



Photodynamic therapy with verteporfin accelerates apoptotic bleb formation in human ameloblastoma

山下, 淳也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2024-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8764号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100489989>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Photodynamic therapy with verteporfin accelerates apoptotic bleb formation in human ameloblastoma

ベルテポルフィンによる光線力学療法はエナメル上皮腫のブレブ形成を促しアポトーシスを引き起こす

(指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻明石昌也教授)

山下 淳也

1 INTRODUCTION

エナメル上皮腫は良性病変にも関わらず局所の浸潤性を示し、その手術手技は根治的手術と保存的手術に分類される。根治的治療は顎骨の切除を要し、病変制御の点からは最も効果的であるが、患者の QOL を低下させる問題点がある。一方保存的外科療法には摘出、開窓などあるが、高頻度で再発となる。

光線力学療法(PDT)は光増感剤の投与および光照射により選択的に組織の障害を引き起こすことができる。光増感剤の中でもベルテポルフィン(VP)は加齢黄斑変性症に臨床応用されている。VP はさらに、Yes-associated protein(YAP)を阻害することで知られている。

本研究では、エナメル上皮腫のヒト組織および培養ヒトエナメル上皮腫由来細胞株における LDLR と YAP の発現、VP PDT のヒトエナメル上皮腫に対する抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

2 MATERIALS AND METHODS

2015 年 7 月から 2020 年 8 月までに当科でエナメル上皮腫の手術を受けた患者 18 名を無作為に抽出し、性別、年齢、部位、腫瘍径、エナメル上皮腫の組織型、当科で行った手術、術前の手術回数について、患者のカルテからデータを収集した。

免疫組織化学的評価について、以下のように分類した：(1)腫瘍細胞における免疫組織化学的染色の強度(なし=スコア 0；弱い=スコア 1；中程度=スコア 2；強い=スコア 3；非常に強い=スコア 4)、および(2)LDLR および YAP 陽性細胞が占める領域の割合 (0%=スコア 0；<2%-5%=スコア 1；25%-50%=スコア 2；50%-75%=スコア 3；および>75%=スコア 4)。(1)と(2)の合計を発現スコアとした (なし=0；弱=1-4；強=5-8)。

ヒトエナメル上皮腫由来細胞株 HAM1 は、理研バイオリソースセンターから入手し、ペニシリン-ストレプトマイシンを含むケラチノサイト無血清培地 (K-SFM) 中で、空気と 5% CO₂ 存在下、37°C で維持した。培養細胞をもちいて免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティング、細胞増殖アッセイ、TUNEL アッセイを行った。

VP 投与濃度およびレーザー照射条件は、文献を参考に決定した。先行研究における VP の最大濃度は 2.0 μ g/mL であり、最も低く有効な VP 濃度を決定するため、0.01、0.1、1.0 μ g/mL で実験を行った。VP PDT 実験では、各濃度で VP を添加し波長 690 nm、出力密度 7.25 mW/cm² の条件でレーザーを照射した。

BZ-X 800 顕微鏡 (Keyence) を用いて、倍率 20 倍で 60 秒ごとに位相差画像を撮影しブレブ形成を観察した。ブレブ形成までの時間は、視野内で最初のブレブ形成が観察されるまでの時間と定義した。

培養細胞を用いた実験のデータは 3 回の独立した実験による平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。Student の t 検定、一元配置分散分析、Tukey の事後検定としての多重比較を用いた。統計解析はすべて JMP10 (SAS Institute Inc, Cary, V C) を用い、有意水準 p 値<0.05 で行った。

3 RESULTS

合計 11 人の男性患者と 7 人の女性患者（年齢中央値、50 歳；範囲、19-79 歳）が含まれた。10 例に手術歴があり、うち 8 例は複数回の手術歴があった。手術歴のある患者では、初回手術の患者と比べ LDLR のスコアが有意に高かった ($p = 0.041$)。

HAM1 の形状は扁平で上皮様であり、LDLR の発現は核周囲と細胞質に観察され、YAP の発現は核と細胞質に観察された。ウェスタンブロット分析の結果、LDLR のバンドは 150kDa よりわずかに上、YAP のバンドは 75kDa 付近に検出された。1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 処理により HAM1 における LDLR および YAP の発現が減少することが示された。

コントロール群と 0.01 $\mu\text{g/mL}$ および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ VP 単独群との間の細胞生存率については有意な差はなかったものの、1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 単独群とレーザー照射を併用した 0.1 $\mu\text{g/mL}$ および 1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 群で、生存率は有意に低下した。

レーザー照射を加えることで HAM1 細胞のアポトーシスがどのように促進されるかを観察したところ、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の VP 単独で処理した約 1 時間後に、HAM1 においてブレブの形成が確認された。0.1 $\mu\text{g/mL}$ の VP 単独処理後、ブレブ形成には約 1 時間かかったが、レーザー照射を加えるとブレブ形成までの時間が有意に短縮した。

4 DISCUSSION

本研究によって、VP PDT が *in vitro* においてブレブ形成を介して効果的に細胞死を誘導することが示唆された。特筆すべきことに、低濃度 VP 投与とレーザー照射の組み合わせの効果は、*in vitro* において高濃度 VP 投与と同等であった。

YAP は細胞増殖を促進することがよく知られており、その過剰発現と活性化は様々なヒトがんで認められる。LDLR の役割は、肝細胞におけるコレステロールクリアランスの制御などが報告されているが、腫瘍における LDLR の役割はまだ解明されていない。LDLR 発現は、初回手術群と比較して非初回手術群で有意に高かった。これは、LDLR の高発現は数回の手術を必要とする腫瘍の侵襲性、もしくは初回手術後の創傷治癒または組織修復を反映しているからと考えられた。

ヒトエナメル上皮腫由来細胞を用いた実験で、LDLR と YAP の発現は確認された。VP 細胞内への取り込みは、特に腫瘍細胞のような増殖性の細胞では LDLR が関与していると報告されており、LDLR が HAM1 に発現していることから、VP は細胞内に取り込まれると思われる。

光による VP 活性化にて誘発される細胞損傷は、活性酸素(ROS)の発生によるものと知られている。ROS は、アポトーシス、オートファジー、ネクロシスを介した細胞死をに引き起こす。我々の研究でも低濃度 VP 投与とレーザー照射の組み合わせは、高濃度 VP 投与と同程度の細胞損傷をもたらした。興味深いことに、低濃度の VP にレーザー照射を加えるとブレブ形成が促進された。アポトーシス細胞では細胞膜のブレブリングが報告されており、VP PDT によりアポトーシスを引き起こしたと考えられる。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3335 号	氏 名	山 下 淳 也
論文題目 Title of Dissertation	Photodynamic therapy with verteporfin accelerates apoptotic bleb formation in human ameloblastoma ベルテポルフィンによる光線力学療法は エナメル上皮腫のブレブ形成を促しアポトーシスを引き起こす		
審査委員 Examiner	主 査 Chief Examiner 丹 生 靖 一 副 査 Vice-examiner 佐 々 木 伸 副 査 Vice-examiner 藤 山 隆 司		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

【背景】

エナメル上皮腫は良性病変にも関わらず局所の浸潤性を示し、その手術手技は根治的手術と保存的手術に分類される。根治的治療は顎骨の切除を要し、病変制御の点からは最も効果的であるが、患者の QOL を低下させる。一方、保存的外科療法には摘出、開窓などあるが、高頻度で再発する。

光線力学療法(PDT)は光増感剤の投与および光照射により選択的に組織の障害を引き起こすもので、光増感剤の一つであるベルテポルフィン(VP)は加齢黄斑変性症に臨床応用されており、Yes-associated protein(YAP)を阻害することも知られている。本研究では、エナメル上皮腫のヒト組織および培養ヒトエナメル上皮腫由来細胞株における LDLR と YAP の発現、VP PDT のヒトエナメル上皮腫に対する抗腫瘍効果を評価することを目的とした。

【対象と方法】

2015年7月から2020年8月までに当科でエナメル上皮腫の手術を受けた患者18名を無作為に抽出し、性別、年齢、部位、腫瘍径、エナメル上皮腫の組織型、当科で行った手術、術前の手術回数について、患者のカルテからデータを収集した。

免疫組織化学的評価について、以下のように分類した：(1)腫瘍細胞における免疫組織化学的染色の強度(なし=スコア0；弱い=スコア1；中程度=スコア2；強い=スコア3；非常に強い=スコア4)、および(2)LDLR および YAP 陽性細胞が占める領域の割合 (0%=スコア0；<2%-5%=スコア1；25%-50%=スコア2；50%-75%=スコア3；および>75%=スコア4)。(1)と(2)の合計を発現スコアとした(なし=0；弱=1-4；強=5-8)。

ヒトエナメル上皮腫由来細胞株 HAM1 は、理研バイオリソースセンターから入手し、ペニシリン-ストレプトマイシンを含むケラチノサイト無血清培地(K-SFM)中で、空気と5%CO₂存在下、37℃で維持した。培養細胞をもちいて免疫蛍光染色、ウェスタンブロッティング、細胞増殖アッセイ、TUNELアッセイを行った。

VP 投与濃度およびレーザー照射条件は、文献を参考に決定した。先行研究における VP の最大濃度は 2.0µg/mL であり、最も低く有効な VP 濃度を決定するため、0.01、0.1、1.0µg/mL で実験を行った。VP PDT 実験では、各濃度で VP を添加し波長 690 nm、出力密度 7.25 mW/cm² の条件でレーザーを照射した。BZ-X 800 顕微鏡(Keyence)を用いて、倍率 20 倍で 60 秒ごとに位相差画像を撮影しブレイブ形成を観察した。ブレイブ形成までの時間は、視野内で最初のブレイブ形成が観察されるまでの時間と定義した。培養細胞を用いた実験のデータは 3 回の独立した実験による平均値±標準誤差で示した。Student の t 検定、一元配置分散分析、Tukey の事後検定としての多重比較を用いた。統計解析はすべて JMP10 (SAS Institute Inc, Cary, V C) を用い、有意水準 p 値<0.05 で行った。

【結果】

合計 11 人の男性患者と 7 人の女性患者(年齢中央値、50 歳；範囲、19-79 歳)が含まれた。10 例に手術歴があり、うち 8 例は複数回の手術歴があった。手術歴のある患者では、初回手術の患者と比べ LDLR のスコアが有意に高かった (p = 0.041)。

HAM1 の形状は扁平で上皮様であり、LDLR の発現は核周囲と細胞質に観察され、YAP の発現は核と細胞質に観察された。ウェスタンブロット分析の結果、LDLR のバンドは 150kDa よりわずかに上、YAP のバンドは 75kDa 付近に検出された。1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 処理により HAM1 における LDLR および YAP の発現が減少することが示された。コントロール群と 0.01 $\mu\text{g/mL}$ および 0.1 $\mu\text{g/mL}$ VP 単独群との間の細胞生存率については有意な差はなかったものの、1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 単独群とレーザー照射を併用した 0.1 $\mu\text{g/mL}$ および 1.0 $\mu\text{g/mL}$ VP 群で、生存率は有意に低下した。

レーザー照射を加えることで HAM1 細胞のアポトーシスがどのように促進されるかを観察したところ、0.1 $\mu\text{g/mL}$ の VP 単独で処理した約 1 時間後に、HAM1 においてブレブの形成が確認された。0.1 $\mu\text{g/mL}$ の VP 単独処理後、ブレブ形成には約 1 時間かかったが、レーザー照射を加えるとブレブ形成までの時間が有意に短縮した。

【考 察】

本研究によって VP PDT が *in vitro* においてブレブ形成を介して効果的に細胞死を誘導することが示唆された。特筆すべきことに、低濃度 VP 投与とレーザー照射の組み合わせの効果は、*in vitro* において高濃度 VP 投与と同等であった。

YAP は細胞増殖を促進することがよく知られており、その過剰発現と活性化は様々なヒトがんで認められる。LDLR の役割は、肝細胞におけるコレステロールクリアランスの制御などが報告されているが、腫瘍における LDLR の役割はまだ解明されていない。LDLR 発現は、初回手術群と比較して非初回手術群で有意に高かった。これは、LDLR の高発現は数回の手術を必要とする腫瘍の侵襲性、もしくは初回手術後の創傷治癒または組織修復を反映しているからと考えられた。

ヒトエナメル上皮腫由来細胞を用いた実験で、LDLR と YAP の発現は確認された。VP 細胞内への取り込みは、特に腫瘍細胞のような増殖性の細胞では LDLR が関与していると報告されており、LDLR が HAM1 に発現していることから、VP は細胞内に取り込まれると思われる。

光による VP 活性化にて誘発される細胞損傷は、活性酸素(ROS)の発生によるものと知られている。ROS は、アポトーシス、オートファジー、ネクローシスを介した細胞死を引き起こす。我々の研究でも低濃度 VP 投与とレーザー照射の組み合わせは、高濃度 VP 投与と同程度の細胞損傷をもたらした。興味深いことに、低濃度の VP にレーザー照射を加えるとブレブ形成が促進された。アポトーシス細胞では細胞膜のブレブリングが報告されており、VP PDT によりアポトーシスを引き起こしたと考えられる。

【結 語】

本研究はエナメル上皮腫に対する光線力学療法について研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかったベルテポルフィンの効果を示した価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。