

平成 21 年 4 月 27 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791532
 研究課題名（和文） レザフィリンを使用した光化学治療とテガフル療法の併用によるアポトーシス誘導効果
 研究課題名（英文） Apoptotic effect combined Photodynamic therapy and tegafur therapy on carcinoma.
 研究代表者 野中美保子（Nonaka Mihoko）
 所属 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号 40380985

研究成果の概要：

光化学治療（Photodynamic Therapy: PDT）は、腫瘍選択性を有する光感受性物質を静注し、病変部にレーザー照射を行うことで、腫瘍壊死を引き起こす癌治療法である。このPDTが、癌細胞にアポトーシスを誘導しやすいことは以前より報告されている。癌細胞に対するアポトーシス誘導は、ネクローシス誘導に比べて、刺激後早く細胞死が訪れるだけでなく、炎症症状が出にくいために、有利な治療法と言える。現在、世界的にレザフィリンを使用したPDTが注目され、国内でも臨床試験が行われ著効率約80%の結果が報告されている。ところが、レザフィリンPDTとテガフル化学治療の併用によってどのように殺細胞効果が変化するのか、また誘導されたアポトーシスがどのシグナル経路に影響するのかについては未だ報告されていない。

私は、数種類の培養癌細胞において、PDTとテガフル療法を併用し、殺細胞効果とアポトーシス誘導効果について、*vitro*と*vivo*において相乗効果を確認した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	480,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：光化学治療 レザフィリン アポトーシス テガフル

1. 研究開始当初の背景

光化学治療 (Photodynamic Therapy: PDT) は、腫瘍選択性を有する光感受性物質を静注し、病変部にレーザー照射を行うことで、腫瘍壊死を引き起こす癌治療法である。利点は非観血的治療法であること、広範囲に及ぶ病巣に有効であること、副作用が少ないことで、世界的に注目されている治療法である。我が国では、1994年に光感受性物質フォトフリン (日本ワイズレダリー) とエキシマ・ダイ・レーザーを使用したPDTの、肺癌、食道癌、胃癌、子宮頸部癌に対する使用認可が厚生省より得られ、1996年より保険採用となっている。

世界的にPDTの研究としては、光感受性物質、レーザー、そしてその作用機序の3つの焦点が当てられている。光感受性物質には腫瘍選択性があり、また速やかに健全な組織から排泄されることが望ましい。現在、世界的に使用されている光感受性物質はフォトフリンであるが、ATX-S10(光・ケミカル研究所)やレザフィリン(明治製菓)などの新薬も開発されている。これらは従来品に比べ、皮膚への薬剤残存が少なく、遮光期間を短くすることができ、遮光レベルも緩和される。また、これらの活性化に用いるレーザーも飛躍的な発展を遂げており、設置・移動・保管に利便性の高いものになってきている。

このPDTが、癌細胞にアポトーシスを誘導しやすいことは以前より報告されている。癌細胞に対するアポトーシス誘導は、ネクローシス誘導に比べて、刺激後早く細胞死が訪れるだけでなく、炎症症状が出にくいために、有利な治療法と言える。そのため、世界的にPDTとアポトーシスの関係について研究が行われている。現在、PDTによるアポトーシスのcascadeはチトクローム経路とFas/Fas Ligand経路と報告されている。これは光感受性

物質の集積部位がどこであるかによって変化するものが多い。いずれにせよ、このCascadeを副作用が少なく速やかに誘導するために研究が進められている。また、さらにより良い癌治療効果を得るために、PDTと他の治療方法との併用についても多くの研究が行われている。最も多い併用療法は抗癌剤との併用であるが、他にも免疫賦活剤や温熱療法などとの併用も研究が行われている。

現在、世界的にレザフィリンを使用したPDTが注目され、国内でも臨床試験が行われ著効率約80%の結果が報告されている。ところが、レザフィリンPDTとテガフルール化学治療の併用によってどのように殺細胞効果が変化するのか、また誘導されたアポトーシスがどのシグナル経路に影響するのかについては未だ報告されていない。私は本研究でこれらを解明することによって、PDTのさらなる発展に貢献できるものと考えている。

2. 研究の目的

現在、薬剤は飛躍的に発展を遂げており、抗癌剤はもとより光感受性物質も例外ではない。特に、抗癌剤ではTS-1(テガフルール)が広く使われるようになってきており、多くの医療機関で好成績が得られている。私はこのテガフルールを使った化学療法と新しい光感受性物質であるレザフィリンを利用したPDTを併用した場合、劇的な殺癌細胞効果が得られると期待している。そこで、これらの併用について、殺細胞効果及びアポトーシス誘導効果について研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1. 培養した数種類の癌細胞においてレザフィリン PDT を行い、その生存率、及びアポトーシス誘導率を検討する。(トリパンブルー染色法、MTT 法、フローサイトメトリー法、ヘキスト染色法、アガロースゲル電気泳動法)
2. 数種類の癌細胞において化学療法(テガフル)を行い、生存率及びアポトーシス誘導率を検討する。(トリパンブルー染色法、MTT 法、フローサイトメトリー法、ヘキスト染色法、アガロースゲル電気泳動法)
3. 両者を併用して生存率、アポトーシス誘導率を検討する。(トリパンブルー染色法、MTT 法、フローサイトメトリー法、ヘキスト染色法、アガロースゲル電気泳動法)
4. マウスにレザフィリン静注後 PDT を行い癌細胞の生存率、アポトーシス誘導率を検討する。(腫瘍部位を採取後、HE 染色法、TUNNEL 法を行う)
5. マウスにテガフルを静注し腫瘍部位を採取後、HE 法及び TUNNEL 法を行い腫瘍壊死、アポトーシス誘導率を測定(腫瘍部位を採取後、HE 染色法、TUNNEL 法を行う)
- 6.1 と 2 の併用において殺細胞効果、アポトーシス誘導に相乗効果があるか検討(腫瘍部位を採取後、HE 染色法、TUNNEL 法を行う)
- 7 アポトーシス経路中の caspase の活性化を測定(蛍光物質法、Western blot 法)

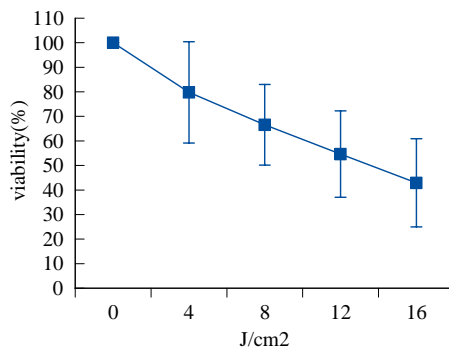
8. アポトーシス誘導因子で Bax、アポトーシス制御因子 Bcl-2 の活性化を検討 (Western blot法)

4. 研究成果

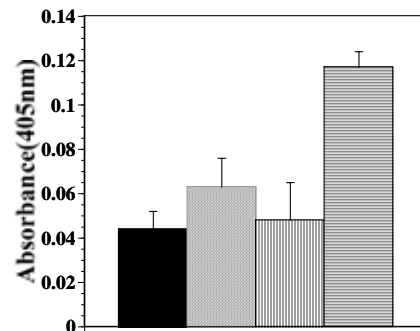
PDT とテガフル療法の併用において、*vivo* では相乗効果が著明に現れたが、*vitro* においては相加効果は見られたものの、相乗効果は認められなかった。これは、テガフルが肝臓で分解された後効果を発揮することと関連していると考えられる。

これを踏まえ、抗癌剤療法について検討し、使用する抗癌剤を抗腫瘍薬オキサリプラチンに変更した。結果を以下に示す。

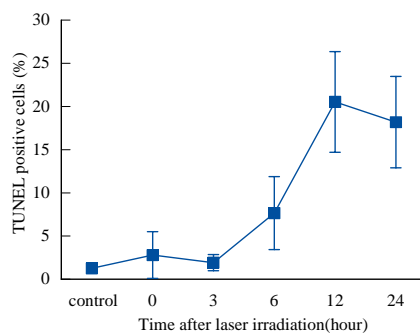
・ PDT の殺細胞効果



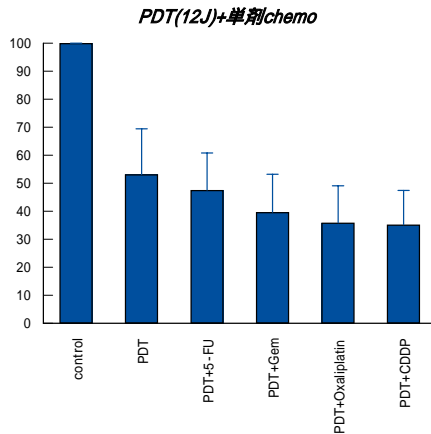
・ Caspase3 activity



・ Tunnel stain



・ 各抗腫瘍剤との併用効果



結果のまとめ

- 胆道癌細胞株 (NOZ) へのフォトフリン PDT と各種抗癌剤との相乗効果を検討した。
- 単剤では5-FUのみ相乗効果を認めなかったものの、CDDP, Oxaliplatin, Gemcitabine は相乗効果を認めた。
- 2剤併用のPDTではGem+Oxaが有意に他剤よりも相乗効果を得る事ができた

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 0件)

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

野中美保子 (Nonaka Mihoko)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：40380985

(2)研究分担者

(3)連携研究者