

## 学位論文の内容の要旨

KHURELBAATAR BOLORTUYA 印

### 学位論文のタイトル

Evaluation of various cryoablation procedures in multiple cell lines using quantitative bio markers of Bioluminescence imaging: an *in vitro* study

複数の細胞株におけるクライオアブレーションの効果判定：バイオルミネッセンスイメージングの定量的バイオマーカーを用いた *in vitro* 研究

### (学位論文の要旨)

[背景] クライオアブレーションは固形腫瘍の凍結融解のサイクルを繰り返すことによって腫瘍の壊死を引き起こす局所療法であり、腫瘍学における低侵襲治療法として知られている。外科的および経皮的アプローチのいずれも可能であり、良性・悪性腫瘍のいずれにも有用とされている。生物発光イメージング(BLI)は、ルシフェリン - ルシフェラーゼ 反応を生じさせることによって組織や細胞からの生物活性シグナルとして光子を検出する、広く使用されている分子イメージング技術である。BLI は他のイメージング手法と比較して感度が高く、イメージング時間が短いことから効率の高いモダリティとされている。本研究ではBLIを用いてさまざまな細胞株におけるクライオアブレーション基本プロトコールの効果判定を行なった。

[目的] 複数の腫瘍細胞株に対する様々なクライオアブレーションプロトコールの効果の違いが *in vitro* のそれと同様であるかどうかを生物発光イメージング (BLI) を使用して検証すること。

[材料と方法] 8種類のルシフェラーゼ発現癌細胞株について評価を行なった。用いた細胞株は肺腺癌 (A549-luc)、肺大細胞癌 (NCIH460-luc)、腎明細胞癌 (Caki1-luc)、肝芽腫 (HepG2-luc)、乳癌 (BT 549-luc)、結腸直腸癌腫 (Col26-luc)、前立腺腺癌 (DU145-luc)、および黒色腫 (B16F10-luc) で、それぞれを96 ウェル プレートに同一の濃度でシーディングした。細胞株はそれぞれグループ 0 (G0) (コントロール群)とそれぞれの治療サイクル数 (G1 ~ G3) ごとの 3 つの治療グループの合計4グループにわけた。G1~G3は、 $-45^{\circ}\text{C}$ ~ $-80^{\circ}\text{C}$ の範囲の温度に調整された異なる冷凍庫で、規定の治療サイクル (1から3サイクル) でクライオアブレーションを行なった (G0はコントロール群なのでクライオアブレーションは行わなかった)。各ウェルプレートの培地を吸引し、クライオアブレーション処理を行った。各凍結融解サイクルは、10 分間の凍結に続いて温度  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  の細胞インキュベーター内での 5 分間の解凍プロセスで構成された。規定のサイクル終了後、生物発光シグナルを生成するための準備として  $0.075\ \mu\text{L}$  の D-ルシフェリン溶液を各ウェル プレートに添加した。2 分間隔で20 分間BLIの撮像を行い、細胞の平均放射輝度を評価した。統計はGraphPad Prism 9.0.0を使用しOne-way ANOVAとDunnett' s multiple comparisons testを行い、各治療群とコントロール群間の治療効果を評価した。

[結果] BLI の放射輝度は細胞株の増殖速度を反映する。BLI と細胞密度の間には強い直線的相関があった ( $r = 0.96$ ,  $p < 0.01$ )。  $-45^{\circ}\text{C}$  の冷凍アブレーションを1サイクル行なったところ黒色腫を除くすべての細胞株において平均輝度に有意差があり、細胞殺傷効果があったことが示された。  $-45^{\circ}\text{C}$  で2または3サイクルのアブレーションを行うと、コントロール群 (未処理の細胞) と比較した場合、平均放射輝度はすべての細胞株について有意に低かった ( $p < 0.01$ )。  $-60^{\circ}\text{C}$  または  $-80^{\circ}\text{C}$  で処理した細胞株の平均放射輝度はコントロール群よりも大幅に低かった ( $p < 0.01$ )。これは特に2または3のサイクルで処理した場合特に顕著だった。すべてのクライオアブレーション温度で 2 サイクルと 3 サイクルの間に細胞殺傷効果に有意な差はいずれも細胞株でも認めなかった。

[結論] 今回の研究ではBLI の平均放射輝度は、サイクル数や細胞株によって異なった。この所見は、凍結に対する感受性の違いによって壊死またはアポトーシスのタイミングが細胞株ごとに異なることを示唆している。今回の研究では黒色種以外の多くの細胞株が  $-45^{\circ}\text{C}$  でのクライオアブレーションに感受性を示したものの、  $-60^{\circ}\text{C}$  以下でのクライオアブレーションが最も効果的であることがわかった。