

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893132

研究課題名(和文) 経皮的炭酸ガス吸収システムを用いた乳癌骨転移に対する局所治療の開発

研究課題名(英文) Development of local control treatment for bone metastasis of breast cancer using transcutaneous carbon dioxide therapy

研究代表者

大西 康央 (ONISHI, YASUO)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：50707122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：経皮的炭酸ガス吸収システムによる乳癌骨転移部に対する局所治療効果について、乳癌骨転移モデルマウスを用いて検討した。モデルマウスを治療群およびコントロール群に分けて治療を行い、治療後の局所骨破壊および骨体積をMicro CTで、治療後腫瘍内低酸素環境についてHIF-1 α およびVEGFの免疫染色にて評価した。治療群ではコントロール群と比較して有意に骨破壊が抑制され、骨体積が維持されていた。また治療群では腫瘍内のHIF-1 α およびVEGFの発現が減少しており、低酸素環境が改善されていた。以上から経皮的炭酸ガス吸収システムにより乳癌骨転移局所の骨破壊を制御できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We assessed the effect of a local treatment for bone metastasis of breast cancer using transcutaneous carbon dioxide (CO₂) therapy. We employed a bone metastasis mouse model of human breast cancer. After the treatments by transcutaneous CO₂ therapy, we evaluated the bone destruction by micro CT scan, and the intratumoral hypoxia by immunohistological staining of HIF-1 α and VEGF. At the end of treatments, bone destruction was significantly suppressed in the CO₂ treated group compared to control group, and the expressions of HIF-1 α and VEGF were decreased by the transcutaneous CO₂ therapy compared to those in the control group. The findings in this study strongly suggest that transcutaneous CO₂ therapy could locally inhibit bone destruction by breast cancer metastasis via decrease in the intratumoral hypoxia.

研究分野：骨軟部悪性腫瘍

キーワード：炭酸ガス経皮吸収 乳癌 骨転移 低酸素環境

1. 研究開始当初の背景

現在、日本の人口の約 50% ががん罹患すると言われており、特に女性のがん罹患率の第 1 位は乳癌である。現在、乳癌に対する治療法の第一選択は手術であるが、それに加え、転移部あるいは局所のコントロールに対して化学療法、放射線療法が併用される。乳癌の遠隔転移陽性患者の 5 年生存率は約 30% と低率であり、化学療法、放射線療法では全身、局所の合併症に苦しむ患者も多く、代替の治療法の開発は急務である。

乳癌の好発転移部の一つに骨があるが、近年の研究で、骨転移部において骨を破壊するのはがん細胞そのものではなく、がん細胞によって誘導、活性化された破骨細胞であることが知られている。破骨細胞は、自身がもつ生理的骨吸収機能を果たすことにより、がん細胞による溶骨性骨転移の成立・進展を助けると言われている。また、破骨細胞の活性化による骨溶解が転移部の骨痛誘発の原因と考えられるようになり、治療対象として様々な研究がすすめられている。

一般的にがん組織においては、がん細胞の活発で無秩序な増殖や、きわめて不規則な血管新生の促進により、血管からの栄養や酸素が十分に届かない領域が生じる。その結果、正常組織には存在しない異常な低酸素、低栄養、低 pH に特徴づけられる腫瘍内微小環境が形成される。これらの領域に存在するがん細胞は化学療法や放射線療法に対して高い抵抗性を示すことが分かっており、そのため、近年、この低酸素微小環境に対しいかに改善、治療を行うかが重要な課題となっている。

我々は、独自に開発した経皮的炭酸ガス投与システムが、投与局所で人工的なボーア効果を生じ、酸素分圧が増強されることを報告してきた。また近年、同様の治療法が骨軟部腫瘍組織において、腫瘍縮小効果、局所の低酸素環境の改善、化学療法抵抗性の改善を生じ、抗腫瘍効果を示すことについても報告し

てきた。

一方、がん骨転移部骨破壊を担う破骨細胞は、低酸素環境において前駆細胞である間葉細胞からの分化が促進され、低酸素微小環境で骨転移部の骨溶解に密接に関与しているとされているが、破骨細胞活性と低酸素環境の改善との関連をターゲットとした研究はなされていない。

そこで我々は、経皮的炭酸ガス吸収システムが、骨転移部において低酸素環境を改善し、投与局所のがん細胞および破骨細胞の活性化をコントロールすることで、骨破壊を抑制するのではないかと考え、本研究に至った。

2. 研究の目的

経皮的炭酸ガス吸収システムは、我々が開発した装置であり、吸収促進剤ジェルを通して炭酸ガスを経皮的に吸収させることで、局所でボーア効果を引き起こし、酸素分圧の増加を得る治療法である。我々はこれまでに、骨軟部肉腫移植モデルにおいて本治療法が抗腫瘍効果を示すことを報告してきた。固形がんでは中央部が低酸素環境となることが知られ、乳癌では酸素分圧 PO_2 が 1.3 程度まで下がる。このようながんの低酸素環境は、骨転移部においても同様に存在し、局所での骨吸収を促進させ、腫瘍浸潤の原因になると言われている。

本研究では、我々の開発した経皮的炭酸ガス吸収システムが、乳癌細胞株の骨転移部での腫瘍内の低酸素環境を改善させ、骨転移の成立・進展を助長している骨リモデリングのバランスを修復することで、局所骨破壊、腫瘍細胞浸潤を抑制する、と仮定し、その評価を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウス乳癌骨転移モデルの作製。

BALB/c-nu マウス (メス) の左脛骨骨髓内にヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 を移植し、乳癌骨転移モデルを作製した。骨転移の評価

法としては、腫瘍移植後より1週間ごとに単純X線(XP)にて下肢の膝周囲を中心に4方向(前後、側面、両斜位)およびMicro CT撮影を行うことで、確認・評価した。その結果にもとづき、腫瘍が骨に生着した時点で、治療開始時期として適切な週数を決定した。腫瘍の生着はMicro CTだけでなく、XPでも骨溶解像が十分確認できる状態とした。

(2) 経皮的炭酸ガス吸収システムによる抗腫瘍効果の評価。

骨転移モデルマウスを治療群(n=10匹)、コントロール群(n=10匹)の2群に分け、経皮的炭酸ガス吸収システムによる治療を行った。治療方法は、下肢骨転移部である膝周囲に吸収促進剤ジェルを塗り、下腹部以下を密封袋にて密封し、袋内を100%の炭酸ガスで充満させた。コントロール群には同様に吸収促進剤ジェルを塗り室内空気を充満させる事とした。(1)にて決定した治療開始日より、1回10分、週2回、2週間、計4回の治療を行った。評価方法としては、適宜XP、Micro CTで骨転移部、コントロール部の撮影を行った。Micro CTでは、解析用ソフトを使用して骨体積を測定し、骨破壊の状態を比較検討した。また、副作用の評価として、吸収促進剤ジェル塗布部の皮膚状態の確認、体重の測定を各治療時に行った。

(3) 治療部位の低酸素環境の評価。

治療終了後に治療群、コントロール群ともに乳癌細胞を移植した脛骨を採取し、低酸素マーカーとして知られるHypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α)の発現状態を免疫染色法にて確認、評価した。また、HIF-1 α の下流に存在し、血管新生促進因子として知られるVascular endothelial growth factor (VEGF)の発現についても同様に評価した。

4. 研究成果

(1) 経皮的炭酸ガス吸収システムは乳癌骨転

移部の骨破壊を抑制し、骨量を維持した。

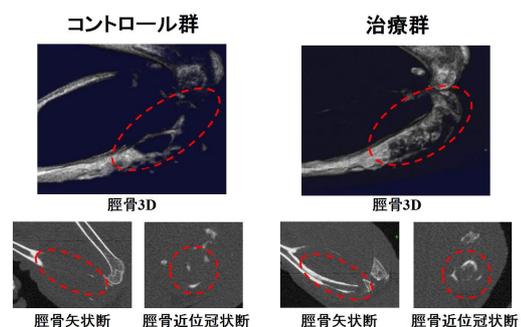
上記方法(1)で示したように、ヒト乳癌細胞株MDA-MB-231(100万細胞)をBALB/c-nuマウス(メス)の左脛骨近位部に骨髓内移植し、骨転移モデルを作製した。

腫瘍移植後、2週程度でXP上確認可能であり、同時期より経皮的炭酸ガス吸収システムによる治療を開始した。

XPおよびMicro CTにて骨溶解像を確認可能となった後、腫瘍サイズが均等になるようにモデルマウスを治療群、コントロール群の2群に分けて治療を行った。

計4回の治療終了後のMicro CT上コントロール群では広範な骨破壊、骨皮質および骨梁の欠損をみとめたが、治療群では骨皮質、骨梁ともに維持されており、骨破壊が抑制されていた(図1)。

図1: 治療後の骨転移部のMicro CT画像

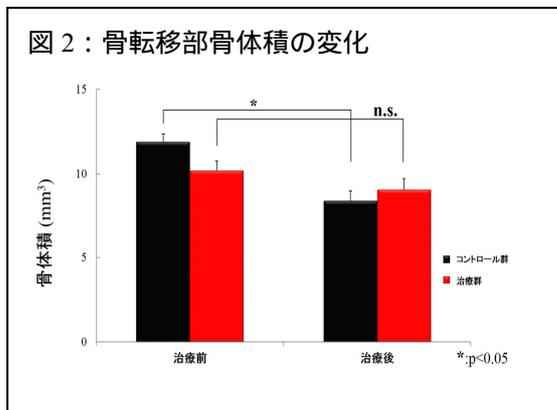


また、Micro CT画像から算出、解析した治療開始時と治療終了時の骨体積はコントロール群では有意な骨体積の減少をみとめたが、治療群の骨体積はコントロール群と比較して維持されていた(図2)。

副作用に関しては吸収促進剤ジェル塗布部の皮膚状態、体重の増減を確認したが、治療群とコントロール群において有意な差はみとめなかった。

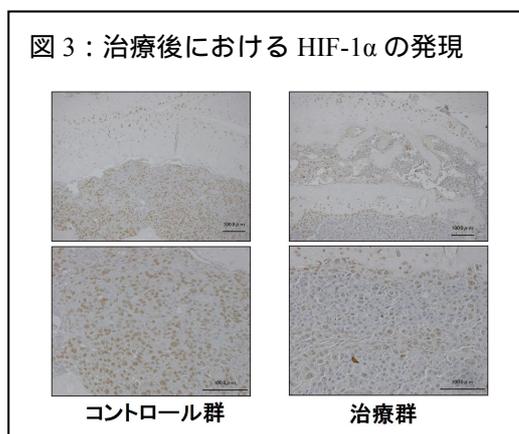
以上より、経皮的炭酸ガス吸収システムを使用することにより乳癌の骨転移部に骨破壊を抑制し、骨量を維持できる可能性が示唆さ

れた。



(2) 経皮的炭酸ガス吸収システムは乳癌骨転移部の低酸素環境を改善した。

次に経皮的炭酸ガス吸収システムによる治療部位の低酸素環境改善の評価検討を行った。治療終了後に乳癌細胞株を移植した脛骨を採取し、低酸素状態のマーカーとして知られる HIF-1 α の発現について、免疫染色法を用いて評価した。コントロール群では骨内の腫瘍細胞に一致して広範に HIF-1 α の発現をみとめたが、治療群においてはその発現が低下していた (図 3)。また HIF-1 α の下流に存在し、血管新生促進因子として知られる VEGF の発現についても同様に評価を行ったところ、治療群においてはコントロール群と比較して HIF-1 α と同様に発現が低下していた。以上より経皮的炭酸ガス吸収システムにより治療部位の低酸素環境が改善される可能性が示唆された。



本研究により経皮的炭酸ガス吸収システム

によって乳癌骨転移部局所の骨破壊が抑制され、骨量が維持できる可能性が示された。治療効果発現のメカニズムはまだ未解明なままであり、今後も検討が必要であるが、投与局所の低酸素環境の改善による治療効果は乳癌細胞そのものへの効果とともに骨破壊機序の中心となる破骨細胞への直接的な抑制効果があると考えられ、他のがん種による骨転移にも同様の効果が得られる可能性が高いと考えられる。上記本治療による破骨細胞活性の状態評価に加え、治療中の経時的な局所低酸素環境の評価、骨強度の評価など形態学的、分子生物学的アプローチによるメカニズムの解明が今後の課題であると思われ、継続的に検討を続けていきたいと考える。

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)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Toda M, Kawamoto T, Ueha T, Kishimoto K, Hara H, Fukase N, Onishi Y, Harada R, Minoda M, Kurosaka M, Akisue T. 'Decoy' and 'non-decoy' functions of DcR3 promote malignant potential in human malignant fibrous histiocytoma cells. *Int J Oncol*, 2013, 43(3):703-12.
2. Harada R, Kawamoto T, Ueha T, Minoda M, Toda M, Onishi Y, Fukase N, Hara H, Sakai Y, Miwa M, Kuroda R, Kurosaka M, Akisue T. Reoxygenation using a novel CO₂ therapy decreases the metastatic potential of osteosarcoma cells. *Exp Cell Res*, 2013, 319(13):1988-97.
3. Onishi Y, Ueha T, Kawamoto T, Hara H, Toda M, Harada R, Minoda M, Kurosaka M, Akisue T. Regulation of mitochondrial proliferation by PGC-1 α induces cellular apoptosis in musculoskeletal malignancies. *Sci Rep*. 2014 Jan 29;4:3916.
4. Onishi Y, Akisue T, Kawamoto T, Ueha T, Hara H, Toda M, Harada R, Minoda M, Morishita M, Sasaki R, Nishida K, Kuroda R, Kurosaka M. Transcutaneous application of CO₂ enhances the antitumor effect of radiation therapy in human malignant fibrous histiocytoma. *Int J Oncol*. 2014, 45(2):732-8.

[学会発表] (計 9 件)

1. 原田理沙. 炭酸ガス経皮投与は骨肉腫細胞の腫瘍増大と転移能を抑制する. 第 86 回日

本整形外科学会学術総会 ,2013.5.23-26 ,広島 .

2. 戸田光紀 .乳癌細胞株を移植した動物モデルに対する経皮的炭酸ガス治療の効果 .第 50 回日本リハビリテーション医学会学術総会 , 2013.6.13-15 , 東京 .

3. 原田理沙 .骨肉腫肺転移マウスモデルに対する経皮炭酸ガス療法の効果の検討 . 第 50 回日本リハビリテーション医学会学術総会 , 2013.6.13-15 , 東京 .

4. Onishi Y .The effects of reoxygenation using a novel CO2 therapy on radiosensitivity in human malignant fibrous histiocytoma cells. 8th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies , 2013.10.13-16 , Venezia , Italy .

5. Toda M .Transcutaneous carbon dioxide (CO2) therapy suppresses bone destruction by breast cancer metastasis with decreased expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in vivo. 60th Annual Meeting of Orthopaedic Research Society , 2014.3.15-18 , New Orleans , USA

6. 大西康央 .炭酸ガスと放射線併用療法による骨軟部肉腫に対する新しい治療法戦略の確立 . 第 122 回中部日本整形外科災害外科学会 , 2014.4.11-12 , 岡山 .

7. 秋末敏宏 .骨・軟部腫瘍 希少疾患に光明をもたらす夢の実現へ -悪性骨・軟部腫瘍に対する炭酸ガス経皮投与療法- . 第 87 回日本整形外科学会学術総会 , 2014.5.22-25 , 神戸 .

8. 原田理沙 .炭酸ガス経皮投与は骨・軟部肉腫における iPS 関連遺伝子の発現を低下させる . 第 87 回日本整形外科学会学術総会 , 2014.5.22-25 , 神戸 .

9. 原田理沙 .炭酸ガス経皮投与による低酸素環境の改善は悪性線維性組織球腫の iPS 関連遺伝子の発現を低下させる . 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 , 2014.10.21-22 , 鹿児島 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕
 ホームページ等

6 . 研究組織
 (1)研究代表者
 大西 康央 (ONISHI, Yasuo)
 神戸大学病院・医員
 研究者番号：50707122

(2)研究分担者 ()
 研究者番号：

(3)連携研究者 ()
 研究者番号：