

博士(医学) 鄒 麗 波

論文題目

Photodynamic treatment of tumor with bacteria expressing KillerRed

(キラーレッド発現細菌による腫瘍の光線力学的治療)

論文の内容の要旨

[はじめに]

光線力学的治療は、光増感剤存在下に光線を照射することにより腫瘍細胞を殺傷するユニークな癌治療法であるが、増感剤の選択性に課題が残っている。最近、細菌による腫瘍ターゲットシステムによって腫瘍のイメージングと治療をおこなうことが提案されている。また、キラーレッドという赤色蛍光タンパクに光照射をすると、酸素ラジカルが産生され、試験管内では真核細胞や大腸桿菌を殺傷する力を出すことが報告されている。これらの研究は、キラーレッドが腫瘍を標的にした光線力学療法に応用できる可能性を示している。申請者は、キラーレッドを腫瘍に送り込むための遺伝子配送システムとして、大腸菌が使えることに注目し、さらに、腫瘍に到達した細菌が増殖することにより、光線力学効果を増幅できるのではないかと発案した。そこで、キラーレッドを発現する遺伝子を組み込んだ大腸菌を作り、担癌マウスの腫瘍に直接注射して、その光線力学的な治療効果を調べた。キラーレッド発現細菌が、マウス皮下に形成された CNE2 細胞と HeLa 細胞の腫瘍を強力に殺傷する能力を発揮することを証明できた。

[材料ならびに方法]

キラーレッド発現大腸菌によって産生される酸素ラジカルの評価のために、ニトロブルーテトラゾリウムを溶かしたアガロースゲルの小空間にキラーレッド細菌の懸濁液を入れ、ゲル相に拡散してくる活性酸素をフォルムアザンの青色沈殿として検出した。また、一重項酸素の産生の程度は、キラーレッド分子から自発放射される 1,270 nm の近赤外光を光電子増倍管で直接検出することにより、その発光量から見積もった。

ヒト咽頭癌細胞株 CNE2 と子宮頸癌細胞株 HeLa を培養し、 5×10^6 個の細胞をヌードマウス皮下に注入して腫瘍を作った。キラーレッドのプラスミド DNA を大腸菌 (*E. coli*) に組み込み、キラーレッド発現性大腸菌を作った。これを培養後、遠心して菌濃度を高めたうえで、上記腫瘍の基部に注入した。菌を腫瘍内へ注入後約 24 時間待ち、腫瘍全体にキラーレッド発現細菌が広がったのを確認してから、水銀ランプの光をバンドパスフィルター(波長 586-610 nm)に通して、腫瘍部分に照射した(光強度 = 324 J/cm^2)。組織学的な観察のためには、腫瘍組織をホルマリン固定し、パラフィン包埋後に薄切し、ヘマトキシリンとエオシンで染色した標本を作った。

[結果]

キラード発現細菌を含む液の周囲に置いたゲル中では、ニトロブルーテトラゾリウムは青色の沈殿を作った。これは拡散性に富んだ活性酸素が産生されたことを示す。一方、キラード溶液からの近赤外光の直接検出によって定量された一重項酸素の産生は、計測限界を下回る微量であることがわかった。これらのことは、キラードがタイプ1の光増感剤として作用していることを示している。

腫瘍内に注入したキラード発現大腸菌は、その後の1日間において、腫瘍内で増殖拡散し、その腫瘍内蛍光量は約5倍まで増加した。その増殖後に光照射を与えると、CNE2とHeLaの2種の腫瘍とも、ほぼ完全に消退した。CNE2腫瘍では小さいもの(80–100 mm³)と大きいもの(150 mm³)の試験を試みたが、いずれも治療可能であった。HeLa細胞腫瘍でも小さいもの(80–100 mm³)では治療可能であったが、大きいものでは一部に残存があった。治療されたものでは、2か月の経過観察では、再発の兆候はみとめられなかった。これに対して、2つの対照群(キラードを発現していない細菌の注入と細菌を含まない生理食塩水のみ注入)では、光照射後も腫瘍の継続的成長が確認された。

キラード発現大腸菌の注入と光照射によって治療した腫瘍組織の組織学的検討では、キラード細胞発現大腸菌の周辺に多くの壊死細胞をみとめた。光照射後の24時間には、多数の膨化変性した腫瘍細胞が観察された。しかし、前述の2種の対照群では、光照射前後でわかるほどの変化はなかった。

[結論]

キラード発現細菌は、その菌体内にのみキラードを有するが、光照射によって寿命の長い酸素ラジカル(活性酸素)を産生し、周辺の細胞を殺傷する効果をもつ。菌は腫瘍限局的に増殖し、限られた大きさであれば光照射で腫瘍全体の細胞をよく殺傷する。細菌は、静脈内投与によって腫瘍を標的にした体内分布を示すことが知られているので、キラード発現大腸菌を用いれば、転移巣や播種巣を標的としたイメージングと治療が可能になる。弱毒化によって細菌感染の安全性を確立し、必要時に抗菌作用を発揮する手段を確保すれば、キラード発現細菌による光線力学治療は、強い効果を期待できる現実的なものとなるであろう。

論文審査の結果の要旨

光線力学療法(PDT)は臓器が温存される癌の治療法として注目されている。現在臨床で使用されている光増感剤は腫瘍細胞の選択性などに改善の余地がある。申請者らは光増感剤を悪性腫瘍細胞に選択的に取り込ませる工夫として、細菌が悪性腫瘍内で効率よく増殖することに着目した。キラードという光増感剤を大腸菌で発現させ、これが悪性腫瘍に対して効果的にPDT作用を

示すか否かについて検討した。基礎的検討としてキラーレッド発現大腸菌が活性酸素を産生するかについてニトロブルーテトラゾリウム法と 1270 nm の近赤外光の検出を行った。動物実験ではヒト咽頭癌細胞株 CNE2 と子宮頸癌細胞株 HeLa を用いヌードマウスに腫瘍を形成させた後、キラーレッド発現大腸菌を局所投与し、その後光を照射し PDT 効果を検討した。

申請者らは以下の結果を得た。キラーレッド発現大腸菌はスーパーオキシドを産生したが、一重項酸素の産生は微量であった。腫瘍内に注入したキラーレッド発現大腸菌は、腫瘍内で増殖拡散し、その後光照射を行うと、CNE2 と HeLa の 2 種の腫瘍ともほぼ完全に消退した。PDT 行った群では、2 か月の経過観察期間では、再発の兆候はみとめられなかった。これに対して対照群では、光照射後も腫瘍の継続的増殖が確認された。本研究はキラーレッド発現大腸菌が光照射によりスーパーオキシドを産生し、PDT 作用を持つことを初めて示したものである。今後大腸菌の弱毒化などを行い安全性が確立されれば、悪性腫瘍の転移巣や播種巣を標的とした PDT 治療が可能になることを示したものであり、本論文を高く評価した。以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 金山 尚裕
副査 大西 一功 副査 小川 美香子