

平成 22 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390390
 研究課題名（和文）アクリジン色素とストロボ光を用いた骨・軟部肉腫の同時・瞬間的診断治療戦略の開発
 研究課題名（英文）Development of rapid and simultaneous diagnosis and therapy for musculoskeletal sarcomas using acridine orange excited by high-power flash light
 研究代表者
 楠崎 克之(KUSUZAKI KATSUYUKI)
 京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：30177993

研究成果の概要（和文）：

アクリジンオレンジ(AO)という色素はがんの特異的に集積して光が当たると蛍光を発生すると同時にがん細胞だけを瞬時に選択的に破壊します。これを利用して骨軟部腫瘍の蛍光による早期診断と治療を同時に行う方法の開発を行いました。その結果キセノン光源の青色ストロボ光を用いると皮膚に近い肉腫であれば蛍光で局在を診断でき、全光照射で強い腫瘍増殖抑制効果も得られることが分かり、この方法が肉腫の診断治療に応用できる可能性が示されました。

研究成果の概要（英文）：

To develop photodynamic diagnosis and photodynamic therapy using acridine orange excited by high-power flash light provided from xenon lamp in musculoskeletal sarcomas, we performed this study using mouse osteosarcoma model. Results showed that it was possible to brilliantly detect tumor localization through skin by PDD and to strongly inhibit tumor growth by PDT after intravenous AO injection followed by flash light illumination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：骨軟部腫瘍の診断と治療

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 整形外科

キーワード：アクリジンオレンジ、光線力学的診断、光線力学的治療法、骨軟部腫瘍、ストロボ光

1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍の外科的治療は広範切除が原則で重要な神経や血管を巻き込んでいる場合は切除により患肢の機能が大きく損な

われる。我々はこれを改善するために1999年からアクリジンオレンジ(AO)を用いた光線力学的治療法(PDT)および放射線力学的治療法(RDT)を開発して臨床応用してきた。そ

の結果本治療法により患肢機能がほぼ正常に保たれなお且つ局所再発率も広範囲切除よりも低く抑えることができることが分かった。そこでこの治療法をさらに効率よく行うためのいくつかの方法論的工夫を行うことが次のステップとして必要になってきた。

2. 研究の目的

本研究ではAO-PDDとAO-PDTを同時に瞬時的に行う方法を開発することを目的とした。

(1)AOは腫瘍への選択的な集積性がありまた青色の励起光で緑色の蛍光を発生するために手術中に腫瘍の局在を蛍光顕微鏡視下に肉眼的に観察することが可能である(fluorovisualization effect)。この性質を利用して体外から励起光を照射して腫瘍の局在を蛍光で検知する光線力学的診断(PDD)が可能であるあるか否かを明らかにすることを目的とした。

(2)上記の方法で腫瘍のPDDが可能の場合、そのまま光線照射を続けることにより同時にPDTの効果も期待できる。

(3)このAOを用いたPDDとPDTを同時にしかも短時間(瞬時的)で行うためにはより強力な光源と高感度のCCDカメラが必要になる。

(4)またこの方法にはAOの全身投与が必要になり、静脈内投与した場合の安全性とPDDおよびPDTの効果を確認する必要がある。

(5)AOが悪性腫瘍に選択的に集積するメカニズムについてはまだ不明な点が多くこれを解明する必要がある。

(6)AO-PDTの殺腫瘍細胞効果のメカニズムについても未だに不明な点が多くこれも解明する必要がある。

3. 研究の方法

(1)AO-PDD効果の検討

ヌードマウス背部皮下、骨内にLM8骨肉腫株を移植し、0.1~10.0mg/kgの濃度のAO溶液を尾静脈から注射した後1時間30後に強力なキセノン光源から選択した青色(490nm)ストロボ光(flash light: FL)を照射して高感度CCDカメラで腫瘍の局在を蛍光画像として検知できるかどうかを検討した。またストロボ光以外にも青色LEDを用いたPDDについても検討した。

(2)AO-PDT効果の検討

LM8培養細胞およびC3Hブラックマウス背部皮下に移植したLM8骨肉腫モデルに対し

てFL光を照射して腫瘍細胞への殺細胞効果および腫瘍増殖抑制効果を検討した。また肺転移巣に対する転移抑制効果についても同時に検討した。

(3)AO安全性試験

AOの経静脈的全身投与の急性毒性試験をAOの濃度を変えてC3Hブラックマウスを用いてLD50で評価した。また三菱安全科学研究所に依頼してさらに正確な安全性試験を行った。

(4)AOの腫瘍集積メカニズム

臨床症例の新鮮骨軟部腫瘍切除標本を用いて腫瘍内および周囲の筋肉、脂肪組織のpHeを測定し、これとAOの蛍光強度を比較した。また培養骨肉腫細胞を用いて細胞内のpHを変化させたときのAOの蛍光染色性や局在について共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。

(5)AOの殺腫瘍細胞効果メカニズム

培養骨肉腫細胞を用いてAO-PDT後の細胞死の形態学的変化を倒立型共焦点レーザー顕微鏡および倒立蛍光顕微鏡で経時的に観察した。また各種の阻害時を用いて殺細胞効果への影響を検討した。

4. 研究成果

(1)AO-PDD効果の検討

1.0~10.0mg/kgの濃度のAOを尾静脈から投与した群では体外からのFL光照射で腫瘍からの蛍光をCCDカメラで撮像することが可能であった。また周囲の筋肉組織とのコントラストがもっとも強いのは投与後1時間30分で2時間30ぐらいまで良好なコントラストと強い蛍光を認めた(図1)。



図1 マウス移植骨肉腫AO蛍光像

ただし、FL光は照度が強いために周囲組織からの反射光や自家蛍光の誘発によると考えられるアーティファクトが強くなる傾向があった。これに対し青色のLEDを励起光にした場合は光量を調節して真っ暗な状態で弱い光で励起してCCDカメラの感度を上げるとより安定した鮮やかな蛍光画像を得られることが分かった。PDDにはLEDのほうが適している可能性が示唆されたが、撮影

条件についてはさらに検討が必要であると考へた。腫瘍の局在部位との関連では肺転移巣はマウス体外から検知することは困難であったが、大腿骨に移植した腫瘍は直径5mm程度でも蛍光像を体外からCCDカメラで検出できた。

(2)AO-PDT 効果の検討

PDTの効果については *in vitro* でも *in vivo* でも FL 光の方が従来の持続光よりも強い殺細胞効果を示すことが判明した。また *in vivo* で FL 光照射群では肺転移巣の数がコントロール群に比較して著明に減少していることが分かった。この原因としては局所の腫瘍の増殖抑制による可能性と、肺転移巣にも強力な FL 光が到達して AO-PDT による腫瘍増殖抑制効果が発揮された可能性がある。また AO-PDT による腫瘍細胞内のライソゾームの酵素が障害され細胞外の基質消化ができなくなり腫瘍細胞の浸潤が抑制された可能性もある。最新の我々のマトリジェルを使った研究でも AO-PDT 後の骨肉腫細胞の細胞浸潤能がコントロールと比較して著明に低下していることは明らかとなっている。現在これらの細胞のカテプシン D,E, L の活性の変化を測定している。

(3) AO 安全性試験

マウスを用いた試験では AO の静脈内投与による LD50 は 30mg/kg と見積もられた。临床上必要な AO の濃度は少なくとも 1mg/kg であり、安全域であると考えられる。AO は経口投与のほうが安全性が高く人に対して 500mg の投与でも全く毒性を示さなかったという報告もある。動物実験ではマウスに 1200mg を分割投与しても異常がなつたとの報告もある。現在は経口による全身投与をビーグル犬を用いて行い安全性について検討している。

(4)AO の腫瘍集積メカニズム

新鮮人骨軟部腫瘍を用いた研究では悪性腫瘍は pHe が 6.5 前後で酸性に傾いていることが判明し、AO の蛍光強度もこの pHe が低いほど高いことが分かった。良性腫瘍や筋肉および脂肪組織は pHe が高く AO の蛍光強度も低いことが分かった。このことから AO は細胞外の pH が低い腫瘍に集積しやすいことが分かった。また細胞レベルでは AO はライソゾームに強く集積してオレンジ色の蛍光を発していた。また細胞質内および核小体から緑色の蛍光を発していた。後者は ribosomal RNA および transfer RNA に結合した AO からの蛍光と考へた。細胞内およびライソゾーム内の pH を同等にする V-ATPase 阻害剤の Baphylomycin で処理すると AO はライソゾームから離れることが観

察できた。つまり AO はライソゾーム内のプロトンイオン(H⁺)と結合していると考えられた。Ionophore でも同様の現象が見られ、この場合は核への AO の移行も認められた。この変化は可逆的であった。いずれの阻害剤でも緑色の蛍光は減少しなかった。これらの結果から AO は細胞内ではライソゾームと RNA に強く結合しているがライソゾームでは H⁺と強く結合して二量体を形成しているが、RNA とは intercalation で単量体として結合し、両者はまったく異なる結合様式であることが推定された。

(5)AO の殺腫瘍細胞効果メカニズム

AO を取り込んだ細胞に光を照射すると先ず細胞がやや膨化し始め、次いで細胞膜の一部から細胞突出(bleb)が出現する。その後 bleb が細胞膜全体から出現して大きくなり一部は細胞質から離れ培養液中に浮遊するようになる。このころになると細胞は著明に膨化し最終的には細胞膜の断片化が生じる。この小さな断片化した小胞は無数に出現し能動的に動き回るのが観察できた。これはアポトーシスに伴う microparticle と考へられた。この microparticle 内には DNA, RNA, 酵素などの断片が入っていてリン脂質で囲まれていると考へる。これらの現象の始まりはライソゾーム内で AO が励起され活性酸素を産生してライソゾーム膜のリン脂質を酸化して破壊することによると考へる。これによりライソゾーム内の各種の酵素が細胞質内に流出して細胞が自爆すると推定する。

以上の結果から AO-PDD と PDT を強力なキセノン光源を用いたストロボ光(FL 光)で同時に瞬間的に行うことは可能であり、臨床応用が期待できると考へた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

1. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Murata H, Marunaka Y, Hosogi S, Uchida A, Sudo A. Photodynamic therapy with acridine orange in musculoskeletal sarcomas. J Bone Joint Surg (Br) (in press) 2010.
2. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Murata H, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. Clinical outcomes of minimally invasive surgery using acridine orange for musculoskeletal sarcomas

- around the forearm, compared with conventional limb salvage surgery after wide resection. *J Surg Oncol* (in press) 2010.
3. Satonaka H, Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Shintani K, Nakamura T, Matsumine A, Iino T, Uchida A. In vivo anti-tumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange, followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma model. *Oncology Letters* 1: 69-72, 2010.
 4. Akeda K, Nishimura A, Satonaka H, Shintani K, Kusuzaki K, Matsumine A, Kasai Y, Masuda K, Uchida A. Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma. *Oncol Rep* 22:997-1003 2009.
 5. Araki K, Wakabayashi H, Shintani K, Morikawa J, Matsumine A, Kusuzaki K, Sudo A, Uchida A. Decorin suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Oncology (Basel)* 77: 92-99 2009
 6. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Murata H, Satonaka H, Shinntani K, Nakamura T, Hosoi H, Iehara T, Sugimoto T, Uchida A. A new therapeutic modality involving acridine orange excitation by photon energy used during reduction surgery for rhabdomyosarcomas. *Oncol Rep* 21: 89-94 2009.
 7. Niimi R, Matsumine A, Kusuzaki K, Araki N, Aoki Y, Ueda T, Kudahara I, Myoui A, Ieguchi M, Hashimoto N, Yoshikawa H, Uchida A. Usefulness of limb salvage surgery for bone and soft tissue sarcomas of the distal lower leg. *J Cancer Res Clin Oncol* 134: 1087-1095, 2008.
 8. Shintani K, Matsumine A, Kusuzaki K, Morikawa J, Matsubara T, Wakabayashi T, Araki K, Satonaka H, Wakabayashi H, Iino T, Uchida A. Decorin suppresses lung metastasis of murine osteosarcoma. *Oncol Rep* 19: 1533-1539, 2008.
 9. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Satonaka H, Shinntani K, Nakamura T, Uchida A. Methylene blue in place of acridine orange as a photosensitizer in photodynamic therapy of osteosarcoma. *In vivo* 22: 297-304 2008.
 10. Nakamura T, Kusuzaki K, Matsubara T, Matsumine A, Murata H, Uchida A. A new limb salvage surgery in cases of high-grade soft tissue sarcoma using photodynamic surgery, followed by photo- and radiodynamic therapy with acridine orange. *J Surg Oncol* 97: 523-528 2008.
 11. Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Satonaka H, Wakabayashi T, Miyazaki S, Morita K, Takegami K, Uchida A. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors magnetic materials by generating electromagnetic field. *Clin Exp Metastasis* 24: 191-200, 2007.
 12. Satonaka H, Kusuzaki K, Murata H,

Matsubara T, Shintani K, Wakabayashi T, Matsumine A, Kimura M, Kawashima N, Uchida A. Flash wave light strongly enhanced cytotoxic effect of photodynamic therapy with acridine orange on mouse osteosarcoma cell line. *Anticancer Res* 27: 3339-3344, 2007.

13. Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Matsumine A, Uchida A. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. *In vivo* 21: 205-214 2007.
14. Satonaka H, Kusuzaki K, Shintani K, Matsumine A, Matsubara T, Wakabayashi T, Uchida A. Extracorporeal photodynamic image detection of mouse osteosarcoma in soft tissues utilizing fluorovisualization effect of acridine orange. *Oncology (Basel)* 70:465-473 2007.

[学会発表] (計 24 件)

1. Matsumine A, Kusuzaki K, Sugita T, Yazawa Y, Isu K, Kawai A, Abe S, Yakushiji T, Ueda T, Uchida A. Clinical Outcomes with the KYOCERA Physio Hinge Total Knee System Type III after the Resection of a bone and soft tissue tumor of the Distal Part of the Femur: from the Japanese Musculoskeletal Oncology Group 8th. Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting 2010 Sebu Philippin
2. Satonaka H, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Nakamura T, Matsumine A,

Iino T, Uchida A. In vivo antitumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma model. 56th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society. 2010 March. 11-14; New Orleans, USA.

3. Niimi R, Matsumine A, Iino T, Shintani K, Nakazora S, Nakamura T, Kusuzaki K, Uchida A. Expression of SAP97 as a biomarker of outcome in malignant fibrous histiocytomas. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2009 March 8-10 Las Vegas USA
4. Nishimura A, Akeda K, Kusuzaki K, Matsumine A, Masuda K, Morimoto R, Okamura N, Kasai Y, Iino T, Uchida A. Three-dimensional alginate spheroid culture system of murine osteosarcoma. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society 2009 March 8-10 Las Vegas USA
5. Kusuzaki K, Murata H, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Uchida A. Acridine orange found in Ehrlich's sera could be a "Magic Bullet" against cancer under photon energy. The 2nd World Conference on Magic Bullets (Ehrlich II) 2008 Oct. 3-5, Neurmberg, Germany.
6. Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Morita K, Takegami K, Uchida. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials. 7th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor

- Society Meeting. 2008 Sept. 26-28, Beijing, China
7. Nakamura T, Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Niimi R, Nakazora Murata H, S, Uchida A new limb salvage surgery in cases of high-grade soft tissue sarcoma using photodynamic surgery, followed by photo- and radio dynamic therapy with acridine orange. 7th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting. 2008 Sept. 26-28, Beijing, China
 8. Satonaka H, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Wakabayashi T, Nakamura T, Matsumine A, Uchida A. In vivo antitumor effect of photodynamic therapy with acridine orange using flash wave light on osteosarcoma. 7th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting. 2008 Sept. 26-28, Beijing, China
 9. Satonaka H, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Wakabayashi T, Matsumine A, Uchida A. Extracorporeal photodynamic image detection of mouse osteosarcoma in soft tissues utilizing fluorovisualization effect of acridine orange. The 14th International Symposium on Limb Salvage. 2007 Sept. 11-14, Hamburg, Germany.
 10. Matsumine A, Kusuzaki K, Matsubara T, Morita K, Takegami K, Uchida. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials by generating an alternating electromagnetic field. The 14th International Symposium on Limb Salvage. 2007 Sept. 11-14, Hamburg, Germany.
 11. Kusuzaki K, Matsubara T, Satonaka H, Wakabayashi T, Matsumine A, Uchida A. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. The 14th International Symposium on Limb Salvage. 2007 Sept. 11-14, Hamburg, Germany
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
楠崎 克之 (KUSUZAKI KATSUYUKI)
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30177993
 - (2) 研究分担者
内田 敦正 (UCHIDA ATSUMASA)
三重大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：40176681
松峯 昭彦 (MATSUMINE AKIHIKO)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：00335118
熊本 忠史 (KUMAMOTO TADASHI)
三重大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50362348
若林 弘樹 (WAKABAYASHI HIROKI)
三重大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：50362348
里中 東彦 (SATONAKA HARUHIKO)
三重大学・大学院医学研究科・医員
研究者番号：60515485
中村知樹 (NAKAMURA TOMOKI)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：50467362
松原孝夫 (MATSUBARA TAKAO)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：30422827