

## 受賞対象論文

Fujita H, Nagakawa K, Kobuchi H, Ogino T, Kondo Y, Inoue K, Shuin T, Utsumi T, Utsumi K, Sasaki J, Ohuchi H: Phytoestrogen Suppresses Efflux of the Diagnostic Marker Protoporphyrin IX in Lung Carcinoma. *Cancer Res* (2016) 76, 1837-1846.

## 藤田 洋史

Hirofumi Fujita

## 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学

Department of Cytology and Histology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences



## &lt;プロフィール&gt;

昭和53年生まれ  
 平成12年3月 九州工業大学情報工学部卒業  
 平成12年4月 九州工業大学大学院情報工学研究科博士前期課程入学  
 平成14年3月 九州工業大学大学院情報工学研究科博士前期課程修了  
 平成14年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程入学  
 平成17年9月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科博士課程早期修了  
 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学 客員研究員  
 平成18年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学 助手  
 平成19年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞組織学 助教  
 現在に至る

## 研究の背景と経緯

Protoporphyrin IX (PpIX)は赤色蛍光を示す光感受性物質であり、5-aminolevulinic acid (ALA) から合成される。PpIXは、がん特異的に蓄積する性質を有することから、ALA投与後に励起光を照射することで腫瘍組織を蛍光により検出することができる。これを光線力学的診断といい、特に膀胱癌や脳腫瘍などの外科手術の際、腫瘍の境界の同定や、小さく判りにくい腫瘍の見落としを防ぐために用いられている。しかし、ALAを用いた光線力学的診断にはPpIXが十分に蓄積せず、診断に用いることができない腫瘍もいくつかあり、この改善が課題となっている。

ALAによるPpIXの蓄積は、ヘム合成を制御する酵素群に依存している。このヘム合成系は、ALAを基質として、ヘム中間代謝物であるPpIXを一連の酵素反応により合成する。その後、このPpIXにフェロキターゼが鉄を結合することで、ヘムが合成される。さらに近年、多剤耐性タンパク質として知られるATP-binding cassette transporter G2 (ABCG2)は、細胞内のPpIXを細胞外へ放出することが明らかとなった。我々は、このPpIX代謝機構と排出機構に着目し、ALAの蓄積を改善する化合物の探索を行ってきた<sup>1-3)</sup>。

エストロゲン療法の副作用として、晩発性皮膚ポルフィリン症が知られている。この疾患は、皮膚光線過敏症とポルフィリン過剰排泄を特徴とする。また、卵巣切除によるエストロゲン枯渇を引き起こしたメスマウスは、PpIXの蓄積が減少し、PpIX合成に関わる酵素の発現が抑制されることから、エストロゲンはPpIX蓄積に対して促進的作用をもつことが示唆された。一方で、フィトエストロゲンとして知られるゲニステインは、哺乳類においてエストロゲン様活性を持つことが知られている。さらにゲニステインは、ABCG2阻害活性をもち、抗がん剤の排出を抑制することも報告されている<sup>4)</sup>。

以上の背景に立脚して我々は、ゲニステインがPpIXの合成や排出の抑制を介して、PpIX蓄積を促進するという仮説を立てた。本報告では主にABCG2を発現するヒト肺がん細胞A549細胞を用い、*in vitro*及び*in vivo*におけるPpIX蓄積へのゲニステインの作用を解析した。

## 研究成果の内容

### 1. ゲニステインは ABCG2 による排出の抑制を介して A549細胞の PpIX 蓄積を促進する

はじめに我々は、ABCG2 高発現細胞 A549と低発現細胞 U937において、ALA による PpIX 蓄積に対するゲニステインの作用を比較した。その結果、ゲニステインは U937細胞において PpIX 蓄積を促進せず、A549細胞において PpIX 蓄積を促進した。また、これは ABCG2 特異的阻害剤と同様の結果であった。これらの結果より、ゲニステインは ABCG2 阻害剤と同じ作用点であることが予想された。さらに我々は、ABCG2 をほとんど発現していない HEK293T 細胞に ABCG2 発現ベクター導入して ABCG2 安定発現 HEK293T 細胞を作製し、ゲニステインの作用を解析した。その結果、ゲニステインは、HEK293T における PpIX 蓄積を促進しなかったが、ABCG2 安定発現 HEK293T に対しては抑制作用を示した。これらの結果は、ゲニステインが、ABCG2 の PpIX 排出機能を抑制することで、PpIX 蓄積を促進することを示した。

### 2. ゲニステインは長時間処理及び前処理により A549細胞やその他のがん細胞の PpIX 蓄積を強く促進する

ゲニステインと ALA 同時処理が PpIX 蓄積を促進したため、ゲニステインと ALA の長時間の共処理が A549細胞における PpIX 蓄積をさらに促進するか解析した。12時間以上から48時間までの長時間ゲニステイン共処理は、ALA 単独及び ABCG2 特異的阻害剤共処理よりも強い PpIX 蓄積促進作用を示した。

次に ALA 前処理の影響を解析した結果、24時間及び48時間のゲニステイン前処理は、ゲニステインと ALA 同時処理よりも ALA による PpIX 蓄積に対して強い促進作用を示すことが明らかとなった。この作用は、A549以外のヒト肺がん細胞である H1299細胞、神経膠芽腫 T98G、乳がん細胞 MDA-MB231、皮膚黒色腫 MeWo など様々なヒトがん細胞においても確認された。

PpIX は、がん細胞の増殖が早いほど、強く蓄積する傾向にある。エストロゲンは乳がんなどの特定の細胞に対し、増殖促進作用を持つことが報告されている。さらにゲニステインはエストロゲン様活性をもつことから、A549細胞の増殖を促進する可能性が推測され

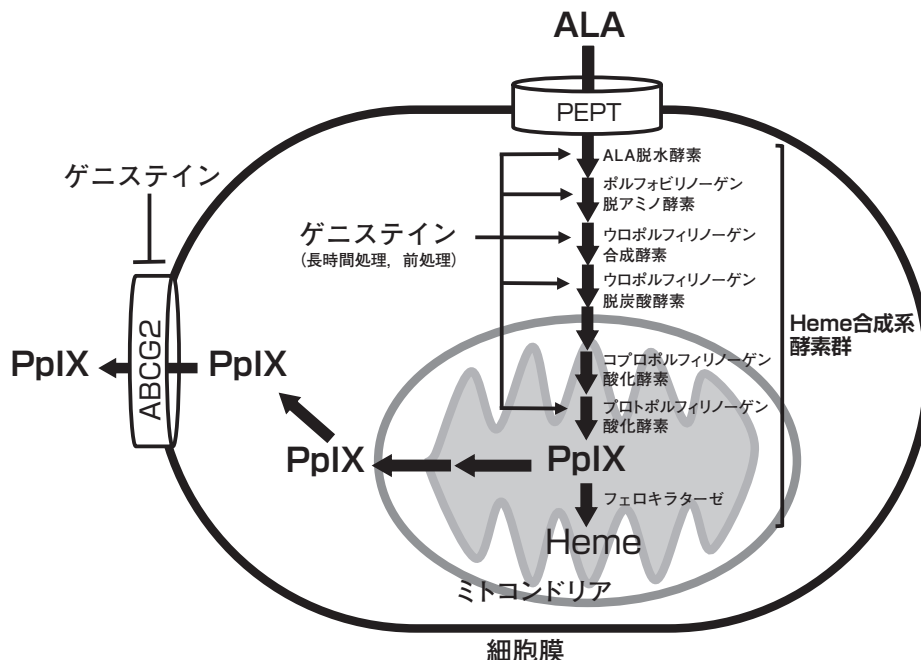


図 フィトエストロゲンによるプロトポルフィリン IX 蓄積促進機構

がん診断マーカーであるプロトポルフィリン IX (PpIX) の合成は、アミノレブリン酸 (ALA) を基質として、Heme 合成系酵素群の一部を介して行われる。本研究により、フィトエストロゲンのゲニステインは、多剤耐性タンパク質 ABCG2 による PpIX の細胞外への排出機能を抑制することで、PpIX の蓄積を促進することが示された。さらに、ゲニステインによる長時間処理及び前処理では、Heme 合成系酵素群の一部の発現を促進することで、PpIX の蓄積を促進することが明らかとなった。

た。そこで、A549細胞の増殖に対する作用を解析した結果、ゲニステインは細胞増殖を抑制することが明らかとなった。

### 3. ゲニステインは tumor xenograft model における PpIX 蓄積を促進する

最後に我々は、ゲニステインが tumor xenograft model においても PpIX 蓄積促進作用を示すかどうか調査した。A549細胞を nude マウスに移植すると2週間で、肉眼で確認出来る腫瘍が形成される。このマウスにゲニステインを3日間投与し、ALA を投与した結果、この腫瘍モデルにおいても、ゲニステインは PpIX 蓄積を促進することが明らかとなった。また、*in vitro* の解析によりゲニステイン前処理は、コプロポルフィリノーゲン酸化酵素とフェロキターゼを除くヘム合成系酵素群の遺伝子発現を促進することが明らかとなった。

#### 研究成果の意義と今後の展開や展望

以上の結果は、A549細胞においてゲニステインが PpIX 蓄積を *in vitro* と *in vivo* の両方で改善することを示した。また、ゲニステインは、ALA と同時処理で ABCG2 の機能的抑制を介して PpIX 蓄積を促進し、ゲニステイン前処理では、これに加え、ヘム合成系の発現促進を伴って PpIX 蓄積を促進していることが明らかとなった。これらの知見は、がん患者の ALA を用

いた光線力学的診断を、フィトエストロゲンが改善することを示唆する。また、エストロゲンなどの光線過敏症の副作用を示す治療薬や化合物のうちの一部は、がん特異的 PpIX 蓄積を促進するかもしれず、ドラッグリポジショニングの観点からも今後の展開が期待される。

#### 文 献

- 1) Amo T, Kawanishi N, Uchida M, Fujita H, Oyanagi E, et al. : Mechanism of cell death by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action and its enhancement by ferrochelatase inhibitors in human histio-cytic lymphoma cell line U937. *Cell Biochem Funct* (2009) 27, 503-515.
- 2) Ogino T, Kobuchi H, Munetomo K, Fujita H, Yamamoto M, et al. : Serum-dependent export of protoporphyrin IX by ATP-binding cassette transporter G2 in T24 cells. *Mol Cell Biochem* (2011) 358, 297-307.
- 3) Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, et al. : Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One* (2012) 7, e50082.
- 4) Imai Y, Tsukahara S, Asada S, Sugimoto Y : Phytoestrogens/flavonoids reverse breast cancer resistance protein/ABCG2-mediated multidrug resistance. *Cancer Res* (2004) 64, 4346-4352.

---

平成29年5月2日受稿  
〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1  
電話：086-235-7081 FAX：086-235-7079  
E-mail：fujita00@md.okayama-u.ac.jp