

論文内容の要旨

論文提出者氏名 森田 翠

論文題目

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

論文内容の要旨

乳癌は女性の癌の中で最も罹患率が高く、女性の癌関連死の主な原因の一つである。その生存率と予後の改善には早期発見と早期診断が重要であるが、確定診断には病理学的診断が不可欠である。とりわけ低侵襲で簡便な穿刺吸引細胞診は、特殊な機器を要さないことから広く普及しているが、明確な客観的指標がないため診断に苦慮することも少なくない。

近年、蛍光イメージングを用いた診断ツールが注目されている。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。これまで経口投与した 5-ALA による癌検出の研究は広く試みられ、現在、脳神経外科や泌尿器科の領域では術中蛍光診断法として実用化されている。しかし、乳癌領域では自家蛍光の影響や 5-ALA の代謝特性の問題などから本手法の有用性は示されていない。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。

まず、*in vitro* で実験を行なった。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 時間と決定した。この条件で 2 種の癌細胞株と非癌細胞株の 5-ALA 負荷後の 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なかった。また、癌細胞では、細胞毎で蛍光強度の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 のヘム代謝経路におけるトランスポーターの影響が関与しているのではないかと考えられたため、5-ALA-PpIX 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量を定量したところ、ABCG2 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 発現の強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、穿刺吸引細胞診での蛍光細胞診断への応用を踏まえて、穿刺吸引細胞で同様の結果が得られるか否かを、乳癌細胞株を移植した担癌マウスを用いて *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 2 時間添加したところ、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、何れの方法でも薬剤処理群の GFP 陽性細胞で蛍光強度の有意な増加が認められ、申請者らの確立した方法は実際の穿刺吸引サンプルにおいても有用であることが示唆された。

本研究で採取した細胞への 5-ALA の直接暴露により高い癌細胞検出が可能であることが明らかになった。また、ABCG2 阻害剤の併用により癌細胞では 5-ALA-PpIX 蛍光がより有意に増加することが確認できた。申請者らの確立した方法は、*in vitro* で薬剤投与前後の蛍光強度を比較することで自家蛍光の問題を回避することができ、患者への投与負担はない。従来の経口摂取による 5-ALA の蛍光診断と比して乳癌細胞の検出においてより期待できる手法であると考えられた。実臨床における本手法の有用性の検証が望まれる。