

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592335

研究課題名(和文)新規発癌関連遺伝子の探索を目指した光力学診断偽陽性尿路上皮の網羅的遺伝子解析

研究課題名(英文)Comprehensive gene analysis of false positive urothelium in photodynamic diagnosis to explore the novel carcinogenesis-related gene

研究代表者

井上 啓史(Inoue, Keiji)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：00294827

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌に対するアミノレブリン酸を用いた光力学診断を行い、その生検検体を用いて、ポルフィリン代謝に関わる遺伝子発現解析を網羅的に行った。

その結果、蛍光陽性癌部および蛍光陰性非癌部からmRNA levelを測定し、peptide transporter PEPT1高発現およびhuman ATP-binding cassette trans-porter ABCG2低発現が腫瘍特異的なPpIX過剰集積に寄与する責任遺伝子であることを検証した。さらに、これらPpに関わるトランスポーターの癌特異的な活性異常により、Pp前駆ポルフィリン物質が尿中に過剰排泄されることも質量分析を用いて検証した。

研究成果の概要(英文)：Comprehensive gene analysis of false positives in aminolevulinic acid-induced photodynamic diagnosis were performed using biopsy specimen of urinary bladder cancer in this study. As a result of measuring the level of mRNA obtained from positive fluorescent cancerous lesion and negative fluorescent non-cancerous lesion, high expression of peptide transporter PEPT1 and low expression of human ATP-binding cassette trans-porter ABCG2 were demonstrated the responsible genes for cancer-specific overaccumulation. Moreover, as a result of mass analysis by high performance liquid chromatography, the precursors of PpIX, uroporphyrin and coproporphyrin, were overexcreted to urine by the cancer-specific abnormal activity of these PpIX-related transporters.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：膀胱癌 光力学診断 アミノレブリン酸 偽陽性病変 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

近年、膀胱癌は緩徐な増加傾向を示し、癌浸潤が粘膜下層までに止まる筋層非浸潤性膀胱癌が約70%を占める。その標準治療は経尿道的膀胱腫瘍切除術で、膀胱温存が可能で、生命予後も90%以上と良好だが、術後膀胱内再発が高率である。この膀胱内再発は手術時に内視鏡で視認し難い平坦病変の残存が大きく関与し、特に上皮内癌は高悪性度で、膀胱内再発の重大な原因かつ予後不良因子である。そこで視認困難な癌を赤色に蛍光発光させ内視鏡診断する「アミノレブリン酸 (ALA)・蛍光膀胱鏡を用いた光力学的診断(PDD)」を本邦初として臨床導入し(平成16年2月本学倫理委員会承認)、薬事承認に向けた取り組みを実施中である。

動植物に内在する天然アミノ酸であるALAは体内投与後に、細胞内に取込まれ、ミトコンドリア内で光活性物質であるプロトポルフィリン (Pp) に合成され、その後、ヘムやビリルビンに代謝される。ヘムはシトクロムとして電子伝達系の中心的役割を担う。

一方、癌細胞では、Pp が過剰集積するため(尿路上皮は約17倍)、ヘムへの代謝やシトクロムの生成は低下し、電子伝達系が機能低下している。この現象は「癌細胞は解糖系が亢進している」としたワールブルグ効果で裏打ちされる。また、癌細胞に過剰集積するPpは光活性を有するため青色光(375-445nm)で励起すると、赤色蛍光(600-740nm)を発光する(図1)。

つまり、この蛍光ナビゲーションによる癌診断法がALA-PDDであり、癌細胞のもつ基本的な生物学的特徴に立脚する技術である。

これまで、筋層非浸潤性膀胱癌に対するALA-PDDは従来の白色光源での内視鏡診断と比較して感度が約20%も向上し、特に、平坦癌の検出においては優れた成績を収めた。しかし、ALA-PDDは偽陽性病変(赤色蛍光を発光する非癌組織)(図2)が全検体の約40%と多数存在し重要課題である。また、ALA-PDD観察下で蛍光発光する全ての病変を内視鏡で切除するPDD補助下経尿道的膀胱腫瘍切除術は、従来の切除術と比較して、術後5年での無再発生存率を約30%も改善した。この膀胱内再発の著減は、当然、内視鏡では視認困難な癌を切除したことに起因すると考えるが、ALA-PDDでのみ検出できた病変は全検体の15~35%であり、全症例の約10%と少数例でのみ有用にすぎず、実際のALA-PDDの検出能と良好な臨床成績には乖離がある。

2. 研究の目的

そこで我々は、この良好な臨床成績を得た背景として、多数の偽陽性病変の存在に着目した。つまり偽陽性病変(蛍光を発光する非癌組織)とは病理学診断での形態的観点による結果であり、これまで偽陽性と捉えていた非癌組織は、実際は潜在的遺伝子異常を有する“遺伝子レベルでの前癌病変”で、これら

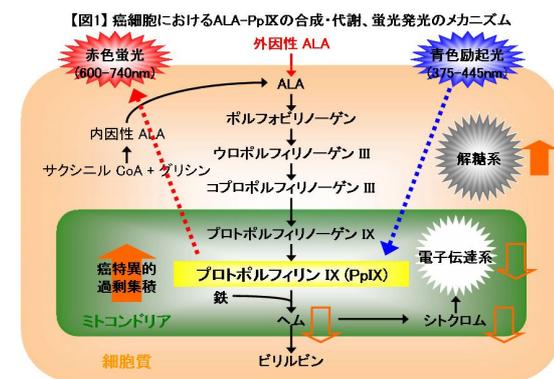
をも切除したことで想定以上に再発を抑えしえたという仮説が成り立つ。また、偽陽性病変に第9番染色体の異常が存在するというMatsuyama Hら(Oncology 76, 118-25, 2009)の報告も、我々の仮説を強く支持するものである。

そこで本研究では、ALA-PDDにて蛍光発光する病理学的非癌病変(偽陽性病変)を対象として、発癌関連遺伝子を主に遺伝子異常を網羅的に解析する。本研究により偽陽性メカニズムを解明し、偽陽性の減少を目指すばかりでなく、膀胱癌の発癌初期(initiation~promotion)における変異を示す未知の癌遺伝子・癌抑制遺伝子(群)の同定にも繋がるものとする。

ALA-PDDは最先端光力学技術を医療分野に活用した先進的取組みで、世界的に注目されている。本研究は、この先進医療技術の課題をシーズとした基礎的研究であり、解明されるALA-PDDでの偽陽性病変の責任遺伝子~メカニズムを活用することで、ALA-PDDの診断精度は向上し、最終的に膀胱内再発のさらなる抑止も期待できる。病悩する膀胱癌患者さんに多大なる恩恵をもたらす、検査や手術の再施行を回避でき医療経済学的に有意義で、社会的貢献も大きいと考える。

また、同様の研究手法を用いて、泌尿器科癌に限らず多くの癌腫においても、未知の発癌関連遺伝子の同定が期待でき、わが国の癌研究・癌医療の発展に寄与できると考える。

このように臨床へのフィードバックのみならず、新規の発癌関連遺伝子の探索という側面も兼ね備えている極めて独創的かつ有意義な研究といえる。



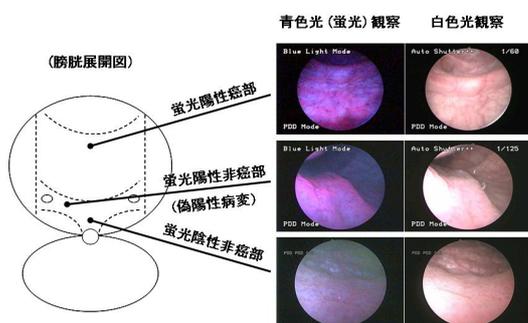
3. 研究の方法

アミノレブリン酸を用いた光力学診断を行い、蛍光陽性癌部、蛍光陽性非癌部(偽陽性病変)、蛍光陰性非癌部(図2)から各々研究検体を採取し、蛍光発光の現象に関わる責任遺伝子の発現ならびにタンパク質の発現を検討した。

まず、検体組織を用いて、ポルフィリン代謝に関わる遺伝子発現解析を網羅的に行った。また、これらPp前駆物質に関わるトランスポーターの活性も検討した。さらに、Pp前駆ポルフィリン物質の尿中排泄量に関して、高速液体クロマトグラフィーを用いて

解析した。

【図2】アミノレブリン酸 (ALA) を用いた光力学診断 (PDD) における膀胱内視鏡所見



このことによって、リン蓄積量が細胞によって異なることが示された。この蓄積量の異なる細胞は本研究で求める責任遺伝子の発現が異なる細胞と言える。網羅的な解析を行った結果、ALA の取り込みに関わる peptide transporter PEPT1 の高発現、ならびにポルフィリンの排出に関わる human ATP-binding cassette trans-porter ABCG2 の低発現が顕著に認められた。興味深いことにポルフィリン代謝酵素の発現量はほぼ同一であった。これまではこの代謝酵素群の発現量が異なると予想されていたが、本研究によってトランスポーターという新たな分子でポルフィリン蓄積量を議論することができるようになった。

さらに上記の研究を裏付けるために、ALA を用いた光力学診断を行い、蛍光陽性癌部、蛍光陽性非癌部(偽陽性病変)、蛍光陰性非癌部から各々研究検体を採取した。

まず、蛍光陽性癌部および蛍光陰性非癌部から mRNA level を測定し、peptide transporter PEPT1 高発現および human ATP-binding cassette trans-porter ABCG2 低発現が腫瘍特異的な PpIX 過剰集積に寄与する責任遺伝子であることを検証した。その結果、培養細胞の結果と同様の PEPT1 高発現、ABCG2 の低発現が蛍光陽性癌部において顕著に確認された。それらの切片の免疫染色でもこれを指示する結果が得られている。以上のことより、PEPT1 ならびに ABCG2 が責任遺伝子であることを明らかとした。

以上のデータは癌部位においてポルフィリンの輸送が正常とは異なっていることを示している。さらにポルフィリン排出トランスポーターの存在を示すことができた。このことからポルフィリンは蓄積した後、癌以外に排泄されることが予想される。そこで、ALA 投与後の患者尿中に含まれるポルフィリン値を高速液体クロマトグラフィーを用いて詳細に検討した。その結果、ALA 投与後に尿中にポルフィリン前駆物質であるウロポルフィリン・コプロポルフィリンが検出された。さらに健常ボランティア群との比較により、代謝・排泄される尿中ポルフィリン物質の腫瘍マーカーとしての有用性も確認できた。今後、これら因子は膀胱癌に対する ALA を用いた光力学診断や治療における重要な key sub

stance となるものと考えられ、飛躍的な展開が期待できる。

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3件)

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 aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 査読有、10 (3): 288-95, 2013.

Doi : 10.1016/j.pdpdt.2013.02.001

Inoue K, Ota U, Ishizuka M, Kawada C, Fukuhara H, Shuin T, Okura I, Tanaka T, Ogura S.

Porphyrins as urinary biomarkers for bladder cancer after 5-aminolevulinic acid administration: The potential of photodynamic screening for tumors.

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 査読有、10 (4), 484-489, 2013.

Doi : 10.1016/j.pdpdt.2013.05.002

井上啓史, 福原秀雄, 川田千明, 執印太郎, 倉林 睦, 降幡睦夫, 小倉俊一郎, 石塚昌宏, 高橋 究, 太田 麗, 石井琢也, 田中 徹.

膀胱癌診療における光力学診断 (PDD) およびスクリーニング (PDS) の有用性、シンポジウム 「膀胱癌の再発予防について」、日本腎泌尿器疾患予防医学研究会雑誌、査読無、21 (1): 48-51, 2013.

(学会発表)(計3件)

井上啓史.

5-アミノレブリン酸 (ALA) による光力学技術を用いた対癌新戦略. ランチョンセミナー.

第22回日本がん転移学会学術集会, 2013/07/12, 長野県松本市ホテルブエナビスタ

井上啓史, 福原秀雄, 執印太郎, 倉林 睦, 降幡睦夫, 渡邊裕修, 谷村正信, 小倉俊一郎, 石塚昌宏, 田中 徹.

5-アミノレブリン酸 (ALA) による光力学技術を用いた対癌新戦略.

日本農芸化学会 2013 年度大会 シンポジウム 4SY18-8 生命の根源物質アミノレブリン酸が拓く、健康・農業・医療への多様な応用の最前線, 2013/03/27, 宮城県仙台市東北大学川内北キャンパス

井上啓史、福原秀雄、執印太郎、倉林
睦、降幡睦夫、小倉俊一郎、石塚昌宏、
田中 徹。
膀胱癌診療における光力学診断(PDD)お
よびスクリーニング(PDS)の有用性。
第 21 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究
会 シンポジウム ~膀胱癌の再発予
防について~, 2012/07/13, 高知県高
知市文化プラザかるぼーと

6 . 研究組織

(1)研究代表者

井上 啓史 (INOUE,Keiji)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：00294827

(2)研究分担者

田村 賢司 (TAMURA,Kenji)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号：50464384
(H23-H24)

執印 太郎 (SHUIN,Taro)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号：70128601

小倉 俊一郎 (OGURA,Shunichiro)
東京工業大学・生命理工学研究科・准教授
研究者番号：90343160