

## 学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏 名 末廣 諭

学位論文名 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 -

---

### 学位論文の要約

#### 【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(U251Oct-3/4)を用いた。また正常コントロールとして ReNcell VM を用いた。超音波の照射条件は 3 MHz、2 W/cm<sup>2</sup>、20% duty cycle、3 分間とした。検討項目は、5-ALA-SDT、SDT、5-ALA、コントロールの 4 群で抗腫瘍効果を検討する為、照射 12 時間後に Cell Counting Kit-8 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。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 OxySelectTM Intracellular ROS Assay Kit により測定した。また radical scavenger である Edaravone を超音波照射後に加えることで、細胞増殖抑制効果への影響を確認した。

〈in vivo〉

U87 グリオーマ、または U251Oct-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  $1 \times 10^5$  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/cm<sup>2</sup>、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)を行った。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 が最も高く、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。また正常細胞(ReNcell VM)には SDT による影響は認めなかった。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、TUNEL 染色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。5-ALA-SDT はコントロールと比較して、SDT 後に活性酸素が優位に上昇していることを確認した。また Edaravone を超音波照射後に加えることで、細胞増殖抑制効果が消失することを確認した。

### 〈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。U251Oct-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。また周辺の正常脳組織に対しての傷害は認めなかった。

## 【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。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Satoshi Suehiro, et al: 5-Aminolevulinic acid-mediated sonodynamic therapy (5-ALA-SDT) enhances antitumor activity by inducing apoptosis in malignant gliomas: significance of high intensity focused ultrasound (HIFU) on 5-ALA-SDT in a mouse glioma model. Journal of Neurosurgery