

氏名	藤城 高広
(ふりがな)	(ふじしろ たかひろ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成31年1月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy can target human glioma stem-like cells refractory to antineoplastic agents (5-アミノレブリン酸による光線力学療法は抗腫瘍薬で難治性のヒト神経膠腫幹様細胞を標的とすることができる)
論文審査委員	(主) 教授 荒若 繁樹 教授 朝日 通雄 教授 鳴海 善文

学位論文内容の要旨

《緒言》

神経膠芽腫に対する標準的治療として、開頭手術とそれに続く放射線療法ならびに化学療法が確立されている。しかし、その生存期間中央値は2年に満たず、神経膠芽腫は非常に予後が不良である。これまでの報告において、神経膠腫幹細胞 (Glioma stem cells: GSCs) の存在が示唆され、この細胞がもつ治療抵抗性が再発の原因ではないかと考えられている。5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid: 5-ALA) による光線力学療法 (Photodynamic therapy: PDT) は、5-ALA を投与すると腫瘍細胞内でポルフィリンが生成され、そこに励起光を照射することで活性酸素が生じ、それによって抗腫瘍作用を惹起する治療法である。これまで多くの報告において、ALA-PDT の脳腫瘍細胞に対する感受性

が解析され、治療法としての有効性が示されている。しかし、GSCs に対する解析はほとんどない。本研究では、神経膠腫幹細胞様細胞 (Glioma stem like cells: GSLCs) における ALA-PDT の感受性を解析した。

《方法》

ヒト脳腫瘍細胞株である A172 細胞を血清培地で培養したものをコントロールとした。GSLCs は、A172 細胞を無血清培地で 10 日間培養することによって作成した。幹細胞性は、幹細胞マーカーである CD133、Sox-2 の発現を Fluorescence activated cell sorter (FACS) で測定することにより評価した。抗腫瘍薬に対する感受性は、細胞をシスプラチン、パクリタキセル、テモゾロミド で 24 時間処理し、Water-soluble tetrazolium salt assay (WST assay) を用いて生細胞を計測することで評価した。5-ALA の取り込みは、細胞を 0.3 mM 5-ALA を含んだ血清培地で培養し、細胞内のプロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX: PpIX) レベルを 1 時間ごとに FACS で測定することによって評価した。ポルフィリン生合成に関与する酵素の発現は、qRT-PCR で評価した。ALA-PDT に対する感受性の比較は、2 つの方法で行った。第 1 の方法として、細胞を 5-ALA 0.3 mM を含んだ培地で 4 時間処理し、その後 405nm の laser 光を照射した。1 週間培養を行った後に WST assay で生細胞を評価した。第 2 の方法として、細胞を 5-ALA を含んだ培地で 4 時間処理し、照射量 (0、0.1、0.2、0.5、1.0 J/cm²) を変えて照射した。血清培地で 14 日間培養し Colony forming assay を行い評価した。GSCs が GSLCs と同様の ALA-PDT 感受性を示すか検討するため、3 種類の GSCs (MD13, MD30, 157NS) に PDT を施行した。血清培地で 1 週間培養を行った後に、WST assay を行った。コントロールとして、血清培地で培養した細胞を用いた。

《結果》

A172 細胞を無血清培地で培養すると、sphere が形成された。GSLCs における CD133、Sox-2 の発現は、A172 細胞における発現より高かった。抗腫瘍薬による細胞毒性を比較す

ると、GSLCs は A172 細胞より抵抗性を示していた。PpIX の蛍光輝度は、5-ALA 処理開始後より 3 時間は GSLCs と A172 細胞間で有意な差を認めなかった。その後、GSLCs は A172 細胞より蛍光輝度が有意に上昇していた。また、A172 細胞より GSLCs は、WST assay および Colony forming assay で評価される ALA-PDT に対する感受性が亢進していた。次に、ポルフィリン/ヘム合成酵素および輸送体に関する分子群の mRNA レベルを解析したところ、A172 細胞と比べて GSLC は全ての分子で発現が亢進していた。特に、PEPT2、ALAD、ABCB6 及び PPOX の mRNA レベルは、4 倍以上に上昇していた。MD13、MD30、157NS の 3 種類の GSCs を用いて ALA-PDT に対する感受性を解析したところ、コントロール細胞を比べて全ての GSCs で感受性が亢進していた。

《考察》

脳腫瘍細胞を無血清培地で培養した GSLCs は、sphere を形成し、幹細胞マーカーである CD133、Sox-2 の発現が上昇していた。また、GSLCs はシスプラチン、パクリタキセル、テモゾロミドといった抗腫瘍薬に対して抵抗性を示した。これらは、GSLCs が幹細胞の特性を有することを支持する所見と考えられた。GSLCs における ALA-PDT に対する感受性は、コントロールより高く、GSCs でも同じ傾向を示していた。GSLCs では、ポルフィリン/ヘム合成酵素および輸送体に関して解析した全ての分子で mRNA の発現が上昇し、ALA で処理した際の PpIX の細胞内レベルも GSLCs で上昇していた。これらの所見は、GSLCs ではポルフィリンの生合成が亢進することによって、PpIX の細胞内レベルが上昇し、その結果 ALA-PDT の感受性が亢進することを示唆していた。GSCs においても GSLCs と同様に ALA-PDT の感受性が亢進していたことから、ALA-PDT は従来の治療法に対して抵抗性を示す GSCs に対して有効な治療法となる可能性が示唆された。

《結論》

本研究は、化学療法および放射線療法に抵抗性を示す GSLCs は ALA-PDT に対して高い感受性を有することを明らかにした。神経膠芽腫の再発の原因と考えられる GSCs の増

殖を効果的に抑制する方法としての可能性を提示した。

(様式 乙9)

論文審査結果の要旨

神経膠芽腫は、標準的治療を行っても予後の改善が乏しい。これは、腫瘍に存在する脳腫瘍幹細胞の持つ化学療法や放射線療法に対する抵抗性が原因ではないかと考えられている。神経膠芽腫における 5-アミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid: 5-ALA)を用いた光線力学療法 (PDT) の有用性が報告されている。しかし、神経膠腫幹細胞 (Glioma stem cells: GSCs)の光線力学療法に対する感受性を評価した報告はほとんどない。申請者らは GSCs の ALA-PDT に対する感受性を調べるため、脳腫瘍幹細胞様細胞 (Glioma stem like cells: GSLCs) および GSCs を用いて解析した。

ヒト脳腫瘍細胞株 (A172 細胞) を無血清培地で培養することで GSLCs を作成し、その幹細胞性を確認した。GSLCs はシスプラチン、パクリタキセル、テモゾロミドといった抗腫瘍薬に対して抵抗性を示した。ALA-PDT 処理を行ったところ、GSLCs では ALA-PDT に対する感受性が亢進していた。GSCs においても同様に感受性が亢進していた。GSLCs では、ポルフィリン/ヘム合成酵素および輸送体に関する分子群の mRNA 発現が上昇し、ALA 処理後の細胞内プロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX: PpIX) レベルが上昇していた。これらの所見は、GSLCs ではポルフィリン生合成が亢進し、細胞内の PpIX がより多く蓄積されることで PDT の効果が生じやすい可能性を示唆していた。

ALA-PDT は従来の治療法に抵抗性を示す GSCs に対して高い感受性をもつことが示唆され、神経膠芽腫の新たな治療手段として有用である可能性が考えられた。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 24: 58-68, 2018