

令和 4 年 5 月 1 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09495

研究課題名(和文) 低悪性度神経膠腫に対する蛍光診断：ポルフィリン代謝分子に対する機能解析

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis for low-grade gliomas: functional analysis of porphyrin synthesis pathway

研究代表者

山口 秀 (Yamaguchi, Shigeru)

北海道大学・医学研究院・講師

研究者番号：70399939

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)：Grade 2,3の低悪性度神経膠腫摘出術では、5-ALAの蛍光ガイド下摘出術で必ずしも陽性が得られない。我々は、ポルフィリン合成経路に着目し、遺伝子発現解析を行って、低悪性度神経膠腫における腫瘍蛍光に関与する分子の同定を行った。この結果、Peptide transporter 2 (PEPT2)の発現亢進が蛍光発光陽性の腫瘍において認められることが判明した。神経膠腫細胞株を用いPEPT2の発現をsiRNAを用いて低下させたところ、蛍光発光が減弱することが確認された。以上より、PEPT2の発現亢進が低悪性度神経膠腫における蛍光発光に関与してい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

低悪性度神経膠腫は摘出における正常脳組織との境界決定が、高悪性度神経膠腫よりもはるかに難しい。摘出術における蛍光診断が不可能であることが多いことも問題である。本研究において、蛍光発光に関わる可能性のある分子を同定できたことで、将来的に分子標的治療薬等を使用することにより、低悪性度神経膠腫を蛍光にて可視化できる可能性を見出すことができた。また、5-ALAを用いた蛍光診断は脳腫瘍手術に限らず、皮膚がん、食道がんなど多がん腫にも応用することが期待されている分野である。これらの多がん腫における腫瘍健康診断の発展にも寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：5-ALA-mediated fluorescence cannot always be detected in grade II/III gliomas. We investigated gene expression patterns in the Protoporphyrin IX (PpIX) synthesis pathway, and attempted to identify the key molecule of 5-ALA-mediated fluorescence. Using 50 surgically obtained specimens, we analyzed gene expression within the PpIX synthesis pathway to identify candidate molecules according to intraoperative 5-ALA-mediated fluorescence status. Among the genes involved in the porphyrin synthesis pathway, the mRNA expression of Peptide transporter 2 (PEPT2) in fluorescence-positive gliomas was significantly higher than that in fluorescence-negative gliomas. The siRNA-mediated downregulation of the mRNA and protein expression of PEPT2 led to decreased PpIX fluorescence intensity, as confirmed by fluorescence spectrum analysis. The results suggest PEPT2 is an important candidate molecule in 5-ALA-mediated FGS in grade II/III gliomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 蛍光診断 5-ALA

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫において、手術での摘出率が予後を決定する最重要因子であることは自明である。しかしながら、一方では、神経膠腫の摘出による術後の神経機能の状態が予後に強く影響するという報告もあり、これは当科の症例群でも同様の傾向を示した(未公開データ)。maximum safe resectionという言葉が示す通り、神経膠腫においては如何に病変を最大限摘出して、かつ、機能温存を行うかということが、治療を行う上での重要な要素である。

この摘出を行う上で、重要な術中支援技術が5-ALA(アミノレブリン酸)を用いた術中蛍光診断である。5-ALAを投与すると、腫瘍組織内で代謝されて、プロトポルフィリンIX(PpIX)が組織内に蓄積する。一方で正常細胞では、正常代謝によりヘムにまで代謝されるのでPpIXが蓄積されることはない。PpIXは紫青色光を当てると励起して赤色の蛍光を発するため、肉眼で腫瘍組織を正常組織と区別して確認することができるようになる。赤色光を発した残存腫瘍を認識することにより、腫瘍摘出度が向上し、それに伴い予後が改善することも示されている。しかしながら、ほぼ全例で蛍光発光を認める膠芽腫と異なり、Grade II/IIIの低悪性度神経膠腫におけるPpIXの蛍光陽性率は、Grade IIの神経膠腫で10%程度、grade IIIの神経膠腫では60%程度で陽性であると報告されている。低悪性度神経膠腫における5-ALA術中蛍光診断の有用性が高いとは言い難い状況であった。

2. 研究の目的

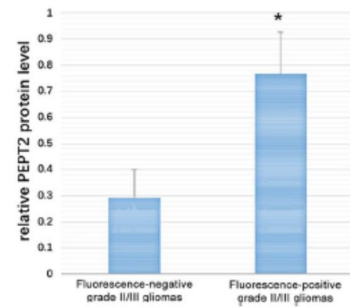
本研究では、5-ALA術中蛍光診断を低悪性度神経膠腫においても有効にすることを最終目標とし、その糸口をつかむためにポルフィリン代謝経路に注目し、その鍵となる分子を同定、さらにその機能・役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

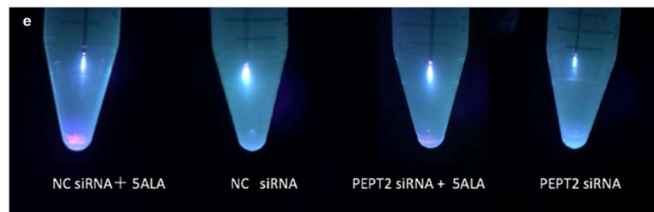
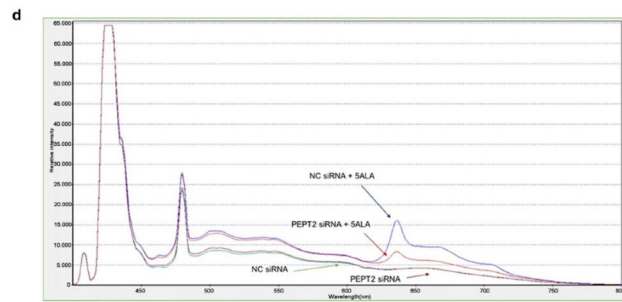
- (1) 本研究では、まず当科で行った手術で得られた保存検体を用いて、低悪性度神経膠腫における5-ALA術中蛍光診断のカギとなる分子を同定することから始めた。当院で5-ALA術中蛍光診断を行って手術を行った低悪性度神経膠腫の凍結検体を用い、mRNAを抽出した。5-ALAが腫瘍細胞内へ取り込まれてから、蛍光発光物質であるPpIXに至る経路で関与する分子は多数同定されおり、これらの分子の遺伝子発現を網羅的に解析し、腫瘍組織から蛍光発光が得られた検体と、得られなかった検体における遺伝子発現の相違を確認した。
- (2) 候補となる分子の機能解析を行った。低悪性度神経膠腫の細胞株として退形成衛星細胞腫の細胞株であるSW-1783細胞株を用い、候補分子の発現を強制的に抑制させ、5-ALAによる蛍光発光の変化を確認した。

4. 研究成果

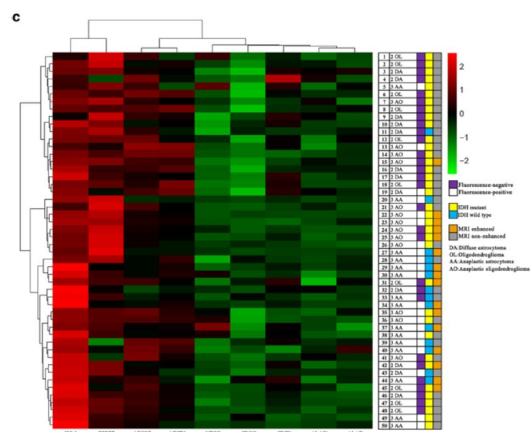
(1) 50 例の低悪性度神経膠腫の凍結検体から 5-ALA の代謝経路に関連する分子の発現解析を行ったところ、5-ALA の細胞内取り込みに関与する PEPT2 の発現が蛍光発光陽性を示した腫瘍で亢進していた。この分子に着目し、免疫染色や Western-blot 法にてタンパク発現に関して検証したところ、蛍光発光陽性の腫瘍で発現が亢進していることが判明した (右図)



(2) 続いて SW-1783 細胞株を用い、PEPT2 の 5-ALA 蛍光発光機序に対する機能解析を行った。SW-1783 細胞に対して si-RNA を用いて PEPT2 の発現を強制的に低下させた。通常の細胞株と PEPT2 発現抑制をかけた細胞株それぞれと 5-ALA を共培養し、その腫瘍細胞の PpIX 蛍光発光に関して VLD-EX (SBI ファーマ社製) を用いて蛍光発光強度を定量的 (右図上) 定性的 (右図下) に評価した。PEPT2 の発現を抑制させることで PpIX の蛍光発光は明らかに低下することが示された。



(3) また、ポルフィリン代謝系の網羅的な遺伝子発現に関してクラスター解析を行ったところ、5-ALA の蛍光発光の有無のみではなく、IDH 遺伝子変異の有無でも遺伝子発現の傾向が異なる傾向があることが判明した (右図)。IDH 変異は低悪性度神経膠腫を分類する鍵となる遺伝子変異であり、これによりポルフィリン代謝系の遺伝子発現パターンも異なっていることは注目すべき事象として、今後の研究発展を予定している。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hou C, Yamaguchi S, Ishi Y, Terasaka S, Kobayashi H, Motegi H, Hatanaka KC, Houkin K.	4. 巻 143
2. 論文標題 Identification of PEPT2 as an Important Candidate Molecule in 5-ALA-mediated Fluorescence-Guided Surgery in WHO Grade II/III Gliomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 197-206
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-019-03158-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口 秀
2. 発表標題 蛍光診断補助装置VLD-EXを用いた深部に存在する悪性神経膠腫の摘出術
3. 学会等名 第30回日本脳神経外科手術と機器学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	伊師 雪友 (Ishi Yuki tomo) (30812284)	北海道大学・大学病院・医員 (10101)	
研究分担者	小林 浩之 (Kobayashi Hiroyuki) (70374478)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------