

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 19 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20791024

研究課題名（和文） 悪性脳腫瘍における光感受性物質の放射線感受性増強効果の検討

研究課題名（英文） Evaluation of a radiosensitizing effect of photosensitizer for malignant gliomas

研究代表者 山本 淳考（YAMAMOTO JUNKOH）

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80461565

研究成果の概要（和文）：5-アミノレブリン酸（ALA）などの光感受性物質は、腫瘍に高い集積性を有し、光線力学療法や悪性脳腫瘍に対する術中蛍光診断に利用されている。本研究では、5-ALA の悪性脳腫瘍に対する放射線感受性増強効果の可能性について、ラットグリオーマ細胞を用いて検証した。5-ALA は、悪性脳腫瘍に対して放射線感受性増強効果を有し、5-ALA によって誘導される PpIX が、放射線照射下において、細胞内の活性酸素種の発生に重要な役割をしていることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Photosensitizer, such as 5-Aminolevulinic acid (ALA), are used in photodynamic therapy and fluorescence-guided resection of malignant brain tumours due to its high cellular uptake in tumours. In the present study, the possible use of 5-ALA as a radiosensitizer for malignant brain tumours is examined *in vitro* using rat glioma cell lines (9L, C6). 5-ALA functions as a specific radiosensitizer for malignant gliomas. Intracellular 5-ALA-induced PpIX plays an important role in the production of ROS and the radiosensitizing effect under ionizing irradiation conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
平成 21 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 22 年度	800,000	240,000	1,040,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：悪性脳腫瘍

科研費の分科・細目：光線力学療法

キーワード: photodynamic therapy (PDT), photodynamic diagnosis (PDD), 放射線治療、glioma, free radical

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍に対する治療戦略として、外科的手術、化学療法、放射線治療と集約的に行われている。患者の予後を決定する、もっとも重要な要素として、腫瘍の摘出率が挙げられる。しかしながら、腫瘍の正常組織への高い浸潤性のために、eloquent areaなど神経機能を温存するため、余儀なく腫瘍摘出を断念させられることがおおい。そのようなケースでは、間違いなくその残存した部位から腫瘍が再発する。現在も、世界中で精力的に、悪性脳腫瘍に対して研究が行われているが、いまだ有用な補助療法がなく、こと、グリオブラストーマに関しては、平均余命は1~1.5年であり、5年生存率は7%前後と極めて低く、これら治療成績は約30年間変わっていないのが現状である。(Shapiro WR: J Neurosurg 71(1): 1-9, 1989) われわれは、この悪性脳腫瘍に対して、光線力学療法に関する研究を行ってきた。(Yamamoto J: Int J Oncol. 2005 Nov;27(5):1207-13, Yamamoto J: Clin Cancer Res 2006 12:7132-7139) この光線力学療法とは、光に反応する光感受性物質 (photosensitizer) と、光照射を用いて殺細胞効果を生み出す治療法であり、すでに、肺がん、頭頸部がん、子宮がんなどさまざまな悪性腫瘍に対して臨床の現場で有効な成績が数多く報告されている。(Fritsch C: Arch Dermatol 134(2): 207-14, 1998, Mimura S: Lasers Surg Med 19(2): 168-72, 1996) この光線力学療法に用いられる光感受性物質 (photosensitizer) は、一般的に2つの性質を持つ。1) 光照射により、活性

酸素 (一重項酸素: 1O_2) を発生させ周囲組織に対し酸化損傷を引き起こす。2) 異なる波長の光照射により、光感受性物質が蛍光を発する。前者の性質は、光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) で利用されており、後者は、術中蛍光診断あるいは光線学的診断 (fluorescence-guided surgery) として利用されている。すなわち、光感受性物質が、腫瘍細胞に選択的に取り込まれれば、PDTと術中蛍光診断によって、残存、あるいは、正常脳組織に浸潤した腫瘍細胞を可視化し、そして消滅させることが可能となる。悪性脳腫瘍については、光感受性物質を用いた術中蛍光診断が極めて有効であることが報告され、すでに世界中の脳神経外科施設で一般的に用いられている。(Stummer, W: Lancet Oncol, 7: 392-401, 2006) この手法では浸潤した悪性脳腫瘍に取り込まれた、光感受性物質が蛍光をはなち、腫瘍細胞と正常脳組織との区別が容易となり、eloquent areaなど神経機能温存を重視した部分の手術に威力を発揮する。しかしながら、正常組織に浸潤した悪性脳腫瘍は完全には摘出できず、神経機能温存を考慮し、この光感受性物質を取り込んだ腫瘍を残さざるをえなくなる。

さて、この光線力学療法に使用される光感受性物質は、放射線感受性も持つことがわかり、その有用性が数多く報告されている。(Luksiene Z: Cancer Lett. 2006 Apr 8;235(1):40-7) すなわち、光感受性物質を投与し、同時に放射線治療を行うことにより、その効果をより高めることができる可能性がある。現在、悪性脳腫瘍に対する治療とし

て、外科的治療に続き、放射線治療が重要な役割を果たしている。放射線照射技術の進歩により、以前から行われている脳腫瘍に対する拡大局所照射などの分割照射法だけでなく、最近では、定位的照射法または、強度変調放射線治療を用いることで、腫瘍に対して、外科的治療が困難な深部の微小病変もしくは、脳幹部周囲などの複雑な形状の腫瘍性病変に対しても、正確な放射線照射が可能となっている。しかしながら、放射線による治療効果は、照射線量に比例するが、線量を上げることにより、それだけ正常脳への損傷が大きくなり、時に放射線壊死や、脳卒中といった致命的な合併症まで報告されている。(Bowers DC: J Clin Oncol 24: 5277-5282, 2006) 脳腫瘍に高い親和性を持つ光感受性物質と放射線治療の相乗効果が悪性脳腫瘍に対して認められれば、術中蛍光診断によって、安全に脳腫瘍が摘出され、術後補助療法としての放射線治療効果を高めるのみならず、被ばく線量を減少させることが可能となり、正常脳組織に対する放射線の影響を軽減することが可能となる。放射線治療および光感受性物質は、生体に対して安全性が確立されており、すでに臨床の現場で使用されていることから、これらを組み合わせた治療は、比較的短期間での臨床応用が可能であり、本研究の意義は大きいと思われる。しかしながら、どのような光感受性物質を使用したらよいか、また、その放射線治療条件など、悪性脳腫瘍に関する研究はほとんどされていない。

2. 研究の目的

脳神経外科ですでに臨床的に術中蛍光診断の光感受性薬剤として使用されている 5-アミノレブリン酸 (ALA) と放射線照射の併用による悪性脳腫瘍に対する 5-ALA の放射線感受性増強効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) ラットグリオーマ細胞株 (9L, C6) を用いた 5-ALA による放射線感受性増強効果の検証

細胞を 5-ALA (10 mM) で処理後、X 線照射装置を使用し、放射線照射を施行後に、MTT assay 法にて、殺細胞効果を検討した。さらに、ガンマ線照射装置を用いて同様の実験を施行。尚、実験の全行程は、光照射による影響を避けるために、遮光下にて行った。

(2) ラットグリオーマ細胞株における 5-ALA から誘導されるプロトポルフィリン (protoporphyrin IX: PpIX) の蛍光イメージング

5-ALA の代謝産物である PpIX は、光感受性物質の性質を有していることから、細胞株間における細胞内 PpIX の発生を比較検討するために、ラットグリオーマ細胞株における細胞内 PpIX の局在を検証した。細胞を低濃度 5-ALA (1 mM) にて処理後、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5: Carl Zeiss 社製: 励起波長 488 nm、蛍光波長 560 nm long pass) 下に、観察を行った。

(3) 低濃度 5-ALA (1 mM) 処理による放射線感受性増強効果の検証

細胞を低濃度 5-ALA (1 mM) で処理を行い、ガンマ線照射装置を使用して放射線照射後、Colony forming assay 法を用いて殺細胞効果を検証した。さらに、臨床的に行われている多分割照射を想定し、低濃度 5-ALA (1 mM: 4 時間培養) 処理を行い、放射線照射 (2 Gy/day) を行い、これを連続 4 日間施行 (放射線総線量: 8 Gy) し、同様に Colony forming assay 法でコロニー生成能を評価した。

(4) ラットグリオーマ細胞株における5-ALA+放射線照射の際に発生する活性酸素イメージング

放射線感受性増強効果を活性酸素の観点から、5-ALA処理後の放射線照射時に発生する活性酸素について、DCF(D, 2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate)を蛍光プローブとして使用し、活性酸素イメージングを行った。細胞を低用量5-ALA (1 mM)で処理後、DCF (最終濃度 1×10^{-5} M)を含む培養液で10分間培養したのちに、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5: Carl Zeiss社製)で観察を行った。

4. 研究成果

(1) ラットグリオーマ細胞株を用いた5-ALAによる放射線感受性増強効果の検証

放射線照射線量率を一定 (0.54 Gy/min)とし、X線照射を行った。コントロール群 (5-ALA未処理) および5-ALA処理群のいずれも、放射線線量が増加するにつれて生細胞数の減少を認めていたが、5-ALA処理群の場合は、コントロール群と比較し有意に生細胞数の減少を認めていた (図1)。つぎに、放射線照射線量を一定 (照射線量 2 Gy)とし、放射線照射線量率を変化 (0.54 Gy/min および 0.07 Gy/min) させ比較した場合においては、放射線照射線量率との間には、統計学的有意差は認めておらず、放射線照射線量率は殺細胞効果に影響していないことがわかった (図2)。さらに、ガンマ線照射装置 (Gammacell 40 Extractor, NORDION International Inc., 線量率 0.8 Gy/min) を使用した場合にても、5-ALAの放射線感受性増強効果が確認された (図3)。

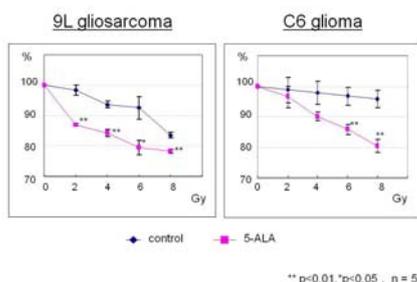


図 1

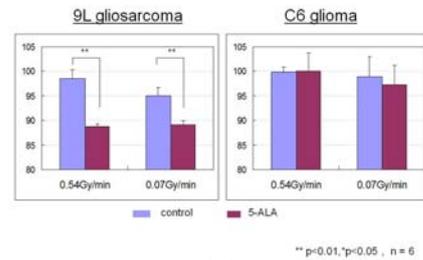


図 2

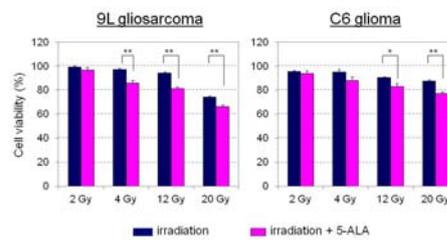


図 3

(2) ラットグリオーマ細胞株における5-ALAから誘導されるプロトポルフィリン (PpIX)の蛍光イメージング

低濃度5-ALA (1 mM)処理によって、細胞内PpIXの蛍光が確認され。それら蛍光の局在は、細胞質内に存在しており、従来の報告と同様な結果がえられた。(Chen X: Lasers Med Sci. Jan;26(1):69-78, 2011) また、9Lの方が、C6と比較し、明らかにPpIXの蛍光が強いことが確認された (図4)。

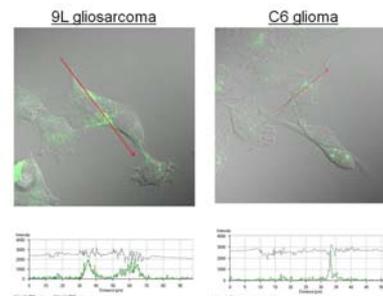


図 4

(3) 低濃度5-ALA (1 mM)処理による放射線感受性増強効果の検証

多重標的 1 ヒットモデルに基づいた生存率曲線から、平均致死線量 (D_0) を算出した。9Lにおける5-ALA処理群の D_0 値は、 4.35 ± 0.20 Gy、5-ALA未処理群の D_0 値は、 4.84 ± 0.23 Gyであり、5-ALA群の方が、統計学的有意に放射線感受性が高いことがわかった ($P \leq 0.05$) (図5)。一方、C6における5-ALA処理群の D_0 値は、 4.26 ± 0.10 Gy、5-ALA未処理群の D_0 値は、 4.51 ± 0.17 Gyであり、両群において統計学的有意差は認めなかった ($P=0.096$)

9L gliosarcoma

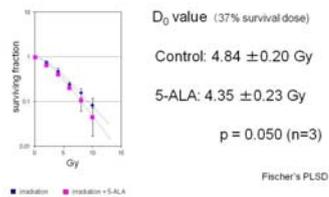


図5：生存率曲線 (9L細胞)

多分割照射 (total 8 Gy/4 days) において、9L細胞では、前述の単回照射と同様に、5-ALAで処理をすることで、未処理の群と比べて、統計学的有意にコロニー増殖能が抑制されることがわかった。さらに、C6細胞においては、単回照射では、5-ALAの放射線感受性増強効果が認められないものの、多分割照射により9Lと同様に、統計学的有意差をもって、5-ALA処理群が、未処理群に比べて、コロニー増殖能抑制効果を示した (図6)。

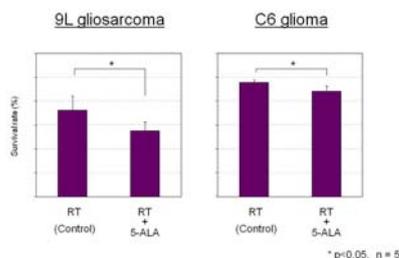


図6：コロニー生成能

(4) ラットグリオーマ細胞株における放射線照射の際に発生する活性酸素イメージ

グ

はじめに、われわれの顕微鏡観察条件 (LSM5: Carl Zeiss社製: 励起波長 488 nm、PpIX: 蛍光波長 560 nm long pass, DCFD: 蛍光波長 505-530 nm band pass) では、5-ALAから誘導されるPpIXの蛍光波長と、DCFdの蛍光波長は干渉していないことを確認した (図7-1)。5-ALA処理および未処理でも、放射線治療を行うことで、DCFdの蛍光が観察されたが、5-ALAで処理をした群は、5-ALA未処理の群と比較して、活性酸素種の産生量が多いことがわかった。また、その局在については、PpIXと一致していることが多いこともわかった (図7-2)。さらに、放射線照射を行うことで、PpIXの蛍光が減衰していることから、活性酸素種の発生にPpIXが関与した可能性が高いことが示唆された (図7-1, 2)。C6細胞を用いて、同様の実験を行ったが、PpIXの蛍光が弱く、DCFdの蛍光も含め観察が困難であった。

Result

Control: 5-ALA

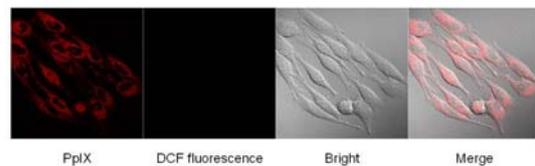


図7-1

Result

DCFd + RT (10 Gy)



5-ALA + DCFd + RT (10 Gy)

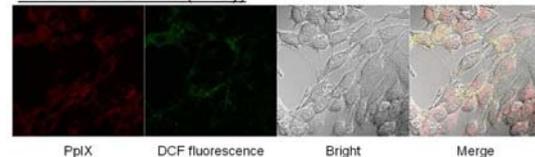


図 7-2

本研究によって、5-ALA は、細胞株によって若干の差はあるものの、放射線感受性増強効果を有することが証明された。5-ALA による放射線感受性増強効果は弱い、多分割照射などにより蓄積効果を認めており、その作用を増強することができる。すなわち、5-ALA は、悪性脳腫瘍における術中蛍光診断に有用のみならず、その後の放射線治療においても放射線感受性増強効果を高めることが可能となる。それに伴い、放射線照射量を減らすことが可能となり、晩期放射線障害などの有害事象を減らすことも可能であろう。頭蓋内疾患に対する放射線治療は、近年の放射線照射技術の進歩により複雑な脳腫瘍の形状や、脳幹部、視神経といった重要な構造物近傍に発育する腫瘍に対して、かなり厳密に放射線照射範囲をコントロールすることが可能であり、光線力学療法に使用される分布予想が困難な、光照射とは異なる。5-ALA および放射線照射は、すでに臨床現場において、安全性が確立され使用されていることを考慮すれば、比較的短期間で臨床応用が可能となり、本研究の意義は大きいと思われる。

本研究では、5-ALA の放射線感受性増強効果のメカニズムを解明するため、光線力学療法と同様になんらかの活性酸素種（光線力学療法では一重項酸素）が重要な役割を果たしていると仮説し、活性酸素に着目し、共焦点レーザー顕微鏡を使用し、その蛍光イメージングを試みた。放射線照射後に発生する活性酸素種の発生は、5-ALA 処理を放射線照射前に行うことにより、より多くの細胞内に発生する活性酸素種の産生を認めていることが証明された。したがって、5-ALA の放射線感受性増強効果は、発生する活性酸素種が重要な働きをしていると示唆される。また、この様

に発生した活性酸素種の発生部位と細胞内 PpIX が一致していることが多いことも証明された。本実験で、5-ALA 処理下で、9L 細胞が、C6 細胞と比較しより多くの細胞内 PpIX の産生を認めていたことから、放射線感受性増強効果は、細胞内 PpIX の産生量に依存している可能性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Yamamoto J, et al. : Radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX in glioma cells in vitro. Oncol Rep. 2012 (in press) (査読有)
DOI: 10.3892/or.2012.1699.

[学会発表] (計 9 件)

1) Yamamoto J, Saito T, Takahashi M, Nishizawa S: Evaluation of a radiosensitizing effect of 5-aminolevulinic acid for malignant gliomas 13th world congress of the international photodynamic association, May 10-14, 2011 (Innsbruck, Austria)
2) Hirano T, Kohno E, Hirakawa K, Yamamoto J, Okazaki S: Singlet oxygen detection in PDT The 2nd Asia Japan-Korea-China Joint Symposium of Photodynamic Therapy, 2010.6.12 (Fukui, Japan)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 淳考 (YAMAMOTO JUNKOH)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80461565