

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21236

研究課題名(和文) 消化管癌に対する新しいレーザー光線力学的診断の基礎的・臨床的研究

研究課題名(英文) Fundamental and clinical research on new laser photodynamic diagnosis for gastrointestinal cancer

研究代表者

松島 加代子 (MATSUSHIMA, Kayoko)

長崎大学・病院(医学系)・助教

研究者番号：90404293

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：光線力学的診断法(photodynamic diagnosis：以下PDD)は、がん細胞に集まる光感受性物質を投与した後、病変部にレーザー光(励起光)を照射して、がんを蛍光発色させることで腫瘍の局在を同定することができる。早期癌に対する簡便で侵襲の低い診断法として有利である。また、この原理を用いた光線力学療法(PDT)へとつながる。本研究では消化管癌におけるPDDの有用性を検証した。胃癌、バレット食道癌では病変の同定に有用であることが確認された。ただし、分化度が低い胃癌では検出率が低く、その原因はがん細胞における光感受性物質の代謝が影響しているということを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic diagnosis (PDD) is an imaging method by administering a photosensitizer that collects in cancer cells, irradiating the lesion with laser light (excitation light), and fluorescing the cancer. It is advantageous as a simple and less invasive diagnostic method for early cancer. It also leads to photodynamic therapy (PDT) using this principle. This study examined the usefulness of PDD in gastrointestinal cancer. It was confirmed that it is useful for lesion identification in gastric cancer and Barrett's esophageal cancer. However, in gastric cancer with low degree of differentiation, the detection rate was low, and it was revealed that the metabolism of photosensitizer in cancer cells is affecting the cause.

研究分野：消化管

キーワード：光線力学的診断 消化管癌

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法 (Photodynamic therapy: 以下 PDT) では、生体内に光感受性物質を投与し、腫瘍細胞へ集積させたのちに、特定のレーザー光を照射することによって、光感受性物質の光化学反応にて殺腫瘍効果をしめす。PDT は現在、早期肺癌、早期食道癌、胃癌、早期子宮頸癌、加齢黄斑症に保険適用されている。消化管領域での PDT は、手術もしくは内視鏡的根治治療が困難な早期食道癌や全身状態不良で手術できない早期胃癌にたいする治療法として利用できるが、PDT 用レーザー装置を有している病院は数少なく、その治療成績についても十分な検討はなされていない。そして、この PDT の原理を応用して、病変を蛍光診断する方法が光線力学的診断法 (photodynamic diagnosis: 以下 PDD) である。PDD は、がん細胞に集積する光感受性物質を投与した後、病変部にレーザー光 (励起光) を照射して、がんを蛍光発色させることで腫瘍の局在を同定する。脳神経外科領域や泌尿器科領域など、一部の外科領域において臨床応用が試みられているが、消化管領域ではまだほとんど検討がなされていない。内視鏡による早期消化管癌診断においては、ズーム機能を搭載した拡大内視鏡検査の出現により、腺管の配列異常や微小血管の異常を捉え、深達度診断や分化度診断に迫ることができる。ただし、的確な内視鏡診断は経験と熟練を要する上、限界もある。たとえば、食道扁平上皮癌ハイリスク患者 (喫煙・多量飲酒者など) の多発病変、化学放射線療法後の局所再発病変、食道バレット腺癌における食道扁平上皮癌への口側進展範囲の同定、胃癌において萎縮性胃炎を背景に、境界が認識しがたい病変、未分化胃癌、潰瘍性大腸炎長期罹患者を背景とした colitic cancer (以下 CC) といった症例においては内視鏡診断困難例がしばしば問題となってきた。

2. 研究の目的

(1) 消化器領域においては、拡大内視鏡が進歩しているものの、まだ診断には限界がある。PDD は消化管領域で使用する場合、内視鏡を用いて病変へアプローチし、直接レーザー光を照射できることから、早期癌に対する簡便で侵襲の低い診断法として有利である。また、この原理を用いた治療である PDT へも直結しうる。本研究では、消化管癌における PDD の有用性を検証し、臨床応用につなげたいと考えた。各種消化管癌患者に PDD を施行し、病変の検出能を検討する。組織型や深達度との相関を検討し、PDD の有用性と限界を明らかにする。(2) PDT で用いられる光感受性物質は porfimer sodium もしくは talaporfin sodium である。PDD では、半減期の短い 5-アミノレブリン酸 (5-aminolaevulinic acid: 以下 5-ALA) が主に用いられるが、これらは

すべてポルフィリン代謝経路の産物である。5-ALA は、ミトコンドリア内で succinyl-CoA と glycine から生成されるアミノ酸の一種であり、外的に投与された 5-ALA は、oligopeptide transporter-1 (PEPT1) を経由し細胞内に取り込まれ、ATP-binding cassette sub-family G member 2 (ABCG2) にて細胞外に排出される。また細胞内に取り込まれた後代謝酵素により Heme が生成される過程において coproporphyrinogen oxidase (CPOX) により、protoporphyrin IX に変換される。臨床症例や細胞株を用いて、組織型によるこれらのポルフィリン代謝における酵素活性 (ABCG2、PEPT1、CPOX) の差異と PDD 感度の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 各種消化管癌臨床症例における光線力学的診断 (PDD) の有用性検討
各種消化管癌症例 (食道バレット腺癌、胃癌、食道扁平上皮癌、炎症性腸疾患関連大腸癌) を対象とし、PDD が有効な組織型・患者群・病理背景を検討した。消化管癌症例に対し、5-ALA 溶液 20mg/kg を診断 3 時間前に経口投与したうえで、内視鏡検査時に、内視鏡下に 405nm 励起光を照射した。励起レーザー光は、内視鏡側孔から専用プローブを用いて照光した (臨床研究機 Sie-P1、富士フィルム社製)。5-ALA は光感受性物質である protoporphyrin IX (Pp IX) に代謝され、内視鏡下に 405nm 励起光を照射すると Pp IX が 635nm の蛍光を呈する。この方法により腫瘍が赤色に蛍光されるため、腫瘍と正常組織の視覚的な識別を行った。また、切除治療後 (内視鏡的切除術もしくは外科切除) 標本における病理組織像との対比を行った。

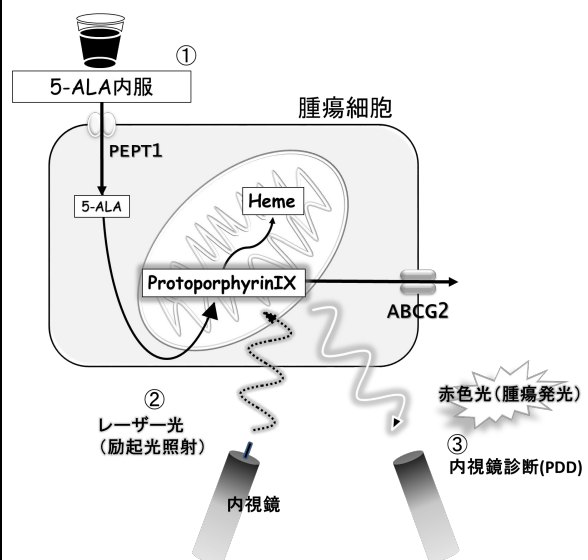


図1 5-ALA による PDD 蛍光機序の概要と内視鏡観察までの手順 ()

(2) 消化管癌組織的特徴による PDD の発光の差異の検討

消化管癌臨床検体を用いた検討

(1)で PDD を行った消化管癌症例の切除治療後の組織標本を用いた。5-ALA の代謝経路における代謝酵素 PEPT1、ABCG2、CPOX の発現を、免疫組織学的手法を用いて、組織学的特徴と比較検討した。

消化管癌細胞株を用いた検討

分化度の異なる胃癌細胞株 MKN-45(低分化型)、MKN-74(分化型)、Kato (未分化型、印環細胞)を用いて、10cm シャーレに散布し、0.1-1.0M の 5-ALA を添加した。4 時間培養後に蛍光発現を確認した。蛍光強度は UV 照射による蛍光顕微鏡下観察および PDD 臨床用プロンプを用いて観察した。

MKN-45 と MKN-74 細胞においては、PEPT1 及び ABCG2 の発現を qPCR にて確認した。

4. 研究成果

(1)各種消化管癌臨床症例における光線力学的診断 (PDD) の有用性検討

胃腫瘍 35 病変中 27 病変で分化型腺癌が 28 病変、印環細胞癌が 4 病変、腺腫が 3 病変であった。赤色蛍光が視認され、10mm 以下の小病変の同定も可能であることが明らかとなった。拡大内視鏡観察ともよく一致する結果であった。しかし、PDD 用の専用プロンプのレーザー出力が弱く、暗いために早期胃癌の視認性が不十分であることは、今後の問題として明らかになった。印環細胞癌を含む 8 病変では PDD 陰性であった。

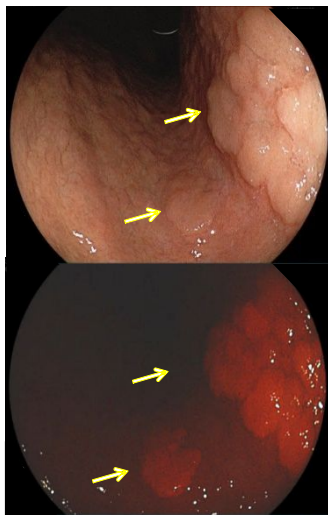


図 2 早期胃癌における 5-ALA を用いた PDD 観察内視鏡像。上段では、通常光観察にて周囲と同色調の病変だが、下段では、PDD により腫瘍が赤色蛍光を呈している。

バレット食道癌 4 例では、PDD 蛍光が確認され、扁平上皮下進展部にも赤色蛍光が見られた。このことから、バレット食道癌でしばしば、診断・治療時に問題となってきた、バレット食道癌の口側境界 (扁平上皮下進展による) の診断が、PDD 観察によって解決できる可能性が示唆された。ただし、疑陽性も 1 例認められたため、精度の向上が今後の課題である。

PDD における蛍光視認性向上のために、富士フィルム社製内視鏡システムの分光推定処理 FICE 画像を用いたが、蛍光強調にはいたらなかった。フィルターの工夫が必要と考えている。

食道扁平上皮癌においては、タラポルフィリンナトリウムによる PDT が 2015 年 5 月に遺残再発食道癌に対して保険適応となった。このため、診断後にそのまま治療に移行できる臨床的利点を考え、光感受性物質は 5-ALA だけでなくタラポルフィリンナトリウムによる PDD が実現すれば、より有用となる可能性を考えた。そこで、まずタラポルフィリンナトリウムによる PDT の人的・環境的整備を行い 10 例の PDT を安全に施行することができ、PDT の有用性について発表した。また、PDD への臨床応用は、今後、多施設で行っていきたい。

炎症性腸疾患関連発癌 (CC) においては、検討観察期間中に評価可能な発癌症例がなく、この症例頻度から長期間・多施設でのエントリーが必要と考えた。別途、共同研究として展開することとした。比較対象の拡大内視鏡観察所見については、後ろ向きに CC 症例と病理所見を対比し、内視鏡観察の限界について発表した。今後、内視鏡所見と PDD の症例集積を行い比較検討していく。

(2) 消化管癌組織的特徴による PDD の発光の差異の検討

消化管癌切除症例標本での検討

胃腫瘍切除症例標本を用いて、PEPT1、ABCG2、CPOX の免疫染色を追加検討した。PEPT1 では高分化癌で高発現、CPOX は印環細胞癌では全く発現が見られなかった。これらの結果から、5-ALA の細胞内の取り込みと排泄、ポルフィリン代謝の差異が分化度による PDD 蛍光強度差異に関与していることを明らかにした。

消化管癌細胞株における検討

MKN-45 と MKN-74 細胞の PEPT1 及び ABCG2 の発現を qPCR にて確認したところ、PEPT1 は MKN-45 細胞でより高発現であり、ABCG2 は MKN-74 細胞でより高発現であった。この結果から MKN-45 細胞の方がより高い赤色蛍光強度を示すと予想された。

そこで、MKN-45、MKN-74、Kato に 5-ALA を投与し 4 時間後に蛍光顕微鏡で観察を行った。UV を照射すると赤色蛍光が認められたが、認識できるバックグラウンドとの差異は僅か

であった。

つぎに、臨床で用いられるプローブで同様に細胞を 5-ALA 投与後に観察したが、明瞭な細胞像及び赤色蛍光を観察することはできなかった。臨床用プローブは単層培養細胞を観察すること自体に不向きであるためと考えられた。

5-ALA 代謝物の PPIX の赤色蛍光を肉眼で捉えることは難しいため、株式会社オプトサイエンスが販売している 395~415nm の光を照射し 630nm~ の波長を取り込むフィルターを用いることで明瞭な像が得られると予想されたため、現在はこのフィルターを用いた観察を展開中である。

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 3 件)

Ogihara K, Isomoto H, Matsushima K, Nakao K(18 人中 11 番目) Expression of coproporphyrinogen oxidase is associated with detection of upper gastrointestinal carcinomas by 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 査読有、p15~21、19、2017
DOI : 10.1016/j.pdpdt.2017.04.003

松島 加代子, 磯本 一, 中尾 一彦(8 人中 1 番目) 消化器癌に対する PDD... とくに胃腫瘍に対する 5-ALA を用いた PDD
G.I. Research, 査読無、p 323-331、23(4)、2015
<https://www.molcom.jp/products/detail/100575/>

Isomoto H, Nanashima A, Matsushima K, Nakao K. (18 人中 12 番目) In vivo fluorescence navigation of gastric and upper gastrointestinal tumors by 5-aminolevulinic acid mediated photodynamic diagnosis with a laser-equipped video image endoscope
Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 査読有、p201-208、12(2)、2015
DOI : 10.1016/j.pdpdt.2015.03.006

[学会発表](計 6 件)

松島 加代子、荻原 久美、山口 直之、中尾 一彦 当院における食道癌 PDT の現状と課題。日本食道学会学術集会、2018 年(栃木県宇都宮市)

荻原 久美、松島 加代子、山口 直之、磯本 一、中尾 一彦 細胞内 GSH 濃度が Talaporfin-PDT に与える影響についての検討。日本消化器内視鏡学会九州支部例会、

2017 年(福岡県福岡市)

松島 加代子、大仁田 賢、赤司 太郎、北山 素、橋口 慶一、南 ひとみ、富永 哲郎、本田 琢也、赤澤 祐子、森田 道、野中 隆、山口 直之、竹下 浩明、藤田 文彦、入江 順二、澤井 照光、竹島 史直、浜田 久之、中島 正洋、中尾 一彦 炎症性腸疾患症例に発生した下部消化管腫瘍の臨床的検討。日本消化器病学会九州支部例会、2017 年(福岡県福岡市)

松島 加代子、大仁田 賢、赤司 太郎、北山 素、橋口 慶一、本田 琢也、赤澤 祐子、森田 道、野中 隆、山口 直之、竹下 浩明、伊藤 信一郎、入江 順二、藤田 文彦、澤井 照光、浜田 久之、中島 正洋、竹島 史直、中尾 一彦 当院で経験した炎症性腸疾患 (IBD) 関連腫瘍と IBD に対する検査法・治療薬との関連性の検討。日本消化器病学会九州支部例会、2017 年(沖縄県那覇市)

嶋倉 茜、荻原 久美、北山 素、橋口 慶一、松島 加代子、赤澤 祐子、山口 直之、大仁田 賢、竹島 史直、中尾 一彦 CRT 後局所再発食道癌に対してタラポルフィン PDT が奏効した 2 例。日本消化器内視鏡学会九州支部例会、2017 年(沖縄県那覇市)

塩田 純也、山口 直之、荻原 久美、中鋪 卓、橋口 慶一、南 ひとみ、松島 加代子、赤澤 祐子、大仁田 賢、竹島 史直、宿輪 三郎、中尾 一彦、食道癌に対する内視鏡治療 (ESD/PDT) を中心とした集学的治療戦略。日本消化器病学会九州支部例会、2016 年(熊本県熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松島 加代子 (MATSUSHIMA, Kayoko)
長崎大学・病院(医学系)・助教
研究者番号 : 90404293

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

磯本 一 (ISOMOTO, Hajime)
鳥取大学・医学部附属病院・
消化器内科・教授
研究者番号 : 90322304

荻原 久美 (OGIHARA, Kumi)
長崎大学・病院(医学系)・医員

