

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10960

研究課題名(和文) 原発性骨腫瘍における骨破壊発生機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of bone destruction in primary bone tumors

研究代表者

川島 寛之 (Kawashima, Hiroyuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30361900

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん骨転移病変において、デノスマブ投与後に約7割の症例で骨硬化を認めたことがわかった。硬化を認めた症例においては、認めなかった症例に比べて有意に骨関連事象の発現が少なかった。原発性骨腫瘍においては、骨巨細胞腫のほか、平滑筋肉腫や動脈瘤様骨嚢腫、線維性骨異形成においても、病変の硬化が認められた。さらに、腱鞘巨細胞腫や色素性絨毛結節性滑膜炎、平滑筋肉腫、未分化多形肉腫などの軟部腫瘍においてもRANKL関連分子の発現が高いことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗RANKL抗体薬であるデノスマブは、多くのがん骨転移に対して使用されているが、どのような癌腫に有効性が高いかを示すことができ、有効な症例に対して選択的に投与することが可能になった。また現在保険適応となっていない、原発性骨腫瘍や軟部腫瘍の一部に対する治療効果も期待される結果を示すことができ、将来的な適応拡大への布石となったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It was found that about 70% of patients with cancer bone metastases showed sclerotic change after denosumab administration. Skeletal-related events were significantly less frequent in cases with sclerotic change than in those without. In primary bone tumors, in addition to giant cell tumor of bone, leiomyosarcoma, aneurysmal bone cyst, and fibrous dysplasia also showed sclerotic change of lesions. Furthermore, we found that RANKL-related molecules are highly expressed in soft tissue tumors such as giant cell tumor of tendon sheath, pigmented villonodular synovitis, leiomyosarcoma, and undifferentiated pleomorphic sarcoma.

研究分野：骨・軟部腫瘍

キーワード：RANKL デノスマブ 骨腫瘍 軟部腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

骨腫瘍においては、原発性が転移性かの如何にかかわらず、その多くが溶骨性病変の形成により骨破壊をきたし、痛み、病的骨折、脊髄圧迫による麻痺症状などの様々な骨関連事象を引き起こす。特に転移性骨腫瘍においては、骨内に浸潤したがん細胞はPTHrP (parathyroid hormone-related protein) や IL-6 などのサイトカインを産生し、間葉系の間質細胞等を刺激して RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand: RANK リガンド) の産生を促進する。RANKL は破骨細胞の形成、機能、および生存を司る必須の因子であり、破骨細胞および破骨細胞前駆細胞に発現する RANKL 受容体 (RANK) に結合し、破骨細胞による骨吸収を促進することで骨破壊を誘導する。さらに骨吸収の際に骨基質内に貯蔵されている PDGF (platelet-derived growth factor), TGF- β (transforming growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) などの腫瘍の増殖、悪性化、あるいは生存を促す因子が分泌される。以上より、転移性骨腫瘍においては、がんによる破骨細胞の誘導・活性化、骨吸収、がん増殖因子の遊離、がんの増殖、破骨細胞による骨吸収というサイクルが形成され、がん細胞はさらに自己増強を起こすという悪循環が引き起こされることが報告されている。これらの結果を踏まえて、破骨細胞阻害薬/骨修飾薬である抗 RANKL 抗体が転移性骨腫瘍に対する治療薬として臨床応用されているが、その骨破壊抑制効果・骨転移治療効果は必ずしも十分ではない。一方で、原発性骨腫瘍は多くが小児や AYA 世代 (若年成人) に好発し、転移性骨腫瘍同様に溶骨性病変を形成することにより、時に病的骨折を誘発し、スポーツ障害、骨成長障害の原因となり QOL を低下させる。破骨細胞様の形態を示す多核巨細胞の存在が組織学的な特徴である骨巨細胞腫に対しては、2014 年に抗 RANKL 抗体が治療薬として承認され、臨床的に効果が確認されつつある。転移性骨腫瘍と異なり、骨巨細胞腫では単核の腫瘍細胞自身が RANKL を産生し、破骨細胞様多核巨細胞を活性化し、骨破壊を進行させているという報告があるが、骨巨細胞腫のほか骨肉腫や軟骨芽細胞腫、線維性骨異形成などの原発性骨腫瘍においても同様な形態を示す多核巨細胞の存在が確認されているが、その役割は分かっていない。さらに、この多核巨細胞が通常存在しないとされる他の原発性骨腫瘍の多くも、同様に溶骨性病変を形成し、骨破壊を起こすが、そのメカニズムは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに保存してきた多数の原発性骨腫瘍症例のパラフィン包埋組織標本や新鮮凍結検体を使用し、骨破壊発生に関与すると考えられる RANKL/RANK 関連分子の発現について分子生物学的手法を用いて蛋白レベルと RNA レベルで検討する。また、組織学的に原発性骨腫瘍組織における破骨細胞もしくは破骨細胞様の多核巨細胞の存在と RANKL 発現細胞の有無とその同定を目指す。さらに *in vitro* 実験系での検討として、原発性骨腫瘍の培養細胞株を用いて、サイトカインの添加や破骨細胞、骨髄細胞との共培養系などの実験手法により、RANKL/RANK 関連分子の発現機序を解明する。RANKL 発現が高く、骨破壊の形成に RANKL の関与が強いと考えられる組織型が明らかになることで、臨床への橋渡し研究として、骨修飾薬である「抗 RANKL 抗体による原発性骨腫瘍治療」という臨床応用にも期待できる。

以上より、本研究の目的は、これまで未知であった原発性骨腫瘍における骨破壊の発生に対する RANKL の関与を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 原発性骨腫瘍組織の凍結検体を用いた解析

倫理的な配慮のもと、生検体として新鮮凍結組織を 10 年以上にわたり保存しており、これらの組織からタンパクや RNA を抽出することにより RANKL/RANK の発現はもとより、がん骨転移組織において、その上流シグナルであるとされている IL-6, PTHrP などのサイトカインの発現や AKT, MAPK, STAT などの細胞内シグナル伝達分子の発現とそのリン酸化 (活性化) の有無などについても、それぞれに特異的な抗体を用いたウェスタンブロット法や定量的 RT-PCR 法により検討する。

(2) 原発性骨腫瘍組織のパラフィン包埋標本を用いた解析

我々の施設においては、膨大な量の臨床検体をパラフィン包埋標本として保存しており、これまでも多数の研究に使用し、十分な症例数が確保による、エビデンスレベルの高い研究を行ってきた。そこで、これらを使用することで、RANKL 関連タンパクの発現を免疫組織化学染色法により調べる。さらに独自の手法で Tissue Microarray を作成することによる組織学的な研究手法も確立しているため、一度に多数の検体を網羅的に調べることができ、作業時間の短縮にもなる。本解析により腫瘍組織内で RANKL 関連タンパクを発現している組織型を抽出するとともに、破骨細胞、骨芽細胞、軟骨細胞などのマーカーとなる TRAP や ALP, SOX-9 などの染色とも比較することにより、腫瘍組織内のどのような性質を有する細胞が RANKL 関連タンパクを発現しているのか同定する。

4. 研究成果

まず初めに、溶骨性病変や骨破壊を呈している原発性および転移性骨腫瘍に対して抗 RANKL 抗体であるデノスマブを投与した症例について、臨床的に検討した。転移性骨腫瘍においては、原発巣別にデノスマブ投与後の骨硬化の出現について検討し、約 7 割の症例で骨硬化を認めたことがわかった。硬化を認めた症例においては、効果を認めなかった症例に比べて有意に骨関連事

象の発現が少なかった。特に肺癌では、骨硬化の認められた症例において有意に骨関連事象の発生が少ないことがわかり、小細胞肺癌、EGFR 遺伝変異、ALK 融合遺伝子陽性肺癌では、全例で骨硬化が認められた。原発性骨腫瘍においては、デノスマブが治療薬として保険適応となっている骨巨細胞腫のほか、腫瘍組織内に破骨細胞様の多核巨細胞を伴う平滑筋肉腫においても、骨病変の硬化が認められることがわかった。また、同様に破骨細胞様の多核巨細胞を伴う動脈瘤様骨嚢腫や線維性骨異形成の組織における RANKL の発現を定量的 RT-PCR 法で検討し、いずれも乳癌骨転移組織に比べ高い発現を認め、骨巨細胞腫の組織と同等レベルの発現を認めることを見出した。

次に、以上の所見と同様の研究手法を用いて軟部腫瘍における RANKL、および関連分子(RANK, osteoprotegerin: OPG)の発現についても蛋白レベルと RNA レベルで検討した。すると腱鞘巨細胞腫や色素性絨毛結節性滑膜炎、平滑筋肉腫、未分化多形肉腫などの一部の軟部腫瘍においても RANKL 関連分子の発現が高いことが見出された。さらに平滑筋肉腫での骨病変を伴う臨床例において、デノスマブを投与したところ、著明な骨硬化が確認でき、デノスマブによる効果であることが推測された。一方で、悪性腫瘍に対する殺細胞性抗がん剤治療により骨髄抑制が生じる機序として、骨髄の線維化について報告した。この中では、化学療法により線維化した骨髄において、骨代謝回転は抑制されていると考えられるが、RANKL の発現はなく、破骨細胞の存在も証明されなかった。

以上についてはそれぞれ、論文や学会で発表、報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Sasaki Taro, Kawashima Hiroyuki, Ariizumi Takashi, Yamagishi Tetsuro, Oike Naoki, Umezu Hajime, Inagawa Shyoichi, Hotta Tetsuo, Endo Naoto, Ogose Akira	4. 巻 2017
2. 論文標題 Denosumab as a potential therapeutic option for leiomyosarcoma with osteoclast-like giant cells: A case report	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecular and Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 30-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2017.1489	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Tetsuro, Kawashima Hiroyuki, Ogose Akira, Ariizumi Takashi, Oike Naoki, Sasaki Taro, Hatano Hiroshi, Ohashi Riuko, Umezu Hajime, Ajioka Yoichi, Endo Naoto	4. 巻 248
2. 論文標題 Expression Profiling of Receptor-Activator of Nuclear Factor-Kappa B Ligand in Soft Tissue Tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 87～97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.248.87	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inagawa Yuta, Komeno Yukiko, Saito Satoshi, Maenohara Yuji, Yamagishi Tetsuro, Kawashima Hiroyuki, Saito Taku, Abe Keiko, Iihara Kuniko, Hatada Yasumasa, Ryu Tomiko	4. 巻 2019
2. 論文標題 Prolonged Myelosuppression due to Progressive Bone Marrow Fibrosis in a Patient with Acute Promyelocytic Leukemia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Case Reports in Hematology	6. 最初と最後の頁 1～7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2019/1616237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大池直樹、川島寛之、生越章、堀田哲夫、有泉高志、畠野宏史、山岸哲郎、遠藤直人
2. 発表標題 巨細胞腫における免疫担当細胞の浸潤状況
3. 学会等名 第91回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 有泉高志、川島寛之、山岸哲郎、大池直樹、堀田哲夫、遠藤直人、生越章、畠野宏史、佐々木太郎
2. 発表標題 転移性骨腫瘍例における原発巣別デノスマブの効果
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 湊圭太郎、平野徹、渡辺慶、大橋正幸、川島寛之、有泉高志、山岸哲郎、遠藤直人、生越章
2. 発表標題 デノスマブ投与後に脊椎全摘術を施行した腰椎骨巨細胞腫の1例
3. 学会等名 第113回東北整形災害外科学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	有泉 高志 (Ariizumi Takashi) (50571915)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	