

論文概要 (Thesis Abstract)

○ 論文題目

(Theme)

頭蓋内悪性脳腫瘍に対する蛍光物質特異的集積現象の解
明と 蛍光修飾法の開発

○ 指導教員

(Supervisor)

人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻 松村 明 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科 疾患制御医学専攻

(氏 名) 上月 暎浩

【目的】悪性神経膠腫は非常に予後不良な疾患で、脳内に浸潤するように広がる。その浸潤領域の広さと脳機能局在のため、全摘出は困難で残存部位からの局所再発が非常に多い。光線力学療法(Photodynamic Therapy:PDT)は、腫瘍に集積させた光感受性物質に特定波長の光を照射することによって活性酸素の一種である一重項酸素を発生させ、正常細胞を損傷せずに腫瘍細胞特異的な殺傷効果を得る治療法であり、eloquent area に存在する腫瘍に対しても有効な治療となり得る。従来光感受性物質としてポルフィリン骨格を有する化合物が使用されてきた。ポルフィリン化合物の一種であるヘマトポルフィリン(Hp)とその誘導体(HpD)は癌特異的な集積現象を示すが、詳細は諸説あり明らかでない。我々はこの集積現象にヘム輸送担体 HCP-1 (Heme Carrier Protein 1) が関係し、HCP-1 発現に細胞内で生じた活性酸素 (Reactive Oxygen Species:ROS) が関与すると報告してきた。また、胃粘膜細胞を用いた *in vitro* 系では、非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシン(IND)の投与が、ミトコンドリア電子伝達系の阻害による ROS と Hp 集積との関係性を *in vitro* および *in vivo* において検討した。

【対象と方法】本実験にはラット脳腫瘍細胞 C6 を用いた。通常培養群、IND の溶媒として用いた dymethyl sulfoxide 群、IND 群の 3 群とし、各群の細胞内活性酸素の測定は電子スピン共鳴法(Electron Spin Resonance: ESR)を用いた。また、HCP-1 の発現量解析はウェスタンブロッティング法を用い、Hp の細胞内集積は蛍光強度をプレートリーダーで測定した。ラット脳腫瘍モデルは 1×10^6 cells/ml の細胞懸濁液を脳内に注入することで作成し、2 週間後に通常群と IND 曝露群に分けて Hp 投与後 6 時間で脳腫瘍を摘出した。摘出した組織をホモジナイズし、蛍光強度をプレートリーダーで測定した。

【結果】*In vitro* 系において、ESR 測定では IND 曝露群で細胞内活性酸素の上昇が認められ、ウェスタンブロッティング法では IND 曝露群で HCP-1 の発現が亢進していた。また、IND 曝露群では Hp 取り込みが有意に上昇していた($P < 0.05$)。*In vivo* では、IND 曝露群において有意に蛍光強度の上昇が認められた($P < 0.05$)。

【考察】ESR による細胞内活性酸素量測定により、インドメタシンはラットグリオーマ細胞においても ROS 産生を誘導することが示唆された。また、IND 投与によって HCP-1 発現が亢進したことから、IND による mitROS 産生量の増加が HCP-1 の発現に寄与したものと考えられる。それに伴い、ポルフィリンの集積が増強されたと考えられる。

in vivo の実験においては、正常脳ではインドメタシン投与によってポルフィリンの増強は得られず、腫瘍特異的に蛍光強度が増強した。胃粘膜細胞を用いた先行研究では、正常細胞においては ROS 産生増加が見られなかった。これは、IND 投与による外因的なストレスに対して正常細胞が防御機構を誘発した結果であると思われる。がん細胞は、恒常的な ROS 産生などのストレスに対して既に防御機構が亢進した状態にあるため、さらなるストレスに対応できず ROS 産生量が増加したものと考えられる。

IND 投与によってラットグリオーマ細胞において HCP-1 発現が亢進したことから、IND による mitROS 産生量の増加が HCP-1 の発現に寄与したものと考えられる。生体内においてもそれに伴い、ポルフィリンの集積が増強されたと示唆される。

【結論】脳腫瘍細胞の *in vitro* 系において、IND 投与によって細胞内活性酸素の産生が増強し、HCP-1 の発現亢進を介して Hp の集積が促進されることが示唆された。また、ラット脳腫瘍モデルを用いた *in vivo* 系においても IND の投与によって Hp の腫瘍への集積効率が増強されることが明らかとなった。