

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861438

研究課題名(和文)膀胱癌に対する分子標的光線力学療法の開発

研究課題名(英文)Molecular target photodynamic therapy against bladder cancer

研究代表者

池上 要介(Ikegami, Yosuke)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：40381868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、以前新規光感受性物質であるフラーレンを併用した、膀胱癌に対する長波長紫外線による光線力学療法について基礎研究を行い、有効性を認めた。今回の研究では光感受性物質を使用せず、長波長紫外線単独照射の有効性について研究を行った。膀胱癌細胞株3種類に長波長紫外線を照射すると、腫瘍特異的に細胞死およびアポトーシスを誘導することを認めた。in vitroの実験では高い治療効果を認めたことから、ヌードマウス皮下移植モデルを用い研究を行った。in vivoにおいても長波長紫外線の治療効果はみとめたが、この実験系では移植効率が低いため、さらなるin vivo実験系での研究が必要である。

研究成果の概要(英文)：Photodynamic therapy(PDT) is an anticancer approach that utilizes a light-absorbing molecule and visible light irradiation. Previously, we reported that ultraviolet A-1(UVA-1) irradiation with Glycoconjugated fullerene (C60-glu) led to the induction of apoptosis in malignant cells but not in normal cells. In this study, we investigated the effects of a novel PDT with only UVA-1 irradiation against bladder cancer cells. Three human bladder cancer cell lines (T24, 5637 and RT4) were used in this study. We analyzed the photocytotoxic effects using the WST-1 assay or flow cytometric analysis. To continue this study in vivo, we implanted tumor cells in BALB/c-nu/nu male mice, and analyzed tumor growth in mice that received or did not receive PDT. We observed a cytotoxic effect and apoptosis induction in all bladder cancer cell lines treated with simple UVA-1 irradiation. We observed a significant photocytotoxic effect and apoptosis. In vivo, PDT suppressed tumor growth.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌

## 1. 研究開始当初の背景

光線力学療法は photodynamic therapy (PDT) といわれ、肺癌や子宮頸癌治療に臨床応用されている。膀胱癌においても、光感受性物質である Photofrin を投与後にレーザー光を膀胱内照射したトライアルや、5-アミノレブリン酸を投与し protoporphyrin を産生させる方法など臨床試験も行われている。しかし光線による組織障害や、光感受性物質投与に伴う太陽光に対する皮膚障害、または薬物による副作用など多くの問題がある。これらのことから PDT の実現と普及には、正常組織への障害がなく、腫瘍特異性の高い治療法の開発が期待されている。

## 2. 研究の目的

筋層非浸潤性膀胱癌の治療では、BCG 膀胱内注入療法が高い効果を挙げている。しかし、治療に伴う副作用も多い。BCG 膀胱内注入療法にかわる新たな治療法を開発すべく、私たちはこれまで、新規光感受性物質と紫外線を併用した膀胱内光線力学療法について研究し、高い治療効果を認める事を発見した。しかし、光感受性物質の人体への安全性は確立していない。ただしこの研究から、長波長紫外線(UVA-1)の単独照射は、正常組織への細胞障害が少なく、癌細胞特異的にアポトーシスを誘導することを見出した。しかし、その作用機序は不明である。本研究で私たちは、UVA-1 照射によるアポトーシス誘導機序を解明することで、中心となる分子を同定し、分子標的による新しい膀胱内光線力学療法の開発を目的にする。

## 3. 研究の方法

(1) UVA-1 照射による膀胱癌培養細胞を用いた抗腫瘍効果の検討

### フローサイトメトリーによるアポトーシス誘導能の解析

膀胱癌細胞株である T24, 5637, RT4 の3種類を 37 °C 10%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養する。2~3 回継代し細胞の分裂・増殖の安定したところで、6cm dish に細胞を撒き一晚培養し、dish 上に 70~80% の割合で細胞がいる状態にコントロールする。次に細胞培養液を抜き、リン酸緩衝液にて 2~3 回洗浄後、紫外線を UVA 10, 20, 30, 60, 120J/cm<sup>2</sup>、UVB 10, 20, 30, 60, 120mJ/cm<sup>2</sup> を各細胞へ照射し、24 時間培養液を加え 7 °C 10%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養する。24 時間後培養液を抜き、トリプシン処理し細胞を回収する。回収後細胞を FITC/PI にて染色し、フローサイトメトリー (FACScan) にて解析する。コントロール (紫外線照射していないもの) と照射したものと、アポトーシスが誘導されている細胞の割合を比較検討した。現在予備実験の段階ではあるが、膀胱癌細胞株 T24 に対し UVA 120J/cm<sup>2</sup>、UVB 120J/cm<sup>2</sup> の照射にて 24 時間後 10~20% のアポトーシス誘導率の結果を得ている。また、24 時間後のアポトーシス誘導効率にてデータがそろい次第、時間経過を 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 時間とふって各細胞株について FACS 解析し、アポトーシスが誘導され始める時間を検討した。

### 紫外線照射後の増殖能の検討

上記膀胱癌細胞株 3 種類を培養し、6cm dish に  $2 \times 10^4$  個細胞を撒き (最適個数であることは予備実験にて確認済み) 1 晩 37 °C 10%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養する。実験より得られたデータをもとに、少ない紫外線線量を決定し各細胞へ照射する。コントロール細胞含め培養液交換後、再度 37 °C 10%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養。照射前、照射後 1, 2, 4, 7 日に dish 上の細胞数をセルカウンター

を使用し計測する。結果は対数関数を使用して増殖曲線を作成し、紫外線照射による各細胞の増殖能変化につき検討した。

(2) UVA-1 照射後の細胞内シグナル伝達機構の解析

紫外線照射後の細胞周期関連タンパクについてウエスタンブロットによる、チェックポイント機構についての検討

膀胱癌細胞株 3 種類を 10cm dish に撒いた後、1 晩 37 10%CO<sub>2</sub> インキュベーターにて培養し、紫外線を UVA 10,20,30J/cm<sup>2</sup>、UVB 10,20,30mJ/cm<sup>2</sup> と線量をふり、各 dish へ照射する。照射後培養液を加え 1 時間 37 10%CO<sub>2</sub> インキュベーター内にて培養し細胞を回収し、ホモジナイズ後 BSA にてタンパク定量を行い、タンパク量をそろえ、サンプル処理する。サンプルを泳動し、セミドライ法にてタンパクをメンブレンに転写し、次の各種抗体にてウエスタンブロットを行う。1)Phospho-Ser1981 ATM、以下すべて Cell signaling 2) Chk2, 3) Phospho-Chk2 (Thr68), 4)Chk1, 5) Phospho-Chk1 (Ser345), 6) Phospho-Chk1 (Ser317),7)ATR。

(3) マウス皮下移植モデルの作製および紫外線照射の in vivo における効果の検討

T24 膀胱癌細胞株を C3H/He マウスの背部へ皮下移植し、膀胱癌皮下移植モデルマウスを作製した。腫瘍の大きさが 1cm に達した段階にて、紫外線を照射した。毎日腫瘍計を測定可能 2 方向にて計測し、腫瘍縮小効果を検討した。

(4) アポトーシス関連タンパクに関する研究

UVA-1 照射 24 時間後にサンプルを回収

し、ホモジナイズ後 BSA にてタンパク定量を行いタンパク量をそろえ、サンプル処理した。ただしチェックポイントタンパクは各細胞により元々の発現量が異なるため(癌になるほど変異しているものあるし、正常に近いものではもともとほとんど発現していないものもある) 各細胞間で総タンパク量をそろえてデータがとれない場合はそれぞれの細胞にてウエスタンブロットでバンドが見える条件にてサンプルを処理する場合もある。サンプルを泳動し、セミドライ法にてタンパクをメンブレンに転写し、次の各種抗体 (PARP,cleaved,caspase3,8,9)にてウエスタンブロットを行った。

4. 研究成果

(1) UVA-1 照射で、著明な殺細胞効果を認められた。UVA-1 照射によりアポトーシスが誘導された。

(2) UVA-1 照射により、Chk1 のセリン 345 のリン酸化は起こらないことから、通常実験で使用される UV とは違う経路でのアポトーシス誘導が示唆された。

(3) 膀胱癌細胞の皮下移植モデルでの移植効率および生着後の増殖力が非常に低く、PDT の効果判定および病理判定には実験系が不向きであることが判明した。

(4) 断片化した PARP を検出したことから PDT によるアポトーシスがタンパクでも確認することができた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計1件)

1. 池上 要介、河合 憲康、小林 大地、

内木拓、山田 健司、安藤 亮介、永田  
大介、戸澤 啓一、郡 健二郎：糖鎖連  
結フラールを併用した長波長紫外線  
(UVA-1)による膀胱癌治療に向けての基  
礎研究。第 102 回日本泌尿器科総会、  
2014.4.24-27、神戸国際会議場 他（兵  
庫県神戸市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

池上 要介 (IKEGAMI Yosuke)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究  
員

研究者番号：40381868

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし