

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510256

研究課題名(和文)ポルフィリンの腫瘍組織特異的な蓄積を促す蛋白質分子群の解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of candidate proteins involved in ALA-PDT

研究代表者

竹谷 茂 (Taketani, Shigeru)

京都工芸繊維大学・工学科学研究科・教授

研究者番号：20121949

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,400,000円、(間接経費) 1,320,000円

研究成果の概要(和文)：種々の化合物や蛋白質分子の発現によるALA-PDTへの影響を調べると、キノロン化合物がprotoporphyrin (PX)の蓄積を増加させることが分った。ミトコンドリアの鉄利用に関与する蛋白質であるmitoferrinやfrataxinも発現量の増加と低下でそれぞれ光感受性の低下と亢進が認められた。鉄シャペロンのfrataxinの発現レベルが癌化に伴って低下したが、p53変異によるfrataxin発現低下が癌細胞特異的なALA-PDTを引き起こす要因であることを強く示唆した。最後にALAの取り込みにはneurotransmitter輸送体が関与することが分かった。

研究成果の概要(英文)：The ALA-induced accumulation of protoporphyrin and photodynamic therapy (PDT) have been used for the diagnosis of cancer. Several factors contribute to the high tumor specificity of ALA-induced accumulation of protoporphyrin as a detection marker for the photodiagnosis of tumors, and we gave evidences that protoporphyrin accumulates owing to the limited capacity for ferrochelatase reaction. Ferrochelatase consists of an iron-sulfur cluster and its expression in tumor cells was decreased due to the low expression of mitochondrial iron-chaperon frataxin unregulated by p53. Thus, mitochondrial dysfunctions, decreased utilization of iron in mitochondria and the recycling of heme-iron can be crucial factors for ALA-PDT. Additional factors including mitoferrin, siderflexin and ABCG2 are also involved in the accumulation of protoporphyrin. Tumor selectivity of ALA-PDT is due to the preferential uptake of ALA through neurotransmitter transporters from the blood stream.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学；生物分子科学

キーワード：ALA PDT heme protoporphyrin mitochondria

1. 研究開始当初の背景

多くの癌患者にヘマトポルフィリン誘導体 (Photofrin) を投与すると癌組織に優先的に Photofrin が蓄積することが良く知られている。ヘマトポルフィリンや細胞内ヘム合成の中間体であるポルフィリンは光に対して反応してラジカルを発生して、細胞死や組織破壊を引き起こすが、これらの癌細胞への特異的な取り込み系を用いた癌の診断法や蓄積した Photofrin に光照射して癌組織を破壊する治療方法が確立されて利用されている。同様にヘム合成の初発物質である 5-aminolevulinic acid (ALA) を癌患者に投与するとプロトポルフィリンが癌細胞に特異的に蓄積するので診断や光照射治療として用いられている (ALA-PDT)。しかしながら、ポルフィリン誘導体の癌細胞への蓄積機構や癌細胞特有のヘム代謝の変化については、全く不明のままである。これらのポルフィリンやヘムの性質については長年、多分野に研究者がいろいろな方向から検討して、解明を試みてきたが、担当分子、制御および遺伝子発現についての答えは得られていない。

2. 研究の目的

全ての腫瘍組織はポルフィリン誘導体の特異的に蓄積する特性が知られており癌の診断と治療に高い有効性がある。しかし、ポルフィリンの癌細胞での蓄積の機構は、全く不明である。広く癌細胞に特異的に高発現もしくは機能変化してポルフィリンの蓄積に関与する分子を単離同定して癌細胞でのヘム合成系の新たな調節機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、癌細胞におけるALA由来のプロトポルフィリンの特異的な蓄積の要因もしくはPhotofrin受容体を単離同定して、癌細胞特異的なポルフィリンの動態を明らかにして癌の光障害性の感度を高める事に寄与する分子機構を見出す。これらに申請者と6-7人の大学院生が従事する。ALA由来の癌細胞特異的なプロトポルフィリンの蓄積については、ミトコンドリアへのポルフィリン中間体代謝や輸送に関係するPBGD, UROS, P22 HBP, ミトコンドリア外膜の末梢型 Benzodiazepine receptor, 同内膜のCPOXとANTなどの関与を遺伝子導入を行って、ひとつずつ検討して、それぞれの癌組織における発現の変動について調べる。一方、ヘム合成終末系酵素のferrochelataseやNADH-dehydrogenase

などの鉄利用関連蛋白質であるクラスター蛋白質の機能を低下する可能性があるので、ポルフィリン蓄積を高める可能性のあるメナジオンなどの種々の阻害剤やNOSの基質であり、食肉中に多く含まれるアルギニンを培地に加えて、NOを発生させてプロトポルフィリンの蓄積や光照射による細胞破壊を試みる。これらの結果を踏まえてポルフィリンの蓄積が中間体代謝分子か終末系分子のどちらに起因するかを明らかにする。またRNAi法をも用いて機能を証明していく。

4. 研究成果

5-Aminolevulinic acid (ALA) を癌患者に投与して癌組織に protoporphyrin を蓄積させて、これに光照射することで癌部位の特定や組織の光力学治療に広く用いられている (ALA-PDT)。癌細胞における protoporphyrin の蓄積機構について研究を行ったところ、ヘム合成の終末酵素の ferrochelatase の活性や量の低下が protoporphyrin の蓄積の大きな要因であることを明らかにした。さらに一酸化窒素が ferrochelatase 発現の低下をもたらす要因であることなど、一連の検討を加えた。種々の化合物や蛋白質分子の発現による ALA-PDT への影響を調べる中で、弱い金属キレーター作用を示す抗菌剤の enoxacin, ciprofloxacin, norfloxacin などのキノロン化合物が protoporphyrin の蓄積を増加させることが分った。これらのキノロン化合物による protoporphyrin の蓄積は、これらの薬品が光障害を引き起こして、薬剤性ポルフィリアを発症させる原因がある可能性を示唆した。また、鉄イオンの再供給源である heme oxygenase (HO) の阻害剤である Sn-protoporphyrin で細胞を処理した時における ALA-PDT への影響をも検討した。HeLa 細胞を低濃度の Sn-protoporphyrin 処理すると protoporphyrin の蓄積の著しい増加と光感受性の亢進が見られた。反対に HO 基質であるヘミン処理を行うと HO-1 が誘導されるが、ALA 由来の protoporphyrin の顕著な蓄積の低下が認められた。HO-1/-2 の高発現や他の HO-1 誘導剤でもその蓄積は低下した。一方 HO-1 および HO-2 siRNA 処理でそれぞれをノックダウンしたところ protoporphyrin の蓄積は増加したのでヘム鉄の HO 分解によるリサイクルが PDT 低下の要因であることが分った。さらにミトコンドリアの鉄利用に関与する蛋白質であ

る mitoferrin-2, sideroflexin-5 や frataxin についても高発現やノックダウンを行って porphyrin の蓄積の検討を加えた結果、発現量の増加と低下でそれぞれ光感受性の低下と亢進が認められ、鉄代謝機能の変化が関係する事が分かった。その他、ポルフィリン代謝中間体を産生する酵素群を高発現させた結果、ALA-PDT の亢進が認められた。これらの結果から癌化による鉄利用の多面的な変化が ALA 由来の protoporphyrin の蓄積をもたらすことが分かった。

ミトコンドリアの鉄利用に関与する蛋白質のなかでも、鉄シャペロンの frataxin の発現レベルが癌化に伴って低下する可能性が考えられた。そこで、癌細胞の frataxin 高発現株を樹立した所、細胞の増殖が低下してミトコンドリア呼吸系酵素群の活性やレベルの上昇が認められた。高発現株では ALA 由来の protoporphyrin の蓄積は低下し、光感受性も減少したので、鉄代謝が改善されることが明らかになった。frataxin を除去したマウスの肝細胞が腫瘍化することや、結腸癌細胞において frataxin を過剰発現させた場合に正常細胞としての形質を取り戻すことから frataxin は癌抑制タンパク質としての機能を有すると言われている。そこで、種々のヒト癌細胞の frataxin の発現量を調べた所、p53 変異のある癌細胞ではレベルの低下がみられた。そこで、正常 p53 の HEK293 細胞の p53 をノックダウンさせた結果、frataxin レベルが低下した。逆に癌細胞 HeLa に正常 p53 を発現させると、frataxin の低下が認められた。また、p53 の機能を阻害する薬剤 philthlin-a で細胞を処理すると frataxin mRNA の減少が起こった。これらの結果は、frataxin の発現は p53 に依存することが示唆された。そこで、マウス frataxin 遺伝子のプロモーター活性測定や CHIP assay を行った結果、-307 to -298 と -294 to -285 の 2 カ所の p53 応答配列が p53 正常細胞では機能していることが分かった。また、p53 siRNA 処理した細胞では p53 量の低下に伴う frataxin 発現の低下を認めた。また、本処理を行った細胞では frataxin レベルの低下に伴って ALA-PDT の亢進が認められた。これらの結果は、p53 変異による frataxin 発現低下やミトコンドリア機能低下が癌細胞特異的な ALA-PDT を引き起こす要因であることを強く示唆した。

そこでマウス frataxin 遺伝子プロモーターの転写活性、特に frataxin プロモーター中に含まれる p53 responsive element (RE) の転写活性が癌細胞において低減していることを調べるために、癌細胞のサンプルとしてマウス線維肉腫由来 Meth-A 細胞を用いた。Meth-A 細胞は p53 null mutant ではないが、p53 機能変異株である事を証明したと考えられる。すなわち、Meth-A 細胞は変異型 p53 を産生し、その構成ペプチドにおける DNA 結合ドメインの 132, 168 および 234 番目のアミノ酸残基に点変異が生じていることが知られている。したがって Meth-A 細胞が産生する p53 は野生型に比べて DNA 結合性が低下しており、frataxin の p53RE に対してもその結合性失われている可能性は高いと考えられる。実際に Meth-A 細胞において、frataxin 遺伝子プロモーターへの p53 の会合を検証したところ、frataxin 遺伝子プロモーターへの p53 の会合は認められなかった。そのため、マウスでは正常細胞に比べて、癌細胞においては frataxin 転写量が低減していることが示唆された。また、Meth-A 細胞において野生型 p53 を発現させた場合でも、frataxin 遺伝子プロモーター(-346 - +1) の転写活性が、p53 を発現させない場合に比べて転写活性が大きく変わらなかった。Frataxin 遺伝子プロモーターの領域(-372 - +1)には p53 の会合が認められたので、何らかの要因により、転写活性が影響を受けたと考えられる。それには 2 つの要因が考えられる。第 1 の要因は、Meth-A 細胞が p53 の null mutant でないことである。p53 は、細胞内に豊富に存在するタンパク質であり、テトラマーを形成することにより、標的遺伝子の転写を活性化する。したがって Meth-A 細胞において野生型 p53 を強制発現させた場合でも、野生型 p53 は、内在性の変異型 p53 とヘテロテトラマーを形成するため、野生型 p53 と変異型 p53 が等量存在する場合でも、野生型 p53 のホモテトラマーが形成される確率は 16 分の 1 である。したがって野生型 p53 を強制発現させても、それが frataxin の転写活性に影響を及ぼす可能性は低下してしまう。第 2 の要因は、レポータープラスミドに組み込んだ frataxin プロモーターの領域である。マウス frataxin 遺伝子のプロモーターには、領域(-358 - -349)と領域(-345 - -336)の 2 か所に

p53 応答配列と考えられる配列が存在する。今回の実験では領域 (-345 - -336) を含むレポータープラスミドを用いたため、p53 の応答性が、領域 (-358 - -349) と領域 (-345 - -336) を含む場合に比べて低下すると考えられる。したがって野生型 p53 を強制発現させた場合でも、その効果が減弱した可能性がある。そのため、p53 の応答性を確認するためには、p53 null mutant の細胞株を用いて実験を行うことや、領域 (-358 - -349) と領域 (-345 - -336) を含むレポータープラスミドを用いて実験を行う必要があると考えられる。また frataxin プロモーター領域 (-358 - -349) と領域 (-345 - -336) には p53 依存性の転写活性が認められた。さらに領域 (-345 - -336) については、実際の frataxin プロモーターを用いた解析においても、転写活性が認められた。以上のことから p53 とマウス frataxin との間に相互作用があることが示唆された。これにより、細胞の癌化とミトコンドリアの代謝機能不全との間に frataxin が関与する経路が存在することが示唆された。ヒト frataxin 遺伝子の p53 依存性についても検討を加えた。ヒト frataxin では遠位、近位および intron 1 内の合計 7 カ所に p53 応答配列が認められたが、近位の -300bp 付近以外は、CHIPassay で、p53 の会合が認められなかった。そこで、-300bp 付近のレポーター活性を調べた所、-273-264bp に p53 の応答が認められ、gel-shift assay でもその結合を確認した。また、frataxin 高発現株を用いて鉄の利用を調べた所、発現株では、鉄イオン処理によって protoporphyrin に蓄積が顕著に減少したので、鉄利用度の向上が示された。従って、frataxin は癌化に伴うミトコンドリア鉄利用の変化の中心的な役割を果たしていると考えられる。

ABCG2/BCRP は乳癌を始めとする、数種類の癌細胞で増加して、細胞の薬剤耐性の獲得に働き膜輸送を担うポンプ蛋白質として知られている。また、ABCG2 には多型があり、細胞からの尿酸排泄の能力がそれぞれの分子型によって異なり、低能力分子を有するヒトでは、痛風を招くリスクが高いことが知られるようになった。さらに、ABCG2 ノックアウトマウスでは細胞内に葉緑体の分解物やプロトポルフィリンが蓄積したことで、ABCG2 の本来の機能はポルフィリンの細胞外への排泄ではないかと考えられるようになった。我々は、ABCG2 の輸送物質を明ら

かにする目的で、Hem1 (ALAS) を欠損させたヘム要求酵母 (Δ hem1) を用いて実験を行った。 Δ hem1 ヘム合成が出来ず、ALA やポルフィリン中間体に依存する生育を示す事が知られている。 Δ hem1 内でのヒト ABCG2 発現による protoporphyrin 依存性の増殖を調べた。その結果、ABCG2 を発現させた菌では、5-10 μ M 存在下で有意な生育促進が認められた。Protoporphyrin の取り込みや輸送に関与するのではないかと考えられた。そこで HeLa 細胞の ABCG2 安定発現株を作製して、ヘム合成の変動を調べたが、親株と比較して増殖には大きな相違は認められなかった。ALA-PDT を行ったところ、ABCG2 発現細胞では protoporphyrin の蓄積の低下や光感受性の減衰が認められて、ノックダウンの結果を指示した。しかし、細胞から培地への porphyrin の排泄は増加せず、porphyrin 輸送に携わるのではなく、ヘム合成の亢進が起きていることを示唆した。Ferrochelatase 活性ならびに酵素量が増加するので、ABCG2 によって mitochondria 機能が亢進するのではないかと考えられた。

最後に ALA の取り込みに関与する輸送分子の同定を試みた。ALA は炭素数 5 のアミノ酸であることから、類似アミノ酸であるグルタミン (酸) 輸送分子が輸送をつかさどっていると考えられたので、グルタミン (酸) による ALA の取り込みの影響を調べた結果、添加によって ALA-PDT は阻害されたが、グルタミン輸送分子の同定には至らなかった。一方、GABA をはじめとする neurotransmitter 分子も ALA の構造類似性があるので、輸送に関与するかどうかを調べた結果、GABA, β -alanine, Taurine や Creatine によって輸送阻害が認められた。そこで、neurotransmitter 輸送体 SLC6A ファミリー分子を発現させたところ、SLC6A6, SLC6A8, SLC6A13 によって ALA-PDT の顕著な亢進が認められ、これらの分子のノックダウンによって逆に低下することが分かった。SLC6A6, SLC6A13 は広くヒトの癌細胞に発現しており、大腸癌患者の癌組織にも多く発現することがわかり、ALA の取り込みの増加に関係することが分かった。

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16件)

1. T T Tai, A Mu, Y Adachi, Y Adachi & S Taketani (2014) Neurotransmitter transporter family including SLC6A6 and SLC6A13 contributes to the 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage, through uptake of ALA by cancerous cells. *Photochem. Photobiol.* in press.
2. Y Nishio, M Fujino, M Zhao, T Ishii, M Ishizuka, H Ito, K Takahashi, F Abe, M Nakajima, T Tanaka, S Taketani, Y Nagahara, and X-K Li (2014) 5-aminolevulinic acid combined with ferrous iron enhance the expression of heme oxygenase-1. *Intl Immunopharmacol.* 19(2): 300-307. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.003.
3. S. Watanabe, M. Hanaoka, M. Ohnuma, S. Taketani and K. Tanaka (2013) Mitochondrial localization of ferrochelatase in a red alga *Cyanidioschyzon merolae* *Plant Cell Physiol.* 54(8):1289-1295. doi: 10.1093/pcp/pct077.
4. D.H.T. Kim, R. Hino, Y. Adachi, A. Kobori, & S. Taketani (2013) The enzyme engineering of mutant homodimer and heterodimer of coproporphyrinogen oxidase contributes to new insight into hereditary coproporphyrin and harderoporphyrin. *J. Biochem.* 154(6): 551-559.
5. H. Ida, O. Suyari, M. Shimamura, T.T. Tran, M. Yamaguchi & S. Taketani (2013) Genetic link between heme oxygenase and the signaling pathway of DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Tohoku J. Exp. Med.* 231, 117-125
6. M. Sawamoto, T. Imai, M. Umeda, K. Fukuda, T. Kataoka and S. Taketani (2013) The p53-dependent expression of frataxin controls 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage in cancerous cells. *Photochem. Photobiol.* 89(1): 163-172.
7. Shiota M, Yasuda Y, Shimaoka M, Tsuritani M, Koike E, Oiki M, Matsubara J, Taketani S, Murakami H, Yamasaki H, Okumoto K, Hoshiai H. (2013) Erythropoietin is involved in hemoprotein syntheses in developing human decidua. *Congenit Anom (Kyoto).* 53(1):18-26.
8. Nagayasu E, Ishikawa SA, Taketani S, Chakraborty G, Yoshida A, Inagaki Y, Maruyama H. (2013) Identification of a Bacteria-like Ferrochelatase in *Strongyloides venezuelensis*, an Animal Parasitic Nematode. *PLoS One.* 2013;8(3):e58458.
9. D.H.T. Kim, A. Kawazoe, P.D. Bang, N. T. Thanh, S. Taketani (2013) Congenital Erythropoietic Porphyria: Mutation of the Uroporphyrinogen III Cosynthase Gene in a Vietnamese Patient. *Case Rep. Dermatol.* 5, 104-109.
10. M. Mori, S. Gotoh, S. Taketani, H. Hiai, K Higuchi (2013) Hereditary cataract in the Nakano cataract mouse is caused by a hypomorphic mutation in the gene for coproporphyrinogen oxidase. *Exp. Eye Res.* 112, 45-50.
11. R. Itoh, K. Fujita, A. Mu, D. H.-T. Kim, T. T. Tai, I. Sagami, S. Taketani (2013) Imaging of Heme/Hemeproteins in Nucleus of the Living Cells Expressing Heme-binding Nuclear Receptors. *FEBS Lett.* 587(14): 2131-2136. doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.036.
12. Ohgari, Y. Miyata, Y., Miyagi, T., Gotoh, S., Ohta, T., Kataoka, T., Furuyama K., and Taketani, S. Roles of porphyrin and iron metabolisms in the δ -aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin and photo-damage of tumor cells (2011) *Photochemistry & Photobiology* 87(5): 1138-1145.
13. Chau, T.T., Ishigaki, M., Kataoka, T., and Taketani, S. Ferrochelatase Catalyzes the Formation of Zn-protoporphyrin of Dry-cured Ham via the Conversion Reaction from Heme in Meat. (2011) *J. Agric. Food Chem.* 59(22):12238-12245.
14. Yokomichi T, Morimoto K, Oshima N, Yamada Y, Fu, L, Taketani S, Ando

M & Kataoka T., Ursolic Acid Inhibits Na⁺ /K⁺ -ATPase Activity and Prevents TNF- α -Induced Gene Expression by Blocking Amino Acid Transport and Cellular Protein Synthesis (2011) Biomolecules, 1(1), 32-47.

15. Tamura R, Chen Y, Shinozaki M, Arao K, Wang L, Tang W, Hirano S, Ogura H, Mitsui T, Taketani S, Ando M, Kataoka T. Eudesmane-type sesquiterpene lactones inhibit multiple steps in the NF- κ B signaling pathway induced by inflammatory cytokines. (2012) Bioorg. Med. Chem. Lett. 201222(1):207-211.
16. N.C. Hiep, S. Kinohira, K. Furuyama and S. Taketani. (2012) Depletion of glutamine enhances sodium butyrate-induced erythroid differentiation of K562 cells. J. Biochem. 152(6): 509-519.

〔学会発表〕(計4件)

1. 竹谷 茂、ヘムによるヘム合成調節と調節因子の作用機序第86回生化学会大会 2013, 9.12 横浜
2. 竹谷 茂、癌特異的 ALA 誘導性 Protoporphyrin の蓄積：酵素、遺伝子発現および物質輸送からの検討 日本農芸化学会 2013 年度大会 2013, 3.26 仙台
3. 竹谷 茂、鉄シャペロン frataxin 発現の p53 による調節とミトコンドリアのヘム代謝の関係 第85回生化学会大会 2012, 12.9 福岡
4. 竹谷 茂、癌細胞におけるミトコンドリアの鉄代謝の機能低下と ALA-PDT. 第84回日本生化学会 2011.10.12 神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
竹谷 茂 (Taketani Sigeru)
京都工芸繊維大学 工芸科学研究科・教授
研究者番号：20121949

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：