

野中隆 学位論文要旨

主論文

Analysis of Apoptotic Effects Induced by Photodynamic Therapy in a Human Biliary Cancer Cell Line

胆道癌細胞における光線力学療法によるアポトーシス誘導効果の解析

野中隆 七島篤志 池田美保子 上原雅隆 磯本一 朝比奈泉 永安武

*ANTICANCER RESEARCH*30 (12):2113-2118, 2010

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻

(主任指導教員： 永安 武 教授)

※主任指導教員が不在の場合は、教室主任代理を記入すること。

【緒 言】

光線力学療法 (Photodynamic Therapy 以下 PDT) は光感受性物質を経静脈投与後腫瘍に特異的に集積し、ある特定の周波数のレーザーを照射することにより抗腫瘍効果を持つ治療であり、肺癌をはじめ様々な癌腫に対して用いられる光線力学治療である。胆道癌に対する PDT は、2つのランダム化無作為試験において、有用性が認められている治療法であるが、胆道癌細胞を用いた基礎実験は少なく、抗腫瘍活性の詳細な検討が望まれていた。今回のリサーチでは胆道癌に対する PDT のアポトーシスの誘導効果に注目して *in vitro*, *in vivo* の検討を行った。

【対象と方法】

in vitro: 胆道癌細胞株は NOZ を使用。光感受性物質はフォトフリン®を用い、24時間メディウム内で接触させた後にレーザー照射を施行。照射 24 時間後の生細胞率の検討は MTT assay にて行った。PDT 後 24 時間における NOZ 細胞の 50%の抗腫瘍効果を得られるレーザー密度 (J/cm^2) の条件でアポトーシスの誘導の確認を行った。Hoechst33342 の蛍光染色により核の凝集, アポトーシス小体などのアポトーシスに特異的な形態確認を行った。断片化 DNA の確認にはアガロースゲルを用いた電気泳動にて DNA ラダーの確認を行った。続いてフローサイトメトリーを用いた DNA 断片化細胞の測定及び細胞周期解析を行い、アポトーシスの誘導率を求めた。最後に caspase3 活性を蛍光マイクロプレートリーダーを用いて測定した。*in vivo*: 4W のヌードマウスの背部に約 1×10^7 の NOZ 細胞を皮下移植し、約 21 日後に照射に適した 8X8mm 大の腫瘍モデルを作成。フォトフリン®7mg/kg を腹腔内注射後 48 時間後に PDT を施行。照射レーザーの条件は $10mJ/cm^2$ を 10 分照射 (計 $60J/cm^2$) とした。PDT 試行後 0, 3, 6, 12, 24 時間毎に標本を摘出 (n=4) し、TUNEL 染色により TUNEL 陽性細胞率を求め、経時的な断片化 DNA の変化を求めアポトーシスの誘導効果を評価した。

【結 果】

in vitro: フォトフリン®濃度が $10 \mu\text{g/ml}$ の条件でレーザー依存性の殺細胞効果を得た。PDT24 時間後、NOZ 細胞の 50%の殺細胞効果を得る条件を LD50 と設定。この時のレーザー照射条件は計 12J/cm^2 となった。続いて LD50 の条件で Hoechst33342 による蛍光染色を行い、クロマチンの凝集及びアポトーシス小体を認めた。アガロースゲルを用いた電気泳動では DNA のラダーを確認。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析にて 22.2%のアポトーシスの誘導率を認めた ($P < 0.01$ vs control)。PDT24 時間後の活性化 caspase3 は PDT 群で有意に高値であった ($P < 0.05$ vs control)。in vivo: TUNEL 陽性細胞は照射 6 時間後から有意に増加し ($P < 0.01$ vs control) 12 時間後にピークに達した後に 24 時間後まで有意な高値を認めた ($P < 0.01$ vs control)。

【考 察】

PDT は非切除肝門部胆管癌などで主に姑息的治療に用いられるが、術後胆管断端の病理学的遺残症例に対する術後補助 PDT や、広汎に進展した胆管癌に対する術前 PDT などの報告も見られる。術前・後の PDT を行ううえで、その抗腫瘍効果がアポトーシスの誘導が高いものであるならば吻合部などの正常組織にかかる影響は少なくすむと考えられ、PDT の臨床応用が進むと考えられる。

フォトフリン®による PDT は、ミトコンドリアのチトクローム C を介し caspase9, caspase3 の活性を経てアポトーシスは誘導される。しかしアポトーシスの誘導率は癌腫や光感受性物質により異なるといわれ、フォトフリン®を用いた NOZ 細胞への in vitro の実験では PDT24 時間後では 22.2%のアポトーシスの誘導が得られる事が判明した。一方 in vivo の検討では、照射 6 時間後よりアポトーシスの発現を認め、12 時間目にピークに到達していた。in vivo においては PDT による血管遮断効果もあり、これに伴う hypoxia がアポトーシス誘導のトリガーになっていると考えられ、in vitro でのアポトーシスの発現時期よりも早期にアポトーシスが誘導されることが考えられる。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。