

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591916

研究課題名（和文） 転移性骨腫瘍に対する次世代ビスフォスフォネートを用いた磁気ターゲッティング療法

研究課題名（英文） Magnetic targeting therapy with new bisphosphonates for the treatment of bone metastasis

研究代表者

久保 忠彦（KUBO TADAHIKO）

広島大学・病院・講師

研究者番号：70397959

研究成果の概要（和文）：

骨吸収抑制剤として臨床応用されているビスフォスフォネートを化学的および分子生物学的な視点からアプローチし、強力な癌治療薬としての新規ビスフォスフォネートを開発、in vitro および in vivo における強力な抗腫瘍効果、免疫細胞賦活作用を確認した。さらに新しいコンセプトからなる抗癌剤としてバナジウム・ビスフォスフォネート複合体の開発も着手した。

研究成果の概要（英文）：

Bisphosphonates, widely used to treat a variety of bone resorption diseases, reportedly have some antitumor effects. In this study, we developed novel bisphosphonates for cancer immunotherapy for bone metastasis and, more, Vanadium/bisphosphonate complex for the treatment of malignant bone tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学,整形外科学

キーワード：癌

## 1. 研究開始当初の背景

転移性骨腫瘍の最近の研究から、ビスフォスフォネートの骨痛や skeletal-related events に対する効果が破骨細胞の抑制によるものだけではないことが分かってきてい

た。ビスフォスフォネートの作用機序は開発当初に考えられていたものより複雑で、その作用は多岐にわたり、癌治療薬としてのポテンシャルが非常に高いことが分かってきた。これまで考えられていた破骨細胞を介する

骨吸収抑制作用のみでなく、癌細胞への分子標的治療薬としての可能性、さらには免疫療法への応用の可能性にまで及んでいる。われわれも minodronate (アステラス製薬株) を用いた悪性骨腫瘍治療について基礎研究を行っていた。この minodronate は日本国内で創製された第三世代ビスフォスフォネートで、zoledronate と並び、現在最も強い骨吸収抑制能をもつビスフォスフォネートである。各種悪性骨腫瘍に対する細胞増殖抑制効果、細胞浸潤能抑制効果、アドリアマイシンとの相乗効果を観察し、その分子メカニズムの一部についても解明していた。

## 2. 研究の目的

しかし、基礎研究においては多くの良好な結果が報告されているが、既存のビスフォスフォネートでは癌治療薬としての効果は十分でなかった。そこで、われわれはイリノイ大学と共同で化学的および分子生物学的な視点からアプローチし、強力な癌治療薬としての新規ビスフォスフォネートの開発を計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) 動物モデルの作製:

ネンブータル麻酔下に生後7週令SCIDマウスにルシフェラーゼ発現ヒト前立腺癌細胞(PC3M-luc-C6) ( $1 \times 10^7$ ) を移植し、骨転移動物モデルを作成、経時的にX線および超微弱発光 in vivo イメージングシステム (WinLight32, Berthold) にて病巣を確認した。

(2) ビスフォスフォネートの免疫細胞誘導効果: 健康人末梢血から Ficoll-Paque 遠心分離法を用いて単核球を分離後、各種ビスフォスフォネートを加え1週間培養後、抗  $\gamma \delta$  TCR 抗体を用い Flow Cytometer で  $\gamma \delta$  T

細胞を分離評価した。 $\gamma \delta$  T細胞を Magnetic Activated Cell Sorting system (MACS, Miltenyi Biotech, Germany) で濃縮採取し、PC3M に対する  $\gamma \delta$  T細胞の殺細胞効果を Cell-mediated cytotoxicity assay (L7010, Molecular Probes, Eugene) で確認した。

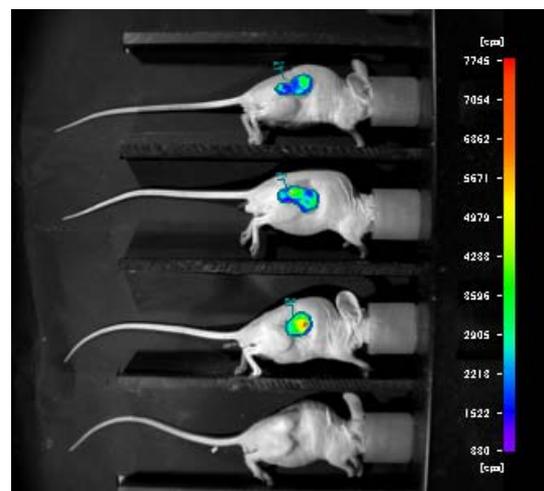
(3) 新規ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体の in vitro 抗腫瘍効果: ヒト前立腺癌細胞に各種ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体治療を行い、cytotoxicity assay を行い、強力な新規ビスフォスフォネートを選択し、動物実験用薬剤の候補とした。

新規ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体の in vivo 抗腫瘍効果: 担癌マウスに新規ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体治療を行い腫瘍移植後4週でコントロール群と抗腫瘍効果を比べた。

## 4. 研究成果

### (1) 動物モデルの作製:

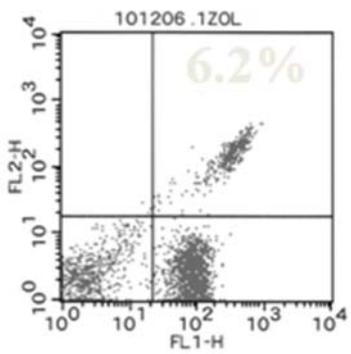
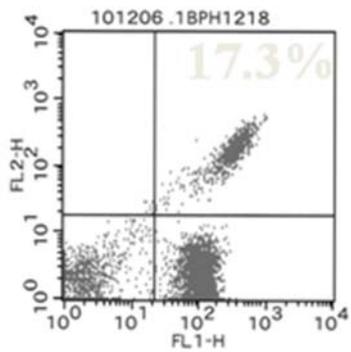
ルシフェラーゼ発現ヒト前立腺癌細胞の動物モデルの作製



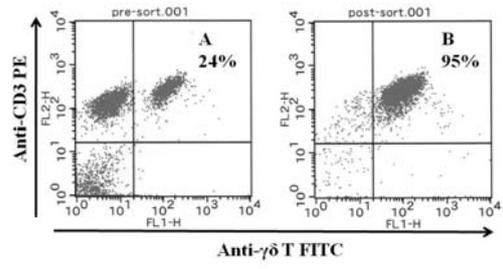
最下部マウスは negative control

(2) ビスフォスフォネートの免疫細胞誘導効果：

- ① 新規ビスフォスフォネート (BPH1218) と既存の最も強力な Zoledronate (ZOL) による  $\gamma\delta$ T 細胞賦活作用の比較

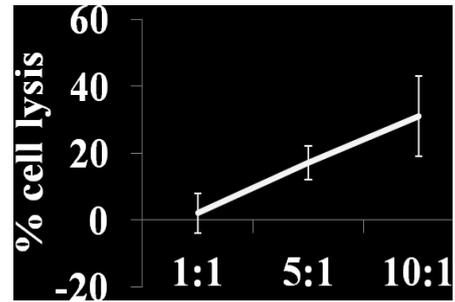


- ② Magnetic Activated Cell Sorting system による  $\gamma\delta$ T 細胞の濃縮



A はソート前、B はソート後

- ③ PC3M 癌細胞に対する  $\gamma\delta$ T 細胞の殺細胞効果



依存性の癌細胞傷害活性がみられた。

- (3) 新規ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体の抗腫瘍効果：

ヒト前立腺癌細胞に各種ビスフォスフォネート治療を行い、cytotoxicity assay を行い、強力な 2 種の新規ビスフォスフォネート (BPH1215, BPH1260) を選択し、動物実験用薬剤の候補とした。担癌マウスに新規ビスフォスフォネートおよびバナジウム・ビスフォスフォネート複合体治療を行い腫瘍移植後 4 週でコントロール群と比べ治療群に有意な腫瘍増大の抑制がみられた。

本研究目的である化学的および分子生物学的な視点からアプローチした強力な癌治療薬としての新規ビスフォスフォネートの開発を順調に遂行することができた。磁気ターゲティング療法については現在も継続しているが、当初の計画以上に進展した成果として、近年、制癌剤として注目されている金属錯体であるバナジウムを利用したバナジウム・ビスフォスフォネート複合体を新規抗癌剤として開発し得た。

本研究結果を基盤として「運動器疾患に対する新規ビスフォスフォネート封入磁性体リポソームの展開研究」を計画している。骨腫

瘍のみならず骨粗鬆症、骨髄炎などの種々の重要な運動器疾患を対象とした全く新しいコンセプトからなるビスフォスフォネート治療の開発が可能であり、その成果は運動器治療法の進歩に大きく貢献することが期待される。

#### 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 2件)

1. Kubo T, Shimose S, Matsuo T, Fujimori J, Ochi M. Minodronate for the treatment of osteoporosis. *Drugs Today (Barc)*. 2010 Jan;46(1):33-7. 査読有。

2. Zhang Y, Cao R, Yin F, Hudock MP, Guo RT, Krysiak K, Mukherjee S, Gao YG, Robinson H, Song Y, No JH, Bergan K, Leon A, Cass L, Goddard A, Chang TK, Lin FY, Van Beek E, Papapoulos S, Wang AH, Kubo T, Ochi M, Mukkamala D, Oldfield E. Lipophilic bisphosphonates as dual farnesyl/geranylgeranyl diphosphate synthase inhibitors: an X-ray and NMR investigation. *J Am Chem Soc*. 2009 Apr 15;131(14):5153-62. 査読有。

[学会発表] (計 2件)

1. 久保忠彦、下瀬省二、藤森淳、越智光夫、 転移性骨腫瘍に対する新規ビスフォスフォネートの開発、第44回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会、2011年7月14,15日、京都府

2. Tadahiko Kubo, Shoji Shimose, Toshihiro Matsuo, Jun Fujimori, and Mitsuo Ochi, Cancer immunotherapy with novel bisphosphonates for bone metastasis, 2012 annual meeting of

american academy of orthopaedic surgeons, February 7-11, 2012  
San Francisco, CA, USA

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

久保 忠彦 (KUBO TADAHIKO)  
広島大学・病院・講師  
研究者番号：70397959

##### (2) 研究分担者

越智 光夫 (OCHI MITSUO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70177244

下瀬 省二 (SHIMOSE SHOUJI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：30304439

松尾 俊宏 (MATSUO TOSHIHIRO)  
独立行政法人国立病院機構 (呉医療センター臨床研究部)・その他部局等・医師  
研究者番号：90397977

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：