

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592244

研究課題名(和文)悪性骨・軟部腫瘍に対するナノ粒子を用いた新規補助療法の開発

研究課題名(英文)Development of new adjuvant therapy using nanoparticles for malignant bone and soft tumors

研究代表者

森岡 秀夫(Morioka, Hideo)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10230096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：原発性悪性骨・軟部腫瘍に対する化学療法は、骨髄抑制をはじめ、副作用が重篤である。治療成績は頭打ちの状態であり、その大きな障害として、薬剤耐性の問題があげられる。一方、近年様々なナノ粒子が報告され、がん治療における有効性が報告されている。我々の用いるナノ粒子は、生体に対する副作用が少なく、側鎖等、修飾可能なことが特徴で、極めて高い濃度で腫瘍に集積する。本研究では、このナノ粒子を用いて、治療抵抗性の原発性悪性骨・軟部腫瘍に対するin vitroおよびin vivo 抗腫瘍効果の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Improvements in surgical technique, chemotherapy, and radiotherapy have enhanced the prognosis of patients with malignant bone and soft tissue tumors, but have since reached a plateau in recent years. Novel approaches have been sought but with limited results. On the other hand, several varieties of nanoparticles, including multifunctional nanoparticles, are available that localize the biodistribution of conventional chemotherapeutics to the tumor site. Also, nanoparticles loaded with chemotherapeutic drugs have the ability to overcome drug resistance which is a major obstacle impeding the progress of the treatment. Multifunctional nanoparticles, which have the potential to further augment the bioavailability of drugs, are being actively investigated. The purpose of this study is to investigate in vitro and in vivo therapeutic effects of multifunctional nanoparticles in malignant bone and soft tissue tumors with drug resistance for current chemotherapy.

研究分野：骨・軟部腫瘍、骨転移、化学療法、分子標的治療

キーワード：悪性骨・軟部腫瘍 化学療法 ナノ粒子 薬剤耐性 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

原発性悪性骨・軟部腫瘍は間葉系由来の悪性腫瘍であり、いわゆる希少がんに含まれる。発生部位が多岐にわたり、病理組織学的に多彩であることが特徴である。米国では原発性悪性骨腫瘍は10万人に0.8人、悪性軟部腫瘍は10万人に5.0人で、年間約2400人の悪性骨腫瘍、約9000人の悪性軟部腫瘍の患者が発生するといわれている。多くの患者は比較的若年齢であるため、小児がんに含まれるものが多い。また上記のように、悪性骨・軟部腫瘍は稀であるがゆえ、他の悪性疾患と比較して、その危険因子ならびに病態についての解明が進まなかった。しかし近年、本疾患群に対して、術前化学療法が導入され、MRIなどの画像診断の進歩が、その治療成績に変化をもたらした。一方、肉腫に対する化学療法は、大量の抗がん剤を使用するプロトコルが多く、骨髄抑制をはじめ、副作用が極めて重篤である。また腫瘍の薬剤耐性の問題などから、治療成績は頭打ちの状態であり、大きな予後の改善を認めていない。現在有効な補助療法がない肉腫も存在し、切除不能例、再発例などは、治療に難渋している状況がある。したがって、原発性悪性骨・軟部腫瘍の治療において、より安全で効果的な新規治療薬の開発が強く望まれている。

治療の大きな障害として、抗がん剤耐性の問題があげられる。治療経過中に薬剤が奏効しなくなる悪性腫瘍の薬剤耐性の問題は肉腫だけではなく、がん治療全体の進歩を阻んでいる。この克服のために様々な研究が行われているが、残念ながら副作用の問題から実用化にはいたっていない。

一方、近年様々なナノ粒子が報告され有効性が諸家より報告されている。我々の用いるナノ粒子はNortheastern大学(米国)との共同開発で、生体に対する副作用がなく、容易に側鎖等、修飾可能なことから注目されている。ナノ粒子は一旦体内に入ったあと、腫瘍血管新生に伴う血管脆弱性(enhanced permeability and retention(EPR))のため(図1)心臓、肝臓等、他の重要臓器には集積せず、極めて高い濃度で腫瘍に特異的に集積することが既に報告されている。本ナノ粒子を用いることで、治療抵抗性の原発性悪性骨・軟部腫瘍の治療にブレイクスルーを起こすことができると考えている。

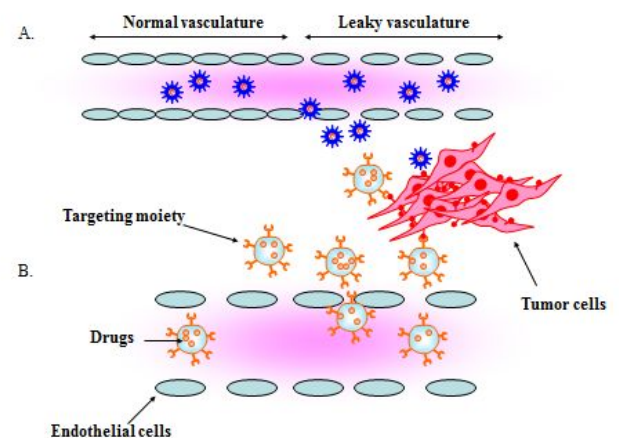
## 2. 研究の目的

治療経過中に薬剤が奏効しなくなる悪性腫瘍の薬剤耐性の問題は肉腫だけではなく、がん治療全体の問題である。一方、ナノ粒子は、抗がん剤やsiRNAを容易に結合しうることから、がん治療への応用が試みられている。我々も、ナノ粒子がP-gpなどの抗がん剤排出ポンプを回避することを報告している。また近年、腫瘍特異的キナーゼが脚光を浴び、

特にgastrointestinal stromal tumorに対するimatinib mesylateの著明な予後改善効果は分子標的治療が、今後のがん治療の標準になる可能性を示唆するものであった。我々は、このキナーゼの効率的な導入にもナノ粒子は応用できるものと考えている。さらにsiRNAの臨床応用にあたって、生体内での不安定性が問題になっているが、ナノ粒子をsiRNAのdeliveryに応用することで、持続性を持つ安定した治療効果が得られる可能性がある。抗がん剤排出ポンプ関連タンパク質や各種の肉腫特異的遺伝子異常の抑制に、ナノ粒子が寄与できる可能性もある。最後にナノ粒子にサイアニン等の蛍光色素を含有あるいは、表面に付着させることにより、腫瘍細胞のトラッキング、治療効果の判定に応用可能と考えている。

本研究では、これらのテーマを中心に、最終的に治療抵抗性の原発性悪性骨・軟部腫瘍に対するナノ粒子を用いた新規治療法の開発を目指し検討する。

(図1)



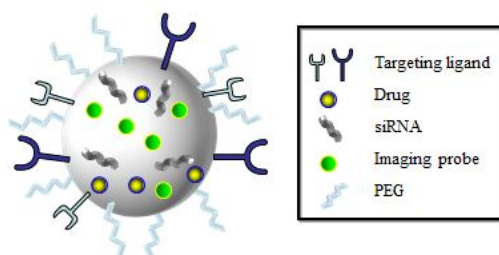
- A. Passive targeting: 腫瘍血管の透過性の亢進により、ナノ粒子がきわめて特異的に腫瘍に集積することが報告されている。
- B. Active targeting: ナノ粒子にリガンドや抗体を修飾させることにより、より腫瘍特異的に抗がん剤や遺伝子導入が可能になるものと考えられる。

## 3. 研究の方法

様々なナノ粒子が近年報告されているが、我々の用いるデキストラン型ナノ粒子は生体に対する副作用が少なく、容易に側鎖等、修飾可能という特徴がある。デキストラン型ナノ粒子に各種抗がん剤、siRNA、蛍光色素を付着、含有させることにより、悪性骨・軟部腫瘍への影響を検討する。生成した新規ナノ粒子を数種類の肉腫細胞

株に作用させることにより、*in vitro*での解析を行った。有意な細胞増殖抑制効果を示したマルチファンクショナルナノ粒子(図2)を肉腫動物モデルに投与し、抗腫瘍効果、副作用の検討を行った。

(図2)



### マルチファンクショナルナノ粒子

ナノ粒子上あるいは内部に遺伝子や抗癌剤を修飾させ、さらにイメージングプローブを導入することにより、治療から効果判定まで幅広い用途を担うものと考えられる。

## 4. 研究成果

骨肉腫、軟骨肉腫、Ewing 肉腫の原発性悪性骨腫瘍細胞株を、また滑膜肉腫、悪性線維性組織球腫(UPS)、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫の原発性悪性軟部肉腫の細胞株を本研究に用いた。可能なものは、既に樹立株化された細胞株を購入し、既存のものが存在しない場合、同意を得て手術等により切除された腫瘍組織から細胞株を樹立し研究に用いた。これらの細胞株を用いて、低濃度接触法で各種抗がん剤(ドキシソルピシンなど)耐性細胞株を作製した。ナノ粒子に肉腫の治療におけるキードラッグであるドキシソルピシンやイフォスファミドを含有させ抗がん効果を結合させ、*in vitro*で抗腫瘍効果を検討したところ、ナノ粒子を用いない場合に比較して、有意な抗腫瘍増殖抑制を認めた。ヌードマウスに移植した薬剤耐性株を用いた *in vivo* 実験では、薬剤耐性骨肉腫、軟骨肉腫、Ewing 肉腫細胞株はヌードマウス的大腿骨内へ、滑膜肉腫、悪性線維性組織球腫(UPS)

横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、脂肪肉腫の薬剤耐性原発性悪性軟部肉腫の細胞株はマウス背部皮下へ移植した。作成した肉腫モデルへは尾静脈から、1.既存の抗がん剤のみ、2.ナノ粒子と結合した抗がん剤を投与した。この結果、ナノ粒子併用により、抗腫瘍効果の改善を得ており、薬剤耐性の克服に有用な方法と考えられた。次に、近年肉腫特異的な転座により生じる融合遺伝子が多数報告されており、これらは有用なターゲットになりうるものと予想される。その中で Ewing 肉腫の *EWS-FLI1*、滑膜肉腫の *SYT-SSX* が代表的であり、既に診断の分野で臨床応用されている。次に、これらの siRNA をナノ粒子により導入し、抗腫瘍効果が得られるか検討した。*In vitro* では、いくつかの細胞株で、腫瘍のアポトーシスが観察されたが、安定した抗腫瘍効果が得られず、ナノ粒子との結合の問題や siRNA の安定性など、いくつかの問題点があることが明らかとなった。ナノ粒子を用いた siRNA による肉腫特異的な分子標的療法開発のためには、ナノ粒子と siRNA の結合性、siRNA の安定化、drug delivery の問題の問題など、様々な条件設定でさらに研究を進める必要があると思われた。最後に、腫瘍の治療効果をより客観的に評価するため、Cy5 などのサイアニンをナノ粒子に付着させ、*in vivo* 実験で、蛍光イメージング装置を併用し腫瘍の縮小効果を評価した。移植した腫瘍径と蛍光強度は相関を示し、非侵襲的に抗腫瘍評価を行うことが可能と考えられ、今後さらに実験を進める予定である。また、drug delivery をさらに有効なものにするため、肉腫特異的なターゲットとなりうる ligand や抗体を付着させ能動的に腫瘍に蓄積するナノ粒子を開発する予定である。

## 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 62 件)

- (1) Kawai,A., Araki,N., Sugiura,H., Ueda,T., Yonemoto,T., Takahashi,M., Morioka,H., Hiruma,T., Kunisada,T., Matsumine,A., Tanase,T., Takahashi,S., Trabectedin monotherapy in advanced translocation-related sarcomas after standard chemotherapy: an open-label randomized phase 2 comparison study with best supportive care. *Lancet Oncol.*、査読あり、2015、16 (4) 406-416. doi:10.1016/S1470-2045(15)70098-7.
- (2) Mori,T., Sato,Y., Miyamoto,K., Kobayashi,T., Shimizu,T., Kanagawa,H., Katsuyama,E., Fujie,A., Hao,W., Tando,T., Iwasaki,R., Kawana,H., Morioka,H., Matsumoto,M., Saya,H., Toyama,Y., Miyamoto,T.: TNF $\alpha$  promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene*. 査読あり、2014、33 (33) : 4236-4241. doi:10.1038/onc.2013.545.
- (3) Kobayashi,E., Sato,R., Ono,M., Masuda,M., Honda,K., Sakuma,T., Kawai,A., Morioka,H., Toyama,Y., Yamada,T.: MicroRNA Expression and Functional Profiles of Osteosarcoma. *Oncology*、査読あり、2014、86(2)、94-103 . doi:10.1159/000357408.
- (4) Kikuta,K., Kubota,D., Yoshida,A., Suzuki,Y., Morioka,H., Toyama,Y., Kobayashi,E., Nakatani,F., Chuuman,H., Kawai,A.: An analysis of factors related to recurrence of myxofibrosarcoma. *Jpn J Clin Oncol.*、査読あり、2013、43(11):、1093-1104 . doi:10.1093/jjco/hyt119.
- (5) Nakayama,R., Miura,Y., Ogino,J., Susa,M., Watanabe,I., Horiuchi,K., Anazawa,U., Toyama,Y., Morioka,H., Mukai,M., Hasegawa,T.: Detection of HEY1-NCOA2 fusion by fluorescence in-situ hybridization in formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a possible diagnostic tool for mesenchymal chondrosarcoma. *Pathol Int.*、査読あり、2012、62(12)、823-826. doi:10.1111/pin.12022.
- (6) Asano,N., Susa,M., Hosaka,S., Nakayama,R., Kobayashi,E., Takeuchi,K., Horiuchi,K., Suzuki,Y., Anazawa,U., Mukai,M., Toyama,Y., Yabe,H., Morioka,H.: Metastatic patterns of myxoid/round cell liposarcoma: a review of a 25-year

experience. *Sarcoma.*、査読あり、2012. doi: 10.1155/2012/345161.

〔学会発表〕(計 126 件)

- (1) Takafumi,U., Takahashi,S., Araki,N., Sugiura,H., Yonemoto,T., Takahashi,M., Morioka,H., Hiruma,T., Hiraga,H., Kunisada,T., Matsumine,A., Tanase,T., Kawai,A.: Stratified efficacy analysis and pharmacokinetic (PK) analysis of tarbectedin from a randomized phase II study comparing trabectedin and best supportive care (BSC) in patients (PTS) with translocation-related sarcomas (TRS). *Connective Tissue Oncology Society, 19th Annual Meeting.* 2014.10. Berlin, Germany.

〔図書〕(計 7 件)

- (1) 森岡秀夫、南山堂、肉腫化学療法マスタークラス、2015、p239-244.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

該当なし

取得状況 (計 0 件)

該当なし

〔その他〕

該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

森岡 秀夫 (Hideo Morioka)  
慶應義塾大学・医学部・専任講師  
研究者番号 : 10230096

### (2)研究分担者

須佐 美知郎 (Michiro Susa)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90327560