

学位論文

5-アミノレブリン酸と超音波の併用による乳がん細胞に対する抗腫瘍活性の評価と作用機序の解明

2016年9月

徳島大学大学院先端技術科学教育部

物質生命システム工学専攻

生命テクノサイエンスコース

島村 義樹

目次

第1章 序論-----	4-11
1-1 乳がん	
1-2 超音波の医療への応用	
1-3 超音波力学療法（SDT）	
1-4 ポルフィリン系超音波増感剤	
1-5 5-aminolevulinic acidおよびProtoorphyrinⅨ	
1-6 ALAの医療応用：光線力学的診断（PDD）と光線力学的療法（PDT）	
1-7 乳がんに対するALA-SDTの有効性	
第2章 実験方法-----	12-20
2-1 細胞実験	
2-1-1 細胞・培地・試薬	
2-1-2 実験器具	
2-2 腫瘍移植鶏卵およびマウスモデル使用した実験	
2-2-1 試薬	
2-2-2 実験器具	
2-3 活性酸素の検出	
2-3-1 試薬	
2-3-2 実験器具	
2-4 Jc-1を用いたミトコンドリア膜電位の変化	
2-4-1 試薬	
2-4-2 実験器具	
2-5 実験操作	
2-5-1 EMT6細胞に対する5-ALAの細胞毒性	
2-5-2 EMT6細胞への5-ALA投与によるPpⅨ生成量	
2-5-3 EMT6細胞に対する5-ALA-SDTの殺細胞活性	
2-5-4 腫瘍移植鶏卵を使用したALA由来PpⅨの薬物動態解析	

- 2-5-5 腫瘍移植鶏卵を使用したALA-SDTの抗腫瘍活性
- 2-5-6 EMT6背部移植マウスモデルに対するALA-SDTの抗腫瘍活性
- 2-5-7 DPBF法による一重項酸素の検出
- 2-5-8 発光スペクトル法による一重項酸素の検出
- 2-5-9 APF法によるOHラジカルの検出
- 2-5-10 ALA-SDTによるミトコンドリア膜電位の観察

第3章 結果および考察-----21-34

- 3-1 マウス乳がん由来EMT6細胞に対するALAの細胞毒性
- 3-2 EMT6細胞におけるALA由来PpIX生成量の経時変化
- 3-3 活性酸素の検出
- 3-4 腫瘍移植鶏卵を使用したALA由来PpIXの薬物動態解析
- 3-5 腫瘍移植鶏卵を使用したALA-SDTの抗腫瘍活性
- 3-6 EMT6/KU背部移植マウスモデルに対するALA-SDTの抗腫瘍活性
- 3-7 DPBF法による一重項酸素の検出
- 3-8 発光スペクトル法による一重項酸素の検出
- 3-9 APF法によるOHラジカルの検出
- 3-10 JC-1を使用したALA-SDTによるミトコンドリア膜電位変化の解析

第4章 結論-----35

第5章 参考文献-----36-37

第2章 序論

1-1 乳がん

乳房には、「脂肪」と「乳腺」組織があり、乳がんとは「乳腺」から発生する癌で、脂肪からは発生せず、他のがん同様に細胞の遺伝子異常の蓄積によって発生することが知られている。乳がん罹患するリスクは年齢と共に増加する。日本人女性の場合、生涯で乳がん罹患する確率は16人に1人（欧米は8～10人に1人）である。極めて稀に男性も乳癌に罹患することがある。乳癌に罹患する確率は色々異なった要因で変わってくる。家系によっては、乳癌は遺伝的家系的なリスクが強い家系が存在する。人種によっては乳癌リスクの高いグループが存在し、アジア系に比べてヨーロッパ系とアフリカ系は乳癌リスクが高い。また、発生・進展ともにホルモンに依存している点が乳がんの特徴で、大人の女性の乳房は、乳頭を中心に乳腺が放射状に15～20個並んでいます。それぞれの乳腺は小葉に分かれ、小葉は乳管という管（くだ）でつながっています。乳がんの約90%はこの乳管から発生し、乳管がんと呼ばれます。小葉から発生する乳がんが約5～10%あり、小葉がんと呼ばれます。標準的な乳がんの治療法である外科手術、化学療法は乳房の形状変化、閉経などの副作用の問題があり患者のQOLを低下させている問題がある。

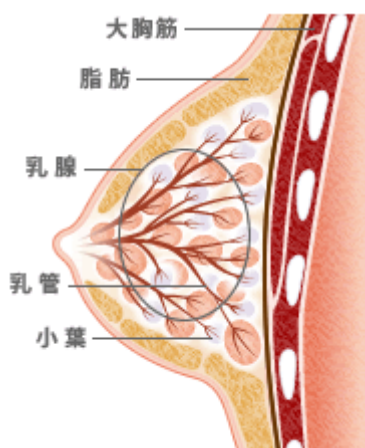


図1. 「女性の健康・医療情報・net」より引用

1-2 超音波の医療への応用

超音波は、音波の一種でありヒトの可聴域(20Hz~20kHz)を超える周波数のものをいい、生体透過性が非常に高い。超音波が物質に何らかの変化を及ぼす場合、その作用はキャビテーションによる作用とキャビテーションによらない作用に大別される。キャビテーションとは、超音波を液体に照射した時に液体中に溶けている気体が核となって微小な気泡を発生させる現象で、微小気泡の周辺には高温高圧の場が形成され、この超音波場で断熱膨張・圧縮を繰り返す気泡の圧壊時には、衝撃波とともに5000℃以上の高温と1000気圧以上の高圧、さらに強力な光（音響ルミネッセンス）や活性酸素が発生すると考えられている。生体における超音波の効果は、熱による作用とそれ以外の作用に分類されることが多い。生体へ超音波を照射すると、音響エネルギーの吸収により生体組織の温度が上昇する。また、機械的な作用はキャビテーションが主な原因と考えられており種々の作用をもたらす。これらの効果は、照射する超音波の強度と周波数に依存し、超音波強度が高ければ熱的作用が強くなり、周波数が低ければキャビテーションの発生に有利となる。

超音波の医療への応用は、1939年にRaimar Pohlmanにより初めて（座骨神経痛の治療）行われて以来、診断と治療の両面で活用されてきた。安全性が高く、胎児の心臓検査にも応用されている。画像診断で使用される超音波の波長は1~10MHzで、腹部用には3.5~5.0MHz、体表面には7.5MHz程度を使用。出力は数百mW/cm²以下。

表1 医療分野で用いられる超音波

	応用例	強度 (W/cm ²)	周波数 (MHz)
診断	腹部エコー、 心エコーなど	数百ミリ	2~4
治療	体外衝撃波結石 破碎術	100~ 100,000	~4
	HIFU 高密度焦点式超音波	1,300~ 1,680	4
	遺伝子治療 DDS、SDT	0.5~5	1~2

ペルフルブタン注射用

(ソナゾイド、第一三共)

超音波診断に用いられているマイクロバブル造影剤：肝腫瘍性疾患の診断で保険適応（2006年承認）。

図2. 「超音波のがん治療への応用」

1-3 超音波力学療法 (SDT)

超音波増感剤を用いた超音波力学療法 (SDT) は、キャビテーションによって生じたエネルギーで励起した増感物質が定常状態に戻るときに放出するエネルギーで活性酸素 (特に一重項酸素) を産生し周辺の細胞を傷害すると考えられている。超音波増感剤としては、ポルフィリン環を有する様々な化合物が検討されてきており、生体ポルフィリンである Protoporphyrin IX の前駆体である 5-Aminolevulinic acid もその一つである。これまでに報告されてきた超音波増感剤は、その殆どが光増感剤でもある。

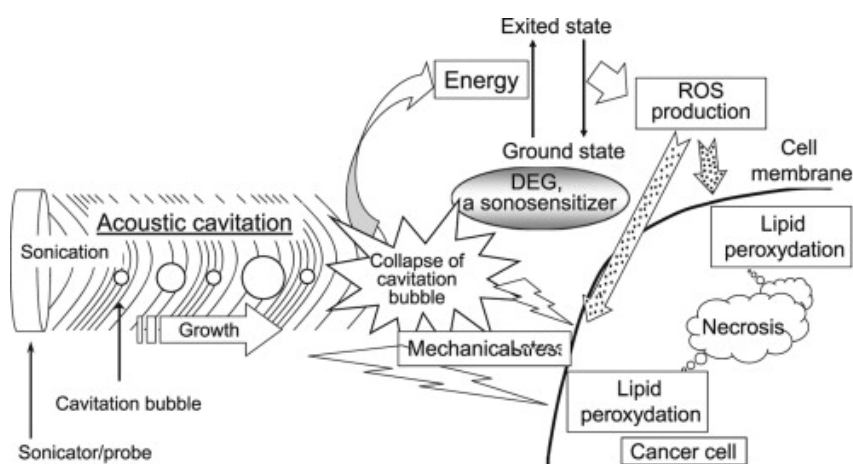


図 3. 超音波と増感剤による殺細胞効果の作用機序

SDT メカニズムを決定づける手法として、*in vitro* 系の SDT 抗腫瘍評価の際に活性酸素種の消去剤を併用させたときの効果の違いを比較した実験が挙げられる。このとき、一重項酸素の消去剤を併用した群だけに有意な抗腫瘍効果の抑制が見られる。このため、超音波によって励起された増感剤由来の一重項酸素が、SDT 殺細胞効果のメカニズムとして考えられている。

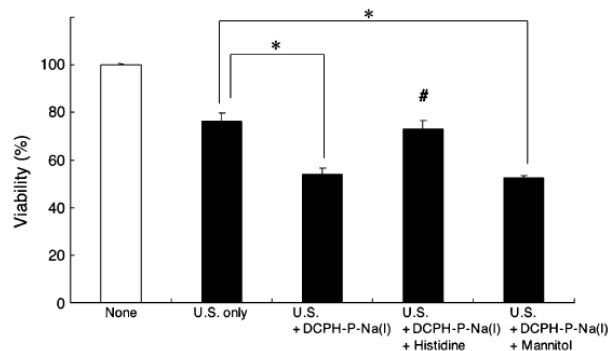


図4. 一重項酸素の消去剤による超音波+増感剤の殺細胞効果に対する低減効果

1-4 ポルフィリン系超音波増感剤

表1. 過去に報告されているポルフィリン系超音波増感剤

Table 2
Porphyrins tested as sonosensitizers

Sonosensitizer	Ultrasound		Biological model	Ref.
	W/cm ²	MHz		
Hematoporphyrin	3.18	1.92	In vitro (sarcoma 180 and AH 130)	[25]
Hematoporphyrin	1.7	1.92	In vitro and in vivo (sarcoma 180)	[26]
Hematoporphyrin	1.7	1.92	In vivo (sarcoma 180)	[27]
Hematoporphyrin	-	1.1	In vivo (sarcoma 180)	[28]
Hematoporphyrin (no sensitization)	3.7	2.21	In vitro (human colorectal adenocarcinoma)	[29]
Hematoporphyrin (no sensitization)	9	1.955	In vitro (CHO)	[30]
Hematoporphyrin	1.8	1.92	In vitro (sarcoma 180)	[94]
Hematoporphyrin	4.5	1.92	In vitro (sarcoma 180)	[97]
Diacetylhematoporphyrin-mitomycin C conjugate	-	2.26	In vitro (sarcoma 180)	[54]
Photofrin II	0.45	0.270	In vitro (HL-60)	[33]
Photofrin II	3-5	1.92	In vivo (colon 26 carcinoma)	[34]
Photofrin II	6	1.93	In vitro (sarcoma 180)	[96]
Photofrin II	3	1.92	In vivo (AH130)	[35]
Photofrin	0.3-0.5	0.450	In vitro (MT-2 cells, PMNC from ATL patients)	[37,38]
Mesoporphyrin	4	1.94	In vitro (murine L1210)	[31]
Mesoporphyrin	7.5	1.94	In vitro (murine L1210)	[57]
Protoporphyrin	4	1.94	In vitro (murine L1210)	[31]
Protoporphyrin IX	4.5	1.92	In vitro (sarcoma 180)	[64]
Copper protoporphyrin	4	1.94	In vitro (murine L1210)	[31]
Tetraphenylporphine tetrasulfonate	4	1.94	In vitro (murine L1210)	[31]
ATX-70	4	1.94	In vitro (murine L1210)	[31]
ATX-70	-	0.05	In vitro (HL-525)	[32]
ATX-70	4.5	1.93	In vitro (sarcoma 180)	[39]
ATX-70	3	2	In vivo (colon 26 carcinoma)	[40]
ATX-70	0.51	1	In vivo (squamous cell carcinoma)	[60]
ATX-70	4.5	1.92	In vitro (sarcoma 180)	[97]
ATX-70	8 + 8 = 16	0.5 + 1	In vivo (colon 26 carcinoma)	[65]
ATX-70	12	0.5 + 1	In vivo (Walker 256 tumor)	[66]
ATX-70	4.5	1.93	In vitro (sarcoma 180)	[97]
ATX-70 derivatives	15	0.047	In vitro (HL-525 and HL-60)	[107]
ATX-70/F39 immunconjugate	1, 2	1	In vitro (KATO-III) and in vivo (xenograft model)	[55]
ATX-S10	3	2	In vitro (sarcoma 180) and in vivo (colon 26 carcinoma)	[42]
ATX-S10	6	2	In vitro (sarcoma 180)	[98]
Pheophorbide-a	4.5	2	In vitro (sarcoma 180)	[43]
Pheophorbide-a	0.51	1	In vivo (squamous cell carcinoma)	[60]
ClAl-phthalocyanine tetrasulfonate	3	1.92	In vivo (colon 26 carcinoma)	[44]
Chlorin PAD-S31	0.3	1	In vivo (neointimal hyperplasia)	[67]

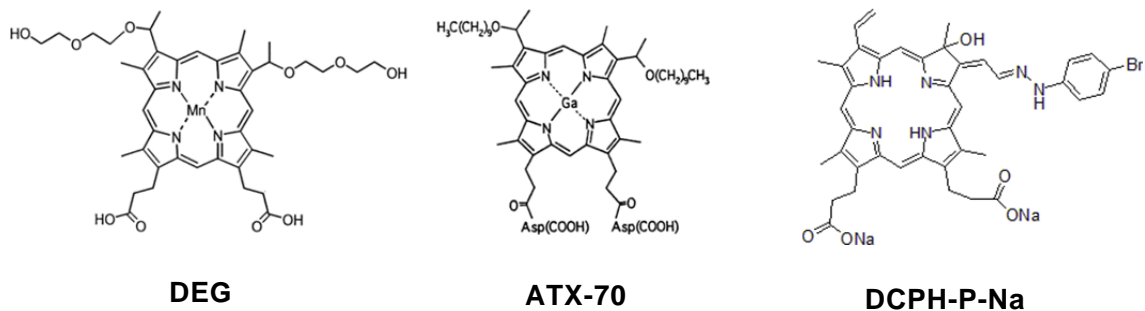


図5. ポルフィリン系超音波増感剤の化学構造式

1-5 5-aminolevulinic acid および Protoorphyrin IX

Protoporphyrin IX (PpIX) は、5-aminolevulinic acid (ALA) を原料としてミトコンドリア内での酵素反応によって生合成される内因性の物質である。ALAは生体内でグリシンとサクシニルCoAにより合成される。哺乳類細胞内の代謝反応は、少なくとも8段階のヘム合成酵素群と、2つのヘム代謝酵素と、ATP-binding cassette(ABC)トランスポーターによって制御されている。8段階の酵素反応のうち4つは細胞質内で順次行われる。以降のヘムまでの生合成反応はミトコンドリアで行われる。外因性に投与されALAはPEPT1もしくはPEPT2を介して取り込まれ、8つのALA分子からPpIXとなるが、腫瘍組織ではPpIXをヘムに変換するフェロキラーゼの活性が低下していることがしばしば報告されており、その際、PpIXが正常組織に比べ高濃度に腫瘍組織に蓄積する。PpIX自体は疎水性が高く正常組織への光過敏症を引き起こさせやすいので、それ自身を薬剤としては用いられにくい。ABCB6(ABCトランスポーター)は、コプロポルフィリノーゲンを細胞質からミトコンドリア内に輸送させているが、細胞膜上に発現しているABCトランスポーターであるABCG2はポルフィリンの排出に深く関与している。しかし、ALAの取込み・PpIXの排出などに関わる因子は上記記載だけではないと考えられており、詳細な分子機構は未だ明らかでない部分も多い。

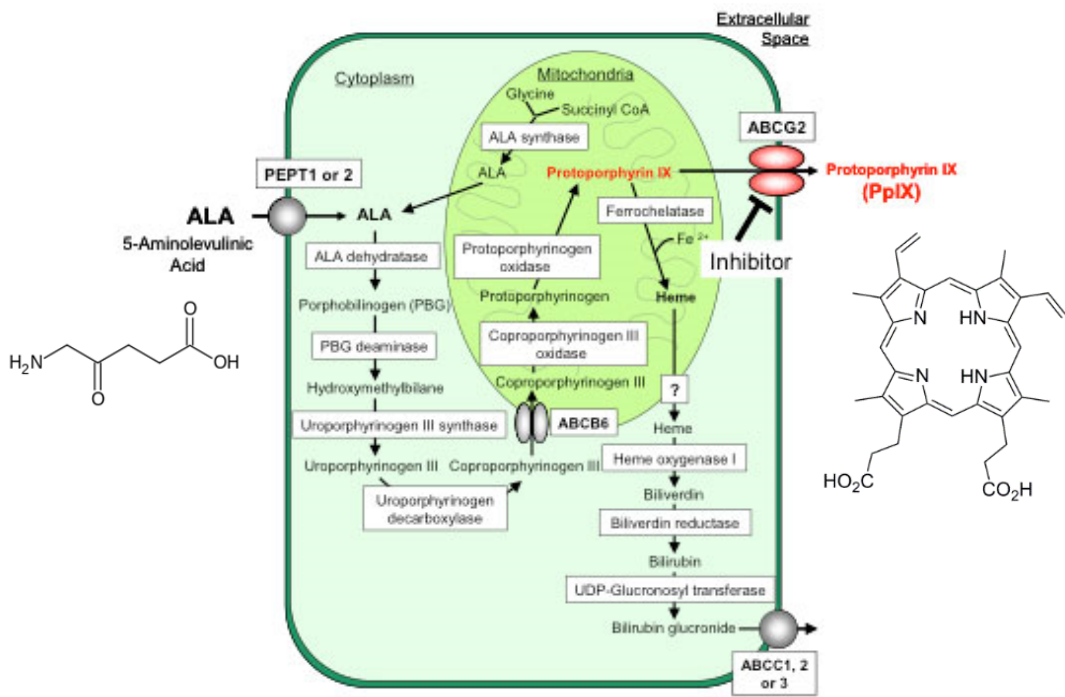
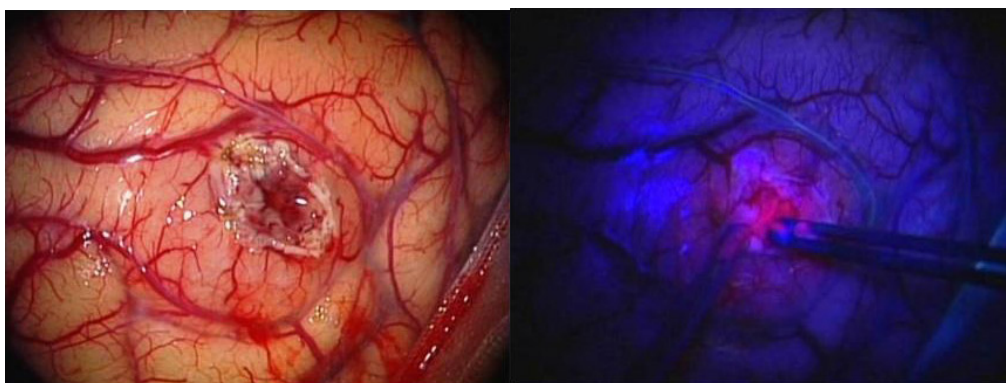


図6. ALAの細胞内生合成によるPpIXの生成経路

1-6 ALAの医療応用：光線力学的診断（PDD）と光線力学的療法(PDT)

ALA由来PpIXの励起波長は 410nm に最大のピークがあり、ほかに 510nm、545nm、580nm、630nm にもピークがあります。これらの特性を利用した光線力学的診断（PDD）や光線力学的療法（PDT）が現在行われている。

PDDの手法としては、ALAを投与しPpIXが集積した腫瘍にもっとも励起率が高い最大ピークの 410nm近辺の青色光を照射することで、腫瘍細胞のみを赤く光らせることができる。ALAは実際に術中蛍光診断として認可されている。通常の手術用顕微鏡では可視光しか出ないために、摘出部位が正常組織、腫瘍組織かの判断が難しいが、ALAを用いた蛍光診断を利用することで安全にかつ的確に腫瘍細胞を摘出でき、切除し残しによる再手術などのリスクを未然に防ぐことができる。



左図が400nm照射前、右図が照射後で腫瘍が赤色光を放っている

図7. ALAによる脳腫瘍の術中診断「横浜新緑総合病院 術中蛍光診断」より引用

光線力学的療法(PDT)とは、可視光では青色光に比べより組織透過性の高い630nmの赤色光を照射することでPpIXが励起されそれが基底状態に戻る際に産生される活性酸素（主として一重項酸素）により腫瘍細胞がネクローシスもしくはアポトーシスに陥ることで抗腫瘍効果が得られる。PDTの光源は、630 nm に吸光度を有するレーザーが用いられている。1回の有効照射量は 50 - 150 J/cm²、照射強度密度は 50 - 100mW/cm²とされている。このPDD及びPDTは、多方面の臨床に応用されるようになり、皮膚や胃や腸など消化管部位の表皮性腫瘍に対して良好な効果が期待できるようになった。しかし、PDTは透過性が低いため深層における腫瘍への治療効果が低いと指摘されている。このため、光よりも生体透過性が高くPpIXを増感させることが出来る新たな物理的作用での治療法が期待されている。

1-7 乳がんに対するALA-SDTの有効性

超音波を乳がん治療に用いるメリットとしては、超音波が脂肪組織に対して高い透過性を示すこと、乳房にメスを入れる必要がなく、副作用のリスク軽減に繋がることが挙げられる。

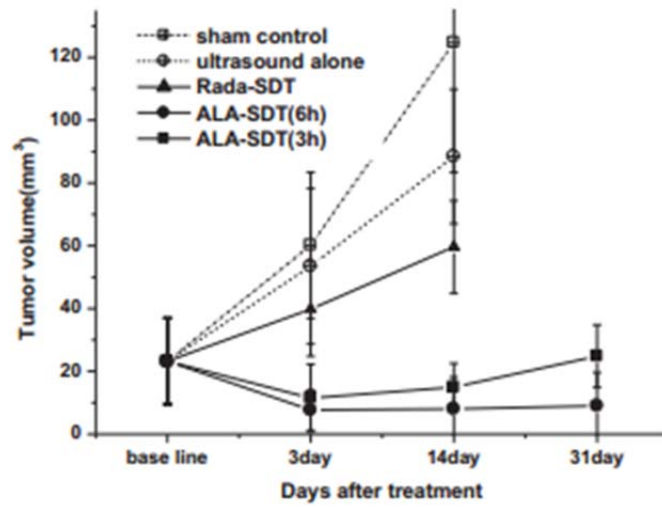


図 8. ラットグリオーマモデルに対するALA-SDTの抗腫瘍効果

また、ALA-SDTは動物モデルでもその抗腫瘍活性が報告されてきている。これらのことから、ALA-SDTが乳がん治療に対して有効な治療法になり得ると考えた。

そこで本研究では、マウス乳線がん細胞を移植した発育鶏卵およびマウスを用いてALA-SDTの抗腫瘍活性の評価と作用機序の解析を行った。

第2章 実験方法

2-1 細胞実験

2-1-1 細胞・培地・試薬

・ EMT6/KU（マウス乳腺がん由来細胞株：京都大学 増永先生より供与）は10%ウシ胎児血清入りのminimum essential medium Eagle (EMEM) で培養した(Sigma;with earle's salts,L-glutamine and NaHCO₃)。

・ ウシ胎児血清

ウシ胎児血清（FBS：Fetal Bovine Serum）を恒温槽中で56℃、30 min振盪しながら加熱することによって非動化した。その後、室温まで冷まし、新しい50 mLチューブに分注し冷凍庫で凍結保存した、使用する際は、37℃の恒温槽で溶かし、3000 rpm,10 minで遠心分離を行い沈殿が出来たのを確認後、上清を使用した。

・ EMEM/10%FBS

低温保存されている495 mLのEMEM（Eagle's minimum essential medium）に対して、非動化したウシ胎児血清（FBS：Fetal bovine serum）の上清55 mLを加えてEMEM/10%FBSを作製し、低温で保存した。

・ 10×PBS

塩化ナトリウム（NaCl）80 g、リン酸水素二ナトリウム・12水和物（Na₂HPO₄・12 H₂O）29 g、リン酸二水素カリウム（KH₂PO₄）2 g、塩化カリウム（KCl）2 gを量り取り、それらをmilliQに溶解させて1000 mLにメスアップした。その後、500 mLずつmedium瓶に分注、121℃、20 minオートクレーブ滅菌した。作製後、低温で保存した。

・ 1×PBS（培養室使用）

滅菌済み10×PBS 50 mLをSDWで500 mLにメスアップし、medium瓶に移して121℃、20 minオートクレーブ滅菌した。作製後、低温で保存した。

・ 1×PBS（CAM室使用）

滅菌済み10×PBS 50 mLを蒸留水で500 mLにメスアップし、medium瓶に移して低温で保存した。

- ・ 0.05% Trypsin-EDTA

0.5% Trypsin-EDTAを1×PBSで10倍に希釈し、0.05% Trypsin-EDTA液を調整した。

- ・ Trypan blue

Trypan blue を50 mLチューブに分注して使用した。

- ・ セルバンカー

セルバンカーを15 mLチューブに分注して使用した。

- ・ WST-1

DOJINDO製WST-1 (Lot No.EA070, EA016, FF092) を使用した。

- ・ 1-Methoxy PMS

2-1-2 実験器具

シャーレ φ6 (6cm×15mm) (TPP)、シャーレ φ10 (10cm×20mm) (TPP)、ピペット (2ml, 5ml, 10ml) (SIBATA)、メスピペット (5ml, 10ml) (SIBATA)、ピペットマン (200 μl, 1000 μl) (NICHIRYO)、15ml遠心チューブ (NUNC)、50ml遠心チューブ (CORNING)、手動式血球計数装置 (株式会社シーアイエス)、滅菌綿(カット綿) (MASUDA)、注射針 (18G) (NIPRO)、96穴プレート (Thermo scientific, 167008)、24穴プレート (SIGMA)、生理食塩水 (株式会社大塚製薬工場)、7%炭酸水素ナトリウム (メイロン液) (株式会社大塚製薬工場) Lot : M7H00 Lot : M7F98

2-2 腫瘍移植鶏卵およびマウスモデル使用した実験

2-2-1 試薬

- ・ 5-Aminolevulinic acid (SBI社より供与)
- ・ Triton X-100 (sigma)

- ・抱水クロラル(sigma)
- ・ソノゲル

2-2-2 実験器具

インキュベーター (ISUZU及びアドバンテック東洋)、転卵器 (四国理研)、ハロゲンライト (MORITEX)、カット綿 (MASUDA)、柄付きピンセット (AS ONE)、先曲りピンセット (AS ONE)、錐、テフロンリング (内径×外径×厚み=8mm×10mm×2mm)、ハサミ (直剪刀両鋭, AS ONE)、汎用注射筒 (NIPRO, 1mL, 10mL)、単回使用皮下注射針 (NIPRO, 18G×1 1/2, 25G×1, 27G×1)、96穴プレート (greinar, transparent, flat bottom)、マイクロプレートリーダー (Tecan)、グラインダー (URAWA minitor)、Opsite (smith&nephew)、Tegaderm Roll (3M)、マイクロピペット (NICHIRYO, 1000μL, 200μL, 20μL, 2μL)、マイクロピペット用青色チップ (greiner bio-one, 1000μL)、マイクロピペット用黄色チップ (BMBio, 200μL, 20μL)、プロワイプ (大王製紙株式会社)、キムワイプ (日本製紙クレシア株式会社)、コニカルチューブ (Nunclon, 15mL, 50mL)、単回使用皮下注射針 (エムエス, 30G 歯科用1/8)、電子天秤 (sartorius)、クリーンベンチ (SANYO)、マイクロチューブ (BMBio, 1.5mL, 2mL, 0.65mL)、mQ (超純水)、クランプ、UST-770(伊藤超短波)、光源 : LLS-405 VIS LED光源 (BAS社)、検出装置 : SEC2000-VIS/NIR、スペクトロメーターSLIT200、蛍光測定装置 (BAS社)、ハンディマイクロホモジナイザー (ヒスコロン社)、経口ゾンデ

2-3 活性酸素の検出

2-3-1 試薬

- ・APF(積水メディカル)
- ・1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF : TCI)
- ・ProtoporphyrinIX disodium salt(TCI)

- ・高速液体クロマトグラフィー用 CH₃CN (キシダ化学株式会社)
- ・重ベンゼン(大阪大学で使用)
- ・ 100 mM SPB

500 mlのmQに対してそれぞれNaH₂PO₄・2H₂Oを15.601 g(A液), Na₂HPO₄・12H₂Oを35.814 g(B液)溶解し作製する。その後、B液にA液を加えることによりpH = 7.0に調整し、オートクレーブ。オートクレーブ後は使用したい濃度に希釈しオートクレーブをかけ使用する。そのあと2倍希釈より100 mMに調整した。

2-3-2 実験器具

マイクロプレートリーダー(TECAN)、24穴プレート(SIGMA)、近赤外分光測光装置(浜松ホトニクス社)、

2-4 Jc-1を用いたミトコンドリア膜電位の変化

2-4-1 試薬

- ・ Jc-1(フナコシ)

他、2-1-1と同様

2-4-2 実験器具

BIOREVO(キーエンス)

2-5 実験操作

2-5-1 EMT6細胞に対する5-ALAの細胞毒性

1. 96穴プレートにEMT6細胞 2.0×10^2 cells/wellで播種。
2. 各濃度に調整した5-ALA溶液を添加。
3. 添加3 h後に、PBSでwashを行い、2時間インキュベート。

4. 72 hインキュベート後、WST-1 assayを行った。

2-5-2 EMT6細胞への5-ALA投与によるPpIX生成量

1. 3.0×10^4 cellsを $\phi 6$ のシャーレに播種し、24 hインキュベーション。
2. 24 h後(1.0×10^5 cells)に100 μ M 5-ALA(0.5 μ mol)で添加。
3. 5-ALA処理後それぞれの時間でPBSでwashを行い、400 μ lの2%-triton X-100を加え細胞を剥がした溶解液を回収。
4. 15000rpm \times 10minで遠心分離を行い上清 100 μ lを蛍光強度の測定に用いた。
(excitation : 410 nm emission : 630 nm)

2-5-3 EMT6細胞に対する5-ALA-SDTの殺細胞活性

1. 24穴プレートに 1.0×10^3 cells/well in 900 μ lでEMT6/KUを播種した。
2. 24 h後、10 mM 5-ALAを100 μ lで培地に添加(終濃度1 mM 5-ALA)。
3. 薬剤添加5 h後、PBSでwashし3400 μ lの培地をプレートに加えた(プレート一杯の培地量)。
4. 下記の照射条件で培地の表面上から照射を行った。
5. 照射から72時間インキュベートさせ培地量を500 μ lに調整し、WST-1試薬を50 μ l添加し2 h呈色させた。(450 nm吸光度測定)

ULS condition

frequency : 1MHz Probe : S Probe(有効照射面積 0.7 cm²) Duty Cycle : 20%
OutPut : 2.15W/cm²(= 1.5 w) Irradiation Time : 2 min

2-5-4 腫瘍移植鶏卵を使用したALA由来PpIXの薬物動態解析

day1

- ・ 転卵開始前の重量測定

1. 電子天秤を用いて卵の重量を測定し、37.6°Cでインキュベートした。

day11

・卵殻開け

1. Day11の卵の気室部からライトを当て、卵殻下の漿尿膜に存在している太く分岐がある血管の周囲にマーキングした。
2. 滅菌綿で卵を拭き、グラインダーで気室に穴を開け、マーキングした窓に切り込みを入れた。
3. ピンセットで卵膜を傷つけないように卵殻を剥がし、少し卵膜に穴を開け、気室の穴をスポイトで吸って血管を落とした。
4. 卵膜を剥がし、Opsiteで窓を閉じた。

・腫瘍添加

1. Opsiteを剥がし血管の分岐点近くにテフロンリングを置いた。
2. 予め調整しておいたEMT6/KU細胞を 2.5×10^5 cellsずつ卵のリング内に添加した。

day13

・リング外し

1. 各卵のリングを血管と膜を傷つけないようにして取り除いた。

day15

・試薬静注準備

1. 静注用の試薬を調整した。
2. 各卵に最も太い血管が見られる場所にマークし、グラインダーを用いて静注用の窓を作成した。
3. 各卵にALA 1 mg/egg in 100 μ L Salineを静注し、各系列の時間で腫瘍、肝臓、血液を単離した。

・腫瘍、肝臓、血液からPpIXの抽出、蛍光強度検出からの定量

1. それぞれ-80°Cで保管していたサンプルを室温で溶かし、腫瘍、肝臓に2% Triton

X-100 in DWを添加した。

2. ホモジナイズし抽出し、15,000 rpmで15分間遠心した。(血清は、希釈してそのまま測定に使用)
3. 上清400 μ Lを限外濾過スピンカラム、分画分子量100 kDa (amicon ultrafree-MC、UFC3BHK00)を用いて、100 kDa以下の画分(濾液)を分離し、測定に用いた。

2-5-5 腫瘍移植鶏卵を使用したALA-SDTの抗腫瘍活性

- ・ day15の腫瘍移植鶏卵に試薬を静注しUST-770を用いて腫瘍に直接超音波照射
- ・ day18にて腫瘍を摘出し腫瘍重量から抗腫瘍活性評価を行った。

ULS condition

Probe: S Output: 2.1 W Frequency: 1 MHz

Duty Cycle: 50% Irradiation time: 10 min

2-5-6 EMT6背部移植マウスモデルに対するALA-SDTの抗腫瘍活性

BALB/cマウスへのEMT6背部移植

1. 8週齢 BALB/c マウスに EMT6 細胞 1.0×10^6 cells/mouse で背部移植した。

ALA-SDT 効果の検討

1. 移植 6 日後の各マウスの体重(15-20 g)を測定し、5-ALA(300 mg /kg) in 100 μ L Saline で経口投与を行った。
2. 投与後 3 h に、20 mg/mL で調整した抱水クロラールを 300 μ L 腹腔内投与した。
3. 麻酔の効果が現れた約 10 min 後、マウスの乳腺腫瘍に 1 cm ゲルを介して result 記載の条件で超音波照射を行った。

2-5-7 DPBF法による一重項酸素の検出

1. アセトニトリルに溶解させた 2.0 μ M PpIXと 50 μ M 1,3-Diphenylisobenzofurane 混合液に超音波照射を行った。
2. 照射した混合液を分光光度計で 450 nm の吸光度測定を行った。

ULS condition

output : 3.4W/cm² (Effective Treatment Area : 0.735 cm²) \doteq 2.5W

frequency : 986kHz Duty Cycle : 80% (on:4 off:1) irradiation time : 2 min \times 5 =10 min

2-5-8 発光スペクトル法による一重項酸素の検出

1. ProtoporphyrinIX Met(メチルエステル体)を重ベンゼンに2.25 mMになるよう溶解させた。
2. 近赤外分光測光装置を使用し、PpIX溶液に超音波照射を行いながら1270 nm 付近での一重項酸素による吸収を直接的に観測した。

ULS condition

Power: 0.1 W/cm² \times Effective Treatment Area (0.283 cm²) = 0.0283 W;

Frequency: 986kHz; Duty Cycle: 100%

2-5-9 APF法によるOHラジカルの検出

1. 100 mM SPB(pH=7.0)を用いて10 μ M Protoporphyrin disodium salt と5 μ M APFを溶解し、混合液を作成した。
2. 下記の照射条件で照射を行い、PpIX-SDTIによるOHラジカルの生成を見た。
(excitation : 490 nm emission : 515 nm)

ULS Condition

Probe : S Frequency : 1MHz Output : 3 W/cm²(=2.1 W)

Duty Cycle : 50% Irradiation Time: 1, 2, 3 min

2-5-10 ALA-SDTによるミトコンドリア膜電位の観察

1. 24穴プレートにEMT6細胞を 2×10^4 cells/ wellで播種した。
2. 24 h後、終濃度1mMになるよう5-ALAを添加した。
3. 5-ALA添加 4 h後、PBSwashを行い、10 μ g/mL in medium JC-1で染色を行った。
4. JC-1添加 1 h後、1 \times PBSでwashを行い、超音波を照射した。

ULS condition

Probe : S Probe(有効照射面積 0.7 cm²) Frequency : 1MHz

Duty Cycle : 20% OutPut: 1.5 W

第3章 結果・考察

3-1 マウス乳がん由来EMT6細胞に対するALAの細胞毒性

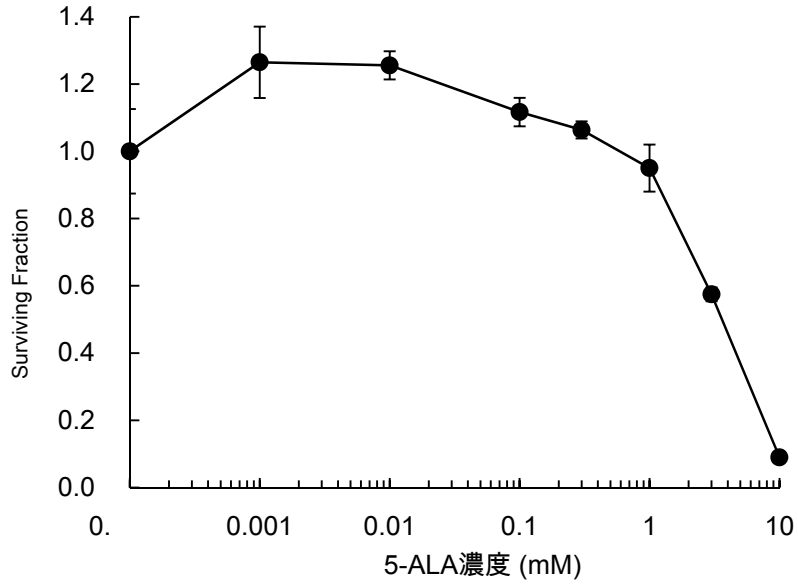


図 9. ALAのEMT6細胞毒性

3-2 EMT6細胞におけるALA由来PpIX生成量の経時変化

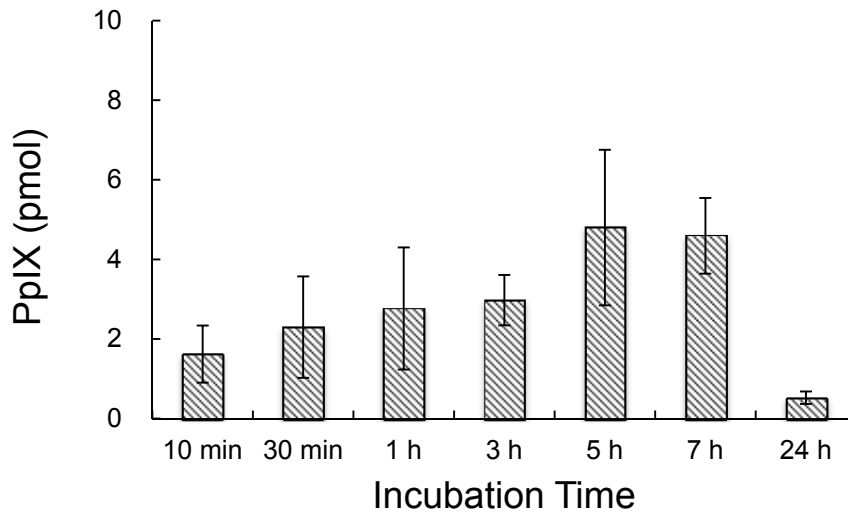


図 10. EMT6細胞におけるALA由来PpIX生成量の経時変化

3-3 EMT6細胞に対する5-ALA-SDTの殺細胞活性

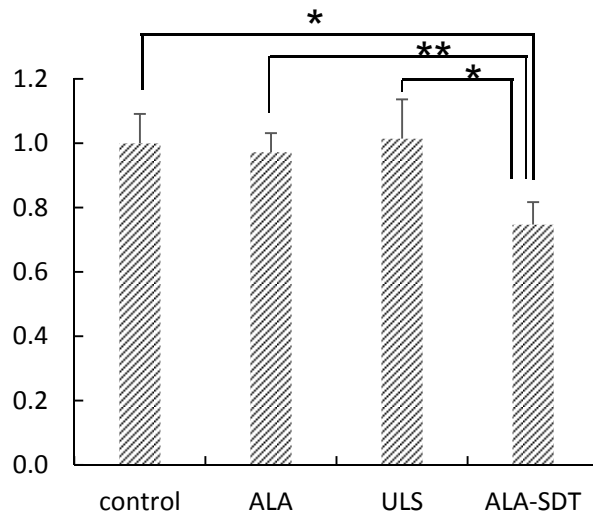


図 1 1. EMT6細胞に対する5-ALA-SDTの殺細胞活性

ALA-SDTはEMT6細胞に対して阻害率は低いがALA-SDT群で有意な抗腫瘍活性が見られた。以前の実験において、EMT6細胞でのALA添加後の細胞内PpIX量を経時的に定量しており、EMT6細胞では5時間後にPpIX量が最大に達していた(データ未掲載)。

3-4 腫瘍移植鶏卵を使用したALA由来PpIXの薬物動態解析

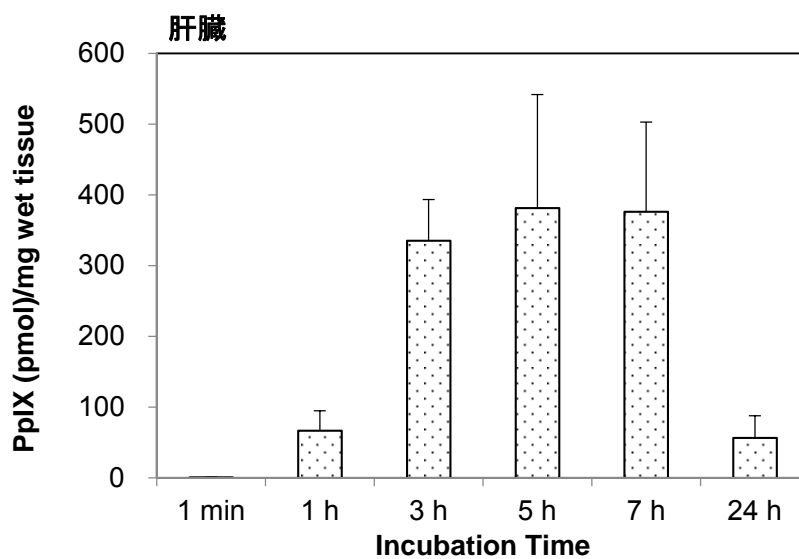


図 1 2 . ALAを静注した腫瘍移植鶏卵の肝臓組織内PpIX濃度

肝臓組織内PpIX濃度は、5時間後をピークに緩やかな減少が見られた。3-7時間後の濃度は他の動物モデルの動態と比較して高濃度を示している。胎児造血は、初期胚では卵黄嚢、中期胚では肝臓、脾臓、出生前では骨髄と知られており(パッテンの発生学)、鶏卵法での実験期間中では肝臓でほとんどの造血が行われていると考えられる。すなわち、ヘム合成も盛んに行われており、ALAの取り込みも高いことが示唆できる。

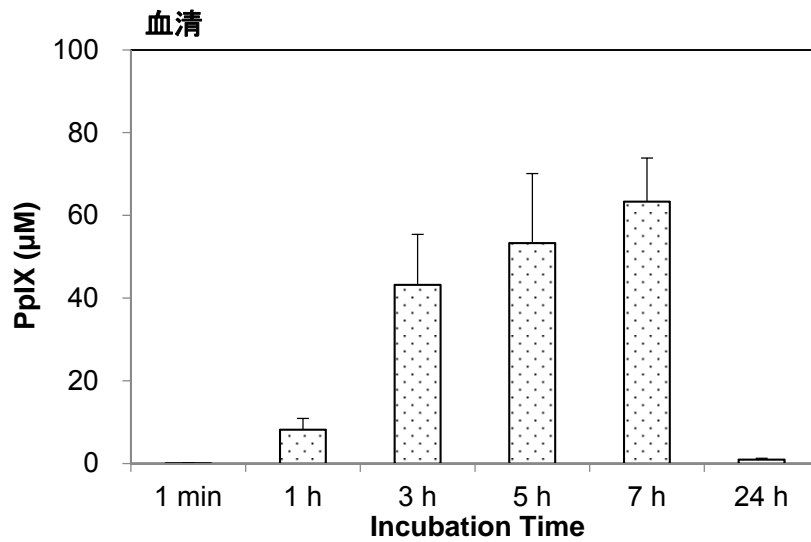


図 1 3 . ALAを静注した腫瘍移植鶏卵の血中PpIX濃度

血中動態では投与後7 h後まで増加が見られ、24 h後では著しい減少が見られた。

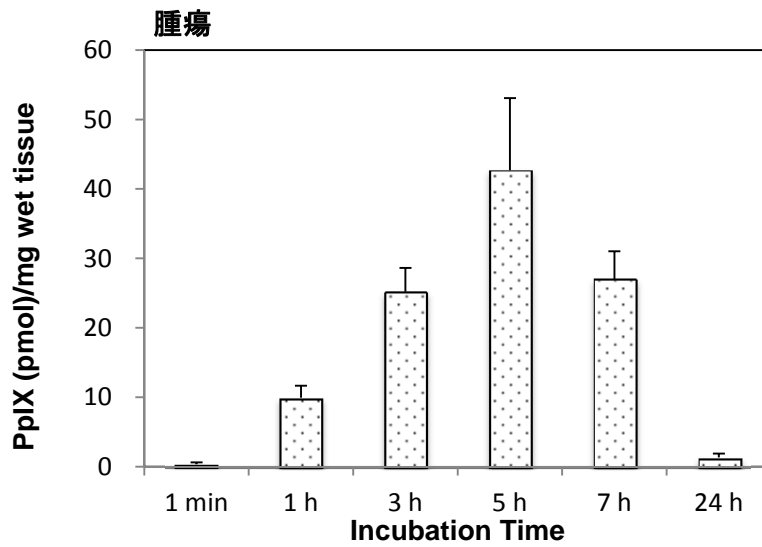


図 1 4. ALAを静注した腫瘍移植鶏卵の腫瘍内PpIX濃度

腫瘍内PpIX濃度の経時変化も肝臓と同様に、投与後5時間後に最大濃度に達し最大濃度に達し、ヒトや他の動物モデルで報告されている動態と同様の結果を示した。肝臓、血中においても高濃度のPpIXが確認されたことから、正常組織で生合成されたPpIXが血液を介して全身に分布している可能性が示唆された。

3-5 腫瘍移植鶏卵を使用したALA-SDTの抗腫瘍活性

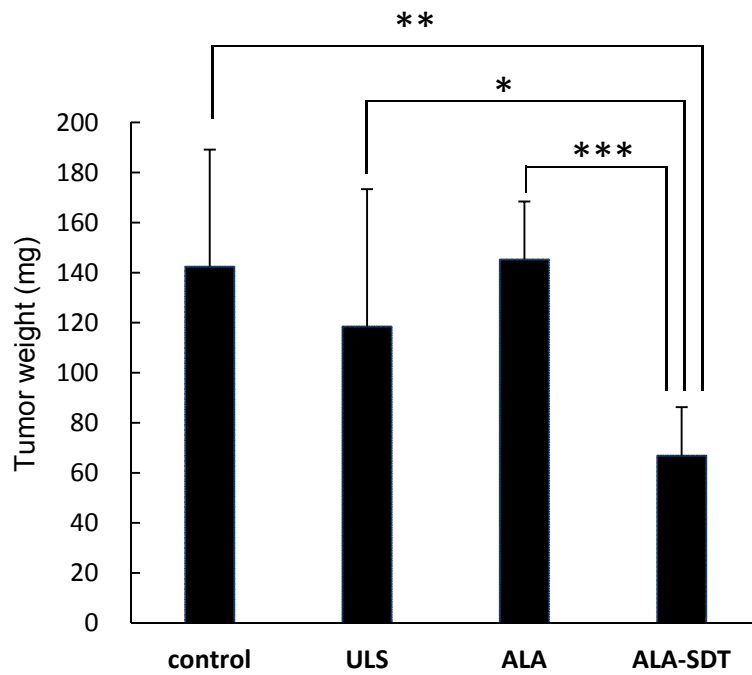


図 1 5 . 腫瘍移植鶏卵に対するALA-SDTの抗腫瘍活性

ALA-SDT 群はコントロール、超音波照射群、ALA 投与群に比べて有意な腫瘍成長抑制効果を示した。以上の結果より、発育鶏卵を用いた *in vivo* 評価系により、5-ALA の薬物動態と超音波増感活性の評価に成功した。

3-6 EMT6/KU背部移植マウスモデルに対するALA-SDTの抗腫瘍活性

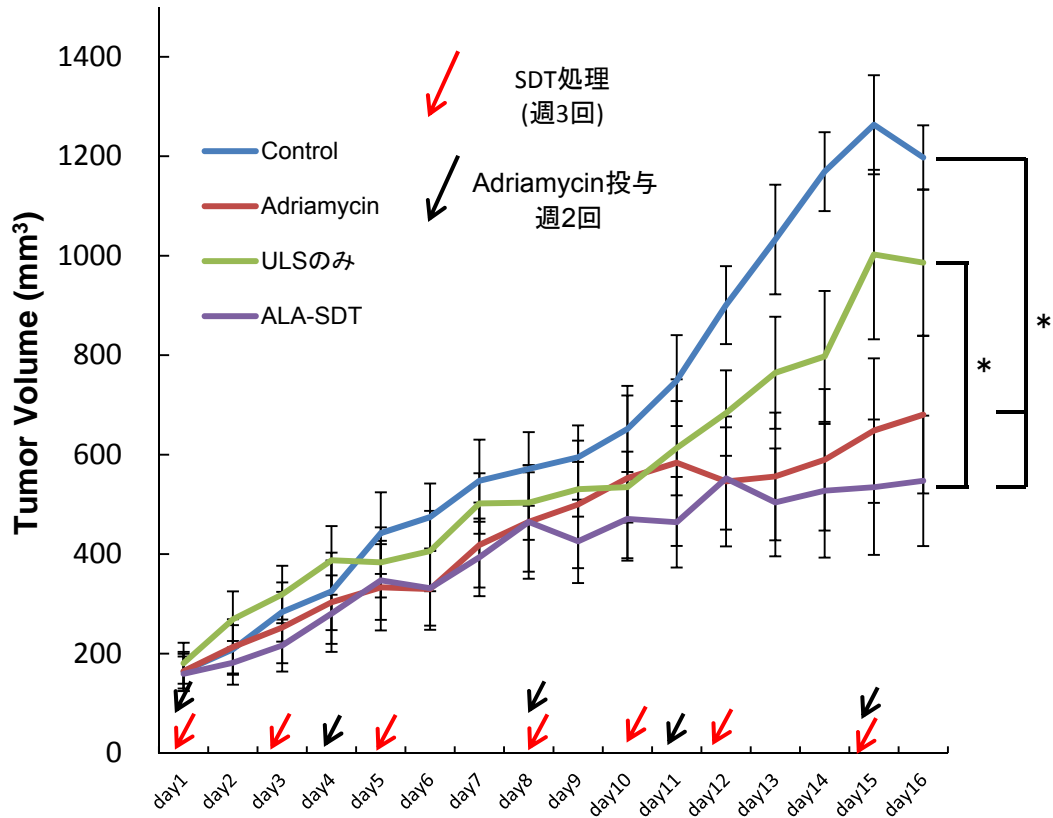


図 1 5 . 腫瘍移植マウスに対するALA-SDTの抗腫瘍活性

EMT6/KU背部移植マウスモデルに対して、週3回のALA-SDT処理では腫瘍体積の成長抑制を示していることが分かる。16日後の時点で、ALA-SDT処理群はcontrol群およびULS群と比較して有意な抗腫瘍効果を示した。ALA-SDTはULS群に対しても有意差が見られたため、ALAの超音波増感剤としての有効性が示唆される。

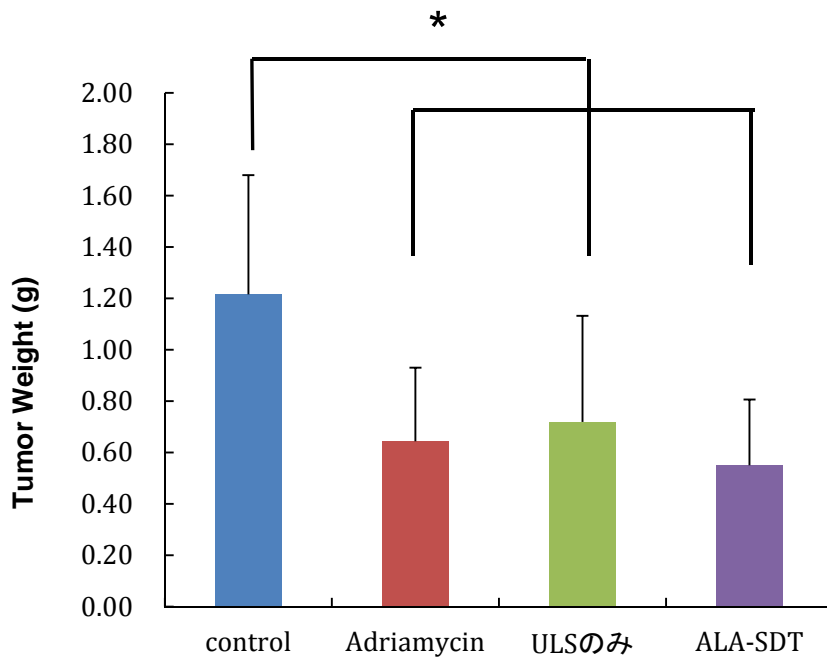


図 1 5 . 16日後に単離した腫瘍重量の比較

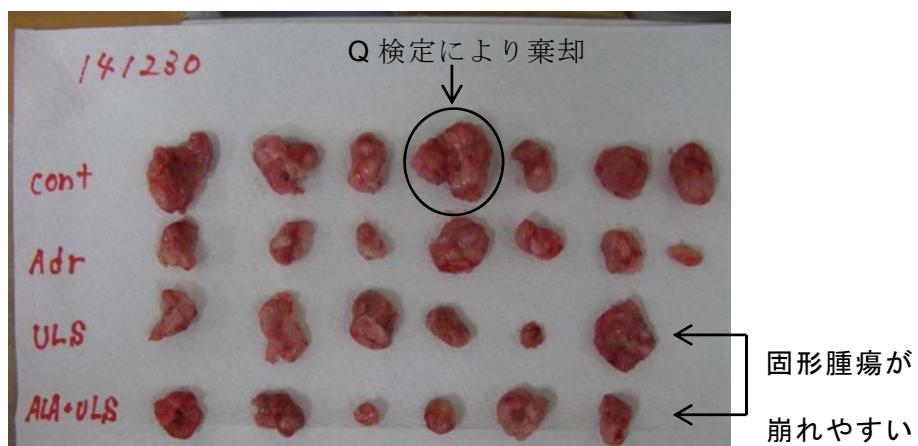


図 1 6 . 16日後に単離した腫瘍の写真

16日後に単離した腫瘍重量においてもALA-SDT群は有意な減少が見られたが、ULS群とALA-SDT群との間には有意差は得られなかった。超音波を照射したULSのみ群とALA-SDT群の摘出した固形腫瘍は、崩れやすく脆いといった形状が多く見られた。これは、超音波照射による細胞膜へのダメージによる効果が考えられる。

また、腫瘍移植鶏卵法とマウスモデルを用いたALA-SDTの抗腫瘍活性は同じような相関が見られ、発育鶏卵を用いた超音波増感剤の評価系が有効であると考えられる。

以上の結果より、ALA-SDT が乳がん動物モデルに対して有効な抗腫瘍効果を有することが示された。

3-7 DPBF法による一重項酸素の検出

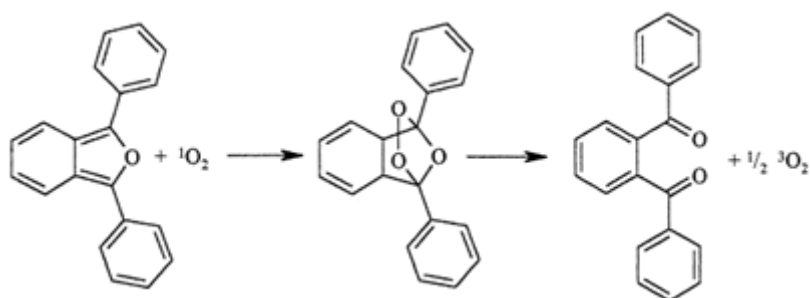


図 1 7 . 1,3-Diphenylisobenzofuran(DPBF)と一重項酸素の反応

DPBFは一重項酸素と選択的に反応して酸化分解されることでDPBF由来の吸収ピークである410 nmの吸光度が低下する。

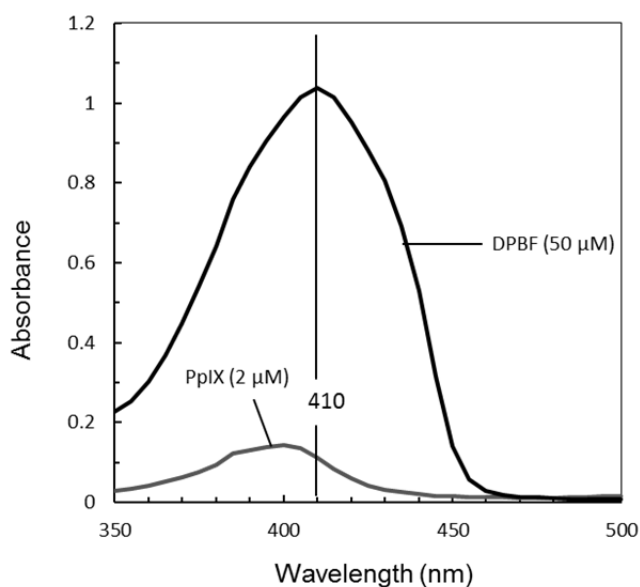


図 1 8 . DPBFおよびPpIXの吸収スペクトル

今回実験で使用したALAの生体内代謝物であるPpIXの吸収ピークもDPBF同様の410 nm付近に存在する。このため、DPBFの吸光度の値に対してPpIX由来のピークが10分の1以下の条件に設定し実験を行っている。

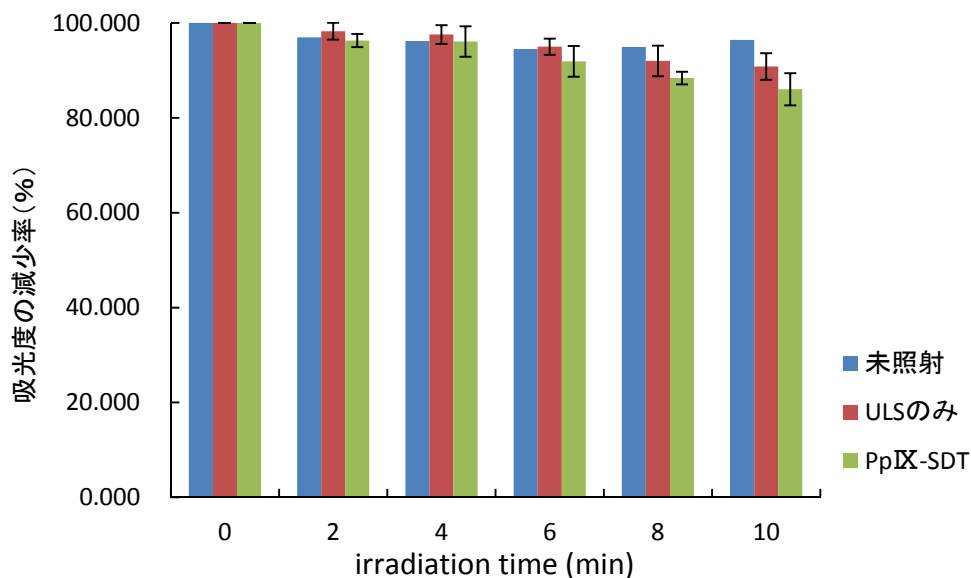


図 1 9 . DPBF法によるPpIX-SDTの一重項酸素の生成

PpIX-SDT群にDPBF由来の吸収ピークの低下傾向は見られたが、有意な減少ではなかったことから、PpIX-SDTでは一重項酸素は生成しないことが示唆される。

3-8 発光スペクトル法による一重項酸素の検出



近赤外分光測光装置(浜松ホトニクス社)

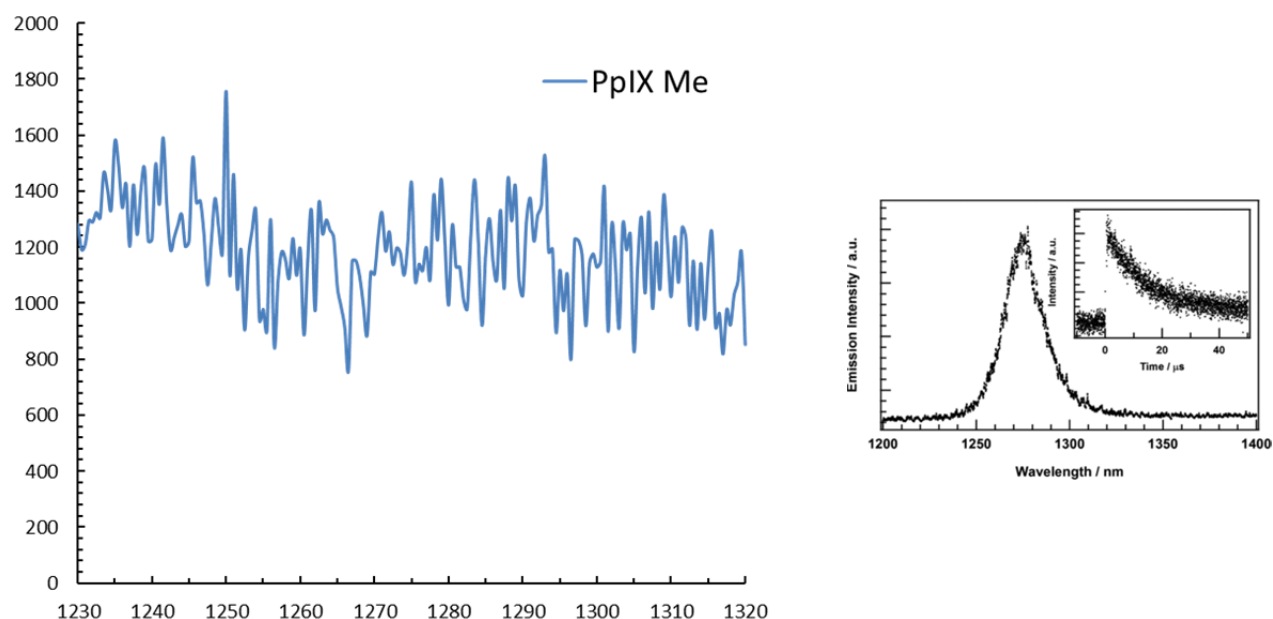


図 20. PpIX-SDTによる一重項酸素の発光スペクトルの検出

一重項酸素が1270 nm付近で発光示すことから、近赤外分光測光装置を使用して2.25 mM PpIXmetylester溶液に超音波照射しながらリアルタイムで一重項酸素の検出を試みたが、Fig21の結果から分かるように有意な吸収ピークの観察は出来なかった。

この結果からSDTの抗腫瘍活性と一重項酸素の関与は小さいことが示唆された。Fig3の実験で使用されているようなヒスチジン、マンニトールといった活性酸素の消去剤は、活性酸素種に対して高選択的に消去していないことも考えられる。また、ヒスチジンの共存で細胞毒性の低下が抑制されているが、これはアポトーシスの際などに発生する活性酸素を消去し細胞を保護しているとも考えられることから、更に詳細なメカニズム探索が必要である。

よって、一重項酸素以外の活性酸素検出・細胞内活性酸素の検出・ミトコンドリア膜電位変化の観察といった観点からメカニズム探索を行った。

3-9 APF法によるOHラジカルの検出

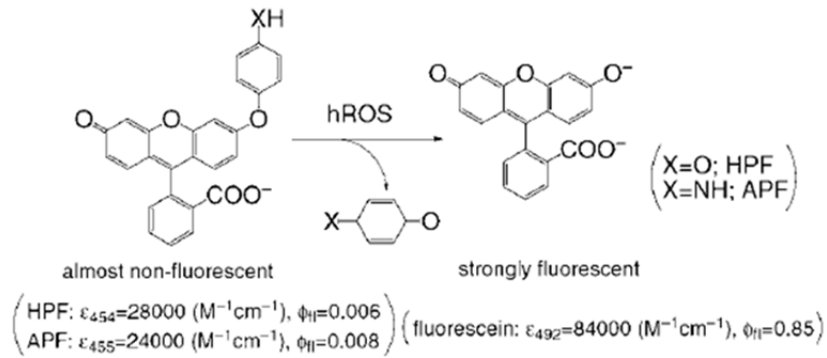


図 2 1 . APF試薬とROSの反応

APFは、ヒドロキシルラジカルやパーオキシナイトライト (ONOO-) のような強い活性を持つ活性酸素種を他の活性酸素種 (O_2^- 、 H_2O_2 、 $^1\text{O}_2$ 、NO等) から区別して検出できることで知られている。今回の実験系では無細胞系のSPB中で実験を行っているためにOHラジカルのみを選択的に検出できることが考えられる。

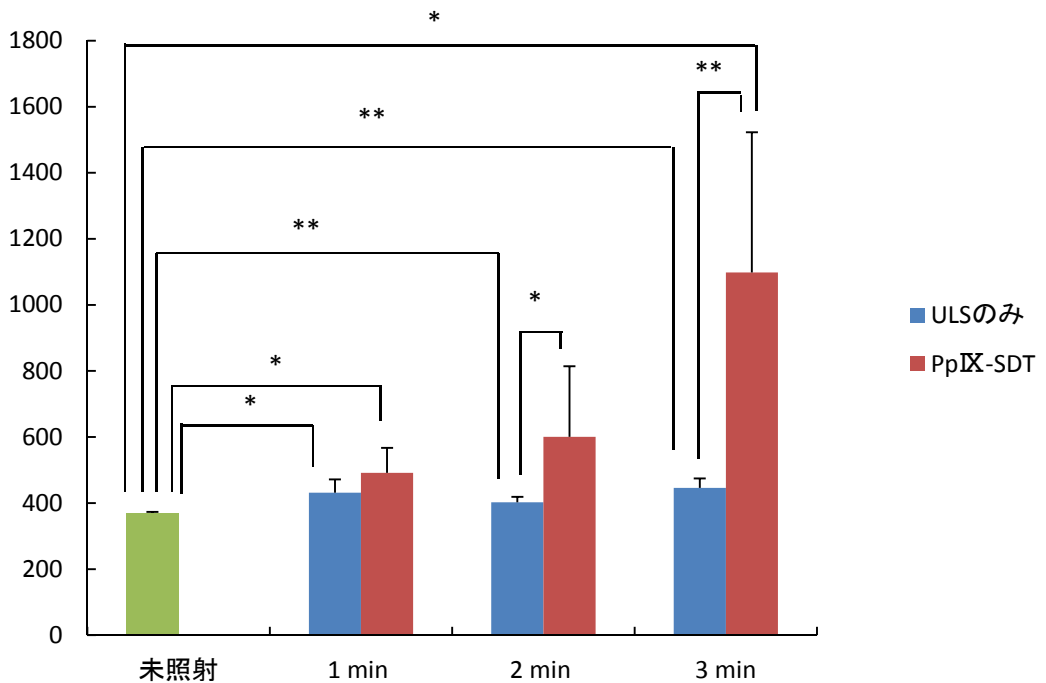


図 2 2 . APF試薬を用いたPpIX-SDTによるOHラジカルの検出

この結果より、照射時間に依存したPpIX-SDT群での蛍光強度の増大が観察されたため、超音波の強度に依存したOHラジカルの産生を示した。また、ULSのみ群においても未照射群と比較したときに有意差がみられたため、超音波照射単独でも水中でOHラジカルを産生させていることが考えられる。以前の実験で、APF法により1 MHzと3 MHzの超音波照射することでのOHラジカル産生能の比較を行った際に1 MHzの条件ではOHラジカルの産生は見られたが、3 MHzでは検出できなかった。(データ未掲載)これは、1 MHzで起きているようなキャビテーションが3 MHzでは起きていないことを示している。

2, 3 min照射を行った条件では、ULSのみ群とPpIX-SDT群の間にも有意差が見られ超音波照射によってPpIXを介した有意なOHラジカルを産生していることが示唆される。PpIXが光によって励起されるように、超音波によっても励起されているかもまだ明らかではない。PpIXが超音波照射されている条件下で、溶存酸素と反応し分解することで活性酸素が産生している可能性も考えられるため、今後更なる詳細な検討が必要である。

3-10 JC-1を使用したALA-SDTによるミトコンドリア膜電位変化の解析

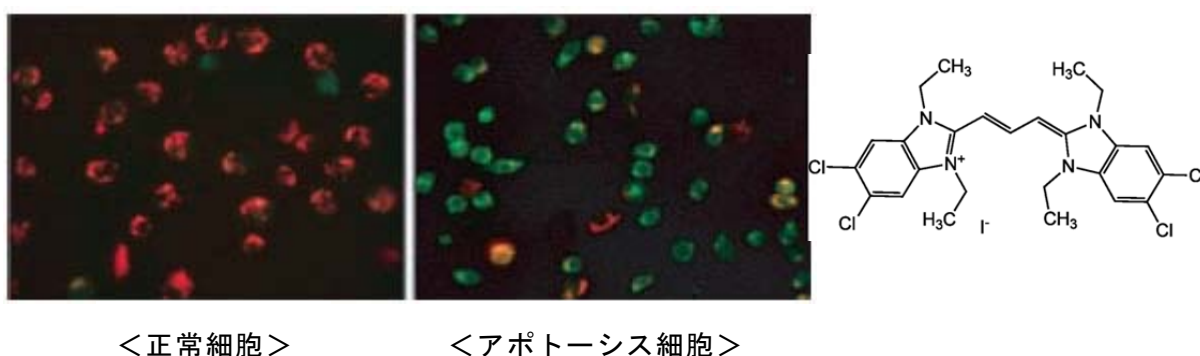


図 2 3. JC-1試薬の化学構造式と正常細胞およびアポトーシス細胞での蛍光特性

JC-1は、ミトコンドリアの脂質二重膜に取り込まれ、膜電位に応じて可逆的に形状と蛍光が変化する蛍光プローブです。膜電位を有するミトコンドリアでは凝集して存在し、赤色蛍光を発します。ミトコンドリア膜電位が消失するとモノマー状に拡散し、緑色蛍光を発する。

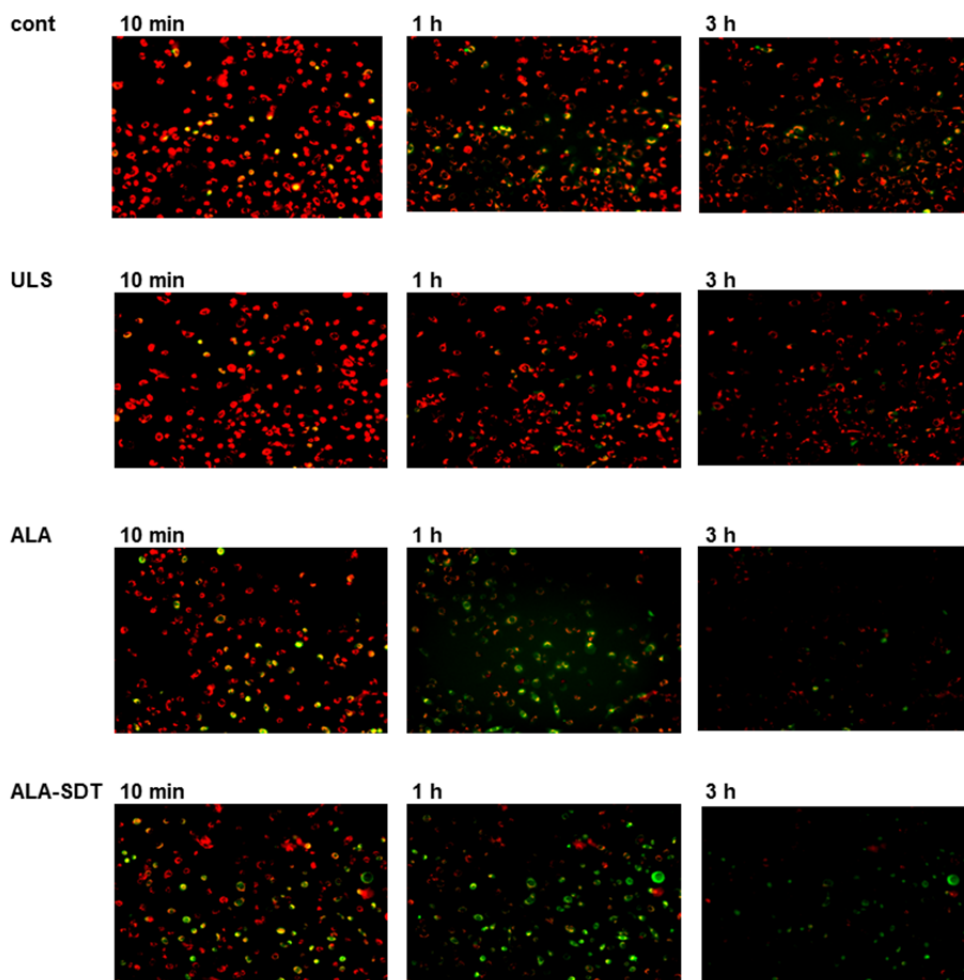


図 2 4 . ALA-SDTによるEMT6細胞のミトコンドリア膜電位の変化

ControlおよびULS群では正常細胞のままを維持しているのに対して、ALA-SDT群では処理後すぐに緑蛍光が見え始め1時間後ではその蛍光がしっかりと確認できる。ALA群にも緑蛍光が見え始めているが、これはタイムラプスによる蛍光イメージングの際

の励起光 530 nmでPDTが僅かに起こっているためと考えられる。

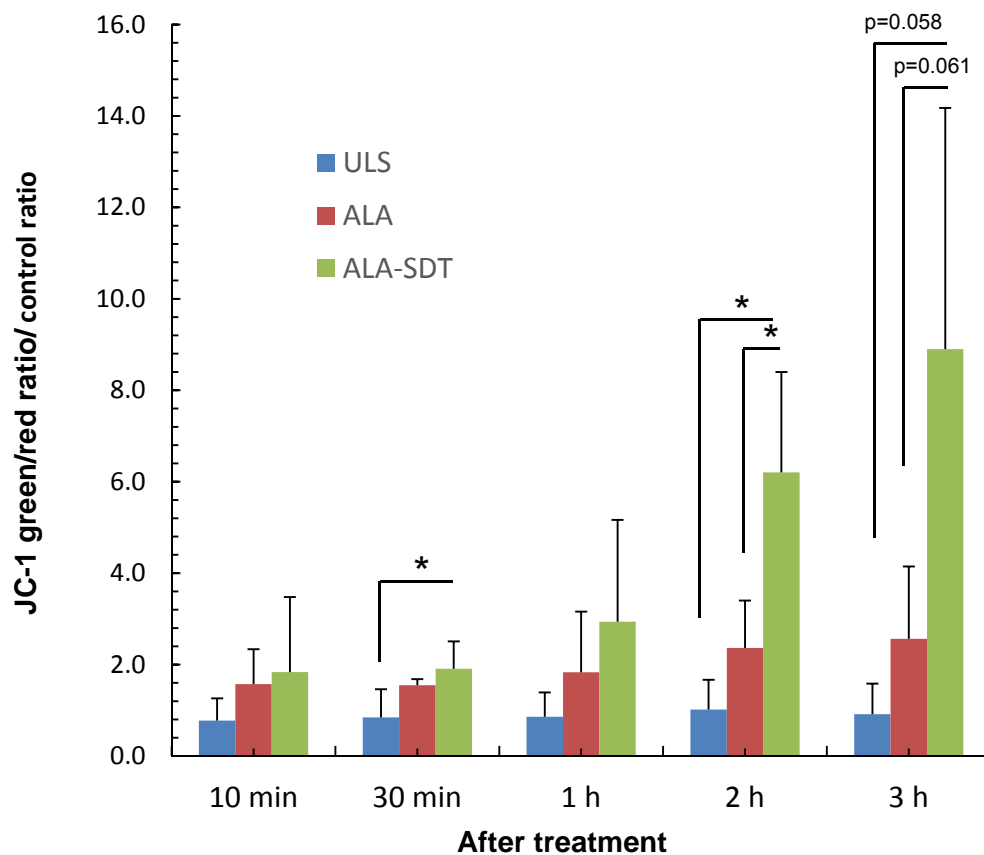


図 2 5. 図 2 4 の結果を数値化した図

ALA-SDT処理を行った群で経時的にミトコンドリア膜電位の低下が起こっており、2 h後で有意な差を示した。ALA添加後細胞のミトコンドリア内に過剰にPpIXが蓄積した条件で超音波照射を行うことでPpIXを介したOHラジカルが産生され、ミトコンドリア膜に損傷を与え細胞死に導いていることが示唆される。

第4章 結論

マウス乳線がん細胞を移植した発育鶏卵及びマウスに対して ALA-SDT は有意な抗腫瘍活性を示した。また、ALA-SDT の作用機序は OH ラジカルを介したミトコンドリアの酸化的損傷によることが示唆された。

第5章 参考文献

1. Sonodynamically Induced Antitumor Effects of 5-Aminolevulinic Acid and Fractionated Ultrasound Irradiation in an Orthotopic Rat Glioma Model, Jeong EJ 2012 Dec;38(12):2143-50
2. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer, Xiaohua Chen 2010 July 30
3. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation., Kobuchi H PLoS One. 2012;7(11):e50082
4. Involvement of reactive oxygen species in the enhancement of membrane lipid peroxidation by sonodynamic therapy with functionalized fullerenes., NAGAIKO YUMITA Anticancer Res. 2014 Nov;34(11):6481-7.
5. Biarmed Poly(ethylene glycol)-(pheophorbide a)₂ Conjugate as a Bioactivatable Delivery Carrier for Photodynamic Therapy, Wool Lim Kim Biomacromolecules, 2014, 15 (6), pp 2224–2234
6. Pro-oxidant effect of ALA is implicated in mitochondrial dysfunction of HepG2 cells, Laafi J Biochimie. 2014 Nov;106:157-66. doi: 10.1016
7. Tumor growth inhibition by sonodynamic therapy using a novel sonosensitizer Tsuru H Free Radic Biol Med. 2012 Aug 1;53(3):464-72
8. 5-Aminolaevulinic acid enhances ultrasound-induced mitochondrial damage in K562 cells, He Y Ultrasonics 50:8 2010 Aug pg 777-81
9. Spectroscopic analyses on ROS generation catalyzed by TiO₂, CeO₂/TiO₂ and Fe₂O₃/TiO₂ under ultrasonic and visible-light irradiation, Mingming Zou Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy Volume

101, 15 January 2013, Pages 82–90

10. Sonodynamic therapy, Katsuro Tachibana, *Ultrasonics* 48 (2008) 253–259
11. Sonodynamic therapy—a review of the synergistic effects of drugs and ultrasound, Ionel Rosenthal, *Ultrasonics Sonochemistry* 11 (2004) 349–363
12. SONODYNAMICALLY INDUCED ANTI-TUMOR EFFECT OF 5-AMINOLEVULINIC ACID ON PANCREATIC CANCER CELLS, YAN JING LI, *Ultrasound in Med. & Biol.*, Vol. 40, No. 11, pp. 2671–2679, 2014
13. Induction of apoptosis by *Rhizoma Paridis* saponins in MCF-7 human breast cancer cells, Chuan Lu, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* Vol. 5(8), pp. 1086-1091, August 2011
14. Monitoring Singlet Oxygen and Hydroxyl Radical Formation with Fluorescent Probes During Photodynamic Therapy, Michael Price, *Photochemistry and Photobiology*, 2009, 85: 1177–1181
15. Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species, Ken-ichi Setsukinai, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:3170-3175.
16. Study of the mechanism of sonodynamic therapy in a rat glioma model, Dayong Song September 2014 Volume 2014:7 Pages 1801—1810