

博士論文審査結果の要旨

学位申請者 森 田 翠

主論文 1 編

Fluorescence-based discrimination of breast cancer cells by direct exposure to 5-aminolevulinic acid.

Cancer Medicine 8;5524-5533, 2019

審査結果の要旨

近年、光線力学を応用した組織内の癌細胞の検出や可視化についての研究が注目されている。天然のアミノ酸である 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は、ミトコンドリアのヘム合成経路におけるヘム前駆体として働くが、同経路の中間産物であるプロトポルフィリン IX (PpIX) は蛍光を呈する。癌細胞では、この PpIX が選択的に蓄積する傾向があるため、PpIX の蛍光を指標として癌細胞を光学的に検出することができる。そこで申請者は 5-ALA を用いた乳癌の光学的診断法を確立することを目的として、本研究を実施した。

代表的なホルモン受容体 (ER, PgR) 陽性乳癌細胞株である MCF7 とホルモン受容体陰性乳癌細胞株である MDA-MB-231, 正常乳腺細胞株である MCF10A を用いて、5-ALA 添加の至適濃度と至適添加時間を各々 5mM と 2 時間とした。この条件下で 5-ALA 暴露後の PpIX 蛍光強度を測定したところ、共焦点顕微鏡法では癌細胞で PpIX 蛍光は有意に増加したが、フローサイトメトリー法では非癌細胞でも有意に増加し癌と非癌との差が出ず、癌細胞では細胞毎で蛍光強度にばらつきが大きく見られた。このばらつきの原因として、5-ALA 代謝経路におけるトランスポーターの影響が考えられたため、代謝経路で重要な役割を担う PEPT1 と ABCG2 に着目した。Western blotting 法で各々の細胞株における発現レベルを測定したところ、ABCG2 の発現が癌細胞で有意に高かった。そこで ABCG2 阻害剤である Ko143 (1 μ M) 存在下で同様の実験を行なったところ、ABCG2 の発現の高い乳癌細胞では生成した PpIX の細胞外への排出が是正された結果、フローサイトメトリー法においても薬剤投与前後の蛍光強度の差が有意に増加し、細胞毎のばらつきが有意に低下した。以上より ABCG2 阻害剤を併用し 5-ALA を細胞に添加することで、癌細胞では 5-ALA-PpIX 蛍光がより有意に増加することが確認できた。

次に、蛍光細胞診断への応用を踏まえ、生体癌組織から穿刺吸引サンプルで同様の結果が得られるか否か、ex vivo で検証した。GFP 標識した MDA-MB-231 細胞を樹立し、BALB/c ノードマウスの皮下に移植した。増大した腫瘍結節の細胞を穿刺吸引し、5-ALA と Ko143 を添加し、フローサイトメトリー法及び共焦点顕微鏡法で分析した。その結果、薬剤処理後 GFP 陽性細胞で蛍光強度の有意な増加が認められ、申請者の確立した方法は実際の穿刺吸引サンプルで有用であることが示唆された。

以上が本論文の要旨であるが、採取した細胞に 5-ALA の直接暴露によって、癌細胞を蛍光検出できる可能性を示した点において、医学上価値ある研究と認める。

令和元年 10 月 17 日

| | | | |
|------|----|---------|---|
| 審査委員 | 教授 | 伊 東 恭 子 | 印 |
| 審査委員 | 教授 | 大 辻 英 吾 | 印 |
| 審査委員 | 教授 | 橋 本 直 哉 | 印 |