

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592241

研究課題名(和文) 担がん患者の骨微小環境の解析と間葉系幹細胞の病態への動的関与

研究課題名(英文) Bone microenvironment affects cancer progression via mesenchymal stromal cells

研究代表者

城戸 顕 (Kido, Akira)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382306

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)：本研究課題は生体においてがん病巣に動員される「正常の間葉系幹細胞の振る舞い」をキーとして、骨微小環境の動態ががんの病態・病勢に与えるはたらきを明らかにし、新たな診断並びに治療法の確立を目指すものである。間葉系幹細胞は正常骨髄からがん病巣に動員され、がん病巣の伸展に有益な環境を構築する。われわれは培養細胞、動物モデルおよびヒト臨床研究を通じて1)末梢血液からの間葉系幹細胞の分離 2)骨微小環境・がん微小環境の分子生物学的検索および生体蛍光観察による病勢評価 3)共培養系によるPCRアレイ・スクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：Mesenchymal stem (stromal) cells play important role in cancer progression. In this study, we focused the (normal) bone microenvironment in patients with cancer. We designed in vitro and in vivo study to assess the interaction between bone marrow-derived stromal cells (BMSC) and malignant cells. We established the isolation method of BMSC from blood samples of patients, investigated bone microenvironment using the near infrared fluorescence endoscopy method, and performed coculture assays with BMDC and malignant cells.

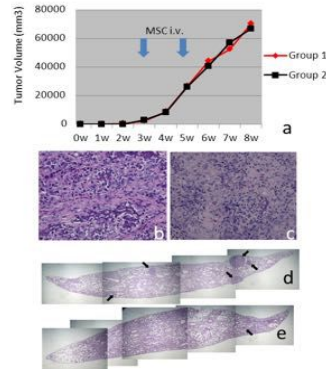
研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：がん 骨転移 骨微小環境 間葉系幹細胞 フラクタルカイン 近赤外蛍光内視鏡 骨微細構造

1. 研究開始当初の背景

骨髄由来の間葉系幹細胞はニッチを形成し腫瘍増殖を促進する：間葉系幹細胞は全身の骨髄から動員され、炎症部・障害部に集積する。消化器がんなどにおいては、間葉系幹細胞は間質に取り込まれ、転移前ニッチを形成しその結果がんの転移・増殖が促進される (Lazennec G, 2008, Goldstein R, 2011)。われわれも間葉系幹細胞の投与が骨肉腫の増殖を促進する事をラットモデルを用いて報告している

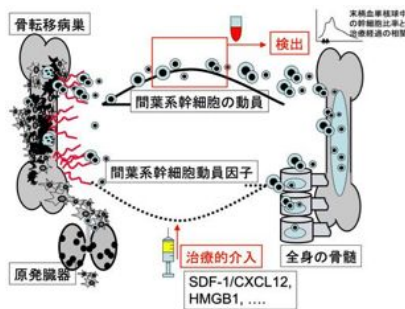
(図、Tsukamoto et al, 2011)。これらの背景からわれわれは、骨転移を有する担がん患者の病態・病勢に、間葉系幹細胞を中心とする骨微小環境が重要な役割を担っているとの仮説を立てた。



2. 研究の目的

生体内の骨髄由来間葉系幹細胞の動員の把握とその動態に対する治療的介入は、特に転移病巣の病勢を抑え、さらには生命予後を改善する可能性がある。これを踏まえ、間葉系幹細胞の動態の把握 (臨床的な) 局所破壊・浸潤と間葉系幹細胞の動態の相関評価 末梢血液検体における間葉系幹細胞の検出 既知の幹細胞動員因子と未知の因子の同定を行うことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

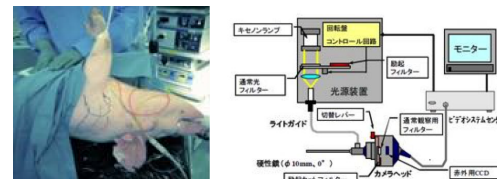


本研究は、大きく (1) 細胞実験を基盤とする細胞間相互作用の検証と (2) ヒト臨床像 (転移の病勢と骨微小環境) の検討の 2 側面より成る。細胞実験は臨床標本の網羅的検索から得られた候補遺伝子に基づいて行う。

間葉系幹細胞の末梢血からの検出：ラット疾患モデル並びに患者血液 (倫理委員会承認済み) から、単核球分離採血管および間葉系幹細胞用培地 + CD105 マイクロビーズ (磁気ビーズ法) を用いたコロ

ニーアッセイを行う。ヒト標本に関してはコロニーアッセイ結果と臨床経過の相関を統計的に検討する。またコロニーアッセイにて遺伝子・タンパク発現の網羅的解析を行い動員候補遺伝子をスクリーニングする。

生体内骨微小環境の検討 (1)。近赤外蛍光イメージング手法を用いて血管新生が病勢を反映すると考え得る骨関節疾患に対する蛍光観察手法の確立を行う。骨関節領域での近赤外蛍光内視鏡の使用に際しては、消化器領域で行われている ICG 法を応用し、ミニプタにて条件設定を行ったのち (下図) 倫理委員会承認を得てヒト症例における観察を行う。



生体内骨微小環境の検討 (2)。臨床用 MDCT を用いた骨梁構造解析。骨微細構造変化の画像的描出を目指し、臨床用 CT データを用いた画像解析を、まずは非がん患者のデータを用いて行う。

細胞メカニカルストレス実験。間葉系幹細胞の動員因子候補として培養細胞進展装置 (ストレックス社、日本) を用いてメカニカルストレス負荷培養を行い次項目の手法にて遺伝子およびタンパク発現解析を行う。

共培養試験における遺伝子・タンパク発現の網羅的解析。得られたデータを指標にがん細胞および間葉系幹細胞の共培養系を用いて (特に細胞遊走因子フラクタルカインを主たるターゲットとした) ELISA, リアルタイム PCR アレイを用いた解析を行う。

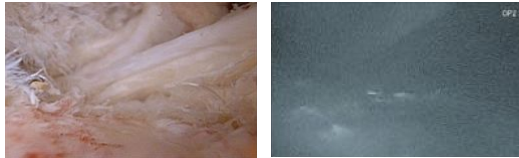
担がん患者病勢評価システムの構築。骨転移を有する担がん患者について、現病巣の病勢と転移巣の病勢の多面的評価を行う為、骨転移キャンサーボード (CB) にて診療科横断的な臨床情報統合を行う。

4. 研究成果

間葉系幹細胞の末梢血からの検出。ラットモデルを用いて磁気ビーズ法による末梢血からの間葉系幹細胞の検出およびコロニーアッセイ法を樹立し、本手法をヒト採血標本に用いた。永眠された 12 名を含む計 20 名の登録追跡患者に関して臨床経過とコロニーアッセイの相関を検討した。全例の末梢血液よりコロニーアッセイ評価は可能であったが、間葉系幹細胞の増殖は原病および転移病巣の双方の病勢に相関する傾向を示し、特に終末期患者においては骨転移の独立した指標とはなり難い。網羅的解析の結果、病勢

の強い群において特に細胞遊走因子フラクタルカインの上昇傾向を認めた（有意差はなし）。

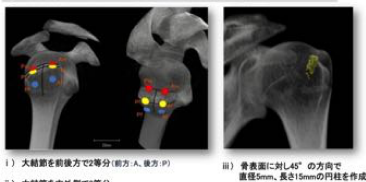
骨・関節微小環境に対する近赤外イメージング観察手法の確立。ミニプタを用いた動物実験の後、本学倫理委員会の承認を得てヒト骨関節病変6例を対象とした近赤外イメージング観察を行った。一部の血管は近赤外可視光のみで描出され、可視光のみでは評価できない深部の血流評価/血管新生の病態・治療効果判定に有益である可能性を見出した(発表20,23-25)。



(肩関節近赤外イメージング鏡視、70代女性。可視光では観察できない血流が静止画およびリアルタイム動画にて観察し得る)

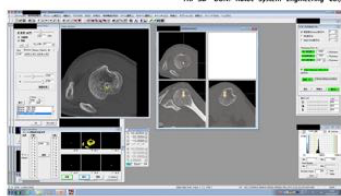
MDCTを用いた骨微細構造評価。倫理委員会承認を経て、患者臨床CTデータを用いた骨微細構造観察手法を樹立し肩関節、股関節にてこれを実施した。非がん病変での関節評価はすでに英文雑誌に採択され掲載された(査読あり、論文1,6)。担がん患者データに関する部位データは現在投稿準備中である(下図に非がん患者肩関節解析のシエマを示す)

① 患側肩のCTデータをもとに、関心領域を設定



1) 大関節を前後方で等分(前方: A, 後方: B)
2) 大関節を内外側で等分
3) 骨断面に対し45°の方向で直径5mm、長さ15mmの円柱を作成

② 骨梁微細構造解析ソフトを用いたパラメータの計測

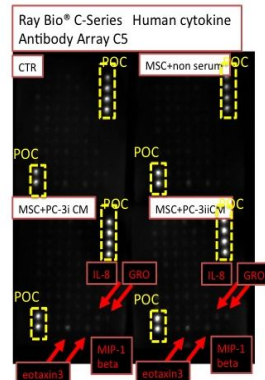
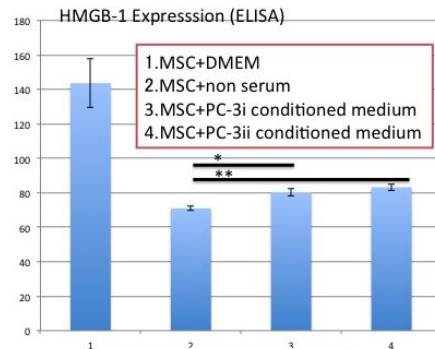


1) 解析ソフト上で関心領域の入力

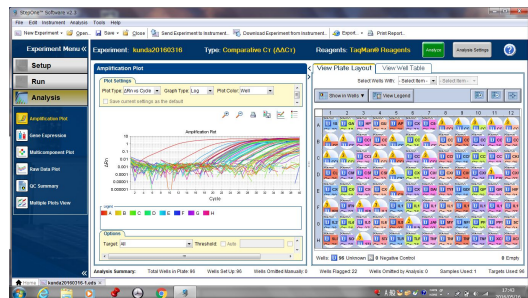
2) 2値化処理(binarization)

がん細胞(PC-3)およびヒトMSC(間葉系幹細胞)を用いた共培養系(およびメカニカルストレス負荷培養)における、フラクタルカインを主たるターゲットとしたELISA,リアルタイムPCRアレイを用いた解析。我々の実験系では当初期待されたCXCL12/CXCR4系には有意な差が現れなかったが、タンパクレベルでPC-3馴化培地にてMSCは有意にHMGB-1を上昇させていた(右上図、*, **,ともに $p < 0.05$)。サイトカインアレイ解析。サイトカインアレイにおいてはPC-3馴化培地にてGRO, IL-8, eotaxin-3, MIP-1 beta, の発

現 増強を認めた(右中図:化学発光メンブレンのイメージング解析)。さらにわれわれはリアルタイムPCRアレイを



用いて、同じく細胞遊走に関わるフラクタルカインを中心に網羅的検索を行い(右下図)サイトカインアレイで得られたタンパク発現結果および特にeotaxin-3を中心とするパスウェイのダイナミックな変化として整合する結果をm-RNAレベルにても確認した。現在これらのデータをもとにした論文“Expression shift of fractal cytokines in bone marrow-derived stromal cells co-cultured with tumor cell-conditioned medium”「悪性細胞馴化培地によるBMSCのサイトカイン発現変化」は投稿先の英文学術誌にて査読中である。



*[補足事項]重要な補足事項として、本研究実施期間中に、近年のiPS細胞を含む再生研究の流れの中で、我々を含む多くの研究グループが従来、間葉系幹細胞として扱ってきた細胞群がいわゆる「幹細胞」ではなく、その起源は血管周皮細胞である可能性が大きい旨が指摘され検証されてきた(Caplan A, JOA 2016)。したがって骨髄由来とされた細胞群も、じっ

さいの起源は骨髄ではなく、骨髄に含まれる血管組織由来である可能性が高い。

(これまで検証された同細胞群の既に明らかになっている細胞活性ならびに生物学的機能に関してはなんら疑いの余地はない)。これを踏まえ我々は、従来の「骨髄由来間葉系幹細胞」を「骨髄組織から採取樹立した多分化性を持つ非造血系前駆細胞」と位置づけし直し、特に血管新生に関わる微小環境(近赤外イメージング)と invitro 細胞間相互作用に焦点を絞り研究を遂行した。

骨転移に特化したカンサーボードによる臨床評価系の確立。骨転移を有する骨転移を有する担がん患者について、各計測値(コロニーアッセイほか)と原病の病勢および転移巣の病勢の多面的評価を正確に行う為、骨転移カンサーボード(CB)にて診療科横断的な臨床情報の統合を行った。2013年1年間にCBにて討議・診療を行った全患者61症例を対象に、診療録の後ろ向き調査を行い原疾患の病勢、SREリスク評価および診療介入によるその変化を検討した。調査内容は、がん診断日、本期間内における原病巣の病勢/治療反応性、骨転移診断日、骨転移フォローアップ期間および回数、骨転移病巣の病勢/治療反応性、骨折・麻痺リスクの変化およびその発症の有無である。骨転移病巣の経緯は、下図のごとくCB介入にて安定化を目指し得ることが判明した。原病と転移巣の病勢は相関せず(下

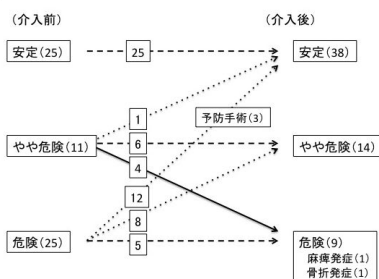


表) コロニーアッセイ評価には領域横断的な臨床側面の総合評価の必要性が明らかと成った。(参照)

表 原発がんの治療反応性と骨転移病巣の

治療反応性(症例数)

原発巣	骨転移病巣
PD (36)	PD (21)
	SD (13)
	PR (1)
	CR (1)
SD (17)	PD (2)
	SD (15)
PR (4)	PD (1)
	SD (3)
CR (4)	PD (1)
	SD (2)
	CR (1)

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15件)

- Munemoto M, Kido A, Sakamoto Y, Inoue K, Yokoi K, Shinohara Y, Tanaka Y. Analysis of trabecular bone microstructure in osteoporotic femoral heads in human patients: in vivo study using multidetector row computed tomography. BMC Musculoskelet Disord. 2016 Jan 12;17:13. doi: 10.1186/s12891-015-0848-z.
- Sakamoto Y, Kido A, Inoue K, Tanaka Y. Gas-Containing Paralabral Ganglion Cyst of the Shoulder. A Case Report JBJS Case Connect, 2015 May 27; 5 (2): e42
- Kira T, Omokawa S, Akahane M, Shimizu T, Nakano K, Nakanishi Y, Onishi T, Kido A, Inagaki Y, Tanaka Y. Effectiveness of Bone Marrow Stromal Cell Sheets in Maintaining Random-Pattern Skin Flaps in an Experimental Animal Model. Plast Reconstr Surg. 2015 Nov;136(5):624e-32e.
- Ueha T, Akahane M, Shimizu T, Uchihara Y, Morita Y, Nitta N, Kido A, Inagaki Y, Kawate K, Tanaka Y. Utility of tricalcium phosphate and osteogenic matrix cell sheet constructs for bone defect reconstruction. World J Stem Cells. 2015 Jun 26;7(5):873-82.
- Uchihara Y, Akahane M, Shimizu T, Ueha T, Morita Y, Nakasaki S, Kura T, Tohma Y, Kido A, Kawate K, Tanaka Y. Osteogenic Matrix Cell Sheets Facilitate Osteogenesis in Irradiated Rat Bone. Biomed Res Int. 2015;2015:629168.
- Sakamoto Y, Kido A, Inoue K, Sakurai G, Hashiuchi T, Munemoto M, Tanaka Y. In vivo microstructural analysis of the humeral greater tuberosity in patients with rotator cuff tears using multidetector row computed tomography. BMC Musculoskelet Disord. 2014 Oct 21;15:351.
- 石田由佳子 城戸 顕 がんのリハビリテーションに必要な知識 5.骨転移のリスク管理 2016年6月 Journal of Clinical Rehabilitation (2016, in press)
- 城戸 顕 転移性脊椎腫瘍の治療戦略 (8) 転移性脊椎腫瘍の治療開始の適切

- なタイミング」関節外科 35, 65-73, 2015
9. 城戸 顕 骨転移のがんのリハビリテーション Journal of Clinical Rehabilitation 24:36-44
 10. 城戸 顕 小山文一 特集 泌尿器科・婦人科・整形外科・大腸外科からみた直腸癌手術に対する究極の骨盤解剖学 整形外科から見た骨盤解剖 安全な仙骨切除のために 手術 69:1249-1258 2015
 11. 城戸 顕ほか奈良県立医科大学附属病院編 cancer board 導入による意義と成果 Cancer board update No.4:1-9 先端医学社 2014
 12. 城戸 顕 がん治療における Bone Management がん治療誘発性骨量減少症 Cancer board update No.4:10 先端医学社 2014
 13. 城戸 顕 整形外科医とがん診療・担がん患者の運動器を守るといふこと。奈良県臨床整形外科医会会報 2014 ; 31 : 21-24
 14. 城戸 顕 筋骨格から見るがん診療・骨転移とがん治療関連骨量減少症(CTIBL) 大阪臨床整形外科医会 40:74-76,2014
 15. 城戸 顕 骨転移 cancer ボード・フォローアップシステムによる骨関連事象(SRE)リスク管理の可能性 骨転移治療戦略とがんのリハビリテーション 日本整形外科学会雑誌 768-774 2015

〔学会発表〕(計 25 件)

1. Kido A Why do I have to treat osteoporosis? A review of fracture mortality. NARA Foot and Ankle Symposium, Nara, Japan (2015)
2. Kido A, Akahane M, Hara R, Shimizu T, Nakano K, Kobata Y, Fujimura T, Shinmyo N, Akai Y, Fujimoto T, Tanaka Y. A patients preference survey for osteoporosis medication on 679 patients: Monthly drug regimen can be the best for the adherence. (Publication) EULAR(The European League Against Rheumatism) Congress 2014, Paris, France.
3. Kido A, Starting hemoglobin value as a possible predicting factor for chemotherapy-induced neutropenia in osteosarcoma patients. (Publication) CTOS (Connective Tissue Oncology Society) 2014 Annual Meeting, Berlin, Germany.
4. Kido A, Yoshida S, Hasegawa M, Sakamoto Y, Munemoto M, Tsukamoto S, Furukawa N, Hiroshi Kobayashi, Kanya Honoki, Tanaka Y. Pelvic insufficiency fracture after radiotherapy for cervical cancer: is routine orthopedic surveillance possible? (示説) 24th International Congress on Anti-Cancer Treatment; 2013; Paris, France.
5. 城戸 顕 骨転移を有するがん患者のリハビリテーション 日本リハビリテーション医学会近畿地方会 第 56 回 専門医・認定臨床医生涯教育研修会 2015. 橿原市 (教育研修講演)
6. 城戸 顕 リウマチ患者に対するオーダメイドリハビリの理想像と実践にあたっての問題点 平成 27 年度リウマチ治療とケア研修会 2015. 奈良市 (教育研修講演)
7. 城戸 顕 「骨太で元気に生き残ろう 骨粗鬆症と脆弱性骨折の少し怖い話」骨と関節の日 市民公開講座 2015 橿原市
8. 城戸 顕 骨転移カンサーボードの取り組み -奈良医大 骨転移 CB 5 年間の運用経験- 第 7 回 JK がんのリハビリフォーラム慶応義塾大学 2015 東京都
9. 城戸 顕 整形外科医とがん診療・担がん患者の運動器を守るといふこと。奈良県臨床整形外科医会; 2013 奈良市
10. 城戸 顕 骨転移カンサーボード・がん診療における整形外科医の役割吉野・五條地区整形外科懇話会 2013 橿原市
11. 城戸 顕 担がん患者の骨マネジメント・骨転移カンサーボードとがん治療関連骨量減少症(CTIBL) 和歌山 Young Oncologist Seminar 2013 和歌山市
12. 城戸 顕、長谷川正俊、岩田栄一郎、重松英樹、朴木寛弥、田中康仁 転移性骨腫瘍のカンサーボード 第 125 回 中部日本整形外科災害外科学会シンポジウム 2「四肢転移性骨腫瘍に対する治療戦略」名古屋市 2015
13. 城戸 顕、片山絵美子、小泉宗久、岩田栄一郎、中村 卓、重松英樹、奥田哲教、本津茂人、浅川勇雄、玉本哲郎、長谷川正俊、青木久美子、四宮敏章、朴木寛弥、田中康仁 転移性骨腫瘍のカンサーボード 第 88 回日本整形外科学会学術総会 シンポジウム 13「転移性骨腫瘍に対する治療戦略」神戸市 2015
14. 城戸 顕、小泉宗久、奥田哲教、岩田栄一郎、重松英樹、倉 知彦、朴木寛弥、田中康仁、長谷川正俊、中村 卓、本津茂人、片山絵美子、浅川勇雄、玉本哲郎、四宮敏章 骨転移カンサーボード・フォローアップシステムによる骨関連事象(SRE)リスク管理の可能性 シンポジウム 1「骨転移治療戦略とがんのリハビリテーション 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2014 大阪市

15. 城戸 顕、石田由佳子、田中優、小林恭代、降矢芳子、北村哲郎、井上良太、堀川博誠、田中康仁 骨転移を有するがん患者における四肢長管骨と脊椎骨に見る骨関連事象(SRE)マネジメント特性に関する検討 第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会 京都市、2016
16. 城戸 顕、石田由佳子、田中優、小林恭代、降矢芳子、北村哲郎、井上良太、堀川博誠、田中康仁 当院における関節リウマチ患者の退院時 Barthel Index(BI)スコアに關与する因子に關する検討第 53 回日本リハビリテーション医学会学術集会 京都市、2016
17. 城戸 顕、下田恵美子、重松英樹、塚本真治、岩田英一朗、藤井宏真、岸真五、森本安彦、増田佳亮、井上和也、浅川勇雄、玉本哲郎、長谷川正俊、朴木寛弥、田中康仁 放射線治療をうける骨転移患者の局所制御評価に關する診療システム上の課題 第 49 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 東京都 2016
18. 森本安彦、岩田栄一朗、重松英樹、小泉宗久、城戸 顕、田中康仁 当院における転移性脊椎腫瘍に対する最小侵襲脊椎安定術の治療経験 第 126 回中部日本整形外科災害外科学会秋季学会 2019 408-9
19. 岩田栄一朗、重松英樹、森本安彦、小泉宗久、城戸 顕、田中康仁 転移性脊椎腫瘍の姑息的後方固定術における手術時間、出血量の危険因子についての検討 第 126 回中部日本整形外科災害外科学会秋季学会 2019 408-9
20. 井上和也、城戸 顕、酒本佳洋、小川宗宏、宗本 充、原 良太、田中康仁 近赤外線蛍光関節鏡によるブタ肩関節内リアルタイム微小血流評価 第 4 1 回日本肩関節学会
21. 朴木寛弥、四宮敏章、城戸 顕、藤井宏真、塚本真治、近藤裕美子、竹下泰史、石原 卓、伊豆原知恵、厚坊 浩史、山崎正晴、吉井由美、神野正敏、片山絵美子、長谷川正俊、田中 康仁 緩和ケア 骨・軟部悪性腫瘍患者の total care management 緩和ケア、地域連携 and beyond 第 48 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2015
22. 城戸 顕、吉田昭三、長谷川正俊、塚本真治、朴木寛弥、小林 浩、田中康仁 子宮頸癌放射線治療後の pelvic insufficiency fractures(PIF)の進展様式と QOL に關する検討 第 87 回日本整形外科学会学術集会 2014 神戸市
23. 酒本佳洋、城戸 顕、井上和也、小川宗宏、宗本 充、原 良太、田中康仁 近赤外線蛍光関節鏡を用いたブタ肩関節内リアルタイム微小血流評価の試み 第 2 9 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 鹿児島市
24. 宗本 充、城戸 顕、小川宗宏、酒本佳洋、井上和也、原 良太、田中康仁 近赤外線蛍光関節鏡を用いたブタ股関節内リアルタイム微小血流評価の試み 第 2 9 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 鹿児島市
25. 小川宗宏、城戸 顕、宗本 充、酒本佳洋、原 良太、井上和也、田中康仁 近赤外線蛍光関節鏡を用いたブタ膝関節可視化蛍光イメージング 第 2 9 回日本整形外科学会基礎学術集会 2014 鹿児島市

6. 研究組織

(1)研究代表者城戸 顕(KIDO, Akira)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70382326

(2)研究分担者

今野元博(IMANO, Motohiro)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号：278681

赤羽学(AKAHANE, Manabu)

奈良県立医科大学・医学部・

准教授 研究者番号：418873

田中康仁(TANAKA, Yasuhito)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30316070

朴木寛弥(HONOKI, Kanya)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号 40336863

五條理志(GOJO, Satoshi)

京都府立医科大学・医学部・教授

研究者番号 90316745

清水隆昌(SHIMIZU, Takamasa)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号 70464667

上羽智之(UEHA, Tomoyuki)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

50572963