

博士學位論文要旨等の公表

学位規則（昭和28年4月1日文部省令第9号）第8条に基づき、当該博士の学位の授与に係る論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

氏名 齋藤 琢磨

学位の種類 博士（理工学）

報告番号 甲第25号

学位授与の要件 学位規程第4条第2項該当

学位授与年月日 令和3年3月20日

学位論文題目

「光線力学的診断・治療用光感受性物質 Talaporfin の細胞内の
取り込みと排出機序の同定」

論文審査委員 主査 教授 李 黎明

委員 教授 川辺 豊

委員 教授 佐藤 昇志

学 位 論 文 要 旨

光線力学的診断・治療用光感受性物質 Talaporfin の細胞内の取り込みと排出機序の同定

光科学研究科 光科学専攻

学籍番号：D2170010

氏 名： 齋藤 琢磨

【背景】光線力学的診断・治療 (PDD・PDT) は、癌細胞に光増感剤がより特異的に蓄積されるという原理に基づいて、癌を診断・治療する新しい方法である。第二世代の光感受性物質である Talaporfin は、その高い診断と治療効果により脳腫瘍および早期肺癌に使用され、Talaporfin の適用はさまざまな癌に拡大している。Talaporfin の蓄積は PDD と PDT の両方で重要だが、エンドサイトーシスの可能性があることを除いて、詳細な取り込みまたは排出のメカニズムはまだ明らかにされていない。本研究では、様々な細胞株を用いて Talaporfin の取り込みと排出メカニズムを明らかにすることである。

【材料・方法】実験では、26 の細胞と細胞株を使用し、10%ウシ胎児血清および1%ペニシリン-ストレプトマイシンを添加した培地を使用した。すべての細胞株は、5% CO₂ インキュベーターで維持した。取り込み実験のために、細胞株を無血清培地に 2.0×10⁵ cells / mL で懸濁した。Talaporfin を懸濁細胞に最終濃度 30μg/ mL で添加し、37°C で 1~4 時間培養し、フローサイトメーターを使用して分析した。細胞内局在実験のために、細胞に 30、60、および 100μg/ mL の Talaporfin を加え、ライソソーム関連膜タンパク質 1 (LAMP-1) GFP または初期エンドソーム抗原 1 (EEA1) GFP または Mitotracker orange を遺伝子導入した。エンドサイトーシスを調べるために、肉腫細胞株 MFH03 を低温または 2-デオキシグルコース + NaN₃ で培養した。また、我々は様々な阻害剤も使用した。我々はライソソームの分解を調べるために、Talaporfin を加えた肉腫細胞株 MFH03 をクロロキン (CQ) もしくは塩化アンモニウム (NH₄Cl) で培養した。

【結果と考察】Talaporfin の蓄積の違いを調べるために、いくつかの細胞株を分析した。PBMC を除くすべての細胞は、高い Talaporfin 蛍光強度を示した。以前の報告は、Talaporfin がエンドサイトーシスに取り込まれることを示唆している。共焦点蛍光顕微鏡により細胞内局在を確認した。Talaporfin は細胞内のライソソームに局在していた。一方、ミトコンドリアの局在は、すべての肉腫および肺癌細胞株で一致しなかった。さらに、我々はエンドサイトーシスの取り込み経路を調べた。低温または 2-DG + NaN₃ は、Talaporfin の内皮内在化の著しい減少を誘発した。その後、さまざまな生化学的阻害剤を使用して、Talaporfin の取り込みにおける異なるエンドサイトーシス経路が特徴づけられた。クラスリン被覆ピット経路の阻害剤である 20μM の

クロムプロマジン塩酸塩は Talaporfin の取り込みに影響しなかったが、クラスリン格子の形成を阻害する 0.45M のスクロースは約 77.0%取り込みを減少させた。カベオラ・ラフトを破壊する 5mM のメチル- β -シクロデキストリンおよびカベオラの取り込みを阻害する 0.1mM のゲニステインは、Talaporfin の取り込みを 49.2%および 55.9%減少させた。我々はライソソームにおける分解が Talaporfin の細胞内からの消失に関与しているかを調べた。クロロキン (CQ)や塩化アンモニウム (NH_4Cl)などの塩基性アミンは、リソソームの pH 値を上げることにより、リソソームの機能を弱く抑制する。CQ を添加した培地で培養した MFH03 は、コントロールよりも 12.5 μM と 25 μM でそれぞれ 24.7%と 30.0%高い蛍光強度を維持した。CQ を添加した培地で培養した SBC5 は、コントロールよりも 12.5 μM と 25 μM でそれぞれ 24.7%と 30.0%高い蛍光強度を維持した。これらの結果から、Talaporfin はクラスリンまたはカベオラのエンドサイトーシスから取り込まれ、初期エンドソームに送られ、その後、後期エンドソームに送られ、最終的にはライソソームにより細胞から消失することが明らかとなった。Talaporfin は、リソソーム活性を抑制することにより、Talaporfin の治療効果を促進する可能性が示された。

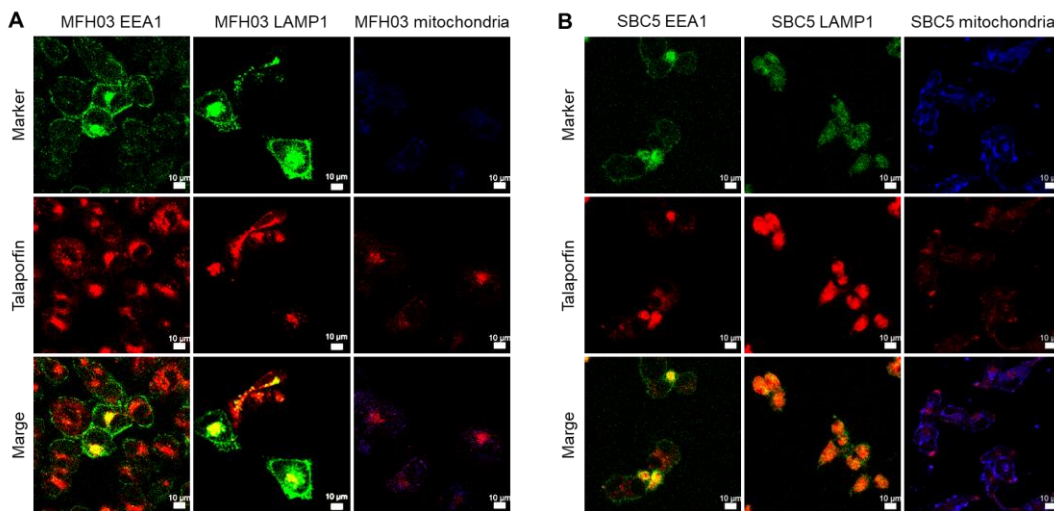


図1 Talaporfin の細胞内局在 (A: MFH03, B: SBC5)

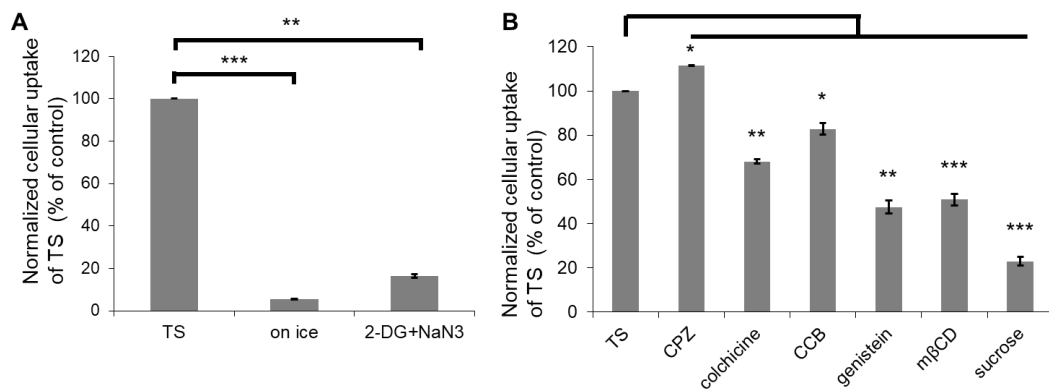


図2 Talaporfin のエンドサイトーシスの経路
(A: ATP と低温処理, B: 各種阻害剤)

論文審査の結果の要旨

申請者齋藤琢磨の博士学位論文に対して、審査員李黎明（主査）、川辺豊（副査）、佐藤昇志（副査）の行った審査結果を記す。

博士学位論文の予備審査は2019年6月27日15時00分より研究棟D209室にて行った。申請者より博士学位論文の概要に関わる発表が約20分、審査員らの質疑応答が約20分、それぞれ行われた後、審査員3名により学位論文審査出願の可否を検討した。その結果、本論文が博士（理工学部）の学位を出願するに十分な内容を含むものと認められた。これにより、2020年1月7日に学位論文出願書が提出された。

本論文は5章より構成されている。第1章では、本研究の対象である光感受性物質 Talaporfin sodiumの研究背景及びメカニズム解明の医学的価値について、そして、研究目的について説明されている。第2章では、研究に必要な知識、実験の原理について説明されている。第3章では、研究に用いた細胞株、実験に用いた試薬、実験方法及び測定方法の詳細が述べられている。第4章では、最初に、Talaporfinの各細胞株、細胞ごとの取り込みと排出量が増加するかを解析し、末梢血単核球（PBMC）を除く全ての細胞でTalaporfinが経時ごとに取り込まれ、全ての細胞でTalaporfinが経時ごとに排出されることが述べられている。2つ目に、緑色蛍光タンパク質（GFP）をマーカーとした初期エンドソーム抗原（EEA1）及びライソソーム関連膜タンパク質1（LAMP1）を遺伝子導入した細胞株にTalaporfinを取り込ませて細胞内局在を観察し、初期エンドソームと後期エンドソームとの細胞内の局在が一致することを述べている。3つ目に、エンドサイトーシスの取り込み経路を阻害し、Talaporfinの取り込みがATP依存かつ能動輸送で、クラスリン依存性エンドサイトーシス及びカベオラエンドサイトーシスが Talaporfinの取り込みに関与したことを述べている。さらに、消失の経路に関しては、ライソソーム内での酵素による分解がTalaporfinの細胞内からの消失経路であることが述べられている。最後に、K-Ras変異を持つ細胞株のPI3K及びMAPKのシグナル伝達経路を阻害することでTalaporfinの取り込みが減少するが、それらはATP非依存な取り込みであることが述べられている。第5章では得られた研究結果からの総括が記述されている。

論文審査過程において、原理、実験方法と材料、結果を主にチェックし、誤字、脱字、図修正、英語の不備などを修正するように指示し、適切な修正がなされた最終稿が2020年2月14日に申請者から提出された。

これまで本論文の研究業績は、採択済の査読付き原著論文（英語）1報、国際学会プロシーディング2報、投稿中のものが査読付き原著論文（英語）1報であった。

博士学位論文発表会は2020年2月10日13時15分より研究棟F203会議室にて開催され、申請者より博士学位論文の発表が約40分、審査員らの質疑応答が約30分行われた。学術成果を以下に総括する。これまでTalaporfinは光線力学的診断（PDD）・治療（PDT）で用いられながら、生体内での分子機構は明らかにされなかった。本研究では、Talaporfinはクラスリン依存性エンドサイトーシス及びカベオラエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ、初期エンドソームから後期エンドソームに移行し、ライソソーム内で分解されることを実証した。また、K-Rasの変異がTalaporfinの取り込

みに影響を与えるが、それらはATP非依存的な取り込みであることを実証した。以上の結果から、本論文は公立千歳科学技術大学大学院学則28条及び公立千歳科学技術大学学位規定により、博士（理工学部）の学位を授与するに値すると結論した。

最終試験（口頭試問）は2020年2月10日14時15分より研究棟F203会議室にて行い、学位論文に関する学術的議論を通して申請者の学識を確認した。

申請者は博士後期課程における研究の過程で、学位論文に記載されるほかにも膨大な光感受性物質の光物性実験、細胞実験を経験しており、理工学は勿論バイオフィotonics科学者として十分なトレーニングを積んでいる。細胞培養、動物実験（飼育・尾静脈注射・皮下・リンパ節転移モデル）、RT-PCR法、RT-qPCR法、電気泳動法、SDS-PAGE、ウェスタンブロッティング法、細胞への遺伝子導入、Flow cytometry解析、マイクロプレートリーダーによる発光測定、分光分析、共焦点蛍光顕微鏡、蛍光免疫染色法、シングルセルソーティング、データ解析など、理工学科学者及びバイオフィotonics科学者として必要な基本技術と先端技術を身に付けている。

申請者の博士学位論文の課題は医療現場の医師から要請されたもので、光感受性物質Talaporfin sodiumが癌診断・治療の臨床に応用されているがそのメカニズムはまだ解明されていない。申請者はその難しいテーマにチャレンジし、独自のアイデアで解明に成功した。よって、独力で研究を展開できる能力を有していると考えられる。

申請者は博士論文の研究実験を公立千歳科学技術大学と札幌医科大学（研究員）両方で行い、その研究の成果は、札幌医科大学病理学教室責任者鳥越俊彦教授から高く評価をされた。

これらのことから判断し、最終試験は合格と結論した。2020年3月4日18時15分よりB101会議室にて開催した光科学研究科委員会において、申請者が必要な研究指導を受け、教育課程を終えたことを認められた。2020年11月11日、審査制度のある学術誌に論文が受理されたことから、公立千歳科学技術大学大学院学則28条及び公立千歳科学技術大学学位規程の定めるところにより、退学後1年以内に学位が申請された。