

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430141

研究課題名(和文) 癌における低分子代謝異常の解明とこれを利用した光線力学診断法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the photodiagnosis for cancer using small molecule metabolism elucidation in cancer cells

研究代表者

小倉 俊一郎 (Ogura, Shun-ichiro)

東京工業大学・生命理工学院・准教授

研究者番号：90343160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与することにより腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積することが知られており、これを利用した癌の診断が広く用いられている。本研究では癌におけるこれらの代謝異常の全容を明らかとすることを目的とした。その結果、ALA投与後の種々のトランスポーターの発現がポルフィリン蓄積に重要であることが分かった。さらに低酸素下における癌や休眠癌細胞など難治療性の癌における診断法を確立できた。

研究成果の概要(英文)：It is well known that porphyrin accumulates in cancer by the administration of aminolevulinic acid (ALA) to cancer patient and cancer diagnosis using this phenomenon is widely used. In this study, the mechanism of porphyrin accumulation is investigated. As a results, various kinds of transporters after ALA administration was important to porphyrin accumulation. Furthermore, we established the diagnostic method in cancer of difficulty treatment characteristics including hypoxic cancer or dormant cancer.

研究分野：分子生物学

キーワード：光線力学診断 アミノレブリン酸 ポルフィリン 鉄代謝 薬物排出トランスポーター 低酸素 休眠癌細胞 癌幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

癌患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与することによって腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積することが知られている。ポルフィリンは赤色蛍光を発する化合物であるため、この現象を用いた癌の診断(光線力学診断、Photodynamic Diagnosis (PDD))が臨床で広く用いられるようになってきた。しかしながら、ALA投与後のポルフィリン蓄積が十分でない腫瘍の存在も指摘されており、PDDの適応範囲は限定的であると言える。

このようなPDDの適応範囲が限定的であった原因として、ALA投与後のポルフィリン蓄積メカニズムの解明が不十分であったことが挙げられる。特にALAからポルフィリンに至る低分子の代謝異常はほとんど知られていなかった。そこで申請者はこれまでに数種類の胃癌培養細胞株においてALA投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積に重要な役割を果たす生体分子を網羅的に解析してきた。(科研費若手B、アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの解明、研究代表者：小倉俊一郎)その結果、低分子化合物のうち、プロトポルフィリンIXが腫瘍特異的に蓄積することを明らかとした。さらに、ALAを細胞内に取り込むトランスポーターであるPEPT1が腫瘍で亢進し、ポルフィリンを細胞外に排出するトランスポーターであるABCG2が腫瘍で抑制されていることを明らかとしてきた(Hagiya et al, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2012, 9, 204-214)。そこで本研究ではPDDのさらなる適応拡大を目指し、種々の癌において、これらのトランスポーターを含むポルフィリン代謝にかかわる生体分子の網羅解析を行い、ALA投与後のポルフィリン蓄積メカニズムを考察する。さらに、上記のALA・ポルフィリンのトランスポーターに加え、鉄の輸送にかかわるタンパク質等にも注目し、ALA投与後のポルフィリン蓄積メカニズムを統合的に解析する。

## 2. 研究の目的

本研究はPDDに関連する低分子化合物の癌における代謝異常を明らかとし、PDDの効果向上をもたらす得る薬剤の開発を行うものである。

## 3. 研究の方法

はじめに腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムを詳細に解析する。特に、ALAならびにポルフィリンの輸送に関わるトランスポーターや鉄代謝を担う酵素群などの発現とポルフィリン蓄積の相関を詳しく調べる。またこれらをコントロールし得る薬剤を開発し、PDDのさらなる適応拡大を目指す。具体的にはトランスポーターの阻害剤や亢進剤、鉄代謝をコントロールする薬剤の開発を行う。これらの知見を統合し、PDDを指標とした癌の個性診断のプラットフォームを構

築する。

## 4. 研究成果

### (1) 癌における低分子代謝異常の解明

はじめに、代謝異常に関する分子の中で中心的と思われる関連トランスポーターの同定を行った。その結果、従来関連が認められていたPEPT1やABCG2の他にABCB6が新たにポルフィリン前駆体排出トランスポーターとして機能していることが明らかとなった。このトランスポーターは実際に診断で用いるポルフィリンの前駆体の状態のポルフィリンを細胞外に排出するため、極めて重要な役割を果たしていると言える。さらに、このトランスポーターは低酸素状態において発現が亢進することが分かった。従来から低酸素状態において腫瘍でのポルフィリン蓄積量が減少する事実が報告されていた。本研究の結果から、この現象の理由が明らかとなり、低酸素におけるABCB6の発現がポルフィリン蓄積に大きな影響を与えていることが分かった。

さらに鉄イオン代謝の影響も詳しく調べた。その結果、ポルフィリンに挿入される鉄イオン濃度がポルフィリン蓄積に大きな影響を与えていることが分かった。具体的には癌細胞では鉄イオン濃度が低く、正常細胞では鉄イオン濃度が高いため、癌細胞は正常細胞と比較して多くのポルフィリンを蓄積することが明らかとなった。

### (2) 光線力学診断の診断効率の向上プラットフォームの構築

これらの知見を踏まえ、診断効率をあげるためにトランスポーターの阻害剤の開発ならびに鉄イオン濃度のコントロールについて焦点を定めた研究を行った。その結果、ポルフィリン排出トランスポーターであるABCG2を阻害する薬剤を用いることによって、ポルフィリン蓄積量を飛躍的に向上させることに成功した。さらに鉄を共添加することによって正常細胞へのポルフィリン蓄積を低減させることに成功し、腫瘍選択性を向上させることを明らかとした。

### (3) 光線力学診断の難治療性癌への応用

これまでに得られた知見を基に特殊環境にある難治療性の癌に対する診断法の確立を行った。具体的には低酸素下における癌ならびに多剤耐性能を持つ休眠癌細胞・癌幹細胞への適応を検討した。低酸素下における癌は、通常酸素下と比較してポルフィリン代謝能が大きく異なることを示した。特にポルフィリン酸化酵素が重要な役割を担っていることを示し、酸素代謝をコントロールすることによってポルフィリン蓄積量を増

加させ、診断効率をあげることに成功した (図1)。

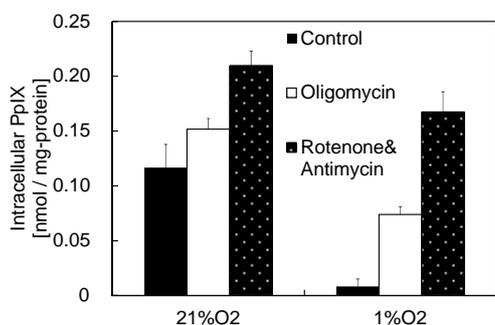


図1 呼吸鎖複合体阻害による低酸素下におけるポルフィリン蓄積量の解析

胃がん細胞株 KatoIII に 1 mM ALA を加えた後 24 時間酸素濃度 21% O<sub>2</sub> または 1% O<sub>2</sub> 条件で培養を行った。また、呼吸鎖複合体 I 阻害剤として 1 μM Rotenone、呼吸鎖複合体 III 阻害剤として 1 μM Antimycin、呼吸鎖複合体 V 阻害剤として 0.1 μM Oligomycin を用いた。ポルフィリン量は HPLC を用いて測定した。

また、休眠癌細胞・癌幹細胞においては上述のような鉄イオンのコントロールによって従来困難であった休眠癌細胞・癌幹細胞の可視化に成功した。具体的にはキレーターを用いた腫瘍内の鉄量を下げる方法論を採用している。以上のように本研究では生化学的基礎検討を通して、従来では困難であった特殊環境下における癌の光線力学診断に成功しており、十分な成果をあげていると言える。

##### 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12件)(すべて査読あり)

1. W. Wang, K. Tabu, Y. Hagiya, Y. Sugiyama, Y. Kokubu, Y. Murota, S. Ogura and T. Taga Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation, *Scientific Reports*, 2017, 7, 42070, DOI: 10.1038/srep42070.

2. T. Nakayama, S. Otsuka, T. Kobayashi, H. Okajima, K. Matsumoto, Y. Hagiya, K. Inoue, T. Shuin, M. Nakajima, T. Tanaka and

##### S. Ogura

Dormant cancer cells accumulate high protoporphyrin IX levels and are sensitive to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, *Scientific Reports*, 2016, 6, 36478, DOI: 10.1038/srep36478.

3. T. Osaki, I. Yokoe, S. Ogura, K. Takahashi, K. Murakami, K. Inoue, M. Ishizuka, T. Tanaka, L. Li, A. Sugiyama, K. Azuma, Y. Murahata, T. Tsuka, N. Ito, T. Imagawa, Y. Okamoto

Photodynamic detection of canine mammary gland tumours after oral administration of 5-aminolevulinic acid, *Veterinary and Comparative Oncology*, 2016, DOI: 10.1111/vco.12213.

4. S. Otsuka, K. Matsumoto, M. Nakajima, T. Tanaka and S. Ogura

Oxygen availability for porphyrin biosynthesis enzymes determines the production of protoporphyrin IX (PpIX) during hypoxia, *PLoS ONE*, 2015, 10, e0146026, DOI: 10.1371/journal.pone.0146026.

5. T. Sawamura, T. Tanaka, H. Ishige, M. Iizuka, Y. Murayama, E. Otsuji, A. Ohkubo, S. Ogura and H. Yuasa

The effect of coatings on the affinity of lanthanide nanoparticles to MKN45 and HeLa cancer cells and improvement in photodynamic therapy efficiency, *International Journal of Molecular Sciences*, 2015, 16, 22415-22424, DOI: 10.3390/ijms160922415.

6. M. Miura, K. Ito, M. Hayashi, M. Nakajima, T. Tanaka and S. Ogura

The effect of 5-aminolevulinic acid on cytochrome P450-mediated prodrug activation, *PLoS ONE*, 2015, 10, e0131793, DOI: 10.1371/journal.pone.0131793.

7. M. Hayashi, H. Fukuhara, K. Inoue, T. Shuin, Y. Hagiya, M. Nakajima, T. Tanaka and S. Ogura

The effect of iron ion on the specificity of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid, *PLoS ONE*, 2015, 10, e0122351, DOI: 10.1371/journal.pone.0122351.

8. K. Matsumoto, Y. Hagiya, Y. Endo, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka and S. Ogura

Effects of plasma membrane ABCB6 on 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced porphyrin accumulation in vitro: Tumor

cell response to hypoxia, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2015, 12, 45-51, DOI: 10.1016/j.pdpdt.2014.12.008.

9. U. Ota, H. Fukuhara, M. Ishizuka, F. Abe, C. Kawada, K. Tamura, T. Tanaka, K. Inoue, S. Ogura and T. Shuin

Plasma protoporphyrin IX following administration of 5-aminolevulinic acid as a potential tumor marker, *Molecular and Clinical Oncology*, 2015, 3, 797-801, DOI: 10.3892/mco.2015.549.

10. T. Chibazakura, Y. Toriyabe, H. Fujii, K. Takahashi, M. Kawakami, H. Kuwamura, H. Haga, S. Ogura, F. Abe, M. Nakajima, H. Yoshikawa and T. Tanaka

5-aminolevulinic acid enhances cell death under thermal stress in certain cancer cell lines, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2015, 79, 422-431, DOI: 10.1080/09168451.2014.975186.

11. K. Yamashita, Y. Hagiya, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka and S. Ogura

The effects of the heme precursor 5-aminolevulinic acid (ALA) on REV-ERB activation, *FEBS Open Bio*, 2014, 4, 347-352, DOI: 10.1016/j.fob.2014.03.010.

12. Y. Sugiyama, Y. Hagiya, M. Nakajima, M. Ishizuka, T. Tanaka and S. Ogura

The heme precursor 5-aminolevulinic acid disrupts the Warburg effect in tumor cells and induces caspase-dependent apoptosis, *Oncology Reports*, 2014, 31, 1282-1286, DOI: 10.3892/or.2013.2945.

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 王文茜、楠康一、萩谷祐一郎、室田吉貴、小倉俊一郎、田賀哲也

アミノレブリン酸を用いた C6 グリオーマ幹細胞の検出に対する鉄キレート剤による向上効果、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日～2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜

2. 大塚慎平、松本健太郎、小倉俊一郎

5-アミノレブリン酸を用いた光線力学療法に対する酸素の重要性、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日～2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜

3. S. Ogura, M. Hayashi, H. Fukuhara, K. Inoue, T. Shuin, Y. Hagiya, M. Nakajima, T. Tanaka

The effect of iron ion on the specificity of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA),

International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2015 年 12 月 15 日～2015 年 12 月 20 日、Honolulu, Hawaii

4. 小倉俊一郎

アミノレブリン酸添加後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積、第 38 回日本分子生物学会年回、第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日、神戸ポートアイランド

5. 小倉俊一郎

5-アミノレブリン酸添加後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの解明、第 36 回日本レーザー医学会総会、2015 年 10 月 24 日～25 日、栃木県総合文化センター

6. 小倉俊一郎

5-アミノレブリン酸添加後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの解明、第 25 回日本光線力学学会学術総会、2015 年 7 月 10 日～11 日、京王プラザホテル

7. 大塚慎平、松本健太郎、田中徹、大倉一郎、小倉俊一郎

低酸素環境における PpIX 蓄積に対する電子伝達系の影響、第 13 回がんハイポキシア研究会、2015 年 6 月 5 日～6 日、国立遺伝学研究所

8. 大塚慎平、松本健太郎、田中徹、大倉一郎、小倉俊一郎

アミノレブリン酸(ALA)を利用したがん治療における低酸素の役割の解明、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26 日～29 日、日本大学船橋キャンパス

9. Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Ichiro Okura

Tumor-specific porphyrin accumulation and tumor screening after administration of aminolevulinic acid, 21th International SPACC Symposium, 2014 年 10 月 31 日～11 月 3 日、Kogakuin University, Shinjuku, Tokyo

10. 中山沢、松本健太郎、小倉俊一郎

がん細胞スフェロイドにおけるアミノレブリン酸添加後のポルフィリン代謝解析、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜

11. 小倉俊一郎、萩谷祐一郎、中島元夫、田中徹

アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積機構の解明、第 9 回バイオ関連化学シンポジウム、2014 年 9 月 11 日～13 日、岡山大学津島キャンパス

12. 林麻衣子、福原秀雄、井上啓史、執印太郎、田中徹、大倉一郎、小倉俊一郎

アミノレブリン酸を用いた光線力学療法における鉄の添加効果、日本鉄バイオサイエンス学会第38回学術集会、2014年9月6日~7日、仙台国際センター

〔産業財産権〕

取得状況（計2件）

1. 名称：光線力学的診断剤、及び、フォトブリーチング防止剤  
発明者：小倉俊一郎，石塚 昌宏，田中 徹，石井 琢也  
権利者：国立大学法人東京工業大学，SBIファーマ株式会社  
種類：特許  
番号：特許第5883889号  
取得年月日：2016/02/12  
国内外の別：国内

2. 名称：赤外域光による光線力学的治療又は診断剤  
発明者：湯浅英哉，小倉俊一郎，高橋 究，井上 克司，田中 徹  
権利者：国立大学法人東京工業大学，SBIファーマ株式会社  
種類：特許  
番号：特許第5854407号  
取得年月日：2015/12/18  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ogura.bio.titech.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小倉 俊一郎 (Ogura, Shun-ichiro)  
東京工業大学・生命理工学院・准教授  
研究者番号：90343160