

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09457

研究課題名（和文）化学療法剤複合カーボンナノチューブによる肉腫の治療

研究課題名（英文）Chemotherapeutic Agent Composite Carbon Nanotubes for the Treatment of Sarcoma

研究代表者

青木 薫 (Aoki, Kaoru)

信州大学・学術研究院保健学系・准教授

研究者番号：30467170

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨肉腫などの骨軟部肉腫に対する化学療法の効果は限定的であり、多剤併用化学療法による副作用は強いが、骨軟部肉腫は希少がんであり、新規化学療法剤の開発は進んでいない。我々は、従来の化学療法剤の効果を向上させ、副作用を軽減させるためCarbon nanotube (CNT)をdrug delivery system (DDS)とする抗がん剤複合CNTを開発した。

ヒト骨肉腫細胞および骨肉腫モデルマウスへの抗がん剤複合CNTの添加実験では、ある程度の抗腫瘍効果が示唆されたが、安全性、CNTの複合量、使用するナノカーボンの種類など今後の検討、検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤複合CNTは骨肉腫細胞株および骨肉腫モデル動物への投与により、ある程度の抗腫瘍効果を有することが示唆された。DDS作製の条件を追求することにより新規の肉腫治療法となりうると期待される。

今回、抗がん剤複合CNTの作成には、CNTを均一分散させるために界面活性剤であるPluronic F-127 (PF-127)を用いた。我々はヒト骨肉腫細胞に影響を与えるPF-127の濃度についても検討を行い、CNTを分散させることができ、骨肉腫細胞の増殖に影響を与えない濃度についての知見を得ることができた。この結果は今後、ナノカーボンを体材料として用いる際のPF-127の濃度の指標となり得る。

研究成果の概要（英文）：The efficacy of chemotherapy for bone and soft tissue sarcomas such as osteosarcoma is limited and the side effects of multiple-drug combination chemotherapy are severe, but osteosarcoma is a rare cancer and the development of new chemotherapeutic agents has not progressed. We have developed an anticancer drug conjugate CNT using carbon nanotubes (CNTs) as a drug delivery system (DDS) to improve the efficacy and reduce the side effects of conventional chemotherapeutic agents.

The addition of CNTs to human osteosarcoma cells and mouse models of osteosarcoma suggested some anti-tumor effects, but further investigation and verification of safety, the amount of CNTs combined, and the type of nanocarbons to be used are still needed.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：カーボンナノチューブ 肉腫 化学療法

1. 研究開始当初の背景

「肉腫」は臓器や皮膚などの上皮性組織から発生する悪性腫瘍である「癌腫」と異なり、非上皮系組織から発生する悪性腫瘍であるが、「癌腫」と同様に局所浸潤や転移を生じて患者を死に至らしめる疾患である。肉腫は後腹腔腔内などからも発生するが、骨や軟部組織などの運動器から発生する肉腫を特に「骨軟部肉腫」と言う。骨軟部肉腫の治療においても癌腫の治療と同様に、手術、抗がん剤による化学療法、放射線照射が治療の三本柱として行われている。

骨軟部肉腫はいわゆる「希少がん」に分類される患者数の少ない悪性腫瘍である。日本では胃がんの患者が年間約 13 万人、肺がんの患者が約 11 万人発病する(厚生労働省調べ、2013 年)のに対し、軟部肉腫の発生率は全悪性腫瘍のうちの 1% 以下、原発性の骨発生肉腫の中で最も患者が多いとされる骨肉腫でさえも、日本国内で年間に 150 ~ 250 人程度の新規患者が発生するのみである。しかし、生活習慣病としての特徴が強く患者の多くが高齢者である癌腫に対し、骨肉腫に代表される肉腫の中には小児 ~ 青年期に発生するものも少なくなく、その治療の結果が患者のその後の人生を左右する。

骨軟部肉腫の治療は手術、化学療法、放射線療法により行われるが、腫瘍の種類、症例の病期などの要素によりそれらの組み合わせは様々である。骨肉腫に対する化学療法が導入される以前は、骨肉腫患者の 5 年生存率が 50% 以下であったが、術前・術後の化学療法を行うことによりその治療成績は飛躍的に向上し、5 年生存率は 70 ~ 80% となった。しかし、生存率が向上したとは言え、5 年生存率が 70 ~ 80% ということは、裏返せば 20 ~ 30% の患者は 5 年以内に亡くなっているということであり、通常の癌腫や白血病の生存率には及ばない。また、骨肉腫に使用する化学療法剤は多量であり、吐き気・嘔吐、骨髄抑制などを代表とした副作用が多く、患者にとって大きな負担となっている。患者が小児の場合、長期の入院加療が必要となる化学療法はその患者自身およびそれを支える家族にも生活に大きな負担を強いることになり、骨軟部肉腫治療における治療効果の向上、化学療法の副作用の軽減は重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨軟部肉腫の化学療法において、腫瘍細胞内に効率よく化学療法剤を送達するための新しい **drug delivery system (DDS)** を開発することである。これにより、腫瘍細胞内に化学療法剤を集中させることができれば、その治療効果が向上し、副作用が軽減されることが期待できる。

ナノテクノロジー、ナノバイオロジーの発展に伴い、ナノ粒子を **DDS** として使用するための研究は広く行われている。しかし、**carbon nanotube (CNT)** に代表されるナノ粒子はその生体親和性、生体安全性、体内動態などについて不明な点が多く、実用化されている全身投与が可能なナノカーボンの **DDS** は存在しない。

化学療法剤複合 **CNT** の作製は研究協力者である韓国の全南国立大学の金隆岩教授の指導の下で行っている。本研究ではその化学療法剤複合 **CNT** の作製法を確立し、化学療法剤複合 **CNT** の肉腫細胞および肉腫モデルマウスへの効果、その作用機序を解明する。

本研究により開発される新しい **DDS** としての化学療法剤複合 **CNT** は、骨軟部肉腫での効果、安全性が証明されれば、肉腫のみならず癌腫や血液腫瘍の治療にも広く応用できる可能性があり、その適応症例は骨軟部肉腫のみに留まらず、多くの「がん」の治療方法を変えることが期待できる画期的な研究開発である。

3. 研究の方法

CNT 自身の肉腫への影響

多層カーボンナノチューブ(**multi-walled carbon nanotube, MWCNT**)(**MWNT-7**, 保土谷化学工業株式会社)を、界面活性剤(ポリソルベート **80**)を溶解した生理食塩水に加え、超音波処理を行うことにより分散させた。ヒト骨肉腫細胞株である **143B** 細胞を培養し、**MWCNT** 分散液を添加した。

免疫不全モデル動物であるヌードマウスの脛骨に **143B** 細胞を移植してヒト骨肉腫 **xenograft** モデルマウスを作製し、**MWCNT** 分散液を腫瘍部位に局所投与した。

化学療法剤複合 CNT の作製

韓国の全南国立大学の金隆岩教授とミーティングを行い、**MWCNT** と抗がん剤の複合方法について検討を行った。**MWNT-7** が生産終了となったため、その後、**MWCNT** は **CNano** 社の **Flotube 9110** を使用することとし、**Pluronic F-127 (PF-127)** を界面活性剤として超音波処理で抗がん剤を複合させることとした。抗がん剤としてはドキシソルビシン塩酸塩(**doxorubicin hydrochloride, DOX**)を使用した。

韓国の全南国立大学の金隆岩教授の提案の下、信州大学先鋭材料研究所基盤分析・高度解析部門の姜天水氏に **DOX** 複合 **MWCNT(Flotube9110, CNano 社)** : **DOX-CNT** を作製していただいた。

化学療法剤複合 CNT の肉腫細胞への影響

DOX-CNT を **143B** 細胞に添加し、細胞増殖率を **AlamarBlue Assay** にて定量評価した。**DOX-CNT** は **DOX** の培養液中の最終濃度が **10 µg/mL** となるように調整し、**CNT** の添加量は最終濃度でそれぞれ **2.0 µg/mL(DOX-CNT02)**、**5.0 µg/mL(DOX-CNT05)**、**10 µg/mL(DOX-CNT10)**、**20 µg/mL(DOX-CNT20)**、**50 µg/mL(DOX-CNT50)**とした。

骨肉腫モデル動物への DOX-CNT の効果

免疫抑制動物であるヌードマウスの脛骨に **143B** 細胞と各濃度の **DOX-CNT** を投与し、骨肉腫モデルマウスへの **DOX-CNT** の効果を評価した。各群 **n = 5** とし、下腿に形成された腫瘍のサイズを測定した。

界面活性剤の肉腫細胞への影響

これまでの我々の **DOX-CNT** を用いた実験では、界面活性剤である **PF-127** は細胞培養液中で **500 µg/mL** の濃度で使用していたが、その影響が無視できないと考えられる結果が出ており、**PF-127** 自身の **143B** 細胞に対する影響を評価した。

143B 細胞に **PF-127** 溶液をそれぞれ最終濃度が **0.1 µg/mL**、**1 µg/mL**、**10 µg/mL**、**100 µg/mL**、**1000 µg/mL** となるよう添加し、**AlamarBlue Assay** にて細胞生存率、増殖率を評価した。

PF-127 濃度を改良した DOX-CNT の骨肉腫細胞への効果

先の実験で、**143B** 細胞に影響を与えない **PF-127** の濃度が明らかになり、**PF-127** の濃度を今までの **1/50** に薄めた低濃度の **PF-127** で **CNT** を分散させた **DOX-CNT** を作製した。この濃度の **PF-127** でも、**CNT** は均一分散していることを確認し、その低濃度 **PF-DOX-CNT** を用いて実験を行った。**CNT** の濃度を変更した低濃度 **PF-DOX-CNT** を **143B** 細胞に添加した。低濃度 **PF-DOX-CNT** は、**DOX** の培養液中の最終濃度は依然と同様で **10 µg/mL** となるように調整し、**CNT** の添加量は最終濃度でそれぞれ **2.0 µg/mL(低濃度 PF-DOX-CNT02)**、**5.0 µg/mL(低濃度 PF-DOX-CNT05)**、**10 µg/mL(低濃度 PF-DOX-CNT10)**とした。

4. 研究成果

CNT 自身の肉腫への影響

24 時間培養後の細胞数は、**MWCNT** の濃度依存性に減少した。また、位相差顕微鏡による培養細胞の観察では、**MWCNT** が **143B** 細胞内に取り込まれていることが観察された。

分散液投与後のモデルマウス下肢の **CT** 像、病理組織標本では **MWCNT** の濃度依存性に腫瘍の増大を抑制することが示された。

化学療法剤複合 CNT の作製

界面活性剤 **PF-127** を純水に溶解し、**5 mg/mL** の濃度の **PF-127** 溶液を作成した。**PF-127** 溶液に **DOX** および **CNT** を添加して超音波処理を行った。作製された **CNT** を静置しても **CNT** は沈殿せず、均一分散されていることが確認できた。

化学療法剤複合 CNT の肉腫細胞への影響

DOX-CNT を添加後 **24** 時間の細胞増殖率は、**Control** を **100%** として **DOX-CNT02** で **61%**、**DOX-CNT05** で **59%**、**DOX-CNT10** で **79%**、**DOX-CNT20** で **82%**、**DOX-CNT50** で **83%**であった。

骨肉腫モデル動物への DOX-CNT の効果

143B 細胞移植後 **4** 週の腫瘍のサイズは、**Control** で **730 mm³**、**DOX-CNT02** で **942 mm³**、**DOX-CNT05** で **897 mm³**、**DOX-CNT10** で **1656 mm³**、**DOX-CNT20** で **1076 mm³**、**DOX-CNT50** で **353 mm³**であった。

界面活性剤の肉腫細胞への影響

PF 溶液暴露後 **24** 時間では **PF** 濃度が **1000 µg/mL** で細胞生存率が **65.8 %** と有意に低下し、**48** 時間では **100 µg/mL** で **67.2 %**、**1000 µg/mL** で **65.3 %** と生存率が有意に低下した。この結果から、その後の **DOX-CNT** は、**PF-127** の濃度が **10 µg/mL** となるよう作製した。

PF 濃度を改良した DOX-CNT の骨肉腫細胞への効果

低濃度 **PF-DOX-CNT** を添加後 **24** 時間の細胞生存率は、低濃度 **PF-DOX-CNT02** で **34.1%**、低濃度 **PF-DOX-CNT05** で **30.9%**、低濃度 **PF-DOX-CNT10** で **19.5%** となり、低濃度 **PF-DOX-CNT** に添加した **CNT** の濃度依存性に **143B** 細胞の増殖が抑制された。

本研究の総括

本研究では、化学療法剤複合 **CNT** を生体親和性の高い界面活性剤 **Pluronic F-127 (PF-127)** を用い、超音波処理にて **CNT** を均一分散させることにより作製した。化学療法剤としては骨軟部肉腫に最も広く使われているドキソルピシン塩酸塩(**doxorubicin hydrochloride, DOX**)を、多層 **CNT** としては **CNano** 社の **Flotube9110** を用いた。

PF-127 の濃度を調節することにより、ヒト骨肉腫細胞 **143B** 細胞の細胞生存率に影響を与えず、**CNT** を均一分散できる **PF-127** の濃度を確認することができた。

PF-127 濃度を改良した低濃度 **PF-DOX-CNT** は **CNT** の濃度依存性に **143B** 細胞の増殖を抑制した。

DOX-CNT は肉腫に対して抗腫瘍効果を有していることが示唆された。今後、**DOX-CNT** の条件設定を精査することにより肉腫に対する新たな治療戦略を開発できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aoki Kaoru, Ogihara Nobuhide, Tanaka Manabu, Haniu Hisao, Saito Naoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Carbon nanotube-based biomaterials for orthopaedic applications	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Materials Chemistry B	6. 最初と最後の頁 9227 ~ 9238
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d0tb01440k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村松優香, 青木 薫, 齋藤直人, 岡本正則, 鬼頭宗久, 田中厚誌, 出田宏和, 高橋 淳
2. 発表標題 骨肉腫細胞株143B細胞に対する界面活性剤の影響
3. 学会等名 第57回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	鎌仲 貴之 (Takayuki Kamanaka) (30791884)	信州大学・医学部附属病院・助教（診療） (13601)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協 力 者	金 隆岩 (Kim Yoong Ahm)	全南国立大学・School of Polymer Science and Engineering・教授	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	姜 天水 (Kang Cheonsoo)	長野工業高等専門学校・工学科・助教	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
韓国	全南国立大学			