

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～ 2010

課題番号：20591749

研究課題名 (和文) 性ホルモンによる新規骨肉腫治療法の検討

研究課題名 (英文) Novel therapeutic strategy for osteosarcoma using sex hormones

研究代表者

河野 博隆 (KAWANO HIROTAKA)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20345218

研究成果の概要 (和文)：

骨肉腫の治療成績は 1980 年代以降大きな前進が見られていない。我々は①選択的エストロゲン受容体調節薬であるラロキシフェンが骨肉腫細胞株に対して抗腫瘍効果があること、②骨肉腫細胞をマウスに移植した実験系で、メスマウスがオスならびに卵巣除去マウスに比べて有意に生存率が高いことを明らかにした。本研究により、女性ホルモンが骨肉腫の進展を抑制する可能性が示され、骨肉腫に対する新規治療法の候補となりうると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Therapeutic strategy for osteosarcoma has grown stagnant since 1980's. In this study, we showed the anti-tumor effect of Laroxifen (SERM: selective estrogen receptor modulator) on osteosarcoma *in vitro*. Moreover, in a murine sarcoma metastases model using osteosarcoma cell line LMS, female mice lived significantly longer than male mice and ovariectomized female mice. These observations indicated that female sex hormones might be candidates as new therapeutic strategy for osteosarcoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：骨肉腫、性ホルモン、治療

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は骨原発悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い悪性腫瘍である。1970 年代以降の多剤併用による全身化学療法への導入と画像診断技術の発達により、その治療成績は飛躍的に向上し、5 年生存率は 70 年代の 10% 台から

80 年代には 60% 以上にまで高まった。しかしながら、この 10 年間は他の腫瘍領域と同様に様々な基礎研究、臨床研究が行われているにも関わらず、治療成績の向上に繋がる革新的な治療法の進歩はないのが現状である。集学的治療を行った後に切除不能な局所再発を生

じた症例や多発転移を生じた症例に対しては、延命効果を期待できるような抗腫瘍効果を持つ補助療法の選択肢が存在しない。悪性腫瘍の治療法として期待され、他の癌領域では一定の成果を上げている分子標的薬も、骨軟部腫瘍領域では明らかな治療効果は報告されておらず、治療成績の向上のためには、これまではない新たな展開が期待されている。

骨肉腫は「腫瘍細胞が直接、骨基質・類骨を産生する肉腫」と定義される。「骨基質・類骨を産生する」性質を持つ骨肉腫の腫瘍細胞は、同様の性質を持つ骨芽細胞に類する特徴を数多く有していることが知られている。近年の骨代謝研究の発展によって、骨芽細胞を含む全身の骨組織は、複雑な骨代謝調節機構により厳密にコントロールされていることが明らかになってきている。新規の骨代謝制御因子の解明が進む中で、性ホルモンは依然として骨代謝を制御する最重要因子の一つと考えられている。閉経後骨粗鬆症が大きな社会的問題になっているように、エストロゲン欠乏状態では骨量が大幅に減少することが知られている。一方、男性でも性腺機能低下によるアンドロゲンの欠乏で骨量が減少することが示唆されていたが、我々は、性ホルモン受容体遺伝子欠損マウスの解析によって、エストロゲンのみならずアンドロゲン自身にもエストロゲンとは独立した強力な骨代謝作用があることを明らかにした (Kawano H, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(16):9416, 2003)。性ホルモンの持つ骨量維持作用を活用して、性ホルモン自体を骨粗鬆症に対する治療薬として用いられている一方で、選択的エストロゲン受容体モジュレーター (SERM) が開発され、すでに骨粗鬆症の治療薬として臨床応用されている。

性ホルモンの標的組織である乳腺あるいは性腺から生じた乳癌、子宮癌、前立腺癌など

では、その分化程度や性ホルモン受容体の発現程度に応じて、ホルモン応答性を利用した治療法が導入され実用化されている。前立腺癌における LH-RH アゴニストを用いた抗アンドロゲン療法や乳癌に対する LH-RH アゴニストやアロマターゼ阻害剤を用いた抗エストロゲン療法は、「癌」そのものに対する根治的な治療効果は持たないにもかかわらず、腫瘍進展を抑制することで明らかに生命予後が延長するという成果が挙がっており、既に世界的な標準補助療法として確立している。これに対して、骨組織も性ホルモンの標的組織であるにもかかわらず、骨組織の特性を持つ骨肉腫を「骨組織」という観点からホルモン応答性を検討し、腫瘍の進展を制御しようとする試みはほとんどなされていない。

骨肉腫は男性に多く女性では少ないという発生頻度の性差があること、そして女性症例の生命予後が良いことが示唆されている (*J Clin Oncol* 20:776, 2002; *Cancer* 68:733, 1991)。この差は当科を受診した骨肉腫症例 257 例 (1961 年～2005 年) でも男性 151 例に対して女性 106 例と有意であり、また発生頻度の差は二次性徴以降に拡大していた (投稿準備中)。米国の統計 (National Cancer Institute: Surveillance Epidemiology and End Results) でも女性で生命予後がよいことが示唆されている。

しかしながら、性ホルモンとの関連から男女間における発生頻度の差および予後の差を検討し、メカニズムに言及した研究は皆無である。骨肉腫の性ホルモン応答性に着目した本研究の対象は、大きな可能性を秘めた未開拓の領域といえる。

2. 研究の目的

本研究は骨肉腫の持つ「骨組織」の特性に着目し、性ホルモンに対する応答性を基礎的に

検討することで、性ホルモンによる腫瘍進展制御という新規治療法の基盤を確立することを目的としている。

3. 研究の方法

1) 細胞培養系における骨肉腫由来細胞の性ホルモン反応性の検討

エストロゲン受容体を発現しているヒト骨肉腫細胞 MG63 ならびにマウス骨肉腫細胞株 LM8 を用いて実験を行った。性ホルモンはアンドロゲンとして 5 α -DHT、エストロゲンとして 17 β -estradiol、SERM としてラロキシフェンを使用した。化学療法剤としてシスプラチン、ドキソルビシン、メソトレキサートならびに 4OH イフォスファミドを用いた。培養細胞に各種濃度の性ホルモンを作用させて以下の項目について検討した。①腫瘍増殖能、②組織侵入能、③転移に重要であるとされている VEGF・MMP13 の発現、④浮遊細胞実験系におけるアポトーシス誘導能、⑤分化誘導能、⑥化学療法剤の増感作用。

2) 生体内における骨肉腫の性ホルモン反応性の検討

C3H マウスの皮下に腫瘍細胞を移植し、局所で腫瘍を形成し肺転移を起こす実験系を用いて、生存率に対する性差の影響を解析した。

4. 研究成果

1) 細胞培養系における骨肉腫由来細胞の性ホルモン反応性の検討

5 α -DHT を除くすべての性ホルモンが以下の効果を持つことが確認された。①細胞増殖抑制効果、②VEGF・MMP13 発現抑制、③浮遊細胞実験系におけるアポトーシスの誘導効果、④分化誘導能、⑤シスプラチンならびに 4OH イフォスファミドに対する増感効果。また、5 α -DHT は MMP を介して組織侵入を亢進した。以上のことから in vitro の実験系において

ラロキシフェンの骨肉腫治療効果が確認された。

2) 生体内における骨肉腫の性ホルモンへの反応性の検討

C3H マウスへの LM8 移植実験系ではメスマウスがオスならびに卵巣除去マウスに比べて有意に生存率が高いことが明らかになった。今後、本実験系を用いて治療実験を行う予定である。

本研究により、女性ホルモンが骨肉腫の進展を抑制する可能性が示され、骨肉腫に対する新規治療法の候補として、さらに実験を進めていく予定である。

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 19 件)

1. Taketomi S, Kawano H (他 9 名、9 番目): Anatomical placement of double femoral tunnels in anterior cruciate ligament reconstruction: anteromedial tunnel first or posterolateral tunnel first? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2010 Sep 3. [Epub ahead of print] (査読有)
2. Akiyama T, Kawano H (他 4 名、4 番目): Systemic RANK-Fc protein therapy is efficacious against primary osteosarcoma growth in a murine model via activity against osteoclasts. *J Pharm Pharmacol.* 2010 Apr;62(4):470-6. (査読有)
3. Akiyama T, Kawano H (他 3 名、4 番目): PEDF regulates osteoclasts via osteoprotegerin and RANKL. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 1;391(1):789-94. (査読有)
4. Shinoda Y (他 9 名、1 番目): Mechanisms

- underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem*. 2010 Mar 1;109(4):755-63. (査読有)
5. Nishino J, Kadono Y (他 5 名、3 番目): The usefulness of neutrophil CD64 expression in the diagnosis of local infection in patients with rheumatoid arthritis in daily practice. *J Orthop Sci*. 2010 Jul;15(4):547-52. (査読有)
6. Nagase Y, Kadono Y (他 11 名、5 番目): Antiapoptotic molecule Bcl-2 is essential for the anabolic activity of parathyroid hormone in bone. *Ann N Y Acad Sci*. 2010 Mar;1192(1):330-7. (査読有)
7. Kadono Y (他 6 名、1 番目): Statistics for orthopedic surgery 2006-2007: data from the Japanese Diagnosis Procedure Combination database. *J Orthop Sci*. 2010 Mar;15(2):162-70. (査読有)
8. Yasui T, Kadono Y (他 5 名、3 番目): Impact of biologics on the prevalence of orthopedic surgery in the National Database of Rheumatic Diseases in Japan. *Mod Rheumatol*. 2010 Jun;20(3):233-7. (査読有)
9. Morioka K, Kawano H (他 14 名、6 番目): Orphan receptor tyrosine kinase ROR2 as a potential therapeutic target for osteosarcoma. *Cancer Sci*. 2009 Jul;100(7):1227-33. (査読有)
10. Kadono Y (他 7 名、1 番目): Rheumatoid arthritis associated with osteopetrosis. *Mod Rheumatol*. 2009;19(6):687-90. (査読有)
11. Kobayashi T, Kadono Y (他 7 名、11 番目): TRAF6 is required for generation of the B-1a B cell compartment as well as T cell-dependent and -independent humoral immune responses. *PLoS One*. 2009;4(3):e4736. (査読有)
12. Goto T, Kawano H, Shinoda Y, Kobayashi H, Okuma T (他 2 名、2, 4, 5, 6 番目): Serum acid phosphatase can be a useful tumour marker for giant cell tumour of bone. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2009 Dec;129(12):1641-4. (査読有)
13. Nakagawa T, Kawano H (他 7 名、7 番目): Intraoperative 3-dimensional imaging-based navigation-assisted anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction. *Arthroscopy*. 2008 Oct;24(10):1161-7. (査読有)
14. Akiyama T, Shinoda Y, Kawano H (他 5 名、5 番目、最後): Juxtacortical chondroma of the sacrum. *J Orthop Sci*. 2008 Sep;13(5):476-80. (査読有)
15. Miura T, Kawano H (他 4 名、5 番目): Early functional improvement after a modified ligament reconstruction tendon interposition arthroplasty for thumb basal joint arthritis. *Hand Surg*. 2008;13(3):153-8. (査読有)
16. Okuma-Yoshioka C, Kadono Y (他 6 名 2 番目): Tumor necrosis factor-alpha inhibits chondrogenic differentiation of synovial fibroblasts through p38 mitogen activating protein kinase pathways. *Mod Rheumatol*. 2008;18(4):366-78. (査読有)
17. Shinoda Y (他 16 名、1 番目): Kruppel-like factor 5 causes cartilage degradation through transactivation of matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem*.

2008 Sep 5;283(36):24682-9. (査読有)

18. Kawasaki Y, Shinoda Y (他 16 名 8 番目)
Phosphorylation of GSK-3beta by
cGMP-dependent protein kinase II
promotes hypertrophic differentiation
of murine chondrocytes. *J Clin Invest.*
2008 Jul;118(7):2506-15. (査読有)
19. Goto T, Okuma T, Kobayashi H (他 2 名、
3, 4 番目): Mirror-image solitary bone
cyst of the humerus in a pair of
mirror-image monozygotic twins. *Arch
Orthop Trauma Surg.* 2008
Dec;128(12):1403-6. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

1. Shinoda Y, Kobayashi H, Okuma T, Kawano
H: A Case of Recurrent Epithelioid
Hemangioma Around The Inguinal Region:
Successful Treatment with Tranilast And
Indometacin. 7th Asia Pacific
Musculosteletal Tumor Society Meeting.
2008. 9.26-28 (Beijing, China).
2. Kawano H, Shinoda Y, Okuma T:
Radio-frequency ablation as a local
control modality for residual soft part
sarcoma after multidisciplinary therapy.
7th Asia Pacific Musculosteletal Tumor
Society Meeting. 2008. 9.26-28 (Beijing,
China).
3. Kawano H, Akiyama T, Shinoda Y, Okuma
T, Kobayashi H: Tranilast,
N-(3,4-dimethoxycinnamoyl) suppresses
the progression of desmoid tumor. -*In
vitro* analysis and interim report of our
clinical trial-8th Asia Pacific
Musculosteletal Tumor Society Meeting.
2010.2.24-27 (Cebu, Philippines).

4. Okuma T, Shinoda Y, Akiyama T, Kawano
H: Clinical outcome of 6 cases with
tumor induced osteomalacia diagnosed by
venous sampling for fibroblast growth
factor (FGF) 23. -8th Asia Pacific
Musculosteletal Tumor Society Meeting.
2010.2.24-27 (Cebu, Philippines).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 博隆 (KAWANO HIROTAKA)
東京大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 20345218

(2) 研究分担者

門野 夕峰 (KADONO YUHO)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 70401065

篠田 裕介 (SHINODA YUSUKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 80456110
(H20→H21)

小林 寛 (KOBAYASHI HIROSHI)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 20407951
(H20)

大隈 知威 (OKUMA TOMOTAKE)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 90534909
(H21→H22)

(3) 連携研究者

特になし