

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 20 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22791362
研究課題名（和文）	がん幹細胞をターゲットにした光線力学療法および化学療法の開発
研究課題名（英文）	A new treatment strategy for targeting the cancer stem cells in photodynamic therapy
研究代表者	
井上 洋人（Inoue Hiroto）	
大阪医科大学・医学部・非常勤医師	
研究者番号：	00570532

研究成果の概要（和文）：

薬剤排出トランスポーターである ABCG2 は、がん幹細胞に普遍的に発現しており、化学療法の治療抵抗性に関与している。一方、光感受性物質であるポルフィリンも ABCG2 の基質であることから、光線力学療法においても ABCG2 は重要なターゲットとなりうる。

本研究では、ABCG2 を臨床的に使用可能な阻害剤（gefitinib）の投与により、5 アミノレブリン酸を用いた光線力学療法の増強効果があるのかを各種脳腫瘍細胞株を用いて検証した。その結果、gefitinib 投与によりポルフィリンの細胞外への排出が減少するに従い、細胞内ポルフィリンが増加し、光線力学療法の効果も増強することを証明した。

研究成果の概要（英文）：

As ABCG2 transporter, a main cause of chemo-resistance in cancer stem cells, also transports porphyrin to extracellular space, ABCG2 may be an effective target for photodynamic therapy. In this study, we proofed that gefitinib, a clinical available ABCG2 inhibitor, reduced extra-cellular transportation of porphyrin and increase intra-cellular concentration of porphyrin, consequently, enhanced the treatment efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳腫瘍学

キーワード：がん幹細胞、ABCG2、ポルフィリン、光線力学療法、5 アミノレブリン酸

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療抵抗性の原因として癌幹

細胞が挙げられる。癌幹細胞では、薬剤排出トランスポーターの ABCG2 を高発現しており、これが化学療法に対する治療抵抗性の一

因である。また、光線力学療法においても、光感受性物質であるポルフィリンの細胞外排出に ABCG2 が関与している。従って、ABCG2 を制御することで、光線力学療法の治療効果を向上させる可能性が高い。

2. 研究の目的

ABCG2 の阻害剤 (Gefitinib) により、腫瘍細胞の ABCG2 発現を制御し、腫瘍細胞内のポルフィリン濃度を高め、光線力学療法の治療効果が向上するのかを検証することである。

3. 研究の方法

(1) グリオーマ細胞株および髄膜腫細胞株におけるポルフィリンの細胞外輸送の証明。

①ポルフィリン産生の経時的かつ定量的評価 U87MG および U87Δ を 5-ALA (0.1mM) 下で培養し、培養プレート上で経時的に産生されたポルフィリン量を培養プレート上で蛍光光度計 Fluoroskan Ascent 2.5 を用いて定量した。

②ポルフィリン排出能の定量的評価 培養 6 および 12 時間後に、細胞外液と細胞成分を分けて測定することでポルフィリンの排出を評価した。

(2) Gefitinib によるポルフィリン排出の抑制効果の評価。

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を 5-ALA (0.1mM) 下で 24 時間培養し、gefitinib 0.01~100 μ M 投与時の細胞内および細胞外のポルフィリン量を蛍光光度計 Fluoroskan Ascent 2.5 を用いて定量した。

(3) Gefitinib による ABCG2 発現抑制効果 (mRNA, 蛋白) の評価。

① 細胞膜上 ABCG2 量の測定 (FACS) :

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を gefitinib 0.1 μ M の環境下で 48 時間培養し、抗 ABCG2 モノクローナル抗体 (間接法) で染色し、FACS を用いて細胞膜上の ABCG2 量を測定した。

② ABCG2 の mRNA の測定 (qRT-PCR) :

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を gefitinib 1 μ M の環境下で 48 時間培養した後に、mRNA を抽出し、cDNA に変換、Real time PCR を用いて定量した。スタンダード細胞と

して HepG2 を用い、RNA 量は、GAPDH との相対値とした。

(4) Gefitinib による 5-ALA 光線力学治療の増強効果の検証。

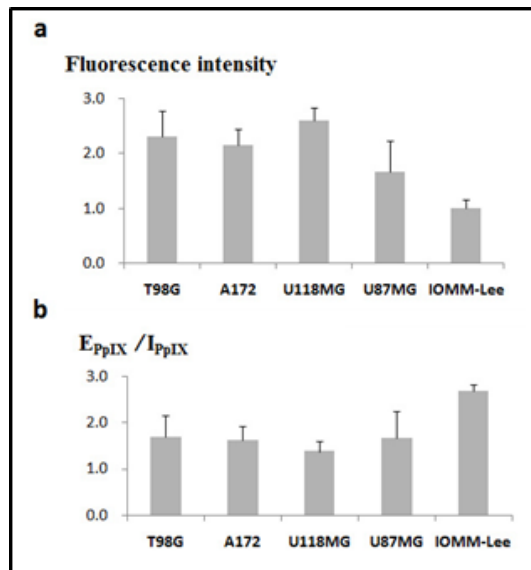
Colony forming assay による殺細胞効果 グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を 5-ALA (1mM) の環境下で 48 時間培養し、同時に Gefitinib を (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) 投与した。その後、半導体 Laser (405 nm、10mW/cm²) を 0、1、3、5、10 分間照射 (0~6 J/cm²) し、Corony forming Assay 法を用いて殺細胞効果を定量化した。

4. 研究成果

(1) グリオーマ細胞株および髄膜腫細胞株におけるポルフィリンの細胞外輸送の証明。

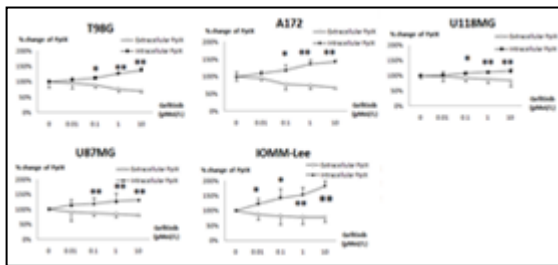
すべての細胞株において、細胞内において PpIX の産生を認めた (下図 a)。

また、細胞内のポルフィリンの細胞外輸送が活発な (Eppix/Ippix の高い) 細胞株ほど (下図 b) 細胞内のポルフィリン濃度は低い傾向にあった。



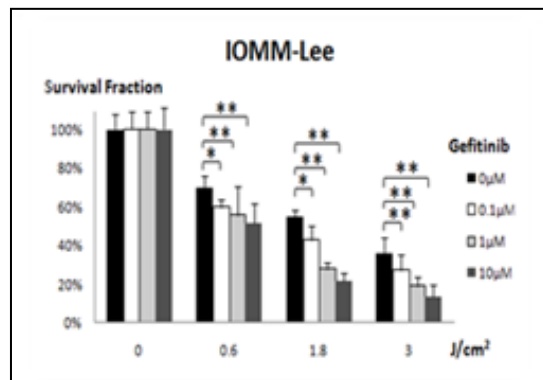
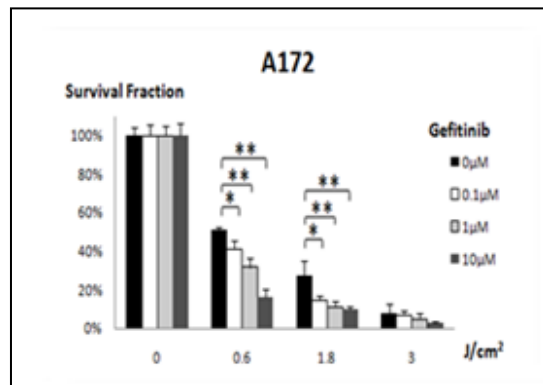
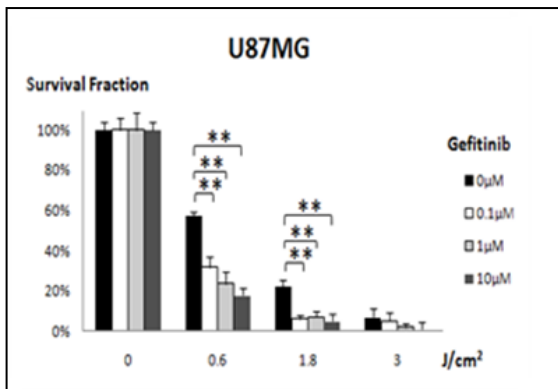
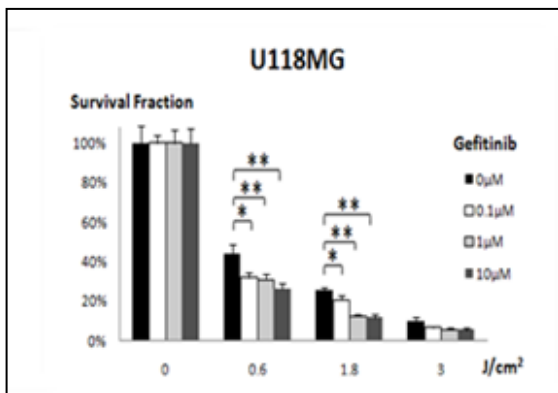
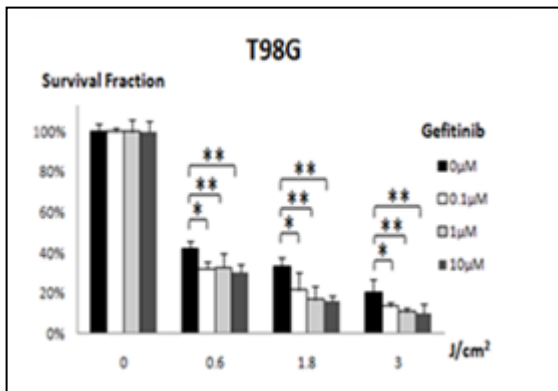
(2) Gefitinib によるポルフィリン排出の抑制効果

また、すべての細胞株において Gefitinib は、10 μ M に至るまで用量依存的に細胞内 PpIX 濃度を増加させ、細胞外 PpIX 濃度を低下させた。



(3) Gefitinib による 5-ALA 光線力学治療の増強効果

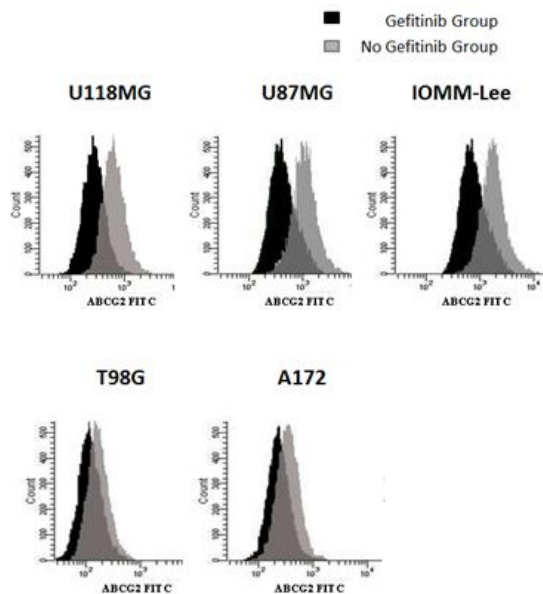
ポルフィリンの細胞内蓄積の結果として、Gefitinib が 5-ALA の PDT 作用を用量依存的に増強した。



(4) Gefitinib による ABCG2 発現抑制効果

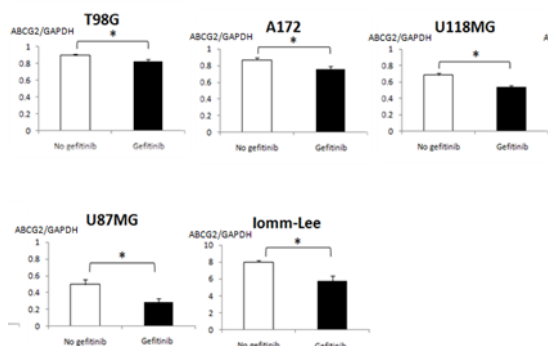
① 細胞膜上 ABCG2 量の測定 (FACS) :

すべての細胞株において、gefitinib 投与により細胞膜表面の ABCG2 蛋白の発現が低下した。



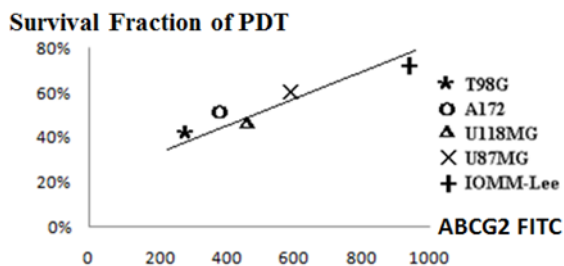
② ABCG2 の mRNA の測定 (qRT-PCR)

Gefitinib の ABCG2 阻害作用の一部は、mRNA レベルでの発現を阻害であることが判明した。



(5) ABCG2 発現と PDT 効果の関係

細胞膜上での ABCG2 の発現が高いほど、光線力学効果は減弱していた。



(6) 研究成果のまとめ

すべての細胞株において Gefitinib は、10 μ M に至るまで用量依存的に細胞内 PpIX 濃度を増加させ、細胞外 PpIX 濃度を低下させた。その結果として、Gefitinib が 5-ALA の PDT 作用を用量依存的に増強した。Gefitinib の ABCG2 に及ぼす影響としては、ABCG2 の mRNA の発現が有意に抑え、細胞膜上の ABCG2 蛋白レベルを低下させていることが判明した。Gefitinib は、PpIX の細胞外排出を抑制し、5-ALA PDT の効果を高めることを示した。Gefitinib は、ABCG2 の mRNA および蛋白レベルでの発現を阻害することがその機序として考えられる。

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 Wei Sun, Yoshinaga Kajimoto, Hiroto Inoue, Shin-Ichi Miyatake, Toshihisa Ishikawa, Toshihiko Kuroiwa. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells. Photodiagnosis and photodynamic therapy 2012 in print.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 洋人 (Inoue Hiroto)

大阪医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：00570532