HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|---|---|
| Title | 消化器癌に対する光感受性物質を用いた光線力学療法に関する研究 |
| Author(s) | 河合, 典子 |
| Description | 配架番号：2603 |
| Degree Grantor | 北海道大学 |
| Degree Name | 博士(医学) |
| Dissertation Number | 甲第14514号 |
| Issue Date | 2021-03-25 |
| DOI | https://doi.org/10.14943/doctoral.k14514 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/81510 |
| Type | doctoral thesis |
| File Information | Noriko_Kawai.pdf |

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

# 学位論文

# 消化器癌に対する光感受性物質を用いた光線力学療法に関する研究

( Study on photodynamic therapy using photosensitive substance for gastrointestinal cancer )

2021　年　3 月

北海道大学
河合　典子

# 学位論文

# 消化器癌に対する光感受性物質を用いた光線力学療法に関する研究

( Study on photodynamic therapy using photosensitive substance for gastrointestinal cancer )

2021　年　3 月

北海道大学
河合　典子

# 目　　次

発表論文目録および学会発表目録‥‥‥‥‥１頁

要旨‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３頁

略語表‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥６頁

諸言‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥７頁

実験方法‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥９頁

実験結果‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥１９頁

考察‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３３頁

結論‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３６頁

謝辞‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３７頁

利益相反‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３８頁

引用文献‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥‥３９頁

# 発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Noriko Kawai, Yoshihiko Hirohashi, Yuma Ebihara, Takuma Saito, Aiko Murai, Takahiro Saito, Tomohide Shirosaki, Terufumi Kubo, Munehide Nakatsugawa, Takayuki Kanaseki, Tomohide Tsukahara, Toshiaki Shichinohe, Liming Li, Satoshi Hirano, Toshihiko Torigoe (2019). ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic dianosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD. PLoS ONE. *14*, e0216503.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

１．河合典子、廣橋良彦、海老原裕磨、久保輝文、中津川宗秀、金関貴幸、塚原 智英、平野聡 鳥越俊彦
Improvement of photodynamic diagnostic efficacy focused on transporters
第 107 回日本病理学会総会：2018 年 6 月 21 日～23 日　札幌

２．河合典子、廣橋良彦、斎藤崇宏、海老原裕磨、野路武寛、七戸俊明、鳥越俊彦、平野聡
The improvement of photodynamic diagnostic efficiency focused on transporters.
第 73 回日本消化器外科学会総会　2018 年 7 月 11 日~13 日・鹿児島

３．河合典子、廣橋良彦、海老原裕磨、久保輝文、中津川宗秀、金関貴幸、塚原 智英、平野聡 鳥越俊彦
トランスポーターに着目した光線力学的診断効率の改善
第 118 回北海道癌談話会　2018 年 10 月 6 日・旭川

4. Noriko Kawai, Yoshihiko Hirohashi, Yuma Ebihara, Teruhumi Kubo, Munehide Nakatsugawa, Takayuki Kanaseki, Tomohide Tsukahara, Satoshi Hirano, Toshihiko Torigoe
Improvement of photodynamic diagnosis efficacy focused on transporters.
第 77 回日本癌学会総会　2018 年 9 月 27 日～29 日・大阪

5. Noriko Kawai, Yoshihiko Hirohashi, Tomohide Shirosaki, Yuma Ebihara, Teruhumi Kubo, Munehide Nakatsugawa, Takayuki Kanaseki, Tomohide Tsukahara, Satoshi Hirano, Toshihiko Torigoe
ABCG2 expression is related to low 5-ALA photodynamic diagnosis (PDD) efficacy and cancer stem cell phenotype, and suppression of ABCG2 improves the efficacy of PDD.
第 78 回日本癌学会総会　2019 年 9 月 26 日～28 日・京都

## 要旨

消化器癌に対する光感受性物質を用いた光線力学療法に関する研究

【背景と目的】近年，光感受性物質が癌細胞に集積することを利用して癌診断を行う光線力学的診断(photodynamic diagnosis：以下 PDD)が各領域で注目されている。PDD とは、レーザー光照射により、癌細胞に特異的に取り込まれた光感受性物質を励起、発光させ、癌を視覚的に検出する診断方法である。アミノレブリン酸塩酸（5-aminolevulinic acid：以下 5-ALA）は、細胞内で光感受性物質の一つであるプロトポルフィリン IX（protoporphyrin IX：以下 PpIX）に代謝され、脳神経外科領域における術中診断方法として臨床応用されてきた。近年、同様の PDD が各種癌領域においても臨床応用されつつある。消化器癌領域では術中における播種病変やリンパ節転移の検出が期待され、試みられているが、検出感度などの面から実臨床応用の拡大には至っていない。今回、5-ALA を用いた光線力学診断の分子基盤を解明する事により、光線力学的診断効率の改善を目的とし、診断効率に寄与する新規バイオマーカーの発見を目的として、本研究を行った。

【材料と方法】胃癌、食道癌、大腸癌、膵臓癌の各種消化器癌細胞株(MKN45、TE4、TE10、SW480、PANC-1、CFPAC、PK9)を 150μg/ml の 5-ALA にて処理し、フローサイトメーターを用いて蛍光陽性細胞を検討した。蛍光陽性の細胞の比較には蛍光細胞の増加率を、%MFI increase = (5-ALA 処理を行ったサンプルにおける MFI) × 100 / (5-ALA 処理を行っていないサンプルにおける MFI) の式で計算し比較した。蛍光されない細胞集団を認めた膵臓癌細胞株 PANC-1 細胞から単細胞ソーティングにより複数のクローン株を樹立し、単細胞レベルでの解析を行った。クローン細胞におけるトランスポーター発現の比較と蛍光増加率の関連性について検討し、ABCG2 トランスポーターの発現量と蛍光増加率に逆相関の関係を認めたため、ABCG2 に着眼した。*ABCG2* 遺伝子特異的 siRNA および、ABCG2 阻害剤である Ko143 を用いて ABCG2 阻害を行い、蛍光強度の変化を検討した。また、ABCG2 はがん幹細胞様細胞に強発現しているとされ、ABCG2 強発現の PANC-1 細胞クローンと低発現のクローンを用い、これらの幹細胞性の違いを検討するために SP 解析および Sphere 形成能の比較、マウスを用いた増腫瘍能について比較検討した。

【結果】各種細胞株は 5-ALA にほぼ 100%の蛍光陽性を示した一方で、PANC-1 細胞では 5-ALA 染色に陰性を示す細胞集団を認めた。PANC-1 細胞を単細胞レベルで解析する為、7 種のクローン細胞を樹立した。PANC-1 クローン株の%MFI increase はクローン間で大きく異なった。qRT-PCR 法で解析すると、*ABCG2* 遺伝子発現量はクローン間において大きく異なり、*ABCG2* 遺伝子発現量と 5-ALA 陽性率が逆相関を示す傾向がみられた。*ABCG2* 発現が高いクローン２と発現が低いクローン 4 の細胞に対し、*ABCG2* 阻害を行った結果、*ABCG2* 遺伝子ノックダウンによりいずれの細胞にお

いても 5-ALA 陽性率の増加を認め、*ABCG2* は 5-ALA 蛍光陽性率の低下に影響を与えることが示された。癌幹細胞性について検討するためクローン２およびクローン４を用いて SP 解析を行うと、クローン４では SP 細胞が 0.5%であった一方で、クローン２では 15.9%と多く認めた。Sphere 培養では、クローン４に比べクローン２で有意に Sphere 形成能が高かった。クローン２およびクローン４細胞をマウスに移植し、増腫瘍能について比較するとクローン２では有意に増腫瘍能が高かった。*ABCG2* のノックダウンおよび ABCG2 阻害を行った上で SP 解析および Sphere 形成能を比較すると、クローン２の SP 細胞は著明に減少した一方で Sphere 形成能に変化を認めなかった。【考察】ABCG2 トランスポーターは様々な内因性および、外因性の化学物質運搬に働く。化学療法剤排出にも関わり、薬剤耐性にも関連する。さらに、ABCG2 は 5-ALA の代謝経路にも関与していることが知られている。また、ABCG2 遺伝子は、膵癌で活性化される主要な伝達経路の一つであるヘッジホッグシグナルの転写因子 GLI1 により転写されることが明らかにされている。本研究では、ABCG2 を高発現している PANC-１クローン２では ABCG2 発現が低いクローン４と比較し、sphere 形成能および免疫不全マウスにおける造腫瘍能が高かった。それゆえ、ABCG2 を高発現したクローン細胞は、膵癌幹細胞様細胞であったと考えられる。すなわち、ABCG2 高発現を示す膵癌幹細胞様細胞は、5-ALA PDD により検出困難である事が示唆された。同時に、ABCG2 阻害剤を併用することにより、ヘッジホッグシグナルが活性化された膵癌幹細胞様細胞を検出出来る様になる可能性が示唆された。*ABCG2* のノックダウンにより細胞内の PpIX の集積は増加したが、クローン４細胞における PpIX 陽性率は 100%には至らなかった。5-ALA 代謝関連トランスポーターとして ABCG2 以外に ABCB6、PEPT1、PEPT2 なども知られている。PANC−1 細胞は ABCB6 および ABCG2 をともに発現した一方で、PEPT1、PEPT2 の発現は非常に低かった。それゆえ、PANC-1 クローン細胞における PpIX の集積は 5-ALA 取り込みトランスポーターである PEPT1、PEPT2 の発現が低かったことも影響している可能性がある。ABCB6 は 5-ALA の取り込みに働くが、これが PpIX の高集積に関与することを示した報告もある。ABCB6 は乳がんにおける術前補助化学療法に対する反応や前立腺癌の進行に関与するとの報告があり、ABCB6 高発現の癌細胞には PpIX がより多く集積すると考えられるため、ABCB6 高発現の悪性腫瘍は 5-ALA PDD の良い適応とも考えられる。一方、PANC−1 における ABCB6 の発現は野生型とクローン細胞間で同等の発現レベルであった。今回の検討において、膵癌細胞株における 5-ALA PDD 有効性を検討する上で、ABCB6 の発現は有効なバイオマーカーとはならない可能性が示唆された。【結論】消化器癌細胞株において多くが 5-ALA で同等に蛍光することを示した。しかし、膵癌細胞株である PANC−1 では蛍光されない細胞が存在し、ABCG2 の高発現が 5-ALA の低蛍光に関与する可能性が示された。さらに ABCG2 高発現のクローン細胞

は癌幹細胞様細胞が濃縮された細胞集団と考えられた。ABCG2 の発現は 5-ALA PDD 効率を予測する新規バイオマーカーとなり得る可能性および、ABCG2 阻害剤を使用した 5-ALA PDD により ABCG2 を高発現した癌幹細胞様の性質を有する癌を含め、その診断効率を高める可能性を示した。

## 略語表

本文中および図中で使用した略語は以下のとおりである。

| | |
|---|---|
| 5-ALA : | 5-aminolevulinic acid |
| ABCG2： | ATP-binding cassette, sub-family G, member 2 |
| CSC： | cancer stem cell |
| DMEM： | Dulbecco Modified Eagle Medium |
| FACS： | fluorescence-activated cell sorting |
| FBS： | fetal bovine serum; |
| MFI： | mean fluorescence intensity |
| MP： | main population |
| mRNA： | messenger rbonucleic acid |
| PBS： | phosphate-buffered saline |
| PDD : | photodynamic diagnosis |
| PDT : | photodynamic therapy |
| PpIX： | protoporphyrin IX |
| qRT-PCR： | quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction |
| RPMI-1640： | RPMI-1640 With L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid |
| RT-PCR： | reverse transcription-polymerase chain reaction |
| siRNA： | small interfering RNA |
| SP： | side population |
| W/T： | wild-type |

## 緒　言

近年，光感受性物質が癌細胞に集積することを利用し、癌の診断および治療を行う光線力学診断（Photodynamic diagnosis：PDD）および治療（Photodynamic therapy：PDT）が各領域で注目されている。癌に特異的に取り込まれる光感受性物質にレーザー光をあてることで癌細胞を発光させ癌を視覚的に検出する診断方法で、これまで脳神経外科の領域では神経膠腫の診断方法として発展してきた（Olzowy et al. , 2002 ; Stummer et al. , 2006 ; Beck Tet al. , 2007 ; Stummer et al. , 2008）が、各種癌領域においても臨床応用が広がりつつある。

消化器癌領域においては、手術時のリンパ節転移や腹膜転移の術中における癌の検出は術式にかかわり、臨床的に非常に重要な所見である。現状、視覚的に転移や播種が疑われる場合は術中に病理診断を行い判断することが多いが、微小転移などの検出は難しく、かつ腹腔内で網羅的に観察を行うことに限界を生じることも少なくはない。

以上より、リンパ節転移や播種病変の検出に対するPDDの発展は非常に有用と考えるが、その感度は大きな幅があり、検出率も時に低く、満足のいくものではない（Loning et al. , 2004 ; Murayama et al. , 2012 ; Liu et al. , 2014 ; Hillemanns et al. , 2017）。従って、PDDにおいてその診断効率を高める新規バイオマーカーの発見は必要性は高く、バイオマーカーの発見によりPDDを発展させたPDTにおける治療成績の向上にもつながる可能性があるものと考える。

アミノレブリン酸塩酸塩（5-aminolevulinic acid：以下5-ALA）はアミノ酸トランスポーターであるPEPT1およびPEPT2によって細胞質に取り込まれ、コプロポロフィリノゲンIIIに合成される。コプロポロフィリノゲンIIIはABCトランスポーターであるABCB6を介して細胞質からミトコンドリア内に取り込まれる。さらにミトコンドリア内で光感受性物質であるプロトポルフィリン（protoporphyrin IX：以下PpIX）が合成される。こうして合成されたPpIXはABCG2を介して細胞質から細胞外へ輸送される（Koizumi et al. , 2016）（図１）。以上のようにPpIXの細胞集積には多くの分子が関与しており、5-ALAによるPDDおよびPDTの発展を目指し、様々なアプローチによる検討がなされてきた（Palasuberniam et al. , 2015 ; Kim et al. , 2015）。最近の研究では5-ALAを用いたPDDはリンパ節転移および腹膜播種の術中診断に有用であると報告もされており（Murayama et al. , 2012 ; Yonemura et al. , 2017）、さらなる研究結果の蓄積が必要とされる。5-ALA PDDによる腹膜播種病変やリンパ節転移検出の診断精度は46~84％と（Yonemura et al. , 2017 ; Koizumi et al. , 2013）一定せず、診断精度の改善が必要不可欠である。

また、癌幹細胞様細胞は高い腫瘍増殖能、自己複製能、多分化能をもつ亜細胞集団として定義される（Clarke et al. , 2006）。更には化学療法、放射線療法に対し抵抗性であるとされ、これらは抗アポトーシス蛋白の発現や、トランスポーターの高発現が

関与しているとされている（Park et al. , 2009 ; Hirohashi et al. , 2016.）。癌幹細胞様細胞を標的とした効果的な治療方法の確立は、今後の癌治療において転移・再発率を軽減しうる重要な役割を担うと考えられる。

以上より、各種消化器癌細胞株を用いた 5-ALA PDD の分子メカニズムを明らかにし、5-ALA PDD の臨床応用拡大の一助にすべく本研究を行った。

また、癌幹細胞様細胞に対する 5-ALA PDD の診断効率が低い可能性が見出されたため、癌幹細胞様細胞における 5-ALA PDD の有効性について検討した。

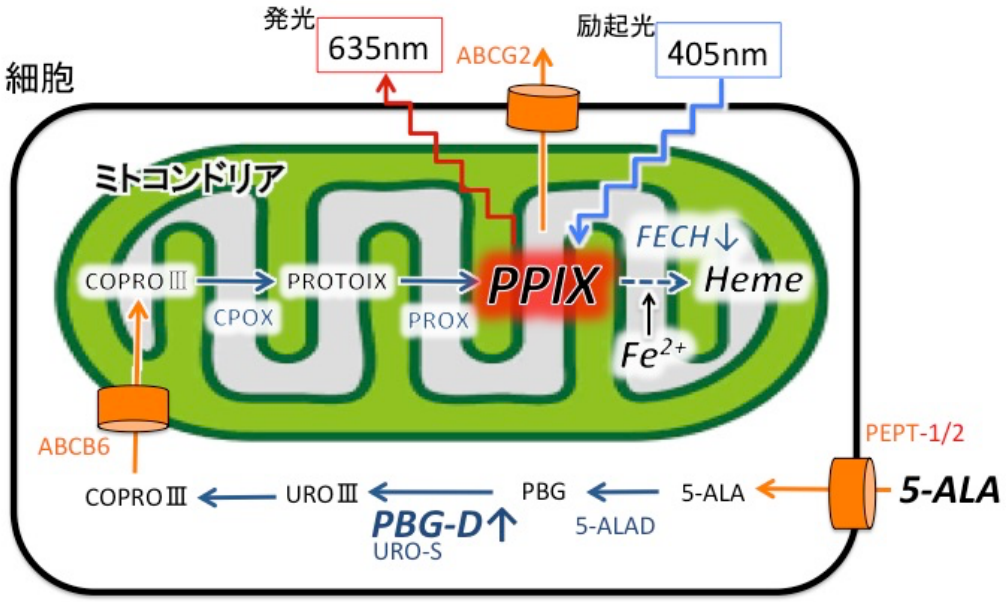


図１　5-ALA 代謝経路図

実験方法

**【5-ALA による蛍光の検出】**

各種細胞株の培地に合わせ、Dulbecco modified Eagle medium（以下 DMEM）(Sigma-Aldrich 社)もしくは RPMI1640 (Sigma-Aldrich 社)＋5% Fetal bovine serum（以下 FBS ) (Sigma-Aldrich 社)を用いて、各細胞 $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL の濃度の細胞液に調整した。 細胞株はヒト膵癌細胞株：CFPAC、PANC-1、PK9、ヒト胃癌細胞株：MKN45、ヒト食道癌細胞株：TE4、TE9 を使用した。CFPAC、PANC-1 は American Type Culture Collection（以下 ATCC）から取得した。MKN45 は国立研究開発法人 JCRB 細胞バンクから、TE4 、TE9、PK9 は 東北大学加齢医学研究所医用細胞資源センターから取得した。

アミノレブリン酸塩酸塩（Aminolevulinic Acid Hydrochloride：以下 5-ALA）（ノーベルファーマ株式会社）は 1xPBS で希釈し、最終濃度を 150 μg/mL として 37℃のインキュベーター内で４時間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、遠心し細胞をペレットにし、PBS を用いて洗浄した。細胞洗浄は２回繰り返した。フローサイトメトリー（Fluorescence-activated cell sorting ：FACS） Aria II (BD Biosciences 社)を用いて 5-ALA による蛍光活性化細胞を検出、解析した。実質的には 5-ALA は生体内におけるヘム代謝で代謝物質として生成される PpIX による蛍光を検出することになるが、488 nm レーザーで励起させ、695/40 nm バンドパスフィルターを用いて蛍光細胞を検出した。5-ALA を投与せず、37℃のインキュベーター内で４時間インキュベーションを行った細胞を、同様に PBS で２度細胞洗浄し、ネガティブコントロール細胞として解析を行った。

蛍光細胞の増加率は蛍光強度中央値（mean fluorescent intensity：以下 MFI）の増加率とし、以下の通り計算し比較した。

%MFI increase = (5-ALA 処理を行ったサンプルにおける MFI) / (5-ALA 処理を行っていないサンプルにおける MFI) X100

**【PANC-1 クローン細胞の樹立】**

PANC-1 を DMEM で $1.0 \times 10^6$ 細胞/mL に調整した細胞懸濁液を 10mL 用意した。5-ALA は PBS で希釈して細胞懸濁液に添加し、37℃のインキュベーター内で４時間インキュベーションを行った。インキュベーション終了後、遠心しペレットにして PBS を用いて２度細胞洗浄を行った。FACS Aria II を用いて 5-ALA による蛍光活性化細胞を検出した。蛍光陰性細胞および、蛍光陽性細胞から 96well プレートに６プレート分シングルセルソーティングを行った。数週間の培養を経て、96well プレートから 24well プレート→12well プレート→6well プレート→10cm ディッシュと培養容

器を拡大し、継代の継続ができた細胞を PANC-1 クローン細胞として下記の図 2 のごとく樹立した。ソーティングの際に陰性側と陽性側にゲートをかけて行ったが、ゲートの中央部分がほぼ重なる形となったため陽性細胞群から蛍光陽性細胞および陰性細胞も含んでしまったが、各クローンを解析すると陽性クローン細胞、陰性クローン細胞に分類可能であったため、この際に樹立したクローン細胞を実験に使用した。

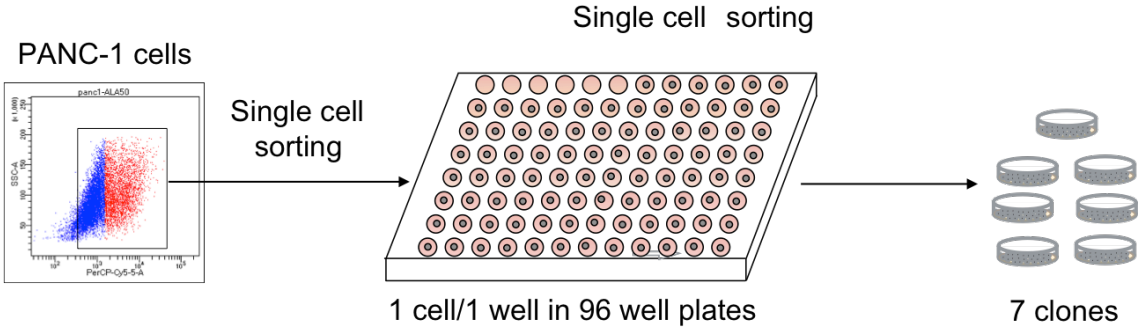


図 2　シングルセルソーティングによる PANC-1 クローン細胞の分離

5−ALA 処理をした PANC-1 からシングルセルソーティングを行い、数週間の培養を経て、７つのクローン細胞を樹立した。

**【Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction（以下 RT-PCR）】**

PANC-1 細胞から樹立したクローン細胞を用いて、単細胞レベルにおける蛍光強度の違いと、ABC トランスポーターの発現の程度を比較することで 5-ALA 蛍光強度に関与する ABC トランスポーターの同定を試みるため、RT−PCR を施行した。また、5-ALA 代謝に関与するとされる、PEPT1、PEPT2 の発現についても検討した。

・RNA の抽出

各細胞における RNA を以下の通り、RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)を用いて抽出した。

１）細胞の回収：$1x10^5$〜$1x10^7$ の細胞を回収し、PBS で洗浄し上清を吸引し、ペレットにした。原則的に細胞の取り扱いは on ice および、4℃の遠心分離機を使用した。

２）RNA 抽出：RNeasy Mini Kit (QIAGEN 社)のプロトコールに準じて RNA を抽出した。RNA は分光光度計濃度測定を行った。

・cDNA の合成

抽出した RNA 1 μg から cDNA を合成した。cDNA の合成には Superscript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific 社) を使用し、本キットのプロトコールに準じて行った。得られた cDNA のうち必要量以外は−20℃で保存し、適宜実験に使用した。

・PCR 反応

以上で合成した各細胞の cDNA を用いて Taq DNA polymerase kit (Qiagen 社)を使用し RT-PCR し行った。サーマルサイクラーは Gene Amp PCR system 2700（Applied Biosystem 社）を用い、94 ℃ 2 分 94 ℃ 15 秒、58 ℃ 30 秒、72 ℃ 30 秒を 35 サイクル行った。

PCR に使用したプライマー情報は下記表に記載する。

表１　本研究で使用した使用したプライマー情報

| 遺伝子名 | プライマー長 | | |
|---|---|---|---|
| *ABCA1* | 183bp | fw | CCGGCTGGTGGAAGACATAG |
| | | rv | CTCTCTTCGGCCACCTTGAG |
| *ABCA2* | 153bp | fw | GCTGCTCTGGAAGAACGTGA |
| | | rv | GCCGCTGTGTAGAAGGAGAC |
| *ABCA3* | 193bp | fw | GCTGTGCTTCGCCATCTCTA |
| | | rv | GGCGACATTAGACAGGAGGC |
| *ABCA4* | 184bp | fw | CTGCTCACAGGACGAGAACA |
| | | rv | CAATGAGTGCGATGGCTGTG |
| *ABCA5* | 170bp | fw | AGCTATCATGGTGTCTGGGC |
| | | rv | GACGGCTTGCATTTGGGAAA |
| *ABCA6* | 192bp | fw | AGCAGCTGAATGTTCCTGTG |
| | | rv | GGAGGACACCTCTCTCTGTG |
| *ABCA7* | 150bp | fw | TACCTGGAAGCTGTGTGCC |
| | | rv | TGCCTCTTCTACCAGCACC |
| *ABCA8* | 193bp | fw | TGCCTCTATCTGGCATTGGC |
| | | rv | ATTCTGGAGGCGCTTGTTCA |
| *ABCA9* | 153bp | fw | CGCAATGATCGCCATCACAC |
| | | rv | GGCTCATCCAGAAGCACCA |
| *ABCA10* | 180bp | fw | TGAGGCTGACATCTTGGCTG |
| | | rv | GCATCAGGAATGTGCTGCTT |
| *ABCA12* | 178bp | fw | CGGCAGTCTTACCTCATCGG |
| | | rv | TGTCTAGCAGCGGATGTGTG |
| *ABCA13* | 173bp | fw | TGACGTGGATGGTGTCTGTG |
| | | rv | AACGATGGCCAGAGTAGCAC |
| *ABCB1* | 173bp | fw | AACAGACTGCAGCAGAGAGG |
| | | rv | AATGTTCTGGCTTCCGTTGC |
| *ABCB2* | 200bp | fw | CACAGAGGTAGACGAGGCTG |
| | | rv | TGATGAGAAGCACTGAGCGG |
| *ABCB3* | 195bp | fw | TGCCGCCTTCTTCTTCCTTG |
| | | rv | ATGGTGTAGGTGAAGCAGCC |
| *ABCB4* | 200bp | fw | GCCATAGCTCACGGATCAGG |
| | | rv | GCAACAAGAACTCCAGCACC |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *ABCB5* | 192bp | fw | ATCACTGGTCAATGGAGCCT |
| | | rv | AAGGCAGCAACACCTATTCC |
| *ABCB6* | 168bp | fw | CACTGTGATGCCTGGACAGA |
| | | rv | CCAATGTGAGACCGGAGAGA |
| *ABCB7* | 158bp | fw | GCCTACCAGCAGATTCCAGA |
| | | rv | TGGAGTCCTCCTCCTGCAT |
| *ABCB8* | 151bp | fw | CCAACATCGCCTTCAACTGC |
| | | rv | AACAGGACAGAGAGGTTGGC |
| *ABCB9* | 157bp | fw | GGCGCAGTCTTCAATGAGC |
| | | rv | TGCTGAAGGCCAGGTTGTAG |
| *ABCB10* | 194bp | fw | TGACAAGACTCGCACAGGAG |
| | | rv | TGATTGACACTGGAGGCACC |
| *ABCB11* | 190bp | fw | CGCAGCTCGTCAGATACAGA |
| | | rv | ACAGATGGTCGAGGTCATGC |
| *ABCC1* | 195bp | fw | TGGACTTCGTTCTCAGGCAC |
| | | rv | TGATCTTGAAGCGGAGGTCG |
| *ABCC2* | 187bp | fw | GAGTCTTCGTTCCAGACGCA |
| | | rv | ATACACGTGGAGAAGCTGCC |
| *ABCC3* | 157bp | fw | TCCAGCTTCCTCATCAGTGC |
| | | rv | TGGAGCACAGGAACATCAGC |
| *ABCC4* | 194bp | fw | ATATCACAGCGCAACCGTCA |
| | | rv | AGCACGGCACTTAACAGTGA |
| *ABCC5* | 166bp | fw | GTTGTGTGGATCTTCTGCCG |
| | | rv | AGGAAGGCTGAACTCTTGGC |
| *ABCC6* | 179bp | fw | TGCCATCGCTGTCTTCCTG |
| | | rv | CTCTGTCCAGAAAGGCTCCC |
| *ABCC7* | 157bp | fw | TGGCATTAGGAGCTTGAGCC |
| | | rv | TTCCAGGCGCTGTCTGTATC |
| *ABCC8* | 194bp | fw | TCCTCAACAACGGCTGCTT |
| | | rv | CAGGACGAAGAGCAGCATGA |
| *ABCC9* | 154bp | fw | TGTGTTCCTGGTTGCTCTCC |
| | | rv | GGTGGTGAGTCCTTCTGCTG |
| *ABCC10* | 163bp | fw | CTTGCTCGTGCTGTCTACCA |
| | | rv | TCTCCAGGTACTCAGTGCGG |
| *ABCC11* | 159bp | fw | ATCGTGGCATCGACATAGGC |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | | rv | TGGTTCTCAAGGCAGCATCA |
| *ABCC12* | 199bp | fw | GAAGGAACCGTGACCTGGAA |
| | | rv | CGACCTCACACATGGTCCTG |
| *ABCD1* | 151bp | fw | AGCTGCGCTACATGCACTC |
| | | rv | ACATACCACAGGCGTTCCAG |
| *ABCD2* | 156bp | fw | TTGGAGCAGCAGTGGACTAA |
| | | rv | ATAGCATCAGCTCCAGAGGC |
| *ABCD3* | 193bp | fw | CTCAACTTCATCGCTGCCA |
| | | rv | GTGTAAGCAGCTGGTCTGG |
| *ABCD4* | 191bp | fw | TGTTCTGAACTCCACGCTGA |
| | | rv | AGAATCGCTCCACGTCCTG |
| *ABCE1* | 155bp | fw | ACCTAGATGTCAAGCAGCGT |
| | | rv | TCCATAGGCGCTTGGTACAC |
| *ABCF1* | 198bp | fw | CAGTGCCAACCAGTGATGAG |
| | | rv | GCTGCTGTTCCTCAGATACG |
| *ABCF2* | 170bp | fw | CATTCAGCAGGTTGCACAGG |
| | | rv | GCAGAGATGCCAATGTCAGG |
| *ABCF3* | 162bp | fw | ACTACGATCCGAAGCACGTC |
| | | rv | TCCTGTGAGCGTGTCTGATG |
| *ABCG1* | 167bp | fw | TCACGCAGTTCTGCATCCTC |
| | | rv | GAAGCCGGAGTTGCTCAAGA |
| *ABCG2* | 206bp | fw | CACCTTATTGGCCTCAGGAA |
| | | rv | CCTGCTTGGAAGGCTCTATG |
| *ABCG4* | 200bp | fw | GCTGAGTGAGAAGCAGGAGG |
| | | rv | AAGAGGCGCTATCCAGACCA |
| *ABCG5* | 176bp | fw | CTGCTTCTCCTACGTCCTGC |
| | | rv | CAATCAGTCGGTCTGCCACA |
| *ABCG8* | 169bp | fw | ACAGAGTGAAGACACTGG |
| | | rv | AGGAGAACAATCTATCCTGG |
| *GAPDH* | 452bp | fw | ACCACAGTCCATGCCATCAC |
| | | rv | TCCACCACCCTGTTGCTGTA |
| *PEPT1* | 206bp | fw | AGCTGGGATGATAACCTGTC |
| | | rv | GTGCCATCATGGTTGTGGTC |
| *PEPT2* | 183bp | fw | ATCATTGATCGGCCTGAGTC |
| | | rv | CTCAGCATGGGTGTGATA |

**【Quantitive-Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(qRT−PCR)】**

ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Thermo Fisher Scientific 社)を用い、TaqMan®(Thermo Fisher Scientific 社)法による qRT-PCR を行い、*ABCG2* 遺伝子発現量を定量化した。cDNA は上記の方法で合成したものを使用し、*ABCG2* probe (TaqMan Gene expression assays; Thermo Fisher Scientific 社)を用いて qRT-PCR を行った。サーマルサイクラーは 95 ℃ 15 秒、60 ℃ 1 分を 45 サイクル行った。各サンプルは triplicate で PCR を行い、内在性コントロールとして GAPDH を使用した。

**【ABCG2 阻害】**

*Small interfering RNA* (以下 siRNA)を用いて *ABCG2* 遺伝子のノックダウンおよび、ABCG2 阻害薬を用いて、各サンプルに対する ABCG2 の阻害を行って 5-ALA PDD に与える影響や幹細胞性の変化について検討を行った。

**1）*Small interfering RNA* (以下 siRNA)を用いた ABCG2 遺伝子のノックダウン**

*ABCG2* を標的としてデザインされた siRNA（silencer Select 社　siRNA: sl 18056, sl18057, sl 18058）を使用した。Transfection には LipofectamineRNAiMAX(Thermo Fisher Scientific 社)試薬を用いて、本試薬のプロトコールに準じて実験を行った。各サンプルに使用した細胞を 6wel plate に 1well に $3.0\times10^5$ 個の細胞を播き、10%FBS および 5% ペニシリン−ストレプトマイシンを含む DMEM 2ml で培養した。ネガティブコントロールとして Negative control siRNA(silencer Select 社)を使用した。20nM の siRNA でトランスフェクションを行った。siRNA を添加後、48 時間培養した細胞を使用した。

**2）Ko143 を用いた ABCG2 の阻害**

Ko143(Santa Cruz Biotechnology 社)は ABCG2 阻害剤の一つであり、本試薬を使用し ABCG2 を阻害する実験を行った。6well plate に $3\times10^5$ 個の各種細胞を播き、24 時間培養したのち、Ko143 を 10μM、20μM の濃度になるように各培地に添加し、さらに 24 時間培養した細胞を使用した。

**【side population 法による癌幹細胞様細胞の分離】**

原理：癌幹細胞様細胞の特性の一つとして化学療法耐性であると考えられている。その一因として薬剤排出トランスポーターの一つである ABCG2 トランスポーターが過剰発現している点が挙げられる。side population 法（SP 法）は、ABCG2 を過剰発現していることを利用した幹細胞様細胞分離方法の一つである（Nakatsugawa M et al. , 2011 ;　Yasuda K et al. , 2017）。本実験には ABCG2 トランスポーターで排出される Hoechst33342（Lonza 社）を使用し、Hoechst33342 染色で染色されない細胞集団（ABCG2 を過剰発現している集団）を side population（以下 SP）、染色される集団（ABCG2 の発現が少ない集団）main population（以下 MP）として観察され、SP 集団は癌幹細胞様細胞が濃縮された細胞集団としてと考えられている。

今回はクローン２およびクローン４を用いて、side population 法により、各クローンにおける幹細胞性について検討を行った。

方法：

各細胞株を 10 cm dish に培養し、トリプシン液で剥離し、遠心で形成したペレットを回収した。上清を吸引、10 ml の PBS で洗浄した後、再度遠心してペレットにした。同様の洗浄を 2 回繰り返した。$1\times10^6$ 個/ml になるように細胞を DMEM + 5%FBS で調整し 2.5 μg/ml の Hoechst33342（Lonza 社）で染色し、遮光下 37 ℃、60 分培養した。培養中、細胞を 20 分ごとに緩やかに震とうさせた。同時に阻害剤使用群として、$1\times10^6$ 個の細胞を 75 μM の ABCG2 阻害剤である verapamil（SIGMA 社）で処理を行った。60 分後、細胞処理は遮光のうえ、on ice もしくは 4℃の遠心機を用いて実験を行った。4℃の PBS + 5 % FBS で 2 回洗浄後、4℃PBS + 5 %FBS＋2 mM EDTA で $1\times10^6$ 個/ml の濃度で回収した。1 μg/ml propidium iodide（以下 PI）（Invitrogen 社）を加え、死細胞の染色を行った。BD FACS Aria II Cell-sorting System（BD Bioscience 社）を用い、PI 陽性細胞を除いた生細胞を選択し、405 nm の Hoechst 青色光、670 nm の Hoechst 赤色光で励起し、細胞の検出を行った。Hoechst に染まらない細胞を SP 細胞として検出した。

**【sphere formation assay による幹細胞様細胞の分離】**

原理：癌幹細胞様細胞の腫瘍形成能を利用した Sphere formation assay は、Sphere 細胞培養用の培地を用いた培養した際に形成するコロニー（Sphere）数を持ってがん幹細胞様細胞を定量化する方法である。

方法：

トリプシンで細胞を剥がし細胞を培養液で回収し、$1x10^5$ 個の細胞分の細胞懸濁液を遠心しペレットにした。これに Sphere 細胞用の培地（培地の組成は下記に示す）を加え、段階希釈により 10000 細胞/ml、1000 細胞/ml、100 細胞/ml、10 細胞/ml の細胞濃度に調整した細胞懸濁液を作り、非接着性の 96well プレート（Corning 社）に各濃度 24well/96well に 1well　100μl 細胞懸濁液を入れ、細胞をまいた。これにより、1000 細胞/well、100 細胞/well、10 細胞/well、1 細胞/well の well が 24well ずつ用意した。これを 37℃で１週間培養し、各 well を観察し Sphere 形成を認めた well と認めない well の well 数をカウントした。各濃度、Sphere 陽性 well 数をカウントし、ELDA 統計サイト(ELDA web site (http://bioinf.wehi.edu.au/software/elda) Hu Y, et al. , 2009) にて、癌幹細胞様細胞の頻度を統計解析し、各細胞ごとに比較を行った。

培地組成：

DMEM/F12（Thermo Fisher Scientific 社）
20 ng/mL basic fibroblast growth factor (R&D Systems 社)
20 ng/mL epidermal growth factor (R&D Systems 社)
Pen/streptmicine 1%　（Thermo Fisher Scientific 社）
N2 supprement 1%　（Thermo Fisher Scientific 社）
Sodium Pyruvate 1%　（Thermo Fisher Scientific 社）

また、今回の Sphere　formation assay には、PANC-1 WT、クローン２、クローン４の細胞と、siRNA で ABCG2 をノックダウンした細胞および、Ko143 で ABCG2 を阻害したクローン２を使用した。別項で示した手順で ABCG2 のノックダウンおよび阻害を行ったが、siRNA によるノックダウン細胞はノックダウンしてから 48 時間培養した細胞を、Ko143 による阻害細胞は Ko143 処理をしてから 24 時間培養した細胞を使用した。

【マウスを用いた造腫瘍能の比較】

マウスを用いて、PANC-1 クローン細胞２および４を用いて造腫瘍能の比較検討を行った。マウス実験に関しては、「北海道大学動物実験に関する規程」および所属研究室がある「札幌医科大学動物実験に関する規定」に従って実験を行った。

BALB/c-nu/nu マウス（メス、4−6 週齢）に対し 100%ジエチルエーテル（関東化学株式会社）で吸入全身麻酔にて行った。PANC-1 クローン細胞２および４を、それぞれの細胞 $10^3$ 個、$10^4$ 個を、100μl の PBS および、100μl のマトリゲルで懸濁し、マウスの背部皮下に注入した。１週間ごとに腫瘍径の測定を行い、腫瘍体積は、腫瘍体積($mm^3$)＝(長径(mm)×短径$(mm)^2$)/2 で計算し記録した。各細胞・細胞数ごとにマウス 5 匹に注入し、その腫瘍体積の平均値をグラフ化した。

【統計解析】

2 群間の比較には Student's t-test を用い、$P < 0.05$ を有意差とした。ABCG2 の発現量と%MFI の相関については Pearson の相関係数を用いて検討した。

## 実験結果

【5-ALA による蛍光の比較】

消化器癌細胞株において、5-ALA による蛍光の程度をフローサイトメトリーを用いて比較検討を行った。用いた細胞株は、膵癌細胞株（CFPAC、PANC-1、PK9）、胃癌細胞株（MKN45）、食道癌細胞株（TE4、TE9）を用いた。5-ALA 処理を行った各種細胞を、蛍光陽性細胞の増加率を検討した。増加率の比較は、蛍光強度中央値（MFI: mean fluorescent intensity）の増加率で行い、5-ALA 処理をおこなっていない細胞群と 5-ALA 処理を行った群における、MFI の増加率で比較した。

フローサイトメトリーの結果を図３に示す。６種類の消化器癌細胞株のうち、PANC-1 以外の５種類がほぼ 100%5-ALA 陽性細胞として検出できた一方で、PANC-1 のみ 43.2%と陽性細胞が低かった。図４において MFI の比較を示すが、PANC-1 が最も MFI が低い結果であった。これは、PANC-1 では 5-ALA 処理をしても蛍光集団として検出しにくい細胞であることが示唆された。

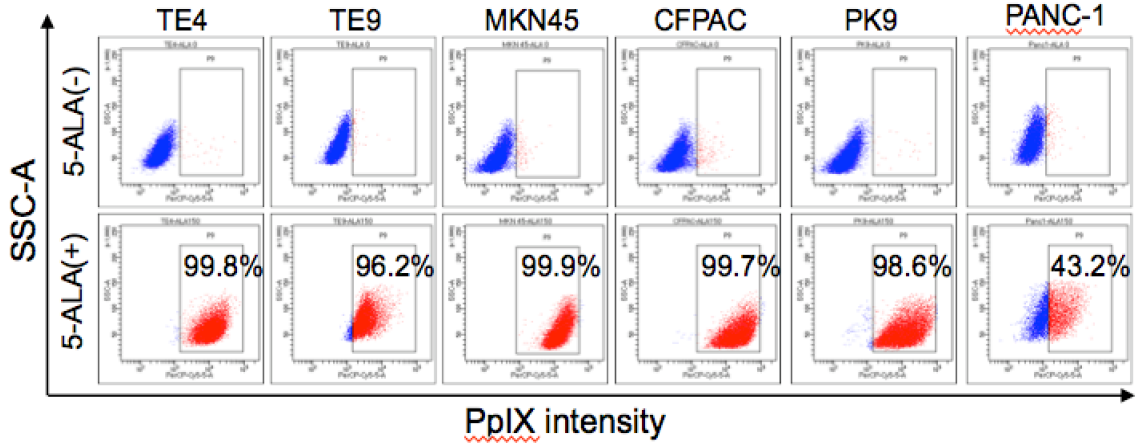


図３　消化器癌細胞株における、蛍光強度の比較

消化器癌細胞株の多くはほぼ 100%が 5-ALA 陽性を示したが、PANC-1 のみ 5−ALA 陽性となった細胞は 43.2%であった。

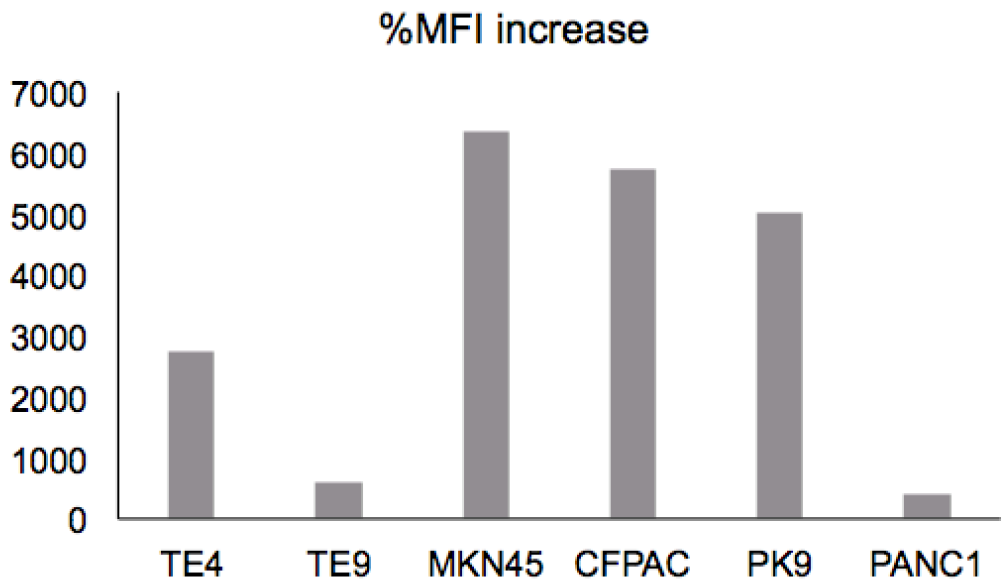


図４　各種細胞株における MFI 増加率の比較

蛍光陽性細胞の増加率は細胞ごとに異なったが、PANC−1 が最も低い結果であった。

## 【PANC-1 の単細胞レベルにおける 5-ALA 蛍光の比較】

PANC-1 のみが他消化器癌細胞株と蛍光の程度が異なったことから、PANC-1 において単細胞レベルで解析を行い、蛍光強度に寄与する因子の究明を試みることとした。

PANC-1 細胞に 5−ALA 処理を行い、フローサイトメトリーを用いて 96well プレートにシングルセルソーティングを行い、数週間の培養を行った（図２）。７つのクローン細胞を樹立でき、これらクローン細胞を用いて 5-ALA 蛍光の程度を比較した。樹立したクローン細胞を前述同様に 5-ALA 処理を行い、フローサイトメトリーを用いて 5-ALA 陽性細胞を検出したところ、PANC-１から樹立したクローン細胞間においても不均一な蛍光を示した。図５で示すように、クローン３やクローン４といったクローンでは陽性細胞率が５０%を超える一方で、クローン２ではわずか 0.6%であった。これらの結果から、5-ALA による蛍光は細胞によって不均一であり、PANC−1 のクローン細胞間においても 5-ALA による蛍光、すなわち PpIX の集積が不均一であることを示した。また、前述の MFI 増加率を比較しても、その結果は不均一であり、クローン２が最も低い結果であった（図６）。

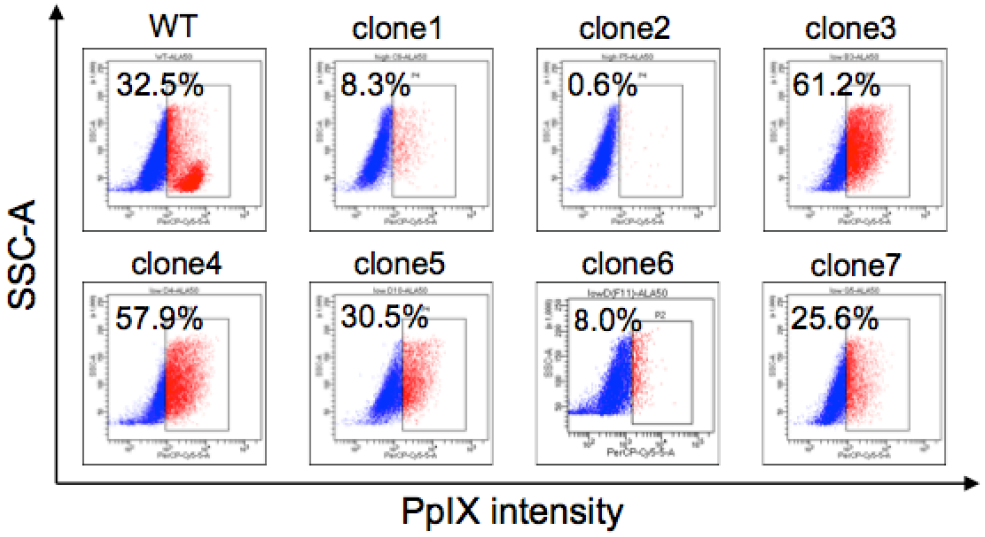


図５　PANC-1 クローン細胞における、5-ALA 陽性細胞の比較

クローン細胞間においても、5-ALA 陽性となる程度は細胞によって異なった。

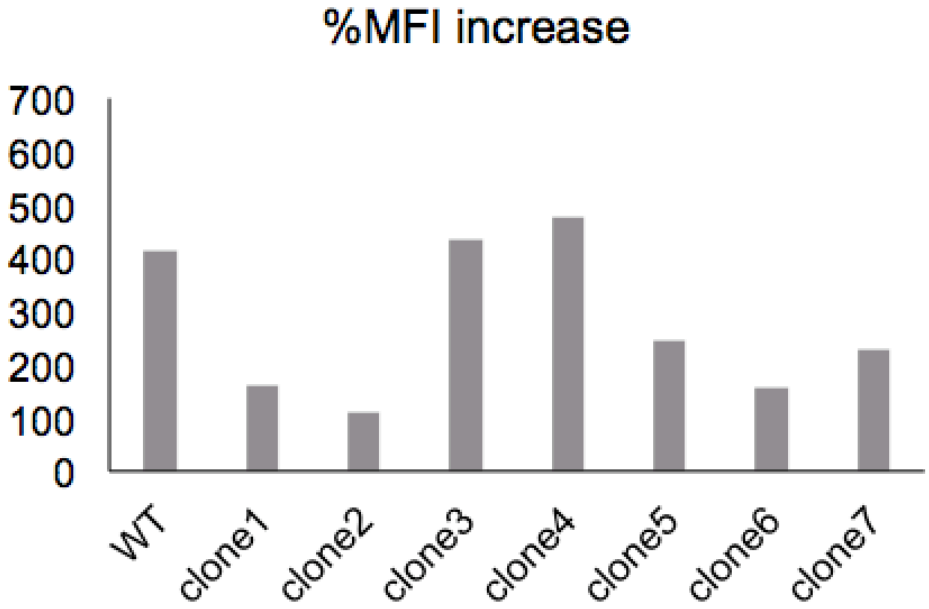


図６　PANC-１クローン細胞間における MFI 増加率の比較

クローン細胞間において MFI 増加率を比較しても、細胞ごとに異なった。

## 【5-ALA 蛍光に関与する遺伝子の検索】

5-ALA 蛍光がクローン細胞間でも異なる機序を明らかにするために、われわれは 5-ALA の取り込み、PpIX の排出に関与するトランスポーターに着目し検討した。過去の報告から PEPT1、PEPT2 のトランスポーターが 5-ALA の取り込みに関与することがわかっている（Doring et al. , 1998 ; Rud et al. , 2000 ; Rodriguez et al. , 2006）。ABCB6、ABCG2 といった ABC トランスポーターも 5-ALA の代謝に関与しているとされ、ABCB6 は 5-ALA の取り込み、ABCG2 は PpIX の排出に働く（Kobuchi et al. , 2012 ; Zhao et al. , 2013）。

PANC-1 クローン細胞における遺伝子発現の検討では、野生型および、MFI 増加率が低かったクローン２とクローン６、MFI 増加率が高かったクローン４を使用した。ABCB6、ABCG2 以外の ABC トランスポーターを含めて、これらの発現についてクローン細胞間での違いを検討した（図７）。*ABCB6* は野生型および、クローン細胞間で明らかな発現の違いを認めなかったが、*ABCG2* ではクローン２で発現が高い一方で、クローン４で発現が低かった。また、PANC-1 クローン細胞間における PEPT1 および PEPT2 遺伝子の発現を RT–PCR で比較検討したが、その発現に差は認めなかった（図８）。

*PEPT1*、*PEPT2*、*ABCB6*、*ABCG2* 遺伝子の発現について、各消化器癌細胞株における発現も比較した（図８）。PANC-1、TE4、TE9 では ABCG2 の発現を認めたが、MKN45、CFPAC では発現を認めなかった。また、MKN45、CFPAC では PEPT1 の発現が高かったが、ほかの細胞株では PEPT1 および PEPT2 の発現を認めなかった。

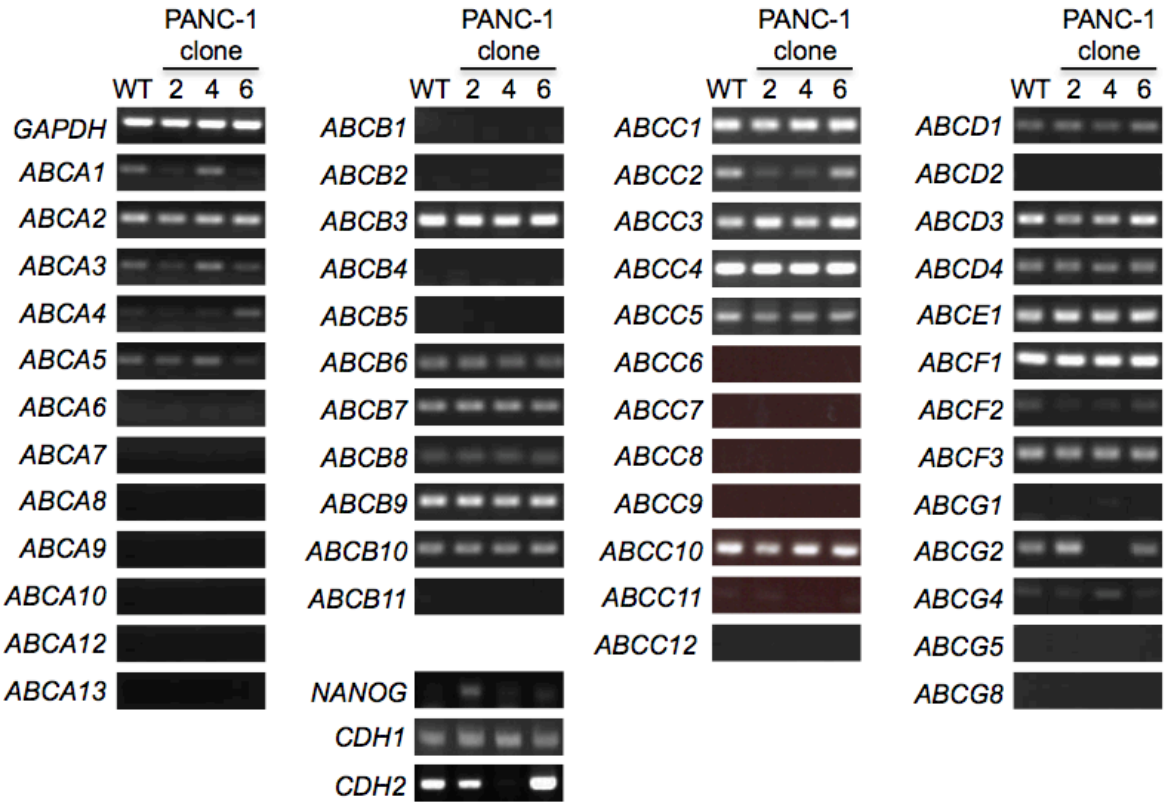


図７　PANC-1 クローン細胞における ABC トランスポーター発現の比較

*ABCB6* はクローン細胞間で明らかな発現の違いを認めなかった一方で、*ABCG2* はクローン２で発現が高く、クローン４で発現が低かった。

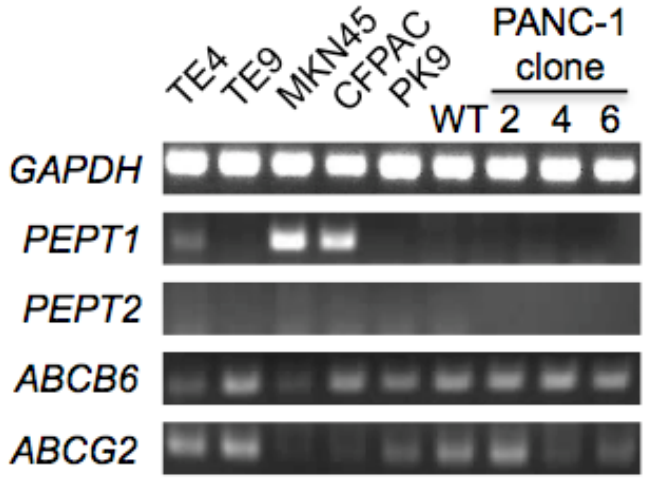


図８　各種消化器癌および PANC-1 クローン細胞における遺伝子発現の比較

*PEPT1*、*PEPT2*、*ABCB6*、*ABCG2* 遺伝子の発現について、各消化器癌細胞株における発現を比較すると、その発現の程度は細胞間で大きく異なった。

MFI 増加率とトランスポーター発現量に最も逆相関があると考えられた ABCG2 に着眼した。PANC-1 クローン細胞における ABCG2 の発現量を定量化するために、ABCG２の発現について qRT-PCR を施行した（図９）。ABCG2 の発現量は PANC-1 クローン 2 で最も高く、クローン 4 で最も低い結果であった。qRT-PCR による遺伝子定量でも、ABCG2 の発現量と PpIX の蛍光強度は逆相関の関係が示唆された。

癌細胞株における ABCG2 の発現量と MFI 増加率の関連性について検討すると、ABCG2 の発現量と MFI 増加率は有意に関連があることが示された(r=-0.9388, p=0.0055) （図１０）。また、PANC−1 クローン細胞においても検討すると、統計学的有意差は認めなかったが、関連を示す傾向にあった(r=-0.4558, p=0.2563) (図１１)。

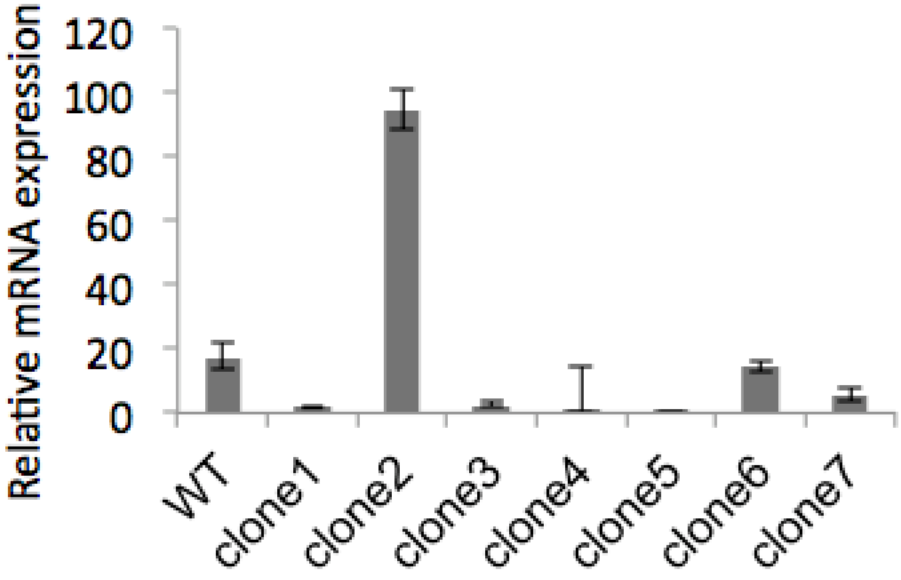


図９　PANC-1 クローン細胞における qRT-PCR を用いた *ABCG2* 遺伝子発現量の比較

qRT−PCR にて *ABCG2* 遺伝子の発現量を定量化すると、クローン２が最も発現が高く、クローン４で最も発現が低かった。

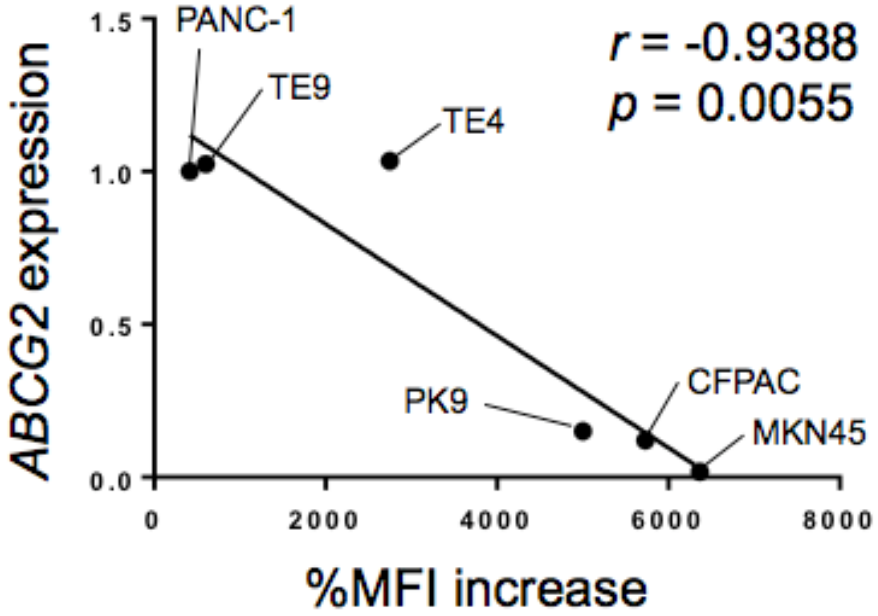


図１０　各消化器癌細胞における *ABCG2* 発現と MFI 増加率の相関

各消化器癌細胞株間で ABCG2 発現量と MFI 増加率に有意な関連を認めた。

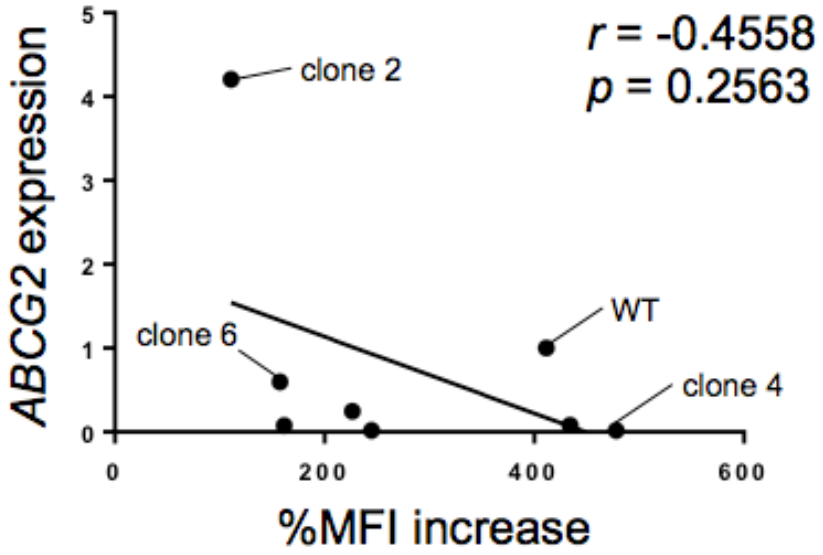


図１１　PANC-1 クローン細胞における *ABCG2* 発現と MFI 増加率の相関

PANC−1 クローン細胞間で ABCG2 発現量と MFI 増加率に統計学的有意差は認めなかったが、関連を示す傾向にあった。

## 【ABCG2 ノックダウンによる蛍光強度の変化についての検討】

過去の報告から、ABCG2 は PpIX の排出に働くことが知られている（Kobuchi et al. , 2012）。siRNA を用いて *ABCG2* をノックダウンすることで、5-ALA 蛍光に ABCG2 が与える影響について検討した。PANC-1 WT、クローン 2、クローン 4 において、*ABCG2* 特異的 siRNA により *ABCG2* のノックダウンを行い、qRT-PCR にてノックダウンされることを確認した（図１２）。*ABCG2* ノックダウン細胞（PANC-1 WT、クローン 2、クローン 4）に 5-ALA 処理を行い、フローサイトメトリーで PpIX 蛍光強度を比較した。*ABCG2* をノックダウンすることでいずれの細胞においても、PpIX の蛍光強度は増強し、ABCG2 は 5-ALA 蛍光の低下に関連していることが示された（図１３）。

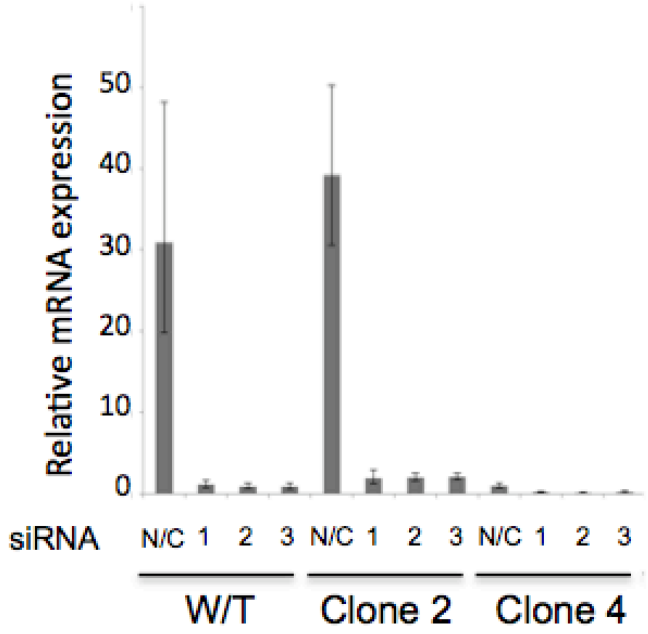


図１２　*ABCG2* のノックダウン細胞における *ABCG2* 発現量の比較

*siRNA* を用いて、W/T、クローン２、クローン４において *ABCG2* のノックダウンを行った。

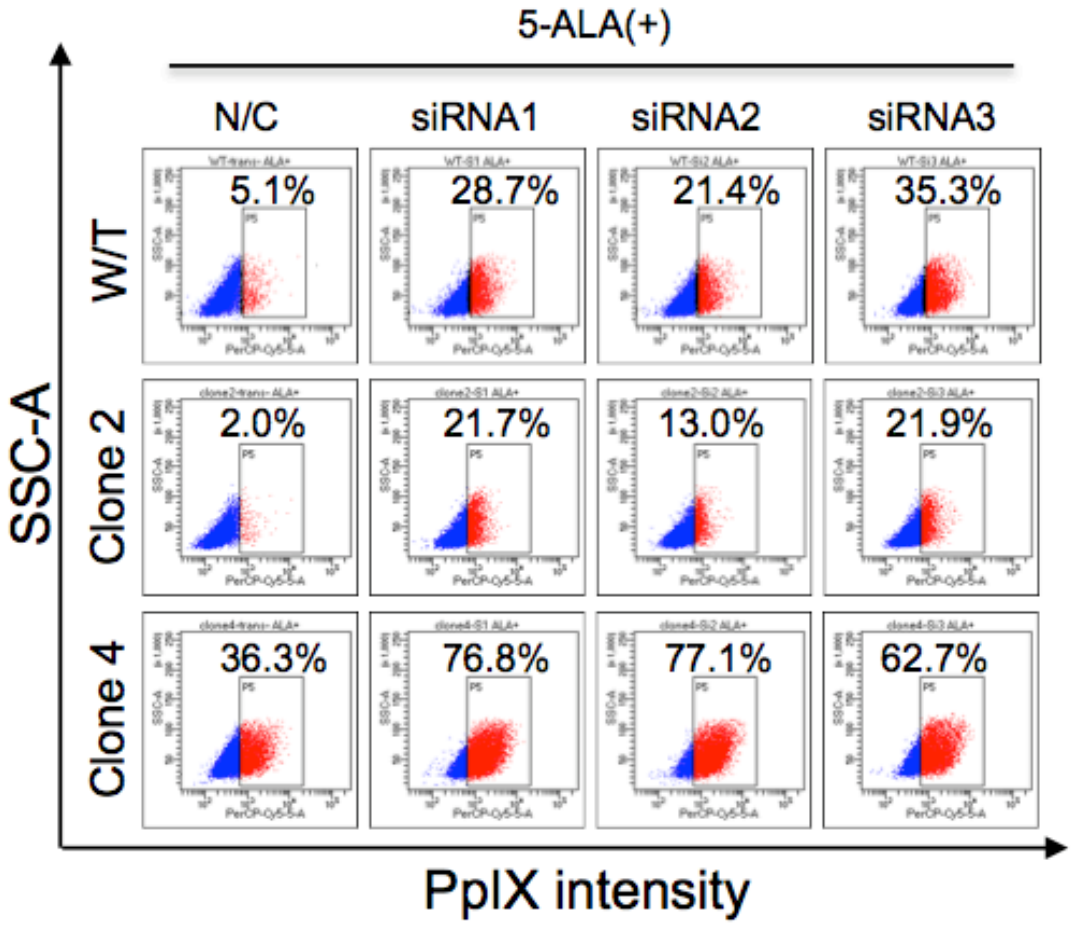


図１３　*ABCG2* ノックダウン細胞における 5-ALA 蛍光の比較

W/T、クローン２、クローン４に *ABCG2* をノックダウンすることで、いずれの細胞においても PpIX の蛍光強度は増加した。

## 【ABCG2 が癌幹細胞性に与える影響についての検討】

高い増腫瘍能をもつ細胞集団、すなわち癌幹細胞様細胞は ABCG２の発現により同定される SP 細胞に濃縮されているとされる（Nakatsugawa et al. , 2011 ; Goodell et al. , 1997 ; Zhou et al. , 2001 ; Kondo et al. , 2004 ; Inoda et al. , 2011）。PANC-1 クローン 2 は癌幹細胞様細胞が濃縮された細胞であると仮定し、SP 解析ならびに Sphere 形成能について検討した。PANC-1 クローン２では SP 細胞を 15.9%認めた一方で、野生型およびクローン４ではそれぞれ 4.4%、0.5%であった（図１４）。Sphere 培養では PANC-1 クローン２はクローン４と比較し、有意に sphere 形成能が高かった（表２）。PANC-1 クローン細胞における、ABCG2 以外の癌幹細胞性を表すマーカーの発

現について検討すると、クローン２で NANOG の発現が高い一方で、クローン４ではその発現は低かった。また、クローン２ではクローン４と比較して、上皮間葉転換のマーカーである CDH2 の発現が高かった（図７）。これらの結果からクローン２は癌幹細胞様細胞が濃縮された細胞であり、EMT 様の表現型をもつことが示唆された。さらに、クローン２はクローン４より高い増腫瘍能を示し（図１５、図１６）、これらの結果からもクローン２は野生型、クローン４と比較し癌幹細胞様細胞の性質を高く有すると示された。PANC-1 クローン２で最も ABCG2 の発現が高かったことから、ABCG2 の発現と癌幹細胞様細胞の表現型との関連について検討した。siRNA を用いた *ABCG2* のノックダウン、また、Ko143 による ABCG2 を阻害することにより、SP 細胞は低下した(図１７、図１８)が、sphere 形成能の低下は認めなかった（表３、表４）。これらの結果から ABCG2 発現は、腫瘍形成能に関与していないことが示唆された。

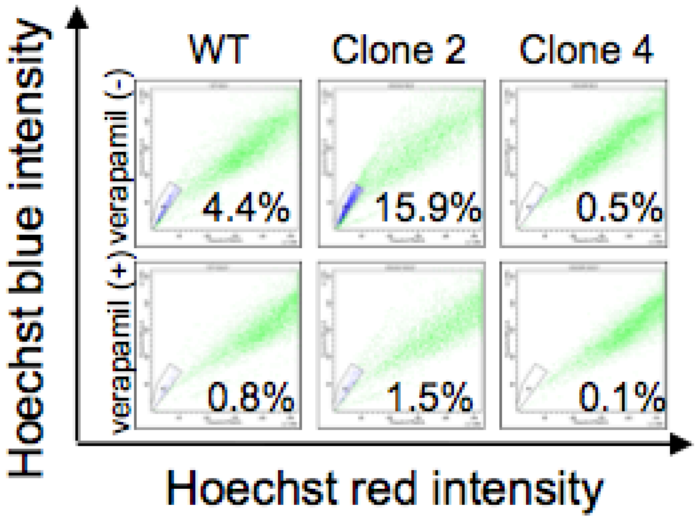


図１４　PANC-1 クローン細胞における SP 解析

クローン２では SP 細胞が 15.9%と多く、クローン４ではわずか 0.5%であった。

表２　PANC-1 クローン細胞における Sphere 形成能

Sphere formation

| clones | Cells/well $10^0$ | $10^1$ | $10^2$ | $10^3$ | CSC frequency | 95% CI |
|---|---|---|---|---|---|---|
| W/T | 0//24 | 0/24 | 24/24 | 24/24 | 1/43.8 | 28.3-67.9 |
| Clone 2 | 0/24 | 4/24 | 24/24 | 24/24 | 1/32.8 | 20.8-51.8 |
| Clone 4 | 0/24 | 0/24 | 20/24 | 24/24 | 1/72.5 | 46.3-113.7 |

*

*$P$=0.0204

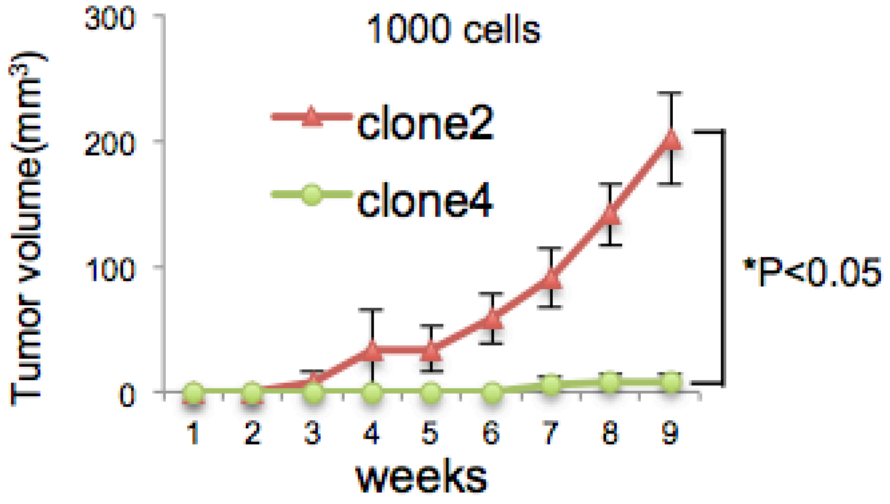


図１５　PANC-1 クローン２、クローン４における増腫瘍能の比較

クローン２、クローン４を各 1000 細胞ずつマウスに植えると、有意にクローン２で増腫瘍能が高かった。

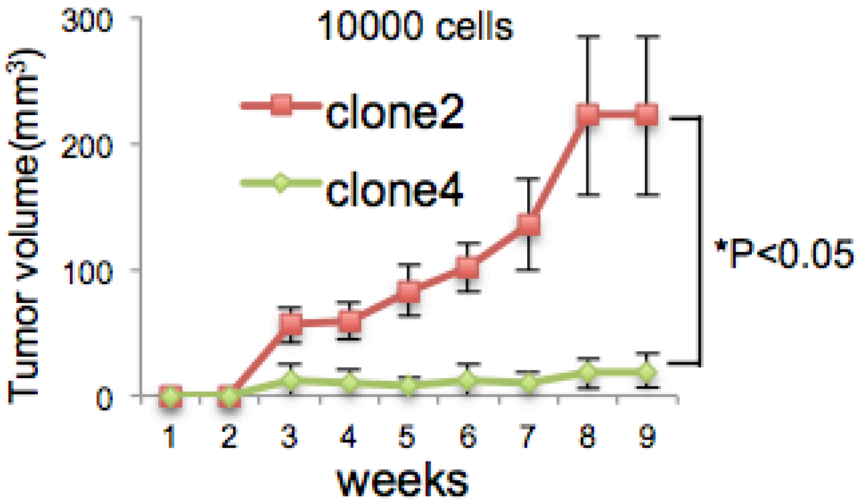


図１６　PANC-1 クローン２、クローン４における増腫瘍能の比較 2

クローン２、クローン４を各 10000 細胞ずつマウスに植えると、有意にクローン２で増腫瘍能が高かった。

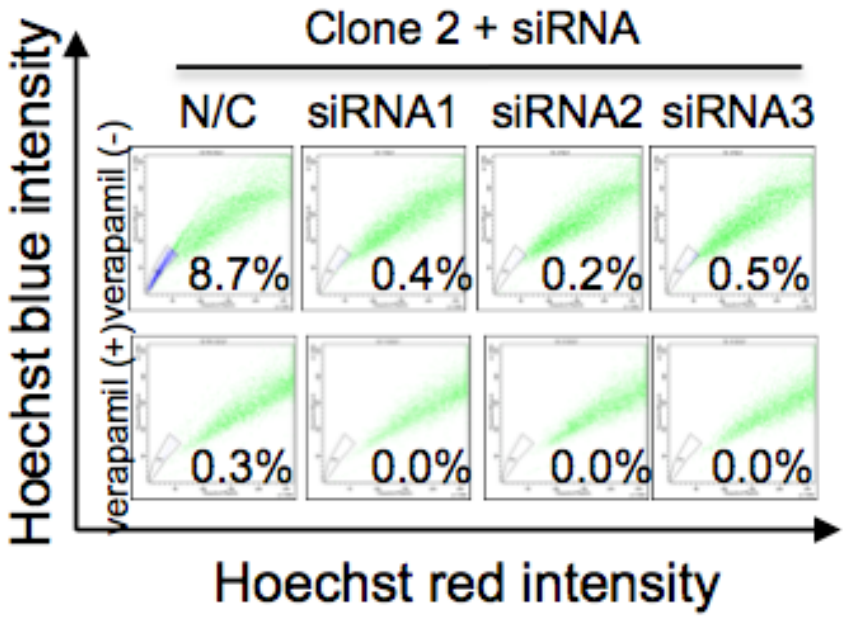


図１７　*ABCG2* のノックダウン細胞における SP 解析

クローン２で *siRNA* を用いて *ABCG2* をノックダウンすると、SP 細胞が減少した。

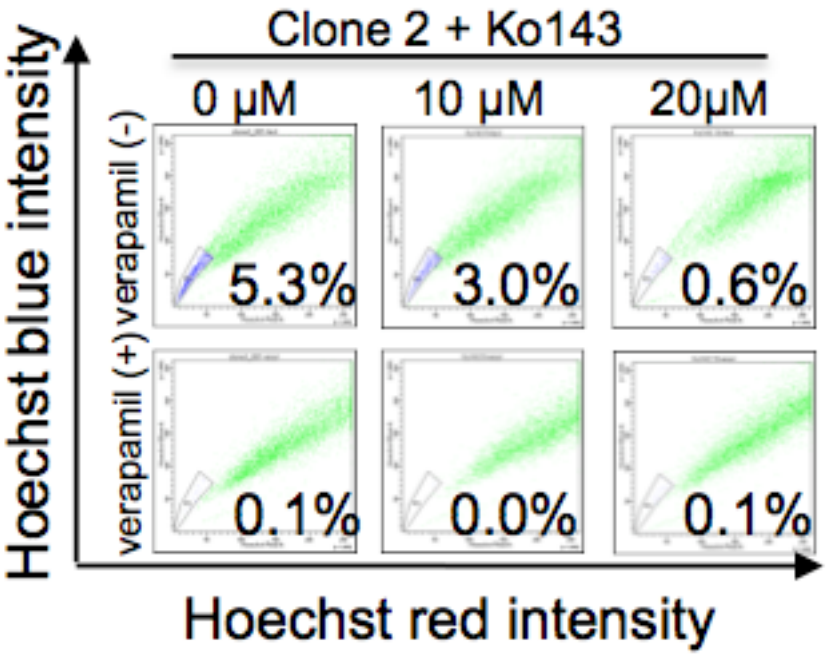


図１８　ABCG2 阻害細胞における SP 解析

クローン２で Ko143 を用いて ABCG2 を阻害すると、SP 細胞が減少した。

表３　*ABCG2* のノックダウン細胞における Sphere 形成能

| Sphere formation | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cells/well | | | | CSC frequency | 95% CI | |
| siRNAs | $10^0$ | $10^1$ | $10^2$ | $10^3$ | | | |
| N/C | 0/24 | 0/24 | 4/24 | 24/24 | 1/325.1 | 205.2-515.2 | * |
| siRNA1 | 0/24 | 0/24 | 12/24 | 24/24 | 1/163.1 | 97.2-274.1 | |
| siRNA2 | 0/24 | 0/24 | 2/24 | 24/24 | 1/376.6 | 240.5-589.9 | |
| siRNA3 | 0/24 | 0/24 | 6/24 | 24/24 | 1/278.6 | 173.1-448.8 | |

*N.S.

表４　ABCG2 阻害細胞における Sphere 形成能

| Sphere formation | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Cells/well | | | | CSC frequency | 95% CI | |
| Ko143 | $10^0$ | $10^1$ | $10^2$ | $10^3$ | | | |
| 0 μM | 0//24 | 10/24 | 24/24 | 24/24 | 1/20.0 | 12.2-33.2 | * |
| 10 μM | 1/24 | 11/24 | 24/24 | 24/24 | 1/17.0 | 10.3-28.3 | |
| 20 μM | 0/24 | 3/24 | 24/24 | 24/24 | 1/35.3 | 22.6-55.4 | |

*N.S.

## 考　察

本研究は、消化器がん領域における5-ALAを用いた光線力学的診断の分子メカニズムの解明を目的として施行した。

5-ALAを用いたPDD / PDTは皮膚がんや脳神経外科領域において承認され、さらに、他の癌種に対しても使用されるようになってきた（Nokes et al. , 2013）。5-ALAを用いた、悪性神経膠腫に対する第３相試験では明らかな無増悪生存期間の延長を示し（Stummer et al/ , 2006）、5−ALAは悪性腫瘍の効果的な診断方法の一つであることが示された一方で、登録患者の多くは病勢の進行を認め、5-ALA PDDの精度を向上する必要があり、これまで5-ALA PDD / PDTに関し、分子レベルでの検討・解析が報告されてきた。消化器癌領域においては、手術中に腹膜播種やリンパ節転移の検出することは術式やその後の治療決定に重要な情報である。しかしながら、広い腹腔内において微小な腹膜播種を術中に検出することは容易ではなく、5-ALA PDDの臨床応用により客観的な術中癌検出の診断精度の向上が期待される一方で、5-ALA PDD自体の診断精度が一定ではないことが問題点として挙げられ、消化器癌領域における5-ALA PDDに関する研究の蓄積は消化器癌領域で5-ALA PDDの普及には必要不可欠である。

ABCG2トランスポーターは様々な内因性および、外因性の化学物質や（Natarajan et al. , 2012）、薬剤耐性に関与し、癌細胞における治療薬の薬理作用に影響を与える（Glavinas et al. , 2004 ; Challen et al. , 2006 ; Krishnamurthy et al. , 2006）。びまん性大細胞性B細胞リンパ腫細胞株を用いた研究では、ABCG2トランスポーターはヘッジホッグシグナルの転写因子GLI1の転写標的であることを明らかにされている（Singh , 2011.）。ソニック・ヘッジホッグ（SHH）シグナル伝達経路は膵癌で活性化される主要な伝達経路の一つである（Rosow , 2012）。転移を有する膵癌患者を対象とした第1b、2相試験では、ヘッジホッグシグナル伝達経路に対する阻害剤であるビスモデキブにゲムシタビンを併用しても無増悪生存期間を延長しなかった（Catenacci , 2015）。これらの結果から、ヘッジホッグシグナル伝達経路を標的とした治療は難しいことが示唆された。ヘッジホッググナル伝達経路に関するPANC-1細胞を使用した研究では、sphereを形成した癌幹細胞様細胞が上皮間葉転換の転写因子であるSNAI1および、ヘッジホッグシグナル伝達のリガンドとなるSMOを高発現することを示しており（Wang et al, 2016）、ヘッジホッグシグナルの活性化は、癌幹細胞様細胞の表現型および、上皮間葉転換と強い関連性をもつことを示唆している。本研究では、ABCG2を高発現しているPANC-1クローン２ではABCG2発現が低いクローン４と比較しsphere形成能が高かった。それゆえ、ABCG2を高発現した膵癌幹細胞様細胞は、ABCG2阻害剤を併用した5ALA PDD / PDTの良い標的になり得、このアプローチによりヘッジホッグシグナルが活性化された膵癌細胞を標的とする手段にもなり得る可能性がある。siRNAにより*ABCG2*をノックダウンすることで細胞内におけるPpIXの集積

は増加したが、クローン４におけるPpIX陽性率は100%には至らなかった。PANC−1細胞はABCB6およびABCG2をともに発現したが、PEPT1、PEPT2の発現は非常に低かった（図7）。それゆえ、PANC-1クローン細胞におけるPpIXの集積はPEPT1、PEPT2の発現が低かったことも影響している可能性がある。近年の研究では、ラット神経膠腫細胞であるC6細胞ではPpIXの集積が低く、さらにそれらは神経膠腫の幹細胞様細胞が濃縮された細胞集団であると報告された（Wang et al. , 2017）。神経膠腫幹細胞様細胞におけるPpIX集積はABCG2阻害剤であるレセルピンを用いても影響を与えず、鉄のキレート剤として働くデフェロキサミンにより影響を受けており、PpIXの集積はあらゆる因子が影響を与えることを示している。

ABCB6は5-ALAの取り込みトランスポーターとして働くが、これがPpIXの高集積に関与することを示した報告もある（Zhao et al. , 2013）。ABCB6の高発現が乳がんにおける術前補助化学療法に対する反応や前立腺癌の進行に関与するとされる（Park et al. , 2006 ; Karatas et al. , 2016 ）。ABCB6の高発現が薬剤耐性や、がんの進行に関与する分子メカニズムは不明であるが、ABCB6高発現のがん細胞ではPpIXが高集積することが予測され、ABCB6高発現の悪性腫瘍に対しては5-ALA　PDD/PDTの良い適応とも考えられる。しかし、PANC−1細胞の野生型とクローン細胞においては、ABCB6は同等の発現レベルを示しており、膵癌細胞株においてはABCB6の発現はPpIXの集積に関係しない可能性もあることから、ABCB6は膵癌に対する5-ALA PDD/PDTの有効性を示すマーカーとはならない可能性がある。今後、膵臓癌患者からの臨床検体を使用したデータの蓄積が必要となる。

本研究では、多くの消化器癌細胞株で同等に 5-ALA による蛍光程度を示した。しかしながら、膵癌細胞株である PANC−1 では、蛍光の程度が低かった。ABCG2 の高発現が 5−ALA の低蛍光に関与する可能性を示し、さらに ABCG2 高発現の細胞集団はクローン細胞を用いた解析から癌幹細胞様細胞が濃縮された細胞集団と考えられた。すなわち、5-ALA PDD 適応が期待される消化器癌においても、ABCG2 発現により、診断効率の低下が危惧される。一方で、ABCG2 の阻害により、5−ALA 蛍光を高めることが可能であった。しかしながら、ABCG2 阻害は Sphere 形成能には影響を与えなかった。これらの結果から、ABCG2 は 5-ALA PDD / PDT の効率・効果予測の新規バイオマーカーとなり得ることが示唆された。その一方で、PANC-1 クローン細胞間でも ABCG2 の発現量が大きく異なることからもわかるように、一患者においても病内において ABCG2 の発現の多様性が存在する事が想定され、どのように ABCG2 発現を評価すべきか、ABCG2 発現の評価には課題が残る。ABCG2 を高発現するクローン細胞は癌幹細胞様の性質を有していた。すなわち、ABCG2 高発現癌幹細胞様細胞は、5-ALA PDD にて検出困難である可能性が示唆される。一方で、ABCG2 阻害剤を併用することにより、ABCG2 高発現癌幹細胞様細胞の診断・治療効率を改善出来る可能

性が示唆される。一方では、ABCG2 阻害と癌幹細胞様形質との直接的な関連性を示す事が出来なかった。すなわち、ABCG2 は、癌幹細胞様細胞の代理マーカーであり、機能的分子ではないと考えられた。ABCG2 阻害剤併用の可能性を示したが、ABCG2 阻害剤の全身投与により腫瘍自体の ABCG2 を阻害することは難しいと考えられ、細胞実験と実臨床において大きな乖離が存在することも課題の一つである。ABCG2 阻害剤を腹膜播種病変などに直接作用させることは考えうるが、腹腔内は広く腹腔内投与による阻害は難しいことが予想される一方で、膀胱や子宮といった限られた空間をもつ管腔臓器においては応用が可能かもしれない。

## 結　論

【本研究から得られた新知見】

- 消化器癌細胞株における多くの癌腫で5-ALAによるその蛍光強度は同等であったが、膵臓癌細胞株PANC1では明らかに蛍光強度は低く、この一因としてABCG2の高発現が関与していた。
- PANC-1クローン細胞間においてABCG2の発現の程度は異なり、ABCG2高発現の細胞集団に癌幹細胞様細胞が濃縮されていた。
- ABCG2の阻害により5-ALAによる蛍光強度を高めたが、sphere形成能に影響は与えなかった。

【新知見の意義】

5-ALA PDDは臨床応用の拡大が期待される一方で、診断精度が一定ではないことが問題点である。本研究の結果で得られた、ABCG2高発現の癌腫では5-ALA PDDの診断精度に関与し、ABCG2阻害剤を併用することで診断精度を向上させうる可能性が示唆されたことに意義があると考える。

また、ABCG2を高発現している癌幹細胞様の性質を有する腫瘍において5-ALA PDDによる診断精度が低下しうる可能性があり、ABCG2阻害剤併用により，これらに対しても診断精度を向上する可能性が考えられる。

【今後の研究の展開】

今回ABCG2発現量と蛍光強度の比較は細胞実験にて行った。今後はマウスを使用したABCG2高発現腫瘍と低発現腫瘍における蛍光強度の比較および、ABCG2阻害剤投与下における蛍光の変化について検討を行う。

さらに、実臨床における5-ALA PDDの診断精度とABCG2の関連性の検討を行うため、手術時の5-ALA PDDの診断精度と手術検体におけるABCG2の発現量の関連についての検討を行う。

【今後の課題】

個体差や病変の違いによりABCG2の発現の程度が異なると考えられ、ABCG2発現の評価に課題が残る。また、ABCG2を阻害することにより5-ALA PDDの診断精度を向上させる可能性を示したが、実際に腫瘍のABCG2をいかに阻害するかという点で課題は大きく、応用には更なる生体実験の蓄積が必要である。

## 謝　辞

本研究に際して、多くのご支援とご指導を頂きました札幌医科大学医学部病理学第１講座鳥越俊彦教授、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室 II 平野聡教授に深く感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり、日々の御指導を多岐にわたりいただきました札幌医科大学医学部病理学第１講座廣橋良彦准教授、北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室 II 海老原裕磨特任講師に深く感謝申し上げます。

最後に本研究にあたり御協力頂きました研究者の皆様、研究室スタッフの皆様方に深く感謝申し上げます。

## 利益相反

開示すべき利益相反はありません。

## 引用文献

Batlle A, Di Venosa G, Battah S, Dobbin P, Macrobert AJ, Casas A. (2006). Mechanisms of 5-aminolevulinic acid ester uptake in mammalian cells. British journal of pharmacology. *147*, 825-33.

Beck TJ, Kreth FW, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Stepp H, Stummer W, Baumgartner R. (2007). Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. Lasers in surgery and medicine. *39*, 386-93.

Catenacci DV, Junttila MR, Karrison T, Bahary N, Horiba MN, Nattam SR, Marsh R, Wallace J, Kozloff M, Rajdev L, et al. (2015). Randomized Phase Ib/II Study of Gemcitabine Plus Placebo or Vismodegib, a Hedgehog Pathway Inhibitor, in Patients With Metastatic Pancreatic Cancer. Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology. *33*, 4284-92.

Challen GA, Little MH. (2006). A side order of stem cells: the SP phenotype. Stem cells. *24*, 3-12.

Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CH, Jones DL, Visvader J, Weissman IL, Wahl GM. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer research. *66*, 9339-44.

Doring F, Walter J, Will J, Focking M, Boll M, Amasheh S, Clauss W, Daniel H. (1998). Delta-aminolevulinic acid transport by intestinal and renal peptide transporters and its physiological and clinical implications. The Journal of clinical investigation. *101*, 2761-7.

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J, Sarkadi B. (2004). The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Current drug delivery. *1*, 27-42.

Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, Marks DF, DeMaria M, Paradis G, Grupp SA, Sieff CA, Mulligan RC, Johnson RP. (1997). Dye efflux studies suggest that hematopoietic stem cells expressing low or undetectable levels of CD34 antigen exist in multiple species. Nature medicine. *3*, 1337-45.

Hillemanns P, Wimberger P, Reif J, Stepp H, Klapdor R. (2017). Photodynamic diagnosis with 5-aminolevulinic acid for intraoperative detection of peritoneal metastases of ovarian cancer: A feasibility and dose finding study. Lasers in surgery and medicine. *49*, 169-76.

Hirohashi Y, Torigoe T, Tsukahara T, Kanaseki T, Kochin V, Sato N. (2016). Immune responses to human cancer stem-like cells/cancer-initiating cells. Cancer science. *107*, 12-7.

Hu Y, Smyth GK. (2009). ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. J Immunol Methods. *347*, 70-8.

Inoda S, Hirohashi Y, Torigoe T, Morita R, Takahashi A, Asanuma H, Nakatsugawa M, Nishizawa S, Tamura Y, Tsuruma T, et al. (2011). Cytotoxic T lymphocytes efficiently recognize human colon cancer stem-like cells. The American journal of pathology. *178*, 1805-13.

Karatas OF, Guzel E, Duz MB, Ittmann M, Ozen M. (2016). The role of ATP-binding cassette transporter genes in the progression of prostate cancer. The Prostate. *76*, 434-44.

Kim JH, Park JM, Roh YJ, Kim IW, Hasan T, Choi MG. (2015). Enhanced efficacy of photodynamic therapy by inhibiting ABCG2 in colon cancers. BMC Cancer. *15*, 504.

Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, Utsumi T. (2012). Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. PloS one. *7,* e50082.

Koizumi N, Harada Y, Minamikawa T, Tanaka H, Otsuji E, Takamatsu T. (2016). Recent advances in photodynamic diagnosis of gastric cancer using 5-aminolevulinic acid. World journal of gastroenterology. *22*, 1289-96.

Kondo T, Setoguchi T, Taga T. (2004). Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. *101*, 781-6.

Krishnamurthy P, Schuetz JD. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. Annual review of pharmacology and toxicology. *46*, 381-410.

Liu Y, Endo Y, Fujita T, Ishibashi H, Nishioka T, Canbay E, Li Y, Ogura S, Yonemura Y. (2014). Cytoreductive surgery under aminolevulinic acid-mediated photodynamic diagnosis plus hyperthermic intraperitoneal chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis from ovarian cancer and primary peritoneal carcinoma: results of a phase I trial. Annals of surgical oncology. *21*, 4256-62.

Loning M, Diddens H, Kupker W, Diedrich K, Huttmann G. (2004). Laparoscopic fluorescence detection of ovarian carcinoma metastases using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX. Cancer. *100*, 1650-6.

Murayama Y, Ichikawa D, Koizumi N, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Kubota T, Nakanishi M, Harada Y, et al. (2012). Staging fluorescence laparoscopy for gastric cancer by using 5-aminolevulinic acid. Anticancer research. *32*, 5421-7.

Nakatsugawa M, Takahashi A, Hirohashi Y, Torigoe T, Inoda S, Murase M, Asanuma H, Tamura Y, Morita R, Michifuri Y, et al. (2011). SOX2 is overexpressed in stem-like cells of human lung adenocarcinoma and augments the tumorigenicity. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. *91*, 1796-804.

Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. Biochemical pharmacology. *83*, 1084-103.

Nishizawa S, Hirohashi Y, Torigoe T, Takahashi A, Tamura Y, Mori T, Kanaseki T, Kamiguchi K, Asanuma H, Morita R, et al. (2012). HSP DNAJB8 Controls Tumor-Initiating Ability in Renal Cancer Stem-like Cells. Cancer research. *72*, 2844-54.

Nokes B, Apel M, Jones C, Brown G, Lang JE. (2013). Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. The Journal of surgical research. *181*, 262-71.

Olzowy B, Hundt CS, Stocker S, Bise K, Reulen HJ, Stummer W. (2002). Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid. Journal of neurosurgery. *97*, 970-6.

Palasuberniam P, Yang X, Kraus D, Jones P, Myers KA, Chen B. (2015). ABCG2 transporter inhibitor restores the sensitivity of triple negative breast cancer cells to aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy. Scientific reports. *5*, 13298.

Park CY, Tseng D, Weissman IL. (2009). Cancer stem cell-directed therapies: recent data from the laboratory and clinic. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy. *17*, 219-30.

Park S, Shimizu C, Shimoyama T, Takeda M, Ando M, Kohno T, Katsumata N, Kang YK, Nishio K, Fujiwara Y. (2006). Gene expression profiling of ATP-binding cassette (ABC) transporters as a predictor of the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. Breast cancer research and treatment. *99*, 9-17.

Rosow DE, Liss AS, Strobel O, Fritz S, Bausch D, Valsangkar NP, Alsina J, Kulemann B, Park JK, Yamaguchi J, et al. (2012). Sonic Hedgehog in pancreatic cancer: from bench to bedside, then back to the bench. Surgery. *152*, S19-32.

Rud E, Gederaas O, Hogset A, Berg K. (2000). 5-aminolevulinic acid, but not 5-aminolevulinic acid esters, is transported into adenocarcinoma cells by system BETA transporters. Photochemistry and photobiology. *71*, 640-7.

Singh RR, Kunkalla K, Qu C, Schlette E, Neelapu SS, Samaniego F, Vega F. (2011). ABCG2 is a direct transcriptional target of hedgehog signaling and involved in stroma-induced drug tolerance in diffuse large B-cell lymphoma. Oncogene. *30*, 4874-86.

Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ, ALA-Glioma Study Group. (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. The lancet oncology. *7*, 392-401.

Stummer W, Beck T, Beyer W, Mehrkens JH, Obermeier A, Etminan N, Stepp H , Tonn JC, Baumgartner R, Herms J, et al. (2008). Long-sustaining response in a patient with non-resectable, distant recurrence of glioblastoma multiforme treated by interstitial photodynamic therapy using 5-ALA: case report. Journal of neuro-oncology. *87*, 103-9.

Wang F, Ma L, Zhang Z, Liu X, Gao H, Zhuang Y, et al. (2016). Hedgehog Signaling Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. Journal of Cancer. *7,* 408-17.

Wang W, Tabu K, Hagiya Y, Sugiyama Y, Kokubu Y, Murota Y, Yang P, Kornmann M, Tian X, Yang Y. (2017). Enhancement of 5-aminolevulinic acid-based fluorescence detection of side population-defined glioma stem cells by iron chelation. Scientific reports. *7*, 42070.

Yasuda K, Torigoe T, Mariya T, Asano T, Kuroda T, Matsuzaki J, Ikeda K, Yamauchi M, Emori M, Asanuma H, et al. (2014). Fibroblasts induce expression of FGF4 in ovarian cancer stem-like cells/cancer-initiating cells and upregulate their tumor initiation capacity. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. *94*, 1355-69.

Yasuda K, Hirohashi Y, Mariya T, Murai A, Tabuchi Y, Kuroda T, Kusumoto H, Takaya A, Yamamoto E, Kubo T, et al. (2017). Phosphorylation of HSF1 at serine 326 residue is related to the maintenance of gynecologic cancer stem cells through expression of HSP27. Oncotarget. *8*, 31540-53.

Yonemura Y, Endo Y, Canbay E, Liu Y, Ishibashi H, Mizumoto A, Hirano M, Imazato Y, Takao N, Ichinose M, et al. (2017). Photodynamic Detection of Peritoneal Metastases Using 5-Aminolevulinic Acid (ALA). Cancers. *9*, 23.

Zhao SG, Chen XF, Wang LG, Yang G, Han DY, Teng L, Yang MC, Wang DY, Shi C, Liu YH, et al. (2013). Increased expression of ABCB6 enhances protoporphyrin IX accumulation and photodynamic effect in human glioma. Annals of surgical oncology. *20*, 4379-88.

Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagtine I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. Nature medicine. *7*, 1028-34.