

# Research of the chemotherapy for osteosarcoma with the liposome with amphipathic polyethylene glycol(PEG) encapsulating anticancer agent or caffeine

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-06-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Tsuchiya, Hiroyuki メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24517/00051057">https://doi.org/10.24517/00051057</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.



---

---

抗癌剤及びカフェイン封入リポゾームを用いた  
骨肉腫の治療とテーラーメイド化学療法

---

---

(課題番号 16591480)

平成 16 年度～平成 18 年度科学研究費補助金  
(基盤研究(C))研究成果報告書

平成 19 年 5 月

代表者 土屋 弘行

金沢大学附属図書館



1300-04381-4

医学部医学系研究科・准教授

## 研究の概要

カフェイン（以下、CAF）を封入したポリエチレングリコール付加リポソームを作成した。CAF 封入リポソーム（以下、CAF-L）をラットに静脈内投与した結果、CAF を投与した場合と比較して有意に血中滞留性が優れていることがわかった。ただ、リポソーム内の CAF 封入率が低く、CAF として十分な量を投与することができず、その臨床効果を評価するにいたらなかった。

このリポソームの腫瘍への集積性を評価するため、蛍光色素を封入したリポソームを作成した。これは自己消失リポソームであり、リポソームから蛍光色素から漏出しない限り発光しないものであった。これを骨肉腫を皮下移植したラットに静脈内投与し、24 時間に取り出した腫瘍内に強い発光を認めた。

この結果、このリポソームには腫瘍への有効な集積が期待できるものと判断し、シスプラチン（以下、CDDP）を封入したリポソームを作成した。この CDDP 封入リポソーム（以下、CDDP-L）の体内動態や抗腫瘍効果、更にカフェインとの併用での抗腫瘍効果について評価した。まず、ラットへ CDDP と CDDP-L を静脈内投与した結果、CDDP に比較し CDDP-L では有意に血中滞留性に優れていた。次に、骨肉腫を皮下移植したラットに CDDP と CDDP-L をそれぞれ投与し、プラチナの腫瘍内濃度を測定し、比較検討した。12 時間後では CDDP 群も CDDP-L 群も同様のプラチナ濃度であったが、24 時間後では CDDP 群ではほぼ測定できない値であった一方で、CDDP-L 群では 12 時間後よりも有意に腫瘍内濃度が上昇していた。そして、骨肉腫を皮下移植したラットに対する腫瘍縮小効果を検討した。CDDP と CDDP-L をそれぞれ 1.75mg/kg 静脈内投与し、14 日後の腫瘍のサイズは両群ともほぼ差は無かった。次に、カフェインとの相乗効果を検討するため、CDDP または CDDP-L を 1.75mg/kg 静脈内投与後、カフェイン（100mg/kg/day）を 3 日間投与した群と 7 日間投与した群を設定し、比較した。4 つの群のうち、CDDP-L 投与後カフェインを 7 日間投与した群で、他の 3 群より有意に腫瘍抑制効果を認めた。以上より、CDDP-L はそのものの効果としては、CDDP と同等ではあるが、腫瘍内への持続的な抗癌剤の徐放効果を有しており、そのためカフェインの連日投与により効果的な抗腫瘍効果が得られるものと判断した。

金沢大学附属図書館



1300-04381-4

著 者 寄 贈

研究組織

研究代表者：土屋 弘行（金沢大学大学院医学系研究科・助教授）

研究分担者：山本 憲男（金沢大学大学院医学系研究科・助手）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 16 年	1,600	0	1,600
平成 17 年	1,100	0	1,100
平成 18 年	700	0	700
総計	3,400	0	3,400

単位 千円

研究発表

なし

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

## 研究成果

(はじめに)

癌化学療法 of 進歩に伴い骨肉腫やユーイング肉腫をはじめとする悪性骨軟部腫瘍の治療成績も向上してきたが、決して満足すべき段階には達してはいない。悪性度の高い骨軟部腫瘍においては初診時既に存在すると考えられる微少転移および経過中新たに生じた遠隔転移を制することができない限り、今以上の治療成績の向上すなわち生存率の上昇は望めない。従って集学的治療を遂行していく上で、転移巣と原発巣の両者の治療が可能である化学療法に寄せられる期待は極めて大きい。抗癌剤の多くは、一般に DNA に作用してその効果を発現する。しかし、DNA には外的因子によって障害を受けた際にそれを修復する機構が存在し、抗癌剤の効果が発現しない場合がある。キサンチン類に属するカフェインが、細胞の DNA に障害を与える物質の作用を増強することを確認しており、これは主としてカフェインの DNA 修復阻害作用による。我々は 1988 年にカフェインと临床上頻用されている各種抗癌剤との併用によりどの様な効果が発現するのかについて検討をした。その結果、カフェインは DNA 合成阻害作用を示す各種の抗癌剤の作用を増強し、特にシスプラチンとは著明な相乗効果を認めることが判明した。以後、当科ではカフェイン併用化学療法の導入により、悪性骨軟部腫瘍の成績は更に向上し、特に当科における骨肉腫の 5 年生存率はカフェイン併用化学療法導入前 40~50%であったが、導入後 90%と飛躍的に向上した。しかし、有害事象による薬剤使用量の制限が、更なる治

療成績の向上の障壁となっているのは事実であり、その問題を打破するためには、標的細胞へ有効に薬物を送達させる drug delivery system が一手を講じるのではないかと考えた。本研究では、シスプラチンもしくはカフェインを封入したポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームを独自に開発した。我々が使用した PEG 修飾リポソームは通常のリポソームよりも安定性に優れており、生体内で肝臓、脾臓などの細網内皮系 (RES) に取り込まれにくく、血中から除去されにくい。そのため、血中に長時間停留することができる。また、腫瘍血管は新生血管が多く血管壁が非常に脆弱であると同時に、血管の透過性も更新している。このため、リポソームは血中を循環しているうちに腫瘍血管に到達し血管壁から癌組織間質へ漏出することが期待できる。更に、腫瘍組織は非常にリンパ管に乏しく、リポソームのような大きい分子は腫瘍組織外へ排出されにくい。以上のことから、PEG 修飾リポソームは腫瘍組織内に選択的に貯留されると考えられ、ドキシソルビシンなどの抗癌剤を封入したものに関する報告も多くなされている。我々はこのリポソームの当科で化学療法に用いているカフェインやシスプラチンを封入し、それらの作用に関して実験を行った。

(目的)

現在、当科では骨肉腫をはじめとする悪性骨軟部腫瘍に対しカフェイン併用化学療法を行っている。この化学療法で用いているシスプラチンまたはカフェインを PEG 修

飾リポゾームに封入する。そして、それらのリポゾームのラットにおける体内動態を評価すると共に、ラット骨肉腫細胞に対する作用および相乗効果に関して評価するのが目的である。

#### (材料と方法)

### 1. カフェイン封入リポゾームに関する実験

#### 材料

- 安息香酸ナトリウムカフェイン
- distearoylphosphatidylcholine (DSPC; Nippon Oil and Fats, Tokyo, Japan)
- 1,2-distearoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (DSPE-PEG; Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL)
- cholesterol (CH; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)

#### カフェイン封入リポゾーム (CAF-L)

上記材料を調製し、カフェイン封入リポゾーム (以下, CAF-L) を作成した。粒子径が 250~300nm の CAF-L (L-CAF-L) と 150~200nm の CAF-L (S-CAF-L) の 2 種類を調製し、ラットを用いて体内動態の評価を行った。

#### 対象

- Fischer 系雄性ラット, 7~10 週齢, 体重 150~200g
- ラットに移植した細胞: ラット骨肉腫細胞 SOSN2

#### 方法

##### a 血中滞留性

- ラットに、カフェインとして 10mg/kg の安息香酸カフェインを静脈内投与した群と L-CAF-L を静脈内投与した群のカフェイン血中内濃度を経時的に測定し、両群を比較検討した。
- ラットに、カフェインとして 4mg/kg の安息香酸カフェインを静脈内投与した群と S-CAF-L を投与した群のカフェイン血中内濃度を経時的に測定し、両群を比較した。

##### b. 腫瘍内集積性

ラット骨肉腫 SOSN2 を皮下に移植したラットに、カフェインとして 4mg/kg の安息香酸カフェインを静脈内投与した群と S-CAF-L を投与した群の腫瘍内濃度を測定し、比較検討した。

### 2. 蛍光色素 (fluorescein) 封入リポゾームに関する実験

#### 材料

カフェイン封入リポゾームで作成したリポゾームと材料は同様であり、内部には fluorescein を封入した。粒子径は S-CAF-L と同様のリポゾームを作成した。

#### 対象

カフェイン封入リポゾームの実験と同様のラットおよび骨肉腫細胞を使用した。

#### 方法

ラット骨肉腫 SOSN2 を皮下移植したラットに、fluorescein 封入リポゾーム (以下, fluorescein-L) を静脈内投与し、8 時間後と 12 時間後に腫瘍を取り出し、ホルマリン固定を行った標本に励起光をあてて腫瘍内の蛍光色素の集積を評価した。

### 3. シスプラチン封入リポゾームに関する実験

#### 材料

カフェイン封入リポゾームで作成したリポゾームと材料は同様であり、内部には粉末シスプラチンを封入した。粒子系はS-CAF-Lと同様のリポゾームであった。

#### 対象

カフェイン封入リポゾームの実験と同様のラットおよび骨肉腫細胞を使用した。

#### 方法

##### a. 血中滞留性

ラットに、シスプラチンとして 1.75mg/kg の液体シスプラチンを静脈内投与した群とシスプラチン封入リポゾーム（以下、CDDP-L）を静脈内投与した群のプラチナ血中内濃度を経時的に測定し、両群を比較検討した。

##### b. 腫瘍内集積性

ラット骨肉腫 SOSN2 を皮下に移植したラットに、シスプラチンとして 1.75mg/kg の液体シスプラチンを静脈内投与した群とCDDP-Lを投与した群の腫瘍内濃度を測定し、比較検討した。

##### c. 腫瘍縮小効果

ラット骨肉腫 SOSN2 を皮下に移植したラットの腫瘍が 1000~5000mm<sup>3</sup>（短径<sup>2</sup>×長径÷2）になった状態で、液体シスプラチンまたはCDDP-Lを静脈内投与し、経時的に腫瘍の大きさを測定した。なお、両群とも投与量はシスプラチンとして 1.75mg/kg とした。

##### d. カフェインによる抗腫瘍効果の増強効果

実験 3-c と同様に骨肉腫を移植したラット

に液体シスプラチンまたはCDDP-Lを静脈内投与をした後、カフェインの腹腔内投与を行った。カフェイン投与のスケジュールにより、4つの群に分けた（図1）。それぞれの群での腫瘍の大きさを経時的に測定し、比較した。

#### （結果）

##### 1. カフェイン封入リポゾームに関する実験

###### a. 血中滞留性

カフェインを静脈内投与した群とL-CAF-Lを静脈内投与した群の間では、血中滞留性の差はほぼ認めなかった（図2）。カフェインを静脈内投与した群とS-CAF-Lを静脈内投与した群では、S-CAF-Lを投与した群で有意に良好な血中滞留性を認めた（図3）。

###### b. 腫瘍内集積性

カフェインを静脈内投与した群では投与後2時間でも6時間でも腫瘍内からカフェインは測定限界値以下であった。S-CAF-Lを静脈内投与した群では、投与後6時間の腫瘍内でカフェインを検出することができた。

##### 2. 蛍光色素（fluorescein）封入リポゾームに関する実験

蛍光色素封入リポゾームはリポゾームに封入されている限り発光しないものであった。その安定性は良好で、血清を加えたりポゾームに励起光を当てても発光は見られず、界面活性剤（triton-X）を加えてリポゾームを壊すと発光が見られた（図4）。蛍光色素封入リポゾームを静脈内投与後12時間での腫瘍内には蛍光色素の強い発光が認められた（図5）。



### 3. シスプラチン封入リポゾームに関する実験

#### a. 血中滞留性

液体シスプラチンを静脈内投与した群と CDDP-L を静脈内投与した群では、CDDP-L 投与群で有意に良好なプラチナの血中滞留性を認めた (図 6)。

#### b. 腫瘍内集積性

液体シスプラチンを静脈内投与した群と CDDP-L を静脈内投与した群を比較すると、投与後 12 時間の腫瘍内プラチン濃度が CDDP-L 投与群で有意に高いことがわかった (図 7)。

#### c. 腫瘍縮小効果

液体シスプラチンを静脈内投与した群と CDDP-L を静脈内投与した群での腫瘍の大きさは、コントロール群に比しては共に有意な増殖抑制を認めたが、両群間には有意な差は認めなかった (図 8)。

#### d. カフェインによる抗腫瘍効果の増強効果

設定した 4 群の中で、CDDP-L を静脈内投与した後にカフェインを 7 日間投与した群で有意な抗腫瘍効果を認めた (図 9)。

#### (考察)

カフェイン封入リポゾームに関しては、粒子がより小さいリポゾームで良好な血中滞留性を認めた。これは肝や脾での細網内皮系組織 (RES) に取り込まれにくく、血管外に排出されにくいためであると思われる。そして、血中滞留性が良好であれば、体内を循環しているうちに腫瘍組織に到達し、豊富であるが非常に脆弱な新生血管から腫瘍内へ漏出し、更に腫瘍組織では回収機能

が欠如しており、その結果リポゾームが蓄積されていく EPR 効果 (enhanced permeability and retention effect) が見込まれる。そのため、S-CAF-L ではカフェイン投与群に比較し、わずかだが投与後 6 時間で腫瘍内のカフェインを検出することができた。しかし、S-CAF-L では、その小さい粒子径とカフェインの性質によりカフェインの封入量が非常に少なく、S-CAF-L では十分な量のカフェインを投与することができない欠点があった。そのため、カフェイン封入量を上げようと試行錯誤したがカフェインの性質上、不可能であった。

S-CAF-L で作成したリポゾームの腫瘍への集積性を確認し、かつ腫瘍内でリポゾーム内の薬剤が放出されているかを評価するために蛍光色素 (fluoresceine) を封入したリポゾームを作成した。このリポゾームは図 4 の如くリポゾームに封入されている限り励起しても発光しないものである。ラットに投与後 12 時間での腫瘍の標本で強い発光が認められ、リポゾームが腫瘍に集積し、更に蛍光色素がリポゾームから放出されたことがわかった。

われわれは、骨肉腫に対する化学療法にシスプラチンとカフェインを併用して用いることで飛躍的な成績の向上を見ることができた。そのため、今回作成したリポゾームにシスプラチンを封入し、実験を試みた。CDDP-L 投与群では、血中滞留性も優れており、腫瘍内への集積性も良好であった。しかし、ラットの腫瘍に対する抗腫瘍効果に関しては、明らかに抗腫瘍効果を認めるものの、液体シスプラチン投与群との間には差は無かった。これは、リポゾームが腫瘍内へ集積はするものの、細胞内へリポゾ

ームが取り込まれず、間質にあるリポゾームから放出されたシスプラチンのうち部分的にしか細胞内へ到達しないためであると考へた。ただし、CDDP-Lの抗腫瘍効果は液体シスプラチンと同等であり、カフェインにより抗腫瘍効果が増強されることは充分考へられた。抗腫瘍効果の実験の途中の経過では、投与後1週間はCDDP-L群で抗腫瘍効果が明らかに下回っていたが、2週間後にはほぼ同等であった。つまり、CDDP-L群では、リポゾームの徐放性という特性から短期間の鉤腫瘍作用は強くはないが、その抗腫瘍作用が持続することが考へられた。この特性を利用し、カフェインを長期に渉って投与した場合により高い抗腫瘍効果が得られるのではないかと考へた。その結果、CDDP-L投与後にカフェインを1週間投与することで液体シスプラチン投与後3日間カフェインを投与した群と7日間カフェインを投与した群よりも高い抗腫瘍効果を得ることができた。リポゾームを腫瘍内へ集積させることはできたので、リポゾーム自体をいかに骨肉腫細胞内へ選択的に送り込むかということが今後の課題と考へる。

(まとめ)

- カフェイン封入 PEG 修飾リポゾームを作成した。優れた血中滞留性を有していたが、臨床的效果を得るのに必要な量のカフェインをリポゾームに封入できなかった。
- 蛍光色素封入 PEG 修飾リポゾームを作成し、リポゾームの腫瘍への集積を確認できた。
- シスプラチン封入 PEG リポゾームを

作成した。骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果を確認したが、液体シスプラチンと同等の効果であった。カフェインによる抗腫瘍効果の増強を確認し、カフェインの7日間連続投与により更なる増強効果を確認した。

图1

Cis: cisplatin (1.75mg/kg, i.v.), CDDP-L: (1.75mg/kg, i.v.), CAF (100mg/kg, i.p.)

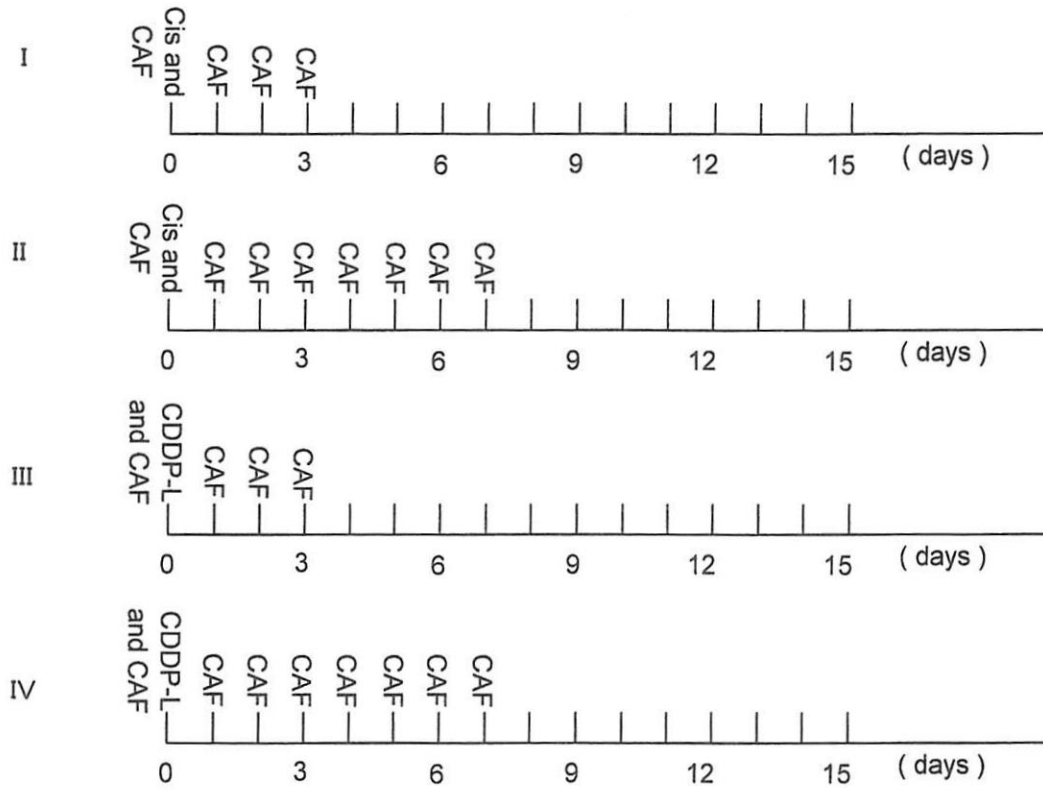


图2

Injected dose of caffeine: 10 mg/kg

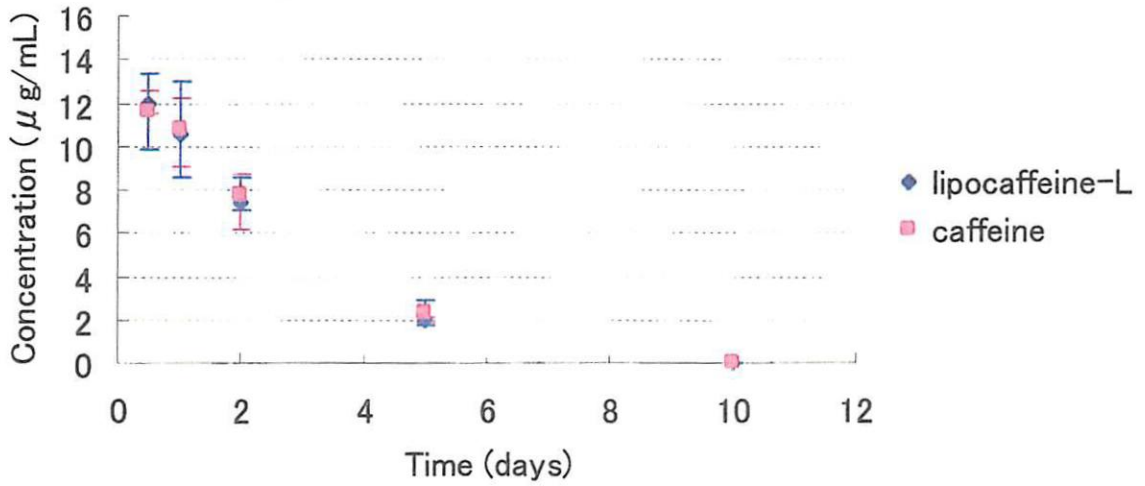


图3

Injected dose of caffeine: 4 mg/kg

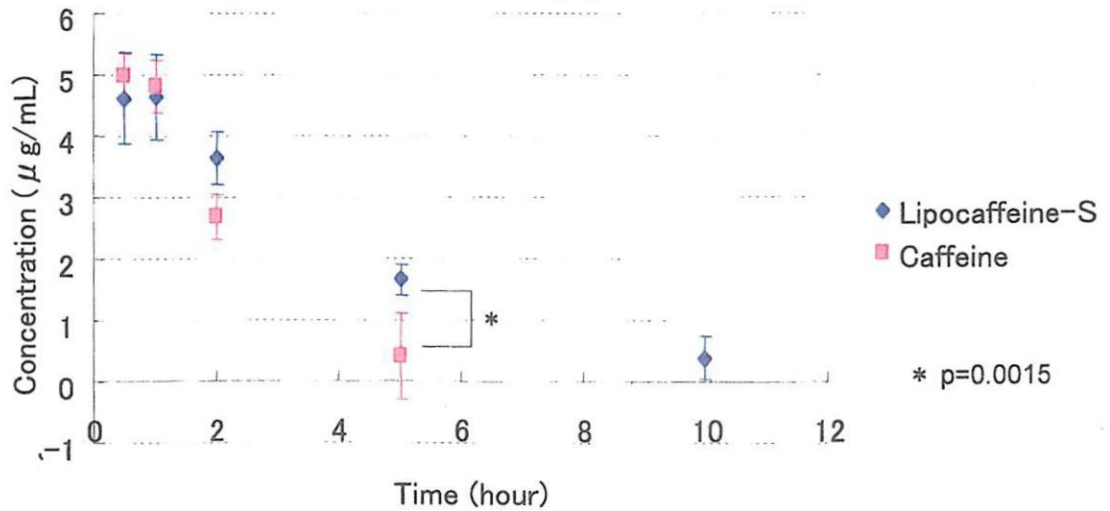


図4

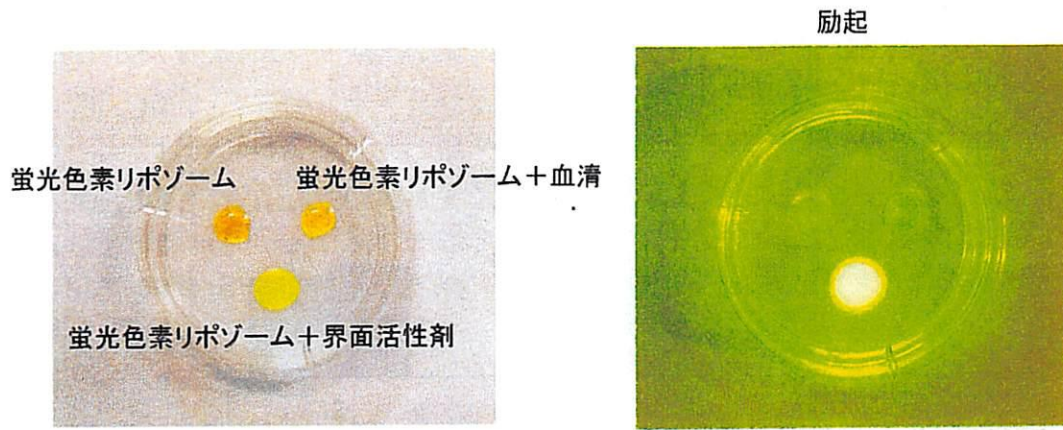


図5

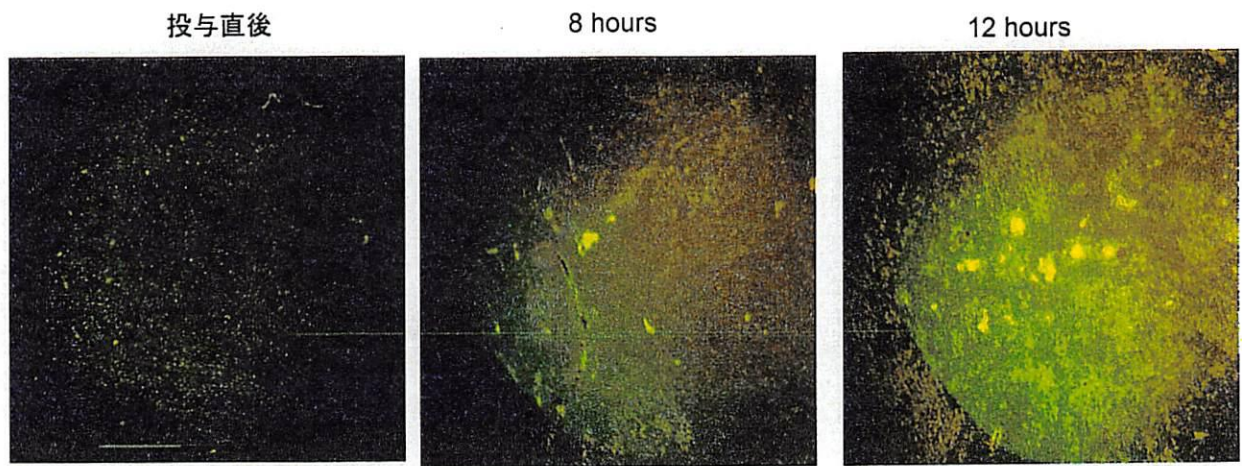


図6

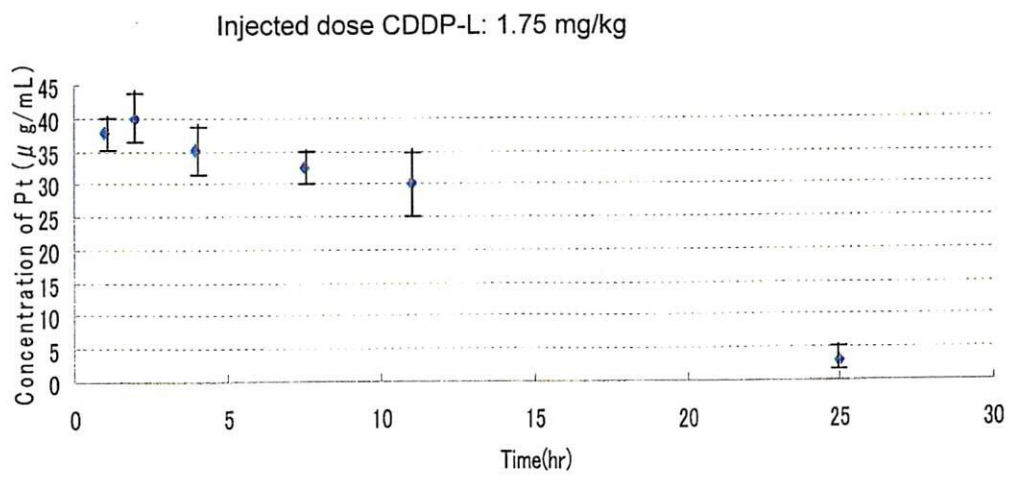


图7

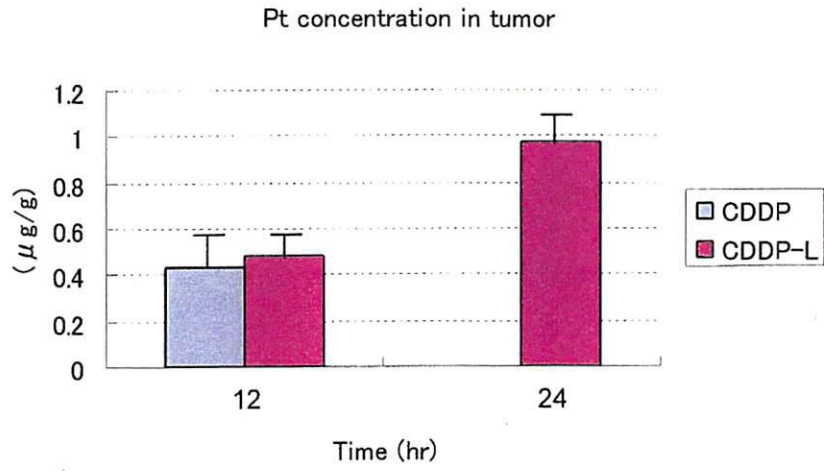


图8

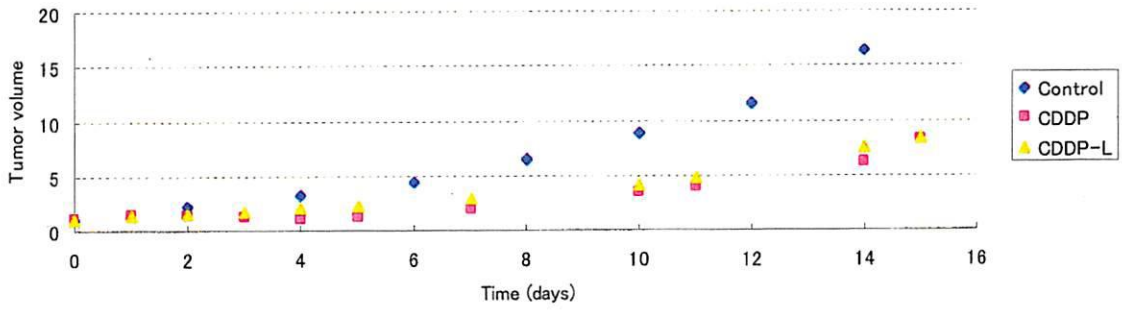


图9

