

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791346

研究課題名（和文）新規光感受性物質を用いた悪性神経膠腫に対する光線力学療法の基本実験

研究課題名（英文）Basic research of photodynamic therapy for the malignant glioma using a newly photosensitizer.

## 研究代表者

菅原 健一（SUGAWARA KENICHI）

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：50375573

研究成果の概要（和文）：ヒト悪性神経膠腫に対する光線力学療法において様々な光感受性物質が臨床応用されつつあるがその殺細胞効果の低さから満足のいく結果が得られていないのが現状である。従来の光感受性物質に比べ殺細胞効果を持つ一重項酸素の発生効率を増加させたケイ素置換基導入ポルフィリン誘導体を用いて基礎実験を行った。この新規光感受性物質は有用と考えられ、ヒト悪性神経膠腫の光線力学療法への応用の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Various photosensitizers are used in a photodynamic therapy for human malignant gliomas. However, no satisfactory results are obtained because of low cytotoxicities. We experimented using a porphyrin derivative by silylation, which increased production efficiency of singlet oxygen with cytotoxicity compared with other photosensitizers. Photodynamic therapy of human malignant gliomas using this newly photosensitizer may be possible.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：悪性神経膠腫、光線力学療法、ポルフィリン誘導体

## 1. 研究開始当初の背景

神経腫は中枢神経系に原発する悪性腫瘍で、現在なお治療の困難な疾患である。手術による肉眼的全摘出の成否が治療予後を左右することが知られているが、正常脳組織を含めた広範な摘出は脳の機能的な問題から限定され、しかも腫瘍は正常脳組織に浸潤、増殖するために腫瘍摘出時に正常脳組織と腫瘍組織を肉眼的に識別することは非常に困難である。正常脳組織中に腫瘍を残して摘出を断念せざるをえないことが多く、局所再発をきたす原因となっている。そのため腫瘍組織だけを選択的に可視化し、治療する方法の開発が進められ、近年、ヘム前駆体ポルフィリンが利用されるようになった。具体的には、ヘムの前駆物質 5-アミノレブリン酸が癌細胞に特異的に取り込まれ、ミトコンドリアで 5-アミノレブリン酸からヘム前駆体である Protoporphyrin IX に生合成され、赤色蛍光を発するとされる。この赤色蛍光は肉眼で観察できるため、術中に正常脳組織と腫瘍組織をリアルタイムに識別する術中蛍光診断法 (Photodynamic diagnosis: PDD) として悪性脳腫瘍の分野でも広く応用されるに至った。当施設でも申請者は平成 13 年より 5-アミノレブリン酸を用いた術中脳腫瘍蛍光診断を行い、正常な神経機能を温存しつつ腫瘍組織のみを選択的に摘出する治療法を試みている。さらに現在、5-アミノレブリン酸は光化学反応によって生じるフリーラジカルにて殺細胞効果を狙った光線力学的治療 (Photodynamic therapy: PDT) へ臨床応用されている。

光線力学的治療とは、ポルフィリン関連化合物が有する腫瘍組織、新生血管への特異的な集積性と光の励起により発生する一重項酸素の強い細胞破壊効果を利用した治療法

である。正常組織に大きな障害を与えることなく、低エネルギーで病変部を選択的に治療することができ、レーザー光照射により様々な病変に対して治療可能である。腫瘍親和性光感受性物質が光線に暴露されると光エネルギーを吸収し、励起状態 (一重項状態) に転位するが、これが基底状態に遷移する際のエネルギー転換の結果生ずる活性酸素が細胞を変性、壊死に陥らせると考えられている。実際には、光感受性物質は静脈投与後、腫瘍組織に集積し、光線により励起される。光線力学療法は機能温存を考慮にいたした侵襲の少ない治療法である。現在、我が国では光感受性物質フォトフリンによる光線力学療法として早期肺癌、早期胃癌、早期食道癌、早期子宮頸癌に保険適応されている。最近では光感受性物質の副作用として問題であった光過敏症が軽度ですむ第 2 世代光感受性物質としてレザフィリン (NPe6) が早期肺癌に対して、ビスダイン (Verteporfin) が滲出型加齢性黄斑変性症による脈絡膜新生血管に対して普及しつつある。悪性脳腫瘍の分野でも 5-アミノレブリン酸、フォトフリン、レザフィリンなどの光感受性物質による PDT が臨床応用されつつあるが、その殺細胞効果の低さから満足に行く結果が得られていないのが現状であり、新規の光感受性物質の開発が待たれている。

## 2. 研究の目的

本研究で用いる新規の光感受性物質は、共同研究者である群馬大学工学部応用化学科助教堀内宏明先生らが光線力学療法用に開発したものである。堀内らはポルフィリン誘導体にケイ素置換基を導入することにより、殺細胞効果を持つ一重項酸素の発生効率が増加することを見出した (*Chem. Lett.* 2006,

35, 662)。さらに、このポルフィリン誘導体

は悪性神経膠腫の細胞株 (U251 cell) に取り込まれ、従来のポルフィリン誘導体よりも強い殺細胞効果を示すことが確認された。本研究では新規の光感受性物質であるポルフィリン誘導体を使用した光線力学療法を確立するため、神経膠腫初代培養細胞、ヌードマウス腫瘍移植モデルにおける殺細胞効果を解析し、ヒトの悪性脳腫瘍治療においてこの新規ポルフィリン誘導体が光線力学療法に応用可能であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) ポルフィリン誘導体の細胞内局在と光線力学療法の効果についての解析

ヒト神経膠腫初代培養細胞の培養液に新規ポルフィリン誘導体を加え、24時間培養する。共焦点レーザー走査型顕微鏡を用い、細胞内に取り込まれた赤色蛍光で新規ポルフィリン誘導体の局在を観察する。光感受性物質はミトコンドリアなどの細胞内小器官と結合し、光により励起されると一重項酸素を発生し、ミトコンドリアを傷害、殺細胞効果を示すと説明されている。MitoTrackerでミトコンドリアを緑色に染色し、ミトコンドリアへの集積を観察する。癌細胞は一般的に低酸素状態にあり、低酸素で発現する低酸素誘導因子1によって血管内皮増殖因子 (VEGF)、グルコーストランスポーター (Glut1) などが誘導される。糖代謝は嫌氣的に傾き、ミトコンドリアの機能は低下する。従って、光感受性物質は必ずしもミトコンドリアに取り込まれる必要性はない。むしろ、重要なのは殺細胞効果で、癌組織が有する活性酸素発生 Xanthin oxidase系も活性化されることが望ましい。

ヒト神経膠腫初代培養細胞を96ウェルのプレートに培養し、培養液に種々の濃度で新規ポルフィリン誘導体を加えて24時間培養後、レーザー光を照射。その24時間後にMTT assayを行い、光線力学療法の効果を評価する。M

TT assayは生存細胞が黄色のMTTを青色のホルマザン産物へ転換することを利用し、吸光度を測定して生存細胞数を測定するもので、これによりin vitroでの光線力学療法の殺細胞効果を評価する。

#### (2) ヌードマウス移植腫瘍モデルでの検討

①動物実験は動物実験倫理を遵守し行う。ヌードマウスの背部皮下にヒト神経膠腫初代培養細胞を移植し、皮下移植モデルを作成する。また、小動物用脳定位固定装置、ハミルトンシリンジを用いてヌードマウスの脳内にヒト神経膠腫初代培養細胞を移植し、脳内移植モデルを作成する。

②ヌードマウス腫瘍移植モデルにおける新規ポルフィリン誘導体の体内動態解析と光線力学療法の効果についての解析

作成したヌードマウス腫瘍移植モデルの尾静脈より新規ポルフィリン誘導体を静脈投与し、腫瘍組織特異的な集積が得られているかどうかをGEヘルスケアバイオサイエンス社製の小動物用in vivo蛍光イメージングシステムを用いて解析する。また摘出脳の凍結切片を作製し、腫瘍組織特異的な集積が得られているかどうかを共焦点レーザー走査型顕微鏡を用いて観察する。

皮下移植モデルにおいて尾静脈より新規ポルフィリン誘導体を静脈投与後、光線力学療法を行って経時的に皮下腫瘍径を測定し、治療効果を判定する。治療を行ったヌードマウスの皮下腫瘍を摘出し、病理組織学的に治療効果を解析する。また、脳内移植モデルにおいて尾静脈より新規ポルフィリン誘導体を静脈投与後、光線力学療法を行い、ヌードマウスの生存曲線を得て治療効果を判定する。また、治療を行ったヌードマウスの脳を摘出し、病理組織学的に治療効果を解析する。なおこの研究は群馬大学生体調節研究所の穂坂正博 准教授の元で行った。

#### 4. 研究成果

最終的にヒト悪性神経膠腫の治療へ応用することを念頭に入れ、樹立された細胞株に比べてより生体内での状態に近いと考えられる初代培養細胞を用いて *in vitro* の検討を行った。倫理的な問題を遵守し、手術摘出したヒト悪性神経膠腫瘍組織より採取した腫瘍細胞を初代培養し実験に用いた。

まずヒト悪性神経膠腫の光線力学療法に一般的に用いられている 5-アミノレブリン酸を用いて検討を行った。培養液中に 5-アミノレブリン酸を添加して培養した後、蛍光顕微鏡にて観察を行った。5-アミノレブリン酸は細胞内に取り込まれただけでは蛍光は発せず、ミトコンドリアで Protoporphyrin IX へ変換されることにより赤色蛍光を発するようになる。細胞質全体がうっすら赤色蛍光を発し、その中に dot 状の濃い赤色蛍光が多数観察された。ミトコンドリアを緑色に標識することにより Protoporphyrin IX はミトコンドリアに多く局在していた。光線力学療法によりミトコンドリアの破壊から細胞死を誘発することが予測されたが、細胞内で 5-アミノレブリン酸が Protoporphyrin IX へ変換される必要があることや殺細胞効果を示す一重項酸素の産生効率の低さなどからその治療効果には限界があると考えられた。

次に、新規ポルフィリン誘導体を用いて検討を行った。培養液中に新規ポルフィリン誘導体を添加して培養した後、蛍光顕微鏡にて細胞内局在の観察を行った。新規ポルフィリン誘導体の赤色光はヒト神経膠腫初代培養細胞全体に観察され、細胞質内に取り込まれていることが確認された。また、ミトコンドリアを緑色に標識することにより、一部ではミトコンドリアにも結合していることが明らかとなった。続いてレーザー光の照射実験を行った。培養液中に新規ポルフィリン誘導体

を添加してヒト神経膠腫初代培養細胞を培養した後、レーザー光を照射して励起し、24 時間後に MTT assay で評価を行った結果、細胞死が誘発されていることが確認された。また、その殺細胞効果は濃度依存性であった。新規ポルフィリン誘導体は細胞内で他の物質へ変換される必要がなく、そのものが光線による励起により効率よく殺細胞効果を示すこと、ミトコンドリアにも結合するためミトコンドリアの破壊も期待できるという特徴を有するものと考えられ、従来の光感受性物質に比べて遜色のない有用なものと考えられた。

続いて *in vivo* での検討を行うため、ヌードマウス腫瘍移植モデルの作成を行った。まず腫瘍皮下移植モデルを作成すべくヒト神経膠腫初代培養細胞  $2 \times 10^6$  個をヌードマウス背中の皮下に移植したが、十分なサイズの腫瘍形成を示さず腫瘍移植モデルを樹立することが困難であった。今後の課題として腫瘍幹細胞マーカーを発現する細胞群を単離、培養して移植することや無血清培地で neurosphere を形成する細胞群を移植するなどの方法を模索している。

以上よりヒト悪性神経膠腫の光線力学療法への応用が可能な有望な光感受性物質と考えられ、今後、臨床応用のため更なる治療効果や安全性の検討が必要であると思われる。

#### 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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅原 健一 (SUGAWARA KENICHI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：50375573