

In vitro 光線力学療法モデルにおける
口腔癌細胞のアポトーシスと
オートファジーの調節

松江 彦兆

日本大学歯学部病理学講座

(指導：小宮山一雄 教授，松本直行 助教)

要 旨

光線力学療法 (photodynamic therapy, PDT) は、光感受性物質を腫瘍細胞に取り込ませた後、励起光の照射で発生する reactive oxygen species (ROS) によって腫瘍細胞を障害する治療法である。照射光の深達度が限られるために、臓器・組織の表在性病変が PDT の対象として注目されている。

一般に細胞の死は形態学的にアポトーシス、非アポトーシス細胞死であるオートファジーおよびネクローシスに分類されている。PDT による細胞死の分子メカニズムは未だ十分には解明されていないものの、これまでの報告ではアポトーシスによる細胞死を誘導することが示されている。

本研究は PDT の口腔癌細胞に対する障害効果のメカニズムを明らかにするため、光感受性物質である 5-aminolevulinic acid (ALA) を用いた *in vitro* ALA-PDT モデルを作製し、アポトーシスおよびオートファジー誘導に注目して解析をおこなった。

ALA-PDT モデルの対象として口腔領域で最も高頻度にみられる扁平上皮癌を選び、舌扁平上皮由来の癌細胞株である HSC-3 細胞の培養液に ALA を添加した後、励起光 (638 ± 5 nm, 100 J/cm²) の照射をおこなった。アポトーシス誘導の

有無を，TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL)で確認した。またアポトーシスを促進し，一方でオートファジーの抑制に働く **c-Jun** の遺伝子発現量を **realtime-PCR** で検討した。さらにオートファジー誘導の有無を確認するため，オートファゴソームマーカーとして知られる **microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3)** の発現を指標として，免疫細胞化学および **Western blot** で検討した。

HSC-3 細胞は ALA-PDT によって，細胞の萎縮や膨化などの形態変化を示し，ALA-PDT 後 3 時間で 6.7% ， 24 時間で 25.1%の細胞にアポトーシスが誘導されていた。**c-Jun** 遺伝子は ALA-PDT 後 1 時間でコントロールの 7.5 倍までに急増し，その後 3 時間に 2.2 倍まで減少したものの，依然として優位な発現上昇を示した。また ALA-PDT 後，LC3 陽性のオートファゴソーム形成が免疫細胞化学で確認された。オートファゴソームを指標としたオートファジーを起こしている細胞の割合は，経時的に有意な増加がみられた。さらにオートファゴソーム形成時に切断される LC3 II の発現増加を **Western blot** で検出した。

オートファジーの抑制に働く **c-Jun** の遺伝子発現が ALA-PDT 後 1 時間をピークに増加し，その後 3 時間まで依然として高い発現を示した。さらに ALA-PDT

後 6 時間からオートファジーが誘導された。

以上の結果から、ALA-PDT は口腔扁平上皮癌に対してアポトーシスおよびオートファジーを誘導することが明らかとなり、口腔癌の新規治療方法として臨床応用可能であると考えられた。

緒 言

光線力学療法（photodynamic therapy, PDT）は、光感受性物質を病変部組織に取り込ませた後、励起光の照射で発生する reactive oxygen species（ROS）によって腫瘍を構成する細胞を障害する治療法である。このときに生成される ROS は一重項酸素、ヒドロキシラジカル、スーパーオキシドラジカルおよび過酸化水素であり、これらが細胞膜、ミトコンドリアおよび DNA を傷害して細胞を死に至らしめると考えられている。¹⁾

PDT は呼吸器、上部消化管、子宮頸部に発生する慢性炎症性疾患や腫瘍の治療や、眼科領域では加齢黄斑変性症の治療に応用されつつある。²⁾ 皮膚科領域では、難治性炎症性疾患、前癌病変および表在性悪性腫瘍の治療に、光感受性物質の一つである 5-aminolevulinic acid（ALA）を用いた PDT が臨床応用されている。³⁻⁷⁾ ALA は、正常細胞では速やかにプロトポルフィリン IX、次いでヘムに代謝されるが、腫瘍細胞ではプロトポルフィリン IX の代謝酵素活性が低いいため、プロトポルフィリン IX が選択的に蓄積される。⁸⁻¹⁰⁾ プロトポルフィリン IX は光に励起されると ROS を発生させ、酸化ストレスによって細胞死が起こる。^{11, 12)} そのため、ALA-PDT は腫瘍細胞を選択的に傷害する治療として注目されて

いる。^{13, 14)} PDT を行うと、アポトーシスによる細胞死を誘導することが報告されている。¹⁵⁾ Agarwal らはアルミニウムフタロシアニンを用いた PDT が、マウスリンパ腫細胞にアポトーシスを誘導することを¹⁶⁾、また津田は ALA を用いた PDT で、ヒト口腔癌細胞にアポトーシスを誘導することを報告している。¹⁷⁾ しかしその後、多くの種類の光感受性物質と腫瘍細胞の検討が進み、PDT による細胞死は光感受性物質と腫瘍細胞の組合せによって異なるうえに、必ずしも PDT 後の細胞死はアポトーシスによるものだけではないことが判明した。^{15, 18)} 一般に細胞死はネクロシスとアポトーシスに大別されてきたが、近年では形態学的にアポトーシスと、非アポトーシス細胞死であるオートファジーおよびネクロシスに分類されている。¹⁹⁾ オートファジーは細胞のバルク分解系の一種であり、細胞質内に存在する異常タンパク質や、損傷を受けた細胞内小器官が脂質二重膜で構成されるオートファゴソームによって分画され、リソソームと融合することで、細胞内小器官の消化が生じる。オートファジーは一般的には栄養飢餓条件によって活性化されるが、発生、分化、神経変性疾患、ストレス、感染などの生理的、病理的な状態で生じることが示された。²⁰⁻²²⁾ しかし PDT によるオートファジー誘導については未だ不明な点が多いため、^{23, 24)} 本研究で

は *in vitro* ALA-PDT モデルによる, 口腔扁平上皮癌細胞に対するアポトーシスおよびオートファジー誘導と, アポトーシス促進およびオートファジー抑制に働く *c-Jun* の遺伝子発現を検討した。

材料および方法

1. *in vitro* PDT システム

口腔癌の *in vitro* PDT システムを作製して実験をおこなった。本システムは, 発光ダイオード (LED) 光源 (LXHL-FD3C, LUMILEDS), 直流安定化電源ユニット (PMC18-2, 菊水電子) とデジタルタイマー (LT4H, Panasonic 電工) で構成される。LED 光源から細胞培養用の直径 35 mm ディッシュ底面までの距離が 30 mm となるように塩化ビニルパイプを設置した (第 1 図)。光照射エネルギー量を 30 W 広域帯パワーエネルギーメーター (メレスグリオ) で測定し, 出力のキャリブレーションをおこなった。

2. ALA-PDT モデル

ALA-PDT モデルは津田の方法¹⁷⁾に従いおこなった。ヒト口腔癌由来扁平上皮癌細胞株である HSC-3 細胞は JCRB 細胞バンクから購入した。HSC-3 細胞の継

代は、10% (v/v) 仔ウシ血清 (Gibco BRL), 1%ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (10 unit/ml Penicillin G, 10 μ g Streptomycin sulfate, Gibco BRL) を含む RPMI1640 培養液 (Gibco RBL) を用いておこなった。対数増殖期にある 1×10^5 個の細胞を直径 35 mm ディッシュ (BD Falcon) に播種し 37°C で 48 時間, 5% CO₂ 条件下で培養した。これらの細胞を培養液で 3 回洗浄した後, 培養液に 2 mM の ALA (コスモバイオ株式会社) を加え, 遮光条件下で 2 時間培養をおこなった。細胞を RPMI1640 培養液で 3 回洗浄した後, 励起波長 638 ± 5 nm の LED を用い光エネルギー量として 100 J/cm^2 の照射 (ALA-PDT) をおこなった。なお ALA 濃度 0 mM かつ LED 照射を行わないものをコントロールとして用いた。

3. TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL)

ALA-PDT によるアポトーシス誘導を TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) で測定した。4 穴チャンバースライド (旭テクノグラス) の 1 ウェルに 1×10^4 個の細胞を播種し, 48 時間後に ALA-PDT をおこなった。ALA-PDT の 3 および 24 時間後に細胞を PBS で 3 回洗浄し, チャンバースライドを風乾した。その後, 氷冷した 4%パラホルムアルデヒドを加え, 60 分間静置した。内因性ペルオキシダーゼを不活化するため, 細胞を 3%過酸化水素溶液で 5 分間の処理を

おこなった。細胞を PBS で洗浄した後、ウサギ抗ヒトサイトケラチン抗体 (Dako) を、次いでローダミンイソチオシアネート標識抗ウサギ IgG 抗体 (Millipore) をそれぞれ室温で 1 時間反応させた。PBS で細胞を洗浄した後、0.1%クエン酸ナトリウム、0.1% Triton X-100 水溶液を加え、氷上で 2 分間静置した。PBS で洗浄した後に、*In situ* cell death detection kit POD (Roche Applied Science) を用いて、TUNEL をおこなった。HSC-3 細胞にフルオレセイン標識された核酸とターミナルトランスフェラーゼを混合した TUNEL 反応液を 37°C で 60 分間反応させた。TUNEL によって核が標識された細胞をアポトーシスが生じている細胞とし、蛍光顕微鏡システム (Leica Microsystems) を用い、対物レンズ 40 倍で写真撮影をおこなった。一視野に観察される細胞のうちアポトーシスの生じている細胞数を計測し、アポトーシス誘導率を算出した。

4. c-Jun mRNA 発現

ALA-PDT が c-Jun の発現におよぼす影響を検討するために、realtime-PCR で、c-Jun 発現を検討した。直径 35 mm ディッシュに 1×10^5 個の HSC-3 細胞を播種して接着させ、ALA-PDT をおこなった。ALA-PDT 後、0.5~3 時間後に細胞を回収し、RNeasy Mini-prep kit (Qiagen) で、全 RNA を抽出した。全 RNA 濃度を

NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) で計測し、500 ng の全 RNA を realtime-PCR に供した。全 RNA から PrimeScript RT reagent (Takara Bioscience) を用い cDNA を作製し、その 2 μ l をテンプレートとして、SYBR Premix Ex Taq (Takara Bioscience) と c-Jun の特異的プライマー (sense; 5'-GCTTACCAAAGGCTAGTGCGATG-3' , antisense; 5'-GCCACCAATTCCTGCTTTGAG-3') を用いて、c-Jun の発現量を半定量的に解析した。ハウスキーピング遺伝子には、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, sense; 5'-GAGTCAACGATTTGGTCGT-3' , antisense; 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3') を用い、GAPDH に対する相対的な c-Jun 遺伝子発現量を計測した。なお ALA-PDT による GAPDH の発現量は変動を認めないことを、あらかじめ確認している。

5. 免疫細胞化学

オートファジーの指標となるオートファゴソームを検出するために、ALA-PDT 後の培養細胞に対して免疫細胞化学をおこなった。直径 35 mm ディッシュ底面に滅菌カバーガラスを設置し、 1×10^5 個の HSC-3 細胞を播種して接着させた。上記の条件で細胞に ALA-PDT をおこなった後に、氷冷した 4%パラホ

ルムアルデヒド PBS で 5 分間固定し、続いて PBS で 3 回洗浄をおこなった。細胞にオートファジーが起こり形成されるオートファゴソームを、そのマーカーである microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) タンパクを対象として免疫細胞化学で検出した。ALA-PDT 後、カバーガラス上の細胞に 1 次抗体のウサギ抗 LC3 ポリクローナル抗体 (MBL バイオサイエンス) を室温で 1 時間反応させた。十分に細胞の洗浄をおこない、2 次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories) を反応させた後、免疫複合体を FITC 標識ストレプトアビジン (Vector Laboratories) で可視化した。

LC3 の免疫細胞化学によって、細胞質内で微細顆粒状に陽性を示したオートファゴソームを指標として、オートファジーが惹起された細胞数を計測し、オートファジー陽性細胞率を算出した。

4. Western blot

細胞溶解液 [50 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1/100 protease inhibitor cocktail] で細胞を処理し、Western blot に供した。細胞溶解液のタンパク量を Bradford 法で測定した後、40 μ g を 10% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を blocking

reagent (東洋紡) で処理した後, 1 次抗体のウサギ抗 LC3 ポリクローナル抗体 (MBL) と反応させた。次いで, 2 次抗体の西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) と反応させ, 免疫複合体を ECL plus detection system (GE Healthcare Biosciences) を使用して, Kodak Biomax フィルム (GE Healthcare Biosciences) 上に検出した。さらに現像したフィルムをスキャナー (CanoScan 8800F, Canon) でデジタル画像化して TIF ファイル (Tagged Image File) に保存した後に, LC3 I と LC3 II の発現量を ImageJ (National Institutes of Health) で 3 回測定し, 総 LC3 発現レベルに対する LC3 II 発現レベルの割合 (LC3 II / LC3 比) を半定量的に測定した。

5. 統計処理

ALA-PDT 後のアポトーシス誘導率, c-Jun 遺伝子発現量, オートファジー陽性細胞率および LC3 II / LC3 比の有意差検定を non-repeated ANOVA 検定でこない, ポストホックテストとして SNK 検定で検証した。 p 値が 0.05 未満を有意差有りとした。

結 果

1. TUNEL によるアポトーシス誘導の検討

TUNEL を用いて, ALA-PDT によるアポトーシス誘導率を検索した(第2図)。

ALA-PDT3 時間後では 6.7%の細胞にアポトーシスを認め, 24 時間後では 25.1%まで増加した。一方, コントロールではいずれの時間でも 1.0%の細胞にアポトーシスを認めるのみであり, ALA-PDT によって有意にアポトーシスが誘導される結果となった ($p<0.01$)。

2. ALA-PDT が口腔癌細胞株の c-Jun 発現におよぼす影響

ALA-PDT が c-Jun の mRNA 発現レベルにおよぼす影響を realtime-PCR で検討した。ALA-PDT 後 0.5 時間で c-Jun 発現は 3.7 倍に上昇し, 1 時間後では 7.5 倍に急激な増加を示した。また 3 時間後では発現レベルが 2.2 倍に減少したものの, 依然としてコントロールと比べて有意な増加を示した (第3図)。

3. 免疫細胞化学によるオートファジー誘導の検討

抗 LC3 抗体を用いた免疫細胞化学によって, ALA-PDT によるオートファジー誘導を検索した (第4図)。コントロールと比べて, ALA-PDT 後 1 時間では有意な変化は認めないが, 6 時間および 24 時間では細胞質に細顆粒状の陽性を示すオートファゴソームを認めた。オートファゴソーム形成を指標として, オー

トファジー陽性細胞率を算出し比較したところ、コントロール群は1.1%であるの
のに比べ、ALA-PDT 後、6、12 および 24 時間ではそれぞれ、9.4%、14.3%と 25.3%
であり、オートファジー陽性細胞率の有意な増加を示した ($p<0.05$) (第 5 図)。

2. Western blot

Western blot で LC3 I および LC3 II タンパクの発現量を検討した。LC3 I (18-kDa)
の発現はコントロールおよび ALA-PDT 後 0.5 時間から 24 時間にかけて検出さ
れた。一方、LC3 II (14-kDa) は ALA-PDT 後 3 時間までは検出されなかったが、
6 時間後から 24 時間にかけて徐々に増加した。(第 6 図) LC3 II / LC3 I 比を半定
量的に解析したところ、ALA-PDT 後、6、12 および 24 時間では、LC3 II が全
LC3 発現に占める割合はそれぞれ、32.8%、39.5%と 57.2%であり LC3 II 発現レ
ベルの有意な増加を示した ($p<0.01$) (第 7 図)。これらの結果は、ALA-PDT に
よってオートファジーが誘導されることを示し、免疫細胞化学およびオートフ
ァジー陽性細胞率のデータを裏付けるものとなった。

考 察

PDT 後に起こる細胞死は、細胞内における光感受性物質の分布、光感受性物

質の種類と、標的となる細胞の種類によって異なると考えられている。¹⁵⁾ 本研究では、光感受性物質に ALA を用い、口腔扁平上皮癌細胞を対象とした *in vitro* ALA-PDT モデルを作成した。ALA-PDT をおこなった HSC-3 細胞におけるアポトーシス誘導率を TUNEL で検討したところ、ALA-PDT 後 3 時間では 6.7%であり、24 時間では 25.1%まで増加した。アポトーシスは death receptor を介する経路と、ミトコンドリアを介する経路の 2 つが主要な役割を果たしている。ミトコンドリアを介する経路では caspase-3 および-9 が活性化し、ミトコンドリアの膜電位の低下によって細胞質への cytochrome *c* 放出が生じ、アポトーシスが生じる。²⁵⁾ Inoue らはラットにグリオーマ細胞を接種した *in vivo* ALA-PDT モデルを用いた実験で、caspase-3 および-9 が活性化しアポトーシスが誘導されることを報告している。²⁶⁾ また津田は HSC-3 細胞を用いた ALA-PDT 後に、活性型 caspase-3 の発現が上昇し、ALA-PDT 後 3 時間で 5.7%、24 時間で 24.6%の細胞にアポトーシスが誘導されたことを報告している。¹⁷⁾ これらの値は、今回の実験で観察された 6.7%および 25.1%とほぼ同等の値であった。

ALA-PDT 後 0.5 時間で c-Jun 発現は 3.7 倍に上昇し、1 時間後では 7.5 倍に急激な増加を示した。また 3 時間後では発現レベルが 2.2 倍に減少したものの、依

然としてコントロールと比べて有意な増加を示した。c-Jun はオートファジー経路を抑制し、アポトーシス経路を促進する。²⁷⁻²⁹⁾ Yogevev らは発現ベクターを用いて c-Jun を強制発現させた実験系で、子宮頸癌細胞 (HeLa), ヒト胎児腎細胞 (HEK293) およびマウス胎児線維芽細胞では、低栄養下で引き起こされるオートファジーが c-Jun によって抑制されることを報告している。²⁷⁾ 一方で, c-Jun の過剰発現とそのリン酸化が, interleukin 1 β -converting enzyme による α -fodrin の分解を促進しアポトーシスを誘導することが報告されている。^{28,29)} 以上の結果から, ALA-PDT を用いた口腔癌細胞のアポトーシスとオートファジーの調節には c-Jun の発現が関与していることが示唆された。

オートファゴソーム形成を, 免疫細胞化学で経時的に検討したところ, LED 照射後 6 時間で, 細胞質に細顆粒状のオートファゴソームが確認された。またオートファゴソーム形成を指標として, オートファジー陽性細胞率を検討すると経時的に陽性細胞率が増加し, ALA-PDT6 後時間で 9.4%であったものが, 24 時間で 25.3%となった。Western blot では, オートファゴソーム形成に中心的役割を果たす, LC3 II の発現が, ALA-PDT 後 6 時間より検出され, 経時的に発現量が増加した。この LC3 II の結果は, オートファジー抑制に働く c-Jun 遺伝子

発現が ALA-PDT 後 3 時間でピークを迎え、以後、減少する結果を反映しているものと考えられた。

近年、オートファジーと腫瘍の発育・成長の関係が注目されている。オートファジーは細胞質内の異常タンパク質や、損傷を受けた細胞内小器官を分解するため、正常細胞および早期の発癌過程にある細胞では腫瘍抑制性に働くが、腫瘍細胞に対しては生存経路として働くとの報告がある。^{23,30-32)} また Takamura ら³³⁾は、オートファジー機能を欠損させたマウスでは、肝臓に多発性の良性腫瘍が発生することを報告している。そのメカニズムは、発癌過程の初期では機能が消失した異常ミトコンドリアがオートファジーによって分解されないため細胞質内に蓄積し、その結果として酸化ストレス、それに引き続く DNA の不安定化が起こり、腫瘍が生じると推定している。一方、癌化した組織では急激に腫瘍細胞が増殖するために十分な血管新生が伴わず、低酸素状態や低栄養状態に暴露される。このような条件下では一般的にアポトーシスの誘導や壊死が生じるが、オートファジーによって分解された細胞内小器官の再構成や ATP の再利用が起こり、腫瘍細胞が生存するとの考えもある。^{34,35)} しかし津田は、HSC-3 細胞を用いて ALA-PDT をおこない、細胞死誘導をトリパンブルー色素排除法で

検討したところ、24 時間で 84.5%の細胞が細胞死をきたしたと報告している。

17) 同じ HSC-3 細胞を用いた今回の実験結果と併せると、口腔癌では ALA-PDT によって生じたオートファジーは細胞生存経路ではなく、むしろ細胞傷害性に働いていると考えられた。

口腔粘膜に発生する白板症、紅板症や早期癌などの腫瘍性病変に対する治療の第一選択は外科的切除であるが、術後に構音・咀嚼・嚥下機能や審美性の回復が困難となることがある。しかし、PDT による治療では術後に生じる後遺症が軽度であることから、試験的に臨床応用の報告がある。³⁶⁻³⁸⁾

PDT は光感受性物質を経口投与方法と、病巣局所に塗布する方法とがある。経口投与は病変が広範囲に及ぶ場合に用いられるが、光感受性物質投与後の光暴露によって皮膚に炎症症状が生じる可能性があるほか、吐き気や一時的な肝機能障害を生じる報告がある。³⁾ 口腔粘膜病変における ALA-PDT では、主に病巣に光感受性物質を塗布した後に、励起光照射を行う方法が試みられている。³⁶⁻³⁸⁾ また Kaneko ら³⁹⁾は耳下腺腫瘍細胞をラット皮下に接種して直径 5 mm の腫瘍を作製した実験的 PDT モデルに対して、光感受性物質である NPe6 を経口投与し体表面から励起光照射する実験をおこなった。その結果、腫瘍組織の

広範囲にアポトーシスを検出した。以上の結果から、ALA-PDT は口腔扁平上皮癌に対してアポトーシスおよびオートファジーの細胞死を誘導することが実験的に明らかとなり、口腔癌の新規治療方法として臨床応用の可能性が示唆された。

結 論

光感受性物質として ALA を用いた PDT による口腔癌治療を検討のため、*in vitro* 実験系を用い口腔癌細胞 HSC-3 に対するアポトーシスおよびオートファジー誘導の解析をおこない、以下の結果を得た。

1. ALA-PDT 後、HSC-3 細胞の細胞形態は膨化ないし萎縮し、ALA-PDT 後 24 時間では有意なアポトーシス誘導を認めた。
2. c-Jun の遺伝子発現は、ALA-PDT 後 1 時間で急激に増加し、その後 3 時間まで有意な増加を示した。
3. ALA-PDT 後 6 時間からオートファゴソーム形成がみられ、オートファジー誘導率は LED 照射後、経時的に増加した。
4. LC3 II の発現量を Western blot で検討したところ、ALA-PDT 後 6 時間から

LC3 II の発現がみられ、経時的に LC3 II 発現レベルが増加することが明らかになった。

以上のことから、ALA-PDT は口腔扁平上皮癌に対してアポトーシスおよびオートファジーを誘導することが実験的に明らかとなり、口腔癌の新規治療方法として臨床応用の可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、懇切なる御指導と御高閲を賜りました本学病理学講座小宮山一雄教授、研究を直接御指導いただいた松本直行助教と、照射機の開発にご助言をいただいた口腔外科学教室第 1 講座西村敏助教に謹んで感謝の意を表します。また、本研究に対して御協力いただいた病理学講座員各位に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Matés JM, Sánchez-Jiménez FM (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 157–170.

- 2) Cruess AF, Zlateva G, Pleil AM, Wirostko B (2009) Photodynamic therapy with verteporfin in age-related macular degeneration: a systematic review of efficacy, safety, treatment modifications and pharmacoeconomic properties. *Acta Ophthalmol* 87, 118-132.
- 3) Kimura M, Itoh Y, Tokuoka Y, Kawashima N (2004) Delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for acne on the body. *J Dermatol* 31, 956-960.
- 4) Fujii N, Danno K, Tanaka T (2010) Photochemotherapy combined with tacalcitol occlusive dressing in the treatment of wide-spread psoriasis vulgaris. *J Dermatol* 37, 743-746.
- 5) Nakano A, Tamada Y, Watanabe D, Ishida N, Yamashita N, Kuhara T, Yanagishita T, Kawamura C, Akita Y, Matsumoto Y (2009) A pilot study to assess the efficacy of photodynamic therapy for Japanese patients with actinic keratosis in relation to lesion size and histological severity. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 25, 37-40.
- 6) Kobayashi M, Nakaseko H, Akita Y, Tamada Y, Matsumoto Y (2002) A study of treatment outcome results after using topical 5-aminolevulinic acid-based

photodynamic therapy on superficial cutaneous carcinomas. *Jpn J Dermatol* 112, 1577-1583.

- 7) Itoh Y, Henta T, Ninomiya Y, Tajima S, Ishibashi A (2000) Repeated 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy following electro-curettage for pigmented basal cell carcinoma. *J Dermatol* 27, 10-15.
- 8) Dailey HA, Smith A (1984) Differential interaction of porphyrins used in photoradiation therapy with ferrochelatase. *Biochem J* 223, 441-445.
- 9) Schoenfeld N, Epstein O, Lahav M, Mamet R, Shaklai M, Atsmon A (1988) The heme biosynthetic pathway in lymphocytes of patients with malignant lymphoproliferative disorders. *Cancer Lett* 43, 43-48.
- 10) Kennedy JC, Pottier RH (1992) Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14, 275-292.
- 11) Sternberg ED, Dolphin D (1993) Second generation photodynamic agents: a review. *J Clin Laser Med Surg* 11, 233-241.
- 12) Pass HI (1993) Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J Natl Cancer Inst* 85, 443-456.

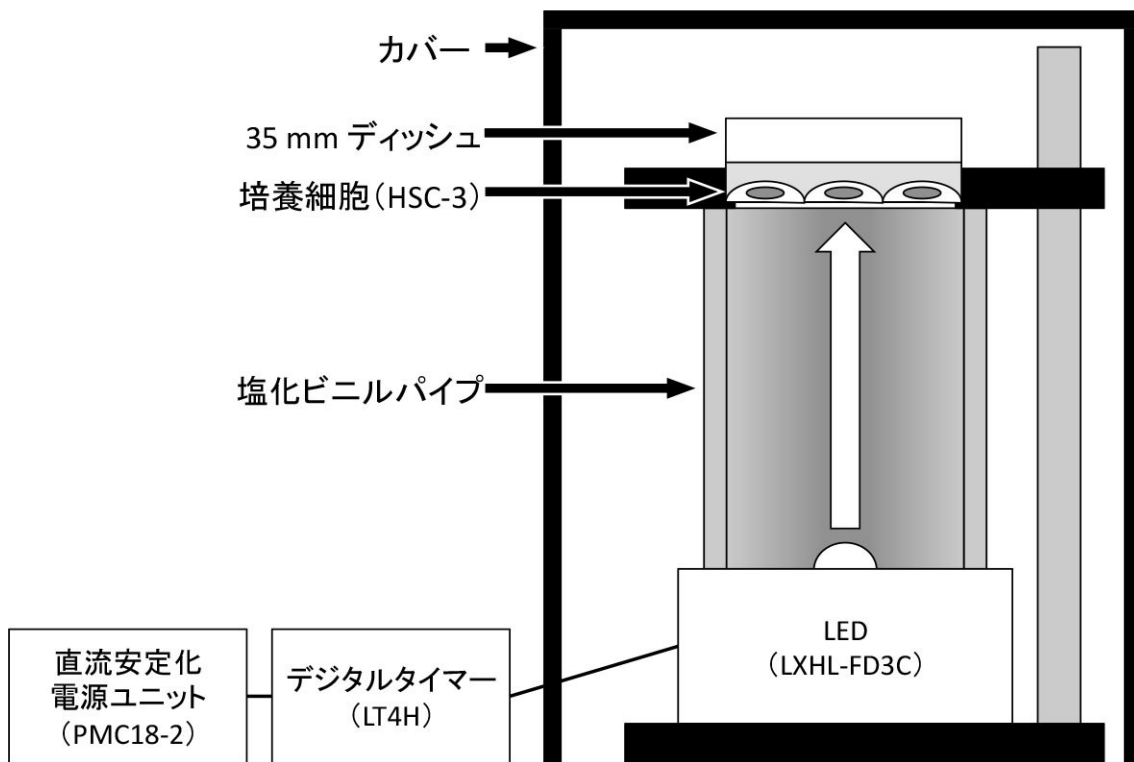
- 13) Gaullier JM, Berg K, Peng Q, Anholt H, Selbo PK, Ma LW, Moan J (1997) Use of 5-aminolevulinic acid esters to improve photodynamic therapy on cells in culture. *Cancer Res* 57, 1481-1486.
- 14) Uehlinger P, Zellweger M, Wagnières G, Juillerat-Jeanneret L, van den Bergh H, Lange N (2000) 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 54, 72-80.
- 15) Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol* 1, 1-21.
- 16) Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ, Evans HH, Antunez AR, Oleinick NL (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 51, 5993-5996.
- 17) 津田宏尚 (20011) *In vitro* 光線力学療法モデルによる口腔癌細胞のアポトーシス誘導. *日大歯学* 85, 161-168.

- 18) Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P (2007) Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1776, 86-107.
- 19) Clarke PG (1990) Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl)* 181, 195-213.
- 20) Levine B, Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 132, 27-42.
- 21) Rajawat YS, Bossis I (2008) Autophagy in aging and in neurodegenerative disorders *Hormones* 7, 46-61.
- 22) Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* 451, 1069-1075.
- 23) Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by *beclin 1*. *Nature* 402, 672-676.
- 24) Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, Lee MS, Tanaka K, Komatsu M (2011) Persistent

- activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* 193, 275-284.
- 25) Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- 26) Inoue H, Kajimoto Y, Shibata MA, Miyoshi N, Ogawa N, Miyatake S, Otsuki Y, Kuroiwa T (2007) Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Neurooncol* 83, 223-231.
- 27) Yogev O, Goldberg R, Anzi S, Yogev O, Shaulian E (2010) Jun proteins are starvation-regulated inhibitors of autophagy. *Cancer Res* 70, 2318-2327.
- 28) Bossy-Wetzell E, Bakiri L, Yaniv M (1997) Induction of apoptosis by the transcription factor c-Jun. *EMBO J* 16, 1695-1709.
- 29) Watson A, Eilers A, Lallemand D, Kyriakis J, Rubin LL, Ham J (1998) Phosphorylation of c-Jun is necessary for apoptosis induced by survival signal withdrawal in cerebellar granule neurons. *J Neurosci* 18, 751-762.
- 30) Kimmelman AC (2011) The dynamic nature of autophagy in cancer. *Genes Dev* 25, 1999-2010.

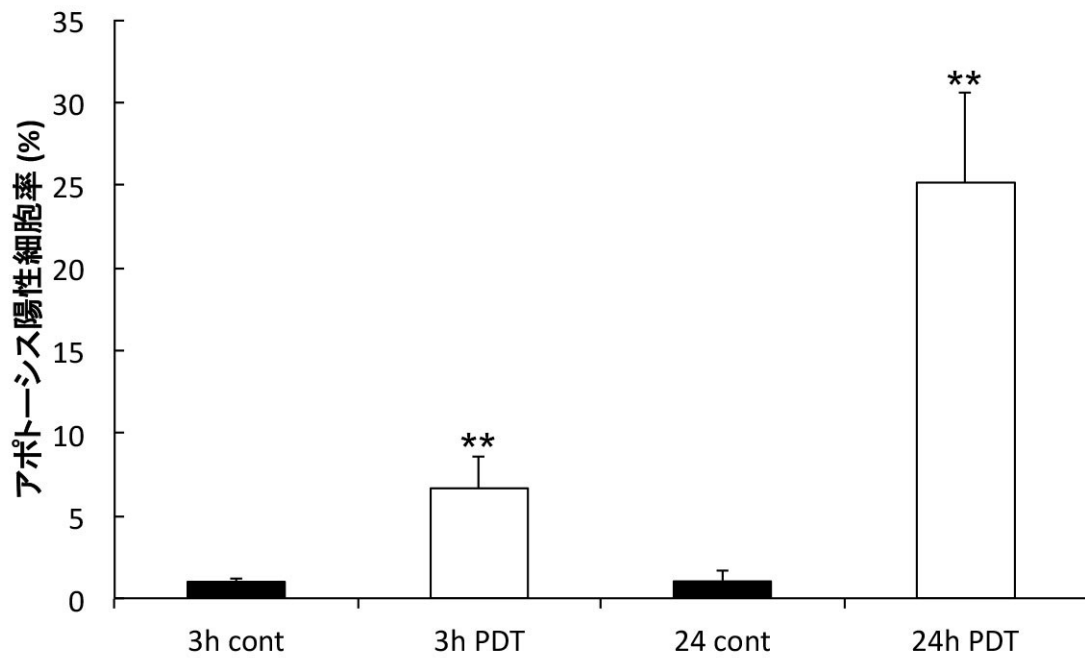
- 31) Choi KS (2012) Autophagy and cancer. *Exp Mol Med* 44, 109-120.
- 32) White E (2012) Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 12, 401-410.
- 33) Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 25, 795-800.
- 34) Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT, Moscat J (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF- κ B mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13, 343-354.
- 35) Ling J, Kang Y, Zhao R, Xia Q, Lee DF, Chang Z, Li J, Peng B, Fleming JB, Wang H, Liu J, Lemischka IR, Hung MC, Chiao PJ (2012) Kras^{G12D}-induced IKK2/ β /NF- κ B activation by IL-1 α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 21, 105-120.
- 36) Tsai JC, Chiang CP, Chen HM, Huang SB, Wang CW, Lee MI, Hsu YC, Chen CT, Tsai T (2004) Photodynamic Therapy of oral dysplasia with topical 5-aminolevulinic acid and light-emitting diode array. *Lasers Surg Med* 34, 18-24.

- 37) Chen HM, Chen CT, Yang H, Lee MI, Kuo MY, Kuo YS, Wang YP, Tsai T, Chiang CP (2005) Successful treatment of an extensive verrucous carcinoma with topical 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. *J Oral Pathol Med* 34, 253-256.
- 38) Yu CH, Lin HP, Chen HM, Yang H, Wang YP, Chiang CP (2009) Comparison of clinical outcomes of oral erythroleukoplakia treated with photodynamic therapy using either light-emitting diode or laser light. *Lasers Surg Med* 41, 628-633.
- 39) Kaneko T, Chiba H, Yasuda T, Kusama K (2004) Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. *Oral Oncol* 40, 787-792.



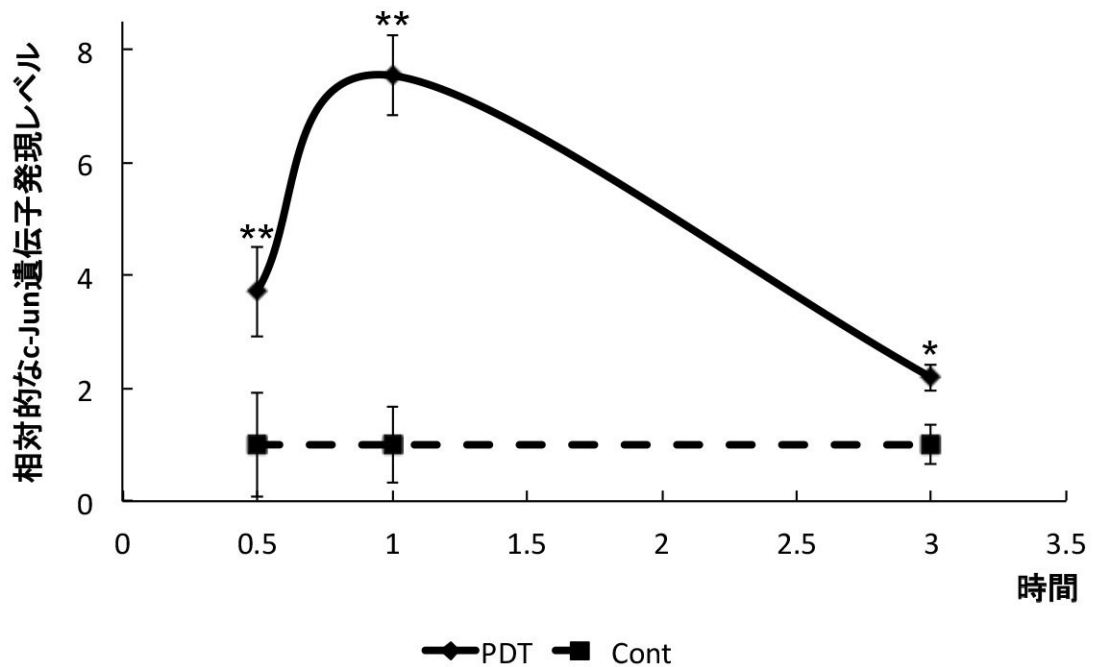
第1図 *In vitro* PDT システムの概略

電源供給時間をデジタルタイマーで調節し、LED を点灯させた。LED からの光は塩化ビニルパイプを通じて、35 mm ディッシュの底面に播種した培養細胞に到達する。なお PDT 実験時には黒色のカバーをかぶせ、環境光を遮断した。



第2図 ALA-PDTによるアポトーシス誘導率

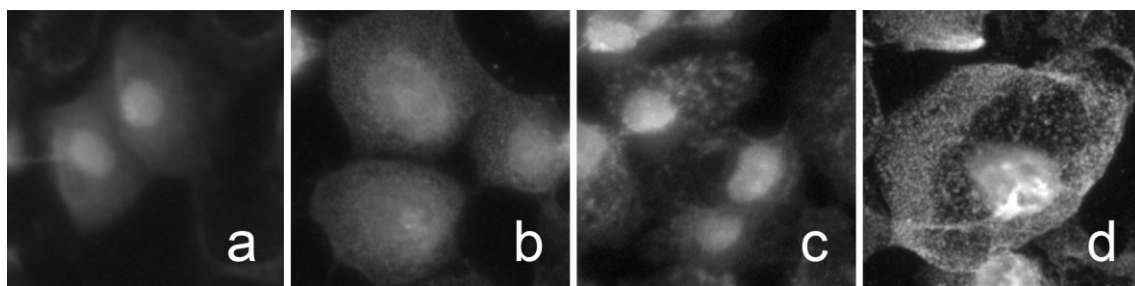
TUNELによってアポトーシス陽性細胞率を検討した。ALA-PDTをおこなった3時間後では6.7%の細胞にアポトーシスを認め、24時間後では25.1%まで増加した。一方、コントロールではいずれの時間でも1.0%であった。(** $p < 0.01$)



第3図 ALA-PDTによるc-Jun発現の変化

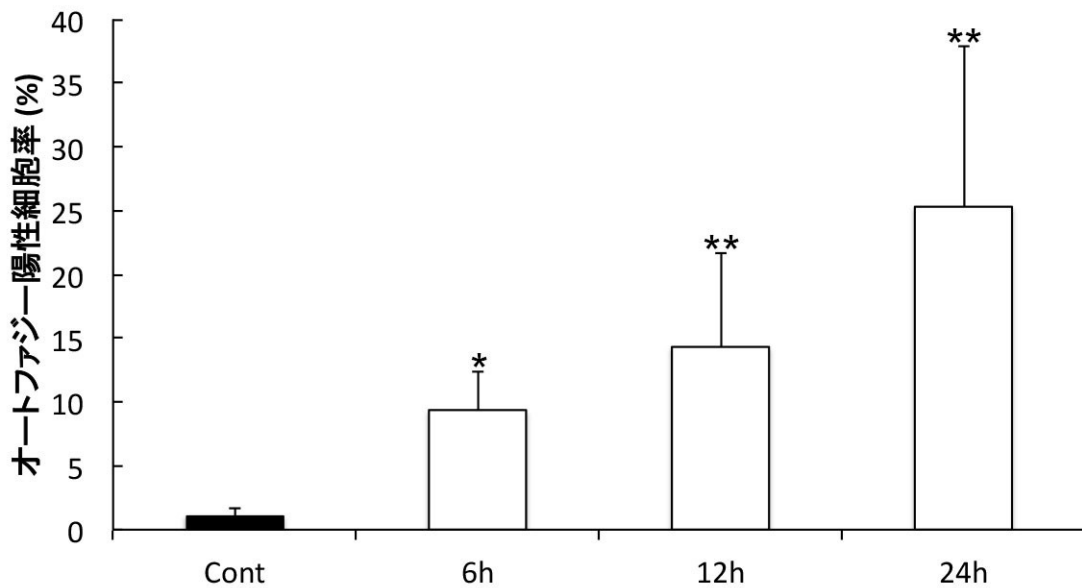
ALA-PDT後0.5時間でc-Jun発現はコントロールに比べて3.7倍に上昇し、1時間後では7.5倍に急激な増加を示した。また3時間後では発現レベルが2.2倍に減少したものの、依然としてコントロールと比べて有意な増加を示した。

(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



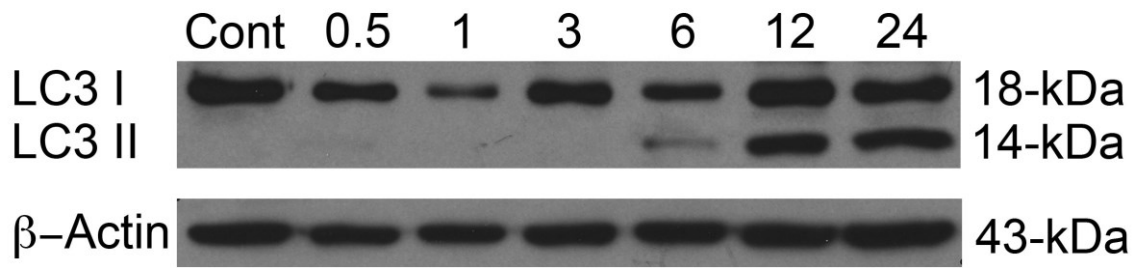
第4図 ALA-PDTによって誘導されたオートファジー

a) コントロールおよび, b) 1時間後では, ALA-PDT 処理をした細胞に著変は見られない。c) ALA-PDT 後, 6時間では, 細胞質に細顆粒状のオートファゴソーム形成が見られ, さらに d) 24時間後では細胞の膨化および細胞質のオートファゴソーム形成の増加がみられた。



第5図 ALA-PDTによるオートファジー陽性細胞率

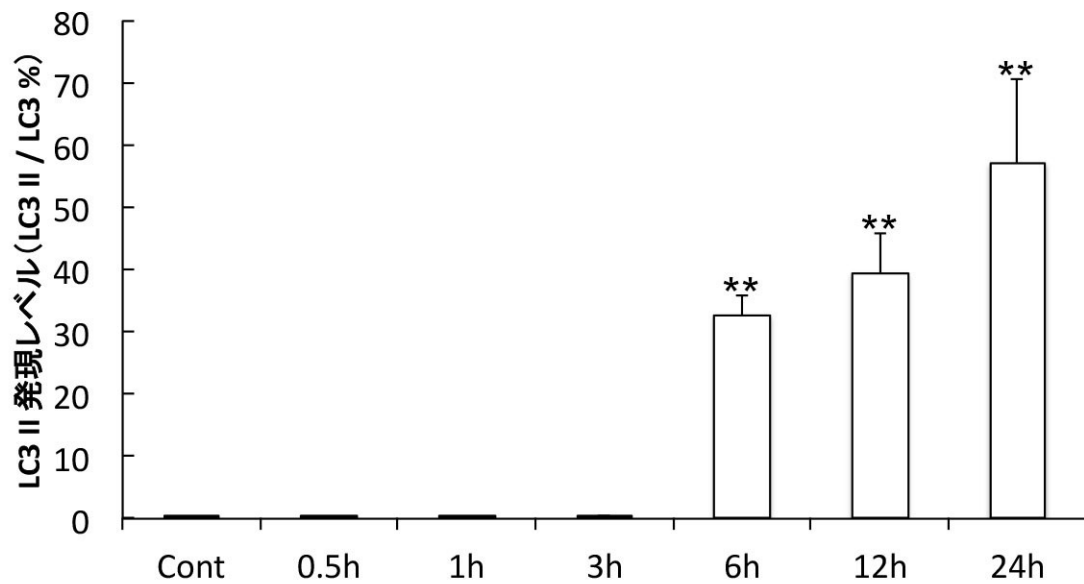
ALA-PDTを行わないコントロール群と、ALA-PDT後、6時間、12時間および24時間後のオートファジー陽性細胞率を検討した。コントロール群では1.1%であるのに対し、ALA-PDT後、6、12および24時間ではそれぞれ、9.4%、14.3%と25.3%であり、オートファジー陽性細胞率の有意な増加を示した。(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)



第 6 図 ALA-PDT による LC3 II 発現

LC3 I はコントロールおよび ALA-PDT 後 0.5 時間から 24 時間に発現を認めた。

一方で、LC3 II は ALA-PDT 後、6 時間から発現が検出され、経時的に発現量の増加を認めた。



第7図 ALA-PDTによるLC3 II/LC3比の変化

総LC3発現レベルに対するLC3 II発現レベルの割合(LC3 II / LC3比)は、

ALA-PDT後、3時間まではコントロールと同様の値であったが、6時間後から

経時的に増加し、24時間後では57.2%まで増加した (** $p < 0.01$)。