

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 4 日現在

機関番号：82612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462784

研究課題名(和文) 難治性小児固形腫瘍における光線力学的治療に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Basic research on Photodynamic Therapy in pediatric refractory cancer

研究代表者

渡邊 稔彦 (Watanabe, Toshihiko)

国立研究開発法人国立成育医療研究センター・外科・医師

研究者番号：50306734

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究によって、in vitroにおいて小児神経芽腫細胞株では5-ALA作用によって時間・濃度依存的に細胞内PpIXを蓄積させ、細胞内PpIX蓄積量に依存的にアポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こすことが確認された。今後の展望として、nude mouseに対して細胞内PpIX蓄積量の高かったNB-1、IMR32を移植し、腫瘍形成後、経口投与による5-ALA投与後PDTを行い、in vivoにおける5-ALA-PDTの有効性の検討が必要である。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (5-ALA) induced apoptosis of tumor cells by promoting accumulation of intra-cellular PpIX in time and concentration dependent manner in pediatric neuroblastoma cell line. For future prospect, investigations on the effect of 5-ALA in vivo is needed.

研究分野：小児悪性腫瘍

キーワード：難治性小児固形腫瘍 光線力学的治療

1. 研究開始当初の背景

1. 学術的背景

1-1: 難治性小児固形腫瘍における治療の変遷
神経芽腫は小児期発症の固形腫瘍のなかで最も頻度が高い腫瘍であるが、多くは進行した状態で発見される。1999年にアメリカの children's oncology group(COG)によるランダム化比較試験により、化学療法、外科療法、幹細胞移植を併用した大量化学療法、局所放射線療法に加えて、13シス-レチノイン酸による分化誘導療法が、進行神経芽腫に標準的な治療骨格として確立されたが、3年生存率は46%に過ぎなかった。治療強度を限界まで高めるといった観点から、大量化学療法を複数回行う「タンDEM移植法」の成績や、最近のランダム化比較試験でも、生存率の向上は50%台と頭打ちであり、晩期合併症を増加させるという結果をもたらした。このような背景から、化学療法、外科療法、幹細胞移植を併用した大量化学療法、放射線療法を骨格とした標準治療に加え、生存率向上のための斬新な新規治療法の開発が求められている。

1-2: これまでの進行神経芽腫に対する新規治療法

神経芽腫では、内照射と幹細胞移植と組み合わせる MIBG 内照射療法、神経芽腫に高発現している GD2 に着目した GD2 抗体療法、遺伝子導入された T 細胞や NK 細胞が直接腫瘍細胞を認識し傷害するキメラ抗原受容体療法(chimeric antigen receptor: CAR)、これらに EB ウイルス特異的細胞障害性 T 細胞(CTL)を導入した GD2-CAR-CTL 療法、など免疫療法、細胞療法など駆使した新規治療法が臨床応用されつつある。神経芽腫以外の、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、ラブドイド腫瘍、肝芽腫などでは、いまだ臨床応用につながるような研究は進んでいない。

1-3: 新たに登場した ALA-PDT によるがん治療

光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) は、腫瘍親和性光感受性物質と低出力レーザー光により生じる光線力学的反応により殺細胞効果を引き起こす治療法である。PDT は低侵襲がん治療法として注目されているが、既存の光感受性物質は、がんの選択性が低い上に光感受性物質の排出に時間を要するため、副作用として強い光毒性を示し治療後の厳しい遮光管理が問題となっていた。5-アミノレブリン酸 (5-aminolevulinic acid: ALA) は、ミトコンドリアで産生されるヘムの生合成原料となる アミノ酸である。ALA はこれまで多くの化学合成法の開発が試みられたが、多段階を必要とし収率も悪く、コストがかかるため用途開発を妨げていた。近年、コスモ石油 (株) は安価で安定した ALA 供給を可能にした醗酵生産法を開発し、SBI ファーマ (株) が中心となり植物分野、健康・美容分野、医療分野での用途開発が進

められている。ALA は、腫瘍細胞では鉄イオンの挿入ができず、ヘムの前駆体であるプロトポルフィリン IX(PpIX)が蓄積される。PpIXは波長410nm付近の紫色光で励起されると強い赤色蛍光を発生し腫瘍の可視化を可能とするほか、産生された活性酸素が腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し、殺細胞効果を発揮する。また、二次的に免疫学的反応の誘導や腫瘍の栄養血管を障害し抗腫瘍効果を高める。ALA-PDTの場合、ALAの腫瘍細胞内での生理的特徴を効果的に利用し、腫瘍細胞への選択性が高く、PpIXは元来の内在性であるため体内から速やかに排出され、事実上光線過敏症の問題がないという利点がある。欧米では、日光角化症を適応に薬事承認されており、将来的には手術、放射線、抗がん剤に並ぶがん治療法として注目されている。

1-4: 本邦における PDT

PDTは成人癌領域で基礎研究が進められ、既存の光感受性物質を用いる方法ではすでに肺癌、胃癌、子宮癌に対して保険適応になっている。最近、脳悪性腫瘍の可視化について第3相試験が終了し薬事承認が待たれ、さらに膀胱がんでも医師主導治験が進行中である。さらに内視鏡手術では摘出率の向上と再発率の低下に有用であることや、腹膜播種の確認にも有用であると報告され、将来は悪性腫瘍の外科手術に欠かせない技術になるとの概念が確立されつつある。しかし、小児固形腫瘍においてALA-PDTの臨床応用を目指した基礎的研究は全く進められていない。

1-5: これまでの研究成果と発想の経緯

SBIファーマ(株)は、大腸がんリンパ節転移が正確に診断可能である、胃癌細胞への効果的なPpIXの蓄積にPEPT1、ABCG2が重要である、尿中ポルフィリン濃度が腫瘍マーカーとなりうる、と報告してきた。これらはALA-PDTは、がんの初発部位や種類を問わずがん全般に応用可能であることを示唆している。当センターの梨井康らは、マウス心移植モデルを用いたALAの移植免疫への効果、また成人癌でALA-PDTと樹状細胞による免疫療法との併用に関する研究に着手しており、小児固形腫瘍においても、基礎研究が必要であるとの発想に至った。

2. 何をどこまで明らかにするか

小児固形腫瘍におけるALA-PDTの臨床応用を目指し、ヒト小児固形腫瘍細胞株を用いた基礎的な実験を行う。

2-1: in vitro: ALA存在下に培養し、細胞内にPpIXが蓄積すること、光照射依存的に細胞増殖の抑制と細胞死誘導が起こることを検証する。

2-1: in vivo: in vitroでALA-PDTの有効性が示された細胞株は、ヌードマウスなどの動物に移植して担癌動物モデルを作製し、生体におけるALA-PDTの有効性を実証する。

担癌動物は異所性・同所性移植モデルと遠隔転移モデルで検討する。

3. 学術的独創点・予想される結果と意義

小児固形腫瘍細胞株においてALA-PDTの治療効果が認められれば、集学的治療の基本骨格の一翼を担う新規治療法として期待できる。腫瘍、リンパ節転移、他臓器転移巣が可視化され、腫瘍本体・リンパ節・転移巣の外科的完全切除を可能とする「小児がん外科」に大きな変革をもたらす事、腹膜播種・胸膜播種に対しても播種巣可視化による可及的切除とPDTによる地固め療法が考えられる。末期的な状態に対しては低侵襲な palliative care としての役割も大きい。

2. 研究の目的

小児固形腫瘍の治療は、従来の化学療法、放射線療法、手術療法に加えて、幹細胞移植を併用する大量化学療法が標準治療となっているが、難治性進行がんではその治療成績は頭打ちであり、治療強度を高めることから、異なる作用機序による治療が必要とされている。光線力学的治療 (photodynamic therapy: PDT) は新たな低侵襲ながん治療法として、すでに成人の悪性腫瘍で臨床応用されているが、小児固形腫瘍では基礎的な研究は欠如している。本研究は、臨床応用を目指した難治性進行小児固形腫瘍におけるPDTの可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

各種細胞の培養

NB-1, IMR32, GOTO, MKN45 はペニシリン-ストレプトマイシンを添加した 10 % FBS RPMI1640 培地で 5 % CO₂, 37 °C, 湿潤環境下で培養を行った。NB-9 は 15 % FBS RPMI1640 培地で 5 % CO₂, 37 °C, 湿潤環境下で培養を行った。

各細胞種に対する 5-ALA の毒性試験

96well 透明プレートに、培養後コンフルエントになるよう細胞種ごとに調製した細胞懸濁液を 90 μL 播種し、24hr 培養を行った。培養後、5-ALA の最終濃度が 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 μM になるよう調製した 5-ALA 入りの培地を 10 μL 投与した後、遮光して 4hr インキュベートした。5-ALA 作用後、上清を取り除き、滅菌済み PBS で洗浄した後、10%WST-8 培養用培地を 100 μL 添加した。30 分インキュベートし、450nm の吸光度を測定して細胞毒性を評価した。

細胞内 PpIX の検出

35 mm 接着細胞用ディッシュに培養後コンフルエントになるよう NB-1 と MKN45 をそれぞれ播種し、24hr 培養を行った。最終濃度 1 mM となるよう 5-ALA を添加し、1, 4, 24 時間インキュベートした。作用後、細胞を回収し、フローサイトメーター Gallios (Beckman

coulter) を用いて励起光 405nm、620nm 偏光フィルターを用いて PpIX を検出した。

各細胞種における細胞内外 PpIX 測定

黒ウェル/透明ボトム接着細胞用 96well プレートに、培養後コンフルエントになるよう細胞種ごとに調製した細胞懸濁液を 90 μL 播種し、24hr 培養を行った。培養後、5-ALA の最終濃度を 0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μM になるよう調整し、10 μL 投与した後、遮光して 4hr インキュベートした。作用後、上清 50 μL を別の well に移し、新鮮培地を 50 μL 加えたものを、細胞外 PpIX 測定サンプルとした。残りの上清を取り除き、滅菌済み PBS で洗浄した後、0.5 % SDS を加え細胞を溶解したものを、細胞内 PpIX 測定サンプルとした。検量線作成の為に、PpIX を用いて、0, 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 μM の濃度を培地と 0.5 % SDS の双方で作成した。ロータリーシェイカーを用いて 5 分攪拌し、Flexstation3 (Molecular Devices) を用いて細胞内外の PpIX を測定した。(細胞外 PpIX 測定は Ex.405nm Em.635nm、細胞内 PpIX 測定は Ex.405nm Em.632nm で行った)(Ex=励起光波長、Em=測定波長)

細胞内 PpIX の観察

35 mm 接着細胞用ディッシュに培養後コンフルエントになるよう NB-1 と MKN45 をそれぞれ播種し、24hr 培養を行った。最終濃度 1 mM となるよう 5-ALA を添加し、1, 4 時間インキュベートした。作用後、上清を除き、滅菌済み PBS で洗浄を行った後に、新鮮培地を添加し、蛍光顕微鏡 BZ-X700 (KEYENCE) を用いて励起波長 545nm、吸収波長 605nm で PpIX を観察した。

各細胞種に対する 5-ALA-PDT (in vitro)

5-ALA の作用までの操作は「各細胞種における細胞内外 PpIX 測定」と同様に行った。作用後、滅菌済み PBS で洗浄した後、新鮮培地を 100 μL 加え、PDT 装置 (SBI ファーマ) を用い、630nm 付近の赤色光で 10 分間照射を行った後、再び遮光して 24hr 培養後、WST-8 を 10 μL 加え、430nm の吸光度を測定して生存率を評価した。

5-ALA-PDT による細胞死形態の観察

35 mm 接着細胞用ディッシュに培養後コンフルエントになるよう NB-1 を播種し、24hr 培養を行った。最終濃度 125 μM となるよう 5-ALA を添加し、4 時間インキュベートした。作用後、滅菌済み PBS で洗浄した後、新鮮培地を 100 μL 加え、PDT 装置 (SBI ファーマ) を用い、630nm 付近の赤色光で 10 分間照射を行った。5-ALA-PDT 後、0, 3, 6, 12, 24 時間で細胞を回収し、Phosphatidylserine (PS)-FITC と Propidium iodide (PI) で染色を行い、フローサイトメーターを用いて細胞死形態を検討した。

細胞内への PpIX 蓄積に関わる分子の探索

各細胞から RNeasy Mini kit(QIAGEN)を用いて RNA を抽出し、DNase Treatment & Removal(ambion)を用いて、サンプル中の DNA を除去した。その後、PrimeScript RT Master Mix(TaKaRa)を用いて cDNA を作成し、KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR Kit を用いて各サンプルに含まれる PEPT1, PEPT2, ABCB6, ABCG2, ABCC1, ABCB1, FECH の mRNA 発現量を 7900HT Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)を用いて確認した。更に、各細胞を Protease Inhibitor Cocktail (SIGMA)を含む RIPA Buffer (Wako)で可溶化したタンパク質サンプルを用いて PEPT1, FECH のタンパク質発現を Western blot 法を用いて確認した。

4. 研究成果

各細胞種に対する 5-ALA の毒性試験 (図 1)

各細胞種における各濃度 (0, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000, 2000 μ M 5-ALA)における 5-ALA の毒性はみられなかった。

細胞内 PpIX の検出 (図 2)

NB-1 および MKN45 は時間依存的に細胞内 PpIX の蛍光(蓄積量)が増加していた。しかし、NB-1 は 5-ALA 作用 4 時間と 24 時間で蛍光に変化がみられなかったのに対して、MKN45 は 5-ALA 作用 4 時間に比べて 24 時間では蛍光が増加しており、細胞種によって最大蓄積量に達する時間に差があることが確認された。

各細胞種における細胞内外 PpIX 測定 (図 3)

各細胞種における細胞内 PpIX の蓄積量は全ての細胞種で濃度依存的に増加し、蓄積量は高いものから MKN45, NB-1, IMR32, NB-9, GOTO となり、細胞種によって細胞内に蓄積する PpIX 量に違いがみられた。また、細胞外に排出された PpIX の量も細胞内 PpIX と同じ傾向がみられた。

細胞内 PpIX の観察 (図 4-1, 4-2, 4-3)

NB-1 および MKN45 共に細胞内に蛍光が観察でき、時間依存的に細胞内へ PpIX が蓄積していることが確認された。

各細胞種に対する 5-ALA-PDT (*in vitro*) (図 5)

各細胞種における 5-ALA-PDT に対する細胞傷害性はより低い濃度でみられたものから MKN45, NB-1, IMR32, NB-9, GOTO となり、細胞内 PpIX 蓄積量と相関性がみられたことから 5-ALA-PDT による細胞傷害性が細胞内 PpIX 蓄積量に依存的であることが確認された。

5-ALA-PDT による細胞死形態の観察 (図 6-1, 6-2)

NB-1 に対して IC50 となる 125 μ M における

5-ALA-PDT による細胞死の形態を観察した。5-ALA-PDT 後、時間依存的にアポトーシス性細胞の増加がみられ、作用 12 時間で細胞生存率の低下がみられた。これらのことから、IC50 における 5-ALA-PDT は細胞に対してアポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こすことが確認された。

細胞内への PpIX 蓄積に関わる分子の探索 (図 7-1, 7-2)

5-ALA-PDT の有効性は細胞内 PpIX 蓄積量に依存的であることから、細胞内への PpIX 蓄積に関わる分子の検討を行った。細胞内 PpIX の蓄積には取り込みと排出に関わるアミノ酸トランスポーターと 5-ALA 代謝酵素群が関係していると言われている。アミノ酸の取り込みに関わる分子として PEPT1, PEPT2, ABCB6 の mRNA 発現と PEPT1 のタンパク質発現を確認した。これら取り込みに関わる分子は細胞内 PpIX 蓄積量と正の相関がみられるはずだが、各分子に正の相関はみられなかった。次に、アミノ酸の排出に関わる分子として ABCG2, ABCC1, ABCB1 の mRNA 発現を検討した。これら排出に関わる分子は細胞内 PpIX 蓄積量と負の相関がみられると予想されるが、各分子の mRNA 発現量に細胞内 PpIX 蓄積量との負の相関はみられなかった。最後に、5-ALA 代謝酵素である FECH の mRNA 発現とタンパク質発現を検討した。代謝酵素の発現量は細胞内 PpIX 蓄積量と負の相関がみられると予想されるが、mRNA 発現量とタンパク質発現量ともに細胞内 PpIX 蓄積量との負の相関はみられなかった。

まとめ

各細胞株 NB-1, IMR32, NB-9, GOTO, MKN45 に対する 5-ALA の毒性は見られなかった。

細胞内 PpIX 蓄積量は細胞種により異なり、蓄積量が多いものから

MKN45>NB-1>IMR32>NB-9>GOTO

となった。また、細胞外 PpIX 蓄積量も同様の傾向がみられた。

In vitro における各細胞種に対する 5-ALA-PDT の有効性は

MKN45>NB-1>IMR32>NB-9>GOTO

となり、細胞内 PpIX 蓄積量との相関性がみられた。

細胞内への PpIX の蓄積に関わる分子として PEPT1, PEPT2, ABCB6, ABCG2, ABCC1, ABCB1, FECH の mRNA/タンパク質発現量を検討したが、各細胞種における細胞内 PpIX 蓄積量との相関はみられなかった。

総括

本研究によって、*in vitro* において小児神経芽腫細胞株では 5-ALA 作用によって時間・濃度依存的に細胞内 PpIX を蓄積させ、細胞内 PpIX 蓄積量に依存的にアポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こすことが確

認された。

今後の展望

nude mouse に対して細胞内 PpIX 蓄積量の高かった NB-1, IMR32 を移植し、腫瘍形成後、経口投与による 5-ALA 投与後 PDT を行い、*in vivo*における 5-ALA-PDT の有効性を検討する。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[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
渡邊稔彦 Watanabe Toshihiko
(国立成育医療研究センター 外科 医師)
研究者番号：50306734

(2)研究分担者
なし

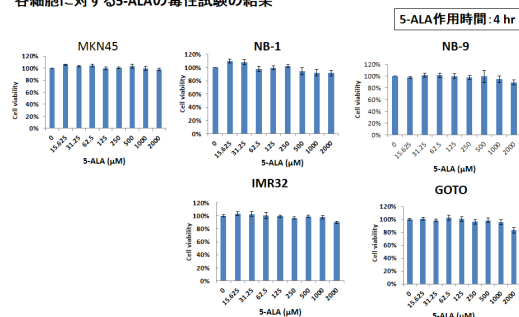
(3)連携研究者
大喜多肇 Okita Hajime
(慶應義塾大学病理学教室 准教授)
研究者番号：50317260
黒田達夫 Kuroda Tatsuo
(慶應義塾大学小児外科学教室 教授)
研究者番号：60170130

梨井康 Rii Kou
(国立成育医療研究センターRI 管理室
室長)

研究者番号：60321890

(図1)

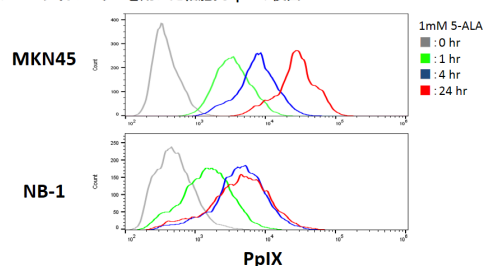
各細胞に対する5-ALAの毒性試験の結果



・各細胞に5-ALAに対する毒性は見られなかった。

(図2)

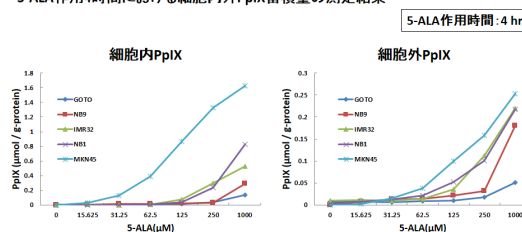
フローサイトメーターを用いた細胞内PpIXの検出



- ・MKN45, NB-1は共に1 mM 5-ALAの添加によってPpIXが検出された。
- ・MKN45は作用時間依存的な蛍光強度の増加(PpIXの蓄積)がみられた。
- ・NB-1は4 hrと24hrで蛍光強度の差がほとんどみられず、細胞種によってPpIXの蓄積速度や蓄積量に差があることが示された。

(図3)

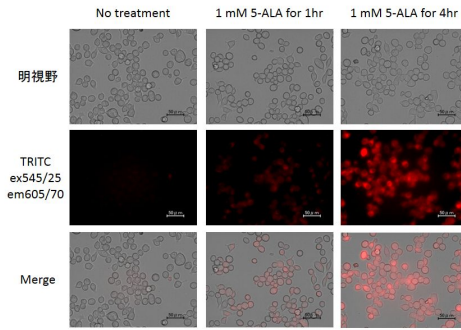
5-ALA作用4時間における細胞内外PpIX蓄積量の測定結果



- ・細胞内外PpIX蓄積量は細胞種によって違いがみられた
- ・MKN45は細胞内PpIXが多く、小児神経芽腫はNB-1>IMR32>NB9>GOTOの順に多く蓄積していた
- ・細胞外PpIX蓄積量は細胞内PpIX蓄積量と同じ傾向がみられた

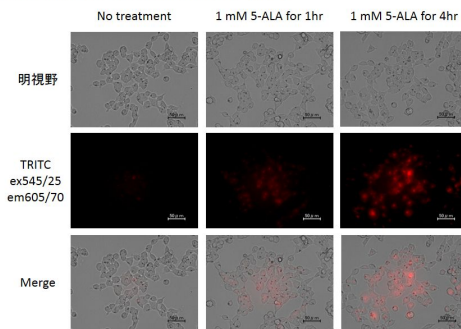
(図4-1)

蛍光顕微鏡を用いた細胞内PpIXの観察 (MKN45)



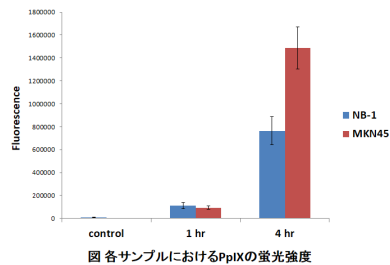
(図4-2)

蛍光顕微鏡を用いた細胞内PpIXの観察 (NB-1)



(図4-3)

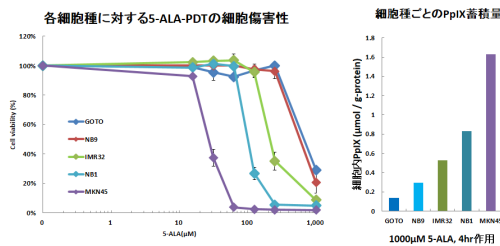
蛍光顕微鏡を用いた細胞内PpIXの観察



1mM 5-ALA作用4時間におけるNB-1とMKN45の蛍光強度はPpIX蓄積量と同様の傾向がみられた

(図5)

5-ALA作用4時間における5-ALA-PDT (in vitro)の細胞傷害性評価の結果



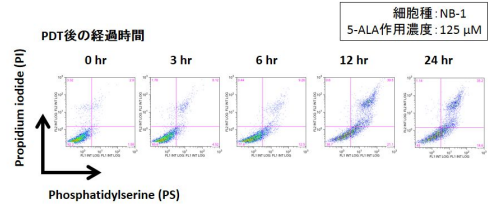
各細胞種に対する5-ALA-PDTの細胞傷害性は

MKN45>NB1>IMR32>NB9>GOTO

の順に高く、細胞内PpIX蓄積量が多い細胞種ほど低濃度での細胞傷害性がみられたことから、5-ALA-PDTの細胞傷害性と細胞内PpIX蓄積量には相関性があることが示された。

(図6-1)

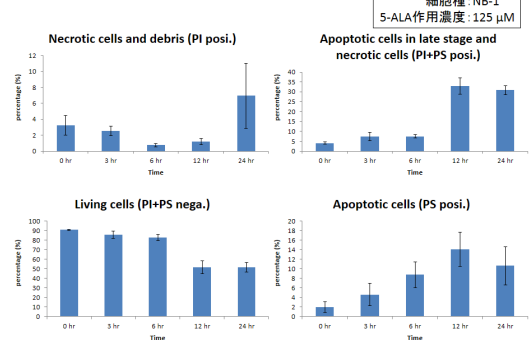
5-ALA-PDTによる細胞死形態の観察



- PDT後、時間依存的にアポトーシス細胞(PS posi.)が増加した。
- PDT後、12時間以降で死細胞(PI+PS posi.)が増加していることからIC50における5-ALA-PDTは持続的なアポトーシスを誘導することで細胞死を引き起こすと考えられる。

(図6-2)

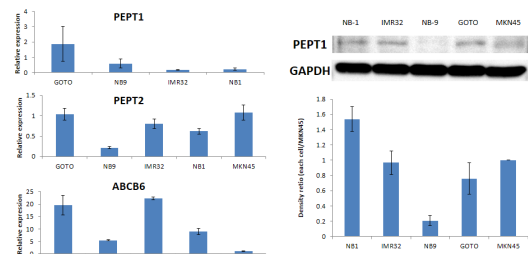
5-ALA-PDTによる細胞死形態の観察



各細胞の割合をグラフに示した。

(図7-1)

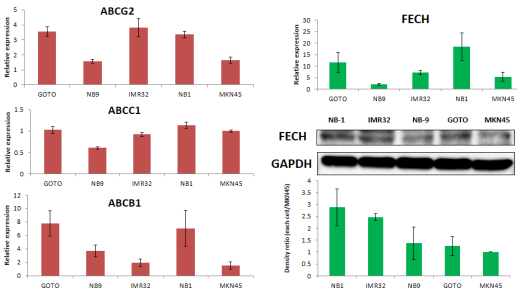
PpIXの蓄積に関わる分子の探索 (取り込みに関わるアミノ酸トランスポーター)



- 取り込みに関わる分子の発現量と細胞内PpIX蓄積量には正の相関がみられると考えられる
- しかし、PEPT1, PEPT2, ABCB6のmRNAおよびPEPT1のタンパク質発現量に細胞内PpIX蓄積量との相関性はみられなかった

(図7-2)

PpIXの蓄積に関わる分子の探索 (排出に関わるアミノ酸トランスポーター, PpIX代謝酵素)



- 排出に関わる分子とPpIX代謝酵素の発現量と細胞内PpIX蓄積量には負の相関がみられると考えられる
- しかし、ABCG2, ABCB1, FECHのmRNAおよびFECHのタンパク質発現量に細胞内PpIX蓄積量との相関性はみられなかった