

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462329

研究課題名(和文) 悪性骨軟部腫瘍に対する新規温度反応性リポソームとラジオ波焼灼術との併用療法の検討

研究課題名(英文) Combination therapy of new temperature-sensitive liposomes and radio frequency ablation for malignant musculoskeletal tumor

研究代表者

浅沼 邦洋 (Asanuma, Kunihiro)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20378285

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫マウス背部皮下モデルに対するRFA(COVIDIEN社、Cool-tip RFシステム)は、腫瘍がすべて焼灼されてしまい、本研究におけるモデルとしては適さなかった。Rat骨肉腫背部皮下モデルにて、Control、RFA(80度5分)、Lipo(アドリアマイシン封入新規温度反応性リポソーム)、RFA+Lipo群でのHE染色組織における壊死領域の最小半径を評価すると、Control、Lipoでは壊死領域は見られなかったのに対し、RFAの壊死領域の最小半径は平均5.8mm、RFA+Lipoでは平均5mmであった。本研究では、RFAとRFA+Lipo間で壊死領域の半径の違いはみられなかった。

研究成果の概要(英文)：RFA(Radiofrequency ablation: COVIDIEN, Cool-tip RF system) for Osteosarcoma mouse model cauterized whole tumors. This RFA system could not use for this mouse model. Next, experimental group was divided into four groups using rat osteosarcoma model: control, RFA(80 degrees Celsius, 5min), Lipo(new doxorubicin-loaded liposome), RFA+Lipo. Minimum radius of necrosis area was evaluated by HE stain in each group. Necrosis area was not observed in control and Lipo groups. The average of minimum radius of was 5.75mm in RFA and 5mm in RFA+Lipo group. There was no significant difference between RFA and RFA+Lipo groups.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：温度反応性リポソーム ラジオ波焼灼 悪性骨軟部腫瘍

### 1. 研究開始当初の背景

悪性骨軟部腫瘍は、多岐にわたる組織型と発生頻度の少なさにより、詳細な解明が他の癌腫ほど進んでいないのが現状である。化学療法の導入により、転移のない骨肉腫では5年生存率が60-70%まで向上したが、悪性軟部腫瘍に対して50%以上の奏効率を示す治療薬は未だ開発されていない。また、放射線に対する感受性もよくないため、一般的な治療法として手術的切除が推奨されている。しかし、巨大腫瘍では、切除による深刻な後遺症を残すのみならず、患肢切断や、重要臓器に接している場合は根治切除が不能なことも少なからずあり、このような場合は有効的な治療法がないのが現状である。

ラジオ波焼灼術(Radiofrequency ablation: RFA)は、経皮的にプローブを腫瘍中心部に刺入し、熱により腫瘍を焼灼する治療法である。研究分担者である当院の山門ら(IVR科)は、肝や肺、腎での癌腫、転移性腫瘍に対する治療としてRFAを先進的に行っている。また、悪性骨軟部腫瘍の肺転移や他臓器転移に対しても同様にRFAを行い、転移巣を良好にコントロールしている(Takaki et al. Int J Clin Oncol. 2011, Hiraki et al. J Vasc Interv Radiol. 2011)。しかし、大抵の原発性悪性骨軟部腫瘍は5cm以上あり、また浸潤性もあるため、焼灼範囲が限られているRFAだけでの根治は不可能である。最近、悪性腫瘍に対し、温熱療法と化学療法の併用療法が注目されつつある。化学療法単独と比較し、化学療法に温熱療法の併用の方がさらなる抗腫瘍効果を示し、良好な予後を獲得できる(Cashin et al. The journal of cancer surgery. 2012)。そこで、本研究ではRFAに注目し、RFAによる腫瘍への焼灼に化学療法を併用することで、骨軟部腫瘍に対してより一層の相乗効果が期待された。

抗癌剤のDrug delivery法の一つとして、リポソーム封入抗癌剤が知られている。STEALTH®リポソームは、その大きさや表面分子の工夫により長時間の血液滞留性を有し、このSTEALTH®リポソームにドキソルピシンを封入した臨床治療薬が、ヤンセンファーマ社のDOXIL(ドキシル)である。DOXIL投与により、腫瘍部のドキソルピシン濃度は、正常部位と比較し約19倍高い濃度であり、より副作用の少なく、より高い抗腫瘍効果の望める治療薬であり、優れたDrug Delivery法である(DOXIL添付文書)。またさらに、リポソームにも多様な機能を持つものが開発されてきており、温度反応性リポソームもその一つである。この温度反応性リポソームは熱により崩壊し、速やかに内部の薬剤を放出するという特徴を有している。現在、Needhamらのグループは、彼らの開発した温度反応性リポソームにドキソルピシンを封入し、RFAとの併用療法の経過をphase まで報告している(Hauck et al. Clin

Cancer Res.2006)。しかし、Needhamらのリポソームは腫瘍集積性がないため、Drug Deliveryのためには先に腫瘍を加熱させる必要がある(約44℃)。この場合、加熱された組織にリポソームが接近すると、腫瘍に入る前に薬剤が放出される可能性がある。それに対し、研究分担者の河野らが開発した新規温度反応性リポソームは、正常臓器に集積しにくく腫瘍に集積しやすい、DOXILのようなSTEALTH性を有しているのみならず、温度上昇により薬剤を放出する温度反応性リポソームでもある。彼らの報告では、アドリアマイシンを封入した温度反応性リポソームを投与し、あらかじめ腫瘍に集積させ、その12時間後に熱をかけることで、良好な抗腫瘍効果があることを報告した(Kono et al. Biomaterials. 2010)。

この新規に開発された温度反応性リポソームは、Needhamらのリポソームよりさらなる有効性が期待できる。その理由としてNeedhamらのリポソームでは、実際約44℃の低温で焼灼を行っている。高温のRFAで広範囲に組織が加熱されると、リポソームが腫瘍外で放出される可能性があるため、あまり高温での焼灼ができず、焼灼が不十分になる可能性がある。それに対して、河野らのリポソームは先に腫瘍に蓄積するため、RFAによる十分な焼灼(60-80℃)が可能であり、かつ腫瘍内でのDrug放出が期待できる。

そこで今回、新規温度反応性リポソームとRFAとの併用療法による、原発性悪性骨軟部腫瘍に対する効果の検討をおこない、臨床応用の足掛かりとなり得る有効性が確立できるかどうかを検討することを、本研究の目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究は、原発性悪性骨軟部腫瘍に対する治療として、新規温度反応性リポソームに抗癌剤を封入し、ラジオ波焼灼術との併用による抗腫瘍効果の検討をすることを目的とした。本研究で使用するリポソームは、体内での異物補足機構を回避し、腫瘍に集積する性質を有するだけでなく、熱に反応して内部薬剤を速やかに放出するという性質をもち、熱源としてラジオ波焼灼術を併用することで、優れたDrug delivery systemになるだけでなく、化学療法+腫瘍焼灼の相乗効果が期待できる。

### 3. 研究の方法

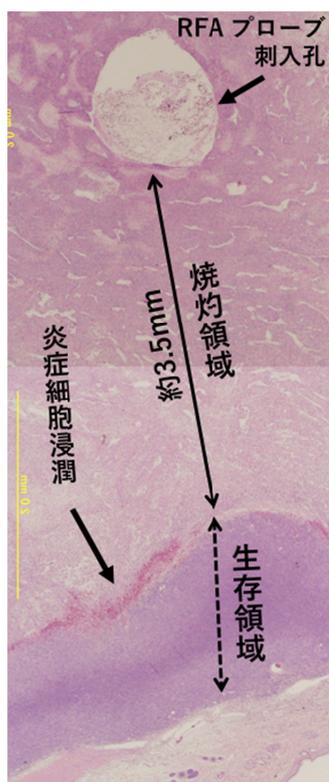
LM8(マウス骨肉腫細胞株)をC3Hマウスの背部皮下に注入( $1 \times 10^6$ /200ul/mouse)し、4週後に皮下腫瘍を形成させた。ヒト用RFA(COVIDIEN社、Cool-tip RFシステム、先端部1cm)を行い、RFAの温度、時間を調節し、焼灼条件の検討を行った。また、同様の実験を、143B(ヒト骨肉腫細胞)のヌードマウスの背部皮下移植モデルを用

いて、同様に行った。  
次に、(ラット骨肉腫細胞株)を Rat の背部皮下に注入(1x10<sup>6</sup>/200ul/mouse)し、4 週後に皮下腫瘍を形成させた。Rat の骨肉腫皮下腫瘍に対する RFA の温度、時間を同様に調節し、焼灼条件の検討を行った。RFA の 1 週間後に Rat を安楽死させ、組織を採取し、HE 染色標本を作成した。

その後、Rat の骨肉腫背部皮下モデルを用いて、Control, RFA, ADM-Lipo (アドリマイシン封入新規温度反応性リポソーム), RFA+ADM-Lipo の 4 群に分けて検討を行った。ADM-Lipo は、RFA の 12 時間前に尾静脈注射を行った。1 週間後に Rat を安楽死させ、組織を採取し、HE 染色標本を作成した。

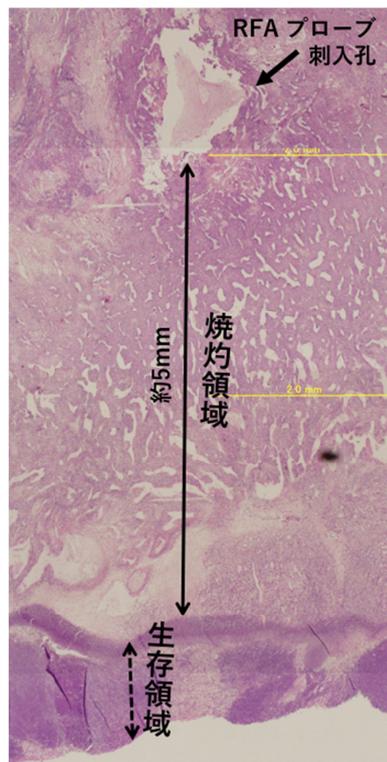
#### 4. 研究成果

LM8 (マウス骨肉腫) のマウス背部皮下移植モデルでは、4 週で 1-1.5cm 程度の腫瘍を形成した。まず、RFA 温度をヒト標準の 80 度で設定し、10 分で焼灼した。1 週後、腫瘍組織のほとんどが消失したため、評価不能であった。1-1.5cm サイズの腫瘍に対し、80 度、10 分は強力すぎるため、RFA の温度、時間の検討をおこなった。80 度、8 分、5 分、3 分で RFA を行ったところ、すべて腫瘍は焼灼された。次に 60 度、及び 50 度にて 8 分、5 分、3 分を行ったが、同様にすべて焼灼された。45 度も考慮したが、実際の臨床における RFA の治療は、80 度程度で行っているため、低温度での実験結果は利用できないと判断し、80 度の RFA に耐えうる、より大きな腫瘍の作成を検討した。LM8 は高肺転移株であり、腫瘍細胞投与後に 4 週を越えると、局所浸潤及び肺転移にて疲弊し、腫瘍死したので、大きな腫瘍は育たなかった。



大きな腫瘍は育たなかった。次に、ヒト骨肉腫細胞 143B によるヌードマウス背部皮下移植モデルにて腫瘍サイズの巨大化を試みたが、同様に疲弊、腫瘍死したため、RFA に良好な腫瘍は育たなかった。大きな骨肉腫の腫瘍を形成させるために、動物種を変更した。Rat 骨肉腫細胞による Rat 背部皮下モデルでは、4 週後に

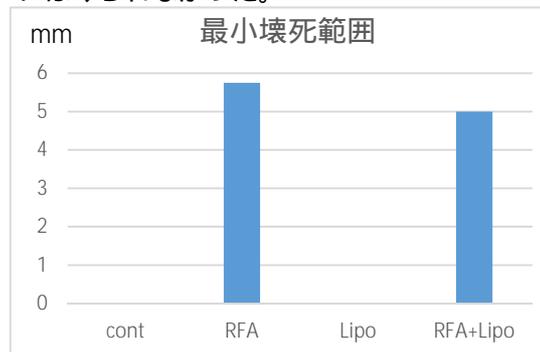
3-5cm の腫瘍を形成した。80 度 3 分での RFA の組織像を左図に示す。RFA のプローブ孔から約 3.5mm の HE 染色で赤く染まっている焼灼領域が確認できた。また、その外周には、青く染まる生存腫瘍細胞の集団を認めた。焼灼領域が生存領域に接している一部に、炎症



細胞の浸潤を認めた。次に、80 度 5 分での RFA の組織像を左図に示す。プローブ孔から約 5mm の、HE 染色で赤く染まる焼灼領域を認め、その外周に同様に HE 染色で青く染まる生存細胞領域を認めた。焼灼領域は、3 分が約

3.5mm、5 分が約 5mm で、5 分の方が焼灼領域が広い傾向であった。

RFA を 80 度 5 分と設定し、ADM-Liposome との併用効果の検討を行った。壊死領域の最小半径を評価すると、下図のような結果となった。Cont、Lipo (ADM-Lipo) は、壊死領域は見られなかったのに対し、RFA での壊死領域の最小半径は平均 5.75mm、RFA+Lipo では平均 5mm であった。今回の検討では、RFA と ADM-Lipo との併用にて壊死領域の半径の違いはみられなかった。



今後、RFA と ADM-Lipo との相乗効果を評価するため、RFA の回数などの検討や、腫瘍の増殖曲線による抑制効果の評価を行う必要がある。

## 5. 主な発表論文等

### 雑誌論文 (計 3 件)

The value of the high-sensitivity modified Glasgow prognostic score in predicting the survival of patients with a soft-tissue sarcoma.

Nakamura T, Matsumine A, Asanuma K, Matsubara T, Sudo A. Bone Joint J. 2015 Jun;97-B(6):847-52.

The role of C-reactive protein in predicting post-metastatic survival of patients with metastatic bone and soft tissue sarcoma.

Nakamura T, Matsumine A, Asanuma K, Matsubara T, Sudo A. Tumour Biol. 2015 Sep;36(10):7515-20.

Treatment of the benign bone tumors including femoral neck lesion using compression hip screw and synthetic bone graft.

Nakamura T, Matsumine A, Asanuma K, Matsubara T, Sudo A. SICOT J. 2015 Jun 26;1:15.

### 学会発表 (計 2 件)

Coagulation and fibrinolysis in 100 soft tissue tumor patients

Kunihiro Asanuma, Akihiko Matsumine, Tomoki Nakamura, Takao Matsubara, Akihiro Sudo. American Academy of Orthopedic Surgeons, 2015, Las Vegas (USA).

Thrombomodulin and tissue factor mRNA expression in 62 soft tissue sarcoma patients

Kunihiro Asanuma; Akihiko Matsumine; Tomoki Nakamura; Takao Matsubara; Yumiko Asanuma; Tomoaki Yoshikawa; Akihiro Sudo. American Academy of Orthopedic Surgeons, 2013, Chicago (USA).

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

淺沼邦洋 (Asanuma Kunihiro)

三重大学・医学研究科・助教

研究者番号：20378285

### (2) 研究分担者

山門亨一郎 (Yamakado Kyouitiro)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20263022

河野健司

大阪府立大学・工学(系)研究科(研究院)・

教授

研究者番号：90215187