

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08673

研究課題名(和文) 深紫外線による新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapy for cancer using deep ultraviolet

研究代表者

宮田 一志 (Miyata, Kazushi)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90752759

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：深紫外線照射は、癌細胞株において細胞形態を変化させ、アポトーシスを誘導した。作用機序としてCHK1、TLK1、MRE11が関与しており、TLK1 およびMRE11の抑制により、深紫外線照射によるアポトーシス誘導能が増強した。担癌動物モデルにおいて、深紫外線照射は腫瘍の増殖を抑制した。TLK1阻害剤の投与は、深紫外線照射による抗腫瘍効果を増強させ、腫瘍におけるKi67の発現は低下していた。ブタの胃粘膜に対して、照射により生じた粘膜面の欠損は、1週間後は治癒していた病理学的検査、血液生化学検査において異常を認めなかった。臨床応用のために更なる研究は必要であるが、新規治療法開発の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

深紫外線によるアポトーシスの作用機序に関連するシグナルを明らかにした。またDNA修復遺伝子の抑制により深紫外線の抗腫瘍効果の増強が可能であることを明らかにした。これらは深紫外線による細胞障害作用を癌治療に応用するための重要な知見であり学術的意義が大きい。また本研究により新規治療法開発の可能性が示唆され、深紫外線による治療法が可能になれば、生存率を含めた治療成績の向上が期待され社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Deep UV (DUV) irradiation altered cell morphology and induced apoptosis in cancer cell lines. CHK1, TLK1, and MRE11 were involved in the cellular events, and suppression of TLK1 and MRE11 enhanced apoptosis by DUV irradiation. In xenograft mouse model, DUV treatment suppressed tumor growth. Administration of the TLK1 inhibitor enhanced the antitumor effect of DUV treatment and reduced the expression of Ki67 in the tumor. In DUV exposure to gastric mucosa of pig, defect and erosion were identified. However, healed after 1 week. There are no abnormalities in pathological examination or blood biochemical examination. Further investigation was required for clinical application. However, our results demonstrated efficiency of DUV irradiation in cancer. This study suggests novel therapies using deep UV irradiation for cancer.

研究分野：消化器外科

キーワード：深紫外線LED 細胞障害作用 癌治療

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌に対する様々な治療法の開発は、治療成績の改善だけでなく患者 QOL の改善にも貢献している。癌治療法には化学的作用によるものと物理的作用によるものがある。化学的作用によるものとしてエタノールや無水酢酸などを直接腫瘍に投与するものがあり、物理的作用によるものとして高周波などによる熱凝固で組織変性をおこすもの、内視鏡下による切除、紫外線照射、光感受性物質を病変に取り込ませたのちに、光をあて治療を行う光線療法などがある。

紫外線は可視光線よりも短く、軟 X 線よりも長い波長を持つ 400nm から 10nm の電磁波である。紫外線 LED (UV LED) は 250nm から 400nm の波長をもつ LED であり、さらに波長範囲により 400nm から 350nm の UVA-LED、350nm から 280nm の UVB-LED、280nm から 250nm の UVC-LED の 3 つに分類される。2014 年にノーベル物理学賞を受賞した青色 LED での技術基盤に基づき深紫外線 LED (DUV-LED: Deep UV-LED) は開発された。深紫外線 LED は青色 LED 同様に GaN、InGaN、AlGaN を材料にした窒化物半導体をサファイア基板の上に層状に結晶成長させた LED 構造をしており、UVB-LED と UVC-LED の波長範囲である 250nm から 350nm を有している。

深紫外線 LED はこれらの紫外線より波長の短い光であり細胞障害作用を有している。これは DNA が 260~270nm 付近に紫外線に対する吸収波長ピークを持ち、この波長の紫外線により変異がおき隣接した 2 個のチミンあるいはシトシンが二量体となり、細胞分裂阻害などの機能障害を引き起こすためである。深紫外線 LED による細胞障害作用は癌治療への応用が可能と考えられるが、深紫外線を用いた癌治療法の開発はいまだされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は深紫外線 LED を用いた癌治療法における有効性および副作用の検討を行い、作用機序に関する詳細なメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) ヒト癌細胞株の培養

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1)、ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) を 10%FBS を含む RPMI にて 37°C の 5%CO₂ インキュベータで培養を行なった。またヒト膵癌由来細胞株 (KP4) を 10%FBS を含む DMEM にて 37°C の 5%CO₂ キュベータで培養した。

(2) 深紫外線 LED による深紫外線照射

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1)、ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) を PBS にて洗浄後に、深紫外線 LED を用いて 250 nm から 350 nm の深紫外線照射を行った。未照射、紫外線 A 波 (UVA) 照射を対照群とした。

(3) 細胞死に関する実験

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1)、ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) に対して、深紫外線の照射時間を 0、5、10、30 秒にて行った。その後 37°C の 5%CO₂ キュベータで 24 および 48 時間の培養後に、アポトーシス誘導能について Muse Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。

(4) 細胞形態に関する実験

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1)、ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) に対して、深紫外線を 5 秒照射した後、37°C の 5%CO₂ キュベータで 1、3、6、12、24 時間の培養を行い、各時間での細胞形態の経時的な変化に関して検討した。

(5) 網羅的遺伝子解析

ヒト膵癌由来細胞株に深紫外線を 5 秒照射した後、37°C の 5%CO₂ キュベータで 24 時間の培養を行い、抗体アレイによる網羅的タンパク解析を行った。

(6) タンパク解析

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4) に深紫外線を 5 秒照射した後、37°C の 5%CO₂ キュベータで 24 および 48 時間の培養後の Chk1、TLK1、MRE11 の発現をウェスタンブロッティング法にて検討した。

(7) DNA 修復遺伝子の発現抑制に関する実験

DNA 修復遺伝子 TLK1 を標的にした TLK1 siRNA をヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4) に導入し、TLK1 の発現抑制 (導入後 48 時間) 後、深紫外線を 5 秒照射した後、37°C の 5%CO₂ キュベータで 24 時間の培養し、アポトーシス誘導能について Muse Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4) に対して MRE11 阻害剤を用いて MRE11 の発現抑制 (投与後 24 時間) 後、深紫外線を 5 秒照射した後、37°C の 5%CO₂ キュベータで 24 時間の培養し、アポトーシス誘導能について Muse Annexin V & Dead Cell kit を用いて検討した。

(8) 担癌動物モデルを用いた実験

ヒト膵癌由来細胞株 KLM1 をヌードマウス (BALB/c、8 週) の背部に接種し、皮下発癌モデルを作製する。皮下発癌モデルの腫瘍に対して深紫外線 LED による深紫外線の 15 分間照射の週 1 回照射群、週 2 回照射群、未照射群での経時的な腫瘍体積の変化を観察した。最終治療 1 週間後に腫瘍を切除し、切除標本の病理学的な検討および TUNEL 法によりアポトーシスの検討をした

TLK1 阻害剤の投与後、皮下発癌モデルの腫瘍に対して深紫外線 LED による深紫外線の週 1 回照射群、TLK1 阻害剤投与群、深紫外線の週 1 回照射+TLK1 阻害剤投与群、未照射群での経時的な腫瘍体積の変化を観察した。治療後の腫瘍を切除し、切除標本の病理学的な検討および TUNEL 法によりアポトーシスの検討をする。

(9) ブタを用いた実験

ブタの開腹手術により胃切開を行い、胃内腔粘膜に対して深紫外線 LED の照射を 30 秒、1 分、5 分、10 分の各時間で行ない、照射部位の肉眼的観察を行なった。1 週間の経過観察後、再開腹し胃内腔の照射部位の粘膜面を確認した。胃切除を行い、切除標本による病理学的検討を行った血液生化学検査 (AST, ALT, LD, Plt など) を検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト癌細胞株に対する深紫外線 LED の有効性の検討

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1) ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) おいても未照射、紫外線 A 波 (UVA) 照射では細胞死の誘導を認めなかった。しかし、深紫外線照射では 5 秒の照射から細胞死の誘導を認め、5、10、30 秒と照射時間の延長に比例して細胞死が増強した。

細胞形態においても、未照射、紫外線 A 波 (UVA) 照射においては経時的な細胞形態に変化を認めなかったが、深紫外線照射により 1、3、6、12、24 時間の照射後の時間の延長により経時的に細胞形態の変化が著明となった。

ヒト膵癌由来細胞株 KP4 おける深紫外線照射後の Late Apoptosis は 79.40% であり、未照射、紫外線 A 波 (UVA) 照射において Late Apoptosis は 10.60%、10.55% と比較して、有意に上昇していた。深紫外線照射後の細胞死はアポトーシスと考えられた。

(2) 深紫外線 LED と DNA 修復遺伝子の関連性の検討

ヒト膵癌由来細胞株 (Panc1, KLM1, KP4)、ヒト大腸癌由来細胞株 (DLD1) ヒト胆管癌由来細胞株 (HuCCT1) において、深紫外線照射により CHK1 の発現の亢進をウェスタンブロッティング法にて認めた。また CHK1 のシグナルの 1 つである DNA 修復遺伝子 TLK1 (Tousled-like kinase 1) の発現も深紫外線照射により発現が亢進していた。また siRNA を用いた TLK1 発現抑制により、深紫外線照射のアポトーシス誘導能が増強していた。また TLK1 阻害剤 (THD) を用いた TLK1 の機能阻害においても、深紫外線照射により、細胞形態の変化およびアポトーシス誘導能が増強していた (図 1、2)。

図 1

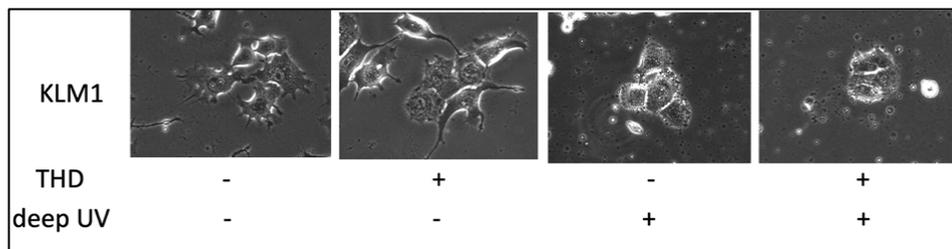
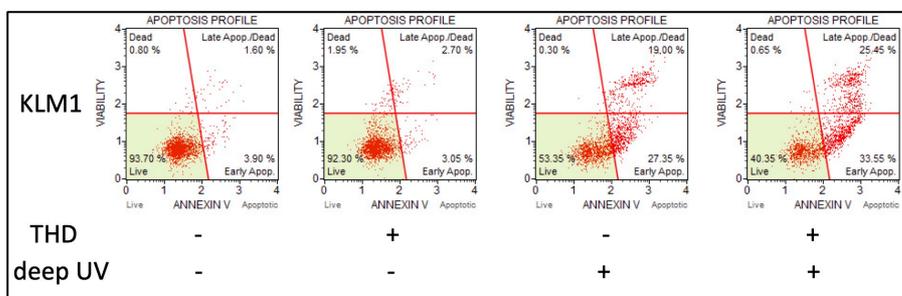


図 2



深紫外線照射の作用機序に関連する遺伝子として MRE11 は、ヒト膵癌由来細胞株への深紫外線照射により発現が亢進している。MRE11 阻害剤を用いた MRE11 発現抑制により、深紫外線照射のアポトーシス誘導能が増強を認めた。

(3) 担癌動物モデルにおける有効性の検討

ヒト膵癌由来細胞株の皮下発癌モデルの腫瘍において、未照射群と比較して週 1 回照射群、週 2 回照射群にて腫瘍の増殖抑制効果を認め、週 2 回照射は週 1 回照射より抗腫瘍効果が増強していた。

皮下発癌モデルの腫瘍において、TLK1 阻害剤の経口投与による TLK1 の発現抑制は深紫外線照射の抗腫瘍効果を増強させた (図 3)。皮下発癌モデルの腫瘍において、Ki67 の発現は低下していたが、アポトーシスについては有意差がなかった。

図 3



(4) 深紫外線 LED による副作用の検討

ブタの胃内腔粘膜に対し 5 分の照射により胃粘膜にびらんが生じ、10 分の照射により粘膜面に欠損が生じた。1 週間後の照射部位の胃粘膜は、照射時間に関わらず粘膜面のびらんと欠損は治癒していた。

病理学的検討により、胃照射部位には核の異型など異常を認めなかった。血液生化学検査（AST, ALT, LD, Plt など）に関して異常を認めなかった。

癌細胞株および担癌動物モデルにおいて、深紫外線照射の抗腫瘍効果を明らかにし、新規治療法開発の可能性が示唆された。またその作用機序として、CHK1、TLK1、MRE11 の関与が明らかになった。明らかな副作用を認めなかったが、少ない動物数、限られた期間の検討であり、照射後長期間の経過確認が不十分であった。臨床応用のためには、適切な照射時間や照度、長期経過などさらなる検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyata Kazushi, Fukaya Masahide, Nagino Masato	4. 巻 6
2. 論文標題 Repair of gastro-tracheobronchial fistula after esophagectomy for esophageal cancer using intercostal muscle and latissimus dorsi muscle flaps: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 172 ~ 172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-020-00936-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asai Soichiro, Fukaya Masahide, Miyata Kazushi, Itatsu Keita, Miyahara Ryoji, Furukawa Kazuhiro, Ebata Tomoki, Nagino Masato	4. 巻 49
2. 論文標題 The impact of cervical lymph node dissection on acid and duodenogastroesophageal reflux after intrathoracic esophagogastrostomy following transthoracic esophagectomy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 1029 ~ 1034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00595-019-01835-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	榑野 正人 (NAGINO Masato) (20237564)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	
研究分担者	江畑 智希 (EBATA Tomoki) (60362258)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	國料 俊男 (KOKURYO Toshio) (60378023)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	山口 淳平 (YAMAGUCHI Junpei) (00566987)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関