

令和元年6月17日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11026

研究課題名(和文)膀胱癌細胞ミトコンドリア内における鉄利用メカニズムの解明とその臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of utilization of iron in mitochondria of bladder cancer cells and its clinical application

研究代表者

中井 靖(Nakai, Yasushi)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90445065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膀胱癌細胞を鉄で処理すると癌細胞が増殖し、5-アミノレブリン酸(ALA)で処理すると細胞増殖が抑制された。ALAを投与すると、膀胱癌細胞のミトコンドリアにおける鉄の発現が低下し、さらに、膀胱癌細胞内のフェリチン(鉄の蓄積)の発現が低下した。これは、膀胱癌細胞が増殖するために必要な鉄が、ALAによってミトコンドリア内で利用され膀胱癌細胞内での鉄が減少し、膀胱癌細胞の増殖が抑制される可能性が示された。このことはALAが新たな膀胱癌に対する治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

鉄を抑制するために鉄キレート剤を用いて癌を制御する可能性は昔から行われてきたことであるが、鉄は正常細胞にも必要であり、鉄キレート剤には副作用が懸念された。5-ALAはミトコンドリアで鉄を利用することで鉄を抑制し、癌制御を示した。このため、鉄をキレートせずに鉄を制御し、癌を抑制することが可能な新しい治療薬としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Iron prompted proliferation of bladder cancer cells. On the other hand, 5-aminolevulinic acid (ALA) inhibited proliferation of bladder cancer cells. When bladder cancer cells were treated with ALA, expression of iron in mitochondria of bladder cancer cells was decreased and expression of ferritin (accumulation of iron) was decreased, too. These results mean that ALA lowered level of iron which needs for proliferation of bladder cancer cells and inhibited proliferation of bladder cancer cells. These results indicates that ALA can be a new anti-tumor agent for bladder cancer.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 5-アミノレブリン酸 鉄 ミトコンドリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞におけるミトコンドリア機能が注目されているが、膀胱癌と鉄およびミトコンドリアについての報告は少ない。

鉄は昔から癌細胞の増殖に必要であり、鉄キレート剤が古くから制癌性を示すことは報告されていたが、鉄は正常細胞にも重要な物質であり、副作用が懸念された。そのため、鉄をキレートさせずに癌細胞内の鉄レベルを低下させることが長年の課題であった。

膀胱癌細胞ではヘム合成経路機能が低下しており、5-アミノレブリン酸 (5-ALA) を用いることで膀胱癌細胞で有意にプロトポルフィリンが蓄積する。これを利用して光力学診断が行われている。このヘム合成経路において鉄も必要な物質であり、これは癌細胞ではミトコンドリア内での鉄利用が低下していることが予測された。

つまり、膀胱癌細胞ではミトコンドリアでの鉄利用が抑制されており、鉄レベルが細胞内で上昇し、癌細胞増殖に寄与していると考えられた。

5-ALA を膀胱癌細胞へ投与すると、ヘム合成経路機能が低下しているものの、ヘム合成が促進されることが示されている。このため、5-ALA を膀胱癌細胞へ投与すると膀胱癌細胞内、特にミトコンドリア内で鉄が利用され、膀胱癌細胞内での鉄レベルが低下し、鉄キレート剤を用いることなく膀胱癌細胞内の鉄レベルを低下させることで、5-ALA が抗腫瘍効果を示す可能性が考えられた。

2. 研究の目的

膀胱癌細胞における癌細胞の鉄利用を明らかにし、5-ALA による膀胱癌細胞内での鉄利用による抗腫瘍効果について検討する。

3. 研究の方法

(1)膀胱癌細胞株である T24, MGHU3 細胞株にクエン酸第一鉄ナトリウム(SFC)を投与し、細胞増殖を評価した。さらに、T24, MGHU3 細胞株に 5-アミノレブリン酸(ALA)を投与し、細胞増殖を評価した。

(2)T24, MGHU3 細胞株に 0.5mM の SFC、1mM の 5-ALA で処理し、それぞれのフェリチン、トランスフェリンの発現をウエスタンブロットで検討した。

(3)T24, MGHU3 細胞株に 0.5mM の SFC、1mM の 5-ALA で処理し、ミトコンドリアにおける Fe^{2+} の発現を評価した。

(4)T24, MGHU3 細胞株に siRNA を用いフェロケラターゼの発現を低下させた。0.5mM の SFC、1mM の 5-ALA で処理し、細胞増殖、フェリチンの発現をウエスタンブロットで評価した。

(5)T24 細胞株において、seahorse を用いて、0.5mM の SFC、1mM の 5-ALA で処理し、ミトコンドリア内の呼吸機能を評価した。

(6) T24, MGHU3 細胞株を 0.5mM の SFC、1mM の 5-ALA で処理し、アポトーシスにつき検討した。

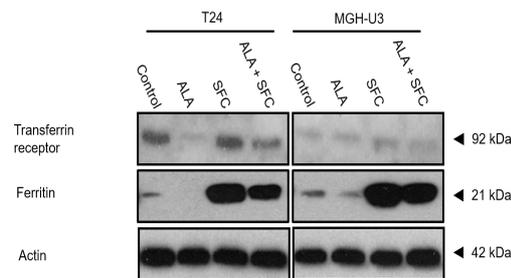
(7) 5-ALA で処理した T24 および MGHU3 細胞株の細胞周期について検討した。

(8) 0.05%N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine を用いた膀胱癌マウスにおいて、5-ALA、および SFC を経口投与し、その影響を検討した。

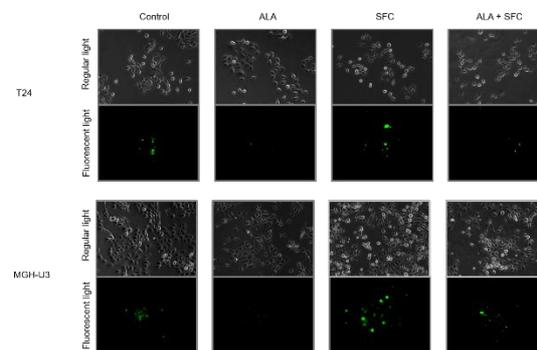
4. 研究成果

(1) T24 細胞株では、0.3mM 以上で有意に細胞の増殖が促進されており、MGHU3 細胞株では 0.6mM で細胞増殖が促進された。5-ALA で処理した際、T24、MGHU3 細胞株では、1mM 以上で有意に細胞の増殖が抑制されていた。

(2) SFC で処理した検体ではフェリチン、トランスフェリンの発現が亢進しており、5-ALA で処理した検体では、フェリチン、トランスフェリンの発現が低下していた。

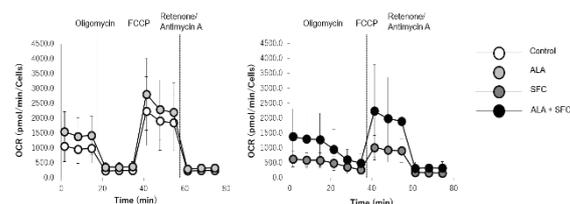


(3) 0.5mM の SFC で処理した検体ではミトコンドリア内での Fe²⁺の発現は亢進、1mM の 5-ALA で処理した検体ではミトコンドリア内での Fe²⁺の発現が低下していた。



(4) T24 細胞株では siRNA による ferrochelatase 発現低下を確認できたが MGHU3 細胞では発現低下が認められなかった。T24 細胞株では 5-ALA 酸で処理した際、5-ALA による細胞増殖の低下は認められなかった。

(5) SFC で処理した検体ではミトコンドリアでの呼吸能が低下し、5-ALA で処理した検体では呼吸能が亢進していた。

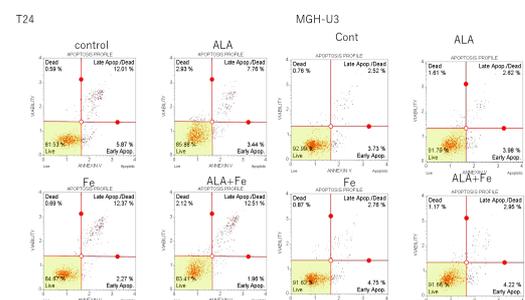


(6) T24 および MGHU3 細胞株において、SFC および 5-ALA で処理した検体においては、コントロールと比較してアポトーシスや細胞死に変化は認められなかった。

(7) 細胞周期の評価においては、コントロールと比較して 5-ALA で処理すると S 期の割合が増加した。

(8) 膀胱重量が 5-ALA を投与したマウス群の膀胱重量は、SFC を投与したマウス群の重量より軽かった。

5-ALA を投与したマウス 2 匹に膀胱癌が認められなかった。また、5-ALA を投与したマウスの膀胱癌部でフェリチンおよびトランスフェリンの発現は低下していた。



以上から、鉄は膀胱癌細胞の増殖に必要であり、5-ALA を投与すると鉄の利用がミトコン

ドリア内で進み、膀胱癌細胞における鉄レベルが低下し、細胞増殖が抑制される可能性が示された。さらにその機序としては当初考えていたアポトーシスではなく、S 期 arrest による可能性が示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

三宅牧人, 藤本清秀, 中井 靖 ほか

抗腫瘍効果を生み出す 5-アミノレブリン酸の可能性 日本腎泌尿器疾患予防医研会誌 査読無 26/1, 24-28

Miyake M, Tanaka N, Hori S, Nakai Y, K Fujimoto et al. Dual benefit of supplementary oral 5-aminolevulinic acid to pelvic radiotherapy in a syngenic prostate cancer model. Prostate 査読有 2019 ;79:340-351.

〔学会発表〕(計 1 件)

三宅牧人, 藤本清秀, 中井 靖 ほか

抗腫瘍効果を生み出す 5-アミノレブリン酸の可能性 第 26 回日本腎泌尿器疾患予防医学研究会

〔図書〕(計 0 件) 該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件) 該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件) 該当なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：三宅牧人

ローマ字氏名：Makito Miyake

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：助教

研究者番号（8桁）：80601400

研究分担者氏名：藤本清秀

ローマ字氏名：Kiyohide Fujimoto

所属研究機関名：奈良県立医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50264867

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀俊太

ローマ字氏名：Shunta Horii

研究協力者氏名：森澤洋介

ローマ字氏名：Yosuke Morizawa

研究協力者氏名：大西 小百合

ローマ字氏名：Sayuri Onishi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。