

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462193

研究課題名(和文) 創薬分子デザインによる悪性グリオーマの5-ALA光線力学診断・治療の革新

研究課題名(英文) Innovation of 5-ALA photodynamic diagnosis and treatment in malignant glioma by drug discovery and molecular design

研究代表者

黒岩 敏彦 (Kuroiwa, Toshihiko)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：30178115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠芽腫は、化学療法や放射線治療に治療抵抗性であり、両者を合わせても生存期間は数ヶ月しか延長しない。特に、生存期間の延長のためには、腫瘍幹細胞に対する有効な戦略が必要である。一般に、腫瘍幹細胞には、薬剤排泄を担うABCG2が高発現しており、ABCG2の制御が治療抵抗性の克服に有望である。

本研究では、創薬分子デザインによってABCG2阻害剤としてlapatinibが有望であることを見出し、腫瘍幹細胞をターゲットとした次世代の光線力学治療を開発のための基礎研究を行った。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is refractory to chemotherapy and radiotherapy, and even if they are combined, the survival time extends only for months. In particular, for prolonging survival time, an effective strategy for tumor stem cells is necessary. Generally, ABCG2 responsible for drug excretion is highly expressed in tumor stem cells, and control of ABCG2 is promising for overcoming treatment resistance. In this study, we discovered that lapatinib is promising as an ABCG 2 inhibitor by drug discovery molecular design, and conducted fundamental research for development of the next generation photodynamic therapy targeting tumor stem cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：光線力学治療 光線力学診断 5-アミノレブリン酸 分子デザイン ABCG2 悪性神経膠腫 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫は、化学療法や放射線治療に治療抵抗性であり、両者を合わせても生存期間の延長は数ヶ月である。特に、生存期間の延長のためには、腫瘍幹細胞に対する有効な戦略が必要であるし、光線力学療法 (PDT) などの集学的なアプローチも必要である。

従って、有効な光線力学療法を開発するためには、腫瘍幹細胞がターゲットとなる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高効率 ABCG2 阻害剤と 5-ALA 併用による腫瘍幹細胞をターゲットとした次世代の光線力学診断と治療を開発することである。具体的には下記の基礎研究を行った。

(1) 創薬分子デザインによる高効率 ABCG2 阻害剤 X の特定

(2) ALA と ABCG2 阻害剤 X ((lapatinib) の併用による腫瘍内外のポルフィリン量変化の解明

(3) グリオーマ幹細胞における PDT 抵抗性についての検証

(4) PDT 用光照射量の安全域の解明

3. 研究の方法

(1) 創薬分子デザインによる高効率 ABCG2 阻害剤 X の特定

Flp-In-293/ABCG2 細胞に ABCG2 の基質である Hoechst33342 を加えた後に、各種 ABCG2 阻害剤を投与し、細胞内に残存する Hoechst33342 量を flow cytometer で定量する。

(2) ALA と ABCG2 阻害剤 X ((lapatinib) の併用による腫瘍内外のポルフィリン量変化の解明

MD13 浮遊細胞に対して ALA 単独、lapatinib 単独、および ALA と lapatinib を併用したもので培養し、細胞内ポルフィリン量を flow cytometer を用いて 660nm の波長で検出した。

(3) グリオーマ幹細胞における PDT 抵抗性についての検証

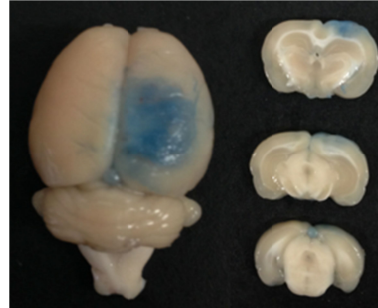
間葉型のグリオーマ細胞株である GBM13、30、1123 それぞれのグリオーマ幹細胞 (GSC) とグリオーマ娘細胞 (GDC) に対して *in vitro* で 5-ALA を 0.3mM 4 時間暴露後に PDT を行い、治療感受性を評価した。

細胞内 Pp レベルは FACS を用いて評価した。In vitro で ALA-PDT を行った GSC をヌードマウスの頭蓋内に植え込み、生存期間を評価した。ALA-PDT 後に生き残った細胞を 3 週間培養し、マイクロアレーで解析した。ALA-PDT で生き残った細胞の幹細胞マーカーを qRT-PCR で解析した。

(4) PDT 用光照射量の安全域の解明

Fisher ラットに、5-ALA (0, 30, 60, 90, 120,

240 mg/kg) の腹腔投与を行った。5-ALA 投与 4 時間後、右大脳 7×7mm の領域に頭蓋骨上から脳に対して 635nmLED 光 (100mW/cm²) を照射 (0, 100, 400 J/cm²) した。照射 48 時間後に Evans blue を静注し、Evans blue の漏出分布から BBB 障害の程度を評価し、H.E 染色にて組織傷害の有無と程度を評価した (下図)。尚、100mW/cm² を経頭蓋骨に照射した場合の透過光量は 44.3±2.96 mW/cm² (n=9) で、個体差は僅かであった。



4. 研究成果

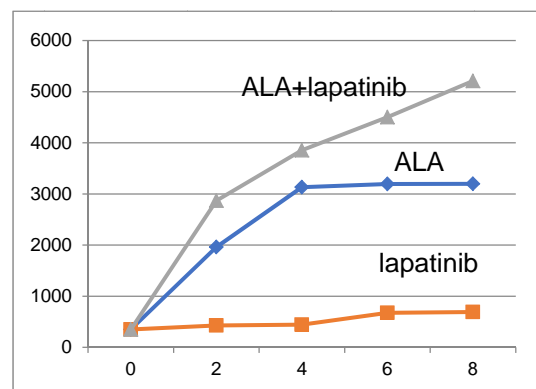
(1) 創薬分子デザインによる高効率 ABCG2 阻害剤 X の特定 (lapatinib が有力候補)

lapatinib が従来強力な ABCG2 阻害剤であると考えられてきた gefitinib よりも効果的な ABCG2 を阻害することが判明した。

(2) ALA と ABCG2 阻害剤 X ((lapatinib) の併用による腫瘍内外のポルフィリン量変化の解明

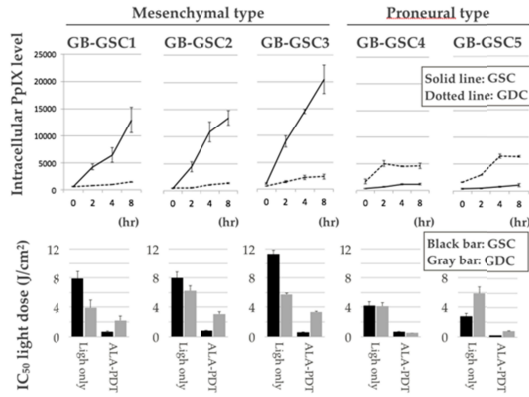
5-ALA 単独では細胞内のポルフィリン量は 4 時間辺りでプラトーになった。

5-ALA と lapatinib の併用群は 8 時間後には、ALA 単独に比較して細胞内ポルフィリン量は 60% 増加した (下図)。しかし、当初期待したほどの劇的な増強効果は得られなかった。

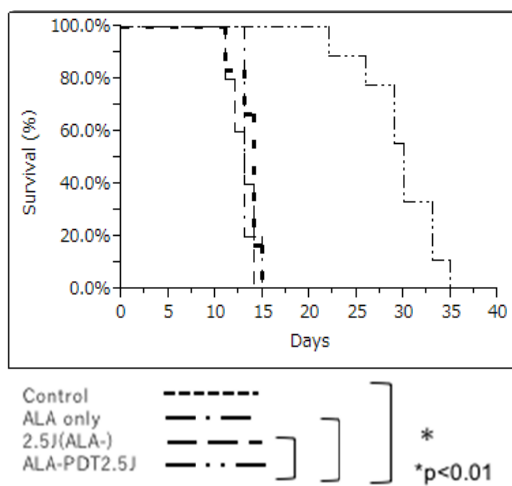


(3) グリオーマ幹細胞における PDT 抵抗性についての検証

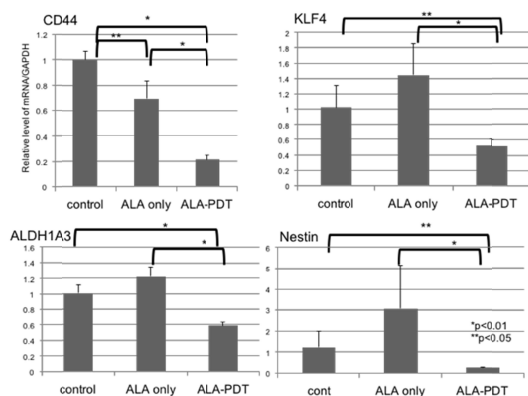
細胞内 Pp レベルは GSC が GDC よりも高く、治療感受性が高かった (下図)。



ALA-PDT 群ではヌードマウスの生存期間は著明に延長した(下図)。



ALA-PDTによりCD44, ALDH1A3, KLF4, Nestinの発現が低下した(下図)。



従って、ALA-PDTはGSCに対し有効な抗腫瘍効果を有し、幹細胞性を低下させる効果があることが判明した。

(4) PDT用照射量の安全域の解明

5-ALA 90mg/kg投与の100J/cm²で脳損傷が起こり始めた。5-ALAは臨床投与量の4倍であり、通常の投与量であれば安全にPDTが施行できることを示した(下表: BBBの破綻、

組織障害の有無を表す)。

ALA (mg/kg)	0	30	60	90	120	240
0 J/cm ²	-	-	-	-	-	-
100 J/cm ²	-	-	-	+	+	+
400 J/cm ²	-	-	-	+	+	++

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 1 件)

Ishikawa T, Kajimoto Y, Inoue Y, Ikegami Y, Kuroiwa T: Critical Role of ABCG2 in ALA-Photodynamic Diagnosis and Therapy of Human Brain Tumor. Adv Cancer Res 査読有り 125:197-21, 2015.

DOI: 10.1016/bs.acr.2014.11.008

[学会発表](計 10 件)

大村直己、梶本宜永、木村誠吾、藤城高広、野々口直助、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦。脳腫瘍幹細胞に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法におけるABCG2阻害薬併用による治療効果増強。第17回日本分子脳神経外科学会 2016年8月26日 帝京大学板橋キャンパス本部棟 臨床大講堂 東京都 板橋区

大村直己、朴 陽太、吉川信彦、野々口直助、梶本宜永、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦。ALA-PDTによる脳腫瘍幹細胞克服の可能性。第16回日本分子脳神経外科学会 2015年8月28日 アクトシティ浜松コンgresセンター 静岡県 浜松市

大村直己、朴 陽太、吉川信彦、野々口直助、梶本宜永、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦。ALA-PDTによる脳腫瘍幹細胞克服の可能性。第11回日本脳神経外科光線力学学会 2015年7月10日 京王プラザホテル 東京都 新宿区

大村直己、梶本宜永、木村誠吾、藤城高広、野々口直助、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦。5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法におけるABCG2阻害薬併用による治療効果増強 第32回日本脳腫瘍学会学術集会 2014年11月30日 シェラトン・グランド・トーキョーベイ・ホテル 千葉県 浦安市

木村誠吾、梶本宜永、藤城高広、大村直己、野々口直助、石川智久、小倉俊一郎、黒岩敏彦

彦.5-ALAPDT による正常脳での脳血液関門の破綻と組織傷害. 第 73 回日本脳神経外科学会総会 2014 年 10 月 9 日 グランドプリンスホテル新高輪 東京都 港区

大村直己、梶本宜永、藤城高広、野々口直助、木村誠吾、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦. 脳腫瘍幹細胞に対する 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における ABCG2 阻害薬併用による治療効果増強. 第 73 回日本脳神経外科学会総会 2014 年 10 月 9 日 グランドプリンスホテル新高輪 東京都 港区

野々口直助、宮田至朗、梶本宜永、石川智久、川端信司、古瀬元雅、鳴海善文、黒岩敏彦. 悪性脳腫瘍に対するアミノレブリン酸併用放射線治療の生物学的効果の検討. 第 15 回日本分子脳神経外科学会 2014 年 9 月 25 日 大手門パルズ 山形県 山形市

大村直己、梶本宜永、木村誠吾、藤城高広、野々口直助、中野伊知郎、石川智久、黒岩敏彦. 脳腫瘍幹細胞に対する 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における ABCG2 阻害薬併用による治療効果増強. 第 15 回日本分子脳神経外科学会 2014 年 9 月 25 日 大手門パルズ 山形県 山形市

梶本宜永. The role of 5-ALA-guided photodynamic diagnosis in the removal of brain tumor. 第 29 回日本脳神経外科国際学会フォーラム 2014 年 7 月 25 日 国立情報学研究所 学術総合センター 東京都 千代田区

黒岩敏彦、梶本宜永. 脳腫瘍に対する光線力学診断. (PDD) と光線力学治療 (PDT). 第 23 回脳神経外科手術と機器学会 (CNTT) 2014 年 4 月 18 日 ヒルトン福岡シーホーク 福岡県福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : Composition for prevention or treatment of treatment-resistant cancer
発明者 : Kuroiwa Toshihiko
権利者 : Kuroiwa Toshihiko
種類 : 特許
番号 : PCT/JP2015/054134
出願年月日 : 2015 年 2 月 26 日
国内外の別 : 外国

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒岩 敏彦 (KUROIWA Toshihiko)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30178115

(2) 研究分担者

梶本 宜永 (KAJIMOTO Yoshinaga)
大阪医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 30224413

(3) 研究協力者

石川 智久 (ISHIKAWA Toshihisa)
研究者番号 : 60193281