

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861938

研究課題名(和文) 活性型Rasタンパク質のGTPを標的とした中赤外レーザーによる腫瘍制御法の開発

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

研究代表者

松本 耕祐 (Matsumoto, Kousuke)

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：30615951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の各種分子結合はそれぞれ赤外領域の光に一致する分子振動をもつ。特定の分子振動と同じレーザーを照射し効率よく標的結合にエネルギーを吸収させることで選択的分子切断が可能となればその意義は大きい。本研究では細胞内でリン酸化によって細胞増殖を促進するグアノシン三リン酸(GTP)を標的とし、GTPのリン酸基を選択的に切断し物性変化させるレーザー光の探索を行った。GTP薄膜に差周波発生式中赤外波長可変ナノ秒パルスレーザーで設定した様々な振動数のレーザーを照射しフーリエ変換赤外分光光度計にてスペクトルの変化を観察し、組成変化を起こす可能性があるレーザー光を認めたが、現在検討の途中である。

研究成果の概要(英文)：Intravital molecular bonds have the matched infrared light frequencies respectively. It is significant that a mild-infrared laser which has the specific wavelength absorbed by the vibration of the target molecule achieves the cleavage for selective molecular bond. In this study, the phosphate bond of guanosine triphosphate (GTP) which relates the cell proliferation is the target molecule, and the purpose is identify the laser condition which achieves the change of the substance of GTP. Nanosecond pulsed laser by difference-frequency generation laser was used in laser irradiation experiments and the absorption spectra of the pre and post irradiated sample of GTP were observed using a Fourier transform infrared spectrometer. It is possible that the specific condition of mild-infrared laser identified in this study can achieve the compositional change of the molecule.

研究分野：レーザー

キーワード：レーザー 分子振動

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高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、局所的に作用することによって低侵襲で副作用が少ないことなどが挙げられる。

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 を損傷しないとされる。以上から波長・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。しかし上記アイデアについてはこれまで医学分野の研究で成功例はない。

GTP 結合タンパク質(以下 G タンパク質)の一つである Ras 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の報告がある。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的とするが、本研究ではまずは実験系が容易な GTP 単独を標的とした基礎実験を行い、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目的とした。

3. 研究の方法

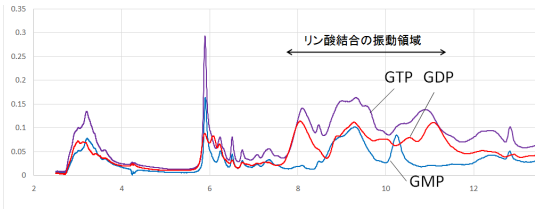
GTP 水溶液 5 μl をフッ化バリウム(以下 BaF₂) 板上に滴下し、自然乾燥させることで GTP 薄膜を作成した。BaF₂ 板で挟んだ GTP 薄膜に対し、リン酸結合の振動領域(8~10 μm)に設定した差周波発生式中赤外波長可変ナノ秒パルスレーザー(以下 DFG レーザー)にて照射実験を行った。照射するレーザーの波長は、フーリエ変換赤外分光光度計(以下 FT-IR)によって測定した GTP 薄膜のリン酸結合に相当する可能性のあるピークを参考に選択した。レーザー照射実験のその他条件として、平均パワー密度、照射時間、GTP 薄膜の濃度についても検討した。レーザー照射後も FT-IR を用いて照射部分に対し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。

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 μm 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 P-0 の振動領域において、GTP では 8 μm でシャープなピークを、また 9 と 11 μm において

ブロードしたピークを認めており、それらに一一致した波長のレーザー照射実験を計画した。

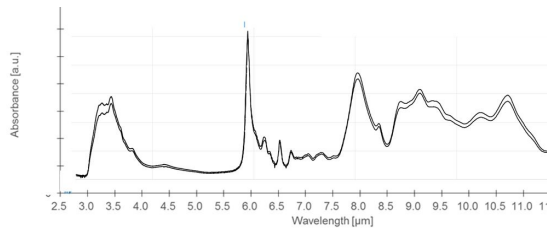
(図1)



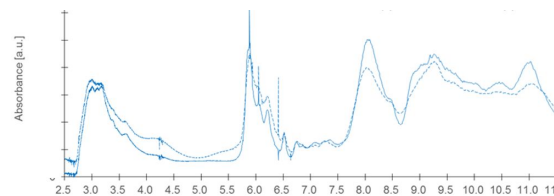
2) GTP 薄膜への DFG レーザーによる照射実験
FT-IR で観察した P-O 領域の吸収ピークを参考にして DFG レーザーで波長やその他条件設定を行った。

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 (図 2: 波長 $9.28\mu\text{m}$ 、照射時間 20 s、平均パワー密度 $3\text{w}/\text{cm}^2$ 、濃度 5mM) では、P-O 結合領域のスペクトルにわずかな縮小を認めたが、形態的にはほぼ変化を認めなかった。一方、 $8\mu\text{m}$ に設定した照射実験では P-O 結合領域の吸収ピークについて鈍化を認めた。(図 3: 波長 $8.05\mu\text{m}$ 、照射時間 10 s、平均パワー密度 $5\text{w}/\text{cm}^2$ 、濃度 5mM)

(図2)



(図3)



3) レーザー照射実験前後の分析実験

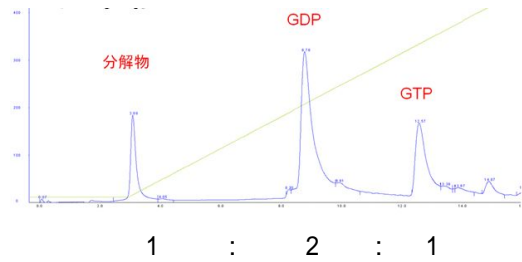
FT-IR において変化を認めた $8.05\mu\text{m}$ のレー

ザー照射後の GTP について、パワー密度毎に HPLC によって分析した。(図4)

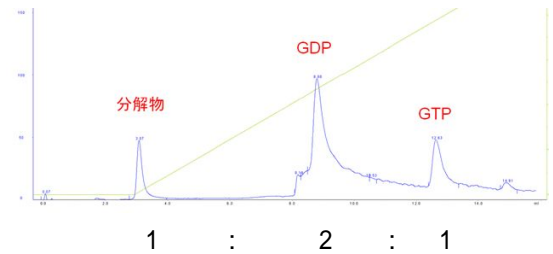
組成比率で比較を行ったところ、GDP と GTP の比率 (2:1) に変化はないが、3 W 以上の照射出力増加に伴って、分解物の組成比率が増大する傾向を認めた。

(図4)

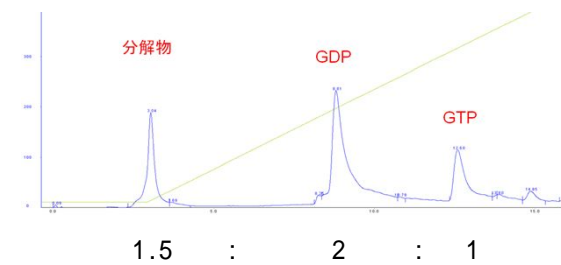
非照射



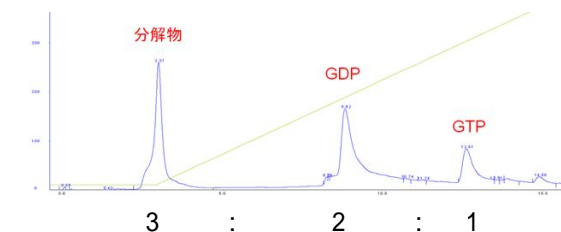
平均パワー密度 $1\text{W}/\text{cm}^2$



平均パワー密度 $3\text{W}/\text{cm}^2$



平均パワー密度 $5\text{W}/\text{cm}^2$



4) 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、この結果だけでは P-O 結合を選択的に切断したかは不明である。

今後は分解物を分集し、NMR や質量分析での解析を検討している。

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 4 件)

松本耕祐、鈴木泰明、古森孝英(11 名、1 番目).Clinical investigation of carbon dioxide laser treatment for lingual leukoplakia. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology. 査読有.27, 493-497.2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2015.01.001>

松本耕祐、古森孝英(8 名、1 番目)、口腔扁平苔癬に対する炭酸ガスレーザー蒸散療法の臨床評価に関する前向き研究、日本レーザー歯学会誌、査読有、Vol.26、No.3、pp124-129、2015、<http://doi.org/10.5984/jjpnsoclaserdent.26.124>

浅井知子、鈴木泰明、松本耕祐、古森孝英(7 名、4 番目)The Long-term effects of red light-emitting diode irradiation on the proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 Cells. Kobe Journal of Medical Science. 査読有、60(1)、12-18. 2014、DOI:

10.1016/j.ijom.2015.08.340

松本耕祐、古森孝英(6 名、1 番目) Clinical investigation of vascular malformations of the oral region treated by multiple photocoagulation with an Nd:YAG laser、Oral Science in Japan 2015. 査読無

[学会発表](計 3 件)

小野真嵩、松本耕祐、古森孝英(9 名、2 番目) Nd:YAG レーザー光凝固反復療法を行った口腔領域血管奇形 5 症例の臨床的検討、第 60 回口腔外科学会総会、2015 年 10 月 17 日、名古屋国際会議場(愛知県)

松本耕祐、石井克典、粟津邦男、古森孝英(6 名 1 番目)中赤外領域レーザーによるリン酸結合切断をメカニズムとした新規分子標的治療の開発、第 60 回日本口腔外科学会総会、2015 年 10 月 16 日、名古屋国際会議場(愛知県)

小野真嵩、松本耕祐、古森孝英(9 名、2 番目)口腔扁平苔癬に対する炭酸ガスレーザー蒸散療法の臨床評価に関する前向き研究、第 27 回日本レーザー歯学会学術大会、2015 年 6 月 6 日、北海道自治労会館(北海道)

[図書](計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6．研究組織

(1)研究代表者

松本耕祐 (Matsumoto Kousuke)

神戸大学・大学院医学研究科外科系講座口腔

外科学分野・特定助教

研究者番号：30615951