

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15324

研究課題名(和文) フローサイトメトリーを用いた光線力学診断による多発性骨髄腫微小残存病変の検出

研究課題名(英文) The photodynamic detection of MRD of multiple myeloma by flowcytometry

研究代表者

張替 秀郎 (HARIGAE, HIDEO)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：50302146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞では、ミトコンドリアでのヘム合成が低下しているため、アミノレブリン酸(ALA)を投与すると、プロトポルフィリンIX(PPIX)が蓄積し、励起光を当てると蛍光を発する。本研究では、この特性を利用し多発性骨髄腫の微小残存病変をフローサイトメトリー(FCM)にて検出する新規の検査法を開発することを目指した。まず、多発性骨髄腫細胞株であるKMS18を用いて、FCMでの検出法の至適条件を確立した。次にALAの競合物質を用いて、ALAの取り込み受容体を明らかにした。また大腸がん細胞株を用いてALAの細胞内動態を検討したところ、一部がPPIX合成に用いられ、一部が再排出されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Heme is generated in mitochondria by insertion of iron to protoporphyrin IX (PPIX). As the activity of mitochondria is decreased in cancer cells, PPIX is accumulated by the administration of ALA. The aim of this study is to establish the novel method to detect minimal residual disease (MRD) of multiple myeloma by applying this characteristic of cancer cell biology to flowcytometry. First, the condition to detect the fluorescence of PPIX was established in KMS18 cell, a myeloma cell line. It was confirmed that the established condition can effectively differentiate KMS18 cells from normal blood cells. Next, transporters which incorporate ALA into cells, were identified by the competition assay. Then the movement of ALA after incorporated into cells was clarified using Caco cells. As a result, a part of ALA was used for the generation of PPIX, and unused ALA was exported from cells. These findings may contribute to the development of a novel detection system of MRD.

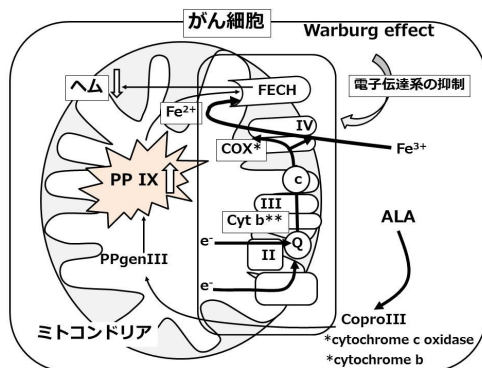
研究分野：血液内科学

キーワード：微小残存病変 フローサイトメトリー アミノレブリン酸

1. 研究開始当初の背景

造血器腫瘍において厳密に治療効果を判定するためには、骨髓中に少数残存する腫瘍細胞(微小残存病変 minimal residual disease:MRD)を高感度で検出することが重要である。これまでに、MRD の検出には腫瘍特異的キメラ遺伝子を PCR で検出する方法や、正常とは異なる表面抗原の発現パターンを呈する腫瘍細胞をフローサイトメトリー (FCM) で検出する方法が用いられてきた。しかしながら、前者は PCR で検出可能な遺伝子異常を有する腫瘍細胞のみが適応となり、後者は正常細胞との分離を高感度に行うことが難しいため、汎用性のある検出法となっていない。

ヘムは酸素運搬をはじめ、多様なたんぱく質の機能に必須の補欠分子であり、すべての細胞に不可欠の分子である。ヘムは、ALA の合成からスタートし、最終的に PPIX に二価の還元鉄が挿入され完成する。がん細胞においては、ワールブルグ効果により解糖系が優先されミトコンドリアでの好気性代謝が落ちているため、電子伝達系の活性が抑制されており、このヘム合成の最終段階で必須の鉄の還元ができない(下図)。

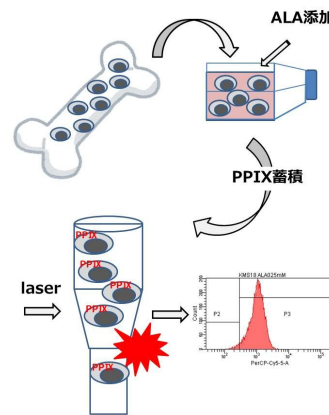


従って、がん細胞が ALA を取り込むと、ヘム合成の前段階でプロトポルフィリン IX (PPIX) が蓄積し、励起光を当てると細胞が

光る。この原理を利用し ALA は脳腫瘍などの固形腫瘍の浸潤範囲を術中に確認するための診断薬として臨床応用されている。

この励起光はフローサイトメトリー で検出が可能ならずであり、この原理を造血器腫瘍に応用すれば、ルーティンで行っているフローサイトメトリーでの解析に応用可能である。しかも、腫瘍細胞の表面抗原検出と併せることにより、より詳細で感度よくかつ簡便に、造血器腫瘍の微小残存病変が検出できると考えた。

ALAを用いたFCMによる腫瘍細胞の検出



2. 研究の目的

がん細胞における PPIX の蓄積を利用し、フローサイトメトリーによる造血器腫瘍の微小残存病変の光線力学診断法を確立することを目的とする。

具体的には、研究期間内に以下の項目を達成する。

- 1) 造血器腫瘍の細胞株、および臨床検体を用いて、腫瘍細胞を検出するための至適条件を確立し、臨床的有用性を検討する。
- 2) 腫瘍細胞のソーティング法としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

本研究では、対象造血器腫瘍を多発性骨髄腫とした。

まず多発性骨髄腫細胞株の中で、PPXI の蓄積効率が高い細胞株を選択し、フローサイトメトリーで解析する際の添加 ALA の濃度、反応時間等の至適条件を確立する。

次に正常末梢血単核球を用いて、細胞株で得られた至適条件により骨髄腫細胞株と正常単核球の分離が、フローサイトメトリー上可能かどうか検討する。

さらに、競合物質を用いて ALA の取り込み受容体と同定し、取り込みの特異性について検討する。

また、取り込まれた後の ALA の細胞内動態について明らかにし、利用効率について検討する。

最終的に腫瘍比率の多い初発・再発検体を用いて本法を行い、骨髄腫細胞での PPIX 蓄積を検討する。その際、ルーチンの表面マーカーを用いた FCM による骨髄腫細胞の検出法と比較し、臨床検査としての有用性を評価する。

4 . 研究成果

まず、複数の多発性骨髄腫細胞株を用いて検討したところ、KMS18 細胞が最も PPXI の蓄積効率が高いこと、フローサイトメトリーにてその励起光が検出できることを見出した。

さらに KMS18 細胞を用いて、フローサイトメトリーでの検出法における ALA の濃度、反応時間などの至適条件を確立した。

正常末梢血単核球における PPXI の蓄積を、KMS18 細胞で確立した至適条件を適用し、フローサイトメトリーで確認したところ、単球において PPXI の蓄積が認められたが、KMS18 細胞に比べて PPXI 蓄積による励起光の蛍光強度は弱く、フローサイトメトリー

上での分別が可能であることが確認できた。

次に ALA が SLC36A1、SLC15A2 により取り込まれることを競合物質を用いて確認した。

さらに ALA の細胞内動態を検討したところ、一部が PPIX 合成に用いられ、一部が再排出されることが明らかとなった。なお、この細胞内動態の解析は、非接着細胞である骨髄腫細胞株では困難であったことから、大腸がん細胞株である Caco 細胞を用いて検討した。

ALA を用いた本光線力学的診断法の臨床検体における特異性、感度の解析については、融解後の viability がよい多発性骨髄腫の凍結検体が十分確保できなかったこと、残された研究期間に必要とする初発、再発症例の臨床検体が得られなかったため、引き続き検討中である。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

1 .Saito K, Fujiwara T, Ota U, Hatta S, Ichikawa S, Kobayashi M, Okitsu Y, Fukuhara N, Onishi Y, Ishizuka M, Tanaka T, Harigae H.

Dynamics of absorption, metabolism, and excretion of 5-aminolevulinic acid in human intestinal Caco-2 cells.

Biochem Biophys Rep. 2017 Jul 13;11:105-111.doi:10.1016/j.bbrep.2017.07.006. eCollection 2017 Sep. (査読有)

[学会発表](計 1 件)

1 . 斎藤慧、藤原亨、田中徹、張替秀郎
腸管上皮細胞モデルにおける ALA の代謝
第 40 回日本鉄バイオサイエンス学会学術

集会

2016年9月10-11日名古屋大学豊田講堂

〔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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

張替 秀郎 (HARIGAE Hideo)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号: 50302146

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()