

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15897

研究課題名(和文) がん骨転移病変における血液凝固能の状態とfibrocyteが与える骨形成効果

研究課題名(英文) Relationships of blood coagulation performance of bone metastatic lesions and osteogenic effect

研究代表者

内田 俊平(Uchida, Shumpei)

香川大学・医学部・協力研究員

研究者番号：20791099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：がんの骨転移巣における組織修復の働きについて血液凝固機能の異常との関連について検討する。研究当初はヒトを対象として担癌患者と健康人との間で線維細胞の形質の差を検討する予定であったが、まずは実験動物を用いてB16メラノーマ骨転移モデルマウスを作成した。B16メラノーマ細胞の骨近傍への直接移植および静脈投与にてがんの骨転移巣を形成し、これにがん免疫療法を行うことで退縮に伴う骨再生の過程を再現する。同部位を採取し、これに含まれる各細胞分画をフローサイトメトリーで検出することを目指したところ目的としていた線維細胞の回収は困難であったが、がん細胞およびこれに特異的な腫瘍浸潤リンパ球は検出できている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんに対する各種治療法が進歩している一方で、これら治療に抵抗性・難治性の病態が存在する。病勢の進行に伴ってがんの転移はあらゆる臓器・器官に起こりうるが、骨転移は骨折リスクを高め、また高度の疼痛を伴うこともあり、患者のADL・QoLを低下させる原因と考えられる。本研究は当初はヒトを対象として骨転移巣に対する治療法を探索することを目的としていたが、それに先立って動物実験において骨転移モデルマウスの作成を行い、がん局所への治療による腫瘍退縮を確認し、局所における細胞の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：To elucidate connection with the abnormality of the blood coagulation performance and the osteogenic function of bone metastatic lesions, we intended to examine the difference of the fibroblasts between healthy person and cancer-bearing patient. In advance of this examination, we made a bone metastasis model mouse using B16 melanoma cell line. The bone metastatic lesions were made with direct transplantation of the B16 melanoma cells to the bone and intravenous administration. Cancer immunity therapy was performed to induce osteogenic process. The lesions were resected and contained cells were analyzed by flow cytometry. Tumor cells and tumor-specific T cells were detected but fibroblasts were unable to collect.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨転移 Fibrocyte

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんに対する治療は近年飛躍的な進歩を遂げているが、その一方で治療抵抗性・難治性の病態を示す患者は少なくない。がんの骨転移はこのような病勢の進行した患者に認められることが多く、また骨転移自体は時に病的骨折による高度の疼痛やADL・QoLの低下、さらには脊椎圧迫などの緊急処置を要する病態、いわゆる「オンコロジー・エマージェンシー (oncology emergency)」を併発しうる。骨転移巣がある場合の抗がん化学療法は、骨病変にのみ個別の治療を要したり、治療経過で骨病変への別処置が必要であったりして、骨病変がない場合よりも予後が悪く治療が困難であるとされる。このような骨病変に対する組織修復の促進は、患者のADL・QoL維持においても、また抗がん治療を遅滞なく実施することにおいても重要であると考えられた。

がんと血液凝固の関係は古くから知られている。がん患者は一般的に血液凝固異常を伴っており、担癌患者の過凝固状態に伴う様々な合併症、トルソー症候群が知られている。がん患者の過凝固性の原因は様々であり一様の要因は定まってはいるが、担癌そのものが血液を凝固傾向に傾け、かつ抗がん剤治療はその多くが血液凝固能を高める。

これらから、担癌状態での凝固異常が、骨転移巣の組織修復を阻害しているのではないかという仮説が考えられた。しかしながら、骨転移巣の形成を血液凝固異常の観点から考察した研究はこれまでにみられない。そこで我々は、血液凝固異常が骨転移巣に与える影響を明らかにするための研究を計画した。骨転移巣における凝固異常の評価、また同部位への抗がん治療によって誘導される骨病変の回復を含む創傷治癒機転に関与していると考えられる線維細胞 (fibrocyte) の動態の評価に着目し、さらには局所への治療介入による凝固異常の解除に着目した。

2. 研究の目的

上記の仮説の検討のため、まずは動物実験を用いてがんの骨転移を作成し、病巣への抗癌治療を行い腫瘍を退縮させることで骨修復を誘導するモデルを作成することを目指した。また同部位より組織を採取し、残存する腫瘍細胞や血球成分、線維細胞などの内部の各細胞分画を解析することとした。

3. 研究の方法

C57BL/6J マウスに同系の腫瘍細胞株である悪性黒色腫 B16-OVA、リンパ腫 E.G7-OVA 等を移植する。同様に BALB/c マウスには大腸癌 CT26、リンパ腫 A20 等を移植する。腫瘍細胞は静脈内投与または大腿骨近傍への移植を行う。腫瘍形成性に乏しい場合は Matrigel (Corning) を使用する。骨転移部には局所的な抗がん治療を行う。これらにより骨転移モデルマウスの作成を行う。

無治療または局所治療後の骨転移巣は骨組織を残して切除し、剪断した上で collagenase type 4 (Worthington, 1mg/mL) および DNase (Worthington, 0.1mg/mL) 存在下で 37 度に加温し 30 分インキュベートして組織を分散させる。これを遠心分離した沈殿物を 40% Percoll (GE healthcare) に再懸濁し、80% (または 70%) Percoll を下層し、密度勾配遠心分離法により血球成分および残存する腫瘍成分を含む分画に分離する。それぞれをフローサイトメトリーにて解析する。

4. 研究成果

各細胞株を同系マウスに静脈内投与することで骨転移巣を作成することを目指したが、肺や肝臓への転移のためマウスが衰弱し、骨転移巣の形成効率も悪かったため、大腿骨近傍への直接移植を行った。各細胞は $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells を移植することで十分な腫瘍形成を認めたが、A20 は腫瘍形成性に乏しかったため Matrigel に懸濁し移植することで着生を得た。外表から観察し腫瘍サイズの十分な増大を認めたのちに、マウスを安楽死させ同部位を切開し、肉眼的に骨浸潤を伴っている腫瘍について回収した。腫瘍局所の凝固異常の評価は各種アッセイを行ったが測定が困難であり、他の方法を検討中である。

組織内の細胞成分の検討のため上記のごとく処理を行い細胞分画を得た。それぞれの分画から腫瘍浸潤リンパ球および多量の debris が検出されたが、fibrocyte の検出は困難であった。OVA 導入細胞株を移植したものについては OVA MHC Class I tetramer 試薬を用いて腫瘍特異的 T 細胞の検出を行ったところ、コントロール群と比較して治療群で増加を認め CD8 陽性細胞中

20%程度の tetramer 陽性細胞を検出した。

回収した組織から直接 fibrocyte を検出することが困難だったために、fibrocyte の遊走能と接着性から、酵素消化し分散させた組織を 10%FBS 添加 DMEM 下に細胞培養ディッシュへ播き、数日間培養することで接着して残存している細胞のみを回収し解析した。コントロール群と治療群から回収された fibrocyte に形質の差は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------