

機関番号：13301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890084

研究課題名（和文）腫瘍組織選択的5-アミノレブリン酸誘導プロトポルフィリン蓄積メカニズムの解明

研究課題名（英文）Evaluation of molecular mechanisms of tumor-specific protoporphyrin accumulation induced by 5-aminolevulinic acid

研究代表者

中西 猛夫 (NAKANISHI TAKEO)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

研究成果の概要（和文）：5-アミノレブリン酸（5-ALA）は腫瘍組織選択的に光増感性蛍光物質プロトポルフィリン IX（PPIX）の蓄積を誘導する光力学療法薬である。しかし、5-ALAによる腫瘍組織選択的 PPIX 誘導メカニズムは未解明である。本研究では、光線力学治療・診断に有効な腫瘍種を判断する分子診断技術の確立を目指し、5-ALA に曝露したヒト腫瘍組織由来株化がん細胞において、細胞内 PPIX 蓄積性決定因子を検討した。その結果、細胞内 PPIX 蓄積は、PPIX 生合成、フェロキラーゼ酵素活性、および PPIX の排出により決定されることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：5-Aminolevulinic acid is one of the most potent photodynamic therapeutic agents, because it induces tumor cell-specific intracellular accumulation of a photosensitizer, protoporphyrin IX (PPIX). However, molecular mechanisms of such 5-ALA-induced PPIX accumulation remain unclear. In the current study, in order to establish a basis to predict efficacy of photodynamic therapy to treat cancer, molecular mechanisms of intracellular accumulation of PPIX induced by 5-ALA were studied in various human cancer cell lines exposed to 5-ALA. Results suggested that PPIX accumulation is likely determined by PPIX biosynthesis, ferrochelatase (FECH) activity and PPIX efflux.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：薬物動態学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：トランスポーター、アミノレブリン酸、プロトポルフィリン、化学療法、フェロキラーゼ、光力学療法、有機アニオン

1. 研究開始当初の背景

5-アミノレブリン酸（以下 5-ALA）は天然に存在するアミノ酸であり、生体内で酸素の

運搬に働くヘムの生合成中間体として生理的に重要な物質である。一方、がん患者に 5-ALA を投与すると、ヘムの前駆体である光感受性物質プロトポルフィリン IX（以下

PPIX) が腫瘍組織に選択的に蓄積することが古くから知られてきた。1990 年に Kennedy らによって基底細胞がんの光線力学的療法 (PDT) に 5-ALA の有効性が示されて以来(*Photochem Photobiol B*, 14: 275-92,1992)、5-ALA は PDT 薬として臨床で使用されてきた。さらに、PPIX は波長 410 nm の光により励起されて固有の赤色蛍光を発するため、5-ALA は神経膠種などの悪性腫瘍の不鮮明領域を可視化する術中蛍光診断 (FD) に用いられ、腫瘍摘出率の向上と予後の改善に効果を発揮している。しかし、5-ALA を用いた PDT/FD の効果や感度は、がん種や進行度、悪性度によって様々であり、現在でも腫瘍選択的な PPIX 蓄積機構についても未解明な点が多く残されている。

研究開始時点では、腫瘍組織の選択的な PPIX 蓄積機構として、PPIX からヘムを合成する酵素フェロキラーゼ (FECH) の発現低下などの要因が重要であると報告されていた。さらに、5-ALA の細胞内取り込みには PEPT1 など複数のトランスポーターの関与も報告されており、腫瘍への PPIX 蓄積性を決める因子は明確ではなかった。そこで本研究では PPIX 蓄積性に寄与する因子として、FECH 活性の変動、細胞内での PPIX 生合成、5-ALA の細胞内取り込みならびに PPIX の細胞外排出の 4 因子に着目し、種々のヒトがん組織由来株化細胞において各因子と PPIX の蓄積性との関係について検討した。5-ALA による腫瘍選択的 PPIX 蓄積機構解明は、がんの悪性度や進行度などの個体差に基づく PDT/FD の有効性および安全性変動を予測し、PDT/FD の個別化の実現に寄与すると期待された。

2. 研究の目的

5-ALA 投与後の細胞内における PPIX 蓄積性にかかわる主な分子メカニズムには、

- (1) FECH 酵素の活性
- (2) 5-ALA 取り込み活性
- (3) PPIX 生合成活性

(4) PPIX 排出活性

が考えられた。研究代表者はこれまでに、5-ALA を輸送するオリゴペプチドトランスポーターやアミノ酸トランスポーターの研究に関わってきたため、がん細胞において 5-ALA を輸送するトランスポーターに関して研究を展開した。研究を開始した当初では、個々の分子メカニズムについては、正常組織 (細胞) とがん組織 (細胞) における比較した結果が報告されていた。しかし、1つ1つのメカニズムが PPIX の蓄積性に如何に寄与するかを明確に示す系統的な研究報告は見られなかった。また、5-ALA 投与後の PPIX 蓄積性のがん細胞でどのように決定されるのかを解明するために、究極的にはヒトがん組織由来試料を近傍の正常組織と比較することが欠かせないが、生体試料の入手には倫理上問題を考慮する必要があるばかりでなく、実験を遂行するにあたり十分な試料を入手する体制を整備することは容易でなかった。そこで、本研究においては、種々のヒトがん組織由来の株価細胞を用いて、PPIX 蓄積性決定因子の解明を目的に研究を展開した。

3. 研究の方法

【細胞培養】

10 種類のヒトがん組織由来細胞株は 37°C、5% CO₂ 存在下インキュベーター内にて、抗生物質および 10% FBS を含む液体培地 (RPMI-1640 等) 中で培養した。

【細胞内への 5-ALA の初期取り込み活性】

24-well プレートに培養したがん細胞に [³H]5-ALA (20nM) を含む培地を添加し、37°C で所定時間インキュベートし、細胞内放射活性を測定することにより 5-ALA の初期取り込み活性を測定した。一方、対象のトランスポーターによる 5-ALA の取り込みについては、トランスポーター遺伝子をヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に安定的に導入、または *in vitro* で合成した目的トランスポーター遺伝子 (cRNA) をアフリカツメガエル卵母細

胞に注入し、トランスポーターを発現させた後 5-ALA の輸送活性を評価した。

【細胞内 PPIX 蓄積性測定】

24-well プレートに培養したがん細胞に 5-ALA (1mM) を含む培地を添加し、37°C 遮光下で所定時間インキュベートした。細胞内 PPIX は 0.5 mM 過塩素酸/50% (v/v) メタノール溶液を用いて抽出し、マイクロ蛍光プレートリーダー(PerkinElmer、Japan)を用いて定量した(ex:408 nm、em:620nm)。10 時間反応させたときの値を定常状態での PPIX の蓄積量とした。さらに、細胞からの PPIX の排出活性については、培地に PPIX を添加したのち 1 時間プレロードした後、培地から PPIX を除去し細胞内に残存する PPIX を測定することにより PPIX の排出を評価した。

【FECH 活性の測定】

がん細胞における FECH 活性は細胞ホモジネートを用いて測定した。各がん細胞ホモジネート(約 5×10^7 個)を調製し、PPIX および酢酸亜鉛を添加し 37°C で所定時間反応させたのち FECH により生成される PPIX-Zn を HPLC により分離し蛍光検出器(ex:415 nm、em:580 nm)を用いて定量した。熱処理(99°C、5 min)したホモジネートを用い非酵素的反応により生成される PPIX-Zn 量を求め、がん細胞における FECH 活性を評価した。

【PPIX 生合成速度の測定】

各がん細胞ホモジネート(約 5×10^7 個)を調製し、5-ALA (0.5-100 nM) および FECH 酵素阻害剤である desferoxamine (DFO、10 mM) を添加し 37°C で所定時間反応させた。ホモジネート中の PPIX 量は上述のように HPLC を用いて定量した。熱処理(99°C、5 min)したホモジネートを用い非酵素的反応により生成される PPIX 量を求め、がん細胞における PPIX 生成活性を評価した。

【PPIX 排出する BCRP 遺伝子発現解析】

培養したヒトがん組織由来細胞株から抽出された RNA を用いて、PPIX の排出にかかわる

BCRP 遺伝子発現を RT-PCR により検討した。ヒト BCRP に特異的なプライマーは、以下のとおりである。

Forward: 5' -GTTTCAGCCGTGGAAC-3'
Reverse: 5' -CTGCCTTTGGCTTCAAT-3'

【トランスポーター/酵素活性の規格化】

トランスポーターおよび酵素活性は Bradford 法(*Anal Biochem*, 72:248-54,1976)により測定した細胞中のタンパク量で規格化した。

4. 研究成果

【OAT、OATP による 5-ALA 輸送】

5-ALA 膜透過機構を検討するため、ヒト由来の種々のがん細胞株において放射性標識された 5-ALA 取込みを測定した。研究代表者らは、5-ALA が生理的条件下で有機酸として存在することに着目し、ヒト有機アニオントランスポーターとして OAT や OATP による 5-ALA 輸送をヒト株化癌細胞で検討した。様々な OAT を発現するヒト肝がん HepG2 細胞における $[^3\text{H}]5\text{-ALA}$ の初期取込みは、有機アニオン性薬物プロベネシドで顕著に阻害された。アフリカツメガエル卵母細胞外来遺伝子発現系や HEK293 発現系を用いて、様々な有機アニオントランスポーター(OAT1-3、OATP1B3、OATP2B1)による 5-ALA 輸送を検討した結果、OAT2 によって 5-ALA が輸送されることが初めて明らかにされた。HEK293/OAT2 細胞による $[^3\text{H}]5\text{-ALA}$ 取り込みは、時間依存的に増加し、10 分まで取り込みに直線性が見られた。また HEK293/OAT2 細胞による 5-ALA の取り込みには飽和性が見られ、 K_m は 4.69 ± 3.04 mM、 V_{max} は 20.0 ± 4.41 nmol/10min/mg protein と見積もられた。従って、これらの結果から、5-ALA が OAT2 の内因性の基質であることが同定された。OAT2 を発現する肝がんや腎臓がん細胞で 5-ALA の細胞内蓄積が増加することが考えられた。本研究成果は日本薬剤学会第 25 年回(2010 年、徳島)で

報告され、現在論文投稿準備中である。

【細胞内 PPIX 蓄積性決定因子の検討】

がん細胞における FECH 活性が PPIX の蓄積性の主要因と考えられていたため、研究代表者らは FECH 酵素活性の他に、種々のがん細胞において 5-ALA 取り込み活性、PPIX 生合成活性、PPIX 排出活性について測定し細胞内 PPIX 蓄積性の要因を検討した。

FECH 活性と 5-ALA 曝露後定常状態における細胞内 PPIX 蓄積量との関係を 9 種のがん細胞株で求めた結果、4 種のがん細胞株で FECH の活性の増加に伴い細胞内 PPIX 蓄積量が減少し一定の負の相関関係がみられた。

しかし、LS180、T-24、LNCaP、MCF-7 細胞の 4 種の細胞株においては、FECH の活性がほぼ等しいにもかかわらず、PPIX 蓄積量には最大の LS180 細胞と最小の MCF-7 細胞の間で 4.7 倍の差が観察された。これらの細胞株において、(1)5-ALA の取り込み速度は PPIX の生合成速度より数百倍大きいこと、(2)PPIX 生合成速度は LS180 細胞で MCF-7 細胞より約 2 倍大きいこと、(3)PPIX 排出活性は MCF-7 細胞で LS180 細胞より約 2 倍大きいこと、が示された。さらに、PPIX を排出するトランスポーターである BCRP の遺伝子発現を定量的 PCR により解析した結果、PPIX の蓄積が最大だった LS180 細胞では BCRP の発現が検出されず、PPIX 蓄積性最小で PPIX の排出活性が高かった MCF-7 細胞において、BCRP の発現が最も高かった。さらにこの 4 種の細胞群では PPIX の蓄積性と BCRP mRNA の発現に優位な順位相関がみられたことから、BCRP の発現は PPIX の蓄積に影響があることが示唆された。以上のことから、細胞内 PPIX 蓄積性には、5-ALA 投与時の比較的高い血漿中濃度（数百 μM ~ 数 mM ）を考慮すると、(1) 5-ALA 細胞取り込みには PPIX の蓄積性に対する寄与は小さいこと、(2) FECH の活性に変化がみられなくても PPIX の生合成速度と排出速度が変化により PPIX 細胞内蓄積性が大きく変化することが示唆された。また、(3) 排出には BCRP

が寄与することが推測された。本研究の成果は学術論文として準備中である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

- ① 小川哲郎、中西猛夫、白坂善之、松井裕史、玉井郁巳(ヒト癌細胞株における OAT2 を介した光線力学療法薬 5-アミノレブリン酸の細胞膜輸送)、日本薬剤学会第 25 年会、2010 年 5 月 14 日、あわぎんホール徳島県強度文化会館 (徳島市、徳島)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 猛夫 (NAKANISHI TAKEO)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：30541742

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

玉井 郁巳 (TAMAI IKUMI)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号：20155237

白坂 善之 (SHIRASAKA YOSHIYUKI)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：60453833