

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591963

研究課題名(和文)食道癌に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法確立のための基礎的検討

研究課題名(英文) Preclinical examination to establish a novel photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid for esophageal cancer

研究代表者

高岡 宗徳 (Takaoka, Munenori)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50548568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：培養食道癌細胞(TE-4, TE-8)を用いた5-アミノレブリン酸(5-aminolevulinic acid, 以下ALA)投与後のLED光照射を行ったところ、TE-8についてはLED照射後24時間よりALA濃度依存性に増殖抑制および細胞周期抑制(G1 arrest)を認めた一方、TE-4では見られなかった。ALA+LEDにて細胞周期関連蛋白発現の明らかな変化を認めなかった。担癌マウスを用いた動物実験は検討不十分となったが、文献検索上、既存の光増感剤は欧米を含め早期食道癌の根治的治療及び進行食道癌の救済療法として有効との報告があり、ALAの食道癌に対するPDTも同等以上の有効性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell culture-based experiments were done using with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) cells, namely TE4 and TE-8, under 5-aminolevulinic acid in their culture media. By irradiating the ALA-treated ESCC cells with light-emitting diode (LED) TE-8 cells underwent a potent growth inhibition and cell cycle arrest on G1 phase in 24 hours after LED-irradiation, while this inhibitory effect was merely observed in TE-4 cells. Although analysis of cell cycle-related protein expressions by western blot is under investigation at this point, the expression of p53 or p21 did not seem to change in the early phase of post-LED irradiation period. Animal experiments resulted in insufficient examination for the designated three years, however, photodynamic therapy with ALA should be attractive for the treatment of ESCC as well as other photosensitizers such as photofrin that have bibliographically demonstrated their excellent therapeutic effects.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道外科学

1. 研究開始当初の背景

5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid, 以下 ALA) は分子量 131 の δ 型アミノ酸で、エネルギー反応に必要なヘムやクロロフィルの生合成調節に関わる前駆体でグリシンとスクシニル CoA からアミノレブリン酸合成酵素の作用で合成される。ALA を過剰投与すると、短時間でポルフィリン中間体を必要以上に蓄積する。植物においてはこれに太陽光を照射すると光増感作用で活性酸素を発生し、殺草作用が出現する。動物の細胞でも同様で、特に癌細胞ではポルフィリンからヘムへの代謝が弱いいため、ALA を投与するとポルフィリン中間体が過剰生産・蓄積されることが知られており、欧米ではレーザー照射と組み合わせた光線力学療法 (photodynamic therapy; PDT) による皮膚がん治療が実用化されている。ALA を用いた PDT では、ミトコンドリアで活性酸素が発生し、アポトーシス様の細胞死となる。癌に特異的に蓄積するポルフィリンの赤色蛍光を用いた診断も進められていて、脳腫瘍の摘出手術に使う体内診断薬として臨床試験が開始している。

食道癌に対する治療は、手術をはじめ放射線療法・化学療法などの集学的治療が行われるが、これらの治療にも拘らず、食道癌は再発・致死率の高い疾患である。現在 ALA はすでに皮膚がんに対する光線力学療法の臨床応用が進んでいるが、日本人が罹患する食道癌の 90% 以上が扁平上皮癌という皮膚がんと病理背景の類似した組織型である特徴から、食道扁平上皮癌に対する光線力学療法の光増感剤として ALA が有用であることは十分に予測される。既に食道癌に対する光線力学診断における ALA の有用性は臨床試験実施中であり、診断薬に留まらず、食道癌の新たな治療戦略としてその臨床応用が待たれるところである。早急に臨床試験に移行するために、今回の基礎的検討の成果が重要で

ある。

2. 研究の目的

食道癌に対する 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法確立のため、将来的な臨床試験の計画実施に向けて必要なデータの蓄積と準備が本研究の目的である。すなわち、培養食道癌細胞と正常食道上皮細胞での発現強度・増殖抑制効果の違い、マウス可移植性腫瘍への集積と抗腫瘍効果、正常組織への影響の有無などを検討し、既存薬剤との有効性比較試験を含めたデータの解析を行う。

3. 研究の方法

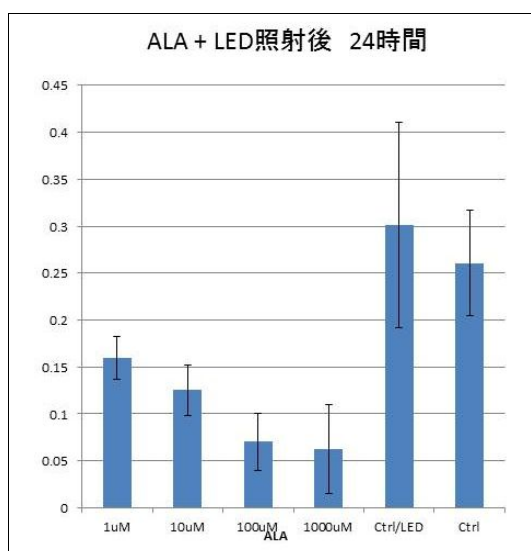
本研究では、まず培養癌細胞及びマウス可移植腫瘍への ALA の特異的集積を確認し、光増感作用にて抗腫瘍効果を発揮するかを検討する。そして、既存の光増感剤との比較による癌特異的集積・細胞死の強度を解析し、ALA の有効性についての基礎的データを蓄積・整理し、臨床試験に向けての準備を進めることを目標とし、以下の項目が当初計画の検討項目である。

- 1) 培養食道癌細胞への ALA 集積の検出及び細胞増殖抑制効果の検討
- 2) 正常食道上皮細胞と培養食道癌細胞への ALA 集積および細胞死誘導の比較検討
- 3) マウス皮下移植腫瘍への ALA 集積の検出及び抗腫瘍効果の検討
- 4) 光線力学療法に用いる既存薬剤 (フォトフィリン、レザフィリン) との優位性あるいは非劣性の比較検討
- 5) マウス同所性移植腫瘍への ALA 集積の検出及び抗腫瘍効果の検討
- 6) 蓄積したデータをもとに ALA を用いた食道癌に対する光線力学療法についての臨床研究プロトコールの作製

4. 研究成果

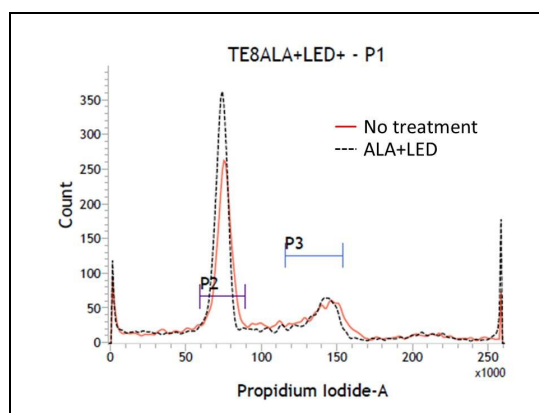
1) 培養食道癌細胞への ALA 集積の検出及び細胞増殖抑制効果の検討

培養食道癌細胞 (TE-4, TE-8) を用い、ALA 投与後の LED 光照射による細胞増殖抑制効果について検討したところ、TE-8 については LED 照射後 24 時間より ALA 濃度依存性に増殖抑制効果が見られた一方、TE-4 では明らかな増殖抑制が見られなかった。TE-8 について、LED 照射のみ、もしくは ALA 投与のみでは細胞増殖への影響はみられなかった。



2) 正常食道上皮細胞と培養食道癌細胞への ALA 集積および細胞死誘導の比較検討

フローサイトメトリーを施行したところ、ALA 存在下で培養された TE-8 食道癌細胞は、LED 照射にて一定の細胞周期抑制効果 (G1 arrest) を認めたものの、LED 照射後 24 時間では明確な細胞死の変化を認めなかった。ウェスタンブロットでの細胞周期に関わる蛋白発現変化を検討したところ、p53, p21 に関しては ALA+LED にて明らかな蛋白量の変化を認めなかった。



3) マウス皮下移植腫瘍への ALA 集積の検出及び抗腫瘍効果の検討

担癌マウスを用いた実験が基礎的データをまとめるには至らず、検討不十分であった。

4) 光線力学療法に用いる既存薬剤 (フォトフィリン、レザフィリン) との優位性あるいは非劣性の比較検討

フォトフィリンは既に欧米を含め食道がん治療の臨床応用の報告があり、早期食道癌症例の 80%以上で有効な抗腫瘍効果が得られている。また、進行食道癌の化学放射線療法後の遺残に対する救済療法として、60%程度の抗腫瘍効果を認めることも文献上報告がある。ALA の食道癌に対する PDT も、それに匹敵する有効性が期待されるが、今回動物実験での結果が得られなかったため、比較検討には至らなかったが、研究協力者の武藤学博士 (現: 京都大学大学院医学研究科腫瘍薬物治療学講座 教授) および中島元夫博士 (現: SBI ファーマ株式会社・取締役執行委員 CSO) との情報交換及び討論を行った。

5) マウス同所性移植腫瘍への ALA 集積の検出及び抗腫瘍効果の検討

担癌マウスを用いた実験が基礎的データをまとめるには至らず、検討不十分であった。

6) 蓄積したデータをもとに ALA を用いた食道癌に対する光線力学療法についての臨床研究プロトコルの作製

研究分担者を交えた今後の発展性について討議し、また研究協力者の武藤学教授より臨床試験の概略と進行についての講演を聴

講する機会を得た。

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)

高岡宗徳：5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた食道発癌抑制の可能性. 川崎医学会誌. 39巻(補遺号)PageS71, 2013

猶本良夫：5-アミノレブリン酸によるシスプラチン腎毒性抑制作用の臨床応用. 川崎医学会誌. 40巻(補遺号), PageS15, 2014

[学会発表](計2件)

高岡宗徳：5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた食道発癌抑制の可能性. 第4回川崎医科大学学術集会. 2013年8月3日 於川崎医科大学(岡山県倉敷市)

猶本良夫：5-アミノレブリン酸によるシスプラチン腎毒性抑制作用の臨床応用. 第5回川崎医科大学学術集会. 2014年8月2日 於川崎医科大学(岡山県倉敷市)

[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：

出願年月日：

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

高岡 宗徳(TAKAOKA MUNENORI)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：50548568

(2)研究分担者

猶本 良夫(NAOMOTO YOSHIO)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00237190