

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591764

研究課題名(和文) ビスホスフォネートを用いた悪性骨軟部腫瘍に対する治療戦略

研究課題名(英文) Treatment using bisphosphonate for malignant bone and soft tissue tumors

研究代表者

村田 博昭 (MURATA HIROAKI)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号：90360031

研究成果の概要(和文)：第3世代 bisphosphonate (BPs) は骨肉腫細胞に対して *in vitro* で腫瘍細胞の転移能を抑制することがわかった。また、*in vivo* では低濃度の BPs は原発巣よりも肺転巣に対してより強い抑制効果を示した。BPs と放射線の併用では、抗腫瘍効果の増強を認めた。一方、BPs は線維肉腫に対しても抗腫瘍効果を示すことが明らかとなり、S 期の細胞比率を増加させ、アポトーシスを誘導することがわかった。さらに、BPs と種々の抗癌剤を併用することで、抗腫瘍効果は増強することが判明した。

研究成果の概要(英文)：The lower dose of third generation bisphosphonates (BPs) significantly prevented lung metastasis for the *in vivo* effects of BPs, although the higher dose of BPs was required to inhibit the growth of osteosarcoma cells at the primary site. In addition, BPs inhibited the production of vascular endothelial growth factor and reduced the migration, adhesion, and invasiveness of osteosarcoma cells *in vitro*. Combination therapy using BPs and radiation augmented the antitumor effects. From the results of antitumor effects of BPs against fibrosarcoma cells, BPs arrested the cell cycle in the S phases, inhibited cell proliferation, and induced the apoptosis of their cells. Moreover, BPs augmented the effect of antitumor agents when administered concurrently with them in human fibrosarcoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：悪性骨腫瘍、悪性軟部腫瘍、ビスホスフォネート、癌

## 1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は近年の化学療法により、生命予後は改善したが、20～30%の患者は、主に肺転移を生じ死亡している。一方、軟部肉腫に関

してはEwing肉腫などの一部の腫瘍を除いて治療成績の著しい改善は認めず、新規薬剤を模索している状況である。

ビスホスフォネート (bisphosphonates):

BP)は、骨吸収阻害剤として、骨粗鬆症などの骨代謝疾患に対して使用されている。BPは骨のヒドロキシアパタイトに強い親和性を示し、骨に選択的に吸収される。窒素基を有する第3世代BPは破骨細胞に対して、メバロン酸代謝経路におけるファルネシルピロリン酸合成酵素の活性化を阻害することで、Ras 関連蛋白のプレニル化を阻害し、破骨細胞の機能低下とアポトーシスを誘導する。さらに、多発性骨髄腫、白血病などに対して、第3世代BPが直接的な抗腫瘍効果を有することが報告されている。われわれはこれまでに、非常に低濃度のBPがマウス骨肉腫細胞株の細胞周期をS期で停止させ、Ras 関連蛋白のプレニル化を阻害し、アポトーシスを誘導することを *in vitro* の実験系で明らかにした (Horie N, Murata H, Kimura S *et al. Cancer Lett.*, 2006)。さらに、P糖蛋白高発現による薬剤耐性骨肉腫細胞株を用いてBPの耐性克服の可能性について検討した。BP単独では耐性克服が不可能であったが、種々の抗癌剤とBPの併用により、相乗もしくは相加効果を示し、薬剤耐性株に対して併用により耐性克服可能であることについても明らかにした (Horie N, Murata H, Kimura S, *et al. Br J cancer*, 2007)。

## 2. 研究の目的

骨肉腫に対してBPの直接的な抗腫瘍効果を増強させる方法や、*in vivo*での転移抑制機序の解明を行うことを本研究の目的とした。さらに、これまでに報告のない軟部肉腫に対するBPの効果についても、同様に検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. 骨肉腫に対する第3世代BPの抗腫瘍効果および転移抑制効果の検討

マウス骨肉腫細胞の高肺転移株であるLM8細胞にLuciferase 遺伝子を安定導入し (LM8<sup>Luc</sup>)、マウスを犠牲にすることなく生体内での腫瘍動態を経時的に観察できる *in vivo* imaging system (IVIS) を用いた実験系をすでに確立した。このモデルでは、腫瘍移植後2週目から肺転移を確認することができる。原発巣、肺転移巣の抗腫瘍効果を検討するため以下の実験を行った。

#### (1) IVISによる検討

LM8<sup>Luc</sup>  $1 \times 10^7$  個をヌードマウスの皮下に移植し、無治療群、BP (1回/週) 治療群、BP (3回/週) 治療群の3群に分けた。移植翌日から第3世代BPの投与を開始した。第3世代BPとしてはzoledronic acid (ZOL) を用いた。BP治療開始後、1週ごとに腫瘍体積の計測およびIVISを用いた解析を行った。

#### (2) 組織学的検討

ZOL治療開始後4週経過時にマウスを安楽

死させ、原発巣である皮下腫瘍および転移巣である肺を切除し、その組織学的検討を行った (組織学的評価: H. E. 染色、免疫染色)。

#### (3) *in vitro*での転移抑制効果の検討

遊走能はmicropore filter assayを用いた。接着能はI型コラーゲンゲルで覆われた96穴プレートを用いて、また、浸潤能はmatrigel collagen assay法で、それぞれ解析した。血管新生能はELISA法を用いて解析し、ZOL投与による転移抑制効果を検討した。

## 2. 第3世代BPと放射線療法の併用効果の検討

### (1) 増殖抑制効果および殺細胞効果の検討

骨肉腫細胞株はマウス骨肉腫細胞株としてLM8およびMOSを、ヒト骨肉腫細胞株としてMG63を用いた。放射線、ZOL単独のHalf-maximal inhibitory concentrations (IC<sub>50</sub>)はMTT assay法を用いて算出し、各々IC<sub>50</sub>以下の照射量、濃度で検討した。骨肉腫細胞に対して低線量の放射線を照射し、72時間後の生存細胞数を計測し、至適量を検討した。BP (72時間) 単独投与群、放射線単独照射群、BP (72時間) 投与+放射線照射の併用群、の3群を作成し、増殖抑制効果はMTT assay法で、殺細胞効果はフローサイトメーターを用いて検討した。

### (2) 細胞周期の解析

併用療法の機序についてはフローサイトメーターを用いた細胞周期解析で検討した。

## 3. 悪性軟部腫瘍に対する第3世代BPの抗腫瘍効果の検討

### (1) *in vitro*での抗腫瘍効果の検討

細胞株はヒト線維肉腫細胞株であるHT1080を用いて、ZOLの*in vitro*における増殖抑制効果、細胞周期解析、Ras 関連蛋白の発現解析等を行った。ZOLの増殖抑制効果および、IC<sub>50</sub>はトリパンブルー染色法を用いて算出した。

### (2) 既存の抗癌剤との併用効果についての検討

ZOLの抗癌剤との併用効果について検討するために、抗癌剤としてドキソルビシン、シスプラチン、エトポシド、フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセル、ゲムシタビン、およびメトトレキサートを用いて、増殖抑制効果をトリパンブルー染色法で評価しIC<sub>50</sub>を算出した。併用効果についてはHT1080播種24時間後に、ZOLと抗癌剤を添加し、72時間後に増殖抑制効果、細胞周期の変化を評価した。また、フローサイトメーターを用いて機序について検討した。

## 4. 研究成果

### 1. 骨肉腫に対する第3世代BPの抗腫瘍効果および転移抑制効果の検討

(1) IVISによる検討

ZOL投与量は80 μg/kgとした。原発巣に対しては、無治療群と比較し、週3回のBP治療群においてのみ、ZOL投与4週目で、有意差をもって増殖抑制効果を認めた。肺転巣に関しては、週1回治療群ではZOL投与4週目から、週3回投与群ではZOL投与3週目から、有意差をもって転移抑制効果を認めた。(図1)

(2) 組織学的検討

HE染色による組織像では、週3回のZOL投与群において腫瘍壊死像を認めた。また、smooth muscle actin(SMA)による免疫染色ではSMA陽性領域はコントロール群と比較して有意に低下していた。

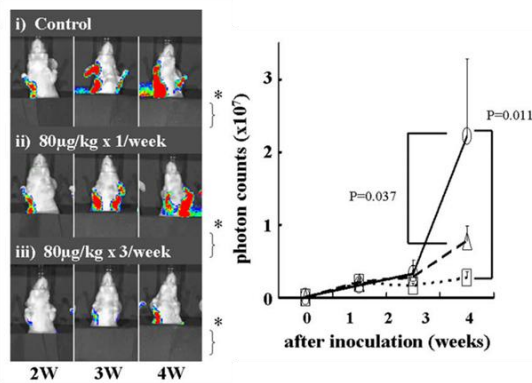


図1) ○ : コントロール群、△ : 1/週治療群  
□ : 3/週治療群

(3) *in vitro*での転移抑制効果の検討

ZOLの濃度はnon-toxic doseである、0.5、1.0および2.0 μMとした。ZOLは1.0 μMおよび2.0 μMの濃度で有意差をもって遊走能を抑制した。ZOLは0.5、1.0および2.0 μMいずれの濃度でも、骨肉腫細胞の接着能および浸潤能を抑制した。VEGFの発現量はZOL 1.0 μM以上の濃度で抑制された。

2. 第3世代BPと放射線療法の併用効果の検討

(1) 増殖抑制効果および殺細胞効果の検討

各々を単独で投与した場合と比較して、併用群では有意差をもって増殖抑制効果の増強およびSub-G1期の細胞比率の増加を認めた。LM8を用いた4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI)染色法による核形態の観察では、ZOLおよび、放射線単独投与群では核の濃縮や断片化を認めなかったが、併用群ではこれらの変化を認めた。

(2) 細胞周期の解析

各々単独投与群と比較して、フローサイトメーターを用いた細胞周期解析では、Sub-G1期の細胞比率の増加を認めた。しかし、各細

胞周期に変化を認めなかった。

3. 悪性軟部腫瘍に対する第3世代BPの抗腫瘍効果の検討

(1) *in vitro*での抗腫瘍効果の検討

ZOLは濃度依存性かつ時間依存性にHT1080の増殖を抑制した。IC<sub>50</sub>は48時間、72時間でそれぞれ1.26 μM、1.66 μMであった、5.0 μM以上の濃度では殺細胞効果を示した。フローサイトメーターを用いて細胞周期を評価した。ZOL添加によりS期の細胞比率が濃度依存性に増加した(図2A)。Sub-G1期の細胞比率は時間および濃度依存性に増加し、特に高濃度暴露においてその効果は顕著であった(図2B)。

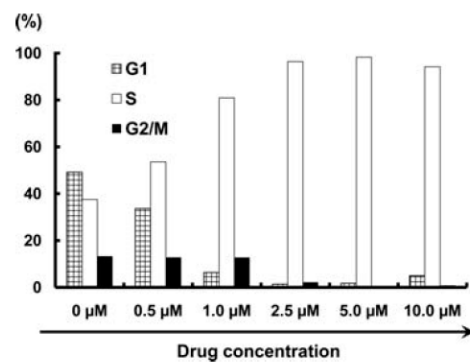


図2A) ZOL投与による細胞周期の変化

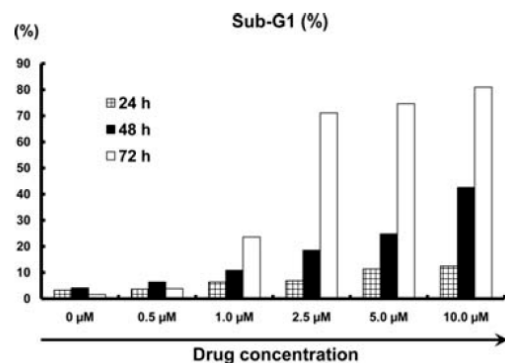


図2B) ZOL投与による殺細胞効果

DAPIによる核染色では、ZOL 2.5 μMを48時間暴露した時、HT1080の核濃縮と断片化を認めた。ZOLにより非プレニル化型Rap 1Aの発現が亢進した。また、ZOL添加48時間でcleaved caspase-3の発現を認めた。

(2) 既存の抗癌剤との併用効果についての検討

ZOLとドキソルビシン、シスプラチン、エトポシド、フルオロウラシル、ドセタキセル、パクリタキセルおよびゲムシタビンを併用

することで、各々単独で使用した場合と比較して、有意差をもって増殖抑制効果の増強を認めた。特に ZOL とエトポシド、またはドセタキセルを併用した場合、極めて高い併用効果を示した ( $p < 0.001$ )。また、併用により Sub-G1 期の細胞比率も顕著に増加したが、細胞周期には変化を認めなかった。しかし、メトトレキサートとの併用では増殖抑制効果の増強を認めず、Sub-G1 期の細胞比率は増加しなかった。

#### 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)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Koto K, Horie N, Kimura S, Murata H, Sakabe T, Matsui T, Watanabe M, Adachi S, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Clinically relevant dose of zoledronic acid inhibits spontaneous lung metastasis in a murine osteosarcoma model. *Cancer Lett*, 査読有, 274:271-278, 2009.
2. Koto K, Murata H, Kimura S, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Ryu K, Sakabe T, Itoi M, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Zoledronic acid inhibits proliferation of human fibrosarcoma cells with induction of apoptosis, and shows combined effects with other anticancer agents. *Oncol Rep*, 査読有, 24: 233-239, 2010.
3. Ryu K, Murata H, Koto K, Horie N, Matsui T, Nishigaki Y, Sakabe T, Takeshita H, Itoi M, Kimura S, Ashihara E, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. Combined effects of bisphosphonate and radiation on osteosarcoma cells. *Anticancer Res*, 査読有, 30: 2713-2720, 2010.

[学会発表] (計 11 件)

1. 小藤和孝, 村田博昭, 西垣泰典, 松井隆明, 堀江直行, 久保俊一. 悪性軟部腫瘍に対するビスホスフォネートを用いた治療 Part 2. 第 30 回近畿肉腫研究会, 2008. 6. 28.
2. 西垣泰典, 村田博昭, 小藤和孝, 堀江直行, 劉 和輝, 竹下秀之, 木村晋也, 前川 平, 伏木信次, 久保俊一. 滑膜肉腫細胞に対する第 3 世代ビスホスフォネートの効果. 第 41 回日整会骨軟部腫瘍学術集会, 2008. 7. 18.

3. 小藤和孝, 村田博昭, 木村晋也, 坂部智哉, 松井隆明, 堀江直行, 伏木信次, 前川 平, 久保俊一: 第 3 世代 Bisphosphonate によるヒト線維肉腫細胞株に対する抗腫瘍効果に関する検討, 第 23 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2008. 10. 24.
4. Koto K, Murata H, Sakabe T, Matsui T, Horie N, Kimura S, Maekawa T, Fushiki S, Kubo T. The third-generation bisphosphonates inhibit tumor proliferation in human fibrosarcoma. 55th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, 2009. 2. 22-25.
5. 劉 和輝, 村田博昭, 小藤和孝, 堀江直行, 松井隆明, 西垣泰典, 坂部智哉, 久保俊一. マウス骨肉腫細胞株に対するビスホスフォネートと放射線照射の併用効果. 第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 2009. 7. 16-17
6. 小藤和孝, 村田博昭, 堀江直行, 坂部智哉, 松井隆明, 木村晋也, 前川 平, 伏木信次, 久保俊一. 骨肉腫細胞に対する第 3 世代ビスホスフォネートの転移抑制効果. 第 18 回がん転移学会学術集会, 2009. 7. 23.
7. Murata H, Koto K, Horie N, Sakabe T, Matsui T, Fushiki S, Kimura S, Maekawa T, Kubo T. The third-generation bisphosphonate inhibits tumor growth and lung metastasis in murine osteosarcoma cells. The combined meeting of International Symposium of Limb Salvage and the Musculoskeletal Tumor Society, 2009. 9. 23-26.
8. 小藤和孝, 村田博昭, 坂部智哉, 劉 和輝, 西垣泰典, 松井隆明, 堀江直行, 伏木信次, 木村晋也, 前川 平, 久保俊一. ヒト軟部肉腫細胞株に対する第 3 世代 Bisphosphonate と放射線の併用効果に関する検討. 第 24 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2009. 11. 6
9. Murata H, Ryu K, Koto K, Horie N, Matsui T, Sakabe T, Nishigaki Y, Kubo T. Combined effects of a third-generation bisphosphonate and radiation against murine osteosarcoma. 8th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society Meeting, 2010. 2. 24-27.

10. 小藤和孝, 村田博昭, 坂部智哉, 劉 和輝, 松井隆明, 堀江直行, 澤井泰志, 久保俊一. ヒト軟部肉腫細胞株に対する 3 世代 Bisphosphonate と放射線の併用効果に関する検討. 第 34 回近畿肉腫研究会, 2010. 7. 24.
11. 小藤和孝, 村田博昭, 坂部智哉, 劉 和輝, 松井隆明, 堀江直行, 澤井泰志, 芦原英司, 伏木信次, 前川 平, 久保俊一. 骨軟部肉腫細胞株に対する第 3 世代 Bisphosphonate 含有ハイドロキシアパタイトの抗腫瘍効果の検討. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2010. 10. 14

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村田 博昭 (MURATA HIROAKI)  
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師  
研究者番号 : 90360031

### (2) 研究分担者

木村 晋也 (KIMURA SHINYA)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号 : 80359794

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :