

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	腫瘍深部モデルにおけるアミノレブリン酸を用いた光線力学療法の評価
Title(English)	Evaluation of 5-aminolevulinic acid based photodynamic therapy under deep-seated tumor model
著者(和文)	中山沢
Author(English)	Taku Nakayama
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11967号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:小倉 俊一郎,小島 英理,中村 浩之,西山 伸宏,堤 浩
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11967号, Conferred date:2021/3/26, 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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (工学) Doctor of
学生氏名： Student's Name	中山 沢		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	小倉 俊一郎
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

【緒言】

新規 PDT (光線力学療法) の薬剤として着目されているアミノレブリン酸(ALA)は、腫瘍におけるポルフィリン蓄積の特異性が高く光過敏症状の副作用も起こさないため、臨床応用が普及しつつある。ALAによって誘導される腫瘍特異的な PpIX 蓄積を用いたがん診断(ALA-PDD)やがん治療(ALA-PDT)は画期的であり、医療現場においても注目されている。その一方で、生体の腫瘍における PpIX の蓄積メカニズムに関しては未だ明らかになっていない事象も多い。がん細胞を用いた in vitro 実験系として平面の 2 次元培養が一般的に用いられているが、2 次元培養したがん細胞と生体の腫瘍では形質面において多くの乖離が認められている。腫瘍深部は腫瘍表面と比較して細胞密度が高いため、一部の細胞が休眠状態にあることが予想される。また、照射光の減衰が生じるが、一般的な in vitro の 2 次元培養ではそれらを含めて評価することが難しい。本研究では、特に上記の 2 点に着目して、2 次元培養ならびに 3 次元培養を用いて新規の評価系を構築し、ALA-PDT の評価を行った。

【論文の構成と要旨】

第 1 章 序論：がんの PDT の歴史や、ALA の細胞内における代謝、ポルフィリンおよびヘム生合成経路、あるいは休眠がん細胞(Dormant Cancer Cells)や 3 次元培養に関する先行研究の知見について概説するとともに、腫瘍深部における治療効果の評価を解決すべき問題点として提起し、本研究の背景と目的について示した。

第 2 章 3 次元培養スフェロイドおよび高密度 2 次元培養におけるがんの休眠性：がん細胞の細胞休眠性が細胞密度と正比例すると仮説を提唱し、休眠がん細胞の 4 条件である増殖の抑制、細胞の生存、代謝の抑制、再活性化をそれぞれ検証した。検証の結果は、細胞の密度依存的に休眠性の亢進を示唆した。また、構築した休眠がん細胞モデルは抗がん剤 2 種 (Cisplatin, 5-FU) に対して治療抵抗性を持つことも確かめられた。以上の結果より、上記の仮説が正しいと判断し、以降の研究において高密度培養のがん細胞を休眠がん細胞モデルとして用いた。

第 3 章 休眠がん細胞における PpIX 蓄積および ALA-PDT 効果の評価：第 2 章において構築した休眠がん細胞モデルに ALA を投与し、PpIX の蓄積評価、PpIX 蓄積後の光照射による殺細胞効果の評価、ポルフィリン代謝に関わるトランスポーターの発現評価を行った。細胞の休眠性に正比例して、がん細胞における PpIX 蓄積が増加し、光照射による治療効果も増大することが明らかになった。続いて、細胞増殖抑制剤を用いて非休眠がん細胞を休眠がん細胞へ誘導し、ALA 投与後の PpIX 蓄積ならびに光照射による治療効果を増大させることを試みた。細胞増殖抑制剤によって PpIX 蓄積が増加し、光照射による治療効果も顕著に増大したため、薬剤による休眠の誘導が可能であると論じた。

第 4 章 ALA 添加後の光照射が種々の遺伝子発現応答に与える影響：PpIX が蓄積した細胞に細胞死が生じない程度の弱い光照射がされた際の細胞の挙動ならびに遺伝子発現を調査した。非がん細胞に対して細胞死が生じない ALA 濃度および光照射条件を探索した。生じた活性酸素によって HO-1 の発現が亢進し、HO-1 の発現亢進ががん抑制遺伝子 p21 の発現も亢進させることを述べた。

第 5 章 ALA 添加後の低用量光照射ががん細胞増殖に与える影響：がん細胞に対して細胞死が誘導されない程度の ALA 濃度および光照射条件を探索し、遺伝子発現ならびに細胞増殖の速度について調査した。がん細胞においても、がん抑制遺伝子である p21 の発現亢進は認められたのみならず、他の複数遺伝子もがん細胞の増殖を抑制するように発現に変化が生じることが明らかになった。また、長期的な細胞増殖試験においても光照射によって有意に増殖速度の抑制が確認された。以上の結果より、ALA 投与後の光照射によって細胞死が誘導されなかったがん細胞に対しても、がんの増殖抑制効果が期待できることが示唆された。

第 6 章 総括：本研究により、腫瘍深部環境の特徴である高細胞密度および照射光の減衰の 2 点が ALA-PDT に及ぼす影響が明らかとなった。

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 1 copy 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

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	中山 沢		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	小倉 俊一郎	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Photodynamic therapy (PDT) and diagnosis (PDD) using 5-aminolevulinic acid (ALA) to control the production of an intracellular photosensitizer, protoporphyrin IX (PpIX), are in common clinical use. Although various studies have been published regarding cell death analysis after photoirradiation by ALA-PDT, the changes in gene expressions induced by it are yet unclear. Especially, ALA-PDT effect on deep-seated tumor cells is not well understood due to high cell density and attenuation of irradiation light.

Here we created uniformly sized PC-3 prostate cancer spheroids using a 3D culture plate. we first demonstrated that cancer cells exhibited dormancy, including the decrease of cell proliferation, dependent on cell density and spheroid size. Cell dormancy was characterized by no proliferation, no death, metabolic suppression, and recovery of active status. Second, we demonstrated an increase of PpIX accumulation after ALA treatment with the same dependency. We infer that PpIX accumulation increases with cell dormancy. Moreover, ALA-PDT cytotoxicity was induced, and transporters involved in porphyrin metabolism were regulated in a cell dormancy-dependent manner in both the 2D culture and spheroids. PpIX accumulation was increased by incubation with ALA and G0/G1-phase arrestors and ALA-PDT cytotoxicity was also induced.

In addition, we demonstrated that photoirradiation increases ROS production in an ALA-concentration dependent manner, which in turn upregulates the expression of three genes in HEK293 cells. HO-1, PAI-1, and p21 mRNA expression was upregulated after photoirradiation; however, the effect was abrogated by adding the reactive oxygen species (ROS) scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC). Further, we constructed a weak photoirradiation system with low irradiation doses to study the cancer cells that survive irradiation in vitro. Using primer array analysis, we showed that the expressions of several genes that repress cell proliferation are upregulated by photoirradiation of PC-3 cells. Furthermore, p21 and Ki-67 expression was upregulated in both PC-3 and MKN45 cells. Finally, we showed that cell proliferation after photoirradiation is suppressed in both types of cancer cells.

Our results demonstrate that ALA-PDT would be an effective approach for not only tumor cells on the surface but deep-seated tumor cells. ALA-PDD or ALA-PDT can result in rapid ROS-induced cell death and have the potential to decrease long-term recurrence.

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 1 copy 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).