

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830114

研究課題名(和文)近赤外レーザーによる膵癌治療応用を目指した基礎的検討

研究課題名(英文)The pilot study of treatment with near-infrared radiation for the pancreatic cancer

研究代表者

大野 栄三郎 (Eizaburo, Ohno)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00447822

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)：915nmの近赤外線が膵癌細胞の増殖や生存に与える影響の検討。膵癌細胞(KP4、MIA-PaCa2、PK9)、線維芽細胞(KMST-6)に対し、波長915nmの近赤外線を低出力、短時間で照射した結果、癌細胞の形態変化及び細胞死(apoptosis)が誘導されていることを確認した。また抗癌剤であるgemcitabineと併用した照射(4W 7min)を行い、併用群は単独群と比較し有意にapoptosis誘導率が高く、相乗効果があることが判明した。レーザー照射による発熱効果は平均11℃の上昇を認めたが、照射域の最高温度からはapoptosis効果が温度上昇により誘導された可能性は低いと思われた。

研究成果の概要(英文)：Cancer remains one of the leading causes of human mortality worldwide. Radiation and chemotherapy are commonly used for cancer treatment; however, the combination of these therapies and surgery do not completely eradicate cancer cells. Near infrared radiation (NIR) is a low energy form of radiation that exerts multiple effects on mammalian cells. Previous studies have reported that NIR induces DNA double strand breaks and apoptosis of cancer cells. In the present study, a 915 nm laser was used to examine the effects of NIR on pancreatic cancer cells. Irradiation of pancreatic cancer cells using a 915 nm laser significantly induced caspase 3 activation and apoptosis. In addition, the combination of gemcitabine treatment and a 915 nm laser synergistically increased the number of apoptotic cells. The results of the present study indicate the use of infrared irradiation and chemotherapy may be a possible therapy for the treatment of cancer.

研究分野：膵疾患診断・治療

キーワード：Near-infrared radiation apoptosis gemcitabine caspase-3 pancreatic cancer

1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後の悪い癌である。現在において治癒が期待できる治療法は外科的切除のみである。しかしながら、切除できる膵臓癌は診断されたなかの20%と低い。

近赤外光は波長 800-2500nm と可視光より長波長域である。光の生体作用については、今まで形成外科の視点で研究が進められてきた。特に皮膚代謝の活性化による色素沈着の除去(いわゆるシミ取り)を中心とした治療法の開発が進められ、波長 1.1~1.6 μ m の通信波長帯を含む高出力・広帯域低コヒーレンス光により高奏功率の治療法が確立され、ケロイドなど皮膚損傷の修復といった医療応用から老人性斑の除去などでの活用も積極的に展開されている。このような皮膚治療用近赤外光の生体作用を検討する中で、生きた癌細胞へ偶然照射した結果、癌細胞が死滅するという発見が Y. Tanaka らにより発見された。そこで改めてこの近赤外光の癌細胞死誘導効果を詳細に検討したところ、生きたマウスに対して非熱性効果として有意に癌細胞を委縮させる効果を確認するとともに、照射後長期間にわたり癌の増殖を抑制し、再発を防止できることが報告された。(引用文献 1,2)そこで我々は新たな治療法として、近赤外線を用いた治療の開発をおこなうことにした。

<引用文献>

1. Tanaka Y, Matsuo K, Yuzuriha S, Yan H and Nakayama J: Non-thermal cytotoxic effect of infrared irradiation on cultured cancer cells using specialized device. *Cancer Sci* 101: 1396-1402, 2010.

2. Tanaka Y, Tatewaki N, Nishida H, Eitsuka T, Ikekawa N and Nakayama J: Non-thermal DNA damage of cancer cells using near-infrared irradiation. *Cancer Sci* 103: 1467-1473, 2012.

2. 研究の目的

(1) 膵癌培養細胞に対しての近赤外レーザーの効果及び殺細胞効果閾値の同定。

現時点までに膵癌培養細胞(KP4)やHela細胞に対する殺細胞効果は認めているが、数種の膵癌細胞株(AsPC-1, BxPC-3, Capan-1, PANC-1など)及び正常細胞への影響の検索のため繊維芽細胞株に対する、近赤外レーザーの効果を評価する。

(2) 殺細胞閾値(癌細胞のみに殺細胞効果を示す閾値)を示す波長及び出力が同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞株を対象に、近赤外光の至適照射量と照射回数を検討する。

使用予定の細胞株は膵癌細胞培養株(KP4, Capan-1, PANC-1など)及び対照群として子宮頸がん培養細胞(Hela)、非癌細胞株として繊維芽細胞培養株を用いる。

近赤外レーザー装置は915nmから1064nmまでの波長可変のものを準備し、且つ連続照射型とパルスレーザー(短時間に高出力のパルス照射可能)の照射方法、照射出力、照射時間、照射スポット径を変化させ、培養細胞への影響を評価する。照射後の培養細胞の形態変化を追跡するため各照射実験後、24時間から72時間のタイムラプス観察を行う。

上記実験において癌細胞に対して死滅効果を起こしうる至適波長、照射量、照射時間、回数を検討する。

(2) 細胞死が得られた培養細胞に対し、細胞死のメカニズムの解析を行う。

得られた細胞死がアポトーシスであるのか、ネクローシスであるのかの解明。具体的にはTUNEL法によるアポトーシス誘導有無の評価。並びにCaspase3アッセイを行うことで細胞増殖抑制効果の評価を行う。

(3) 抗がん剤である塩酸ゲムシタピンと近赤外レーザーとの併用による殺細胞効果の

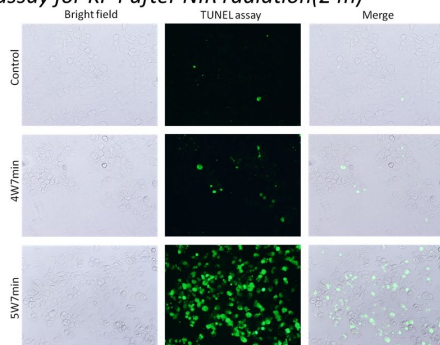
評価を行う。

(4) 近赤外レーザー照射により発生する熱の細胞に与える影響を評価するため、照射野の温度測定を行う。

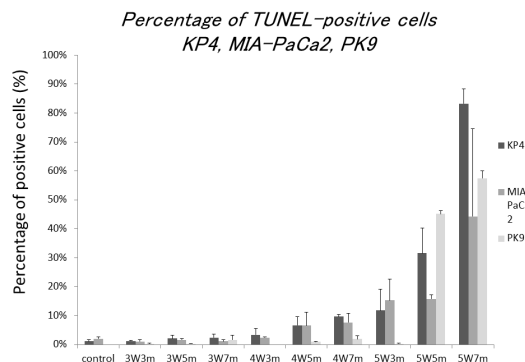
4. 研究成果

(1) 我々は 915nm の近赤外線が膵臓癌にどのような効果があるかを検討した。1-30W の出力で照射径 1.5mm の 915nm の近赤外線を照射できる機械を作成した。それを用いて様々な出力、時間で膵臓癌に照射し、その影響を観察した。実験には膵臓癌細胞の KP4、PK9、MIA-PaCa2 の 3 種類及び線維芽細胞である KMST-6 の細胞株を使用した。これらの 4 種類の細胞を 96 穴に培養し、時間と出力を変えた条件で近赤外線を照射し、細胞の形態変化を 24 時間観察した。その結果、条件によっては細胞が死ぬことが観察された。さらに確認するため、細胞死を検出する TUNEL アッセイをおこなった。その結果、多くの細胞で細胞死(アポトーシス)が誘導されることが判明した。(下図)

Morphological change and image by TUNEL assay for KP4 after NIR radiation(24h)

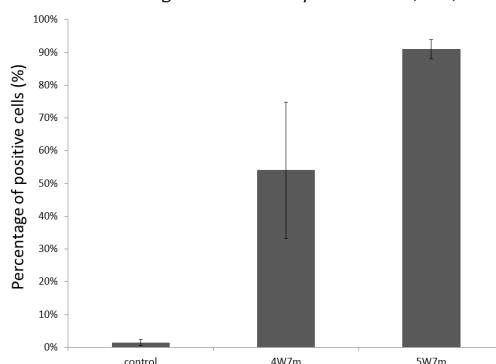


(2) 3Wで3分の照射では細胞死はほとんど観察されないが、4Wで5分の照射では MIA-PaCa2 と KP4 において 10% ほどの細胞死が観察される。さらに出力をあげ、5Wで5分の照射では、どの細胞においても 3 割以上の細胞死が観察された。(下図)



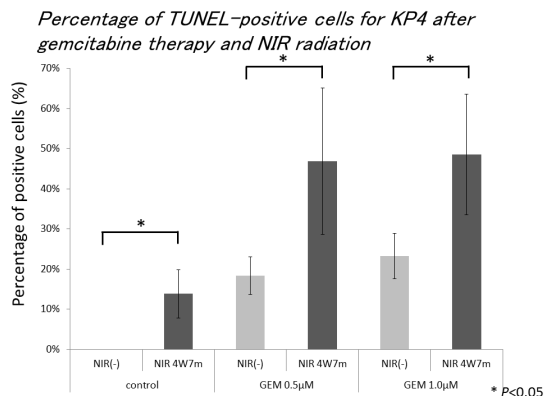
(3) アポトーシスが近赤外線照射で誘導されていることをさらに確認するため、近赤外線照射後の Caspase3/7 の活性を評価した。Caspase3/7 はアポトーシスが誘導されるときに活性化される酵素であり、アポトーシスの指標として有用である。KP4 に対し近赤外線照射 2 時間後に Caspase3/7 の活性を評価したところ、4W(7 分)の照射で 50%以上の細胞で陽性となることが判明した。(下図)

Percentage of active Caspase-3 cells(KP4)

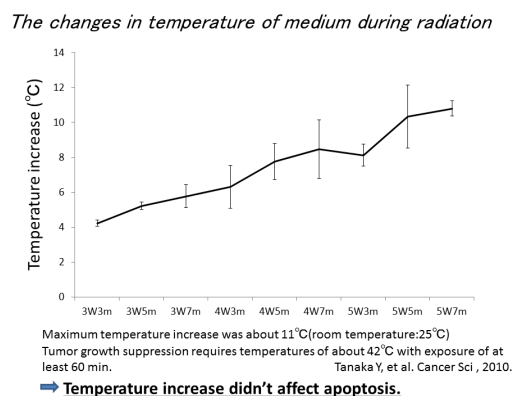


(4) 遠隔転移を有しない膵癌に対し、現時点でもっとも根治性が高い治療法は外科的切除であるが、膵癌は進行が早く切除可能な症例は多くなく、抗癌剤治療や放射線治療などの集学的治療が行われている。そのため、近赤外線と抗癌剤との併用による効果を評価した。KP4 に対し、膵癌に臨床で広く使用されている gemcitabine を 0.5 μM、1.0 μM の濃度で曝露し、48 時間後に 4W(7 分)で近赤外光を照射した群と照射しない群に分け、さらに 24 時間後に TUNEL 法にて陽性率を比較

した。0.5 μ M、1.0 μ M のどちらの濃度でも、照射した群の方が照射しない群と比較して有意に TUNEL 陽性率が高かった。(下図)



(5) 温度上昇が膵癌細胞株のアポトーシスに影響を与えた可能性を考え、熱電対を使用し照射中のメディアムの温度変化を測定した。今回使用した最大・最長の5W 7分の照射にて、平均で11の上昇を認めた。室温(25)で照射を開始したため、温度は最高36程度であった。細胞の増殖を抑制するには42で60分以上の暴露が必要であるという報告があり、本実験においては温度上昇がアポトーシスに影響を与えた可能性は低いと思われた。(下図)



(6) 今後の研究の推進方策

近赤外線照射によりどのようなメカニズムで細胞死が誘導されるかを検討する。細胞死に関係する様々なタンパク質の発現やタンパク質の修飾を免疫染色などの手法を用いて調べる。また、細胞死に必須なシグナル経路の阻害剤などを用いて細胞死に関わるシグナルの同定をする。

今回の研究期間中に、レーザー波長が可変である装置の入手が困難であった。今後は医工連携などを通じより多彩な波長、強度、照射範囲の調整可能なレーザー発生装置の開発、入手が必要となる。その後、マウスを用いた実験をおこなう。ヌードマウスに生着させた膵癌に対して近赤外光を照射し、照射後の腫瘍抑制効果について、組織学的所見(腫瘍組織量、腫瘍増殖能など)を評価する。近赤外レーザーの出力、時間、照射回数などを変えた様々な条件で実験をおこなう。その際、レーザー照射による熱発生及び熱による細胞死を否定するため、照射野を冷却するためのクーリングプローブを準備し併用する。また、近赤外線の効果があどの程度の深部まで到達するかを明らかにする。今後、近赤外レーザーによる抗腫瘍療法開発のためには上記項目の更なる検討が必要であると考えられた。

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 1件)

TOMOHIKO OBAYASHI, KOHEI FUNASAKA, EIZABURO OHNO, RYOJI MIYAHARA, YOSHIKI HIROOKA, MICHINARI HAMAGUCHI, HIDEMI GOTO and TAKESHI SENGU

・論文標題

Treatment with near-infrared radiation promotes apoptosis in pancreatic cancer cells

・雑誌名

Oncology Letters

・査読の有無 有

・巻 10

・発行年 2015

・最初と最後の頁 1836-1840

DOI: 10.3892/ol.2015.3399

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 栄三郎 (OHNO, Eizaburo)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号: 447822

(2) 研究分担者

なし

(3)研究協力者

千賀 威 (SENGA, Takeshi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

後藤 秀実 (GOTO, Hidemi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

廣岡 芳樹 (HIROOKA, Yoshiki)
名古屋大学・医学部附属病院・准教授

大林 友彦 (OBAYASHI, Tomohiko)
名古屋大学・大学院生