

令和元年6月14日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08921

研究課題名(和文) 便微生物移植とアミノレブリン酸に着目した薬剤性消化管粘膜障害保護の治療戦略の確立

研究課題名(英文) A potential preventive effect of fecal microbiota transplantation and 5-aminolevulinic acid against anti-cancer drug-induced damage to intestinal mucosa

研究代表者

高岡 宗徳 (Takaoka, Munenori)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50548568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗悪性腫瘍薬イリノテカン(CPT-11)の代謝産物SN-38による消化管粘膜障害に対し5-アミノレブリン酸(5-ALA)の腸管上皮保護効果に焦点を絞って検討した。

培養小腸上皮細胞において、5-ALAは酸化ストレス応答生存シグナルheme oxygenase-1(HO-1)発現を誘導し、SN-38投与により5-ALA非存在下では抑制されるHO-1が、5-ALA投与により発現維持された。マウス小腸上皮オルガノイドに対しSN-38を投与すると、オルガノイドに細胞死がみられたが、5-ALA共投与下では細胞死が生じず、5-ALA投与によるHO-1誘導が腸管上皮保護効果を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学療法における5-ALAの腸管粘膜保護効果については理論的に妥当であるものの未だ報告がなかったため、本研究における5-ALAの消化管粘膜保護作用の研究成果には新規性を有する。故に、近い将来に化学療法に対する新規支持療法として臨床応用が期待される。

さらに、5-ALA合成能を高めたプロバイオティクス製剤創出に向けての新たな研究・開発へのステップを踏み出すことが可能となれば、実臨床の観点からも画期的である。5-ALAと既存のプロバイオティクス製剤との併用療法、すなわちシンバイオティクスを考案することができれば、社会的意義へつながるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We utilized organoid culture established from mouse intestinal epithelium, and focused on the study of 5-aminolevulinic acid (5-ALA)-mediated protective effect on a damage to the intestinal mucosa by anticancer drugs.

In two-dimensional culture with commercially available rat intestinal epithelial cells, 5-ALA treatment could induce heme oxygenase-1 (HO-1), a major survival signal molecule that responds to oxidative stress. Under the treatment with SN-38, an active metabolite of a popular anticancer drug CPT-11 (Irinotecan), which is known to injure intestinal mucosa, the addition of 5-ALA could maintain the expression of HO-1 in rat intestinal epithelial cells but not without 5-ALA. We also observed the similar phenomenon in mouse intestinal organoid. Furthermore, 5-ALA treatment could reduce a chance of cell death by SN-38 treatment in this culture setting, suggesting that 5-ALA can be a potential supportive reagent against anticancer drug-induced damage to intestinal mucosa.

研究分野：消化器外科、消化器がんの発生と浸潤転移機構、消化器がん治療(特に手術と化学療法)と支持療法の開発

キーワード：薬剤性消化管粘膜障害 5-アミノレブリン酸 オルガノイド heme oxygenase-1

1. 研究開始当初の背景

近年の集学的治療の発達により、消化器がん罹患者の長期生存などの治療成績向上が期待できる時代となったが、抗がん剤や放射線照射による有害事象の対策はいまだ十分とは言えず、治療を受ける罹患者の生活の質に少なからず影響を与える問題である。抗悪性腫瘍薬による代表的な消化器症状として下痢が挙げられる。消化器がんが頻用される抗がん剤においては、イリノテカンで約 62%の患者に下痢症状が出現し、また 5-fluorouracil (以下 5-FU) やカペシタビン、S-1 などのフッ化ピリミジン系製剤にて 12~20%、メトトレキサートで約 5%の発現頻度である。

最近腸内細菌叢の変化が炎症性腸疾患や薬剤性腸炎の病態に深く関与することが報告され、健常者の便に含まれる腸内細菌叢分布に置換する、いわゆる「便微生物移植(Fecal microbiota transplantation, 以下 FMT)」が腸管炎症の改善を促進させることが報告され、本邦でも潰瘍性大腸炎に対する臨床試験が開始された。この手法は、経口的に腸内細菌叢を調整するプロバイオティクス概念に相通ずるものであり、既に乳酸菌を代表とする複数の「善玉菌」が製品化されてきた。

一方、5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid, 以下 5-ALA)は正常細胞においては生存活動に必要なヘム合成の元となるが、癌細胞ではヘムへ変換されず、ミトコンドリア内でプロトポルフィリン IX (protoporphyrin IX, 以下 PpIX)に変換され、PpIX が持つ光増感性により発光する原理を応用した光線力学診断(photodynamic diagnosis, 以下 PDD)や、PpIX 蓄積による活性酸素を介したアポトーシス誘導効果を応用した光線力学療法(photodynamic therapy, 以下 PDT)への臨床応用が始まっている。つい最近では 5-ALA が食道癌や胃癌で頻用される抗がん剤であるシスプラチン誘因性の急性腎障害に対し保護効果を示すことが報告された (Terada Y. et al, PLoS One. 2013;8:e80850)。これは 5-ALA が腎尿細管細胞においてヘムオキシゲナーゼ-1(hemoxygenase-1, 以下 HO-1)の発現を上昇させることで、シスプラチンによって誘導される酸化ストレスを低下させることがその機序であると考えられた。

我々は 5-ALA の供給元である SBI ファーマ株式会社より 5-ALA 製剤の供給を受け、シスプラチン誘因性急性腎障害に対する 5-ALA の腎保護効果の多施設共同臨床試験に参加している経緯から、抗がん化学療法による消化管粘膜障害に対する予防戦略についても、5-ALA に着目した。抗癌化学療法による腸管粘膜障害の一因として酸化ストレスによる影響が示唆されているが、プロバイオティクス製剤による腸内細菌叢の正常化によって粘膜保護効果が得られることが報告されている (Wada et al. Support Care Cancer, 2010;18:751-759, Yamashiro et al. Beneficial Microbes, 2010;1:357-365)。イリノテカンによる薬剤性消化管粘膜障害においては、肝臓から胆汁排泄にて腸管内に到達し、腸内細菌によって活性代謝物の SN-38 に変換され、腸管粘膜障害を生じる。この過程において何らかの酸化ストレス誘導が考えられ、FMT やプロバイオティクスによる腸管上皮細胞内での HO-1 発現増強により粘膜保護効果の機序が推察される。さらに、5-ALA によって腎尿細管細胞と同様に腸管上皮細胞においても HO-1 を発現させることができれば、効果的な粘膜保護が得られると期待される。さらに、FMT やプロバイオティクスによる腸内細菌叢の調整において、動員された腸内細菌自体の 5-ALA 産生能やその腸管粘膜への作用については未解明のままである。5-ALA 存在下での腸内細菌による消化管粘膜保護作用が増強すれば、5-ALA と FMT (もしくはプロバイオティクス製剤)との併用療法、すなわちシンバイオティクスを考案することが可能であり、ひいては 5-ALA 合成能を高めたプロバイオティクス製剤創出が期待できる。

2. 研究の目的

抗がん化学療法による消化管粘膜障害は重大な有害事象の 1 つである。抗がん剤治療を要するがん患者の生活の質を損なわないために、画期的かつ効果的な支持療法の確立が急務である。本研究では、腸内細菌叢の正常化を目的に、炎症性腸疾患で臨床応用が始まった便微生物移植(Fecal microbiota transplantation)による消化管粘膜保護効果と、種々の正常細胞に対し保護活性作用のある 5-アミノレブリン酸を組み合わせることで、薬剤性消化管粘膜障害に対する新規支持療法の確立を目指す。

3. 研究の方法

当初、下記項目についての検討を予定していた。

- A. 抗悪性腫瘍薬による腸管細菌叢の変化及び腸管粘膜障害との関連性の検討
- B. 健常マウスの糞便から精製した腸内細菌叢移植(FMT)による腸管粘膜障害保護の検討
- C. 5-ALA 投与による薬剤性腸管粘膜障害保護効果とその細胞生物学的機序の検討
- D. 腸内細菌叢自体の 5-ALA 発現とその細胞生物学的意義についての検討
- E. FMT と 5-ALA 併用による相乗的な腸管粘膜障害保護効果の検討

研究開始当初より、FMT 研究の根幹をなすネズミを用いた動物実験遂行が困難な当該研究機関の状況に直面したため、動物実験環境を模倣するためにマウスの小腸上皮より分離培養した

オルガノイドを用い、FMT 関連データの集積はいったん凍結し、5-ALA による腸管上皮保護効果に焦点を当て、下記実験を行う方針とした。

1. 培養小腸上皮細胞を用いた検討：

培養ラット小腸上皮細胞(IEC6, IEC18)に対し、5-ALA 投与による HO-1 発現誘導を確認し、SN-38 共投与下での HO-1 発現変化について検討した。

2. マウス小腸上皮より分離培養したオルガノイドを用いた検討：

マウス小腸上皮オルガノイドに対し、5-ALA 投与による HO-1 発現誘導の確認、および SN-38 共投与下でのオルガノイド構成細胞の生存維持・細胞死についての評価を行った。

4. 研究成果

培養ラット小腸上皮細胞(IEC6, IEC18)において 5-ALA は heme oxygenase-1(HO-1)発現の誘導が認められた。SN-38 投与下において、5-ALA 非存在下では発現抑制される HO-1 が、5-ALA 投与により発現維持されることを確認した。

次に、マウス小腸上皮より分離培養したオルガノイドを用いて同様の 5-ALA 投与を行うと、オルガノイド構成細胞に HO-1 発現が誘導された。SN-38 をオルガノイドに投与すると、オルガノイド構成細胞に細胞死シグナルが発現されたが、5-ALA 共投与下ではオルガノイドに細胞死がみられず、5-ALA 投与により HO-1 発現が誘導されることで、抗悪性腫瘍薬による腸管上皮細胞死が抑制されることが示唆された。

以上の結果を纏めた成果を論文作成し、近日中に報告予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

高岡宗徳：抗がん化学療法での消化管粘膜障害に対するアミノレブリン酸による保護効果の可能性. 第 8 回川崎医科大学学術集会. 2019 年 (発表予定)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：猶本 良夫

ローマ字氏名：Naomoto Yoshio

所属研究機関名：川崎医科大学

部局名：医学部

職名：特任教授

研究者番号(8桁): 00237190

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。