

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11006

研究課題名(和文) 転移性骨腫瘍の骨リモデリングに対する炭酸ガス療法の効果について

研究課題名(英文) Effect of carbon dioxide therapy on bone remodeling of metastatic bone tumors

研究代表者

原 仁美 (Hara, Hitomi)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40437489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌骨転移モデルマウスを作成し、経皮的炭酸ガス治療群とコントロール群で骨転移部の骨形態学的、質的評価を行い、摘出した組織で病理組織学的、分子生物学的に低酸素環境の評価、破骨細胞による骨吸収の評価を行った。経皮的炭酸ガス治療群では腫瘍サイズ、マイクロCT画像において腫瘍の増大が抑制されていた。病理組織学的には、治療群の脛骨病巣部でHIF-1の発現が抑制され、TRAP陽性細胞数が減少していた。また、RANKL、IL-1、IL-6、IL-8の発現抑制を認めたことより、経皮的炭酸ガス治療が乳癌骨転移の低酸素環境を改善させ、破骨細胞の分化誘導を抑制し骨破壊を抑制した可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

経皮的炭酸ガス投与法は、炭酸ガスを経皮的に組織へ吸収させ組織内を酸素化することで効果を得る治療法として当施設独自で研究開発してきた。悪性腫瘍の腫瘍内は低酸素環境にあり、腫瘍細胞は化学療法、放射線療法に抵抗性を示すことがわかっている。転移性骨腫瘍に関しても、病巣内の低酸素環境が破骨細胞の分化を促進し、骨融解が進行することが報告されている。乳癌の転移性骨腫瘍内の低酸素環境を改善することで、抗腫瘍効果、骨融解抑制効果が確認された。本研究の成果により、低酸素環境改善は転移性骨腫瘍の治療標的と考え、経皮的炭酸ガス療法が転移性骨腫瘍に対する新たな治療法として確立することを目指す。

研究成果の概要(英文)：Bone metastatic model of human breast cancer was created, bone morphological and qualitative evaluation of the bone metastasis was performed in the transcutaneous carbon dioxide treatment group and the control group. The excised tissue was evaluated the hypoxic environment and the bone resorption by osteoclasts histopathologically and molecularly biologically. In the transcutaneous carbon dioxide treatment group, tumor growth was suppressed in tumor size and micro CT images. Histopathologically, the expression of HIF-1 was suppressed in the tibial lesion of the treatment group, and the number of TRAP-positive cells decreased. In addition, the expression of RANKL, IL-1, IL-6, and IL-8 was suppressed. It is speculated that transcutaneous carbon dioxide treatment improved the hypoxic environment of breast cancer bone metastasis, suppressed the induction of osteoclast differentiation, and suppressed bone destruction.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：転移性骨腫瘍 乳癌 経皮的炭酸ガス治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん患者数の増加と治療法や画像診断の進歩に伴い、がん患者の骨転移は年々増加している。疼痛、骨折といった骨関連事象は、がん患者の ADL, QOL に大きく関与することは明白である。最近では、分子標的薬や骨修復薬の臨床応用が進み、骨転移が出現してからも原発巣に対する積極的な治療が可能であったり、治療を継続しながら日常生活、社会生活を送れたりするがん患者も少なくない。また、緩和治療に転向しても、骨転移を制御することで終末期患者の苦痛を減らすことが可能となる。そのため、転移性骨腫瘍に対する化学療法、外科的治療、放射線治療、緩和治療を含めた集学的治療が重要視されるようになってきている。

(2) 一方、経皮的炭酸ガス投与法は、炭酸ガスを経皮的に組織へ吸収させ Bohr 効果により組織内を酸化することで効果を得る治療法として当施設で独自で研究開発してきた。本治療法が、骨肉腫、悪性線維性組織球腫(MFH)、扁平上皮癌などの悪性腫瘍において腫瘍内の低酸素環境を改善し、抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。また、骨折に対しては骨形成を促進することを報告し臨床試験を進めている。

(3) そこで、転移性骨腫瘍による切迫骨折や病的骨折に対し有効ではないかと考え、乳癌骨転移モデルマウスを用いて経皮的炭酸ガス投与を行ったところ、骨破壊の進行が抑制された。本研究の目的は、転移性骨腫瘍に対する経皮的炭酸ガス投与法の抗腫瘍効果や骨破壊抑制効果について検討し、そのメカニズムを明らかにすることである。

### 2. 研究の目的

(1) 乳癌骨転移に対する経皮的炭酸ガス投与法の抗腫瘍効果や骨破壊抑制効果について検討し、そのメカニズムを明らかにすることである。

(2) 転移性骨腫瘍に対する新たな治療法として、経皮的炭酸ガス療法を確立することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) In vivo 実験で、経皮的炭酸ガス療法により腫瘍内の低酸素環境を改善し、抗腫瘍効果と骨破壊抑制効果がおこるかを調べる。具体的には、乳癌骨転移モデルマウスを作成し、経皮的炭酸ガス治療群とコントロール群で骨転移部の骨形態学的、質的評価を行い、摘出した組織で病理組織学的、分子生物学的に低酸素環境の評価、骨吸収および骨リモデリングの評価を行う。

(2) In vitro 実験で、乳癌細胞株や破骨細胞培養キットを用い、低酸素環境下で培養し低酸素状態や骨吸収に関連する調節因子の発現や、破骨細胞の分化と骨吸収能を調べる。

### 4. 研究成果

(1) 乳癌骨転移モデルマウスを作成し、経皮的炭酸ガス治療群とコントロール群で骨転移部の骨形態学的、質的評価を行い、摘出した組織で病理組織学的、分子生物学的に低酸素環境の評価、骨吸収および骨リモデリングの評価を行うことを計画した。

(2) 乳癌骨転移モデルマウスを作成して、経皮的炭酸ガス治療群で腫瘍の増大が抑制されていたことを腫瘍サイズ(図 1)、マイクロ CT 画像(図 2)で確認した。

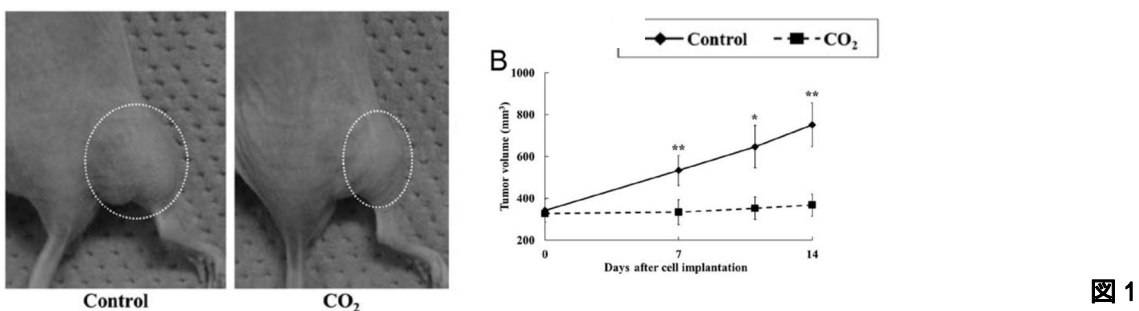


図 1

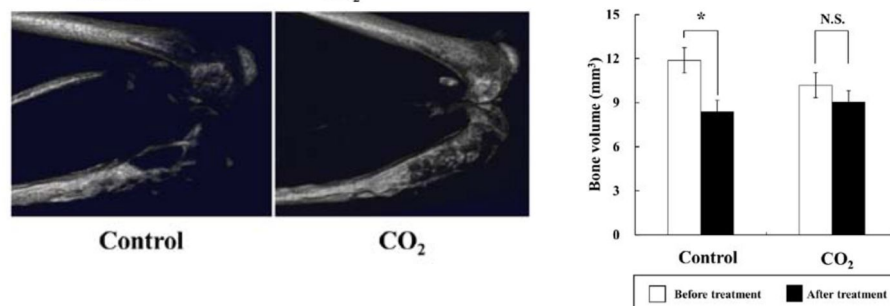


図 2

(3) 治療後のヌードマウスから脛骨を摘出し、病理標本の作成と、病巣部の組織採取を行い、HE染色にて病理学的に骨破壊の評価を行った。さらにHIF-1 免疫染色を行い、骨転移部の低酸素環境の評価しTRAP染色にて破骨細胞による骨吸収の評価を行った。RANKL, IL-1, IL-6, IL-8の骨リモデリング関連因子の免疫染色を行いそれらの発現を調べたところ、経皮的炭酸ガス治療群で病変部の骨破壊が抑制されており、HIF-1の発現低下、TRAP陽性細胞の低下(図3)、RANKL, IL-1, IL-6,8の発現低下(図4)を認めた。

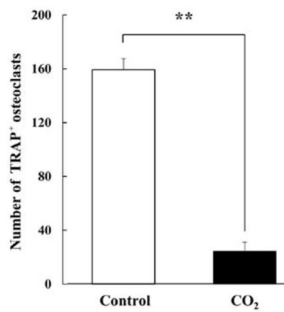


図3

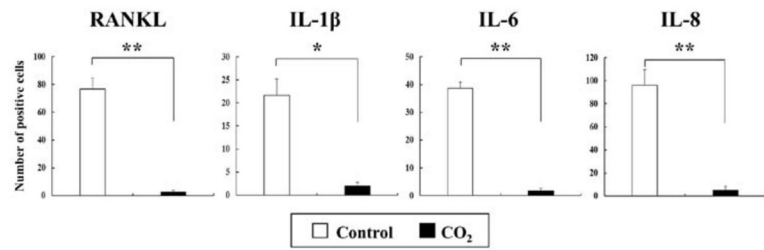


図4

(4) 使用した乳癌骨転移細胞株MDA-MB-231を20% O<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>の条件下で培養し、RANKL, PTHrP, IL-1, IL-6,8の発現量を定量測定したところ、RANKL, PTHrP, IL-8は低酸素下で発現量が増加し、酸素化を正常化すると発現量が戻ること(図5)を確認した。

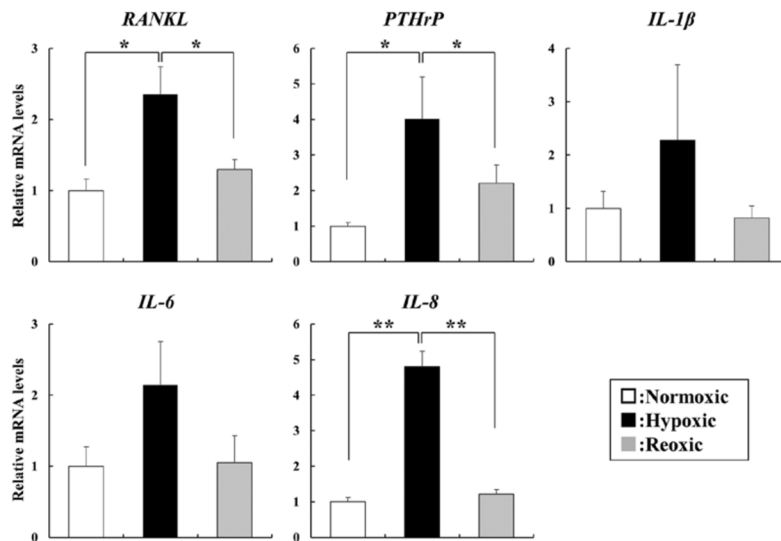


図5

(5) 以上より、乳癌骨転移に対して経皮的炭酸ガス治療により腫瘍内の低酸素環境を改善することで、破骨細胞の分化誘導を抑制し、溶骨性因子の発現を抑制することで骨破壊を抑制することが示唆された。経皮的炭酸ガス治療は乳癌骨転移に対する新規治療法として期待できると考えている。

< 引用文献 >

Onishi Y, [Hara H](#), et al. Transcutaneous application of CO<sub>2</sub> enhances the antitumor effect of radiation therapy in human malignant fibrous histiocytoma. *Int J Oncol.* 2014, 45(2):732-8.

Harada R, [Hara H](#), et al. Reoxygenation using a novel CO<sub>2</sub> therapy decreases the metastatic potential of osteosarcoma cells. *Exp Cell Res.* 2013, 319(13):1988-97.

Onishi Y, [Hara H](#), et al. Transcutaneous application of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) induces mitochondrial apoptosis in human malignant fibrous histiocytoma in vivo. *PLoS One*, 2012, 7(11):e49189.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takemori Toshiyuki, Kawamoto Teruya, Ueha Takeshi, Toda Mitsunori, Morishita Masayuki, Kamata Etsuko, Fukase Naomasa, Hara Hitomi, Fujiwara Shuichi, Niikura Takahiro, Kuroda Ryosuke, Akisue Toshihiro	4. 巻 40
2. 論文標題 Transcutaneous carbon dioxide application suppresses bone destruction caused by breast cancer metastasis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2079-2087
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 竹森 俊幸、河本 旭哉、戸田 光紀、深瀬 直政、原 仁美、黒田 良祐、秋末 敏宏
2. 発表標題 経皮炭酸ガス吸収による低酸素環境の改善は乳癌骨転移モデルの骨破壊を抑制できる
3. 学会等名 第55回日本リハビリテーション医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹森 俊幸、河本 旭哉、上羽 岳志、戸田 光紀、蒲田 悦子、藤原 周一、深瀬 直政、原 仁美、黒田 良祐、秋末 敏宏
2. 発表標題 経皮炭酸ガス吸収による低酸素環境の改善は乳癌骨転移モデルの骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第51回日本整形外科骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹森 俊幸
2. 発表標題 乳癌骨転移に対する炭酸ガス経皮吸収の効果
3. 学会等名 第152回関西骨軟部腫瘍研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Takemori, Teruya Kawamoto, Takeshi Ueha, Mitsunori Toda, Naomasa Fukase, Hitomi Hara, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 The improvement of hypoxia blocks the progressive bone destruction in a metastatic bone tumor model
3. 学会等名 Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Toshiyuki Takemori, Teruya Kawamoto, Takeshi Ueha, Mitsunori Toda, Naomasa Fukase, Hitomi Hara, Ryosuke Kuroda, Toshihiro Akisue
2. 発表標題 The Improvement of Hypoxia by Transcutaneous CO2 Application Blocks The Progression of Bone Destruction in Bone Metastatic Animal Model.
3. 学会等名 The 19th International Society of Limb Salvage General Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹森 俊幸、河本 旭哉、上羽 岳志、戸田 光紀、片山 悦子、森下 雅之、深瀬 直政、原 仁美、黒田 良祐、秋末 敏宏
2. 発表標題 経皮炭酸ガス吸収による低酸素環境の改善はがん骨転移部の骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第50回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 竹森 俊幸、河本 旭哉、上羽 岳志、戸田 光紀、片山 悦子、森下 雅之、深瀬 直政、原 仁美、秋末 敏宏、黒田 良祐
2. 発表標題 炭酸ガス経皮吸収による低酸素環境の改善は乳癌骨転移による骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第32回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	河本 旭哉  (Kawamoto Teruya)  (30420558)	神戸大学・医学研究科・特命講師   (14501)	
研究分担者	深瀬 直政  (Fukase Naomasa)  (60579324)	神戸大学・医学部附属病院・医員   (14501)	
研究分担者	秋末 敏宏  (Akisue Toshihiro)  (90379363)	神戸大学・保健学研究科・教授   (14501)	
研究分担者	川上 洋平  (Kawakami Yohei)  (50626570)	神戸大学・医学部附属病院・医員   (14501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------