

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2010～2011
課題番号：	22791360
研究課題名（和文）	悪性脳腫瘍術中蛍光診断の蛍光メカニズム解析と神経膠腫幹細胞への光線力学療法への応用
研究課題名（英文）	The analysis of the molecular mechanism of 5ALA induced photodynamic diagnosis for malignant brain tumor and the challenge to application of photodynamic therapy for glioma stem cells
研究代表者	
	池田 直廉 (Ikeda Naokado)
	大阪医科大学・医学部・非常勤講師
研究者番号：	50434775

## 研究成果の概要（和文）：

転移性脳腫瘍および悪性神経膠腫患者に対し術前 5ALA を投与し、光線力学的診断(PDD)を行い腫瘍摘出し、術中蛍光を確認して手術摘出した。標本より抽出した mRNA を用いてポルフィリン代謝に関わる 13 遺伝子の発現解析を行った。coproporphyrinogen oxidase (CPOX)のみが有意に蛍光を示さない腫瘍に比して蛍光を示す腫瘍で上昇しており、CPOX に対する免疫組織染色では強い蛍光を示す腫瘍で有意に陽性細胞が多く存在した。CPOX が悪性脳腫瘍における 5ALA による蛍光強度差異に強く関連していることが示唆され、これまで蛍光を呈していなかった悪性脳腫瘍細胞群に対するアプローチを可能にすると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Little is known, however, about the detailed molecular mechanisms underlying 5-ALA-induced fluorescence.

We analyzed transcriptome profiles for the genes encoding enzymes, transporters, and a transcription factor involved in the porphyrin-biosynthesis pathway for surgically removed malignant brain tumors.

The high mRNA level of CPOX expression was significantly well correlated with the phenotype of strong 5-ALA induced fluorescence. These findings were further confirmed by immunohistochemical studies with a CPOX-specific antibody. It is concluded that induction of CPOX gene expression is one of the key molecular mechanisms underlying the 5-ALA-induced fluorescence of malignant brain tumors.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：悪性脳腫瘍 神経膠芽腫 転移性脳腫瘍 CPOX 5-アミノレブリン酸

## プロトポルフィリン IX 光線力学的診断 光線力学的治療

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍に対する治療法は現在のところ、可及的外科的切除および放射線分割外照射が標準的治療法として用いられ、神経膠芽腫の生存中央値は12ヶ月とされている。近年、悪性脳腫瘍の中でも悪性神経膠腫に対する新規治療薬として登場したテモゾロマイドを使用しても、生存期間の中央値で約2ヶ月半延長するにすぎないのが現状である。現在のところ悪性脳腫瘍に対する治療は満足できるものではない。

これまで我々は悪性脳腫瘍、特に悪性神経膠腫に対しては機能予後、生命予後改善を目指して様々な手法を駆使して挑戦を続けてきた。このうちの1つが $\delta$ アミノレブリン酸

(5-aminolevulinic acid; 以下5ALA)を用いた術中光線力学的蛍光診断である。5ALAを用いた術中蛍光診断は膀胱癌、皮膚癌で積極的に用いられてきたが、悪性神経膠腫における光線力学的診断 (photodynamic diagnosis; 以下PDD)も2006年のStummerらを中心とした前向き無作為抽出研究他施設ランダムマイズコントロール研究以来(Stummer et al. Lancet oncol 7; 392-401, 2006)、脚光を集めている。彼らは5ALAを用いることによって腫瘍摘出率は向上し、6ヶ月の progression free survival の延長を報告している。また、脳腫瘍における5ALAを用いたPDDは励起光源内蔵脳神経外科手術顕微鏡の市販により急速に普及した。

我々も早期より、安全でかつ最大限の脳腫瘍摘出をめざして $\delta$ アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid; 以下5ALA)を用いた術中蛍光診断を本邦の中でも特に積極的に導入するとともに、5ALAによる術中蛍光診断のための光源開発(レーザー光源、LED光源の開発)、悪性神経膠腫に対する5ALAを用いた光線力学療法の研究を行ってきた。加えて、悪性神経膠腫のみならず、その他の周囲脳組織への浸潤性の高い転移性脳腫瘍、悪性髄膜腫をはじめとする様々な悪性脳腫瘍に対しても積極的に5ALAによる術中PDDを用いてきた。

これらの経験より5ALAを用いた術中蛍光診断の悪性神経膠腫のみならず、他の脳腫瘍に対する有用性が明らかになったが、様々な疑問点が挙げられるようになったのも事実である。その1つが、同量の5ALAを投与しているにもかかわらず、その蛍光強度が各々の腫瘍によって極端に異なる場合があ

ることである。顕著であるのは、悪性神経膠腫においてはほぼ100%で強い赤色蛍光を示すが、同じ悪性脳腫瘍の1つである転移性脳腫瘍においては原発組織型に関わらず80%において腫瘍本体では全く蛍光を呈さず、腫瘍周辺部はvague fluorescenceを呈することを経験していることである。Stummerらは5ALAによる脳腫瘍蛍光強度はその細胞密度、腫瘍細胞分裂能、腫瘍内血管床密度が高いほど強い蛍光を呈すると報告している(Acta neurochir suppl. 2003)。しかしながら、転移性脳腫瘍、悪性神経膠腫ともに細胞密度や、悪性脳腫瘍であることからその増殖能は程度の差はあれ高い腫瘍であり、造影MRI上強い増強効果が認められる腫瘍であることから、また組織学的にも脳血液関門の破綻、血管床の増加が認められる腫瘍である。つまり、Stummerらが述べるどころの4要素は、これら2つの腫瘍における蛍光強度の極端な差を認める要因とはなり難いと考えられた。

そこで我々は腫瘍細胞そのものの性質の違い、特にヘム代謝やプロトポルフィリンIXの細胞外へくみ出し機構の違いが蛍光強度に何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えるに至った。

(2) Glioma Stem Cell (以下GSCと略)の概念が提唱され、脚光を浴びている。GSCは悪性神経膠腫の中にもわずかに存在し、X線照射に対する回復が早く、放射線抵抗性であるがゆえに、標準放射線治療後の再発の機序として提唱されている(Nature 447:756-760, 2006)。また、腫瘍幹細胞は化学療法剤積極的に排出する機構があることからテモゾロマイドをはじめとする化学療法に対する抵抗性を獲得していると考えられる。よってこのGSCの治療抵抗性の克服が悪性神経膠腫の治療における大きなキーポイントとなると思われる。われわれはGSC細胞株では5ALA投与により神経膠芽腫細胞株に比して蛍光強度が低いことを確認した。プロトポルフィリンIXを細胞外へくみ出すトランスポーターであるABCG2トランスポーターはGSCを多く含むとされる神経膠芽腫細胞のside populationに強く発現していることが知られており、ABCG2トランスポーターは5ALAによるGCSの蛍光強度低下に関与しているものと考えた。

## 2. 研究の目的

(1) 臨床悪性脳腫瘍サンプルにおける、特に ABCG2 を含めたポルフィリン代謝およびくみ出しに関わる遺伝子発現と 5ALA による術中蛍光強度の関係を解明することで、術中蛍光診断の精度向上、蛍光を呈さない悪性脳腫瘍に対する術中蛍光診断、光線力学的治療への応用へと発展させていく事を目的とした。

(2) また、GSC をいわゆる蛍光を呈しにくい細胞から蛍光しやすい細胞へと変化させる事が出来れば、術中蛍光診断、ひいては術中 PDT のターゲットに引き上げる事が出来ると考える。以上より、GSC を 5ALA を用いた PDD および PDT のターゲットに引き上げる事を目的とした。

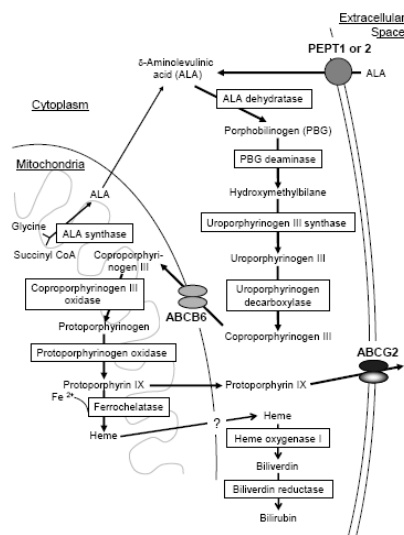
## 3. 研究の方法

(1)

悪性脳腫瘍患者に対して術前 5ALA を投与して、PDD を行い腫瘍摘出を行う。強い蛍光を示す腫瘍、蛍光を示さない腫瘍それぞれより手術摘出サンプルより抽出した mRNA を用いて定量的 real time PCR 法を用いて発現遺伝子プロファイリングを行い、術前画像所見、病理所見、腫瘍摘出標本を用いた免疫組織学的検討と共に検討を行った。

遺伝子発現プロファイリングを行ったのはポルフィリン代謝に関わる酵素群およびトランスポーター13 遺伝子 (図 1) である。

図 1

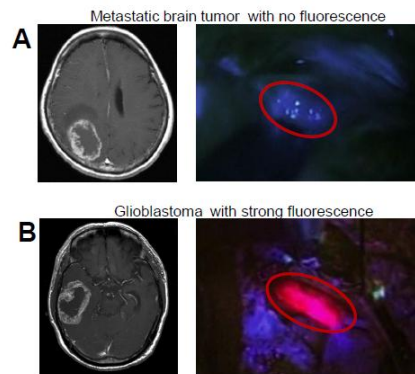


## 4. 研究成果

(1)

腫瘍の内訳は 5ALA 投与により強い蛍光を示す腫瘍 10 腫瘍 (組織診断; 神経膠芽腫 7 例 転移性脳腫瘍 3 例 図 2B)、全く蛍光を示さない腫瘍 10 腫瘍 (転移性脳腫瘍 7 例、神経膠芽腫 3 例 図 2A) であった。

図 2



① いずれの腫瘍も術前 MRI ガドリニウム造影にて強い増強効果を認めていた。また、腫瘍摘出標本細胞の分裂能を Ki67 染色にて確認したところ両群とも高い分裂能を示し明らかな有意差を認めなかった。

② 発現遺伝子プロファイリングでは、強い蛍光を示す腫瘍では全く蛍光を呈さない腫瘍に比して有意に coproporphirinogen oxydase の mRNA 発現が高かった。他の 11 遺伝子については明らかな有意差を認めなかった。(図 3A, B)

図 3

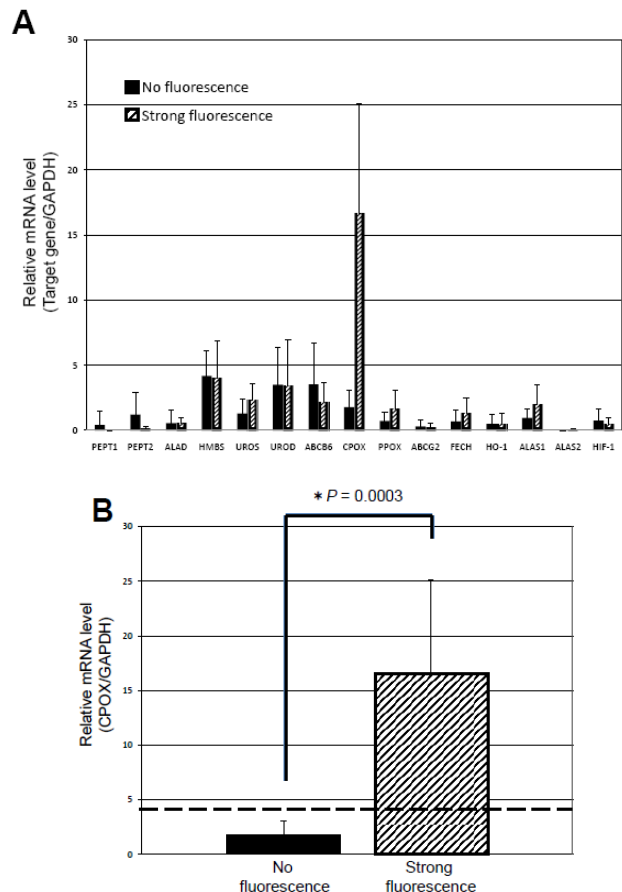
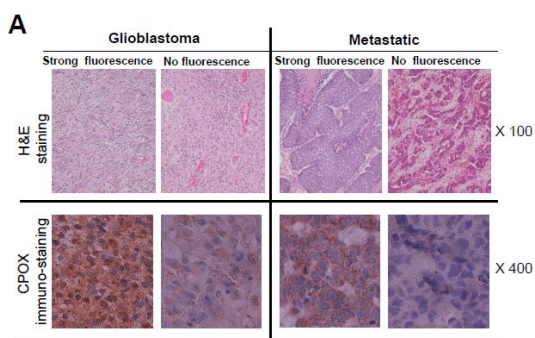


図 4



③ また CPOX に対する免疫組織染色をそれぞれの腫瘍摘出標本に対して行ったところ、組織系に関わらず強い蛍光を呈する腫瘍において全く蛍光を呈さない腫瘍に比して有意に CPOX 陽性細胞が多く存在した。(図 4)

以上より CPOX が悪性脳腫瘍における 5ALA による蛍光強度差異に強く関連していることが示唆された。本研究では 5ALA を用いた PDD の更なる応用につながるものと考ええる。すなわち、これまで蛍光を呈していなかった悪性脳腫瘍細胞群に対するアプローチを可能にする一歩となりえ、ひいては悪性脳腫瘍の機能、生命予後改善における手術療法の役割の拡大につながるものと考ええる。

(2) ※ 尚、GSC に対する光線力学的治療の応用に関する研究については、提供を受けた GSC の stemness の維持がされていないことが研究途中 (平成 23 年度) に判明したため目標を達成することができなかった。GSC 樹立を再度独自で行い、引き続き GSC に対する 5ALA を用いた光線力学的診断、光線力学的治療の応用を目指したいと考えている。

## 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 1 件)

- 1) Kenkichi Takahashi, Naokado Ikeda, Naosuke Nonoguchi 他7名; Enhanced expression of coproporphyrinogen oxidase in malignant brain tumors: CPOX expression and 5-ALA-induced fluorescence. Neuro-Oncology 13; 1234-43, 2011. DOI; 10.1093/neuonc/nor116

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 梶本 宣永、米田 隆、高橋 賢吉、池田 直廉 他 2 名; 高輝度 LED 補助光源は、5-ALA 蛍光ガイド手術における励起光不足による偽陰性判定を防止する。第 21 回日本光線力学学会学術集会 2011 年 7 月 大阪大学吹田キャンパス
- 2) 梶本 宣永、米田 隆、高橋 賢吉、池田 直廉 他 2 名; 腫瘍組織におけるポルフィリン蛍光の分光蛍光輝度計測法。第 21 回日本光線力学学会学術集会 2011 年 7 月 大阪大学吹田キャンパス
- 3) 高橋 賢吉、池田直廉 他 5 名; 悪性及び良性脳腫瘍における光線力学的診断の陽性率とその影響因子について。第 70 回日本脳神経外科学会学術総会 2011 年 10 月 パシフィコ横浜
- 4) Kenkichi Takahashi, Naokado Ikeda 他 5 名 ; Enhanced Expression of Coproporphyrinogen Oxidase in Malignant Brain Tumors: CPOX Expression and 5-ALA Induced Fluorescence. 2011 年 11 月 BIT's 2<sup>nd</sup> Annual Congress of Biomarkers. Beijing

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 直廉 (Ikeda Naokado)

大阪医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号 : 50434775