

機関番号：13301  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20590307  
 研究課題名（和文） 生体内における化学療法・放射線療法による形態学的癌細胞死のリアルタイム画像検証  
 研究課題名（英文） Real time imaging & morphological analysis of cell death induced by chemotherapy & radiotherapy *in vivo*  
 研究代表者  
 白井 寿治（SHIRAI TOSHIHARU）  
 金沢大学・医学系・助教  
 研究者番号：20397186

## 研究成果の概要（和文）：

核に GFP、細胞質に RFP が発現した 2 色のがん細胞を用い、マウスの血管内に転移巣を形成させ、抗癌剤投与もしくは紫外線照射によりがん細胞の細胞死を誘導して、その形態的違いについて *in vivo* での観察を行った。その結果、アポトーシスとネクローシスという 2 つのカテゴリーでは分類しきれない数種類の細胞死の形態が存在する事が観察できた。またがん細胞の種類や投与する抗癌剤の種類、照射する放射線の波長により、それらに違いがあることが分かった。

## 研究成果の概要（英文）：

We observed morphology of *in vivo* cell death, induced by anti-cancer agent or ultraviolet light, using dual-color cancer cells in which GFP was expressing in nucleus and RFP in cytoplasm. As results, we found several morphologies of cell death, even though there is usually said to be only two categories for cell death, apoptosis and necrosis. We also found that those morphologic differences were dependent on cell line, anti-cancer drug, and wave length of radiation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 1,300,000 | 390,000   | 1,690,000 |
| 2009 年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2010 年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：骨軟部腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：(1) がん細胞 (2) 形態学的細 (3) リアルタイム (4) GFP (5) RFP (6) *in vivo* (7) 紫外線

## 1. 研究開始当初の背景

新規抗癌剤の開発や、従来の抗癌剤の効果

を増強する新規薬剤などの登場により、これまで治癒が望めなかった担癌症例でも、化

学療法を行うことで長期の無病期間や十分な延命効果が得られるようになった。また癌の種類や場所によっては放射線治療も十分根治を望める治療手段の一つであり、これに外科的手術を併せた集学的治療が大きな効果を示している。

一般に化学療法・放射線治療が奏功した場合には、腫瘍は小さくなったり中心部が壊死に陥ったりする。術後摘出した腫瘍を観察しても、壊死に陥った部位は本来の腫瘍の部位とは明らかに性状が異なっている。これらを臨床の立場では「壊死」と呼んでいる。一方基礎研究においては、現在アポトーシスについての研究が活発に行われている。本来は特異な形態をたどりつつ細胞死に至る一つの過程であったが、これまでの研究によりがん研究のみならず、人の成長などにも大きく関与することはすでに周知の事実である。一般にアポトーシスを起こすと、その細胞は縮小しクロマチンが凝集、核が断片化しアポトーシス小体が形成され、最後には炎症を起こすことなく消滅する。非常に特異な細胞死であり、いまだに研究を行う余地のある分野であると考えられる。

このように非常に特異な細胞死であるアポトーシスは、本来形態学の見地から分類された。そして現段階では基礎研究の立場からの「アポトーシス」と、臨床の立場からの「壊死」という2つしか細胞死を分類する方法がない。そこで、もともと形態学的に分類されたアポトーシスに続いて、同じく形態学的にアポトーシスとは異なる細胞死を分類し、その医学的な意味を研究することを思うに至った。

## 2. 研究の目的

我々はすでに緑色蛍光蛋白 (GFP) や赤色蛍光蛋白 (RFP) で標識した癌細胞をマウス

に血管内注入あるいは移植することにより、生きたマウスにおける癌の血行性転移のダイナミックな各過程を高解像度の蛍光顕微鏡を使用して連続的に且つ視覚的に捉えることに成功している。このモデルではがん細胞1つ1つを核と細胞質を別々にはっきりと視認できるため、化学療法や放射線療法を併用することで、形態学的に新しい細胞死を観察することが可能となると思われる。

他の研究グループによりこれまでに報告されている研究の多くは、マウスに移植したGFP、RFP、もしくはルシフェラーゼによって標識された癌の腫瘍塊をマウス全体位から撮影し、主として局所進展（周辺組織への浸潤）を観察したものである。皮下に移植した癌が大きくなっていく様子を非侵襲的に観察することが可能である。これに化学療法などを行い、その腫瘍塊の大きさを調べている。手技的にも容易であり、常に同じマウスを用いて定期的ながん細胞を観察することが可能であり、データのばらつきが少なくなるという利点がある。マウスを定期的に犠牲死させる必要がなく、ひとつの実験で使用するマウスの数も少なくて済むため、管理面・経済面からも優れている。本研究ではシングルセルレベルで細胞死を視覚化する。これまでにいくつかの施設でこのような試みが行われたことがある。ある施設では肝臓における癌細胞の動態を観察している。肝臓は臨床的にも非常に重要な臓器であり、癌の肝転移を研究することはそのまま臨床にも直結するが、マウスは生きた状態にあるため、肝臓を露出しているため長時間の観察には不向きである。他の施設ではマウスの尾静脈に癌細胞を注射した直後にマウスを犠牲死させ、その肺を取り出して観察している。この状態ならば癌細胞をしっかりと確認できるが、すでに心臓からの血流はなく、自然な状態を表してい

るとは考えられないという欠点がある。

本研究の目的は、前述のマウスでのがん細胞観察モデルを用いて、生体内での細胞死において、どのような形態があるのかを観察し、その形態についてどのような違いがあるかについて検証し、分類化を行っていくことである。本モデルでは経時的な観察も可能であるため、生きたマウスというヒトの体内と出来るだけ近い環境で細胞死を観察する。そして化学療法を行う際にも、作用点の違ういくつかの抗癌剤を用いることで、ある種の抗癌剤に特異的な形態変化や、抗癌剤投与後、おおよそ一定の時間で生じる変化についても観察を行う。また放射線治療を行うことで、化学療法のとくとは違った形態変化が観察されると考えられ、それらを可能な限り時系列で観察する。

### 3. 研究の方法

今回の研究では核がGFP、細胞質がRFPで標識された2色のがん細胞を用いた。この細胞を使用することで核および細胞質の変化を別々に観察することができ、細胞死を形態的にリアルタイムに観察することが可能であった。

(1) 2色で蛍光標識されたマウス乳癌細胞もしくはヒト線維肉腫細胞をヌードマウスの腹部静脈内に直接移植し、転移巣を作成させた。その後、尾静脈より抗癌剤（シスプラチン、アドリアマイシン）を投与し、蛍光顕微鏡を用いて生きたマウスの中でのがん細胞の形態学的な細胞死を単一細胞レベルで継時的に観察した。

(2) (1)の実験に引き続き、細胞死を誘導する方法として放射線の代わりに紫外線を用いた。紫外線を照射して癌細胞の細胞死を誘導し、どのような形態

学的変化が生じるかを観察した。また、照射する紫外線の波長の長さや照射時間を変えることでどのような変化が生じるかも観察した。

### 4. 研究成果

(1) 核が凝集せずに細胞死を起こすネクロシスでは、核がその形を維持しながら細胞質から脱核するタイプ、核が紡錘形に変形しながら脱核するタイプ、また細胞質が分解され核が取り残されるタイプが確認できた。核が凝集して細胞死するアポトーシスでは、核が断片化しながら多数の核小体を作っていくタイプと、一旦凝集した一つの核から複数の核小体ができるタイプが確認できた。一般的にネクロシスとアポトーシスのみにしか分類されていない形態学的細胞死だが、実際にはそれぞれの中に更に異なる形態変化が確認できた。

(2) 紫外線照射により観察できたがん細胞の細胞死の形態としては、①核・細胞質とも形を維持しながら分離する②細胞質が分解され核が取り残される③核がリング状になる④核・細胞質ともに断片化し分散していく⑤核だけが凝集し細胞質が丸く膨張する⑥核小体の一部と細胞質の一部が一緒になって細胞からちぎれていく、などが観察できた。これらの細胞死は、紫外線照射後に徐々に進行していくのではなく、突如として始まり短時間のうちに終了する事がリアルタイムの観察で明らかになった。また、癌細胞の種類や紫外線の波長に依存して細胞死の形態に特徴があることもわかった。

抗癌剤を用いた実験ではネクロシスとアポトーシスのみにしか分類され

ていない形態学的細胞死の中に更に異なる形態変化を確認したが、紫外線を用いた実験からは更に細胞の種類や治療媒体の性質によって細胞死の形態変化に特徴があることが分かった。

これまでの観察を総合すると、細胞死の形態にはアポトーシスとネクローシスという2つのカテゴリーでは分類しきれない数種類の細胞死が存在すると考えることができる。今後は、これまでのデータを解析した上で、細胞死の新たな形態学的な分類化を行い、その違いがアポトーシスやネクローシスに関連する細胞内シグナルなどと、どの様な関連があるかを深く研究していきたい。

#### 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 20 件)

- 1 Shirai T, Shimizu T, Ohtani K, Zen Y, Takaya M, Tsuchiya H. Antibacterial iodine-supported titanium implants. *Acta Biomater* 7: 1928-1933, 2011. (査読あり)
- 2 Tanzawa Y, Tsuchiya H, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Takeuchi A, Kawahara M, Tomita K. Potentiation of the antitumor effect of calcium phosphate cement containing anticancer drug and caffeine on rat osteosarcoma. *J Orthop Sci* 16:77-84, 2011. (査読あり)
- 3 白井寿治, 土屋弘行, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 富田勝郎: 小児骨肉腫患者に対するカフェイン併用化学療法の治療成績. *日小整会誌* 20: 159-163, 2011. (査読あり)
- 4 Miwa S, Kitamura S, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Takeuchi A, Nojima T, Tsuchiya H. Desmoplastic small round cell tumour successfully treated with caffeine-assisted chemotherapy: a case report and review of the literature. *Anticancer Res.* 30:3769-3774, 2010. (査読あり)
- 5 Kato S, Kawahara N, Murakami H, Demura S, Shirai T, Tsuchiya H, Tomita K: Multi-level total en bloc spondylectomy for solitary lumbar metastasis of myxoid liposarcoma. *Orthopedics* 33:446, 2010. (査読あり)
- 6 Miwa S, Kitamura S, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Takeuchi A, Nojima T, Tsuchiya H: Desmoplastic small round cell tumour successfully treated with caffeine-assisted chemotherapy: a case report and review of the literature. *Anticancer Res* 30:3769-3774, 2010. (査読あり)
- 7 Tsuchiya H, Nishida H, Srisawat P, Shirai T, Hayashi K, Takeuchi A, Yamamoto N, Tomita K: Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. *J Orthop Sci* 15:340-349, 2010. (査読あり)
- 8 三輪真嗣, 白井寿治, 西田英司, 林克洋, 武内章彦, 土屋弘行: 大腿骨近位悪性骨腫瘍に対する有茎液体窒素処理骨と人工骨頭を併用した再建術の検討. *整形・災害外科* 53: 1533-1538, 2010. (査読あり)
- 9 西田英司, 土屋弘行, 白井寿治, 林克洋, 武内章彦, 悪性骨軟部腫瘍に対する樹状細胞を用いた免疫療法の試み 臨床応用のための安全性・有効性試験. *中部整災誌* 53: 663-664, 2010. (査読なし)
- 10 三輪真嗣, 土屋弘行, 白井寿治, 林克洋, 大成一誓, 富田勝郎, 滝淳一: 悪性骨軟部腫瘍の治療効果判定における<sup>99m</sup>Tc-MIBI シンチグラムの有用性の検討 201Tl シンチグラム, 血管造影との比較. *臨床整形外科* 45: 157-163, 2010. (査読あり)
- 11 大成一誓, 土屋弘行, 白井寿治, 林克洋, 三輪真嗣, 富田勝郎: 液体窒素処理骨で再建した大腿骨全置換の2例. *中部整災誌* 53: 401-402, 2010. (査読なし)
- 12 武内章彦, 土屋弘行, 白井寿治, 林克洋, 三輪真嗣, 富田勝郎: 高悪性度軟部肉腫に対するカフェイン併用化学療法の治療成績. *中部整災誌* 53: 661-662, 2010. (査読なし)

- 13 Takeuchi A, Tsuchiya H, Shirai T, Hayashi K, Nishida H, Tomita K : Occlusive dressing for large soft tissue defects following soft tissue tumor excision. *J Orthop Sci* 14:385-390, 2009. (査読あり)
- 14 Shirai T, Tsuchiya H, Shimizu T, Ohtani K, Zen Y, Tomita K : Prevention of Pin Tract Infection with Titanium-Copper Alloys. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 91B:373-380, 2009. (査読あり)
- 15 Kimura H, Tsuchiya H, Shirai T, Nishida H, Hayashi K, Takeuchi A, Ohnari I, Tomita K : Caffeine-potentiased chemotherapy for metastatic osteosarcoma. *J Orthop Sci* 14:556-565, 2009. (査読あり)
- 16 Tanzawa Y, Tsuchiya H, Shirai T, Hayashi K, Yo Z, Tomita K. Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed after implantation. *J Orthop Sci* 14:761-768, 2009. (査読あり)
- 17 Hayashi K, Tsuchiya H, Yamamoto N, Shirai T, Yamauchi K, Takeuchi A, Kawahara M, Miyamoto K, Tomita K : Impact of serum caffeine monitoring on adverse effects and chemotherapeutic responses to caffeine-potentiased chemotherapy for osteosarcoma. *J Orthop Sci* 14:253-258, 2009. (査読あり)
- 18 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎 : チタン銅合金による創外固定ピン感染の予防—ステンレススチールとチタンをコントロールとした *in vitro* 及び *in vivo* 研究—. *日本創外固定・骨延長学会雑誌* 20 : 31-35, 2009. (査読あり)
- 19 大成一誓, 土屋弘行, 白井寿治, 林克洋, 武内章彦, 安竹秀俊 : 石灰化を伴った手指の血管平滑筋腫の 1 例. *中部整災誌* 52 : 435-436, 2009. (査読なし)
- 20 Tsuchiya H, Shirai T, Morsy A, Sakayama K, Wada T, Kusuzaki K, Sugita T, Tomita K: Safety of external fixation during postoperative chemotherapy. *J Bone Joint Surg* 90-B: 924-928, 2008. (査読あり)  
[学会発表] (計 18 件)
1. 白井寿治, 西田英司, 渡邊孝治, 野村一世, 土屋弘行. ヨード担持チタン製創外固定ピン刺入による感染予防の試み (主題 : 創外固定の将来). 第 24 回日本創外固定・骨延長学会. 2011 年 2 月 11 - 12 日 ; 札幌パークホテル (北海道).
2. 白井寿治, 清水徹, 全陽, 高谷松文, 土屋弘行. 抗菌作用を有するヨード担持チタン創外固定ピンの開発. 第 30 回 整形外科バイオマテリアル研究会. 2010 年 12 月 4 日 ; 京都テルサ (京都).
3. 白井寿治, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行. カフェイン併用化学療法を行った四肢骨肉腫 stage IIB 患者の治療成績. 第 48 回日本癌治療学会学術集会. 2010 年 10 月 28 - 30 日 ; 国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都 (京都)
4. 白井寿治, 山本憲男, 林克洋, 西田英司, 木村浩明, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行. 単純性骨嚢腫に対するドレナージ法の治療成績. 第 115 回中部日本整形外科災害外科学会. 2010 年 10 月 8 - 9 日 ; ザ・リッツ・カールトン大阪 (大阪).
5. 白井寿治, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行. 小児骨肉腫患者に対するカフェイン併用化学療法の治療成績 (シンポジウム : 小児悪性骨腫瘍の集学的治療とその成績). 第 43 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2010 年 7 月 15 - 16 日 ; 京王プラザホテル (東京).
6. 白井寿治, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行. カフェイン併用化学療法を行った四肢骨肉腫 stage IIB 患者の治療成績 (最優秀ポスター賞). 第 43 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2010 年 7 月 15 - 16 日 ; 京王プラザホテル (東京).
7. 白井寿治, 林克洋, 西田英司, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行, 高谷松文. ヨード加工インプラントによる術後感

- 染症の治療と予防. 第 83 回日本整形外科学会学術総会. 2010 年 5 月 27 - 30 日; 東京フォーラム (東京).
8. 白井寿治, 土屋弘行, 西田英司, 林克洋, 大成一誓, 武内章彦, 三輪真嗣, 富田勝郎. 小児骨肉腫患者に対するカフェイン併用化学療法の治療成績. 第 20 回日本小児整形外科学会学術集会. 2009 年 12 月 4-5 日; ひめぎんホール (愛媛).
9. 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎, 高谷松文. 抗菌作用を有するヨード担持チタン創外固定ピンの開発. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2009 年 11 月 5-6 日; パシフィコ横浜 (神奈川).
10. 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎, 高谷松文. 抗菌作用を有するヨード担持チタン創外固定ピンの開発. 第 113 回中部日本整形外科災害外科学会. 2009 年 10 月 2-3 日; 神戸国際展示場 (兵庫).
11. 白井寿治, 土屋弘行, 西田英司, 高田宗知, 富田勝郎. テイラーフレームを 41 か月装着し続けた下肢短縮変形症の 1 例. 第 15 回日本イリザロフ研究会. 2009 年 9 月 19 日; フォーシーズンズホテル椿山荘 (東京).
12. 白井寿治, 土屋弘行, 西田英司, 林克洋, 大成一誓, 三輪真嗣, 富田勝郎. ヨード担持腫瘍用人工膝関節で治癒した, 液体窒素処理骨感染症の 1 例. 第 12 回骨軟部腫瘍セミナー. 2009 年 8 月 29 日; リーガロイヤル京都 (京都).
13. 白井寿治, 土屋弘行, 林克洋, 大成一誓, 三輪真嗣, 富田勝郎. 四肢骨巨細胞腫に対する人工骨を用いた治療成績. 第 42 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集. 2009 年 7 月 16-17 日; パシフィコ横浜 (神奈川).
14. 白井寿治, 土屋弘行, 滝淳一, 林克洋, 大成一誓, 武内章彦, 三輪真嗣, 富田勝郎. 骨肉種に対する化学療法効果判定における  $^{99m}\text{Tc}$ -MIBI シンチグラムの有用性. 第 82 回日本整形外科学会学術総会. 2009 年 5 月 14-17 日; 福岡国際会議場 (福岡).
15. 白井寿治, 土屋弘行, 林克洋, 大成一誓, 三輪真嗣, 富田勝郎. 大腿骨遠位骨肉腫症例の再建法. 骨軟部腫瘍外科研究会. 2009 年 3 月 28 日; がん研有明病院 (東京).
16. 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎, 高谷松文. 抗菌作用を有するヨード担持チタン創外固定ピンの開発. 第 22 回日本創外固定・骨延長学会. 2009 年 3 月 6-7 日; ウェスティン都ホテル京都 (京都).
17. 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎. 抗菌作用を有するチタン銅合金創外固定ピンの開発. 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2008 年 10 月 23-24 日; 京都国際会館 (京都).
18. 白井寿治, 土屋弘行, 清水徹, 全陽, 富田勝郎. 抗菌作用を有するチタン銅合金創外固定ピンの開発. 第 111 回中部日本整形外科災害外科学会. 2008 年 10 月 17-18 日; 石川県立音楽堂 (石川).
6. 研究組織  
(1)研究代表者  
白井寿治 (Shirai Toshiharu)  
金沢大学・医学系・助教  
研究者番号: 20397186
- (2)研究分担者  
なし
- (3)連携研究者  
なし