

様 式 C - 1 9、F - 1 9 - 1、Z - 1 9 （共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 3 年 6 月 1 0 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15280

研究課題名（和文）活性型Rasタンパク質のGTPを標的とした赤外レーザーによる抗腫瘍療法の開発

研究課題名（英文）Development of the tumor suppression therapy targeting GTP bound form of Ras by the irradiation of infrared laser

研究代表者

松本 耕祐（Matsumoto, Kousuke）

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：30615951

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000 円

研究成果の概要（和文）：生体内の分子振動に一致したレーザー光の照射によって特定の分子を制御することを当初の目標とし、細胞増殖に関連するグアノシン三リン酸のリン酸基を標的としたレーザーの探索を差周波発生式中赤外波長可変ナノ秒レーザーとフーリエ変換赤外分光光度計で行った。特定の波長のレーザー照射で分子の吸収ピークが他の波長群と比べ異質な変化を認めた。照射前後のサンプルをHPLCで分析したが、光化学的作用を示す結果は得られず、熱エネルギーによる分子破壊を示す結果であった。熱エネルギーを抑えた低出力条件の同波長の照射実験や、熱エネルギーが極めて少ない波長領域の細胞への光照射実験を行ったが、明らかな変化を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子特異的吸収ピークの波長に一致する中赤外レーザーの照射による光化学反応の効果については低出力と他の波長での条件検討や、分析方法の変更などの余地はあるが、今回の研究では熱エネルギーによる分子破壊を効率的に行う可能性のみを示す結果となった。細胞増殖を進める標的分子を破壊しながら効率的に腫瘍切除を進めることができる手術デバイスを開発するという観点では、本研究のレーザー探索方法について有用性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The initial goal was to control specific molecules by laser irradiation that matched molecular vibrations in vivo, and the search for lasers targeting phosphates of guanosine triphosphate associated with cell proliferation was carried out with a Difference-frequency generation mild infrared wavelength variable nanosecond laser and Fourier transform infrared spectrometer. Laser irradiation of a specific wavelength showed a different change in the absorption peak of the molecule compared with the other wavelength. The sample before and after irradiation was analyzed with HPLC, but no results showing photochemical action were obtained, and it was a result of showing molecular destruction by thermal energy. We conducted irradiation experiments with the same wavelength under low output conditions with reduced thermal energy, and light irradiation experiments on cells in the wavelength region where thermal energy was extremely low, but no obvious changes were observed.

研究分野：口腔外科

キーワード：レーザー リン酸結合

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1．研究開始当初の背景

口腔癌に対する手術以外の治療法としては放射線療法や化学療法が選択される。しかし、重篤な合併症を生じるため年齢や全身状態を理由に治療を断念する患者も少なくない。また近年分子標的薬や粒子線治療など新規治療法の発展は目覚ましいが、副作用は依然存在し、開発や実用に多大な費用と時間を要するためその恩恵を受けることは容易ではない。次世代の癌制御療法の持つ要件として分子レベルでの抗腫瘍効果をもつことや、局所的に作用により低侵襲で副作用が少ない特性が挙げられる。

波長 3～20 μm の中赤外領域の光は生体内の分子振動と一致する波長がそれぞれ存在する。また紫外・可視光とは異なり DNA を損傷しない領域とされる。よって波長・位相・方向が統一されたレーザー光は、特定の分子振動と同じ振動数（波長）の条件で照射することによって、特定の分子結合を高振動状態に励起し切断することが期待される。

Ras タンパク質など GTP 結合タンパク質はグアノシン三リン酸（GTP）と結合した活性型と、グアノシン二リン酸（GDP）と結合した不活性型の構造を行き来する分子スイッチとして細胞内で機能している。GTP 結合型は細胞増殖を進め口腔癌との関連性について報告もあり、特異的に GTP を制御することができれば、腫瘍制御につながる可能性がある。

2．研究の目的

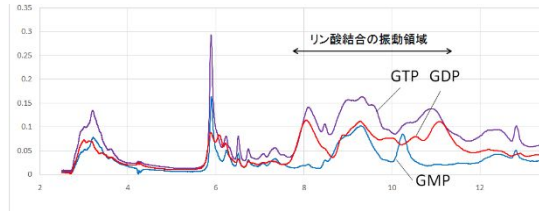
Ras タンパク質と結合する GTP のリン酸結合の分子振動と同じ波長のレーザー光の探索を最終的な目標とするが、本研究ではまずは実験系が容易な GTP 単独を標的とする前実験を行い、選択的に分子切断する可能性のある赤外レーザー光の探索を行った。

3．研究の方法

GTP 水溶液 5 μl をフッ化バリウム（以下 BaF_2 ）板上に滴下し、自然乾燥させることで GTP 薄膜を作成した。レーザー照射により飛散するため、レーザー照射面も BaF_2 板で覆った GTP 薄膜に対し、リン酸結合の振動領域（8～10 μm ）に設定した差周波発生式中赤外波長可変ナノ秒パルスレーザー（以下 DFG レーザー）にて照射実験を行った。照射するレーザーの波長は、フーリエ変換赤外分光光度計（以下 FT-IR）によって測定した GTP 薄膜のリン酸結合に相当する可能性のあるピークを参考とした。レーザー照射実験の条件として、平均パワー密度、照射時間、GTP 薄膜の濃度を変更し実験を行った。レーザー照射後も FT-IR を用いて照射部分の吸収スペクトルを測定した。照射前後で FT-IR のスペクトルに変化のあった条件の GTP 薄膜については、高速液体クロマトグラフィー（以下 HPLC）にて組成分析を行った。熱エネルギーを排除した実験例として 1 μm 以下の波長での照射実験を行うために LED の使用も行った。FTIR での実験では変化を認めないことから、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-3 を用いた細胞増殖能などで評価する光照射実験を行った。

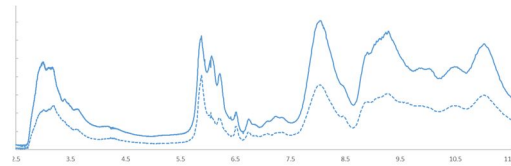
4. 研究成果

1) FT-IR による GTP の吸収スペクトルの測定リン酸基数のみが異なる、GTP (リン酸 3 つ)、GDP (リン酸 2 つ)、GMP (リン酸 1 つ) について、FT-IR による吸収スペクトルを測定した (図 1 : 波長 $6\mu\text{m}$ における吸収ピークに合わせ規格化)。レーザー照射の対象となるリン酸結合 (P-O-P) の振動領域において、GTP では $8\mu\text{m}$ でシャープなピークを、また 9 と $11\mu\text{m}$ においてブロードしたピークを認めており、それらに一致した波長を主とするレーザー照射実験を行った。



[図 1]

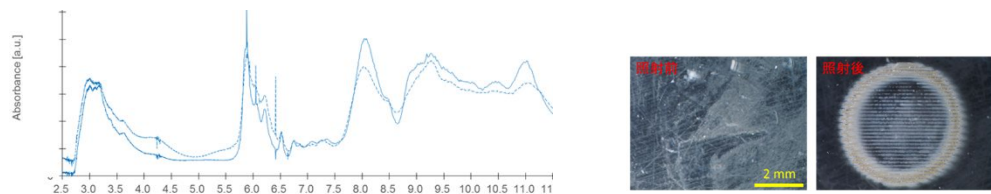
2) GTP 薄膜への DFG レーザーによる照射実験 FT-IR で観察した P-O 領域の吸収ピークを参考にして DFG レーザーで波長やその他条件を設定した。GTP 薄膜に対し、リン酸結合領域の $9\mu\text{m}$ に設定した DFG レーザーによる照射実験では、P-O 結合領域のスペクトルを含めた全体的な縮小を認めたが、形態的にはほぼ変化を認めなかった (図 2 : 波長 $9.28\mu\text{m}$ 、照射時間 10s 、平均パワー密度 $4\text{W}/\text{cm}^2$ 、濃度 5mM)。



[図 2]

一方、 $8\mu\text{m}$ に設定した DFG レーザーによる照射実験では、全体的には大きな変化は示さなかったことに比べ、P-O 結合領域の吸収ピークにおいて鈍化したような顕著な形態変化を認めた。(図 3 : 波長 $8.05\mu\text{m}$ 、照射時間 10s 、平均パワー密度 $5\text{W}/\text{cm}^2$ 、濃度 5mM 、照射前後の結晶写真)

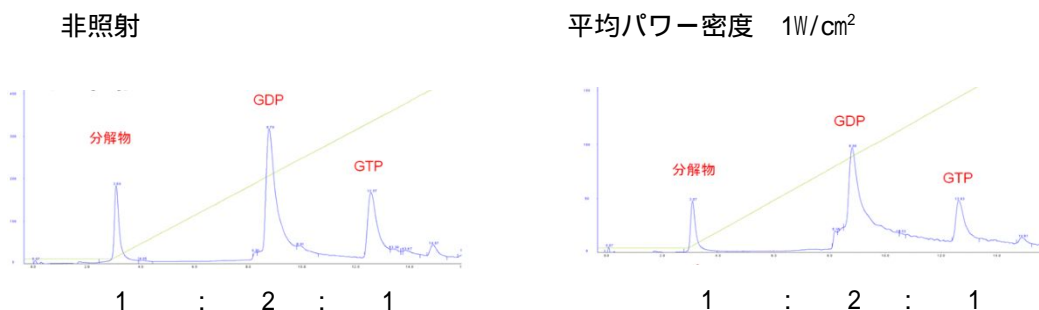
[図 3]



3) レーザー照射実験前後の分析実験

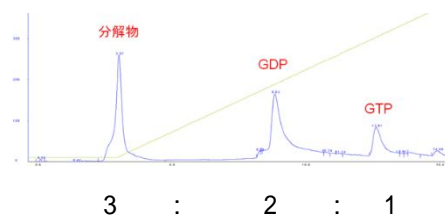
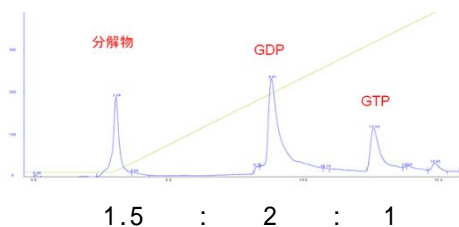
FT-IR においてリン酸領域に顕著な形態変化を認めた $8.05\mu\text{m}$ のレーザー照射後の GTP について、パワー密度に分けて HPLC による分析を行った。(図 4) 組成比率で比較を行ったところ、GDP と GTP の比率 (2:1) に変化はないが、 3W 以上の照射出力増加に伴って、分解物の組成比率が増大する傾向を認め、熱エネルギーによる分子破壊を示す結果となった。

[図 4]



平均パワー密度 3W/cm²

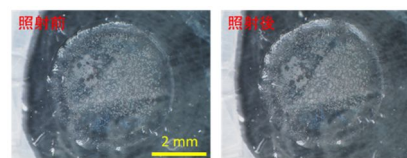
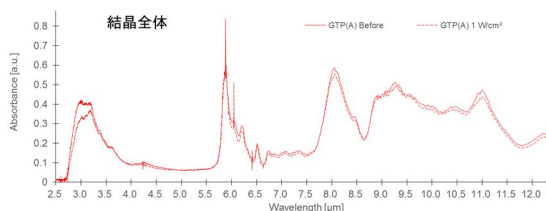
平均パワー密度 5W/cm²



4) 低出力での照射実験とその他波長での細胞への照射実験

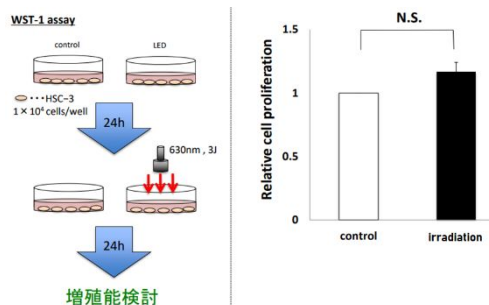
熱エネルギーを可及的に排除した実験を行うために 1W以下の低出力での DFG レーザー照射実験を種々の条件でおこなったが明らかな変化を認めなかった (図 5: 波長 8.05 μm 、照射時間 10 s、平均パワー密度 1W/cm²、濃度 5mM、照射前後の結晶写真)。

[図 5]



熱エネルギーを排除できる LED も使い、細胞への照射実験を行い、細胞増殖について有意な結果は得られなかった (図 6: 赤色 LED 630nm、Pre-Mix WST-1 Proliferation Assay)。

[図 6]



5. 総括

8.05 μm のレーザー照射によって FT-IR の吸収スペクトルと、HPLC による組成の変化を認めたが、光化学的作用を示す結果は得られず、熱エネルギーによる分子破壊を示す結果であった。熱エネルギーを抑えた低出力条件の同波長の照射実験や、細胞への光照射実験も行ったが、明らかな変化を認めなかった。

分子特異的吸収ピークの波長に一致する中赤外レーザーの照射による光化学反応の効果については、低出力や他の波長での条件検討や、分析方法の変更などの余地はあるが、今回の研究では熱エネルギーによる分子破壊を効率的に行う可能性のみを示す結果となった。細胞増殖を進める標的分子を破壊しながら効率的に腫瘍切除を進めることができる手術デバイスを開発するという視点では、本研究のレーザー探索方法の有用性はあると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Matsuo K, Suzuki H, Yatagai N, Enomoto Y, Kitayama M, Shigeoka M, Kimoto A, Matsumoto K, Komori T.	4. 巻 64(6)
2. 論文標題 Red LED light is influenced by IL-6 to promote the migration ability of oral squamous cell carcinoma cell line.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Kobe J. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 E210-E216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Akashi M, Matsumoto K, Takeda D, Yamashita J, Yatagai N, Hashikawa K, Komori T.	4. 巻 7-65
2. 論文標題 Dental rehabilitation for free fibula flap-reconstructed mandible with scar contracture: A technical note.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dent. J.	6. 最初と最後の頁 E65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/dj7030065	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 Matsumoto K, Matsuo K, Yatagai N, Enomoto Y, Shigeoka M, Hasegawa T, Suzuki H, Komori T.	4. 巻 37(3)
2. 論文標題 Clinical evaluation of CO2 laser vaporization therapy for oral lichen planus: a single-arm intervention study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser surgery.	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/photob.2018.4559	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 有本智美, 長谷川巧実, 松本耕祐, 重岡学, 南川勉, 古森孝英.	4. 巻 66(5)
2. 論文標題 下顎歯肉に発生した乳頭状扁平上皮癌の1例	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会誌	6. 最初と最後の頁 219-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Matsumoto K, Tanakura M, Mitani I, Kimoto A, Akashi M.	4. 巻 12:e19
2. 論文標題 Removal of large Wharton's duct salivary stones using a CO2 laser: A report of two cases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of lasers in medical sciences	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34172/jlms.2021.19	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本耕祐, 棚倉万紀子, 中西洋介, 古森孝英.
2. 発表標題 上下顎歯肉に多発したメトトレキサート関連リンパ増殖疾患の1例.
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会・第31回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 棚倉万紀子, 松本耕祐, 中西洋介, 古森孝英.
2. 発表標題 口腔内多発血腫を契機にI T P と診断された1例.
3. 学会等名 第28回日本口腔内科学会・第31回日本口腔診断学会合同学術大会
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------