

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870722

研究課題名（和文）5-ALA光線力学治療によるグリオーマ幹細胞の治療抵抗性の克服

研究課題名（英文）Improvement of therapeutic resistance of glioma stem cells by 5-ALA photodynamic therapy

研究代表者

鱒渕 誉宏（Masubuchi, Takahiro）

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：90512103

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：グリオーマ幹細胞の放射線・化学療法に対する治療抵抗性は、悪性グリオーマの治療における大きなハードルである。本研究では、グリオーマ幹細胞株（mesenchymal type 3種類、proneural type 2種類）を用いてALA-PDTを行った。その結果、ALA-PDTは、グリオーマ幹細胞に対してむしろ感受性が高く、PDT治療後には幹細胞性が低下するなどの優れた特性があることが判明した。

研究成果の概要（英文）：Therapeutic resistance to radiation therapy and chemotherapy of glioma stem cells is a major hurdle in the treatment of malignant glioma. In this study, ALA-PDT was performed using glioma stem cell lines (3 cell lines of mesenchymal type and 2 cell lines of proneural type). As a result, it was found that ALA-PDT is more sensitive to glioma stem cells and has superior characteristics such as decreased stemness after PDT treatment.

研究分野：脳神経外科

キーワード：光線力学治療 光線力学診断 5 - アミノレブリン酸 ポルフィリン ABCG2 腫瘍幹細胞 悪性神経膠腫 脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

グリオーマ幹細胞の放射線・化学療法に対する治療抵抗性は、悪性グリオーマの治療における大きなハードルである。しかし、我々の研究室は、5-ALA による光線力学治療 (ALA-PDT) が 4 種類のグリオーマ幹細胞株において、むしろ治療感受性であることを見出した。すなわち、ALA-PDT は、難治性の悪性グリオーマの治療に、極めて有用である可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、グリオーマ幹細胞株における 5-ALA 治療感受性の証明とその機序の解明である。具体的には下記の研究を行う。

- (1) グリオーマ幹細胞に対して ALA PDT が治療感受性であることを証明する。
- (2) グリオーマ幹細胞の ALA PDT 治療感受性の分子生物学的メカニズムを解明する。
- (3) 幹細胞に高発現する ABCG2 阻害が ALA-PDT 効果をさらに増強するかを検証する。
- (4) ALA-PDT の臨床応用に必要な、光照射量の安全域を確定する。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ幹細胞における PDT 抵抗性についての検証

Mesenchymal (type) のグリオーマ細胞株である GB-GSC1、GB-GSC2、GB-GSC3 および Proneural (PRO) type グリオーマ細胞株である GB-GSC4、GB-GSC5 のグリオーマ幹細胞 (GSC) とグリオーマ娘細胞 (GDC) に対して *in vitro* で 5-ALA を 0.3mM 4 時間暴露後に細胞内ポルフィリン量を測定した。また、同じ条件で PDT を行い、治療感受性を評価した。

また、GBM13 と GBM1123 をヌードマウスの脳腫瘍モデルにおける生存期間を ALA 単独、光照射単独、ALA-PDT 群に分けて評価した。

(2) グリオーマ幹細胞の 5-ALA PDT 治療感受性の分子生物学的メカニズムの解明

細胞内 Pp レベルは FACS を用いて評価した。*in vitro* で ALA-PDT を行った GSC をヌードマウスの頭蓋内に植え込み、生存期間を評価した。ALA-PDT 後に生き残った細胞を 3 週間培養し、マイクロアレイで解析した。ALA-PDT で生き残った細胞の幹細胞マーカーを qRT-PCR で解析した。

(3) ABCG2 阻害が ALA-PDD や PDD 効果や PDT 効果をさらに増強するかを検証

MD13 浮遊細胞に対して ALA 単独、lapatinib 単独、および ALA と lapatinib を併用したもので培養し、細胞内ポルフィリン量を flow cytometer を用いて 660nm の波長で検出した。

また、F98 rat glioma cell 脳腫瘍モデルをもちいて、5-ALA125mg/kg 腹腔内投与後の

脳切片におけるポルフィリン蛍光輝度を分光蛍光輝度計で測定し、lapatinib 投与による蛍光輝度の増加の程度を検証した。

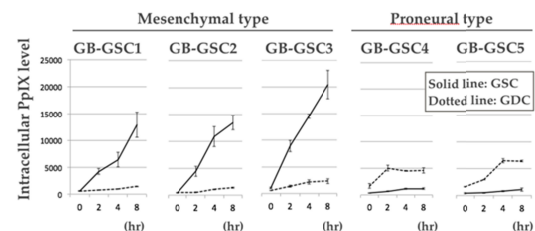
(4) PDT 用光照射量の安全域の解明

Fisher ラットに、5-ALA (0, 30, 60, 90, 120, 240 mg/kg) の腹腔投与を行った。5-ALA 投与 4 時間後、右大脳 7×7mm の領域に頭蓋骨上から脳に対して 635nmLED 光 (100mW/cm²) を照射 (0, 100, 400 J/cm²) した。照射 48 時間後に Evans blue を静注し、Evans blue の漏出分布から BBB 障害の程度を評価し、H.E 染色にて組織傷害の有無と程度を評価した。尚、100mW/cm² を経頭蓋骨に照射した場合の透過光量は 44.3±2.96 mW/cm² (Mean±SD, n=9) で、個体差は僅かであった。

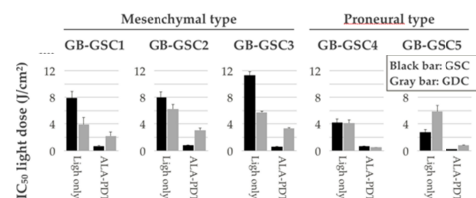
4. 研究成果

(1) グリオーマ幹細胞における PDT 抵抗性についての検証

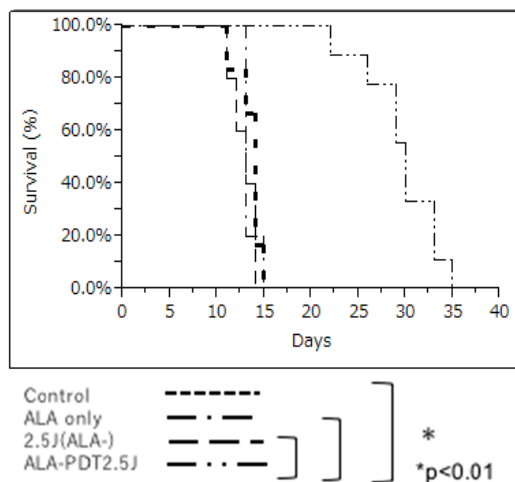
治療抵抗性で予後不良である mesenchymal type において、GSC が GDC よりもむしろ細胞内のポルフィリン濃度が高かった。一方、Proneural type においては、GSC においてポルフィリン濃度が低い傾向がみられた (下図)。



Mesenchymal type において、GSC が GDC よりも予想に反して治療感受性が高かった。一方、Proneural type においては、GSC において治療抵抗性がみられた (下図)。

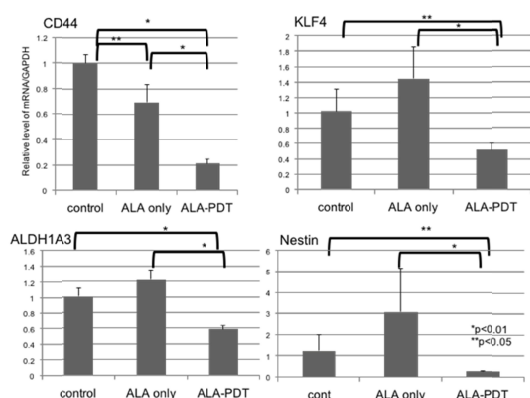


ALA-PDT 群ではヌードマウスの生存期間は著明に延長した (下図)。

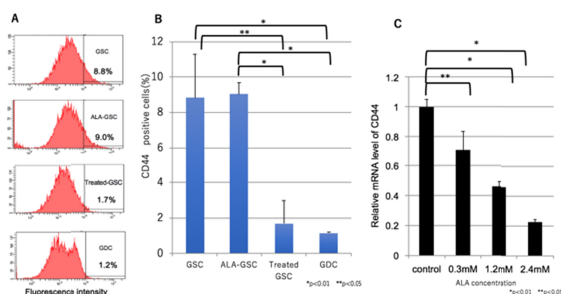


(2) グリオーマ幹細胞の 5-ALA PDT 治療感受性の分子生物学的メカニズムの解明

ALA-PDT 後の GSC の stem cell と mesenchymal marker について qRT-PCR で評価した。ALA-PDT 後の GSC では CD44、KLF4、ALDH1A3、Nestin の発現が低下していた（下図）。



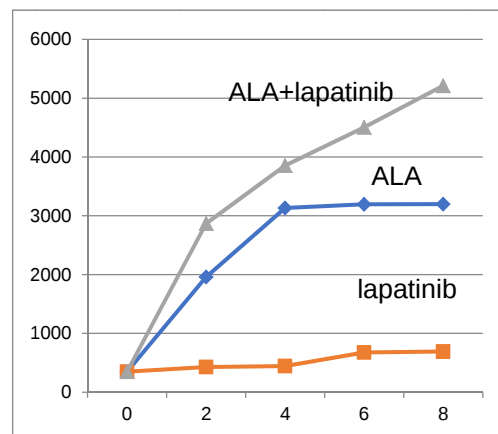
また、CD44 の発現量を FACS で測定した。treated GSC では CD44 の発現が優位に低下していた（下図）。



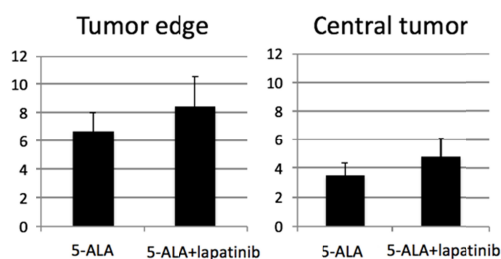
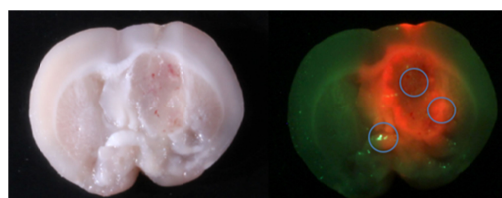
以上のことから、ALA-PDT は GSC に対し幹細胞性を低下させる効果があることが分かった。

(3) 幹細胞に高発現する ABCG2 阻害が ALA-PDT 効果を増強するかの検証

5-ALA 単独では細胞内のポルフィリン量は 4 時間辺りでプラトーになった。5-ALA と lapatinib の併用群は 8 時間後には、ALA 単独に比較して細胞内ポルフィリン量は 60%増加した（下図）。しかし、当初期待したほどの劇的な増強効果は得られなかった。



脳切片における蛍光輝度は、腫瘍辺縁部および中心部において lapatinib を併用することで約 20%増加した（下図）。



(4) PDT 用光照射量の安全域の解明

5-ALA 90mg/kg 投与の 100J/cm² で脳損傷が起こり始めた。5-ALA は臨床投与量の 4 倍であり、通常の投与量であれば安全に PDT が施行できることを示した（下表：BBB の破綻、組織障害の有無を表す）。

ALA (mg/kg)	0	30	60	90	120	240
0 J/cm ²	-	-	-	-	-	-
100 J/cm ²	-	-	-	+	+	+
400 J/cm ²	-	-	-	+	+	++

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

鱒淵 誉宏 (MASUBUCHI takahiro)
大阪医科大学・医学部・非常勤医師
研究者番号： 90512103