

主論文の要旨

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

〔 近赤外光照射による治療は膵癌細胞株において
アポトーシスを促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 消化器内科学分野

(指導：後藤 秀実 教授)

大林 友彦

【緒言】

近年、癌の発生や進展などについて多くの知見が報告されているが、いまだに死亡原因の大多数を占めている。現状では外科的切除が最も効果的な治療ではあるが、診断時に局所進行、あるいは遠隔転移している切除不能進行症例も多い。これらの癌には主に化学療法、放射線療法が行われる。化学療法、放射線療法共に正常細胞にも影響を与えるため副作用が多く、代替治療の開発が望まれている。

近赤外光は 750-2500nm の範囲の波長を持つ電磁波で、その照射による細胞への影響については、角化細胞の増殖の誘導、細胞接着の促進、ラットや犬において心筋梗塞の梗塞域の縮小、骨格筋の再生の誘導など、多くの効果が報告されている。さらに、癌細胞に対しても抑制効果が報告されており、1100-1800nm の広いスペクトラムの照射により *in vitro* で多くの癌細胞株にアポトーシスを誘導したという報告がある。以上のように近赤外光による治療は癌に対し有用である可能性が高いが、その報告は多くない。本研究では、膵癌細胞株に対し 915nm の近赤外光を照射し、その細胞への影響を評価することを目的とした。

【対象と方法】

細胞株

膵癌細胞株である KP4、MIA-PaCa2、PK9 を使用した。

近赤外光照射

細胞株を 96 ウェルプレートで培養し、室温である 25℃ で GaAs 系半導体レーザーを使用し波長 915nm の近赤外光を照射した。照射の出力、時間は Fig.1 に示す条件とした。

TUNEL assay

近赤外光を照射 24 時間後に、細胞株を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、*in situ* Cell Death Detection kit を使用し TUNEL assay を施行した。蛍光顕微鏡を用い、100 倍の倍率でランダムに選択した 5 視野で陽性率を計測し、その平均値を算出した。3 回の独立した実験を行った。

Caspase-3 assay

近赤外光を照射 2 時間後に、細胞株を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、NucView 488 Caspase-3 Assay kit for Live Cells を使用し、Caspase-3 assay を施行した。蛍光顕微鏡を用い、100 倍の倍率でランダムに選択した 5 視野で陽性率を計測し、その平均値を算出した。3 回の独立した実験を行った。

温度測定

熱電対を使用し、照射中の培地の温度を測定した。

統計

陽性率、温度は平均±SD で表記し、群間比較には unpaired Student's t-tests を使用した。 $P<0.05$ を有意差ありとした。

【結果】

915nm の波長のレーザー機器を用い、96 ウェルプレートに播種した KP4 に様々な出力、時間で近赤外光を照射し、その 24 時間後に TUNEL assay でアポトーシスを評価し(Fig.1A)、TUNEL 陽性率をグラフで表した(Fig.1B)。3 Watt(W)の出力ではアポトーシス細胞はほとんど見られなかったが、レーザーの出力を上げ照射時間を長くするに従いアポトーシス細胞は増加し、4W7 分の照射で約 10%、5W5 分で約 30%、5W7 分では約 90%の割合でアポトーシス細胞を認めた。

この結果をさらに確認するために、caspase-3 の活性化も評価した。caspase-3 は cysteine-aspartic acid protease ファミリーの 1 つでアポトーシス細胞で活性化し、extrinsic (death ligand) pathway と intrinsic (mitochondrial) pathway の両方に関与する。照射 2 時間後の caspase-3 の活性化を評価し(Fig.2A)、陽性率をグラフで表した(Fig.2B)。対照群ではほとんど活性化は見られなかったが、4W7 分で約 50%の細胞で Caspase-3 活性は陽性となり、5W7 分では約 90%で陽性となった。

これらの結果から、915nm の近赤外光照射は細胞株のアポトーシスを促進することが示された。

KP4 以外の膀胱癌細胞株である、MIA-PaCa2、PK9 に対しても同様に近赤外光を照射し、24 時間後の TUNEL 陽性率を評価した(Fig.3)。細胞株によって感受性が違い、MIA-PaCa2 は KP4 と同様に 4W でアポトーシス細胞が増加し始め、5W3 分にて 10%を超えたが、5W7 分では 44%であった。PK9 は 5W3 分まではあまり変化を認められなかったが、5W5 分の照射で急激に陽性率が増加した。これらの結果から、915nm の近赤外光照射で誘導されるアポトーシスの閾値は、膀胱癌細胞株の種類により様々であることが示された。

抗癌剤との併用療法の可能性を検討するため、実臨床で膀胱癌に対し頻用される gemcitabine を KP4 に 48 時間暴露し、その後に 4W7 分で近赤外光を照射し、その 24 時間後に TUNEL 陽性率を評価した(Fig.4)。gemcitabine 0.5 μ M、1.0 μ M、いずれの濃度でも、gemcitabine 単独治療に比べ近赤外光を併用した方が有意に陽性率が高く、相乗効果を認めた。

アポトーシスが温度上昇により誘導された可能性を除外するために、近赤外照射中の培地の温度変化を測定した(Fig.5)。近赤外光照射により温度上昇を認め、出力を上げ、照射時間を長くする程、温度上昇は大きくなった。本研究の最大出力、最長時間である 5W7 分で 10.8 $^{\circ}$ C の上昇を認めたが、照射は室温 25 $^{\circ}$ C で開始しているため、アポトーシスは温度上昇により誘導されたのではないと考えられた。

【考察】

本研究では、膀胱癌細胞株に 915nm のレーザー光を照射し、その影響を評価した。出力を上げ照射時間を長くする程、有意に多くのアポトーシス細胞が観察された。照射により培地の温度上昇が見られたが、腫瘍細胞の増殖を抑制するには 42 $^{\circ}$ C で 60 分以上の暴露を必要とすると報告があり、本研究では室温の 25 $^{\circ}$ C で照射を開始している

ため、10℃程度の温度上昇ではアポトーシスの誘導には十分ではないと考えられた。そのため、アポトーシスは近赤外光照射により誘導されたもので、温度の上昇によるものではないと判断した。本研究に関連して、過去の研究でも近赤外光照射は熱エネルギーとは関係なく多くの細胞株で増殖を抑制し、アポトーシスを誘導したと報告されている。

低出力の非電離放射線は、近赤外光によるミトコンドリアのシグナル伝達の調節など、細胞内の電気化学的システムを調節することにより、多くの細胞の活動に影響を与えることが知られている。様々な細胞の活動に影響を与える分子機構は明らかではないが、多くの報告が、低出力放射線が癌の治療に使われるうる可能性を示している。近赤外光がどのように細胞に毒性を示すかの正確な分子機序は明らかではないが、DNA の二本鎖を切断することでアポトーシスが導かれるという報告がある。また、近赤外光は DNA 障害チェックポイントパスウェイを活性化し、細胞周期を G2/M 期に導くことで、アポトーシスを誘導すると実証されている。

本研究では、膵癌細胞に対する近赤外光の効果を評価した。膵癌は最も予後が悪い癌の一つである。gemcitabine による化学療法は進行膵癌に対する標準治療である。しかし、多くの患者が gemcitabine 治療に抵抗を示す。本研究により、近赤外光と gemcitabine の併用がどちらかの単独治療より、効果的であることが示された。直接膵癌に照射することは技術的には簡単ではないが、そのためのデバイスを開発することは有用であり、膵癌患者の予後の改善のために、さらなる近赤外光治療の開発、研究が必要である。

【結語】

915nm の近赤外光照射は、膵癌細胞株においてアポトーシスを促進した。また、抗癌剤との併用による相乗効果も確認され、臨床への応用の可能性が示唆された。