

## 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：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462414

研究課題名(和文)膀胱癌におけるヘムオキシゲナーゼ1の役割の解明と発現誘導による制癌効果の検討

研究課題名(英文)Elucidation of the function and the anti-tumor effects of heme oxygenase-1(HO-1) in bladder cancer.

研究代表者

井上 啓史 (INOUE, Keiji)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00294827

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)：近年、膀胱癌に対する光線力学診断における光感受性物質として、アミノレブリン酸(ALA)が用いられている。本実験において、光感受性物質であるアミノレブリン酸(ALA)投与により、癌細胞におけるヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)の発現の増加を認めた。さらに、このHO-1で誘導されるp21により、細胞周期をG1期で停止させ、抗腫瘍効果を示すことを認めた。本実験によりALAががん治療において有用な物質であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, aminolevulinic acid (ALA) is used as a photosensitive substance in the photodynamic diagnosis of bladder cancer.

It was revealed that the expression of heme oxygenase-1(HO-1) was increased by the addition of ALA in cancer cells. The increased expression of p21 induced by HO-1 led G1 arrest in cell cycle, resulted in anti-tumor effects.

In conclusion, this study demonstrated ALA was effective substance for cancer therapy.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1) アミノレブリン酸(ALA) p21 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

近年、膀胱癌に対する術中診断法として、光感受性物質であるアミノレブリン酸(ALA)を用いた光線力学診断(PDD)が実施されている。これはALAを投与した後に腫瘍特異的に蓄積するポルフィリンの蛍光により癌を診断する手法である。この診断の根幹であるALA投与後のポルフィリン蓄積に関して、鉄ポルフィリンを分解する酵素であり、ストレス応答タンパク質として知られるこのヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)が、腫瘍特異的に飛躍的に亢進していることが明らかとなった(Hagiya et al., Photodiagnosis and Photodynamic therapy 10, 288-95, 2013)。そこで、本研究ではHO-1に着目した。

2. 研究の目的

本研究ではストレス応答タンパク質として知られるこのHO-1の腫瘍での役割を詳細に検討する。さらに、ALA投与によって亢進するため、HO-1の発現亢進がもたらす抗腫瘍効果を検討することを目指した。

3. 研究の方法

HO-1の癌における役割を調べるために、培養細胞に対するHO-1発現量と悪性度の相関を詳細に解析する。特にマイクロアレイ等を用いてHO-1関連遺伝子を網羅的に解析する。また、発現抑制株や過剰発現株をin vitroにおいて構築し、その性質を調べる。さらに、ALAによってHO-1を含むこれらの遺伝子制御が行われるかを詳細に検討し、その有用性を統合的に評価する。

4. 研究成果

はじめにALAを添加した際における遺伝子群の変化を網羅的に測定した。その結果、ALA添加後にはHO-1ならびにp21の遺伝子変化が顕著であった。そこで本研究では主にHO-1とp21に照準を絞って以下の実験を行った(Fig.1)。HO-1とp21の発現をウエスタンブロッティングによってタンパク質レベルで確認した。本実験ではHepG2にALAと同時に2価の鉄イオンの供給源としてクエン酸第一鉄ナトリウム(SFC)を添加した。Fig.2にHO-1とp21のタンパク質発現の検出結果を示す。HO-1を介してp21誘導する化合物として報告があるHeminをポジティブコントロールとして用いた。Hemin添加によってHO-1とp21の発現増加が確認できた。

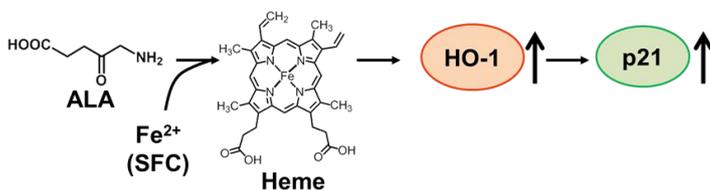


Fig.1 本研究の概念図

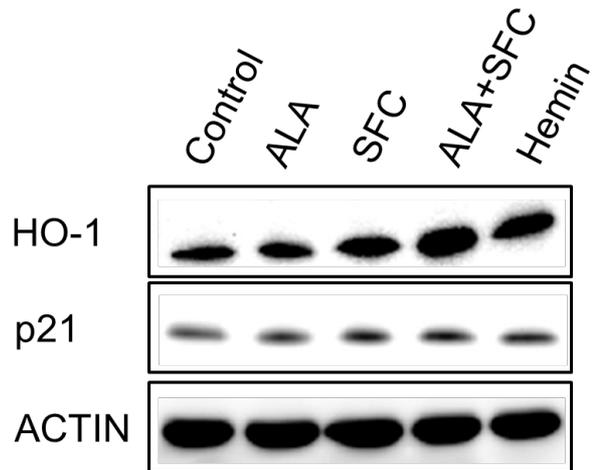


Fig.2 ALA 及び SFC 添加による HO-1 と p21 の発現変化

1 mM ALA、0.5 mM SFC、10 μM Hemin 含有培地で4時間培養後、Western blotting によって検出した。

また、ALA 単独添加により HO-1 の発現が増加することが分かった。これは細胞内でヘムが合成されたためであると考えられる。さらに ALA+SFC 共添加では ALA 単独添加に比べ HO-1 の発現が増加した。これは ALA 単独添加に比べ ALA+SFC 共添加では細胞内ヘム量が増加したためであると考えられる。p21 の発現は ALA 単独添加と ALA+SFC 共添加の両方で若干増加した。これは増加した HO-1 によって p21 が誘導されたためであると考えられる。

in vivo における ALA による HO-1 と p21 誘導効果を確認するために、253JBV を移植した担癌マウスを用いて実験を行った。担癌マウスより摘出した腫瘍組織における HO-1 と p21 の発現を Western blotting によってタンパク質レベルで検証した(Fig.3)。in vivo において ALA 投与による HO-1 の発現増加が確認できた(Fig.2)。これは in vivo においても、ALA 投与により細胞内ヘム量が増加したためであると考えられる。また p21 の発現も ALA 投与により増加した(Fig.2)。これは ALA 投与により増加した HO-1 が p21 を誘導したためであると考えられる。これらの結果は in vitro と同様の結果であった。以上の結果より ALA は in vivo においても腫瘍の細胞増殖を抑制する可能性が示唆された。

さらに ALA が HepG2 の細胞増殖へ与える影響を評価するために、HepG2 を、ALA 及び SFC 含有培地で暗所にて7日間培養した。24時間おきに細胞を回収し、生細胞数をトリパンブルー染色により計測した。

Control において HepG2 の細胞増殖が確認できた(Fig.4)。SFC 単独添加でも Control と同様に HepG2 の細胞増殖が確認できた(Fig.4)。

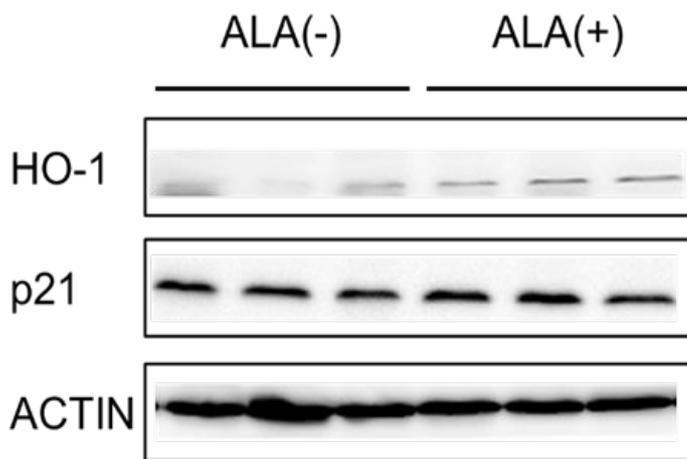


Fig.3 担癌マウスにおける ALA による HO-1 と p21 誘導効果  
253JBV がヌードマウスに生着した後に 50 mg / kg ALA を腹腔内投与した。投与 4 時間後に摘出した腫瘍組織からサンプルを調製し Western blotting によって HO-1 と p21 の発現を検出した。

一方で、ALA 単独添加及び ALA+SFC 共添加によって細胞増殖が抑制された (Fig.4)。特に ALA 及び SFC 添加 3 日目以降から顕著に細胞数が減少した。これは ALA 及び SFC 添加により誘導された p21 が HepG2 の細胞周期を G1 期で停止させたためであると考えられる。以上のように本研究では ALA 投与後に HO-1 から誘導される p21 の機能を詳細にしらべ、抗腫瘍効果を持つことを初めて明らかにしたものである。これは ALA はがん治療において有用な物質であることが示唆された。

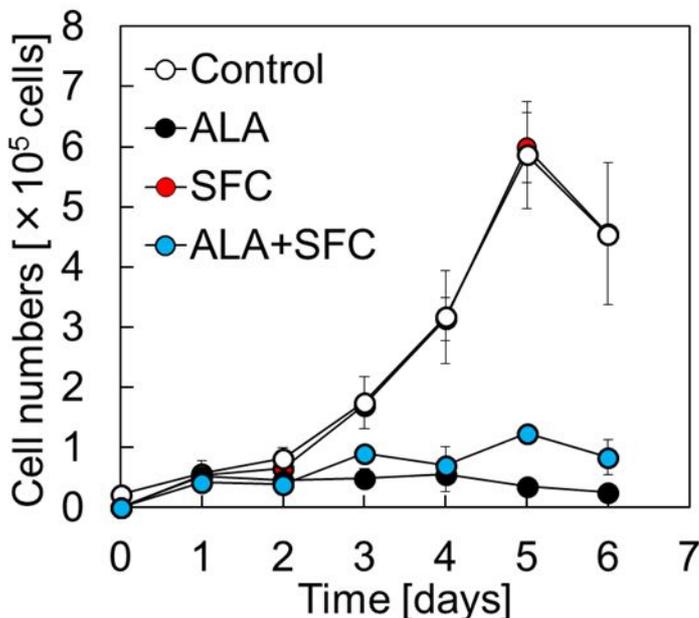


Fig.4 ALA による細胞増殖抑制効果  
HepG2 に 1 mM ALA 及び 0.5 mM SFC を添加し、24 時間おきに生細胞数を計測した。

#### 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 1 件)

1. Hayashi M, Fukuhara H, Inoue K, Shuin I, Hagiya Y, Nakajima M, Tanaka T, Ogura S. The effect of iron ion on the specificity of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid. PLoS One. 2015;10(3):e0122351. doi: 10.1371/journal.pone.0122351.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Shun-ichiro Ogura, Maiko Hayashi, Hideo Fukuhara, Keiji Inoue, Taro Shuin, Yuichiro Hagiya, Motowonakajima, Tohru Tanaka  
The effect of iron ion on the specificity of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA) 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies. 2015年 12月 15日 ~ 2015年 12月 20日, Honolulu, Hawaii.
2. 林麻衣子、井上啓史、福原秀雄、執印太郎、小倉俊一郎. アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における鉄イオンの役割. 第 73 回日本癌学会学術総会. 2014 年 9 月 25 日 (木) ~ 27 日 (土). パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市).
3. 林麻衣子、福原秀雄、井上啓史、執印太郎、田中徹、大倉一郎、小倉俊一郎. アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における鉄の添加効果. 第 38 回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会. 2014 年 9 月 6 日 (土) ~ 7 日 (日). 仙台国際センター (宮城県、仙台市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等 該当なし

## 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臨床医学  
部門・教授  
研究者番号：00294827

### (2)研究分担者

執印 太郎 (SHUIN, Taro)  
高知大学・その他部局・その他(教授相当)  
研究者番号：70128601

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

### (3)連携研究者 該当なし