

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501305

研究課題名(和文)細胞膜輸送系の機能修飾に基づく光線力学的治療の効果増強法の基礎開発

研究課題名(英文)Development of novel lead compounds with enhancing effect on ALA-based photodynamic therapy

研究代表者

遠藤 良夫 (ENDO, YOSHIO)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号：30211783

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的治療(PDT)は低侵襲性のがん治療法の一つである。5-アミノレブリン酸(5-ALA)は腫瘍細胞内で光感受性物質であるプロトポルフィリンIX(PpIX)に代謝、活性化される新世代の光増感物質として注目されている。本研究では、5-ALAおよびPpIXの細胞膜輸送系に作用するPDT効果増強剤の開発を目指し、ヒトがん細胞を用いた感受性試験法により低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを実施した。その結果、5-ALAと同時処理することにより細胞内PpIXが増加し、PDT効果を相乗的に増強する化合物、TX-816を見出した。今後、TX-816をリード化合物とする誘導体展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Protoporphyrin IX (PpIX)-dependent photodynamic diagnosis (PDD) and therapy (PDT) using 5-aminolevulinic acid (ALA-PDD and ALA-PDT) are widely recognized novel therapeutic strategies for the treatment of various cancers. Previously, we demonstrated that the balance between the influx of ALA through the transporter PEPT1 and the efflux of intracellular PpIX through the ABC transporter ABCG2 determines the sensitivity of cancer cells to ALA-PDT. Recently, we found that the Schiff base derivative TX-816 could significantly increase the effect of ALA-PDT. The ability of TX-816 to enhance the efficacy of ALA-PDT was markedly stronger than that of dipyridamole, which inhibits ABCG2 and equilibrative nucleoside transporters. Furthermore, TX-816 could recover the sensitivity to ALA-PDT in cancer cells with acquired resistance. These results indicate TX-816 is a potent lead compound to develop an ALA-PDT sensitizer.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：光線力学的療法 PDT 5-アミノレブリン酸 5-ALA トランスポーター 効果増強剤

## 1. 研究開始当初の背景

光感受性物質とレーザー光線を用いる光線力学的治療 (photodynamic therapy, PDT) は低侵襲性のがん治療法であり、現在ポルフィマーナトリウムとタラポルフィンナトリウムが、早期肺がん、表在型かつ早期の胃がん、食道がん等の一部で治療目的の使用が認められている。5-アミノレブリン酸 (以下5-ALA) は、従来のポルフィリン関連化合物とは異なり、腫瘍細胞内でヘム生合成経路の酵素による修飾を受けてプロトポルフィリン IX (PpIX) に代謝され、光感受性物質として初めて活性化される。5-ALA は腫瘍内で活性化されることから、腫瘍特異性が高く、副作用も少ない新世代の光増感物質 (前駆体) として注目されている。5-ALA の投与によりがん細胞内で PpIX が蓄積した後に、630 nm 付近の赤色励起光を照射すると大量の一重項酸素が生じ、殺細胞効果が発揮され、がん細胞は死滅する (ALA-PDT)。一方、PpIX は 405-410 nm 付近の青色光を照射すると赤色の蛍光を発するため、がん組織が赤く光り可視化され、術中診断が可能となる (ALA-PDD)。今日では本邦においても5-ALA は脳腫瘍の蛍光診断に使用されるようになった。

ALA-PDT においては PpIX の細胞内蓄積量が治療の成否の鍵を握ると考えられるが、ALA-PDT に対する感受性規定因子の詳細は明らかではなかった。最近、我々は ALA-PDT に対するがん細胞の感受性は5-ALAの細胞内取り込みに重要なオリゴペプチドトランスポーター (PEPT1/SLC15A1) と PpIX の排出に関与する ATP-結合カセットトランスポーター (ABCG2) の発現バランスにより決定されることを見出した。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、5-ALA および PpIX の膜輸送トランスポーターの機能修飾作用を有し、ALA-PDT の効果増強に有用なリード化合物を創出し、がんの光線力学的治療および診断の発展に寄与することを目的とした。5-ALA のがん細胞における集積性と PpIX 産生の促進を図り、微弱な励起エネルギーでも細胞内で十分な活性酸素を産生する条件を整えることができれば、これまで適応がなかった腹膜播種や中皮腫、がん性腹膜炎や胸膜炎などにも ALA-PDT の応用範囲が広がることが期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、PEPT1 や ABCG2 等の膜輸送系トランスポーターの発現様式が異なるヒトがん細胞を用いて、既存の細胞膜輸送系の阻害剤、細胞内シグナル伝達の作動剤や阻害剤について *in vitro* ALA-PDT における感受性増強作用を評価した。さらに連携研究者より供与された低分子化合物ライブラリーを用いて新規感受性増強剤の1次スクリーニングを実施した。ALA-PDT に対する感受性増強作用を示した候補化合物についてはヒト胃がん細胞 MKN-45 より樹立した獲得耐性細胞を用い、ALA-PDT に対する耐性の克服作用についても検討した。

ヒトがん細胞としては、主に以下の細胞を使用した: 胃がん細胞 MKN-45 (PEPT1 高発現、ABCG2 低発現)、KKLS (PEPT1 低発現、ABCG2 低発現)、NUGC-4 および Nakajima (PEPT1 中程度発現、ABCG2 中程度発現) および線維肉腫 HT-1080 細胞 (PEPT1 低発現、ABCG2 高発現)、PEPT1-EGFP 融合タンパク発現ベクターを導入した KKLS および HT-1080 の安定株。尚、*in vitro* 感受性試験法では5-ALA を添加4-5時間後に96ウェル治療用LED光照射システム (図1) を用いて630 nm の治療光を照射し、その48または72時間後にWST-8を用いたMTT法により生細胞数の定量を行った。また、候補化合物の細胞内 PpIX 蓄積に与える影響については、SEC2000-UV/VIS 蛍光解析システムを用いて解析した。

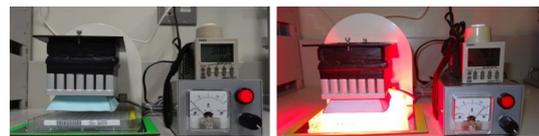


図1 . 96 ウェル治療用 LED 光照射システム

## 4. 研究成果

本研究ではまずヒトがん細胞を用いた ALA-PDT 感受性試験法により、PpIX の排出に関与する ABCG2 に対する特異的阻害剤 fumitremorgin C や抗血小板・抗凝固作用ならびに血管拡張作用を有する非特異的 ABCG2 阻害剤ジピリダモールの感受性増強作用を検討した。その結果、5-ALA の細胞内取り込みに重要なオリゴペプチドトランスポーターである PEPT1 を発現しながらも ABCG-2 を発現しているがん細胞 (PEPT1-EGFP 強制発現 HT-1080、NUGC-4 および Nakajima 等) においてはこれらの阻害剤が ALA-PDT 感受性を効果的に増強することが明らかになり、PEPT1 と ABCG2 の双方が重要な ALA-PDT 感受性規定因子であることを実験的に確認できた。一方、ジピリダモールと同様に血管拡張性ヌクレオシドトランスポーター阻害剤であるジラゼブには、5-ALA-PDT 効果増強作用は認められなかった。

PEPT1のプロモーター領域にはcAMP-responsive elementが存在し、レプチンや酪酸はcAMPの活性上昇を介してPEPT1の遺伝子発現を亢進することが報告されている。そこで、アデニル酸シクラーゼを活性化しcAMP産生を高める作用を有するプロスタグランジンやcAMPアナログである8-Br-cAMPのALA-PDT増強効果についても検討した。しかしながら、プロスタグランジンE<sub>2</sub>や8-Br-cAMP、さらに酪酸の単独処理では、ALA-PDTに対する効果増強は認められなかった。ジピリダモールはアデノシンの再取り込みの抑制およびアデノシン受容体A<sub>2</sub>の活性化、アデニル酸シクラーゼの活性化やホスホジエステラーゼの阻害等を介して細胞内cAMP濃度を上昇させ、PKAを賦活化する。cAMP-PKA系を介した血管拡張とPEPT1の発現誘導における共通メカニズムが存在し、ALA-PDTに影響を与えている可能性も示唆されたが、ジピリダモールのALA-PDT増強作用はABCG2阻害活性に基づくことが確認できた。

MMKN-45より樹立した獲得耐性株は2 mM以上の5-ALAを用いたPDTにも耐性を示す。これらの耐性株にはPEPT1の発現が著減し、ABCG2の発現が増加することにより耐性を示す株とPEPT1やABCG2の発現には変化が見られない株がある。カチオン性アミノ酸トランスポーターの一つであるSLC7A7と鉄イオン排出トランスポーターSLC40A1はこれらの耐性細胞株で共通に発現が低下している遺伝子群の中から見出され、5-ALAの取り込みの減少やプロトヘムの産生促進に関与する可能性が考えられた。SLC7A7とSLC40A1のcDNA発現ベクターを新たに作製し、KKLSに導入してALA-PDT感受性への影響を検討したところ、ALA-PDT感受性にはこれらの遺伝子は直接的に関与しないことが明らかになった。MMKN-45の獲得耐性株ではPEPT1とABCG2を含む複数のアミノ酸トランスポーターやABCトランスポーターの発現が変化している他、ヘムの分解酵素であるheme oxygenase 1やbilirubinの細胞外排出に関わるトランスポーターの発現も亢進しており、今後ヘム分解系の活性化と耐性獲得の関連性についても詳細に検討する必要がある。

本研究では、連携研究者（徳島大学、宇都義浩准教授）より供与を受けた低分子化合物ライブラリーを用いてALA-PDTに対する感受性増強剤のスクリーニングを実施した。その結果、5-ALAと同時に処理をすることでPDT効果を相乗的に増強することができるシッフ塩基

化合物TX-816(N-3',5'-ジクロロ-2'-ヒドロキシベンジリデン-2-クロロ-4-ニトロアニリン)を見出すことができた(図2)。TX-816はジクロロフェノールとクロロニトロベンゼンがシッフ塩基として結合した化合物で、ALAと同時に処理することにより相乗的なPDT効果増強作用を示した。TX-816はDMSO中で長時間保存すると、3,5-ジクロロサリチルアルデヒド(DCSA)と2-クロロ-4-ニトロアニリン(CNA)に分解する。これら2化合物についてALA-PDT効果増強活性を評価した結果、TX-816による効果増強作用の活性本体はDCSAであることが判明した。DCSAで処理したがん細胞では細胞内PpIXが著しく増加することも明らかになった。興味深いことに、TX-816およびDCSAはMKN-45の獲得耐性株のALA-PDT感受性を一部回復できることも明らかになった。一方、ジピリダモールではこの獲得耐性は解除されなかった。TX-816およびDCSAの作用機序や、PEPT1やABCG2の発現に変化が見られないMKN-45の耐性化機構は未だ明らかではない。今後、耐性化機構と効果増強の作用機序を詳細に比較検討することにより、ALA-PDTの効果増強に有用な分子標的が同定されることが期待される。

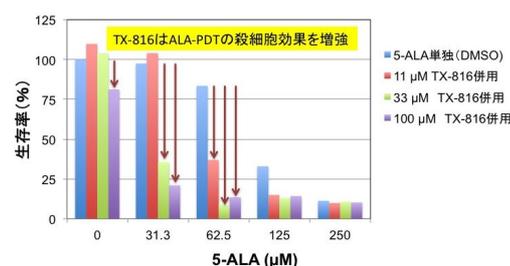


図2. TX-816によるALA-PDT感受性の亢進

## 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4件)

1. Canbay E, Ishibashi H, Sako S, Kitai T, Nishino E, Hirano M, Mizumoto A, Endo Y, Ogura S, Yonemura Y: Photodynamic detection and management of intraperitoneal spreading of primary peritoneal papillary serous carcinoma in a man: report of a case. Surg Today. 2014 Feb;44(2):373-7. 査読有, DOI: 10.1007/s00595-013-0500-1.
2. Hagiya Y, Fukuhara H, Matsumoto K, Endo Y, Nakajima M, Tanaka T, Okura I, Kurabayashi A, Furihata M, Inoue K,

- Shuin T, Ogura S: Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2013 査読有, Sep;10(3):288-295. Doi: 10.1016/j.pdpdt.2013.02.001.
3. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Okura I, Ogura S: Tumor Suppressor Protein p53-dependent Cell Death Induced by 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Cancer cells in Vitro. ALA-Porphyrin Science, 査読有, 2012 1(1):23-31. [http://porphyrin-ala.com/wp-content/uploads/21\\_31.pdf](http://porphyrin-ala.com/wp-content/uploads/21_31.pdf)
  4. Hagiya Y, Endo Y, Yonemura Y, Takahashi K, Ishizuka M, Abe F, Tanaka T, Okura I, Nakajima M, Ishikawa T, Ogura S: Pivotal roles of peptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 in 5-aminolevulinic acid (ALA)-based photocytotoxicity of gastric cancer cells in vitro. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2012 査読有, Sep;9(3):204-214. doi:10.1016/j.pdpdt.2011.12.004.
- [学会発表](計13件)
1. 遠藤良夫, 小倉俊一郎, 米村 豊: ABCG2 阻害剤による 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強 日本薬学会第134年会 2014年3月30日(3月27日-30日)(熊本県、熊本市総合体育館)
  2. 玉谷 大, 宇都義浩, 水木佑輔, 國安翔太, 野口智帆, 遠藤良夫, 中西郁夫, 大久保敬, 石塚昌宏, 田中 徹, 口池大輔, 久保健太郎, 乾 利夫, 堀 均: 腫瘍移植 鶏卵モデルを用いた 5-aminolevulinic acid および Tin chlorin e6 の超音波増感活性の評価 日本薬学会第134年会 2014年3月29日(3月27日-30日)(熊本県、熊本市総合体育館)
  3. 宇都義浩, 玉谷 大, 河井智仁, 遠藤良夫, 大久保敬, 中西郁夫, 石塚昌宏, 田中 徹, 口池大輔, 久保健太郎, 乾 利夫, 堀 均: 発育鶏卵を用いた 5-aminolevulinic acid および Tin Chlorin e6 の超音波増感活性と薬物動態の評価 第17回バイオ治療法研究会 2013年12月7日(土)(福岡県、福岡大学病院 福大メディカルホール)
  4. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Kimura Masashi: Enhanced effect of ALA-PDT using dipyrindamole 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月5日(土)(10月3日-5日)(神奈川県、パシフィコ横浜)
  5. Yoshihiro Uto, Yoshio Endo, Hiroshi Sato, Hitoshi Hori: Development of antimetastatic hypoxic cytotoxin TX-2137 targeting for Akt/protein kinase B 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月5日(土)(10月3日-5日)(神奈川県、パシフィコ横浜)
  6. 宇都義浩, 玉谷 大, 遠藤良夫, 石塚昌宏, 田中 徹, 堀 均: 発育鶏卵を用いた 5-ALA の超音波増感活性の評価 第3回ポルフィリン-ALA 学会年会 2013年4月27日(神奈川県、東京工業大学 すすかけ台キャンパス すすかけホール)
  7. 遠藤良夫, 小倉俊一郎, 米村 豊: 5-ALA を用いるがんの光線力学的療法における耐性化機序の解析 日本薬学会第133年会 2013年3月30日(3月27日-30日)(神奈川県、パシフィコ横浜)
  8. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Katsushi Inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Masashi Kimura: Molecular mechanism underlying ALA-PDT resistance in human cancer cells 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日(9月19日-21日)(北海道、ロイトン札幌、札幌市教育文化会館)
  9. Yutaka Yonemura, Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Akiyoshi Mizumoto, Haruki Ishibashi, Candy Emel: Visualization and detection small PC by 5-aminolevulinic acid (5-ALA) 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日(9月19日-21日)(北海道、ロイトン札幌、札幌市教育文化会館)
  10. 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 2012年3月30日(3月28日-31日)(北海道、北海道大学)
  11. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Masashi Kimura: Significance of membrane transporters in determining the ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日(10月3日-5日)(愛知県、国際会議場)
  12. Yuichiro Hagiya, Yoshio Endo, Yutaka Yonemura, Kiwamu Takahashi, Masahiro

Ishizuka, Fuminori Abe, Motowo Nakajima, Toshihisa Ishikawa, Shun-ichiro Ogura:Pivotal Role of PEPT1 and ABCG2 on 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Gastric Cancer Cells *in Vitro*. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日(10月3日-5日)(愛知県、国際会議場)

13. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima: 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(石川県、金沢、石川県立音楽堂)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称:PDT効果増強剤 WO/2013/187069

発明者:遠藤良夫、宇都義浩、堀均、田中徹、石塚昌宏、高橋究

権利者:国立大学法人金沢大学、国立大学法人徳島大学、SBIファーマ株式会社(共同出願)

種類:国際出願 A61K 31/197

番号:PCT/JP2013/003728

出願年月日:2013年6月13日

国内外の別:PCT:WO

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

遠藤良夫(ENDO YOSHIO)

金沢大学・がん進展制御研究所・准教授

研究者番号:30211783

### (2)連携研究者

宇都義浩(UTO YOSHIHIRO)

徳島大学・工学部・准教授

研究者番号:20304553