

Ultrasound modulates fluorescence strength and
ABCG2 mRNA response to aminolevulinic acid
in glioma cells

(訳) 超音波は神経膠腫細胞において蛍光強度
とアミノレブリン酸に対する ABCG2 mRNA
反応を調節する

日本医科大学大学院医学研究科 神経病態解析学分野

大学院生 樋口直司

Journal of Nippon Medical School Vol.87 No.6 (2020) 掲載予定

論文内容の要旨

Ultrasound modulates fluorescence strength and
ABCG2 mRNA response to aminolevulinic acid
in glioma cells

(訳) 超音波は神経膠腫細胞において蛍光強度
とアミノレブリン酸に対する ABCG2 mRNA
反応を調節する

日本医科大学大学院医学研究科 神経病態解析学分野

大学院生 樋口直司

Journal of Nippon Medical School Vol.87 No.6 (2020) 掲載予定

<Introduction>

脳腫瘍の光線力学診断 (PDD) は、手術中の腫瘍の検出に広く使用されている。5-アミノレブリン酸 (5-ALA) 蛍光診断は神経膠腫手術において残存腫瘍を検出するのに有効な方法である。5-ALA は細胞内で protoporphyrin IX (PpIX) に変換されヘムに代謝される。腫瘍細胞内ではヘムに代謝されず PpIX が蓄積し PDD に用いられる。しかし glioblastoma のような最も悪性な神経膠種であっても蛍光強度はあらゆる場合で異なる。そして偽陰性の蛍光は腫瘍の残存をもたらす可能性がある。我々の研究では超音波効果について、細胞内の PpIX と PpIX を細胞質外に排出するトランスポーターである ATP 結合カセット輸送体 (ABCG2) の発現レベルについて調べた。

<Method>

悪性神経膠腫細胞樹立細胞株は SNB19、U87MG、および T98G を *in vitro* 実験に使用した。各培養細胞を 1.0mM の濃度の 5-ALA にて暴露し、超音波照射を行った。(条件: 1MHz, 3W/cm², Duty cycle 10%) 光線力学療法の効果を極力減ずるため、暗室で実験を行った。培養細胞は 5-ALA 投与単独群と 5-ALA 投与に超音波照射を加えた群に大別し、それぞれの腫瘍細胞の形態を顕微鏡にて観察し、PpIX のレベルは分光計を用い蛍光スペクトルを検出した。ABCG2 の発現は定量 RT-PCR にて計測した。

<Result>

神経膠腫細胞は超音波照射により培養ケースから溶媒内に遊離したが、培養ケースへ再付着し、ほとんどの細胞は生存し 6 時間後までに元の形態に回復した。PpIX 発現レベルは全ての培養細胞において超音波照射群が 5-ALA 投与単独群よりも早く発現した。ABCG2 発現について、超音波照射群では 5-ALA 単独投与群よりも各培養細胞において比較的抑制効果を認めた。

<Discussion>

超音波は多種多様な生物学的効果を有する (細胞溶解、細胞分裂能の変化、超微細構造の変化、等)。顕微鏡での細胞の形態観察については、超音波の効果で最も影響が大きな細胞溶解がもたらされるかどうかを確認したが、ほとんどの細胞が生存し、本研究で用いた超音波強度は細胞溶解に至る影響はなく、安全に使用できた。

次に細胞間での PpIX 蛍光スペクトラムのレベルについては、T98G 細胞株が一番高かった。過剰な PpIX は活性酸素 (ROS) による DNA 損傷を生じる可能性があるため、多くの細胞において porphyrin の恒常性を維持する代謝経路を有する。中でも細胞質外へ排出する ABCG2 活性の増加は、5ALA 投与後の細胞質内 PpIX 発言を低下させ、PpIX 蛍光を低下させることが示されている。

本研究では時間依存的に 5ALA 投与後、ABCG2 発現のわずかな増加が認められた。外因

的に投与された 5ALA が porphyrin の上昇を引き起こし、ABCG2 等の膜輸送体の活性を高めることにより過剰な porphyrin より細胞を保護するための機構ではないかと考えた。

最近、ABCG2 発現が変化することで、超音波が乳がん幹細胞の化学療法抵抗性を逆転させるという報告もあり、本研究でも ABCG2 発現について調査した。上述の通り、ABCG2 は porphyrin を細胞質外へ排出する膜輸送体であり、ATP 依存性に作用する。またミトコンドリア膜にも局在する。5ALA 投与後の ABCG2 mRNA の上昇に対して、超音波照射を行うと神経膠腫細胞の ABCG2 発現に対する抑制効果を示した。

本研究において超音波照射の条件は、以前の研究で用いた条件で設定した。腫瘍細胞内へ最も多い PpIX の蓄積と人体への安全性を求めた最適条件を見出すため、さらなる研究が必要と思われ、また臨床において超音波による正常細胞への影響を考慮する必要がある、この影響を解明するにも、さらなる研究が必要と考える。

<Conclulsion>

悪性神経膠腫への超音波照射は、細胞内 PpIX レベルを上昇させ、より強い 5-ALA 蛍光の誘導をもたらす。また超音波照射による ABCG2 発現の抑制は、神経膠腫細胞における PpIX 蓄積に寄与する要因の一つである可能性がある。