

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K12509

研究課題名(和文) 全身性微振動刺激のがん骨転移の成立・進展に対する予防効果の実験的検証

研究課題名(英文) Experimental study on preventive effect of whole body vibration on metastatic progression of breast cancer to bone

研究代表者

松本 健志 (Matsumoto, Takeshi)

徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・教授

研究者番号：30249560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの骨転移に対する全身性微振動刺激(WBV)の治療効果について検討した。がん細胞を乳腺移植したマウスを3群に分け、各々に0 Hz(無負荷)、45 Hz、90 HzのWBV(加速度振幅0.3g)を、1日20分、週5日で与えた。3週間後、脛骨近位骨幹部を放射光CTで計測し、3次元骨構造解析を行った。無負荷群に比べ、90 HzのWBVを与えた群では皮質骨体積、海綿骨体積分率ともに有意に高値を示し、血中オステオカルシンも上昇した。一方、45 HzのWBVはほとんど効果を示さなかった。WBVによる骨形成促進ががんによる骨破壊を遅延させていると推測され、その効果は振動数依存的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Whole body vibration (WBV) is reported to be bone-anabolic; however, its preventive effect on metastatic progression of breast cancer to bone remains unclear. In the present study, bone destruction by breast cancer metastasis was examined in tumor-bearing mice exposed to WBV. Breast cancer cells 4T1 was implanted at the mammary fat pad of female BALB/c mice aged 8 wk. One day after the implantation, mice were divided into three groups (n=10 each): W\_45, W\_90, and s\_W, exposed to 45-Hz, 0.3g-WBV, 90Hz, 0.3g-WBV, and sham-WBV, respectively, for 20 min/day, 5 d/wk for 3 wk. The reduction of both cortical and cancellous bone volumes was suppressed in W\_90. The serum osteocalcin level in W\_90 mice was elevated compared with that in s\_W. These results indicated that WBV may mitigate or retard the metastatic progression of breast cancer in a frequency-dependent manner, likely owing to the WBV-enhanced osteogenic activity.

研究分野：生体医工学

キーワード：がん骨転移 微振動刺激 骨メカノセラピー

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物(がん)は我が国の死亡原因の第1位で(全体の30%以上),生涯のうちに男性で2人に1人,女性で3人に1人が罹患すると推測される。人口の高齢化を主な要因として,がんの死亡数と罹患数は増加し続け,2016年にがん死亡した人は372,986人(男性219,785人,女性153,201人),2017年のがん罹患数予測は約101万4千例にのぼる。一方,人口高齢化の影響を除いた統計(年齢調整率)では,がん罹患は1980年代以降増加しているものの,死亡は1990年代半ばをピークに減少している[国立がん対策情報センター]。すなわち,がん患者の生存期間は近年の治療技術の進歩によって着実に伸びているといえる。こうした背景のもと,骨破壊に伴う激しい骨痛や病的骨折,高カルシウム血症などの併発によるがん患者のQOL低下が懸念されるようになった。骨転移に掛かる治療費は医療費高騰の一因であり,そのリスク管理は喫緊の課題である。

がん骨転移では,がん細胞のサイトカインや増殖因子によって骨芽細胞や間質細胞内のRANKL(ligand for receptor activator of nuclear factor)の発現が高まり,破骨細胞の増殖・活性化が促進される。破骨細胞による骨破壊が進行すると,骨基質中のTGF-などの腫瘍増殖因子が放出される。その結果,さらにがん細胞が増殖して,悪循環が形成される(Fig. 1)[Roodman, N Engl J Med 2004]。

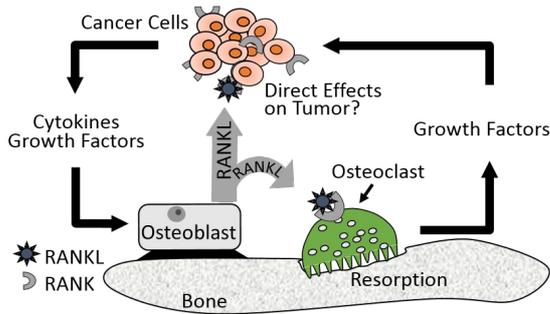


Fig. 1 Vicious cycle of tumor growth

全身性微振動(Whole-body Vibration, 以下WBV)には骨アナボリック作用が報告されていることから[Slatkovska 他, Osteoporosis Int 2013],がん骨転移の悪循環を弱める効果が期待できる。WBVは極めて低強度な機械的刺激ではあるため,骨が脆弱したがん患者にも適用が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

マウス脛骨の成長板直下(がん骨転移好発部位)を対象とした骨の微細構造解析に基づいて,乳がん骨転移成立に対する全身性微振動(WBV)の予防効果を検証する。

3. 研究の方法

(1) マウス骨転移モデル

WBVの効果検証を困難とする過度な骨破壊進展とならない,適切なマウス骨転移モデル(BALB/c, 8週齢)の作製を試みた。文献調

査に基づき,易骨転移性を示す乳がん細胞(4T1)を以下の組み合わせで移植した(いずれもn=5)。これまでのマウスWBV負荷実験において,その骨への作用が3週間ほど認められたことから,実験期間は3週間とした。

- ・左心腔内移植:10,000 cells
- ・左心腔内移植:20,000 cells
- ・乳腺移植:200,000 cells
- ・乳腺移植:1,000,000 cells

左心腔内移植については,いずれの移植数でも2~3週間で死亡し,胸腔内,肺,心管周囲,胸膜に腫瘍が確認された。20,000 cells移植では体重減少も認められた。一方,乳腺移植については,1,000,000 cells移植で一匹のみ2週後に死亡が見られたが,体重減少は認められず,立毛やうずくまりも確認されなかった。移植3週後の腫瘍転移は4T1細胞の好転移部位である肺,骨に確認された。本結果より,WBV実験に利用されるマウス4T1骨転移モデルとして,乳腺移植(200,000~1,000,000 cells)とすることが適切と考えられた。

(2) WBV実験

BALB/cマウス( )の8週齢時に $1.0 \times 10^7$  cell/mLに調整した4T1細胞懸濁液をマウスの乳腺(鼠径部脂肪内)に移植した( $5.0 \times 10^5$  cells/50  $\mu$ L/匹)。マウスは3群:s\_W, 45\_W, 90\_W(各群10匹)に分け,各々0 Hz, 45 Hz, 90 Hzで振動加速度0.3gのWBVを与えた。実験期間は3週間で,5日/週,20分/日の頻度でWBVを与えた。WBVは乳がん移植後の翌日から与え,0 Hz群には他群と同様の頻度・時間で振動ゲージにマウスをいれるのみとし,振動は与えなかった。Fig. 2に脛骨に発生するひずみの計測例を示す。

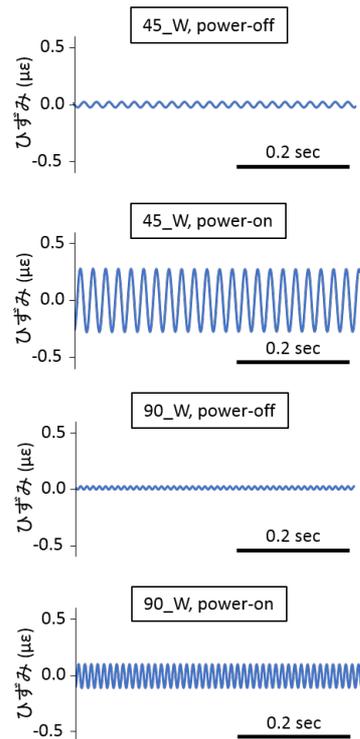


Fig. 2 Strain measured at tibial diaphyseal bone

実験終了時に安楽死させ、マウスの両側の脛骨を摘出し、ホルマリン固定した。また、WBV 実験終了時の週齢に相当する 11 週齢の健常マウスの脛骨も採取した (n=5)。

### (3) 画像処理

脛骨構造解析は SPring-8 放射光 CT に基づいて行った。Fig. 3a に脛骨近位骨幹端部の関心領域を示す。成長板から 0.275 mm の位置から遠位方向に 1.375 mm の領域で CT 再構成を行った。再構成後、腓骨を取り除き、ラスタスキャンによって、皮質骨領域と海綿骨領域を分離して、解析を行った (Fig. 3b)。

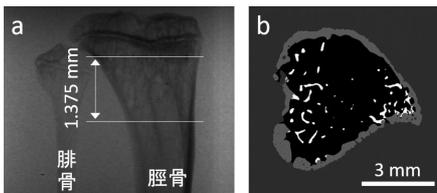


Fig. 3 Region of interest (a) and bone region segmented into cortical and cancellous bone (b)

### 4. 研究成果

皮質骨、海綿骨の 3D 画像を Fig. 4 に示す。健常骨に比べ、がん移植モデルでは脛骨皮質骨厚さは減少し、壁を貫通する欠損も確認できる。また、海綿骨の体積分率もがん移植モデルでは減少しており、がん骨転移による骨破壊が認められた。しかしながら、各群における皮質骨体積 (Fig. 5a) と海綿骨体積分率 (Fig. 5b) から、90\_W では骨破壊が抑制されていることがわかる。なお、皮質骨体積はその空隙部を除いた正味の体積であり、空隙率 (空隙体積/皮質骨体積) には群間差は無かった。

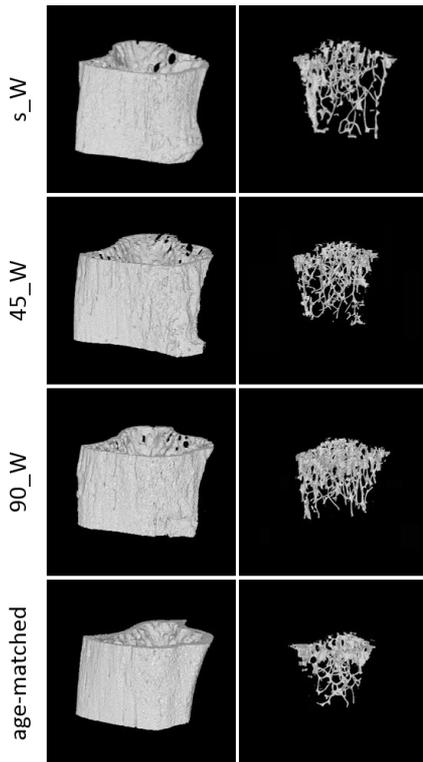


Fig. 4 Representative 3D images of cortical and cancellous bone regions

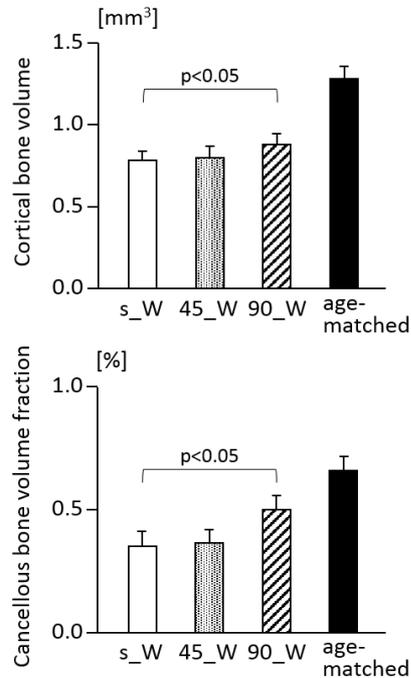


Fig. 5 Cortical bone volume (a) and cancellous bone volume fraction (b)

血中の骨形成マーカー (オステオカルシン, OC) および骨吸収マーカー (骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ) の ELISA 測定の結果を Fig. 6 に示す。s\_W と比較して、90\_W ではオステオカルシン濃度が有意に高く、骨形成優位の骨代謝バランスとなっていることを示している。

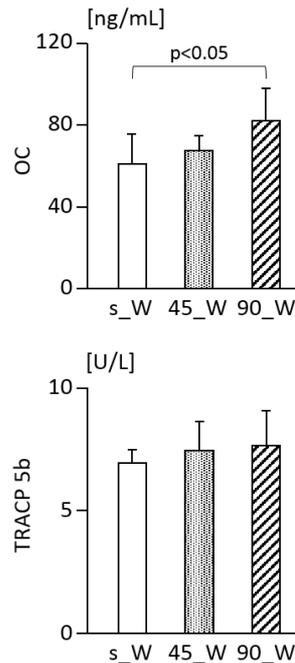


Fig. 6 Markes of bone formation (a) and resorption (b)

以上の結果から、WBV による骨形成の促進がんにによる骨破壊を遅延させる可能性が示唆された。45 Hz の WBV はほとんど効果を示さなかったことから、がん骨転移に対する WBV の効果は

振動数依存であった。治療効果を最大化する振動条件の探索が必要であると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計 7 件)

T. Matsumoto, Y. Kawahito, Bone-anabolic action of low-intensity whole-body vibration and the involvement of bone vascularization in juvenile mic, 2018 World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, 2018.6, Prague Congress Centre (Czech Republic, Prague)

川人侑弥, 松本健志, 微振動刺激による骨アナボリック作用と骨微小循環構築の関与, 第 30 回バイオエンジニアリング講演会, 2017.12.15, 京都大学(京都府, 京都市)

松本健志, 骨リモデリング・再生における微振動刺激作用の検証, 第 44 回日本臨床バイオメカニクス学会(招待講演), 2017.11.24, 松山市総合コミュニティセンター(愛媛県, 松山市)

宇治田俊樹, 松本健志, がん骨転移における微振動刺激の作用関す実験的検証, 第 28 回バイオフロンティア講演会, 2017.10.28, 徳島大学(徳島県, 徳島市)

宇治田俊樹, 松本健志, がん骨破壊に対する全身性微振動刺激の作用について:インビボ位相 CT に基づく検討, JBMS 2016, 2016.9.17, 大雪クリスタルホール国際会議場(北海道, 旭川市)

T. Matsumoto, S. Itamochi, Effects of whole body vibration on breast cancer bone metastasis and vascularization in mice, Physiology 2016, 2016.7.29 (Dublin, Ireland)

T. Matsumoto, S. Itamochi, S. Sato, Bone and microvascular imaging by k-edge subtraction  $\mu$ CT using synchrotron lights with zirconia contrast medium, Proc.10th World Cong. Microcirc, 2015.9.25, Kyoto International Conference Center(京都府, 京都市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 健志(MATSUMOTO, Takeshi)  
徳島大学・大学院社会産業理工学研究部  
(理工学域)・教授  
研究者番号: 30249560

### (2) 研究分担者

福島 修一郎(FUKUSHIMA, Shuichiro)  
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教  
研究者番号: 40362644

### (3) 連携研究者

福島 敬(FUKUSHIMA, Takashi)  
筑波大学・医学医療系・准教授  
研究者番号: 30323299

上杉 健太郎(UESUGI, Kentaro)

高輝度光科学研究センター・放射光研究  
所・副主幹研究員

研究者番号: 80344399