

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790769

研究課題名（和文） 音響力学による新しい皮膚癌治療法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel sonodynamic therapy for skin cancers

研究代表者

松崎 康司（MATSUZAKI YASUSHI）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50322946

研究成果の概要：新規光増感剤 ATX-70 は、培養ヒト有棘細胞癌細胞に対し光力学ならびに音響力学効果を示し、培養マウスメラノーマ細胞に対しても 70%以上の細胞死を生じる音響力学効果がみられた。メラノーマモデルマウスに対して、ATX-70 の濃度、超音波照射時間の延長など様々な条件で施行したが、臨床的および組織学的に有意な音響力学作用は認められず、さらなる研究が必要である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	0	1,000,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	270,000	2,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化に伴い皮膚癌罹患率は増加の一途を辿っている。しかし、高齢や合併症のために外科的処置が不可能な例が少なくない。また、多くの皮膚癌が顔面に生じるため、Quality of Life (QOL) の観点からより低侵襲性で整容に優れる治療法が求められている。皮膚科領域においては、生体色素であるポルフィリン前駆物質（5-アミノレブリン酸）

を光増感剤として、レーザー光や可視光線の照射を組み合わせる光力学療法が表在性皮膚癌に対し応用され効果を上げている。しかし、可視光線は皮膚表層の約 2～5 mm 深しか作用を及ぼすことができず、それより深層に浸潤する病巣や、光を遮断するメラニン色素を有するメラノーマでは、光力学効果を発揮することができない。そこで、われわれは光線よりはるかに深達性に優れる超音波に

着目した。超音波のキャビテーション現象により生じる光エネルギーと光増感剤を併用することで、光力学療法と同様の抗腫瘍効果が皮膚深部組織で行えるものと考えた（音響力学療法）。これにより、光力学療法では治療できなかったメラノーマや深在性皮膚癌の組織を非侵襲的に死に至らしめることが可能になると考えた。また、生体の最外層に位置する皮膚は、超音波を最も容易に照射することができる臓器であり、音響力学療法の開発に最適な条件を備えている。

## 2. 研究の目的

光増感剤である gallium-dueteroporphyrin (ATX-70：光ケミカル研究所提供) は腫瘍細胞に取り込まれた後、細胞内ミトコンドリアに集積し、超音波による音響により励起状態となり、それに伴い発生する一重項酸素がその腫瘍細胞をアポトーシスに誘導すると考えられている（音響力学効果）。そこで、皮膚悪性腫瘍である有棘細胞癌、メラノーマに対する音響力学効果の有効性を確認することを目的に、培養細胞ならびにメラノーマモデルマウスを用い、細胞死・細胞傷害について、比較検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞における音響力学効果

①培養腫瘍細胞として、ヒト有棘細胞癌細胞 (A431)、マウスメラノーマ細胞 (B16) を培養。

②トリプシン処理後、 $1 \times 10^5$  の細胞に増感剤 ATX-70 (最終濃度 5、 $10 \mu\text{M}$ ) を添加、超音波刺激または可視光照射後、トリパン・ブルー染色、LDH 活性測定キットで細胞死を評価。

(2) in vivo における音響力学の抗腫瘍効果

①B16細胞を培養し、 $5 \times 10^6$  個の細胞を回収。細胞を 0.1 ml 1 X PBS に戻し、ヌードマ

ウス (BALB/cAJcl-nu/nu, homo) 背部皮膚に皮内投与。

②背部皮膚に形成された腫瘍に、ATX-70 を投与。

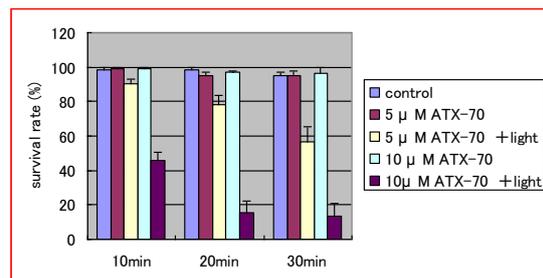
③24 時間後、同部位に1~10分間の超音波照射を行い、腫瘍の経時的変化を観察。

④照射後、1、3、7日目に照射部位より皮膚を採取し、組織学的に腫瘍細胞の変性・壊死について比較検討した。

## 4. 研究成果

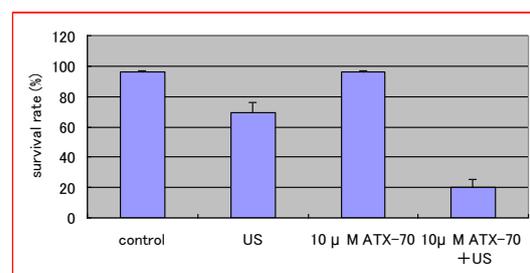
(1) 増感剤 ATX-70 の培養ヒト有棘細胞癌細胞 (A431) における光力学的効果

5、 $10 \mu\text{M}$  の ATX-70 では、可視光照射下で経時的に殺細胞効果が認められるが、遮光下では ATX-70 自身による影響はみられず、有棘細胞癌に対し光増感剤として効果的に作用することが確認された。



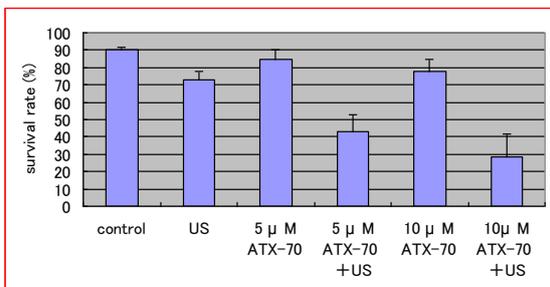
(2) 増感剤 ATX-70 の A431 細胞における音響学的効果

超音波刺激単独でも約 25%の殺細胞効果がみられるが、 $10 \mu\text{M}$  ATX-70 を添加後、30 秒間超音波刺激を加えた A431 細胞では、約 80%の細胞死を認めた。



(3) 増感剤 ATX-70 のマウスメラノーマ細胞 (B16) における音響学的効果

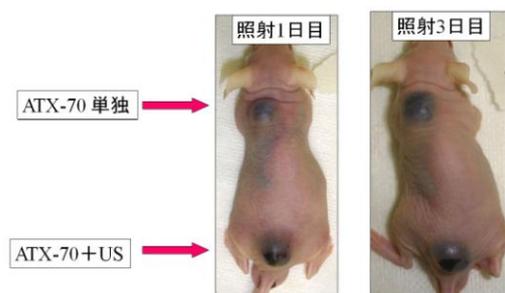
A431 細胞同様、超音波刺激、ATX-70 添加単独でも 20~30%の殺細胞作用がみられるが、5、10  $\mu$  M ATX-70 と超音波刺激の併用で、それぞれ 58%、70%の細胞死を認めた。



(4) B16 細胞の各刺激における細胞障害率  
各刺激後に B16 細胞の細胞溶解液を回収、LDH 活性を測定したところ、音響力学効果により 40%以上の細胞死を確認した。

細胞傷害率	
US	24.8%
10 $\mu$ M ATX-70	13.8%
10 $\mu$ M ATX-70 + US	41.5%

(5) in vivo における音響力学の有効性  
腫瘍形成後、増感剤 ATX-70 を投与し、超音波を照射、経時的に経過観察したが、臨床的に腫瘍抑制作用はみられず、また組織学的にも腫瘍細胞の変性などは認められなかった。



## 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 14 件)

- ① Matsuzaki Y, et al. (1 番目/5 名)  
Localized pagetoid reticulosis (Woringer-Kolopp disease) in early childhood. J Am Acad Dermatol, in press. 査読有
- ② Oshima H, Matsuzaki Y, et al. (2/5)  
CD20+ primary cutaneous T-cell lymphoma presenting as a solitary extensive plaque. Br J Dermatol 160: 894-6, 2009. 査読有
- ③ Rokunohe A, Nakano H, Aizu T, Kaneko T, Nakajima K, Ikenaga S, Matsuzaki Y, et al. (7/10) Significance of sentinel node biopsy in the management of squamous cell carcinoma arising from recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J Dermatol 35: 336-40, 2008. 査読有
- ④ Yamamoto C, Tamai K, Nakano H, Matsuzaki Y, et al. (4/6) Vitamin D3 inhibits expression of bullous pemphigoid antigen 1 through post-transcriptional mechanism without new protein synthesis. J Dermatol Sci 50: 155-8, 2008. 査読有
- ⑤ Nishizawa A, Toyomaki Y, Nakano A, Takeuchi S, Matsuzaki Y, et al. (5/9)  
A novel H1 domain mutation in the keratin 2 gene in a Japanese family with ichthyosis bullosa of Siemens. Br J Dermatol 156: 1042-4, 2007. 査読有
- ⑥ Kitamura H, Matsuzaki Y, et al. (2/7)  
Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)

- expression in human epidermal keratinocytes. *J Dermatol Sci* 45: 127-34, 2007. 査読有
- ⑦ Kaneko T, Tamai K, Matsuzaki Y, et al. (3/10) Interferon- $\gamma$  down-regulates expression of the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene (BPAG1) in epidermal keratinocytes via novel chimeric sequences of ISRE and GAS. *Exp Dermatol* 15: 308-14, 2006. 査読有
- ⑧ Nakano H, Ikenaga S, Aizu T, Kaneko T, Matsuzaki Y, et al. (5/8) Human metallothionein gene expression is upregulated by beta-thujaplicin: possible involvement of protein kinase C and reactive oxygen species. *Biol Pharm Bull* 29: 55-9, 2006. 査読有
- ⑨ Jiang Q, Matsuzaki Y, co-first, et al. (1/4) Transcriptional regulation and characterization of the promoter region of the human ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* 126: 325-35, 2006. 査読有
- ⑩ Matsuzaki Y, et al. (1/5) Tissue-specific expression of the ABCC6 gene. *J Invest Dermatol* 125: 900-9, 2005. 査読有
- ⑪ Miyano T, Tobinaga Y, Kanno T, Matsuzaki Y, et al. (4/7) Sugar micro needles as transdermic drug delivery system. *Biomed Microdevices* 7: 185-8, 2005. 査読有
- ⑫ Takeda H, Kaneko T, Harada K, Matsuzaki Y, et al. (4/6) Successful treatment of lymphadenosis benigna cutis with topical photodynamic therapy with delta-aminolevulinic acid. *Dermatology* 211: 264-6, 2005. 査読有
- ⑬ Klement JF, Matsuzaki Y, co-first, et al. (1/11) Targeted ablation of the *Abcc6* gene results in ectopic mineralization of connective tissues. *Mol Cell Biol* 25: 8299-310, 2005. 査読有
- ⑭ Matsuzaki Y, et al. (1/6) Keratinocyte responsive element 3: Analysis of a keratinocyte-specific regulatory sequence in the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene promoter. *J Invest Dermatol* 120: 308-12, 2003. 査読有
- [学会発表] (計4件)
- ① 木村一之、UVBとウイルス感染が retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) 発現に与える影響について、日本皮膚科学会青森地方会第 344 回例会、2008.12.7、弘前
- ② Kimura K, Effect of ultraviolet B irradiation and viral infection on retinoic acid-inducible gene-I expression, 37th Annual Meeting of the ESDR, 2007.9.5-8, Switzerland
- ③ Minakawa S, Tumor necrosis factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  synergistically induce retinoic acid-inducible gene-I in cultured human keratinocytes, 36th Annual Meeting of the ESDR, 2006.9.7-9, France
- ④ Kitamura H, Cytokine modulation of retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I) expression in human epidermal keratinocytes in vivo and in vitro. 67th Annual Meeting of the SID,

2006. 5. 3-7, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松崎 康司 (MATSUZAKI YASUSHI)  
弘前大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：50322946

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：