

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 遠藤 将吾

学 位 論 文 題 名

Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro
(悪性神経膠腫細胞株に対するポルフィリン誘導体を用いた音響力学療法)

【背景と目的】

神経膠腫は本邦の原発性脳腫瘍の約19.5 %を占め、取り分け悪性神経膠腫の代表である膠芽腫は手術摘出と放射線照射、化学療法を組み合わせるが、その2年生存率はわずか33.9 %と全癌種の中で最も予後不良である。また正常脳への浸潤のため腫瘍の全摘出を断念せざるを得ない場合が多く、標準治療後もその90 %が原発巣の2cm以内に局所再発することからも局所再発を如何に予防するかが本疾患制御の最大の課題と言える。

ここで、術後の後療法としてまず我々が着目したのが光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) である。これは外的に光感受性物質を取り込ませた標的腫瘍細胞に対して低エネルギーのレーザー光を照射することで光感受性物質が励起して、活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) を発生することで標的腫瘍細胞に酸化的損傷を引き起こしてアポトーシスを誘導するといった治療方法である。本邦では2013年9月に原発性悪性脳腫瘍に対して光感受性物質であるレザフィリン® (Talaporfin sodium: TS) と半導体レーザーの組み合わせによるPDTが保険承認された。

悪性腫瘍細胞では正常細胞に比べて内因性の光感受性物質であるプロトポルフィンIX (protoporphyrin IX: PpIX) の代謝活性が低下していることから、外的にPpIXの前駆物質（後述）を投与することで腫瘍細胞内に正常細胞と比較してより多くのPpIXが蓄積される。このためPDTは腫瘍選択性が高く周囲正常組織への影響が少ない利点がある一方、レーザー光は組織深達度が低いため皮膚癌や膀胱癌などの表在性の腫瘍では有効であるのに対して脳腫瘍では開頭後に残存腫瘍を視認し、これに直接レーザー光を照射するといった比較的侵襲が高い実施方法に局限されている。

そこで、その欠点を補うべく注目されているのが音響力学療法 (sonodynamic therapy: SDT) である。前述のTSやPpIXを含むポルフィリン誘導体はレーザー光と同様、超音波照射によっても励起してROSを発生することは既に知られており、レーザー光に比して超音波は圧倒的に組織深達度に優れていることから、SDTでは深部の腫瘍に対して腫瘍選択的に効率的な治療が理論上は可能である。

音響感受性物質として天然のアミノ酸の一つでヘムの前駆物質であるアミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid hydrochloride: ALA) に着目した。ALA自体に音響感受性物質としての作用はないが、その経口投与後に腫瘍細胞のミトコンドリアに取り込まれて代謝されることで音響感受性を有するPpIXが生成される。腫瘍細胞に蓄積したPpIXはある一定波長のレーザー光を照射することで赤色蛍光を発することから、ALAは悪性神経膠腫に対する術中蛍光診断薬として既に広く臨床応用されており、その安全性は立証されている。

既にALAやPpIX、TSを用いたSDT (それぞれALA-SDT, PpIX-SDT, TS-SDT) は多癌腫において有望な報告が散見される一方、神経膠腫においてはALA-SDTに関するin vivoの報告が2編あるのみである。以上より本研究は悪性神経膠腫細胞株に対するALA-SDTおよびPpIX

-SDT、TS-SDTのin vitroでの抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

【材料と方法】

5 継代以上のラット神経膠腫細胞株 C6 およびヒト膠芽腫細胞株 U87MG を、6 ウェルプレートに 3.0×10^5 cells/well の濃度で播種してこれを 24 時間培養した後、ALA 200 μ g/mL、PpIX 1.0 μ g/mL および TS 30 μ g/mL と各 4 時間共培養した。その後、Resonant frequency 1.0 MHz、Duty ratio 50 %、 I_{sata} 0.16 W/cm²、60 秒間の超音波照射を行った。治療 24 時間後に Calcein AM/Ethidium homodimer costaining kit と Hoechst33342 で処理して、蛍光顕微鏡を用いて生細胞/死細胞の実数をカウントして腫瘍生存率を算出した。その際、超音波照射によってプレートの底面から剥がれて治療 24 時間後も再接着しなかった細胞を死細胞と仮定した。また C6 細胞株に対する ALA-SDT の 6 時間後に Annexin V-FLUOS Staining Kit と Propidium iodide の二重染色を行い、フローサイトメーターを用いてその細胞障害機序を評価した。さらに各音響感受性物質と共培養後の各細胞株内の音響感受性物質の蛍光強度をフローサイトメーターを用いて解析した。

【結果】C6細胞株を対象としたALA-SDTにおいて腫瘍生存率の低下が確認され、その細胞障害機序はアポトーシスが主体であることが立証された。またPpIX-SDT、TS-SDTでも同様に統計学的に有意に腫瘍生存率の低下を認めた。しかしU87MG細胞株においては前者と同一の実験条件ながら各SDTにおいて腫瘍生存率に統計学的有意差は得られなかった。各細胞株内の音響感受性物質の蛍光強度は、いずれの音響感受性物質においてもC6細胞株と比較してU87MG細胞株で低下していた。

【考察】細胞内に蓄積した各音響感受性物質（もしくはその代謝産物）の蛍光強度の違いがSDTによる抗腫瘍効果に関与していることが示唆された。実際にポルフィリン誘導体の細胞内からの排泄を調整するABCG2トランスポーターの働きを阻害することで、細胞内の音響感受性物質の濃度を高めてSDTによる抗腫瘍効果を増強させる試みは既に報告されており、腫瘍細胞の根絶と神経機能の維持という相反する課題を克服するためには、より効率的に音響感受性物質を腫瘍細胞内に蓄積させる必要があることから、共培養条件のさらなる検討が必要であると考えられた。

近年、本態性振戦やParkinson病、神経因性疼痛など機能脳神経外科領域において、経頭蓋的MRIガイド下収束超音波照射装置が導入され、深部脳刺激療法に代わる新たな低侵襲治療方法として注目されている。最近、深部の再発悪性神経膠腫を対象として本機器を用いた第1相試験が行われその安全性が示されたが、本機器が収束超音波を用いた組織の熱凝固を原理としていることから脳腫瘍などの容積の大きい対象物ではやはり周囲正常組織への影響が懸念される。本研究においては組織温度の上昇が得られないほどの0.16 W/cm²という極めて低強度の超音波照射でSDTの抗腫瘍効果が確認されており、深部脳腫瘍に対して低侵襲かつ有用な治療モダリティとなる可能性がある。上記機器を用いて低強度の超音波照射を経頭蓋的に脳腫瘍に収束させることは技術的には十分に可能であると考えられる。

【結論】本研究は悪性神経膠腫細胞株に対するALA-SDT、PpIX-SDT、TS-SDTに関するin vitroでの初めての報告である。C6細胞株において各SDT群で腫瘍生存率の低下が確認され、ALA-SDTの細胞障害機序はアポトーシスが主体であることが示された。また細胞内の各音響感受性物質の蛍光強度が各SDTによる抗腫瘍効果と相関していることが示唆された。悪性神経膠腫の治療戦略としてALAおよびTSはすでに臨床応用されている薬剤であり、各音響感受性物質との共培養条件や超音波照射条件（装置）が整えさえすれば、ALA-SDTならびにTS-SDTの実臨床へのフィードバックは実現可能なものと考えられた。