

(第7号様式)

学位論文審査結果の要旨

氏 名	末 廣 諭
審 査 委 員	主査 今村 健志 副査 三浦 裕正 副査 中城 公一 副査 松原 圭一 副査 柳原 豊

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 -

審査結果の要旨

本論文は、各種がんで有効性の報告がある超音波力学療法と悪性神経膠腫で診断用薬剤として認可されている 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を併用した 5-ALA-音響力学療法 (sonodynamic therapy; SDT) の悪性神経膠腫に対する有効性及び作用機序を *in vitro* と *in vivo* で検討し、その臨床応用の可能性を明らかにしたものである。

【目的】悪性神経膠腫は浸潤性の予後不良な腫瘍で、正常脳組織との境界が不鮮明であるために、手術で完全に摘出することが困難で、再発を予防するための新たな治療法が求められている。本研究では、悪性神経膠腫で診断用薬剤として認可されている 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) が超音波増感剤としても機能することに着目し、近年、各種がんで有効性の報告がある超音波力学療法と 5-ALA を組み合わせた 5-ALA-音響力学療法 (sonodynamic therapy; SDT) の有効性及び作用機序を明らかにし、その臨床応用の可能性について考察することを目的とした。

【方法】2種類のヒトグリオーマ細胞 (U87、U251) と幹細胞様ヒトグリオーマ細胞 (Oct3/4 を強制発現した U251^{Oct-3/4}) に、*in vitro* で 1 MHz、3 W/cm²、50% duty cycle (DC)、2 分間 (Low power: Lo) と 1MHz、5 W/cm²、100% DC、3 分間 (High power: Hi) の条件で

超音波を12時間照射し、Cell Counting Kit-8 (Dojindo) を用いた細胞増殖抑制効果の評価、形態変化の評価、フローサイトメトリーと TUNEL 染色を用いたアポトーシスの評価、蛍光プレートリーダーを用いた 5-ALA の代謝産物 Protoporphyrin IX (PpIX) の蓄積量の評価、Oxy Select™ Intracellular ROS Assay Kit (CELL BIOLABS) を用いた SDT 後の活性酸素の産生量の評価を行った。さらに、 1×10^5 個の U87 ヒトグリオーマ細胞または U251^{Oct-3/4} ヒトグリオーマ幹細胞様細胞を 6-8 週齢の nu/nu BALB/c mice 脳内に移植し、1 週間後に MRI にて腫瘍形成を評価した後、集束超音波 (High Intensity Focused Ultrasound : HIFU) を用いて 2.2 MHz、0.5 kW/cm²、100% DC、5 分間、3 回の SDT 照射を週に 1 回行い、マウスの生存期間と脳内移植腫瘍の病理学的解析の評価を行った。

【結果】 *in vitro* の細胞増殖抑制効果の評価では、全ての細胞で 5-ALA-SDT (High) の抑制効果が高く、5-ALA の併用効果が認められた。形態学的には、SDT 単独では細胞突起の短縮を認め、5-ALA-SDT ではさらに細胞の腫大や空胞形成を認めた。細胞死の機序としてアポトーシスの関与を確認し、SDT 単独と比較して 5-ALA-SDT にてアポトーシスの増加を認めた。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 PpIX として蓄積することが知られているが、実験に用いた各細胞で PpIX が蓄積されることを確認した。さらに、SDT 後にコントロールと比較して SDT 群で活性酸素が優位に上昇していることを確認した。一方、*in vivo* では、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】 超音波力学療法と 5-ALA を組み合わせた 5-ALA-SDT が悪性神経膠腫に対して、*in vitro* で細胞増殖抑制効果を認めることを明らかにし、その作用機序として活性酸素を介したアポトーシスの可能性を示した。*in vivo* の脳腫瘍モデルマウスでは、集束超音波を用いた 5-ALA-SDT が、正常脳組織の損傷なく、照射焦点で腫瘍細胞壊死、周辺でアポトーシスと増殖抑制効果を示し、マウスの生存期間を延長することを示した。以上の結果から 5-ALA-SDT が悪性神経膠腫の浸潤細胞を標的とした新規治療法となり得る可能性が示唆された。現在臨床においては、頭蓋外から頭蓋内に超音波の照射が可能になっており、開頭手術に代わる新たな治療法として 5-ALA-SDT の台頭が期待される。

本論文に対する公開審査会は平成28年4月26日に開催された。申請者から研究内容が英語で口頭発表された後に、審査委員から本研究に関連する質問がなされた。質問は、5-ALAの蛍光を発する作用、用いた細胞の特徴、移植実験方法、集束超音波の原理・照射方法、データの統計学的処理など具体的な実験方法から、照射部位での温度上昇、マイクログリアの関与、アポトーシス誘導のメカニズム、血液脳関門に対するSDTの影響、抗がん剤治療など他の治療とのコンビネーションについてなど具体的なメカニズムや応用についてまで多岐になされたが、これらに対して申請者は、質問の意図を十分に理解した上で、詳細かつ明解に応答した。本論文は、難治性の悪性神経膠腫に対して開頭手術に代わる新たな治療法を提案するもので、作用機序の基礎研究として有用な知見を含んでおり、今後の研究の発展が期待される。審査委員は一致して本論文を高く評価し、博士 (医学) の学位論文に値するものと結論した。