

5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 李, 偉 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1184

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 331号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	李 偉		
論文題目	5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells (多剤耐性白血病細胞に対する 5-aminolaevulinic acid の代謝及び光線力学的治療効果の検討)		

博士(医学) 李 偉

論文題目

5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells

(多剤耐性白血病細胞に対する5-aminolaevulinic acidの代謝及び光線力学的治療効果の検討)

論文の内容の要旨

[はじめに]

自家骨髄移植(自己幹細胞移植)法は白血病治療の重要な手段として広く行われている。しかし、再発が多いのが欠点であり、その原因の一つに移植片の微小残存腫瘍細胞が考えられている。この微小残存腫瘍細胞を除去する(purging)方法は、残存腫瘍細胞には多剤耐性蛋白P-glycoprotein(P-gp)が高発現しているため、薬物処理法はあまり効果的ではない。また、purgingには造血幹細胞に影響を与えないよう高い腫瘍選択性が要求される。光線力学的治療法(PDT)は近年開発された癌治療法で、腫瘍細胞に特異的に取込まれた光感受性物質とレーザー光が光化学反応した結果発生する一重項酸素を利用して、腫瘍を選択的に破壊するものである。PDTはpurgingにも有効であることが報告され、中でも最近、光感受性物質として光毒性が低く腫瘍選択性に優れている5-aminolaevulinic acid(ALA)が研究され注目されている。ALAは従来の光感受性物質とは異なりALA自体に光感受性はなく、ALAが細胞内に取り込まれた後、細胞内酵素により代謝されprotoporphyrin IX(PpIX)が生成されることにより光感受性を得る。この時、おのこの細胞が持つ酵素活性差により、腫瘍細胞では特異的にPpIXを多く蓄積する。現在まで白血病細胞におけるALA-PDTの有効性は報告されているが、多剤耐性細胞への有効性は検討されていない。本研究の目的は多剤耐性白血病細胞に対してALA-induced PpIXの代謝におけるP-gpおよびferrochelatase活性の関与、ALA-PDTの有効性について検討することである。

[材料ならびに方法]

研究には、親株NB4、NOMO-1、K562細胞と多剤耐性mdr遺伝子導入した細胞株NB4/MDR、抗癌剤で誘導した多剤耐性細胞株NOMO-1/ADR、K562/ADR細胞を用いた。

光感受性物質の測定：細胞を各濃度のALAとともに培養し、経時的にフローサイトメトリで細胞内PpIXを測定した。細胞外PpIXは蛍光分光光度計で測定した。

細胞酵素活性の測定：細胞内ferrochelatase活性はHPLC法で測定した。

PDT治療効果の検討：細胞をALAとともに8時間培養した後レーザー照射を行い、さらに24時間培養し、MTT法で評価した。細胞形態はMay-Grünwald-Giemsa染色して観察し、アポトーシスはDNA断片で確認した。

[結果]

1. ALA処理により各細胞のPpIX細胞内蓄積は8時間後ピークに達した。
2. NB4/MDRはNB4より高いPpIX蓄積性を認めた。NOMO-1/ADR細胞はNOMO-1よりPpIX蓄積性は低い。K562とK562/ADRには両者とも微量のPpIXを認めた。P-gp阻害剤verapamilの細胞内PpIX蓄積への影響は認められなかった。
3. 細胞外PpIXは細胞内PpIX量とは一致しなかった。

4. 細胞内ferrochelatase活性はK562、K562/ADR細胞に高く認められたが、ほかの細胞株は低かった。NB4/MDR細胞はNB4より少し低くなっていたが、NOMO-1/ADRはNOMO-1より倍以上高くなっていた。
5. PDT効果はNB4、NB4/MDR、NOMO-1およびNOMO-1/ADR細胞に認められたが、K562、K562/ADR細胞には認められなかった。
6. 治療効果の細胞形態について、NOMO-1/ADR細胞はPDTによりアポトーシスで排除されていたが、NOMO-1、NB4、NB4/MDR細胞はネクローシスで排除されていた。

〔結論〕

1. P-gpはALAの代謝およびPpIXの蓄積と排出に関与していない。
2. 多剤耐性白血病細胞に対する細胞内PpIXの蓄積は、細胞内ferrochelatase活性により調整されていると考えられる。
3. ALA-PDTは多剤耐性との交叉耐性は認められない。
4. ALA-PDTによる細胞死形態は照射量及びALA投与量により異なる。
5. ALA-PDTは多剤耐性白血病における自己幹細胞移植時のpurging応用の可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

〔はじめに〕

白血病治療において自己幹細胞移植法が広く用いられている。しかし再発が多い欠点がある。その原因の一つとして移植片に腫瘍細胞の残存が考えられている。腫瘍細胞に多剤耐性蛋白P-glycoprotein (P-gp) が発現しているため、この腫瘍細胞を除去(purge)する方法として薬物療法は効果的ではない。またpurgingには造血幹細胞に傷害を与えないよう高い腫瘍選択性が要求される。

光線力学的治療法(PDT)は、腫瘍に特異的に取り込まれた光感受性物質に励起光を当てて光化学反応の結果発生する一重項酸素を利用して、腫瘍を選択的に破壊するものである。PDTはpurgingにも有効であるとの報告がある。今回、申請者はPDTに用いる光感受性物質として光毒性が低く腫瘍選択性に優れている5-aminolaevulinic acid (ALA)を用いて多剤耐性白血病細胞におけるALAの効果、ALA投与後のメカニズムについて基礎的な検討を行うことを考案した。

ALAそれ自体には光感受性はなく、ALAが細胞内に取り込まれた後、細胞内の複数の酵素によりprotoporphyrin IX (PpIX)になると光感受性を持つ。レーザー光はPpIXを励起して細胞は死に至る。これまでに白血病細胞に対してALA-PDTが有効であるとの報告はあるが、多剤耐性白血病細胞に対する検討はなされていない。

本研究の目的は多剤耐性白血病細胞に対してALA-induced PpIXの代謝におけるP-gpおよびferrochelatase活性の関与、ALA-PDTの有効性について検討することである。

〔対象と方法〕

(1)P-gpを発現しない株として親株NB4、NOMO-1、K562細胞と、P-gpを発現する株として多剤耐性mdr遺伝子を導入した細胞株NB4/MDR、抗癌剤で誘導した多剤耐性細胞株NOMO-1/ADR、K562/ADR細胞をもちいた。(2)細胞をALAとともに培養し、経時的にフローサイトメトリで細胞内PpIXを測定した。細胞

外PpIXは蛍光分光光度計で測定した。(3)細胞内ferrochelatase活性をHPLC法で測定した。(4)PDT治療効果は、ALA存在下に細胞を8時間培養後レーザー照射を行い、さらに24時間培養し、MTT法で測定した。また細胞形態を観察し、apoptosisをDNA断片化から確認した。

〔結果〕

- (1) ALA処理後、細胞内PpIXの蓄積は8時間後にピークに達した。
- (2) PpIXの細胞内蓄積はNB4/MDRはNB4より高く、NOMO-1/ADRはNOMO-1より低く、K562/ADR、K562はともに低値を示した。
- (3) 細胞外PpIX濃度は細胞内PpIX濃度と相関しなかった。
- (4) Ferrochelatase活性は細胞内PpIX量と逆相関していた。
- (5) PDTの効果はPpIXを蓄積していた細胞NB4、NB4/MDR、NOMO-1、NOMO-1/ADRに強く認められた。
- (6) PDTによりNOMO-1/ADR細胞にはapoptosisが強く現れ、NB4、NB4/MDR細胞には壊死が認められた。

〔結論〕

- (1) P-gpはALAの代謝、PpIXの蓄積に関与していない。
- (2) 多剤耐性白血病細胞におけるPpIXの蓄積は細胞内ferrochelatase活性に調整されている。白血病多剤耐性細胞ではPpIXは十分に蓄積された。
- (3) ALA-PDTでは多剤耐性との交叉耐性は認められない。
- (4) ALA-PDTによる細胞死形態は光照射量、ALA投与量により異なる。

これらのことからALA-PDTは多剤耐性白血病における自己幹細胞移植時のpurguingに応用できる可能性がある。

多剤耐性白血病に対して行われる自己幹細胞移植においてALAを用いた、purguingが可能であることについての報告はなく、基礎的検討を含め、PDTを考案したことを審査員一同高く評価した。

この発表の際、申請者に次のような質問がなされた。

- 1) 光感受性物質の分類で第1世代と第2世代の違いは何か
- 2) ALA、Rhodaminの細胞内蓄積機序はなぜ違うか
- 3) PpIXは細胞内のどこに局在するか
- 4) P-pgは細胞のどこに存在するか
- 5) K562とNB4、NOMO-1とでFC活性はちがうか
- 6) PpIXが細胞外(medium内)に存在する理由
- 7) PDTでapoptosisとnecrosisが起こるのはなぜか
- 8) 細胞膜の透過性について
- 9) in vivoでPDTを行う時の問題点

これらの質問に対し申請者の解答はおおむね適切であり、本研究での問題点を十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 中 村 達
副査 寺 川 進 副査 梅 村 和 夫