

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010~2012

課題番号：22791486

研究課題名（和文） 紫外線による腫瘍特異的光線力学的治療法に向けての基礎研究

研究課題名（英文） The effect of a novel photodynamic therapy with glycoconjugated fullerene and ultraviolet A-1 irradiation against bladder cancer cells

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

研究成果の概要（和文）：【目的】紫外線（特に UVA-1）は正常細胞と比較し、悪性細胞に対し、より apoptosis 誘導能が高いとの報告がある（Yamauchi R ら, J Invest Dermatol., 122(2):477-83, 2004）。また紫外線は有効深度が浅く、粘膜内のみ照射が可能で、筋層・粘膜下組織への影響は少ないと考えられる。我々はこの効果を膀胱癌治療に応用できないかと考えた。さらに新規光感受性物質であるフラーレンにグルコースを付加することで、FDG-PET CT の原理を応用した光感受性物質を開発した。私たちは、膀胱がんの新しい治療法としてフラーレンを併用した UVA-1 による、癌特異的 photodynamic therapy の開発を本研究の目的としている。【方法】膀胱癌細胞株を用いて、UVA-1 照射+フラーレン投与による効果を次のように検討した。1) WST-1 assay による殺細胞効果、2) フローサイトメトリーによる apoptosis 誘導効果、3) Chk1 を中心とした、各種リン酸化抗体による新規細胞内シグナル伝達機構の解析。

【結果】1) UVA-1 照射にフラーレンを併用することで、著明な殺細胞効果を認めた。2) UVA-1 照射+フラーレン投与により apoptosis が誘導された。3) 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 apoptosis 誘導が示唆された。【考察】膀胱癌細胞株への UVA-1 単照射では、ほとんど効果を認めないが、フラーレンを併用することにより著明な治療効果を細胞レベルではあるが確認した。UVA-1 は広く世の中で人工的な日焼けに用いられており、またフラーレンも化粧品の一成分として使用されている。これらのことから UVA-1 やフラーレンの人体への安全性が保障されていることから、十分に臨床への応用が可能な治療法であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：【Purpose】Photodynamic therapy (PDT) is an anticancer approach utilizing a light-absorbing molecule and visible light irradiation to generate, in the presence of O_2 , cytotoxic reactive oxygen species, which cause tumor ablation. Glycoconjugated fullerene (C60-glu) is a new photosensitizer which accumulates in malignant cells (Fig. 1). Previously, we report that ultraviolet A-1 (UVA-1) irradiation induced apoptosis occurs in a malignant cells rather than a normal cells. In this study, we investigated the effect of a novel PDT with C60-Glu and UVA-1 irradiation against bladder cancer cells.

【Material and Methods】Fullerene is considered a new class of carbon molecules. Fullerene

discovered in 1985 is composed of 60 carbon atoms arranged in a soccer ball-like structure. Although fullerene is a well-known radical scavenger, it has excitation wavelengths in the ultraviolet A-1 region (340-400nm) and generates ROS effectively upon excitation. And, fullerene is not toxic in the dark. Three human bladder cancer cell lines (T24, 5637 and RT4) were used in this study. We analyzed these photocytotoxic effects by WST-1 assay or flow cytometric analysis. Next in vivo, we implanted in BALB/c-nu/nu male mice, and analyze the tumor growth by no treatment or PDT.

【Results and Discussion】 We were able to observe the cytotoxic effect and apoptosis in all bladder cancer cell lines treated with only C60-gul or simple UVA-1 irradiation. But by these combination therapy, we observed a significant photocytotoxic effect and apoptosis. In vivo, this PDT suppressed the tumor growth. These studies indicated that PDT with C60-glu and UVA-1 was a new choice as a bladder cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：癌、光物性、蛋白質

1. 研究開始当初の背景

Photodynamic therapy (PDT) は光線力学的療法といわれ、さまざまな光線を利用し、臨床的にも治療へ応用されている。例えばアトピー性皮膚炎などの炎症性疾患への PUVA 療法やがん治療においては、腫瘍親和性のある光感受性物質を体内へ投与し、正常組織と腫瘍細胞の濃度差をつくることで、レーザー光を照射する方法などが子宮頸がんや肺がんなどの分野で行われている。

膀胱がんの分野においても、光感受性物質である photofrinII を投与後にレーザー光を膀胱内照射したトリアルや、5-アミノレブリン酸を投与し protoporphyrinIV を産生させる方法など臨床治験が行われている。しかし、レーザー光自体の組織障害の問題や光感受性物質投与に伴う太陽光に対する皮膚障害

もしくは薬物自体の副作用などの問題がある。以上より我々は、正常組織には傷害が少なく、腫瘍特異的に影響の強い光の波長はないかと考えた。

紫外線（特に UVA-1）は正常細胞と比較し、悪性細胞に対しよりアポトーシス誘導能が高いとの報告がある。我々は、紫外線のこの特徴を膀胱がんにおいても利用できないかと考えた。また、炭素原子 60 個からなる切頂 20 面体（サッカーボール状）構造のフラーレンは、超潤滑剤、化粧品（美容液など）に応用されている化合物であるが、光感受性物質としても可能性を秘めた物質であるとされている。我々は、化粧品としても用いられ人体への安全性が保障されているフラーレンを紫外線と併用することで、副作用も少なく治療効果の高い新しい膀胱がん治療法

を開発できないかと考えた。

2. 研究の目的

表在性膀胱がんは経尿道的切除術によって高い治療成績をおさめている。しかし、残念ながら高い確率で膀胱内再発が認められる現状にある。一方、切除不能なほど多発した表在性膀胱がんの治療としては、膀胱全摘除術などの侵襲の高い治療法が選択されている。現在、再発予防および膀胱温存目的として、BCG 膀胱内注入療法が高い治療効果を挙げているが、治療に伴う副作用が強いなど問題点も多い治療法である。BCG 膀胱内注入に替わる新たな表在性膀胱がんの治療法とするべく、新規光感受性物質フラレーンと紫外線による膀胱内 photodynamic therapy の開発を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

膀胱癌細胞株を用いて、UVA-1 照射+フラレーン投与による効果を次のように検討した。

- (1) WST-1 assay による殺細胞効果を調べる。
- (2) フローサイトメトリーによる apoptosis 誘導効果を調べる。
- (3) Chk1 を中心とした、各種リン酸化抗体による新規細胞内シグナル伝達機構の解析をする。
- (4) 膀胱癌皮下移植モデルによる研究：BALB / c Slc-nu/nu に T24 : 1×10^6 cells / 100 μ l (in PBS) で背中 of 左右に皮下移植し腫瘍長径が 5mm になるまで経過観察し、その後フラレーンを 6.25 pmol / kg の濃度で腫瘍に局所注射し、4 時間後に UVA-1 を 2.5J/m² 照射した。その後の腫瘍の変化を無刺激 control, C60-Glu1 のみ、UVA-1 のみ、C60-Glu1+UVA-1 の 4 群について、それぞれ腫瘍体積の変化 (control 腫瘍長径が 20mm になるまで) および病理組織学的検査により解析す

る。

- (5) apoptosis 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、サンプル処理する。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 (がんになるほど変異しているものもあるし、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, caspase 3, 8, 9) にてウエスタンブロットを行う。

4. 研究成果

- (1) UVA-1 照射にフラレーンを併用することで、著明な殺細胞効果を認めた。
- (2) UVA-1 照射+フラレーン投与により apoptosis が誘導された。
- (3) 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 apoptosis 誘導が示唆された。
- (4) 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。
- (5) 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、戸澤 啓一、小林 大地、
山田 健司、安藤 亮介、福田 勝洋、
河合 憲康、森田 明理、郡 健二郎：
膀胱癌に対する糖鎖連結フラーレンを
併用した長波長紫外線による光線力学
療法の開発。第69回日本癌学会学術総
会、2010.9.22-24、大阪市

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