

マイクロ波精密照射による 新規癌治療法開発に向けた基礎的研究

浅野 麻実子^{1*}

A fundamental research on development of novel cancer therapies by microwave irradiation

Mamiko Asano^{1*}

概要

近年、マイクロ波の特殊な加熱機構により、化学反応が通常加熱による反応温度よりも低温で制御できることがわかってきた。著者らは、本現象を生体に応用し、現行の治療温度よりも低温で癌細胞を死滅することができれば、新しいマイクロ波癌治療法として応用可能と考えた。そこで、マイクロ波を精密に照射可能な装置を開発し、癌細胞を低温にて死滅可能なマイクロ波照射条件を明らかにするとともに、死滅経路の解析を行った。本稿では、マイクロ波加熱の原理を概説するとともに、開発したマイクロ波照射装置や癌細胞の死滅メカニズムについて報告する。

1. はじめに

マイクロ波は電磁波の一種であり、熱発生効率の良さが特徴である。医療では、マイクロ波凝固焼灼療法やハイパーサーミアにおいて、腫瘍を高温にする局所癌治療のツールとして使用されてきた。その経緯から、これまでのマイクロ波癌治療は、病巣の高温化を目的として発展してきた。一方で近年、マイクロ波の特殊な加熱機構（スーパーヒーティング・内部加熱・選択加熱等）により、様々な化学反応が通常加熱の反応温度よりも低温で制御できることがわかってきた¹⁾。また臨床現場では、体温に近い低温条件下で行うマイクロ波照射により、腫瘍の酵素失活等の変化が確認されており²⁾、マイクロ波の特殊な加熱機構との関連が示唆されている。そこで著者らは、現行の治療法よりも低温でのマイクロ波照射にて癌細胞の死滅が誘導できれば、病巣周辺にダメージを与えないより緩和な癌治療法として応用でき、治療領域の拡大も期待できると考えた。その第一段階として、マイクロ波の低温照射が癌細胞に与える影響を詳細に解析する必要がある。しかし、世界的に主流のマグネトロン方式のマイクロ波発振器では、周波数や出力、温度上昇の微弱制御ができない。そのため、細胞を低温条件下で一定に保つことができず、詳細な解析が不可能であった。そこで著者らは企業との共同研究により、半導体方式発振器と温度制御可能なアプリーターを開発し、これらの問題を克服した³⁾。本装置を用いて複数の癌細胞にマイクロ波を照射した結果、低温照射でも細胞死が誘導されることを

2019年7月30日受理。

¹⁾〒611-0011 宇治市五ヶ庄 京都大学生存圏研究所 生存圏学際萌芽研究センター。

* E-mail: mamiko_asano@rish.kyoto-u.ac.jp

突き止めた³⁾。更に、ヒト骨髄性白血病由来株 HL-60 細胞を用いて、マイクロ波低温照射による細胞死経路を解析した⁴⁾。本稿では、マイクロ波加熱の原理について概説するとともに、著者らのこれまでの研究について説明する。

2. 細胞用マイクロ波照射装置の開発

筆者らは、細胞用マイクロ波照射装置として、2.45GHz 半導体発振器を導入したアプリケーションを開発した(図1)。出力の微弱制御が可能な半導体発振器とアプリケーションにより、細胞を培養温度である 37°C 条件下で一定に保つことができる。アプリケーション内のシャーレ設置場所の下部には赤外線温度センサーがあり、シャーレ底面の温度をモニターしている。本装置では、この温度が 37°C を維持した状態となるようマイクロ波を照射することができる。このとき、アプリケーション内の温度を冷却することで、37°C に維持した状態でも出力を変動することができる。

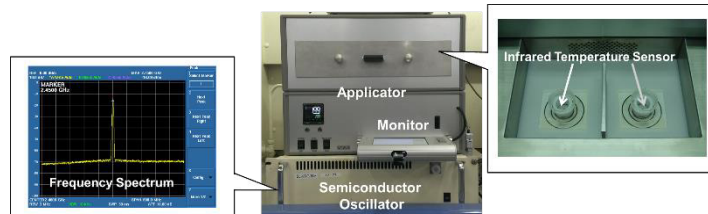


図1：マイクロ波照射装置の外観
(参考文献3のFigure5より抜粋)

3. マイクロ波照射における HL-60 細胞のアポトーシス経路の解析

3.1 マイクロ波低温照射による細胞死の経時的変化と細胞周期解析

本検討では、ヒト骨髄性白血病由来 HL-60 細胞を用いて、マイクロ波を 37°C 管理化で照射した際の細胞死経路について解析した。マイクロ波照射は、上記装置を用いた。アプリケーション内を 12°C に冷却し、シャーレ底面温度が 37°C となるように HL-60 に対してマイクロ波を 1 時間照射した。また、マイクロ波を照射せずに 42.5°C にて 1 時間静置した群を比較対象とした(一般的に、細胞は 42.5°C 以上にて死滅すると言われている)。

始めに、Annexin V 及び Propidium iodide (PI) を用い、マイクロ波照射後 0~24 時間でのアポトーシスの解析を行った(図2A)。Annexin V 陽性細胞は初期のアポトーシス、PI 陽性の細胞は後期アポトーシスもしくはネクローシスと判別される。その結果、後期アポトーシスもしくはネクローシスの細胞が経時的に増加し、マイクロ波照射後 24 時間における割合は、全

体の細胞数に対して 40.7%であった。一方で、初期のアポトーシス細胞は経時的に増加したが、その変化は僅かであった。これらのマイクロ波照射後 24 時間における割合は、全体的細胞数に対して 2.7%であった。これらの傾向は、42.5°C にて静置した熱処理群においても同様のであり、24 時間における割合は、後期アポトーシスもしくはネクローシスの細胞で 15.5%、初期アポトーシス細胞で 4.1%で

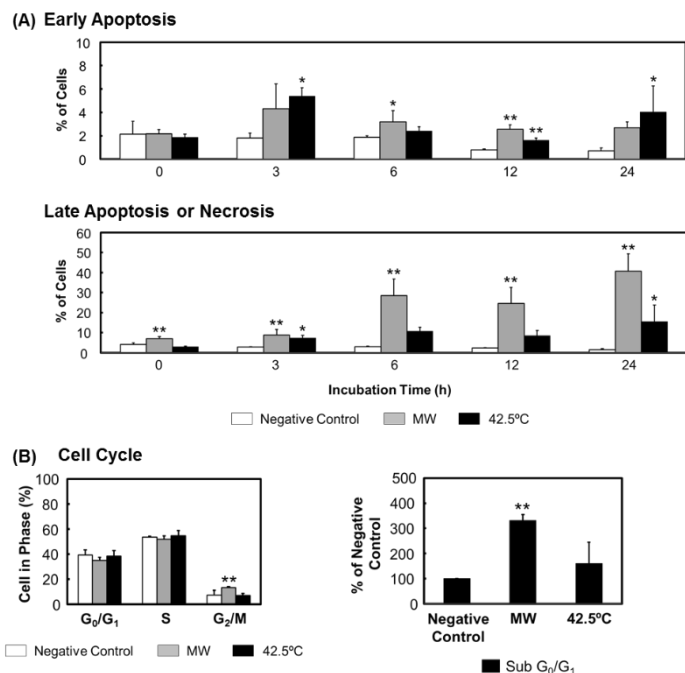


図2：Annexin V-PI による細胞死解析と細胞周期解析
(参考文献4のFigure1より抜粋)

あった。

更に、マイクロ波照射後 24 時間後の細胞周期を解析したところ、マイクロ波照射では SubG0/G1 の増加が確認された (図 2B)。また、G2/M の割合が有意に増加していた。以上より、マイクロ波照射された細胞では、細胞周期の G2/M 期 arrest が起こることが示唆された。

3.2 マイクロ波低温照射による熱ストレス非依存的なミトコンドリア傷害

マイクロ波照射後 3 時間におけるミトコンドリア傷害について解析した。まず、アポトーシスを抑制する Bcl-2 とアポトーシスを促進する Bax の発現について解析した (図 3A)。マイクロ波照射では、Bcl-2 の発現が減少し Bax の発現増加が確認された。更に、ミトコンドリアの膜電位差を測定したところ、マイクロ波照射のみで電位差が消失していた (図 3B)。一方でマイクロ波照射では、Heat Shock Protein 70 (HSP 70) の発現増加が見られなかったことから、マイクロ波照射により細胞が熱ストレスを受けていないことが示された (図 3C)。

3.3 ミトコンドリア傷害により誘導されるアポトーシス経路の解析

マイクロ波を照射した細胞では、ミトコンドリア膜電位差の消失に伴い、サイトゾルの Apoptosis-inducing factor (AIF) が増加し、経時的な DNA の断片化の確認された (図 4A, 4B)。照射後 24 時間後の DNA 断片化細胞の割合は、45.6%であり、Annexin V、PI による解析での死細胞の割合とほぼ一致した (図 2A)。つまり、マイクロ波照射による細胞死のほとんどは、AIF により DNA 断片化が生じた“カスパーゼ非依存的アポトーシス”であることが示唆された。更に、シトクロム C もサイトゾルで増加した。ミトコンドリアから漏出したシトクロム C は、Apoptotic protease activating factor 1 (Apaf-1) 及び Caspase 9 と結合して Apoptosome と呼ばれる複合体を形成し、Caspase 9 及び 3、7 をこの順で活性化することでアポトーシスを誘導する (カスパーゼ依存的アポトーシス) ⁴⁾。しかし、マイクロ波照射では、Apaf-1 と Caspase 9 はほとんど検出されず、Apoptosome が形成されていないことが示唆された (図 4A)。その結果、Caspase 3/7 の活性が有意に上昇せず、結果として“カスパーゼ依存的アポトーシス”は起こらなかったと考えられた (図 4C)。またマイクロ波照射では、Second mitochondria-derived activator of caspase (Smac) がサイトゾルで増加した。Smac は、X chromosome-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) の働きを抑制することで、Apoptosome の形成を促進するが ⁴⁾、Apaf-1 と Caspase 9 の消失に伴い、機能していないことが示唆された。

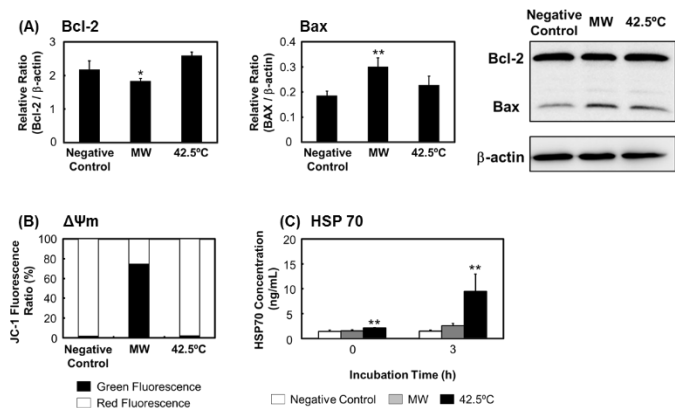


図 3：マイクロ波誘導細胞死の熱ストレス応答を
経路しないミトコンドリア傷害
(参考文献 4 の Figure 2 より抜粋)

3.4 ミトコンドリア傷害を誘導する各種ストレスの関連

ミトコンドリア傷害は、デスレセプター刺激や小胞体ストレスにより誘導されることが知られている^{4,5)}。そこで、これらがマイクロ波照射によるミトコンドリア傷害の原因であるか解析した。

デスレセプターの一種である TNF-R1 刺激では、Caspase 8 が receptor interacting protein (RIP) 1 や 3 に結合した後断片化し、Caspase 3 を活性化することでアポトーシスを誘導する⁴⁾。マイクロ波照射では、Caspase 8 は照射後 9 時間に有意な活性上昇が起きたものの、その後 Caspase 3 は活性化しなかった (図 5A, 4C)。更に、RIP1 と 3 の発現誘導と RIP 1 と 3 の断片化がほとんど起きなかった (図 5A)。以上

から、マイクロ波による細胞死では、デスレセプター刺激による細胞死の誘導とは異なる可能性が示された。一方で、熱処理群においては、RIP1 と 3 の発現上昇や RIP 1 と 3 の断片化、Caspase 8、3 の活性化が確認され、デスレセプター刺激と同様な細胞死の誘導と推測された。また、小胞体ストレスの有無を調べるため、C/EBP homologous protein (CHOP) 及び Activating transcription factor-4 (ATF-4) の発現量と Caspase 12 の活性を解析した (図 5B)。その結果、マイクロ波照射、熱処理では発現上昇や活性化は見られず、小胞体ストレスが起きていないことが示された。

4. 考察および将来の展望

本研究をまとめると、以下の通りである (図 6)。マイクロ波照射による細胞死のほとんどは、AIF の DNA 断片化によるカスパーゼ非依存的アポトーシスであることが示された。また HSP 70 が過剰発現しておらず、熱ストレスに応答していなかった。一方で熱処理群では、マイクロ波照射よりも生存率低下の割合が小さかった。ミトコンドリアは傷害されず、RIP1 や 3 の発現上昇や断片化、Caspase 8 及び 3 の活性化が確認されたことから、デスレセプター刺激と同様な細胞死の誘導が推測された。また、HSP 70 の過剰発現が確認された。

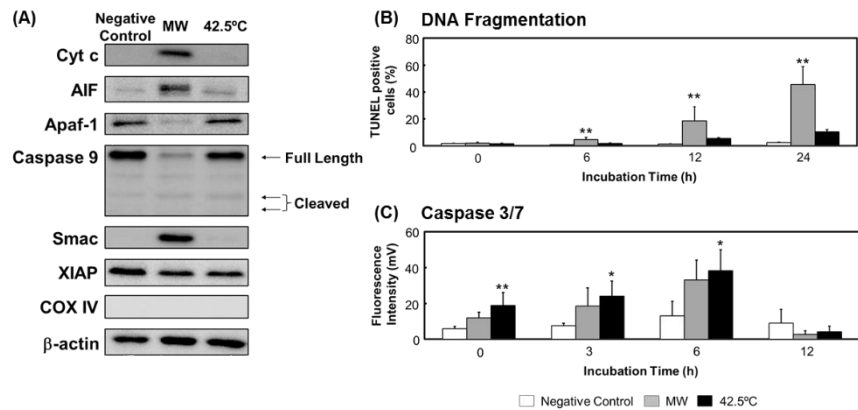


図 4：細胞の Apoptosome 活性 (参考文献 4 の Figure 3 より抜粋)

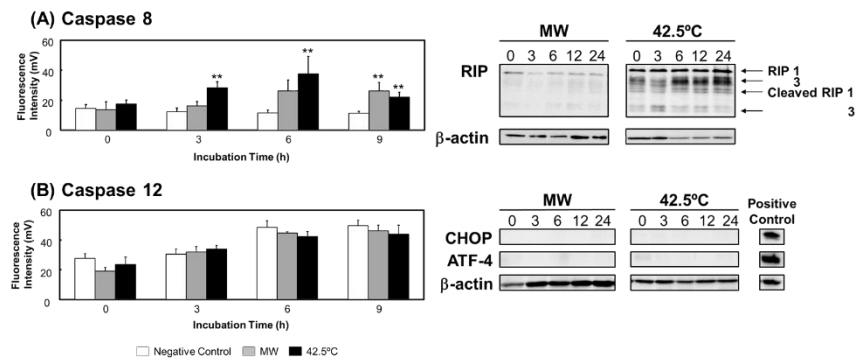


図 5：デスレセプター経路細胞死と小胞体ストレスの解析 (参考文献 4 の Figure 4 より抜粋)

以上から、マイクロ波低温照射による細胞死は、熱処理とは異なる経路で死滅することが示された。今後は新規癌治療法確立のため、本研究を生体に適用し、細胞死の挙動を確認する予定である。

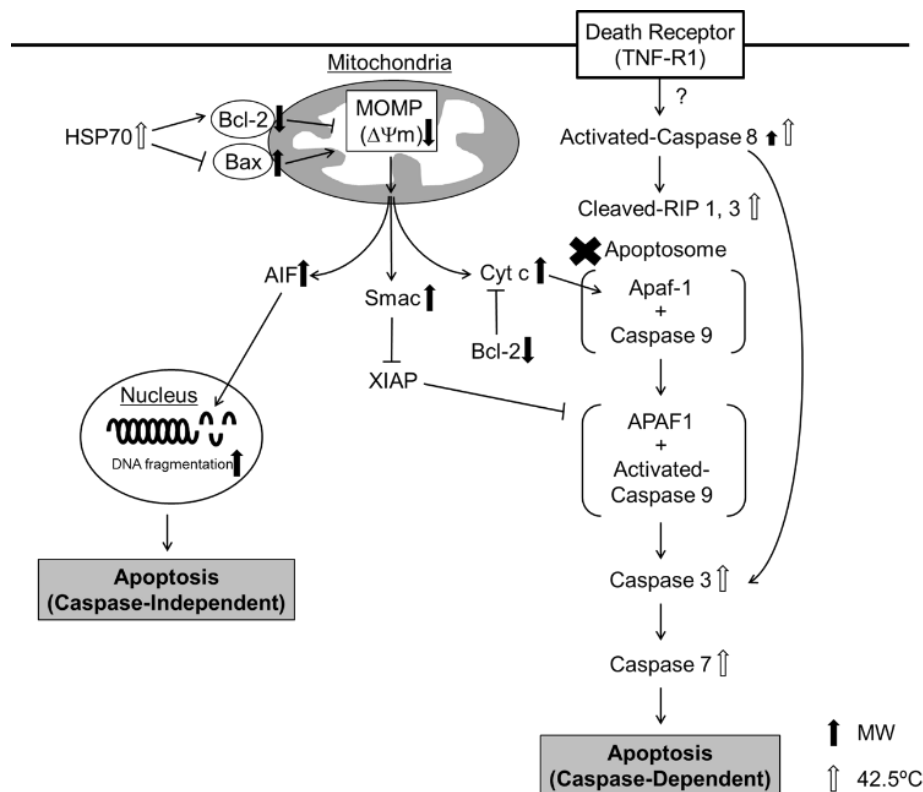


図6：マイクロ波照射による細胞死経路（参考文献4のFigure 6より抜粋）

参考文献

- 1) Sawada T. and Yamada T., *J. Jpn. Petrol. Inst.*, **61**(2), 121-128, 2018.
- 2) Mori I., Ozaki T., Tabuse K., Utsunomiya H., Taniguchi E., Kakudo K., *Pathol Int.*, **59**, 294-299, 2009.
- 3) Asano M., Sakaguchi M., Tanaka S., Kashimura K., Mitani T., Kawase M., Matsumura H., Yamaguchi T., Fujita Y., Tabuse K., Effects of normothermic conditioned microwave irradiation on cultured cells using an irradiation system with semiconductor oscillator and thermo-regulatory applicator. *Sci. Rep.*, **7**, 41244, 2017.
- 4) Asano M., Tanaka S., Sakaguchi M., Matsumura H., Yamaguchi T., Fujita Y., Tabuse K., Normothermic microwave irradiation induces death of HL-60 cells through heat-independent apoptosis., *Sci. Rep.*, **7**(1), 11406 (2017).
- 5) Xu C., Bailly-Maitre B., Reed J.C., *J. Clin. Invest.*, **115**, 2656-2664, 2005.

著者プロフィール



浅野 麻実子 (Mamiko Asano)

＜略歴＞ 2004 年大阪薬科大学薬学部卒業／2010 年大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程修了（薬学博士）／同年国際医療福祉大学薬学部助教／2011 年大阪薬科大学薬学部助手／2017 年理化学研究所研究員／2018 年京都大学生存圏研究所研究員現在に至る。＜研究テーマと抱負＞マイクロ波を用いた癌セラノスティックスの技術開発を行い、医療応用を目指している。＜趣味など＞犬の散歩、ハイキング。