



Cell-cycle-dependent efficacy of photodynamic therapy with ATX-S10(Na)

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: 佐野, 宗孝 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/355

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 3 1 号	学位授与年月日	平成 1 8 年 9 月 2 2 日
氏 名	佐 野 宗 孝		
論文題目	Cell-cycle-dependent efficacy of photodynamic therapy with ATX-S10(Na) (ATX-S10(Na)を用いた光線力学的治療の細胞周期に依存した効果)		

博士(医学) 佐野 宗孝

論文題目

Cell-cycle-dependent efficacy of photodynamic therapy with ATX-S10(Na)

(ATX-S10(Na)を用いた光線力学的治療の細胞周期に依存した効果)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

光線力学的治療(PDT)は、様々な悪性腫瘍に対する有効な治療法である。しかし、しばしば病変の再発を認めるため、PDTのメカニズムを明らかにし、その効果を改善させることが重要である。

いくつかの研究でPDTの効果が細胞周期に依存することが証明されており、ヘマトポルフィリン誘導体を用いたPDTではS期中期の細胞に、アミノレブリン酸を用いたPDTではS期とG₂期の細胞に特に感受性があると報告されている。これを利用して、S期に細胞を停止させるマイトマイシンCを併用すると、PDTに対する細胞の感受性が増加したことを示す報告もある。

最近、多くの水溶性光感受性物質が開発され精力的に研究されているが、これら薬剤におけるPDT感受性と細胞周期との関係についてはまだ十分に理解されていない。そこで我々は、水溶性光感受性物質であるATX-S10(Na)と同調培養したHeLa細胞を用いて、細胞周期と光感受性との関係について調べた。

〔材料ならびに方法〕

対数増殖期にある子宮頸癌由来のHeLa S3細胞に、2 mMチミジンを16時間接触させてG₁-S期境界に同調培養した(チミジンプロック法)。これに24 μ Mデオキシシチジンを加えて同調を解除した後、2または3時間間隔で細胞を採取して、フローサイトメーターと解析ソフトを用いて各時間における細胞周期の割合を計算した。この結果から、HeLa S3細胞におけるS期、G₂/M期、G₁期に相当する時間帯を決定した。つぎに、それぞれの細胞周期に一致させて5、10、25 μ g/mlのATX-S10(Na)をHeLa S3細胞に2時間接触後、波長670 nm、エネルギー密度160 mW/cm²の半導体レーザーを20 J/cm²照射し、24時間後にMTTアッセイで細胞の生存率を測定した。さらに、各細胞周期に10 μ g/mlのATX-S10(Na)を2時間接触させた後、1%ドデシル硫酸ナトリウムで細胞を溶解した(この際、細胞数も測定)。この細胞溶液の上清に413 nmの励起光を当て、670 nmにおける蛍光強度を蛍光分光光度計で測り、あらかじめ求めてあったATX-S10(Na)濃度と蛍光強度との関係から、10⁵個細胞あたりの細胞内ATX-S10(Na)濃度を算出した。統計処理は一元配置分散分析法(one-way ANOVA)と多群比較検定(Scheffe法)を用いた。

〔結果〕

同調培養を解除してから2時間後にS期、6時間後にG₂/M期、10および12時間後にG₁期の割合が最も高かった。これよりATX-S10(Na)を2時間接触させる時間を、S期は同調培養解除後1.5-3.5時間、G₂/M期は5.5-7.5時間、G₁期は10-12時間に決定した。

それぞれの細胞周期において行ったPDTの効果は、投与したATX-S10(Na)濃度に依存して認められ、かつS期とG₂/M期の細胞はG₁期の細胞よりPDTに対する感受性が有意に高かった(ATX-S10(Na)が10 μ g/mlの場合、S期、G₂/M期、G₁期の生存率はそれぞれ37.0%、38.9%、56.7%)。

10 μ g/mlのATX-S10(Na)を2時間接触させた際の細胞内ATX-S10(Na)濃度は、S期とG₂/M期の細胞がG₁期

の細胞より有意に多かった(10⁵個細胞あたりS期: 43.9 ng、G₂/M期: 36.2 ng、G₁期: 25.0 ng)。

〔考察〕

今回の検討結果から、1)PDTの効果は投与したATX-S10(Na)濃度に依存して認められること、2)S期とG₂/M期の細胞はG₁期の細胞よりPDTに対する感受性が有意に高いこと、3)ATX-S10(Na)の細胞内取り込みはS期とG₂/M期の細胞がG₁期の細胞より有意に多いことが明らかとなった。

ATX-S10(Na)の細胞内取り込みが細胞周期に依存し、G₀/G₁期よりもS期とG₂/M期の細胞に多いことについては、非同調培養のグリオーマ細胞での検討でも報告されており、G₁期の細胞よりもS期とG₂/M期の細胞の方がPDTに対する感受性が高い理由の一つとなっている可能性がある。

ATX-S10(Na)の細胞内取り込みが細胞周期依存性であることの理由は不明であるが、子宮頸癌由来NHIK3025細胞の大きさやヒト大腸癌由来WiDr細胞の表面積が、G₀/G₁期からG₂/M期に至る細胞周期に一致して増加するとともに、取り込まれるフォトフリンIIの蛍光も比例して増加したとの報告などを考慮すると、細胞周期毎の細胞サイズの違いがATX-S10(Na)の細胞周期に依存した取り込みに影響している可能性がある。しかし、フォトフリンIIや他の光感受性物質を用いたPDTでは、M期において微小管形成を阻害して細胞死に至らせるとの報告もあり、ATX-S10(Na)を用いたPDTによる細胞障害が細胞周期依存性である理由として、ATX-S10(Na)の細胞内取り込みの差以外の機序が介在している可能性も否定できない。

今回の結果は、細胞周期をS期やG₂/M期にとどめる作用のある抗腫瘍薬とATX-S10(Na)を用いたPDTを併用すると相乗効果が得られる可能性を示している。

〔結論〕

細胞周期によって細胞内のATX-S10(Na)濃度が異なり、これがATX-S10(Na)を用いたPDTの効果の細胞周期依存性に関係している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

〔はじめに〕

光線力学的治療(PDT)は、さまざまな悪性腫瘍に対する有効な治療法である。PDTは、正常な細胞よりむしろ癌細胞に選択的に光感受性物質が集積するため、癌細胞の致死損傷を誘導することができる。しかしながら、悪性病変の再発がしばしば認められる。従って、PDTの詳細な機序を明らかにし、その効果を改善することは重要である。

いくつかの研究でPDTの効果は細胞周期に依存することが報告されている。ヘマトポルフィリン誘導体によるPDTの場合、S期中期の細胞が最も感受性が高い。アミノレブリン酸によるPDTの場合、プロトポルフィリンIXの産生のためS期とG₂期の細胞感受性が高い。従って、化学療法剤によるPDTの効果は細胞周期によって異なる。Maらの研究はマイトマイシンCがS期-遮断を誘発するので、マイトマイシンCによってPDTの前にS期の細胞を増加させ、PDTに対する細胞の感受性が増すことができることを示した。近年、多くの親水性光感受性薬剤の報告がなされているが、これらの薬剤によるPDTに対する細胞周期と細胞感受性の関係はまだ分かっていない。今回われわれは、水溶性光感受性物質であるATX-S10(Na)と同調培養したHeLa S3細胞を用いて、細胞周期と光感受性の関係について検討した。

〔材料ならびに方法〕

光感受性物質としてATX-S10(Na)を、細胞は対数増殖期にある子宮頸癌由来のHeLa S3細胞を用いチミジン遮断法によって同調培養を行った。チミジン遮断を解放後、2 または 3 時間間隔で標本を採取し、フローサイトメーターと解析ソフトを用いて、各時間における細胞周期の割合を計算した。

各々の細胞周期(S期、G₂/M期、G₁期)で5、10、25 $\mu\text{g/ml}$ のATX-S10(Na)を2時間接触させた後、波長670nm、エネルギー密度160mW/cm²の半導体レーザーを20J/cm²で照射。MTTアッセイで細胞の生存率を調べた。

〔結果〕

同調培養を解放後、S期細胞の割合は2時間、G₂/M期は6時間、G₁期は10～12時間で最高値を示した。レーザー照射24時間後の細胞生存はATX-S10(Na)の用量に依存し減少する結果を得た。S期、G₂/M期、G₁期に照射された細胞生存率は37.0%、38.9%、56.7%で、S期、G₂/M期が有意差を持ってより過敏に反応した。また、2時間後のATX-S10(Na)集積細胞数も有意差を持って、S期、G₂/M期に多くみられた。

〔考察〕

本研究ではS期、G₂/M期のHeLa S3細胞はATX-S10(Na)を用いたPDTにより光感受性のあることが分かった。S期、G₂/M期のHeLa S3細胞のATX-S10(Na)の細胞内レベルがG₁期と比較すると上昇しており、これは光感受性の増大と関係しているかもしれない。また、細胞表面積がATX-S10(Na)の細胞レベルの主要決定要因であることも考えられた。

ATX-S10(Na)はリソゾームだけでなく、サイトゾルにも分布しておりチューブリン/微小管システムはATX-S10(Na)を用いたPDTの細胞周期に依存する感度に関係しているのかもしれない。

現在、化学療法併用のPDTに効果のあることが知られており、抗腫瘍効果ばかりでなく光感受性物質と抗癌剤の減量にもつながる。つまり、化学療法によりS期、G₂/M期で細胞周期を停止させ、PDTを併用することでより高い抗腫瘍効果が得られることが示唆された。

〔結論〕

細胞周期によって細胞内のATX-S10(Na)濃度が異なり、これがATX-S10(Na)を用いたPDTの効果の細胞周期依存性に関係していることを見出した。

審査委員会では、このATX-S10(Na)を用いたPDTの効果が細胞周期依存性であることを見出した点を高く評価した。

審査の過程において、審査委員会は次のような質問を行った。

- 1) 胃癌のPDTのcomplete response(CR)はどのように確認しているのか
- 2) PDTと抗癌剤の併用はどのような臓器癌に行われているのか
- 3) PDTとアポトーシスの関係はどのようなになっているのか
- 4) HeLa S3細胞以外のcell lineは用いなかったのか
- 5) ATX-S10(Na)を2時間作用させたのはなぜか
- 6) PDTと抗癌剤の併用の目的は、CR率の向上か、再発の低下か
- 7) 併用薬剤による臓器障害の可能性について

- 8) ATX-S10(Na)はレザフィリンの欠点を補える薬剤か
- 9) 同調培養はどのくらいの期間可能か
- 10) S期、G₂/M期に取り込みが多いのはなぜか
- 11) 実験はどのくらい繰り返し行ったか
- 12) 抗癌剤との併用ではなく、放射線治療との併用は考えられるか
- 13) 放射線治療と併用の場合、細胞周期と関係するか
- 14) 組織内酸素分圧は治療効果に関与しているか
- 15) p53 mutationがあるような癌にも有効か

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、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	橋 本 賢 二	
	副査	峯 田 周 幸	副査 大 井 豪 一