

主論文の要旨

**Novel potential photodynamic therapy strategy using
5-Aminolevulinic acid for ovarian clear-cell carcinoma**

〔 卵巣明細胞癌株における 5-aminolevulinic acid を用いた
光線力学療法の有用性の検討 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
発育・加齢医学講座 産婦人科学分野

(指導：吉川 史隆 教授)

勅使河原 利哉

【緒言】

卵巣癌は婦人科疾患の中でも死亡率が最も高い疾患として知られている。上皮性卵巣癌の組織型の一つに明細胞癌がある。明細胞癌は欧米に比べアジアに多く、日本では卵巣癌全体の 20%を占める。明細胞癌は化学療法に抵抗性で、他の組織型に比べ予後が悪い事が知られている。卵巣癌治療において明細胞癌の治療は重要な課題の一つとなっている。

光線力学療法 (Photodynamic therapy :PDT)は癌細胞に蓄積した光感受性物質に特定の励起光を照射する事で生じる一重項酸素を含む活性酸素種により癌細胞を選択的に死滅させる治療法である。日本ではフォトフリン[®]やレザフィリン[®]といった光感受性物質が保険適応となっている。これらの薬剤を用いた従来の PDT は、日光過敏症のリスクが高く長期間の遮光が必要であった。本実験で用いた 5-aminolevulinic acid (ALA)は光感受性物質ではなく、ALA から合成されるヘムの前駆物質 Protoporphyrin IX (PpIX)が光感受性物質として作用する。ALA-PDT では、従来の PDT と違い長期間の遮光を必要としない事が特徴として挙げられる。

本研究ではヒト卵巣明細胞癌細胞株における ALA-PDT の殺細胞効果の検討と PpIX の蓄積に関わる因子の解析を行った。

【方法】

ヒト明細胞癌細胞株 ES2・TOV21G・KOC7C・OVTOKO・RMG1・RMG2・OVMANA を用いて ALA-PDT の殺細胞効果・PpIX 蓄積量・PpIX の蓄積に関わる因子の遺伝子発現解析を行った。PDT の光源は赤色発光ダイオード、ピーク波長 631 nm・照射出力 17.4 mW/cm²を使用した。

1) ALA-PDT の殺細胞効果の検討

各細胞を 96 well 培養プレートに播種し培養した。翌日に ALA を 0-1000 μ M の各濃度で添加し遮光下で 4 時間培養した。新たな培地に交換した後、光照射を 600 秒間行った。照射後 24 時間培養した後に WST8 試薬を用いて細胞生存率を算出した。

2) PpIX 蓄積量の検討

ALA 投与後の細胞内外の PpIX 蓄積量を測定した。各細胞を 96 well 黒色培養プレートに播種、翌日に ALA を 0-1000 μ M の各濃度で添加し 4 時間培養した。PpIX 蓄積量は蛍光プレートリーダーを用いて吸光度を測定した。

3) PpIX の蓄積に関わる因子の遺伝子発現解析

Real-time PCR を用いて PpIX の蓄積に関わる因子の遺伝子発現を解析した。ALA の細胞内への取込みに関わる因子はペプチドトランスポーターの PEPT1・PEPT2、タウリンのトランスポーターの TAUT、 γ -アミノ酪酸のトランスポーターの GAT2、プロトン共役アミノ酸トランスポーターの hPAT1 を解析した。PpIX の細胞外排出に関わる因子では、ABC トランスポーターの ABCG2 を解析。さらにヘム合成経路に関わる酵素のフェロキラーゼ (FECH)の遺伝子発現を解析した。

4) ABCG2 阻害剤を使用した ALA-PDT・PpIX 蓄積量の検討

ABCG2 の特異的阻害剤である Fumitoremogin C (FTC) を用い ALA-PDT の増強効果を調べた。同様に PpIX 蓄積量の増加効果も検証した。

【結果】

1) ALA-PDT の殺細胞効果の検討

照射 24 時間後の細胞生存率を Fig.1 に示す。照射群では全細胞株で ALA の濃度依存性に細胞生存率の低下を認めた。各細胞株の ALA-PDT に対する効果の指標として IC50 を用いて評価した (Table2)。RMG1、RMG2、OVMANA 株では IC50 値が 56-97 μM と低く ALA-PDT の感受性が高いことが分かった。RMG1、RMG2、OVMANA 株では ALA250 μM で細胞生存率が 20% 近くまで減少を認めた。一方で ES2 株では IC50 値が 882 μM と高く、ALA-PDT に対して最も抵抗性を示した。

2) PpIX 蓄積量の検討

細胞内の PpIX 蓄積量を Fig.2-A、細胞外の PpIX 蓄積量を Fig.2-B に示す。全ての細胞株で細胞内 PpIX 蓄積量は、ALA の濃度依存性に上昇を認めた。RMG1、RMG2、OVMANA 株では、ALA 60 μM から細胞内 PpIX の蓄積を認めた。細胞内 PpIX 蓄積量と ALA-PDT の効果を比較すると、Fig.1 でも同様に ALA 60 μM 以上で、細胞生存率が低下することが確認できる。

3) PpIX の蓄積に関わる因子の遺伝子発現解析

RMG1、RMG2、OVMANA 株では ALA の取り込みに関わるトランスポーター全ての発現を認めた。特に PEPT1 は RMG1、RMG2、OVMANA 以外の細胞株では発現を認めておらず、PEPT1 の発現の有無が ALA-PDT の効果に関与している可能性がある。ABCG2 の発現においては、ES2 株で最も高く認めた。この結果は ES2 株での ALA-PDT に対する治療抵抗性に関与していると考えられる。

4) ABCG2 阻害剤を使用した ALA-PDT・PpIX 蓄積量の検討

ABCG2 の遺伝子発現の高い ES2 株を用いて実験を行った。FTC 併用する事で ALA-PDT の殺細胞効果は増強を示した (Fig.4-A)。細胞内 PpIX 蓄積量においても FTC 併用することで増加を認めた (Fig.4-B)。

【結論】

本研究では、卵巣明細胞癌における ALA-PDT の殺細胞効果を示した。RMG1、RMG2、OVMANA 株では ALA-PDT の殺細胞効果を強く認めた。IC50 で比較しても、これら細胞株では他の細胞株と比べ高い殺細胞効果を示した。一方で ALA-PDT に抵抗性の細胞株も認めた。ES2 株では IC50 が高く、ALA-PDT に抵抗性を持つことが分かった。細胞株毎に比較すると、細胞内 PpIX 蓄積量は ALA-PDT の殺細胞効果と相関している事が示された。さらに遺伝子発現では、ALA の細胞内への取り込みに関わる PEPT1 の発現が、ALA-PDT に高い感受性を持つ RMG1・RMG2・OVMANA 株でのみ認めた。PEPT1 が明細胞癌細胞株における ALA-PDT の感受性に関与してい

る可能性が考えられた。PpIX の細胞外への排出に関わる ABCG2 においては、ES2 株で発現が高く、この結果から ABCG2 の発現が ALA-PDT の抵抗性に関わっている可能性が示された。

ALA-PDT 抵抗性の ES2 株に対し ABCG2 阻害剤である FTC を併用する事で、ALA-PDT・細胞内 PpIX 蓄積量の増加効果を認めた。ALA-PDT 抵抗性株においても、ABCG2 阻害剤を併用する事で ALA-PDT の感受性が上がる事を示した。ABCG2 の基質には、卵巣癌治療ではドキソルビシン、イリノテカン、CPT-11 といった薬剤が知られている。これら薬剤を ALA と併用する事で、ALA-PDT の殺細胞効果の増強が得られる可能性も考えられる。

本研究では、*in vitro* において ALA-PDT が卵巣癌治療として有用である可能性を示した。さらに ALA-PDT 抵抗性株においても ABCG2 阻害剤を併用することで増強効果が得られる事を示した。卵巣明細胞癌での PEPT1、ABCG2 の遺伝子発現が、ALA-PDT の殺細胞効果の指標となる可能性を示した。