

氏名	ちゃん ていん たい TRAN TIEN TAI
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第717号
学位授与の日付	平成26年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 生命物質科学専攻
学位論文題目	Potential aspects supporting $\delta$ -aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy (腫瘍組織における $\delta$ -アミノレブリン酸誘導性の光線力学的療法 の分子的有効性の解明)
審査委員	(主査)教授 竹谷 茂 教授 山口政光 教授 亀井加恵子

### 論文内容の要旨

光線力学的療法は光反応に基づいた魅力的な腫瘍の治療法である。光感受性物質としては種々の化学化合物が使われており、それぞれの構造の特徴に応じた適切な波長や光の強さによって活性化されたのちにエネルギーを生み、これが光化学反応を開始させることが知られている。この反応では一重項酸素と呼ばれる高い反応性を持つ物質の発生が最高点に達した時、分子状の酸素が励起もしくはエネルギーを与えられた状態になって、続いて腫瘍の破壊を引き起こすのである。ヘム合成の最終段階の酵素であるフェロケラターゼ (FECH) は二価鉄 ( $Fe^{2+}$ ) をプロトポルフィリンIX (PPIX) に挿入する働きを担っている。腫瘍細胞においては FECH 活性が減少して、鉄の利用を制限されることで ミトコンドリア内での PPIX の蓄積が増加する。蓄積した PPIX は光との反応性が強く、これを標的にした癌治療が世界で用いられている (ALA-PDT)。ALA の細胞内への取り込みの活性化についても PPIX の蓄積と関係していると考えられている。しかしながら、ALA の輸送体については、ほとんど研究が行われていない。本研究では、ALA の細胞への取り込みについて、ALA の構造類似体の影響を調べた。その結果 ALA と同じ C5-化合物であるグルタミンやグルタミン酸などのアミノ酸は ALA の取り込みを阻害したので、グルタミンやグルタミン酸輸送体を発現させたが、ALA-PDT は殆ど変化しなかった。そこで、次に立体構造類似体 GABA、クレアチンやタウリンなどの神経伝達物質の効果を調べた結果、大腸癌細胞への取り込みが顕著に阻害された。それらのトランスポーターである SLC6A6、SLC6A12 や SLC6A13 を発現させた所、ALA の取り込みおよび ALA-PDT が著しく増加した。また、これらの分子をノックダウンすると、ALA の癌細胞への取り込みが低下した。さらに、これらの SLC6A ファミリー分子は多くの大腸癌患者の患部組織での発現の亢進が認められた。従って、癌細胞における優先的な ALA 由来の PPIX の蓄積には SLC6A ファミリー分子が関与することがわかった。これらの分子が同定できたことで、従来の癌の診断や治療方法を改善し臨床医学において利益をもたらすに違いないと考えられる。一方、癌細胞における優先的な PPIX の蓄積の機構は不明である。次に、FECH の発現を調節している可能性のあるミトコンドリアの鉄シャペロンであるフラタキシンと ALA-PDT の関係について調べた。ヒトの培養細胞にフラタキシンを発現させると ALA 由

来の PPIX の蓄積は低下した。さらに詳細にフラタキシンの発現調節について検討するために、フラタキシン mRNA の変動を癌抑制遺伝子 p53 の機能阻害剤処理もしくはノックダウンさせて調べた所、顕著な減少が認められた。また正常 p53 を変異 p53 を産生する癌細胞に発現させた結果、フラタキシン mRNA は増加した。次にヒトフラタキシン遺伝子の近位プロモーターをレポーター活性測定法、CHIP assay もしくはゲルシフト法を用いて解析することにより p53 の応答配列の存在を見いだした。これらの結果から ALA-PDT の効率の上昇は、癌細胞における p53 発現の破綻によってフラタキシンレベルの低下が引き起こされ、FECH 機能を含めたミトコンドリア内の鉄利用の低下によることが強く示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

癌患者の有効で、世界で広く用いられている診断治療法として、光線力学的療法がある。本研究は、そのなかでも近年、安全でかつ最も有効な治療法として脚光を浴びているδ-アミノレブリン酸 (ALA) を用いる ALA-PDT についての新しい知見を得る事を目的にしている。まず ALA の癌細胞への取り込みの機構については殆ど知られていなかったが、ALA の構造類似体である GABA や Taurine などによる ALA の取り込みの低下を見いだして、その担当分子として神経伝達物質トランスポーターである SLC6A6、SLC6A12 や SLC6A13 の役割を分子の発現やノックダウン法を用いて明らかにしている。また、光感受性の変動についても確認している。癌細胞や組織での SLC6 ファミリーの発現を調べて、種々の癌細胞での SLC6A6 と SLC6A13 の高発現を確認し、さらには大腸癌患者の癌組織での両分子の発現の亢進を見いだした。従って、癌細胞における優先的な ALA-PDT には SLC6A ファミリー分子が関与することがわかった。ALA-PDT は外科的切除が困難な脳腫瘍治療に特に有効であることを考えると、神経伝達物質トランスポーターの関与の発見は脳腫瘍の診断や治療方法の改善を始め将来の腫瘍医学において大きく貢献するに違いないと考えられる。一方、癌細胞のミトコンドリアの鉄代謝は正常な細胞とは異なることが知られているがミトコンドリアの鉄シャペロンであるフラタキシンと ALA-PDT の関係について調べている。すなわちフラタキシンの発現が癌抑制遺伝子 p53 によって調節されていることを p53 の機能阻害や発現のノックダウン法を用いて明らかにした。また正常 p53 の癌細胞で強制発現実験やフラタキシン遺伝子プロモーター上の p53 の応答配列の存在を見いだした。従って ALA-PDT の効率の上昇の一因は癌細胞における p53 発現の破綻によるフラタキシンを始めとするミトコンドリアの鉄利用分子の機能低下であることを発見した。これらの発見は腫瘍細胞のミトコンドリアの新しい分子生物学的な解釈を与えるのみならず、ALA-PDT の臨床的な弱点を克服するための提言になり高く評価できる。

これらの研究の成果は、下記の国際学術雑誌 4 編 (主論文 3 ; 参考論文 1) に掲載されている。

「公表論文」

#### 主論文

1. Neurotransmitter transporter family including SLC6A6 and SLC6A13 contributes to the 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced accumulation of protoporphyrin IX and photo-damage, through uptake of ALA by cancerous cells. Tran T. Tai, A. Mu, Y. Adachi, Y. Adachi & S. Taketani

*Photochemistry and Photobiology.* (2014) In press.

2. p53 directly regulates the transcription of the human frataxin gene and its lack of regulation in tumor cells decreases the utilization of mitochondrial iron. R. Shimizu, Nguyen N. Lan, Tran T. Tai, A. Kawazoe, A. Mu & S. Taketani. *Gene*. (2014) In press.
3. Imaging of heme/hemeproteins in nucleus of the living cells expressing heme-binding nuclear receptors R. Itoh, K. Fujita, A. Mu, Dao H. T. Kim, Tran T. Tai, I. Sagami & S. Taketani. *FEBS Letters* 587 (2013), 2131-2136.

参考論文

1. H. Ida, O. Suyari, M. Shimamura, Tran.T. Tran, M. Yamaguchi & S. Taketani (2013) Genetic link between heme oxygenase and the signaling pathway of DNA damage in *Drosophila melanogaster*. *Tohoku J. Exp. Med.* 231, 117-125