



Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy with OPO Pulsed Laser and a Hematoporphyrin Derivative (HpD) in a Human Leukemia Cell Line, HL60RG

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 佐藤, 守彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1068

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 215号	学位授与年月日	平成 8年 3月26日
氏 名	佐 藤 守 彦		
論文題目	Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy with OPO Pulsed Laser and a Hmatoporphyrin Derivative (HpD) in a Human Leukemia Cell Line, HL60RG (ヒト白血病細胞株 HL60RG における OPO パルスレーザーとヘマトポルフィリン誘導体とを用いた光線力学的治療により誘導されたアポトーシス)		

博士(医学) 佐藤 守彦

論文題目

Apoptosis Induced by Photodynamic Therapy with OPO Pulsed Laser and a Hematoporphyrin Derivative (HpD) in a Human Leukemia Cell Line, HL60RG

(ヒト白血病細胞株 HL60RG における OPO パルスレーザーとヘマトポルフィリン誘導体を用いた光線力学的治療により誘導されたアポトーシス)

論文の内容の要旨

【はじめに】光線力学的治療 (PDT) は、腫瘍親和性の光感受性物質を投与した後、レーザー光を照射し、抗腫瘍効果を得る治療である。その主な作用機序はレーザー光により励起された一重項酸素によるミトコンドリアの破壊でネクローシスであると考えられていたが、近年リンパ腫や上皮系腫瘍の細胞株を用いた実験でアポトーシスによる細胞死が報告されている。今回、我々はヒト白血病細胞株 HL60RG を用いて、*in vitro* の実験を行ない、複数の方法で、アポトーシスの関与について検討した。

【材料】ヒト白血病細胞株 HL60RG は国立衛生試験所より提供され、10% 胎仔牛血清加 RPMI-1640 培養液にて培養された。ヘマトポルフィリン誘導体であるフォトサン 3 は、Hans Mueller 博士 (Seehof Lab.GmbH、ドイツ) より提供された。レーザー装置としては、浜松ホトニクス社製波長可変型の光パラメトリック発振 (OPO) パルスレーザー (パルス周波数 15Hz) を使用した。フローサイトメーターとしては、Coulter 社製 EPICS Profile を使用した。蛍光顕微鏡としては、Zeiss 社製 Axiophot を使用した。

【方法】対数増殖期にある 1×10^7 個の HL60RG を、25又は50 $\mu\text{g/ml}$ のフォトサン 3 を加えた 10% 胎仔牛血清加 RPMI-1640 培養液にて、37°C、5%CO₂ 下に 60 分間培養した。フェノールレッドを含まない 10% 胎仔牛血清加 RPMI-1640 培養液にて洗浄した後、同液に浮遊させ、OPO パルスレーザー光 (波長 630nm、3 mJ/パルス、5 又は 10 J/cm²) を照射した。その後 10% 胎仔牛血清加 RPMI-1640 培養液にて 37°C 5%CO₂ 下 6 又は 24 時間培養した後以下の方法で細胞の変化を検討した。1. アガロースゲル電気泳動 2. ギムザ染色による形態学的観察 3. フローサイトメトリーによる細胞変化とアポトーシスの光学的測定 (1) Fluorescein diacetate (FDA) 染色による細胞生存率の測定、及び forward scatter (FS) 値及び side scatter (SS) 値の測定 (3) TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法によるアポトーシスの検出 4. 蛍光顕微鏡を用いたヘキスト 33258 蛍光色素染色による形態学的観察。3. (3) 及び 4. に関しては、レーザー照射のみの効果に対する波長の影響を検討するため、波長 480、630、750nm、1 mJ/パルス、10 J/cm² のレーザー照射も併せて行なった。

【結果】1. アガロースゲル電気泳動：コントロール及びフォトサン 3 単独投与では DNA 断片化は認められなかったが、レーザー照射単独では軽度、フォトサン 3 投与とレーザー照射との併用では中等度に、DNA 断片化を示すラダーパターンが認められた。2. ギムザ染色による形態学的検討：コントロール及びフォトサン 3 投与のみの群では細胞は特に変化が認められず均一であったが、フォトサン 3 投与とレーザー照射とを併用した群では多くの細胞で核の断片化やアポトーシス小体を認め、各細胞は不均一であった。レーザー照射単独では少数の細胞で同様の所見を認めた。また、これらは、6 時間後より 24 時間後の方が著明であった。3. フローサイトメトリーによる細胞の変化及びアポトーシスの検出：フォトサン 3 投与とレーザー照射との併用では、(1) 生存率の低下、FS 値の低下、及び SS 値の上昇を認め、(2) PI 染色により Hypodiploid DNA の増加を認めた。これらは、6 時間後より 24 時間後

の方が著明であった。また、(3)TUNEL 法により FITC で標識された 3'-OH 末端を持った DNA の増加を認めた (約65%)。レーザー照射単独では、TUNEL 法により約 5-10% に FITC で標識された 3'-OH 末端を持った DNA を認めた。レーザーの波長による比較では、多いほうから 630nm、480nm、750nm の順であった。4. ヘキスト 33258 蛍光色素染色による形態学的観察では、365nm 励起にて、フォトサン 3 投与とレーザー照射との併用ではほとんどの細胞で核の断片化やアポトーシス小体を認めた。レーザー照射単独では、10-20% に核の断片化やアポトーシス小体を認めた。レーザーの波長による比較では、多いほうから 630nm、480nm、750nm の順であった。

【結語及び考察】以上より、ヒト白血病細胞株 HL60RG において、OPO パルスレーザーとフォトサン 3 とを用いた PDT によって、アポトーシスが誘導されたことが複数の方法により明らかになった。これより、臨床的に白血病が PDT の適応となりうる可能性があることが示唆された。また、これまでの PDT によるアポトーシスの報告では、電気泳動および形態学的観察によりアポトーシスを証明していたが、我々はそれらに加えて、TUNEL 法を含むフローサイトメトリーによる解析により、アポトーシスを定量化した。また、アポトーシスが時間依存的であること及び TUNEL 法にて検出されたことより、エンドヌクレアーゼによる酵素反応の関与が示唆された。また、従来の報告では、レーザー照射単独ではアポトーシスの誘導は認められていないが、我々の報告は、レーザー照射単独でも、ごくわずかではあるが、アポトーシスが誘導されることを、見出した。これについては、更に確認の実験を進めているところである。

論文審査の結果の要旨

現在、光増感色素で処理したガン細胞などを光照射によって死滅させる光線力学的治療(PDT)が、実験段階から臨床段階へ応用されつつある。このような状況のなかで、細胞死が有効に引き起こされるかどうかについての研究は数多くあるが、光線力学的治療による細胞の死滅の機構については諸説が出され、未だコンセンサスは得られていない。そこで、申請者は光増感色素で染色処理したヒト白血病細胞株の HL60RG に OPO レーザーの光照射をおこない、PDT における細胞死がどのような性質のものかを調べた。培養ディッシュ中で、ポルフィリン誘導体のフォトサン 3 存在下に HL60RG 細胞を 60 分インキュベートした後、630nm の光を約 11 分間 (10J/cm²) 照射した。その後、6 時間後と 24 時間後に各種の測定をおこなった。論文記載の研究結果と審査員の評価は次のようである。

1. DNA のアガロースゲル電気泳動では、光照射しない対照群で DNA の断片化は見られなかったが、光照射群では DNA の断片化を示すラダーパターンが認められた。審査委員はゲルパターンの定量性については疑問をもったが、定性的には明瞭な結果と認めた。

2. 細胞塗抹標本のギムザ染色では、光照射群で核の断片化やアポトーシス小体の出現が認められた。審査委員は途中経過についての観察があることがより信頼性を高めることを指摘したが、光照射をしてから 24 時間後の標本については劇的な変化があるのを確認した。

3. Flow cytometer により個々の細胞の光学的特性を調べ、それを統計処理した。フルオレッセイン ジアセテートの代謝能力を指標として検定した細胞死の率は、光照射群で有意に大きかった。光散乱測定では、光照射群で細胞体積の減少、細胞内顆粒構造の増加が見られた。DNA の 3' OH 断端に特異的に蛍光ラベルを入れる TUNEL 法では、光照射群で蛍光強度の増加があり DNA の断片化が起こることが示された。審査員は光散乱の測定でアポトーシスの検定がどの程度確実にできるかについて疑問を呈したが、TUNEL 法で観察された核の大きな蛍光増大が、アポトーシスが起きている証拠と

して信頼性が高いものであることを認めた。

4. DNA に特異的な色素による蛍光染色像では、光照射群で hypodiploid DNA の増加、核の断片化、アポトーシス小体の出現が観察された。審査員はこの蛍光像の判定について異議を唱えなかった。

以上のことよりヒト白血病細胞株では光線力学的治療によってアポトーシスが誘導されることが示された。HL60RG 細胞で準定量的にアポトーシスの判定がなされ、その機構がエンドヌクレアーゼの関与するものであることが示唆された。審査委員会は、本研究を、光線力学治療の作用機序を明らかにし、この治療法を応用する上で有用な基礎知識を与えるものと評価した。さらに、将来的に白血病に対しても PDT が適応となりうる可能性が示された点も評価した。

このような申請者の発表に対して、審査員からは次のような質疑がおこなわれた。

- 1) HL60RG 細胞の特徴について
- 2) 光散乱をアポトーシスの指標として使うことの意義
- 3) 光散乱と細胞形態の関係について
- 4) OPO パルスレーザーを使った理由
- 5) 波長630nm の光を照射に使った理由とフォトサン 3 の630nm での分子吸光係数
- 6) レーザーの照射方法とエネルギー表記について
- 7) 色素濃度の選択の根拠
- 8) フォトサン 3 の細胞内局在について
- 9) フォトサン 3 の処理時間と光照射の効果の相関について
- 10) ラダーパターンの densitometry について
- 11) ラダーパターンのバンド幅が広がる理由
- 12) 一重項酸素がエンドヌクレアーゼを活性化させる経路
- 13) 光のもつ熱効果の関与はどのくらいに評価されるか
- 14) 正常白血球への光増感色素による染色と光照射の効果について

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点の理解も十分であると判断し、本論文は博士（医学）の学位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 教授 寺 川 進

副査 教授 藤 瀬 裕 副査 教授 星 野 知之

副査 助教授 小 出 幸 夫 副査 助教授 福 田 廣 志