

博士(医学) 小澤英親

論文題目

Zinc Coproporphyrin I derived from meconium has an antitumor effect associated with singlet oxygen generation

(胎便由来の亜鉛コプロポルフィリン I は、一重項酸素を介して抗腫瘍効果を持つ)

論文の内容の要旨

[はじめに]

亜鉛コプロポルフィリン I (ZnCP-I) は胎便中に存在する胎児固有のポルフィリンで、波長 405 nm の可視光によって励起され、波長 580 nm と 630 nm に 2 つのピークを持つ蛍光スペクトルを発する。ZnCP-I は、新生児における胎便吸引症候群の研究の過程で胎便から発見されたが、その生理的意義に関しては未だ明らかにされていない。一方、ポルフィリン化合物が有する腫瘍組織や新生血管への特異的な集積性と、光励起されたポルフィリン化合物が発する一重項酸素の強い細胞障害効果を、腫瘍の治療に利用する光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) が近年臨床応用されている。我々は、ZnCP-I の構造が既存の PDT の光増感剤と類似していることを見出している。そこで今回我々は生体由来で安全性の高いと思われる ZnCP-I が、同様に PDT の光増感物質として働くかを、光化学的及び病理学的手法を用いて世界で初めて検証した。

[材料ならびに方法]

[1] ZnCP-I の 50 μM 水溶液に波長 532 nm の光を照射し、発生した近赤外 (near-infrared: NIR) 光を、フィルター、分光器、NIR 光電子倍增管、光子カウンター等からなる独自のシステムを用いて分析することにより、一重項酸素の発生を検討した。

[2] RPMI 1640 medium 中で培養した HeLa cell (5×10^4) に、200 μM の ZnCP-I を加え、その 13 時間後細胞表面の ZnCP-I を洗浄除去した。これらに光源、蛍光スキャナー、及びイメージアナライザーからなる蛍光解析装置 ARGUS/HiSCA を用いて、波長 405 nm、強さ 2.74 mW/cm^2 の光を照射し、発生した波長 500 nm 以上の蛍光を同装置で捕捉し検討した。

[3] 総数 25 匹の BALB/c マウスの大腿に HeLa cell 腫瘍を作成した。まず 7 匹に 10 mg/kg の ZnCP-I を経静脈的に投与し 20 分後それらの腫瘍に対しハロゲンランプで波長 580 nm、総量 100 J/cm^2 の光を照射した。5 匹のマウスには ZnCP-I を投与せず、同様の照射を行った。さらに 13 匹のマウスに 50~250 mg/kg の ZnCP-I を経静脈的に投与し、20 分後それらの腫瘍に対し同様に光を照射した。照射 24 時間後に全てのマウスの腫瘍を摘出し、病理学的に比較検討した。

[結果]

[1] ZnCP-I 水溶液から波長 1270 nm の近赤外光の発生が認められ、その強度は照射された光の強さ (10-80 mW) に比例し、また濃度 10.8 mM のアジ化ナトリウム添加により著明に抑制された。

[2] ZnCP-I 添加 HeLa cell においては照射にて、ZnCP-I 由来と思われる波長 500 nm 以上の蛍光が、HeLa cell の細胞質に一致して検出された。ZnCP-I 無添加の場合は、同様の蛍光は一切検出されなかった。

[3] ZnCP-I 投与群では、投与量にかかわらず光照射を受けた腫瘍組織すべてに核融解と細胞断片化が認められた。光照射表面からの腫瘍組織壊死深度は ZnCP-I の投与量に比例したが、

200 mg/kg で上限に達した。ZnCP-I 非投与群では、光照射による有意な組織学的変化は認められなかった。また ZnCP-I 投与や光照射によると思われるような他の特段の副作用は、両群ともに認められなかった。

[考察]

今回 ZnCP-I 水溶液から 1270 nm の近赤外光が発生し、それが一重項酸素消去剤のアジ化ナトリウムによって抑制されたことより、ZnCP-I が光照射により一重項酸素を発生することが発見できた。次に ZnCP-I の腫瘍への集積性を調べるため、ZnCP-I 暴露後に表面の ZnCP-I を除去された HeLa cell に、波長 405 nm の光を照射したところ波長 500 nm 以上の蛍光が HeLa cell 内部に認められたことより、ZnCP-I の細胞内集積が確認された。続いて HeLa cell 担癌マウスに ZnCP-I を投与し、それらの腫瘍に対し光照射したところ PDT 効果が認められた。これは投与された ZnCP-I が腫瘍組織に集積し、かつ光照射により一重項酸素を発生し腫瘍細胞を死滅させたと考えられた。照射後の組織解析でも従来の PDT と同じような組織変化が認められた。以上より、生体由来の ZnCP-I は光増感剤として PDT 作用を持つことが明らかとなった。現在使用されている光増感剤は非生理的な物質であり、生体内貯留時間も長いなど臨床的には改善の余地がある。今回我々が発見した ZnCP-I は胎児由来の物質で安全性が高い。今後新規の光増感剤として臨床応用すべく検討していく予定である。

[結論]

ZnCP-I は HeLa cell 細胞内に集積し、光照射により一重項酸素を発生し、それにより HeLa cell 腫瘍に対して抗腫瘍効果を有することが世界で初めて明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

早期の子宮頸癌に対する治療は手術療法が主に行われるが、将来的に挙児希望の症例などには低侵襲の光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) も適応とされている。本法は、腫瘍親和性の光感受性物質が有する腫瘍組織や新生血管への特異的な集積性と光励起されたポルフィリン化合物が発する一重項酸素の強い細胞障害効果を利用した治療法である。しかし、従来の PDT では光線過敏症を予防するため、術後に長期入院を余儀なくされることが臨床的に問題であった。

一方、浜松医大産婦人科学講座では以前より新生児における胎便吸引症候群の研究が行われており、その過程で胎便中に発見された亜鉛コプロポルフィリン I (ZnCP-I) の構造が既存の PDT の光増感剤と類似していることから、今回の研究の着想に至った。

そこで、申請者は ZnCP-I の PDT における光増感物質としての特性ならびに有効性に関して、光化学的ならびに病理学的に検討を加えた。その結果、ZnCP-I が光照射により一重項酸素を発生すること、子宮頸癌細胞である HeLa 細胞を用いて ZnCP-I の細胞内への集積性ならびに HeLa 細胞担癌マウスを用いて ZnCP-I の抗腫瘍効果などを確認した。本研究結果より、生体由来の ZnCP-I は光増感剤として PDT 作用を有することが明らかとなり、既存の光増感剤と比較して有用性が認められたことより、今後の臨床応用が大いに期待される。

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 大園 誠一郎
副査 蓑島 伸生 副査 戸倉 新樹