

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592429

研究課題名(和文) 光線力学的療法とクロフィブリン酸を用いた卵巣癌播種病巣に対する治療戦略

研究課題名(英文) Therapeutic strategy for peritoneal dissemination of ovarian cancer using dynamic phototherapy and clofibric acid

研究代表者

横山 良仁 (Yokoyama, Yoshihito)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90261453

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的療法(PDT)が卵巣癌の微小病巣で抗腫瘍効果を発揮するためには細胞内に取り込まれた5-アミノレブリン酸メチルエステル(Methyl-ALA)から変換されるプロトポルフィリンIX(PpIX)量が重要であり、細胞内のPpIX量によって抗腫瘍効果が違うこと、ヘム合成・分解とも活発な細胞では外因性のアミノ酸誘導体を取り込んでもPpIXが細胞内に蓄積されにくいことを示した。一方でMethyl-ALA-PDTは癌性腹膜炎の有力な治療法の一つになることが示唆され、PDTの治療効果を高めるには細胞内PpIX量の維持が重要になる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to investigate the reason why intracellular amount of protoporphyrin IX (PpIX) varies in ovarian cancer cells and the effect of Photodynamic therapy (PDT) on peritoneal carcinomatosa. 1) The amount of PpIX (microg/dl) was 67.7 in DISS cells and 22.4 in MCAS cells. 2) Expression of delta-ALA synthetic enzyme, heme oxygenase and biliverdin reductase B in MCAS increased more than 3 times compared with those in DISS. 3) The rats treated with a methyl ester of 5-aminolevulinic acid (Methyl-ALA)-PDT was significantly longer in survival than those of the control and debulking surgery (DS)-Methyl-ALA-PDT significantly prolonged survival compared with DS alone. These results suggest that PpIX is not accumulated in cells in which heme synthesis and resolution is active and that Methyl-ALA-PDT is promising in ovarian cancer treatment. The amount of PpIX in cells is important in PDT treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：光線力学的療法 卵巣癌 腹膜播種 5-アミノレブリン酸メチルエステル プロトポルフィリンIX ヘム合成・分解

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌細胞株 HTOA、HRA、DISS (以上漿液性腺癌)、MCAS (粘液性腺癌)、TOV21G (明細胞腺癌) からヌードマウスに皮下腫瘍を作製し、光感受性物質である 5-アミノレブリン酸メチルエステル塩酸塩 (Methyl-ALA) による PDT を行ったところ HTOA、HRA、DISS 細胞で有意な腫瘍縮小効果を得た。さらに、DISS 細胞を用いた癌性腹膜炎ラットを作製し、開腹後光照射のみ (コントロール) 対 Methyl-ALA ip + 開腹後光照射 (Methyl-ALA-PDT)、Debulking surgery (DS) 対 DS + Methyl-ALA-PDT の生存期間を比較したところ、Methyl-ALA-PDT、DS + Methyl-ALA-PDT で有意に生存期間の延長が得られた。これらの結果は卵巣癌の腹膜播種病巣に対して PDT は有効な治療法になり得ることを示唆するものである。PDT によって抗腫瘍効果を発揮するためには細胞内に取り込まれた Methyl-ALA から変換される PpIX 量が重要であり、細胞内 PpIX 量によって抗腫瘍効果が違うことを見いだした。すなわち細胞内 PpIX 量が多い卵巣癌細胞による腫瘍では有意に PDT の効果が優れていたのである。PpIX はヘムの合成分解経路に参与する中間代謝産物である。5.5 μ M の Methyl-ALA を卵巣癌細胞に添加すると、PpIX 量は HTOA、HRA、DISS (以上 PDT 感受性) で MCAS、TOV21G (以上 PDT 不応性) に比べ有意に高値であった。DISS と MCAS のヘム合成と分解経路の変換酵素群の遺伝子プロファイルをマイクロアレイで解析してみると、MCAS ではヘム合成経路の ALA 合成酵素 (3 倍)、ヘム分解経路の Heme oxygenase 2 (10 倍) と Biliverdin reductase B (7 倍) の遺伝子発現が DISS に比べ増加していた。この結果は、ヘム合成・分解とも活発な細胞では外因性のアミノ酸誘導体を取り込んでも PpIX が細胞内に蓄積されにくいことが示唆される。PDT に反応する腫瘍がある一方で、PDT に反応しにくい腫瘍が存在する。では卵巣癌の腹膜播種病巣に対して PDT の治療効果を高めるには、どのようにすればよいか? まず考えるべきは細胞内 PpIX 量の維持である。このた

めには、PpIX からヘムへの変換酵素であるフェロケターゼを阻害することであるが、阻害物質の代表に鉛がある。しかし臨床応用を考えた場合、鉛中毒によるポルフィリン症が知られているようにその使用には躊躇する。ヘムは HIF-1 の活性化を介してエリスロポエチン遺伝子発現を誘導するのであるが、エリスロポエチンは PDT の感受性を阻害することが報告されている。GST01 は、ヘムへの分化を抑制することが知られている。従って、ヘムへの分化を抑制し細胞内の PpIX 量を維持するためには GST01 の働きが期待できるのではないだろうか。GST01 は生体内解毒酵素であり、生体内で無機ヒ素の変換と代謝に關する役割がある。本研究では特に GST01 に焦点を絞り、GST01 cDNA を各種の卵巣癌細胞に導入して、Methyl-ALA 添加からの PpIX を定量、GST01 遺伝子導入細胞に対する PDT の効果を *in vitro*、*in vivo* で検証する。

我々は PDT の抗腫瘍作用はアポトーシスと血管新生の抑制から得られることを証明した。我々は以前、複数のヒト卵巣癌細胞から作製した皮下担癌マウスと癌性腹膜炎マウスを用いた実験的卵巣癌において、PPAR リガンドであるクロフィブリン酸の投与により卵巣癌の key drug の一つであるシスプラチンと同等の腫瘍縮小効果と生存期間の延長が得られることを見いだした。クロフィブリン酸投与の腫瘍内で観察された血管新生の抑制とアポトーシスの誘導は PDT の作用機序と同じである。動物実験により、PDT とクロフィブリン酸投与を同時に行い、癌性腹膜炎ラットの生存期間が延長されるかどうかを確認したのち、最終的には卵巣癌腹膜播種病巣に対する PDT とクロフィブリン酸併用の臨床応用を計画している。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣癌の微小病変に対して抗腫瘍効果を持つ光線力学的療法 (PDT) と Peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) リガンドであるクロフィブリン酸が特に再発卵巣癌の腹膜播種病巣に対する治療戦略となり得るかどうかを

検討することが最大の目的である。ヘム合成分解経路の中間代謝産物である細胞内プロトポルフィリン IX (PpIX) 量が PDT の効果発現に重要であるため、ヘムへの分化抑制の働きがある Glutathione S-transferase Omega-1 (GSTO1) 遺伝子導入により細胞内 PpIX 量、PDT 効果がどう変化するかを検討することも本研究の目的である。

3. 研究の方法

4 つの実験に分け検討した。1) Carbonyl reductase (CR) が腫瘍増殖に果たす役割: sense CR 導入 T-Ag MOSE cells (CR 導入群)、vector のみ導入 T-Ag MOSE cells (コントロール群) の各細胞をヌードマウス側腹に移植し (各々 n=8) 腫瘍体積の推移を 5 週間比較した。腫瘍内の CR 発現量の定量、VEGF、腫瘍内血管密度、Caspase-3、アポトーシス細胞を測定した。MFG-E8 発現の発現量と局在を調べ、蛍光二重染色法で Phagocytosis の出現を調べた。2) 卵巣癌自然発癌マウスモデルを用いたクロフィブリン酸 (CA) の腫瘍抑制効果: *MISIIR-TAg* マウスを i) コントロール (無処置) 群 (n=8)、ii) 3000ppm CA 連日投与群 (n=8)、に分け生存期間を比較した。3) 癌性腹膜炎に対する光線力学的療法と CA の併用療法の効果: DISS 細胞による癌性腹膜炎マウスを作製した。コントロール (光照射のみ) 群 (n=8)、250mg/kg アミノレブリン酸メチルエステル塩酸塩腹腔内投与 (ALA methylester ip) + 1 時間後腫瘍への光照射 (Irradiated ALA methylester ip) 群 (n=8)、Irradiated ALA methylester ip + 3000ppm CA 投与群 (n=8) の 3 群に分け生存期間を比較した。4) 大網切除 (OM) の至適時期に関する検討: 8 週齢の F344 ヌードラットを用い、開腹して OM を行った群 (n=8) () と OM を行わなかった群 (n=16) に分け、DISS 細胞を腹腔内投与した。3 週後、OM を行わなかった 16 頭を、腫瘍を含め OM を行った群 (n=8) ()、OM を行わない Sham operation 群 (n=8) () に分けた。3 群の生存期間を比較した。

4. 研究成果

1) コントロール群は 5 週間腫瘍体積が増加した。一方、CR 導入群は 2 週目まで腫瘍

体積は増加したが、それ以降 5 週目まで腫瘍体積は減少した (Mann-Whitney test、 $P < 0.001$)。CR 導入群の腫瘍はネクローシスと炎症性細胞浸潤が顕著であった。CR 導入群の腫瘍内の VEGF 発現と血管密度は有意に減少していた ($P < 0.001$)。CR 導入群の腫瘍では Caspase-3 の活性化とともにアポトーシス細胞の出現頻度は有意に増加していた ($P < 0.001$)。MFG-E8 蛋白発現は CR 導入群で有意に増加していた ($P < 0.002$)。MFG-E8 は CR 導入群の腫瘍細胞質内と間質細胞内に広く分布しており、MFG-E8 発現箇所でマクロファージによるアポトーシス細胞の貪食像が観察された。2) 生存期間中央値は、コントロール群の 111 日に対して、CA 投与群では 149 日であった ($P < 0.01$)。3) 生存期間中央値 26 日のコントロール群に比べ、さらには Irradiated ALA methylester ip 群と比べても Irradiated ALA methylester ip + 3000ppm CA 群で有意な生存期間の延長が得られた (各々 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)。4) の生存期間が最も短く中央値で 35 日間 (28 日~37 日間)、 は 42 日間 (39 日~54 日間)、 は 2 頭が 42 日目に死亡したが残り 6 頭は実験終了まで生存した。

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)

[雑誌論文] (計 20 件)

以下はすべて査読あり。

1. Yokoyama Y, Matsushita Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. Decreased ARID1A expression is correlated with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. *J Gynecol Oncol* 2014; 25: 58-63. doi: 10.3802/jgo.2014.25.1.58.
2. Yokoyama Y, Futagami M, Watanabe J, Sato N, Terada Y, Miura F, Sugiyama T, Takano T, Yaegashi N, Kojimahara T, Kurachi H, Nishiyama H, Fujimori K, Tase T, Mizunuma H. Redistribution of Resistance and Sensitivity to Platinum According to the Observation Period After the Treatment of Epithelial Ovarian

- Cancer. *Mol Clin Oncol* 2014; 2: 212-218. doi: 10.3892/mco.2013.223.
3. Hirakawa H, Yokoyama Y, Yoshida H, Mizunuma H. Inhibitory effects of aromatase inhibitor on estrogen receptor-alpha positive ovarian cancer in mice. *J Ovarian Res* 2014; 7: 4. doi: 10.1186/1757-2215-7-4.
 4. Yokoyama Y, Futagami M, Fijimoto T, Terada Y, Takatori E, Sugiyama T, Otsuki T, Yaegashi N, Kojimahara T, Kurachi H, Nishiyama H, Fujimori K, Tase T, Mizunuma H. Investigation of the clinico-pathological features of fallopian tube malignancy. *Oncol Rep*, 2013; 30: 79-84. doi: 10.3892/or.2013.2439.
 5. Kojimahara T, Nakahara K, Takano T, Yaegashi N, Nishiyama H, Fujimori K, Sato N, Terada Y, Tase T, Yokoyama Y, Mizunuma H, Shoji T, Sugiyama T, Kurachi H. Yolk sac tumor of the ovary: a retrospective multicenter study of 33 Japanese women by Tohoku Gynecologic Cancer Unit (TGPU). *Tohoku J Exp Med* 2013; 230: 211-217. doi: 10.1007/s00432-011-0993-1.
 6. Yokoyama Y, Mizunuma H. Recurrent epithelial ovarian cancer and hormone therapy. *World J Clin Cases* 2013; 1: 187-190. doi: 10.12998/wjcc.v1.i6.187.
 7. Shimada M, Nishimura R, Nogawa T, Hatae M, Takehara K, Yamada H, Kurachi H, Yokoyama Y, Sugiyama T, Kigawa J. Comparison of the outcome between cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients with adjuvant radiotherapy following radical surgery: SGSG/TGPU Intergroup Surveillance. *Mol Clin Oncol*. 2013; 1: 780-784. doi: 10.3892/mco.2013.112.
 8. Tamura R, Yokoyama Y, Kobayashi A, Osawa Y, Shigeto T, Futagami M, Mizunuma H. A case of small cell carcinoma of the vagina. *Rare Tumors* 2013;5:189-191.doi:10.4081/rt.2013.e58
 9. Xin B, Yokoyama Y, Shigeto T, Masayuki F, Mizunuma H. Enhanced inhibitory effect of meloxicam, a cyclooxygenase-2 inhibitor combined with cisplatin on the growth of human ovarian cancers. *J Tumor* 2013; 1: 53-61.doi:10.6051/j.issn.1819-6187.2013.01.18
 10. Futagami M, Yokoyama Y, Mizukami H, Shigeto T, Mizunuma H. Can malignant transformation in mature cystic teratoma be preoperatively predicted? *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33: 662-665.
 11. Yanagita T, Yokoyama Y, Tamura R, Taniguchi R, Shigeto T, Mizunuma H. A case of granulosa cell tumor of the ovary detected from metastatic foci. *Eur J Gynaecol Oncol* 2012; 33: 648-651.
 12. Yokoyama Y, Yokota M, Futagami M, Mizunuma H. Carcinosarcoma of the fallopian tube: Report of four cases and review of literature. *Asia Pac J Clin Oncol* 2012; 8: 303-311. doi: 10.1111/j.1743-7563.2011.01513.x.
 13. Yokoyama Y, Hirakawa H, Wang H, Mizunuma H. Is omentectomy mandatory in the operation for ovarian cancer? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2012; 164: 89-92. doi: 10.1016/j.ejogrb.2012.05.020.
 14. Matsushita Y, Yokoyama Y, Taniguchi R, Abe K, Watanabe J, Mizunuma H. A case of ovarian mucinous adenocarcinoma in a premenarcheal girl.

- Int J Clin Oncol 2012; 17: 517-521. doi: 10.1007/s10147-011-0333-0.
15. Tamura R, Yokoyama Y, Yanagita T, Matsumura Y, Abe K, Taniguchi R, Mizunuma H. Presentation of two patients with malignant granulosa cell tumors, with a review of the literature. World J Surg Oncol 2012; 10: 185. doi: 10.1186/1477-7819-10-185.
 16. Shoji T, Kumagai S, Yoshizaki A, Yokoyama Y, Fujimoto T, Takano T, Yaegashi N, Nakahara K, Nishiyama H, Sugiyama T. Efficacy of neoadjuvant chemotherapy followed by radical hysterectomy in locally advanced non-squamous carcinoma of the uterine cervix: a retrospective multicenter study of Tohoku Gynecologic Cancer Unit. Eur J Gynaecol Oncol 2012; 28: 353-357.
 17. Murakami A, Yakabe K, Yoshidomi K, Sueoka K, Nawata S, Yokoyama Y, Tsuchida S, Al-Mulla F, Sugino N. Decreased carbonyl reductase 1 expression promotes malignant behaviours by induction of epithelial mesenchymal transition and its clinical significance. Cancer Lett 2012; 323: 69-76. doi:10.1016/j.canlet.2012.03.035.
 18. Ayhan A, Mao TL, Seckin T, Wu CH, Guan B, Ogawa H, Futagami M, Mizukami H, Yokoyama Y, Kurman RJ, Shih IM. Loss of ARID1A expression is an early molecular event in tumor progression from ovarian endometriotic cyst to clear cell and endometrioid carcinoma. Int J Gynecol Cancer 2012; 22:1310-1315.doi:10.1097/IGC.0b013e31826b5dcc.
 19. Wang H, Yokoyama Y, Tsuchida S, Mizunuma H. Malignant ovarian tumors with induced expression of carbonyl reductase show spontaneous regression. Clin Med Insights: Oncology 2012; 6: 107-115. doi: 10.4137/CMO.S9005.
 20. Yokoyama Y, Xin B, Shigeto T, Mizunuma H. Combination of ciglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, and cisplatin enhances the inhibition of growth of human ovarian cancers. J Cancer Res Clin Oncol 2011; 137:1219-1228.doi:10.1007/s00432-011-0993-1.
- 〔学会発表〕(計8件)
1. Yokoyama Y, et al. Decreased ARID1A expression is correlated with chemoresistance in epithelial ovarian cancer. 第3回アジア婦人科腫瘍学会、2013年12月13日-12月15日、京都
 2. Yokoyama Y, et al. Redistribution of Resistance and Sensitivity to Platinum According to the Observation Period After the Treatment of Epithelial Ovarian Cancer. 第17回欧州癌会議、2013年9月28日-10月2日、アムステルダム(オランダ)
 3. 横山良仁 婦人科悪性腫瘍術後管理 第64回日本産科婦人科学会学術講演会、2012年4月13日-4月15日、神戸
6. 研究組織
- (1)研究代表者
横山良仁 (YOKOYAMA YOSHIHITO)
弘前大学・医学研究科・准教授
研究者番号：90261453
 - (2)研究分担者
なし
 - (3)連携研究者
なし