

平成24年4月27日提出

対象研究テーマ：ヒト消化器・呼吸器がんの分子病態の解明と臨床応用

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：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細胞レベルでの解明

研究代表者：東京工業大学フロンティア研究機構 特任准教授 小倉俊一郎

研究成果の概要：

がん患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与すると、腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積されることが知られており、この現象を利用したがんの蛍光診断・がんの光線力学治療が臨床で用いられている。しかしながら、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究は ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。その結果、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムには ALA 取り込みに関わるトランスポーターである PEPT1 ならびにポルフィリン汲み出しにかかわるトランスポーターである ABCG2 が深く関与していることを細胞レベルで示唆することができた。

本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個性診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。

研究分野：分子生物学、腫瘍診断学

キーワード：アミノレブリン酸・ポルフィリン・光線力学治療・光線力学診断

1. 研究開始当初の背景

ALA を投与すると生合成経路を経てポルフィリンが生成する。この反応は腫瘍において亢進しており、ALA 投与によって腫瘍特異的なポルフィリンの蓄積が観察されている。さらに、悪性グリオーマなど悪性度の高いがんは多くのポルフィリンが蓄積する興味深い所見が得られている。しかしながら、がん細胞への特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。

2. 研究の目的

ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個別診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。

3. 研究の方法

種々の細胞株に対して、ポルフィリン蓄積

に関与していると予想される分子のたんぱく質の発現量ならびにその mRNA の発現量の解析を行う。候補としてはポルフィリン生合成に関与する6種類の酵素とALA取り込みに関わるPEPT1およびPEPT2、ポルフィリン輸送に関わるABCG6およびABCG2などの分子があげられる。これらの分子のたんぱく質の発現量はWestern blot解析により、mRNAの発現量は定量的PCRで評価する。さらにこれらの分子の変異の有無について詳細に検討する。また、ALA投与によってこれらのmRNA・たんぱく質の発現量が変化することが考えられるため、ALA投与群と非投与群の比較も行う。これらのデータをポルフィリンの蓄積量と併せて考察する。

4. 研究成果

ポルフィリン生合成に関連する12遺伝子のmRNA配列に特異的なRT-PCR用プライマーを設計した。5種類のヒト胃がん由来細胞株を用いて、RT-PCR法で各遺伝子の発現解析を行った。その結果、ALA投与後にポルフィリンを多く蓄積する細胞と蓄積しない細胞を比較した結果、ポルフィリン生合成酵素発現量はほぼ同一であることが分かった。しかし

ながら、ペプチドトランスポーターPEPT1 およびATP-binding cassette (ABC)トランスポーターABCG2の顕著な発現変化が認められ、ポルフィリン蓄積にはトランスポーターの発現が大きく関わることを強く示唆された。これらのトランスポーターはALAの取り込み並びにポルフィリン排出に関わっていると推測される。現在、これらの過剰発現株・発現抑制株を樹立し、その機能の解析を行っている。

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2件)

1. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Okura I, Ogura S: Tumor Suppressor Protein p53-dependent Cell Death Induced by 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Cancer cells in Vitro. ALA-Porphyrin Science, December 08, 2011, accepted.
2. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Takahashi K, Ishizuka M, Abe F, Tanaka T, Okura I, Nakajima M, Ishikawa T, Ogura S: Pivotal Roles of Peptide Transporter PEPT1 and ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 in 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photocytotoxicity of Gastric Cancer Cells in Vitro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, in press, available online 4 January 2012 (December 06, 2011, accepted)

[学会発表] (計4件)

1. Yuichiro Hagiya, Yoshio Endo, Yutaka Yonemura, Kiwamu Takahashi, Masahiro Ishizuka, Fuminori Abe, Motowo Nakajima, Toshihisa Ishikawa, Shun-ichiro Ogura: Pivotal Role of PEPT1 and ABCG2 on 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Gastric Cancer Cells *in Vitro*. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月 (名古屋、大阪国際会議場)
2. 遠藤 良夫, 小倉 俊一郎, 萩谷 祐一郎, 米村 豊, 石塚 昌宏, 井上 克司, 高橋 究, 中島 元夫: 5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法感受性と膜輸送系の関連性 日本薬学会第131年会 2011年3月 (静岡、ツインメッセ静岡)

3. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima: Role of membrane transporters in determining ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム 2011年5月 (金沢、石川県立音楽堂)
4. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Masashi Kimura: Significance of membrane transporters in determining the ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月 (名古屋、大阪国際会議場)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東京工業大学フロンティア研究機構・特任准教授 小倉俊一郎

(2) 研究分担者

東京工業大学フロンティア研究機構・特任准教授 田島健治

東京工業大学生命理工学部・4年

松本健太郎

東京工業大学生命理工学部・4年

伊藤謙介

(3) 本研究所担当者

中央実験施設・准教授 遠藤良夫