

血管新生，細胞増殖にかかわる変性IV型コラーゲンと光感受性物質会合—微弱光照射による病態の評価と誘導制御の基礎研究

町田 稔¹ 亀山 孝二² 清水 昭夫³ 森山 紀之¹ 内藤 善哉²

要 旨：hematoporphyrin(HP)を用いて変性したIV型コラーゲン(IV型)と脂質複合体の光反応性を観察し，間質病変制御の可能性について検討した。中性から酸性条件でIV型にHPを加えた溶液の蛍光スペクトルは差異を示した。さらに，リボソームを用いた疎水環境でIV型は変性し，HP存在下で光感受性が増大した。以上，HPを用いた光照射により間質病変の診断や治療の可能性が期待される。(J Jpn Coll Angiol, 2006, 46: 67-71)

Key words: hematoporphyrin, type IV collagen, atherosclerosis

背景と目的

光感受性物質hematoporphyrin dihydrochloride IX(HP)は元来親水性にもかかわらず動脈硬化病巣では，細胞成分が豊富で基底膜の傷害がみられる病巣と脂質が豊富な粥腫病変のそれぞれの部位で特異的な蛍光スペクトルを示す^{1,2)}。われわれはこれまでHPは動脈硬化病巣の線維性被膜や線維性肥厚部に比べ，基底膜病変や細胞膜の傷害が主体である病変により強く局在していることを報告してきた^{1,2)}。

最近，動脈硬化病巣とともに悪性腫瘍の光線力学的診断・治療においても光感受性物質HPが有用との報告がみられる^{3,4)}。HPは動脈硬化病巣の脂質蓄積部位や悪性腫瘍内の酸性環境下において選択的に集積する特徴があり，さらにこのような特殊な環境では，HPと酸可溶性コラーゲンとの会合が生じていることが報告されている^{4,5)}。

近年，酸可溶性コラーゲンのなかでもIV型コラーゲンについては，変性条件下での立体構造の変化に伴い種々の生物学的活性を示すcryptic siteが出現するとの報告がみられる⁶⁾。このような変性IV型コラーゲンのcryptic siteにより，血管新生や腫瘍増殖が誘導される⁷⁾。

これらの事実からさまざまな病態の形成には細胞のみならず間質成分の構造変化も重要な制御因子の対象となることが明らかとなってきた。そこでわれわれは，HP等による光線力学的治療効果には細胞成分に対する直接作用のみならず，細胞間質や基底膜成分の形態変化を介した間質病変制御の可能性があると考え検討した。

材料と方法

(1)材料

ウシ胎盤由来0.3%IV型コラーゲン溶液(株式会社高研，東京)とhematoporphyrin dihydrochloride IX(Porphyrin Products, Utah, USA)，中空リボソームとしてCOATSOME(日本油脂株式会社，東京)を用いた。

IV型コラーゲンとHPは250mMリン酸緩衝液(pH4, pH7)，IV型コラーゲン0.06%，HP10 μ molの濃度で全量2mlに調整してスペクトルの測定に用いた。

(2)実験 1

まず，IV型コラーゲンとHPの会合(結合)につき，①コラーゲンの2次構造を調べる目的でCDスペクトラム(円偏光二色性：circular dichroism)測定(JASCO-J805，日本分光株式会社，東京)，②IV型コラーゲンとHP結合状態を調べる目的でIV型コラーゲン-HP結合

¹国立がんセンターがん予防・検診研究センター

²日本医科大学病理学教室

³創価大学工学部

2005年8月30日受付 2006年2月14日受理

Published online before print March 20, 2006

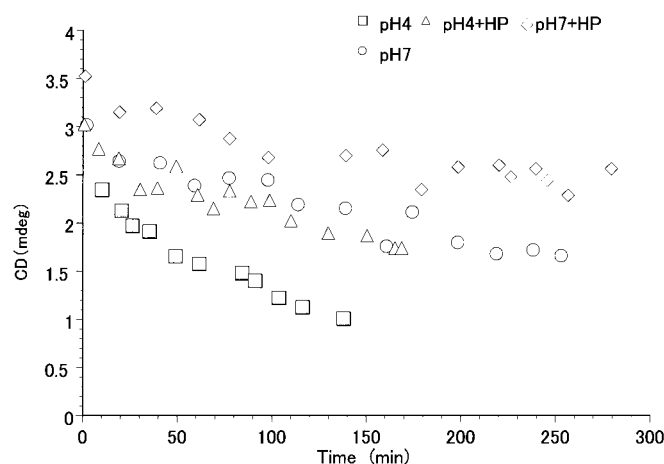


Figure 1 Time course of circular dichroism (CD) spectra at 222 nm of type IV collagen in the presence of hematoporphyrin (HP) (50 mM phosphate; buffer pH 4 or pH 7, 37°C).

体を波長400nmで励起し420～700nmにおける蛍光スペクトラム測定(JASCO-V560, 日本分光株式会社, 東京), ③IV型コラーゲンとHPの結合状態をHP特異蛍光波長である374nmでの吸光度(JASCO-FP6500, 日本分光株式会社, 東京)で測定し120時間にわたり経時的に確認した。

(3)実験 2

IV型コラーゲンはNaClによる凝集を示す。このIV型凝集体に脂質の豊富な動脈硬化病巣のモデルとしてリポソーム(コレステロール含有)を添加した会合体を作成した。

そして、この会合体に対してHP存在下の光照射によるNaCl凝集の抑制効果を次の3条件で250mMリン酸緩衝液(pH4)150 μ lに(A)(B)(C)の前処理を施行し暗視野散乱光で観察した。

A: 0.3%IV型コラーゲン溶液25 μ lに0.1mMのHPを20 μ l加え白色光を2時間照射。照射直後、正荷電リポソーム75 μ lを添加し、さらに35 μ lの5M NaCl溶液を加えた。

B: 正荷電リポソーム75 μ lにIV型コラーゲン25 μ lおよび0.1mMのHPを20 μ l加え白色光(COLD LIGHT SOURCE PLO75, HOYA-SCHOTT株式会社, 東京)を2時間照射後、35 μ lの5M NaCl溶液を添加した。

C: 正荷電リポソーム75 μ lにIV型コラーゲン25 μ lと0.1mMのHPを20 μ l加えた後、遮光し2時間放置。さら

に35 μ lの5M NaCl溶液を添加した。

以上の条件下でタンパク脂質会合体の凝集状態について高感度CCDを用いた撮像, 観察を行った。

また、タンパク脂質会合体の変化については高感度偏光蛍光顕微鏡を用い蛍光と暗視野観察を行って検討した。

結 果

(1)IV型コラーゲンのCDスペクトル値の時間変化

Fig. 1 はあらかじめ、IV型コラーゲンの2次構造を確認するため、円偏光(222nm)におけるpH4およびpH7の溶媒条件とHPの添加の有無の4条件で円偏光強度の値を計測しプロットした。変性したランダムコイル状態ではCD値は0以下を示すが、用意したIV型コラーゲンのサンプルは、2次構造が保たれていることを確認し、以下の光反応の影響を検討した。

(2)IV型コラーゲン-HP会合体の蛍光スペクトル

IV型コラーゲン-HP会合体の蛍光スペクトルを示す。グラフ(**Fig. 2A**)のIV型コラーゲンとHPの混合状態とグラフ(**Fig. 2B**)のHPのみの蛍光は0時間, 16時間, 120時間で波形と強度に明らかな差が認められる。pH7の環境(**Fig. 2C**)では各時間ともに変化がない。IV型コラーゲンはpH4で長時間HPとの弱い結合状態であることがわかる。一方, pH7ではスペクトルの差は乏しく, 結合状態を認めない。

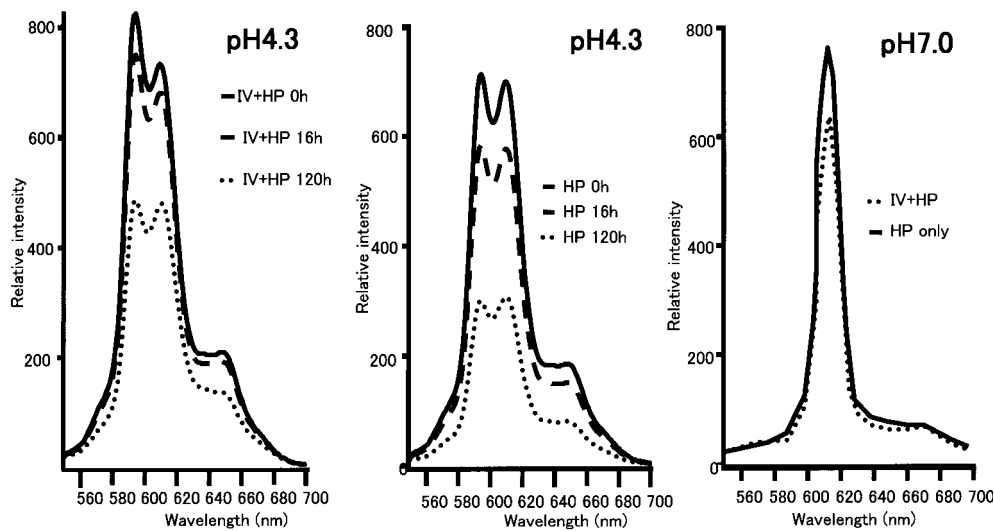


Figure 2 Fluorescence spectra of the type IV collagen-hematoporphyrin complex.
HP: hematoporphyrin, IV: type IV collagen

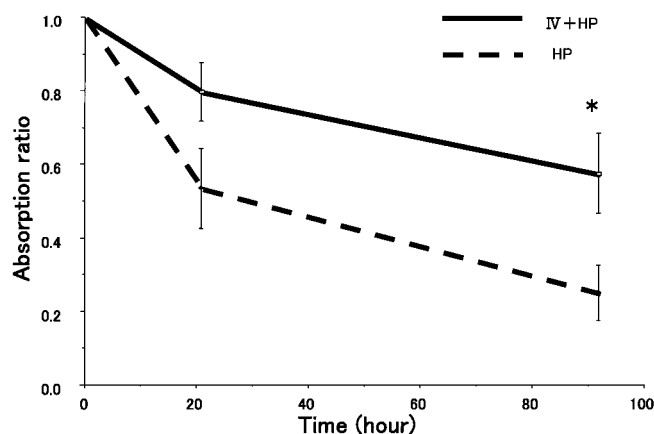


Figure 3 Time course of the intensity ratio of UV absorption at 374 nm
(n=6, mean±SEM).
HP: hematoporphyrin

(3) 374nm(HP特異吸収波長)における吸光強度比の時間変化

蛍光での長時間変化に対応して、HPの特異吸収である374nmにおける吸光強度比の変化を計測し、結合状態を確認すると、HP単独では時間とともに吸光強度比の低下が観察される。一方、HPとIV型コラーゲンの混合物はpH4の酸性の変性状態では吸光強度比の低下が緩やかで沈降せず(* $p<0.05$)、IV型コラーゲンとHPは集積を示し、両者の会合体を形成している(**Fig. 3**)。

(4) 白色光によるIV型コラーゲンの会合体の抑制

上段には各条件の暗視野観察像を示す(**Fig. 4**)。IV型コラーゲンが凝集形成し光未照射のもの(**Fig. 4C**)に対してあらかじめIV型コラーゲンとHPを加えて光照射を行って凝集を抑制した例(**Fig. 4A**)とIV型コラーゲンとHPを加えて凝集形成し、その後に光照射を行った例(**Fig. 4B**)では、対照(**Fig. 4C**)に比較して凝集形成の抑制を認めた。下段の棒グラフには各条件(A1, B1, C1)に対応した輝度分布(A2, B2, C2)を示す。照射群

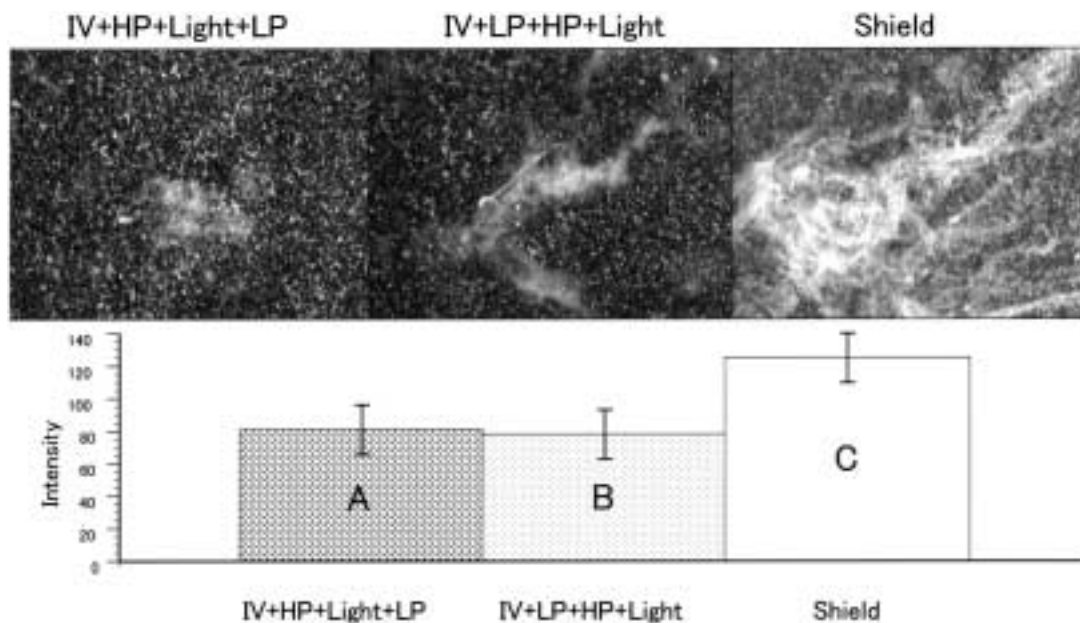


Figure 4 Suppression of the structuralization of type IV collagen by photoirradiation with hematoporphyrin. HP: hematoporphyrin, IV: type IV collagen, LP: liposome

(A2, B2)では平均輝度が対照C2に比較して有意 ($p<0.01$)に低下し凝集形成を抑制していた。

考 察

動脈硬化病巣の初期病巣では、光感受性物質HPは傷害された細胞膜や基底膜病変に親和性を示し、進展した病巣でも線維性被膜部位では、HPはコラーゲン線維増生部位との会合は認められない^{1,2)}。そして、本来親水性のHPが脂質の豊富な粥腫に集積する。この時、HPは両親媒性を有する細胞膜構造と結合するという特徴と、HPは血管構成細胞の傷害部位および基底膜破壊との関連が組織化学的に認められるIV型コラーゲンに集積性を示しているという特徴をわれわれは報告してきた^{1,2)}。IV型コラーゲンは生理的条件下では α 鎖やnon collagenous (NC) ドメインに内皮細胞増殖抑制機能や血管新生抑制作用がある⁷⁾。そこで、われわれは組織の改築と関連するIV型コラーゲンの変性に伴うHPの親和性の変化と光の応答性について検討した。基底膜を構成する主要な分子であるIV型コラーゲンの会合様式の変化は、基底膜に接する細胞の代謝に著しく影響する^{8,9)}。IV型コラーゲン成分の α 鎖は $\alpha 1$ から $\alpha 6$ までが知られているが、タンパク質の線維構造が崩壊する過程

などについてはまだ明らかではない⁸⁻¹⁰⁾。さらにIV型コラーゲンとHPの会合と結合については、HPは脂質蓄積病巣の酸性環境下¹¹⁾で選択的に集積し¹²⁾、酸可溶性コラーゲンとHPとの結合親和性があると報告されてきた^{2,13)}。今回われわれの実験では、対照IV型コラーゲンのCD計測の結果により、IV型コラーゲンはpH4の溶液中でHPと会合しても2次構造が保たれていることが明らかになった。また、塩析されたIV型コラーゲンはHPと会合しないことや正常IV型コラーゲンとHPの親和性は低いことも確認された。

HPは正常組織ではその親和性や蓄積性は極めて乏しい。しかし今回のリポソームを添加したモデルではHPとコラーゲンの会合による光応答性がみられた。従って、動脈硬化病巣で観察される基底膜の変性や破壊により、線維構造の要素を担うコラーゲン分子が不安定になり、コラーゲンの網目構造が不均一な会合を示し、この構造とHPの集積が生じる可能性が実験結果から示唆された。われわれは既に膜様の両親媒性構造の乱れにはHPが集積しやすいことを報告してきた^{1,2)}。今回のわれわれの実験結果である酸性条件下では、NaClによるIV型コラーゲンの会合形成体への2時間光照射で分解が促進するなど光応答性が顕著であった。こうし

たことから変性タンパク会合体の会合構造は光照射により凝集が抑制され解離が促進する可能性が示唆された。また、光感受性物質存在下での光照射は変性したIV型コラーゲンのタンパク構造の変化と密接に関連し種々の生物学的活性にも影響することが示唆された。

結 論

HPを用いた光照射により間質病変の診断や治療の可能性が期待される。

文 献

- 1) 町田 稔, 亀山孝二, 浅野伍郎: 光感受性物質Hematoporphyrinによるヒト大動脈硬化病変と蛍光スペクトルの検討. 脈管学, 1997, **37**: 799–807.
- 2) Machida M, Kameyama K, Asano G et al: Fluorescence spectroscopic and histochemical analysis using hematoporphyrin as a microenvironmental probe for atherosclerotic change in the human aorta. Lab Invest, 1999, **79**: 733–745.
- 3) Musser DA, Wagner JM, Datta-Gupta M: The interaction of tumor localizing porphyrins with collagen and elastin. Res Commun Chem Pathol Pharmacol, 1982, **36**: 251–259.
- 4) Ackroyd R, Kelty C, Brown N et al: The history of photo-detection and photodynamic therapy. Photochem Photobiol, 2001, **74**: 656–669.
- 5) Friberg EG, Cunderlikova B, Pettersen EO et al: pH effects on the cellular uptake of four photosensitizing drugs evaluated for use in photodynamic therapy of cancer. Cancer Lett, 2003, **195**: 73–80.
- 6) Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E et al: Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. J Cell Biol, 2001, **154**: 1069–1079.
- 7) Roth JM, Akalu A, Zelmanovich A et al: Recombinant $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ domain inhibits tumor cell-extracellular matrix interactions, induces cellular senescence, and inhibits tumor growth in vivo. Am J Pathol, 2005, **166**: 901–911.
- 8) 安達栄治郎, 水野一乗, 廣瀬志弘 他: IV型コラーゲンの細胞生物学. 細胞, 2001, **33**: 109–113.
- 9) 二宮善文: 基底膜はどのように構築されるか? 生化学, 2001, **73**: 1234–1238.
- 10) Dolz R, Engel J, Kuhn K: Folding of collagen IV. Eur J Biochem, 1988, **178**: 357–366.
- 11) Naghavi M, John R, Naguib S et al: pH Heterogeneity of human and rabbit atherosclerotic plaques; a new insight into detection of vulnerable plaque. Atherosclerosis, 2002, **164**: 27–35.
- 12) Rockson SG, Lorenz DP, Cheong WF et al: Photo-angioplasty: An emerging clinical cardiovascular role for photodynamic therapy. Circulation, 2000, **102**: 591–596.
- 13) el-Far MA, Pimstone NR: The interaction of tumor-localizing porphyrins with collagen, elastin, gelatin, fibrin and fibrinogen. Cell Biochem Funct, 1985, **3**: 115–119.

Hematoporphyrin, a Photosensitivity Agent, Combined with the Denaturation Type IV Collagen — Controlling Angiogenesis and Cell Proliferation by Irradiating very Weak Light

Minoru Machida,¹ Koji Kameyama,² Akio Shimizu,³ Noriyuki Moriyama,¹ and Zenya Naito²

¹Research Center for Cancer Prevention and Screening, National Cancer Center, Tokyo, Japan

²Department of Pathology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

³Department of Engineering, Soka University, Tokyo, Japan

Key words: hematoporphyrin, type IV collagen, atherosclerosis

We studied the photosensitivity of denatured type IV collagen (type IV) using hematoporphyrin (HP), and examined the possibility of controlling the extracellular matrix in arteriosclerosis and angiogenesis. The fluorescence spectra of type IV associated with HP differed according to the pH of solution. Furthermore, type IV showed degeneration in a hydrophobic environment with added liposomes, as well as augmented photosensitivity to HP. These findings suggest that photoirradiation with HP is a viable method to control the extracellular matrix in angiogenesis and atherosclerosis.

(J Jpn Coll Angiol, 2006, **46**: 67–71)

Published online before print March 20, 2006