



Photodynamic therapy for experimental tumors using ATX-S10 (Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer, and diode laser

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-31 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 森, 眞彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1635

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 358号	学位授与年月日	平成14年 2月22日
氏 名	森 眞 彦		
論文題目	Photodynamic therapy for experimental tumors using ATX-S10(Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer, and diode laser (実験腫瘍における親水性クロリン光感受性物質 ATX-S10(Na)と半導体レーザーを用いた光線力学的療法)		

博士(医学) 森 眞 彦

論文題目

Photodynamic therapy for experimental tumors using ATX-S10(Na), a hydrophilic chlorin photosensitizer, and diode laser

(実験腫瘍における親水性クロリン光感受性物質ATX-S10(Na)と半導体レーザーを用いた光線力学的療法)

論文内容の要旨

〔はじめに〕

癌の光線力学的療法(PDT)は癌組織集積性を持つ光感受性物質とレーザー光による光増感反応を利用した治療法である。現在、臨床では光感受性物質としてポルフィマーナトリウムのみが用いられているが、体内からの排泄が遅いため長期にわたる光過敏症が問題となっている。親水性クロリン化合物であるATX-S10(Na)は波長670nmのレーザーにより励起され、1重項酸素を産生する光感受性物質である。ATX-S10(Na)は体内からの排泄がポルフィマーナトリウムと比較して速やかであり、光毒性が弱いことから次世代の光感受性物質候補として期待されている。そこで本研究では、ATX-S10(Na)を用いたPDTの癌治療法としての有用性を探るため、培養腫瘍細胞および担癌動物に対する抗腫瘍効果について検討した。また、PDTの抗腫瘍効果は光感受性物質の腫瘍集積性に影響を受けるが、その腫瘍細胞への取り込み機序については詳細な検討がなされていないため、ATX-S10(Na)の腫瘍細胞への取り込み様式についても検討した。

〔材料ならびに方法〕

1. 抗腫瘍効果の測定

培養細胞に対する殺細胞効果の検討では、T.Tn、HeLa、KB、A549、Meth-AおよびColon26細胞を96穴マイクロプレートに播種し、 $3.13 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ のATX-S10(Na)を24時間暴露後、 $25 \sim 50 \text{J/cm}^2$ の半導体レーザーを照射した時の細胞生存率を測定した。担癌動物に対するPDTの至適条件の検討では、Meth-A細胞皮下移植マウスに、 $3.13 \sim 25 \text{mg/kg}$ のATX-S10(Na)を静脈内投与し、その2～6時間後に $50 \sim 200 \text{J/cm}^2$ の半導体レーザーを照射した時の腫瘍消失率および毒性所見の観察を行った。また、ヒト腫瘍T.Tn、HeLaおよびKB細胞をヌードマウスに皮下移植したモデルに対して、ATX-S10(Na) ($2.5 \sim 10 \text{mg/kg}$)と半導体レーザー (200J/cm^2)によるPDT、あるいはポルフィマーナトリウム ($10 \sim 20 \text{mg/kg}$)とエキシマダイレーザー (100J/cm^2)によるPDTを行い抗腫瘍効果を比較した。さらに、PDT後に腫瘍組織を摘出し、光学顕微鏡および透過型電子顕微鏡にてPDTによる傷害を組織学的に観察した。

2. 腫瘍細胞への取り込み

ATX-S10(Na)結合血漿タンパクの同定では、アガロースゲル電気泳動法およびゲル濾過法により結合タンパクの血漿タンパク画分および分子量を推定し、それに当てはまる主要血漿タンパクの中から、高密度リポタンパク(HDL)、フィブリノーゲン、ハプトグロビン、血清アルブミンを候補として選択した。また、他の光感受性物質が結合するトランスフェリンおよび低密度リポタンパク(LDL)も結合タンパクの候補として選択した。それらタンパクの精製品とATX-S10(Na)との結合をゲル濾過法により解析した。また、ATX-S10(Na)の細胞内取り込み機序の検討では、エンドサイトーシス阻害剤および種々トランスポーター阻害剤存在下、および培養温度4℃の条件下でATX-S10(Na)の腫瘍細胞への取り込み量を測定

した。さらに、ATX-S10(Na)の細胞内局在を調べるため、ATX-S10(Na)とライソゾーム染色剤による腫瘍細胞の2重染色、およびPDT後の細胞内小器官の電子顕微鏡観察を行った。

〔結果および考察〕

1. 抗腫瘍効果

ATX-S10(Na)を用いたPDTは、ヒトおよびマウス種々培養腫瘍細胞に対して、ATX-S10(Na)濃度依存的な殺細胞活性を示した。また、担瘤マウスに対して種々条件でPDTを行ったところ、100%腫瘍を消失させ、かつ重篤な毒性も発現しないPDT条件が得られた。さらに、ヒト腫瘍移植ヌードマウスに対して、5mg/kgのATX-S10(Na)と200J/cm²の半導体レーザー照射によるPDTは、20mg/kgのポリフィマーナトリウムと100J/cm²のエキシマダイレーザー照射によるPDTと同等の抗腫瘍効果を示した。従って、臨床における癌治療法としての有用性が期待された。組織学的観察において、PDTの直後より腫瘍血管の傷害が認められたことから、ATX-S10(Na)を用いたPDTでは、栄養補給路の断絶による腫瘍細胞に対する間接的な影響も作用機序の一つであることが示唆された。

2. ATX-S10(Na)の腫瘍細胞への取り込み様式

ポリフィマーナトリウムは、LDLと結合しLDLレセプターを介してエンドサイトーシスにより癌細胞に取り込まれると報告されているため、まず、ATX-S10(Na)の結合タンパクの同定を試みた。その結果、ATX-S10(Na)は、アルブミン画分および α_2 -グロブリン画分のタンパクと結合し、さらに分子量60k~100kおよび200k~400kのタンパクと結合した。また、精製タンパクを用いた検討から、ATX-S10(Na)はHDLおよび血清アルブミンと結合するが、LDLとほとんど結合しないことが示された。従って、LDLレセプターを介した細胞への取り込み機序は、ATX-S10(Na)の場合当てはまらなないと考えられた。さらに、HDLや血清アルブミン存在下では、細胞へのATX-S10(Na)取り込み量が減少することから、それら血漿タンパクは腫瘍組織への担体として働き、腫瘍細胞へはフリーのATX-S10(Na)が取り込まれるものと考えられた。ATX-S10(Na)の細胞への取り込みは、エンドサイトーシス阻害剤存在下および4℃の培養条件下で部分的に阻害されたが、種々のトランスポーター阻害剤存在下では影響を受けなかった。さらに、ATX-S10(Na)とライソゾーム染色剤による腫瘍細胞の2重染色パターンが一致した。よって、ATX-S10(Na)はエンドサイトーシスにより取り込まれ、主にライソゾームに集積するものと考えられた。また、PDT直後からミトコンドリアやゴルジ体等の細胞内小器官の傷害が観察されたことから、ATX-S10(Na)の一部は腫瘍細胞内に広く分布しているものと考えられた。

〔結論〕

ATX-S10(Na)と半導体レーザーを用いた光線力学的療法は、ヒト腫瘍移植マウスに対して優れた抗腫瘍効果を示し、その効果は現在臨床で用いられているポリフィマーナトリウムとエキシマダイレーザーを用いたPDTと同等であった。従って、本療法は癌の治療法として非常に有望であることが示唆された。また、ATX-S10(Na)は、血清アルブミンおよびHDLに結合して腫瘍組織へ運ばれた後、解離したフリー体が腫瘍細胞内に取り込まれると考えられた。ATX-S10(Na)は主にエンドサイトーシスにより細胞へ取り込まれ、ライソゾームに移行した後、細胞内に広く分布するものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

癌に対する光線力学的療法(Photodynamic therapy; PDT)は組織集積性を持つ光感受性物質のレーザー光による光増感反応を利用した治療法である。臨床で用いられているphotofrin(ポルフィマーナトリウム)は体内からの排泄が遅いため治療後の暗室生活が長く、1ヶ月後でも強い日焼けを起こす場合がある。クロリン系の化合物であるATX-S10(Na)は親水性が高いため体内からの排泄が早く、しかも670nmという長波長領域で励起できるのでレーザー光によってより深部までの治療が期待される次世代の光感受性物質である。

今回、申請者はこのATX-S10(Na)の評価に関し、各種の細胞系に対する殺細胞効果、担癌動物での至適条件、photofrinとの比較、等の実験を行い、さらに腫瘍細胞への取り込みに関連した検討を行った。

〔対象と方法〕

1. PDTとしての適用性について：

a) 殺細胞効果をみるため、T.Tn、HeLa、KB、A549、Meth-A、Colon26細胞を96穴マイクロプレートに播種し、3.13～50 μ g/mlのATX-S10(Na)に24時間暴露後、波長670nmの半導体レーザーを25～50J/cm²照射したときの細胞生存率を測定した。

b) 担癌動物に対するPDTの至適条件に関する検討：Meth-A細胞を皮下に移植したマウスに3.13～25mg/kgのATX-S10(Na)を静注2～6時間後、波長670nmの半導体レーザー50～200J/cm²照射した後、腫瘍消失率および毒性所見を観察した。

c) Protofrinとの比較：ヒト腫瘍T.Tn、HeLaおよびKB細胞をヌードマウスに皮下移植し、ATX-S10(Na)2.5～10mg/kgと半導体レーザー200J/cm²によるPDTとポルフィマーナトリウム10～20mg/kgとエキシマダイレーザー100J/cm²によるPDTの効果を比較した。さらにPDT後の腫瘍組織の光学顕微鏡所見、透過電顕所見を比較した。

2. 細胞への取り込みに関する検討：

a) 結合血漿蛋白の同定：ATX-S10(Na)結合血漿蛋白のうちアガロースゲル電気泳動法、ゲル濾過法で血漿蛋白画分及び分子量を推定し、そのうち主要血漿蛋白の中から高密度リポ蛋白(HDL)、フィブリノーゲン、ハプトグロビン、血清アルブミンを候補として選択した。さらに光感受性物質が結合するトランスフェリン、低密度リポ蛋白(LDL)も候補とした。精製したこれらの蛋白とATX-S10(Na)との結合をゲル濾過法で解析した。

b) 細胞内取り込み様式：エンドサイトーシス阻害剤または種々トランスポーター阻害剤の存在下、および培養温度4℃での腫瘍細胞への取り込み量を測定した。

ATX-S10(Na)の細胞内局在をATX-S10(Na)とライソゾーム染色剤による腫瘍細胞の2重染色、PDT後の細胞内小器官の電子顕微鏡的観察を行った。

〔結果〕

1. 抗腫瘍効果：ATX-S10(Na)を使用したPDTは種々の培養細胞に対し濃度依存的に殺細胞活性を示した。担癌マウスの腫瘍に対するPDTは重篤な毒性もなく100%の腫瘍壊死が得られた。

ヒト腫瘍移植ヌードマウスにおけるATX-S10(Na)を使用したPDTはポルフィマーナトリウムと同等の効果が得られた。組織学的検索では治療直後から腫瘍細胞の壊死及び腫瘍血管の傷害を認めた。

2. ATX-S10(Na)の腫瘍細胞内取り込み：ATX-S10(Na)はアルブミン画分および α 1-グロブリン画分の蛋

白と結合し、分子量60k～100kおよび200k～400kの蛋白と結合した。ATX-S10(Na)はHDLおよび血清アルブミンと結合するが、LDLとはほとんど結合しなかった。血漿蛋白がATX-S10(Na)の腫瘍組織への担体であり、腫瘍細胞内へはフリーのATX-S10(Na)が取り込まれる。細胞内取り込みはエンドサイトーシス阻害剤、4℃の培養条件下で部分的に阻害されたが、トランスポーター阻害剤では影響されなかった。腫瘍細胞内のATX-S10(Na)局在とライソゾームの局在パターンが一致した。PDT直後からミトコンドリア、ゴルジ体等細胞内小器官が傷害された。

〔結論〕

(1)ATX-S10(Na)と半導体レーザーを用いたPDTはマウスに移植されたヒト腫瘍に優れた抗腫瘍効果を示した。これはポルフィマーナトリウムとエキシマダイレーザーを用いたPDTと同等であり、臨床応用が有望であると考えられた。(2)ATX-S10(Na)は、血清アルブミン、HDLに結合して腫瘍組織へ運ばれ、フリーのATX-S10(Na)が腫瘍細胞内へ、主としてエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、ライソゾームに移行した後、細胞内に広く分布するものと考えられる。

審査委員会はATX-S10(Na)の血液中でのキャリアーを明らかにし、細胞内取り込みがフォトフリンと異なる機序を阻害剤を用いて明らかにしたこと、臨床応用の可能性をin vivoとin vitroで確認し、これらはこれまでに報告がないことから2編の英文誌に掲載されたことを高く評価した。

審査の過程において申請者に次のような質問がなされた。

- 1)ATX-S10(Na)の副作用、死因について
- 2)薬の毒性は動物により異なるか
- 3)照射で細胞の何処が壊死になるか
- 4)PDTが行われた腫瘍の中の傷害の状況
- 5)フォトフリンを用いたPDTとの機序の違い
- 6)エンドサイトーシスについて
- 7)ATX-S10(Na)の腫瘍集積性とその経時的変化について
- 8)体内分布と増感剤の結合状態について
- 9)エンドサイトーシス阻害剤の阻害の機序

これらの質問に対し申請者の解答は概ね適切であり、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	藤 瀬	裕	副査 花 井 洋 行