

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10713

研究課題名(和文) 卵巣癌の5-アミノレブリン酸による光線力学診断と新規治療の確立

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis of ovarian cancer by 5-aminolevulinic acid and establishment of novel treatment

研究代表者

水野 美香 (Mika, Mizuno)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍免疫学部・研究員

研究者番号：50588837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学療法(PDT)は、癌に対する低侵襲性治療である。5-アミノレブリン酸(ALA)は、増感剤であるプロトポルフィリン(PpIX)の前駆物質である。難治性卵巣がんに対するALA-PDTの有効性の検証と作用増強の関連因子の検討を、卵巣がん細胞株を用いたin vitro, in vivo実験で行った。

様々な卵巣がんの細胞株を用いて、ALA-PDTの殺細胞効果を確認したが、とくに、化学療法抵抗性の高い予後不良な明細胞腺癌においても、効果があること、その要因にALAの取り込みとPpIXの排泄における各々のトランスポーターPEPT1とABCG2の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy (PDT) is known as a minimally invasive treatment for cancer. 5-Aminolevulinic acid (ALA) is a precursor of the photosensitizing agent protoporphyrin IX (PpIX). We evaluated the efficacy of ALA-PDT and investigated relevant factors of enhancement of effect on various ovarian cancer cells in vitro and in vivo.

We confirmed the effect of ALA-PDT using various ovarian cancer cell lines. Especially, we found that three cell lines of clear cell carcinoma, which is chemoresistance tumor, were also highly sensitive to ALA-PDT. The cell lines sensitive to ALA-PDT expressed PEPT1 (an ALA uptake transporter) and the cell line resistant to ALA-PDT expressed ABCG2 (a PpIX export transporter). In the resistant cell line, a combination treatment with both ALA and an ABCG2 inhibitor resulted in the promotion of cytotoxic sensitivity in vitro.

研究分野：婦人科悪性腫瘍

キーワード：5-aminolevulinic acid Photodynamic therapy 卵巣がん 難治性癌

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんは最も予後不良な婦人科癌であり、その診断と治療成績の向上は期待されている。卵巣がんの主な進展様式である腹膜播種の診断と治療が予後改善に寄与すると考えた。我々は、婦人科癌の転移・浸潤に上皮間葉転換の関与、治療耐性に関与するがん幹細胞において多くの研究を行ってきている。光線力学療法 (photodynamic therapy: PDT) は、光感受性物質が腫瘍特異的に集積する特性を利用し、励起光を照射し、一重項酸素などの reactive oxygen species (ROS) を発生させ、腫瘍細胞を致死損傷させる低侵襲治療法の一つである。光増感剤 porfimer sodium と大型で高価な excimer dye-laser を用いた早期子宮頸癌に対する PDT は、表在性食道癌、表在性胃癌、早期肺癌と共に、世界に先駆けて 1994 年 10 月に厚生省が認可、1995 年 4 月より薬価収載された。しかし、日光過敏症などの副作用の懸念や 2-3 週間の入院も必要とされ、普及率は高くない。近年、5-アミノレブリン酸 (5ALA) は脳腫瘍の光線力学診断薬として 2013 年に本邦でも承認された。また、光線力学療法 (PDT) の治療薬としての有用性も報告されつつあり、我々も 2012 年より子宮頸部上皮内腫瘍 (CIN1-3) に対する 5ALA-PDT の臨床試験を行っていた。

2. 研究の目的

侵襲性の低い増感剤の前駆物質である (5ALA) を用いて、難治性かつ播種形式で進展する卵巣がん細胞株を用いて、PDD, PDT の有用性を検討。および、PDT 効果増強の点において、5ALA の代謝経路だけでなく、上皮間葉転換因子からのアプローチを行い、臨床応用の実現を目的とする。

3. 研究の方法

卵巣癌播種の診断の臨床応用に向けて 5ALA-PDD の有用性を検討。様々なヒト卵巣癌細胞株を用いて、励起光を照射した際の PPIX の細胞内の集積を *in vitro* で確認、播種に対する 5ALA-PDT の有効性を確認。様々な卵巣がん株を用いて、5ALA-PDT の有用性を検討する。とくに、採用増強に関わる取り込み、排泄に関わるトランスポーターなどの関連因子の検討も行った。漿液性腺癌株、抗がん剤耐性株、明細胞がん株など様々なヒト卵巣がん細胞株において、5ALA-PDT の治療効果を検討してきた。【1】その中で、特に非常に予後不良で、化学療法抵抗性が強い明細胞がんに着目し、以下の方法で研究を行った。【2】癌幹細胞の性格を有する卵巣がん細胞株を用いて、同様の結果を行った。各々結果を後述する。

【1 方法の詳細】

ヒト明細胞癌細胞株 ES2・TOV21G・KOC7C・OVTOKO・RMG1・RMG2・OVMANA を用いて ALA-PDT の殺細胞効果・PpIX 蓄積量・PpIX の蓄積に関わる因子の遺伝子発現解析を行った。PDT の光源は赤色発光ダイオード (Light

Emitting Diode :LED)、ピーク波長 631 nm・照射出力 17.4 mW/cm² を使用した。

1) ALA-PDT の殺細胞効果の検討

各細胞株を 96 well 培養プレートに播種し培養した。24 時間後 5ALA を 0-1000 μM の各濃度で培地交換にて添加し遮光下で 4 時間培養した。次に PBS (-) で洗浄した後に新たな培養培地に交換し赤色 LED 光源を 600 秒間照射した。照射から 24 時間培養した後に WST8aasy 試薬を用いて細胞生存率の評価

2) 細胞内外 PpIX 蓄積量の検討

5ALA 投与後の細胞内外の PpIX 蓄積量を測定した。各細胞株を 96 well 黒色培養プレートに播種した。24 時間後 5ALA を 0-1000 μM の各濃度で添加し 4 時間培養した。細胞内・細胞外における PpIX の蓄積量は蛍光プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

3) PpIX 蓄積の関連因子の遺伝子発現解析。Real-time PCR を用いて PpIX の細胞内への蓄積に関わる因子の遺伝子発現解析を行った。5ALA の細胞内への取込みに関わる因子としてペプチドトランスポーター :PEPT1・PEPT2、taurine のトランスポーター :TAUT、γ-アミノ酪酸のトランスポーター :GAT2、プロトン共役アミノ酸トランスポーター :hPAT1 の解析を行った。PpIX の細胞外排出に関わる因子として ABC トランスポーターの ABCG2、ヘム合成経路に関わる酵素 :ferrochelatase (FECH) の遺伝子発現を解析した。

4) ABCG2 阻害剤を使用した 5ALA-PDT・PpIX 蓄積量の検討。 ABCG2 の特異的な阻害剤である Fumitremogin C (FTC) を使用し 5ALA-PDT の増強効果を調べた。同様に PpIX 蓄積量の増加効果も検証した。

【2 の方法も 1 と同様に CD133 陽性 NOY1 細胞株を用いて行った】

4. 研究成果 (図表は雑誌論文 1 より抜粋)

【1】1) 5ALA-PDT の有効性

5ALA-PDT から 24 時間後の細胞生存率を Figure1 に示す。光照射群では全ての細胞株で 5ALA の濃度依存性に細胞生存率の低下を認めた。各細胞株の 5ALA-PDT に対する効果の指標に IC50 を用いて評価した。Figure1 の結果から 5ALA 濃度の IC50 を算出し、細胞株間の検討を行った。

RMG1、RMG2、OVMANA 株では IC50 の値が 56-97 μM と低く 5ALA-PDT に対する感受性が高いことを示した。RMG1、RMG2、OVMANA 株では ALA250 μM で細胞生存率が 20% 近くまで減少を認めた。一方で ES2 株では IC50 の値が 882 μM と高く、ALA-PDT に対して最も抵抗性を示した。ES2 株では ALA1000 μM における細胞生存率は 40% に達しなかった。また光照射を行わな

Primer	Sequence	Primer	Sequence
PEPT1	F:GGCAGGCCAGTTCAGCAA R:AGCAACCGCGCAATAGAA	hPAT1	F:TCTGCCGAGGCTGAATAAA R:AGTCCACAACAAGCTTCC
PEPT2	F:CAGCAGGGTTCACGATGGA R:GGTCCGGCTGAAGCACAA	FECH	F:AGTCTAACATCAGGAAGCCGA R:AGTGTATGAGGTTCTCGGTC
TAUT	F:AGGAGCTCCCAACAAGCA R:GGAGTTTTCCCTCAGCCTC	ABCG2	F:TTTACGGCTTTGAGCATAATG R:TCTTCGGCATCATGTTGCAT
GAT2	F:GGCAGCAGTTCACCTAAGGT R:GGTCCATCTTCTCTTCT	β-actin	F:ACAGAGCCTCGCCTTTC R:CGCGCGATATCATCATCA
	F. Forward R. reverse		

Table1

った群では、全ての細胞株において細胞生存率は低下しなかった。

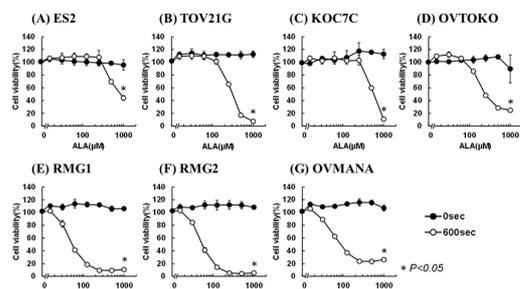


Figure 1

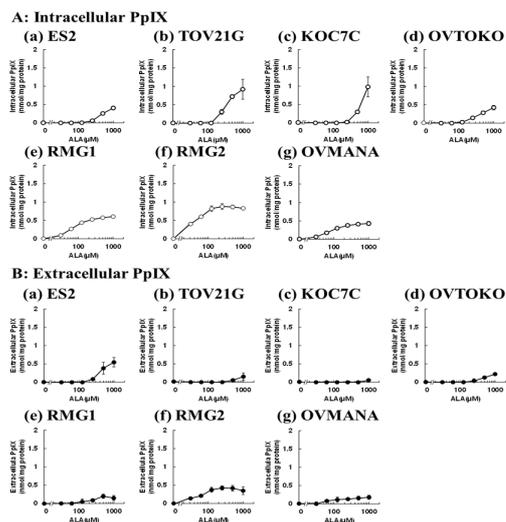


Figure 2

2) 細胞内外 PpIX 蓄積量の検討

5ALA 投与から 4 時間後の細胞内の PpIX 蓄積量を Figure 2-A、細胞外の PpIX 蓄積量を Figure 2-B に示しているが、全ての細胞株で細胞内・外の PpIX 蓄積量は、5ALA の濃度依存性に増加を認めた。RMG1、RMG2、OVMANA 株では、5ALA 60 μM 以上で細胞内 PpIX の蓄積を認めており、細胞内 PpIX 蓄積量と 5ALA-PDT の効果を比較すると、Figure 1 でも同様に 5ALA 60 μM 以上で、細胞生存率が低下することを確認できている。PpIX 蓄積量と 5ALA-PDT の効果には相関が示唆された。5ALA-PDT の効果の低かった ES2 株では 5ALA 最大量 1000 μM での PpIX 蓄積量も、他の株と比較し、最も低かった。

3) PpIX 蓄積に関与する因子の遺伝子発現解析

RMG1、RMG2、OVMANA 株では 5ALA の取り込みに関わるトランスポーター全てで発現を認めた。特に PEPT1、TAUT の発現が高い事が示された。これらの遺伝子発現の結果は、RMG1、RMG2、OVMANA 株における 5ALA-PDT の殺細胞効果に大きく関わっている可能性がある。特に PEPT1 は RMG1、RMG2、OVMANA 以外の細胞株では発現を認めておらず、PEPT1 の発現の有無が 5ALA-PDT の効果に大きく関与してい

る可能性がある。ABCG2 の発現においては、ES2 株で最も高く認めた。この結果は ES2 株での 5ALA-PDT に対する治療抵抗性に大きく関与していると考えられる。

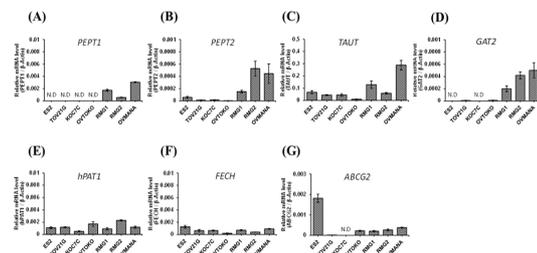


Figure 3

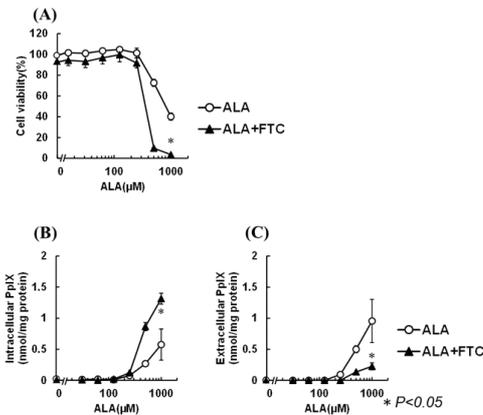
4) ABCG2 阻害剤を使用した 5ALA-PDT・PpIX 蓄積量の検討

ABCG2 の遺伝子発現の高い ES2 株を用いて実験を行った。ES2 株において、FTC 併用における 5ALA-PDT の殺細胞効果は増強を示した (Figure 4-A)。FTC 併用による細胞内 PpIX 蓄積量は 2 倍以上の増加を認めた (Figure 4-B)。5ALA-PDT の結果と細胞内 PpIX 蓄積量の結果は FTC 併用の実験においても相関を認めた。細胞外の PpIX 量 (Figure 4-C) は FTC 併用によって蓄積量の減少を認め、生成される PpIX 量の総和には差がない事も示した。

今回の研究で、難治性である卵巣明細胞癌に対して 5ALA-PDT の殺細胞効果を確認した。細胞株に効果の差はみられたものの、特に RMG1、RMG2、OVMANA においては 5ALA-PDT の殺細胞効果を強く認めた。これらの細胞株の IC50 は 56 μM、56 μM、90 μM と、他の細胞株と比較し非常に高い殺細胞効果を示した。一方で 5ALA-PDT の効果が低い ES2 株では IC50 が 882 μM と高く、5ALA-PDT に抵抗性を持つことが分かった。細胞株毎に比較すると、細胞内の PpIX 蓄積量は 5ALA-PDT の殺細胞効果と相関している事が示された。さらに遺伝子発現においても 5ALA-PDT 効果に影響を与える因子をトランスポーターの側面より解析した。5ALA の細胞内への取り込みに関わるとされる PEPT1 においては、5ALA-PDT に高い感受性を持つ RMG1・RMG2・OVMANA 株でのみ発現を認めた。このことから、PEPT1 が明細胞癌細胞株における 5ALA-PDT の感受性に関与している可能性が考えられた。PpIX の細胞外への排出に関わる ABCG2 においては、5ALA-PDT の効果の低い ES2 株で発現が高く認められた。この結果から ABCG2 の発現が 5ALA-PDT 効果の抵抗性に関わっている可能性が示された。5ALA-PDT 抵抗性株である ES2 株に対し ABCG2 阻害剤である FTC を併用する事で、5ALA-PDT の増強効果、細胞内 PpIX 蓄積量の増加を認めた。この結果から 5ALA-PDT に抵抗性の細胞株においても、ABCG2 阻害剤を併用する事で 5ALA-PDT の感受性が上がる事を示した。

ABCG2 の基質としては知られる卵巣癌治療薬のドキシソルピシンやイリノテカン、CPT-11 といった薬剤と 5ALA と併用する事で、PDT 効果の増強が得られる可能性も考えられる。

Figure 4



5ALA を用いた光線力学診断(Photodynamic diagnosis :PDD)は、脳腫瘍、膀胱癌において既に保険適応となっている。腹膜播種に対する 5ALA-PDD では胃癌、大腸癌、卵巣癌で臨床試験の報告が認められる。PDD による正確な病期診断は治療効果の改善につながると考えられ、卵巣癌治療においても PDD と PDT を併用することにより、治療効果の改善につながる可能性がある。ヌードマウスを用いた 5ALA-PDD の有効性は漿液性がんの細胞株では確認されたが、明細胞がん株では安定した結果が得られなかった。

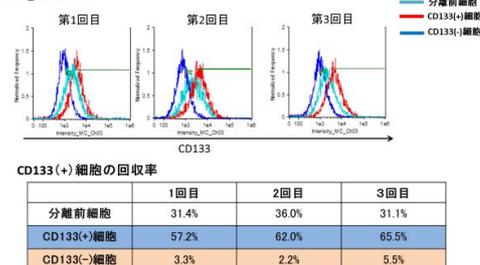
本研究では、in vitro において 5ALA-PDT が卵巣癌治療として有用である可能性を示した。さらに 5ALA-PDT 抵抗性の癌細胞でも、ABCG2 阻害剤を併用することで増強効果が得られる事を示した。卵巣明細胞癌において PEPT1、ABCG2 の遺伝子発現が、5ALA-PDT の殺細胞効果の指標となる可能性を示した。今後、in vivo でも検証も必要となる。

【2】癌幹細胞様卵巣がん細胞株の研究

ヒト卵巣嚢胞腫瘍細胞株である NOY1 細胞株には、癌幹細胞マーカーとして知られている CD133 の陽性細胞と陰性細胞が混在している。そのため CD133 をマーカーとして細胞を分離することにより、癌幹細胞と癌細胞に区別することができる。今回、ヒト卵黄嚢腫細胞 NOY1 の両細胞群で 5ALA-PDT の有効性と PpIX 蓄積の解析を行い、それらに違いがあるかどうかを検討した。

1)磁気ビーズによる分離細胞の評価(FACS)

Figure 5



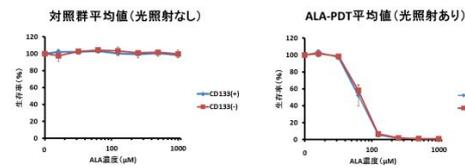
磁気ビーズでの実験において、安定した効率で CD133(+)細胞と CD133(-)細胞を分離できることを確認した (Figure 5)。

2)5ALA-PDT の有効性

WST8aasy を用いて、殺細胞効果を検証したが、CD133(+) 細胞と CD133(-) 細胞両群で 5ALA-PDT の効果が表れる ALA 濃度に統計上で有意な差は観察されなかった (Figure 6)。

Figure 6

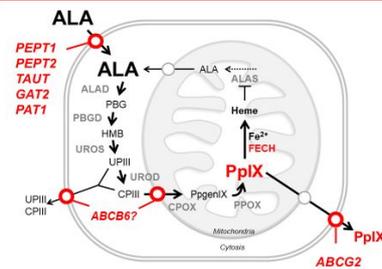
ALA-PDT の有効性評価 (独立した3回の実験の平均値)



3) PpIX 蓄積に関与する因子の遺伝子発現解析

遺伝子発現解析の概要

CD133の発現とALA-PDTの有効性の関係を調べるために、ヘム代謝経路(下図)のうち、ALAの取り込み・PpIX排出関連の遺伝子発現(赤字)を解析対象とした。

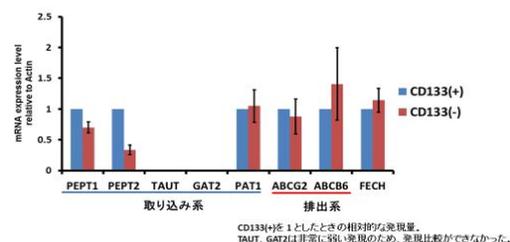


前項でも述べたが、上記図示するような 5ALA 取り込み、PpIX 排出に関わるトランスポーターの発現について 同様に検討した。PEPT1 と PEPT2 は、CD133(+)細胞と CD133(-)細胞の発現量に差がある可能性が高い。ABCG2 と ABCB6 は遺伝子発現量が弱いため、CD133(+)細胞と CD133(-)に差があるように示されたが、実験結果の解釈としては有効な差ではない可能性が高い。この実験では特に ABCB6 は遺伝子発現量に大きなばらつきが観察された (Figure 7)。

Figure 7

遺伝子発現解析 (qRT-PCR)

ALA関連遺伝子発現の平均値 (N=5)



CD133(+)細胞は通常癌幹細胞様であり、安定しており治療に抵抗性を示すことも報告されているが、増殖スピードも遅く、この実験より得られる細胞数が少ないため、結果の不

安性は懸念される。各々の細胞株をヌードマウスを用いて皮下結節モデルを作成したが、この in vivo 検証では有意な結果が得られなかった。しかしながら、本研究においては、CD133(-)細胞と比較しても 5ALA-PDT の効果に差は見られず、癌幹細胞様の性格をもつ今回の細胞株においては効果が期待されることが示唆された。

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 2 件)

1 : Toshiya Teshigawara, Mika Mizuno, Takuya Ishii, Yuya Kitajima, Fumi Utsumi, Jun Sakata, Hiroaki Kajiyama, Kiyosumi Shibata, Masahiro Ishizuka, Fumitaka Kikkawa Novel potential photodynamic therapy strategy using 5-Aminolevulinic acid for ovarian clear-cell carcinoma, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy Volume 21, March 2018, 121-127 査読あり

2 : Mizuno M, Kajiyama H, Shibata K, Mizuno K, Kawai M, Nagasaka T, et al. Prognostic value of histological type in stage IV ovarian carcinoma: a retrospective analysis of 223 patients. Br J Cancer. 2015;112:1376-83. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1 : 第 38 回日本レーザー医学会総会シンポジウム 慶応義塾大学 日吉台 ミニシンポジウム 2017 年 11 月 8, 9 日 産婦人科領域におけるレーザー治療の現状と展望 子宮頸部上皮内腫瘍に対する 5-aminolevulinic acid を用いた photodynamic therapy の検討 臨床試験結果より. 水野美香

2 : 第 69 回日本産科婦人科学会学術講演会, 2017, (広島) 勅使河原 利哉, 水野美香, 坂田 純, 内海 史, 関谷 龍一郎, 鈴木 史朗, 梶山 広明, 柴田 清住, 吉川 史隆 卵巣明細胞癌における 5-aminolevulinic acid を用いた光線力学療法の検討

3 : 第 58 回日本婦人科腫瘍学会学術講演会 (2016 年 7 月 8 日~10 日 鳥取 米子コンベンションセンター) 抗癌剤耐性ヒト卵巣癌細胞株における 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法の検討

勅使河原 利哉, 水野美香, 石井 琢也, 三井 寛子, 内海 史, 関谷 龍一郎, 鈴木 史朗, 梶山 広明, 柴田 清住, 高橋 究, 石塚 昌宏, 吉川 史隆

4 : 第 37 回日本レーザー医学会総会シンポジウム (2016 年 10 月 21 日~22 日 旭川グランドホテル)

婦人科疾患のレーザー医療の新たな展開 5-Aminolevulinic Acid を用いた光線力学療法 子宮頸がんにおける基礎研究から臨床

応用まで 水野 美香

〔図書〕(計 1 件)

子宮頸がんの治療 (機能性アミノ酸 5-アミノレブリン酸の科学と医学応用 : がんの診断・治療を中心に) -- (がんの診断と治療) Author : 水野美香 (愛知県がんセンター中央病院) 吉川史隆, Source : 現代化学 : 増刊 現代化学 : 増刊 (45), 59-63, 2015-10 東京化学同人

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水野 美香 (MIZUNO, Mika)
愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍免疫学部・研究員
研究者番号 : 50588837

(2) 研究分担者

柴田 清住 (SHIBATA, Kiyosumi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 90335026

(3) 連携研究者

梶山 広明 (KAJIYAMA, Hiroaki)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号 : 00345886

(4) 研究協力者

勅使河原 俊哉 (TESHIGAWARA, Toshiya)
石井 琢也 (ISHII, Takuya)
石塚 昌宏 (ISHIZUKA, Masahiro)