

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09640

研究課題名(和文) 転移性骨腫瘍に対するアクリジンオレンジ血管内投与の効果の検討

研究課題名(英文) Effects of intravascular administration of acridine orange and bisphosphonate in a local bone metastasis of breast cancer model

研究代表者

土江 博幸 (Tsuchie, Hiroyuki)

秋田大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80513019

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は癌の骨転移に対するAcridine Orange(AO)の血管内投与およびZoledronates(ZOL)との併用効果を明らかにすることである。マウス局所骨転移モデルを用いて、薬剤介入の有無で分けた5群において、大腿骨骨破壊率と腫瘍重量、体積、組織学的検討としてTUNEL染色で評価した。結果として乳癌局所骨転移モデルにおいて、AOは局所腫瘍の縮小効果を示し、ZOLは骨破壊を抑制した。癌の骨転移において、AOとZOLの併用療法はその作用機序の違いからより高い効果が得られる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

転移性骨腫瘍はADLを大きく低下させ、進行を予防するために骨吸収抑制剤を一般に用いるが、完全に進行を抑えることは難しい。AOはこれまで骨肉腫などに対する抗腫瘍効果が報告されていたが、がん患者に対する報告はほとんどされておらず、転移性骨腫瘍に対する効果もまた検討されていない。転移性骨腫瘍に対する新規治療薬としてAOが有効である可能性、さらにはZOLとの併用効果を検討することで、がん患者のADL低下予防、進行予防となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated the effect of hematogenous administration of acridine orange (AO) alone and in combination with zoledronate (ZOL) on bone metastases. E0771 cells were injected directly into the right femur of female mice. The mice were divided into five groups according to treatment and were reared and sacrificed after six weeks. At four weeks, the bone destruction rate was lower in the AO+ZOL group than in the radiation group. At six weeks, the AO+ZOL group had a lower bone destruction rate than the control and radiation groups; the ZOL group had a lower rate than the radiation group. The AO and AO+ZOL groups had suppressed tumor weight and volume compared to the control and radiation groups. The number of extraosseous apoptotic cells was higher in the AO+ZOL group than in all other groups except the AO group. In a model of local bone metastasis of breast cancer, hematogenous administration of AO reduced tumor size and more so when combined with ZOL.

研究分野：整形外科 がん治療

キーワード：転移性骨腫瘍 アクリジンオレンジ ビスホスホネート

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの骨転移はADLを大きく低下させ、進行を予防するために骨吸収抑制剤を一般に用いるが、完全に進行を抑えることは難しい。AOは弱塩基性の蛍光色素であり、酸性物質に親和性をもつ特徴を有し、光エネルギーや放射線などを加えると、細胞をアポトーシスに導く作用を持つ試薬である。AOはがんの特異的な親和性を有していることが判っており、血管内投与された骨肉腫モデルマウスの肺転移を抑制することが報告されている。AOを血管内投与することで、転移病変を縮小させる効果が期待できるが、骨転移に対する効果はまだ検討されていない。さらに、骨吸収抑制剤との併用効果に関しては、全く調べられていなかった

2. 研究の目的

がんに対するAOの効果を検討し、さらに骨吸収抑制剤との併用効果を検討することで、がん患者に対する新規治療薬としての可能性を検討し、がん患者のADL低下予防、進行予防となる可能性を模索すること。

3. 研究の方法

マウスの脛骨に直接乳癌細胞を注射することで骨転移モデルを作成し、これらのマウスに対してAOとZOLを投与する。具体的にはコントロール群、放射線単独群、AO投与+放射線群、ZOL投与群、AO投与+ZOL投与+放射線群の5群を用意し、それぞれ6週間飼育する。経時的な μ CTでの腫瘍サイズの評価と骨腫瘍周囲での組織染色・免疫染色での評価、 μ CTでの骨形態計測を主な評価項目とした

4. 研究成果

予備実験としてマウスの大腿骨に乳がん細胞株(E0771)を注入する、局所骨転移モデルを新規に確立し、ZOLを用いてその有用性を検討した。具体的にはC57BL6/Nマウスの膝蓋骨を脱臼させ、大腿骨への注射目標濃度である 1.0×10^5 個/ 10μ Lの細胞数を注射し、約3週間の飼育で骨破壊モデルを作成することができた。安定した局所骨転移モデルの作成が可能となり、ZOLの効果も認めため、本実験に用いるモデルとして有用なものであると考えた。予備実験で作成したマウスを前述した5群に分けて、介入を行い、6週間飼育した。腫瘍細胞注射後4週目の μ CTでAO+ZOL群は放射線照射群に比べて骨破壊率有意に低下していた($p < 0.05$)。6週では、AO+ZOL群はCon群および放射線照射群に比べて、ZOL群は放射線照射群に比べて、破壊率有意に低下していた($p < 0.05$)。腫瘍重量および体積は、AO群およびAO+ZOL群では、Con群および放射線照射群に比べて有意に抑制された($p < 0.05$)。TUNEL染色ではAO+ZOL群において、骨外アポトーシス細胞数がAO群以外の3群よりも有意に増加していた。結論として、乳癌局所骨転移モデルにおいて、AOは局所腫瘍の縮小効果を示し、ZOLは骨破壊を抑制した。癌の骨転移において、AOとZOLの併用療法はその作用機序の違いからより高い効果が得られる可能性があると考えられた。

Table1 Summary of the five-group comparison

	Con	ZO	AO	Rad	AO+ZO
Tumor weight (g)	6.1 \pm 1.5	7.0 \pm 2.0	2.9 \pm 1.0 ^a	5.5 \pm 2.0	4.4 \pm 2.1 ^b
Tumor volume (mm ³)	2982 \pm 1647	2899 \pm 1312	1728 \pm 1189 ^c	4208 \pm 1794	1970 \pm 1713 ^c
Bone destruction rate					
3 weeks (%)	3.0 \pm 3.2	6.7 \pm 6.2	2.9 \pm 3.0	7.0 \pm 5.7	2.0 \pm 2.9
4 weeks (%)	12.9 \pm 6.4	11.7 \pm 8.4	10.0 \pm 4.4	15.5 \pm 7.5	6.8 \pm 3.8 ^c

6 weeks (%)		26.6 ± 9.4	16.4 ± 11.0 ^c	21.0 ± 7.7	28.6 ± 7.8	13.6 ± 7.3 ^d
Cortical Volume (mm ³)	Bone	0.46 ± 0.34	0.69 ± 0.41 ^e	0.30 ± 0.19	0.37 ± 0.23	0.80 ± 0.58 ^e
Cortical Surface (mm ²)	Bone	5.9 ± 4.5	8.4 ± 2.6 ^e	4.9 ± 2.3	5.6 ± 2.8	10.2 ± 3.2 ^e
Number of apoptosis cells						
Inside of bone (number)		68.7 ± 44.6	111.5 ± 40.8	89.8 ± 73.5	76.2 ± 33.1	148.6 ± 87.1
Outside of bone (number)		39.7 ± 16.3	26.3 ± 19.8	105.3 ± 69.9 ^b	29.4 ± 12.5	144.7 ± 91.8 ^a

Con : Control, Z0 : Zoledronates, A0 : Acridine orange, Rad : Radiation, A0+Z0 : Acridine orange and Zoledronates

^aP<0.05(One-way ANOVA) vs. Con, Z0, Rad groups.

^bP<0.05(One-way ANOVA) vs. Z0 group.

^cP<0.05(One-way ANOVA) vs. Rad group.

^dP<0.05(One-way ANOVA) vs. Con, Rad group.

^eP<0.05(One-way ANOVA) vs. Con, A0, Rad groups.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Shoji, Hiroyuki Tsuchie, Hiroyuki Nagasawa, Michio Hongo, Yuji Kasukawa, Daisuke Kudo, Naohisa Miyakoshi	4. 巻 36
2. 論文標題 Development of New Mouse Breast Cancer Model of Local Bone Metastasis and Verification Using Bisphosphonates.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 667-671
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12751.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 東海林亮
2. 発表標題 新しい乳癌局所骨転移モデルの作成
3. 学会等名 第42回東北骨代謝・骨粗鬆症研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryo Shoji, Hiroyuki Tsuchie, Yuji Kasukawa, Naohisa Miyakoshi
2. 発表標題 Effects of intravascular administration of acridine orange and bisphosphonate on local bone metastasis model of breast cancer
3. 学会等名 American Society Bone and Mineral Research Annual Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海林諒、土江博幸、永澤博幸、粕川雄司、宮腰尚久
2. 発表標題 新しい局所骨転移モデルマウスに対するゾレドロン酸の効果
3. 学会等名 第41回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海林諒、土江博幸、粕川雄司、宮腰尚久
2. 発表標題 乳癌局所骨転移モデルに対するAcridine orange血管内投与とBisphosphonateの効果
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 東海林諒、土江博幸、粕川雄司、宮腰尚久
2. 発表標題 乳癌局所骨転移モデルに対するAcridine orange血管内投与とBisphosphonateの効果
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2021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	永澤 博幸 (Nagasawa Hiroyuki) (50375284)	秋田大学・医学部附属病院・助教 (11401)	
研究 分担者	宮腰 尚久 (Miyakoshi Naohisa) (90302273)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------