

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591395

研究課題名（和文）ポルフィリン類化合物のX線増感作用に関する基礎的研究

研究課題名（英文）A fundamental study of the porphyrins as radiosensitizing materials for X-ray

研究代表者

高橋 淳子 (TAKAHASHI JUNKO)

独立法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：80415702

研究成果の概要（和文）：放射線療法は周囲の正常部位にも障害を与えることから、癌限局的に照射の効果を与える手法の開発が必要である。細胞が5-アミノレブリン酸(5-ALA)を取り込み、プロトポルフィリン IX(PpIX)を生合成すること、また、PpIXの蓄積性は正常細胞より癌細胞で高い。PpIXに光照射すると活性酸素を発生して細胞損傷を招く性質を利用し、近年5-ALAは光線力学療法の光増感剤としての実用化が進められている。これまでに提案者らはPpIXがX線照射により活性酸素を発生することを見いだした。本課題では、インビトロおよびインビボにおけるマウスメラノーマ細胞 B16-BL6 に対する5-ALAのX線増感作用について検討した。インビトロの試験では5-ALA濃度1～50 µg/mL、1～3 GyのX線照射の24時間培養後に優位な生育の差が生じた。インビボの試験では、照射24時間前に5-ALAを50 mg/kgを局所投与し、3 Gy×10回、合計30 Gyの分割照射を行ったところ、未処理、および単独処理(5-ALA処理のみ、X線処理のみ)と比較すると、ALA-X線処理群は腫瘍細胞体積増加の優位な抑制が観察された。このことから、ALA-X-ray放射線療法の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：Radiotherapy damages normal and cancerous cells, causing treatment-related side effects. To control and limit irradiation to tumor cells while sparing normal cells, we must develop methods to enhance dosing precision. 5-Aminolevulinic acid (5-ALA) is a photosensitizer used in photodynamic therapy (PDT) because it causes preferential accumulation of protoporphyrin IX (PpIX) in tumor cells, where it forms singlet oxygen upon light irradiation and kills the tumor cells. Our previous study demonstrated that PpIX enhances generation of reactive oxygen species (ROS) by physicochemical interaction with X-rays. This study investigated the effect of ALA administration with X-ray irradiation of mouse B16-BL6 melanoma cells *in vitro* and *in vivo*. ALA administration (1 to 50 µg/mL) and X-ray irradiation (1 to 3 Gy) was effective after 24-h incubation *in vitro*. Tumor suppression significantly improved in animals treated with fractionated doses of radiation (3 Gy × 10; total, 30 Gy) with local administration of 50 mg/kg ALA at 24 h prior to fractional irradiation, without acute side effects. Our results show that use of ALA may improve the efficacy of cancer radiotherapy by acting as a radiomediator, facilitating accumulation of PpIX in tumor cells and enhancing generation of ROS. ALA-X-ray radiotherapy may enable treatment of tumors deep under the skin, in body organs, or for invasive cancers that are difficult to remove surgically.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012年度	200,000	60,000	260,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、放射線学

キーワード：放射線治療、X線、増感剤、ポルフィリン、5-アミノレブリン酸

1. 研究開始当初の背景

放射線治療をより効果的に行うため、正常組織の損傷を抑え、特異的に腫瘍の放射線感受性を高める増感剤の開発が進められている。X線エネルギー量に比例して腫瘍細胞を損傷するタイプの増感剤は、エネルギーを変えることにより治療の強度を制御できるため、低被曝の治療に有効であるが、この種の増感剤に関する研究はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

濃度(数 $\mu\text{g/ml}$)のプロトポルフィリンと数グレイのX線照射処理により、光照射とは異なる活性酸素種が発生することを見いだした。また、培養細胞のコロニー形成能評価により細胞増殖能の阻害が促進され、さらに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によりリボソーム構成タンパク質の遺伝子群の発現が特異的に抑制されることから、ポルフィリン類化合物のX線増感作用が確認された。ポルフィリン誘導体は腫瘍細胞親和性を有し光線力学的治療において既に臨床応用されている。そこで、ポルフィリン類化合物をX線増感剤とした新規の深部低被曝悪性腫瘍の治療方法確立の基礎的研究として、担癌動物を用いて増感効果を検証し、遺伝子発現解析により作用機序を解明して最適な治療方法の開発につなげる。

3. 研究の方法

深部の腫瘍の選択的な治療を可能とするX線励起による新しい物理化学療法の可能性を明らかにするため、ポルフィリン類化合物のX線増感効果の検証を行い、実用化に必要な基礎技術開発を行うために、以下の項目を実施した。

1) ポルフィリン類化合物の選択

プロトポルフィリン、ポルフィリン誘導体、ポルフィリン類縁物、ポルフィリン前駆物質、金属ポルフィリン等を候補とした。これらのX線増感作用を、活性酸素が測定可能な蛍光プローブを用いて計測した。

2) 担癌動物実験

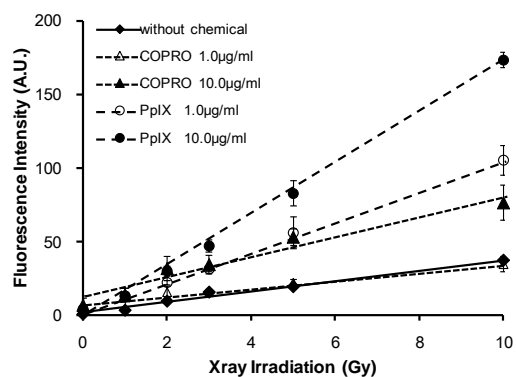
担癌マウスは57BL/6JマウスにB16黒色腫由来細胞株を皮下投与して作成した。X線照射の実験条件として、放射線照射(略称R)、増感剤投与(略称S)とすると、(R-,S-)、(R+,S-)、(R-,S+)、(R+,S+)の4群を比較する。X線照射には、厚さ10mmの鉛板に直径5~30mmの照射口を設けたコリメータを準備し、腫瘍部位以外への被曝を避ける。麻酔下で動物を

固定し、1~20Gy相当のX線を腫瘍部位に照射した。

4. 研究成果

1) ポルフィリン前駆体および合成経路の活性酸素発生能

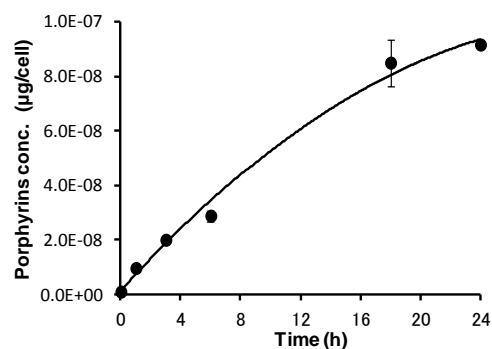
DHE (Dihydroetidium) を蛍光プローブとしてX線照射による活性酸素発生能を計測したところ、プロトポルフィリンが高い活性酸素発生能を示した。プロトポルフィリンは光毒性を有することから、その前駆体である5-アミノレブリン酸(5-ALA)を使用することとした。

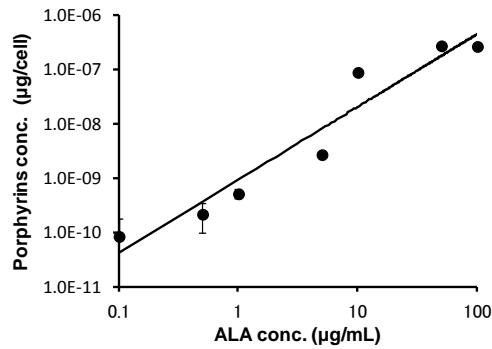


2) *in vitro*における5-ALAのB16-BL6マウスメラノーマ細胞のプロトポルフィリン合成能

*in vivo*における線照射試験を行う前に、B16-BL6マウスメラノーマ細胞の5-ALA投与濃度および時間とプロトポルフィリン合成能についての検討を行った。

*in vitro*試験では、5-ALAの濃度および投与時間に依存してプロトポルフィリンが蓄積することが確認された。

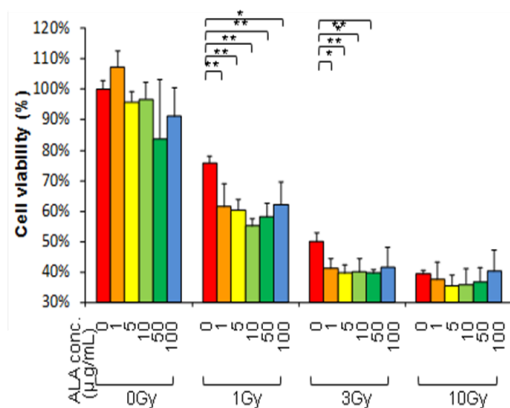




また、*in vivo*において、局所投与と全身投与を比較すると、局所投与の方が高いポルフィリンの蓄積性を示した。さらに操作の再現性を考慮し、局所投与を選択することとした。

3) 癌細胞における 5-ALA の X 線増感効果の検証

B16-BL6 マウスメラノーマ細胞に対する 5-ALA の X 線増感効果の試験を行った。マイクロプレートに播種した細胞に、5-ALA 濃度 1 ~ 50 µg/mL、1 ~ 10 Gy の X 線照射を行い、24 時間培養後の細胞活性を WST-1 により評価した。24 時間後に 5-ALA を添加した細胞では、X 線照射 1~3Gy で生育の低下が観察された。

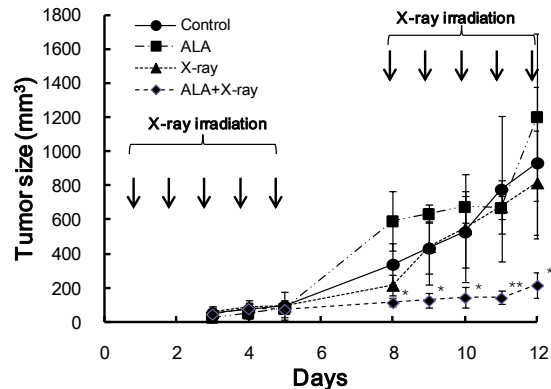


4) 担癌動物モデルにおける、5-ALA の X 線増感効果の検証

C57BL/6J マウスに B16-BL6 マウスメラノーマ細胞を接種して作成した担癌に対して、5-ALA の X 線増感効果試験を行った。5-ALA は 50mg/kg を投与し、X 線を 3Gy/day、5day/week でトータル 30Gy の分割照射を行った。

実験群は、X 線照射 (略称 R)、5-ALA 投与 (略称 S) とすると、(R-,S-)、(R-,S+)、(R+,S-)、(R+,S+) の 4 群を比較したところ、5-ALA 投与と X 線照射を行った群において腫瘍増殖抑制効果が検証された。

さらに、30Gy の分割照射終了後にマウスから摘出した腫瘍組織から得られた RNA について、マイクロアレイ解析を行ったところ、遺伝子損傷を起因とする細胞周期の停止が示唆された。



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)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Junko Takahashi, Hitoshi Iwahashi, Minimally invasive protocol for evaluating the chemical toxicity using whole blood gene expression profiles of miniature pigs. SETAC, September 27, 2012 (Kumamoto Japan)
- ② Junko Takahashi, Microarray analysis of the evaluation of chemical toxicity in miniature pigs. International Conference on Environmental OMICS, November 11, 2011 (Guangzhou China)
- ③ Masaki Misawa, Junko Takahashi, Radiosensitizing effect of Gold Nanoparticles under X-ray irradiation. 1st Annual World Congress of Nanomedicine 2010, December 5, 2010 (Beijing, China)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 淳子 (TAKAHASHI JUNKO)

独立行政法人産業技術総合研究所・計測標準研究部門・主任研究員

研究者番号：80415702

(2) 研究分担者

三澤 雅樹 (MISAWA MASAKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・ヒューマンライフテクノロジー研究部門・主任研

究員

研究者番号：60358083

岩橋 均 (IWAHASHI HITOSHI)

岐阜大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：60356540