

氏 名	大村 直己
(ふりがな)	(おおむら なおき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第13号
学位審査年月日	令和5年1月20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	Ablation efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy on human glioma stem cells (ヒトグリオーマ幹細胞に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法の切除効果)
論文審査委員	(主) 教授 二瓶 圭二 教授 近藤 洋一 教授 高井 真司

## 学位論文内容の要旨

### [背景]

悪性神経膠腫 (High Grade Glioma: HGG) は治療オプションが少なく、予後不良な脳腫瘍である。Cancer Genome Atlas データベースの解析により HGG は4つのサブタイプ (proneural, neural, classic, mesenchymal) に分類され、これらのサブタイプにより患者の全生存率が異なる。特に mesenchymal タイプは proneural タイプに分類される患者よりも有意に予後が悪いと報告されている。

HGG 内においても他の癌と同様に、幹細胞様の特徴を持つ高度な腫瘍形成能を有する population があり、glioma stem cells (GSCs) と呼ばれている。Proneural-GSC (PN-GSCs)

と mesenchymal-GSC (MES-GSCs) の放射線感受性比較では MES-GSCs が高い放射線耐性を示した。

5-Aminolevulinic acid (5-ALA) はヘム合成の基質となる生体アミノ酸の一種である。外科性の ALA は HGG を含む悪性腫瘍に対し選択的に集積することが知られており、蛍光性ポルフィリンである protoporphyrin-IX (PpIX) へと変換される。ALA 由来の PpIX 蛍光は HGG の外科的切除時に腫瘍組織を識別する術中診断薬として使用されている。光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は、細胞内の PpIX が光励起される際に発生する活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) により腫瘍細胞を損傷させる治療であり、ALA をプロドラッグとして用いた PDT (ALA-PDT) は悪性腫瘍の新規治療法として注目されている。

本研究では、MES-GSCs と PN-GSCs の間で ALA-PDT に対する感受性に差があるかどうかを検討し、さらに MES-GSCs の中でも腫瘍再生能の高い細胞に ALA-PDT が有効であるかを検証した。

## [方法]

ヒト MES-GSC である HGG13、30、1123 と、それぞれ分化させた Differentiated glioma cell (DGC) を使用した。また、ヒト Proneural type (PN)-GSC である HGG146、157 も ALA-PDT の感受性比較のために使用した。それぞれの細胞を 0.3mM の ALA を添加した培地で 4 時間培養した。細胞内の PpIX 蓄積と ALA-PDT に対する感受性を *in vitro* で評価した。また ALA-PDT 施行後生き残った細胞を回収し、2 週間経過した HGG13-GSC の幹細胞・間葉系マーカー (CD44, ALDH1A3, KLF4, Nestin) を qRT-PCR で評価した。また、生き残った細胞の CD44 の発現を FACS で naïve な細胞と比較した。

HGG13-GSC で naïve な細胞と生き残った細胞の PpIX 産生能を FACS で比較した。

ヌードマウスの頭蓋内に HGG13-GSC を移植して、生存期間を評価した。HGG13-GSC は移植前に 4 群 (コントロール・ALA のみ投与・ALA を投与せず励起光照射・ALA-PDT) に分けて評価した。

同じ細胞株で naïve な細胞と治療し、生き残った細胞で sphere 形成能とコロニー形成能と PpIX 産生能を評価した。最後に HGG13-GSC の PpIX 産生能とコロニー形成能との相関を調べた。

## [結果]

MES-GSCs の PpIX の産生量は MES-DGCs と比較して有意に高かった。一方、PN-GSCs の PpIX の産生量は PN-DGCs よりも有意に低かった。

ALA 非存在下および ALA 存在下で、細胞の 50% を死滅させるのに必要な励起光量 (LD50) で感受性を評価した。ALA 非存在下では全ての MES-GSCs は対応する MES-DGCs よりも波長が 405nm の青色光に対して、有意に高い抵抗性を示した。ALA 存在下 (ALA-PDT) では 3 種類の MES-GSCs はいずれも各 MES-DGCs よりも有意に感受性が高かった。一方、ALA 非存在下での HGG146-GSC (PN-GSC) の光感受性は、HGG146-DGC と差が無かった。HGG157-GSC (PN-GSC) は HGG157-DGC より高い光感受性を示した。これらの細胞に ALA-PDT を行ったところ、HGG146 では GSC と DGC の間で感度に差を認めず、HGG157 では GSC が DGC より ALA-PDT に対して高い感受性を示した。

MES-GSC である HGG13-GSC に対し ALA-PDT を行い、mesenchymal 幹細胞マーカー (CD44, ALDH1A3, KLF4, nestin) を qRT-PCR で評価した。遺伝子発現レベルはいずれも naïve な細胞よりも生き延びた細胞で有意に低かった。また FACS で細胞表面の CD44 の発現量を評価したところ、naïve な細胞よりも生き延びた細胞で発現陽性の割合が有意に低かった。(それぞれ  $9.0\% \pm 0.7\%$  vs.  $1.7\% \pm 1.3\%$ ,  $p = 0.01$ )

HGG13-GSC で naïve な細胞と ALA-PDT に対し生き残った細胞の PpIX 産生能を FACS で比較した。生き残った細胞は ALA 曝露後 4 時間の PpIX 量が有意に低かった。(ALA 曝露 4 時間後 :  $6528 \pm 1256$  vs.  $3837 \pm 1058$  au,  $p = 0.047$ )

ALA-PDT 後に残存した HGG13-GSCs を頭蓋内に移植したヌードマウスは、コントロール群と比較して有意に長い生存期間を示した (ALA-PDT vs. control:  $29.7 \pm 3.9$  vs.  $13.4$

± 0.9 days,  $p = 1.16 \times 10^{-7}$ )。一方、非 ALA-PDT 群とした 3 群 (コントロール、ALA 負荷のみ、励起光のみ) の生存時間には有意差はなかった。

HGG13-GSC のコロニー形成能と sphere 形成能を naïve な細胞と ALA-PDT 後に生存した細胞で比較した。コロニー形成は( $26.3 \pm 3.2$  vs  $8.7 \pm 2.5$ ,  $p = 0.002$ )であり、sphere 形成は( $14.5 \pm 2.7$  vs  $3.8 \pm 2.9$ ,  $p = 0.00034$ )とそれぞれで ALA-PDT に生き残った細胞で有意に低下していた。

HGG13-GSC を ALA に曝露し、細胞内の PpIX レベルが高い細胞 (PpIX-High) と低い細胞 (PpIX-Low) を FACS で分注した。PpIX-High 群は有意に高いコロニー形成能 ( $30.7 \pm 2.9$  vs  $16.0 \pm 2.7$ ,  $p = 0.003$ ) を示した。それぞれの ALA-PDT に対する治療感受性は ( $0.90 \pm 0.20$  vs.  $3.64 \pm 1.08 \text{ J/cm}^2$ ,  $p = 0.012$ ) と PpIX-High 群で有意に高い感受性を示した。

#### [考察]

細胞内 PpIX 蓄積量は 3 つの MES-GSC においてそれぞれ MES-DGC よりも高く、2 つの PN-GSC ではそれに対応する PN-DGC よりも低いことがわかった。GSC であっても MES と PN との間でポルフィリン代謝に違いがあると考え、合成酵素やトランスポーターの mRNA 発現量を解析したが、解析した細胞株内における細胞内 PpIX 蓄積量の違いを説明するのには不十分であった。

MES-GSC は化学療法や放射線治療に対して大きな抵抗性を示すが、今回検討した 3 つの MES-GSC は対応する MES-DGC よりも ALA-PDT に対し有意に高い感受性を示した。

ALA-PDT 後も生存している MES である HGG13-GSC 細胞において、sphere 形成能およびコロニー形成能に正に相関する CD44、ALDH1A3、KLF4、Nestin の mRNA 発現量が治療していない naïve な細胞よりも有意に低下していた。また、ヌードマウスを用いた頭蓋内腫瘍モデルにおいて、ALA-PDT を行った細胞を頭蓋内に移植したモデルでは、他のコントロール群と比較し生存期間の延長を認めた。この生存期間の延長は生細胞数の減少と、ALA-PDT により生き残った細胞の腫瘍形成能が低下したことによる相加効果であ

る可能性がある。

ALA-PDT 後に生存した HGG13-GSC では、再度 ALA を負荷後に FACS で細胞内の PpIX 蓄積量を測定すると、ALA-PDT 前の naïve な細胞よりも有意に低い値を示した。これは、ALA-PDT がより PpIX 蓄積量が高い細胞に対し有効であった可能性を示した。そこで naïve な細胞を ALA 負荷後に PpIX 蓄積量に応じて FACS を用いて分画した。PpIX 蓄積量が多い細胞は少ない細胞と比較し、コロニー形成能が有意に高いが ALA-PDT に対する感受性も有意に高いことが判明した。以上の事から、幹細胞マーカーが高発現し、腫瘍増殖能が高い MES-GSC は外因性の ALA に曝露されると、細胞内 PpIX をより多く蓄積する傾向があると結論付けた。この結果より、in vitro での neurosphere 培養環境下で維持される GSC spheroid は、表現型が非一様な細胞で構成されており、外因性の ALA によって細胞内に蓄積された PpIX は、より高い幹細胞性を維持する GSC を選択するための有用なバイオマーカーとなる可能性を示した。

#### [結語]

今回 ALA-PDT は PN-GSC と MES-GSC 双方に治療感受性があることを示した。特に、高い増殖能と治療抵抗性を示す MES-GSC に対しても ALA-PDT は感受性を示し、MES-GSC では外因性 ALA 由来の細胞内 PpIX 蓄積量が高いことを反映していると考えた。本研究で得られた結果は HGG 患者に対する ALA-PDT の臨床応用を目指すための有益な基礎資料になると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

悪性神経膠腫 (High Grade Glioma: HGG) は治療オプションが少なく、予後不良な脳腫瘍である。HGG は4つのサブタイプ (proneural, neural, classic, mesenchymal) に分類され、特に mesenchymal タイプは proneural タイプよりも有意に予後が悪いと報告されている。

5-Aminolevulinic acid (5-ALA) はヘム合成の基質となる生体アミノ酸の一種である。外因性の ALA は HGG を含む悪性腫瘍に対し選択的に集積することが知られており、蛍光性ポルフィリンである protoporphyrin-IX (PpIX) へと変換される。光線力学療法 (Photodynamic Therapy: PDT) は、細胞内の PpIX が光励起される際に発生する活性酸素 (Reactive Oxygen Species: ROS) により腫瘍細胞を損傷させる治療であり、ALA をプロドラッグとして用いた PDT (ALA-PDT) は悪性腫瘍の新規治療法として注目されている。

本研究の目的は、MES-GSCs と PN-GSCs の間で ALA-PDT に対する感受性に差があるかどうかを検討することと、MES-GSCs の中でも腫瘍再生能の高い細胞に ALA-PDT が有効であるかを検証した。

細胞内 PpIX 蓄積量は3つの MES-GSC においてそれぞれ MES-DGC よりも高く、2つの PN-GSC ではそれに対応する PN-DGC よりも低いことがわかった。

MES-GSC は化学療法や放射線治療に対して大きな抵抗性を示すが、今回検討した3つの MES-GSC は対応する MES-DGC よりも ALA-PDT に対し有意に高い感受性を示した。

ALA-PDT 後も生存している MES である HGG13-GSC 細胞において、sphere 形成能コロニー形成能に相関する幹細胞マーカーが治療していない naïve な細胞よりも有意に低下していた。また、ヌードマウスを用いた頭蓋内腫瘍モデルにおいて、ALA-PDT を行った細胞を頭蓋内に移植したモデルでは、生存期間の延長を認めた。この生存期間の延長は生細胞数の減少と、ALA-PDT により生き残った細胞の腫瘍形成能が低下したことによる相加効果である可能性がある。

ALA-PDT 後に生存した HGG13-GSC では、細胞内の PpIX 蓄積量が低下し、ALA-PDT がより PpIX 蓄積量が高い細胞に対し有効であった可能性を示した。PpIX 蓄積量に応じて

FACS を用いて分画すると、PpIX蓄積量が多い細胞は少ない細胞と比較し、コロニー形成能が有意に高いが ALA-PDT に対する感受性も有意に高いことが判明した。以上の事から、幹細胞マーカーが高発現し、腫瘍増殖能が高い MES-GSC は外因性の ALA に曝露されると、細胞内 PpIXをより多く蓄積する傾向があると結論付けた。

今回 ALA-PDT は PN-GSC と MES-GSC 双方に治療感受性があることを示した。特に、高い増殖能と治療抵抗性を示す MES-GSC に対しても ALA-PDT は感受性を示し、MES-GSC では外因性 ALA 由来の細胞内 PpIX蓄積量が高いことが反映していると考えた。本研究で得られたデータは HGG 患者に対する ALA-PDT の臨床応用を目指すためにも有力な結果となった。

以上により、本論文は本学大学院学則第 14 条第 1 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, 2022/11/4