



Apotosis of gastic cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with Photofrin

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 高平, 健一郎 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/315

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	医博論第 4 1 4 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 1 月 2 0 日
氏 名	高 平 健一郎		
論文題目	<p>Apoptosis of gastric cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with Photofrin (胃癌細胞 MKN45 に対するフォトフリンを用いた光線力学治療によるアポトーシスについて)</p>		

博士(医学) 高 平 健一郎

論文題目

Apoptosis of gastric cancer cell line MKN45 by photodynamic treatment with Photofrin

(胃癌細胞株MKN45に対するフォトフリンを用いた光線力学治療によるアポトーシスについて)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

光線力学治療(PDT)は、現在、癌治療法のひとつとして確立されている。適度な波長の光照射により励起された光感受性物質は、一重項酸素を放出し細胞障害を引き起こす。1991年にAgarwalらがマウスのリンパ腫細胞にフタロシアニンを光感受性物質として用いてアポトーシスが誘導されることを報告して以来、多数のPDTによるアポトーシスの研究が報告された。それらの報告によると、PDT統一の細胞障害機序はなく、投与された光感受性物質、対象となる細胞、光の強さや照射時間などに影響される。日本では、20年以上も前からフォトフリンを用いた胃癌に対するPDTがおこなわれているが、フォトフリンによる胃癌細胞への細胞障害機序は十分に解明されておらず、アポトーシスの観点からPDTの細胞障害を研究した。

〔材料ならびに方法〕

光照射は、波長441nm、先端出力5mW/cm²のHe-Cdレーザーを用い、エネルギー量を1J/cm²にした。

はじめに、ヒト胃癌細胞株のMKN45細胞に対して、PDTの細胞障害効果をメチルテトラゾリウム法(MTTアッセイ)にて調べた。

アポトーシスは、DNAの断片化をアガロースゲルでの電気泳動で評価し、形態学的変化は、蛍光顕微鏡で観察した。カスパーゼ活性の定量は、カスパーゼプロテアーゼアッセイによって計測した。Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethyl ketone (VAD fmk) をカスパーゼファミリーの阻害剤として使用した。

ミトコンドリア膜の透過性は、ローダミン123の取り込みをフローサイトメトリーで測定した。

〔結果〕

PDTの効果は、光の照射量とフォトフリンの濃度に比例した。10 μ g/mlのフォトフリンでは、光照射96時間後に95%の細胞障害を認めた。5 μ g/ml以下のフォトフリンでは光照射96時間後にはコントロールと変化がなかった。また、20 μ g/ml以上では、光照射なしでも細胞毒性を認め、以後の実験では、10 μ g/mlのフォトフリンを用いた。

DNAの階段状断片化は、PDT60分後から認められた。PDT30分以内、あるいはフォトフリンのみ、光照射のみでは検出されなかった。蛍光顕微鏡では、典型的なアポトーシスで認められるクロマチンの凝集と断片化を示した。

カスパーゼ3と9様の活性は、PDT15分後に最も上昇し、120分後まで続いた。カスパーゼ阻害剤VAD fmkを10 μ M以上加えると、DNAのラダー形成は阻害された。しかし、MTTアッセイで測定した細胞障害効果は、VAD fmkの有無に違いはなかった。

フローサイトメトリーは、PDT30分後のローダミン123の低下を示した。PDT15分後では、取り込みは

低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。

〔考察〕

この実験では、対象が単層の細胞であり低出力レーザーを選んだ。

5 μ g/mlのフォトフリンでは、PDTの2時間後に細胞数は減少したが、24時間後では、再び増殖しはじめており、96時間後では、PDTグループとコントロールグループでは差がみられなかった。

MTTアッセイは、ミトコンドリアの機能に依存しているため、PDTでは生細胞が低く見積もられた可能性がある。

一方、10 μ g/ml以上のフォトフリンでは、細胞死は、光照射2時間後以降も進行した。この細胞毒性は、早期のアポトーシスだけでなく、遅発性の細胞障害も関与すると考えられた。

リンパ腫細胞やヒラ細胞において、PDTによってミトコンドリアのチトクロームCの放出を伴ったカスパーゼ活性化がおこるとの報告がある。

我々の研究では、PDT60分後にDNAのラダーが示され、アポトーシスの特徴とされる核の凝集、核の断片化などがみられた。ローダミン123の取り込みは、ミトコンドリアの膜の透過性に相關するため、ミトコンドリア膜のポテンシャルは、PDT後に落ちていると推測された。PDTがミトコンドリア膜を破壊し、続いてカスパーゼの活性化を引き起こしたと考えられた。

〔結論〕

胃癌細胞株MKN45細胞に対するフォトフリンを用いたPDTは、カスパーゼの活性化を伴う早期のアポトーシスを起こしたが、カスパーゼ阻害剤は、細胞死に影響しなかった。このアポトーシスは、ミトコンドリアの機能に依存したもので、ここでおきている細胞障害は、ミトコンドリアがターゲットになっていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

光線力学治療(PDT)は、現在、癌治療法のひとつとして確立されている。適度な波長の光照射により励起された光感受性物質は、一重項酸素を放出し細胞障害を引き起こす。1991年にAgarwalらがマウスのリンパ腫細胞にフタロシアニンを光感受性物質として用いてアポトーシスが誘導されることを報告して以来、多数のPDTによるアポトーシスの研究が報告された。それらの報告によると、PDT統一の細胞障害機序はなく、投与された光感受性物質、対象となる細胞、光の強さや照射時間などに影響される。日本では、20年以上も前から胃癌に対するPDTがおこなわれているが、sodium porfimer(フォトフリン)による胃癌細胞への細胞障害機序は十分に解明されていなかった。申請者は臨床自験例をふまえて下記のような実験を行い、特にアポトーシスの観点からPDTの細胞障害について論じた。

〔材料ならびに方法〕

光照射は、波長441nm、先端出力5mW/cm²光照射は、波長441nm、先端出力5mW/cm²のHe-Cdレーザーを用い、エネルギー量を1J/cm²にした。

はじめに、ヒト胃癌細胞株のMKN45細胞に対して、PDTの細胞障害効果をメチルテトラゾリウム法(MTTアッセイ)にて調べた。

アポトーシスは、DNAの断片化をアガロースゲルでの電気泳動で評価し、形態学的変化は、蛍光顕微鏡で観察した。カスパーゼ活性の定量は、カスパーゼプロテアーゼアッセイによって計測した。Z-Val-Ala-Asp-Fluoromethyl ketone (VAD fmk) をカスパーゼファミリーの阻害剤として使用した。

ミトコンドリア膜の透過性は、ローダミン123の取り込みをフローサイトメトリーで測定した。

〔結果〕

PDTの効果は、光の照射量とフォトフリンの濃度に比例した。10 μ g/mlのフォトフリンでは、光照射96時間後に95%の細胞障害を認めた。5 μ g/ml以下のフォトフリンでは光照射96時間後にはコントロールと変化がなかった。また、20 μ g/ml以上では、光照射なしでも細胞毒性を認め、以後の実験では10 μ g/mlのフォトフリンを用いた。

DNAの階段状断片化は、PDT60分後から認められた。PDT30分以内、あるいはフォトフリンのみ、光照射のみでは検出されなかった。蛍光顕微鏡では、典型的なアポトーシスで認められるようなクロマチンの凝集と断片化像を示した。

カスパーゼ3と9様の活性は、PDT15分後に最も上昇し、120分後まで続いた。

カスパーゼ阻害剤VAD fmkを10 μ M以上加えると、DNAのラダー形成は阻害された。しかし、MTTアッセイで測定した細胞障害効果は、VAD fmkの有無に違いはなかった。

フローサイトメトリーは、PDT30分後のローダミン123の低下を示した。PDT15分後では、取り込みは低下傾向を示したが、有意差は認められなかった。

申請者は、この実験で、対象が単層の細胞であることから、低出力レーザーを選んだことは特記すべきである。結果としては、5 μ g/mlのフォトフリンでは、PDTの2時間後に細胞数は減少したが、24時間後では、再び増殖しはじめており、96時間後では、PDTグループとコントロールグループでは差がみられなかった。

MTTアッセイは、ミトコンドリアの機能に依存しているため、PDTでは生細胞が低く見積もられた可能性がある。一方、10 μ g/ml以上のフォトフリンでは、細胞死は、光照射2時間後以降も進行した。この細胞毒性は、早期のアポトーシスだけでなく、遅発性の細胞障害も関与すると考えられた。

リンパ腫細胞やヒーラ細胞において、PDTによってミトコンドリアのチトクロームCの放出を伴ったカスパーゼ活性化がおこるとの報告がある。本実験でPDT60分後にDNAのラダーが示され、アポトーシスの特徴とされる核の凝集、核の断片化などがみられた。ローダミン123の取り込みは、ミトコンドリアの膜の透過性に相関するため、ミトコンドリア膜のポテンシャルは、PDT後に落ちていると推測された。PDTがミトコンドリア膜を破壊し、続いてカスパーゼの活性化を引き起こしたと考えられた。

以上の結果より、申請者は胃癌細胞株MKN45細胞に対するフォトフリンを用いたPDTは、カスパーゼの活性化を伴う早期のアポトーシスを起こすこと、しかしカスパーゼ阻害剤は、細胞死に影響しなかったことを明らかにし、このアポトーシスは、ミトコンドリアの機能に依存したもので、ここでおきている細胞障害はミトコンドリアがターゲットになっていると結論づけた。

審査委員会はこの論文について以下の質問を行った。

- 1) PDTの歴史上、エオジンも増感剤として使われたのか
- 2) 各種光感受性増感剤の組織親和性について
- 3) フォトフリンがオリゴマーというが、n(モノマーの数)はどのくらいか
- 4) 実験時、ディッシュの底面からあてるときの波長の範囲と線量について

- 5) He-Cdレーザー光を用い、441nmの波長を選んだ理由
- 6) フォトフリン5 μ g/mlと10 μ g/mlとで劇的に違うのは何故か
- 7) DNA断片化のラダーを同定するキットの成分と操作法
- 8) アポトーシスや光感受性を決める細胞の状態はなにか
- 9) 光感受性と細胞周期との関係について
- 10) PDTとVADfmk添加の時間的關係について
- 11) フォトフリン以外に臨床応用されている光感受性物質について
- 12) 胃癌に対するPDTの適応と将来展望について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、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	梶	村	春	彦	
	副査	瀧	川	雅	浩	副査 鈴木昌八