



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Porphyrin Derivatives Mediated Sonodynamic Therapy on Malignant Glioma in Vitro [an abstract of entire text]
Author(s)	遠藤, 将吾
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号 : 2134 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11652号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59011
Type	doctoral thesis
File Information	Shogo_Endo_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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)

2015 年 3 月

北海道大学

遠藤 将吾

緒言

神経膠腫は本邦の原発性脳腫瘍の約19.5 %を占める。なかでも膠芽腫に代表される悪性神経膠腫は外科的切除に放射線化学療法を組み合わせてもその5年生存率は約10 %と不良である。本腫瘍は正常脳組織に浸潤性に進展することから90 %以上が切除断端近傍から再発を来す。このため生存率の改善のためには如何に浸潤腫瘍を制御し局所再発を防ぐかが重要である。ここで我々は本腫瘍に対する新規補助療法として音響力学療法 (sonodynamic therapy: SDT) に着目した。

SDT とは腫瘍細胞内に蓄積させた触媒 (音響感受性物質) を超音波によって励起し、その際に発生する活性酸素により酸化的細胞損傷を与えるという治療方法である。組織深達度に優れた超音波を用いた本治療は切除困難な脳深部の腫瘍への効果も期待されている。

音響感受性物質としては、悪性神経膠腫に対する術中蛍光診断薬のアラベル[®]として既に広く臨床応用されているアミノレブリン酸 (5-Aminolevulinic acid hydrochloride: ALA) と、2013年9月に原発性悪性脳腫瘍に対する光線力学療法薬として本邦で保険承認されたレザフィリン[®] (Talaporfin sodium: TS) に着目した。これらポルフィリン誘導体は腫瘍細胞によく蓄積する一方で正常組織では速やかに代謝されることから正常組織への毒性が低いことが知られている。なおALAは天然のアミノ酸の一つでヘムの前駆物質であり、それ自体に音響感受性物質としての作用はないが、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物質としての作用を有するprotoporphyrin IX (PpIX) が生成される。また同様にTSも音響感受性物質としての作用を有することが既に報告されている。

悪性神経膠腫に対してはALA、PpIX、TSを触媒としたSDTに関するin vitroの報告はでこれまでにないことから、本研究ではラット神経膠腫細胞株C6およびヒト膠芽腫細胞株U87MGを対象としてこれらポルフィリン誘導体を用いたSDTのin vitroでの抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

実験方法

【培養細胞株】

ラット神経膠腫細胞株C6、ヒト膠芽腫細胞株U87MG (ATCC[®]; the American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) を10 % heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Life Technologies, Minato, Tokyo, Japan)、penicillin G 100 U/mlとstreptomycin 100 µg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (以降、FBSとpenicillin G、streptomycin無添加のDMEMとの混同を避けるため、FBSとpenicillin G、streptomycinを含むDMEMをDMEM (+) と表記する) 内で単層培養した。インキュベーターでの培養環境は温度37 °C、相対湿度100 %、酸素濃度95 %、二酸化炭素濃度5 %とした。

【超音波照射装置】

ファンクションジェネレータ (AFG3022: Tektronix, Minato, Tokyo, Japan) で生成してアンプ (UOD-WB-1000: Tokin, Sendai, Miyagi, Japan) を用いて増幅した交流電圧信号を水槽内に留置した超音波振動子を用いて、6ウェルプレート底に照射した。全ての超音波照射実験で6ウェルプレート (MULTIWELL 6 well: BD FALCON[®], Bedford, MA, USA) を用いた。プレートの各ウェルと同径 (35 mm) の平面円形の超音波振動子を水槽 (0.4×0.2×0.1 m³) 内に留置して、プレート底 (プレート底面厚は1.62 mm) を超音波振動子の表面から5 mmの位置に設置した。気泡は超音波を減衰させるため水槽内の水は脱気して用いた。またウェル内の液面やウェル側壁からの定在波の影響を少なくするため、超音波振動子とプレート底を平行になるように設置した。照射強度はmembrane型ハイドロホン (MHB-500, Onda, Sunnyvale, CA, USA) を用いて測定した。水槽内の水温を37 °Cに維持して超音波照射の際に発生する熱を可能な限り排除することで、本装置を用いて生じる事象が非熱的作用によるものとした。

【SDTプロトコール】

6ウェルプレートの各ウェル内に 2.5×10^5 cells/mLの細胞懸濁液1mL (2.5×10^5 cells/well) を播種して、これを24時間培養した後、各ウェルをフェノールレッド不含のDMEM 1mLで一度洗浄した。音響感受性物質単独群ならびにSDT群では各ウェルの培地を各音響感受性物質溶液4 mL (ALA 200 µg/mL、PpIX 1 µg/mL、TS 30 µg/mL) に置換し、4時間の供培養を行っ

た。一方、コントロール群ならびに超音波照射単独群では、同様にフェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄した後、各ウェル内の培地を音響感受性物質溶液の替わりに不含のDMEM 4 mLに置換し、上記と同じ時間で培養を行った。

超音波照射条件はResonant frequency 1.0 MHz、Duty ratio 50 %、 I_{sata} 0.16 W/cm²、照射時間60秒に統一した。

【抗腫瘍効果判定】

I. 腫瘍生存率の算出

超音波照射から 24 時間の培養後に Calcein AM/Ethidium homodimer (EthD-1) costaining kit (Live/Dead Viability/Cytotoxicity Assay Kit: Life Technologies, Minato, Tokyo, Japan) を用いて生細胞/死細胞を評価した。-20 °C で保存した 2 mM の EthD-1 ストック溶液 20 μ L を PBS10 mL で希釈した後、4 mM の Calcein AM ストック溶液 5 μ L を混和しワーキング溶液を調整した。各ウェルを PBS で一度洗浄した後、1 mL の PBS と本溶液 100 μ L を添加して、室温で 30 分間の呈色反応を行った。その際に全細胞数をカウントするため Hoechst33342 との二重染色を行った。各ウェルを PBS で一度洗浄した後、1 mL の PBS と Hoechst33342 を 0.2 μ L 添加して、室温で 30 分間の呈色反応を行った。蛍光顕微鏡 (IX71 + U-LH100HGAPO: OLYMPUS, Shinjuku, Tokyo, Japan) で観察して、デジタルカラーカメラ (VB-6010: KEYENCE, Higashi-yodogawa, Osaka, Japan) で記録した。

1) まず 6 ウェルプレートの各ウェルで任意の 5 点の全細胞数 (Hoechst33342 陽性細胞数) と死細胞数 (EthD-1 陽性細胞数) をカウントした (n=3)。

2) 次に超音波照射によってプレートの底面から剥がれて、超音波照射 24 時間後も再接着しなかった細胞を死細胞と仮定して、仮定死細胞数を下記の公式を用いて算出した。

[仮定死細胞数 = 無治療群の Hoechst33342 陽性細胞数 - 治療群の Hoechst33342 陽性細胞数]

3) 下記の公式を用いて、各群において補正死細胞数を算出した。
[補正死細胞数 = 実測死細胞数 (EthD-1 陽性細胞数) + 仮定死細胞数]

4) 最後に下記の公式を用いて腫瘍生存率を算出した。
[腫瘍生存率 (%) = 100 - 補正死細胞数 / 無治療群の Hoechst33342 陽性細胞数 $\times$ 100]

II. ALA-SDTによる細胞障害機序の評価

Annexin V-FLUOS Staining Kit (Roche Applied Science, Minato, Tokyo, Japan) と Propidium iodide (PI: Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) の二重染色後にフローサイトメーターを用いて、ALA-SDTによる細胞障害機序を評価した。培地内のALAの存在によるアーチファクトを可能な限り減ずるため、音波照射の直前に6ウェルプレートの各ウェルをフェノールレッド不含のDMEM 1mLで一度洗浄して、培地をフェノールレッド不含のDMEM 4 mLに置換した後に超音波照射を行い、治療6時間後に解析した。治療後の各ウェルをPBSで一度洗浄して、0.05 % trypsinを用いて細胞を回収した後にPBSで適当量に懸濁した。その際、超音波照射によってプレート底面から細胞が剥離して培地内に浮遊することを考慮して、それら浮遊細胞も同時に回収して検体とした。-20℃で保存した20 μ Lのフルオレセイン標識Annexin V試薬をインキュベーションバッファー (10 mM Hepes、pH 7.4、140 mM NaCl、5 mM CaCl_2) 1 mLで希釈した後、50 $\mu\text{g/mL}$ のヨウ化プロピジウムストック溶液20 μ Lを混和した。回収した細胞懸濁液 1 mLに本溶液100 μ Lを添加して、室温で15分間の呈色反応を行った。これらを488 nmのアルゴンイオンレーザーで励起して、Annexin V-FLUOSとPIの蛍光強度を各々530/30 nm、574/26 nmのフィルターを用いて解析した。解析結果はAnnexin-V-/PI-の細胞群を生細胞、Annexin-V+/PI-の細胞群を早期アポトーシス細胞、Annexin-V+/PI+の細胞群を後期アポトーシス細胞もしくはネクローシス細胞と評価した。

【細胞内音響感受性物質量の半定量化】

各細胞内に蓄積した音響感受性物質の蓄積量を、その蛍光強度をフローサイトメーター (Attune[®] Acoustic Focusing Cytometer: Life Technologies Japan, Minato, Tokyo, Japan) で解析することで半定量化して、細胞株の違いによる細胞内音響感受性物質量を比較した。

6ウェルプレートの各ウェル内に 4.0×10^5 cells/wellの各細胞株を播種して、これを24時間培養した。その後、フェノールレッド不含のDMEM 1mLで各ウェルを一度洗浄して、上記条件で各音響感受性物質と共培養した。共培養後の各ウェルをPBSで一度洗浄して、0.05 % trypsinを用いて細胞を回収した後にPBSで適当量に懸濁した。これらを488 nmのアルゴンイオンレーザーで細胞内音響感受性物質を励起して、その蛍光強度を690/50 nmのフィルターを用いて解析した。

【統計学的解析】

超音波照射実験は各群3ウェルに対して実施した。データは全てStatcel 3 software (OMS publishing Inc, Tokorozawa, Saitama, Japan) を用いて統計学的解析を行った。結果は中央値±標準偏差で表記した。2群の比較は一元配置分散分析法 (one-way analysis of variance: ANOVA) を用いて、 $P < 0.05$ を統計学的有意差ありと判定した。

実験結果

in vitro での検討で、いずれの触媒においてもラット膠芽腫細胞株 C6 を対象とした SDT にてコントロールに対して有意な腫瘍生存率の低下が確認された。さらにそ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。他方、ヒト膠芽腫細胞株 U87MG においては C6 と同一の実験条件ながらいずれの音響感受性物質においても有意な抗腫瘍効果は得られなかった。そこで細胞内の音響感受性物質の蓄積量の半定量的解析を行ったところ、いずれにおいても C6 と比較して U87MG でその蓄積量が低かった。

考察

超音波が生体に与える作用は主に2つに分類され、一方は音響エネルギーの吸収による生体組織の温度上昇作用（『熱的作用』）で、他方は超音波音場内で溶存微小気泡が振動することによって膨張と圧縮を繰り返した結果、これが崩壊するという一連の過程（キャビテーション）を経てフリーラジカルや放射圧が発生する機械的作用（『非熱的作用』）である。前立腺癌などの固形癌に対する超音波治療は広義には高密度焦点式超音波療法（High Intensity Focused Ultrasound: HIFU）を代表とする一種の温熱療法で前者を基本原理とするが、病変が機能野と近接することが多い脳腫瘍の治療では組織温度の上昇は非常に大きな問題である。このためSDTが音響感受性物質の励起によって産生されたROSによる細胞障害、すなわち『非熱的作用』を利用する点は見逃せない。以上よりSDTでは理論上、標的腫瘍細胞に対して選択的かつ安全な局所補助療法が可能である。

本研究の結果より細胞内の音響感受性物質の蓄積量がSDTの抗腫瘍効果と相関していることが示唆された。ポルフィリン誘導体の細胞内からの排泄を調整するATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2) トランスポーターの働きを阻害して細胞内の音響感受性物質の濃度を高めることでSDTによる抗腫瘍効果が増強されたとの報告もあり、今後、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ことができるよう更なる検討が必要と考えられる。

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、いくつかの国際共同試験により MRI ガイド下収束超音波照射装置（ExAblate[®] Neuro; InSightec, Haifa, Israel）が導入されている。本機器は超音波の『熱的作用』を利用した定位的な組織凝固をその基本原理としており、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。

最近では深部の再発悪性神経膠腫を対象に本機器を用いた定位凝固の第1相試験が行われその安全性が示されたが、腫瘍の局所制御が得られるほどの腫瘍サイズの縮小には至らず、周囲正常脳組織へ影響を考慮した場合には本機器が『熱的作用』を用いている点で懐疑的である。ここで我々は充実性腫瘍に対してより低侵襲な局所治療を達成するため本機器を『非熱的作用』つまり SDT に応用できる可能性について考えている。本研究では熱が発生しないほど極めて低強度の超音波照射条件（0.16 W/cm²、60 秒間）で、悪性神経膠腫細胞株のアポトーシスを誘導することが確認された。また ALA、

PpIX および TS によって、そのアポトーシス誘導が増強されることが立証されたことから、本機器の超音波照射出力を周囲正常脳組織への影響が少ない低強度に設定することによって、本機器を『非熱的作用』に応用することは技術的には十分可能と確信している。

結語

本研究は悪性神経膠腫細胞株を対象とした ALA、PpIX、TS を用いた SDT の *in vitro* での初めての報告である。

apoptosis を介した細胞障害が確認され、また細胞内の音響感受性物質の蓄積量が SDT の抗腫瘍効果と相関していることが示唆された。

今回の結果から SDT が悪性神経膠腫に対する新規補助療法となる可能性が示された。