

原 著

光線力学的療法耐性口腔扁平上皮癌細胞株の
樹立とその耐性機構の解明

木 本 直 孝

Establishment of Photo Dynamic Therapy Resistant Oral Squamous Cell Carcinoma
Cell Line and Elucidation of Its Resistant Mechanism

Naotaka Kimoto

(平成14年2月12日受付)

緒 言

近年、ヘマトポルフィリン誘導体などの腫瘍親和性の高い光感受性色素と低エネルギーのレーザー光照射の併用により癌組織を破壊する光線力学的療法¹⁾(photodynamic therapy: PDT)が、早期の肺癌²⁾、胃癌³⁾や子宮頸癌⁴⁾などに用いられ、良好な治療成績が得られている。このPDTの殺細胞作用は癌細胞内に取り込まれた光感受性色素が光照射により活性化され、周囲に存在する三重項酸素を活性酸素の一つである一重項酸素に変換し、さらにこの酸素分子が細胞器官を酸化させ、癌細胞を死に至らしめるために生じると考えられている^{1,5)}。PDTは、レーザー光照射による痛みがなく、無麻酔で行えること、またPDTに使用する光感受性色素による合併症は、軽度の日光過敏症が最も多く、重要臓器に対する重篤な副作用はほとんどないことなど、高齢者や全身状態の不良な患者にも応用できるなど利点が多い治療法であり、最近ではPDTを用いた口腔癌症例^{5,6)}も散見されるようになってきた。

口腔に発生する悪性腫瘍は、解剖学的にレーザー光の照射が比較的容易であること、PDTに感受性の高い扁平上皮癌が大部分を占めること⁷⁾などからPDTの有用性が期待されている。また一次癌は、原発部位や進展度により手術療法、放射線療法、あるいはそれらに化学療法や免疫療法を併用した治療が行われている。しかし再発癌や異時性重複癌の治療は、放射線あるいは抗癌剤に耐性を示すことが多く、治療に難渋することが少なくない。これらの問題を解決する一助として、

PDTの応用が考えられる。しかしPDTの再発癌や重複癌の治療への応用に関しては基礎的、臨床的にもほとんど検討されていない。

悪性腫瘍の耐性獲得の機序の解明は抗癌剤および放射線に関して行われている。抗癌剤の耐性に関連する因子として⁸⁾、薬物の細胞外排出を促進するMDR-1やMRPなどの膜輸送タンパクの高発現、解毒に関与するglutathione, metallothioneinなどの低分子化合物やGSTなどの酵素の発現亢進、抗癌剤の標的分子であるtopoisomeraseなどの変化・増幅、あるいはbcl-family, p53などの癌抑制遺伝子の異常によるアポトーシス抑制などが考えられている。また、放射線耐性の機序として⁹⁾、free radicalの消去に関連するglutathione, metallothioneinあるいはGSTやSODなどのradical scavengerの亢進、放射線により生じたDNA損傷の修復の促進あるいはアポトーシスの抑制などが報告されている。

そこで本研究では、PDT耐性口腔癌細胞を樹立し、その耐性獲得機構および抗癌剤との併用によるPDTの感受性の変化について抗癌剤耐性因子を中心に検討した。

材料ならびに方法

1. 培養液、培養細胞および培養方法

培養液は脱イオン化および逆浸透により純化した水(ELIX水純化装置, Millipore)に溶解したRPMI 1640 mediumとDulbecco's Modified Eagle medium(以上、極東製薬)を等量混和した培地¹⁰⁾(以下、RDと略す)に、sodium pyruvate 110 μg/ml(片山化学)、Kanamycin sulfate 90 μg/ml, aminobenzylpenicillin(以上、明治製薬) 90 μg/ml, sodium bicarbonate(和

広島大学大学院医歯薬学総合研究科創生医科学専攻先進医療開発科学講座分子口腔医学・顎顔面外科学(主任:岡本哲治教授)

光純薬) 2 mg/ml, 15 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES, 同人化学) を加え, pH7.4 に調整し, 0.2 μ m メンブレンフィルター (Acrocap, Gelman Science Inc., USA) を用いて滅菌濾過したものを基礎培地として用いた。

無血清培養は, RD に crystalline bovine insulin 10 μ g/ml, human transferrin 5 μ g/ml, 10 μ M 2-aminoethanol (以上, Sigma Chemical Co., USA), 10 μ M 2-mercaptoethanol, 10 nM sodium selenite (以上, 片山化学) の 5 種類の因子 (5-factors) を加えた無血清培地 RD5F^{11,12)} を用いて行った。培養プレートは type I 型コラーゲン (新田ゼラチン) で処理して用いた。

細胞の維持, 継代には 5% 仔牛血清 (CS; Hy Clone Laboratories Inc., USA) を含む RD を用いた。

培養細胞は当科で樹立したヒト口腔由来扁平上皮癌 (OSCC) NA 細胞¹³⁾ およびヒト唾液腺由来腺癌 (SAC) HSY 細胞¹⁴⁾ (徳島大学歯学部口腔外科学第二講座 佐藤光信教授より供与) を用い, 上記培地を用い, 37°C 5% CO₂ インキュベーター内で静地培養を行った。

2. 光感受性色素および抗癌剤

光感受性色素として porfimer sodium¹⁻⁵⁾ (以下, PHE と略す。日本ワイスレダリー(株)より供与) を Dulbecco's Ca²⁺Mg²⁺-free phosphate buffered saline (以下, CMF-PBS と略す) に溶解し用いた。

抗癌剤は doxorubicin hydrochloride (ADM), cis-diammine dichloroplatinum (II) (CDDP), bleomycin hydrochloride (BLM, 以上日本化薬より供与) および 5-fluorouracil (5-FU, 協和発酵) を生理食塩水に溶解し, 実験に用いた。

3. 光照射

光照射の光源として1000ワット・スライドプロジェクター (Hi-Lux, 理科学精器) を用いた。プロジェクター先端から標的細胞まで 50 cm の距離で光照射を行った。培養細胞表面の照度は20,000ルクスであった。

4. PDT 耐性細胞の誘導および抗癌剤処理

NA および HSY を RD5F を用いて, I 型コラーゲンでコートした 12 well plastic plate (Falcon, USA) に 1 well あたり 2 × 10⁴ 個の細胞を 2 ml の培養液を用いて播種した。24時間培養後に PHE を 0~0.1 μ g/ml の濃度で24時間作用させた後, 培地交換を行い, 3時間後に光照射を 5 分間行った。培養開始 7 日目に生細胞数を計測し, コントロールの細胞数の10%以下の well の細胞を回収し, 再増殖させた。この操作を20回繰り返し, 得られた細胞をクローニングした (表1)。

表1 培養細胞の各サイクルの PHE 濃度

Cycle No.	PHE (μ g/ml)	Cycle No.	PHE (μ g/ml)
1	0.03	11	0.3
2	0.05	12	0.3
3	0.05	13	0.3
4	0.1	14	0.3
5	0.3	15	0.2
6	0.3	16	0.3
7	0.3	17	0.3
8	0.5	18	0.5
9	0.3	19	0.5
10	0.3	20	0.5

Photo-radiation time (5 min.)

RD5F 培地を用い, 1 well あたり 2 × 10⁴ 個の細胞を 2 ml の培養液を用いて 12 well plastic plate に播種し, PHE で24時間処理後, 5 分間の光照射を行った。生細胞数が10%以上の well の細胞を回収し, 再増殖させた。表に, その時の PHE 濃度を示す。

PHE: porfimer sodium

表2 ADM, CDDP 5 回処理後に PDT を 5 回行った各サイクル

Cycle No.	ADM (μ g/ml)	PHE (μ g/ml)	CDDP (μ g/ml)	PHE (μ g/ml)
1	0.03		1.0	
2	0.03		1.0	
3	0.05		1.0	
4	0.01		1.0	
5	0.05		3.0	
6		0.25		0.1
7		0.25		0.1
8		0.5		0.25
9		0.25		0.25
10		0.25		0.25

Photo-radiation time (5min.)

RD5F 培地を用い, 1 well あたり 2 × 10⁴ 個の細胞を 2 ml の培養液を用いて12 well plastic plate に播種し, PHE で24時間処理後, 5 分間の光照射を行った。生細胞数が10%以上の well の細胞を回収し, 再増殖させた。表に, その時の PHE 濃度を示す。

PDT: photodynamic therapy

ADM: doxorubicin hydrochloride

PHE: porfimer sodium

CDDP: cis-diammine dichloroplatinum

クローニングは、コロニー形成法で行った。100 mm plastic dish (Falcon, USA) に播種した細胞に PDT を行い、増殖能の高いコロニーを回収し再増殖した後、再度同様のクローニングを行った。

NA を用いて抗癌剤の前処理による PDT 耐性細胞の誘導を行った。抗癌剤として ADM および CDDP を用い、上記の実験と同様に各種の濃度の抗癌剤を24時間作用させた細胞を5回再増殖させた後、PDT を5回処理した細胞を実験に用いた (表2)。

5. 感受性試験

PDT および抗癌剤感受性試験は以下の方法で行った。培養細胞を RD5F を用い、I 型コラーゲンでコートした 24 well plastic plate (Falcon, USA) に 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて播種し、培養した。24 時間後から PHE または抗癌剤を24時間作用させた後、培地を交換した。PDT の場合は培地交換 3 時間後にスライドプロジェクターを用いて5分間の光照射を行った。培養7日目に trypsin-EDTA で細胞を分散し、生細胞数をコールターカウンター (Coulter Electronics, Luton Beds, UK) を用いて計測した。

6. 細胞内 PHE 濃度の定量

NA を 60 mm plastic dish (Falcon, USA) に無血清培養条件下で培養し、PHE を 24 時間作用させた後、培地を交換した。3 時間後に培地を吸引除去し、CMF-PBS で 2 回洗浄後、0.1N NaOH 0.2 ml を添加し、30 分間 37°C でインキュベートし細胞を溶解した。さらに蒸留水を 0.8 ml 加え試料とした。PHE の定量はその蛍光の強度を測定することで求めた。すなわち 390 nm で励起し、630 nm の蛍光を分光蛍光光度計 (日立 850 型) を用いて測定した。タンパク定量は Bradford の方法に準じて行った¹⁵⁾。

7. 細胞膜脂質組成の分析法

NA を RD5F を用い 100 mm plastic dish で培養し、subconfluent に達した細胞を冷却 CMF-PBS で 3 回洗浄し、細胞をラバーポリスマンで回収した。続いて、遠心した沈渣を凍結融解処理し、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5) 中で超音波破砕器 (Ultra S Homogeniser VP-5S, TAITEC) を用いて粉砕した。同試料を $10,000 \times g$ (微量高速冷却遠心機 MX-150, TOMY) で10分間遠心し、さらにその上清を $90,000 \times g$ (Optima™ TL Ultracentrifuge 100,000 RPM, BECKMAN) で1時間遠心し、沈渣をマイクロゾーム-膜画分とした。

マイクロゾーム-膜画分からの脂質の抽出は、Bligh & Dyer 法¹⁶⁾ に準じて行った。試料に蒸留水 1 ml を加え、

超音波破砕機にて破砕し、メタノール 2 ml, クロロホルム 1 ml を加え、15 分間振とうした。次いでクロロホルム 1 ml を再度加え、10 分間振とう後、蒸留水 1 ml を再度加え、さらに 5 分間振とうした。 $1000 \times g$ で5分間遠心後、下層のクロロホルム層を回収した。さらに残液にクロロホルム 2 ml を加え、15 分間振とうし、 $1000 \times g$ で5分間遠心後、下層のクロロホルム層を再度回収し、先に得られたクロロホルム画分とともにロータリーエバポレーター (Vacuum Evaporator, Merk Heidolph, 三田村理工工業) にて濃縮乾燥後、クロロホルム 500 μ l を加え、試料とした。

Phospholipid (PL) と free cholesterol (FCh), free fatty acid (FFA), triglyceride (TG), cholesterol ester (ChE) などの neutral lipid (NL) の分離は、以下に示す順層系薄層クロマトグラフィー法で行った。TLC plate (silica gel 60, Merk) を用い、hexan/diethylether/acetic acid (80:20:1)¹⁷⁾ の溶媒系で分離し、ヨードを用いて発色させた。Color Imaging (Epson GT 9500, Seiko Epson Co.)¹⁷⁾ にて TLC 画像を取り込み、Luminous Image (Luminous Imager standard, アイシン・コスモス) で画像解析を行い脂質の定量を行った。各脂質の標準物質として L- α phosphatidylcholine, cholesterol olate, 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol, oleic acid (以上, Sigma Chemical Co.), cholesterol (和光純薬) を用いた。

8. NA および NA-PDT における ATP binding cassette transporter superfamily (ABC superfamily) および glutathione S-transferase (GST) pi の mRNA 発現の検討

各細胞からの total RNA の抽出は、Chomczynski らの方法¹⁸⁾ に準じて行った。細胞を denaturing solution (4M guanidine thiocyanate, 25 mM sodium citrate: pH 7.0, 0.1M 2-mercaptoethanol, 0.5% N-lauryl sarcosine) で回収し、20G 注射針を用いてホモジナイズした。試料の 1/10 容の 2M sodium acetate: pH 4.0 を加えた後、等量の平衡化酸性フェノール/Tris EDTA および 1/5 容のクロロホルム/イソアミルアルコールを加え、氷上にて15分間静置後、遠心し上清を回収した。再度等量の平衡化酸性フェノール/TE を加え遠心し上清を回収した。この上清に等量のイソプロパノールを加え RNA を沈殿させ、再度 denaturing solution で溶解し、さらにイソプロパノールにて沈殿させた。沈渣をエタノールで洗浄し、乾燥させ TE に溶解したものを total RNA とした。

定量 RT-PCR には、Quantitect SYBR Green RT-PCR kit (QIAGEN Co.) を使用した。DNA 増幅は ABI

Sequence Detection System (ABI PRISM 7700: Applied Biosystem Co.) を用いて行った。Template として total RNA を 1 試料当たり 200ng/ μ l に調整し, Reaction Mix (2 \times Quantitect SYBR Green RT-PCR Master Mix, 25pM upstream primer, 25pM downstream primer, Quantitect RT Mix) に加え, 25 μ l とした。逆転写反応は 50°C 30分間, PCR 初期活性化ステップ 95°C 15分間とし, PCR 増幅反応は, 変性反応 94°C 15秒間, アニリング 55°C 30秒間, 伸長反応 72°C 1分間にて40 サイクル行った。増幅された RT-PCR 産物の発現量の解析には, ABI detection system を用いた。すなわちワンステップ RT-PCR にて増幅され, 最初に SYBR Green 色素の蛍光が検出されたサイクル数 (Threshold cycle: Ct 値) を計測した。さらに各サンプルの house-keeping 遺伝子 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) の Ct 値にて補正し, 相対的 mRNA の発現量を得た。

特異的プライマー^{19,20)} は以下のように設計した。

MDR-1: sense

5'-TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG-3'

antisense

5'-TAGCCCCTTTAACTTGAGCAGC-3'

MRP-1: sense

5'-TACCTCCTGTGGCTGAATCTGG-3'

antisense

5'-CCGATTGTCTTTGCTCTTCATG-3'

MRP-2: sense

5'-CAAACCTATCTTGCTAAGCAGG-3'

antisense

5'-TGAGTACAAGGGCCAGCTAAGCAGG-3'

MRP-3: sense

5'-CTTAAGACTTCCCTCAACATGC-3'

antisense

5'-GGTCAAGTTCCTCTTGGCTCA-3'

GST pi: sense

5'-CATGCTGCTGGCAGATCAG-3'

antisense

5'-GATTCATCATGTCCACCAGG-3'

9. Western Blot 法による bcl-2 および caspase 3 タンパクの発現

無血清培養条件下で 100 mm plastic dish に培養した NA を PHE 8 ng/ml の濃度で24時間処理し, 培地交換 3 時間後に光照射を 5 分間行った。その 2 時間後に培養細胞を Laemmli の sample buffer²¹⁾ で可溶化し, 5% 2-mercaptoethanol 存在下で 5 分間煮沸, 還元し 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE) にてタンパクの分離を行った。電気泳動は, 恒温式 2 速ミニゲルスラブ電気泳動装置 (日本エイドウ) を用い, Lastick らの方法²²⁾ に準じ, 100V 1 時間行った。次に Towbin らの方法²³⁾ に準じて, ゲルを Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad Laboratories) を用いて 20V 1 時間通電して PVDF 膜 (Millipore, USA) に転写した。非特異的反応を阻害するため転写後の PVDF 膜を 5% skim milk および 0.1% Tween 20 を含む 0.1M Tris-HCL (pH7.4) で 1 時間室温で反応させた。

その後, 一次抗体として1000倍希釈した抗 caspase 抗体 (rabbit polyclonal IgG antibody, DAKO) および抗 bcl-2 抗体 (mouse monoclonal IgG₁ antibody, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) と 1 時間室温で反応させた。PVDF 膜を 0.1% Tween 20 を含む 0.1M Tris buffer で洗浄後, 二次抗体として1000倍希釈した goat anti-rabbit IgG HRP conjugate および goat anti-mouse IgG₁ HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories) を用いて 1 時間反応させた。発色には ECL Western blotting detection reagents (Amersham Pharmacia Biotech) を用いた。

結 果

1. PDT 耐性細胞の樹立

1) PDT 耐性細胞の樹立

NA および HSY を用いて PDT を 20 回繰り返し行い, PDT 耐性培養細胞の誘導を行った。NA では PDT の回数が増えるに従って PDT に対する感受性が低下した

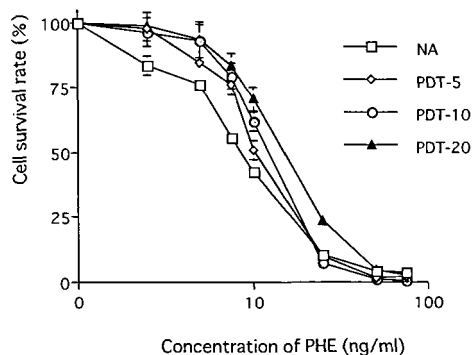


図 1 NA 細胞に対する光感受性色素と光照射の影響
RD5F 培地に 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて 24 well plastic plate に播種し, PHE を 24 時間作用させ, 光照射を 5 分間行った。培養 7 日目に生細胞数を計測した。値は 3 回の実験の平均値 \pm SD を表す。

NA: NA 細胞

PDT-5: PDT を 5 回行った NA 細胞

PDT-10: PDT を 10 回行った NA 細胞

PDT-20: PDT を 20 回行った NA 細胞

(図1)。50%細胞増殖抑制濃度(以下、 IC_{50} と略す)は、PDTを10回行った細胞で13.2 ng/ml, 20回では16.9 ng/mlとNAの8.3 ng/mlに比較して、PDT 10回で1.59倍, 20回で2.04倍の耐性を獲得していた(図2)。

一方、HSYでは、PDTを5回および10回行った細胞の IC_{50} はHSYに比較して軽度低下したが、20回のPDTを行った細胞ではHSYと同等の感受性を示した(図3, 4)。

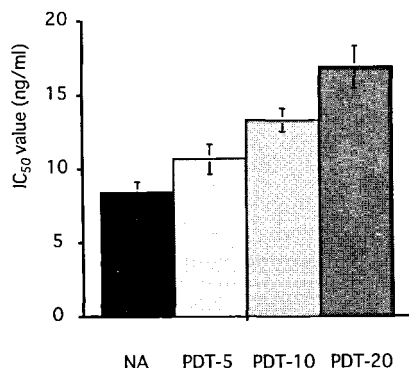


図2 NA細胞におけるPDTによる IC_{50} の変化

図1から、 IC_{50} を求めた。値は3回の実験の平均値±SDを表す。

NA: NA細胞

PDT-5: PDTを5回行ったNA細胞

PDT-10: PDTを10回行ったNA細胞

PDT-20: PDTを20回行ったNA細胞

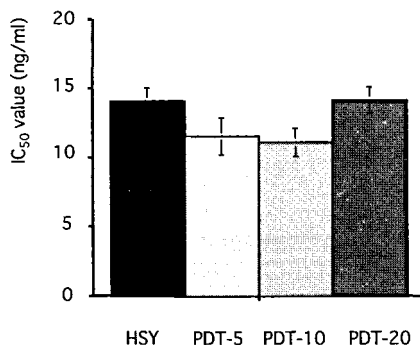


図4 HSY細胞におけるPDTによる IC_{50} の変化

図3から、 IC_{50} を求めた。値は3回の実験の平均値±SDを表す。

HSY: HSY細胞

PDT-5: PDTを5回行ったHSY細胞

PDT-10: PDTを10回行ったHSY細胞

PDT-20: PDTを20回行ったHSY細胞

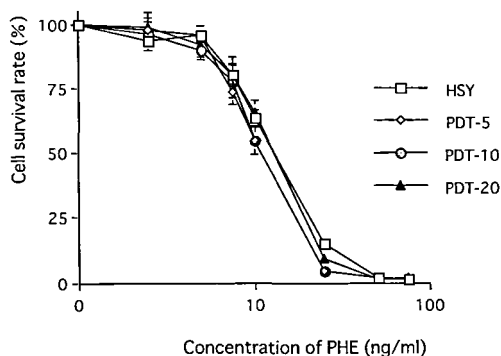


図3 HSY細胞に対する光感受性色素と光照射の影響

RD5F培地に1wellあたり 1×10^4 個の細胞を1mlの培養液を用いて24well plastic plateに播種し、PHEを24時間作用させ、光照射を5分間行った。培養7日目に生細胞数を計測した。値は3回の実験の平均値±SDを表す。

HSY: HSY細胞

PDT-5: PDTを5回行ったHSY細胞

PDT-10: PDTを10回行ったHSY細胞

PDT-20: PDTを20回行ったHSY細胞

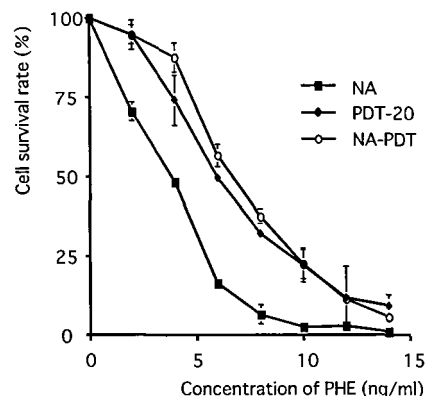


図5 NA, PDT-20 および NA-PDT に対する光感受性色素と光照射の影響

RD5F培地に1wellあたり 1×10^4 個の細胞を1mlの培養液を用いて24well plastic plateに播種し、PHEを24時間作用させ、光照射を5分間行った。培養7日目に生細胞数を計測した。値は3回の実験の平均値±SDを表す。

NA: NA細胞

PDT-20: PDTを20回行った細胞

NA-PDT: PDT耐性NA細胞

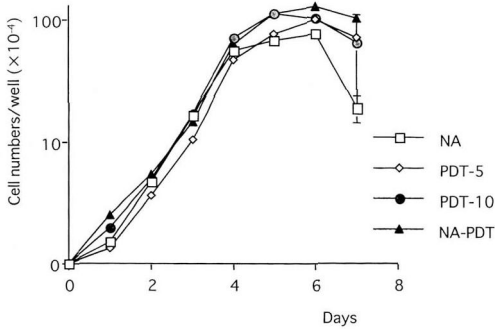


図6 NA, NA-PDT 細胞の増殖曲線

RD5F 培地に 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて 24 well plastic plate に播種して培養し、経時的に細胞数を算定した。値は 3 回の実験の平均値 \pm SD を表す。

NA: NA 細胞

PDT-5: PDT を 5 回行った細胞

PDT-10: PDT を 10 回行った細胞

NA-PDT: PDT 耐性 NA 細胞

顕鏡での観察結果から、NA-PDT は NA の細胞形態と差を認めなかった (写真 1)。

2) PDT 耐性細胞の多剤耐性について

NA-PDT の抗癌剤に対する感受性の変化、すなわち多剤耐性能について検討した。NA-PDT のそれぞれの抗癌剤に対する IC_{50} を NA のそれを 1 と比較す

ると、ADM で 0.82, CDDP で 0.79, BLM で 0.82, 5-FU で 0.55 と、NA に比較して NA-PDT では、今回検討した全ての抗癌剤に対して感受性が增大していた (図 7)。

2. PDT 耐性細胞の耐性獲得機序

1) 細胞内 PHE 濃度

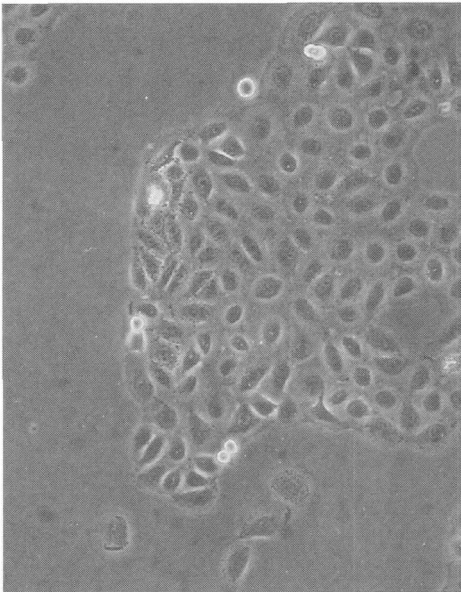
NA-PDT と NA の細胞内 PHE 濃度の違いを蛍光の強度を指標に検討した。その結果、NA-PDT の細胞内 PHE 濃度は NA に比較して有意に低下していた (図 8)。

2) 細胞膜脂質組成の変化

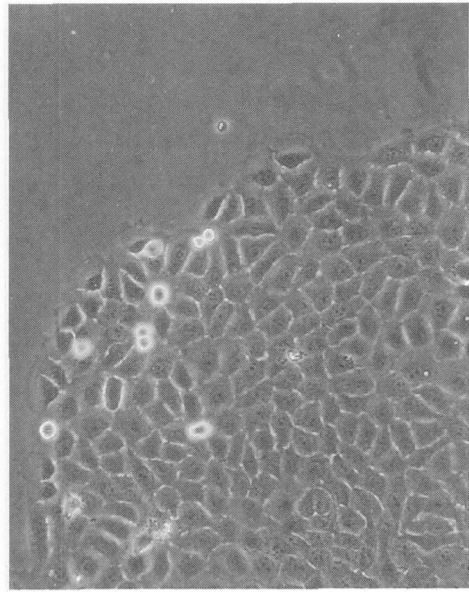
NA-PDT と NA の細胞膜の脂質組成を検討した。PL 量を 100 として各脂質の変化を比較したところ、NA-PDT では NA に比べて PL に対する FCh の比率が 110.45% から 65.5% に低下していた。FFA および TG の比率は差を認めなかった (図 9)。

3) ATP binding cassette transporter superfamily (ABC superfamily) の遺伝子発現

抗癌剤の耐性に関連し、細胞内の薬剤の排出に最も関与している ABC superfamily の MDR-1, MRP-1, -2, -3 の遺伝子発現量を検討した。その結果、NA-PDT では NA に比べて MDR-1 mRNA の発現が約 13 倍増大していた。しかし、MRP-1, -2, -3 mRNA の発現量は NA に比較してむしろ低下する傾向を示した (図 10)。



NA



NA-PDT

写真 1 NA および NA-PDT の位相差顕微鏡像

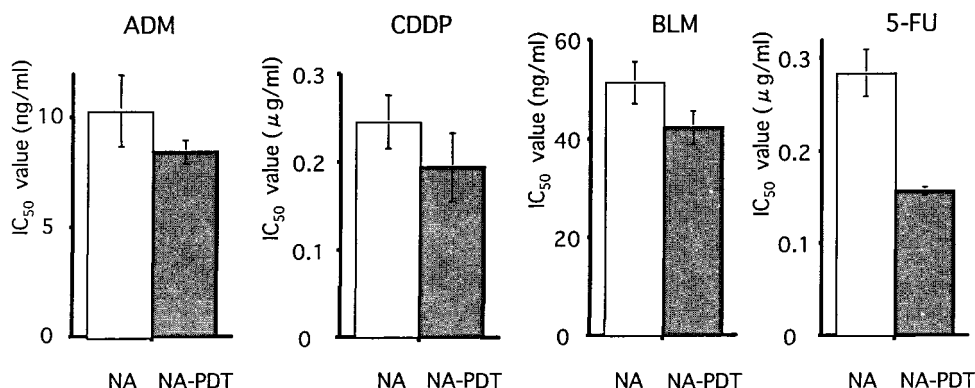


図7 NA および NA-PDT の ADM, CDDP, BLM, 5-FU に対する感受性の変化の検討
RD5F 培地を用い, 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて 24 well plastic plate に播種し, 24 時間後から抗癌剤を 24 時間作用させ, 培地交換した。培養 7 日目に生細胞数を計測し, IC₅₀ を求めた。

NA: NA 細胞 NA-PDT: PDT 耐性 NA 細胞
ADM: doxorubicin hydrochloride
CDDP: cis-diammine dichloroplatinum
BLM: bleomycin hydrochloride
5-FU: 5-fluorouracil

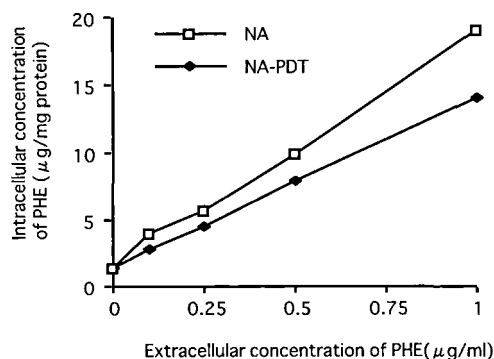


図8 細胞内 PHE 濃度

細胞を RD5F 培地で 60 mm plastic dish に播種し, PHE を 24 時間作用させた後, 細胞を回収し, 試料とした。PHE の定量は 390 nm で励起し, 630 nm の蛍光強度により得た。値は 3 回の実験の平均値 \pm SD を表す。

PHE: porfimer sodium NA: NA 細胞
NA-PDT: PDT 耐性 NA 細胞

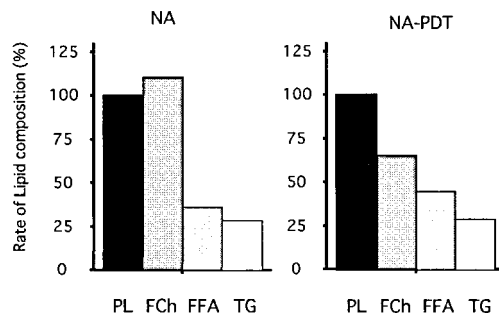


図9 NA および NA-PDT の膜画分の脂質組成の比率 (%)

各細胞の PL を 100 とした場合のそれぞれの脂質の割合を求めた。

PL: phospholipid FCh: free cholesterol
FFA: free fatty acid TG: triglyceride
ChE: cholesterol ester

4) Glutathione S-transferase pi (GST pi) の発現
抗癌剤などの解毒や活性酸素のスカベンジャーとして機能し, 一部の抗癌剤の耐性にも関与している GST pi の遺伝子発現について検討した結果, NA-PDT では NA に比べて GST pi mRNA の発現が低下していた (図11)。

5) アポトーシス関連因子の変化

PDT や抗癌剤の細胞死や耐性に関与している可能性

が考えられているアポトーシス関連因子の発現の変化を Western blot 法を用いて検討した。NA を PHE 8 ng/ml の濃度で処理後に PDT を行い, その 2 時間後に培養細胞からタンパクを回収し試料とした。アポトーシスを抑制する bcl-2 タンパクおよび促進する caspase 3 タンパクの発現は, NA および NA-PDT ともに認められた。しかし, PDT 処理の有無に関わらず bcl-2, caspase 3 の発現量に差は認められなかった (図 12)。

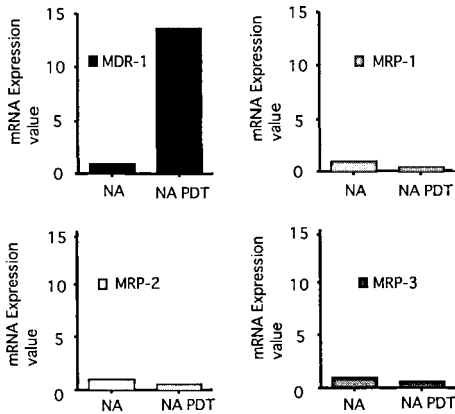


図10 MDR-1 および MRP-1,2,3 mRNA の発現量の検討
 定量 RT-PCR により、得られた NA の mRNA の発現量を 1 として表した。値は実験を 2 回行った平均を示す。
 MDR-1: 多剤耐性遺伝子 (P 糖タンパク質)
 MRP-1, 2, 3: 多剤耐性関連タンパク質

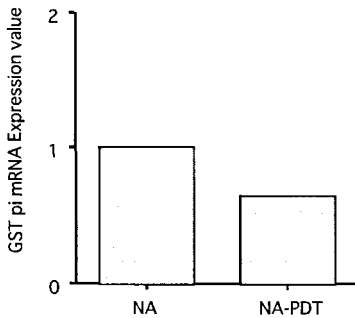


図11 GST pi mRNA の発現量の検討
 定量 RT-PCR により、得られた NA の mRNA の発現量を 1 として表した。値は実験を 2 回行った平均を示す。

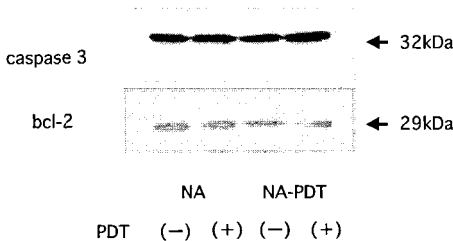


図12 NA および NA-PDT におけるカスパーゼ 3, bcl-2 蛋白の発現の検討
 RD5F 培地で 100 mm plastic dish に培養した各細胞からタンパクを回収し、Western Blot 法を用いて分析した。
 NA: NA 細胞 NA-PDT: PDT 耐性 NA 細胞
 PDT(-): PDT 未処理 PDT(+): PDT 処理

3. 抗癌剤併用による PDT 感受性の変化

1) 抗癌剤・PDT 併用による PDT 感受性の変化
 PDT に対する感受性に及ぼす抗癌剤処理の影響を明らかにするために、ADM および CDDP で 5 回処理した後、さらに PDT を 1 回および 5 回行った NA を用いて検討した。その結果、ADM で前処理することにより、PDT に対する感受性は低下し、PDT で 1 回および 5 回処理後の IC₅₀ 値は NA と比較してそれぞれ 1.15 倍と 1.49 倍の耐性を示した (図13)。

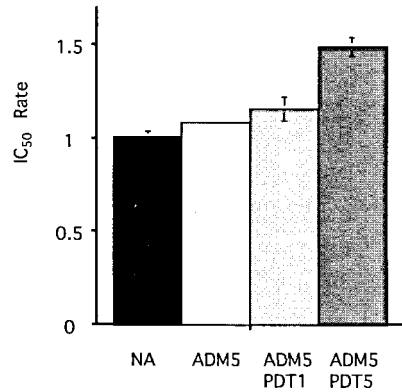


図13 ADM 前処理による PDT に対する感受性の変化の検討

RD5F 培地に 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて 24 well plastic plate に播種し、PHE を 24 時間作用させ、光照射を 5 分間行った。培養 7 日目に生細胞数を計測し、IC₅₀ を求めた。値は NA の IC₅₀ を 1 として表し、3 回の実験の平均値 \pm SD を表す。

NA: NA 細胞
 ADM5: ADM 5 回処理した細胞
 ADM5 PDT1: ADM 5 回処理後に PDT 1 回行った細胞
 ADM5 PDT5: ADM 5 回処理後に PDT 5 回行った細胞

一方、CDDP 前処理では PDT 5 回行った後の IC₅₀ 値は 1.08 倍で、感受性に変化はなかった (図14)。なお ADM および CDDP で 5 回処理した細胞では、ADM および CDDP に対する感受性に変化を認めなかった (未発表データ)。

2) 抗癌剤・PDT 併用細胞の MDR-1 mRNA の発現の変化

ADM および CDDP で 5 回前処理した細胞と、これらの細胞にさらに PDT を 5 回行った細胞に対する MDR-1 遺伝子の発現の変化を定量 RT-PCR を用いて検討した。ADM 処理後、PDT を行った細胞では MDR-1 mRNA の発現が NA に比較して約 7 倍増大していた。

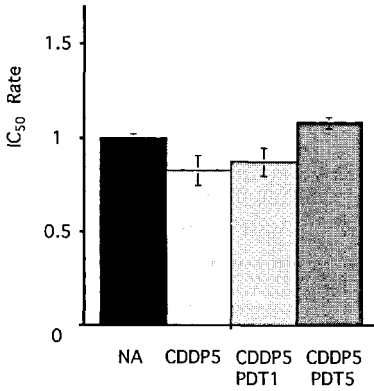


図14 CDDP 前処理による PDT に対する感受性の変化の検討

RD5F 培地に 1 well あたり 1×10^4 個の細胞を 1 ml の培養液を用いて 24 well plastic plate に播種し、PHE を 24 時間作用させ、光照射を 5 分間行った。培養 7 日目に生細胞数を計測し、IC₅₀ を求めた。値は NA の IC₅₀ を 1 として表し、3 回の実験の平均値 ± SD を表す。

NA: NA 細胞

CDDP5: CDDP 5 回処理した細胞

CDDP5 PDT1: CDDP 5 回処理後に PDT 1 回行った細胞

CDDP5 PDT5: CDDP 5 回処理後に PDT 5 回行った細胞

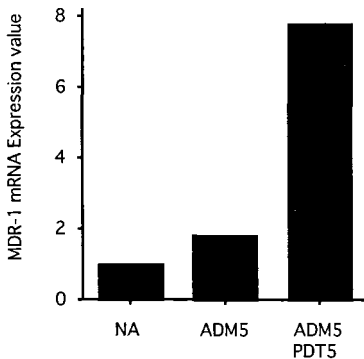


図15 MDR-1mRNAの発現量の変化の検討

定量 RT-PCR により、得られた NA の mRNA の発現量を 1 として表した。値は実験を 2 回行った平均を示す。

ADM5: NA を ADM で 5 回処理した細胞

ADM5 PDT5: NA を ADM で 5 回処理後に PDT を 5 回行った細胞

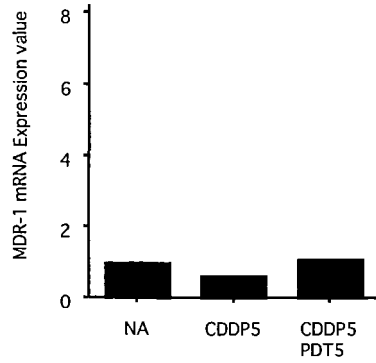


図16 MDR-1mRNAの発現量の変化の検討

定量 RT-PCR により、得られた NA の mRNA の発現量を 1 として表した。値は実験を 2 回行った平均を示す。

CDDP5: NA を CDDP で 5 回処理した細胞

CDDP5 PDT5: NA を CDDP で 5 回処理後に PDT を 5 回行った細胞

(図15) 一方、CDDP 前処理では MDR-1 mRNA の発現は、NA の 0.61 倍に低下した。(図16)

考 察

光線力学的療法 (PDT) は、腫瘍親和性の高い光感受性色素と低エネルギーのレーザー光照射の併用により、癌組織を破壊する新しい治療法である。この PDT の殺細胞作用は細胞内に取り込まれた光感受性色素が光照射により活性化され、周囲に存在する三重項酸素を活性酸素の一つである一重項酸素に変換し、さらにこの酸素分子が細胞器官を酸化させ、癌細胞を死に至らしめるために生じると考えられている。

本療法を進展させるためには、化学療法や放射線療法との併用、あるいは再発癌や耐性癌に対しての有効性などを検討する必要がある。そこで今回の研究では、PDT 耐性細胞を樹立し、その耐性獲得の機序や細胞の特性を明らかにし、さらに抗癌剤との併用療法の有効性について無血清培養系を用いて検討した。

PDT 耐性細胞の樹立には、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) と唾液腺由来腺癌細胞 (SAC) を用いて試みた。OSCC では PDT を繰り返す行うことで PDT に対する感受性が低下し、20 回処理では親株に対して約 2 倍の耐性を獲得した。しかし SAC では感受性に変化は認めず、耐性細胞を得ることはできなかった。これは SAC の PDT に対する IC₅₀ は 14.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ と IC₅₀ 値は高値を示したことから、既に自然耐性を獲得していた可能性が考えられた。

NA を PDT で 20 回処理した細胞をクローニングし、

PDT 耐性細胞株 NA-PDT を樹立した。PDT に対する耐性株は現在まで4株が報告²⁴⁻²⁷⁾されており、ヒト由来細胞では2株のみである。使用した光感受性色素は現在臨床で用いられている Photofrin が3例と最も多かった。また耐性はほとんどの株で2倍前後と今回樹立した NA-PDT とほぼ同じ傾向を示していた。

抗癌剤などに対する耐性機序として、薬剤の細胞内への取り込みや細胞外排出の変化、薬剤の不活化、薬剤を活性化する経路の不活化、薬剤の標的の変化、アポトーシスの抑制など⁸⁾が考えられている。

そこで NA-PDT の耐性獲得の機序を解明するため、まず PHE の細胞内濃度および取り込み、排出について検討した。細胞内 PHE 濃度は NA-PDT で親株の NA に比較して有意に低下していた。薬剤の細胞内への取り込みは、受動輸送の場合では、細胞膜の脂質組成の変化によって差が出るのが明らかになっている²⁸⁻³⁰⁾。そのためリン脂質 (PL) の割合が高く、中性脂質 (NL) が低い疎水性の細胞膜では、親水性の薬剤では、細胞内濃度が低くなり、逆に疎水性の薬剤では高くなると予想された。PHE の溶解性は水で高く、エタノールやエーテルには低く、親水性であることが知られている。今回の実験結果では NA-PDT の細胞膜の NL、特に FCh の割合が NA に比較して約半分に低下し、細胞膜の疎水性が増加したことが、細胞内 PHE 濃度が減少した一因と考えられた。

一方、薬剤の細胞外排出に関連する ATP binding cassette transporter superfamily (ABC superfamily) 4 種類の mRNA 発現について検討した結果、MDR-1 遺伝子の発現が親株に比べて13倍増加していることが明らかになった。従って、MDR-1 の高発現による PHE の細胞外排出の増加も、NA-PDT の PDT 耐性の原因の一つと考えられた。

Sighn ら²⁵⁾は、マウス放射線誘発線維肉腫細胞 RIF-1 由来 PDT 耐性株 (RIF-8A) では MDR-1 の発現および Photofrin の細胞内濃度は親株と差がないことを報告しており、NA-PDT と RIF-8A の PDT に対する耐性獲得の機序は異なると考えられた。また耐性癌の形態も RIF-8A では親株に比べて小型であった³¹⁾のに対し、NA-PDT では親株と差がないなど細胞の性格がかなり異なっていた。その原因として NA 細胞は、抗癌剤や放射線の影響を受けていない細胞株であるため、異なった機序で耐性を獲得したものと考えられる。

PDT の殺細胞作用は、活性酸素の細胞障害作用によるものと考えられ、PDT に対する感受性の相違に活性酸素のスカベンジャーの関与が推察されている。自然耐性の細胞においては還元型 glutathione の細胞内濃度の増加³⁰⁾や、その関連酵素 glutathione peroxidase^{30,32)}

および glutathione S-transferase (GST) の活性の上昇^{30,33)}が関連していることが明らかにされている。しかし NA-PDT では親株 NA に比較して GST pi mRNA の発現が低下していることから、PDT 耐性に GST pi が関与していないことが示唆された。

PDT による細胞死にはアポトーシスが関連しているとの報告がなされていることから、PDT の耐性獲得に bcl-2 や caspase などのアポトーシス関連因子の関与^{34,35)}が考えられる。しかし今回の実験結果では、NA-PDT と親株 NA の間で bcl-2 や caspase 3 タンパクの発現に差を認めなかった。bcl-2 を過剰発現した細胞では PDT に対する感受性が逆に増加するとの報告³⁶⁾があり、PDT 耐性にアポトーシス抑制機構の関与は少ないものと考えられる。

交叉耐性の有無について検討したところ、NA-PDT では ADM, CDDP, BLM および 5-FU に対する感受性が親株 NA に比べて亢進し、交叉耐性は認めなかった。特に 5-FU に対しては約2倍の感受性を示した。しかし Singh らの作製した放射線誘発線維肉腫由来の PDT 耐性細胞 RIF-8A では ADM に対して軽度感受性の増加が認められているが、CDDP に対しては逆に耐性を示していることから、親株の由来、特に遺伝子の不安定性が感受性の相違に関連しているものと考えられた。

MDR-1/P-glycoprotein (Pgp) は、anthracycline 系抗癌剤や vinca alkaloid 系抗癌剤などの構造も作用機序も異なる薬剤に対し、同時に耐性化する多剤耐性 (multidrug resistant: MDR) の現象に関係する膜タンパク質³⁷⁻⁴⁰⁾として、1985年前後にクローニングされた。Pgp は、6回の膜貫通ドメインと ATP 結合領域を含む1つの細胞質ドメインが2回繰り返された構造からなり、ATP エネルギーに依存し作動する排出ポンプ機能を持ち、薬剤を細胞内から外に排出する⁴¹⁾ことで多剤耐性能を獲得するものと考えられている。MDR-1/Pgp は、抗癌剤に対する代表的な耐性獲得機構に関与していると考えられ、anthracycline 系、vinca alkaloid 系抗癌剤のみならず etoposide, taxsol および actinomycin D など多数の薬剤の耐性⁴²⁾に関与している。しかし人工的に作られた水溶性の CDDP、5-FU などの抗癌剤に対しては MDR-1/Pgp は機能せず⁴²⁾、専ら植物⁴³⁾や微生物由来⁴⁴⁾の抗癌剤や抗生物質などの疎水性あるいは両親媒性をもつ物質が MDR-1/Pgp の基質として輸送されることが明らかにされている。PHE はブタ血液のヘミンから精製され、酢酸、塩酸および水酸化ナトリウムで処理され、ヘマトポルフィリン・オリゴマーの構造で、両親媒性の性質を持っていると考えられる。しかし、細胞内からの PHE の排出に関して検討した報告はなく、今回の結果から、MDR-1/Pgp が

PHEの細胞外への排出に関与している可能性が示唆された。さらに紫外線⁴⁵⁾または放射線^{46,47)}などのストレスによりMDR-1/Pgpの発現が増加するとの報告が散見されるが、その真偽はまだ定かでない⁴⁸⁾。しかしNA-PDTにおけるMDR-1/Pgpの高発現はPHEの細胞外排泄機能のみでなく、PDTの酸化ストレスにより誘導された可能性も推察された。

一方、MRP遺伝子⁴⁹⁾は、Pgpを発現していないdoxorubicin耐性細胞から過剰発現しているmRNAに対応するcDNAを分離し、コードされているタンパク質をMRP (multidrug resistance-associated protein)と命名した。その後の研究で、MRPは、MDR-1/Pgpと同様にdoxorubicin, vincristine, etoposideなどの抗癌剤に対する耐性に関連していることが明らかにされている。またMRPはアミノ酸配列などからMDR-1/Pgpと同様にATP結合領域を持ちABCトランスポーター膜貫通タンパク質であることが明らかにされた。さらにMRPの近縁ファミリーとしてMRP-2/cMOAT^{50,51)}やMRP-3⁵²⁾などのABCトランスポーターが次々に発見され、抗癌剤に対する耐性との関連が報告されている。MRP-2/cMOATは、特にMDR-1やMRP-1で排出できないCDDPなどの抗癌剤を細胞外へ排出することにより、耐性に関与していること⁵³⁾が明らかになっている。MRP-3は、遺伝子の高発現やantisenseの導入により、etoposide, methotrexateやCDDPに対する耐性との関連が示唆されている^{54,55)}。しかしNA-PDTにおいてMRP-1, -2, -3のmRNAの発現は親株と比較し、低下傾向を示したことから、これらのトランスポーターとPDT耐性獲得とは関連がないことが考えられた。

一方、MRP-1およびMRP-2/cMOATの抗癌剤の輸送や耐性の獲得には、還元型グルタチオン(GSH)や関連酵素の存在が重要といわれている⁵⁶⁾。白血病細胞HL-60由来ADM耐性細胞でglutathione S-conjugateの関連するATP依存のトランスポートの関連が示唆される報告⁵⁷⁾がある。またCDDP耐性株をCDDPなどの重金属で刺激すると、MRP-1とGS-X(ATP-dependent glutathione S-conjugate export) pumpが共に発現することや、 γ -glutamylcysteine synthetase mRNAの高発現による細胞内GSHの増加あるいはCDDP-グルタチオン抱合体によるATP依存膜輸送の亢進がみられ、CDDPの耐性にMRP-1およびGSHの関連が示唆される報告⁵⁸⁾がなされている。またbuthioninesulfoximine処理によりGSHの細胞内濃度の減少と同時にMRP-2/cMOATの発現の低下により、培養細胞内CDDPの濃度が減少し、細胞外への放出が増加するとの報告⁵⁹⁾がある。一方、CDDP耐性細胞でGSH濃度やATPに依

存した重金属の細胞外排出能もコントロールより高いが、耐性とMRP-2/cMOATとの関連はないとの報告⁶⁰⁾がみられ、MRP-2の薬剤排出とGSHとの関連性は明確ではない。しかしNA-PDTにおいてMRP-1, MRP-2/cMOATおよびGSH関連酵素のGST piのmRNAの発現の低下がみられたことは、ADMやCDDPなどの抗癌剤に対する感受性が高くなった原因の一つであると考えられた。

以上より、NA-PDTの耐性獲得の機序は、細胞膜の脂質組成の変化による疎水性の上昇によるPHEの細胞内への取り込みの低下とMDR-1の高発現によるPHEの細胞外排出の増加によるものと示唆された。またNA-PDTの抗癌剤感受性の亢進にMRPやGST pi mRNAの発現減少が関連している可能性が考えられた。

また抗癌剤で前処理した細胞を用いて、PDTの感受性の変化を検討したところ、CDDP前処理ではPDT感受性の変化は認めなかったが、ADM前処理ではPDTの回数が増えるに従って、PDTに対する耐性が増すことが明らかになった。この原因として、ADM処理によりMDR-1の発現がある程度亢進している状態で、PDTを行ったためMDR-1 mRNAの発現が一気に増大したものと考えられた。一方、CDDP前処理ではMDR-1 mRNAの発現が低下しているため、PDT 5回処理ではMDR-1 mRNAの発現が亢進しなかったものと考えられた。またNAをADMあるいはCDDPで12回処理し、それぞれの薬剤に耐性を示す細胞を用いてPDTに対する感受性を検索したところ、ADM耐性細胞ではPDTに対し1.2倍の耐性を示したが、CDDP耐性細胞では親株と同じ感受性であった(未発表データ)。ハムスター卵巣由来ADM耐性細胞は、Photofrinを用いたPDTに対して耐性を示すという報告⁶¹⁾や、逆にADM耐性ヒト白血病細胞に対して光感受性色素Merocyanine 540を用いたPDTでは、感受性が増大するとの報告⁶²⁾があり、用いる色素や細胞の種類により感受性は異なると考えられた。一方、CDDP耐性癌のPDTに対する感受性の変化や抗癌剤ADMの前処理によるPDTの耐性の獲得についての報告は皆無である。

以上より、PDTと抗癌剤の併用においてCDDPではPDTの感受性に変化をもたらさないが、ADMの併用ではMDR-1/Pgpの発現上昇を誘導し、PDTに対して耐性を示す可能性が示唆された。

臨床においてPDTに対する耐性癌の報告はない。PDTは表在性の固形癌で、通常1回あるいは2回のPDTで根治が可能な症例が適応症となり、その治癒率は8割以上と高い²⁻⁴⁾。またPDT後に腫瘍の残存が認められた場合は、手術あるいは放射線に移行することが多く、同一部位に複数回PDTを行うことは希である

ため、耐性癌の発生の報告がないものと考えられる。しかし多発肺癌27症例の PDT の治療報告⁶³⁾では、異時性の13症例に対して PDT 2~5回を行っているが耐性癌の発生は認めていない。一方、口腔癌において手術療法、放射線療法あるいは化学療法を用いた一次癌治療後に生じる異時性多重癌あるいは再発癌は、一般に抗癌剤や放射線に対して耐性を示す場合が多く、治療に難渋することが多い。しかし今回の結果では、抗癌剤処理あるいは耐性細胞は PDT に対して耐性を示すことがなく、特に口腔癌で多用される CDDP 処理では感受性に変化がないか、あるいは亢進しており、口腔癌再発癌や多重癌に対して有効な治療法となるものと考えられた。

総 括

1. PDT 耐性口腔扁平上皮癌細胞株 (NA-PDT) を樹立した。NA-PDT は親株に比較して PDT に対して約 2 倍の耐性を示した。
 2. PDT 耐性獲得機構は、細胞膜脂質組成の変化および多剤耐性遺伝子 MDR-1 の高発現による細胞内 PHE 濃度の低下がその原因であることが示唆された。
 3. PDT 耐性獲得機構にアポトーシス関連因子の caspase や bcl-2 および活性酸素のスキャベンジャーである GST pi の関連は認めなかった。
 4. NA-PDT では、各種の抗癌剤に対して感受性が亢進していた。その原因として MRP-1, -2, -3 および GST pi の mRNA 発現の減少が関連していることが示唆された。
 5. ADM で前処理することにより、その後の PDT に対する感受性が徐々に低下し耐性を示したが、CDDP 前処理では PDT に対し耐性を示さなかった。ADM と PDT の併用で MDR-1 mRNA の発現が増大したのに対し、CDDP との併用では変化が認められなかったことがその原因と考えられた。
- 以上の結果より、PDT 耐性癌に対して ADM, CDDP, 5-FU や BLM などの抗癌剤は依然有効性を示すこと、また PDT と化学療法を併用する際は PDT を先行し、続いて CDDP を用いることが有効であることが示唆された。今後の口腔癌に対して PDT と化学療法との併用療法における有用な知見が得ることができた。

謝 辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学歯学部口腔外科学第一講座 岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また、本論文作成上、終始御懇切なる御教示、御校閲を賜りました本学歯科薬理学講座 土肥敏博教授ならびに本学口腔生

学講座 加藤幸夫教授に心より感謝致します。

尚、本研究を進めるに際し、多大の御配慮、御指導を賜りました歯学部附属病院 鹿谷茂昭博士に深く感謝致します。また、多大の御指導を頂きました歯学部口腔外科学第一講座 田中良治博士、歯学部附属病院 新谷智章博士および笛吹恵美子博士に感謝致します。さらに、御支援、御協力を頂きました本学口腔外科学第一講座教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) 加藤治文：光線力学的治療法，過去・現在・未来。癌と化学療法 23, 8-15, 1996.
- 2) 楠 洋子, 梁 尚志, 高田 実, 瀧藤仲英, 福岡正博：肺癌に対する PDT. 日本レーザー医学会誌 15, 13-19, 1994.
- 3) 三村征四郎, 奥田 茂：エキシマダイレーザーによる早期胃癌の光化学治療. 医学のあゆみ 168, 801-804, 1994.
- 4) 室谷哲弥, 作永穂高, 杉田道夫, 杉下 匡, 水野一夫, 太田正博, 加藤 紘, 早田義博：PHE (porfimer sodium) および Excimer Dye Laser (PDT EDL-1) による初期子宮頸癌ならびにその前癌病変に対する Photodynamic Therapy (PDT) の臨床第Ⅲ相試験. *Oncology & Chemotherapy*, 8, 302-307, 1992.
- 5) 橋本賢二：最新の光化学療法 (PDT) の成果と将来展望. 日本歯科医師会雑誌 52, 934-944, 1999.
- 6) Savary, J-F., Monnier, P., Fontollet, C., Mizeret, J., Wagnieres, G., Braichette, D., von den Berg, H.: Photodynamic therapy for early squamous cell carcinomas of esophagus, bronchi, and mouth with m-tetra (hydroxyphenyl) cholin. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 123, 162-168, 1997.
- 7) Toratani, S., Kimoto, N., Shinki, T. and Okamoto, T.: Effect of photodynamic action with pheophorbide-a on human oral carcinoma cells in serum-free culture. *Tiss. Cult. Res. Commun.*, 18, 345-352, 1999.
- 8) 坂本 優, 馬屋原健司, 坂本宙子, 河崎恵子, 末広 寛, 功刀孝也, 秋谷 司, 岩淵浩之, 作永穂高, 室谷哲弥, 菊池義公, 杉下 匡, 天神美夫, Gray, J.W., 田中忠夫：癌関連遺伝子異常と薬剤感受性. 癌と化学療法 25, 1819-1831.
- 9) 尾下文浩：放射線と化学療法剤の相互作用. 癌の臨床 46, 263-265, 2000.
- 10) Sato, J.D., Kawamoto, T. and Okamoto, T.: Cholesterol requirement of P3-X63-Ag8 and X63-Ag8.653 mouse myeloma cells for growth in vitro. *J. Exp. Meth.*, 165, 1761-1766, 1987.
- 11) Myoken, Y., Okamoto, T., Osaki, T., Yabumoto, M., Takada, K. and Sato, G.: An alternative method for the isolation of NS-1 hybridomas using cholesterol auxotrophy of NS-1 mouse

- myeloma cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 477-480, 1989.
- 12) Myoken, Y., Myoken, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, J.D. and Takada, K.: Release of fibroblast growth factor-1 by human squamous cell carcinoma correlates with autocrine cell growth. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **30A**, 790-795, 1994.
 - 13) Miyauchi, S., Moroyama, T., Kyoizumi, S., Asakawa, J., Okamoto, T. and Takada, K.: Malignant tumor cell lines produce interleukin-1-like factor. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **24**, 753-758, 1988.
 - 14) Yanagawa, T., Hayashi, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yura, Y. and Sato, M.: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adeno-carcinoma clonal cells grown in athymic nude mouse. *Virchows Arch. [B]*, **51**, 187-195, 1986.
 - 15) Bradford, N.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, 1976.
 - 16) Bligh, E.G. and Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917, 1959.
 - 17) Anders, P. and Armand, G.: Solvents of thin layer chromatography of blood serum lipids. *Nature*, **212**, 402-403, 1966.
 - 18) Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**, 156-159, 1987.
 - 19) Hinoshita, E., Uchimi, T., Taguchi, K., Kinukawa, N., Tsuneyoshi, M., Mehara, Y., Sugimachi, K. and Kuwano, M.: Increased expression of an ATP-binding cassette superfamily transporter, multidrug resistance protein 2, in human colorectal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2401-2407, 2000.
 - 20) Cho, Y.S. and Kim, M.J.: Expression of multi-drug resistance-related genes in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology*, **37**, 652-659, 2001.
 - 21) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of a head bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
 - 22) Lastick, S.M., McConkey, E.D.: Exchange and stability of Hela ribosomal proteins in vivo. *J. Biol. Chem.*, **251**, 2867-2875, 1976.
 - 23) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354, 1979.
 - 24) Luna, M.C. and Gomer, C.J.: Isolation and initial characterization of mouse tumor cells resistant to porphyrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **51**, 4243-4249, 1991.
 - 25) Singh, G., Wilson, B.C., Sharkey, S.M., Browman, G.P. and Deschamps, P.: Resistance to photodynamic therapy in radiation induced fibrosarcoma-1 and Chinese hamster ovary-multi-drug resistant. *Photochem. Photobiol.*, **54**, 307-312, 1991.
 - 26) Singh, G., Epiritu, M., Shen, X.Y., Hanlon, J.G. and Rainbow, A.J.: In vitro induction of PDT resistance in HT29, HT1376 and SK-N-MC cells by various photosensitizers. *Photochem. Photobiol.*, **73**, 651-656, 2001.
 - 27) Morgan, J. and Oseroff, A.R.: Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **49**, 71-86, 2001.
 - 28) 新木恒猪: 無血清培養下における正常上皮細胞ならびに癌細胞の脂質合成能に関する研究. 広大歯誌 **27**, 149-161, 1995.
 - 29) 虎谷茂昭, 岡本哲治, 新木恒猪, 尾崎輝彦, 藪本正文, 田中良治, 谷 亮治, 高田和彰: 口腔癌の膜脂質組成の相違に基づく抗癌剤感受性. *Tissu. Cult. Res. Commun.*, **15**, 147-153, 1996.
 - 30) 虎谷茂昭, 岡本哲治, 尾崎輝彦, 新木恒猪, 高田和彰: 癌細胞膜の脂質組成の差を利用した癌化学療法の基礎的研究. 日癌治誌 **31**, 413-419, 1996.
 - 31) Sharkey, S.M., Wilson, B.C., Moorehead, R. and Singh, G.: Mitochondrial alteration in photodynamic-resistant cells. *Cancer Res.*, **53**, 4994-4999, 1993.
 - 32) Wang, H.P., Qian, S. Y., Schafer, F.Q., Oberley, L.W. and Buettner, G. R.: Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase protects against single oxygen-induced cell damage of photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, 825-835, 2001.
 - 33) Thomas, J. P. and Girotti, A. W.: Role of lipid peroxidation in hematoporphyrin derivative-sensitized photokilling of tumor cells: Effect of glutathione peroxidase. *Cancer Res.*, **49**, 1682-1686, 1989.
 - 34) Das, H., Koizumi, T., Sugimoto, T., Yamaguchi, S., Hasegawa, K., Tenjin, Y. and Nishimura, R.: Induction of apoptosis and manganese superoxide dismutase gene by photodynamic therapy in cervical carcinoma cell lines. *Int. J. Clin. Oncol.*, **5**, 97-103, 2000.
 - 35) Agarwal, M.L., Clay, M.E., Harvay, E.J., Evans, H.H., Antunez, A.R., Oleinick, N.L.: Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, **51**, 5993-5996, 1991.
 - 36) Kim, H-R. C., Luo, Y., Li, G. and Kessel, D.: Enhanced apoptotic response to photodynamic

- therapy after bcl-2 transfection1. *Cancer Res.*, **59**, 3429–3432, 1999.
- 37) Riordan, J.R., Deuchars Kathryn, Kartner Norbert, Alon Noa, Trent Jeffrey and Ling Victor: Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. *Nature*, **316**, 817–819, 1985.
 - 38) Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D-W., Gottesman, M.M., and Pastan, I. mbn: Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4538–4542, 1986.
 - 39) Sugimoto, Y., Turuo, T.: DNA-mediated transfer and cloning of a human multidrug-resistant gene of adriamycin-resistant myelogenous leukemia K562. *Cancer Res.*, **47**, 2620–2625, 1986.
 - 40) Ueda, K., Pastan, I. and Gottesman, M.M.: The human multidrug resistance (mdr) gene, cDNA cloning and transcription Initiation. *J. Biol. Chem.*, **262**, 17432–17436, 1987.
 - 41) Higgins, C.F.: ABC transporters: from microorganisms to man. *Ann. Rev. Cell Biol.*, **8**, 67, 1992.
 - 42) 内海 健, 日下英司, 芳賀 整, 和田守正, 桑野信彦: P糖タンパク / MDR1 と cMOAT の薬剤耐性への関与. *最新医学* **54**, 2044–2051, 1999.
 - 43) Hirai, M., Tanaka, K., Shimizu, T., Tanigawara, Y., Yasuhara, M., Hori, R., Kakehi, Y., Yoshida, O., Ueda, K., Komano, T., Inui, K.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **275**, 73–78, 1995.
 - 44) Ueda, K., Shimabuku, A. M., konishi, H., Fujii, Y., Takebe, S., Nishi, K., Yoshima, M., Beppu, T., Komano, T.: *FEBS. Lett.*, **330**, 279–282, 1993.
 - 45) Uchiumi, T., Kohno, K., Tanimura, H., Matsno, K., Sato, S., Uchida, Y., Kuwano, M.: Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ.*, **4**, 147–157, 1993.
 - 46) Hill, B.T., deuchars, K., Ling, V. and Whelen, R.D.: Overexpression of P-glycoprotein in mammalian tumor cell lines after fractionated X irradiation in vitro. *J. natl. Cancer Inst.*, **82**, 607–612, 1990.
 - 47) Hill, B.T., Whelen, R.D., Hurst, H.C. and McClean, S.: Identification of a distinctive P-glycoprotein-mediated resistance phenotype in human ovarian carcinoma cells after their in vitro exposure to fractionated X-irradiation. *Cancer*, **73**, 2990–2999, 1994.
 - 48) Ruth, A.C. and Roninson, I.B.: Effect of the multidrug transporter P-glycoprotein on cellular responses to ionizing radiation. *Cancer Res.*, **60**, 2576–2578, 2000.
 - 49) Cole, S.P., Bhardwaj, G., Gerlach, J.H., Mackie, J.E., Grant, C.E., Almquist, K.C., Stewart, A.J., Kurz, E.U., Duncan, A.M. and Deeley, R.G.: Overexpression of transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*, **258**, 1650–1654, 1992.
 - 50) Paulusma, C.C., Bosma, P.J., Zaman, G.J.R., Bakker, C.T.M., Otter, M., Scheffer, G.L., Scheper, R.J., Borst, P., Oude Elferink, R.P.J.: Congenital jaundice in rats with a mutation in a multidrug resistance-associated protein gene. *Science*, **271**, 1126–1128, 1996.
 - 51) Taniguchi, K., Wada, M., Kohno, K., Nakamura, T., Kawabe, T., Kawakami, M., Kagotani, K., Okumura, K., Akiyama, S. and Kuwano, M.: A human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation1. *Cancer Res.*, **56**, 4124–4129, 1996.
 - 52) Kool, M., van der Linden, M., de Haas, M., Scheffer, G.L., de Vree, J.M., Smith A.J., Jansen, G., Peters, G.J., Ponne, N., Scheper, R.J., Elferink, R.P., Baas, F. and Borst, P.: MRP-3, an organic anion transporter able to transport anti-cancer drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 6914–6919, 1999.
 - 53) Koike, K., Kawabe, T., Tanaka, T., Toh, S., Uchiumi, T., Wada, M., Akiyama, S., Ono, M. and Kuwano, M.: A canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) antisense cDNA enhances drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.*, **57**, 5475–5479, 1997.
 - 54) Haga, S., Hinoshita, E., Ikezaki, K., Fukui, M., Scheffer, G.L., Uchiumi, T. and Kuwano, M.: Involvement of the multidrug resistance protein 3 in drug sensitivity and its expression in human Glioma. *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 211–219, 2001.
 - 55) Kool, M., Haas, M., Scheffer, G.L., Sheper, R.J., van Eijk, M. J.T., Juijn, J.A., Baas, F. and Borst, P.: Analysis of expression of cMOAT (MRP 2), MRP 3, MRP 4, MRP 5, homologues of multidrug resistance-associated protein gene (MRP 1), in human cancer cell lines. *Cancer Res.*, **57**, 3537–3547, 1997.
 - 56) Muller, M., Meijer, C., Zaman, G.J.R., Borst, P., Scheper, R.J., Mulder, N., de Vries E.G.E. and Janes, P.L.M.: Overexpression of the gene encoding the multidrug resistance-associated protein results in increased ATP-dependent glutathione S-conjugate transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 13033–13037, 1994.
 - 57) Jedlitschky, C., Leier, I., Buchholz, U., Center M. and Keppler, D.: ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance associated protein. *Cancer Res.*, **54**, 4833–4836, 1994.

- 58) Ishikawa, T., Bao, J.-J., Yamane, Y., Akumaru, K., Frindrich, K., Wright C.D. and Kuo, M.T.: Coordinated induction of MRP/GS-X pump and γ -glutamylcysteine synthetase by heavy metals in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14981-14988, 1996.
- 59) Minamino, T., Tamami, M., Itoh, Y., Tatsumi, Y., Nomura, M., Yokogawa, K., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Ohshima, T., Miyamoto, K.: In vivo cisplatin resistance depending upon canalicular multi-specific organic anion transporter (cMOAT). *Jpn. J. Cancer Res.*, **90**, 1171-1178, 1999.
- 60) Chen, Z. S., Mutoh, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Saijo, N., Kondo, T., Akiyama, S.: An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.*, **240**, 312-320, 1998.
- 61) Moorehead, R., Armstrong, B. C., Wilson, B. C., and Singh, G.: Cross-resistance to cisplatin in cells resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.*, **54**, 2556-2559, 1994.
- 62) 佐藤 靖, 山崎哲男, 安川清貴, 兼板佳孝, 持丸純一郎, 花井将彰, 入江哲也, 藏 良政, 沢田海彦, 堀江孝至: Merocyanine 540 を用いた光化学療法による K562 Adriamycin 耐性細胞における P 糖蛋白の阻害. *癌と化学療法* **26**, 2195-2200, 1999.
- 63) 小中千守, 奥伸哲弥, 古川欣也, 酒井治正, 小川一平, 佐藤正敏, 加藤治文: 原発性多発肺癌の光線力学的治療. *癌と化学療法* **23**, 31-35.