

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
井上 洋人	主査 教授 黒 岩 敏 彦 副査 教授 大 槻 勝 紀 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 芝 山 雄 老 副査 教授 檜 林 勇
主論文題名 Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法におけるヒトグリオーマ細胞のミトコンドリア経路を介したアポトーシス)	
学位論文内容の要旨	
<p>(緒言)</p> <p>悪性グリオーマに対しては手術、放射線治療、化学療法等の集学的な治療が行なわれているが、未だ治療成績の向上には至っておらず、新たな局所治療の方法が必要とされている。光線力学療法(PDT)は有望な局所治療法のひとつで、腫瘍組織に選択的に光感受性物質を蓄積させた後、特定の波長の可視光を照射するものである。光によって活性化された光感受性物質が活性酸素を誘導し、これが細胞を傷害して死に至らせる。グリオーマ患者の術後の局所補助療法としていくつかの報告がなされている。</p> <p>光感受性物質のひとつであるプロトポルフィリン IX (PpIX)は、ミトコンドリア内で 5-アミノレブリン酸(5-ALA)より合成される内因性の物質である。5-ALA もまた、生体内で生合成されるが、5-ALA を外部から過剰投与することにより、悪性腫瘍に選択的に PpIX が蓄積することが知られている。この特性を利用して、5-ALA を PDT に応用することが可能である。既に、皮膚や消化器の悪性腫瘍の治療においては、有望な結果が報告されている。グリオーマにおいても高い選択性をもって腫瘍に蓄積することが知られており、術後の残存腫瘍細胞を選択的に傷害することが可能である。</p> <p>PDT の細胞傷害の機序としては、アポトーシスやネクローシスが関与することが知られているが、5-ALA を用いた PDT (ALA-PDT)におけるグリオーマ細胞の細胞死のメカニズムは十分には解明されていない。そこで我々は、5-ALA により誘導される PpIX の細胞内蓄積、および ALA-PDT による細胞死の詳細な経路をヒトグリオーマ細胞の細胞株を用い、<i>in vitro</i> で検討した。</p> <p>(対象および方法)</p> <p>1) 5-ALA 存在下で培養したグリオーマ細胞内での PpIX 蓄積の検討</p> <p>ヒトグリオーマ細胞の細胞株 (U251MG、U87MG および U118MG)を 1 mM (以下全ての実験で同濃度を使用)の 5-ALA を含む培養液内で 8 時間培養し以下の実験に用いた。細胞内における PpIX 蓄積量を PpIX の蛍光強度より培養開始から 1 時間毎に測定した。具体的には、フローサイトメーターを用いて、アルゴンイオンレーザー線 (488 nm)で細胞内 PpIX を励起し、その蛍光 (635 nm)の強度を 600 nm のロングパスフィルターを通して測定した。</p> <p>2) フローサイトメーターを用いた光毒性の評価</p> <p>U251MG 細胞を 5-ALA 含有培養液内で 4 時間培養した後、励起光 (約 405 nm、約 1 mW/cm²)をそ</p>	

れぞれ 0.1、0.2、0.5 および 1.0 J/cm² 照射した。照射後直ちに 5-ALA を含まない培養液に入れ替え、24 時間の培養後、フローサイトメーターの scattergram による細胞形態の解析から細胞傷害の評価を行った。

3) TUNEL 染色

U251MG 細胞を 5-ALA 含有培養液内で 4 時間培養した後、0.1、0.2、0.3 および 0.4 J/cm² の励起光を照射し、光照射 24 時間後に TUNEL 法によるアポトーシスの評価を行った。フローサイトメトリック用のアポトーシス検出キットを用いてフローサイトメーターにて分析した。また、*in situ* アポトーシス検出キットを用いて顕微鏡観察も行なった。

4) Caspase 活性

PDT (0.2 J/cm²) 24 時間後の U251MG 細胞にて蛍光プロテアーゼ評価キットを用い、caspase-3、-8 および -9 の活性を測定した。細胞を溶解して蛋白を抽出し、各試料の蛋白濃度を 25 µg/µl に調整し、蛋白溶液を 7-amino-4-trifluoromethyl coumarin (AFC) を含む緩衝液と反応させた。この AFC には caspase-3、-8 および -9 のそれぞれに対する基質が接合されており、蛍光光度計を用いて AFC の蛍光強度から caspase 活性を測定した。(各群 n=5)

5) ミトコンドリア膜電位 (MMP)

ミトコンドリアの透過性変化によって cytochrome *c* が細胞質へ放出され、ミトコンドリア経路を介したアポトーシスが誘導される。この過程は膜電位の変化として測定される。MMP の減少はカチオン型蛍光色素、5, 5', 6, 6' -tetrachloro-1, 1', 3, 3' -tetraethylbenzamidozolocarbocyanine iodide (Mit-E-Ψ mitochondrial permeability detection kit) を用いて測定した。この蛍光色素は容易に細胞内に浸透し、負に帯電した健全なミトコンドリア内へと集積し、赤色の蛍光を発する。一方、膜電位が破綻していると、色素はミトコンドリア内に蓄積できず、細胞外へと分布、色素は緑色の蛍光を発する単量体を形成し、結果として赤色の蛍光強度が減少する。PDT (0.2 J/cm²) 20 時間後の U251MG 細胞で、細胞の MMP 変化を赤色の蛍光強度から分析した。(各群 n=4)

6) ミトコンドリアからの cytochrome *c* 放出

PDT (0.2 J/cm²) 20 時間後の U251MG 細胞に Mitochondria/cytosol fractionation kit を用い、細胞の細胞質分画と濃縮されたミトコンドリア分画を分離した。Cytochrome *c* ELISA kit を用い、細胞質分画における cytochrome *c* の定量的評価を行なった。(各群 n=5)

統計学的解析には Mann-Whitney U test を用い、P 値 0.05 以下を有意とした。

(結果)

1) 5-ALA 存在下で培養したグリオーマ細胞内での PpIX 蓄積

フローサイトメーターを用い、PpIX の蛍光強度を測定した。PpIX の蛍光は実験に用いた 3 種類のグリオーマ細胞全てにおいて観察され、蛍光強度は 5-ALA 投与後約 4 時間でプラトーに達した。ピーク時の PpIX 蓄積は U118MG 細胞で最も高く、U251MG 細胞の約 2.5 倍、U87MG 細胞の約 4 倍であった。

2) 光毒性

PDT を加えた 24 時間後の U251MG 細胞において、フローサイトメーターの scattergram による細胞傷害の評価を行った。5-ALA を取り込ませた後に光を照射した細胞、すなわち PDT を加えた細胞では照射量の増加に伴い、細胞死の増加を認めた。一方、5-ALA を取り込ませただけの細胞、および光 (1.0 J/cm²) を照射しただけの細胞では細胞死は認めなかった。

3) TUNEL 染色

フローサイトメーターにおける評価では、PDT の光の照射量増加に伴い、TUNEL 陽性細胞の数は増加した。

また、PDT (0.2 J/cm^2) 24 時間後の U251MG 細胞を TUNEL 染色した顕微鏡写真では多数のアポトーシス細胞を認めた。

4) Caspase 活性

PDT 後の U251MG 細胞で caspase-3 および-9 の有意な活性上昇を認めた。(p<0.01) これに対し、caspase-8 の活性上昇は有意ではなかった。この結果は ALA-PDT で誘導される U251MG 細胞のアポトーシスには主にミトコンドリア経路が関与していることを示唆する。

5) ミトコンドリア膜電位

コントロール U251MG 細胞ではミトコンドリア内のカチオン型蛍光色素が発する赤色の蛍光を認めたが、PDT 後の U251MG 細胞ではこの赤色の蛍光は認めなかった。この現象は PDT 後の細胞における MMP の低下を示している。PDT 後の細胞では有意な MMP の低下を認めた。(p<0.05) この結果は、ALA-PDT において、細胞質への cytochrome *c* の放出を誘導するミトコンドリアの透過性変化が起こっていることを示している。

6) ミトコンドリアからの cytochrome *c* 放出

コントロール U251MG 細胞と比較し、PDT 後の U251MG 細胞の細胞質分画では cytochrome *c* の著明な増加を認めた。(p<0.01) 細胞質分画の cytochrome *c* 増加はミトコンドリアから細胞質への cytochrome *c* の放出を示し、この cytochrome *c* 放出はミトコンドリア経路を介したアポトーシスのトリガーとなるものである。

(考察)

ALA-PDT はグリオーマ患者における局所補助療法のひとつとして期待されている。今回の実験では ALA-PDT での光の照射量の増加に伴い、細胞死の増加を認め、 1.0 J/cm^2 の照射ではほぼ全ての細胞が死に至った。この結果は *in vitro* における ALA-PDT のグリオーマ細胞に対する強い殺傷能力を示している。PpIX は 410 nm 付近に吸収スペクトルの最大のピークをもち、500 nm から 650 nm の間にも 4 つの吸収スペクトルのピークをもっている。今回用いた約 405 nm の光は吸収スペクトルの最大ピーク付近のもので、最も有効な殺傷効果が期待できる。しかし *in vivo* においては病変における光の深達距離が問題となるため、更に長い波長(635 nm)の光との併用が必要となるかもしれない。

今回の実験では PDT の光の照射量増加に伴い、TUNEL 陽性細胞の増加を認めた。これは ALA-PDT による U251MG 細胞の細胞死が主にアポトーシスであることを示している。アポトーシスでは一般に death receptor/ligand を介する経路とミトコンドリアを介する経路の2つが主要な役割を果たしている。ALA-PDT 後の U251MG 細胞において有意な caspase-3 および-9 の活性上昇を認め、更に MMP の低下、および細胞質分画での cytochrome *c* の著明な増加を認めた。これらの事実より MMP の機能障害によりミトコンドリアの cytochrome *c* が放出され、これがミトコンドリア経路によるアポトーシスを誘導していると考えられる。多くの悪性グリオーマが、化学療法や放射線治療に抵抗性である一因として、アポトーシスに対する抵抗性が示唆されている。今回、p53 の突然変異を持つ U251MG 細胞において、ALA-PDT がミトコンドリア経路のアポトーシスを誘導することを確認した。この知見は、ALA-PDT が、p53 の状態にかかわらず直接ミトコンドリア経路を活性化し、強力にアポトーシスを誘導することを示している。これらの事実は、ALA-PDT がアポトーシスに抵抗性の腫瘍に対しても適応可能であることを示しており、ALA-PDT は悪性グリオーマに有効な治療となり得る可能性がある。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	井上 洋人
論文審査担当者		主 査 教授 黒 岩 敏 彦 副 査 教授 大 槻 勝 紀 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 芝 山 雄 老 副 査 教授 檜 林 勇	
主論文題名 Massive apoptotic cell death of human glioma cells via a mitochondrial pathway following 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法におけるヒトグリオーマ細胞のミトコンドリア経路を介したアポトーシス)			
論文審査結果の要旨			
<p>5-アミノレブリン酸 (5-ALA)はヘムの前駆物質として本来生体内に存在し、ミトコンドリア内で代謝され光感受性物質であるプロトポルフィリン IX (PpIX)へと合成される。外因性の 5-ALA の投与により PpIX は脳腫瘍に高い選択性をもって蓄積することが知られている。5-ALA を用いた光線力学療法 (PDT) (ALA-PDT)はグリオーマ摘出後の残存腫瘍細胞に対する局所補助療法の一つとして期待されている。申請者は ALA-PDT によるヒトグリオーマ細胞の詳細な細胞死の経路を <i>in vitro</i> で検討した。</p> <p>ヒトグリオーマ細胞の細胞株 (U251MG、U87MG および U118MG)を用いて 5-ALA により誘導される PpIX の細胞内蓄積を測定後、光の照射量と PDT の効果を検証し、<i>in vitro</i>での強い殺傷能力を確認した。U251MG 細胞を用い、TUNEL 法によって ALA-PDT で誘導される細胞死が主にアポトーシスであることを証明した。更に ALA-PDT 後の細胞で caspase-3 および-9 の活性が有意に上昇していることを示し、アポトーシスの機序としてミトコンドリア経路の関与を予測した。そこで ALA-PDT 後に細胞のミトコンドリア膜電位 (MMP)が有意に低下していることを確認し、更に細胞質分画での cytochrome <i>c</i> の著明な増加を明らかにした。これらの事実よりミトコンドリアの cytochrome <i>c</i> 放出が ALA-PDT 後ヒトグリオーマ細胞のアポトーシスを誘導していることを証明した。</p> <p>今回申請者は p53 の突然変異を持つ U251MG 細胞において ALA-PDT がミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することを証明した。この事実は p53 の状態にかかわらず、ALA-PDT が直接ミトコンドリア経路を活性化させ、強力にアポトーシスを誘導することを示し、アポトーシスに抵抗性をもつ悪性グリオーマに対しても適応可能であることを示している。</p> <p>よって、5-ALA を用いた ALA-PDT が悪性グリオーマに対する有望な局所補助療法の一つと成り得ることを証明し、難治性脳腫瘍の臨床治療応用への可能性を示唆した。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第 9 条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。</p> <p>(主論文公表誌) Journal of Neuro-Oncology (in press)</p>			