

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25年5月27日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591662
 研究課題名(和文) 超音波バブルリポゾームを用いた新規抗癌剤デリバリーシステムによる肉腫標的治療
 研究課題名(英文) Anti-tumor effect of doxorubicin with bubble liposome and ultrasound

研究代表者

横内 雅博(YOKOUCHI MASAHIRO)
 鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
 研究者番号：80359976

研究成果の概要(和文)：悪性骨軟部腫瘍(骨軟部肉腫)に対する治療において、超音波薬剤導入法を使用し抗癌剤の作用を増強させることによる副作用軽減・予後改善を目的として、臨床応用に役立つ最適なプロトコルの確立を目指して研究を行った。超音波薬剤導入法を使用することにより肉腫細胞の増殖及び肺転移が抗癌剤単独使用群に比べ、有意に抑制できることを確認できた。

研究成果の概要(英文)：

We constructed a drug delivery system by concomitant use of ultrasound with doxorubicin, a key drug in the chemotherapy of osteosarcoma, and demonstrated both *in vitro* and *in vivo* that this drug delivery system markedly inhibited the proliferation of osteosarcoma cells and pulmonary metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学分野

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：骨軟部肉腫 化学療法 抗癌剤 有害事象

1. 研究開始当初の背景

かつて肺転移をみない骨肉腫に対しては、ただちに切断術が行われていたが、残念なことに多くのものがその後の経過中に肺転移をきたし、5年生存率は20%以下という時代があった。このことは骨肉腫患者の大半が初診時に既に微小肺転移をきたしていることを意

味し、骨肉腫の治療にあたっては局所の制圧とともに、肺の微小転移に対する治療も初期の段階より必要欠くべからざるものであることを示している。その肺転移の制御の中心となるのは化学療法であり、骨肉腫の生命予後は化学療法により決定されるといっても過言ではない。事実、

近年の抗がん剤や有効なプロトコールの開発により5年生存率は50% - 70%にまで向上している。しかしながら薬剤無効例や薬剤に対する耐性を獲得した例、また化学療法副作用によりプロトコールを逸脱する症例などについては現在も、骨肉腫は予後不良の難治性疾患として我々の前に立ちはだかっている。さらに腫瘍の存在部位により、外科的治療が困難な症例や安全な切除縁の確保が困難な症例などでは、より高い機能的予後も鑑みたより強力な局所制御を有する治療方法が必要であると考えられる。このような背景において我々は骨肉腫の治療成績の更なる向上のためのひとつの手段として抗がん剤の腫瘍細胞への選択的取り込み効率を増強する方法の開発について検討してきた。

腫瘍細胞への薬剤（抗がん剤）の取り込みを効率よく行わせる重要な手段として、超音波薬物導入法があげられる。超音波刺激を利用した遺伝子導入法は基礎実験や治療への応用が注目されているが、近年では現在臨床応用されている診断用超音波造影剤（マイクロバブル）と治療的超音波エネルギーを応用することで更に遺伝子導入の効率が高められることが発見されている。しかし超音波を利用し細胞内へ遺伝子を導入する試みは現在では数多くの報告があるが、薬剤導入については未だ報告は少なく骨軟部悪性固形腫瘍に関しては報告がなかった。しかし他の悪性腫瘍については有効性が認められているものがあり、骨軟部悪性腫瘍に関しても超音波刺激による薬剤導入効率、腫瘍壊死効果が十分期待できると考えられた。

超音波を用いる利点としては、現在臨床の場において主に治療、診断用機器に使用されており、低侵襲であるうえ、その安全性も確立されたものであることが挙げられる。さらに、体内照射式の超音波装置も臨床応用されていることを考えれば、超音波薬剤導入法は臨床へ直結する方法といえるものである。しかし、超音波薬剤導入法は骨軟部悪性固形腫瘍に対する有効性については報告がなく、有効な治療プロトコールも確立されていないのが現状であった。

我々はこれまで骨軟部組織への物理刺激による生体反応については、高気圧酸素療法、温熱、電磁波、超音波などについて一連の基礎的実験を行ってきた。この中で超音波を使用した肉腫治療に対しても、研究成果を国内外に発表してきた

(Ueno et al. Anti-tumor effect of doxorubicin with bubble liposome and ultrasound.

54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society
March 2-5, 2008 San Fransisco).

今回はこの超音波を用いた薬剤増強効果に

関して、臨床応用に役立つ最適なプロトコールの確立を目指して研究を行った。

2. 研究の目的

悪性骨軟部腫瘍はその発生頻度の低さから他の癌種に比べ、基礎および臨床研究や新規治療法の開拓が満足に進んでいるとは言い難い。実際にその5年生存率は20数年間停滞しており、更なる飛躍的な治療成績の向上には何らかのbreak throughが必要である。本研究の目的は、超音波を用いた抗がん剤治療法に関して、臨床応用に役立つ最適なプロトコールの確立を目指すことで、新規治療法へと結び付けていくことである。

3. 研究の方法

(概要)

1. 抗がん剤の肉腫細胞に対する効率よい導入条件についての確立 (in vitro, in vivo)
2. モデルマウスの作成及び超音波を用いた薬剤導入による抗がん剤増強効果についての検討

3. 薬剤耐性骨肉腫担がんマウスの作成、及び薬剤耐性骨肉腫マウスに対する超音波を用いた薬剤導入による抗がん剤増強効果についての検討

この3つの点について明らかにし、臨床応用に役立つ最適なプロトコールの確立という目的の達成を目指した。

(具体的方法)

I 培養細胞の調整及び薬剤投与と超音波照射
超音波照射直前に超音波造影剤を加え、薬剤 adriacin(ADM)と cisplatin(CDDP)と methotrexate(MTX)をそれぞれ単独で添加し超音波を溶液に照射する。対照として非薬剤投与群、薬剤投与+非超音波照射群をたてた。評価はMTT法、フローサイトメトリーによる生細胞数の測定、細胞内薬剤濃度測定で行った。

II マウス由来肉腫細胞 cell line LM8を 1×10^7 に調整し6WのC3Hマウスの側背部に注射した。腫瘍体積が 1cm^3 になるまで観察し、研究に用いた。

まず、C3Hマウスに超音波を単独照射し組織障害を引き起こさない条件を確認した。次に、adriacin(ADM)と cisplatin(CDDP)とを、それぞれ超音波造影剤と混合し投与した。薬剤の濃度は薬剤によって変更し、超音波造影剤の濃度は0%~30%までで行った。投与後超音波を腫瘍部位に照射し、その後腫瘍を経時的に観察した。対照として非薬剤投与群、薬剤投与+非超音波照射群をたてた。薬剤の効果判定評価は、

1. 腫瘍体積
2. 腫瘍壊死率

3. 腫瘍細胞内薬剤濃度の測定

4. 肺転移の有無、生存率

上記で行った。

さらに薬剤の導入効率を、組織内抗がん剤濃度を測定することにより検討した。

III 薬剤耐性骨肉腫モデルマウスの作成。

分子生物学的手法を用いて多剤薬剤耐性遺伝子を発現ベクターに組み込み、培養骨肉腫細胞 (LM8) に遺伝子導入した。そこから G418 による選択をおこない、stable cell line を作成し薬剤による耐性を解析した。Stable cell line は、その発現の程度の異なるいくつかの株を用いた。

4. 研究成果

我々は、まず超音波を使用した抗がん剤の肉腫細胞に対する効率よい導入条件について *in vitro* で確認を行った。その結果に基づき、各種パラメーター (強度 W/cm^2 , duty cycle, 照射時間、超音波造影剤濃度、抗がん剤濃度など) についてマウスを用いた *in vivo* でも検討を加えた。これらの予備実験による導入効率の高い各種パラメーターの設定に基づき、超音波を使用することにより肉腫細胞の増殖が抗がん剤単独使用群に比べ有意に抑制されることを *in vitro*, *in vivo* の両方において確認できた。骨軟部肉腫の転移様式は血行性であり、多くの症例で肺転移が認められる。このため、超音波使用群での肺転移の抑制効果を調べてみると、肺転移に関しても *in vivo* において抗がん剤単独使用群に比べ、超音波使用群では有意に抑制できることを確認できた。しかし、本研究では、この詳細なメカニズムを明らかにすることはできなかったため、肺転移の抑制については今後の研究課題としてさらに調べていく必要があると思われる。超音波使用群における抗がん剤増強作用としては、抗がん剤単独使用群の約 1/5 の抗がん剤使用量でほぼ同等の抗腫瘍効果を得ることができるものであった。これは結果として宿主の有害事象を軽減できる可能性があることが示唆された。つまり実際の臨床の場において抗がん剤による有害事象の発現頻度を減らし、より安全な治療が可能となると期待される。さらに、有害事象による治療中止例を減少させることによる予後の改善にも結び付く可能性がある。

超音波使用群では、腫瘍内の抗がん剤の濃度は control に比べ 1.5 倍に上昇していた ($p < 0.05$)。これは他の癌種におけるこれまでの報告のように、超音波を使用した薬剤導入では EPR 効果により腫瘍特異的に抗がん剤を高濃度に集積させ、さらにそこへ超音波を照射することで起こされたキャビテーション、ソノポレーションによって腫瘍組織内へ強

制的に高濃度の抗がん剤を取り込ませることが可能であったと考えられた。つまり、これまでに報告がなかった骨軟部悪性固形腫瘍に関しても、他の悪性腫瘍と同様に超音波刺激による薬剤導入効率の上昇、腫瘍壊死効果の増強が十分期待できると考えられた。

さらにマウスを使用した *in vivo* の実験系では、抗がん剤単独使用群に比べ超音波を使用することで、肉腫担がんマウスの生存率が有意に延長できることが確認できた。これはひとつには局所効果の増強作用によるものと考えられる。また、この詳細なメカニズムは不明であるが、肺転移の結節数も抑制されており、この結果も生存率延長に寄与したと考えられた。

超音波は現在臨床の場において主に治療、診断用機器に使用されており低侵襲であるうえその安全性も確立されたものである。本研究において骨軟部の悪性腫瘍に対してもこの超音波刺激薬剤導入が有効であることが証明できたことは、本法が簡易な設備で行え、組織障害が少ない点からも臨床応用の可能性が高く新しい治療法として骨軟部肉腫の治療成績向上に大いに役立つと考えられた。本研究は学問的に重要な意味を持つとともに、骨軟部肉腫患者へ大きな福音を与え、社会に大きな利益をもたらすものと期待できる。

以上のように、本研究は新しい側面からの骨軟部肉腫の新規治療方法と成り得る非常に意義のある研究であり、難治性疾患である骨軟部肉腫の今後の治療発展のために先駆的な研究であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

(1) Kawamura I, Maeda S, Imamura K, Setoguchi T, Yokouchi M, Ishidou Y, Komiya S. SnoN suppresses maturation of chondrocytes by mediating signal cross-talk between transforming growth factor- β and bone morphogenetic protein pathways. J Biol Chem. 査読有 17;287(34):29101-13. 2012. doi: 10.1074/jbc.M112.349415.

(2) 上野 宜功, 園田 祥三, 丸山 一雄, 坂本 泰二, 横内 雅博, 小宮 節郎 分子レベルからみた整形外科疾患 (シリーズ IX) Bubble liposome と超音波を併用した drug delivery system の開発, : 整形・災害外科 査読無 55 巻 12 号 Page1488-1489 2012

(3) Ueno Y, Sonoda S, Suzuki R, Yokouchi M, Kawasoe Y, Tachibana K, Maruyama K, Sakamoto T, Komiya S. Combination of ultrasound and bubble

liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth. Cancer Biol Ther. 査読有
Aug 15;12(4):270-7. Epub 2011
PMID:21613828

(4)Yokouchi M, Terahara M, Nagano S, Arishima Y, Zemmyo M, Yoshioka T, Tanimoto A, Komiya S.

Clinical implications of determination of safe surgical margins by using a combination of CT and 18FDG-positron emission tomography in soft tissue sarcoma.

BMC Musculoskelet Disord. 査読有 Jul 21;12:166. 2011

doi:10.1186/1471-2474-12-166.

(5)Zemmyo M, Tanimoto A, Sakakima H, Yokouchi M, Nagano S, Yamamoto T, Ishido Y, Komiya S, Ijiri K.

Gadd45 β expression in chondrosarcoma: a pilot study for diagnostic and biological implications in histological grading.

Diagn Pathol. 査読有 Oct 13;5:69. 2010

doi: 10.1186/1746-1596-5-69.

[学会発表] (計3件)

(1)上野宜功, 園田 祥三, 鈴木 亮, 横内雅博, 川添 泰臣, 丸山 一雄, 坂本 泰二, 小宮 節郎 超音波と Bubble Liposome を併用したドキシソルビシンのマウス骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果 日本生体電気・物理刺激研究会 (2012. 3月 於鹿児島)

(2)横内 雅博, 上野 宜功, 川添 泰臣, 永野 聡, 小宮 節郎, 園田 祥三, 坂本 泰二, 鈴木 亮, 丸山 和雄
超音波を使用した新規抗癌剤デリバリーシステムについての実験的検討 日本癌治療学会 (2011. 10月 於名古屋)

6. 研究組織

(1)研究代表者

横内 雅博 (YOKOUCHI MASAHIRO)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・

講師

研究者番号 : 80359976

(2)研究分担者

善明 美千久 (ZEMMYO MICHIHISA)

鹿児島大学・医学部・助教

研究者番号 : 10289465

小宮 節郎 (KOMIYA SETSURO)

鹿児島大学・医学部・教授

研究者番号 : 30178371

(4)研究協力者

上野 宣功 (UENO YOSHINORI)

鹿児島大学・医学部・大学院生