

論文 / 著書情報
Article / Book Information

| | |
|-------------------|--|
| 題目(和文) | 腫瘍内低酸素環境におけるポルフィリン代謝機構の解明 |
| Title(English) | |
| 著者(和文) | 大塚慎平 |
| Author(English) | Shimpei Otsuka |
| 出典(和文) | 学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10500号, 授与年月日:2017年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小倉 俊一郎,中村 聡,三原 久和,和地 正明,蒲池 利章 |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10500号, Conferred date:2017/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,, |
| 学位種別(和文) | 博士論文 |
| Category(English) | Doctoral Thesis |
| 種別(和文) | 論文要旨 |
| Type(English) | Summary |

論文要旨

THESIS SUMMARY

| | | | |
|-------------------------|--------|----|---|
| 専攻： Department of | 生物プロセス | 専攻 | 申請学位 (専攻分野)： 博士 (工学) Academic Degree Requested Doctor of |
| 学生氏名： Student's Name | 大塚 慎平 | | 指導教員 (主)： Academic Advisor(main) 小倉 俊一郎 |
| | | | 指導教員 (副)： Academic Advisor(sub) |

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

生体内においてヘム生合成経路は細胞機能の恒常性維持に対して重要な役割を担っており、その代謝機構の破綻は様々な疾患の原因となる。また、ヘムの前駆体であるアミノレブリン酸 (ALA)は腫瘍特異的に蛍光物質であるプロトポルフィリン IX (PpIX)を蓄積することから、様々ながんに対して術中診断や光線力学療法の臨床応用が期待されている。一方固形腫瘍の一つの特徴に、酸素や栄養、薬剤などが届きにくい低酸素環境が存在することが知られている。腫瘍内低酸素環境は放射線抵抗性や薬剤抵抗性の原因となり、ALAを用いた光線力学療法 (ALA-PDT)においても治療抵抗性の原因となることが考えられる。また、酸素と親和性の高いヘムの制御は低酸素環境における適応応答に重要であることが考えられる。しかしながら、低酸素環境におけるポルフィリン代謝の変化やその制御には不明な点が多い。本研究では、低酸素下のがん細胞におけるポルフィリン代謝に対し、通常酸素下と低酸素下のポルフィリン代謝物や遺伝子発現変化を包括的に比較した。以上の知見より、腫瘍内低酸素環境におけるポルフィリン代謝機構の全容を解明することを目的とした。

先行研究により低酸素下においてALAを投与してもPpIXはほとんど蓄積せず、PDTによる細胞殺傷効果が減少することが知られていたが、その分子機構については不明であった。先行研究により、低酸素下でALAを投与するとPpIXの中間体であるコプロポルフィリノーゲン III (CPgenIII)の細胞外への排出が促進されることが示された。しかしながら、低酸素下においてポルフィリン代謝機構については明らかではなかった。そこで、低酸素下におけるポルフィリン代謝機構を明らかとするために、酸素濃度によるポルフィリン蓄積の変化を調べた。その結果、10% O₂以下において酸素濃度が減少するにつれてPpIXの蓄積が減少し、それに伴い細胞外CPIII量が増加した。このことから、酸素濃度がPpIX蓄積と細胞外CPIII量と深く関わることが示唆された。一方、低酸素下におけるポルフィリン代謝に関わる遺伝子発現変化はポルフィリン蓄積に影響を与えなかった。

ポルフィリン生合成経路の中で、ミトコンドリアのポルフィリン生合成酵素はその代謝に分子状酸素を必要とする。そこで、ミトコンドリア内ポルフィリン生合成酵素におけるPpIX合成を通常酸素下と低酸素下において比較した。その結果、低酸素下においてはミトコンドリアにおける酸素が不足し、PpIXの合成量が減少することを示した。また、ミトコンドリアにおける酸素利用の大部分は呼吸鎖複合体によるエネルギー産生に用いられている。このことから呼吸鎖複合体を阻害し、ミトコンドリアにおける酸素利用を抑制した。その結果、低酸素下においても細胞外CPIII量は減少し、PpIXの蓄積量が回復することが分かった。これらの結果より、低酸素下において呼吸鎖複合体の阻害を行うことでALA-PDTに対する抵抗性を回避することができることが示唆された。

生体内で発生する腫瘍低酸素領域を模倣するために三次元培養モデルであるスフェロイドを用いて、ALA投与によるPpIXとCPIII量を調べた。その結果、スフェロイドにおいて細胞外でCPIIIが検出され、呼吸鎖複合体阻害剤の添加によって細胞外CPIII量は減少することが明らかとなった。このことから、スフェロイドにおける低酸素領域においてもミトコンドリアにおける酸素利用が制限され、PpIX合成量減少とそれに伴った細胞外CPIII量の増加が起きていることが示された。一方でスフェロイドのPpIX蓄積量は呼吸鎖複合体阻害剤を行っても増加しなかった。さらに、スフェロイドの共焦点レーザー顕微鏡解析により、スフェロイド内部におけるPpIX蓄積分布は呼吸鎖複合体阻害を行っても完全には回復しないことが明らかとなった。このことから、スフェロイド内部におけるPpIX蓄積量の減少はスフェロイドにおけるCPgenIII産生のみならず、ALA輸送量の減少や低酸素下におけるポルフィリン代謝に関わるトランスポーターの発現の変化など他の要因も重要であることが示唆された。

本研究により、低酸素下におけるPpIX産生にミトコンドリアの酸素利用が重要な役割を担っていることが明らかとなった。これらの結果は腫瘍内低酸素環境におけるヘム生合成経路に対し、新しい分子機構モデルとなることが期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

| | | | | | |
|-------------------------|--------|----|--|-----------|------|
| 専攻： Department of | 生物プロセス | 専攻 | 申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested | Doctor of | (工学) |
| 学生氏名： Student's Name | 大塚 慎平 | | 指導教員 (主)： Academic Advisor(main) | 小倉 俊一郎 | |
| | | | 指導教員 (副)： Academic Advisor(sub) | | |

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Heme biosynthetic pathway plays a critical role in maintaining the homeostasis of cellular function in the human body, and its breakdown causes various diseases. Tumor hypoxia is formed by the excess proliferation of cancer cells and irregular angiogenesis, which is known to be the cause of treatment resistance and tumor malignancy. Recently, there are many researches on clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA), a precursor of heme biosynthetic pathway. However, the molecular mechanism of heme biosynthetic pathway in hypoxic tumor-microenvironment is unclear. In this study, I aimed to elucidate the alteration of heme biosynthetic pathway in hypoxic tumor-microenvironment.

Previous studies showed that PpIX accumulation with ALA decreased under hypoxic condition, which is derived from the blockage of porphyrin biosynthesis at Coproporphyrinogen III (CPgenIII), the intermediate metabolite of PpIX. In order to elucidate the mechanism of blockage of porphyrin biosynthesis, PpIX production of the mitochondrial porphyrin enzymes, which metabolize intermediate porphyrin metabolites using molecular oxygen, was examined. As a result, production of PpIX from CPgenIII was restricted in mitochondria. Furthermore, inhibitor of mitochondrial respiration complexes recovered the production of PpIX, implicating that molecular oxygen plays an essential role for producing PpIX under hypoxic condition.

In order to evaluate the in vivo hypoxic tumor-microenvironment, PpIX and CPgenIII production was examined by using 3D cell culture model spheroid, which mimics tumor hypoxic region. As a result, CPgenIII production increased as the spheroid size increases, accompanying the increased amount of hypoxic region. On the other hand, PpIX production did not decrease depending on the spheroid size, suggesting that other factor is important for PpIX production in spheroids.

In conclusion, I unveiled the critical role of CPgenIII production in hypoxia. These findings provide new insights on heme biosynthetic pathway in hypoxic tumor-microenvironment.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).