

令和 2年 9月

神田 努 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

Low-density lipoprotein receptor expression is involved in the beneficial effect of photodynamic therapy using talaporfin sodium on gastric cancer cells

(低密度リポタンパク質受容体の発現は、胃癌細胞に対するタラポルフィンナトリウムを使用した光線力学療法の効果に關与している)

(著者：神田努、杉原誉明、高田知朗、前ゆかり、木下英人、坂口琢紀、長谷川隆、
菓裕貴、池淵雄一郎、村上孝、磯本一)

平成31年 Oncology Letters 17巻 3261頁～3266頁

参考論文

1. Identification of human herpes virus 1 encoded microRNAs in biopsy samples of lower esophageal sphincter muscle during peroral endoscopic myotomy for esophageal achalasia

(食道アカラシアの経口内視鏡的筋切開術中の下部食道括約筋の生検サンプルにおけるヒトヘルペスウイルス1がエンコードするマイクロRNAの同定)

(著者：池淵雄一郎、神田努、池田晴夫、吉田亮、坂口琢紀、卜部繁俊、南ひとみ、
中尾一彦、桑本聡史、井上 晴洋、磯本一)

令和元年 Digestive Endoscopy 32巻 136頁～142頁

学位論文要旨

Low-density lipoprotein receptor expression is involved in the beneficial effect of photodynamic therapy using talaporfin sodium on gastric cancer cells

(低密度リポタンパク質受容体の発現は、胃癌細胞に対するタラポルフィンナトリウムを使用した光線力学療法の効果に関与している)

光線力学療法(PDT)は、タラポルフィンナトリウム(TS)を含む光増感剤およびレーザー光の組合せによって誘導される活性酸素によって腫瘍組織を破壊する治療法である。本研究では、胃癌細胞株MKN45およびMKN74を用いて*in vitro*でのTS-PDTの効果を評価した。細胞生存アッセイにより評価したところ、MKN74細胞におけるTS-PDTの抗腫瘍効果はMKN45細胞より弱く、MKN74細胞はTS-PDTに対して抵抗性である可能性があった。しかし、より高いTS濃度を用いるか、またはより長い処理時間(24時間)を用いることにより、MKN74細胞に対しても有効な血用効果が認められた。さらに、LEDの照射強度を上げることによっても、MKN74細胞に対して抗腫瘍効果を誘導することができた。この結果よりMKN45とMKN74細胞の間のTS-PDT効果の差は、TSの細胞内への取り込みの差に基づくことが示唆された。予想通り、MKN74細胞によるTSの取り込みはMKN45細胞より低かった。また取り込みに関与する低比重リポ蛋白(LDL)受容体の発現レベルはMKN74細胞ではMKN45細胞より低かった。アゴニスト/活性化因子であるGW3965処理により、LDL受容体発現を減少させると、TS-PDT効果が減弱した。さらに、ヒドロキシメチルグルタリル-補酵素A還元酵素阻害剤として、シンバスタチンを用いてLDL受容体発現を増加させると、MKN74細胞に対してTS-PDT効果を高めることができた。結論として、2系統の胃細胞系統間のLDL受容体発現の差は、TS-PDT効果に影響を及ぼすと考えられる。

方法

実験にはヒト胃がん由来細胞株であるMKN45-Luc及びMKN74/CMV-Luc細胞を使用した。タラポルフィンナトリウムの検出は蛍光顕微鏡で励起光405 nm、630 nmのフィルターにより行った。PDTによる抗腫瘍効果は細胞株をGW3965またはsimvastatinにより22時間処理した後にTSを血清フリーの培地に添加し処理し、4時間後に洗浄、660 nm LEDを照射し、24から48時間後にMTS assayにより細胞生存率を求めて評価した。

LDLレセプターの発現はWestern blotting及びRT-qPCRにより評価した。

結 果

MKN74細胞に対するTS-PDTの効果はMKN45細胞より小さく、30 μ Mにおいてのみ治療効果が認められた(図1A)。しかしMKN74細胞においても10 μ MのTSで24時間処理することで、治療効果が認められた(図1B)。また、LEDの照射パワーを上昇させるとMKN74細胞においても治療効果が認められた(図1C)。またTSは取り込み後リソソームに運ばれることが確認できた(図2A)。このリソソームへの移動はLDLと同様であること、またTSの取り込みにはLDL受容体が関与している報告があることから、TS-PDTの効果の違いは、TSの取り込み量の違いによるものではないかと予想した。4時間後におけるMKN74細胞のTSの取り込み量はMKN45細胞と比較し、明らかに少なかった(図2B)。さらに、MKN74細胞におけるLDL受容体タンパク質及びmRNAの発現レベルはMKN45細胞よりも低いことを確認した(図2C及び2D)。さらにGW3965によってLDL受容体を減少させたところ(図3A)、治療抵抗性の誘導が認められた(図3B及び3C)。最後に治療抵抗性を高めるために、これらの細胞をシンバスタチンで処理して、LDL受容体の発現レベルを増加させた(図4A及び4B)。その結果、MKN45細胞においては効果を認めなかったが(図4C)、MKN74細胞においてはシンバスタチン処理によりTS-PDTの効果を高めることができた(図4D)。

考 察

本研究では、胃癌細胞株に対しTS-PDTを実施し評価した。シンバスタチン処理により、MKN74細胞においてはPDTの効果が増強されたが、期待したほどの劇的な効果は誘導されなかった。この理由の一つとして、TSの取り込みにはLDL受容体に加えて、アルブミン受容体やヘムキャリアタンパク質-1などの他の受容体が関わっているために、LDL受容体発現量の上昇は部分的な影響しか与えなかった可能性が考えられる。さらに、MKN74細胞は分化型胃癌から、MKN45細胞は未分化型胃癌から樹立されたこと考慮すると、TS-PDTは未分化型胃癌に対してかなり効果的である可能性がある。また、本研究の知見は、PDT治療に耐性のある症例において、シンバスタチンまたは同様の誘導体によりPDTの治療効果を増強または相加的に高められる可能性を示すものである。

結 論

LDL受容体発現はTS-PDTの有効性に関与しており、シンバスタチンを併用することでTS-PDTの治療効果を高めることが期待できる。