

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861278

研究課題名(和文) Photodynamic therapyによる脳腫瘍幹細胞の根絶

研究課題名(英文) Curetative treatment for glioblastoma with photodynamic therapy

研究代表者

貞廣 浩和 (SADAHIRO, Hirokazu)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50509320

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)：脳腫瘍幹細胞に対してPhotodynamic therapy(PDT)を行い、脳腫瘍幹細胞を死滅させることができることをin vitro、in vivoで明らかにし、脳腫瘍幹細胞をターゲットとした脳腫瘍治療において、PDTが効果的な治療になり得る可能性を検討した。

脳腫瘍幹細胞モデルを用いたxenograftにおいては、vitroではよく蛍光発色した。vivoでは蛍光発色は限局的であり、さらなる検討を要した。vitroとvivoの解離のみならず、本研究ではパラフィン切片ではなく、生細胞を用いる必要があり、これを薄くスライスし、PDDさらにPDTまで行うには、技術的課題の克服が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (5-ALA) induced photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) are used for patients with glioblastoma multiforme (GBM). The goal of this study was to investigate the effects of 5-ALA-induced PDD and PDT in GS cells in vitro. Three GS cell lines (G144, G179 and Y10) were obtained as primary cultures from GBM specimens. Four hours after addition of 5-ALA, PDD was evaluated based on detection of PpIX fluorescence using flow cytometry. The effect of PDT on the cells was assessed after irradiation at 20 J/cm² using an argon-pumped dye laser. PpIX was observed in more than 70% of GS cells from just after washing out of 5-ALA until 6 hours later. The GS cell death rate was 89% after PDT. 5-ALA-induced PDD and PDT are very effective for GS cells in vitro. These photodynamic techniques may be useful for diagnosis and therapy associated with GS cells.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 5-ALA

1. 研究開始当初の背景

多彩な phenotype を示す集合体である腫瘍塊の中には cancer stem cell が少数存在し、腫瘍形成・維持に深く関わっているとする癌幹細胞学説が提唱され、腫瘍研究の topic となっている。脳腫瘍においても脳腫瘍幹細胞 BTSC (brain tumor stem cell) が同定され、脳腫瘍形成・維持のソースとなっていることが証明された (Singh S et al. Nature 432: 396-401, 2004)。幹細胞マーカーである CD133 を発現する BTSC は、自己複製能および多分化能を持つ。BTSC 自身が自己複製して腫瘍のソースとして維持されつつ、一部は分化腫瘍細胞へ分化し、全体として heterogeneous な phenotype を持つ腫瘍塊を形成する。BTSC は放射線化学療法に強い耐性を持つため (Piccirillo SGM et al. Nature 444: 761-765)、通常 BTSC は残存し再発が起こる。つまり癌幹細胞学説に基づけば、腫瘍の根源である BTSC を駆逐する脳腫瘍幹細胞ターゲット療法こそが究極の治療法であるが、その具体的方法は未だ報告されていない。

一方、脳腫瘍摘出術の際に 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を用いた photodynamic diagnosis (PDD) が行われている (Stummer W et al. J Neurosurg 93:1003-13, 2000)。この 5-ALA は細胞内へム代謝経路に入るのであるが、腫瘍内においてのみ蛍光発色を示す protoporphyrin IX (PpIX) が蓄積する (Stummer W et al. J Photochem Photobiol B 45:160-169, 1998)。よって、手術中に励起光を照射することによって、腫瘍は蛍光を示し正常脳は蛍光を示さないため、これを頼りに腫瘍摘出を行っている。さらに PpIX 蛍光発色を利用し、photodynamic therapy (PDT) も行われている。これは蛍光発色した腫瘍に対し、laser を照射し腫瘍死を起こす治療で、深部で直達手術の難しい脳腫瘍や再発した脳腫瘍などに用いられている (Stummer W et al. J Neurooncol 87:103-109, 2008)。この PDT のメカニズムとして cytochrome c などを経た apoptosis が考えられており、効率よく腫瘍死を起こしている可能性がある (Inoue H et al. J Neurooncol 83:223-231)。また正常脳細胞では 5-ALA 投与による PpIX の発現はなく、laser 照射による正常脳細胞への影響はないとされている。

我々は、脳腫瘍より EGF/FGF 添加、血清非添加により Neurosphere + adhesive culture を用いることで BTSC の高純度脳腫瘍幹細胞長期培養システムを可能としてきた (Pollard SM, Yoshikawa K et al. Cell Stem Cell 4:568-580, 2009)。これらは長期継代培養が可能であり、腫瘍幹細胞のマーカーである CD133 や CD15 の陽性細胞を含み、heterogeneous な腫瘍形成能を有していることを証明した。また、EGF/FGF 非添加、血清添加の条件で 28 日間培養し、BTSC

を強制分化誘導することで CD133 や CD15 が低下することも確認した。さらに in vitro において 5-ALA 投与による PpIX の発現を BTSC と強制分化誘導を行った細胞とで比較した。BTSC は強制分化誘導した細胞に比し、有意に PpIX の発現が高く、持続して蛍光発色していることを証明した。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍に対して 5-ALA を用いた PDT には PDT が行われている。現在脳腫瘍研究のトピックとなっている脳腫瘍幹細胞 BTSC が 5-ALA を用いた PDD や PDT にどのように反応するかは、報告がない。我々は先行研究として、脳腫瘍幹細胞が 5-ALA を用いた PDD で十分な蛍光発色を示すことを in vitro で明らかにした。本研究では、脳腫瘍幹細胞に対して PDT を行い、脳腫瘍幹細胞を死滅させることができることを in vitro、in vivo で明らかにし、脳腫瘍幹細胞をターゲットとした脳腫瘍治療において、PDT が非常に効果的な治療になり得る可能性について検討した。

3. 研究の方法

(1) ヒト悪性神経膠腫サンプルから脳腫瘍幹細胞 (BTSC) 細胞株の樹立と長期安定培養
すでに細胞株として確立している BTSC の cell line を複数使い、EGF, FGF, LIF 添加 (血清非添加) 培養液にて adhesion monolayer cell culture で培養を継続した。なお、EGF, FGF, LIF 添加 (血清非添加) 培養液を一貫して用いることで、BTSC のみが選択的に濃縮培養され続けることを確認している (Pollard SM, Yoshikawa K et al. Cell Stem Cell 4:568-580, 2009)。

(2) BTSC の ABCG2 トランスポーターと ferrochelatase の発現の確認

BTSC に ABCG2 トランスポーター抗体を用いて flow cytometry を行い、BTSC 表面の ABCG2 トランスポーターの発現を確認した。また、1mM の 5-ALA を事前に投与し、PpIX の蛍光発現と ABCG2 トランスポーターの発現の関係を調べた。さらに、BTSC から RNA を抽出し real time PCR を用いて、タンパクを抽出し、Western-blo 法により ABCG2 トランスポーターと ferrochelatase の発現を調べ、BTSC に EGF, FGF 非添加、血清添加の条件で強制分化誘導した non-BTSC とこれらの発現を比較した。

(3) BTSC への photodynamic diagnosis (PDT) in vitro

BTSC を single cell suspension し、coating した平底の 96well plate に 20000/well となるよう分配した。24 時間放置し、1mM の 5-ALA を投与し 4 時間放置した。5-ALA を wash out しエキシマ・ダイ・レーザー (浜松ホトニクス) を照射した。照射の線量に関してはあらかじめ pilot study を行い、適切な照射量を

調節した。照射後は24時間放置し、MTT assayを行い細胞の生存率を測定した。5-ALAを入れず laser も照射しないものを normal control 群とし、5-ALAのみを dark control 群、laserのみを light control 群とし、5-ALAを入れ laser を照射するものを PDT 群とした。normal control 群に比し、どの程度の細胞死が得られたかを各群で比較した。また、BTSCを強制分化誘導した細胞に対しても PDT を行い、BTSC と細胞死の割合を比較した。

(4) BTSC を移植したマウス脳腫瘍モデルに対する photodynamic diagnosis (PDD) の検討

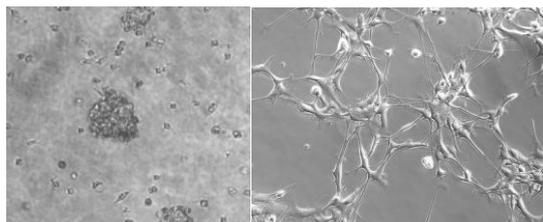
既に確立している BTSC 細胞株由来脳腫瘍マウスモデルを作製した後、マウスに 5-ALA を経口投与した。数時間の後マウスを sacrifice し、脳を一塊として摘出した。腫瘍部分を選択的に取り出し、single cell suspension して flow cytometry を用いて、PpIX の蛍光と同時に CD133 と CD15 の発現を確認し、腫瘍幹細胞マーカーと PpIX の共発現の有無を調べた。また、摘出脳の冠状断切片を作製し、PpIX の発現を蛍光顕微鏡で確認した後、それをホルマリン固定した。ホルマリン固定後、nestin や GFAP の免疫染色を行い、PpIX の発現との関係を調べた。

(5) BTSC を移植したマウス脳腫瘍モデルに対する photodynamic diagnosis (PDD) の検討

既に確立している BTSC 細胞株由来脳腫瘍マウスモデルを作製した後、マウスに 5-ALA を経口投与した。数時間後 sacrifice し、腫瘍生着部分の冠状断切片を作製し、これに PDT を行った。24 時間培養液に浸した後、ホルマリン固定し、各種染色により、BTSC に necrosis/apoptosis が起こっているかを検討した。また、脳腫瘍マウスモデルに 5-ALA を投与した後、麻酔下に開頭を行って脳表より PDT を実施し、24 時間後 sacrifice を行い、同様に組織染色を行った。In vitro の PDT 実験と同様に何も行わない normal control 群、5-ALA の投与のみを行う dark control 群、laser のみを行った light control 群をと比較し、PDT 群が強い細胞死を起こしているかも検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト悪性神経膠腫サンプルから脳腫瘍幹細胞 (BTSC) 細胞株の樹立と長期安定培養



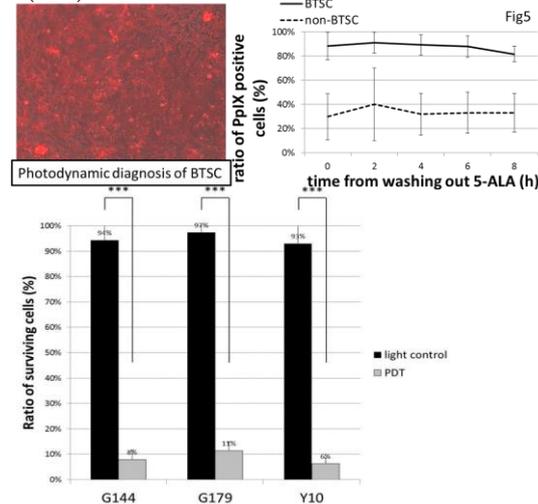
摘出手術サンプルより Neurosphere を作成後、接着培養を行い、長期安定培養が可能であった。

(2) BTSC の ABCG2 トランスポーターと ferrochelatase の発現の確認

ABCG2 トランスポーターの flow cytometry を行ったがうまく同定できず、5-ALA から PpIX の代謝の検討は断念した。

(3) BTSC への photodynamic diagnosis

(PDT) in vitro



BTSC は 5-ALA 投与に対し、十分赤色蛍光を発色し、PDT では 72 時間後に 90%以上の細胞死を確認した。

(4) BTSC を移植したマウス脳腫瘍モデルに対する photodynamic diagnosis (PDD) の検討

BTSC 細胞株由来 mouse 脳腫瘍モデルを作成し Photodynamic diagnosis (PDD) の検討を進めた。脳腫瘍モデルマウスに対し 5-ALA を経口投与し、4 時間後に sacrifice し、脳を摘出した。その後蛍光顕微鏡にて蛍光発色の確認を行ったが、蛍光は腫瘍の一部にとどまり、腫瘍全体をカバーしていなかった。

(5) BTSC を移植したマウス脳腫瘍モデルに対する photodynamic Therapy (PDT) の検討

脳腫瘍幹細胞モデルを用いた xenograft においては、vitro ではよく蛍光発色したものの、vivo では蛍光発色は限局的であり、PDD、さらに PDT への成果は難しかった。vitro と vivo の解離のみならず、本研究ではパラフィン切片ではなく、生細胞を用いるが必要があり、これを薄くスライスし、PDD、さらに PDT まで行うのは技術的に困難であった。



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 1 件）

Sadahiro H, Yoshikawa K, Ideguchi M,
Kajiwara K, Ishii A, Ikeda E, Owada Y,
Suzuki M、Brain Tumor Pathology 2014,
31(2), 77-84
DOI: 10.1007/s10014-013-0149-x

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

無し

〔その他〕

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

貞廣浩和 (SADAHIRO, Hirokazu)

山口大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：50509320