

学 位 論 文 要 旨

氏 名 末 廣 論

論 文 名 悪性神経膠腫における新規治療法の開発
- 集束超音波を用いた5-アミノレブリン酸併用超音波力学療法 -

学位論文要旨

【目的】

悪性神経膠腫における広範な浸潤は、腫瘍再発の主たる要因であり、予後を不良にしている。再発をコントロールする為には、浸潤細胞を標的とした新たな治療法が求められている。近年、各種癌で超音波力学療法の有効性の報告がある。悪性神経膠腫では5-アミノレブリン酸(5-ALA)が既に、診断用薬剤として認可、臨床使用されており、5-ALAは超音波増感剤としても使用し得ることが報告されている。5-ALAは経口投与により細胞内で代謝され腫瘍特異的に蛍光物質である Protoporphyrin IX(PpIX)として蓄積する。そこで、私は超音波に5-ALAを併用した音響力学療法(sonodynamic therapy:SDT)は悪性神経膠腫に対して、腫瘍選択的な新たな治療法となると考え、本研究では5-ALA-SDTの有効性及び作用機序、さらに臨床応用の可能性について解析した。

【方法】

〈in vitro〉

細胞はU87、U251ヒトグリオーマ細胞と幹細胞様細胞としてOct3/4を強制発現したU251(U251^{Oct-3/4})を用いた。超音波の照射条件は1MHz、3W/cm²、50% duty cycle (DC)、2分間(Low power: Lo)と1MHz、5W/cm²、100% DC、3分間(High power: Hi)とした。検討項目は、5-ALA-SDT(High、Low)、SDT(High、Low)、コントロールの6群で抗腫瘍効果を検討する為、照射12時間後にCell Counting Kit-8 (Dojindo)にて細胞増殖抑制効果の評価を行い、形態変化についても検討した。

氏名 末廣 諭

細胞死の様式を解析するため、フローサイトメトリー及び、TUNEL 染色を行いアポトーシスの関与について検討した。

各細胞における PpIX の蓄積量を蛍光プレートリーダーにて測定した。

SDT 後の活性酸素の産生量を OxySelect™ Intracellular ROS Assay Kit (CELL BIOLABS) により測定した。

〈in vivo〉

U87 グリオーマ、または U251^{Oct-3/4} グリオーマ幹細胞様細胞を 6 から 8 週齢の nu/nu BALB/c mice 脳内に 1×10^5 個移植した。1 週間後に腫瘍形成を MRI にて確認し、集束超音波(High Intensity Focused Ultrasound : HIFU)を用いて SDT を行った。照射条件は 2.2 MHz、0.5 kW/cm²、100% DC、5 分間を腫瘍全体に照射出来るよう 3 回に分けて照射(週に 1 回)行った。SDT 後のマウスの生存期間、および脳内移植腫瘍の病理学的解析を行った。

【結果】

〈in vitro〉

抗腫瘍効果は、全ての細胞で 5-ALA-SDT(High)が最も高かった。5-ALA を併用することで、優位に効果が上昇することを確認した。形態学的変化としては、SDT 単独では細胞突起の短縮を認め、5-ALA-SDT では更に、細胞の腫大や空胞形成を認めた。フローサイトメトリーでは細胞死の機序として、アポトーシスの関与を確認した。また TUNEL 染色にて、SDT 単独と比較して、5-ALA-SDT にて明らかに TUNEL 陽性細胞(DNA の断片化+)が増加することを確認した。5-ALA を添加することで、PpIX が各細胞で蓄積されることを確認した。SDT 後にコントロールと比較して、活性酸素が優位に上昇していることを確認した。しかし、SDT 単独と ALA-SDT の間には有意な差はなかった。

〈in vivo〉

U87 移植モデルマウスに 5-ALA-SDT を行った群は、コントロールと比較して優位に生存期間の延長を認めた。U251^{Oct-3/4} 移植モデルマウスにおいて、病理学的検討を行い、超音波集束部位の中心部においては壊死を認め、集束中心部前後の腫瘍組織ではアポトーシス(Caspase-3 陽性)と、増殖抑制(MIB-1 陽性細胞の減少)が見られた。

【考察】

5-ALA-SDT は悪性神経膠腫に対して、有効な抗腫瘍効果を認めた。その機序にはアポトーシスの関与が確認され、SDT により活性酸素の産生が上昇していることから、活性酸素がアポトーシスを促進している可能性が示唆された。脳腫瘍モデルマウスでは、集束超音波を用いて 5-ALA-SDT を行うことで、生存期間は延長し、照射焦点では壊死、周辺ではアポトーシスと増殖抑制がみられたが、正常脳組織の損傷はなかった。よって浸潤細胞を標的とした治療となり得る可能性が示唆された。技術の進歩により、頭蓋外から頭蓋内に超音波の照射が可能になっており、今後、脳腫瘍に対して。開頭手術に代わる、新たな治療法として 5-ALA 併用超音波力学療法が実施出来る可能性も示唆された。

キーワード (3~5)

悪性神経膠腫、5-アミノレブリン酸、超音波力学療法
集束超音波