

## 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24年6月1日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700910

研究課題名（和文）アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism of tumor specific porphyrin accumulation after administration of aminolevulinic acid

研究代表者

小倉 俊一郎（OGURA Shun-ichiro）

東京工業大学・フロンティア研究機構・特任准教授

研究者番号：90343160

研究成果の概要（和文）：

がん患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与すると、腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積されることが知られており、この現象を利用したがんの診断・治療が臨床で用いられている。しかしながら、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究では腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。その結果、ALAの取り込みにトランスポーターPEPT1、ポルフィリンの排出にはATP-binding cassette (ABC)トランスポーターABCG2が関わっていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Recently, aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (ALA-PDT) is being widely used in cancer therapy owing to the tumor-specific accumulation of photosensitizing protoporphyrin IX (PpIX) after the administration of ALA. In the present study, by focusing on genes involved in the porphyrin biosynthesis pathway, we aimed to explore biomarkers that are predictive for the efficacy of ALA-PDT. We found that high expression of the peptide transporter PEPT1 (ALA influx transporter) and low expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 (porphyrin efflux transporter) determined ALA-induced PpIX production and cellular photosensitivity in vitro. Thus, it is suggested that PEPT1 and ABCG2 are potential biomarkers to predict the selective porphyrin accumulation after ALA administration.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,100,000 | 630,000 | 2,730,000 |
| 2011年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 総計     | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード： がんの個性診断・バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

がん患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与すると、腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積されることが知られており、この現象を利用し

たがんの蛍光診断・がんの光線力学治療が臨床で用いられている。しかしながら、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個性診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。

## 3. 研究の方法

本研究では培養細胞における ALA 投与後のポルフィリン蓄積メカニズムを解明し、ポルフィリン蓄積に重要な役割を果たす分子を同定する。特に、ポルフィリン生合成に関わる酵素・取り込みや排出に関わるトランスポーターなどの分子を重点的に解析する。具体的にはこれらの分子群の mRNA・たんぱく質の発現レベルを調べ、ALA 投与後のポルフィリン群の蓄積量との相関を調べる。さらに候補分子特異的な siRNA 存在下ならびに候補分子安定発現株に対してポルフィリン蓄積量を検証し、がん特異的なポルフィリン蓄積に関わる分子を決定する。以上で得られた分子を用いてポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個性診断を行い、光線力学治療効果予測マーカーとしての検証を行う。

## 4. 研究成果

ポルフィリン蓄積能が異なる種々の細胞を解析した結果より、ALA の取り込みにペプチドトランスポーター PEPT1、ポルフィリンの排出には ATP-binding cassette (ABC) トランスポーター ABCG2 が関わっていることが示された。さらに、ポルフィリンを蓄積しやすい株は PEPT1 および ABCG2 の顕著な発現変化が認められた。そこでこれらの過剰発現株・発現抑制株を樹立し、その機能解析を行った。その結果、PEPT1 の過剰発現株ならびに ABCG2 発現抑制株ではポルフィリン蓄積能が飛躍的に向上した。以上のことから、この二つのトランスポーターの発現が腫瘍特異的なポルフィリン蓄積に大きく関わっていることが明らかとなった。

さらに、がんの蛍光診断を施した膀胱がん臨床検体において、よりポルフィリンを蓄積する検体は PEPT1 の発現が亢進し、ABCG2 の発現が抑制されていることが分かった。以上のことからこれらのトランスポーターの発現がポルフィリン蓄積に与えることが臨床検体レベルにおいても確認できた。

また、好気呼吸能が低下しているがんほどポルフィリン蓄積能が高いことが分かった。ALA は好気呼吸能を司るヘムタンパク質の前駆体であることを考え合わせると、ALA 投

与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積は好気代謝能の低下から惹起される現象であるということも示唆された。

以上の成果に加え、これらの現象を利用した新たながんの検診技術も提案した。これは腫瘍特異的に蓄積したポルフィリンを血液・尿から検出するものであり、新たながん患者の簡易スクリーニング法として期待できる。

## 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 13 件)(すべて査読あり)

1. Shun-ichiro Ogura  
Aminolevulinic acid and porphyrin biosynthesis, Aminolevulinic acid (Edited by Ichiro Okura and Tohru Tanaka), SBI ALApromo, 2011, 3-9.
2. Shun-ichiro Ogura  
Photodynamic screening of tumors using aminolevulinic acid, Aminolevulinic acid (Edited by Ichiro Okura and Tohru Tanaka), SBI ALApromo, 2011, 169-176.
3. Takao Kunii, Shun-ichiro Ogura, Masayasu Mie, Eiry Kobatake  
Selection of DNA aptamers recognizing small cell lung cancer using living cell-SELEX, *Analyst*, 2011, 136, 1310-1312.
4. Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Yorikane Fukuda, Shun-ichiro Ogura, Masanori Terashima, Ken Yamaguchi and Tohru Mochizuki  
Identification of a novel protein isoform derived from cancer-related splicing variants using combined analysis of transcriptome and proteome, *Proteomics*, 2011, 11, 2275-82.
5. Shun-ichiro Ogura, Kouji Maruyama, Yuichiro Hagiya, Yuta Sugiyama, Kyoko Tsuchiya, Kiwamu Takahashi, Fuminori Abe, Kenji Tabata, Ichiro Okura, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka  
The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome c oxidase activity in mouse liver, *BMC Research Notes*, 2011, 4, 66.
6. Masahiro Ishizuka, Yuichiro Hagiya, Yasuhiro Mizokami, Kanako Honda,

- Kenji Tabata, Toshiaki Kamachi, Kiwamu Takahashi, Fuminori Abe, Tohru Tanaka, Motowo Nakajima, Shun-ichiro Ogura and Ichiro Okura  
Porphyrins in mouse urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2011, 8, 328-331.
7. Masahiro Ishizuka, Yasunobu Ueda, Satoshi Utsugi, Shun-ichiro Ogura, Masao Kondo and Ichiro Okura  
Potential for cancer diagnosis by porphyrin determination after 5-aminolevulinic acid (ALA) administration –Establishment of a porphyrin determination method, *Porphyryns*, 2011, 19 (2-3), 11-19.
  8. Kenkichi Takahashi, Naokado Ikeda, Naosuke Nonoguchi, Yoshinaga Kajimoto, Shin-ichi Miyatake, Yuichiro Hagiya, Shun-ichiro Ogura, Hiroshi Nakagawa, Toshihisa Ishikawa and Toshihiko Kuroiwa  
Enhanced expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence, *Neuro-oncology*, 2011, 13 (11), 1234-43.
  9. Masahiro Ishizuka, Fuminori Abe, Yuki Sano, Kiwamu Takahashi, Katsushi Inoue, Motowo Nakajima, Takeo Kohda, Naoki Komatsu, Shun-ichiro Ogura and Tohru Tanaka  
New development of 5-aminolevulinic acid (ALA) in cancer diagnoses and therapy, *International Immunopharmacology*, 2011, 11, 358-365.
  10. 田中徹、石塚昌宏、小倉俊一郎、井上克司  
5-アミノレブリン酸を用いた PDD、PDT の現状と将来, *Japanese Journal of Endourology*, 2011, 24, 39-34.
  11. Shigenobu Yano, Shiho Hirohara, Makoto Obata, Yuichiro Hagiya, Shun-ichiro Ogura, Atsushi Ikeda, Hiromi Kataoka, Mamoru Tanaka and Takashi Joh  
Current states and future views in photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 2011, 12 (1), 46-67.
  12. Toshihisa Ishikawa, Kenkichi Takahashi, Naokado Ikeda, Yoshinaga Kajimoto, Yuichiro Hagiya, Shun-ichiro Ogura, Shin-ichi Miyatake  
Transporter-Mediated drug interaction strategy for 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photodynamic diagnosis of malignant brain tumor: molecular design of ABCG2 inhibitors, *Pharmaceutics*, 2011, 3 (3), 615-635.
  13. Keiichi Ohshima, Kanako Inoue, Akemi Fujiwara, Keiichi Hatakeyama, Kaori Kanto, Yuko Watanabe, Koji Muramatsu, Yorikane Fukuda, Shun-ichiro Ogura, Ken Yamaguchi, Tohru Mochizuki  
Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line., *PLoS ONE*, 2010, 5, e13247.
- [学会発表](計 27 件)
1. 杉山雄太、萩谷祐一郎、林哲也、土屋京子、石塚昌宏、大倉一郎、小倉俊一郎  
アミノレブリン酸代謝における好気呼吸能の影響, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日(日)-28 日(水), 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス
  2. Matsumoto K., Hagiya Y., Nakagawa H., Ishikawa T., Okura I., Ogura S.  
Screening of transporters involved in porphyrin accumulation after administration of 5-aminolevulinic acid in vitro, 日本化学会第 92 春季年会, 2012 年 3 月 25 日(日)-28 日(水), 慶應義塾大学日吉キャンパス・矢上キャンパス
  3. 遠藤 良夫, 小倉 俊一郎, 萩谷 祐一郎, 米村 豊, 石塚 昌宏, 井上 克司, 高橋 究, 中島 元夫  
5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法感受性と膜輸送系の関連性, 日本薬学会第 132 年会, 2011 年 12 月 9 日(金), 北海道大学札幌キャンパス
  4. 渡瀬寛也, 湯浅英哉, 小倉俊一郎, 萩谷祐一郎, 高橋究, 井上克司, 田中徹  
近赤外線を用いた光線力学治療, GlycoTOKYO2011, 2011 年 12 月 9 日(金), 理化学研究所 鈴木梅太郎記念ホール

5. Matsumoto K., Hagiya Y., Nakagawa H., Ishikawa T., Okura I., Ogura S.  
Screening of transporters involved in porphyrin accumulation after administration of 5-aminolevulinic acid in vitro, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日(火)-16日(金), パシフィコ横浜
6. 杉山雄太、萩谷祐一郎、林哲也、土屋京子、石塚昌宏、大倉一郎、小倉俊一郎  
The Effect of 5-Aminolevulinic Acid on Cytochrome c oxidase Activity, 第34回日本分子生物学会年会, 2011年12月13日(火)-16日(金), パシフィコ横浜
7. Ishikawa T., Takahashi K., Ikeda N., Kajimoto Y., Hagiya Y., Ogura S., Miyatake S., and Kuroiwa T.  
Molecular fluorescence imaging to assist neurosurgery of malignant brain tumors in humans: from bench to bedside, 日独がんワークショップ, 2011年9月18日~20日, グランドプリンスホテル広島
8. 萩谷 祐一郎、遠藤 良夫、米村豊、高橋究、石塚昌宏、安部史紀、田中徹、大倉一郎、中島元夫、石川智久、小倉俊一郎  
Pivotal Role of Peptide Transporter PEPT1 and ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 in 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photodynamic Sensitization of Cancer cells in Vitro, 平成23年度がん若手研究者ワークショップ, 2011年8月31日(水)-9月3日(土), アートランドホテル 蓼科
9. Matsumoto K., Hagiya Y., Nakagawa H., Ishikawa T., Ogura S.  
アミノレブリン酸を用いたポルフィリン蓄積に関わるトランスポーターの探索, 2011年10月3日(月)-5日(水), 名古屋国際会議場
10. Hagiya Y., Endo Y., Yonemura Y., Takahashi K., Ishizuka M., Abe F., Nakajima M., Ishikawa T., Ogura S.  
5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における PEPT1 および ABCG2 の役割, 2011年10月3日(月)-5日(水), 名古屋国際会議場
11. 遠藤良夫、小倉俊一郎、萩谷祐一郎、米村豊、石塚昌宏、井上克司、高橋究、中島元夫、木村仁  
5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学療法における感受性規定因子としての膜輸送系の関与, 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月3日(月)-5日(水), 名古屋国際会議場
12. 杉山雄太、萩谷祐一郎、林哲也、土屋京子、石塚昌宏、大倉一郎、小倉俊一郎  
アミノレブリン酸のマウスシトクロム c オキシダーゼ活性に及ぼす影響, 第84回日本生化学会大会, 2011年9月21日(水)-24日(土), 国立京都国際会館
13. 杉山雄太、萩谷祐一郎、林哲也、土屋京子、石塚昌宏、大倉一郎、小倉俊一郎  
アミノレブリン酸のマウスシトクロム c オキシダーゼ活性に及ぼす影響, 第1回ポルフィリン-ALA学会, 2011年5月7日(土), 東京工業大学大岡山キャンパス
14. 松本健太郎、萩谷祐一郎、中川大、大倉一郎、小倉俊一郎  
アミノレブリン酸を用いたポルフィリン蓄積に関わるトランスポーターの探索, 第1回ポルフィリン-ALA学会, 2011年5月7日(土), 東京工業大学大岡山キャンパス
15. 高橋賢吉、池田直廉、野々口直助、梶本宣永、宮武伸一、萩谷祐一郎、小倉俊一郎、中川大、石川智久、黒岩敏彦  
アミノレブリン酸(5-ALA)による悪性脳腫瘍の蛍光強度とその調節因子について, 第1回ポルフィリン-ALA学会, 2011年5月7日(土), 東京工業大学大岡山キャンパス
16. 湯浅英哉、渡瀬寛也、小倉俊一郎、萩谷祐一郎、高橋究、井上克司、田中徹  
ALA とランタニドナノ粒子を併用した近赤外線力学治療法の開発, 第1回ポルフィリン-ALA学会, 2011年5月7日(土), 東京工業大学大岡山キャンパス
17. Endo Y., Ogura S., Hagiya Y., Yonemura Y., Ishizuka M., Tanaka T., Inoue K., Takahashi K., Nakajima M.  
Role of membrane transporters in determining ALA-PDT sensitivity in human cancer cells, 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム, 2011年5月25日(水)-26日(木), 石川県立音楽堂
18. Y. Hagiya, Y. Endo, K. Inoue, K. Takahashi, S. Ogura, I. Okura  
Tumor specific porphyrin accumulation after administration of 5-Aminolevulinic acid, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM

- 2010), Hawaii convention center, Hawaii, 2010年12月15日(水)~20日(月)
19. S. Ogura, K. Tabata, T. Kamachi, I. Okura  
Analysis of porphyrins in mouse plasma/urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Hawaii convention center, Hawaii, 2010年12月15日(水)~20日(月)
  20. Y. Endo, S. Ogura, Y. Hagiya, I. Okura, Y. Yonemura, M. Ishizuka, T. Tanaka, K. Inoue, K. Takahashi, M. Nakajima  
Role of membrane transporters in determining ALA-PDT sensitivity in human cancer cells, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2010年9月22日(水)~24日(金)
  21. 萩谷 祐一郎、遠藤 良夫、小倉 俊一郎、大倉 一郎  
Tumor specific porphyrin accumulation after administration of 5-Aminolevulinic acid, 第69回日本癌学会学術総会, 大阪国際会議場, 2010年9月22日(水)~24日(金)
  22. 萩谷 祐一郎、遠藤 良夫、小倉 俊一郎、大倉 一郎  
Tumor specific porphyrin accumulation after administration of 5-Aminolevulinic acid, 平成22年度がん若手研究者ワークショップ, アートランドホテル蓼科, 2010年9月1日(水)~4日(土)
  23. 萩谷 祐一郎、遠藤 良夫、小倉 俊一郎、大倉 一郎  
アミノレブリン酸投与における腫瘍特異的ポルフィリン蓄積機構の解明, 第5回トランスポーター研究会年会, 東京医科大学病院, 2010年7月10日(土)~11日(日)
  24. 萩谷 祐一郎、遠藤 良夫、小倉 俊一郎、大倉 一郎  
アミノレブリン酸投与における腫瘍特異的ポルフィリン蓄積機構の解明, 第37回ポルフィリン研究会学術集会, 東京工業大学, すずかけ台キャンパス, 2010年4月17日(土)
  25. S. Ogura, K. Tabata, T. Kamachi, I. Okura

Analysis of porphyrins in mouse plasma/urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, The 17th International SPACC Symposium, 鹿児島大学, 2010年10月13日(水)~16日(土)

26. S. Ogura, K. Tabata, T. Kamachi, I. Okura  
Analysis of porphyrins in mouse plasma/urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, 2010 International Symposium on Advanced Biological Engineering, 精華大学、北京、中国, 2010年7月23日(金)~24日(土)
27. Shun-ichiro Ogura  
Analysis of porphyrins in mouse plasma/urine after administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, HIT International Symposium 2010, Hanyang University, Ansan, Korea, 2010年4月23日(金)~24日(土)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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3件)

名称：赤外域光による光線力学的治療又は診断剤  
発明者：湯浅英哉・小倉俊一郎・高橋究・井上克司・田中徹  
権利者：SBI アラプロモ株式会社・国立大学法人東京工業大学  
番号：特願 2011-103816  
取得年月日：2011年5月6日  
国内外の別：国内

名称：光線力学的診断剤、及び、フォトブリーチング防止剤  
発明者：石塚昌宏・田中徹・小倉俊一郎・石井琢也  
権利者：SBI アラプロモ株式会社・国立大学法人東京工業大学  
番号：特願 2012-014135  
取得年月日：2012年1月26日  
国内外の別：国内

名称：アミノ糖連結抗がん性貴金属錯体  
発明者：矢野重信・柴原隆志・小倉俊一郎  
権利者：国立大学法人奈良先端科学技術大学  
院大学

番号：特願 2012-016735  
取得年月日：2012年 1月 30日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
新聞報道

「がん」尿・血 光らせ確認  
日刊工業新聞  
2011年 2月 16日  
日刊工業新聞社

老化防止作用 アミノ酸 ALA  
日刊工業新聞  
2011年 6月 28日

蛍光で光らない原因解明  
日刊工業新聞  
2011年 10月 5日

がん、ALA で早期発見  
化学工業日報  
2012年 1月 11日

ホームページ

<http://www.ogura.bio.titech.ac.jp/>  
[http://www.fcrc.titech.ac.jp/docs/ogura\\_tabata.pdf](http://www.fcrc.titech.ac.jp/docs/ogura_tabata.pdf)

6．研究組織

(1)研究代表者

小倉 俊一郎 (OGURA Shun-ichiro)  
東京工業大学・フロンティア研究機構・特  
任准教授

研究者番号：90343160