

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282120

研究課題名(和文) がん骨転移に伴う骨破壊の抑制を目的とした全身性微振動刺激に関する実験的研究

研究課題名(英文) Effects of whole body vibration on cancer-induced bone destruction

研究代表者

松本 健志 (Matsumoto, Takeshi)

徳島大学・大学院理工学研究部・教授

研究者番号：30249560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：骨アナボリック作用を持つ全身性の微振動刺激(WBV)には、がん骨破壊の抑制効果が期待できるが、血管新生誘導を介した腫瘍の悪性化の懸念もある。本研究では、がん骨破壊におけるWBVの効果および血管新生の関与について検討した。乳がん細胞を脛骨に接種したマウスにWBV(90Hz, 0.3g, 20 min/day)を与え、放射光CTによって骨破壊の進行を観察した。接種後28日には、対照に比較して骨吸収は亢進し、血管新生の促進も認められた。また、骨マーカー測定からも、WBVによる骨吸収亢進が認められた。WBVはがん骨破壊を憎悪する結果となったが、振動条件を変えてWBVの効果を検証することも必要である。

研究成果の概要(英文)：Bone tumor destruction may be interfered by whole body vibration (WBV) because of its bone anabolic action. However, WBV also potentiates angiogenesis, providing a favorable tumor environment. Thus, we investigated the effect of WBV on bone tumor destruction and angiogenesis. Mice with tibial bone inoculation of breast cancer cells were exposed to WBV (90Hz, 0.3g, 20 min/day) and compared with those undergoing no WBV exposure. On day 28 post-inoculation, the tumor region was perfused with a contrast agent and CT-scanned. Lesions of osteolysis and new bone formation increased and decreased, respectively, and the tumor vascularity was enhanced by the WBV exposure, implying the involvement of angiogenesis in the WBV-enhanced tumor malignancy. These results were confirmed by in vivo phase-CT and bone marker analysis. The possibility of anti-bone resorption effect of WBV cannot be completely denied though, because of its dose-dependent efficacy for osteogenesis.

研究分野：生体医工学

キーワード：がん骨破壊 血管新生 微振動刺激 放射光CT

1. 研究開始当初の背景

高齢化によって国内のガン罹患率は年々増加し、2014年に新たにガンと診断される推計罹患数は88万人にのぼった[国立がん対策情報センター]。我が国の死亡原因の第1位で、生涯のうちに男性で2人に1人、女性で3人に1人が罹患すると推測される悪性新生物(ガン)であるが、ガン患者の生存期間は近年の治療技術の進歩によって着実に伸びている。しかしその一方で、ガン骨転移の有病率は増加し、骨破壊に伴う激しい骨痛や病的骨折、高カルシウム血症などの併発によるガン患者のQOL低下が懸念されるようになった。また、骨転移に掛かる治療費は医療費高騰の一因であり、そのリスク管理は喫緊の課題である。

ガン骨転移では、ガン細胞のサイトカインや増殖因子によって骨芽細胞や間質細胞内のRANKL(ligand for receptor activator of nuclear factor)の発現が高まり、破骨細胞の増殖・活性化が促進される。破骨細胞による骨破壊が進行すると、骨基質中のTGF-βなどの腫瘍増殖因子が放出される。その結果、さらにガン細胞が増殖して、悪循環が形成される[Roodman, N Engl J Med 2004]。

全身性の微振動刺激(WBV: Whole-body Vibration)は極めて低強度な機械的刺激ではあるが、RANKL発現を減少させ破骨細胞の活性を抑制する作用が報告されている[Pichler 他, Histol Histopathol 2013]。したがって、WBVにはガン骨転移における悪循環を弱める効果を期待できるが、腫瘍を栄養する血管新生にも関与することから、その作用は単純ではない(図1)。

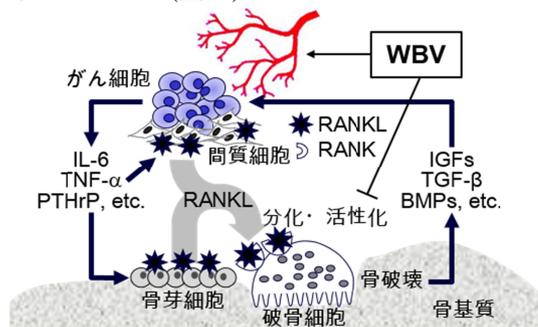


図1 ガンによる骨破壊の悪循環とWBVの関与

2. 研究の目的

本研究では、ガンの骨破壊および腫瘍の悪性化に対するWBVの効果について、骨への生着率が高い乳ガン細胞を脛骨に移植したマウスを対象に、放射光CTに基づく実験的な検討を行なった。

3. 研究の方法

(1) ex vivo 評価

動物モデル BALB/c マウス(♀)の6週齢時に乳ガン細胞(4T1, 1×10^5 個)を右脚脛骨内へ移植した。C2群(n=10)およびW2群(n=9)、C4群(n=14)、W4群(n=13)の4群に無作為に分け、4T1細胞移植3日後から、W2群およびW4

群にWBV刺激(0.3 g, 90 Hz, 20 min/day)を開始した。また、C2群およびC4群は、振動ケージに入れるのみとした。WBV刺激を開始して2週間(W2群, C2群)および4週間(W4群, C4群)、麻酔下で開胸し、安楽死後直ちに左心室よりジルコニア/アガロース造影剤を血管灌流した[Matsumoto 他, Lab Invest 2013]。下肢を冷水に浸漬してアガロースをゲル化させた後に脛骨腫瘍部を採取し、血管造影剤試料を作製した。

放射光サブトラクションCT 抽出試料の構造解析は、SPring-8放射光施設にて、高解像度マイクロCT装置を利用して行った(1800投影/180度, ボクセル分解能 3.95 μm)を行った。ジルコニアのK-吸収端(18 keV)の直上・直下のX線エネルギー(18.1, 17.9 keV)でスキャンし、18.1 keVの血管強調再構成画像から17.9 keVの再構成画像を引き算して血管画像を、さらにこれを利用して骨画像を得た。骨画像はそのミネラル密度に基づいて新生骨(0.5-1.2 g/cm³)と既存骨(>1.2 g/cm³)に分離した(図2)。

骨および血管の微細構造は、画像処理ソフトウェアImageJ/BoneJおよび独自に作成したプログラムを用いて解析した。また解析範囲は、成長板より1 mm末梢側からさらに2 mmまでの領域とし、評価パラメータとして、骨量および、骨近傍300 μm以内の血管体積、血管数、血管径、血管長さ、血管-骨間距離等を算出した。

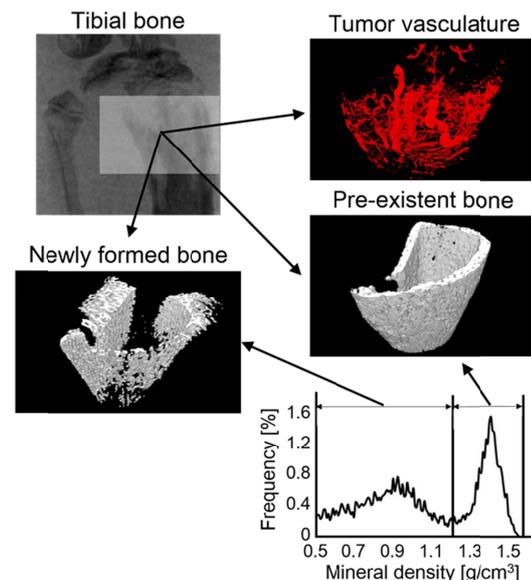


図2 既存骨, 新生骨, 血管の分離

(2) in vivo 評価

動物モデル BALB/c マウス(♀)の7週齢時に4T1細胞(2×10^4 個)を右脚脛骨内へ移植した。C群(n=15)およびW群(n=15)に分け、前者には移植4日後よりWBVを与え(0.3 g, 90 Hz, 20 min/day), C群は振動ケージに入れるのみとした。WBV負荷は3週間行った。

in vivo 放射光位相CT 4T1細胞移植3日後より、1週間ごとに計4回(week 0-3)の計測を行った。光源にはSPring-8の高コヒーレントな

単色放射光を利用し、4T1 移殖部脛骨の形態を *in vivo* 位相 CT によってトラッキングした。被曝の影響を抑えるために、長軸方向のスキャン幅は 2 mm とし、インライン法を用いた。投影像(600 投影/180 度、ピクセル分解能 6.54 μm)を位相回復して再構成し、経時的に得られた脛骨画像は相互情報量を用いてレジストレーションした(図 3)。各個体とも、脛骨成長板より 0.5 mm 抹消側から 1 mm の幅を関心領域として、ミネラル密度 0.5 g/cm^3 以上の骨領域について解析を行った。

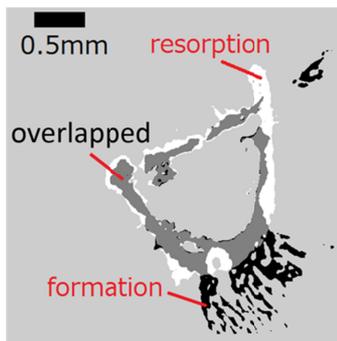


図 3 レジストレーションによる骨吸収、新生骨領域の決定(脛骨横断面)

生化学的評価 計測後、採血して血清分離し、ELISA によって骨形成マーカー(オステオカルシン)、骨吸収マーカー(TRACP-5b)を測定し、WBV の骨代謝への影響を評価した。

4. 研究成果

10 週齢の健常マウスの脛骨骨幹部の表面で計測された歪み変動(100-Hz ローパスフィルタ処理)の一例を図 4 に示す。WBV による歪みは $1\mu\text{e}$ 程度で、骨の変形は殆ど無いことが分かる。

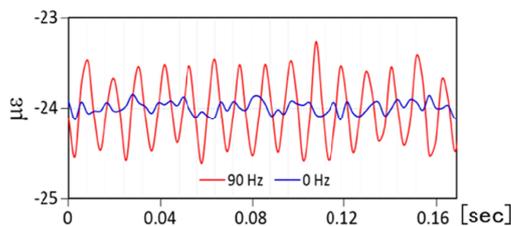


図 4 歪みゲージによる脛骨表面の歪み変動

C2 群および W2 群については、全ての評価パラメータでほとんど違いは見られなかった。C4 群および W4 群についても有意差 ($P < 0.05$) は見られなかったが、W4 群は C4 群に対して、既存骨および新生骨の骨量は減少傾向を示し(図 5)、血管体積および血管径は増加傾向を示した(図 6, 7)。

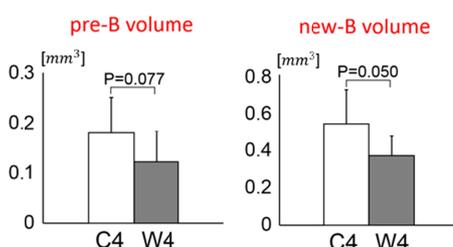


図 5 既存(pre-B)骨量と新生(new-B)骨量

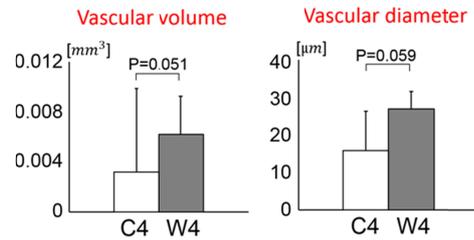


図 6 血管体積量と血管径(既存骨周囲)

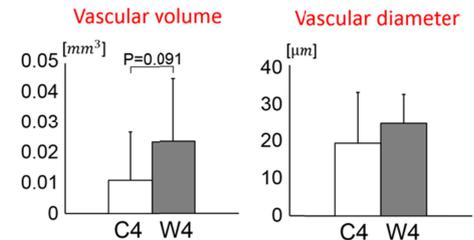


図 7 血管体積量と血管径(新生骨周囲)

in vivo 放射光位相 CT でも同様の結果が得られたが、個体内変化の評価が可能であることから、有意な WBV の作用が検出できた。図 8 には計測開始時の骨量を 1 としたときの全骨量の変化を示す。week2 において、骨体積は C 群よりも W 群で有意に小さく、WBV によって骨量低下が加速されたことが窺われた。また、画像レジストレーションの結果、week1-2 間の骨吸収は W 群で有意に高く、WBV による骨量低下の加速は主に骨吸収の増強によるものであった(図 9, 10)。

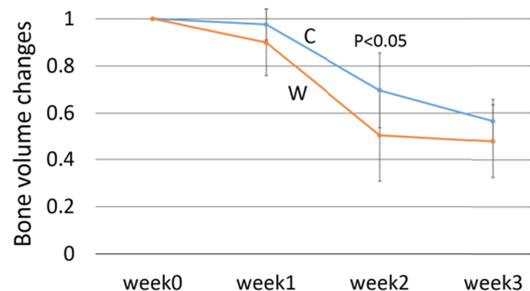


図 8 week0 の骨量を 1 とした時の骨量変化

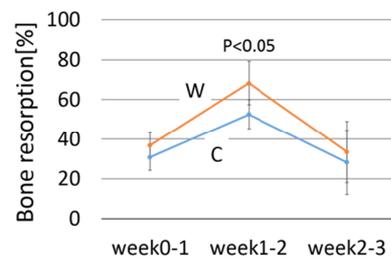


図 9 1 週間の骨吸収量変化(吸収骨量 / 既存骨量)

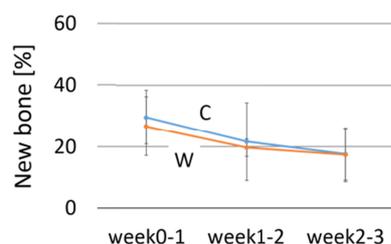


図10 1週間の新生骨量変化(新生骨量/既存骨量)

骨代謝については、C群よりもW群でTRACP-5bは有意に高値を示し(8.3 vs. 7.2 U/L, $p < 0.05$)、オステオカルシンには有意差はなかった(59.8 vs. 56.4 ng/mL)。

WBVは破骨細胞の活性を抑制することが報告されており、この作用は骨破壊を抑えてガンの悪性化サイクルを弱めるように働く。一方、WBVは血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の発現も高めることが報告されている。誘導促進された新生血管はガン細胞が好む生育環境を提供してガン悪性化サイクルを強め、前者の作用に相反する作用をもたらす。図5-10はWBVによる新生骨量の減少と骨吸収骨量の増加を示し、血管新生の誘導がこれに関与していることを示している。また、骨代謝マーカーはWBVによる骨吸収のみの亢進を示しており、新生骨量の減少は、造骨の抑制より寧ろ吸収亢進によるものであった。すなわち、本研究では、WBVの血管新生を介したガン悪性化の作用がその破骨細胞抑制の作用を凌駕した結果、骨破壊が亢進したと考えられる。しかし、WBVの効果は振動数や振幅に大きく依存しており[Pasqualini 他, Bone 2013]、ガン骨破壊および腫瘍の悪性化の抑制に効果的な振動パターンや条件が存在する可能性は否定できない。振動条件の変更、あるいは血管新生阻害剤の併用によって、WBVの抗腫瘍効果の可能性を探ることが必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

T. Matsumoto, D. Goto, Effect of low-intensity whole-body vibration on bone defect repair and associated vascularization in mice, Med. Biol. Eng. Comput., in press, 2017

T. Matsumoto, S. Itamochi, Y. Hashimoto, Effect of Concurrent Use of Whole-Body Vibration and Parathyroid Hormone on Bone Structure and Material Properties of Ovariectomized Mice, Calcif. Tissue Int., vol.98, pp.520-529, 2016

Y. Hashimoto, S. Fukushima, T. Matsumoto, H. Naito, M. Tanaka, Second Harmonic Generation Microscopy and Synchrotron Radiation CT for the Determination of Collagen and Mineral Deposition in Early-Stage Bone Repair: Effect of Whole Body Micro-Vibration, Adv. Biomed. Eng., vol.3, pp.101-105, 2014

[学会発表](計 4 件)

宇治田俊樹, 松本健志, ガン骨破壊に対する全身性微振動刺激の作用について:インピボ位相 CT に基づく検討, JBMS 2016, 2016.9.17, 大雪クリスタルホール国際会議場(北海道旭川市)

T. Matsumoto, S. Itamochi, Effects of Whole

Body Vibration on Breast Cancer Bone Metastasis and Vascularization in Mice, Physiology 2016, 2016.7.29, Dublin, Ireland
板持伸弥, 松本健志, 田中正夫, ガン骨破壊に対する全身性高周波微振動負荷の抑制作用の検討, 日本機械学会関西支部第91期総会・講演会, 2016.3.11, 大阪電気通信大学(大阪府寝屋川市)

T. Matsumoto, S. Itamochi, S. Sato, Bone and Microvascular Imaging by K-edge Subtraction μ CT Using Synchrotron Lights With Zirconia Contrast Medium, 10th World Cong. Microcirc., 2015.9.25, ICC Kyoto, Kyoto

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 健志 (MATSUMOTO, Takeshi)
徳島大学・大学院理工学研究部・教授
研究者番号: 30249560

(2)研究分担者

百武 徹 (HYAKUTAKE, Toru)
横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 20335582

宮崎 浩 (MIYAZAKI, Hiroshi)
藍野大学・医療保健学部・教授
研究者番号: 00263228
(平成26年度まで)

福島 修一郎 (FUKUSHIMA, Shuichiro)
大阪大学・大学院基礎工学研究科・助教
研究者番号: 40362644
(平成27年度まで)

(3)連携研究者

福島 敬 (FUKUSHIMA, Takashi)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・准教授
研究者番号: 30323299

上杉 健太郎 (UESUGI, Kentaro)
高輝度光科学研究センター・放射光研究所・

副主幹研究員
研究者番号: 80344399