

## 新奇光感受性物質 PLP による光線力学療法が オートファジーの働きでがん細胞を選択的に破壊することを解明

新しい治療法である光線力学療法（PDT）に新奇光感受性物質ポリフィリポプロテイン（PLP）を用い、正常細胞とがん細胞への効果を観察しました。その結果、PLP はオートファジーのメカニズムによりがん細胞を選択的に破壊することを発見しました。効果的ながん治療につながる画期的な成果です。

がんは1981年以降現在に至るまで日本人の死因の第1位です。現在は主に手術療法、化学療法、放射線療法が治療に用いられていますが、これらは術後のQOL(Quality of Life)が大きく低下するため、新しい治療法の開発が強く望まれています。光線力学療法(PDT: Photo Dynamic Therapy)は、他の治療法に比べ侵襲性が低いとして注目されている新しい治療法です。PDTではまず体内に光感受性物質を投与します。次に、患部に光を照射し、光感受性物質に光化学反応を引き起こして活性酸素(ROS)を発生させ、がん細胞を壊死させます。PDTの性能向上には、光感受性物質ががん細胞に特異的に集積し、ROSががん細胞だけを効率よく壊死させるメカニズムの解明が必要不可欠です。

本研究では、近年開発された光感受性物質ポリフィリポプロテイン(Polphyliipoprotein: PLP)に注目しました。高い治療効果を持った光感受性物質ですが、そのメカニズムは分かっていませんでした。

正常細胞のラット胃上皮細胞株 RGM1 と、同じ由来のがん細胞であるラット胃粘膜由来がん様変異体 RGK1 を用い、PLP による PDT の効果の違いを共焦点超解像顕微鏡で詳細に観察しました。その結果、ファゴソームと呼ばれる細胞内小胞の膜上に PLP が蓄積することが明らかになりました。ファゴソームは、細胞内の異物やタンパク質などを分解して再利用するオートファジー機構の初期に生成されます。増殖が激しいがん細胞が飢餓状態にあるとオートファジー機構が進みます。そこで PDT を行うと、RGK1 ではファゴソーム膜が破れ、タンパク質などを分解する加水分解酵素や ROS などの内容物が細胞内に拡散し、細胞は壊死しました。これに対し RGM1 では、小さなファゴソームが合体して大きなファゴソームを形成しましたが、ファゴソームは破壊されませんでした。

つまり、PLP ががん細胞を選択的に壊死させ高い治療効果を生じさせるのは、飢餓状態にあるがん細胞がオートファジー機構を進行させ、分解された内容物を用いてがん細胞を壊死させるユニークで新しいメカニズムであることが明らかになりました。この発見は、PLP-PDT の高い選択性と潜在的な効果を含め、治療のさまざまな側面について新たな方針を与えるものと言えます。

### 研究代表者

筑波大学数理物質系物理工学域

重川 秀実 教授

筑波大学数理物質系／タカノ株式会社技術開発本部

谷中 淳 客員准教授／主査

## 研究の背景

がんは日本人の死因の3割近くを占め、1981年以降現在に至るまで死因第1位となっています。対策は急務ですが、がん細胞には人体が持つ免疫機構や修復機構が機能しないことから、確実な治療法は確立されていません。

現代の医学では、がんの発生機構、増殖機構、転移機構を研究することで、治療法が開発されています。分子生物学や化学の進歩によって分子レベル、遺伝子レベル、細胞レベルで研究が行われています。その結果、がんの種類によっては、新しい治療方法が見いだされ、生存率が著しく向上したものもあります。しかし、がんは発生機構、増殖機構、転移機構が患者によって異なるため、治療効果が現れない患者も多く、あらゆる種類のがんに対して有効な治療方法が確立されているとは言えません。

多種多様ながんに対して有効な治療方法として、現在は主に手術療法、化学療法、放射線療法が用いられています。しかし、これらは術後のQOL(Quality of Life)が大きく低下するため、より侵襲が少なく臓器温存が可能な新しい治療法の開発が強く望まれています。

新しいがん治療法のうち、光線力学療法(PDT: Photo Dynamic Therapy)は体内に光感受性物質を投与し、患部に光を照射することで、一重項酸素などの活性酸素種<sup>注1)</sup>(Reactive Oxygen Species: ROS)をがん細胞内で発生させ、がん細胞を壊死させる治療法です。この治療法の性能向上の鍵は、光感受性物質をがん細胞のみに集積させ、特定の光によって光感受性物質から効率よくROSが発生するようにデザインすることです。しかし、そのためには、光感受性物質ががん細胞に特異的に集積し、ROSが効率よくがん細胞だけを壊死させるメカニズムの解明が必要不可欠です。

ポルフィリポプロテイン(Polphylioprotein: PLP、図1(a))は、近年開発された高い生体適合性と腫瘍選択性を持ったナノ粒子状物質です。これまでPDT及び光線力学診断<sup>注2)</sup>(PDD: Photodynamic diagnosis)における高性能な光感受性物質として研究されています。近年ではPLPを用いたPDTによって、治療した部位から離れた箇所の腫瘍を抑制するアブスコパル効果<sup>注3)</sup>も実証されています。

PLPを用いたPDTも、従来のPDTと同様に細胞にPLPを投与した後に光を照射することでROSを発生させ、病変を破壊して治療効果を発揮すると考えられてきました。しかし、PLPは正常細胞にも多く取り込まれるため、PDTにおいて、なぜPLPががん細胞に特異的に働き、高い治療効果をもたらすのかを説明できませんでした。PLPは非常に有望な光増感剤であり、PDTにおける役割の解明が強く望まれます。そこで、正常細胞のラット胃上皮細胞株RGM1と、同じ由来のがん細胞であるラット胃粘膜由来がん様変異体RGK1<sup>注4)</sup>を用意し、それぞれにPLPを投与しました。そして、PDTの効果の違いを共焦点超解像顕微鏡<sup>注5)</sup>で詳細に観察しました。

## 研究内容と成果

本研究により、まず、PLPがファゴソーム膜に蓄積されることが明らかになりました。

ファゴソームは細胞内小胞で、オルガネラ<sup>注6)</sup>の一部や異物がリン脂質二重膜で構成された隔離膜で囲まれたものです。細胞が不要な成分を分解する機能であるオートファジー<sup>注7)</sup>は、ファゴソームの生成から始まります。PLPが細胞内に取り込まれた場合、細胞はそれらを異物とみなし、ファゴソームが形成されます。PLPはファゴソームに取り込まれ、分解・隔離される対象と考えられます。ラット胃粘膜由来がん様変異体RGK1の細胞にファゴソームにPLPが蓄積すると、このファゴソームはオートファジーのメカニズムに従ってリソソーム<sup>注8)</sup>と結合し、ファゴリソソームを形成します。取り込まれた物質は通常、ファゴリソソーム内で加水分解酵素を用いて分解されます。

図1(c)は、PLPを投与したRGK1サンプルの明視野画像と蛍光画像<sup>注9)</sup>のオーバーラップ画像(左)と細胞の模式図で、核の近くにファゴリソソームが存在している様子が分かります。がん細胞が飢餓状態

にあると、オートファジーによってファゴソームが核の近くに移動し、リソソームと結合するためです。図 1(d)は、共焦点超解像顕微鏡によって得られた、Z 方向(高さ方向)に焦点を移動させ観察した蛍光画像(左)と、その画像を高さ方向に並べて三次元(3D)化した画像(右)です。ファゴリソソームが明瞭に観察されています。一方、RGM1 では、PLP を取り込んだファゴソームは細胞の端の方に移動し、リソソームとは結合しません。

図 2 は PLP 投与後に、PLP が活性酸素を発生させる光の波長で、1 分間継続して光照射を行った際のファゴソームの変化を示すタイムラプス像(一定間隔で画像を撮り並べたもの)です。PLP が蓄積したファゴリソソームが細胞内で生成した後に PDT を行うと、RGK1 では、1 分以内にファゴソームのリン脂質二重膜が破壊される様子が観察されました。ファゴリソソームでは、光照射によって発生した ROS がファゴソーム膜を破壊し、加水分解酵素や ROS といったファゴリソソームの内容物が細胞内に拡散して小器官を破壊します。これらのメカニズムにより、細胞は壊死を起こすことが分かりました。

これに対し RGM1 では、小さなファゴソームが合体して大きなファゴソームを形成しますが、光を照射した 1 分間ではファゴソームは破壊されませんでした。RGM1 は正常細胞であるため RGK1 中のファゴリソソームに比べて酸化が進んでおらず、安定なためかも知れません。

ファゴソームはがん細胞や正常細胞などあらゆる種類の細胞で産生されますが、本メカニズムが PDT において PLP ががん細胞に高い治療効果を生じさせる理由であることが明らかになりました。正常細胞のラット胃上皮細胞株 RGM1 と、同じ由来のがん細胞であるラット胃粘膜由来がん様変異体 RGK1 を併せて用いることで、PLP による PDT はオートファジーの経路を利用したユニークで新しいメカニズムであることが始めて明らかになりました。この発見は、PLP-PDT の高い選択性と潜在的な効果を含め、がん治療のさまざまな側面について新たな可能性を示唆するものです。

## 今後の展開

本研究は、PLP を用いた PDT が、オートファジーを誘導・利用することでがん治療効果を高めるという、これまで報告されていなかったメカニズムを持つことを明らかにしました。また、PDT における光照射時の PLP によるファゴソーム生成とその反応過程は、RGK1 と RGM1 とで全く異なる挙動を示し、がん細胞に対して高い選択性を持つ PLP による PDT のメカニズムを解明しました。

オートファジーはとりわけ、誤って特定の立体構造を作らず正常な機能を発揮できなくなった、即ち、ミスフォールド<sup>注 10)</sup>したタンパク質を除去することによって細胞機能を正常化する役割を果たします。このため、早期がんでは腫瘍抑制効果があります。従って、ファゴソームの形成を誘導することは、腫瘍抑制につながる可能性があります。一方、成長期の腫瘍では、オートファジーは重要な生存経路として働いて栄養を供給し、抗がん剤を排除します。よって、腫瘍におけるオートファジーを制御することは、効果的な治療法となります。

ファゴソームを選択的に制御する PLP と PDT の併用は、オートファジーに関連するさまざまな疾患の治療に貢献する可能性があります。また、PLP は元々、ドラッグデリバリー剤<sup>注 11)</sup>として開発されました。本研究は PLP によるオートファジーを介した細胞内ドラッグデリバリーの可能性も示唆しています。PLP 以外でも、(1) 細胞に効率よく取り込まれる構造を持っていること、(2) オートファジーを誘導する物質であること、(3) ファゴソーム膜上に蓄積する物質であること、を満たす他の分子や生体材料は同様の効果を示すと考えられ、将来、全く新しい創薬を切り開く可能性があります。

参考図

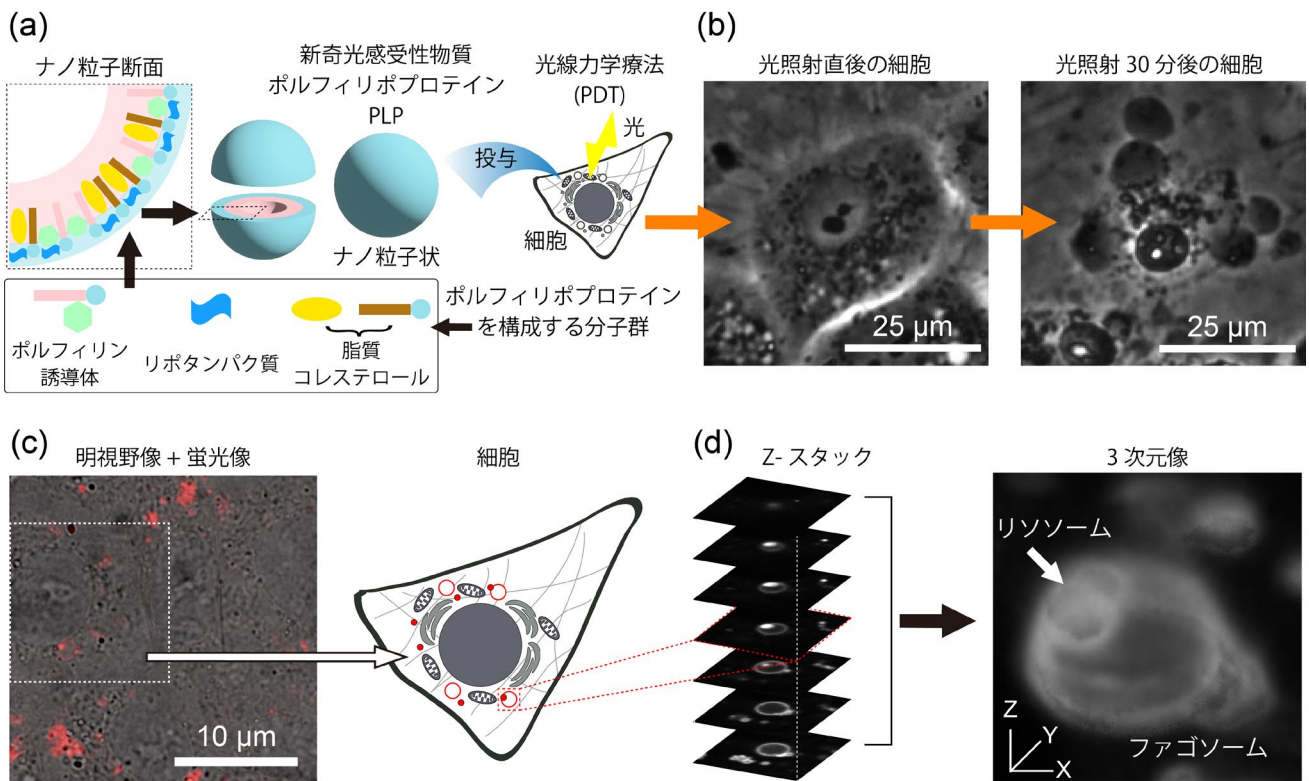


図 1 (a)PLP ナノ粒子の構造と、(b)PDT 直後と 30 分後の RGK1 細胞の様子。(c)共焦点超解像顕微鏡により得られた RGK1 の明視野観察像と蛍光観察像を重ねたもの。(d)z 方向の深さを変えて得られた一連の蛍光観察像(左)と、それを用いて作製した 3 次元像。

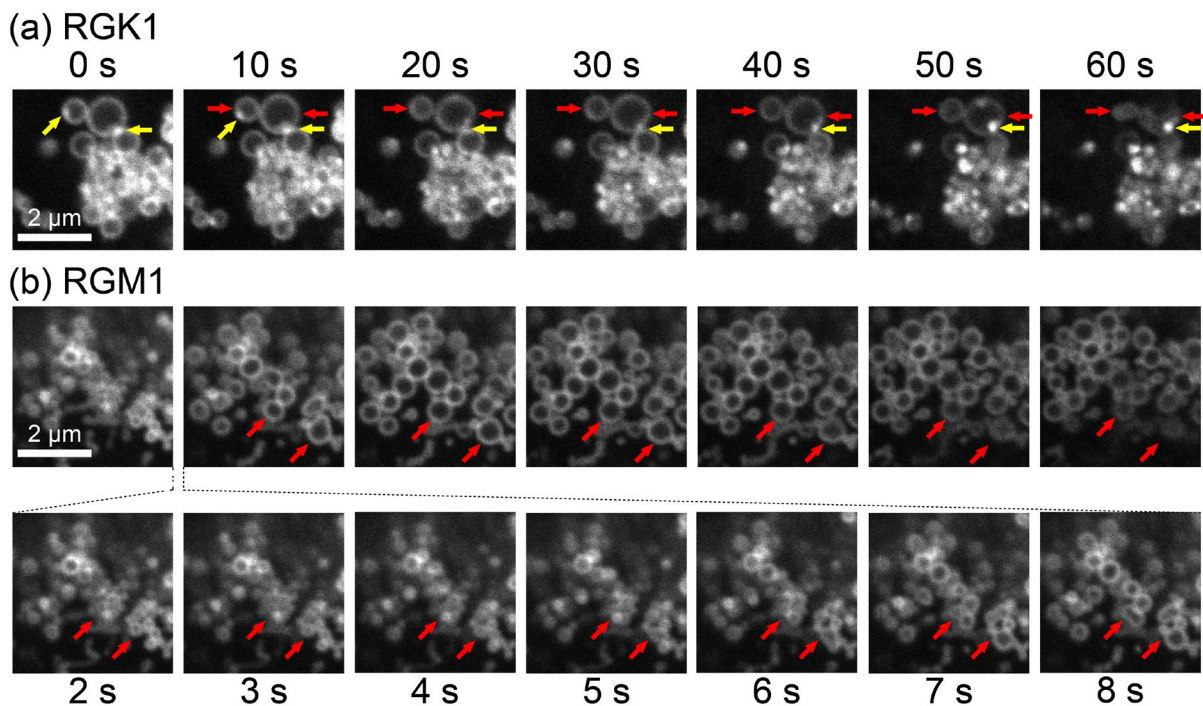


図 2 (a)RGK1 と (b)RGM1 に PDT (光照射) を 1 分間行いながら観察したタイムラプス像 (一定間隔で撮影した像を並べたもの)。赤色の矢印がファゴソーム、黄色い矢印がリソソームを示している。RGK1 では、ファゴソームとリソソームが結合してファゴリソソームを形成している。RGK1 では、50 秒から

ファゴリソームが壊れているが、RGM1 では、光照射 10 秒で小さいファゴソームが融合してある大きさにそろい、その後 1 分までファゴソームは壊れない。

## 用語解説

### 注1) 活性酸素種 (ROS)

酸素分子から変化した反応性の高い分子一群の総称。スーパーオキシドアニオン( $O_2^-$ )、ヒドロキシラジカル( $\cdot OH$ )、過酸化水素( $H_2O_2$ )、一重項酸素 ( $^1O_2$ ) などが含まれる。

### 注2) 光線力学診断 (PDD)

がんなどの病巣に特異的に集積する光感受性物質を投与し、励起光を照射することで発生する蛍光を検知することにより、目視では認識困難な病巣を診断する手法。

### 注3) アブスコパル効果

治療を施した病巣から転移などで離れた(遠隔)他の病巣に治療効果が現れる現象。放射線治療においてしばしば現れる効果で、免疫活性の増強が機序であると考えられている。光線力学療法でアブスコパル効果が表れることは非常にまれだが、近年では、既存の光感受性物質とチェックポイント阻害剤(がん細胞がリンパ球などの免疫細胞の攻撃を逃れる仕組みを解除する薬剤)などと併用することでアブスコパル効果を生じさせることに成功している。

### 注4) ラット胃粘膜由来がん様変異体 RGK1

筑波大学医学医療系の松井裕史講師が樹立したラット胃上皮細胞株 RGM1 をがん化させた細胞株。RGM1 と由来が同じであるため、正常細胞とがん細胞の比較実験に用いられる。

### 注5) 共焦点超解像顕微鏡

共焦点顕微鏡は点光源からの光を、レンズを通してサンプルの一点に照射し、反射光あるいは蛍光をレンズで集光して、焦点を結んだ光をピンホールに通して検出することで、サンプルの焦点面以外の光を除去する光学系が組み込まれた顕微鏡である。この共焦点光学系のピンホールをマイクロレンズにすることで分解能を向上させ、超解像化した顕微鏡が共焦点超解像顕微鏡である。(https://www.yokogawa.co.jp/solutions/products-and-services/life-science/spinning-disk-confocal/super-resolution/#詳細\_\_SoRa 超解像の原理)

### 注6) オルガネラ

細胞内小器官の総称。細胞核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体など。

### 注7) オートファジー

細胞が細胞内の異物やタンパク質、不要となった細胞小器官の一部を分解し再利用する仕組み。

### 注8) リソソーム

細胞小器官の一つ。細胞内にある小胞で、内部に加水分解酵素を保有している。細胞内消化器官。

### 注9) 明視野観察と蛍光観察

明視野観察は試料を白色光などで照らし、直接対物レンズで拡大観察する方法。一方、生体試料は多くの場合透明なので、観察対象に特異的に集積、結合する蛍光物質を用い、励起光を照射した際に生じる蛍光を観察する方法が蛍光観察である。

### 注10) ミスフォールディング

タンパク質は、生体内で一次構造であるポリペプチド鎖を形成した後、二次構造を経て、その機能を発現するように特定の立体構造(三次構造)に折りたたまれ、それらが集合体となる(四次構造)。ミスフォールディングは、この際に何らかの理由で正しく折りたたまれず、機能を発現しない、正常な役割を果たせないものが生じること。

#### 注1 1) ドラッグデリバリー剤

ドラッグデリバリーとは薬(ドラッグ)を生体内に投与した際に、場所や量など薬物の分布を制御すること。届けたい箇所に薬を届けることが狙いで、それを目的とした薬剤がドラッグデリバリー剤。

#### 研究資金

本研究は、日本学術振興会科学研究費補助金(23H00264)および戦略的創造研究推進事業(CREST)(JPMJCR1875)の一環として実施されました。

#### 掲載論文

【題名】 Polphylipoprotein-induced autophagy mechanism with high performance in photodynamic therapy.

(光線力学治療で高い効果を発揮するポリフィリポタンパク質誘導オートファジー機構)

【著者名】 Atsushi Taninaka<sup>1,2</sup>, Hiromi Kurokawa<sup>3</sup>, Mayuka Kamiyanagi<sup>1</sup>, Takahiro Ochiai<sup>2</sup>, Yusuke Arashida<sup>1</sup>, Osamu Takeuchi<sup>1</sup>, Hirofumi Matsui<sup>3</sup>, and Hidemi Shigekawa<sup>1</sup>

【所属】 1) Institute of Pure and Applied Sciences, University of Tsukuba

2) TAKANO Co. LTD.

3) Institute of Medicine, University of Tsukuba

【掲載誌】 Communications biology

【掲載日】 2023年11月28日

【DOI】 10.1038/s42003-023-05598-0

#### 問い合わせ先

【研究に関すること】

重川 秀実(しげかわ ひでみ)

筑波大学 数理物質系物理工学域/イノベティブ計測技術開発研究センター 教授

URL: <https://dora.bk.tsukuba.ac.jp>

【取材・報道に関すること】

筑波大学広報局

TEL: 029-853-2040

E-mail: [kohositu@un.tsukuba.ac.jp](mailto:kohositu@un.tsukuba.ac.jp)