

令和 6 年 4 月 30 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10127

研究課題名（和文）青色光を応用した光線力学療法による新規口腔癌治療法の検討

研究課題名（英文）Development of a novel oral cancer treatment using photodynamic therapy using blue light

研究代表者

吉野 文彦（FUMIHIKO, YOSHINO）

神奈川歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：20308307

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：光線力学療法(PDT)の最大の特徴は、様々な波長の光を用いて光感受性物質を励起させることで生じる活性酸素種(ROS)により、抗悪性腫瘍作用を発揮することである。今回、5-アミノレブリン酸(ALA)-PDTへ青色光を用い、従来型PDTより治療効果が高い口腔癌PDT確立を目的として基礎的検討を行った。結果、口腔癌細胞(Ca9-22)に対し、ALA-PDTは有意な殺細胞効果を示した。細胞内酸化ストレスは青色光照射で有意に増加した。以上の結果、ALA 処置により癌細胞内でプロトポルフィリンIXが増加し、とくに青色光照射により細胞内でROSが生成され殺細胞効果を発揮した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通法によるPDTは赤色光を用いることで、人体の深部癌の治療を行うものであるが、この研究では青色光を用いることで、より表層に生じる癌へのPDTを検討した。その結果、十分な抗癌作用を示したため、口腔領域、とくに舌表層に生じる舌癌に対し、非外科的治療を含めた口腔癌患者のQOL維持への応用、貢献が期待できる治療プランへ応用できる可能性が考えられ、今後のPDT研究において、極めて重要な社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：Photodynamic therapy (PDT) utilizes light-sensitive agents and light to generate reactive oxygen species (ROS) with anti-tumor effects. This study aimed to establish a novel ALA-PDT strategy for oral cancer with superior therapeutic efficacy by employing blue light irradiation. Oral cancer cells (Ca9-22) were treated with ALA followed by blue light irradiation. Cell viability and intracellular ROS levels were assessed. ALA treatment significantly increased intracellular PpIX levels. Blue light irradiation on ALA-treated cells resulted in a significant decrease in cell viability compared to the control group. Additionally, ROS levels were markedly elevated upon blue light irradiation. These findings suggest that ALA treatment enhances PpIX accumulation in oral cancer cells. Subsequent blue light irradiation triggers ROS generation, leading to potent cytotoxicity. This approach has the potential to be a promising strategy for improved ALA-PDT efficacy in oral cancer treatment.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：光線力学療法 5-アミノレブリン酸 活性酸素種 青色光 プロトポルフィリンIX 舌癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光線力学療法 (PDT) の最大の特徴は、様々な波長の光を用いて光増感剤を励起させることで生じる活性酸素種 (ROS) により、抗悪性腫瘍作用や殺菌作用を発揮することである。現在、保険適用されている光増感剤は、第 2 世代のヘマトポルフィリン誘導体であるが、これは副作用を第 1 世代より僅かに軽減しただけの薬剤であり、より副作用が少ないとされる第 3 世代ポルフィリン前駆体 5-アミノレブリン酸 (ALA) の研究が進められている。ALA は、それ自体には光増感性はなく、生理的に様々な代謝経路を経た後、ミトコンドリア内で Protoporphyrin IX (PpIX) となり、キレート形成され最終的にヘムとなる。とくに、ALA の細胞内代謝速度は正常細胞と癌細胞では著しく異なり、生じた PpIX は正常組織より癌組織に高度に蓄積する特徴をもつ。これは、いずれの癌細胞も有する基本的な生物学的特徴であり、PpIX の光増感作用を利用することで ALA を用いた PDT (ALA-PDT) は、ほぼ全ての癌種に応用できる技術である。さらに ALA は、局所適用でも同様の効果を発揮するとされ、近年、皮膚科における癌分野で注目されている。

癌 PDT で照射する光は赤色光である。赤色光は、長波長であるため組織深くまで浸透する性質をもつ。このため、ALA-PDT でも深部癌治療へ赤色光が通法として照射される。一方、PpIX の吸光スペクトルには、青色光に吸収度の大きいピークがある。これは、PpIX を励起させる光は赤色より青色が適切であることを示しており、我々は先行研究で、PpIX への青色光照射で細胞傷害性が非常に高い一重項酸素 (1O_2) が生成されることを報告している。しかし、深度の大きい癌 PDT では青色より低吸収度の赤色光が使用されており、この事実は本来の PpIX の光励起反応を最大限に生かしていない。

2. 研究の目的

1996 年には、光増感剤に特定波長の光照射で癌細胞を死滅させる PDT が早期肺癌、胃癌、食道癌、子宮頸癌に対し保険適用を受けている。PDT は他臓器への副作用が少なく、腫瘍の選択的治療や反復治療が可能である。さらに、臓器毒性がない等の利点を有している反面、進行癌や深部癌への適応に限界がある。また従来の PDT の最大の欠点は、光増感剤の代謝速度が非常に遅いことに伴う光線過敏症の副作用であり、14 日前後の遮光期間が必要であることから、慎重な遮光管理を行うことが推奨される。

一方、口腔癌への PDT の歴史は非常に浅いが、これまで他臓器癌 PDT と同様に組織透過性の良い赤色光が有益な光になるとして期待されている。このため、従来の癌治療と比較し、副作用が少ない等多くの利点を持つ ALA-PDT による口腔癌へのアプローチは急務である。しかし、これまで基礎的研究は少なく、とくに青色光に着目した口腔癌への ALA-PDT 研究は行われていない。さらに、口腔癌は粘膜表層を原発とする表在型や内向型癌の発現頻度が高く、口腔は直接的な光照射や薬剤の貼付が容易である。したがって、本研究では歯科臨床で頻用される青色光に着目し、ALA 適用で生じる PpIX へ青色光を活用し、従来型 PDT より治療効果が高い口腔癌 PDT 戦略の確立を目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題は、PpIX に対する青色光照射で生じる ROS の検討、癌細胞に対する ALA-PDT の諸条件、細胞内動態および殺細胞効果の検討を実施した。

- (1) 細胞：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3, Ca9-22) を用いた。
- (2) 細胞内 PpIX 測定：最終濃度 0~10 mM の ALA を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に添加し、4~24 時間インキュベートした後、上清を除去し、PBS で洗浄し、0.5% のドデシル硫酸ナトリウム水溶液を添加し、Infinite M200 (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) を用いて細胞内 PpIX を蛍光測定した。
- (3) キレート剤添加および血清存在における細胞内 PpIX 変化：細胞内 PpIX は時間経過とともに鉄イオンとキレート結合することでヘムになる。したがって、これら反応を阻害するため、Deferoxamine (DFX) 添加および無血清培地を用いた細胞培養を行い細胞内 PpIX をマイクロプレートリーダーで蛍光測定した。
- (4) 細胞増殖分析：細胞増殖は ALA, DFX を添加後 24 時間インキュベートし、Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いマイクロプレートリーダーで吸光測定した。また、フェノールレッドの影響を検討するため、フェノールレッド含有/非含有 DMEM で 24 時間培養し細胞増殖を評価した。
- (5) ALA-PDT 評価および酸化ストレス解析：青色光および赤色光を一定時間照射 (10 J/cm^2) し殺細胞効果と光エネルギー依存性について評価した。また、Ca9-22 に対し ALA-PDT を行い生じる酸化ストレスを蛍光性酸化ストレス検出薬 (CellROX Green, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) を用いて検出を行った。
- (6) 統計解析：GraphPad Prism 6.05 for Windows (GraphPad Software, Inc., CA, USA) および SAS Studio software (Release: 3.8, Enterprise Edition, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA)

を用いて解析を行った。二元配置分散分析および多元配置分散分析の後に, Tukey の多重比較検定 (細胞増殖, キレート剤, ALA-PDT), Dunnett の多重比較検定 (細胞内 PpIX), および Mann Whitney 検定 (酸化ストレス評価) を行った。各統計解析における有意水準は 0.05 とした。

4. 研究成果

ALA 処置により, HSC-3, Ca9-22 で共に ALA 濃度依存的な細胞内 PpIX 濃度の増加が観察された。しかしながら, 1.25 mM 以上では, 細胞内 PpIX 濃度の低下傾向が観察された。DFX 存在下および無血清培地による ALA 処置で, 細胞内 PpIX 濃度は高値を示した ($P < 0.05$)。フェノールレッド含有 DMEM では ALA および DFX 添加で培養時間依存的な細胞増殖が観察されなかった。しかしながら, フェノールレッド不含 DMEM では培養時間依存的な細胞増殖が観察され, ALA, DFX 添加群と比較し有意差は認められなかった。ALA-PDT を実施した結果, 赤色光照射では HSC-3, Ca9-22 とともに細胞数に変化は認められなかったが, 青色光照射では Ca9-22 で有意に細胞数の減少が認められた ($P < 0.01$) (図 1)。Ca9-22 に対する ALA-PDT の結果, 細胞内酸化ストレスの有意な増加が認められた ($P < 0.05$) (図 2)。本研究における ALA-PDT の結果は, とくに Ca9-22 における積極的な PpIX 生合成および蓄積を加速させ, さらに PpIX の最大励起波長である青色光を照射することで有効な殺細胞効果が示された可能性を示唆しており, 他の癌細胞にも適用できるかもしれない。ALA-PDT の作用メカニズムとして, 細胞内, とくにミトコンドリア細胞膜における ROS 生成を増強することで酸化ストレスが増加したことに起因する可能性が示された。

図 1

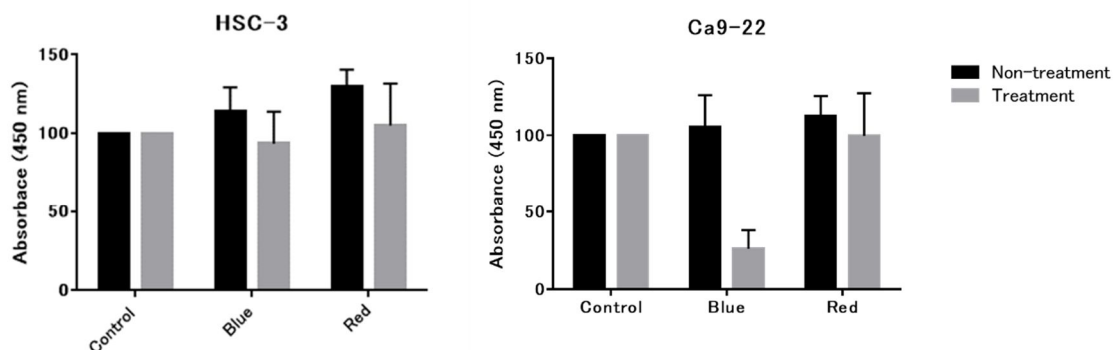
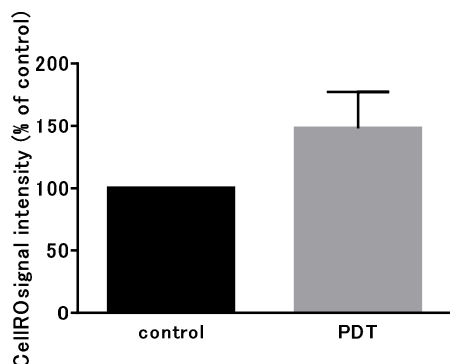


図 2



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yoshida Ayaka, Inaba Keitaro, Sasaki Haruka, Hamada Nobushiro, Yoshino Fumihiko	4. 巻 36
2. 論文標題 Impact on Porphyromonas gingivalis of antimicrobial photodynamic therapy with blue light and Rose Bengal in plaque-disclosing solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 102576 ~ 102576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pdpdt.2021.102576	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 Toyama Toshizo, Fujioka Jun, Watanabe Kiyoko, Yoshida Ayaka, Sakuma Takaaki, Inaba Keitaro, Imai Takayuki, Nakajima Takashi, Tsukiyama Koichi, Hamada Nobushiro, Yoshino Fumihiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Investigation of bactericidal effect of a mid-infrared free electron laser on Escherichia coli	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-22949-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉野文彦
2. 発表標題 感受性物質を利用した 口腔癌治療への光線力学療法への応用
3. 学会等名 神奈川歯科大学学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

神奈川県立歯科大学大学院光歯科医学チーム
<http://www.labs.kdu.ac.jp/pmd/>

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
研究分担者	吉田 彩佳 (YOSHIDA AYAKA) (00609414)	神奈川県立歯科大学・歯学部・准教授 (32703)	
研究分担者	居作 和人 (IZUKURI KAZUHITO) (90257296)	神奈川県立歯科大学・歯学部・講師 (32703)	

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