

論 文 要 旨

Combination of ultrasound and Bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth

〔 バブルリポソームと超音波の併用はマウス骨肉腫に対する
ドキシソルビシンの効果を増強させ腫瘍を抑制する 〕

上 野 宜 功

【序論および目的】

骨肉腫は近年治療成績に大きな進歩が見られていない。最近、マイクロバブルと超音波は遺伝子導入、ドラッグデリバリーの分野で注目されている。組織に超音波を照射すると超音波エネルギーによりミクロの気泡が発生し、キャビテーションと呼ばれる物理運動を起こし、細胞膜の透過性の亢進をもたらすことがわかっている。また、その時細胞膜付近にある薬物、遺伝子は容易に細胞内へ取り込まれ、これらの現象はsonoporationと呼ばれている。さらに超音波診断用の造影剤であるマイクロバブルの添加で、より低出力の超音波でキャビテーションを起こせることが分かっている。バブルの崩壊により引き起こされるキャビテーション効果は細胞内への薬物輸送のキイメカニズムと考えられている。今研究では、骨肉腫に対するあらたな補助治療のひとつとして、マイクロバブルの代わりにバブルリポソームを使用し、化学療法に低出力超音波を併用することにより抗腫瘍効果が認められるかマウスを用いて検討した。

【材料および方法】

研究ではマウス骨肉腫細胞株 LM8 を使用し抗腫瘍薬として Doxorubicin(DOX)を使用した。in vitro では、MTT assay にて腫瘍増殖抑制効果を確認した。In vivo study ではマウス背部に腫瘍を移植し尾静脈より抗腫瘍薬とバブルリポソームを注射し、腫瘍に超音波を照射した。LM8 腫瘍のサイズ、生存率、副作用、主要組織内濃度について検討した。

【結 果】

In vitroでは超音波とバブルリポソームを併用することで有意に腫瘍増殖が抑制された。in vivoでは腫瘍体積を有意に抑制していた。超音波とバブルリポソームの併用することでDOX単独投与の1/5の濃度のDOXで同等の抗腫瘍効果を認めた。また、主要組織内濃度の増加と副作用の軽減も認めた。

【結論及び考察】

骨肉腫の治療の key drug である DOX を用いた drug delivery system の研究は腫瘍学の分野で進めら

れているが最近では特にリポソーム製剤と DOX を組み合わせ使用した報告が認められるようになってきている。リポソーム製剤を drug delivery のアプリケーションとして使用する最大の利点は、リポソームは安全性が確立された製剤であるという点であり、また、修飾が容易であるため機能的リガンドなどの修飾物を表面に付加することも容易であるという点である。

今研究では超音波とバブルリポソームを併用することで腫瘍組織内へ DOX が高濃度に取り込まれることが確認され、それが局所の抗腫瘍効果、生存率の上昇をもたらすと考えられた。また、網内系組織である肝臓への取り込みは上昇せず、肝酵素上昇などの副作用の低減ももたらされた。

バブルリポソーム、超音波は生体にとって安全であり、簡便な装置で場所特異的に治療を行うことが可能である。今治療法は臨床的に実用化に近い治療法となると考えられた。

(Cancer Biology Therapy. 2011 Aug 15;12(4):270-7. 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 171 号	学位申請者	上野 宜功
審査委員	主査	古川 龍彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査 河野 嘉文
	副査	中川 昌之	副査 谷本 昭英

Combination of ultrasound and bubble liposome enhance the effect of doxorubicin and inhibit murine osteosarcoma growth

(バブルリポソームと超音波の併用はマウス骨肉腫に対するドキソルビシンの効果を増強させ腫瘍を抑制する)

組織に超音波を照射すると超音波エネルギーにより微小な気泡が誘発され (cavitation 効果)、気泡が崩壊する際のジェット流により細胞膜に一過性の透過性亢進をもたらすことがわかっている。その際に周囲にある薬物や遺伝子は容易に細胞内に取り込まれることもわかっている (sonoporation 効果)。さらに超音波造影剤であるマイクロバブルを添加することでより低出力の超音波で cavitation を起こすことが可能である。しかし薬剤 (抗がん剤) においては遺伝子同様に細胞内への導入効果が高められるという報告が散見されるが、いまだ確立された薬剤導入法と呼ぶには程遠く、今後の研究が必要である。さらにマイクロバブルは生体内で非常に不安定であり、臨床的な応用としてはまだ多くの課題を残している。そこで学位申請者は、リポソームに着目し、リポソーム製剤の内部に cavitation の核となるパーフルオロプロパンガスを封入したバブルリポソーム (BL) を開発し、低出力超音波と併用する drug delivery system (DDS) を構築した。薬剤は骨肉腫治療の key drug であるドキソルビシンを使用し、この DDS でマウス骨肉腫に対する抗腫瘍効果が増強するかを、in vivo で検討した。マウス骨肉腫細胞株 LM8 をマウス背部に作成し、ドキソルビシン、BL を混合したものを尾静脈より体循環内へ注射し、その後超音波を照射するという治療を行った。治療効果の判定を局所腫瘍サイズ、肺転移結節数、生存率、副作用、腫瘍組織内薬物濃度で検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) BL、超音波それぞれ単独では腫瘍抑制効果は認めない。
- 2) BL、超音波を併用しドキソルビシン 1 mg/kg を尾静脈内注射すると著明な腫瘍増殖抑制効果を認めた。その効果はドキソルビシン 5mg/kg を単独で使用した場合と同等であった。
- 3) BL、超音波を併用することで生存率の上昇、副作用の抑制を認めた。
- 4) 以上の結果が組織内薬物濃度の上昇によりもたらされていると考え、腫瘍組織内薬物濃度を測定したところ、BL、超音波併用群では約 1.5 倍の薬物取り込み上昇を認めた。

以上より、腫瘍組織のもつ enhanced permeability and retention (EPR) 効果により BL が腫瘍組織間により多く集積し、そこで腫瘍局所特異的に超音波を照射することで cavitation、sonoporation を引き起こし、ドキソルビシンの腫瘍細胞への取り込み上昇がもたらされたと考えられる。multidrug resistance (MDR) 発現腫瘍に対する効果、より腫瘍特異的な targeting 能の付与など、今後解明すべき点、改善点などはあるものの、本研究で使用されているものは、リポソーム製剤、超音波、ドキソルビシンといずれも現在臨床の場で使用されているものばかりであり、その安全性について確立されたもので構築された DDS である。より臨床に直結した実験モデルであり、骨肉腫患者の予後改善の一助となる可能性のある意義ある研究として判定される。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 171 号		学位申請者	上野 宜功
審査委員	主査	古川 龍彦	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	夏越 祥次	副査	河野 嘉文
	副査	中川 昌之	副査	谷本 昭英
<p>主査および副査の5名は、平成24年1月30日、学位申請者 上野 宜功 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 今研究においては薬物を高濃度に集積させるのが目的なのか、徐放効果を期待することが目的なのか。 (回答) 抗がん剤封入体ではないので徐放効果ではなく、高濃度に集積させるのが目的である。</p> <p>質問2) polyethylene glycol (PEG) の役割は？ (回答) PEG を表面修飾することで肝臓、脾臓など細網内皮系での取り込みを防ぐことが可能となる。</p> <p>質問3) リポソームの大きさは？理想的なサイズはあるのか。 (回答) 今回使用したリポソームは 150-200nm で平均的なリポソーム製剤の大きさである。理想的なサイズについての検討は行っていないが、サイズが小さければより深部組織への到達性が増すと考える。</p> <p>質問4) 静脈注射がもれた際は何か症状があるか。 (回答) 静脈炎をきたし実験には使用できなくなる。</p> <p>質問5) active targeting と passive targeting とは？ (回答) リポソームが EPR 効果によって腫瘍に集積することを passive targeting といい、その後超音波を照射することで照射細胞周辺に sonoporation を起こすことを active targeting と呼ぶ。</p> <p>質問6) このリポソームは腫瘍特異性か。 (回答) 抗体などで修飾しているものではないので、バブルリポソーム自体が腫瘍特異性というわけではない。腫瘍の持つ血管透過性亢進という性質に依存する。</p> <p>質問7) では血管透過性の亢進する一般的な炎症でも同様のことが起こる可能性があるか。 (回答) 可能性はあるが一般的な炎症の効果は今回は検討しておらず不明である。</p> <p>質問8) 血管径により EPR 効果に違いはあるのか。 (回答) 血管径の違いでの効果の差は現在のところわかっていない。</p> <p>質問9) リポソームが担癌動物で腫瘍部に集積しやすく、臓器では少ないというデータは存在するのか。 (回答) colon26 担癌マウスにおいて確認されている。</p> <p>質問10) ドキソルビシンの抗腫瘍効果は？ (回答) DNA 合成阻害によりもたらされる。</p> <p>質問11) 組織標本上、細胞死の根拠はあるのか。 (回答) 今回は検討していない。</p> <p>質問12) 物理刺激で血管密度が高くなると言われているが、この実験ではこのようなことが生じていないか。 (回答) 検討はしていないが、超音波照射は 60 秒と短時間であり血管密度の増生は考えにくいと思われる。</p> <p>質問13) 超音波プローブを骨内腫瘍に通して行うことは可能か。 (回答) 播種の問題もあり臨床的には困難であると考ええる。</p>				

質問 14) 超音波の出力、周波数の関係は？

(回答) 一般に低い周波数ほど強い cavitation を誘導可能であるが cavitation の直径が大きくなり細胞障害性が高くなる。高周波数の超音波では cavitation 直径も小さくすることが可能だが出力(強度)が必要になる。そのためにもあらかじめ核となるバブルの存在が必要である。

質問 15) 実験で使用している 2 MHz は妥当か。

(回答) 至適条件については予備実験を行っており、この値が妥当である。

質問 16) ドキソルビシンを 1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg と使い分けているが根拠は？ヒトに当てはめるとどれくらいの投与量か。

(回答) マウスに対する致死量と、ドキソルビシンをマウスに用いている他の論文を参考にした。ヒトに使用する際には 60mg/m²/week 程度であり、今回の実験で言えば 1~2mg/kg となる。

質問 17) in vitro で 48 時間から 72 時間で増殖曲線が頭打ちになっている理由は？

(回答) 細胞数が増えすぎたためと考えている。

質問 18) sonoporation は元々どのようにして生まれた技術か。

(回答) 元々は遺伝子導入法の一つとして開発された。

質問 19) 薬剤としてドキソルビシンを選択した理由は。

(回答) 臨床の場において骨肉腫への有効性が示されている key drug であるという点が先ず挙げられる。また蛍光を発する薬物であり濃度測定が行いやすい点も選択した理由である。

質問 20) cavitation で細胞膜に pore があいている時間はどれくらいか。

(回答) 30 秒以内に自然閉鎖する。

質問 21) 組織像で壊死像やアポトーシスなどの変化がないのになぜ増殖抑制が生まれるのか。

(回答) 今実験で用いた薬剤濃度が増殖速度を遅らせるだけの濃度でしかなかったと考える。

質問 22) 腫瘍の増殖抑制効果は 1mg/kg+BL+超音波と 5mg/kg 単独投与が同等であるのに、組織内濃度では約 2 倍程度しか取り込みが増加していないのはなぜか。

(回答) 腫瘍増殖への効果は細胞内濃度と直線的な比例関係ではないためと考える。また厳密に言えば組織内濃度と細胞内濃度は異なり、組織内濃度は 2 倍でも細胞内濃度はそれより高くなっていた可能性がある。

質問 23) 体表面腫瘍以外での効果は期待できるか。

(回答) 主に整形外科の腫瘍は体表面に近いところにある。また臨床の場で問題になるのはむしろ骨外病変であり、より体表へ近くなる。

質問 24) in vitro でのドキソルビシンの濃度設定はどのようにして行ったか。

(回答) 予備実験を行い差の表れやすい条件を決定した。

質問 25) in vitro よりも in vivo でより効果が現れているのはなぜか。

(回答) in vitro では血管を介さないので、passive targeting の部分が発揮されず、超音波による sonoporation の効果だけに依存したものとなっているためと考えられる。in vivo では EPR 効果による passive targeting と sonoporation による active targeting の両方の効果をもたらされた結果、より効果が高かったと考える。

質問 26) 肝組織内濃度を調べているが肝臓に直接超音波をを当てているのか。

(回答) 肝臓には超音波は当てていない。

質問 27) 抗がん剤がより腫瘍に多く集まる理由は。

(回答) 組織特異的に抗がん剤が集まるのではなく、超音波を腫瘍局所に照射することで照射部位局所において、そこに流れてきた抗がん剤をトラップしたためと考える。

質問 28) 整形外科領域で他の腫瘍にも応用可能か。

(回答) 十分可能であると考えます。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。