

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462350

研究課題名(和文) 転移性骨腫瘍に対する内固定の腫瘍抑制効果の検討

研究課題名(英文) Effects of internal fixation for metastatic bone tumor.

研究代表者

寺井 秀富 (Terai, Hidetomi)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：20382046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌の骨転移に対する治療は担癌患者の増加する高齢社会にとって極めて重要な問題である。われわれは、兔悪性腫瘍株(VX2) Carcinomaを人工的に家兔脛骨に埋植し、人工的に転移性骨腫瘍モデルを作成することに成功した。さらに、転移のある脛骨に予防的に内固定術を施行することで骨破壊の進展を予防し、さらには生命予後が延長する可能性を明らかにした。今後はそれらのメカニズムについてさらに探求していく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Treatment of bone metastasis is a big issue in the aged society because people with tumor increase as aging. We successfully developed the metastatic bone model of rabbit using VX-2 carcinoma cells implanted into their tibiae. Furthermore, we have proved that prophylactic internal fixation of metastatic bone prevented bone destruction and improve the survival rate of metastatic rabbit. Further study is required to clarify its mechanism.

研究分野：整形外科学

キーワード：骨転移 内固定 生命予後 骨破壊 VX-2 転移性骨腫瘍 悪性腫瘍 癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 高齢者において癌の有病率は増加する (CA Cancer J Clin 2009; 59:225-49)。我が国における高齢化は周知の事実であり、今後も癌患者数は増加していくと推測される。がん治療の進歩により原発巣のコントロールがついて担癌状態での生存率が向上する一方、ADL に多大な影響を及ぼす転移巣に対する治療が確立されていないことが現状の問題点である。なかでも脊椎転移は強い疼痛や、運動麻痺・知覚低下などの神経麻痺をきたすために患者の ADL を大きく低下させる。実際に悪性腫瘍患者の 10%程度が脊椎転移による痛みや神経症状を有するといわれており、悪性腫瘍死亡患者の 30-70%で剖検上脊椎への転移があることがわかっている。神経麻痺や疼痛による歩行障害は生命予後に影響するとも報告されており (Cancer 2003;97:476-84. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2006;64:182-8) 骨転移への有効な治療法のエビデンスを確立することは極めて重要であると考えられる。

(2) 骨転移による症状の一部は転移巣により破壊された骨皮質が荷重を支えきれなくなると骨破壊が進行、同時に腫瘍の増大が進行することによって出現する。骨組織の破壊は腫瘍細胞自身ではなく、腫瘍細胞に賦活化された破骨細胞によって行われる。破骨細胞の賦活化は局所での腫瘍細胞との細胞応答やサイトカインによってなされるが、骨組織への動的ストレスも骨破壊の重要な因子であると考えられる。動的ストレスの制御により骨破壊の進行が抑制できれば腫瘍の増大が抑制でき、症状の出現を遅らせることができる。本仮説が証明できれば脊椎転移巣や大腿骨などの荷重がかかる骨転移に対して早期に内固定術を行うことの科学的根拠が得られる。

2. 研究の目的

動的ストレスの制御が骨破壊に及ぼす影響

を調べ、その腫瘍増殖抑制効果の有無の検証とそのメカニズムを検討すること。

転移した骨腫瘍の増大・進展には必ず骨破壊の過程を伴う。細胞レベルに於いては腫瘍が放出するサイトカインによって破骨細胞が活性化され、骨破壊が進行するという報告がなされている (Cancer Control. 2012 Apr;19(2):92-101)。しかし、骨組織に加わる動的ストレスと破骨細胞活性化の関係については知られていない。しかし、実際の臨床に於いて骨転移が問題となるのは脊椎や大腿骨など動的ストレスのかかる部位に骨転移が生じ荷重負荷に耐えられなくなる場合である。明らかに支持機能が破綻していると考えられる場合には強固な内固定を行うことにより骨の支持機能を再建するが、支持機能が残存している状態での内固定による再建には明確な科学的エビデンスは得られていない。

3. 研究の方法

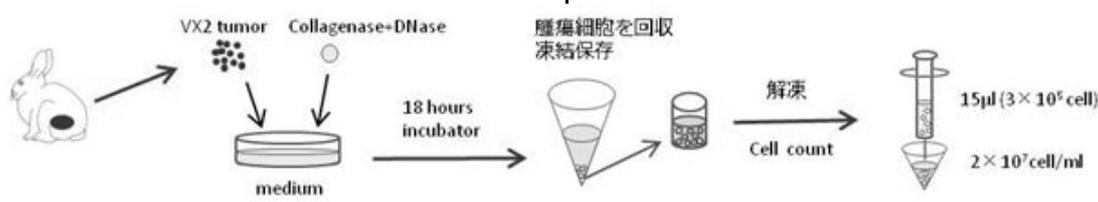
(1) 骨転移モデルの作成

VX2 carcinoma は日本白色家兎の大腿筋内で担癌させているものを 2-3 週おきに継代し使用する。腫瘍細胞の接種は Amundson らの報告 (Neurosurgery 2005;57:341-6) を一部改良して行う。腫瘍組織 0.5g を刻み、腫瘍組織を collagenase と DNase を添加した培地上で 18 時間培養する。腫瘍細胞を回収し凍結保存、腫瘍接種直前に解凍し、細胞カウントを行い 2×10^7 cell/ml に濃度調整を行う。

(2) 内固定と腫瘍接種

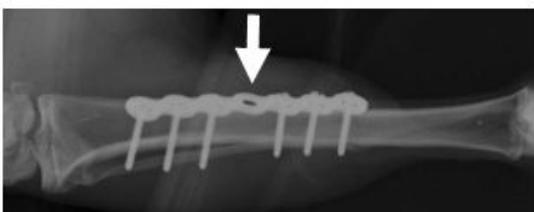
内固定は顎骨骨折用 locking plate (Striker 社) の 7 穴プレートを用いて行う。真ん中の Screw hole には Screw を刺入せずに腫瘍の接種を行う穴を作製する (下図矢印)。具体的には径 2mm の high-speed-drill で cortex を開窓した後 5mm の深さまで 21G 針を外套として挿入し、Hamilton syringe を用いて腫瘍細胞を 3×10^5 cell (15 μ l) を注入する。腫瘍細胞が漏れないよう骨ろうで開窓部を

sealing 行う。(下図参照)



(3) 骨破壊の定量的評価

術直後にレントゲン、単純 CT 撮影を行う。術後は 1 週ごとに麻酔下に CT 撮影を行う。溶骨した骨の体積はワークステーションソフト(Zio Station, Zio-soft 社)を用い、CT 値によって骨体積を計測する。これを両群比較行うことで溶骨の速度の差を評価する。兎は Survival time を測定するために、途中での安楽死は行わない。腫瘍死した後、paraformaldehyde で固定し、H-E 染色、TRAP 染色を行う。組織学的には腫瘍の進展度、破骨細胞の数を評価する。de で固定し、H-E 染色、TRAP 染色を行う。組織学的には腫瘍の進展度、破骨細胞の数を評価する。(下図)



(4) 動的ストレス制御が骨破壊過程へ及ぼす影響を免疫組織学的、分子生物学的に検証する。両群において骨破壊が進んでいる部分と、骨破壊が起っていない部分(前肢)から骨組織を採取し、固定群と非固定群での違いを骨形成/骨破壊に関わる転写因子を中心として免疫組織学的、分子生物学的に検証する。具体的には、腫瘍接種後 3 週時点で、腫瘍接種部と明らかな転移が起っていない前肢から骨組織を採取し、破骨細胞の活性化に関わる転写因子(RANK/RANKL など)を中心に調べる。

4. 研究成果

日本白色家兎(20 週齢、メス、n=45)の脛骨骨幹部(片側)に 1.6 mm の骨孔を作製し、 1×10^6 個のウサギ VX2 腫瘍細胞を埋植した。それらを(1)固定群(2)コントロール群(3) Sham -OP 群の 3 群に分けた。固定群には腫瘍移植部を中心にしてミニプレートによる内固定を行い、Sham 群にはプレートを使用せずにスクリュー設置のみを行った。経時的に単純 X 線ならびに CT による骨破壊の進行に対する画像的評価、血液学的異常所見の評価を行い、併せて骨細胞移植後の生存日数を検討した。

CT にて計測した骨吸収体積は、固定群において他の群と比較し有意に少なかった(3 週目:固定群 -1.2%、Sham 群 -2.5%、Control 群 -6.1%)、また、固定群では術後生存日数が有意に延長した。(固定群 64.5 ± 13.5 日、Sham 群 50.3 ± 11.6 日、Control 群 38.2 ± 4.9 日)また、骨破壊を反映して 6 週目のカルシウム値は Sham 群で 11%、Control 群で

14%上昇しクレアチニン値もそれぞれ、19%、8%の上昇が認められたが、固定群では上昇しなかった。

今回の研究結果から、癌転移巣を有する長管骨への予防的な内固定により骨破壊の進行が抑制され、生命予後が延長する可能性が明らかになった。

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1件)

[雑誌論文]

Ibrahim M, Terai H, Yamada K, Suzuki A, Toyoda H, Nakamura H. The role of internal fixation for long bone metastasis prior to impending fracture: an experimental model. J Orthop Sci. 2013 Jul;18(4):659-66. 査読有
<http://dx.doi.org/10.1007/s00776-013-0380-7>

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺井 秀富 (TERAI, Hidetomi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 20382046

(2)研究分担者

堂園 将 (DOUZONO, Shou)
大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医
研究者番号： 10618945

豊田 宏光 (TOYODA, Hiromitsu)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号： 50514238

中村 博亮 (NAKAMURA, Hiroaki)
大阪市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 60227931