

氏 名	高 橋 賢 吉
(ふりがな)	(たかはし けんきち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 24 年 1 月 13 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題名	Enhanced Expression of Coproporphyrinogen Oxidase in Malignant Brain Tumors: CPOX Expression and 5-ALA-induced Fluorescence (悪性脳腫瘍におけるコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ発現量と 5-ALA による脳腫瘍の蛍光強度に関する検討)
論文審査委員	(主) 教授 林 秀 行 教授 鳴 海 善 文 教授 猪 俣 泰 典 教授 辻 求

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《諸 言》

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は体外から過剰に投与することにより悪性腫瘍細胞内に選択的に蓄積し、ポルフィリンヘム生合成及び代謝酵素により光感受性物質のひとつであるプロトポルフィリン IX (PpIX) が合成される。

PpIX は光感受性物質であり紫外光により励起されて蛍光を発するため、その性質を利用して、正常脳との境界が不明瞭である悪性神経膠腫において術中の腫瘍の同定に利用されており、これにより腫瘍摘出率や無増悪生存期間が有意に上昇することが証明されている。5-ALA による腫瘍の蛍光強度に関して、血液脳関門の破綻・細胞密度・細胞増殖能・血管密度が蛍光強度と相関することが報告されているが、4 因子が存在するにも関わらず全く

蛍光を呈さない症例が存在するため、4 因子以外の機序の関与が疑われる。そこで我々は 5-ALA の細胞内への取込み、PpIX の細胞外への排出に関与するトランスポーターや、PpIX 代謝酵素の発現の差異が腫瘍の蛍光強度に関与するのではないかと考え、摘出した脳腫瘍サンプルにおけるそれらのタンパク質を発現する mRNA の量を定量 PCR 法を用いて測定した。サンプル間での遺伝子発現プロファイリングの差異を比較検討し、脳腫瘍の蛍光強度に影響する因子に関して考察した。

《対象および方法》

手術開始の 3 時間前に 5-ALA を経口投与し、術中に腫瘍を露出させた後、励起光を内蔵した手術顕微鏡にて腫瘍を観察した。腫瘍の蛍光強度の判定は、周囲と比較して明らかに強い赤色の蛍光を発するものを Strong fluorescence (Strong) , まったく蛍光のないものを No fluorescence (None) と定義し分類した。

定量 PCR による mRNA 量の定量に関しては、まず脳腫瘍サンプルより total RNA を抽出し、それを鋳型にした逆転写反応により cDNA を合成した。その cDNA サンプルを用いて、定量 PCR 法によりポルフィリンの生合成及び代謝に関与するトランスポーターや酵素の 15 種類の遺伝子 (oligopeptide transporters1/2:PEPT1/2, 5-aminolevulinate synthases1/2:ALAS1/2, 5-aminolevulinate dehydratase:ALAD, hydroxymethylbilane synthase:HMBS, uroporphyrinogen III synthase:UROS, uroporphyrinogen decarboxylase:UROD, ABC transporters-B6/G2:ABCB6/G2 coproporphyrinogen oxidase :CPOX, protoporphyrinogen oxidase:PPOX, ferrochelatase:FECH, hypoxia inducible factor-1 alpha subunit:HIF-1 alpha, heme oxygenase 1:HO-1) の mRNA 発現量を定量した。定量したすべての遺伝子発現量に関して、Strong 群と None 群間にて統計学的に比較検討した。

《結 果》

19 名の患者より、None を 10 サンプル、Strong を 10 サンプル、計 20 サンプルを採取

し解析した。None 群中、3 例は神経膠芽腫、7 例は転移性脳腫瘍であった。Strong 群中、7 例が神経膠芽腫、3 例が転移性脳腫瘍であった。定量 PCR 法により前述の計 15 種類の遺伝子の mRNA 発現量を定量し、None 群と Strong 群の 2 群間で比較した結果、CPOX のみが統計学的有意差をもって Strong 群にて約 3 倍高いという結果が得られた ($p = 0.0003$)。また我々は CPOX の発現をタンパク質レベルにて調べるために、病理切片の CPOX 免疫染色を行い顕微鏡強拡大視野における CPOX 陽性細胞の割合 (%) を評価したところ、None 群では平均 $19 \pm 15.8\%$ 、Strong 群では平均 $91.2 \pm 11.5\%$ であり、タンパク質レベルにおいても None 群と比較し Strong 群では CPOX の発現量が有意に高かった。以上より、CPOX の発現量は 5-ALA による腫瘍の蛍光強度と正の相関があると考えられた。

《考 察》

CPOX の mRNA 及びタンパクの発現量は 5-ALA による蛍光の強度に関わる重要な分子メカニズムの一因である可能性が示唆された。CPOX はミトコンドリア内で coproporphyrinogen III を protoporphyrinogen に酸化する酵素であるが、その発現の制御に関わるメカニズムは不明であり今後の研究課題であると考えている。

CPOX の発現制御のメカニズムを解明し CPOX の発現を誘導することが可能となれば、悪性脳腫瘍に対する光線力学的診断の効果を促進できる可能性がある。

(様式甲 6)

論文審査結果の要旨

悪性脳腫瘍に対する 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いた光線力学的診断は腫瘍の摘出率を向上し生存期間を延長することが証明されており、術中の補助診断技術として普及している。しかしながら症例毎に蛍光強度は異なり、術中蛍光が確認できず十分な診断効果が得られない症例も存在することは克服すべき課題である。腫瘍の蛍光強度に影響する因子として、血液脳関門の破綻・細胞密度・細胞増殖能・血管密度が報告されているが、それらの因子が存在するにも関わらず全く蛍光を呈さない症例が存在するためこれら 4 因子以外の機序の関与が疑われる。

申請者は新たな因子として 5-ALA の細胞内への取込みや光感受性物質であるプロトポルフィリン IX の合成、代謝及び排出に関与するトランスポーターの発現の差異が腫瘍の蛍光強度に影響するという仮説を立て、臨床脳腫瘍サンプルを用いてそれらの mRNA 量を定量し検証している。mRNA 量は定量 PCR 法を用いて測定し、それぞれの遺伝子発現量に関して蛍光の極めて強い(Strong) 群と蛍光の全くない(None)群間にて統計学的に比較を行った結果、coproporphyrinogen oxidase (CPOX) のみが Strong 群にて有意差をもって高く、さらに CPOX の免疫染色を用いた病理学的検証においても Strong 群で発現レベルが高いという結果を得ている。以上より、CPOX 発現量は腫瘍の蛍光強度と正の相関があり CPOX は蛍光強度に関わる重要な分子メカニズムの一因である可能性が示唆された。今後 CPOX の発現制御のメカニズムを解明し CPOX の発現を誘導することが可能となれば悪性脳腫瘍に対する光線力学的診断の効果を促進できる可能性があることから、本知見は臨床医学への貢献が期待できると考えられる。

以上により本論文は本学大学院学則第 11 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。

(主論文公表誌)

Neuro-Oncology 13(11): 1234-1243, 2011