

令和 6 年 5 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07191

研究課題名（和文）がん細胞特異的代謝を標的とした5アミノレブリン酸併用光線力学療法の開発と実用化

研究課題名（英文）5ALA-photodynamic therapy targeting cancer specific metabolisms

研究代表者

堀 浩樹 (Hori, Hiroki)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40252366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）：神経芽腫細胞株を用いて解糖系阻害薬の5ALA-PDTによる抗腫瘍効果の増強作用について検討を行い、グルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)阻害薬である6-aminonicotinamide(6AN)が併用候補薬として有望であることを見出した。6AN投与はNADPH/NADP⁺比とGSH/GSSG比を減少させ、過酸化脂質蓄積を促進させることが明らかになった。また、6AN併用5ALA-PDTによる細胞死のメカニズムとして、5ALA-PDTにより産生された活性酸素種が細胞膜を傷害しネクローシスを誘導すると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児がん治療後晩期合併症を軽減し、低中所得国でも安価で実施できる新しいがん治療の選択肢を提供することを目的に本研究を実施した。研究結果は、G6PD阻害薬が5ALA-PDTによる細胞死誘導を効果的に増強することを示した。解糖系阻害薬は分子標的薬等と比較して安価であり、経済的で副作用の少ない光線力学療法の開発に本研究成果が活用されることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We conducted a study to assess whether inhibitors of glycolysis can enhance the cytotoxic effect of 5-aminolevulinic acid-photodynamic therapy against neuroblastoma cells and found that 6-aminonicotinamide (6AN), an inhibitor of glucose-6-phosphate dehydrogenase, is a promising agent for its combination. 6AN reduced ratios of NADPH/NADP⁺ and GSH/GSSG which might promote accumulation of lipid peroxidation. This cytotoxic effect was induced with necrosis following damages of cell membrane by the lipid oxidation.

研究分野：小児がん

キーワード：神経芽腫細胞 光線力学療法 5アミノレブリン酸 解糖系阻害薬 6アミノニコチン酸 脂質酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児がんの治療では成長・発達期にある患者の晩期合併症を減らすため、臓器機能障害を最小限にする治療が望まれる。また、WHO が「世界の小児がんの生存率を 2030 年までに 60%に引き上げる」ことを目標に Global Initiative for Childhood Cancer(GICC)に取り組んでいる。この活動に沿って低中所得国における小児がんの治療成績の向上を目指すためには、安全性、経済性、実施可能性を考慮した新しいがん治療の開発が望まれる。これらを背景に、光線力学に基づく選択性の高いがん治療の開発と実用化を目指す研究に着手した。世界的には光感受性色素と抗体薬を組み合わせた光免疫療法が実用化されつつあるが、費用と腫瘍特異的抗原同定の点で課題がある。5-Aminolevulinic acid(5-ALA)を用いた PDT は、5-ALA を投与することにより、光増感物質であるプロトポルフィリン IX(PpIX)が、がん細胞に選択的に蓄積することを利用するがん治療である。PpIX は一定の波長の光により活性酸素を生じるため、正常細胞には影響を与えず、がん細胞を選択的に破壊することができる。しかし、がんの種類により PpIX 蓄積量が十分でない場合があり、本治療の臨床への応用にはさらに検討を進める必要がある。がん細胞における PpIX 蓄積増強のメカニズムは十分に解明されておらず、そのメカニズムの一つとして、がん細胞ではワールブルグ効果により解糖系が亢進していることによるとの仮説が提唱されている。この仮説が正しければグルコース供給が阻害されれば、PpIX 蓄積量は減少するはずであるが、我々はこれまでにがん微小環境下でみられる低グルコース状態では PpIX 蓄積が増強されることを見出し、従来の仮説を支持しない結果を得ていた。本研究では、解糖系亢進などのがん微小環境下でのがん細胞の代謝変化に着目し、がん細胞における PpIX 蓄積増強のメカニズムを明らかにし、その結果に基づいてより有効性の高い 5ALA- PDT の開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、がん微小環境下において細胞の代謝機能を変化させたがん細胞(とくに小児がんの細胞)における PpIX 選択的蓄積のメカニズムを明らかにし、PpIX の選択的蓄積を増強させる併用薬を探索することである。さらに、解糖系阻害薬等の併用候補薬剤の有効性メカニズムを明らかにするため、その併用効果を *in vitro* 実験系を用いて検証し、臨床試験に必要な基礎的知見を蓄積することを目的とした。本研究の成果を小児がん診療の新しい課題である治療後晩期合併症の軽減を実現する治療法の開発に繋げ、低中所得国でも実施できる新しいがん治療の選択肢を提供することを目指した。繰り返し実施できる 5ALA-PDT は、小児がん経験者における晩期合併症の最大の原因となる放射線療法に代わる治療法となる可能性がある。また、経済的で白血球減少などの副作用がなく複雑な医療機器を必要としない 5ALA-PDT は、低中所得国におけるがん治療、とくに診療機会が多く光照射が容易な網膜芽細胞腫や頭頸部原発バーキットリンパ腫に対する新しい治療となることが期待される。さらに、脳腫瘍やウィルムス腫瘍などの手術時術中光照射への応用も期待できる。

3. 研究の方法

神経芽腫細胞株を用いて Pentose phosphate pathway (PPP) を含む解糖系に対する阻害薬である 3-Bromopyruvate (Hexokinase II inhibitor)、2-Deoxyglucose (Glycolytic inhibitor)、Lonidamine (Hexokinase inhibitor)、Mannose (Glycolytic inhibitor)、Metformin (Hexokinase-II inhibitor)、Zoledronic acid (G6PD inhibitor)、6-Aminonicotinamide (グルコース 6 リン酸脱水素酵素 [G6PD] inhibitor)、Polydatin (G6PD inhibitor) の 5-ALA-PDT による抗腫瘍効果の増強作用について検討を行った。この検討結果の基づき、5-ALA-PDT による抗腫瘍効果を増強させる解糖系阻害薬を選定した。さらに、この薬剤の 5-ALA-PDT 抗腫瘍効果増強のメカニズムについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) Hexokinase 阻害薬と G6PD 阻害薬が併用薬として有望であることを確認した。このうち、解糖系の一部を為すペントースリン酸回路の律速酵素であり細胞内グルタチオン濃度を維持することで細胞を酸化ダメージから保護する作用を持つ G6PD に着目し、同酵素の阻害薬である 6-aminonicotinamide (6-AN) の 5-ALA-PDT との併用効果について検討することとした。さらに、複数の神経芽腫細胞株を用いて、6-AN 併用 5-ALA-PDT の併用効果発現のパターンに基づいて細胞株をグループ分けし、SJ-N-JF 細胞を最も併用効果が高い細胞株として同定した。この結果に基づき、SJ-N-JF を使用し、6-AN 併用 5-ALA-PDT による細胞死誘導メカニズムについて検討することとした。

(2) 5-ALA-PDT によって脂質過酸化が生じること、6-AN 併用によって脂質過酸化が増強されることを蛍光イメージング法 (Lipid Peroxidation Sensor) によって確認した。

(3) 6-AN による酸化ストレス増強メカニズムを以下の結果から明らかにした。抗酸化作用を有する還元型グルタチオン (GSH) は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を介して、酸化型グルタチオン (GSSG) を還元して産生される。この NADPH は、ペントースリン酸回路を構成するグルコース-6-リン酸脱水素酵素 (G6PD) によって、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP⁺) から還元して産生される。G6PD 阻害作用を有する 6-AN 投与の結果、NADPH/NADP⁺ 比が減少することを NADPH・NADP⁺ の分別定量によって確認した。さらに、6-AN 投与により GSH/GSSG 比が減少することを GSSG・GSH の分別定量によって確認した。これらの結果から、6-AN がペントースリン酸回路およびグルタチオン代謝・合成系を阻害し、過酸化脂質蓄積の促進に寄与することを推定した。

(4) 酸化ストレスによる細胞死としてフェロトーシスが知られている。また従来の報告では、5-ALA-PDT による細胞死としてアポトーシスが確認されている。一方、本研究で着目した 6-AN 併用 5-ALA-PDT において、フェロトーシス阻害薬 ferrostatin-1 および liproxstatin-1 を併用しても細胞死を回避することはできなかった。また、6-AN 併用 5-ALA-PDT によるアポトーシスは確認できなかった。このことから、アポトーシスおよびフェロトーシスのいずれも否定的であり、6-AN 併用 5-ALA-PDT による細胞死のメカニズムとして、5-ALA-PDT により産生された活性酸素種 (ROS) が Fe 非依存的に細胞膜を傷害し、ネクローシスを誘導することが推定された。

本研究は、G6PD 阻害薬が 5-ALA-PDT による細胞死誘導を効果的に増強することを示した。解糖系阻害薬は分子標的薬等と比較して安価であるため、経済的で副作用の少ない光線力学療法の開発に寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森山 貴也 (Moriyama Takaya) (50625689)	三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエイト (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関