

氏 名	孫 偉
(ふりがな)	(すん うえい)
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25年1月12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	Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells (Gefitinibによる悪性脳腫瘍細胞における5アミノレブリン酸光線力学療法の増強効果)
論文審査委員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 鳴 海 善 文 教授 森 脇 真 一

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は、ポルフィリン合成経路の鍵となるアミノ酸類似物質である。5-ALAを患者に投与すると、腫瘍細胞内で特異的にプロトポルフィリンIX (PpIX) に変換されて蓄積される。この状態で外部から励起光を照射するとPpIXから蛍光や活性酸素種が発生する。この現象を利用した術中蛍光診断 (photodynamic diagnosis ; PD) や光線力学療法 (photodynamic therapy ; PDT) がすでに臨床応用され始めている。一方、PpIX自体にも弱い毒性があることから、生理的に細胞内で生じた余剰なPpIXは速やかにABCG2トランスポーターにより細胞外に排出されることが知られている。すなわち、ABCG2は、PpIXの生理的な細胞外排出機能を担っている。従って、5-ALA PDTにおいても生成される大量のPpIXはABCG2により細胞外に排出されることが予想され、ABCG2発

現の多寡がPDTの効果に影響している可能性がある。本研究の目的は、5-ALA投与時の腫瘍細胞における細胞外へのPpIX排出を明らかにし、ABCG2発現の多寡やその制御が細胞内PpIX量やPDT効果に及ぼす影響を調べることである。そこで、ABCG2の選択的な阻害剤であるgefitinibを用い、5-ALAによる細胞内PpIX蓄積、PpIX細胞外排出およびPDT効果に対する影響について種々のヒト脳腫瘍細胞株を用いて検討した。

《方 法》

1) 細胞内PpIX量およびPpIX細胞外排出の検討

ヒトグリオーマ細胞株(U87MG、U118MG、A172、T98G)および悪性髄膜腫細胞株(IOMM-Lee)を用いた。これら細胞株を1mMの5-ALA環境下に6時間培養し、細胞毎のPpIX蛍光量をFACSにて、細胞内外のPpIX量の比を、蛍光マイクロプレートリーダーを用いて測定した。

2) Gefitinib の細胞内外のPpIX量に及ぼす影響の評価

すべての細胞株において種々の gefitinib 濃度(0、0.01、0.1、1、10 μ M)で48時間培養した後、1mMの5-ALAにて6時間培養し、細胞内外のPpIX量について蛍光マイクロプレートリーダーを用いて評価した。

3) Gefitinib のABCG2の細胞膜上の蛋白およびmRNA発現に及ぼす影響の評価

0.1 μ Mのgefitinibで48時間培養した後に、ABCG2抗体を用いたFACSおよびRT-PCRにより調べた。

4) Gefitinibの5-ALA PDT効果への影響の評価

種々のgefitinib (0 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M) 濃度で48時間培養した後に、1mMの5-ALAにて6時間培養した。その後、405 nmのレーザー光を照射 (0、0.6、1.8、3 J/cm²) し、11から14日後にcolony formation assayにてPDT効果を評価した。

《結 果》

1) 細胞内PpIX量およびPpIX細胞外排出

細胞内PpIX蛍光および細胞内外のPpIX比は、各腫瘍細胞株において異っていた。IOMM-Leeが最も細胞内のPpIX量が低く、細胞外のPpIXの割合が最も高いことから、IOMM-Leeが活発に細胞内のPpIXを細胞外に排出していると考えられた。

2) Gefitinib の細胞内外PpIX量に及ぼす影響

Gefitinib投与により、すべての細胞株において細胞内のPpIX量は用量依存的に増加し、細胞外のPpIX量は用量依存的に減少した。

3) Gefitinib のABCG2の細胞膜上の蛋白発現およびmRNA発現に及ぼす影響

ABCG2蛋白の細胞膜上での発現は、IOMM-Lee細胞株において最も多かった。Gefitinibは、すべての細胞株において細胞膜上での蛋白発現を減少させた。この効果は、U118MG, U87MGおよびIOMM-Lee細胞株において顕著であった。また、gefitinibは、ABCG2のmRNAの発現も有意に低下させていた。

4) Gefitinibの5-ALA PDT効果への影響

低用量のgefitinib投与（0.1 μ M）により5-ALAを用いたPDT効果をすべての悪性脳腫瘍細胞株において増強した。特に、PDT感受性の低かったIOMM-Lee細胞株において増強効果は顕著であった。ABCG2の細胞膜上での発現量が多いほど、PDT効果は低い傾向が見られた。

《考 察》

本研究において、5-ALA 投与後に腫瘍細胞において生成された PpIX は活発に細胞外に排出されていることが明らかとなった。この現象は、5-ALA PDT においては ABCG2 を介した PpIX の細胞外排出が治療効果に影響しうることを示すものである。実際に、ABCG2 選択的阻害剤である gefitinib は、10 μ M に至るまで用量依存的に細胞内 PpIX 濃度の増加し、5-ALA の PDT 作用を用量依存的に増強した。特に、ABCG2 の発現レベルの高く PDT 効果が低い腫瘍細胞ほど gefitinib による PDT 増強効果が高く、このことは臨床的にも意義深いものである。すなわち、ABCG2 は腫瘍幹細胞において高発現であり腫瘍の治療抵抗性に関連していることから、gefitinib の PDT 増強効果は治療抵抗性を克服する可能性

を示唆する。一方、gefitinib が ABCG2 を阻害する機序としては、細胞膜上の ABCG2 蛋白レベルを低下および ABCG2 の mRNA の発現の抑制の関与が示された。

論文審査結果の要旨

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、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)は悪性脳腫瘍摘出後の摘出腔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。一方、PpIXは、腫瘍幹細胞に高発現していることで知られている ABCG2 トランスポーターにより能動的に細胞外に排出されることから、ABCG2 発現の多寡やその制御が細胞内 PpIX や PDT 効果に及ぼす可能性がある。申請者は、5-ALA 投与時の腫瘍細胞における細胞外への PpIX 排出について精査し、ABCG2 の選択的な阻害剤である gefitinib による ABCG2 の制御が細胞内 PpIX や PDT 効果に及ぼす影響について5種類の脳腫瘍細胞株を用いて検討した。

ヒトグリオーマ細胞株(U87MG、U118MG、A172、T98G)および悪性髄膜腫細胞株(IOMM-Lee)を用い、5-ALA投与後に腫瘍細胞において生成されたPpIXは活発に細胞外に排出されていることを明らかにした。更に、ABCG2 選択的阻害剤である gefitinib は、10 μ Mに至るまで用量依存的に細胞内PpIX濃度を増加させ、細胞外PpIX濃度を低下させ、その結果として、gefitinibが5-ALAのPDT作用を用量依存的に増強することを確認した。特に、ABCG2の発現レベルの高い腫瘍細胞ほどPDT効果が低く、gefitinibによるPDT増強効果が高いことを明確に示した。すなわち、ABCG2は腫瘍幹細胞において高発現であり腫瘍の治療抵抗性に関連していることから、gefitinibのPDT増強効果は治療抵抗性を克服する可能性を示している。一方、gefitinibのABCG2阻害効果の機序としては、細胞膜上のABCG2蛋白レベルを低下のみならずABCG2のmRNAの発現の抑制が関与していることも証明した。

今回申請者は、脳腫瘍細胞株において5-ALA投与によって生成したPpIXは、細胞外に排出されることを証明した。また、PpIXを細胞外に排出するABCG2トランスポーターの選択的な阻害剤である gefitinib が、PpIXの細胞外への排出を阻害し、細胞内のPpIX濃度を上昇させ、その結果としてPDT効果を増強することを証明した。ABCG2は、腫瘍幹

細胞に高発現しており、腫瘍の治療抵抗因子としても知られている。本研究は、ABCG2の制御により PDT の治療抵抗性が克服可能であることを示すものである。

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)

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 10(1): 42-50, 2013