

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870622

研究課題名(和文) 膵癌腹膜播種に対する新規診断法ならびに新規治療法の開発

研究課題名(英文) Photodynamic diagnosis and therapy of peritoneal dissemination for pancreatic cancer using 5-ALA.

研究代表者

村山 康利 (Murayama, Yasutoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50578979

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)：難治性の癌である膵癌に対する新たな微小癌巢の診断法ならびに治療を開発することが目的である。5-aminolevulinic acid(5-ALA)はヘムの前駆体物質であり、内因性のアミノ酸である。5-ALAは代謝されると、蛍光物質であるprotoporphyrin IX (PpIX)を癌細胞内で蓄積する。18例の膵癌患者に5-ALAを術前に内服してもらい、術中に蛍光観察すると、蛍光陽性な腹膜結節を有する症例を2例認め、病理診断でも腹膜播種と診断された。膵癌細胞株を5-ALAで処理すると、いずれの細胞株でもPpIXの蛍光を認め、LEDを照射するとコントロール群と比較すると有意に治療効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a natural amino acid and heme precursor. 5-ALA is converted to protoporphyrin IX (PpIX) that is photosensitizer. In this study, we evaluated the usefulness of photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) using 5-ALA. Fluorescence laparoscopy was performed in 18 patients with advanced pancreatic cancer. Two of the 18 patients demonstrated by fluorescence laparoscopy. All lesions were diagnosed as peritoneal disseminations by hematoxylin and eosin staining. The human pancreas cancer cell lines were used both in vitro and in vivo. After 5-ALA administration, cells were irradiated using various LEDs. After irradiation, the cytotoxic effects of ALA-PDT were measured using the MST assay. After 5-ALA administration xenograft mice were irradiated with LEDs. ALA-PDT was repeated three times at weekly intervals. Tumor weights were measured. Relative to controls, ALA-PDT using LEDs showed significant anti-tumor effects both in vitro and in vivo.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 腹膜播種 光線力学的診断 光線力学的治療 5-ALA

1. 研究開始当初の背景

5-ALA(5-aminolevulinic acid)は内因性のヘム合成前駆体のアミノ酸である。癌細胞では、その代謝酵素である porphobilinogen deaminase の活性が高く、ferrochelatase の活性が低いことが知られている。その結果として、5-ALA を投与すると protoporphyrinIX(PpIX)の癌細胞内での増加・蓄積をきたし、5-ALA の代謝産物である PpIX の光励起特性を利用した光線力学的診断(Photodynamic diagnosis: 以下 PDD)の報告が散見される。更には、この光励起された PpIX が、三重項酸素状態を通じて基底状態に復帰する際に産生する、一重項酸素および OH ラジカルを介したアポトーシス誘導効果を利用した光線力学的治療(Photodynamic therapy: 以下 PDT)の報告もされた。PDT はそれ単独の効果も高いが、手術・化学療法・放射線療法との併用も可能である。

我々は、これらの背景を基に、ヒト大腸癌細胞株の同所性移植によるマウスの直腸癌リンパ節転移モデルを用いて、5-ALA の術前投与による微小転移巣の検出の有用性を世界に先がけて発表した。同蛍光診断法を用いた、リンパ節内の微小転移巣の検出能については、従来の HE 染色による病理診断との比較で、感度 100%、特異度 100%と極めて有用性が高いことも確認した。また、同手法を胃癌・大腸癌に対する実地臨床へも応用し、近傍リンパ節における術中のリアルタイム転移診断の有用性についても確認した。更には、進行胃癌・大腸癌患者における術前 5-ALA 投与による術中腹膜播種診断や、漿膜浸潤診断の有用性についても確認している(論文投稿中)。大腸癌移植モデルに対する PDT の有効性についても確認し、他癌種への応用が期待される。

膵癌は消化器癌の中でも代表的な難治性の癌であり、外科手術のみによる成績は極めて不良であることから、今後は新たな化学療法剤を利用した集学的治療に期待が寄せられている。そのため、個々の患者に適した治療法(外科手術の適応や方法)の選択が必要不可欠であり、正確な病期診断が極めて重要となる。本研究課題による新たな診断手法の確立によって、肉眼では捉えられない微小な癌転移の存在診断が可能となり(腹膜播種、肝転移、腹水細胞診陽性など)結果として、高度進行膵癌に対する Over-surgery を避けることが可能である。一方で、系統的郭清が比較的困難な膵癌手術における至適化リンパ節郭清にも応用可能であり、また一方で、微量の腹膜播種巣や、神経切離断端面などの手術による切除が不可能な微量遺残癌に対する PDT は、外科手術のみでは根治不可能な高度進行膵癌患者に極めて大きな恩恵を齎す可能性を秘めた治療法になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、まだ難治癌である膵癌患者の術

中の 1)潜在的腹膜播種の検出、2)センチネルリンパ節への微小転移の検出、3)微小肝転移の検出という新規の診断法の確立並びに、光線力学的治療を応用した膵癌の微小な臨床的潜在癌に対する新たな治療法の確立を目的とした基礎的検討を行う。

(1) 新規膵癌腹膜播種、リンパ節転移、微小肝転移診断法の確立

5-ALA 由来 PpIX の励起に適した腹腔鏡下高輝度励起照明装置および蛍光検出装置の開発を行い、膵癌転移診断において適用条件の最適化を行い、蛍光腹腔鏡診断システムを構築する。

癌患者の洗浄腹水を用いて、5-ALA 由来 PpIX の定量化を試みる。

転移巣のスペクトル測定、蛍光強度測定、コンピュータによる演算処理(Linear Unmixing)により微小転移診断法の確立。

上記で得た結果を基に新規の診断機器の開発を光学技術者と共同で行う。

(2) 5-ALA を用いた膵癌腹膜播種に対する光線力学的治療(Photodynamic therapy: PDT)に対する基礎的研究

5-ALA 投与後の膵癌細胞株を用いて各種波長の LED による光照射による抗腫瘍効果を検討し、照射エネルギーと波長の最適化を試みる。

マウス膵癌細胞株皮下移植モデルや腹膜播種モデルを作製し、5-ALA 投与後の各種 LED 光照射を行い、抗腫瘍効果を判定するとともに、切除組織におけるアポトーシス誘導率についても検討を加え、in vivo での照射条件の最適化を図る。

癌細胞内の PpIX 蓄積量を増加させる事により PDT の効果を増強させる。具体的には PpIX は ABCG2 により排泄させるが、ABCG2 により排泄される抗癌剤と併用し、競合阻害する事で、癌細胞内の PpIX 蓄積量を増やす。

3. 研究の方法

研究初年度は、5-ALA の術前投与を行った膵癌患者における切除膵組織ならびに郭清リンパ節に対する摘出標本上での蛍光診断を行い、通常病理検査結果との対比による同手法の膵癌への適用の妥当性について検討する。また、膵癌細胞株を用いた基礎検討による細胞診への応用の可能性についても検討する。更に、膵癌細胞株並びにマウスモデルを用いた光線力学療法を確立する。

これらの結果を受けて、次年度は、膵癌患者の術中蛍光観察を行い、遠隔転移(腹膜・肝臓)や所属リンパ節転移検出についての検討を行う。更には次世代の蛍光腹腔鏡診断機器の開発を目指す。一方で、PpIX の細胞外排泄に関わる ABCG2 を阻害することにより癌細胞内の PpIX 蓄積量を増加させ、膵癌腹膜播種に対する光線力学的治療の治療効果を

増強させる。

(1)5-ALA を用いた膵癌術後標本での切除断端、転移リンパ節リアルタイム蛍光診断法の開発ならびに蛍光腹腔鏡検査への応用

進行膵癌との確定診断を受けた術前患者を検索対象とし、術前に5-ALA15~20mg/kgを内服し、通常の膵切除を施行。切除標本に対して蛍光観察を行う。

蛍光診断に関しては実体蛍光顕微鏡(SZX12:オリンパス)を用いて切除標本に対する蛍光観察、蛍光スペクトル測定並びに蛍光強度を測定することにより、腫瘍のcut off値を決定し診断能の向上を図る。

通常の観察下では、転移巣の蛍光が正常な脂肪組織・コラーゲンなどの自家蛍光のクロストークが発生することにより、識別困難となる可能性がある。そこで、各波長の蛍光スペクトルの画像の作製、ならびにコンピュータによる演算処理(Linear Unmixing)を行う事で、蛍光スペクトルが近接する蛍光色素間のクロストークを排除し、結果としてPpIXの蛍光のみを捉えるよう工夫し、膵臓癌における微小転移・浸潤診断に対する有用性を検討する。

蛍光腹腔鏡観察システムは既存の内視鏡統合ビデオシステム(プロセッサー:CV-180と光源装置:CLV-180および硬性鏡:OTV-Y0007;オリンパス)を使用し、励起カットフィルタを光源装置に組み込み、硬性腹腔鏡にフィルターを挿入する事で作製する。

進行膵癌患者に術前に5-ALAを内服してもらい、で作製した蛍光腹腔鏡観察を行う。白色光による腹膜播種、肝転移、リンパ節転移診断と蛍光診断を比較する。病理組織診断の結果を比較し蛍光腹腔鏡を用いたリアルタイム診断の優位性を証明する。

(2)膵癌細胞株を用いた腹水細胞診への応用ならびに臨床応用

5-ALA処理を行ったヒト膵癌細胞株(Panc-1)の細胞密度の希釈列を作製し、通常の腹水細胞診同様の遠心分離後の共焦点顕微鏡(FV1000:Olympus)を用いた蛍光診断による検討を行う。また、同希釈列を用いたフローサイトメトリーによるPpIX陽性細胞の分離も試みる。

の結果と、従来の細胞診ならびにリアルタイムRT-PCR結果との比較検討を行い、同蛍光診断の有用性について検討する。

(1)と同様に膵癌患者に対して5-ALAを術前に内服してもらい、洗浄腹水を採取。遠心分離後に共焦点顕微鏡を用いた蛍光観察を行う。さらに、フローサイトメトリーによりPpIX陽性細胞の分離も試みる。

(3)ヒト膵癌細胞株および皮下移植腫瘍モデル、腹膜播種モデルに対する光線力学的療法の有用性についての検討

の有用性についての検討

ヒト膵癌細胞株Panc-1、PK-1、PK-45Hなどを培養し、5-ALAで処理した後に、LEDで光を照射し、細胞死の効果をMTT assayで測定する。至適電力、時間を検討する。照射波長はPpIXの吸収スペクトルピークに合わせて、各色のLEDを用いて行う。

で用いた 0.5×10^6 個の細胞をメスのBALB/cヌードマウスの皮下に注入することで皮下移植モデルを作製、また、腹腔内に注入することで腹膜播種モデルを作製する。

5-ALAを静注後に、LEDの光を照射する。1)と同様に至適条件を設定する。腫瘍を摘出し、TUNEL染色、caspase-3染色を行い、LED照射群で腫瘍細胞をアポトーシスに誘導できているかを確認する。

PDTの効果を増強させるためにABCG2より排泄させる抗癌剤(gefitinib、imatinib、CPT-11など)並びにABCG2の阻害薬であるfumitremorgin Cを用いる事により癌細胞内のPpIX蓄積量を増加させる。PDTを行い、通常のPDTと治療効果を比較し、ABCG2阻害が有用である事を確認する。

4. 研究成果

18例の膵癌患者に5-ALAを術前に内服してもらい、術中に蛍光診断を行った。蛍光陽性腹膜播種結節を有する症例を2例認め、病理診断でも腹膜播種と診断された。切除標本に対する蛍光観察では腫瘍組織に一致してPpIXの蛍光が確認できた。しかし、蛍光強度の弱い症例やリンパ節でのfalse positive、negative例も認めた。リンパ節に関してはunmixingを行う事でコラーゲンや脂肪組織の自家蛍光を除外することができたが、PpIXの蛍光も減弱し、今後さらなる検討が必要と考えられた。

5-ALA処理を行ったヒト膵癌細胞株(Panc-1)の細胞密度の希釈列を作製し、通常の腹水細胞診同様の遠心分離後の共焦点顕微鏡(FV1000:Olympus)を用いた蛍光診断では、PpIX陽性細胞が確認された。また、同希釈列を用いてフローサイトメトリーを行う事でPpIX陽性細胞の分離が可能であり、今後臨床応用に向けて検討を引き続き行う。

膵癌細胞株である、Panc-1、MIA Paca2、PK-45H、KP4-1、PK-59を5-ALAで処理するといずれの細胞株もPpIXの蛍光を確認することができた。また、5-ALAで処理した細胞株にLEDの光を照射するとコントロールと比較し、有意に治療効果を認めた。MIA Paca2を皮下移植し、LEDを照射するとコントロールと比較し有意に治療効果を認めた。また、PpIXの吸収スペクトルに合わせた3種類のLED(青色、緑色、赤色)を用いると、その効果は青>緑>赤の順であった。HE染色では壊死部分が多く、免疫染色ではアポトーシスの部位も認められたが、全範囲ではないため、今後さらに検討

する。

膵癌細胞株に5-ALAとともにABCG2を競合阻害する薬剤を投与すると、PpIXの蛍光強度は増強し、PDTの治療効果も増強した。その理由としてROS (reactive oxygen species) を測定すると治療効果の高い群でROSの産生量が高いことが確認できた。しかし、照射光の波長によりその産生量と治療効果に差があり、今後さらなる検討が必要と考えられた。

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 5 件)

Kondo Y, Murayama Y. et al.:
Fluorescent detection of peritoneal metastasis in human colorectal cancer using 5-aminolevulinic acid. 査読あり
Int J Oncol. 2014 May 45; 41-46. doi:
10.3892/ijco.2014.2417. Epub 2014 May 6.

Harada K, Murayama Y. et al.: Detection of lymph node metastases in human colorectal cancer by using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence with spectral unmixing 査読あり Int J Mol Sci. 2013 Nov 21;14(11):23140-52. doi: 10.3390/ijms141123140.

Koizumi N, Murayama Y. et al: Detection of metastatic lymph nodes using 5-aminolevulinic acid in patients with gastric cancer 査読あり Ann Surg Oncol. 2013 Oct;20(11):3541-8. doi: 10.1245/s10434-013-3017-3. Epub 2013 Jul 12.

Hino H, Murayama Y. et al.:
5-Aminolevulinic acid- mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes of different wavelengths in a mouse model of peritoneally disseminated gastric cancer. 査読あり J Surg Res. 2013 Jun 185; 119-126. Doi: 10.1016/j.jss.2013.05.048. Epub 2013 Jun 2.

Hatakeyama T, Murayama Y. et al.:
Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. 査読あり Oncol Rep. 2013 Jan 29; 911-916. doi: 10.3892/or.2013.2220. Epub 2013 Jan 3.

[学会発表](計 18 件)

原田恭一、村山康利ほか：膵癌に対する5-aminolevulinic acid(5-ALA)を用いたphotodynamic diagnosis(PDD)の検討。第115回日本外科学会定期学術集会 2015

年4月16日～18日 名古屋

Murayama Y.: Intraoperative Imaging and Photodynamic Therapy for GI Cancer Using 5-ALA. 2nd International Congress on Fluorescent Imaging Guided Surgery Feb 14th～18th 2015 Miami, Florida, USA
Murayama Y. et al. Intraoperative fluorescence diagnosis for gastric cancer using 5-aminolevulinic acid. The 39th biennial world congress of the international college of surgeons Oct 20th～23rd 2014 Bali

Hatakeyama T, Murayama Y. et al.: Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colorectal cancer cells. The 39th biennial world congress of the international college of surgeons Oct 20th～23rd 2014 Bali

Harada K, Murayama Y. et al.: 5-Aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis in primary gastric/colorectal cancer. The 39th biennial world congress of the international college of surgeons Oct 20th～23rd 2014 Bali

日野仁嗣、村山康利ほか：5-aminolevulinic acidを用いた胃癌・大腸癌原発巣に対する photodynamic diagnosis についての検討。第69回日本消化器外科学会総会 2014年7月16日～18日郡山

村山康利ほか：5ALAを用いた胃癌・大腸癌に対する腹膜播種診断ならびに光線力学的療法の有用性について。第69回日本消化器外科学会総会 2014年7月16日～18日郡山

西村真澄、村山康利ほか：肝細胞癌に対する5-アミノレブリン酸を用いた光線力学的診断について。第69回日本消化器外科学会総会 2014年7月16日～18日郡山

西村真澄、村山康利ほか：胃癌マウスモデルに対する5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた光線力学的療法について。第114回日本外科学会定期学術集会 2014年4月3日～5日 京都

村山康利ほか：5-ALAを用いた大腸癌腹膜播種に対する術中蛍光診断の有用性についての検討。第68回日本大腸肛門病学会 2013年11月15日～16日 東京

村山康利ほか：5-アミノレブリン酸を用いたマウス胃癌腹膜播種モデルに対する光線力学的療法について 第11回日本消化器外科大会 2013年10月11日～12日 東京

近藤裕、村山康利ほか：5-アミノレブリン酸を用いた大腸癌リンパ節転移の光線力学診断の検討。第72回日本癌学会

2013年10月3日～5日 横浜
村山康利ほか：5-ALA を用いた胃癌・大腸癌腹膜播種に対する術中光診断の有用性についての検討． 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日～19日 宮崎

小泉範明、村山康利ほか：蛍光を用いた正確な消化器癌リンパ節転移迅速診断法の開発． 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日～19日 宮崎

近藤裕、村山康利ほか：5 - アミノレブリン酸を用いた大腸癌リンパ節転移の光線力学的診断の応用． 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日～19日 宮崎

日野仁嗣、村山康利ほか：マウス胃癌腹膜播種モデルにおける 5-ALA を用いた光線力学的療法の有効性についての検討． 第 68 回日本消化器外科学会総会 2013年7月17日～19日 宮崎

村山康利ほか：5-ALA を用いた胃癌に対する術中腹膜播種診断ならびに光線力学的療法の有効性についての検討． 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日～13日 福岡

米花正智、村山康利ほか：5-aminolevulinic acid を用いた食道癌リンパ節転移に対する光線力学的診断． 第 113 回日本外科学会定期学術集会 2013年4月11日～13日 福岡

村山 康利 (MURAYAMA YASUTOSHI)
京都府立医科大学・医学研究科・助教
研究者番号：50578979

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

〔図書〕(計 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