

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460680

研究課題名(和文)ポルフィリン生合成系タンパクをマーカーとした口腔がんパーソナライズド光線力学療法

研究課題名(英文) personally customized photodynamic therapy for oral cancer patients using porphyrin synthesis protein as a biomarker

研究代表者

長田 哲次 (Nagata, Tetsuji)

浜松医科大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60264058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔がん罹患者の腫瘍部分に青色光照射して励起すると赤色の蛍光が観察されることがある。申請者らは、赤色蛍光陽性がんは、光増感剤前駆物質として5-アミノレブリン酸(ALA)を用いた光線力学治療に感度が高い可能性を着想し、本研究では、口腔内腫瘍病変におけるプロトポルフィリンIX(PpIX)に起因する赤色蛍光の発現につき解析した。その結果、口腔内腫瘍病変の約4割に赤色蛍光を認めた。赤色蛍光は腫瘍部に不均一に分布し、腫瘍細胞の分化や組織型とは関連を認めなかった。今後、赤色蛍光の由来を探り、光線力学治療効果を高くする要因を追求する。

研究成果の概要(英文)：It is known that the oral cancer lesion is activated by blue-light irradiation and emits red fluorescence. We focused on efficacy of the photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA), and analyzed the red fluorescent expression by protoporphyrin IX(PpIX) in the tumor of of the oral cavity. As a result, approximately 40% of the tumors of oral cavity lesion emitted red fluorescence. The red fluorescence was distributed over the tumor region heterogeneously, and there was no association with the differentiation nor the histologic type of the tumor. We need to investigate a red fluorescent origin, and seek a factor to raise the effect of photodynamic therapy.

研究分野：歯科口腔外科

キーワード：口腔がん プロトポルフィリン

## 1. 研究開始当初の背景

アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid, 以下 ALA) はヘム合成の前駆物質であり、生体に内在するアミノ酸である。がん細胞のヘム合成代謝においては、正常細胞の場合と異なり、中間代謝物であるプロトポルフィリン IX (Protoporphyrin IX, 以下 PpIX) が蓄積しやすいことが知られている。これは、がん細胞のポルフィリン生合成・分解系に関わるタンパク (酵素、トランスポーター等) の発現異常に起因すると考えられている。PpIX は蛍光物質であるため、がん細胞に集積しやすい性質を利用したがん検知が可能で、本邦においても ALA 投与後の PpIX 蛍光を利用した脳腫瘍の診断が保険収載されている。

一方で PpIX は光増感物質でもあるため、光増感剤前駆物質として ALA を用いた光線力学治療 (PDT) の有効性の報告も散見される。口腔がん (扁平上皮癌) への ALA-PDT 適用の報告も 1990 年代後半より見られるようになってきた。ALA-PDT では、腫瘍組織における PpIX の濃度 (蓄積量) が高いほど、殺細胞効果が高いことが報告されているが、PpIX の産生量が腫瘍によって、あるいは同じ癌腫であっても個体差によって異なるため、治療効果は一定しない。したがって、ALA 投与後の PpIX 濃度が高い腫瘍を選別することができれば、言い換えると、治療効果が高いと考えられる個体を予想できれば、ALA-PDT による寛解率を向上させることが可能となる。これを実現する簡便な方法として、ALA 投与後に病巣 (がん部位) の PpIX 蛍光を測定すること、が挙げられるが、蛍光測定は原理的に定量性に劣る上、ALA 投与から測定までの時間や、がん細胞の組織内密度等に大きく左右されるため、事前評価における指標としての信頼性は低く、ALA-PDT の治療効果も安定しないことが予測できる。

他方、口腔がんでは ALA を投与しなくても内在性の赤色蛍光 (青色光励起) が観察されることがある。その理由は明らかではないが、生体由来物質であればポルフィリン系物質とくに PpIX である可能性が高く、上述のがん細胞におけるポルフィリン生合成・分解系の異常の関与が推定される。そこで申請者らは、口腔がんの赤色蛍光の発現に関わる要因を明らかにすることが、ALA-PDT の感受性を高めることにつながることを着想し、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

口腔がん患者に対して ALA-PDT による高い寛解率が期待できる患者を選別する方法論を確立するために、本研究では、がん組織における PpIX 発現につき解析した。

## 3. 研究の方法

口腔がん患者の病巣 (腫瘍) の一部を採取し、PpIX 蛍光測定ならびに PpIX 濃度を高速液体クロマトグラフィーで定量測定をおこなった。

### 1. 対象とする口腔がん

浜松医科大学倫理委員会で承認を受けた実施計画に基づき口腔がん患者にインフォームドコンセントを行い、バイオプシーもしくは手術により得られた検体を用いた。

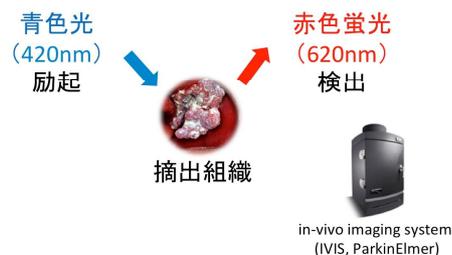
### 2. 病変部解析

#### 2-1. 生体イメージング

口腔内で病変が認められた症例においては、蛍光励起カメラで病変部の PpIX 由来の蛍光撮影をおこなった。デジタルカメラには、蛍光励起のためのリング型 LED 照明 (青色 400 nm) を装着して、蛍光透過様のバンドパスフィルタ (630 nm) を撮像レンズに前置したものを使用した。

他方、摘出した生体試料における PpIX 蛍光イメージングは、生体イメージングシステム (IVIS™) を用いておこなった。下図のように青色光 (420 nm) で励起される赤色蛍光を検出した。

### 方法



#### 2-2. HPLC

検体を Lysis buffer 中でホモジナイズして、遠心後に上清を採取して、逆相 C<sub>18</sub> カラムを用いて PpIX を分離した。溶出は、溶媒 A (12.5% アセトニトリル、1 M 酢酸アンモニウム、pH 5.2) で 5 分間 0-100% 直線勾配の溶媒 B (80% アセトニトリル、50 mM 酢酸アンモニウム、pH 5.2) で 25 分間 100% 溶媒 B で 10 分間の処理でおこなった。PpIX 濃度は、蛍光分光計 (ex = 404 nm; em = 624 nm) で検出し、標準 PpIX サンプルの保持時間 (= 33.5 分) を参照して濃度を決定した。

#### 2-3. 病理学的検討

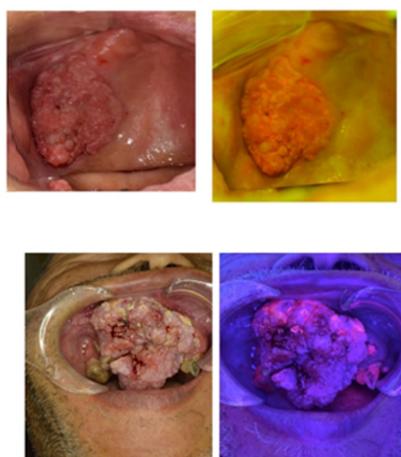
検体は HE 染色後、顕微鏡による観察を行われ、

病理組織学的に診断された。

#### 4. 研究成果

全 24 試料が採取された。内訳は、口腔がん 19 例〔扁平上皮癌 16 例、疣贅状癌 3 例〕、1 例は悪性リンパ腫であった。その他 4 例は歯肉炎などの炎症性の肉芽組織であった。口腔がん 19 例は、舌癌 6 例、下歯肉癌 4 例、上歯肉癌 3 例、頬粘膜癌 3 例、口唇癌 2 例、口底癌 1 例であった。

口腔内蛍光撮影において蛍光を呈する症例は全例の約 40%であった。蛍光が観察された例では、蛍光は腫瘍全体に均質に分布しているわけではなく、局所的に散発的に認められた(下図)。

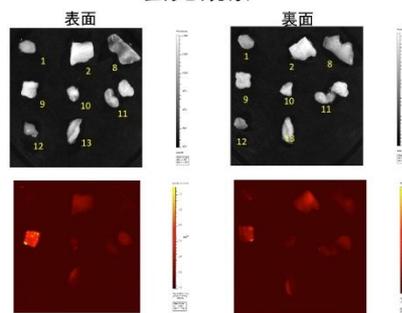


IVIS による標本イメージングでの観察でも蛍光を呈する部位としない部位を認め、均一な蛍光は観察されなかった(下図)。また、がん組織のみではなく肉芽組織でも蛍光を認めた例があった。蛍光が認められた試料の蛍光確認部位をさらに切り分け、新たに面出しを行ったところ、断面からも赤色蛍光を認めた。

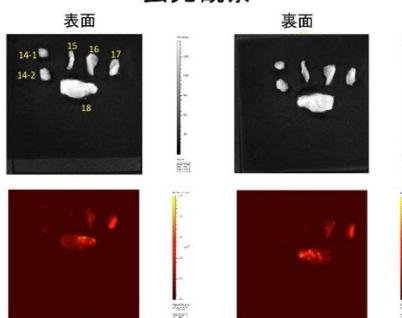
全体として、口腔内病変に対し青色光を照射すると 41.7% (10/24) の頻度で赤色蛍光を認めた。赤色蛍光は、口腔内部位や腫瘍分化との相関は認められず、他の何らかの原因によるものと考えられた。

生検で得られた組織切片を用いて HPLC による PPIX の定量分析を行ったが、PPIX は検出限界以下であった。これは HPLC によるポルフィリン計測における感度の問題であった可能性が高く、さらに高感度の検出方法が必要と考えられた。

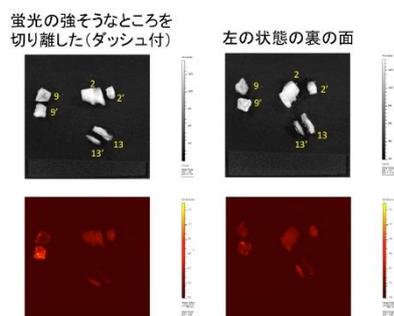
#### 蛍光観察



#### 蛍光観察



#### 蛍光観察



#### 【結論】

摘出された口腔内病変に青色光を照射すると約 4 割の頻度で PPIX 由来と考えられる赤色蛍光が、腫瘍塊内部に部分的に観察された。赤色蛍光が認められた症例では、外因的に ALA を投与すると病変部での PPIX 濃度が高まり、光線力学治療効果が高まる可能性がある。

#### 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 7 件)

T Nagata, K Masumoto, Yutaro Hayashi, Yoshiko Watanabe, F Katou: Three-dimensional computed tomographic analysis of variations of the carotid artery. *J Cranio-Maxillo Fac Surg* 査読有り 44: 734-742(2016)  
DOI:10.1016/j.jcms.2016.02.011  
Masumoto K, Kitagawa M: E3 ubiquitin ligases as molecular targets in human

oral cancers. *Curr Cancer Drug Targets*, 査読有り 16, 130-135, 2016.

DOI:10.2174/1568009616666151112122336

Zulaziz N, Azhim A, Himeno N, Satoh Y, Tanaka M, Kinoshita M, Miyazaki H, Saitoh D, Shinomiya N, Morimoto Y.

Photodynamic Therapy Mediates Innate Immune Responses via Fibroblast-Macrophage Interactions. *Hum Cell* 査読有り 28: 159-66 (2015)

DOI:10.1007/s13577-015-0118-2

Tsujimoto H, Morimoto Y., Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Hiraki S, Horiguchi H, Miyazaki H, Ono S, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K. Theranostic Photosensitive Nanoparticles for Lymph Node Metastasis of Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* 査読有り (2015)

DOI:10.1245/s10434-015-4594-0

T. Nagata, K. Masumoto, Y. Uchiyama, Y. Watanabe, R. Azuma, Y. Morimoto, F. Katou: Improved technique for evaluating oral free flap by pinprick testing assisted by indocyanine green near-infrared fluorescence angiography. *J Cranio-MaxilloFac Surg* 査読有り 42: 1112-6 (2014)

DOI:10.1016/j.jcms.2014.01.040

Tsujimoto H, Morimoto Y., Takahata R, Nomura S, Yoshida K, Horiguchi H, Hiraki S, Ono S, Miyazaki H, Saito D, Hara I, Ozeki E, Yamamoto J, Hase K. Photodynamic therapy using nanoparticle loaded with indocyanine green for experimental peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci* 査読有り 105:1626-30 (2014)DOI:10.1111/cas.12553

Miyazaki K, Morimoto Y., Nishiyama N, Satoh H, Tanaka M, Shinomiya N, Ito K. Preconditioning methods influence tumor property in an orthotopic bladder urothelial carcinoma rat model. *Mol Clin Oncol* 査読有り 2: 65-70 (2014)

DOI:10.3892/mco.2013.214

〔学会発表〕(計 1件)

鬼木玲奈、寺島航、小島涼、長井健一郎、仲谷将隆、江南慧、増本一真、長田哲次、小倉俊一郎、四ノ宮成祥、守本祐司 第55回日本生体医工学会大会 2016年4月26-28日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 哲次 (NAGATA Tetsuji)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 60264058

### (2) 研究分担者

守本 祐司 (MORIMOTO Yuji)  
防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・准教授  
研究者番号: 10449069

増本 一真 (MASUMOTO Kazuma)  
浜松医科大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50464136

小倉 俊一郎 (OGURA Shun-ichiro)  
東京工業大学・生命理工学院・准教授  
研究者番号: 90343160

加藤 文度 (KATOU Fuminori)  
浜松医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 60204492

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

(4) 研究協力者 ( )