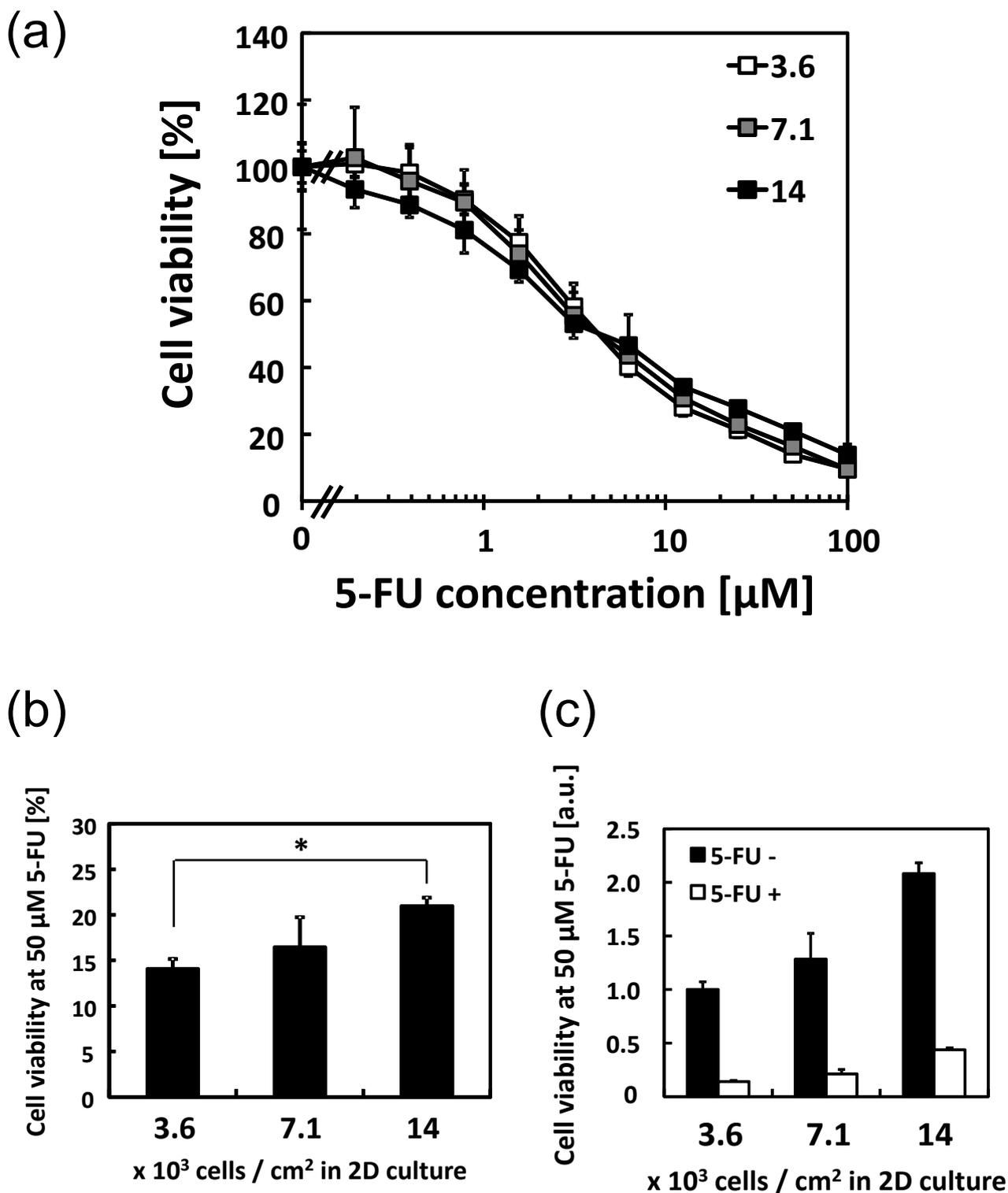


Fig. 2-10 2次元培養における5-FUの細胞毒性評価 (MTT法)

薬剤添加72時間後に細胞生存率を測定した。

(a) 全濃度における細胞生存率 (n = 6.)

(b) 50 μMにおける細胞生存率 (計算値[%], * ; p < 0.001. n = 6.)

(c) 50 μMにおける細胞生存率 (n = 6.)

2-4 結言

本章では、形質変化の原因が細胞密度であると仮定し、細胞密度と休眠性の相関を検証した。まず、異なる細胞密度環境を作成するために、2次元培養において5段階、3次元培養において3段階を構築した。2次元培養における細胞密度勾配は培養皿に対する播種数を変えることによって実現した。3次元培養はEZSPHERE®を用いることで、がん細胞スフェロイドを形成した。2次元培養と同様に、播種数を変えることで3段階の異なる大きさのスフェロイドの形成に成功した。なお、EZSPHERE®をがん細胞スフェロイドの形成に用いた報告はなく、本研究が初めての報告である。共焦点レーザー顕微鏡を用いた核染色下におけるスフェロイドの立体構造解析により、2次元培養と比較して細胞密度が顕著に高いことが明らかになったとともに、EZSPHERE®を用いて形成したスフェロイドは球状ではなくお椀型であることも分かった。一般的に、スフェロイドは直径が200 µmを超えると中心が低酸素領域になり、低酸素誘導因子であるHIFの働きによって遺伝子発現が通常酸素環境下と異なることが報告されている。しかし、本研究で形成したスフェロイドは厚みがおよそ80 µmであるため、低酸素による影響を排除することが可能となる。実際のところ、もっとも大きいスフェロイドであるS500においてもHIF-1 α およびHIF-2 α の発現は認められなかった。一方で、本研究のスフェロイドは、他の手法(マトリゲル、スピナーフラスコなど)を用いて形成したスフェロイドで認められた特徴である「細胞増殖の抑制」と「*veg*fの発現亢進」の両方を満たした。これらのことから、EZSPHERE®は低酸素領域をほとんど発生させずに、高密度な細胞培養環境を構築することができると考えられる。

続いて、休眠性の評価を行うために No proliferation, No death, Metabolic suppression, Recovery to active status の4項目を評価した。No proliferationを検証するためにKi-67およびp21の遺伝子発現解析、加えてBrdUの陽性率を調査した。No deathを検証するためにトリパンブルー染色による細胞生存率を測定した。Metabolic suppressionを検証するために2-NBDGの細胞内取り込み量を測定した。最後に、Recovery to active statusを検証する

ためにスフェロイドを形成していた細胞の再増殖能を評価した。これらの実験より、どの項目においても2次元培養とスフェロイドの両方で、細胞密度依存的にがん細胞が休眠状態へ移行することが明らかになった。このことから以降の実験では、スフェロイドを含む高密度培養を休眠がん細胞のモデルとして使用した。

次に、休眠がん細胞に対する一般的な抗がん剤の効能を検証した。細胞周期のS期に作用する抗がん剤としてCDDPと5-FUの2つを選択し、異なる細胞密度環境下において薬剤の毒性評価を行った。その結果、休眠がん細胞の割合が多いと考えられる高密度培養下において、抗がん剤の殺細胞効果が低下した。一般的に、細胞増殖が抑制されている休眠がん細胞に対して抗がん剤は十分な効果を発揮することができないと報告されており、本研究もこれに合致する結果となった。

当研究室の知見において、通常酸素環境下の *in vitro* において休眠がん細胞のモデル構築を行った報告はない。そのため、3次元培養を用いることで簡単に休眠がん細胞を作成することができることを示した本章は非常に意義がある研究であると考えられる。休眠がん細胞モデルはポルフィリン代謝のみならず、数多のがん研究に対して貢献することが期待される。

第3章

休眠がん細胞における PpIX 蓄積および ALA-PDT 効果の評価

3-1 緒言

3-2 実験方法

3-3 結果と考察

3-3-1 休眠がん細胞における PpIX 蓄積の評価

3-3-2 休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の評価

3-3-3 休眠がん細胞におけるトランスポーターの発現解析

3-3-4 非休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の亢進

3-4 結言

3-1 諸言

ALA をがん患者に経口投与すると、腫瘍特異的に PpIX の蓄積が認められる。PpIX が蛍光物質であることを利用して、がん診断(ALA-PDD)に応用されている。また、PpIX は可視光照射下において活性酸素種を発生させることで細胞死を誘導するため、がん治療(ALA-PDT)への応用も期待されている。ALA を用いたがん診断・がん治療効果は細胞内の PpIX 蓄積量と比例するため、がん細胞における PpIX 蓄積量を増加させることを目的とした研究が数多く行われている。しかし、ALA 添加による PpIX の蓄積メカニズムは未だ解明されていない。当研究室の先行研究から PpIX 蓄積量はトランスポーターである PEPT1 および ABCB6 の発現亢進、ABCG2 の発現低下と密接に相関することが明らかになった [34]。

休眠がん細胞はがん再発の一因とされているが、細胞増殖が抑制されているために一般的な抗がん剤(CDDP, 5-FU)では十分な治療効果が得られない。一方で、休眠がん細胞に対して ALA を用いたがん診断・がん治療の有効性を検証した報告はない。第2章では3次元培養法を用いることで、高密度培養下のがん細胞が休眠状態に移行することを示した。そこで本章は、がんの休眠性と ALA 添加後の PpIX 蓄積の相関を検証した。さらに、休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の評価し、PpIX 蓄積量と比較した。加えて、PEPT1, ABCB6, ABCG2 の発現解析を行い、PpIX 蓄積量と比較した。また、細胞増殖抑制剤を ALA と併用することで、非休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の改善を試みた。

3-2 実験方法

試薬

アミノレブリン酸(ALA)塩酸塩はコスモ石油株式会社(東京)から購入した。Methotrexate はコスモ・バイオ株式会社(東京)より、Cycloheximide は Nacalai Tesque (京都)よりそれぞれ購入した。他に用いた試薬は 2-2 章に記したのと同じものである。

共焦点レーザー顕微鏡による PpIX 蓄積の解析

解析を行う 24 時間前に細胞に 1 mM ALA を添加した。24 時間後に PBS (-)で 1 回 wash を行い、HBSS (+)を 3 ml 添加して、共焦点レーザー顕微鏡による観察を行った。正立共焦点レーザー顕微鏡 LSM780 (Carl Zeiss SAS, Jena, Germany)を用い、倍率 40 倍の水浸レンズ、励起波長 405 nm、検出波長 620-700 nm、レーザー強度 2.0%、ピンホールサイズ 1AU の条件で断面を取得した。取得した画像は LSM780 に付属している解析ソフト ZEN を用いて解析を行った。

HPLC によるポルフィリン種の定量

解析を行う 24 時間前に細胞に 1 mM ALA を添加した。細胞内ポルフィリンを抽出するために、細胞を PBS (-)で洗浄後、各 well に 100 - 400 μ L の 0.1 M NaOH を加えて細胞溶解液を調製した。細胞溶解液のうち 50 μ L を 1.5 mL チューブに回収後、150 μ L の DMF : 2-プロパノール溶液(100 : 1, v / v)を加えタンパク質を変性させ、細胞内ポルフィリンを抽出した。変性したタンパク質を除去する目的で 13,400 rpm で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。一晚室温・暗所で静置し、ポルフィリノーゲンを酸化させた後 HPLC で分析した。細胞内ポルフィリン量は、残った細胞溶解液のサンプルを用いて測定したタンパク質濃度で標準化した。タンパク質濃度は Bradford 法を用いて定量した。

ポルフィリンの HPLC 解析には、40°C に維持した逆相 C18 カラム(CAPCELL PAK, C18, SG300, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 資生堂、東京)を備えた Type Prominence システム(島津製

作所、京都)を使用した。ポルフィリンの溶出には pH 5.2 に調製した 12.5%アセトニトリル含有 1 M 酢酸アンモニウム溶液である移動相 A と、80%アセトニトリル含有 50 mM 酢酸アンモニウム溶液である移動相 B を用いた。溶出プログラムは移動相 A のみで開始し、流速 1 mL/min で 5 分間、その後、移動相 B を 0 から 100%までリニアグラジエントで 25 分間、さらに移動相 B 100%で 10 分間送液した。溶出液は蛍光分光計を備えた検出器で励起波長 404 nm、検出波長 624 nm で連続的に検出した。サンプルは 100 μ L 注入した。注入サンプル中のポルフィリン濃度は標準物質で作成した検量線を基に算出した。細胞内で合成されるウロポルフィリン I (UPI)、ウロポルフィリン III (UPIII)、コプロポルフィリン I (CPI)、コプロポルフィリン III (CPIII)、プロトポルフィリン IX (PpIX)のクロマトグラムを Fig. 3-1 に示す。

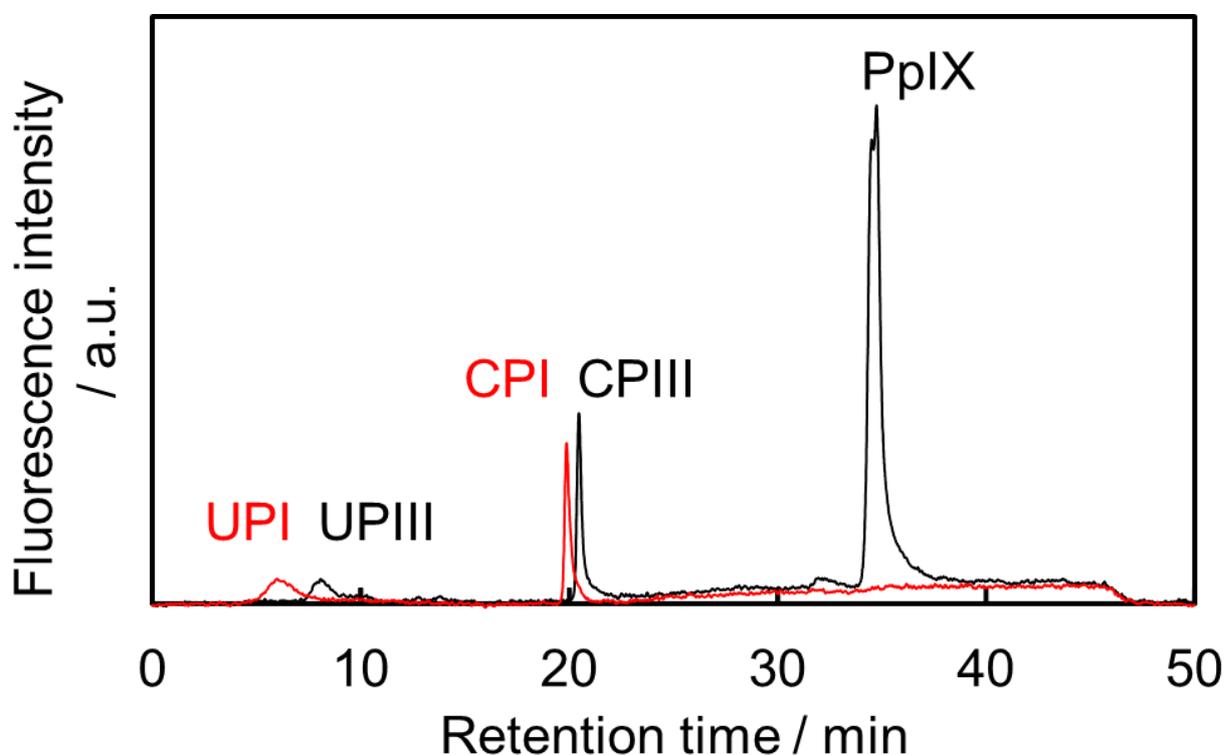


Fig. 3-1 細胞内で合成される各ポルフィリンのクロマトグラム

Western blotting を用いたタンパク質の発現解析

ABCG2 以外の細胞溶解液は 2-2 章に記した手法で調整した。ABCG2 は 2 量体を検出するために、以下の手順で細胞溶解液を調整した。細胞を PBS (-) で洗浄後、Lysis buffer A (-) [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM N-methylmaleimide, 1% (v / v) Triton X-100, and protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, 京都)] で処理した。サンプルは 27G の注射針を用いて 10 回、ホモジナイズを行った。1,000 × g、4°C、10 分間遠心分離を行って得られた上清を細胞溶解液として回収し、以後の実験に使用した。

1 次抗体には、抗ヒト Ki-67 抗体 (ab15580, 1:1000 dilution; Abcam, Cambridge, Great Britain)、抗ヒト PEPT1 抗体 (ab55936, 1:200 dilution, Abcam, Cambridge, Great Britain)、抗ヒト ABCB6 抗体 (600-401-945, 1:500 dilution, Rockland, Limerick, Ireland)、抗ヒト ABCG2 抗体 (BXP-21, 1:200 dilution, Convance Research Products, Emeryville, Canada)、抗ヒト Actin 抗体 (691001, 1:500 dilution, MP Biomedicals, Santa Ana, United States) をそれぞれ使用した。化学発光は 2-2 章で記した手法を用いて検出した。

光線力学療法(ALA-PDT)の殺細胞効果測定

培養細胞に 1 mM ALA を添加し 24 時間培養した。その後、新たな培養液に交換し、SBI ファーマ株式会社(東京)より供与された LED 照射装置を用いて細胞に 5 分間 LED 照射を行った(630 nm, 1080 mJ / cm²) [92]。その後さらに 24 時間培養し、MTT 法もしくはトリパンプルー染色法を用いて細胞生存率を測定した[89]。MTT 法は以下のように行った。MTT 試薬 (5 mg / ml) を培養液に添加後、4 時間培養した。その後、培養液と同量の 10% (w / v) SDS を加え一晩培養した。MTT 代謝物であるホルマザンは測定波長 570 nm、基準波長 655 nm における吸光度を Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) により測定した。

3-3 結果と考察

3-3-1 休眠がん細胞における PpIX 蓄積の評価

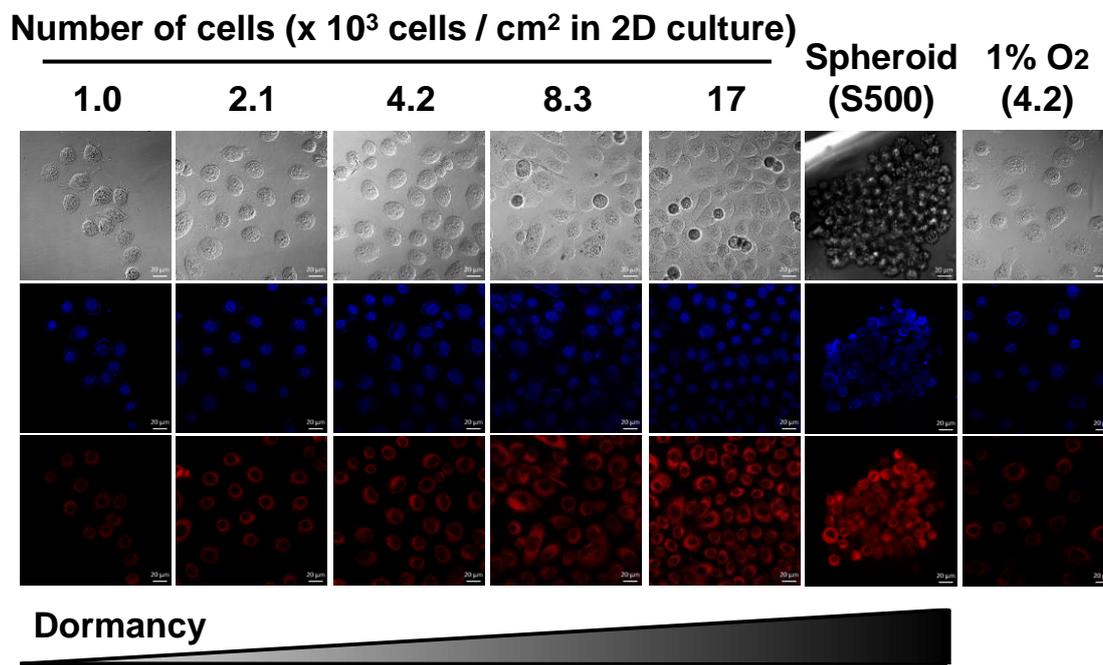
ALA 添加後の PpIX 蓄積と休眠性との関係性を検証するために、共焦点レーザー顕微鏡および HPLC を用いて PpIX 蓄積を解析した。ALA を添加する濃度・時間は 1 mM・24 時間とし、がん患者に ALA を投与する場合と比較して特異な条件にならないよう配慮した。生細胞内の PpIX 蓄積を解析するために正立の共焦点レーザー顕微鏡を用い、観察のための検出プログラムを作成した。作成したプログラムは Z 軸に対して 0.7 μm の厚みで写真を撮影するため、細胞の大きさ(約 10 μm)と比較しても十分な薄さを確保できた。一般的に共焦点レーザー顕微鏡によるスフェロイドの観察は細胞を有機溶媒で固定してから行うことが多い。しかし、固定を行うと疎水性である PpIX は細胞外へ流出してしまうため、PpIX 蓄積を観察するためには生細胞で行う必要がある。一方で、他の 3 次元培養法であるマトリゲルなどでは、スフェロイドに対して対物レンズが十分に接近できない。これらのことをふまえ、本研究では 3 次元培養法として EZSPHERE[®]を選択し、正立の共焦点レーザー顕微鏡を用いて培養皿の上部から撮影を行うことで、上記の問題を克服した。なお、スフェロイドにおける PpIX 蓄積の断面図を撮影した共焦点レーザー顕微鏡写真は本研究が初めてである。

スフェロイド用に作成した共焦点レーザー顕微鏡の検出プログラムを用いて、2 次元培養における異なる細胞密度環境下の PpIX 蓄積を解析した。共焦点レーザー顕微鏡の写真より、細胞密度依存的に PpIX の発光が強く認められることが明らかになった(Fig. 3-2 (a))。また、同密度 dish 内の細胞においても、PpIX 蓄積に関して 1 細胞あたり最大 2 倍程度の差が認められ、蓄積の不均一性が観測された。このことは、同密度 dish 内における BrdU 陽性の不均一性が一因であると考えられる(Fig. 2-5(c))。一方で、低酸素環境下において PpIX の発光が弱くなったため、PpIX 蓄積増加の原因は低酸素環境ではないことが示唆された。さらに、細胞を NaOH 水溶液で溶解し、HPLC を用いて細胞内 PpIX の定量を行った(Fig. 3-2 (b))。なお、縦軸は回収した細胞のタンパク質量で補正したため、細胞密度が異

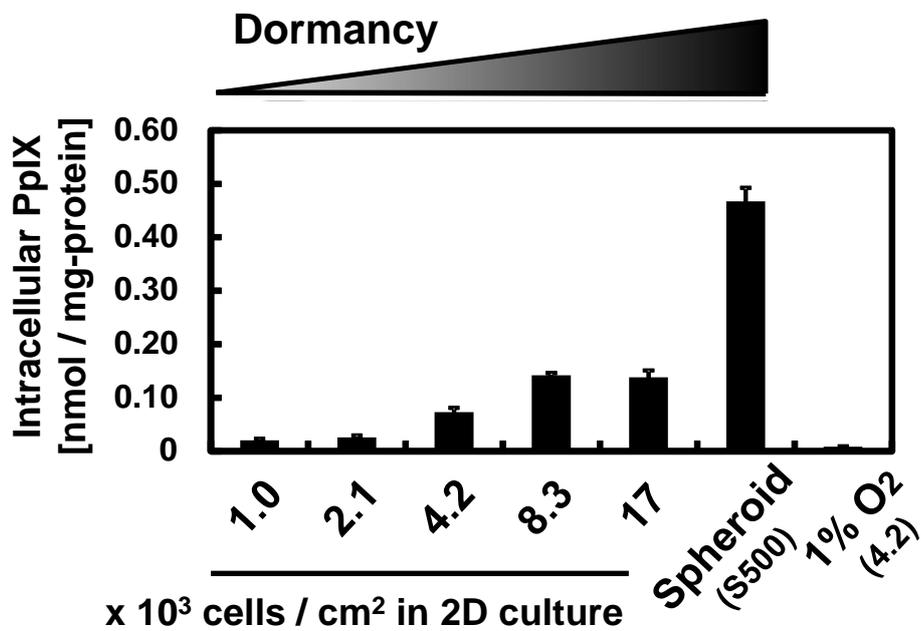
なっているにもかかわらず、単位細胞あたりの PpIX 蓄積量として比較することができる。HPLC による定量結果から、最も細胞密度が低い 2 次元培養に対してスフェロイドでは PpIX 蓄積が 23 倍も増加した。同一細胞株であるにもかかわらず、PpIX 蓄積が 23 倍も増加することは特異な現象である。第 2 章より、細胞密度依存的にがん細胞が休眠状態へ移行することが明らかになったため、がんの休眠性と ALA 添加後の PpIX 蓄積は正の相関を示すことが示唆された。

同様に、異なる大きさのスフェロイドにおいても共焦点レーザー顕微鏡および HPLC を用いて PpIX 蓄積を解析した(Fig. 3-2 (c)(d))。こちらにおいても細胞密度依存的な PpIX 蓄積の増加が認められた。また、スフェロイドの外側は内部よりも PpIX 蓄積が多く認められた。PpIX 蓄積が休眠性と正の相関を示すならば、スフェロイド内部の PpIX 蓄積が外部よりも増加すると予想されるが、予想とは逆の結果となった。この理由として、スフェロイド外部の方が内部よりも培地中の ALA を細胞内に取り込みやすいことが考えられる。以上のことから、3 次元培養においてもがんの休眠性と ALA 添加後の PpIX 蓄積は正の相関を示した。同時に、休眠がん細胞に対して ALA-PDD、ALA-PDT が効果的であると示唆された。

(a)



(b)



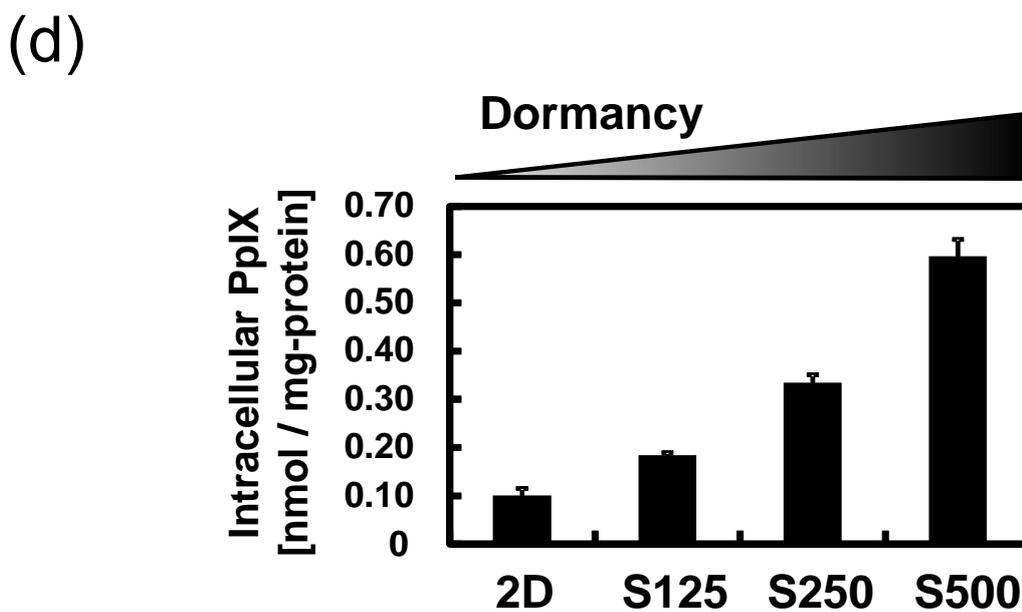
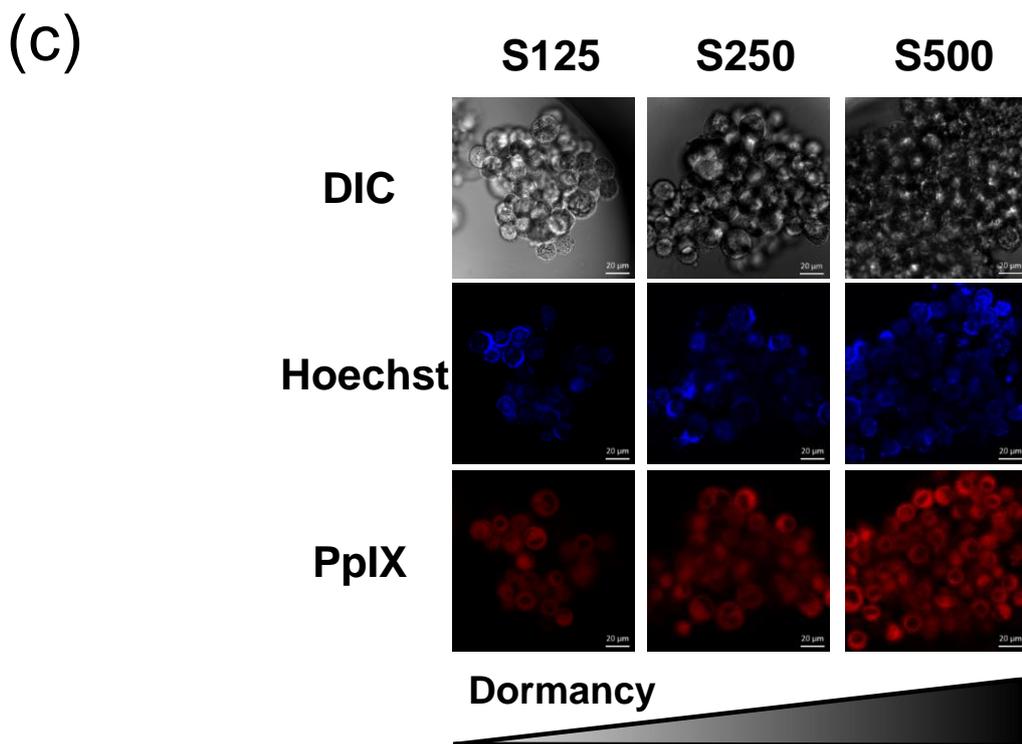


Fig. 3-2 休眠性と PpIX 蓄積の相関

1 mM ALA で 24 時間培養した。HBSS(+)中で共焦点レーザー顕微鏡による生細胞観察を行った。0.1 M NaOH 溶液で溶解した後に HPLC によって定量した。(Scale bar, 20 μ m.)

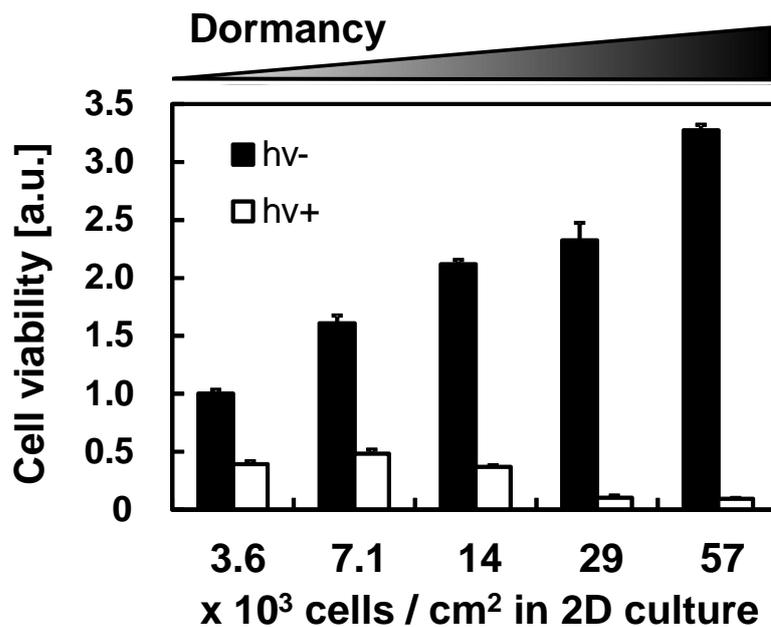
- (a) 共焦点レーザー顕微鏡による 2 次元培養下の PpIX 蓄積解析
- (b) HPLC による 2 次元培養下の PpIX 蓄積解析 (n=3.)
- (c) 共焦点レーザー顕微鏡による 3 次元培養下の PpIX 蓄積解析
- (d) HPLC による 3 次元培養下の PpIX 蓄積解析 (n=3.)

3-3-2 休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の評価

PpIX が蓄積した細胞に対して光照射を行うことでアポトーシスやネクローシスを誘導する治療法が ALA-PDT である。休眠がん細胞における ALA-PDT の殺細胞効果を検証するために、PpIX 蓄積後の細胞に赤色光を照射した。その後、細胞のアポトーシス応答が生じる猶予として、光照射後はインキュベーターで一晩培養し、MTT 法によって細胞生存率を算出した。

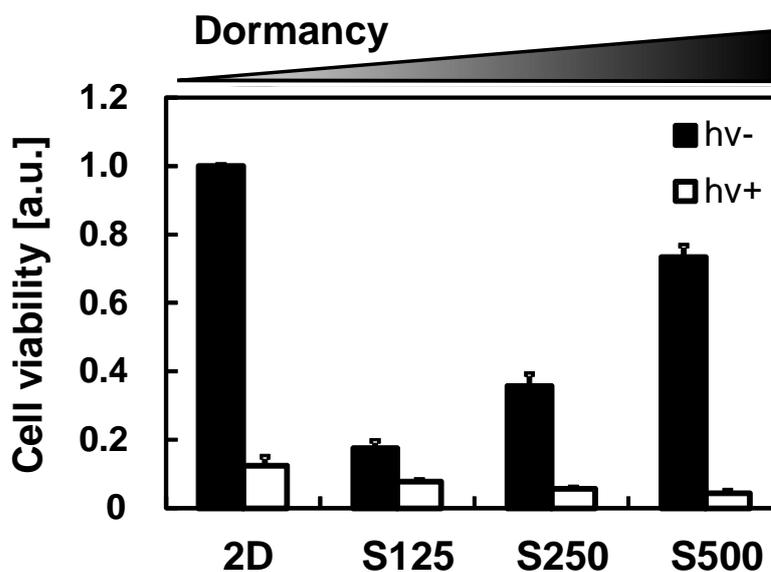
2次元培養において細胞密度依存的に、細胞生存率が低下した(Fig. 3-3(a))。同様に3次元培養においても、スフェロイドの大きさ依存的に細胞生存率が低下した(Fig. 3-3(b))。これらの結果は、細胞内の PpIX 蓄積量が細胞密度依存的に増加したためであると考えられる。以上のことから、休眠がん細胞に対して ALA-PDT は特に有効な治療法であると示唆された。

(a)



Cell viability [%]	39.2	30.0	17.4	5.0	2.9
--------------------	------	------	------	-----	-----

(b)



Cell viability [%]	12.4	44.6	16.1	6.0
--------------------	------	------	------	-----

Fig. 3-3 ALA-PDT 効果と休眠性の相関

1 mM ALA で 24 時間培養後に赤色光を 5 分間照射した。一晚培養後に、MTT 法によって細胞生存率を測定した。Cell viability [%]は、「hv+ / hv- ×100」で算出した。

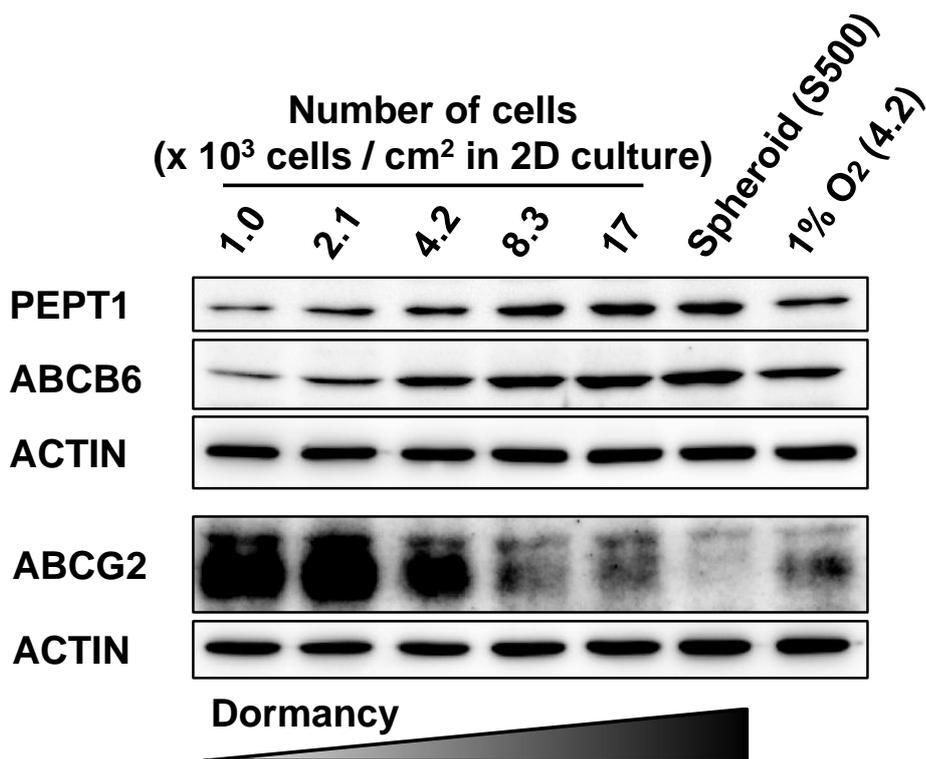
(a) 2次元培養における ALA-PDT の殺細胞効果 (n = 6.)

(b) 3次元培養における ALA-PDT の殺細胞効果 (n = 3.)

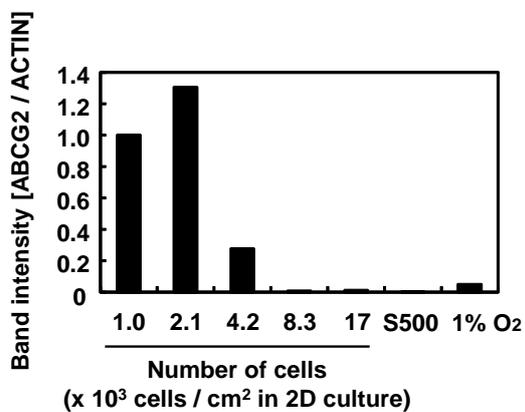
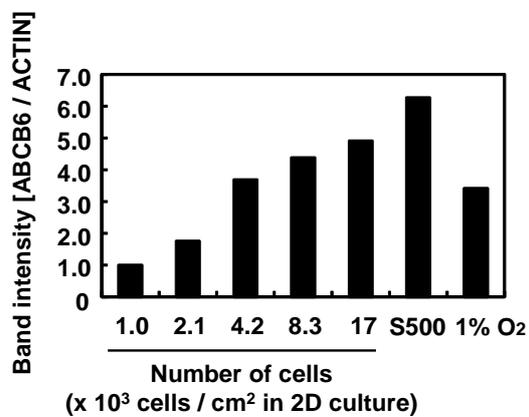
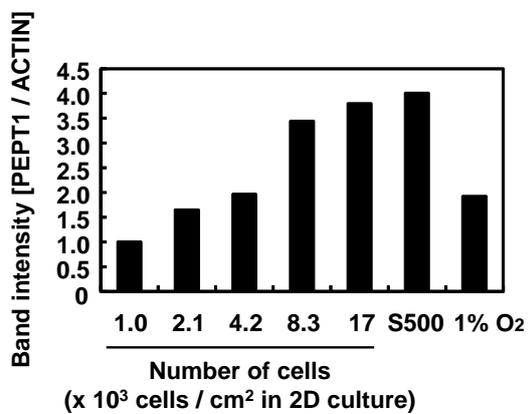
3-3-3 休眠がん細胞におけるトランスポーターの発現解析

ALA 添加後の PpIX 蓄積と強い相関がある 3 つのトランスポーター、PEPT1, ABCB6, ABCG2 の発現をタンパク質レベルで解析した。なお、発現解析は細胞に ALA を添加せずに行った。2次元培養において、細胞密度依存的に PEPT1 および ABCB6 の発現は亢進し、ABCG2 の発現は低下した(Fig. 3-4 (a)(b))。スフェロイドにおいても、細胞密度依存的に上記の傾向が認められた(Fig. 3-4 (c)(d))。すなわち、細胞密度が高い休眠がん細胞は ALA を取り込みやすく、中間体である CPgenIII のミトコンドリアへの輸送も速い一方で、ABCG2 による PpIX の排出は遅いため細胞内の PpIX 蓄積が増加したと考えられる(Fig. 3-4 (e))。このことは、休眠性依存的に PpIX 蓄積が増加したことや ALA-PDT 効果が亢進したと一致する。

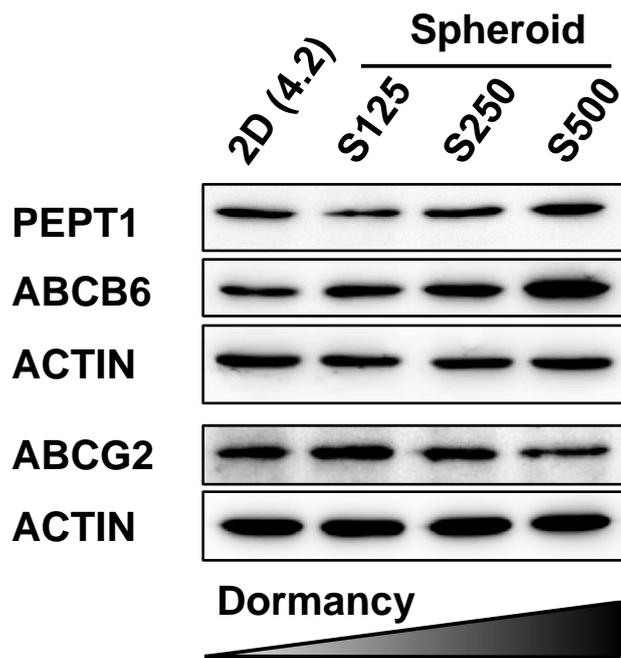
(a)



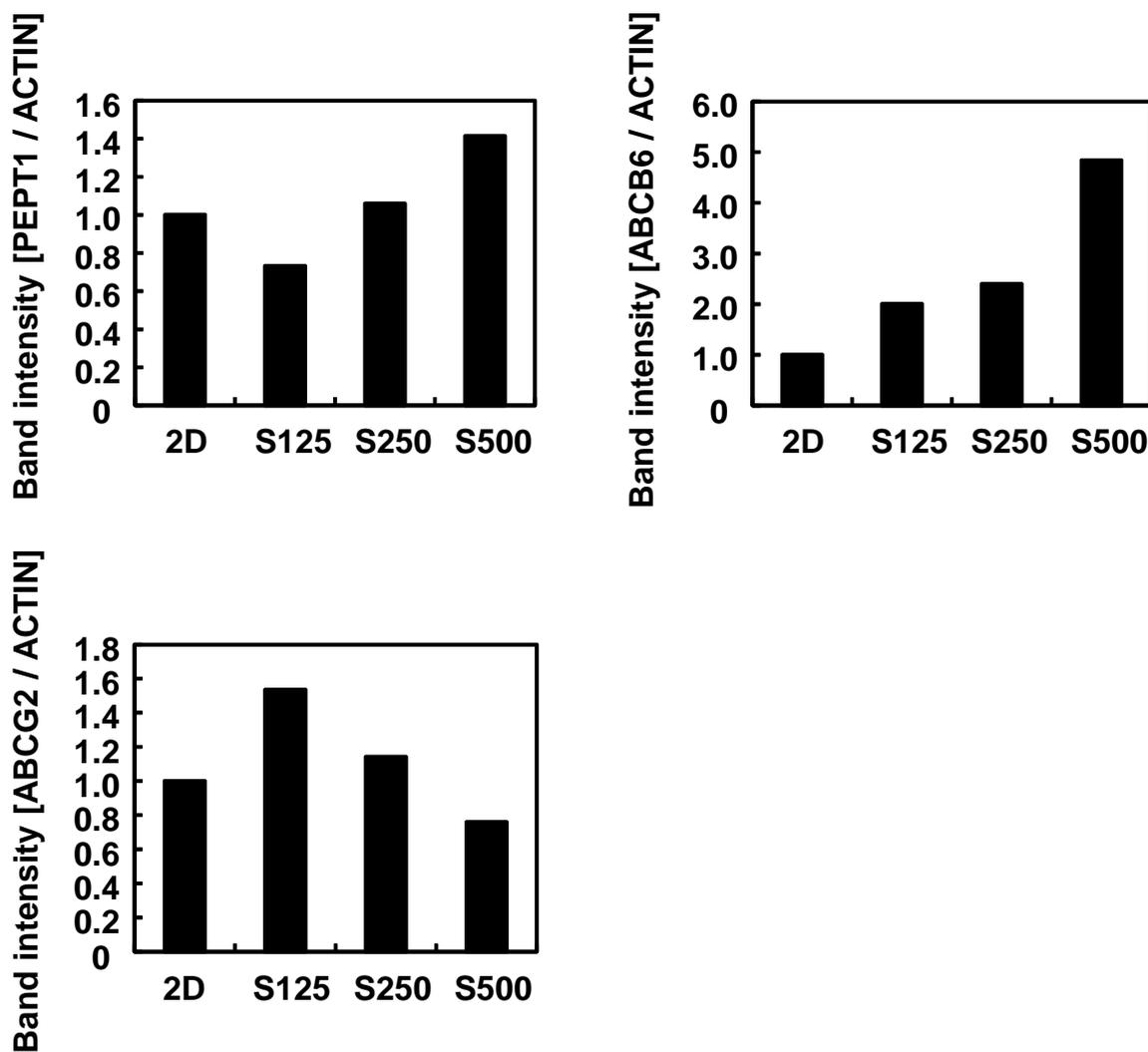
(b)



(c)



(d)



(e)

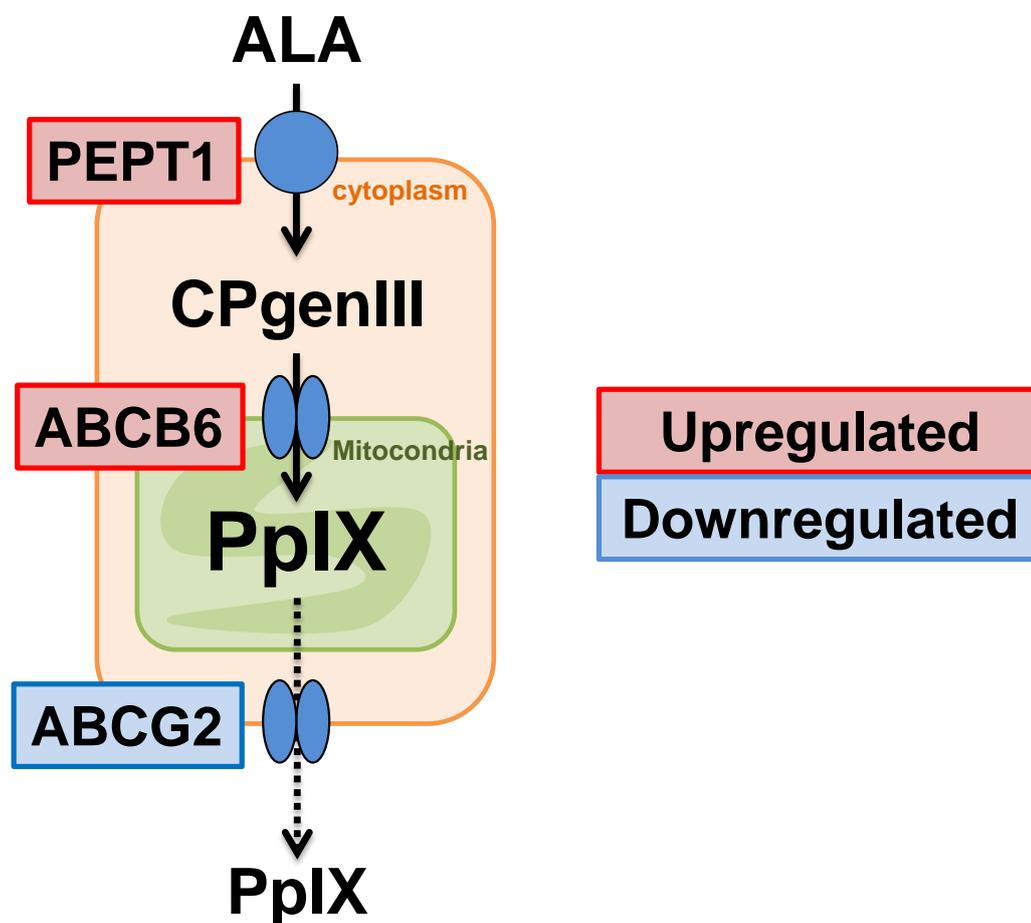


Fig. 3-4 PpIX 蓄積に関連するトランスポーターの発現解析

全ての細胞は4日間培養した後に Lysis buffer で溶解させた。

- (a) 2次元培養におけるトランスポーターの発現解析 (Western blotting)
- (b) 2次元培養におけるバンド強度
- (c) 3次元培養におけるトランスポーターの発現解析 (Western blotting)
- (d) 3次元培養におけるバンド強度
- (e) 休眠がん細胞における発現傾向

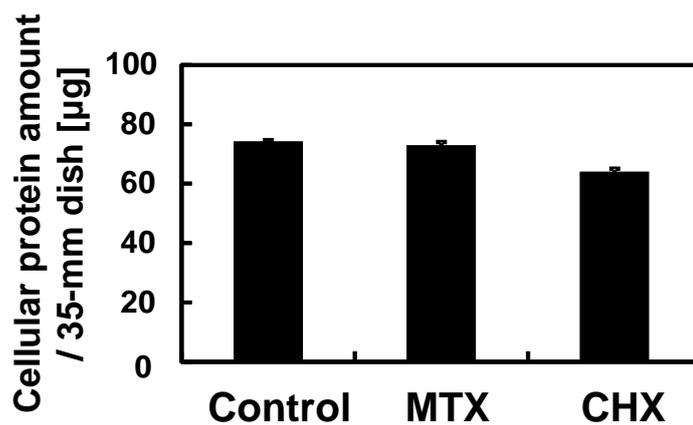
3-3-4 非休眠がん細胞における ALA-PDT 効果の亢進

これまでの実験結果より、「細胞密度依存的にがん細胞の細胞増殖が抑制され、休眠状態へ移行すること」および「休眠性の高いがん細胞においては PpIX 蓄積が多く、ALA-PDT 効果も顕著に現れること」の2つを明らかにした。そこで、細胞密度が低い非休眠がん細胞に対して細胞増殖を抑制した擬似的な休眠状態にすることで、ALA 添加後の PpIX 蓄積を増加させることができるという仮説を立てた。本仮説を検証するために、PC-3 細胞の細胞周期を G0 / G1 期で止める薬剤として報告されている Methotrexate (MTX) および Cycloheximide (CHX) を用いた[97]。非休眠がん細胞モデルは、2次元培養において細胞密度を低くすることで構築した。

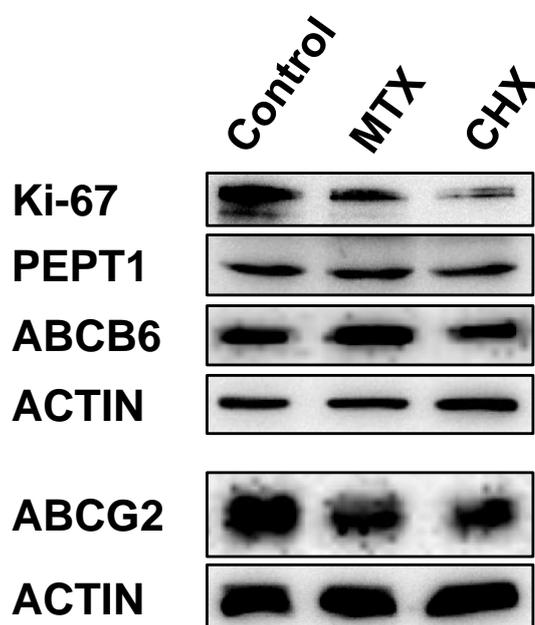
まず始めに、MTX および CHX によって細胞増殖が抑制されることを確かめるために、Ki-67 を含む遺伝子の発現解析を行った。なお、細胞密度は薬剤添加 48 時間後の回収時に同じになるように細胞播種数を調整した(Fig. 3-5 (a))。Ki-67 は MTX・CHX の両方で発現が低下した (Fig. 3-5 (b)(c))。このことから、細胞増殖が抑制されることが確かめられた。また、薬剤添加によって PEPT1 および ABCB6 の発現は変化しなかったが、ABCG2 の発現は MTX・CHX の両方で低下した(Fig. 3-5 (b)(c))。このことから、細胞内に PpIX が蓄積しやすくなると予想される。次に ALA 添加後の PpIX 蓄積を解析した。共焦点レーザー顕微鏡による観察から、ALA のみを添加した Control に比べて ALA と MTX もしくは CHX の共添加群では、PpIX の発光が強く認められた(Fig. 3-5 (d))。HPLC による PpIX 定量より、共添加群は Control に対して PpIX 蓄積が約4倍増加することが明らかになった(Fig. 3-5 (e))。これは、細胞増殖抑制剤によって細胞が擬似的な休眠状態になったためであると考えられる。最後に、共添加群において ALA-PDT 効果を検証した。その結果、共添加群は Control に比べて顕著に細胞生存率が低下した(Fig. 3-5 (f))。MTX の単独添加においても約 50% の細胞死が認められたが、CHX の単独添加においては著しい細胞死が認められなかった。このことから、ALA-PDT 効果の顕著な亢進は薬剤自体の毒性ではなく、がん細胞が擬似的な休眠状態になり PpIX 蓄積が増加したためであると考えられる。以上のことから、非

休眠がん細胞においても細胞増殖抑制剤と ALA を併用することで、ALA を用いたがん診断・がん治療効果を向上させることに成功したと言える。

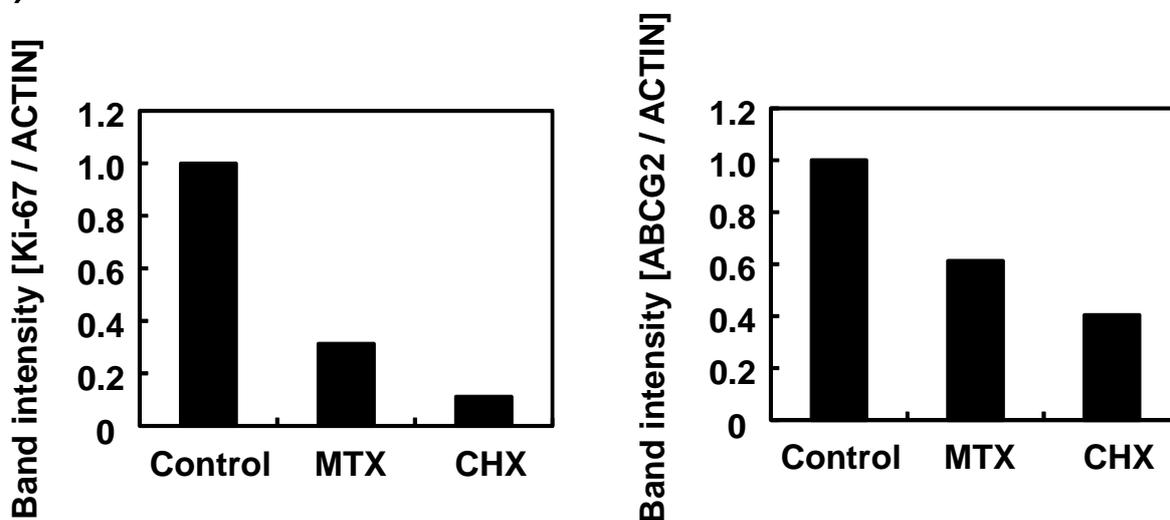
(a)



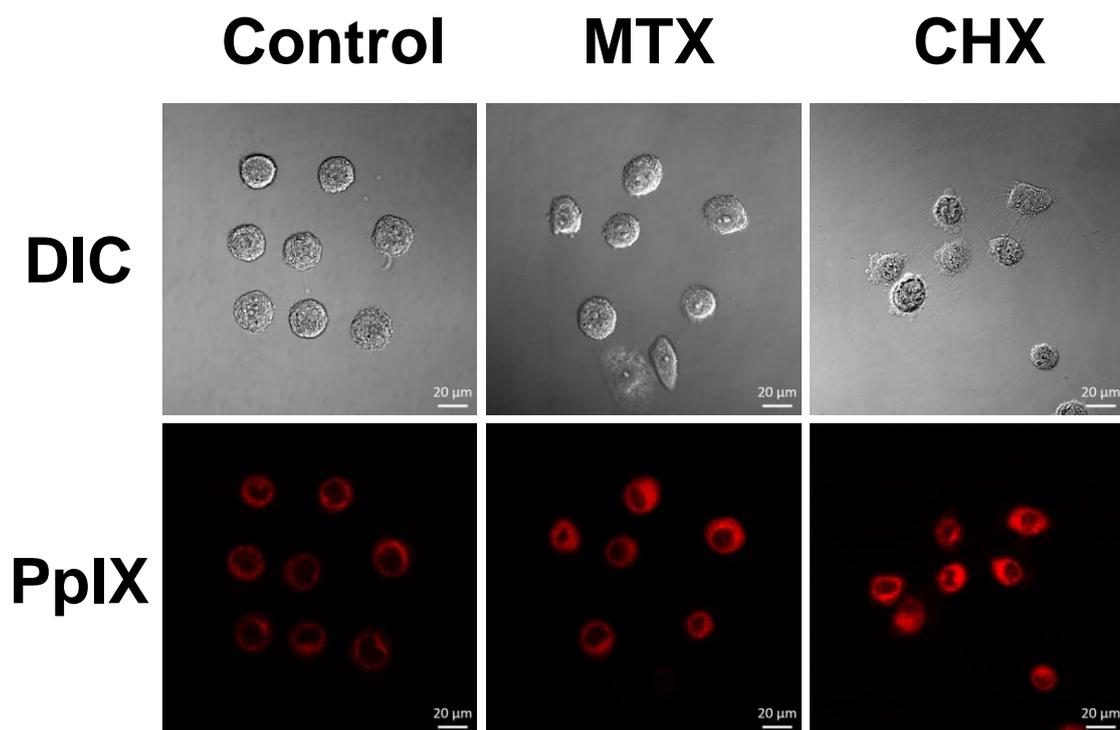
(b)



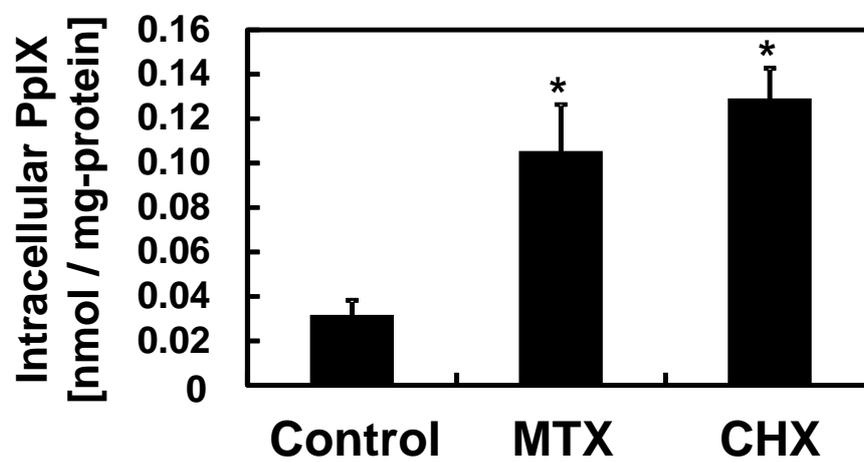
(c)



(d)



(e)



(f)

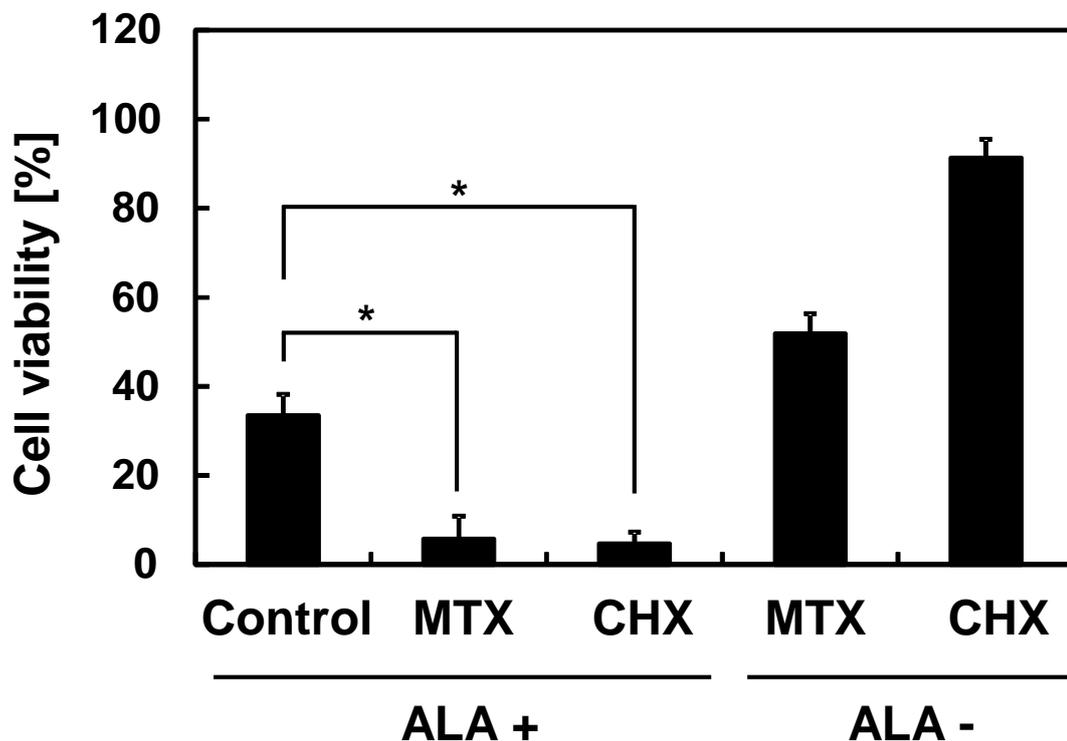


Fig. 3-5 細胞増殖抑制下における PpIX 蓄積解析

タンパク質発現は 10 μ M Methotrexate (MTX) および 10 μ g / ml Cycloheximide (CHX) を 48 時間添加した細胞を用いて解析した。PpIX 蓄積は、細胞増殖抑制剤を 24 時間添加した後に ALA を 24 時間添加した細胞を用いて解析した。

- (a) 細胞内タンパク質量 (Bradford 法, n = 3.)
- (b) 遺伝子発現解析 (Western blotting)
- (c) Ki-67 および ABCG2 のバンド強度
- (d) 共焦点レーザー顕微鏡による PpIX 蓄積解析 (Scale bar, 20 μ m.)
- (e) HPLC による PpIX 蓄積解析 (* ; p < 0.005. n = 3.)
- (f) ALA-PDT による殺細胞効果 (* ; p < 0.003. n = 3.)

3-4 結言

休眠がん細胞は化学療法や放射線療法に対して抵抗性を持つと言われており、第2章においても抗がん剤であるシスプラチンおよび5-フルオロウラシルに対して抵抗性を持つことを明らかにしている。ALAによって誘導される腫瘍特異的なPpIX蓄積は、光線力学診断(ALA-PDD)や光線力学療法(ALA-PDT)に応用されている。そこで、本章では休眠がん細胞におけるPpIX蓄積を解析し、ALA-PDDやALA-PDTの有効性を検証した。第2章で構築した休眠がん細胞モデルにALAを添加することにより、休眠状態依存的にPpIX蓄積が増加することを明らかにした。このことから、休眠がん細胞に対してALA-PDDが効果的であると示唆された。臨床においても、Idoateらが神経膠芽腫において細胞密度が高い腫瘍では手術中のPpIXの蛍光が強く認められることを報告しており[98]、本研究の理論と合致する。

また、「細胞密度とPpIX蓄積に関する報告」もしくは「細胞周期とPpIX蓄積に関する報告」も存在する。Georgakoudiら、およびMoanらはそれぞれ2次元培養において、低密度培養の細胞よりも高密度培養の細胞のPpIX蓄積が増加したことを報告している[99,100]。しかし、それらの報告はPpIX蓄積が増加したメカニズムに関しては言及をしていない。さらにMoanらは大腸がん由来細胞株(WiDr)において細胞周期とPpIX蓄積に関して報告している[99]。G1期の細胞と比べてG2・M期の細胞のPpIX蓄積量が1.9倍増加したことから、PpIX蓄積量は単純に細胞の大きさに比例すると彼らは結論づけている。しかしながら、本研究の細胞増殖抑制剤とALAを共添加した実験において、細胞の大きさが変化しなかったにも関わらず1細胞あたりのPpIX蓄積が増加した。このことから、PpIX蓄積増加のメカニズムは細胞株によって異なる可能性がある。

ALA-PDTによる殺細胞効果は休眠状態依存的に亢進した。休眠がん細胞は多くの治療法に対して抵抗性を持つため、ALA-PDTは休眠がん細胞に対する画期的な治療法になると考えられる。

続いてPpIX蓄積に関連するトランスポーターの発現解析を行い、休眠状態依存的に

PEPT1・ABCB6の発現が亢進し、ABCG2の発現が低下することを明らかにした。このことは、PpIX蓄積増加と合致しており、休眠性が複数遺伝子の発現調整に影響することが明らかになった。細胞密度や休眠性によってPEPT1, ABCB6, ABCG2の発現が調整されることを示した報告は、今までにない。他の報告より、胃がん由来細胞株および卵巣がん由来細胞株を用いて形成したスフェロイドにおいて、ABCG2の発現亢進が示されている[61,101]。一方で、前立腺がん由来細胞株を用いて作成した本研究のスフェロイドではABCG2の発現が低下した。また、細胞増殖抑制剤を添加することでABCG2の発現が低下したことから、スフェロイドにおけるABCG2の発現低下の一因は細胞増殖の抑制であると示唆された。しかし、PEPT1およびABCB6の発現が亢進した理由は明らかになっていない。当研究室の先行報告および他の報告より、PEPT1およびABCB6の発現が低酸素環境下において亢進することが示されている[102–105]。本研究のスフェロイドでは、低酸素環境下において誘導される転写因子であるHIFの発現は認められなかった。加えて、HIFの安定化剤である塩化コバルト(CoCl_2)やDimethyloxaloylglycine (DMOG)を添加してもPpIX蓄積の増加は観測されなかった。さらに、低酸素環境下においてALAを添加すると細胞外に排出されるCoproporphyrin IIIもスフェロイドにおいて検出されなかった[102]。以上のことから、低酸素環境がPpIX蓄積増加の主要因ではないと示唆された。TNF- α やIFN- γ がPEPT1の発現と活性を亢進することが知られているため、トランスポーターの発現変化は細胞密度依存的なサイトカイン濃度の分布によってもたらされた可能性がある[106]。

最後に、細胞増殖抑制剤であるMethotrexate (MTX)やCycloheximide (CHX)をALAと共に添加することにより、細胞密度が低い非休眠がん細胞に対してALA-PDT効果を亢進できることを示した。MTXとALAを共添加することでALA-PDT効果が亢進することは、皮膚がんと前立腺がんに対してそれぞれ報告があり、本研究と合致する[107,108]。それらの報告はCPOXの発現および活性が亢進したためにPpIX蓄積が増加したと主張しており、がん細胞の休眠性には言及していない。本研究は、ALA-PDT効果亢進の原因が休眠性で

あると示した初めての報告である。

第4章

ALA 添加後の光照射が種々の 遺伝子発現応答に与える影響

4-1 緒言

4-2 実験方法

4-3 結果と考察

4-3-1 ALA 添加後の光照射による細胞生存率評価

4-3-2 ALA 添加後の細胞内ヘム蓄積とヘム応答性遺伝子の発現変化

4-3-3 ALA 添加後の光照射による ROS の発生

4-3-4 ALA 添加後の光照射による遺伝子発現変化

4-4 結言

4-1 諸言

第2章では3次元培養を用いて休眠がん細胞のモデルを構築し、第3章では休眠がん細胞において PpIX の蓄積が多いため、手術中の診断に適するだけでなく、ALA-PDT に対してより感受性が高いことを示した。加えて、低分子の抗がん剤を用いてがん細胞の細胞周期を停止させることにより、PpIX 蓄積を一層増加させることが可能であることを示した。しかしながら、ALA-PDT によってがん細胞スフェロイドの全細胞を細胞死に誘導することが可能となった訳ではなく、一部の細胞の生存が確認された(Fig. 3-3)。本研究にて用いたスフェロイドは厚みが比較的均一であるため、低酸素・低栄養が生じづらい。そのため、細胞が生存を続けた理由としてスフェロイド内における照射光の減衰が一因として挙げられる。以下の章では、深部腫瘍においても認められる照射光の減衰を想定して低用量の光照射を行った際のがん細胞の解析を行った。

ALA はヘムの前駆体であり、がん細胞における PpIX 蓄積以外にも多くの遺伝子変化・代謝変化を生体に及ぼすことが報告されている。例えば、シトクロム P450 は薬剤代謝に関わる酵素であるが、活性中心にヘムを持つため、ALA によって活性が亢進し、プロドラッグを活性代謝物に変換する能力が向上する[109]。また、ミトコンドリアの電子伝達系の構成因子であるコンプレックス IV もヘムタンパク質であるため、ALA によって活性が亢進し、活性酸素種 (ROS) の発生を通じてがん細胞をアポトーシス誘導する[110]。加えて、ALA によって誘導されたヘムの分解物である一酸化炭素がマクロファージの免疫応答に関わる[111]。光照射を行わない ALA 単独でも数多の効果が認められるため、がん細胞に対して低用量の光照射を行った際には多くの挙動変化が推測され、解析が難航することが予想された。そのため、本章では、ALA 添加後の PpIX 蓄積が少なく、がん細胞と比較してゲノム変異が少ない正常細胞に光照射を行い、正常細胞の遺伝子変化・代謝変化を解析することにより、がん細胞に対する低用量の光照射試験の事前検証を行うことを目的とした。

ROS は生存に必要な生理機能を制御している重要な分子である。ROS は特定のタンパ

ク質を修飾することで、そのタンパク質の活性スイッチとして働いている。特に、転写因子の活性を変化させ、様々な遺伝子の発現を調節していることが知られている。正常細胞に ALA を添加すると細胞内にヘムと微量の PpIX が蓄積することが知られている[112]。また一方で、ALA 添加によって細胞内に蓄積するヘムは、REV-ERB α をはじめとした転写因子の活性を制御していることが知られている[113–115]。そこで、ヘムを介した遺伝子発現変化の確認もあわせて行った (Fig. 4-1)。

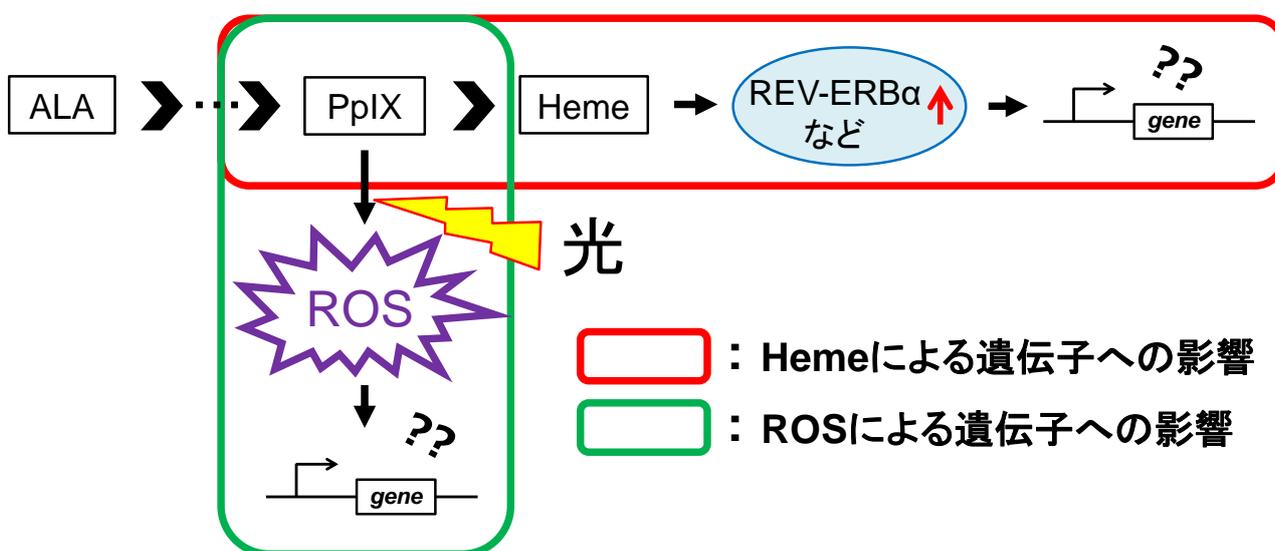


Fig. 4-1 ALA 添加後の光照射により起こると予想される遺伝子発現応答

4-2 実験方法

試薬

アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA) 塩酸塩はコスモ石油株式会社 (東京) から購入した。[3-(4, 5-Dimethylthial-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] (MTT 試薬)、N-Acetyl-L-cysteine (NAC) は Sigma Aldrich (St. Louis, MO) から購入した。2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入した。DMEM (高グルコース) 培地、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (ABAM)、Protease inhibitor cocktail は Nacalai Tesque (京都) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) から購入した。その他、すべての試薬は分析グレードのものを使用した。

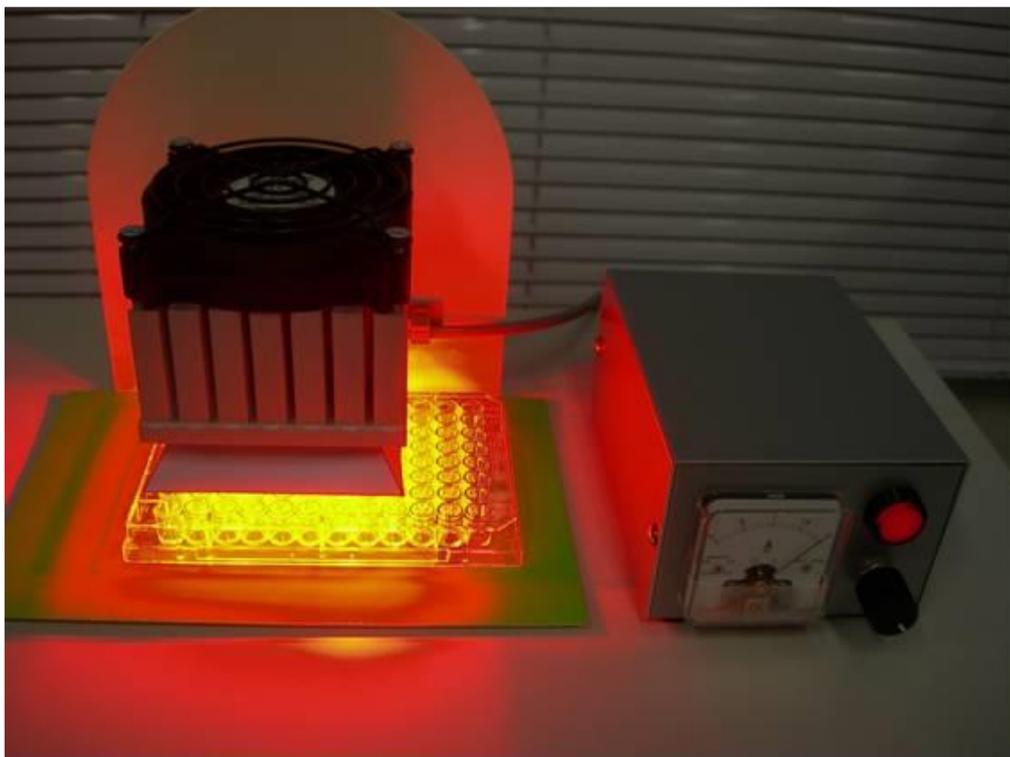
細胞培養

ヒト胎児腎由来正常細胞株である HEK293 細胞は SBI ファーマ株式会社 (東京) より供与された。細胞は 10% の非働化 FBS、ABAM を添加した DMEM (高グルコース) 培地で 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。

HEK293 に対する ALA 添加と光照射

HEK293 を 35-mm dish もしくは 96-well plate (ともに Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) に播種した。35-mm dish に対しては 1.0×10^6 個の細胞を播種し、96-well plate に対しては 35-mm dish の場合と同様の細胞密度となるよう播種した。播種より 24 時間培養した後培地交換を行い、適当な濃度で ALA を細胞に添加した。さらに 4 時間培養した後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で 5 分間光照射し、以降の実験を行った。光照射装置は SBI ファーマ株式会社 (東京) から供与された (Fig. 4-2)。

A



B

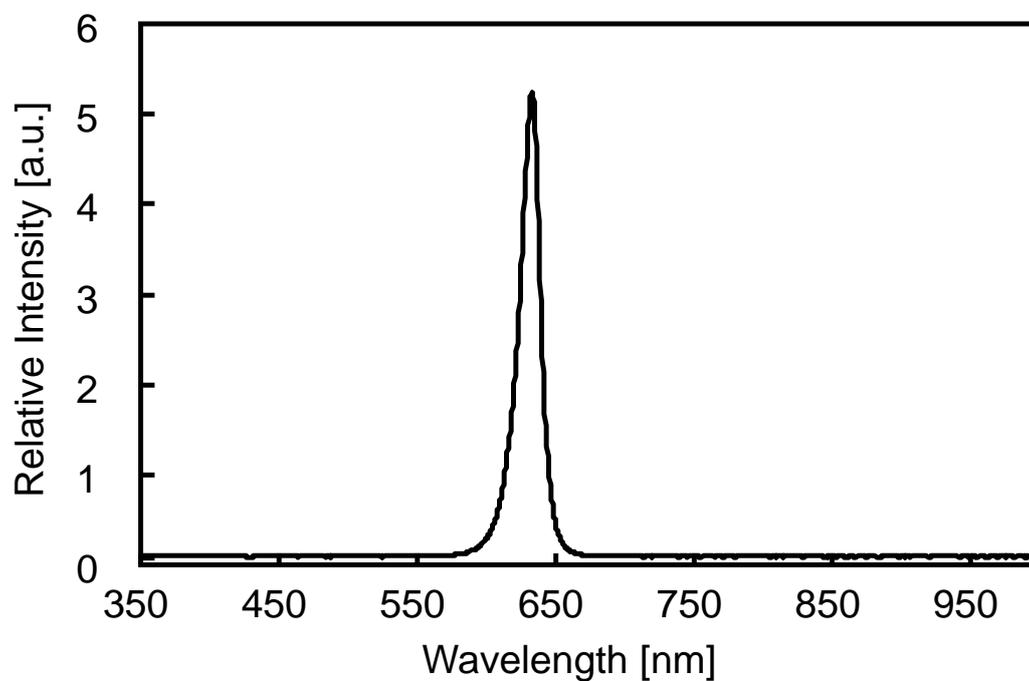


Fig. 4-2 光照射装置

(A) 光照射装置の概観 (B) 光照射装置の発光スペクトル

HPLC を用いた PpIX 定量

細胞に適当な濃度の ALA を添加した後、4 時間培養した。PBS (-) で洗浄後、200 μ l の 0.1 N NaOH を加え溶解した。その後、サンプルの一部を回収し、Quick Start™ Bradford プロテインアッセイ (Bio-Rad Laboratories, Inc, CA) を用いてタンパク質量を定量した。残りのサンプルから 50 μ l 回収し、pH 5.2 に調製した 12.5%アセトニトリル含有 1 M 酢酸アンモニウム溶液である移動相 A と、80%アセトニトリル含有 50 mM 酢酸アンモニウム溶液である移動相 B の混合液 (1 : 9、v/v) を 150 μ L 加え攪拌した。4°C、10,000 \times g で 10 分間遠心分離し、変性タンパク質の沈殿を除いて得られた上清を PpIX 抽出液として HPLC 解析に用いた[116–118]。

PpIX の HPLC 解析には、40°C に維持した逆相 C18 カラム (CAPCELL PAK, C18, SG300, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm, 資生堂、東京) を備えた Prominence システム (島津製作所、京都) を使用した。溶出プログラムは移動相 A : 移動相 B = 1 : 9 で開始し、流速 2 mL/min で 7 分間送液した。サンプル中の PpIX 濃度は分光検出器を用いて励起波長 404 nm、蛍光波長 624 nm で検出し、標準物質で作成した検量線に基づいて算出した。内部標準には Bradford 法によって算出したタンパク質量を用いた。

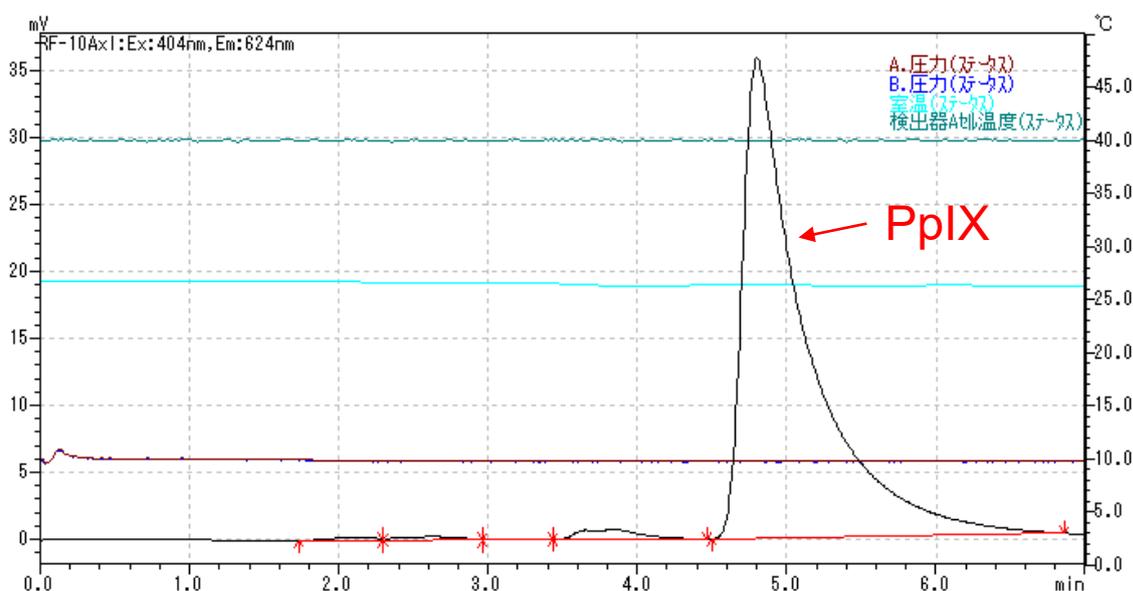


Fig. 4-3 PpIX 標準物質を検出したときの HPLC クロマトグラム

MTT 試験による細胞生存率測定

MTT 試薬 (5 mg / ml) を培養液に添加後、4 時間培養した。その後、培養液と同量の 10% (w / v) SDS を加え一晩培養した。MTT 代謝物であるホルマザンは測定波長 570 nm、基準波長 655 nm における吸光度を Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により測定した。

シュウ酸法を用いたヘム定量

培養細胞を PBS (-) で洗浄した後、400 μ L の 0.02 N NaOH で溶解した。40 μ L の細胞溶解液と 960 μ L の 2 M シュウ酸を混合し、混合液を 95°C で 30 分間加熱した。これにより細胞溶解液中のヘム 1 分子が PpIX 1 分子へと変換される[119]。混合液を充分ピペッティングした後、4°C、5,000 \times g で 10 分間遠心分離し、上清を測定溶液とした。SBI ファーマ株式会社 (東京) より供与された蛍光測定器により、励起波長 405 nm、蛍光波長 605 nm、基準波長 750 nm で PpIX を検出し、標準物質で作成した検量線に基づいて PpIX 濃度を算出した。95°C で加熱したサンプルの PpIX 濃度から、加熱しなかったサンプルの PpIX 濃度を引くことで、ヘム濃度を算出した。

SYBR Green I 検出系を用いた qRT-PCR による mRNA 発現解析

培養細胞からの total RNA 抽出には NucleoSpin[®] RNA II (MACHERY-NAGEL, Düren, Mannheim, Germany) を使用した。抽出した total RNA を鋳型に、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa バイオ、滋賀) を使用して、1 μ g の完全長 1 本鎖 cDNA を逆転写反応によって合成した。各遺伝子の mRNA 発現量を、SYBR Premix ExTaq (TaKaRa バイオ、滋賀) を用いて Thermal Cycler Dice[®] Real Time System Single (TaKaRa バイオ、滋賀) によって測定した。各遺伝子に特異的なプライマーとしては Table. 4-1 に示す通りである。各標的遺伝子の発現量は内部標準として測定した Actin β の発現量で標準化した。

Table. 4-1 第4章で使用した qRT-PCR 用プライマー

Gene	F / R	Primer sequence	Amplicon
ALAS1	Forward	AACCATGCCTCCATGATCCAA	199 bp
	Reverse	ACTCATGGGCCACATCACACA	
PAI-1	Forward	GCATGACCTACCAGGACAGAACT	147 bp
	Reverse	TCCGAGCTGCCTGTCTCTCT	
HO-1	Forward	GCTCAAAAAGATTGCCAGAA	429 bp
	Reverse	TCACATGGCATAAAGCCCTACA	
REV-ERB α	Forward	TGCTTAAGGCTGGCACCTTTG	160 bp
	Reverse	CTGAAGTCGAACATGGCACTGAG	
BMAL1	Forward	GCCTACTATCAGGCCAGGCTCA	149 bp
	Reverse	AGCCATTGCTGCCTCATCATTAC	
p21	Forward	GCAGACCAGCATGACAGATTT	70 bp
	Reverse	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA	
ACTIN β	Forward	TGGCACCCAGCACAAATGAA	186 bp
	Reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	

DCFH-DA を用いた ROS 発生量測定

培養細胞に ALA を添加して 4 時間培養した。PBS (-) で洗浄した後、培地を無血清培地に交換し、10 μ M の DCFH-DA を添加した。30 分培養した後に培地を破棄し、1 mL の Hanks' Balanced Salt solution (HBSS(-)) (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) を加えた。635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で 5 分間光照射した後に HBSS (-) を破棄し、再度 200 μ L の HBSS (-) を細胞に加え、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。その後回収した溶液を HBSS (-) で適宜希釈し、分光蛍光光度計 F-7000 (株式会社日立ハイテクサイエンス, 東京) を用いて蛍光を測定した。DCFH-DA の代謝物である DCFH が ROS と反応することによって生成する DCF は、励起波長 480 nm、蛍光波長 522 nm で検出した (Fig. 4-4)。

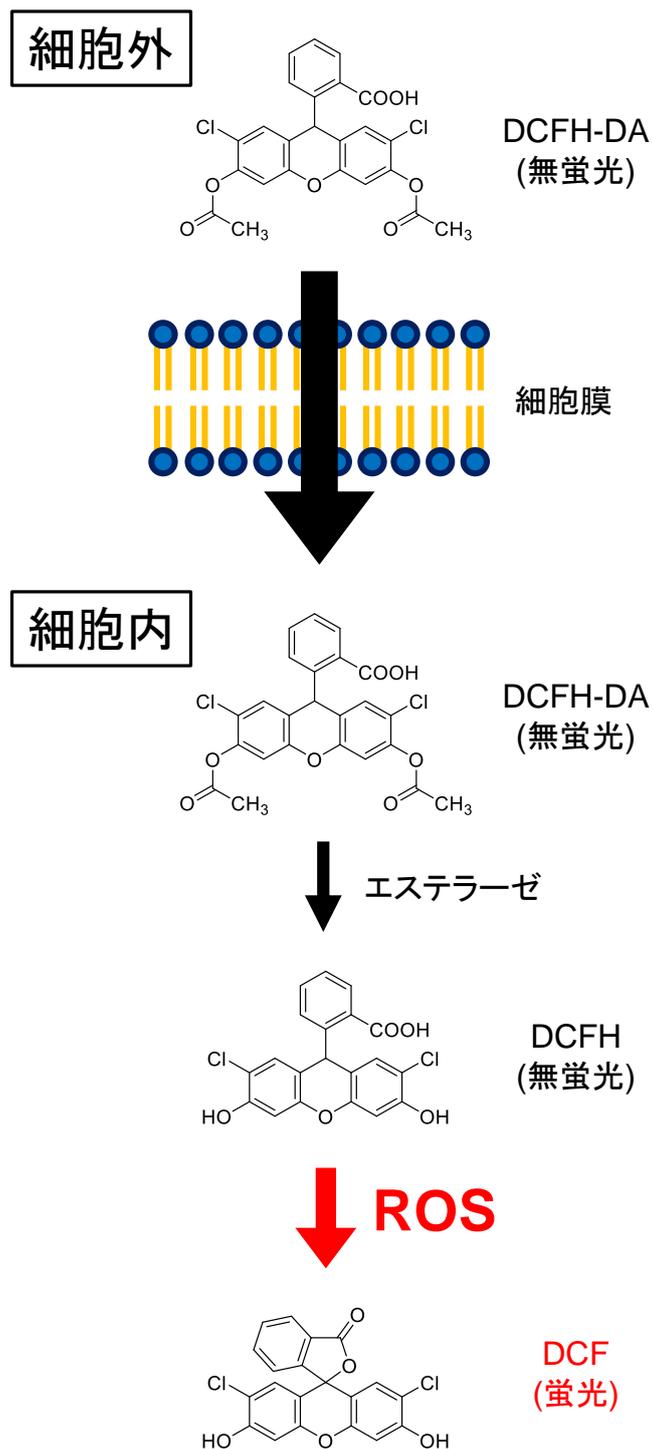


Fig. 4-4 DCFH-DAを用いた ROS の検出

DCFH-DA は無蛍光物質であり、細胞膜を通過して細胞内に入る。DCFH-DA は細胞内でエステラーゼにより無蛍光物質である DCFH に変換される。DCFH は ROS による攻撃を受けて蛍光物質である DCF に変換される。本研究ではこの DCF の蛍光を測定し、ROS 発生の目安とした。

4-3 結果と考察

4-3-1 ALA 添加後の光照射による細胞生存率評価

本章では ALA 添加とその後の光照射によって遺伝子発現が変化する様子の観察を目的とする。よって、ALA 添加後の光照射によって培養細胞が死滅しないような条件を見出すために、以下の実験を行った。

はじめに、ALA 添加により細胞内に光増感分子である PpIX が蓄積することを確認した (Fig. 4-5)。ヒト胎児腎由来細胞株 HEK293 に対し ALA を添加し、4 時間培養した後に細胞溶解液を回収した。細胞溶解液を HPLC によって解析し、細胞内に蓄積した PpIX を定量した。Fig. 4-5 より、ALA 500 μ M 以上では細胞内に PpIX が蓄積することが示された。ゆえに、500 μ M 以上の ALA を細胞に添加し 4 時間培養した後に光照射を行うと、ROS が発生し、細胞が死滅する可能性があることが示唆された。

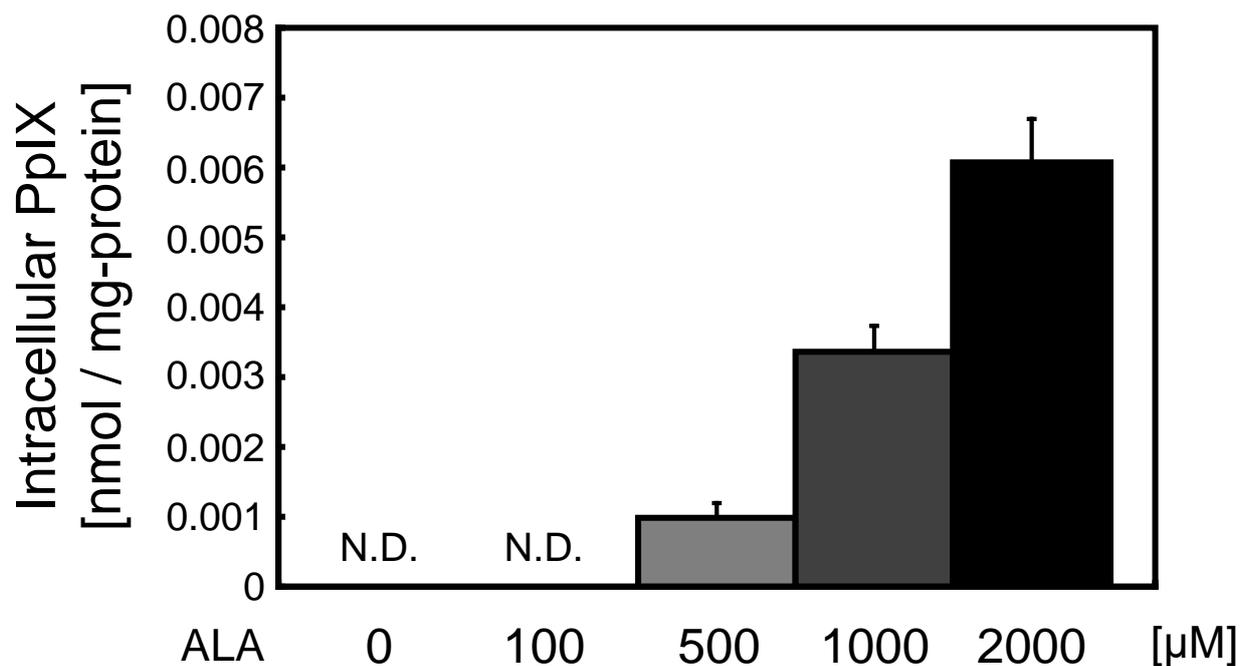


Fig. 4-5 ALA 添加による光増感分子 PpIX の蓄積

ALA 添加後 4 時間時点の細胞内 PpIX 量を HPLC により定量した。細胞溶解液中のタンパク質量を Bradford 法により測定し、内部標準として用いた。N.D.は PpIX が検出されなかったことを表す。(n = 3.)

続いて、実際に ALA 添加後に光照射を行い、細胞が死滅するか確認した (Fig. 4-6)。細胞に ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に光照射を 5 分間行った。光照射から 24 時間培養した後に、細胞死判定法のひとつである MTT 法により細胞生存率を測定した。Fig. 4-6 より、ALA 1000 μM 以上では光照射により細胞死が観察された。一方で、ALA 500 μM 以下では細胞死が観察されなかった。よって本章の以降では、ALA 500 μM を添加し 4 時間培養した後に 5 分間光照射を行う条件で実験を進めることとした。

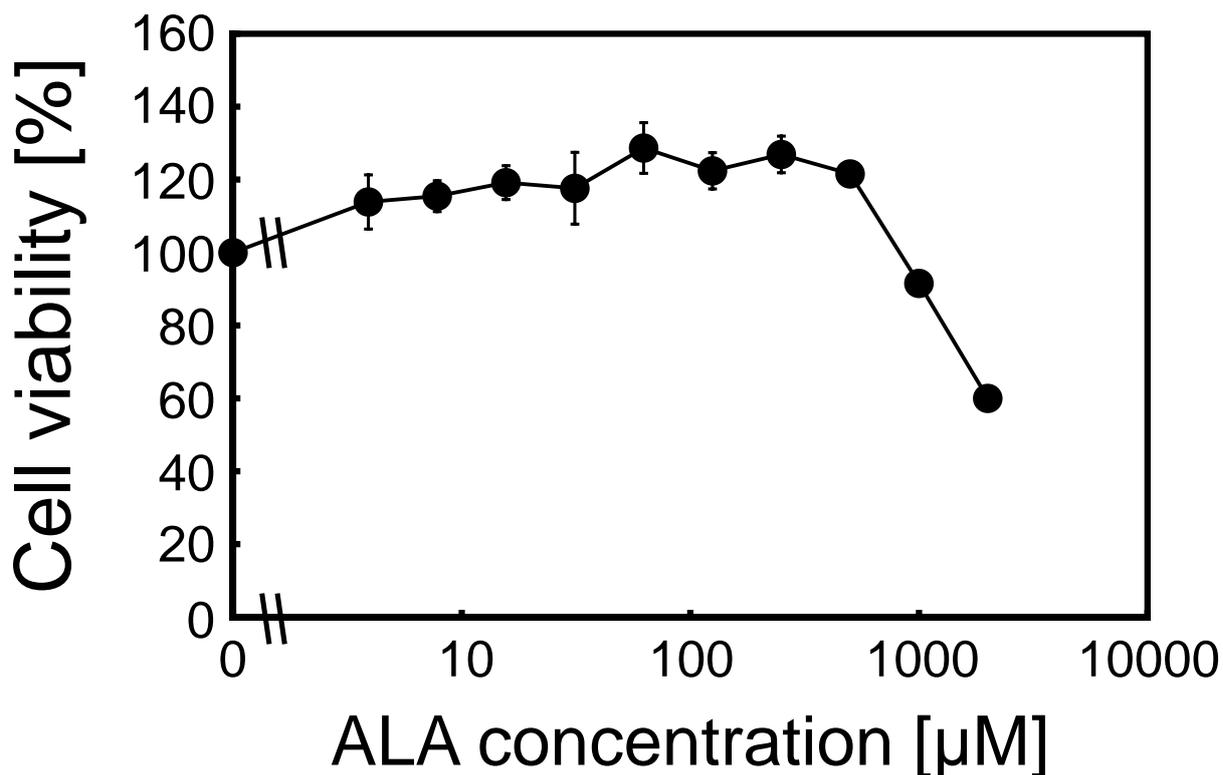


Fig. 4-6 光照射 24 時間後の細胞生存率

ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、24 時間培養した後に MTT 法により細胞生存率を測定した。ALA 0 μM (ALA 非添加群) における吸光度を 100% とし、細胞生存率を算出した。グラフの右から 1 つ目のマーカーが ALA 2000 μM (生存率 60.0%)、2 つ目のマーカーが ALA 1000 μM (生存率 91.5%)、3 つ目が ALA 500 μM (生存率 121.6%) を表す。(n = 6.)

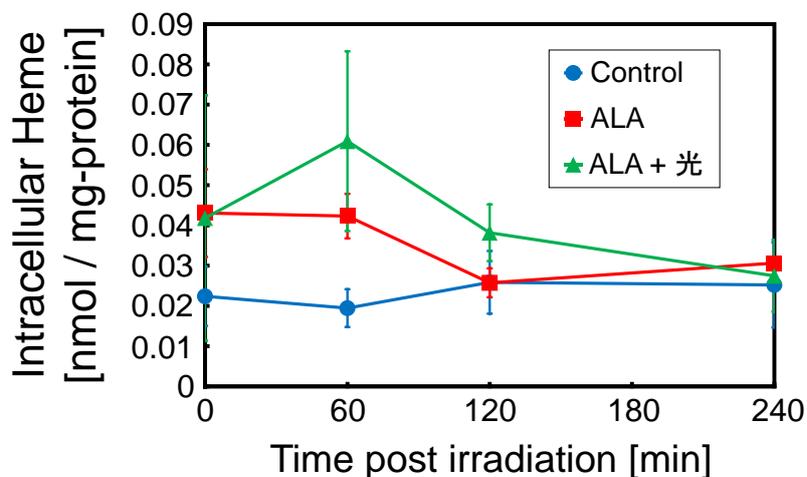
4-3-2 ALA 添加後の細胞内ヘム蓄積とヘム応答性遺伝子の発現変化

ヘムは多くのタンパク質の補欠分子族としてはたらく。ヘムをリガンドにもつタンパク質には転写因子が含まれており、細胞内ヘム量に応答して様々な遺伝子の発現が変化している[113–115,120,121]。本項では、細胞に ALA を添加することによって細胞内にヘムを蓄積させ、それにより遺伝子発現を変化させることができるか検証した。

はじめに、ALA 添加によって細胞内にヘムが蓄積することを確認した (Fig. 4-7(a))。細胞に 500 μ M の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に 5 分間光照射を行った。その後、所定の時刻に細胞溶解液を回収し、シュウ酸法によって細胞内ヘム量を測定した。Fig. 4-7(a)より、光照射の有無にかかわらず、ALA 添加によって細胞内にヘムが蓄積することが示された。特に、光照射後 1 時間時点で顕著なヘムの蓄積が観察された。このことから、ALA 添加によってヘム応答性遺伝子の発現が変化する可能性が示唆された。

続いて、ALA 添加によってヘム応答性遺伝子の発現が変化するか調べた。ALA synthase-1 (ALAS1) はヘム応答性転写因子である REV-ERB α などによりその発現が調節される遺伝子である[122,123]。そこで、ALAS1 の発現を確認した (Fig. 4-7(b))。細胞に 500 μ M の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に 5 分間光照射を行った。その後、細胞内にヘムが蓄積していた光照射 1 時間後に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって ALAS1 の発現を解析した。Fig. 4-7(b)より、光照射の有無にかかわらず、ALA 添加によって ALAS1 の発現が減少した。このことから、ALA 添加によって細胞内にヘムが蓄積し、それによりヘム応答性遺伝子の発現が変化することが示唆された。ゆえに、ALA 添加によってヘムに応答する多くの遺伝子の発現を調節できると期待できる。

(a)



(b)

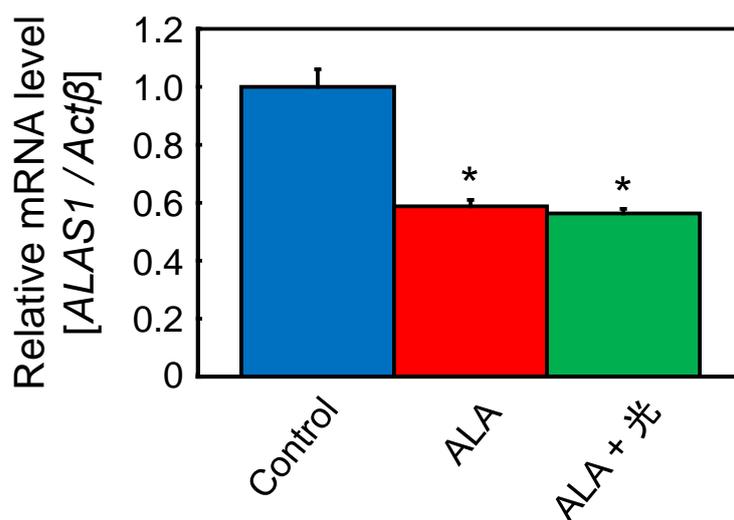


Fig. 4-7 ALA 添加によるヘム応答性遺伝子の発現変化

(a) 500 μ M ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、その後回収した細胞溶解液中のヘムを定量した。(n = 3.)

(b) 500 μ M ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、1 時間後に mRNA を回収した。逆転写反応を用いて mRNA から cDNA を作製し、qRT-PCR 法により ALAS1 の発現を解析した。Actin β の発現を内部標準として用いた。*; p < 0.01 vs. Control. (n = 2.)

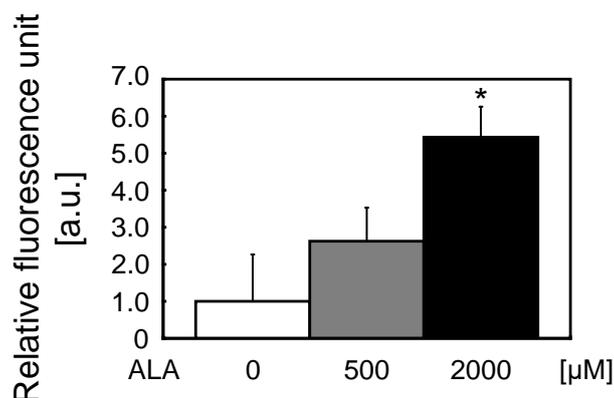
4-3-3 ALA 添加後の光照射による ROS の発生

細胞に対する ALA の添加は、細胞内に PpIX の蓄積を引き起こす (Fig. 4-5)。PpIX に対して光照射を行うと ROS が発生し、その ROS によって様々な遺伝子発現が変化すると予想される。本項では、ROS による遺伝子発現変化を観察する準備として、ALA 添加後の光照射によって実際に ROS が発生することを確認した。

はじめに、ROS 測定用蛍光プローブ DCFH-DA を用いて、ALA 添加後の光照射によって発生した ROS を定量した (Fig. 4-8(a))。細胞に 500 μM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、DCFH-DA を添加した。30 分後に光照射を行い、回収した細胞中の蛍光を測定した。Fig. 4-8 より、ALA 2000 μM では非常に高い蛍光が観察された。このことから、ALA 2000 μM 添加後の光照射は、細胞内に大量の ROS を発生させることが示唆された。また ALA 500 μM では、ALA 0 μM と有意差はないものの高い蛍光が得られた。このことから、ALA 500 μM 添加後の光照射は、細胞内に微量の ROS を発生させることが示唆された。以上を踏まえると、Fig. 4-6 において ALA 2000 μM で細胞が 40%ほど死滅していた原因は、ROS が大量に発生したためであると考えられる。一方で、Fig. 4-6 において ALA 500 μM では細胞がすべて生存していた。よって ALA 500 μM 添加後の光照射は、細胞への傷害をある程度抑えつつ遺伝子発現を変化させることが期待できる。

Plasminogen activator inhibitor -1 (PAI-1)は ROS によって発現が誘導されることが広く知られている遺伝子である[124]。そこで、ALA 添加後の光照射によって PAI-1 の発現が上昇するか確かめた (Fig. 4-8(b))。細胞に 500 μM の ALA と ROS の消去剤である N-Acetyl-L-cysteine (NAC)を 10 mM 添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に 5 分間光照射を行った。光照射 4 時間後に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって PAI-1 の発現を解析した。Fig. 4-8 より、ALA 添加のみでは PAI-1 の発現は上昇しなかったが、ALA 添加後に光照射を行うと PAI-1 の発現が上昇した。また、ALA と NAC を共添加した後に光照射を行った場合、NAC を添加しなかった場合と比較して PAI-1 の発現は大きく減少した。以上より、ALA 添加後の光照射による ROS の発生が遺伝子応答からも示唆された。

(a)



(b)

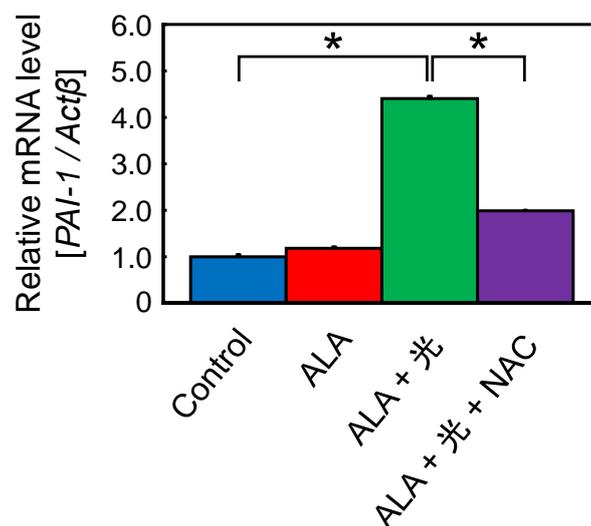


Fig. 4-8 ALA 添加後の光照射による ROS の発生

(a) ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、ROS 測定用蛍光プローブ DCFH-DA を用いて発生した ROS を定量した。細胞溶解液中のタンパク質量を Bradford 法により測定し、内部標準として用いた。ALA 0 μM (非添加) 群の蛍光強度を 1.0 とした。*; p < 0.01 vs. Control. (n = 3.)

(b) 500 μM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、4 時間後に mRNA を回収した。逆転写反応を用いて mRNA から cDNA を作製し、qRT-PCR 法により PAI-1 の発現を解析した。Actinβ の発現を内部標準として用いた。Control の発現を 1.0 とした。*; p < 0.001. (n = 2.)

Heme oxygenase -1 (HO-1) はヘムを分解する酵素であり、細胞内にヘムが蓄積するとその発現が誘導される[125]。一方で、HO-1 は ROS の発生によっても発現が誘導される遺伝子である[126]。これは、HO-1 によってヘムが分解されると、抗酸化分子であるビリベルジンが産生するためであると考えられている[127-130]。それゆえ HO-1 はヘム分解だけではなく、抗酸化酵素としての役割も担っている。ここでは、ALA 添加後に光照射を行い、HO-1 の発現を測定することで、ヘム蓄積と ROS 発生の目安とした (Fig. 4-9)。細胞に 500 μ M の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に 5 分間光照射を行った。その後、所定の時刻に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって HO-1 の発現を解析した。Fig. 4-9 より、光照射 0 分後 (ALA 添加から 4 時間後) には、ALA 群・ALA + 光群ともに HO-1 の発現が上昇した。これは ALA 添加によって細胞内にヘムが蓄積したためと考えられる。また光照射から 120 分以降では、ALA + 光群の発現がさらに上昇した。この上昇分は、ALA 添加後の光照射によって発生した ROS の影響であると考えられる。以上より、ALA 添加により細胞内にヘムが蓄積し、さらに光照射を行うことによって ROS が発生することが改めて示された。

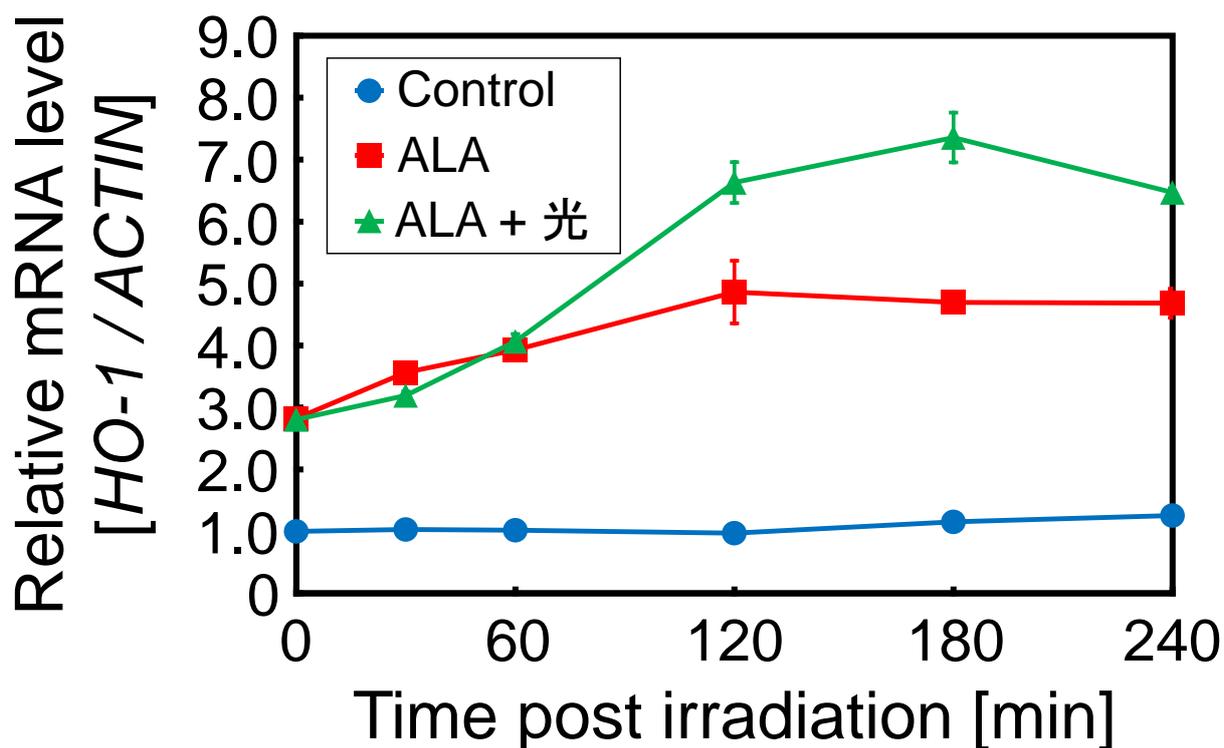


Fig. 4-9 光照射後のHO-1発現

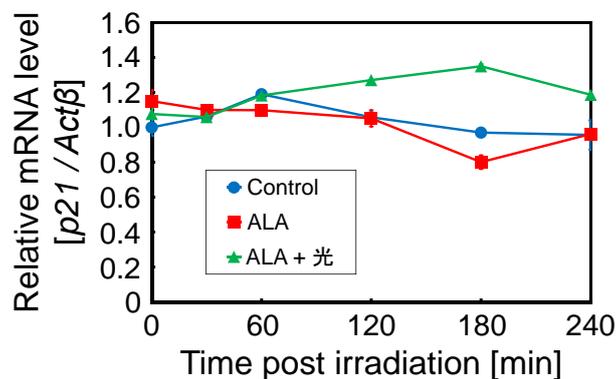
500 μ M ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、qRT-PCR 法により HO-1 の発現を解析した。Actin β の発現を内部標準として用いた。横軸 0 min 時の Control の発現を 1.0 とした。(n = 2.)

4-3-4 ALA 添加後の光照射による遺伝子発現変化

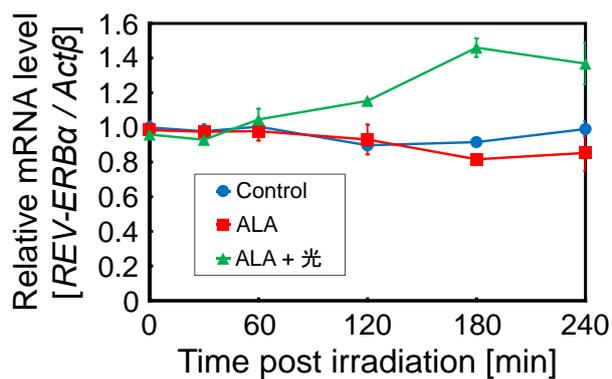
これまでの結果より、ALA 添加後の光照射は REV-ERB α の転写因子活性を上昇させつつ、細胞内に ROS を発生させることが示された。そこで本項では、ROS により実際に発現が変化する遺伝子を探索した。細胞に 500 μ M の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に 5 分間光照射を行った。その後、所定の時刻に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって種々の遺伝子の発現を解析した。実験の結果、ALA 添加後の光照射によって 3 つの遺伝子の発現が変化した (Fig. 4-10)。p21 は細胞周期関連遺伝子のひとつであり、細胞周期の G₁ 期から S 期へ移行するのを妨げるはたらきをもつ[131,132]。また、HO-1 の下流に p21 が存在する報告があり[133]、Fig. 4-9 にて認められた HO-1 の発現亢進に伴って p21 の発現が亢進する可能性がある。REV-ERB α と BMAL1 は体内時計を調節する時計遺伝子のひとつである[134–136]。これらの遺伝子は、ALA 添加のみでは発現が変化しなかったが、ALA 添加後に光照射を行うと発現が上昇した。よって、ALA 添加後の光照射は様々な遺伝子の発現を変化させ、その結果生理機能を制御できる可能性が考えられる。

続いて、ALA と同時に ROS 消去剤である NAC を添加した後に光照射を行い、p21、REV-ERB α 、BMAL1 の発現を解析した。Fig. 4-11 より、ALA と NAC を共添加した後に光照射を行った場合、NAC を添加しなかった場合と比較して各遺伝子の発現は減少し、かつ Control と同程度になった。このことから ALA 添加後の光照射によって種々の遺伝子発現が変化した原因は ROS にあることが示唆された。

(a)



(b)



(c)

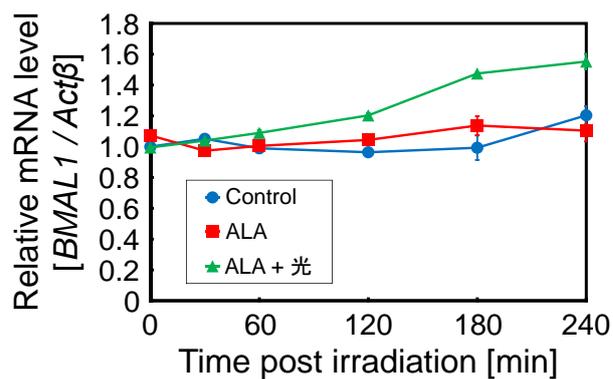
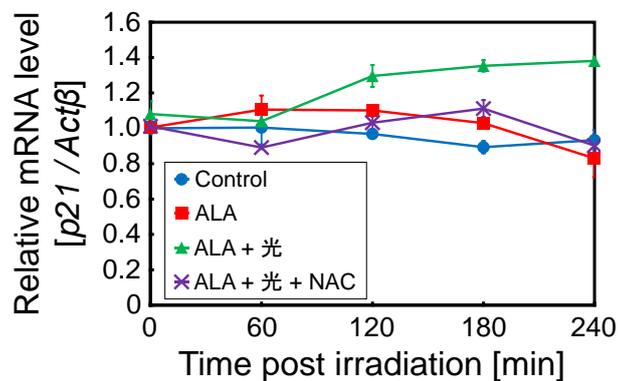


Fig. 4-10 光照射後の種々の遺伝子発現

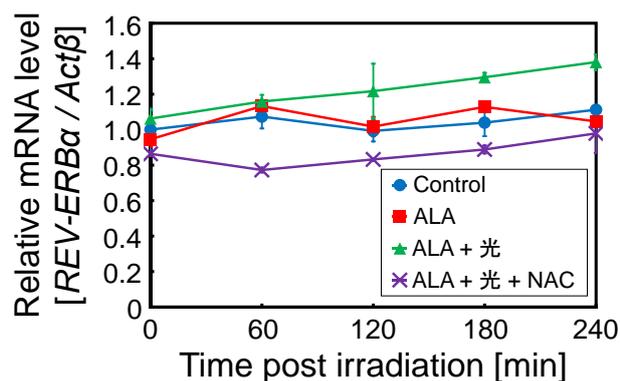
500 μ M ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、qRT-PCR 法により各遺伝子の発現を解析した。Actin β の発現を内部標準として用いた。横軸 0 min 時の Control の発現を 1.0 とした。(n = 2.)

- (a) p21 の mRNA 発現
- (b) REV-ERB α の mRNA 発現
- (c) BMAL1 の mRNA 発現

(a)



(b)



(c)

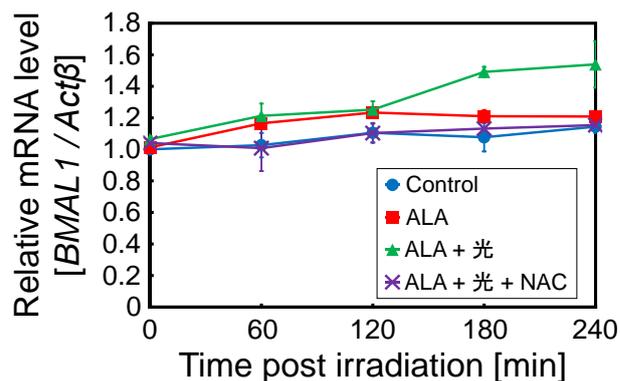


Fig. 4-11 ROS 消去剤を添加した場合の遺伝子発現

500 μ M ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、qRT-PCR 法により各遺伝子の発現を解析した。Actin β の発現を内部標準として用いた。横軸 0 min 時の Control の発現を 1.0 とした。(n = 2.)

- (a) p21 の mRNA 発現
- (b) REV-ERB α の mRNA 発現
- (c) BMAL1 の mRNA 発現

4-4 結言

ROSは酸化ストレスの原因となる分子だが、同時に生理機能を制御する役割をもっている。そのため、生体内においてはROSの濃度が適切に保たれており、細胞を傷害することなく多くのシグナル伝達や遺伝子発現が制御されている。本章では、ALAと赤色光を用いて、正常細胞において微量のROSを発生させることによって種々の遺伝子の発現変化を解析した。また、ALA添加によって細胞内に蓄積したヘムによっても遺伝子発現の変化が起こるか検証した。

はじめに、ALA添加後の光照射によって、細胞死が起こらない条件を見つけた (Fig. 4-6)。次に、その条件下で細胞内にヘムが蓄積し、それによって遺伝子発現の変化が起こることを確かめた (Fig. 4-7)。ヘムはREV-ERB α をはじめとした様々な遺伝子の転写因子活性を調節している[113–115]。ALAS1はREV-ERB α によって発現が調節される遺伝子であることから[122]、細胞に対するALA添加によりREV-ERB α の転写因子活性が上昇したことが示唆された。また、ヘムをリガンドにもつその他の転写因子の活性も変化していると予想できる。つづいて、ALA添加によって細胞内にPpIXが蓄積し、その後の光照射によってROSが発生することを確認した (Fig. 4-8)。そして、発生したROSによって種々の遺伝子発現が変化していることを確かめた (Fig. 4-10, 4-11)。p21は細胞周期のG₁期からS期への移行を妨げる遺伝子である[131]。今回の結果から、ALA添加後の光照射は細胞周期の移行を停滞させ、細胞増殖を抑制できることが示唆された。一方で、REV-ERB α とBMAL1は体内時計を調節する時計遺伝子のひとつである[134–136]。このことから、ALA添加後の光照射は体内時計機能に影響をあたえることができると示唆された。本章より、ALAと光照射はヘムやROSを介して、細胞増殖を始めとする多くの生理現象を制御できることが示唆された。

第5章

ALA添加後の低用量光照射が がん細胞増殖に与える影響

5-1 緒言

5-2 実験方法

5-3 結果と考察

5-3-1 ALA添加後の光照射による細胞生存率評価

5-3-2 ALA添加後の光照射による遺伝子発現変化

5-3-3 ALA添加後の光照射によるがん細胞増殖抑制

5-3-4 ALA添加後の光照射による細胞周期関連遺伝子の発現変化

5-4 結言

5-1 諸言

第4章より、細胞に対する ALA 添加後の光照射は、種々の遺伝子発現を変化させることが示された。特に Fig. 4-10 および 4-11 において確認された p21 の発現亢進はがん細胞の細胞増殖を抑制する可能性がある。この知見を踏まえて、第5章では、正常細胞株ではなく、第2章および第3章において用いたヒト前立腺がん由来細胞株 PC-3、加えてヒト胃がん由来細胞株 MKN45 を選択して検証した。

生体内の腫瘍に光照射を行うと、腫瘍表面には光が直接当たり大量の ROS が発生するため、表面のがん細胞は死滅する。しかし、照射面から遠い腫瘍深部やスフェロイド深部では、光が組織を通過することによって減衰するため、十分量の ROS が発生せず、細胞死が生じない(Fig. 5-1)[137,138]。つまり、ALA-PDT には腫瘍深部のがん細胞を死滅させづらいという問題点があるといえる。この問題点は、現在の技術で解決しきれものではない。一方で ALA-PDT 後の腫瘍深部のがん細胞は、細胞死が起こらない程度の ROS により刺激を受けており、治療の前後で細胞の性質が変化している可能性がある。第4章でみられた現象ががん細胞でも引き起こされるとすれば、腫瘍深部のがん細胞の遺伝子発現は ALA-PDT の前後で変化していると予想できる(Fig. 5-1)。また、遺伝子発現の変化に伴い、生理機能にも変化が生じている可能性がある。そこで本章では、ALA-PDT を行った後の腫瘍深部のがん細胞を始めとした、光照射量が十分でなかったために細胞死まで至らなかった細胞を想定して実験モデルを構築した。つまり、ALA 添加後に低用量光照射を行って、がん細胞株に細胞死が起こらない程度の ROS を発生させ、その後の遺伝子発現の変化を測定した。また、細胞周期関連遺伝子の発現変化に注目し、細胞増殖の抑制についても併せて検証した。

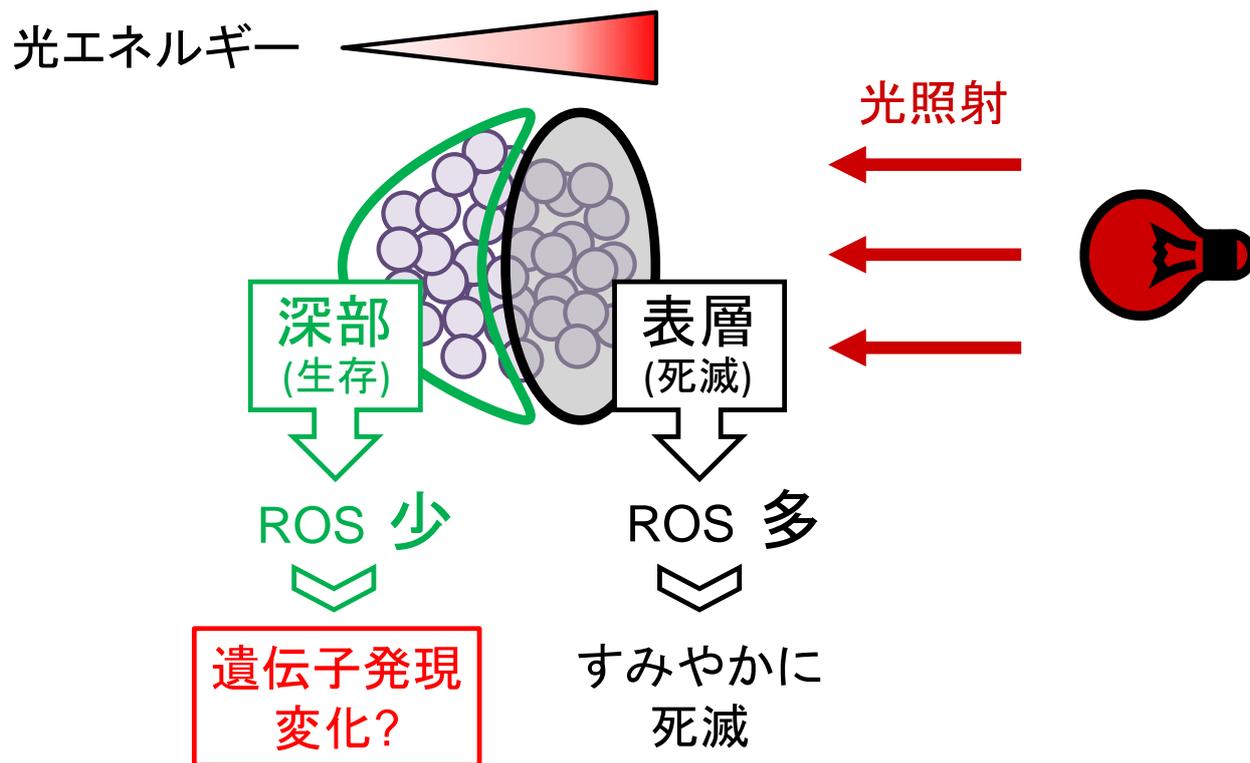


Fig. 5-1 生体の腫瘍に対して ALA-PDT を行った際の細胞の応答

5-2 実験方法

試薬

アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid, ALA) 塩酸塩はコスモ石油株式会社 (東京) から購入した。[3-(4, 5-Dimethylthial-2-yl)-2, 5-Diphenyltetrazolium Bromide] (MTT 試薬)、RPMI1640 培地、Antibiotic-Antimycotic Mixed Stock Solution (ABAM)、Protease inhibitor cocktail は Nacalai Tesque (京都) から購入した。ウシ胎児血清 (FBS) は Biowest (Nuaille, France) から購入した。その他、すべての試薬は分析グレードのものを使用した。

細胞培養

ヒト胃がん由来細胞株 MKN45 は理研 BRC (茨城) より購入した。ヒト前立腺がん由来細胞株である PC-3 細胞は井上啓史博士 (高知大学) から供与された。細胞は 10% の非働化 FBS、ABAM を添加した RPMI1640 培地で 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養した。

MKN45, PC-3 に対する ALA 添加と光照射

MKN45, PC-3 を 35-mm dish もしくは 96-well plate (ともに Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) に播種した。35-mm dish に対しては 0.5×10^6 個もしくは 0.05×10^6 個の細胞を播種し、96-well plate に対しては 35-mm dish の場合と同様の細胞密度となるよう播種した。一晚培養した後培地交換を行い、適当な濃度で ALA を細胞に添加した。さらに 4 時間培養した後に 5 分間光照射し、以降の実験を行った。光照射装置は SBI ファーマ株式会社 (東京) から供与された (Fig. 4-2)。

MTT 試験による細胞生存率測定

MTT 試薬 (5 mg / ml) を培養液に添加後、4 時間培養した。その後、培養液と同量の 10% (w / v) SDS を加え一晚培養した。MTT 代謝物であるホルマザンは測定波長 570 nm、基準

波長 655 nm における吸光度を Multiskan FC 吸光マイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により測定した。

SYBR Green I 検出系を用いた qRT-PCR による mRNA 発現解析

培養細胞からの total RNA 抽出には NucleoSpin® RNA II (MACHERY-NAGEL, Düren, Mannheim, Germany) を使用した。抽出した total RNA を鋳型に、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa バイオ、滋賀) を使用して、1 µg の完全長 1 本鎖 cDNA を逆転写反応によって合成した。各遺伝子の mRNA 発現量を、SYBR Premix ExTaq (TaKaRa バイオ、滋賀) を用いて Thermal Cycler Dice® Real Time System Single (TaKaRa バイオ、滋賀) によって測定した。各遺伝子に特異的なプライマーとしては Table 3-1 に示す通りである。各標的遺伝子の発現量は内部標準として測定した Actinβ の発現量で標準化した。

Table 5-1 第5章で使用した qRT-PCR 用プライマー

Gene	F / R	Primer sequence	Amplicon
REV-ERBα	Forward	TGCTTAAGGCTGGCACCTTTG	160 bp
	Reverse	CTGAAGTCGAACATGGCACTGAG	
BMAL1	Forward	GCCTACTATCAGGCCAGGCTCA	149 bp
	Reverse	AGCCATTGCTGCCTCATCATTAC	
p21	Forward	GCAGACCAGCATGACAGATTT	70 bp
	Reverse	GGATTAGGGCTTCCTCTTGGA	
ACTINβ	Forward	TGGCACCCAGCACAAATGAA	186 bp
	Reverse	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA	

Western blotting を用いたタンパク質の発現解析

タンパク質発現解析のために、所定の処理を行った各細胞から細胞溶解液を以下の手順で調製した[89]。細胞を PBS (-) で洗浄後、Lysis buffer A (+) [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM N-methylmaleimide, 1 mM DTT, 1% (v / v), 1% (v / v) Triton X-100, and Protease inhibitor cocktail (Nacalai Tesque, 京都)]で処理した。サンプルは 27G の注射針を用いて 10 回、ホモ

ジナイズを行った。1,000 × g、4°C、10 分間遠心分離を行って得られた上清を細胞溶解液として回収し、以後の実験に使用した。

サンプルは SDS-PAGE サンプルバッファーで処理した。その後、サンプル中のタンパク質溶液は 7.5%もしくは 15%のポリアクリルアミドゲルで SDS-PAGE によって分離した。分離したタンパク質は Immobilon-P PVDF membrane (Millipore Corp., MA) に転写後、5% (w/v) スキムミルクを溶解した TTBS [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20] で、1 時間以上室温でブロッキングした。1 次抗体には、抗ヒト p21 抗体 (sc-397, 1:200 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Texas, United States)、抗ヒト Ki-67 抗体 (ab15580, 1:1000 dilution; Abcam, Cambridge, UK)、抗ヒト Actin 抗体 (691001, 1:500 dilution, MP Biomedicals, Santa Ana, United States) をそれぞれ使用した。2 次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) を結合した抗マウス IgG 抗体および抗ラビット IgG 抗体 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) を 3,000 倍希釈で使用した。HRP の基質である Western Lightning Chemiluminescent Reagent Plus (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA) もしくは Western BLoT Ultra Sensitive HRP Substrate (TaKaRa Bio, 滋賀) を用いて化学発光によってタンパク質を検出した。発光は Lumino Imaging Analyzer LAS-4000 mini (GE Healthcare UK, Amersham Place, England) で検出した。

トリパンブルー染色を用いた細胞増殖評価

約 24 時間おきにトリプシンを用いて細胞を回収した。回収した細胞はトリパンブルーで生死判定を行い、生細胞数を計測した。縦軸に細胞数、横軸に回収時刻をとるグラフを作成し、細胞増殖曲線とした。

PrimerArray[®]を用いた細胞周期関連遺伝子発現の網羅解析

培養細胞からの total RNA 抽出には NucleoSpin[®] RNA II (MACHERY-NAGEL, Düren, Mannheim, Germany) を使用した。抽出した total RNA を鋳型に、PrimeScript RT reagent Kit

with gDNA Eraser (TaKaRa バイオ、滋賀) を使用して、1 μ g の完全長 1 本鎖 cDNA を逆転写反応によって合成した。その後、PrimerArray[®] Cell cycle (Human) (TaKaRa バイオ、滋賀) を用いて細胞周期関連遺伝子の発現を網羅的に測定した。測定結果は PrimerArray Analysis Tool Ver.2.2 (TaKaRa バイオ、滋賀) を用いて解析した。

5-3 結果と考察

5-3-1 ALA 添加後の光照射による細胞生存率評価

ヒト胃がん由来細胞株 MKN45、ヒト前立腺がん由来細胞株 PC-3 に対して ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に光照射を 5 分間行った。光照射から 24 時間培養した後に、細胞死判定法のひとつである MTT 法により細胞生存率を測定した。

Fig. 5-2 より、高濃度の ALA を添加した場合、光照射により細胞死が観察された。特に、高濃度である ALA 1 mM のとき顕著な細胞死が観察された。

続いて、Fig. 5-1 にあるような腫瘍深部のがん細胞を平面培養で再現できる ALA-PDT 条件を探索した。表層の細胞と比較して、深部の細胞では照射された光が組織を通過する際に減衰しているため、吸収できる光エネルギーは小さくなると考えられる。よって、照射する光の強度を落とすことによって細胞が死滅しない条件を決定した。MKN45、PC-3 に対して 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、様々な出力で光照射を 5 分間行った。光照射から 24 時間培養した後に、細胞死判定法のひとつである MTT 法により細胞生存率を測定した。また、第 3 章において細胞密度と PpIX 蓄積量が顕著に相関することが判明したため、細胞の播種濃度を 5.0×10^5 cells / 35-mm dish と同等の濃度 (Fig. 5-3(a)(b))、 5.0×10^4 cells / 35-mm dish と同等の濃度 (Fig. 5-3(c)(d)) の 2 種類用意した。 5.0×10^5 cells / 35-mm dish の濃度では光強度 0.696 mW/cm^2 以上で細胞死が観察された (Fig. 5-3(a)(b))。また、 5.0×10^4 cells / 35-mm dish の濃度では、MKN45 は 1.10 mW/cm^2 以上、PC-3 は 1.47 mW/cm^2 以上で細胞死が観察された (Fig. 5-3(c)(d))。これらより、以降の実験では Table 5-2 で示すような細胞が死滅しない条件で実験を進めることとした。

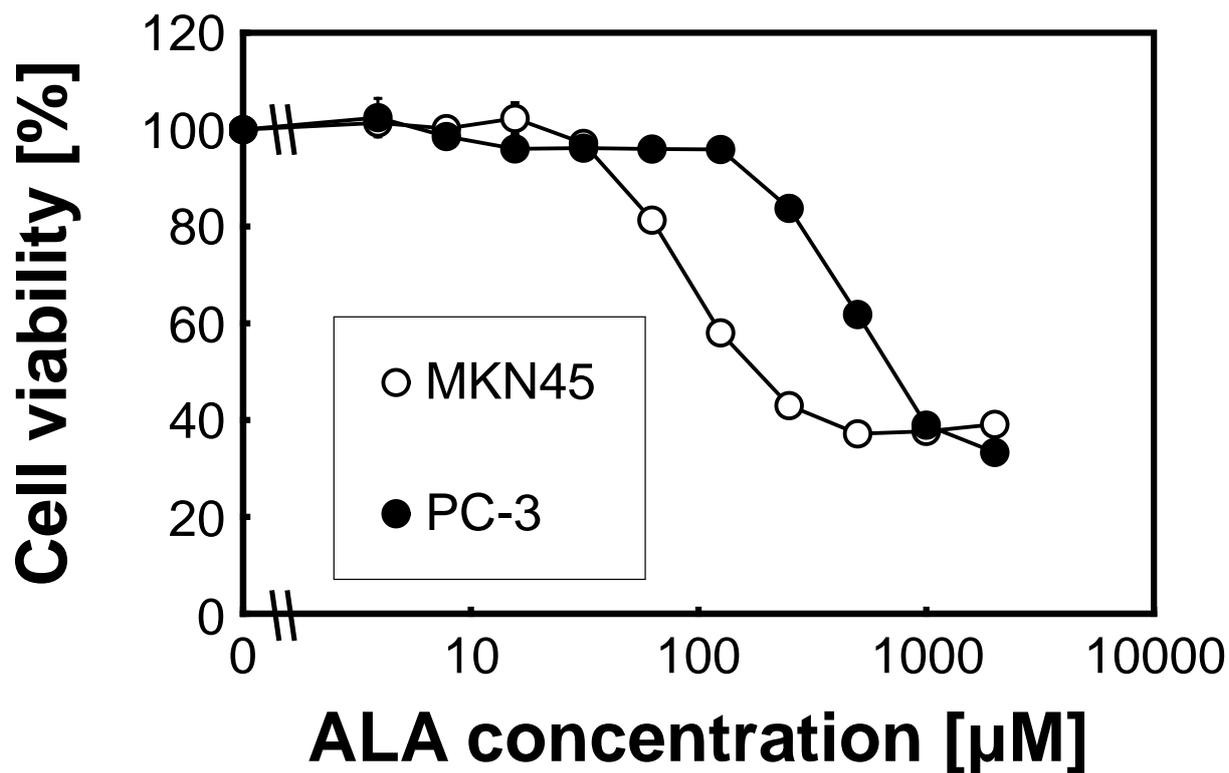


Fig. 5-2 光照射 24 時間後の細胞生存率

ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 6.01 mW/cm² の条件で光照射を行い、24 時間培養した後に MTT 法により細胞生存率を測定した。ALA 0 μM (ALA 非添加群) における吸光度を 100% とし、細胞生存率を算出した。(n = 6)

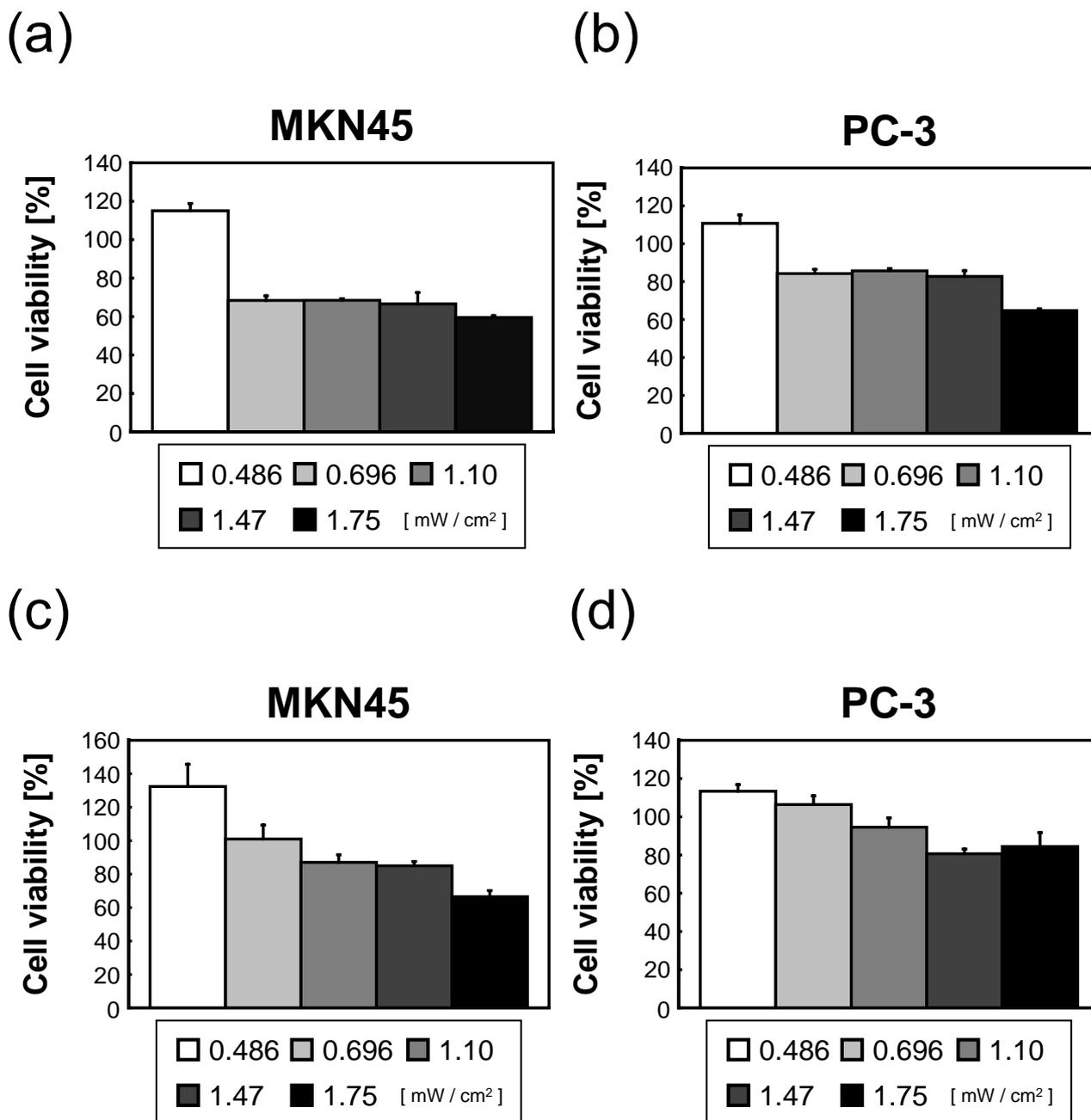


Fig. 5-3 光照射 24 時間後の細胞生存率

1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm の光照射を行い、24 時間培養した後に MTT 法により細胞生存率を測定した。ALA 0 μ M (ALA 非添加群) における吸光度を 100% とし、細胞生存率を算出した。(n = 6.)

- (a) MKN45, 5.0×10^5 cells / 35-mm dish の濃度
- (b) PC-3, 5.0×10^5 cells / 35-mm dish の濃度
- (c) MKN45, 5.0×10^4 cells / 35-mm dish
- (d) PC-3, 5.0×10^4 cells / 35-mm dish

Table. 5-2. 細胞が死滅しない条件

	5.0×10^5	5.0×10^4	[cells / 35 mm dish]
MKN45	0.486	0.696	[mW / cm ²]
PC-3	0.486	1.10	

ALAは1 mMを添加する

1 mM ALA 添加 4 時間後に上記の強度で光照射を行い、その後種々の解析を行うこととした。

5-3-2 ALA 添加後の光照射による遺伝子発現変化

第4章では、正常細胞株に対して ALA 添加と光照射を行い、p21、REV-ERB α 、BMAL1 の発現が変化することを確認した。本項では同様に、がん細胞において上記3遺伝子の発現が ALA 添加後の光照射によって変化するか調べた (Fig. 5-4)。 5.0×10^5 cells / 35 mm dish の MKN45, PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。光照射 3 時間後に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって各遺伝子の発現を解析した。Fig. 5-4 より、p21、BMAL1 の発現は ALA 添加後の光照射によって顕著に上昇した。また REV-ERB α の発現は、有意差はなかったものの、ALA 添加後の光照射によって上昇する傾向を示した。このことから、がん細胞においても ALA 添加後の光照射によって種々の遺伝子発現が変化していることが確かめられた。このことから、ALA-PDT 時に腫瘍深部に存在するがん細胞に対しても様々な遺伝子発現を及ぼす可能性も示唆された。

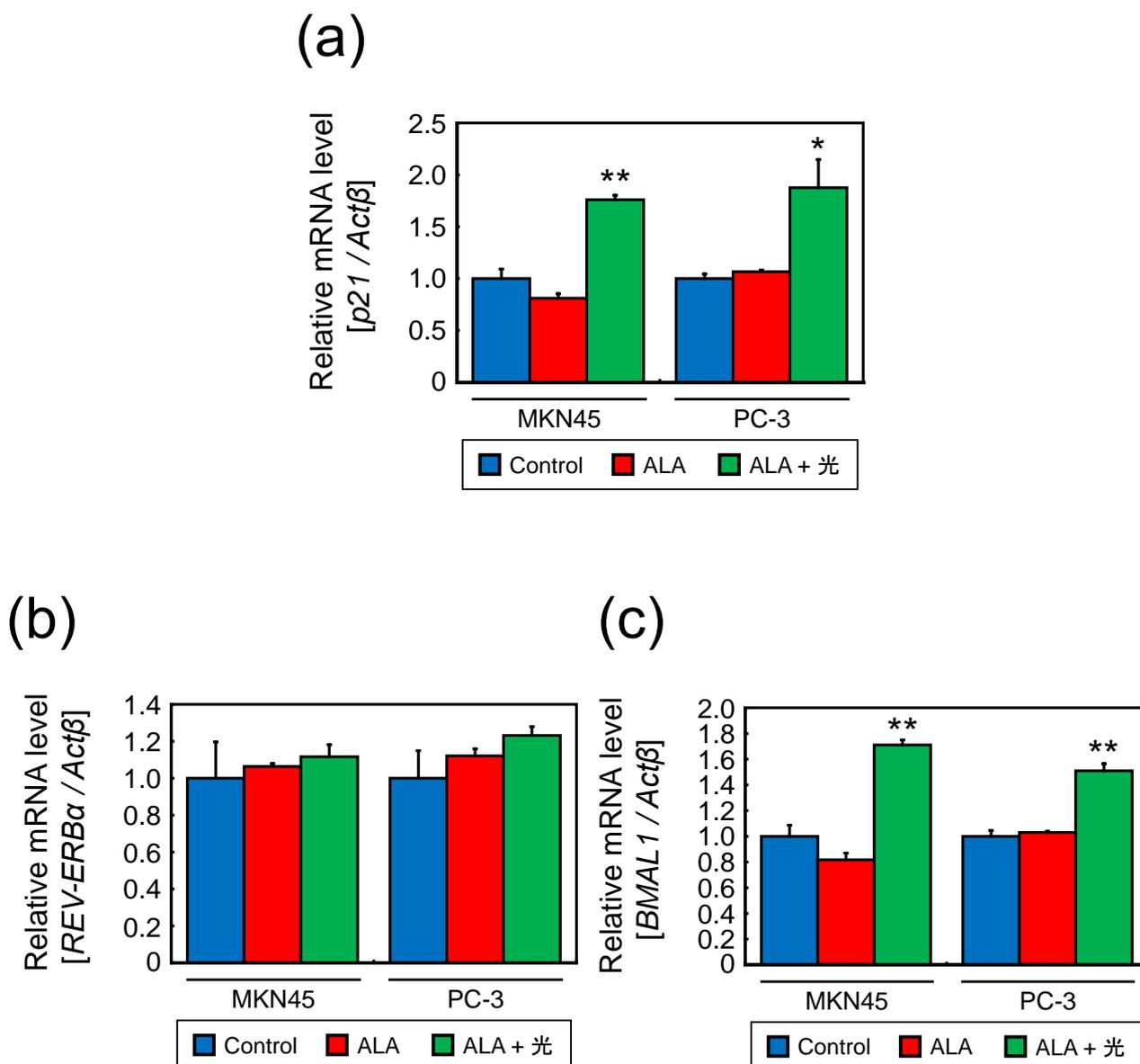


Fig. 5-4 ALA 添加後の光照射によるがん細胞の遺伝子発現変化

1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 0.486 mW/cm² の条件で光照射を行い、3 時間後に mRNA を回収した。Actinβ の発現を内部標準として用いた。Control の発現を 1.0 とした。(n = 2., *, p < 0.05 vs. Control. **, p < 0.01 vs. Control.)

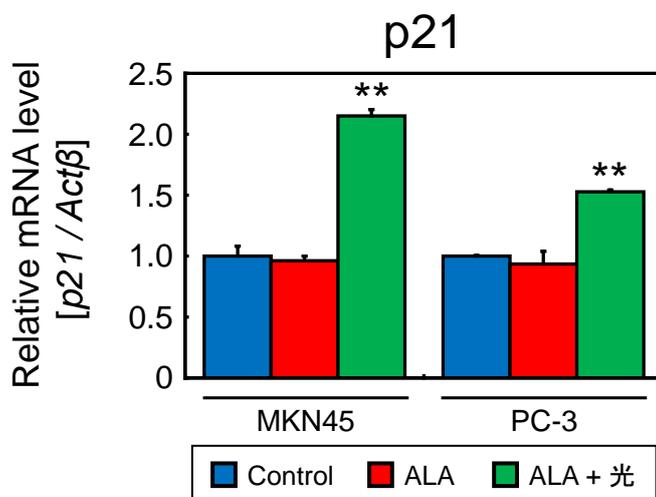
(a) p21 の mRNA 発現

(b) REV-ERBα の mRNA 発現

(c) BMAL1 の mRNA 発現

続いて、ALA 添加後の光照射によって p21 の発現が上昇していることに注目した。p21 は細胞周期の G₁ 期から S 期への移行を妨げる遺伝子である[131,139]。従って、ALA 添加後に低用量の光照射を行うことによって、がん細胞の増殖が抑制される可能性があると予想した。この予想を検証する前に、p21 の発現上昇がどれくらいの期間継続するかを確かめた。5.0×10⁵ cells / 35 mm dish の MKN45, PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。光照射 24 時間後に mRNA を回収し、qRT-PCR 法によって p21 の発現を解析した (Fig. 5-5(a))。図のように、ALA 添加後の光照射によって p21 の発現は上昇していた。Fig. 5-4(a)と合わせて考えれば、光照射直後から p21 の発現は上昇しはじめ、24 時間後も発現は上昇したままであると考えられる。また、p21 のタンパク質発現についても調べた。5.0×10⁴ cells / 35 mm dish の MKN45, PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。その後所定の時刻に細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後に Western Blotting 法を用いて p21 の発現を解析した (Fig. 5-5(b))。図のように、p21 のタンパク質発現は光照射 24 時間後時点で大きく上昇しており、48 時間後でも上昇したままだった。しかし、72 時間後の発現は Control と同程度だった。このことから、ALA 添加後の光照射は p21 の発現を上昇させ、それは 48 時間程度継続することが示された。ゆえに、腫瘍深部で照射光が減衰する環境において生き残ったがん細胞でも p21 の発現は 2 日間ほど上昇し、その間がん細胞の増殖が抑制される可能性が示唆された。

(a)



(b)

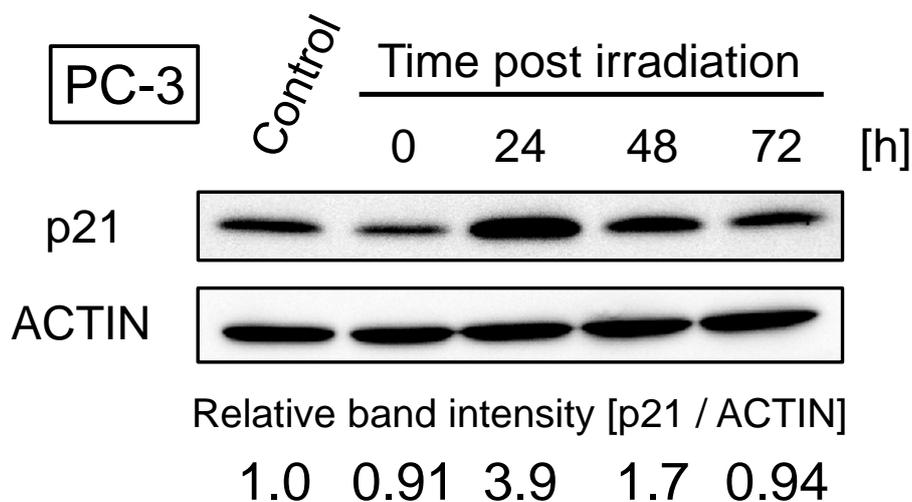


Fig. 5-5 光照射 24 時間後以降の p21 発現

- (a) 1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 0.486 mW/cm² の条件で光照射を行い、24 時間後に mRNA を回収した。Actinβ の発現を内部標準として用いた。Control の発現を 1.0 とした。(n = 2., **, p < 0.01 vs. Control.)
- (b) 1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 1.10 mW/cm² の条件で光照射を行い、その後所定の時刻に細胞溶解液を回収した。Control は Time post irradiation 0 h のサンプルと同時に回収した。Control は ALA 非添加で光照射を行わないサンプル、それ以外は ALA 1 mM で光照射を行ったサンプルである。Actinβ の発現を内部標準として用いた。Relative band intensity は Control を 1.0 として算出した。

5-3-3 ALA 添加後の光照射によるがん細胞増殖抑制

前項の結果より、ALA 添加後の光照射によってがん細胞の増殖が抑制されると予想された。そこで、本項では ALA 添加と光照射の後に、細胞の増殖について調べた。

まず、細胞数の計測によりがん細胞の増殖曲線を作成した (Fig. 5-6(a)(b))。5.0×10⁴ cells / 35 mm dish の MKN45, PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。その後所定の時刻に細胞を回収し、細胞数を計測した。Fig. 5-6(a)(b)より、ALA 添加後の光照射によって細胞の増殖速度は低下した。従って、ALA 添加後に低用量の光照射を行うことによって、がん細胞の増殖が抑制されることが示唆された。

続いて、細胞増殖マーカー Ki-67 の発現を調べた。Ki-67 は細胞周期の G₀ 期以外で発現するタンパク質であることから、増殖マーカーとして広く用いられている[93,140]。そこで本項でも細胞増殖の目安として Ki-67 の発現を確かめた (Fig. 5-6(c))。5.0×10⁴ cells / 35 mm dish の PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。その後所定の時刻に細胞溶解液を回収し、SDS-PAGE によってタンパク質を分離した後に Western Blotting 法を用いて Ki-67 の発現を解析した。Fig. 5-6(c)より、光照射 24 時間後において Ki-67 の発現は減少した。このことから、ALA 添加後に低用量の光照射を行うことによって、がん細胞の増殖抑制が遺伝子レベルでも示された。

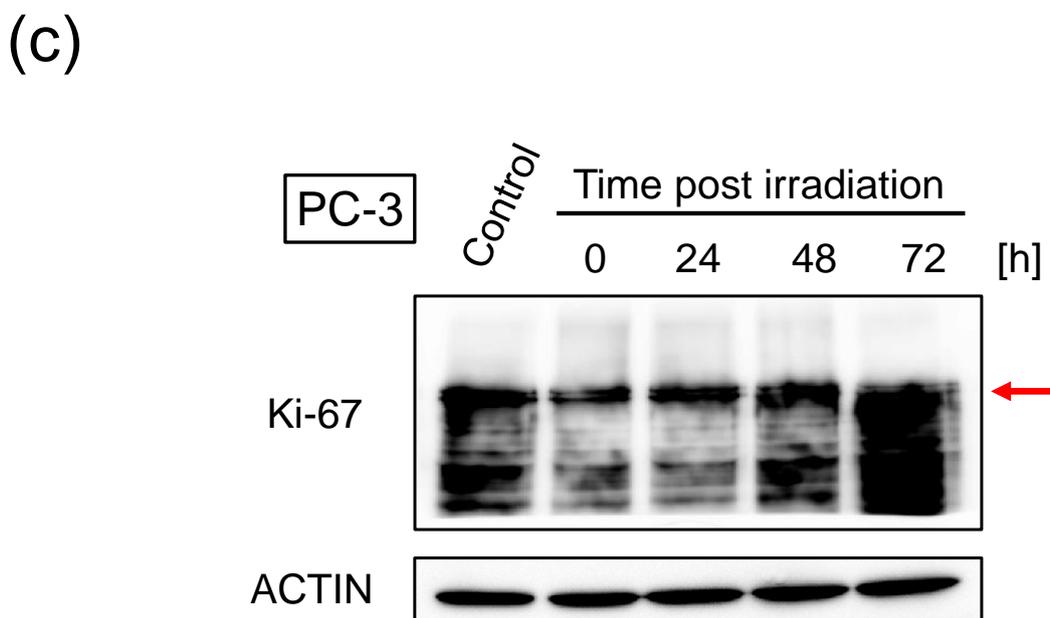
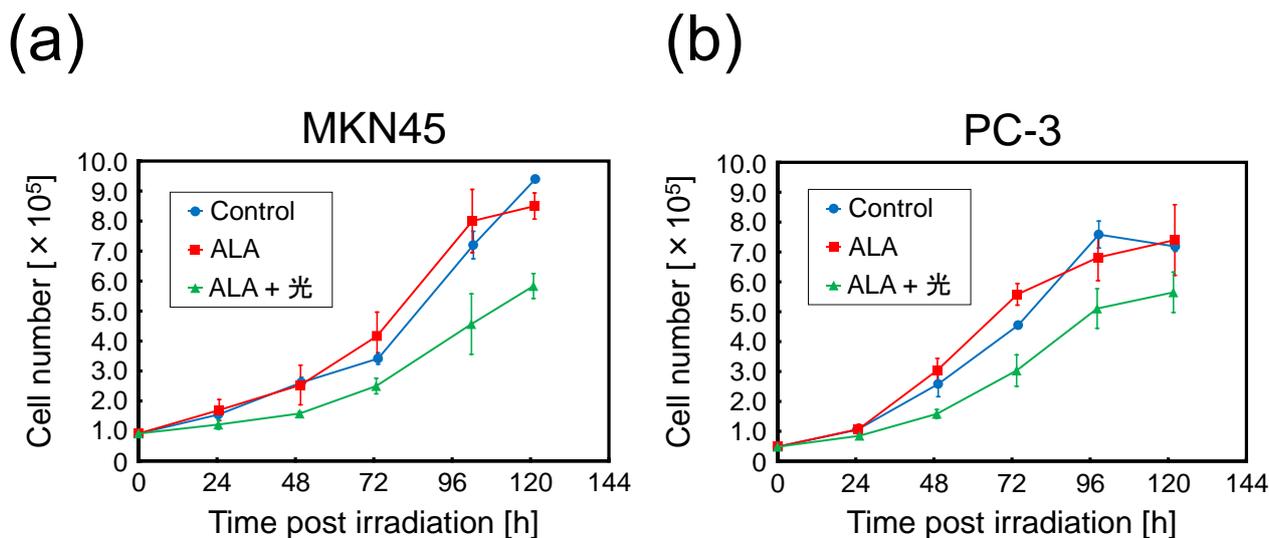


Fig. 5-6 ALA 添加後の光照射による増殖抑制

1 mM ALA 添加 4 時間後に Table. 5-2 の条件で光照射を行い、その後所定の時刻にトリプシンを用いて細胞を回収した。回収した細胞はトリパンブルーによって染色し、血球計算盤上で生細胞を計数した。(n = 3.)

- (a) MKN45 の増殖曲線
- (b) PC-3 の増殖曲線

1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 1.10 mW/cm² の条件で光照射を行い、その後所定の時刻に細胞溶解液を回収した。Control は Time post irradiation 0 h のサンプルと同時に回収した。Actinβ の発現を内部標準として用いた。

- (c) p21 の発現解析

5-3-4 ALA 添加後の光照射による細胞周期関連遺伝子の発現変化

これまでの結果より、ALA 添加後の光照射によってがん細胞の増殖が抑制され、その現象には p21 が関与している可能性が示唆された。そこで、p21 以外のどのような遺伝子が増殖抑制に関与しているか調べることにした。実験には PrimerArray[®] Cell cycle (Human) を用い、細胞周期に関連した遺伝子の発現を網羅的に解析した。

5.0×10^5 cells / 35 mm dish の PC-3 に 1 mM の ALA を添加し、4 時間培養した後に培地交換を行い、直後に Table. 5-2 の条件で 5 分間光照射を行った。すぐに Control サンプル (Control 群) および ALA 添加後に光照射を行わなかったサンプル (ALA 群) の mRNA を回収し、光照射 24 時間後に ALA 添加後に光照射を行ったサンプル (ALA + 光群) の mRNA を回収した。逆転写反応によって mRNA から cDNA を作製し、PrimerArray[®] Cell cycle (Human) を用いて遺伝子の発現を解析した (Fig. 5-7)。実験の結果、ALA 添加後の光照射によっていくつかの遺伝子発現が変化した (Fig. 5-7(a)(c)(e))。またほぼすべての発現変化が、細胞周期を停止させるような方向の変化であった (Fig. 5-7(b)(d))。

以降の議論は Fig. 5-7(e)にもとづいて、ALA+ 光群の遺伝子発現が、Control 群と比較したとき・ALA 群と比較したとき両方で変化した遺伝子について行う。CDKN2B (p15)・CDKN2C (p18)・CDKN2D (p19) は ALA 添加後の光照射によって上昇した。これらの遺伝子は細胞周期を G₁ 期から S 期へ進める Cyclin-dependent kinase 4, 6 (CDK4, CDK6) を阻害する働きをもっている[141]。よって、これら 3 遺伝子の発現上昇は細胞周期を停止に向かわせ、細胞増殖の抑制に寄与していると考えられる。TGFB1, 2 (TGF-β1, 2) と SMAD4 はともに TGF-β/SMAD シグナル経路の主要構成遺伝子である[142]。TGF-β ははじめ細胞の増殖を誘導するサイトカインであると考えられていたが、後に成熟細胞に対しては増殖を抑制するはたらきをもつ場合が多いと判明した。TGF-β が細胞表面にあるレセプターに結合すると細胞内にシグナルが走り、SMAD4 を介して遺伝子発現を誘導する。このシグナルによって発現が誘導される遺伝子の中には G₁/S arrest をかけるものが多く存在するため[143]、細胞の増殖が抑制される。本実験においては、ALA + 光群において TGFB1 と

SMAD4 の発現が上昇しており、これは細胞増殖の抑制に貢献していると考えられる。一方で、TGFB2 の発現は減少しており、これについては議論の余地がある。CDC25A は様々な CDK を脱リン酸化し、活性化する酵素である[144–146]。CDK は細胞周期を促進する役割を担うため、CDC25A も細胞周期を促進する酵素のひとつであるといえる。本実験においては CDC25A の発現は減少していたため、ALA + 光群において細胞周期のいたるところで停止指示が生じ、細胞増殖が抑制されたと考えられる。以上のことから、ALA 添加後の光照射によって多くの細胞周期関連遺伝子の発現が変化することで、がん細胞の増殖が相乗的に抑制されたことが示唆された。

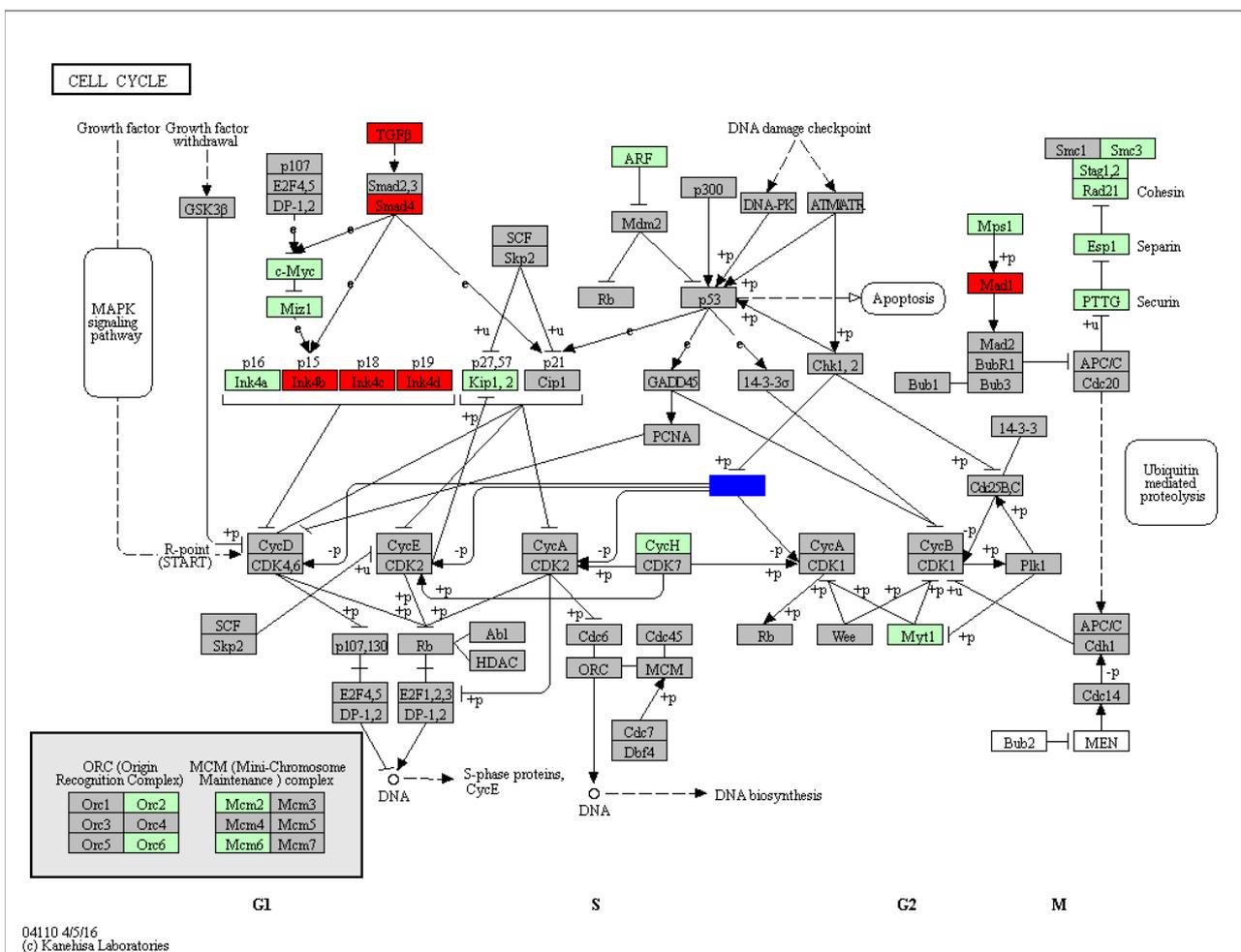
(a)

ALA + 光 vs. Control

3D Profile	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1.49E+00	1.37E+00	7.27E-01	1.11E+00	3.92E+00	1.12E+00	1.23E+00	1.02E+00	2.04E+00	1.14E+00	8.71E-01	1.35E+00
B	8.71E-01	9.46E-01	1.68E+00	1.17E+00	1.38E+00	1.28E+00	1.26E+00	1.28E+00	6.20E-01	1.09E+00	1.26E+00	1.28E+00
C	1.30E+00	1.21E+00	3.82E-01	1.18E+00	8.77E-01	5.82E-01	9.27E-01	1.19E+00	9.33E-01	1.15E+00	1.45E+00	1.78E+00
D	1.06E+00	1.07E+00	1.15E+00	4.12E-01	1.92E+00	1.27E+00	1.40E+00	1.66E+00	8.07E-01	1.03E+00	1.22E+00	1.00E+00
E	1.14E+00	1.59E+00	1.80E+00	1.47E+00	1.82E+00	1.97E+00	1.21E+01	1.17E+00	1.06E+00	1.40E+00	2.19E+00	1.60E+00
F	1.69E+00	1.77E+00	1.04E+00	1.39E+00	1.01E+00	1.39E+00	1.39E+00	1.60E+00		1.06E+00	1.21E+00	1.09E+00
G	1.44E+00	1.43E+00	1.35E+00	1.30E+00	1.83E+00	8.71E-01	1.10E+00	1.21E+00	8.01E-01	1.38E+00	1.40E+00	1.58E+00
H	1.10E+00	8.95E-01	1.19E+00	1.38E+00	1.06E+00	1.55E+00	1.85E+00	6.60E-01	2.50E+00	2.27E+00	1.25E+00	1.13E+00

Symbol	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATM	RB1	CDKN1A	TP53	TGFB1	SMAD2	CHEK2	BUB3	MAD1L1	CDC16	CREBBP	GUSB
B	E2F5	ATR	BUB1B	CCNA2	CCNE1	CDC6	CDC20	CDC27	CDK6	CHEK1	HDAC2	HPRT1
C	CCND3	CDC2	CDC25A	CDK7	GADD45A	E2F3	E2F4	GSK3B	MAD2L1	MCM3	ORC4L	PGK1
D	ORC5L	PCNA	RBL1	TGFB2	TGFB3	WEE1	YWHAZ	CDC7	CDC45L	CUL1	CDC14B	ACTB
E	CCNA1	ORC1L	BUB1	CDC25B	CDC23	CCNB2	CDKN2B	HDAC1	PLK1	E2F1	SMAD4	GAPDH
F	RBL2	SMAD3	MCM4	MCM7	SKP2	SFN	SMC1A	MAD2L2	GADD45G	DBF4	MCM5	TBP
G	YWHAE	YWHAQ	MDM2	PRKDC	SKP1A	TFDP1	ABL1	ORC3L	YWHAH	ANAPC4	RBX1	B2M
H	ANAPC10	GADD45B	ANAPC5	FZR1	CCNB1	CDC14A	CDK2	CCND1	CDKN2C	CDKN2D	YWHAH	PPIA

(b)



(e)

	ALA + 光 vs. Control	ALA + 光 vs. ALA	機能
ATM	→	↑↑	主にDNAの二重鎖切断で誘導され修復を担当
CDKN2B (p15)	↑↑	↑↑	CDK4, 6の活性を阻害し細胞周期を停止させる
CDKN2C (p18)	↑↑	↑↑	CDK4, 6の活性を阻害し細胞周期を停止させる
CDKN2D (p19)	↑↑	↑↑	CDK4, 6の活性を阻害し細胞周期を停止させる
TP53 (p53)	→	↑↑	がんを抑制する転写因子
SMC1A	→	↑↑	コヒーシンの主要構成成分
SMAD4	↑↑	↑↑	G1/S arrestを起こす遺伝子を発現させる
CDC25A	↓↓	↓↓	CDKを活性化する
MAD1L1	↑↑	→	有糸分裂の進行を阻害する
WEE1	→	↑↑	CDK1を不活性化する
TGFB1	↑↑	↑↑	主に増殖を抑制するような遺伝子の発現を促す
TGFB2	↓↓	↓↓	主に増殖を抑制するような遺伝子の発現を促す
TGFB3	→	↑↑	主に増殖を抑制するような遺伝子の発現を促す

Fig. 5-7 PrimerArray[®]による細胞周期関連遺伝子の発現解析

1 mM ALA 添加 4 時間後に 635 nm, 0.486 mW/cm² の条件で光照射を行い、直後に Control サンプル (Control 群) および ALA を添加した後に光照射を行わなかったサンプル (ALA 群) の mRNA を回収した。また光照射 24 時間後に、ALA 添加後に光照射を行ったサンプル (ALA + 光群) を回収した。逆転写反応を用いて mRNA から cDNA を作製し、PrimerArray[®]を用いて各遺伝子の発現を解析した。Actin β の発現を内部標準として用いた。

- (a) Control 群の発現を 1.0 としたときの、ALA 添加後に光照射を行った群の発現。表中に赤く塗りつぶされたウェルは、発現が 2.0 倍以上上昇した遺伝子を示す。表中に青く塗りつぶされたウェルは、発現が 0.5 倍以下まで減少した遺伝子を示す。
- (b) (a)の結果を KEGG pathway 上に表示した図。
- (c) ALA 添加後に光照射を行わなかった群の発現を 1.0 としたときの、ALA 添加後に光照射を行った群の発現。表中に赤く塗りつぶされたウェルは、発現が 2.0 倍以上上昇した遺伝子を示す。表中に青く塗りつぶされたウェルは、発現が 0.5 倍以下まで減少した遺伝子を示す。
- (d) (c)の結果を KEGG pathway 上に表示した図。
- (e) (a)(c)の中から発現が変化したものだけを抽出した表。赤の 2 本矢印は発現が上昇したことを、青の 2 本矢印は発現が減少したことを表す。赤く塗りつぶした遺伝子は Control 群・ALA 添加後に光照射を行わなかった群のどちらと比較しても発現が上昇した遺伝子を表す。青く塗りつぶした遺伝子は Control 群・ALA 添加後に光照射を行わなかった群のどちらと比較しても発現が減少した遺伝子を表す。

5-4 結言

ALA-PDT は副作用が小さく患者への負担が少ないため今後の発展が期待されるが、照射光が減衰する腫瘍深部のがん細胞に対する効果が不明瞭という問題点がある。一方で、光照射によって腫瘍深部のがん細胞中においても ROS は発生しており、がん細胞自体は ROS による刺激を受けていると考えられる。そこで、照射光が減衰する腫瘍深部の環境を *in vitro* で再現し、PpIX を蓄積したがん細胞に対して低用量の光照射を行った際の遺伝子変化・増殖能変化を調査した。第4章の正常細胞における実験で得られた知見をもとに、がん細胞において種々の遺伝子発現を測定した。

まず、ALA-PDT による治療が有効な細胞株を選定し (Fig. 5-2)、その細胞株に対して照射する光の強度を変えることによって、細胞死が起こらない条件を探索した (Fig. 5-3, Table. 5-2)。この条件で光照射を行ったがん細胞を、ALA-PDT で死滅しなかったがん細胞とみなし、以降の実験を行った。第4章と同様に、がん細胞でも ROS によって種々の遺伝子発現が変化していると予想し、p21・REV-ERB α ・BMAL1 の発現を測定した (Fig. 5-4)。その結果、がん細胞でも ROS によって種々の遺伝子発現が変化することがわかった。ここで、ALA 添加後の光照射で p21 の発現が上昇することに注目した。p21 は細胞周期の G₁ 期から S 期への移行を妨げる遺伝子であるため[131,139]、ALA 添加後に光照射を受けたがん細胞では細胞周期の停止が起こり、増殖が抑制されているのではないかと予想した。本検証にあたり、光照射による p21 の発現上昇が 24 時間以上継続することを確認した (Fig. 5-5)。この結果から ALA-PDT によるがん細胞の増殖抑制が 24 時間以上は継続すると考え、実際に細胞増殖を測定した (Fig. 5-6)。予想の通り、ALA 添加後の光照射によってがん細胞の増殖は抑制された。このことから、ALA 添加後に光照射を行ったがん細胞では細胞増殖が抑制されると考えられる。つまり、照射光が減衰する腫瘍深部の環境において、がん細胞の細胞死を誘導できなかつたとしても、生存し続けたがん細胞の細胞増殖を遅らせることで、腫瘍を弱体化できるといえる。以上の知見は、実臨床における ALA-PDT の有用性を新たに示したといえる。また増殖マーカー Ki-67 の発現を測定することで、増殖抑

制されたがん細胞が G_0 期で休止していることも示唆された (Fig. 5-6)。第3章にて休眠がん細胞は PpIX 蓄積が多く ALA-PDT に対して感受性高いことを示しているため、ALA-PDT を複数回行うことによって生存し続けたがん細胞も休眠状態へ誘導され、より PpIX 蓄積が増加し、ALA-PDT に対する感受性も一層亢進することが期待される。最後に、網羅的な解析を行った結果、ALA 添加後の光照射によって多くの細胞周期関連遺伝子の発現が変化していることが明らかとなった (Fig. 5-7)。これにより、p21 のみならず多くの遺伝子により、細胞周期のいたるところで停止指示が生じ、細胞増殖が抑えられていると示唆された。以上より、ALA-PDT はがん細胞を死滅させる効果だけでなく、例え死滅させきれなかった場合でも、がん細胞の増殖を遅らせる効果をもつことが示された。

第6章 総括

6-1 結論

6-2 本研究の展望と課題

6-1 結論

ALAによって誘導される腫瘍特異的なPpIX蓄積を用いたがん診断(ALA-PDD)やがん治療(ALA-PDT)は、医療現場において広く使用されている。がん細胞を用いた *in vitro* 実験系として平面の2次元培養が一般的に用いられているが、2次元培養したがん細胞と生体の腫瘍では形質面において多くの乖離が認められている。腫瘍深部は腫瘍表面と比較して細胞密度が高いため、一部の細胞が休眠状態にあることが予想される。また、照射光の減衰が生じるが、一般的な *in vitro* の2次元培養ではそれらを含めて評価することが難しい。本研究では、2次元培養ならびに3次元培養を用いて独自の評価系を構築し、ALA-PDTの評価を行うことで、実臨床にて使用する際に課題となる2項目である休眠がん細胞への影響ならびに照射光の減衰に対する基礎的な知見の獲得を目的とした。

第2章では、3次元培養したがん細胞スフェロイドにおける形質変化の原因が細胞密度であると仮定し、細胞密度と休眠性の相関を検証した。がん細胞スフェロイドは、スフェロイド形成の培養用容器であるEZSPHERE®を用いることで3つの大きさを形成した。2次元培養においても5段階の異なる細胞密度環境を構築することで、詳細に細胞密度と休眠性の相関を評価した。スフェロイドの3次元構造解析により、EZSPHERE®を用いて形成したスフェロイドはお椀型で厚みが薄く、低酸素領域がほとんど存在しないことが明らかになった。一般的に、スフェロイドは中心が低酸素環境になるため、低酸素領域を形成しづらく、高密度培養を行うことができる点はEZSPHERE®の長所の1つである。なお、本研究がEZSPHERE®を用いてがん細胞スフェロイドを形成した初めての報告である。

続いて、休眠性を検証するために休眠がん細胞の特徴である **No proliferation, No death, Metabolic suppression, Recovery to active status** の4項目を評価した。No proliferation を評価するために、Ki-67 および p21 の発現解析、BrdU の陽性率測定を行った。No death を評価するために、トリパンブルーによる染色を行った。Metabolic suppression を評価するために、2-NBDG の細胞内取り込み量の測定を行った。Recovery to active status を評価するために、スフェロイド形成後の細胞における再増殖評価を行った。4項目のいずれにおいても、

休眠がん細胞の特徴に合致したため、細胞密度依存的な休眠性の亢進が明らかになった。3次元培養によって一般的ながん細胞株も休眠がん細胞の形質を示すようになることを明らかにした報告は本研究が初めてであり、本実験の理学的な価値は極めて高いと考えられる。さらに休眠がん細胞に対して、一般的な抗がん剤であるシスプラチンおよび5-フルオロウラシルの殺細胞効果を評価し、上記2種の抗がん剤は休眠がん細胞に対して殺細胞効果が弱いことを確認した。

第3章では、構築した休眠がん細胞モデルに対して、ALA-PDD および ALA-PDT 効果を検証した。第2章において構築した8段階の異なる休眠性環境(2次元培養:5段階、3次元培養:3段階)に対してALAを添加し、PpIX蓄積を解析した。この結果より、休眠性依存的なPpIX蓄積の増加が明らかとなり、休眠がん細胞に対してALA-PDDが有効な診断方法であると示唆された。臨床においても、Idoateらが神経膠芽腫において細胞密度が高い組織では手術中のPpIXの蛍光が強く認められることを報告しており[98]、本研究の結果と合致する。さらにPpIX蓄積後に光照射を行うことで、休眠がん細胞に対してALA-PDTが顕著な治療効果を示すことも明らかになった。休眠がん細胞に対して有効な治療法はほとんど報告されていないため、本結果は臨床的に重要な知見である。PpIX蓄積に関わるトランスポーターの遺伝子発現解析を行い、休眠状態によって複数の遺伝子が制御されることを明らかにした。加えて、非休眠がん細胞に対しても細胞増殖を抑制して、擬似的な休眠状態にすることでPpIX蓄積が増加するという仮説を立て、これを検証した。この結果より、PC-3細胞に対して細胞増殖抑制剤となるMethotrexateやCycloheximideとALAを共添加することにより、PpIX蓄積が増加しALA-PDTに対する感受性の亢進が認められた。以上の結果は臨床的な価値もさることながら、PpIX蓄積増加のメカニズム解明の一助になると言える。

第4章では、がん細胞における照射光の減衰を評価するために、正常細胞を用いてALA投与後の低用量光照射の影響を解析した。まず、細胞にALAを添加することによって細胞内にヘムが蓄積することを明らかにした。ヘムは多くのタンパク質の補欠分子族となる

分子だが、そのようなタンパク質には転写因子も含まれる。そこで、ヘム応答性遺伝子の発現を調べたところ、ALA 添加によってその発現が変化した。また、ALA 添加後に光照射を行っても遺伝子発現は変化したままだった。そして、ALA 添加後の光照射によって ROS が発生することを確認し、その条件で種々の遺伝子発現が変化するを確認した。発現が変化した遺伝子は、p21・REV-ERB α ・BMAL1 の3種類であった。p21 は細胞周期の G1 期から S 期への以降を妨げる遺伝子であることから、ALA 添加後の光照射によって細胞周期を制御できる可能性が示された。また REV-ERB α ・BMAL1 は体内時計を司る時計遺伝子のひとつである[134–136]。このことは、ALA 添加後の光照射によって体内時計を制御できる可能性が示唆される。病気を治療するための薬剤の中には、その効果に体内時計の影響を受けるものが存在する[147–149]。すなわち、投薬のタイミングが薬効に大きく影響を及ぼす可能性があると言える。ALA 投与によって患者の体内時計をあらかじめ調節できれば、最も適切なタイミングで薬剤を投与することができる (Chronotherapy)。ROS の消去剤である NAC を用いた実験により、光照射による遺伝子発現変化の原因が ROS にあることも明らかとなった。第4章を通して、ALA 添加によってヘム応答性遺伝子の発現を制御できた一方、その後の光照射によって ROS 応答性遺伝子の発現を制御することも可能であった。これは光照射によって遺伝子発現のスイッチングができるということであり、光照射の有無で発現を変化させる遺伝子を選択できるということである。本章は次章の条件検討としてのみでなく、ALA と光照射を用いて生体の遺伝子発現を制御し、生理機能を調節できる可能性が示された。

第5章では、がん細胞において ALA 投与後の低用量光照射によって種々の遺伝子発現が変化することを示し、更に細胞生理機能のひとつである増殖が抑制されることを明らかにした。また、その知見を ALA-PDT の観点から考察した。まず、2種のがん細胞株に対して ALA 添加後に光照射を行い、第4章と同様 p21・REV-ERB α ・BMAL1 の遺伝子発現が上昇することを確認した。このことから、がん細胞においても ALA 添加後の光照射によって、遺伝子発現や生理機能を制御できる可能性が示唆された。また、p21 の発現に着

目し、ALA 添加後の光照射によってがん細胞の細胞周期が停止し、その増殖が抑制されるのではないかと予想した。検証の結果、確かにがん細胞の増殖速度が低下していることが示された。また、Ki-67 の発現解析より、ALA 添加後の光照射によってがん細胞は細胞周期の G₀ 期に入り、増殖を停止していることが示唆された。第3章にて休眠がん細胞は PpIX 蓄積が多く ALA-PDT に対して感受性高いことを示しているため、ALA-PDT を複数回行うことによって生存し続けたがん細胞も休眠状態へ誘導され、より PpIX 蓄積が増加し、ALA-PDT に対する感受性も一層亢進することが期待される。また、本章で ALA 添加後に光照射を行ったがん細胞は、ALA-PDT で死滅しない腫瘍深部の細胞と想定することができる。すなわち、腫瘍に対して ALA-PDT を行ったとき、腫瘍深部のがん細胞が死滅しなかったとしても、その増殖は抑制されていると考えられる。従って、ALA-PDT はがん細胞を死滅させるだけでなく、増殖能という観点で腫瘍を弱体化させることのできる治療法であるといえる。このことから、本章で得られた知見は ALA-PDT の実臨床における有用性を一層高めたと言える。また、ALA 添加後の光照射によるがんの増殖抑制について、網羅解析によりいくつかの細胞周期関連遺伝子の関与が示唆された。それら遺伝子の発現変化は、G1/S arrest や G2/M arrest を誘導していると考えられる。ALA 添加後の光照射により、多くの遺伝子が CDKs の活性を低下させるはたらきをすることで、細胞周期が停止していることが示された。本章より、ALA と光照射を用いてがん細胞の生理機能を調節できることが示唆され、加えて ALA-PDT の有用性の側面が示せたといえる。

本研究により、腫瘍深部環境の特徴である高細胞密度および照射光の減衰の2点が ALA-PDT に及ぼす影響が明らかとなった。高密度の細胞は低密度の細胞よりも休眠性が高く、休眠性が高いがん細胞は ALA 投与後の PpIX 蓄積が多く、光照射によって顕著な細胞死が認められた。PpIX を蓄積したがん細胞に対して、細胞死を誘導しない低用量の光照射を行った場合は、細胞増殖が抑制されるよう複数の遺伝子が誘導され、細胞増殖の遅延が認められた。以上のことから、ALA-PDT は腫瘍表面のがん細胞に対してのみならず、腫瘍深部のがん細胞に対しても有効な治療であると示唆された。

6-2 本研究の展望と課題

第2章および第3章では、がん細胞が細胞密度依存的に休眠状態に移行し、休眠性が高い細胞においてALA添加後のPpIX蓄積が多く、ALA-PDDやALA-PDTに対して感受性が高いことを明らかにした。しかし、細胞密度依存的に休眠状態へ移行するメカニズムの解明に関しては不十分である。可能性の1つとしてヒッポシグナル伝達(Hippo Signaling)が考えられる。ヒッポシグナル伝達は細胞分裂、アポトーシス、細胞小器官の大きさを制御する機構の1つで、細胞密度に応じて変化することが報告されている[150,151]。細胞密度が高いと活性化するため、これによって細胞の休眠が誘導されると考えられる。休眠状態へ移行するメカニズムの解明を行うことは、休眠がん細胞モデルの改善につながるとともに新規薬剤および新規治療法開発の一助となる。

第2章において構築したスフェロイドは休眠がん細胞モデルとしてだけでなく、低濃度かつ長期間の薬剤投与モデルとしても使用できると考えられる。一般的に2次元培養した*in vitro*のがん細胞は接触阻害が弱いため増殖し続ける。そのため、長期間にわたって薬剤の毒性評価を行うことができない[79]。一方で、本モデルの細胞は細胞増殖が著しく抑制されるため、長期間にわたる薬剤の投与が可能であると考えられる。そのため、2次元培養の*in vitro*では難しいとされる低濃度かつ長期間の毒性評価を、本モデルによって実現できると期待される。

第3章より、細胞密度依存的にPpIX蓄積が増加しALA-PDTによる殺細胞効果も顕著に亢進することが明らかになった。このことより、生体の腫瘍においても細胞密度が高く固い腫瘍ほどALAを用いたがん診断・がん治療が効果的であり、細胞密度が低い軟らかい腫瘍に対しては効果が期待しづらいという仮説が立てられる。この仮説を検証するためには、動物を用いて*in vivo*実験を行う必要がある。生体の腫瘍におけるPpIX蓄積を測定することは、ALAを用いたがん診断・がん治療の利用拡大につながる。

腫瘍組織における微小環境の影響により、腫瘍内の一部細胞ががん幹細胞(Cancer stem cells)になると言われている。がん幹細胞は普通のがん細胞と異なり、自己複製をする上に

他のがん細胞の供給源にもなる未分化な細胞である[3]。さらに、がん幹細胞は化学療法・放射線療法に対して抵抗性を持つため、がん再発の大きな要因であると示唆されている[152]。CD44, CD133, VEGF などの遺伝子をマーカーとして用いることでがん幹細胞を判別しているが、明確な定義は定まっていない[3,153]。そのため、がん幹細胞に対する研究が遅れ、有効な治療法も存在しないことが現状である。近年の報告より、がん幹細胞は細胞増殖が抑制された休眠状態であることが示唆されている[154]。また、がん幹細胞の特徴である VEGF の発現亢進は本研究で作成した休眠がん細胞モデルにおいても確認されている(Fig. 2-4(a))。これらのことから、高密度培養を行うことでがん幹細胞としての性質が強くと考えられ、休眠がん細胞モデルはがん幹細胞モデルとしても使用できる可能性が高い。この仮定を真とすれば、がん幹細胞に対して ALA を用いたがん診断・がん治療は特に有効であると考えられる。

第4章では正常細胞において ALA 添加後の光照射によって種々の遺伝子発現が変化することが明らかとなり、それに伴って生理機能が調節される可能性が示唆された。この現象には ROS が関与していることが本研究より示唆されているが、どのような種類の ROS が遺伝子発現制御に関わっているかは明らかとなっていない。ROS には過酸化水素、ヒドロキシルラジカルなどいくつかの種類があり、そのうちのどれが遺伝子発現を調節しているのか、解明するためには更に詳細な検証が必要である。本研究では、ROS の消去剤として NAC を用いた。NAC はグルタチオンの合成材料であることから、広範な種類の ROS を消去する薬剤として用いられる。どの ROS が遺伝子発現変化を引き起こしているか決定するためには、特定の ROS を特異的に消去する薬剤を用いることが適切であると考えられる。一般的に、PpIX に対する光照射で発生する ROS は一重項酸素が主であると考えられている。しかし、特定の ROS を特異的に検出・定量する方法は完全に確立されているわけではなく、一重項酸素以外の ROS が多量に生成されている可能性は十分残されている。また、一重項酸素も周囲の分子との反応やその後の酵素による不均化を経て別の ROS に変化している可能性も否めない。その点にも留意して、遺伝子発現変化の原因とな

る ROS を特定していくべきである。また、本研究では ALA 添加後の光照射によって遺伝子発現が変化することは実験的に確かめられたが、それにより正常細胞で生理機能が変化するかどうかを観察することはできなかった。今回、時計遺伝子の発現が変化したことを示したが、体内時計機能への影響は明らかにはなっておらず、因果関係を解明するためには詳細な検証が求められる。本来体内時計とは、個体の各細胞が協調しながら形成するものであることから、*in vitro* における評価のみでは限界がある。ゆえに体内時計の研究については *in vivo* において進めていくべき課題である。マウス等の動物に ALA を投与し、光照射を行うことで概日リズムをはじめとした時計機能の変化が明らかとなるだろう。哺乳類は通常、目から入ってきた光情報をもとに体内時計を補正している。そのため、体細胞に対する ALA 添加後の光照射によって体内時計が調節されれば、視神経を介さずとも光によって体内時計が制御されることになる。

第5章ではがん細胞においても ALA 添加後の光照射によって種々の遺伝子発現が変化することが明らかとなった。また、同時にがん細胞の増殖も抑制された。これらの結果より、ALA-PDT で死滅しなかったがん細胞はその増殖が抑制されたとも考えられる。これまで ALA-PDT で死滅しなかったがん細胞に関してその性質検討を行った研究はなく、本研究により、そのような細胞は治療により死滅しないまでも弱体化することが明らかとなった。ALA-PDT によりがん細胞は弱体化すると結論づけたが、それはあくまで増殖に限定して議論した場合であり、浸潤能・転移能・薬剤耐性能などの変化は未知である。実臨床の知見とするためには、これらの能力を検証し、総合的な判断を行う必要がある。

本研究は ALA-PDT に関する培養細胞を用いて行った基礎研究であり、この結果が実臨床を始め、世に生かされるためには、現実に即した応用・発展研究が必要不可欠である。本研究で得られた知見が、我が国において死亡原因第一位であるがんの征圧に貢献できることを期待したい。

参考文献

- [1] Lauren Pecorino, *Molecular Biology of Cancer* - Lauren Pecorino - Oxford University Press, (2016).
- [2] M. Shipitsin, K. Polyak, The cancer stem cell hypothesis: In search of definitions, markers, and relevance, *Lab. Investig.* 88 (2008) 459–463. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2008.14>.
- [3] J.E. Visvader, G.J. Lindeman, Cancer stem cells in solid tumours: Accumulating evidence and unresolved questions, *Nat. Rev. Cancer.* 8 (2008) 755–768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>.
- [4] D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 380–387. <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- [5] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (1998) 889–905. <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>.
- [6] E.B.I.W. SB Brown, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol.* 5 (2004) 497–508.
- [7] J. Moan, PORPHYRIN PHOTSENSITIZATION AND PHOTOTHERAPY, *Photochem. Photobiol.* 43 (1986) 681–690. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1986.tb05647.x>.
- [8] T.J. Dougherty, A brief history of clinical photodynamic therapy development at Roswell Park Cancer Institute., *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14 (1996) 219–221. <https://doi.org/10.1089/clm.1996.14.219>.
- [9] F. Kinya, H. Kato, Photodynamic therapy (PDT), *Nihon Rinsho.* 60 (2002) 414–418.
- [10] B.W. Henderson, T.J. Dougherty, HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK?, *Photochem. Photobiol.* 55 (1992) 145–157. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>.
- [11] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and

- disease, *Biochem. J.* 219 (1984) 1–14. <https://doi.org/10.1042/bj2190001>.
- [12] J. Moan, K. Berg, PHOTOCHEMOTHERAPY OF CANCER: EXPERIMENTAL RESEARCH, *Photochem. Photobiol.* 55 (1992) 931–948. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb08541.x>.
- [13] K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty, Identification of Singlet Oxygen as the Cytotoxic Agent in Photo-inactivation of a Murine Tumor, *Cancer Res.* 36 (1976).
- [14] T. Shigeru, Development of a Novel Photosensitizer, Talaporfin Sodium, for the Photodynamic Therapy (PDT), *Jpn J Cancer Chemother.* 31 (2004) 979–985. <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ab8gtkrc/2004/003106/030&name=0979-0985j&UserID=133.97.13.92> (accessed October 6, 2020).
- [15] K.P. B Krammer, ALA and its clinical impact, from bench to bedside, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7 (2008) 283–289.
- [16] J. Zawacka-Pankau, J. Krachulec, I. Grulkowski, K.P. Bielawski, G. Selivanova, The p53-mediated cytotoxicity of photodynamic therapy of cancer: Recent advances, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 232 (2008) 487–497. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.07.012>.
- [17] T. Nitta, K. Sato, Prognostic implications of the extent of surgical resection in patients with intracranial malignant gliomas, *Cancer.* 75 (1995) 2727–2731. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19950601\)75:11<2727::AID-CNCR2820751115>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19950601)75:11<2727::AID-CNCR2820751115>3.0.CO;2-H).
- [18] G.E. Keles, B. Anderson, M.S. Berger, The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere, *Surg. Neurol.* 52 (1999) 371–379. [https://doi.org/10.1016/S0090-3019\(99\)00103-2](https://doi.org/10.1016/S0090-3019(99)00103-2).
- [19] Brain Tumor Registry of Japan (2001–2004), *Neurol. Med. Chir. (Tokyo).* 54 (2014) 1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4740110/> (accessed October 1, 2020).
- [20] Brain tumor registry of Japan, *Neurol Med Chir.* 32 (1992) 381–547.

- https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcns/24/10/24_699/_pdf/-char/ja (accessed October 6, 2020).
- [21] S. Kaneko, A Current Overview : Photodynamic Diagnosis and Photodynamic Therapy using 5-Aminolevulinic Acid in Neurosurgery, *Nippon Laser Igakkaishi*. 29 (2008) 135–146. <https://doi.org/10.2530/jslsm.29.135>.
- [22] W. Stummer, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol*. 7 (2006) 392–401.
- [23] W. Stummer, H.J. Reulen, A. Novotny, H. Stepp, J.C. Tonn, Fluorescence-guided resections of malignant gliomas - An overview, *Acta Neurochir. Suppl*. 88 (2003) 9–12. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6090-9_3.
- [24] A. Johansson, G. Palte, O. Schnell, J.-C. Tonn, J. Herms, H. Stepp, 5-Aminolevulinic Acid-induced Protoporphyrin IX Levels in Tissue of Human Malignant Brain Tumors, *Photochem. Photobiol*. 86 (2010) 1373–1378. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2010.00799.x>.
- [25] P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab, Photodynamic therapy of cancer: An update, *CA. Cancer J. Clin*. 61 (2011) 250–281. <https://doi.org/10.3322/caac.20114>.
- [26] P. Krishnamurthy, T. Xie, J.D. Schuetz, The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis, *Pharmacol. Ther*. 114 (2007) 345–358. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.02.001>.
- [27] K. Furuyama, K. Kaneko, P.D. Vargas, Heme as a magnificent molecule with multiple missions: Heme determines its own fate and governs cellular homeostasis, *Tohoku J. Exp. Med*. 213 (2007) 1–16. <https://doi.org/10.1620/tjem.213.1>.
- [28] Y.Y. Yien, A.R. Ringel, B.H. Paw, Mitochondrial transport of protoporphyrinogen IX in

- erythroid cells, *Oncotarget*. 6 (2015) 20742–20743.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.5124>.
- [29] M. Ishizuka, F. Abe, Y. Sano, K. Takahashi, K. Inoue, M. Nakajima, T. Kohda, N. Komatsu, S.I. Ogura, T. Tanaka, Novel development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy, *Int. Immunopharmacol.* 11 (2011) 358–365.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.11.029>.
- [30] H. Chavan, P. Krishnamurthy, Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mediate transcriptional activation of the ATP binding cassette transporter ABCB6 gene via the aryl hydrocarbon receptor (AhR), *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 32054–32068.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.371476>.
- [31] Y. Ohgari, Y. Nakayasu, S. Kitajima, M. Sawamoto, H. Mori, O. Shimokawa, Mechanisms involved in δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin, *Biochem Pharmacol.* 71 (2005).
- [32] W. Kemmner, K. Wan, S. Rüttinger, B. Ebert, R. Macdonald, U. Klamm, K.T. Moesta, Silencing of human ferrochelatase causes abundant protoporphyrin-IX accumulation in colon cancer, *FASEB J.* 22 (2008) 500–509. <https://doi.org/10.1096/fj.07-8888com>.
- [33] M. Hayashi, H. Fukuhara, K. Inoue, T. Shuin, Y. Hagiya, M. Nakajima, T. Tanaka, S. Ogura, The Effect of Iron Ion on the Specificity of Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid, *PLoS One*. 10 (2015) e0122351.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122351>.
- [34] Y. Hagiya, H. Fukuhara, K. Matsumoto, Y. Endo, M. Nakajima, T. Tanaka, I. Okura, A. Kurabayashi, M. Furihata, K. Inoue, T. Shuin, S. ichiro Ogura, Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.02.001>.

- [35] S.G. Zhao, X.F. Chen, L.G. Wang, G. Yang, D.Y. Han, L. Teng, M.C. Yang, D.Y. Wang, C. Shi, Y.H. Liu, B.J. Zheng, C. Bin Shi, X. Gao, N.G. Rainov, Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin ix accumulation and photodynamic effect in human glioma, *Ann. Surg. Oncol.* 20 (2013) 4379–4388.
<https://doi.org/10.1245/s10434-011-2201-6>.
- [36] H. Kobuchi, K. Moriya, T. Ogino, H. Fujita, K. Inoue, T. Shuin, T. Yasuda, K. Utsumi, T. Utsumi, Mitochondrial Localization of ABC Transporter ABCG2 and Its Function in 5-Aminolevulinic Acid-Mediated Protoporphyrin IX Accumulation, *PLoS One.* 7 (2012).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050082>.
- [37] R.W. Robey, K. Steadman, O. Polgar, S.E. Bates, ABCG2-mediated transport of photosensitizers: Potential impact on photodynamic therapy) ABCG2-mediated transport of photosensitizers: Potential impact on photodynamic therapy, *Cancer Biol. Ther.* 4 (2005) 187–194. <https://doi.org/10.4161/cbt.4.2.1440>.
- [38] S. Zhou, Y. Zong, P.A. Ney, G. Nair, C.F. Stewart, B.P. Sorrentino, Increased expression of the Abcg2 transporter during erythroid maturation plays a role in decreasing cellular protoporphyrin IX levels, *Blood.* 105 (2005) 2571–2576.
<https://doi.org/10.1182/blood-2004-04-1566>.
- [39] Y.J. Fei, Y. Kanai, S. Nussberger, V. Ganapathy, F.H. Leibach, M.F. Romero, S.K. Singh, W.F. Boron, M.A. Hediger, Expression cloning of a mammalian proton-coupled oligopeptide transporter, *Nature.* 368 (1994) 563–566. <https://doi.org/10.1038/368563a0>.
- [40] T. Yang, D. Sun, Y.G. Huang, A. Smart, J.P. Briggs, J.B. Schnermann, Differential regulation of COX-2 expression in the kidney by lipopolysaccharide: Role of CD14, *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* 277 (1999). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1999.277.1.f10>.
- [41] I. Knütter, I. Rubio-Aliaga, M. Boll, G. Hause, H. Daniel, K. Neubert, M. Brandsch, H⁺-peptide cotransport in the human bile duct epithelium cell line SK-ChA-1, *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 283 (2002) G222–G229. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00534.2001>.

- [42] K. Inui, S. Masuda, H. Saito, Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney, *Kidney Int.* 58 (2000) 944–958. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2000.00251.x>.
- [43] F. Döring, J. Will, S. Amasheh, W. Clauss, H. Ahlbrecht, H. Daniel, Minimal molecular determinants of substrates for recognition by the intestinal peptide transporter, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 23211–23218. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.23211>.
- [44] F. Döring, J. Walter, J. Will, M. Föcking, M. Boll, S. Amasheh, W. Clauss, H. Daniel, Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2761–2767. <https://doi.org/10.1172/JCI1909>.
- [45] C.M.H. Anderson, M. Jevons, M. Thangaraju, N. Edwards, N.J. Conlon, S. Woods, V. Ganapathy, D.T. Thwaites, Transport of the photodynamic therapy agent 5-aminolevulinic acid by distinct H⁺-coupled nutrient carriers coexpressed in the small intestine, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332 (2010) 220–228. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.159822>.
- [46] 萩谷祐一郎, アミノレブリン酸投与における腫瘍特異的ポルフィリン蓄積機構と光感受性因子の解明, 東京工業大学 博士論文. (2012).
- [47] P.C. Krishnamurthy, G. Du, Y. Fukuda, D. Sun, J. Sampath, K.E. Mercer, J. Wang, B. Sosa-Pineda, K.G. Murti, J.D. Schuetz, Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter, *Nature.* 443 (2006) 586–589. <https://doi.org/10.1038/nature05125>.
- [48] S.G. Zhao, X.F. Chen, L.G. Wang, G. Yang, D.Y. Han, L. Teng, M.C. Yang, D.Y. Wang, C. Shi, Y.H. Liu, B.J. Zheng, C. Bin Shi, X. Gao, N.G. Rainov, Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin ix accumulation and photodynamic effect in human glioma, *Ann. Surg. Oncol.* 20 (2013) 4379–4388. <https://doi.org/10.1245/s10434-011-2201-6>.
- [49] J.K. Paterson, S. Shukla, C.M. Black, T. Tachiwada, S. Garfield, S. Wincovitch, D.N. Ernst, A. Agadir, X. Li, S. V. Ambudkar, G. Szakacs, S.I. Akiyama, M.M. Gottesman, Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane,

- Biochemistry. 46 (2007) 9443–9452. <https://doi.org/10.1021/bi700015m>.
- [50] M. Tsuchida, Y. Emi, Y. Kida, M. Sakaguchi, Human ABC transporter isoform B6 (ABCB6) localizes primarily in the Golgi apparatus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 369 (2008) 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.02.027>.
- [51] K. Kiss, A. Brozik, N. Kucsma, A. Toth, M. Gera, L. Berry, A. Vallentin, H. Vial, M. Vidal, G. Szakacs, Shifting the Paradigm: The Putative Mitochondrial Protein ABCB6 Resides in the Lysosomes of Cells and in the Plasma Membrane of Erythrocytes, *PLoS One.* 7 (2012) e37378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037378>.
- [52] G. Szakács, J.P. Annereau, S. Lababidi, U. Shankavaram, A. Arciello, K.J. Bussey, W. Reinhold, Y. Guo, G.D. Kruh, M. Reimers, J.N. Weinstein, M.M. Gottesman, Predicting drug sensitivity and resistance: Profiling ABC transporter genes in cancer cells, *Cancer Cell.* 6 (2004) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.026>.
- [53] K. Yasui, S. Mihara, C. Zhao, H. Okamoto, F. Saito-Ohara, A. Tomida, T. Funato, A. Yokomizo, S. Naito, I. Imoto, T. Tsuruo, J. Inazawa, Alteration in Copy Numbers of Genes as a Mechanism for Acquired Drug Resistance, *Cancer Res.* 64 (2004) 1403–1410. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-3263-2>.
- [54] H. Chavan, M. Oruganti, P. Krishnamurthy, The ATP-binding cassette transporter ABCB6 is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity, *Toxicol. Sci.* 120 (2011) 519–528. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfr008>.
- [55] K. Polireddy, H. Chavan, B.A. Abdulkarim, P. Krishnamurthy, Functional significance of the ATP-binding cassette transporter B6 in hepatocellular carcinoma, *Mol. Oncol.* 5 (2011) 410–425. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.07.005>.
- [56] R. Allikmets, L.M. Schriml, A. Hutchinson, V. Romano-Spica, M. Dean2, A Human Placenta-specific ATP-Binding Cassette Gene (ABCP) on Chromosome 4q22 That Is Involved in Multidrug Resistance¹, *CANCER Res.* 58 (1998) 5337–5339. <http://www.ncbi.nlm>. (accessed October 8, 2020).

- [57] L. Austin Doyle, W. Yang, L. V. Abruzzo, T. Krogmann, Y. Gao, A.K. Rishi, D.D. Ross, A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 15665–15670. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.26.15665>.
- [58] M. Keisuke, M. Lyn, L. Thomas, Z. Zhirong, R. Robert, C. Barbara, B. Mariafiorella, G. Lee, D. Michael, F. Tito, E.B. Susan, Molecular Cloning of cDNAs Which Are Highly Overexpressed in Mitoxantrone-resistant Cells: Demonstration of Homology to ABC Transport Genes, *CANCER Res.* 59 (1999) 8–13.
- [59] Van Herwaarden, Antonius E., A.H. Schinkel, The function of breast cancer resistance protein in epithelial barriers, stem cells and milk secretion of drugs and xenotoxins, *Trends Pharmacol. Sci.* 27 (2006) 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.11.007>.
- [60] H. Saito, H. Hirano, H. Nakagawa, T. Fukami, K. Oosumi, K. Murakami, H. Kimura, T. Kouchi, M. Konomi, E. Tao, N. Tsujikawa, S. Tarui, M. Nagakura, M. Osumi, T. Ishikawa, A new strategy of high-speed screening and quantitative structure-activity relationship analysis to evaluate human ATP-binding cassette transporter ABCG2-drug interactions, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 1114–1124. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.099036>.
- [61] J. Liu, L. Wang, L. Ma, J. Xu, C. Liu, J. Zhang, J. Liu, R. Chen, Significantly increased expression of OCT4 and ABCG2 in spheroid body-forming cells of the human gastric cancer MKN-45 cell line, *Oncol. Lett.* 6 (2013) 891–896. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1506>.
- [62] K. Wakabayashi, A. Tamura, H. Saito, Y. Onishi, T. Ishikawa, Human ABC transporter ABCG2 in xenobiotic protection and redox biology, *Drug Metab. Rev.* 38 (2006) 371–391. <https://doi.org/10.1080/03602530600727947>.
- [63] J.C. Forster, W.M. Harriss-phillips, M.J.J. Douglass, E. Bezak, IMAGENS HYPOXIA VASO A review of the development of tumor vasculature and its effects on the tumor microenvironment, (2017) 21–32.
- [64] C.A. Lyssiotis, A.C. Kimmelman, *Metabolic Interactions in the Tumor Microenvironment*,

- Trends Cell Biol. 27 (2017) 863–875. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.06.003>.
- [65] K. Matsumoto, Y. Hagiya, Y. Endo, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka, S. ichiro Ogura, Effects of plasma membrane ABCB6 on 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced porphyrin accumulation in vitro: Tumor cell response to hypoxia, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 12 (2015) 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.12.008>.
- [66] M.F. Clarke, Clinical and Therapeutic Implications of Cancer Stem Cells, *N. Engl. J. Med.* 380 (2019) 2237–2245. <https://doi.org/10.1056/nejmra1804280>.
- [67] J.A. Aguirre-Ghiso, Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 834–846. <https://doi.org/10.1038/nrc2256>.
- [68] C.L. Chaffer, R.A. Weinberg, A perspective on cancer cell metastasis, *Science* (80-.). 331 (2011) 1559–1564. <https://doi.org/10.1126/science.1203543>.
- [69] A.H. Kyle, J.H.E. Baker, A.I. Minchinton, Targeting quiescent tumor cells via oxygen and IGF-I supplementation, *Cancer Res.* 72 (2012) 801–809. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3059>.
- [70] J.B.A.M. AH Kyle, Targeting quiescent tumor cells via oxygen and IGF-I supplementation, *Cancer Res.* 72 (2012) 801–809.
- [71] J. Aguirre-Ghiso, Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 834–846.
- [72] C. Wenzel, B. Riefke, S. Gründemann, A. Krebs, S. Christian, F. Prinz, M. Osterland, S. Golfier, S. Räse, N. Ansari, M. Esner, M. Bickle, F. Pampaloni, C. Mattheyer, E.H. Stelzer, K. Parczyk, S. Prechtel, P. Steigemann, 3D high-content screening for the identification of compounds that target cells in dormant tumor spheroid regions, *Exp. Cell Res.* 323 (2014) 131–143. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.01.017>.
- [73] H. Okuyama, H. Endo, T. Akashika, K. Kato, M. Inoue, Downregulation of c-MYC protein levels contributes to cancer cell survival under dual deficiency of oxygen and glucose, *Cancer Res.* 70 (2010) 10213–10223. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2720>.

- [74] H. Endo, H. Okuyama, M. Ohue, M. Inoue, Dormancy of Cancer Cells with Suppression of AKT Activity Contributes to Survival in Chronic Hypoxia, *PLoS One*. 9 (2014) e98858. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098858>.
- [75] J.L. Ku, K.A. Yoon, I.J. Kim, W.H. Kim, J.Y. Jang, K.S. Suh, S.W. Kim, Y.H. Park, J.H. Hwang, Y.B. Yoon, J.G. Park, Establishment and characterisation of six human biliary tract cancer cell lines, *Br. J. Cancer*. 87 (2002) 187–193. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600440>.
- [76] H.C. R Lin, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 1172–1184.
- [77] M.J. Bissell, V.M. Weaver, S.A. Lelièvre, F. Wang, O.W. Petersen, K.L. Schmeichel, Tissue Structure, Nuclear Organization, and Gene Expression in Normal and Malignant Breast I, 1999.
- [78] F. Pampaloni, E.G. Reynaud, E.H.K. Stelzer, The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8 (2007) 839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>.
- [79] S.C. Ramaiahgari, M.W. Den Braver, B. Herpers, V. Terpstra, J.N.M. Commandeur, B. Van De Water, L.S. Price, A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies, *Arch. Toxicol.* 88 (2014) 1083–1095. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1215-9>.
- [80] S. Ramaiahgari, A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver like properties for repeated dose high throughput toxicity studies, *Arch Toxicol.* 88 (2014) 1083–1095.
- [81] S.J. Elledge, Cell cycle checkpoints: Preventing an identity crisis, *Science* (80-.). 274 (1996) 1664–1672. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1664>.
- [82] C.J. Sherr, Cancer cell cycles, *Science* (80-.). 274 (1996) 1672–1674. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>.
- [83] M.B. Kastan, J. Bartek, Cell-cycle checkpoints and cancer, *Nature*. 432 (2004) 316–323.

- <https://doi.org/10.1038/nature03097>.
- [84] M. Malumbres, M. Barbacid, Cell cycle, CDKs and cancer: A changing paradigm, *Nat. Rev. Cancer*. 9 (2009) 153–166. <https://doi.org/10.1038/nrc2602>.
- [85] A. Kreso, C.A. O'Brien, P. Van Galen, O.I. Gan, F. Notta, A.M.K. Brown, K. Ng, M. Jing, E. Wienholds, C. Dunant, A. Pollett, S. Gallinger, J. McPherson, C.G. Mullighan, D. Shibata, J.E. Dick, Variable clonal repopulation dynamics influence chemotherapy response in colorectal cancer, *Science* (80-.). 339 (2013) 543–548. <https://doi.org/10.1126/science.1227670>.
- [86] H. Okuyama, H. Endo, T. Akashika, K. Kato, M. Inoue, Downregulation of c-MYC protein levels contributes to cancer cell survival under dual deficiency of oxygen and glucose, *Cancer Res*. 70 (2010) 10213–10223. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2720>.
- [87] R.Z. Lin, H.Y. Chang, Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>.
- [88] H.R. Mellor, D.J.P. Ferguson, R. Callaghan, A model of quiescent tumour microregions for evaluating multicellular resistance to chemotherapeutic drugs, *Br. J. Cancer*. 93 (2005) 302–309. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602710>.
- [89] A. Tamura, Y. Onishi, R. An, S. Koshiba, K. Wakabayashi, K. Hoshijima, W. Priebe, T. Yoshida, S. Kometani, T. Matsubara, K. Mikuriya, T. Ishikawa, In vitro evaluation of photosensitivity risk related to genetic polymorphisms of human ABC transporter ABCG2 and inhibition by drugs., *Drug Metab. Pharmacokinet.* 22 (2007) 428–440. <https://doi.org/10.2133/dmpk.22.428>.
- [90] T. Nakayama, S. Otsuka, T. Kobayashi, H. Okajima, K. Matsumoto, Y. Hagiya, K. Inoue, T. Shuin, M. Nakajima, T. Tanaka, S.I. Ogura, Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep36478>.

- [91] Y. Hagiya, T. Adachi, S. Ogura, R. An, A. Tamura, H. Nakagawa, I. Okura, T. Mochizuki, T. Ishikawa, Nrf2-dependent induction of human ABC transporter ABCG2 and heme oxygenase-1 in HepG2 cells by photoactivation of porphyrins: biochemical implications for cancer cell response to photodynamic therapy., *J. Exp. Ther. Oncol.* 7 (2008) 153–67. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18771089> (accessed April 4, 2019).
- [92] Y. Hagiya, Y. Endo, Y. Yonemura, K. Takahashi, M. Ishizuka, F. Abe, T. Tanaka, I. Okura, M. Nakajima, T. Ishikawa, S. ichiro Ogura, Pivotal roles of peptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 in 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photocytotoxicity of gastric cancer cells in vitro, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 9 (2012) 204–214. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.12.004>.
- [93] J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67., *J. Immunol.* 133 (1984) 1710–1715.
- [94] T. Waldman, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, p21 Is Necessary for the p53-mediated G1 Arrest in Human Cancer Cells, *Cancer Res.* 55 (1995).
- [95] H. Huang, L. Zhu, B.R. Reid, G.P. Drobny, P.B. Hopkins, Solution structure of a cisplatin-induced DNA interstrand cross-link, *Science* (80-.). 270 (1995) 1842. <https://doi.org/10.1126/science.270.5243.1842>.
- [96] D.B. Longley, D.P. Harkin, P.G. Johnston, 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer.* 3 (2003) 330–338. <https://doi.org/10.1038/nrc1074>.
- [97] J.N. Ho, D.M. Fishwild, Screening cytoactive compounds to determine cell cycle arrest using a microplate-based benchtop cell analysis system., *Cancer Res.* 64 (2004).
- [98] M.A. Idoate, R. Díez Valle, J. Echeveste, S. Tejada, Pathological characterization of the glioblastoma border as shown during surgery using 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence, *Neuropathology.* 31 (2011) 575–582. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1789.2011.01202.x>.

- [99] J. Moan, Ø. Bech, J.M. Gaullier, T. Stokke, H.B. Steen, L.W. Ma, K. Berg, Protoporphyrin IX accumulation in cells treated with 5-aminolevulinic acid: Dependence on cell density, cell size and cell cycle, *Int. J. Cancer*. 75 (1998) 134–139.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19980105\)75:1<134::AID-IJC20>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980105)75:1<134::AID-IJC20>3.0.CO;2-F).
- [100] I. Georgakoudi, P.C. Keng, T.H. Foster, Hypoxia significantly reduces aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX synthesis in EMT6 cells, *Br. J. Cancer*. 79 (1999) 1372–1377. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6690220>.
- [101] Y. Chen, M.M. Bieber, N.N.H. Teng, Hedgehog signaling regulates drug sensitivity by targeting ABC transporters ABCB1 and ABCG2 in epithelial ovarian cancer, *Mol. Carcinog.* 53 (2013) n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/mc.22015>.
- [102] K. Matsumoto, Effects of plasma membrane ABCB6 on 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced porphyrin accumulation in vitro: Tumor cell response to hypoxia, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 12 (2015) 45–51.
- [103] X.D. Huang, Z.F. Wang, L.M. Dai, Z.Q. Li, Microarray analysis of the hypoxia-induced gene expression profile in malignant C6 glioma cells, *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 13 (2012) 4793–4799. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.9.4793>.
- [104] R.K. Vadlapatla, A.D. Vadlapudi, V.K.C. Ponnaluri, D. Pal, M. Mukherji, A.K. Mitra, Molecular expression and functional activity of efflux and influx transporters in hypoxia induced retinal pigment epithelial cells, *Int. J. Pharm.* 454 (2013) 444–452.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.06.044>.
- [105] P.C. Krishnamurthy, G. Du, T. Vu, D. Sun, J.D. Schuetz, The mitochondrial transporter ABCB6 promotes hypoxic survival and its expression is regulated by hypoxic signals, *Cancer Res.* 64 (2004).
- [106] S. Vavricka, Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma increase PepT1 expression and activity in the human colon carcinoma cell line Caco-2/bbe and in mouse intestine, *Pflugers Arch.* 452 (2006) 71–80.

- [107] S. Anand, G. Honari, T. Hasan, P. Elson, E. V. Maytin, Low-dose methotrexate enhances aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells in vitro and in vivo, *Clin. Cancer Res.* 15 (2009) 3333–3343. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-3054>.
- [108] A.K. Sinha, S. Anand, B.J. Ortel, Y. Chang, Z. Mai, T. Hasan, E. V. Maytin, Methotrexate used in combination with aminolaevulinic acid for photodynamic killing of prostate cancer cells, *Br. J. Cancer.* 95 (2006) 485–495. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603273>.
- [109] M. Miura, K. Ito, M. Hayashi, M. Nakajima, T. Tanaka, S. Ogura, The Effect of 5-Aminolevulinic Acid on Cytochrome P450-Mediated Prodrug Activation, *PLoS One.* 10 (2015) e0131793. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131793>.
- [110] Y. Sugiyama, Y. Hagiya, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka, S.I. Ogura, The heme precursor 5-aminolevulinic acid disrupts the Warburg effect in tumor cells and induces caspase-dependent apoptosis, *Oncol. Rep.* 31 (2014) 1282–1286. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2945>.
- [111] Y. Sugiyama, Y. Hiraiwa, Y. Hagiya, M. Nakajima, T. Tanaka, S.I. Ogura, 5-Aminolevulinic acid regulates the immune response in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology, *BMC Immunol.* 19 (2018) 41. <https://doi.org/10.1186/s12865-018-0277-5>.
- [112] K. Yamashita, Y. Hagiya, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka, S.-I. Ogura, The effects of the heme precursor 5-aminolevulinic acid (ALA) on REV-ERB β activation, *FEBS Open Bio.* 4 (2014) 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.03.010>.
- [113] L. Yin, N. Wu, J.C. Curtin, M. Qatanani, N.R. Szwegold, R.A. Reid, G.M. Waite, D.J. Parks, K.H. Pearce, G.B. Wisely, M.A. Lazar, Rev-erb α , a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways, *Science* (80-.). 318 (2007) 1786–1789. <https://doi.org/10.1126/science.1150179>.
- [114] S. Raghuram, K.R. Stayrook, P. Huang, P.M. Rogers, A.K. Nosie, D.B. McClure, L.L. Burris, S. Khorasanizadeh, T.P. Burris, F. Rastinejad, Identification of heme as the ligand

- for the orphan nuclear receptors REV-ERB α and REV-ERB β , *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14 (2007) 1207–1213. <https://doi.org/10.1038/nsmb1344>.
- [115] L. Yin, M.A. Lazar, The Orphan Nuclear Receptor Rev-erb α Recruits the N-CoR/Histone Deacetylase 3 Corepressor to Regulate the Circadian Bmal1 Gene, *Mol. Endocrinol.* 19 (2005) 1452–1459. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0057>.
- [116] M. Ishizuka, Y. Hagiya, Y. Mizokami, K. Honda, K. Tabata, T. Kamachi, K. Takahashi, F. Abe, T. Tanaka, M. Nakajima, S. ichiro Ogura, I. Okura, Porphyrins in urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 8 (2011) 328–331. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.04.004>.
- [117] K. Inoue, U. Ota, M. Ishizuka, C. Kawada, H. Fukuhara, T. Shuin, I. Okura, T. Tanaka, S. ichiro Ogura, Porphyrins as urinary biomarkers for bladder cancer after 5-aminolevulinic acid (ALA) administration: The potential of photodynamic screening for tumors, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 484–489. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2013.05.002>.
- [118] K. Yamashita, Y. Hagiya, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka, S. ichiro Ogura, The effects of the heme precursor 5-aminolevulinic acid (ALA) on REV-ERB α activation, *FEBS Open Bio.* 4 (2014) 347–352. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2014.03.010>.
- [119] G.R. Morrison, Fluorometric Microdetermination of Heme Protein, *Anal. Chem.* 37 (1965) 1124–1126. <https://doi.org/10.1021/ac60228a014>.
- [120] K. Ogawa, J. Sun, S. Taketani, O. Nakajima, C. Nishitani, S. Sassa, N. Hayashi, M. Yamamoto, S. Shibahara, H. Fujita, K. Igarashi, Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1, *EMBO J.* 20 (2001) 2835–2843. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.11.2835>.
- [121] J. Sun, H. Hoshino, K. Takaku, O. Nakajima, A. Muto, H. Suzuki, S. Tashiro, S. Takahashi, S. Shibahara, J. Alam, M.M. Taketo, M. Yamamoto, K. Igarashi, Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene, *EMBO J.* 21 (2002) 5216–5224.

- <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf516>.
- [122] N. Wu, L. Yin, E.A. Hanniman, S. Joshi, M.A. Lazar, Negative feedback maintenance of heme homeostasis by its receptor, Rev-erb α , *Genes Dev.* 23 (2009) 2201–2209.
<https://doi.org/10.1101/gad.1825809>.
- [123] K. Kaasik, C.C. Lee, Reciprocal regulation of haem biosynthesis and the circadian clock in mammals, *Nature.* 430 (2004) 467–471. <https://doi.org/10.1038/nature02724>.
- [124] A. Görlach, U. Berchner-Pfannschmidt, C. Wotzlaw, R. Cool, J. Fandrey, H. Acker, K. Jungermann, T. Kietzmann, Reactive oxygen species modulate HIF-1 mediated PAI-1 expression: involvement of the GTPase Rac1, *Thromb. Haemost.* 89 (2003) 926–935.
<https://doi.org/10.1055/s-0037-1613480>.
- [125] J. Alam, S. Shibaharas, A. Smith⁵, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY
Transcriptional Activation of the Heme Oxygenase Gene by Heme and Cadmium in Mouse Hepatoma Cells*, 264 (1989) 6371–6375.
- [126] Y. Lavrovsky, M.L. Schwartzman, R.D. Levere, A. Kappas, N.G. Abraham, Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa B and AP-2 in the promoter region of the human heme oxygenase 1 gene., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91 (1994) 5987–91.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.91.13.5987>.
- [127] P. Di Mascio, T.P. Devasagayam, S. Kaiser, H. Sies, Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet molecular oxygen quenchers., *Biochem. Soc. Trans.* 18 (1990) 1054–6.
<https://doi.org/10.1042/BST0181054>.
- [128] S. Doré, S.H. Snyder, Neuroprotective action of bilirubin against oxidative stress in primary hippocampal cultures, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 890 (1999) 167–172.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1999.tb07991.x>.
- [129] J. Kapitulnik, Bilirubin: An endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 773–779.
<https://doi.org/10.1124/mol.104.002832>.

- [130] M. Minetti, C. Mallozzi, A.M.M. Di Stasi, D. Pietraforte, Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma, *Arch. Biochem. Biophys.* 352 (1998) 165–174. <https://doi.org/10.1006/abbi.1998.0584>.
- [131] J. Wade Harper, G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S.J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, *Cell*. 75 (1993) 805–816. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90499-G](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90499-G).
- [132] C. Deng, P. Zhang, J. Wade Harper, S.J. Elledge, P. Leder, Mice Lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell*. 82 (1995) 675–684. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90039-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90039-X).
- [133] P. Inguaggiato, L. Gonzalez-Michaca, A.J. Croatt, J.J. Haggard, J. Alam, K.A. Nath, Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis, *Kidney Int.* 60 (2001) 2181–2191. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.2001.00046.x>.
- [134] K. Kume, M.J. Zylka, S. Sriram, L.P. Shearman, D.R. Weaver, X. Jin, E.S. Maywood, M.H. Hastings, S.M. Reppert, mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop, *Cell*. 98 (1999) 193–205. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81014-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81014-4).
- [135] M. Reick, J.A. Garcia, C. Dudley, S.L. McKnight, NPAS2: An analog of clock operative in the mammalian forebrain, *Science* (80-.). 293 (2001) 506–509. <https://doi.org/10.1126/science.1060699>.
- [136] N. Preitner, F. Damiola, Luis-Lopez-Molina, J. Zakany, D. Duboule, U. Albrecht, U. Schibler, The orphan nuclear receptor REV-ERB α controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator, *Cell*. 110 (2002) 251–260. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00825-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00825-5).
- [137] N. Dögnitz, D. Salomon, M. Zellweger, J.P. Ballini, T. Gabrecht, N. Lange, H. van den Bergh, G. Wagnières, Comparison of ALA- and ALA hexyl-ester-induced PpIX depth

- distribution in human skin carcinoma, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 93 (2008) 140–148.
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.07.012>.
- [138] B. Liu, T.J. Farrell, M.S. Patterson, A dynamic model for ALA-PDT of skin: Simulation of temporal and spatial distributions of ground-state oxygen, photosensitizer and singlet oxygen, *Phys. Med. Biol.* 55 (2010) 5913–5932.
<https://doi.org/10.1088/0031-9155/55/19/019>.
- [139] C. Deng, P. Zhang, J. Wade Harper, S.J. Elledge, P. Leder, Mice Lacking p21 CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control, *Cell.* 82 (1995) 675–684. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90039-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90039-X).
- [140] T. Scholzen, J. Gerdes, The Ki-67 protein: From the known and the unknown, *J. Cell. Physiol.* 182 (2000) 311–322.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9).
- [141] H. Drexler, Review of alterations of the cyclin-dependent kinase inhibitor INK4 family genes p15, p16, p18 and p19 in human leukemia–lymphoma cells, *Leukemia.* 12 (1998) 845–859. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2401043>.
- [142] Y. Shi, J. Massagué, Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus, *Cell.* 113 (2003) 685–700. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00432-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00432-X).
- [143] J. Massagué, G1 cell-cycle control and cancer, *Nature.* 432 (2004) 298–306.
<https://doi.org/10.1038/nature03094>.
- [144] S. Jinno¹, K. Sutol, A. Nagata¹, M. Igarashi², Y. Kanaoka¹, H. Nojima¹, H. Okayama¹, Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle, 1994.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC394984/pdf/emboj00055-0063.pdf>
(accessed April 4, 2019).
- [145] Z. Xiao, Z. Chen, A.H. Gunasekera, T.J. Sowin, S.H. Rosenberg, S. Fesik, H. Zhang, Chk1 mediates S and G2 arrests through Cdc25A degradation in response to DNA-damaging agents., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 21767–73. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300229200>.

- [146] N. Mailand, A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek, J. Lukas, Regulation of G2/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability, *EMBO J.* 21 (2002) 5911–5920. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf567>.
- [147] F. Lévi, R. Zidani, J.L. Misset, Randomised multicentre trial of chronotherapy with oxaliplatin, fluorouracil, and folinic acid in metastatic colorectal cancer, *Lancet.* 350 (1997) 681–686. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)03358-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)03358-8).
- [148] M.C. Mormont, F. Levi, Cancer chronotherapy: Principles, applications, and perspectives, *Cancer.* 97 (2003) 155–169. <https://doi.org/10.1002/cncr.11040>.
- [149] R.C. Hermida, D.E. Ayala, J.R. Fernández, C. Calvo, Chronotherapy improves blood pressure control and reverts the nondipper pattern in patients with resistant hypertension, *Hypertension.* 51 (2008) 69–76. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096933>.
- [150] B. Zhao, X. Wei, W. Li, R.S. Udan, Q. Yang, J. Kim, J. Xie, T. Ikenoue, J. Yu, L. Li, P. Zheng, K. Ye, A. Chinnaiyan, G. Halder, Z.C. Lai, K.L. Guan, Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control, *Genes Dev.* 21 (2007) 2747–2761. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>.
- [151] Y. Ma, Y. Yang, F. Wang, Q. Wei, H. Qin, Hippo-YAP signaling pathway: A new paradigm for cancer therapy, *Int. J. Cancer.* 137 (2015) 2275–2286. <https://doi.org/10.1002/ijc.29073>.
- [152] M.S. Wicha, S. Liu, G. Dontu, Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift, *Cancer Res.* 66 (2006) 1883–1890. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3153>.
- [153] S. Bao, Q. Wu, S. Sathornsumetee, Y. Hao, Z. Li, A.B. Hjelmeland, Q. Shi, R.E. McLendon, D.D. Bigner, J.N. Rich, Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor, *Cancer Res.* 66 (2006) 7843–7848. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-1010>.
- [154] A.P. Kusumbe, S.A. Bapat, Cancer stem cells and aneuploid populations within developing tumors are the major determinants of tumor dormancy, *Cancer Res.* 69 (2009) 9245–9253.

<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2802>.

研究業績目録

原著論文

本研究を含む論文

1. Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. **Taku Nakayama**, Shimpei Otsuka, Tatsuya Kobayashi, Hodaka Okajima, Kentaro Matsumoto, Yuichiro Hagiya, Keiji Inoue, Taro Shuin, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura, Sci. Rep. 6, 36478; doi: 10.1038/srep36478, 2016.
2. Photoirradiation after aminolevulinic acid treatment suppresses cancer cell proliferation through the HO-1/p21 pathway. **Taku Nakayama**, Tatsuya Kobayashi, Shimpei Otsuka, Hideo Fukuhara, Tsutomu Namikawa, Keiji Inoue, Kazuhiro Hanasaki, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura. Photodiagnosis Photodyn. Ther. 2019 Aug 9. doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.07.021, 2019.

その他の論文

1. Intracellular heme increases in a manner dependent on cell density. **Taku Nakayama**, Hodaka Okajima, Tatsuya Kobayashi, Shimpei Otsuka, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura. ALA-Porphyrin Science, 4(2), 13-17, 2015.

学会発表

口頭発表

1. ○中山 沢、松本 健太郎、田中 徹、大倉 一郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、日本化学会第 95 春季年会、1J5-42、千葉、2015 年 3 月
2. ○中山 沢、松本 健太郎、田中 徹、大倉 一郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ、OS-31、長野、2015 年 9 月
3. ○中山 沢、大塚 慎平、小林 竜也、岡島 穂高、松本 健太郎、萩谷 祐一郎、井上 啓史、執印 太郎、中島 元夫、田中 徹、小倉 俊一郎「休眠がん細胞モデルにおける ALA 添加後の PpIX 蓄積および PDT 感受性の評価」、第 8 回 ポルフィリン-ALA 学会、東京都、2018 年 11 月
4. ○**Taku Nakayama**, Shimpei Otsuka, Kazuhiro Hanazaki, Keiji Inoue, Taro Shuin, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura, “Dormant Cancer Cells Accumulate High Protoporphyrin IX Levels And Are Sensitive To 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy”, The 6 th International ALA and Porphyrin Symposium, Tokyo, November, 2018
5. ○**Taku Nakayama**, Shimpei Otsuka, Kazuhiro Hanazaki, Keiji Inoue, Taro Shuin, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura, “Dormant Cancer Cells Accumulate High Protoporphyrin IX Levels And Are Sensitive To 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy”, 第 5 回 先端 PDDT フォーラム, Nara, December, 2018
6. ○中山 沢、小林 竜也、高橋 究、中島 元夫、田中 徹、福原 秀雄、井上 啓史、小倉 俊一郎「腫瘍細胞における ALA-PDT 後の遺伝子変化および細胞増殖評価」、第 9 回 ポルフィリン-ALA 学会、大阪市、2019 年 4 月
7. ○**Taku Nakayama**, Shimpei Otsuka, Kazuhiro Hanazaki, Keiji Inoue, Taro Shuin, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka & Shun-ichiro Ogura, “Dormant Cancer Cells Accumulate High Protoporphyrin IX Levels And Are Sensitive To 5-aminolevulinic Acid-based Photodynamic

- Therapy”, 17th International Photodynamic Association World Congress, Boston, June, 2019
8. ○中山 沢「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、高知大学&高知工科大学&高知県立大学 医工連携交流会、高知市、2019年7月
 9. ○小倉 俊一郎、中山 沢、大塚 慎平、中島 元夫、田中 徹、山本 新九郎、花崎 和弘、井上 啓史「休眠がん細胞モデルにおける ALA 添加後の PpIX 蓄積および PDT 感受性の評価」、2019 年 日本光線力学学会・日本脳神経外科光線力学学会 合同学術講演会、東京、2019 年 9 月
 10. ○中山 沢、小林 竜也、高橋 究、中島 元夫、田中 徹、福原 秀雄、井上 啓史、小倉 俊一郎「腫瘍細胞における ALA-PDT 後の遺伝子変化および細胞増殖評価」、第 40 回日本レーザー医学会総会、浜松市、2019 年 10 月
 11. ○中山 沢、小林 竜也、高橋 究、中島 元夫、田中 徹、山本 新九郎、井上 啓史、小倉 俊一郎「ALA-PDT が腫瘍細胞に及ぼす遺伝子変化および細胞増殖変化」、第 6 回 先端 PDDT フォーラム、大阪市、2019 年 12 月
 12. ○中山 沢、大塚 慎平、花崎 和弘、井上 啓史、中島 元夫、田中 徹、小倉 俊一郎「休眠がん細胞における 5-ALA-PDT の評価」、第 38 回 日本ヒト細胞学会学術集会、高知市、2020 年 8 月
 13. ○**Taku Nakayama**, Shinkuro Yamamoto, Keiji Inoue, Kazuhiro Hanazaki, Motowo Nakajim, Tohru Tanaka, Shun-ichiro Ogura, “Novel strategy to treat dormant cancer cells by photodynamic therapy”, LASER WEEK IN KOCHI、高知市、2020 年 10 月
 14. ○中山 沢、山本 新九郎、花崎 和弘、井上 啓史、中島 元夫、田中 徹、小倉 俊一郎「がん休眠性が 5-ALA-PDT に及ぼす影響」、LASER WEEK IN KOCHI、高知市、2020 年 10 月

ポスター発表

1. ○中山 沢、松本 健太郎、田中 徹、大倉 一郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、第4回ポルフィリン-ALA学会、P-10、兵庫、2014年4月
2. ○中山 沢、松本 健太郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、第73回日本癌学会学術総会、P-2210、神奈川、2014年9月
3. ○**Taku Nakayama**, Kentaro Matsumoto, Tohru Tanaka, Ichiro Okura, Shun-ichiro Ogura「The mechanism of porphyrin metabolism in cancer spheroid after administration of 5-aminolevulinic acid」、21th International SPACC Symposium, SPACCp14, Tokyo, Nov 2014
4. ○中山 沢、松本 健太郎、田中 徹、大倉 一郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、第5回ポルフィリン-ALA学会、P-9、東京、2015年4月
5. ○中山 沢、松本 健太郎、小倉 俊一郎「3次元培養がん細胞におけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、第74回日本癌学会学術総会、P-3150、愛知、2015年10月
6. ○**T. Nakayama**, K. Matsumoto, T. Tanaka, I. Okura, S. Ogura「Mechanism of porphyrin metabolism in cancer spheroid after administration of 5-aminolevulinic acid」、2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, #397 124, Hawaii, Dec 2015
7. ○**Taku Nakayama**, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Keiji Inoue, Shun-ichiro Ogura, “Photoirradiation after aminolevulinic acid treatment suppresses cancer cell proliferation through the HO-1/p21 pathway”, 第78回日本癌学会学術総会、京都市、2019年9月

受賞歴

口頭講演賞

1. ○中山 沢、松本 健太郎、田中 徹、大倉 一郎、小倉 俊一郎「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ、OS-31、長野、2015 年 9 月、**ベストトーク賞**

ポスター賞

1. ○中山 沢「がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析」、平成 26 年度「論文研究計画論 B」中間発表会、神奈川、2014 年 12 月、**優秀ポスター賞**
2. ○**Taku Nakayama**, Kentaro Matsumoto, Tohru Tanaka, Ichiro Okura, Shun-ichiro Ogura「The mechanism of porphyrin metabolism in cancer spheroid after administration of 5-aminolevulinic acid」、21th International SPACC Symposium、SPACCp14、Tokyo、Nov 2014、**Poster Award**

謝辞

本論文は筆者が東京工業大学・生命理工学部・生体分子コース・学士課程、東京工業大学大学院・生命理工学研究科・生物プロセス専攻・修士課程および東京工業大学大学院・生命理工学院・生命理工コースに在籍中の研究成果をまとめたものである。本研究を遂行するにあたり、愛する家族に感謝の意を表す。家族の精神的・金銭的補助があったからこそ、私は研究に専念することができた。同専攻准教授・小倉俊一郎先生には指導教員として、本研究実施の機会を与えて頂き、その遂行にあたって終始、直接のご指導を頂いた。並びに本専攻の小倉研究室の各位にも日頃より有益なご討論・ご助言を頂いた。ここに深謝する。

本研究の第3章の実験では、高知大学・医学部・泌尿器科学教室の教授・井上啓史、川田千明氏に有益なご助言、論文の細部にわたりご指導を頂いた。第2章から第3章までの実験では、SBIファーマ株式会社取締役CTO・田中徹博士、執行役員・中島元夫博士、神戸研究所所長・石塚昌宏氏、研究開発部研究員・井上克司氏、白銀玲博士、医薬開発本部探索研究部・高橋究博士に研究試料を提供して頂くとともに有益なご助言を頂いた。第3章の共焦点レーザー顕微鏡のプログラム作成に関して、カールツァイスマイクロコピー株式会社・薬袋厚氏に有益なご助言を頂いた。第2章のがん休眠性に関する実験では、大阪成人病センター研究所・井上正宏博士に有益なご助言を頂いた。ここに同氏に対して深謝する。

最後に、先人の研究者らに対して深い尊敬を抱くとともに心より感謝する。私は彼らが築きあげた巨人の肩に立ったにすぎない。特に引用文献に挙げた著者らの努力がなければ、私の研究を遂行することは不可能であった。「生命神秘の解明」および「人類生活の向上」という大きな目標を、国籍・地域・時代を越えて彼らと同じように目指した経験は大きな誇りである。私の研究成果が未来の研究者の一助になるのであれば、それはこの上ない喜びである。

令和 3年 1月 5日