

氏名	伊藤 紘		
学位の種類	博士（医学）		
学位記番号	博甲第	7952	号
学位授与年月	平成	28年	9月 23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Reactive oxygen species induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs enhance the effects of photodynamic therapy in gastric cancer cells (非ステロイド性抗炎症薬によって惹起された活性酸素種が光線力学療法効果を増強する)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	入江 賢児
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	宮崎 淳
副査	筑波大学准教授	博士（医学）	山本 哲哉
副査	筑波大学講師	博士（理学）	塩見 健輔

### 論文の内容の要旨

伊藤紘氏の博士学位論文は、光線力学療法における非ステロイド性抗炎症薬インドメタシンの効果を検討したものである。その要旨は以下の通りである。

#### （目的）

光線力学療法（Photodynamic Therapy : PDT）とは、腫瘍部位に集積させた光増感剤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、腫瘍組織の細胞を死滅させる治療法である。筑波大学消化器内科ではこれまで、PDT用の光増感剤として使用されるポルフィリンの集積メカニズムの研究において、ポルフィリンがヘムを輸送する heme carrier protein 1 (HCP1) によって輸送されることを明らかにしてきた。また、ラット由来正常胃粘膜細胞 RGM1 に比べ、そのがん様変異細胞 RGK1 では HCP1 の発現量が上昇していること、RGK1 にミトコンドリアから産生される活性酸素種 (mitROS) を特異的に消去する酵素マンガンスーパーオキシドディスムターゼ (MnSOD) を発現した RGK MnSOD 細胞では HCP1 の発現が抑制されることも示してきた。さらに PDT 効果も MnSOD の過剰発現によって抑制されていたことから、mitROS による HCP1 発現亢進が PDT 効果を増強させていることが示唆されていた。そしてこれらの結果から、ミトコンドリアの電子伝達系を阻害し mitROS 産生を誘導するような薬剤を事前投与することによってさらなる PDT 効果の向上が期待さ

れ、非ステロイド性抗炎症薬の一つであるインドメタシン (IND) が mitROS 産生を誘導することも報告してきた。本研究で著者は、IND の事前投与が PDT 効果を増強させるか否かについて *in vitro* において検討した。

#### (対象と方法)

著者は RGM1、RGK1、RGK MnSOD、遺伝子導入ベクターのみを組み込んだ RGK vector 細胞種を用い、以下の実験を行った。(1) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間曝露し、細胞内活性酸素を電子スピン共鳴装置 (ESR) によって測定した。(2) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養後の HCP1 の発現量を免疫染色法によって確認した。(3) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養した。その後 20  $\mu$ M ヘマトポルフィリン (HP) を 6 時間曝露し細胞内ポルフィリン蛍光量をプレートリーダーによって測定した。(4) 各細胞種に 1 mM IND を 1 時間前処理し、24 時間培養した後 20  $\mu$ M ヘマトポルフィリン (HP) を 6 時間曝露した。エキシマダイレーザーを用いて細胞にレーザー照射 (630 nm, 1 J/cm<sup>2</sup>) を行った後さらに 24 時間培養した。細胞生存率を WST-8 によって評価した。

#### (結果)

IND 前処理によって RGK1 および RGK vector で細胞内 ROS による ESR シグナル強度の増加を認めた。また、IND 前処理によって HCP1 発現量ががん細胞特異的に増強され、RGK MnSOD では IND による変化は見られなかった。それに伴って HP 集積量、PDT 効果も RGK1、RGK vector 細胞で増強が確認された。

#### (考察)

ESR による生細胞内活性酸素量測定により、IND はがん特異的な ROS 産生を誘導することが示唆された。また MnSOD の過剰発現が ESR シグナル増強を抑制したことから産生された ROS はミトコンドリア由来であることが考えられた。一方、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 投与による外因的ストレスに対して正常細胞が防御機構を誘発した結果と考えられた。実際に既往研究では、IND 投与が RGM1 において MnSOD の発現を誘導することが示されていた。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ので、さらなるストレスに対応できず ROS 産生量が上昇したものと考えられた。IND 投与によって HCP1 発現が亢進したことから、IND による mitROS 産生量の増加が HCP1 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および PDT 効果が増強されたと示唆された。

## 審査の結果の要旨

#### (批評)

本研究では、ラット胃粘膜細胞を用いた実験により、インドメタシンががん特異的なミトコンドリア由来活性酸素種の産生を増加させ、ポルフィリン輸送タンパク HCP1 の発現を亢進させること、がん特異的なポルフィリンの集積および PDT 効果を増強させることを明らかにした。これらの本研究成果は、PDT の効率化の上で重要な知見であり、高く評価される。

平成 28 年 8 月 5 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。