

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Ultrasound modulates fluorescence strength and ABCG2 mRNA response to aminolevulinic acid in glioma cells

超音波は神経膠腫細胞において蛍光強度とアミノレブリン酸に対する ABCG2 mRNA 反応を調節する

日本医科大学大学院医学研究科 神経病態解析学分野
大学院生 樋口 直司

Journal of Nippon Medical School Vol.87 No.6 (2020) 掲載予定

申請者は、神経膠腫細胞における超音波照射とアミノレブリン酸の組み合わせにつき、蛍光強度と ABCG2 mRNA 反応の変化について研究した。

脳腫瘍の光線力学診断 (PD) は術中腫瘍検出に広く利用され、PD の光増感剤として 5 アミノレブリン酸 (5ALA) が使用される。5ALA は正常細胞内で protoporphyrin IX (PpIX) に変換されヘムに代謝されるが、腫瘍細胞内ではヘムに代謝されず PpIX が蓄積し PD に用いられる。しかし glioblastoma のような最悪性な神経膠腫であっても蛍光強度はばらつきを生じる。そして偽陰性の蛍光は腫瘍の残存をもたらす可能性がある。本研究では超音波効果について、細胞内の PpIX と PpIX を細胞質外に排出するトランポーターである ATP 結合カセット輸送体 (ABCG2) の発現レベルについて調べた。

本研究で使用した悪性神経膠腫細胞樹立細胞株は、SNB19、U87MG、および T98G の 3 種類を *in vitro* 実験に使用した。5ALA は開発元より購入し、各培養細胞を 1.0mM 濃度の 5ALA にて暴露し、超音波照射を行った。超音波装置は実際に理学療法で使用されている器具を使用し実験を行った。超音波照射の条件は 1MHz、3W/cm²、Duty cycle 10%、2 分間照射で設定した。光線力学療法の効果を実力減ずるため、半暗室で実験を行った。培養細胞は 5ALA 投与単独群と 5ALA 投与に超音波照射を加えた群に大別し、それぞれの腫瘍細胞の形態を顕微鏡で観察した。次に分光計を用い PpIX の蛍光スペクトルを検出した。ABCG2 発現は定量 RT-PCR にて計測した。

結果として、神経膠腫細胞は超音波照射により培養ケースから溶媒内に遊離したが、培養ケースへ再付着し、ほとんどの細胞は生存し 6 時間後までに元の形態に回復した。PpIX 発現レベルは全ての細胞株において超音波照射群が 5-ALA 投与単独よりも早く発現したが、発現レベルのピークパターンは細胞間で差が見られた。ABCG2 発現について、超音波照射群では 5-ALA 単独投与群よりも全ての細胞株で比較的抑制効果を認めた。

超音波は多種多様な生物学的効果を有する（細胞溶解、細胞分裂能の変化、超微細構造の変化、等）。顕微鏡での細胞の形態観察については、超音波の効果で最も影響が大きな細胞溶解がもたらされるかどうかを確認したが、ほとんどの細胞が生存し、本研究で用いた超音波強度は細胞溶解に至る影響はなく、安全に使用できた。

次に細胞間での PpIX 蛍光スペクトラムについて、T98G 細胞株が一番高かった。過去の報告において、T98G 細胞株は MGMT メチル化を有せず、臨床的に悪性化しやすい性質を有する。その際、MGMT メチル化を有さない細胞株は ABCG2 の発現は低く、結果として PpIX の細胞内蓄積が高くなるものと考えられている。他の MGMT メチル化を有する細胞株は 5ALA 投与 4 時間をピークに PpIX 発現低下に転じた。細胞株の過剰な PpIX は活性酸素 (ROS) による DNA 損傷を生じる可能性があるため、多くの細胞において porphyrin の恒常性を維持する代謝経路を有する。時間依存的に細胞質外へ排出する ABCG2 活性が上昇し、5ALA 投与後の細胞質内 PpIX 発現が低下、その結果 PpIX 蛍光強度が低下した。

また時間依存的に 5ALA 投与後、ABCG2 発現のわずかな増加を認めた。上記のメカニズムにより、外因的に投与された 5ALA が porphyrin の上昇を引き起こし、ABCG2 等の膜輸送体の活性を高めることにより過剰な porphyrin より細胞を保護するための機構ではないかと考えた。

過去の論文において、ABCG2 発現が変化することで、超音波が乳がん幹細胞の化学療法抵抗性を逆転させるという報告もあり、本研究でも ABCG2 発現について調査した。悪性神経膠腫において temozolomide 代謝に ABCG2 が関与していると最近報告され、ABCG2 発現抑制が化学療法治療抵抗性を克服する可能性を秘めていると考えられた。

本研究において超音波照射の条件は、以前の研究で用いた条件で設定した。腫瘍細胞内へ最も多い PpIX の蓄積と人体への安全性を求めた最適条件を見出すため、さらなる研究が必要と思われ、また臨床において超音波による正常細胞への影響を考慮する必要がある、この影響を解明するにも、さらなる研究が必要と考える。

本研究の結論として、悪性神経膠腫への超音波照射は、細胞内 PpIX レベルを上昇させ、より強い 5-ALA 蛍光の誘導をもたらし、蛍光診断の感度を上昇させる。また超音波照射による ABCG2 発現の抑制は、神経膠腫細胞における PpIX 蓄積に寄与する要因の一つであり、将来的な化学療法治療抵抗性を克服できる可能性がある。

二次審査では、上記内容の詳説に加え、審査委員・臨時審査委員から、細胞種の違いによる反応の差の原因、glioma stem cell 根絶への応用の可能性、超音波の照射条件による差の可能性、動物実験や臨床への応用の可能性、正常脳細胞への影響の可能性、光線力学療法と音響療法の複合による利点等に関する質疑が広くおこなわれたが、いずれも適切な回答がなされた。

よって本論文は学位（医学博士）論文として価値のあるものと認定した。