

学位論文題名

Acute Morphological and Histological Changes of Glioma Cells after 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Therapy

(神経膠腫細胞に対する5アミノレブリン酸を用いた
光線力学療法における急性期反応の評価)

学位論文内容の要旨

【背景・目的】

成人に好発する代表的脳腫瘍である神経膠芽腫(Glioblastoma multiforme)は現在の標準治療である外科治療(広範囲摘出術)、放射線治療、テモゾロマイド(Temozolomide) 化学療法を含む集学的治療を行った場合でも、全生存期間中央値は15か月と極めて短くいまだ予後不良な疾患である。神経膠芽腫の多くは再発形式として初回摘出部近傍に局所再発を生ずることから外科摘出部に対する強力な局所補助治療の開発は予後改善に向けた有用なアプローチである。5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid;5-ALA) はヘム合成経路(heme-biosynthesis pathway)におけるプロトポルフィリンIX(Protoporphyrin IX; PpIX) の前駆体である。ヘム合成経路は最終段階のフェロケラターゼ(ferrochelatase)により律速されるため過剰に外的に5-ALAが導入された場合、細胞内にPpIXの集積が生ずる。これらPpIXの集積は既に多くの研究者により正常組織に比べ神経膠芽腫を含む悪性腫瘍において特異的に生ずることが報告されている。PpIXは400nmを最大吸収波長とする強い蛍光物質であり、この特性は既に臨床領域において光線力学診断(photodynamic diagnosis:以下PDD)として神経膠腫の摘出に広く利用されており、摘出度の向上に効果をあげている。一方、PpIXは光感受性物質として適度の波長及びエネルギーを持つレーザー光により励起された後、基底状態に戻る際に一重項酸素を放出することで細胞障害能力をもあわせ持っている。この細胞障害能により、5-ALAを光感受性物質として用いた光線力学療法(photodynamic therapy:PDT)によって細胞死が誘導されることが報告されている。しかし新規局所補助治療法としての5-ALA用いた光線力学療法(PDT)は細胞障害機序を含めた急性期反応に関しては不明な点が多く、本研究ではいまだ不鮮明な照射急性期における同治療効果を*in vitro*環境において単層培養細胞、スフェロイド培養細胞を用いて検討を行った。

【方法】

(1) 膠芽腫細胞株、スフェロイド作成

C6細胞(ラット神経膠芽腫細胞株)、U251MG細胞(ヒト神経膠芽腫細胞株)を用いて通常条件下で単層培養細胞、スフェロイド培養(小径、大径)を行った。スフェロイド作成に関しては非吸着性プレートであるSUMIRON Celltight Spheroid® 96well plate(Sumitomo Bakelite)を使用した。スフェロイドは初期培養細胞数(1×10^2 , 5×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 cells/100ul of culture medium)の違いにより小径(350um前後)~大径(650um前後)各サイズのスフェロイドを作成した。

(2) 光感受性物質

5-ALA(NACALAI TESQUE)は4°Cで暗所保存し使用1時間前にPBSで希釈し、最終的にメデイ

ウム中(フェノールレッド、FBS含有無し)に100ug/mlになるように調整した。5-ALA共培養時間は各実験ともに4時間に設定した。

(3) レーザー照射機器

レーザー照射器として630-640nmの照射波長域、最大出力750mWを持つアルゴンポンプダイレーザー(Dual laser diode system for research DLD-R², M&M corporation)を本実験に使用した。レーザー光は本体より400umのシリカファイバー内に収束させハンドプローブ(LPS-02, Photon)をファイバーと組み合わせ照射を行った。ファイバーより放出されたレーザーは干渉性パワーメーター(NovaTM, OPHIR)により照射前後で出力の確認を行った。本研究で用いた全レーザー出力は2.5, 25, 50J/cm²、フルエンスレイトはそれぞれ5mW, 50mW, 100mWである。照射時間は500秒で統一した。

(4) PDT後急性期評価

光線力学療法治療群に加えコントロール群として5-ALAの共培養に伴う毒性評価、レーザー照射単独影響による細胞障害の有無の評価のため5-ALA共培養単独群(ALA only group)、レーザー照射単独群(Laser only group)、未治療未共培養群(No drug and no treatment group)を対象として用意。照射後細胞障害程度に対する急性期評価法として各対象群に位相差顕微鏡下での形態評価に加え各種種蛍光染色(Calcein AM, Ethidium homodimer, Annexin V-FITC, Propidium iodide and Hoechst33342)を行い、蛍光顕微鏡下での評価を行った。またスフェロイド培養細胞に対しては照射前、照射終了後から7日間のスフェロイドのサイズ、形態を40倍率の位相差顕微鏡下で観察し、画像はデジタルカメラで取り込みをおこなった後、画像分析ソフトを用いてスフェロイド増殖曲線の計測、形態評価を行った。

【結果】

5-ALA共培養単独群、レーザー照射単独群では単層培養細胞、スフェロイド培養細胞ともに形態変化(細胞長計)を認めない一方($P > 0.05$)、光線力学療法施行群(PDT群)では施行したいずれのエネルギー条件下(2.5, 25, 50J/cm²)でも位相差顕微鏡下で培養細胞の形態変化(細胞腫脹)、スフェロイド計20%前後の増加(膨張)が照射直後から顕著に認められた。同顕微鏡下の評価では、スフェロイド膨張に伴いスフェロイド辺縁部の光透過性が亢進しており、一部には辺縁部を構成する細胞の脱落が確認できた。この膨張反応自は各PDTエネルギー量間での膨脹率には有意な差は認められなかった。またこれらPDTを行ったグリオーマ細胞株単層培養細胞、スフェロイドでは構成細胞においてコントロール群細胞(レーザー単独照射群、5-ALA共培養単独群)に対し特異的所見としてCalcein AM、Hoechst33342陰性、EthD-1、Propidium iodide、Annexin V陽性所見が蛍光顕微鏡下で認められた。一方PDTが行われたスフェロイド群は施行全エネルギー条件においてコントロール群と比較し照射後数日間の成長抑制効果が認められた。しかし結果的に多くのスフェロイド培養細胞群で照射3日目以降には再増大を示した。同スフェロイド培養細胞に行った蛍光染色ではスフェロイド培養細胞外側縁に位置する細胞にのみ Calcein AM 陰性、 EthD-1陽性所見が認められた。

【考察・結語】

位相差、蛍光顕微鏡下での単層培養細胞、スフェロイド培養細胞による細胞障害評価では5-ALAを光感受性物質として使用した光線力学療法では神経膠芽腫細胞に対し選択的に急性期より細胞腫脹を生じてさせており、同治療により細胞膜障害が誘起されたと考えられた。急性期に細胞形態変化を示したことから細胞死形態としてネクロシスを誘起する可能性が示唆されたが、本所見はその後の蛍光染色結果からも、急性期細胞障害の結果としてネクロシスを示唆する結果が得られた。加えてスフェロイド培養細胞に対する光線力学療法ではレーザー照射量(エネルギー量)により照射後急性期の細胞障害度に差異が認められたが、多くのスフェロイド培養細胞はその照射終了後再増大を示しており、構成細胞全体に対する細胞障害効果は今回の条件では不十分だと考えられた。本結果を改善するためには新規光感受性物質の導入、照射時酸素濃度の変更など変更が有用である可能性があるが、一方本研究において*in vitro*環境における実験のためにはPDTにおける重要な標的である血管構造に関する

評価が行えておらず、詳細な細胞障害機序に関してはin vivoの実験を含めた更なる評価が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 田 中 伸 哉

副 査 教 授 石 田 晋

副 査 教 授 寶 金 清 博

学 位 論 文 題 名

Acute Morphological and Histological Changes of Glioma Cells after 5-Aminolevulinic Acid Mediated Photodynamic Therapy

(神経膠腫細胞に対する5アミノレブリン酸を用いた
光線力学療法における急性期反応の評価)

成人に好発する代表的脳腫瘍である神経膠芽腫(Glioblastoma multiforme)は現在の標準治療である外科治療(広範囲摘出術)、放射線治療、テモゾロマイド(Temozolomide) 化学療法を含む集学的治療を行った場合でも、全生存期間中央値は15か月と極めて短くいまだ予後不良な疾患である。神経膠芽腫の多くは再発形式として初回摘出部近傍に局所再発を生ずることから外科摘出部に対する強力な局所補助治療の開発は予後改善に向けた有用なアプローチである。5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid;5-ALA) を光感受性物質として用いた光線力学療法(photodynamic therapy: PDT)によって細胞死が誘導されることが報告されている。しかし新規局所補助治療法としての5-ALA用いた光線力学療法(PDT)は細胞障害機序を含めた急性期反応に関しては不明な点が多く、本研究ではいまだ不鮮明な照射急性期における同治療効果を*in vitro*環境において単層培養細胞、スフェロイド培養細胞を用いて検討を行った。治療対象としてラット神経膠芽腫細胞株、ヒト神経膠芽腫細胞株を用いて単層培養細胞、スフェロイド培養(小径、大径)を使用した。用いた全レーザー出力は2.5, 25, 50J/cm²、フルエンスレートはそれぞれ5mW, 50mW, 100mWであり、照射時間は500秒で統一した。照射後細胞障害程度に対する急性期評価法として各対象群に位相差顕微鏡下での形態評価に加え各種蛍光染色(Calcein AM, Ethidium homodimer, Annexin V-FITC, Propidium iodide and Hoechst33342)を行い、蛍光顕微鏡下での評価を行った。結果として5-ALA共培養単独群、レーザー照射単独群では形態変化(細胞長計)を認めない一方(P>0.05)、光線力学療法施行群(PDT群)では施行したいずれのエネルギー条件下(2.5, 25, 50J/cm²)でも位相差顕微鏡下で培養細胞の形態変化(細胞腫脹)、スフェロイド計20%前後の増加(膨張)が照射直後から顕著に認められた。同顕微鏡下での評価では、スフェロイド膨張に伴いスフェロイド辺縁部の光透過性が亢進しており、一部には辺縁部を構成する細胞の脱落が確認できた。またこれらPDTを行った単層培養細胞、スフェロイドでは構成細胞においてコントロール群細胞(レーザー単独照射群、5-ALA共培養単独群)に対し特異的所見としてCalcein AM、Hoechst33342陰性、EthD-1、Propidium iodide、Annexin V陽性所見が蛍光顕微鏡下で認められた。一方PDTが行われたスフェロイド群は施行全エネルギー条件においてコントロール群と比較し照射後数日間の成長抑制効果が認められた。しかし結果的に多くのスフェロイド培養細胞群で照射3日目以降には再増大を示した。同スフェロイド培養細胞に行った蛍光染色ではスフェロイド

培養細胞外側縁に位置する細胞にのみ Calcein AM 陰性、EthD-1陽性所見が認められた。位相差、蛍光顕微鏡下での単層培養細胞、スフェロイド培養細胞による細胞障害評価では5-ALAを光感受性物質として使用した光線力学療法では神経膠芽腫細胞に対し選択的に急性期より細胞腫脹を生じてさせており、同治療により細胞膜障害が誘起されたと考えられた。急性期における細胞形態変化、蛍光染色結果より細胞死形態としてネクロシスを誘起する可能性が示唆された。スフェロイド培養細胞に対する光線力学療法ではレーザー照射量(エネルギー量)により照射後急性期の細胞障害度に差異が認められたが、多くのスフェロイド培養細胞はその照射終了後再増大を示しており、構成細胞全体に対する細胞障害効果は今回の条件では不十分だと考えられた。本結果を改善するためには新規光感受性物質の導入、照射時酸素濃度の変更など変更が有用である可能性があるが、一方本研究において*in vitro*環境における実験のためはPDTにおける重要な標的である血管構造に関する評価が行えておらず、詳細な細胞障害機序に関しては*in vivo*の実験を含めた更なる評価が必要である。

2011年2月1日 午後4時30分より臨床大講堂において本学位論文に対する審査が行われた。主査、副査より5-ALAの腫瘍選択性の機序、他の光感受性物質と差異、640nm波長の組織深達度、現段階における国内、海外多施設での同分野における動向、周囲正常脳組織に生じる組織障害の可能性、実際の臨床応用を考えた場合の照射方法、*in vivo*の実験を行う場合に新たに検討すべき項目、光線力学療法を行う上で新たに考えられる工夫に関して質問があり、申請者は自己実験データ、過去の文献データを引用し各質問に対し回答した。本論文は北海道医学雑誌(既掲載)及びNeurological Research誌(*in press*)に掲載され、5-ALAを用いた光線力学療法の今後の動物実験を経て、膠芽腫患者への臨床応用が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。