

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10959

研究課題名(和文) 抗がん剤の骨内局所投与による骨転移がんの局所制御

研究課題名(英文) Effects of locally delivered anti cancer drugs using HAp/Col

研究代表者

山田 剛史 (Yamada, Tsuyoshi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：40645727

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HAp/Colに抗がん剤のパクリタキセルを含浸させて骨組織内に移植すると、移植後8週まで抗がん剤の効果は持続し、その後はHAp/Colによる骨形成促進効果が確認された。ラットの骨転移がんモデルで同様の検討を行うと、抗がん剤を含浸させたHAp/Colを移植した群は生存率が高いだけでなく、移植部位での骨再生が促進されていた。

HAp/ColはVCMやMINO、TEICなどの抗菌薬を吸着でき、その吸着効果によりこれらの抗菌薬を含浸させたHAp/Colを生体内に移植した場合、2週間以上にわたり抗菌作用が維持された。骨髄炎モデルに移植をすると骨髄炎は治癒し、骨髄炎治療に対する有効性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨転移がんや骨髄炎など、局所病変であるにも関わらず難治性の骨病変がある。これらに対する治療薬は全身投与した場合、必ずしも局所への移行が十分とは言えず治療効果が不十分であることが多い。また局所での薬剤濃度を有効濃度まで高めるためには大量投与が必要となり、全身への影響を考慮すると不可能であることが多い。今回、HAp/Colという薬剤を吸着する特性を有する骨補填材を薬剤担体として使用することで、これら疾患に対して安全で有効性の高い治療法を提供できる可能性を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Hydroxyapatite/collagen composite (HAp/Col) containing paclitaxel, which is an anticancer drug, maintained the anticancer efficacy even at 8 weeks after transplanted into bone defects. Then the HAp/Col promoted bone regeneration at the bone defect sites. The efficaciousness was proved using a rat bony metastasis model.

Minocycline, vancomycin and teicoplanin, which are antibacterial drugs, adsorbed on HAp/Col. HAp/Col combined with these adsorptive drugs maintained the maintained antibacterial activity more than 14 days even after transplanted in muscle. HAp/Col combined with vancomycin healed osteomyelitis caused by Staphylococcus aureus.

研究分野：人工骨、骨再生、整形外科

キーワード：HAp/Col 吸着 骨転移がん 骨髄炎 抗がん剤 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

[がんの骨転移]

乳がんは女性において罹患数の最も多いがんで(115人/10万人/年)、前立腺がんは男性において罹患数が胃、大腸、肺に次いで4番目に多いがんである(120人/10万人/年)。死亡数は乳がんで部位別4位(20人/10万人/年)、前立腺がんで部位別6位(18人/10万人/年)であり、両者に共通する特徴として罹患率が高い割には死亡数がそれほど高くない全ステージ合計での5年生存率が、ともに約80%にも達し予後が長いということが挙げられる。さらに共通する特徴として骨転移の頻度が高いということが挙げられる。骨転移の頻度は、どちらのがんも20~30%と考えられており、完治せずに長期生存している骨転移患者の数は相当な数にのぼる。

[骨転移がんの治療]

がんの骨転移が生じた場合も原発がんに対する治療がベースとなり、骨転移巣局所には放射線を照射してがん細胞を死滅させようという治療が行われてきた。近年では、これらの治療に加え、がんの骨転移に重要な破骨細胞の働きを強力に抑制できる薬剤が開発され使用されている。代表的な薬剤としてビスフォスフォネート製剤(BP)であるゾレドロネートや抗RANKL抗体のデノスマブが挙げられる。全身性に投与するため多発骨転移にも有効で、疼痛緩和、Caの上昇抑制などの効果が高い。しかしながら、がん細胞に対する作用はほとんどなく、転移がんを死滅させることは不可能である。ストロンチウムの放射性同位元素であるSr89も骨転移治療に用いられている。Sr89は骨転移巣の破骨細胞によって生じた骨びらん部に集積する性質があり、周囲のがん細胞を死滅させることで疼痛を緩和することができる。副作用には骨髄抑制があり、抗がん剤治療との同時進行ができないなどの問題点がある。このように、骨転移がんの治療は、近年目覚ましい進歩を遂げているものの、骨転移局所の完治は、ほとんど期待できない。非荷重部であれば完治しなくてもあまり問題にならないかもしれないが、骨盤や下肢などの荷重骨であれば疼痛の原因となり歩行困難などが生じる。また、脊椎への骨転移の場合には、麻痺を生じ著しくADLを低下させることも稀ではない。しかしながら、骨転移局所の完治を目的とした手術は広範切除となり、転移の生じた骨だけでなく、筋肉などの周囲組織も摘出することになるため、機能的な損失は大きい。当然ながら、できるだけ侵襲が小さい手術が理想であるが、姑息的に病巣を搔爬するだけでは再発は時間の問題で、治療的価値は無かったことになってしまう。

[ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体(HAp・Col)]

HAp/Colはナノサイズのハイドロキシアパタイト(HAp)結晶とコラーゲン線維からなる生体材料で、これを多孔体化した多孔質HAp/Colは高い骨伝導能を有し、すでに発売されている。HApは様々な物質を吸着することができるが、HAp/Colに含まれるHAp結晶はナノサイズであるため、表面積が非常に大きく(1gあたり75m²)、親和性を持つ物質であれば多量に吸着することができる。

2. 研究の目的

仮説 : 骨転移巣において腫瘍のみを搔爬あるいは切除するような姑息的な手術であっても、その後、同部位局所を一般的な全身投与の抗がん剤治療よりも高い抗がん剤濃度で一定期間維持できれば、局所での根治性が得られるだけでなく、全身性の副作用のリスクも減らすことができる。

仮説 : 転移腫瘍の死滅後、骨再生を促進するには足場材が必要。

本研究では、上記仮説のもと、HAp/Col を抗がん剤の担体として、かつ骨再生の足場材として用いることで、抗がん剤の局所デリバリーによる骨転移巣のがんを死滅させるとともに、骨転移により生じた骨欠損の再生を促進することを最終的な目的とする。

[抗がん剤の局所投与に関する研究]

これまでも抗がん剤を担体に担持させて骨転移がんの治療に応用しようという試みはされており、国内でも 1990 年代前半から報告され始めている。薬剤ではシスプラチンやパクリタキセル、アドリアマイシンなどが多く、担体では PMMA セメントやリン酸カルシウムセメントもしくはハイドロキシアパタイト含有のゲルなどが多い。しかしながら、臨床応用されたという報告もあるが、実際には臨床で普及しておらず、十分な結果が得られていないことを示唆しているといえる。

3. 研究の方法

骨欠損モデル (正常組織) における評価

抗がん剤 (パクリタキセル、カルボプラチン) を含浸させた HAp/Col を健常ラットの骨欠損に移植し影響を評価する。

ラットの両側大腿骨に骨孔を作成し、片側に抗がん剤を含浸させた多孔質 HAp/Col を移植し、反対側には比較対象として、抗がん剤を含まない多孔質 HAp/Col を移植し、左右比較を行う。抗がん剤を局所投与したラットでは、抗がん剤の局所投与による移植部への影響 (細胞侵入・増殖、細胞死、骨再生など) を投与側と非投与側で比較し、期待通り投与側のみで抗がん剤の影響が表れているか確認する。評価はマイクロ CT、組織標本を用いて行った。

骨転移モデルにおける有効性評価 (パクリタキセル)

ラット由来乳がん細胞をラット皮下に移植した。移植後 1 週で皮下に形成されたがん細胞の結節を摘出し、1mm 角に切り分けた。ラットの大腿骨に骨孔を作成しがん組織片を移植し、さらにパクリタキセル含浸 HAp/Col を移植した。コントロールは生理食塩水を含浸させた HAp/Col。移植後 8 週まで経過観察し、途中で死亡したラットに関してはその時点で組織を摘出し評価を行った。

抗菌薬担体としての HAp/Col の評価

整形外科領域において骨髄炎も骨転移がんと同様難治性で治療に難渋する疾患である。抗菌薬を全身投与しても骨への移行性は低いものが多く、目的とする菌に感受性の高い薬剤

を全身投与しても治療効果が不十分なことも多い。抗菌薬を骨髄炎の病巣に局所的に投与できれば全身性の影響も少なく局所濃度を高めることができ、骨髄炎治療に有効であると考えられる。

抗菌薬の吸着評価：

HAp/Col と抗菌薬溶液を混ぜ合わせてから遠心分離し、上清中の抗菌薬濃度を分光光度計を用いて計測した。上清の抗菌薬濃度が低下していればその分は HAp/Col に吸着していることになる。検討抗菌薬：CEZ, CTM, DPT, MINO, PIPC, TEIC, VCM

抗菌薬含浸 HAp/Col の生体内での抗菌作用持続期間の評価

各種抗菌薬を含浸させた HAp/Col をラットの皮下に移植した。移植後 1, 3, 5, 7, 14 日後に摘出し凍結保存した。凍結保存した摘出インプラントを解凍し、黄色ブドウ球菌を含む寒天培地中に埋入し 24 時間培養した。埋入したインプラント周囲に形成される阻止円で抗菌作用を評価した。

骨髄炎モデルでの抗菌薬含有 HAp/Col の評価

ラット大腿骨に直径 1mm の骨孔をあけ、黄色ブドウ球菌を含む菌液を骨内に接種した。骨孔を骨蝟で塞ぎ、1 週間後に同部位に直径 3mm の骨孔を作成し、抗菌薬（生食、CEZ または VCM）を含浸させた HAp/Col を移植した。経時的に評価し骨髄炎治療に対する有効性を評価した。

4. 研究成果

骨欠損モデル（正常組織）における評価

パクリタキセルを含まない多孔質 HAp/Col を移植した部位では、移植後 4 週において旺盛な骨形成が認められたのに対し、パクリタキセル含浸多孔質 HAp/Col を移植した部位では、移植後 4 週において、インプラントの気孔内部には細胞の侵入もほとんど認めなかった。この所見は 8 週まで続いたが 12 週になると移植部に旺盛な骨形成を認め、インプラントの吸収も進んでいた。このことから、8 週までは含浸させたパクリタキセルの薬効は発揮され、さらに残存した HAp/Col はパクリタキセルの薬効消失後に骨補填材として骨再生を促進することが確認された。

カルボプラチンを含まない多孔質

HAp/Col を移植した部位では、移植後 4 週において旺盛な骨形成が認められたのに対し、カルボプラチン含浸多孔質 HAp/Col を移植した部位では、移植後 4 週において、インプラントの気孔内部には細胞の侵入もほとんど認めなかった。しかしながら移植後 8 週めには旺盛な骨形成をみとめカルボプラチン含浸 HAp/Col を移植した部位でも骨再生は進んでいるのが確認され、これは昨年度検討を行ったパクリタキセルよりも早く骨再生が生じたことになる。これはカルボプラチンの薬理作用がパクリタキセルよりも短期間しか維持されなかったことを示していると考えられるが、パクリタキセルが脂溶性であるのに対しカルボプラチンが水溶性であり、よる早く多孔質 HAp/Col より放出されたためと考えられた。

骨転移モデルにおける有効性評価 (パクリタキセル)

抗がん剤を含まない HAp/Col を移植したコントロール群では、術後 3 週までにすべてのラット (n=10) が死亡した (平均生存期間 17.5 日)。パクリタキセル含浸 HAp/Col を移植した群では移植後 6 週までに 8 匹が死亡し、2 匹は最終観察期間の 8 週においても生存していた。死亡した 8 匹の平均生存期間は 26.5 日であった。生存例に関しては、残存した HAp/Col 周囲の骨形成を認め、HAp/Col が抗がん剤の担体としてがんの局所制御に寄与しただけでなく、骨欠損の再生にも骨補填材として寄与したことが確認できた。

抗菌薬担体としての HAp/Col の評価

CEZ, CTM, PIPC などが HAp/Col に吸着しなかったのに対し、DPT, MINO, TEIC, VCM は HAp/Col に吸着することが確認された。

抗菌薬含浸 HAp/Col の生体内での抗菌作用持続期間の評価

移植する前の抗菌薬含有 HAp/Col はどの抗菌薬に関しても阻止円を形成し黄色ブドウ球菌に対する抗菌作用を有していることが確認された。移植後 1 日に摘出したインプラントを埋入した場合、で HAp/Col に吸着しないことが確認されている CEZ, CTM, PIPC に関しては阻止円が形成されず、移植後 1 日で既に薬剤が放出され抗菌作用を失っていることが確認された。これに対し HAp/Col に吸着することが確認されている MINO, TEIC, VCM に関しては、移植後 14 日に摘出したインプラントでも阻止円を形成し、生体内においても 2 週間以上にわたり抗菌作用を維持できることが確認された。なお、DPT に関しては生体内の条件下では薬剤自体が活性を失ってしまうことを確認しており、その結果 3 日後のインプラントまでしか抗菌作用を維持していなかった。

このことから HAp/Col に吸着する MONO, TEIC, VCM などは骨髄炎などの局所的な感染症の治療に関して、HAp/Col に含ませて移植することで有効であると考えられた。

骨髄炎モデルでの抗菌薬含有 HAp/Col の評価

生食を含ませた HAp/Col を移植した群では、移植後 1 週の時点で骨髄炎による激しい骨溶解と骨膜反応を認めた。対して VCM を含浸させた HAp/Col を移植した群では骨溶解はほとんど認めず、骨膜反応もごく軽度であった。CEZ を含浸させた HAp/Col を移植した群は、これらの中間的な結果であった。移植後 2 週、4 週と骨髄炎自体は消退傾向に向かった。(本骨髄炎モデルが自然治癒するモデルであるためと考えられた) しかしながら、VCM 群がオリジナルの骨が維持され、さらに移植した HAp/Col による骨再生促進効果が認められたのに対し、生食群では 2 週の時点で HAp/Col は消失し、治癒後の骨は骨溶解後に再生された骨であった。CEZ 群はオリジナルの骨は保たれていたものの、HAp/Col は早期に消失し、HAp/Col による骨形成促進効果は認められなかった。

このことから、VCM などの HAp/Col に吸着する抗菌薬を含浸した HAp/Col は、骨髄炎治療に有効であるだけでなく、その部位の骨再生も促進することが確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大木 崇宏、江川 聡、松本 連平、平井 敬悟、吉井 俊貴、湯浅 将人、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）の各種抗菌剤の吸着性とラット生体 内の経時的抗菌作用についての検討
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平井 敬悟、江川 聡、松本 連平、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳、中島 武彦、早乙女 進一
2. 発表標題 ガンマ線照射が多孔質ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）に与える影響—筋組織内での評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 連平、江川 聡、平井 敬悟、山田 剛史、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 乳癌骨転移モデルラットに対するパクリタキセル 含浸HAp Col による局所制御実験
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 早乙女 進一、松本 連平、江川 聡、平井 敬悟、湯浅 将人、吉井 俊貴、大川 淳
2. 発表標題 骨形成を促進する薬剤担体としてのハイドロキシ アパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉井 俊貴、早乙女 進一、江川 聡、平井 敬悟、松本 連平、平井 高志、湯浅 将人、猪瀬 弘之、新井 容嘉、大川 淳
2. 発表標題 当科で開発した人工骨，多孔質ハイドロキシアパタイト コラーゲン複合体の脊椎固定術における 臨床使用と骨癒合評価
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江川 聡、松本 連平、平井 敬悟、吉井 俊貴、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 ラット大腿骨急性骨髄炎モデルにおける抗菌剤含 有ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体（HAp Col）の治療効果
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本 連平、江川 聡、平井 敬悟、偉 雪濤、吉井 俊貴、大川 淳、早乙女 進一
2. 発表標題 乳癌骨転移モデルラットに対するパクリタキセル含浸HAp/Colによる局所制御実験
3. 学会等名 第39回日本バイオマテリアル学会
4. 発表年 2017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	阿江 啓介 (Ae Keisuke) (20376726)	東京医科歯科大学・医学部・非常勤講師 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	早乙女 進一 (Sotome Shinichi) (20401391)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・非常勤講師 (12602)	
研究分担者	大川 淳 (Okawa Atsushi) (30251507)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	吉井 俊貴 (Yoshii Toshitaka) (50583754)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	