

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24015

研究課題名(和文)大腸癌に対する青色LEDの抗腫瘍効果と光受容体の関与についての研究

研究課題名(英文) Tumor-suppressive effect of blue light-emitting diodes on colon cancer cells via Opsin 3

研究代表者

武原 悠花子 (TAKEHARA, Yukako)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：90846122

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)：近年、種々の腫瘍細胞に対して青色発光ダイオード(LED)光が抗腫瘍効果を持つことが報告され、研究代表者もこれまでに、青色LEDは光受容体opsin3(Opn3)を介しオートファジーを誘導することで大腸癌細胞の増殖抑制効果を示すことを報告してきた。本研究では、青色LED照射の腫瘍微小環境に対する影響についても検討を行い、青色LED光は大腸癌細胞に対する直接的な効果だけでなく癌関連線維芽細胞に対しても抑制効果を発揮し、さらに腫瘍免疫関連因子であるPD-L1を介して腫瘍抑制に働きうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸・直腸癌は本邦における部位別がん罹患数・死亡数において上位に位置しており、その罹患者は増加の一途をたどっているが、下部直腸癌の外科的治療では肛門温存・肛門機能温存が不可能な場合も多々あり、新たな低侵襲治療の開発は喫緊の課題である。本研究により腫瘍のみならず腫瘍微小環境をターゲットとした青色LEDによる大腸癌治療の有用性が示唆され、新たな低侵襲治療法として非常に大きな社会的意義を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In recent years, it has been reported that blue light emitting diode (LED) light has an antitumor effect on various tumor cells, and I have also reported that blue LED induces autophagy via the photoreceptor opsin3 (Opn3). In this study, we investigated the effect of blue LED irradiation on the tumor microenvironment, and blue LED light exerted not only a direct effect on colon cancer cells but also an inhibitory effect on cancer-related fibroblasts. It was suggested that blue light may suppress tumor microenvironment including tumor immunity.

研究分野：癌研究

キーワード：青色LED 光受容体 大腸癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の学術的背景

LEDによる特定の波長の光照射は、生体に種々の影響を及ぼすことが知られているが、中村修二らによる青色発光ダイオードの発明により、単一波長の青色光が生体に及ぼす影響を研究することが可能となった。これまでに、青色LED光は特定の細胞種に対し殺細胞効果を持ち、殺虫効果や殺菌効果があることが明らかにされている。近年、黒色腫やリンパ腫などの腫瘍細胞株に対しても青色LED光が抗腫瘍効果を持つことが報告され、可視光線によるがん治療の可能性が示唆されている。青色LEDによる細胞増殖抑制や細胞死の機序については最終的にアポトーシスやオートファジー、cell cycle 停止などが起こるとされているが、細胞種によって異なる報告がなされている。研究代表者も徳島大学工学部との連携によりLED装置を作成し、青色LED光(465nm)が、大腸癌細胞株に対し10分間複数回照射ではアポトーシス誘導により増殖抑制効果を、30分単回照射ではオートファジー誘導により増殖抑制効果を示すことを報告した(T. Yoshimoto et al. *Annals of Gastroenterological Surgery*, 2018)。膀胱癌細胞株においては、青色LED光の複数回照射により細胞周期G2/M期細胞が減少し、cell cycle regulationに必要なcyclin D1が減少していた。このように青色LED光は癌に対して細胞増殖抑制効果を示すが、その作用機序は癌種によって、また照射方法によって異なることが示唆された。しかしどのようなメカニズムによりそれらのシグナルが開始され、なぜ異なる機序によって細胞死がもたらされるのかは依然として不明である。

(2) 本研究の目的および学術的独自性と創造性

研究代表者は青色LEDの抗腫瘍効果について光受容体が関与しているという仮説の下、ヒト体細胞に広く発現しているGi/o Gタンパク共役型光受容体オプシン3(OPN3)に着目した。ヒトを含む動物の網膜に発現している光受容体としてロドプシンが良く知られているが、近年このロドプシンファミリータンパクが網膜のみならず視覚と関係のない臓器の細胞にも広く発現していることが発見され、Non-visual opsinと呼ばれている。その中で、OPN3に関してはヒトの脳、気道上皮、肝臓、腎臓、胎盤その他全く光と関係のないと思われる臓器にも広く発現していることが発見された。その役割は不明であるが、青色光照射によって複合体を形成しているGi/oタンパクが活性化され、潜在的な光受容体として働きうることが明らかとなっている。これらのことから、青色LEDが癌細胞に作用する際にも、このOpn3が光受容体として働きGタンパクを介してアポトーシスの誘導やcell cycleの抑制などを引き起こし、結果として抗腫瘍効果を発揮すると着想した。

2. 研究の目的

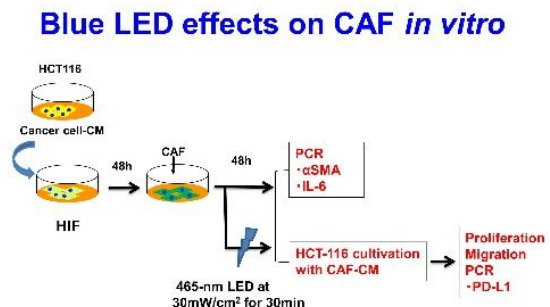
本研究は、光受容体OPN3に着目し、in vitro研究による青色LED光の抗腫瘍効果の作用機序解明・制御の可能性をさらに追求するとともに、in vivo研究への移行・臨床検体を用いた検討を追加し、さらなる臨床応用への可能性を模索することを目的とする。大腸癌は本邦における部位別がん罹患数・死亡数においてともに上位に位置しており、OPN3をターゲットとした青色LEDによる大腸癌治療の有用性が明らかとなれば、新たな低侵襲治療法として非常に大きな社会的意義を持つと考えられる。

3. 研究の方法

(研究1) LEDの大腸癌に対する抗腫瘍効果(in vitro)

ヒト大腸癌細胞株HCT116のconditioned mediumを用い、ヒト線維芽細胞を48時間培養し癌関連線維芽細胞(CAF)を作成した後、青色LED照射(465nm・30mW/cm²・30min)群とcontrol群に分けた。HCT-116とCAFのOpn3発現をPCRで評価した。LED照射あり/なしによるCAF活性化への影響について、SMAとIL-6発現を検討した。LED照射あり/なしのCAFのconditioned mediumでHCT-116の培養を行い、migration/invasion assayを行い、またHCT-116のPD-L1発現について評価した(図1)。

図1



CM: Conditioned medium
HIF: Human Intestinal Fibroblast

(研究2) LEDの癌細胞に対する抗腫瘍効果(in vivo)

4-5週齢 Balb/c ノードマウスの直腸にHCT-116を5×10⁶個移植して同所性モデルを作成した。

移植後 7 日目から 465nm・30mW/cm²・30min/week のプロトコルで腫瘍部に LED を照射し、抗腫瘍効果について 21 日目に検討した。腫瘍部の autophagy/cell cycle 関連因子について PCR で発現を評価した。免疫染色を行い腫瘍の Opn3、TGF- β 、SMA 及び PD-L1 発現について検討した。

4. 研究成果

(研究 1) LED の大腸癌に対する抗腫瘍効果 (in vitro)

HCT-116 と CAF の Opn3 発現を PCR で評価したところ、ともに発現を認めた(図 2)。LED 照射による CAF の SMA 及び IL-6 発現への影響について PCR で検討したところ、照射により発現がともに低下した(図 3)。LED 照射あり/なしの CAF の conditioned medium で HCT-116 の培養を行い、migration/invasion assay を行ったところ、LED 照射ありの CAF で培養した HCT-116 は migration/invasion ともに低下した(図 4,5)。また HCT-116 の PD-L1 発現については、LED 照射ありの CAF で培養した HCT-116 で PD-L1 発現が低下していた(図 6)。

図2

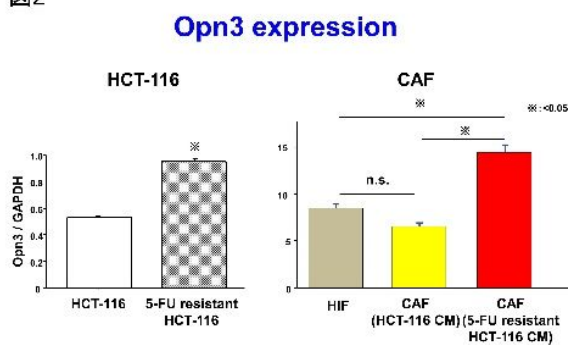


図3

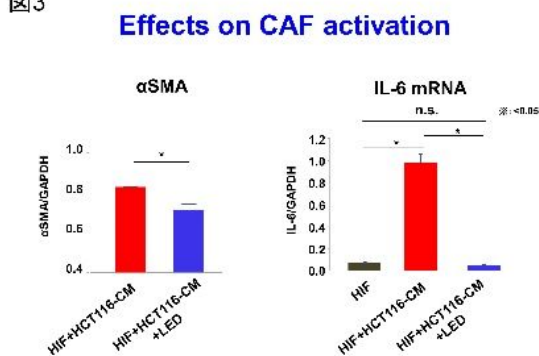


図 4

Transwell migration assay of HCT116

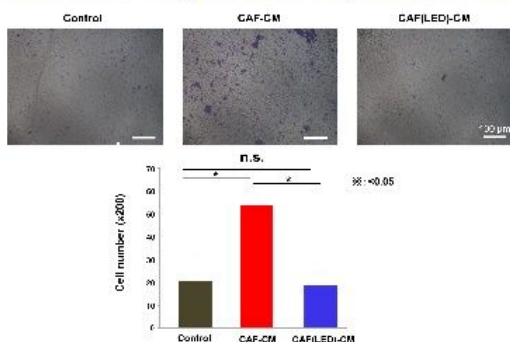


図5

Invasion assay of HCT116

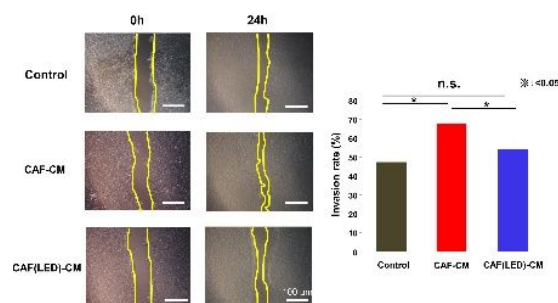
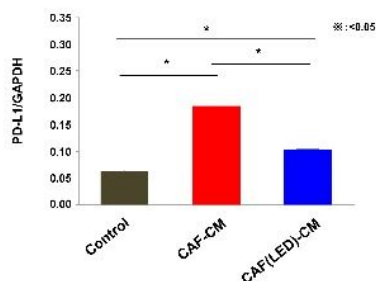


図6

PD-L1 expression of HCT116



(研究 2) LED の癌細胞に対する抗腫瘍効果 (in vivo)

腫瘍サイズについて腫瘍細胞播種後 21 日目に検討したところ、LED 照射群でそのサイズが有意に減少していた(図 7)。腫瘍部の autophagy/cell cycle 関連因子については、照射群で LC-3、Beclin-1、Cyclin-D/E の発現が低下した(図 8)。免疫染色では、腫瘍部の Opn3 が照射群では細胞質から細胞膜へと発現部位が変化し、TGF- β 、SMA 及び PD-L1 発現が照射群で低下した(図 9-11)。

図7 465nm LED on colon cancer
- In vivo -

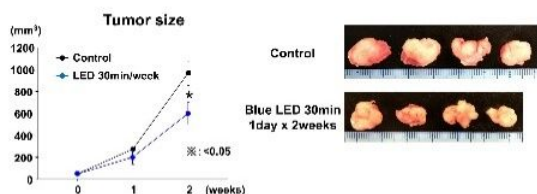


図8 Autophagy and cell cycle
- RT-PCR -

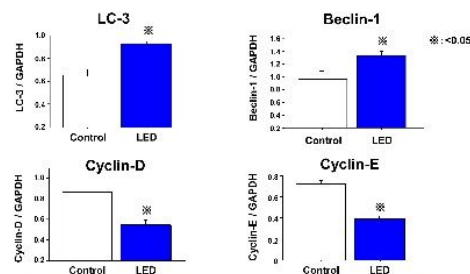


図9 Opn3 expression in HCT-116

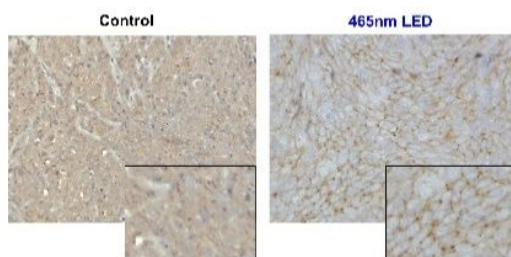


図10 TGF- β and α -SMA expression

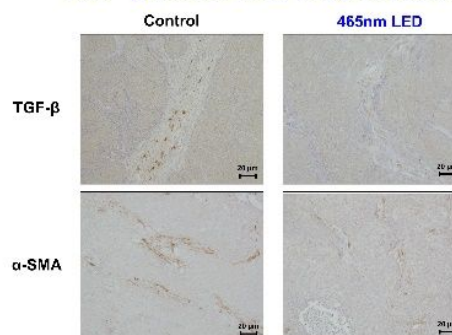


図11 PD-L1 expression



以上から、青色 LED 光照射は腫瘍細胞のみならず CAF にも抑制効果を持ち、in vivo においても腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yoshimoto T, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T, Tokunaga T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Takehara Y, Shimada M	4. 巻 4
2. 論文標題 Bevacizumab-associated intestinal perforation and perioperative complications in patients receiving bevacizumab.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg.	6. 最初と最後の頁 151-155
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 Takehara Y, Yoshikawa K, Tokunaga T, Nishi M, Takasu C, Kashihara H, Yoshimoto T, Shimada M	4. 巻 67
2. 論文標題 Desmoid-type fibromatosis difficult to distinguish from GIST: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Med Invest.	6. 最初と最後の頁 375-377
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 Yoshimoto T, Ikemoto T, Morine Y, Imura S, Saito Y, Yamada S, Miyazaki K, Takehara Y, Shimada M	4. 巻 4
2. 論文標題 Impact of using a perioperative artificial endocrine pancreas in pancreatic resection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ann Gastroenterol Surg.	6. 最初と最後の頁 591-596
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 良元俊昭, 武原悠花子, 柏原秀也, 高須千絵, 西正暁, 徳永卓哉, 宮谷知彦, 吉川幸造, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 LED光による新たな癌制御法の開発
3. 学会等名 第260回徳島医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokunaga T, Yoshikawa K, Miyatani T, Nishi M, Kashihara H, Takasu C, Yoshimoto T, Takehara Y, Shimada M
2. 発表標題 The Usefulness of Intraoperative X-ray Fluoroscopy for Avoiding Urethral Injury in Transperineal total Mesorectal Excision
3. 学会等名 IASGO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 良元俊昭, 吉川幸造, 宮谷知彦, 徳永卓哉, 西正暁, 高須千絵, 柏原秀也, 武原悠花子, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 The tumor suppressive effects of blue LED via Opn3 in colon cancer
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 良元俊昭, 吉川幸造, 宮谷知彦, 徳永卓哉, 西正暁, 高須千絵, 柏原秀也, 武原悠花子, 森根裕二, 島田光生
2. 発表標題 光受容体Opsin3をターゲットとした青色LEDの大腸癌抑制効果
3. 学会等名 第81回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2019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
---------	---------