

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791548

研究課題名(和文) マウス骨転移モデルに対するリン酸化プルラン・ゾレドロン酸混和物の抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文) Antitumor Effect of Zoledronic Acid-Loaded Phosphorylated Pullulan on Bone Metastasis Model of Mice.

研究代表者

武田 健 (TAKEDA, KEN)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70614923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞および、乳がん骨転移モデルマウスにリン酸化プルラン・ゾレドロン酸混和物を投与し抗腫瘍効果を検討した。in vitroでは、リン酸化プルラン・ゾレドロン酸混和物からの溶出液が抗腫瘍効果を示し、リン酸化プルランがゾレドロン酸の徐放効果を有していることが分かった。in vivoでもマウス脛骨の腫瘍内に局所投与したリン酸化プルラン・ゾレドロン酸混和物周囲に腫瘍壊死を認め抗腫瘍効果があった。また混和物周囲には骨形成を認めた。

研究成果の概要(英文)：We analyzed in vitro and in vivo antitumor effect of the mixture of zoledronic acid and phosphorylated pullulan for human breast cancer cell line. The elution of zoledronic acid released from phosphorylated pullulan exhibited antitumor effect. Phosphorylated pullulan exhibited a drug release property for zoledronic acid. The local administration of the mixture of the mixture of zoledronic acid and phosphorylated pullulan into the metastatic bone tumor model of nude mice exhibited antitumor effect. Furthermore, bone formation was observed around the mixture.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分科：整形外科学・細目：骨・軟部腫瘍学

キーワード：がん骨転移 ゾレドロン酸 ビスフォスフォネート

1. 研究開始当初の背景

研究協力者の吉田（北海道大学大学院生体材料工学）らは、独自に開発した硬組織接着性多糖誘導体リン酸化プルラン（特願2010-036350号）を用い、生体親和性が高く、かつ骨に対し強固に接着する生体吸収性骨セメントを創製した。これまでの研究でリン酸化プルランは骨の主成分であるハイドロキシアパタイトに対し、優れた接着性を示し、主々のリン酸化カルシウムと組み合わせることにより骨形成を促進することが分かった。またリン酸化プルランは薬剤徐放能を有しており、抗腫瘍薬を混和させることにより悪性骨腫瘍の治療へ応用できる可能性がある。本研究では、がんの骨転移モデルを用いて、転移性骨腫瘍におけるリン酸化プルラン・ビスホスホネート混和物の有用性を検討することを目的とした。

2. 研究の目的

(1) リン酸化プルランのビスホスホネート徐放能の検討

リン酸化プルランに第三世代のビスホスホネートであるゾレドロン酸を混和させ PBS バッファーに浸漬させゾレドロン酸を溶出させる。その濃度を経時的に計測し、徐放量を求めた。

(2) マウスがん骨転移モデルにおけるリン酸化プルラン・ビスホスホネート混和物の抗腫瘍効果の検討

がん骨転移モデルにリン酸化プルラン・ゾレドロン酸混和物を局所投与し、その抗腫瘍効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 薬剤徐放能の検討

第三世代のビスホスホネートであるゾレドロン酸を混入したリン酸化プルランのビーズ（直径 6mm、厚さ 2mm）を作製し、37 の PBS バッファーに浸漬し 24 時間後に PBS バッファーを交換し、それをゾレドロン酸が徐放されなくなるまで繰り返した。ビーズから溶出したゾレドロン酸の濃度を高速液体クロマトグラフィー法を用いて経時的に計測した。

(2) 抗腫瘍効果の検討

in vitro の抗腫瘍効果の検討

リン酸化プルランビーズから徐放された溶出液を、段階希釈し乳がん細胞株（MDA-MB-231）とともに培養し、cell proliferation assay（WST-1 assay）を行い、抗腫瘍効果を検討した。

in vivo の抗腫瘍効果の検討

4 週齢の BALB/c nu/nu マウスを用い、全身麻酔下に右脛骨骨内に乳がん細胞株（MDA-MB-231-luc）を接種させた。

がん骨転移モデルに、がん細胞接種後 4 週時に、下記 3 群の治療モデルを全身麻酔下に作製した。（N=5）

a：未治療群（リン酸化プルラン投与なし）

b：ゾレドロン酸 40 μ g/ml のみを充填した群

c：ゾレドロン酸 40 μ g/ml をリン酸化プルランに含有させ充填した群

・がん骨転移モデルの評価

a. 画像評価

1 週間毎にルシフェリンを腹腔内投与し、IVIS imaging system を用いて腫瘍組織の発光シグナルを検出した。

最終観察時（4 週時）に micro CT 撮影を行い評価を行う。以下の点に注目し評価を行った。

1. 骨転移による骨破壊の程度

2. ゾレドロン酸含有リン酸化プルラン周囲での骨形成の有無

b. 組織学的評価

全身麻酔下にマウスを屠殺し、右脛骨を摘出し、HE 染色により腫瘍進展範囲の観察を行った。

4. 研究成果

(1) 薬剤徐放能の検討

高速液体クロマトグラフィー法の条件検討を行い、徐放されたゾレドロン酸を検出したが、リン酸化プルランと思われる夾雑物により、正確な検量線の作成が困難であった(図 1)。

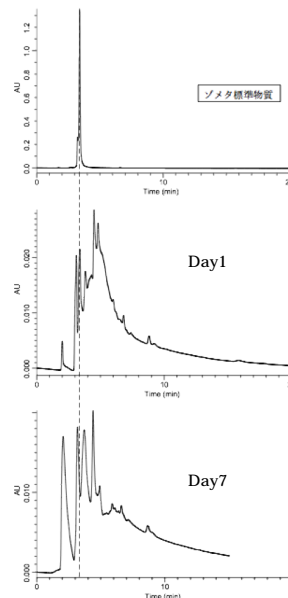


図 1. 徐放されたゾレドロン酸の測定

(2) 抗腫瘍効果の検討

in vitro での抗腫瘍効果の検討

リン酸化プルランにゾレドロン酸を混和し、PBS バッファーに浸漬させて生じた溶出液と

乳がん細胞株(MDA-MB-231)と共に培養し、WST-1 assay を行った。ゾレドロン酸群と同等程度の抗腫瘍効果が in vitro で認められた。

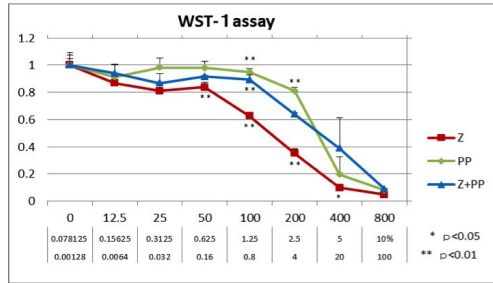


図 2. in vitro での抗腫瘍効果

縦軸 : MDA-MB-231 luc2 の生存数を各コントロール群での生存数と比較した相対値
第 1 横軸 (Z) : ゾレドロン酸投与量[ng/μl]
第 2 横軸 (PP) : リン酸化プルランの希釈割合 [%]
第 3 横軸 (Z+PP) : ゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物の希釈割合

in vivo での抗腫瘍効果の検討

未治療群に比べ、ゾレドロン酸単独、ゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物投与群では、IVIS にて腫瘍の活性が低下していた。(図 3)

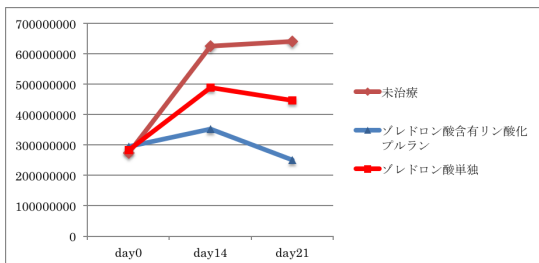


図 3. IVIS での腫瘍活性

micro CT による画像評価では、未治療群では、脛骨の骨破壊が顕著であったが、ゾレドロン酸投与群およびゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物投与群では、骨皮質は保たれており、骨転移巣の増大の抑制効果を認めた。(図 4)

組織学的に、未治療群では、脛骨骨内に腫瘍組織が充満していた。ゾレドロン酸単独投与群では、ゾレドロン酸充填部周囲に壊死組織を認めた。ゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物投与群では、投与部周囲に壊死組織を認めたほか、リン酸化プルラン周囲には骨組織を認めた。(図 4, 5)

これら、の結果から、ゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物は、乳癌細胞に in vitro, in vivo とともに抗腫瘍効果を認めることが明らかとなった。また、マウス骨転移モデルではゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物周囲に骨組織を認め、抗腫瘍効果に加え骨形成を促進している可能性がある。

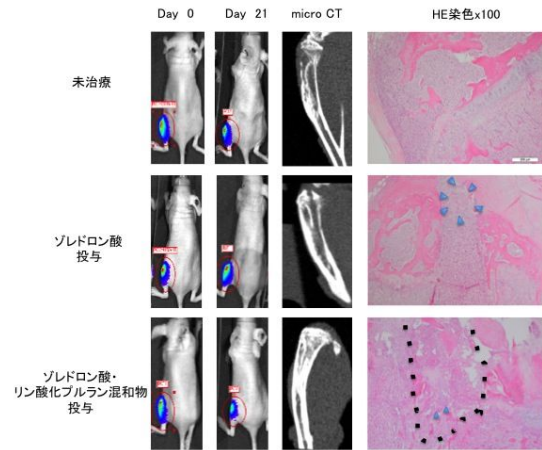


図 4. 骨転移モデルの評価 (IVIS, micro CT, HE 染色)

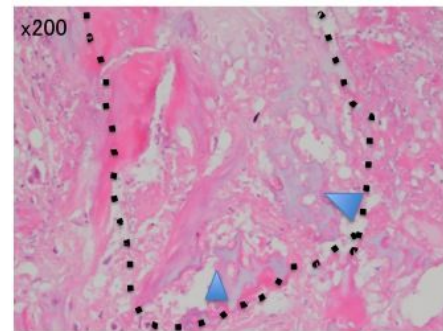


図 5. ゾレドロン酸・リン酸化プルラン混和物周囲での腫瘍壊死と骨形成

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

1. 発表者: Ken Takeda

演題名: Surgical treatment of Giant Cell Tumor of Bone in extremity.

学会名: International Society of Limb salvage
17th General Meeting

発表年月日：2013年9月11日~2013年9月13日

発表場所：ボローニャ(イタリア)

6 . 研究組織

研究代表者

武田 健 (TAKEDA KEN)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70614923