

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592147

研究課題名(和文) グリオーマ幹細胞を標的とした光線力学療法の開発：ポルフィリン排泄と分化の制御

研究課題名(英文) Development of photodynamic therapy targeted at glioma stem cells

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) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞の治療抵抗性の一因であるABCG2は、5-ALA光線力学治療(5-ALA PDT)のポルフィリン(PpIX)を細胞外に排出する。従って、ABCG2制御は、5-ALA PDTの効果を高め、がん幹細胞の治療抵抗性を克服の鍵となる。

本研究では、ABCG2の阻害剤によるPpIX排泄の抑制が、細胞内PpIXを上昇させ、5-ALA PDT効果を増強することを明らかにした。一方、A172グリオーマ幹細胞では、5-ALA PDTでの治療感受性がであった。従って、5-ALA PDTはがん幹細胞の制御に有用であり、ABCG2併用によりこの効果が増強される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells is a main cause of resistance of various cancer therapies. ABCG2 transporter, which is highly express in cancer stem cells, also transport excessive porphyrin to extracellular space. Therefore, controlling ABCG2 may enhance the effect of 5-ALA PDT and may control cancer stem cells.

In this study, we found that more than a half of porphyrin by produced by 5-ALA administration transported to extracellular space, and inhibition of ABCG2 transporter increased intra-cellular porphyrin and enhanced 5-ALA PDT effect. Furthermore, A172 glioma stem cell had a nature of 5-ALA PDT sensitivity, rather than resistance. These results indicated that 5-ALA PDT and/or combined with ABCG2 inhibitor may useful for controlling the cancer stem cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：光線力学治療 5-アミノレブリン酸 ポルフィリン 脳腫瘍 悪性グリオーマ がん幹細胞 ABCG2

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、がんの治療抵抗性の主要因である。がん幹細胞には、薬剤排泄トランスポーター(ABCG2)が高発現するが、この ABCG2 は 5-ALA 光線力学治療(5-ALA PDT)における光感受性物質であるポルフィリンを細胞外に排出する。従って、ABCG2 制御は、5-ALA PDT の効果を高め、がん幹細胞の治療抵抗性を克服するための鍵となる。

2. 研究の目的

第一の目的は、がん幹細胞の光線力学療法治療抵抗性の有無を明確にする。

第二の目的は、がん幹細胞に関係の深い薬剤排泄(ABCG2)を制御することによる光線力学療法の作用増強効果を確認する。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞の 5-ALA PDT の治療抵抗性の評価。

A172 グリオーマ幹細胞の治療抵抗性評価

A172 グリオーマ細胞および A172 細胞を無血清培地にて 10 日間培養して作成した A172 グリオーマ幹細胞を用いた。0.3 mM 5-ALA にて 4 時間培養した後、励起光(405nm, 635nm)にて PDT を行い WST-8 アッセイにて治療効果を評価した。また、細胞内プロトポルフィリン IX(PpIX)量は、FACS で測定した。また、ポルフィリン関連遺伝子発現を RT-PCR により評価した。

A172 グリオーマ幹細胞の幹細胞性

幹細胞性は、CD133 および Sox-2 の細胞膜上での発現にて評価した。

A172 グリオーマ幹細胞の薬剤抵抗性評価。

A172 グリオーマ細胞および A172 細胞を無血清培地にて 10 日間培養して作成した A172 グリオーマ幹細胞を用いた。cisplatin, temozolomide, paclitaxel, irinotecan と種々の濃度で添加し、殺細胞効果を WST-8 アッセイにて評価した。

(2) グリオーマ細胞株および髄膜腫細胞株でのポルフィリンの細胞外輸送の証明。

ポルフィリン産生の経時的・定量的評価

U87MG および U87 を 5-ALA (0.1mM) 下で培養し、培養プレート上で経時的に産生されたポルフィリン量を培養プレート上で蛍光光度計 Fluoroskan Ascent 2.5 を用いて定量した。

ポルフィリン排出能の定量的評価

培養 6 および 12 時間後に、細胞外液と細胞成分を分けて測定することでポルフィリンの排出を評価した。

(3) Gefitinib によるポルフィリン排出の抑制効果の評価。

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を

5-ALA(0.1mM)下で 24 時間培養し、gefitinib 0.01 ~ 100 μ M 投与時の細胞内および細胞外のポルフィリン量を蛍光光度計 Fluoroskan Ascent 2.5 を用いて定量した。

(4) Gefitinib による 5-ALA 光線力学治療の増強効果の検証。

Colony forming assay による殺細胞効果
グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を 5-ALA (1mM) の環境下で 48 時間培養し、同時に Gefitinib を (0.01, 0.1, 1, 10 μ M) 投与した。その後、半導体 Laser (405 nm、10mW/cm²) を 0、1、3、5、10 分間照射 (0 ~ 6 J/cm²) し、Corony forming Assay 法を用いて殺細胞効果を定量化した。

(5) Gefitinib による ABCG2 発現抑制効果 (mRNA, 蛋白) の評価。

細胞膜上 ABCG2 量の測定 (FACS):

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を gefitinib 0.1 μ M の環境下で 48 時間培養し、抗 ABCG2 モノクローナル抗体 (間接法) で染色し、FACS を用いて細胞膜上の ABCG2 量を測定した。

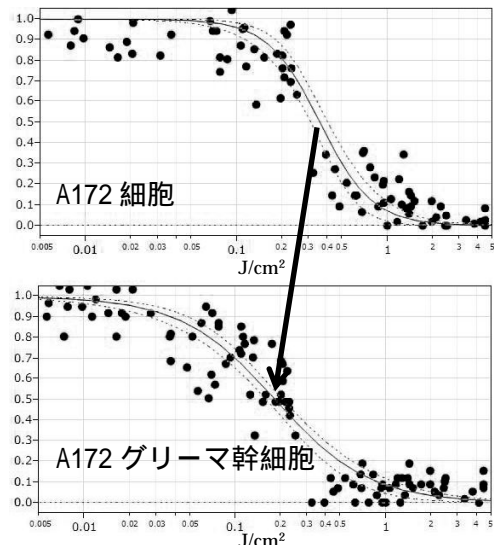
ABCG2 の mRNA の測定 (qRT-PCR):

グリオーマ細胞株 (U87MG, U118MG, A172, T98G) および髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee) を gefitinib 1 μ M の環境下で 48 時間培養した後、mRNA を抽出し、cDNA に変換、Real time PCR を用いて定量した。スタンダード細胞として HepG2 を用い、RNA 量は、GAPDH との相対値とした。

4. 研究成果

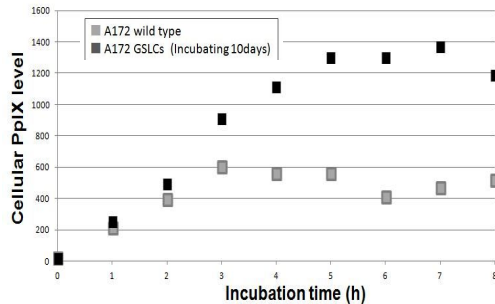
(1) がん幹細胞の 5-ALA 光線力学療法における治療抵抗性の評価。

A172 グリオーマ幹細胞は 5-ALA 光線力学療

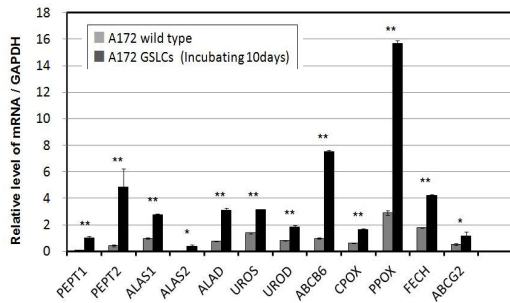


法治療感受性がある。

5-ALA 光線力学治療において A172 細胞の LD50 は 0.33J/cm² であったのに対して A172 グリオーマ幹細胞では LD50 は、0.18J/cm² と低い照射量で殺細胞効果が表れた。この現象は、グリオーマ幹細胞では 5-ALA 光線力学治療にたいして治療抵抗性でなく、むしろ治療感受性であることを示唆する。



細胞内 PpIX は、グリオーマ幹細胞の方が約 2 倍細胞内に蓄積しており、治療感受性の原因であった。

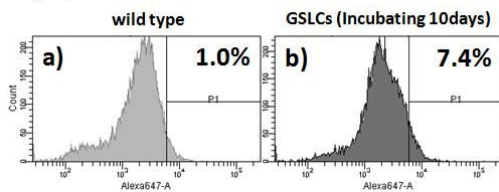


グリオーマ幹細胞ではすべてのポルフィリン代謝関連酵素発現が高く、特に PEPT1,2 や ABCB6 で顕著であった。

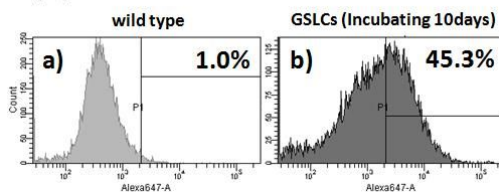
A172 グリオーマ幹細胞の幹細胞性

A172 グリオーマ幹細胞では、CD133 および Sox-2 の細胞膜上での発現が、A172 細胞と比較して高かった。

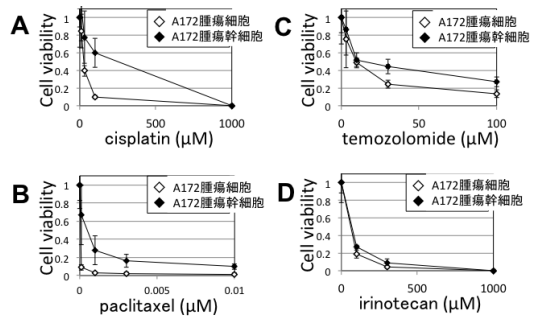
(A) CD133



(B) Sox-2



A172 グリオーマ幹細胞の薬剤抵抗性評価。

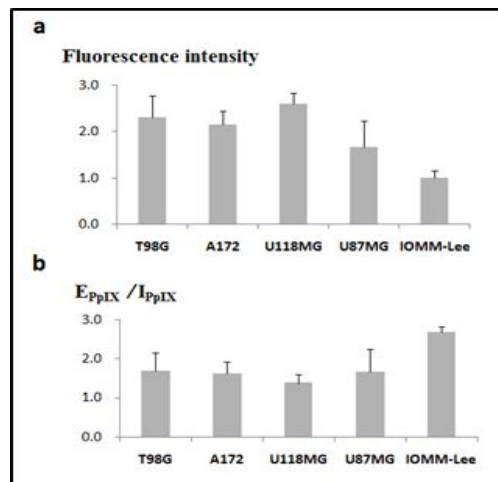


いずれの抗癌剤に対しても A172 グリオーマ幹細胞は治療抵抗性を示した。

(2) グリオーマ細胞株・髄膜腫細胞株におけるポルフィリンの細胞外輸送の証明。

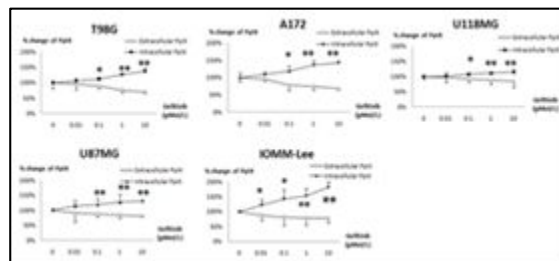
すべての細胞株において、細胞内において PpIX の産生を認めた (下図 a)。

また、細胞内のポルフィリンの細胞外輸送が活発な (Eppix/Ippix の高い) 細胞株ほど (下図 b) 細胞内のポルフィリン濃度は低い傾向にあった。



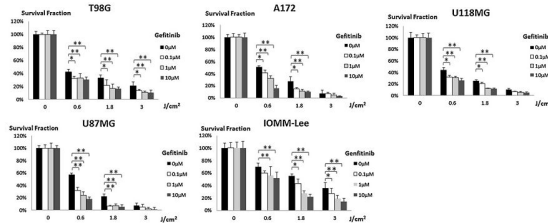
(3) Gefitinib によるポルフィリン排出の抑制効果

また、すべての細胞株において Gefitinib は、10 μM に至るまで用量依存的に細胞内 PpIX 濃度を増加させ、細胞外 PpIX 濃度を低下させた。



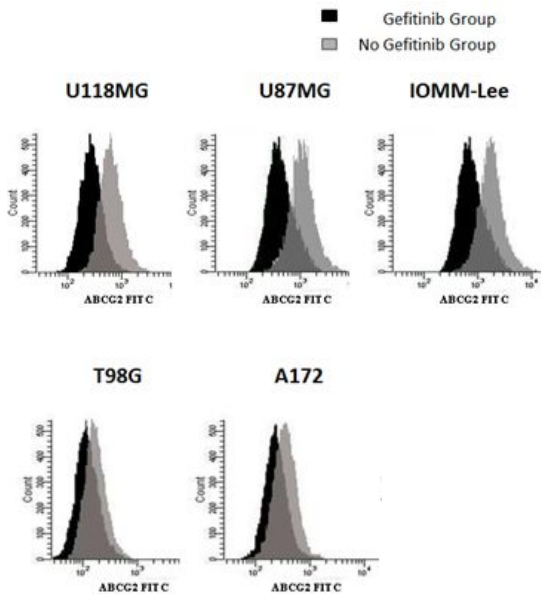
(4) Gefitinib による 5-ALA 光線力学治療の増強効果

ポルフィリンの細胞内蓄積の結果として、Gefitinib が 5-ALA の PDT 作用を用量依存的に増強した。



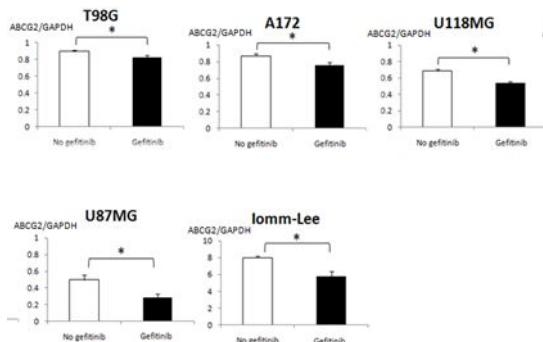
(5) Gefitinib による ABCG2 発現抑制効果
細胞膜上 ABCG2 量の測定 (FACS):

すべての細胞株において、gefitinib 投与により細胞膜表面の ABCG2 蛋白の発現が低下した。



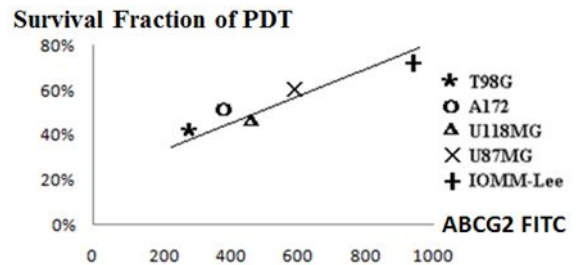
ABCG2 の mRNA の測定 (qRT-PCR)

Gefitinib の ABCG2 阻害作用の一部は、mRNA レベルでの発現を阻害であることが判明した。



(6) ABCG2 発現と PDT 効果の関係

細胞膜上での ABCG2 の発現が高いほど、光線力学効果は減弱していた。



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)

Wei Sun, Yoshinaga Kajimoto, Hiroto Inoue, Shin-Ichi Miyatake, Toshihisa Ishikawa, Toshihiko Kuroiwa. Gefitinib enhances the efficacy of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in malignant brain tumor cells. Photodiagnosis and photodynamic therapy 10: 42-50, 2013. (査読有り)

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・講師
研究者番号：30224413