

令和 5年 2月

枝野 未来 学位論文審査要旨

主 査 藤 原 義 之
副主査 植 木 賢
同 磯 本 一

主論文

Intracellular glutathione levels affect the outcomes of verteporfin-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer cells

(食道癌細胞内のグルタチオン量はverteporfinを介した光線力学療法の結果に影響を与える)

(著者：枝野未来、神田努、樽本亮平、濱本航、長谷川隆、前ゆかり、斧山巧、高田知朗、杉原誉明、磯本一)

令和4年 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

DOI:10.1016/j.pdpdt.2022.103090

参考論文

1. Next-generation laser-based photodynamic endoscopic diagnosis using

5-aminolevulinic acid for early gastric adenocarcinoma and gastric adenoma

(早期胃癌および胃腺腫に対する5-アミノレブリン酸を用いた次世代レーザーによる光線力学的内視鏡診断)

(著者：坂口琢紀、木下英人、池淵雄一郎、神田努、山下太郎、菓裕貴、藤井政至、枝野未来、長谷川隆、斧山巧、吉田亮、河口剛一郎、八島一夫、磯本一)

令和2年 Annals of Gastroenterology 33巻 257頁～264頁

学位論文要旨

Intracellular glutathione levels affect the outcomes of verteporfin-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer cells

(食道癌細胞内のグルタチオン量はverteporfinを介した光線力学療法の結果に影響を与える)

Verteporfin (VP)を用いた光線力学療法(PDT)は、食道癌に対しては適用ではない。本研究は、食道癌細胞株KYSE30(高分化型)及びKYSE170(中分化型)を用いてVP-PDTの効果を評価した。VPのEC50はKYSE170に比べてKYSE30の方が高く、KYSE30は比較的VP-PDT抵抗性であった。VPの取り込みに関与すると考えられる3つの受容体の両細胞株での発現量を比較した結果、mRNAの発現量には差を認めたが、タンパク質の発現量には有意差がなかった。VPの取り込み量や局在にも両細胞株間で差がなく、VP-PDTの効果の差は受容体の発現量の差によるものではなく、他の要因によると考えられた。そこで、酸化ストレス抵抗性を比較したところ、KYSE30の方がKYSE170より酸化ストレス抵抗性であり、さらにKYSE30のグルタチオン量及びCD44 variant発現量がKYSE170より有意に高かった。以上より、KYSE30の示す酸化ストレス抵抗性は細胞内グルタチオン量によるものであると予想した。そこで、グルタチオン合成阻害剤であるButhionine sulfoximine (BSO)で細胞を処理したところ、VP-PDTの効果が増強した。BSOは臨床での使用が承認されていないため、臨床使用可能なスルファサラジン(SASP)を用い、同様にSASPで細胞を処理したところ、細胞内グルタチオン量が減少し、かつVP-PDTの効果が増強した。結論として、SASPによりVP-PDTの効果が高まることが確認でき、臨床応用に有用なデータを得ることができた。

方法

実験にはヒト食道癌由来細胞株であるKYSE30とKYSE170を使用した。細胞は暗所にてVPを用いて処理し、689nmのLEDを照射し、24時間後にクリスタルバイオレットで染色後撮影を行った。その後メタノールで溶出し、540nmで吸光度測定を行い癌細胞株の生存率を評価し、VPの50%効果濃度(EC50)を算出した。VPの検出は蛍光顕微鏡で励起光405nmおよび蛍光630nmのフィルターを用いて行った。LDL受容体、アルブミン受容体、Heme carrier protein-1 (HCP-1)の発現はWestern blotting及びRT-qPCRにより評価した。酸化ストレス耐性は過酸化水素で処理し、MTSアッセイにより測定した。細胞内グルタチオンの量は

GSH-Gloグルタチオンアッセイの値をMTSアッセイの値で補正した。

結 果

両細胞株で治療効果が認められ、その効果はVPの投与量と光強度に依存した(図1)。EC50はKYSE170に比べてKYSE30の方が高く、KYSE30は比較的VP-PDT抵抗性であった(表1)。VPの取り込みに関係すると考えられる、LDL受容体、アルブミン受容体、HCP-1の発現は両細胞株間でmRNAでは有意差があり、LDL受容体はKYSE30で高く、アルブミン受容体とHCP-1はKYSE170で高かったが、タンパク質では有意差がなかった(図2)。また、VPの取り込み量や速度、局在に差はなかった(図3)。過酸化水素に対する感受性は、KYSE30よりもKYSE170で有意に高かった(図4A)。細胞内グルタチオンレベルは、KYSE30でKYSE170よりも有意に高かった(図4B)。CD44variant9(CD44v9)のタンパク質およびmRNAの発現量は、KYSE170よりもKYSE30で高かった(図4C、4D)。両細胞株をBS0で処理しても細胞毒性は認めなかった(図5A)。BS0処理はいずれも細胞内グルタチオン量を減少させ、VP-PDTの効果を増強した(図5B、5C)。SASPで両細胞株を処理した際には細胞毒性効果を認めた(図6A)。SASP処理では同様に細胞内グルタチオン量が減少し、VP-PDTの効果が増強した(図6B、6C)。

考 察

VP-PDTは、両細胞株に対し、感度に差はあるものの有効であると示された。両細胞株間で、3つの受容体のmRNAの発現量に差を認めたが、タンパク質の発現量に差はなく、VPの取り込み量や速度、局在に差がなかったことから、VPの取り込みはEC50とは無関係で、細胞内の抗酸化物質など別の理由が考えられた。KYSE30はKYSE170より酸化ストレス抵抗性であり、KYSE30のグルタチオン量及びCD44 variant発現量がKYSE170より有意に高かったため、KYSE30の示す酸化ストレス抵抗性はCD44 variant高発現に由来する豊富な細胞内グルタチオン量によると予想された。BS0は細胞内グルタチオン量を低下させ、VP-PDTの効果を増強し、同様にSASPでも細胞内グルタチオン量の低下とVP-PDTの効果増強を認めた。以上から、細胞内グルタチオン量を低下させることでVP-PDTの効果は増強すると考えられ、SASPをそのために使用することができる可能性がある。

結 論

細胞内グルタチオン量はVP-PDTの効果に影響を与え、SASPは細胞内グルタチオン量を減少させることでVP-PDTの効果を高めることが可能であると確認できた。