

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462055

研究課題名(和文) 膵癌における光線力学診断を応用した化学療法効果予測法の開発

研究課題名(英文) Prediction of Chemotherapy Response to Pancreatic Cancer Using Photodynamic diagnosis

研究代表者

皆川 昌広 (MINAGAWA, Masahiro)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：10464009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：術前5-ALA投与によって膵癌の標本を蛍光させることができる。15名の膵癌患者において、5-ALA投与における切除標本の確認をおこなった。蛍光パターンを3つのタイプ(カテゴリー0：蛍光なし、カテゴリー1：点状また部分的経口、カテゴリー2：全体的な蛍光)に分類した。カテゴリー0および1群、カテゴリー2群の2群にわけてカプランメイヤー法にて比較するとカテゴリー2群のほうがカテゴリー0および1群にくらべて有意に生存率が高かった。膵癌細胞株にてALA蛍光性とGemcitabineの奏効率をみてみると、ALA蛍光性があるものはGemcitabineの奏効率が高かった。

研究成果の概要(英文)：Preoperative administration of 5-ALA induces fluorescence of specimens in pancreatic cancer. Fifteen pancreatic cancer patients were preoperatively given 5-ALA and fluorescence patterns of their specimen were observed. We categorized to three patterns (Category 0; no fluorescence, Category 1; fluorescence in spotted or small area, Category 2; fluorescence in whole area). The survival rate of the patients was significantly higher in Category 2 group than in category 0 and 1 group. The experiments using pancreatic cancer cell lines showed that 5-ALA induced fluorescence intensity is correlated to the response rate to gemcitabine.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 5-ALA 光線力学診断

## 1. 研究開始当初の背景

悪性度の高い肝胆膵領域の癌に対して、我々は蛍光法による術中腫瘍可視化によって外科的切除率向上や腫瘍進展度評価をめざしてきた (Minagawa ら . Surgery, 2011) . 2012 年からは脳腫瘍や膀胱癌で使われているアミノレブリン酸を使い、膵癌、胆道癌に対する腫瘍蛍光可視化を臨床的に試みている (図 1 膵癌の腫瘍部が赤色に蛍光) . アミノレブリン酸はワイン、お茶、カイワレ大根等の食品に含まれ、自然界で摂取しているアミノ酸の一つであるが、細胞内ミトコンドリア内のヘム合成系の作用をうけて蛍光性をもつプロトポルフィリン (PP IX) に変換され、腫瘍細胞内に集積することが知られている . PP IX が集積した腫瘍に励起光 (405nm の青色光) を照射することにより赤色 (635nm) に光らせることで術中の腫瘍視認が可能である . 症例を重ねていくうちに、膵癌患者においてアミノレブリン酸投与後の腫瘍蛍光強度と術後化学療法の奏功性に関連があることに気がついた . 当施設では手術不能であった膵癌患者に対して化学療法においてゲムシタピンを投与しており、膵癌化学療法のキードラッグとなっている . アミノレブリン酸から代謝された蛍光性をもつ PP IX とゲムシタピンが同じ排出トランスポーター (ABCG2) を使用しているというこれまでの報告から、「アミノレブリン酸の代謝蛍光物質である PP IX と化学療法剤ゲムシタピンの腫瘍内蓄積度に関連している」という仮説を考えた .

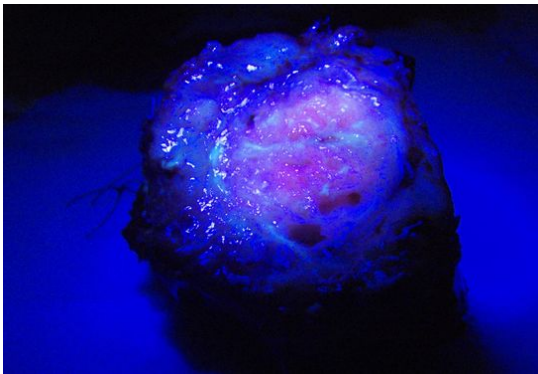


図 1  
5-ALA 投与による膵癌組織における蛍光性の確認

膵癌は腹部固形癌の中でも悪性度が高く (膵癌の 5 年生存率は全体で 9.7% にすぎず、切除例でも 13% にとどまっている . 膵臓 18 : 101 ~ 69, 2003) , 外科的切除したとしても再発が多く、術後の補助化学療法が予後を改善する鍵となっている . 膵癌に有効な化学療法剤としてゲムシタピン、TS-1 などがあり、近年その薬剤代謝に関するトランスポーターの存在が指摘されるようになってきた . これまでトランスポーターの発現量を遺伝子的、病的に解析して腫瘍の薬剤耐性との関

連が報告されるようになってきているが、いまだに不明な点も多い . 我々が発見した膵癌におけるアミノレブリン酸蛍光強度と化学療法剤の効果と関連する現象の機序を明らかにすれば、トランスポーター蛋白の発現量だけではわからなかった実際上の細胞内クリアランスを反映した薬剤蓄積性をみる新しい評価法を確立できるとともに蛍光強度計測によって光線力学診断による迅速かつ簡便な化学療法剤の効果予測が可能となる .

## 2. 研究の目的

悪性度の高い膵癌の予後を改善させるために、化学療法剤の効果予測は非常に重要であり、遺伝子解析・病理組織的評価法よりもさらに機能的な化学療法剤における実際の腫瘍内クリアランスを知る方法が望まれている . 今回我々は膵癌患者において、アミノレブリン酸投与による腫瘍蛍光強度と化学療法剤奏功性が関連していることを見出した . アミノレブリン酸の代謝物と膵癌化学療法のキードラッグであるゲムシタピンの排出トランスポーターが同等であることがこの現象と関連していると考えられる . このことから着想した本研究は関連トランスポーター分子の発現性と腫瘍蛍光強度・化学療法剤奏功性との相関を証明することを目的とする . この研究により、腫瘍を蛍光させる光線力学診断を応用した低侵襲かつ精度の高い新しい化学療法剤効果予測法の確立が可能となる .

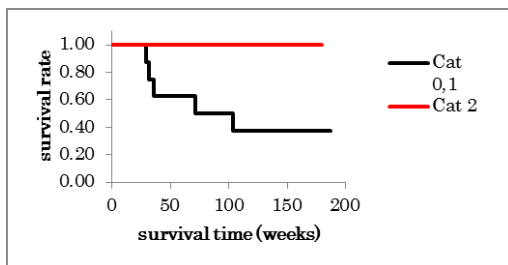
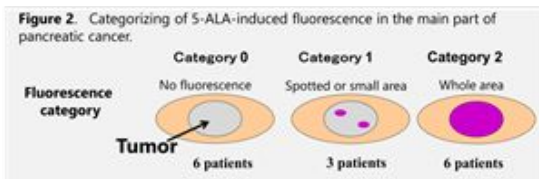
## 3. 研究の方法

膵癌と診断された患者に対して、術前に 5-ALA を蛍光してもらい、切除した標本の蛍光性を確認する . 蛍光強度および病理組織学的検査データ、臨床的な生存率との相関を確認する ( 2 年間) . 標本の直接蛍光観察のほかに、術中腫瘍部観察を行い、自家蛍光観察を併用することによって腫瘍の深さを考慮できる蛍光強度定量化を試みる . 凍結標本においてアミノレブリン酸蛍光強度測定を実験室にておこなうことにより、さらに客観的データを集積する .

切除標本においてアミノレブリン酸代謝におけるトランスポーターである PEPT1 , ABCB6 , ABCG2 およびゲムシタピン代謝に関わるトランスポーターである hENT1 , RRM1 の免疫組織化学染色を行い、アミノレブリン酸蛍光強度とトランスポーター発現の相関を確認する . 膵癌細胞株を用いて、アミノレブリン酸蛍光強度、ゲムシタピンの効果、ABCG2 をはじめとするトランスポーター蛋白発現量の各々の相関をさらに確認し、我々の仮説を細胞レベルにて確認する .

#### 4. 研究成果

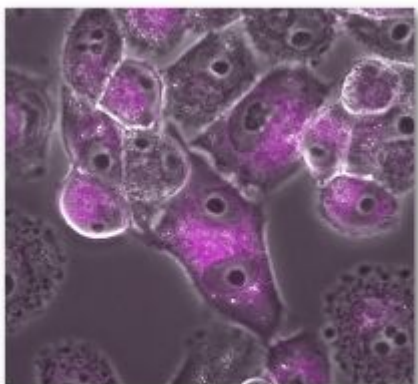
ALA 投与を術前施行し、手術にて切除可能であった 15 例が登録された。申請者らは切除標本の蛍光性（図 2）によって膵癌予後に差があることを見出した（図 3）。切除標本から、mRNA によるトランスポーター遺伝子をリアルタイム PCR によって確認したが、優位な差はなく、免疫組織染色では発現量と AL 蛍光強度に相関を見出すことはできなかった。臨床的データから、ALA 投与蛍光性は化学療法剤である Gemcitabine に対する奏効率との関連があると思われた。



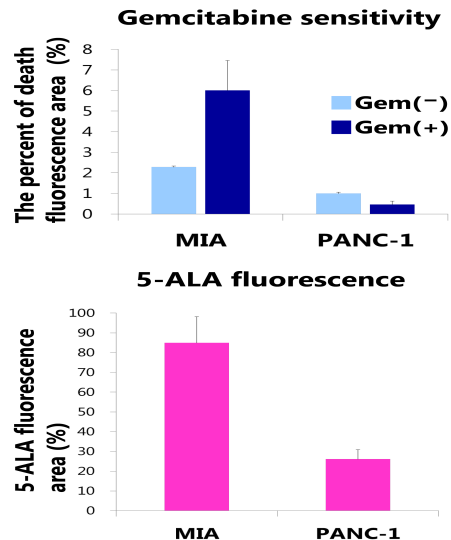
**Figure 3.** Kaplan-Mayer curve of recurrence rate in Category 0+1 and Category 2 groups.

All patients in Category 2 groups was able to survive 1 year after the surgery. Unfortunately, there was no significant difference between Category 0+1 and Category 2 (log rank test). Recurrence rates of each group were shown in Table 1 (below).

膵癌細胞株を用いた実験で、Gemcitabine 感受性のある細胞株 MIA と感受性の少ない PANC-1 を比較すると、ALA 投与後の蛍光性は PANC-1 に比べ PANC-1 が非常に高い蛍光性をもつことより、Gemcitabine 感受性と ALA 蛍光性は何らかの相関があることが示唆された。



**Figure 4.** 5-ALA-induced fluorescence in MIA Paca-2 cell line.



**Figure 5.** Gemcitabine sensitivity and 5-ALA fluorescence in MIA paca-2 and PANC-1 cell line.

PANC-1 is resistant to Gemcitabine, which is also the fluorescence intensity induced by 5-ALA was significantly lower than MIA paca-2 which is sensitive to Gemcitabine (P=0.02).

#### 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)

Miura K, Kobayashi T, Zhang Z, Soma D, Hirose Y, Ishikawa H1, Takizawa K, Nagahashi M, Sakata J, Kameyama H, Minagawa M, Kosugi S, Koyama Y, Wakai T. Study of Immune Tolerance Cases in Adult Living Donor Liver Transplantation. Transplant Proc. 査読有. 2016 May;48(4):1119-22.

Sakata J, Wakai T, Matsuda Y, Ohashi T, Hirose Y, Ichikawa H, Kobayashi T, Minagawa M, Kosugi S, Koyama Y, Akazawa K, Ajioka Y. Comparison of Number Versus Ratio of Positive Lymph Nodes in the Assessment of Lymph Node Status in Extrahepatic Cholangiocarcinoma. Ann Surg Oncol. 査読有. 2016 Jan;23(1):225-34.

皆川昌広, 高野可赴, 滝沢一泰, 佐藤良平, 仲野哲矢, 廣瀬雄己, 三浦宏平, 坂田純, 小林隆, 若井俊文. 肝胆膵領域手術での再切開創に対する真皮縫合の効果. 日本外科日本外科感染症学会雑誌 査読有, 2015;12(3):209-216.

〔学会発表〕(計 2 件)

Masahiro Minagawa, Tetsuya Naito, Jun Hasegawa, Tatsuo Tani, Naohiro Shimakage, Kazuyasu Takizawa, Kabuto Takano, Toshifumi Wakai. 5-Aminolevulinic Acid-induced Fluorescence Relates to Prognosis in Pancreatic Cancer. 71th General Meeting of the Japanese Society of Gastro- enterological Surgery. July 15, 2016. Tokusima, Japan

Masahiro Minagawa, Kazuyasu Takizawa, Kohei Miura, Jun Sakata, Takashi Kobayashi, Toshifumi Wakai. 5-Aminolevulinic Acid-induced Fluorescence Relates to the Gemcitabine Clearance in Pancreatic Cancer . March 20, 2015. AHPBA. Seoul, Korea

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

皆川 昌広(MINAGAWA, Masahiro)  
新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員  
研究者番号：10464009

### (2)研究分担者

若井 俊文(WAKAI, Toshifumi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：50372470

坂田 純(SAKATA, Jun)  
新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：70447605

滝沢 一泰(TAKIZAWA, Kazuyasu)  
新潟大学・医歯学総合病院・助教  
研究者番号：30706437

小杉 伸一(Kosugi, Shin-ichi)  
新潟大学・医歯学総合病院・特任教授  
研究者番号：90401736

小林 隆(Kobayashi, Takashi)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号：40464010

(3)連携研究者

(4)研究協力者