

学位論文審査結果の要旨

氏名	中田 浩史
審査委員	主査 今村 健志 副査 浜川 裕之 副査 長谷川 均 副査 山田 耕治 副査 越智 誉司

論文名

Span80 ナノベシクルによる新規 DDS を用いたカフェイン併用化学療法の開発

審査結果の要旨

近年、転移を伴う予後不良な骨肉腫の治療において、カフェイン併用化学療法が注目されているが、カフェインによる副作用が問題になっている。そこで、筆者らは、骨肉腫に対する化学療法剤イフォスファミド (IFO) と治療効果増強剤安息香酸ナトリウムカフェイン (CSB) の併用療法の治療効果の増強と副作用の軽減と治療効果の増強に関する基礎的知見を得るために、非イオン性界面活性剤 Span80 で構成される新規 Drug Delivery System (DDS) 製剤 (Span80 ナノベシクル) の効果を *in vitro* と *in vivo* で検討した。その結果、Span80 ナノベシクルに内包した IFO と CSB の併用が、*in vitro* で骨肉腫細胞株に対し高い殺細胞効果があり、*in vivo* の骨肉腫移植モデルにおいて、有害事象を抑制し、高い治療効果を発揮する事を明らかにした。

具体的には、Span80、Tween20 とコレステロールから二段階乳化法を用いて、PBS 内包 Span80 ナノベシクル (PV)、CSB 内包 Span80 ナノベシクル (CV) と IFO 内包 Span80 ナノベシクル (IV) を作製し、エクストルーダーを用いて平均 117 nm に粒径を揃えた。まず、*in vitro* で殺細胞効果を調べるために、マウス骨肉腫細胞株 LM8 を培養し、培養液中に PBS、CSB と IFO 及び PV、CV と IV をさまざまな組み合わせで投与し、トリパンブルー染色を行い、死細胞を定量した。その結果、PBS、CSB、PV や CV の投与では殆ど死細胞を認めず、IFO 投与で 13%、IV 投与で 28%、IFO+CSB 投与で 25%、IV+CSB 投与

で 40%、IF0+CV 投与で 75%に死細胞を認め、さらに IV+CV 投与で 98%に死細胞を認めた。一方、PI 法によるアポトーシスの解析では、IV+CV 投与では殆どの培養 LM8 細胞 (97%) がアポトーシスを呈し、PV や CV の投与では殆ど細胞のアポトーシスを認めず、IF0 投与で 9%、IV 投与で 10%、IF0+CSB 投与で 17%、IV+CSB 投与で 25%、IF0+CV 投与で 33% に細胞のアポトーシスを認めた。

次に、*in vivo* での抗腫瘍効果を検討するために、LM8 細胞を C3H/HeJ マウスの皮下に同種移植した骨肉腫移植モデルを作製し、腫瘍体積が 500 mm³ に達した担がんマウスに、day0, 2, 4 で、PBS、CSB と IF0 及び PV、CV と IV をさまざまな組み合わせで投与し、体重と腫瘍体積を毎日測定し、day7 で解剖して組織学的解析を行った。その結果、day 7 での腫瘍体積の平均値は、CV > PBS > IV+CSB > IF0 > IV > IV+CV で、コントロールに比べ IV+CV 投与群は、優位に腫瘍体積の増加が抑制されていた。

最後に、*in vivo* での毒性・副作用を検討するために、さまざまな臓器・組織を病理組織学的に検討したところ、IF0 投与群では、腎臓に尿細管損傷とメサンギウム増殖性糸球体腎炎を、精巣に生殖細胞の壊死を伴う造精の停止を認めたが、IV 投与群では、腎臓と精巣を含めた全身の組織で異常を認めなかった。さらに、妊孕性試験では、IV 投与群の雄の妊孕性は保たれており、胎仔に奇形も認めなかった。

以上の結果から、IV+CV 投与群では高い抗腫瘍効果と副作用の軽減が認められ、骨肉腫のカフェイン併用化学療法において新規 DDS 製剤 Span80 ナノベシクルが有用である可能性が示唆された。

本学位審査は平成 26 年 12 月 24 日に開催され、申請者は、研究の背景と目的、Span80 ナノベシクルの作製方法、各種実験方法、*in vitro* 実験結果と *in vivo* 実験結果を丁寧に説明し、化学療法剤 IF0 内包 Span80 ナノベシクルと治療効果増強剤 CSB 内包 Span80 ナノベシクルの併用の有用性を明らかにし、骨肉腫治療の新しい治療方法となり得る可能性を示した。審査委員から、①Span80 ナノベシクルの作製方法、②研究のデザインと条件設定、③内包された IF0 と CSB の濃度の評価、④腫瘍選択性の分子メカニズム、⑤カフェインの作用の分子メカニズム、⑥放射線治療や骨肉腫以外の治療における応用等、研究の背景から実験内容の詳細まで幅広い内容について質問があり、申請者は的確に答えた。骨肉腫治療においてその副作用軽減が重要な課題であるカフェイン併用化学療法に対して、DDS に着目し、新規製剤で新しいシステムを開発し、その有用性を *in vitro* と *in vivo* で明らかにした点は特記でき、骨肉腫治療におけるカフェイン併用化学療法の発展の面で大いなる寄与をもたらす点を評価し、審査員は全員一致で本研究が学位(医学)に値すると判定した。