

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592191

研究課題名(和文) スパン80ベシクルによるDDSを用いた骨腫瘍に対するカフェイン療法の開発

研究課題名(英文) Development of a caffeine-assisted chemotherapy against bone tumors using a novel DDS by Span80 vesicles

研究代表者

木谷 彰岐 (Kidani, Teruki)

愛媛大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60380234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：悪性骨・軟部腫瘍の特異的DDSによる治療法を開発を企図し、Span80ベシクルを用いて、化学療法剤を内包するナノベシクルを開発し、in vitroにおける抗腫瘍効果の検討を行うとともに、腫瘍移植マウスを用いて治療実験を行った。その結果、カフェインおよびイフォスファミド内包Span80ベシクルによる高い抗腫瘍効果を示し、ほぼ有害事象のない新たな治療モデルを確立した。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a novel therapeutic model by a novel tumor-specific drug delivery system (DDS), we tried a novel DDS by span80 nano-vesicles containing anti-tumor agent in vitro and in vivo with osteosarcoma bearing mouse model. As a result, we established a novel therapeutic model using caffeine and ifosfamide containing Span80 vesicles which manifested prominent efficiency and almost no adverse effect.

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：骨・軟部腫瘍学 カフェイン 骨肉腫 DDS 化学療法モデル Span80ベシクル

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、従来、整形外科領域に於ける悪性骨・軟部腫瘍の外科的治療、化学療法の実践を専門的に行っており、個々の症例を解析することにより臨床情報を得るとともに、悪性骨・軟部腫瘍の細胞株を用いてその生物学的特性の解析や新たな治療法の開発につながる基礎的研究を行ってきた。そのなかで、臨床材料を用いた解析から、悪性腫瘍患者にとって、最も重要な死因のひとつである癌悪液質は、宿主免疫系の反応による高サイトカイン血症のみでおこるのではなく、宿主のLPL動態の異常および腫瘍細胞による脂質代謝の亢進が深く関与することを明らかにしてきた。また、これらの知見を元に、悪性骨・軟部腫瘍に対する新たな抗腫瘍療法の開発を企図し、特に Drug Delivery System (DDS)に関する解析を行ってきた。その結果、NSAIDs 貼付薬が腫瘍の栄養血管増生を抑制することにより、腫瘍そのものの増殖や転移を抑制できることを、マウスを用いた実験系により明らかにし、これを発表するとともに特許を取得した。

界面活性剤Span80ベシクル

一方、本学理工学研究科、加藤敬一准教授からは、非イオン性界面活性剤Span80から調製した超微小なベシクルを開発し(図1参照)、申請者らは、これを用いて悪性腫瘍をはじめとする病変局所に薬剤を特異的に作用させる方法を研究してきた。Span80は、1)食品添加物としても使用され、また 2) 薬剤安定化剤としてすでに臨床で使用されている。3) 従来のリポソームよりも膜流動性や膜融合性に優れている。4) また、物質包括能、制癌活性、代謝性、コスト(リポソームの約六千分の一)などの点でもリポソームより優れた特性を有する。リポソームとは似て非なるものであり、従来のリポソームを用いたDDSによる癌治療よりも優れた抗癌効果が期待できる。Span80ベシクルは安定した膜組成を有し、医薬品としてのSpan80ベシクルが容易に製造可能であり、特許を取得している。

レクチン固定化のSpan80ベシクルの腫瘍選択性

連携研究者の宮崎は、このプロジェクトに参画して海藻由来の新規レクチンEuclidean serra agglutinin (ESA)をこのベシクル上に固定化したベシクルが、大腸癌腫瘍細胞株に対して腫瘍特異的なアポトーシスを強力に誘導することを明らかにした¹¹⁾。そこで、申請者らはそのESAを悪性骨・軟部腫瘍に対する標的性物質としてSpan80ベシクル上に固定化し、そのベシクルを薬物キャリアとして用いて、悪性骨・軟部腫瘍の新しい治療法を開発することを着想し、基礎的解析を続けてきた。

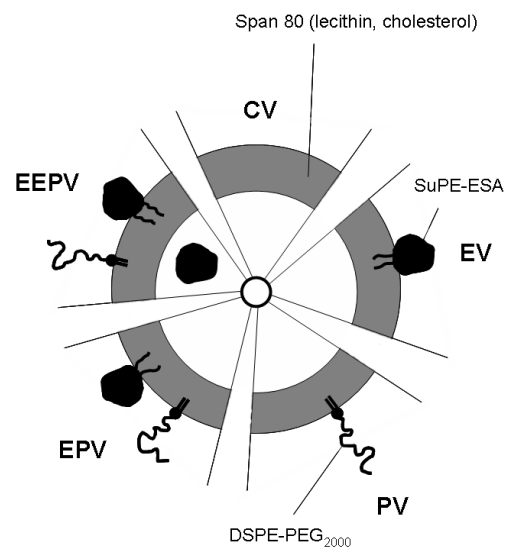


図1 Span80ベシクルの模式図 表面にPEGやレクチンを付加し、さらに薬剤を内包させられる。

骨腫瘍治療におけるカフェイン投与の有用性

カフェインはDNA修復を阻害する作用があることが知られており、骨腫瘍、特に骨肉腫に対するカフェイン投与は、シスプラチンを含む化学療法の効果を劇的に改善することが研究協力者の土屋、富田らにより提唱され、現在では臨床応用が進められ、転移をきたした骨肉腫においても生存期間の著明な延長や高い完全寛解率が報告されている。しかし、現在のカフェイン併用療法では、血清中に高濃度のカフェインを維持することが求められており、カフェインによる副作用を考慮すると、腫瘍に特異的にカフェインを到達させるDDSの開発が望まれている。

2. 研究の目的

本申請研究では前述の萌芽研究の結果に鑑み、悪性骨・軟部腫瘍への特異的標的機能を持つレクチン ESA を Span80 ベシクル表面に装着し、さらに増感剤としてのカフェインと化学療法剤を同時に内包するナノベシクルを新たな DDS として悪性骨・軟部腫瘍のあらたな治療法を開発することを企図し、以下の9項目について明らかにすることを当初の目的とした。

- (1) in vitro におけるカフェイン内包ベシクルによる腫瘍へのカフェイン送達効果
- (2) in vitro におけるカフェイン及び抗癌剤内包 ESA ベシクルの腫瘍選択性
- (3) in vitro におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果
- (4) in vitro におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用
- (5) in vitro における ESA 以外の腫瘍標的分子を用いた腫瘍選択性最適化
- (6) in vivo におけるカフェイン内包ベシクルによる腫瘍へのカフェイン送達効果
- (7) in vivo におけるカフェイン及び抗癌剤内包ベシクルの腫瘍選択性
- (8) in vivo におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果
- (9) in vivo におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用

なお、研究を進めるに当たって、preliminary な実験系で ESA の腫瘍選択性、in vivo における抗腫瘍効果・毒性・副作用をスクリーニングしたところ、高い腫瘍選択性と抗腫瘍効果を示す一方で、薬剤性肝障害を誘導する可能性が示唆されたため、ESA を用いた腫瘍選択性に関する実験系は中止した。

3. 研究の方法

海藻由来レクチン Eucheuma serra agglutinin (ESA) を固定化し、かつカフェインおよび抗がん剤イフォスファミドを内

包したベシクルが腫瘍に特異的・効率的に内包物を送達するか、また in vitro における抗腫瘍効果と毒性を解析することを主な目的に、以下の方法で研究を行った。

In vitro における解析

(1) in vitro におけるベシクルによる腫瘍へのカフェイン送達効果の解析

ESA 固定化 Span80 ベシクル、および非固定化ベシクルに蛍光色素を内包させ、培養骨肉腫細胞株に加え、細胞内への蛍光色素取込を蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーで定量的に解析した。

(2) in vitro におけるカフェイン及び抗癌剤内包 ESA ベシクルの腫瘍選択性の解析

上記1.の実験系を用いて、骨肉腫細胞株のみでなく、線維芽細胞など非腫瘍性細胞株を用いてカフェイン送達効果を解析し、ESA 固定化による腫瘍選択性を定量的に解析した。

(3) in vitro におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果の解析

ベシクルにカフェインを内包 (CV)、イフォスファミド内包させたもの (IV) を作製し、上記と同様に投与する。投与後、経時的に腫瘍細胞を固定し、Propidium Iodide 法により、腫瘍細胞の壊死率、アポトーシス率を解析した。

(4) in vitro におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用の解析

非腫瘍性線維芽細胞株に上記のベシクルを加えて、同様の手法で非腫瘍性細胞株への毒性を解析した。

In vivo における解析

ヒト骨肉腫細胞株として LM8 を、その由来マウス系である C3H/HeJ マウス系の背部皮下に移植し、担癌動物として以下の解析を行った。

(5) in vivo におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果の解

析

上記の解析により、もっとも効果が得られると期待される DDS の数系統につき、実際に骨肉腫移植マウスに経静脈的に投与を行い、その抗腫瘍効果を解析した。投与開始後、経時的に腫瘍径を測定し、マウスを sacrifice して腫瘍を採取し、腫瘍細胞の viability を病理組織学的に評価すると共に、増殖マーカー、アポトーシスマーカーを解析する。また、採取した腫瘍から mRNA を採取して array 解析を行った。

(6) in vivo におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用の解析

上記の解析に用いたマウスの尿、血清を採取し、生化学的に各臓器機能を解析する。さらに、全臓器を治療による臓器毒性・副作用に関して病理組織学的に詳細に解析した。

(7) 孕任性試験

IV 投与後の雄マウスを雌マウスと掛け合わせ孕任性試験を行った。また得られた仔マウスに奇形がないか解析した。

4. 研究成果

(1) ESA 固定化ベシクルによる腫瘍への薬剤送達効果の解析

ESA 固定化 Span80 ベシクル、および非固定化ベシクルに蛍光色素を内包させて培養骨肉腫細胞株に加え、細胞内への蛍光色素取込を蛍光顕微鏡、フローサイトメトリーで定量的に解析したところ、腫瘍細胞の細胞質に蛍光色素の取り込みが観察され、その効果は ESA を付加しないものよりも強かった。

(2) in vitro におけるカフェイン及び抗癌剤内包 ESA ベシクルの腫瘍選択性の解析

上記の実験系を用いて、線維芽細胞株 Flow7000 に蛍光色素が取り込まれるかどうかを検証したところ、background とほぼ変わらない蛍光強度しか認めなかった。少なくとも、コントロールに線維芽細胞株を用いた場合、ESA 固定化ベシクルには一定の腫瘍選択性があることを明らかにした。

このあと、preliminary な実験系で ESA の

腫瘍選択性、in vivo における抗腫瘍効果・毒性・副作用をスクリーニングしたところ、高い腫瘍選択性と抗腫瘍効果を示す一方で、薬剤性肝障害を誘導する可能性が示唆されたため、ESA を用いた腫瘍選択性に関する実験系は中止した。

(3) in vitro におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果の解析

マウス骨肉腫細胞株 LM8 を培養し、培養液中に PBS (陰性コントロール)、CSB、PBS 内包 Span80 ベシクル (PV)、CBS 内包 Span80 ベシクル (CV)、イフォスファミド内包 Span80 ベシクル (IV)、IV+CSB、IV+CV および IV+CV 倍量を培養液に加え、1 時間後に harvest し、PI 法を用いて細胞傷害を定量した。その結果、PBS、CSB、PV、CV ではほとんど細胞死が認められなかったのに対し、IFO、IV では約 13% の細胞にアポトーシスまたは壊死を認めた。これらに CSB を加えると、得私立は 25% 程度まで上がり、CV を加えると、細胞傷害効果は劇的に増大し、IV+CV ではほとんど生細胞を認めなかった。(図 2, 図 3)

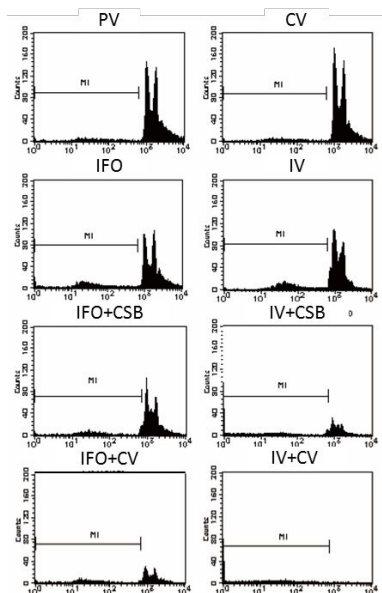


図 2 LM8 にベシクル投与後 1 時間の PI 法によるアポトーシス・壊死率の解析

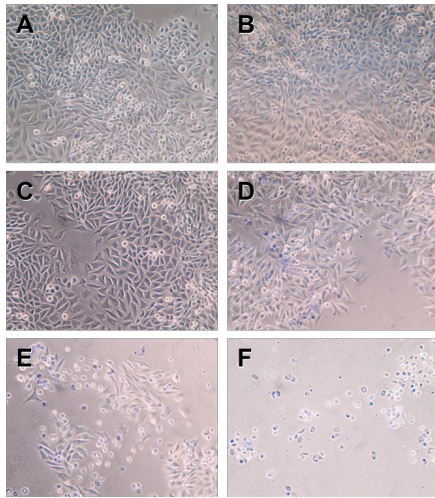


図3 LM8 にベシクル投与後2時間のトリパンブルー染色による死細胞の解析 A:PV, B:CV, C:IFO, D:IV, E:IFO+CV, F:IV+CV

(4) in vitro におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用の解析

非腫瘍性線維芽細胞株に上記のベシクルを加えて、同様の手法で非腫瘍性細胞株への毒性を解析したところ、IV, CV 投与群ともに有意な細胞傷害を認めなかった。

In vivo における解析

ヒト骨肉腫細胞株として LM8 を、その由来マウス系である C3H/HeJ マウス系の背部皮下に 3×10^7 個移植し、腫瘍径を測定しながら飼育し、腫瘍体積が 500 mm^3 に達したものを担癌動物として以下の解析を行った。

(5) in vivo におけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクル投与による抗腫瘍効果の解析

抗腫瘍剤として、IFO, IV, IV+CSB, IV+CV を、陰性対照として PBS または CV を、day0, 3, 6 に各々 $50 \mu\text{l}$ 経尾静脈的に投与し、毎日腫瘍径を測定した。Day7 にマウスを sacrifice して腫瘍を採取し、腫瘍細胞の viability を病理組織学的に評価した。

投与7日目の腫瘍体積の平均値は $\text{PBS} > \text{CV} > \text{IFO} > \text{CV} > \text{IV} + \text{CSB} > \text{IV} + \text{CV}$ となり、コントロールに比べて、IV+CSB および IV+CV 投与群は有意に腫瘍体積増加を抑制した。(図4)

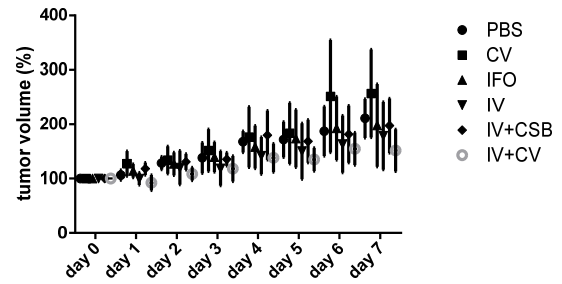


図4 ベシクル投与後の腫瘍体積

また、腫瘍の最大断面における壊死率を Image Pro Plus software®で測定したところ、壊死率は $\text{IV} + \text{CV} > \text{IV} + \text{CSB} > \text{IV} > \text{IFO} > \text{controls}$ (PBS, CV) となった。IV+CV 投与群の壊死率は IFO 単独または IV 単独投与群の壊死率に対し、有意に高かった。(図5、図6)

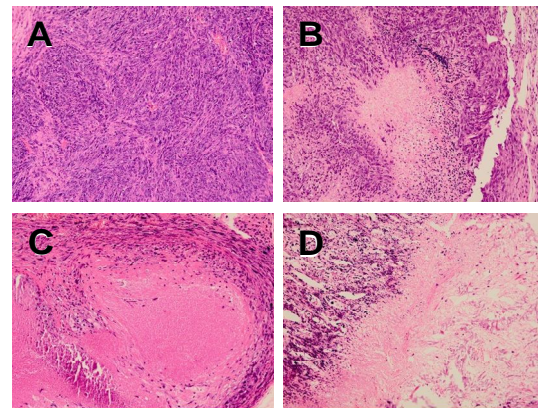


図5 ベシクル投与後の腫瘍の代表的組織像 A: CV, B: IFO, C: IV, D: IV+CV

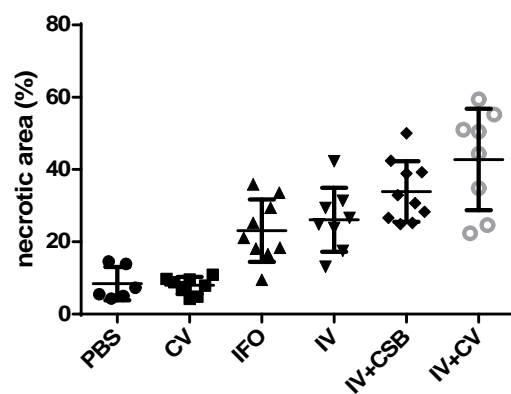


図6 ベシクル投与による組織学的腫瘍壊死率

(6) in vivo におけるカフェイン内包ベシクル投与による毒性・副作用の解析

上記の解析に用いたマウスの尿、血清を採取し、生化学的に各臓器機能を解析する。さ

らに、全臓器を治療による臓器毒性・副作用に関して病理組織学的に詳細に解析した。

IF0 単独投与では、タンパク尿と肝機能障害を示唆する生化学的所見を得たが、IV+CV 投与による生化学的異常は認めなかった。

IV または IV+CV 投与群では組織学的に、心、肺、肝、腎、脾、副腎、精巣、唾液腺、涙腺、消化管には異常所見を認めなかった。

(7) 孕妊性試験

IV 投与後の雄マウスを用いて孕妊性試験を行ったところ、孕妊性は保たれており、誕生したマウスに奇形は認めなかった。

(8) まとめ

これらの結果より、ifosfamide vesicle と CSB vesicle の同時投与がもっとも強い抗腫瘍効果を発揮し、少なくとも組織学的、生化学的に明らかな有害事象を誘導しないことが明らかとなった。

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 5 件)

1. 木谷 彰岐, 亀井 節也, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

転移性骨腫瘍が疑われた MTX 関連リンパ増殖性疾患の 1 例

中部日本整形外科災害外科学会雑誌 56 巻 6 号 Page1397-1398 (2013.11)

2. 木谷 彰岐, 亀井 節也, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

当院における粘液型脂肪肉腫の治療成績
中部日本整形外科災害外科学会雑誌 56 巻 2 号 Page359-360 (2013.03)

3. Nakamura A, Aizawa J, Sakayama K, Kidani T, Takata T, Norimatsu Y, Miura H, Masuno H. Genistein inhibits cell invasion and motility by inducing cell differentiation in murine osteosarcoma cell line LM8.

BMC Cell Biol. 2012 Sep 26;13:24.

4. 木谷 彰岐, 坂山 憲史, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

悪性腫瘍との鑑別に 201T1 シンチグラフィが有用であった Gossypiboma の 3 例
中部日本整形外科災害外科学会雑誌 54 巻 4 号 Page743-744(2011.07)

5. Sakayama K, Sugawara Y, Kidani T,

Fujibuchi T, Kito K, Tanji N, Nakamura A.

Polyostotic fibrous dysplasia with gigantism and huge pelvic tumor: a rare case of McCune-Albright syndrome.

Int J Clin Oncol. 2011 Jun;16(3):270-4.

[学会発表](計 3 件)

1. 木谷 彰岐, 亀井 節也, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

転移性骨腫瘍が疑われた MTX 関連リンパ増殖性疾患の 1 例、日本整形外科学会骨軟部腫瘍学会、2013/7/11-12、東京

2. 木谷 彰岐, 亀井 節也, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

当院における粘液型脂肪肉腫の治療成績
2012/10/5-6 中部整形災害外科学会、福井

3. 木谷 彰岐, 坂山 憲史, 藤渕 剛次, 中村 篤志, 中田 浩史, 三浦 裕正

悪性腫瘍との鑑別に 201T1 シンチグラフィが有用であった Gossypiboma の 3 例
中部日本整形外科災害外科学会、2011/4/6-7
中部日本整形外科災害外科学会 高知

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木谷彰岐 (KIDANI Teruki)

愛媛大学 医学部付属病院 講師

研究者番号：60380234

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

宮崎龍彦 (MIYAZAKI Tatsuhiko)

岐阜大学 医学部付属病院 准教授

研究者番号：80239384