

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592178

研究課題名(和文) RANKシグナル制御による新規骨肉腫治療法の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic strategy of osteosarcoma by regulation of RANK signal pathway

研究代表者

河野 博隆 (Kawano, Hirotaka)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20345218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫の治療成績にはこの10年間大きな向上がなく、新たな治療法の展開が求められている。近年、破骨細胞分化誘導因子RANKLが腫瘍細胞に直接作用して腫瘍の増殖・転移を促進することが報告されたため、RANKLを標的とした新規治療の妥当性・有効性に関する解析を行った。

骨肉腫の進展におけるRANKシグナル制御効果の検討では、RANKのRANKL結合領域とヒトIgGのFc鎖からなる融合タンパクであるRANK-Fcがin vitroの実験系において、破骨細胞の分化・生存・骨吸収能の抑制効果を持つこと、骨肉腫細胞株の細胞増殖、接着依存性、局所侵入能に関与していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：There has been no significant improvement in the clinical outcome of osteosarcoma and novel therapeutic strategy is required. We have focused on osteoclast differentiation factor RANKL which was reported to act directly on tumor cells and to promote proliferation and migration. In vitro analysis, it was revealed that RANK-Fc, fusion protein consisting of the Fc chain of human IgG and RANK binding region of RANKL, had suppressive effect on differentiation, and survival and bone resorption activity of osteoclast. It was also confirmed that RANK-Fc suppressed migration, invasion ability and anchorage-independent ability in osteosarcoma cell lines.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨肉腫 RANKシグナル

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の導入、そしてCT、MRIなどの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、その後は様々な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導入はなく、治療成績に大きな変化が見られないのが現状である。切除不能な局所再発症例、多発転移症例に対する抗腫瘍療法はなく、緩和医療のみが行われている。悪性腫瘍の治療法として期待される分子標的薬も、骨軟部腫瘍領域では未だ明らかな治療効果は報告されておらず、これまでにない新たな展開が期待されている。

原発性骨悪性腫瘍である骨肉腫は、多くが骨内に発生するという特徴を持つ。骨肉腫が原発巣を拡大し、周囲組織へ浸潤し、遠隔転移を行うためには周囲の骨を破壊することが必要である。骨肉腫治療において骨破壊を阻害することは、腫瘍増殖の抑制を介して、生命予後の改善に繋がる可能性がある。

がんの骨転移において、腫瘍細胞自体は骨を直接破壊することはできないとされている。骨基質を破壊し進展するためには、腫瘍周囲に生体内で唯一骨基質を吸収する細胞である破骨細胞を誘導する必要がある(Mundy G R., Nat Rev Cancer. 2002)。原発性骨悪性腫瘍である骨肉腫が骨破壊するためにも破骨細胞を腫瘍周囲に誘導することが必須である可能性がある。

これまでに破骨細胞を標的とした骨肉腫治療薬は存在しない。破骨細胞を標的とした転移性骨腫瘍治療薬としてはゾレンドロネートなどのビスホスホネート製剤が臨床応用されている。ゾレンドロネートは、乳癌骨転移患者において、有意に病的骨折などの骨関

連事象の発現を抑制することが明らかになっている。

我々は破骨細胞分化誘導因子RANKL(Receptor Activator of NFκB Ligand)に注目した。RANKLは破骨細胞分化に必須なだけでなく、破骨細胞の生存・骨吸収を促進する効果がある。また、近年RANKLが破骨細胞だけでなく腫瘍に直接作用して腫瘍の骨転移を促進するという報告がなされている(Jones DH., Nature. 2006)。そして、骨肉腫細胞においても機能的RANKL受容体の発現が報告されており、RANK-Fcは破骨細胞のみならず骨肉腫細胞に直接阻害効果を持っている可能性がある。RANKLを標的とした骨肉腫治療法に関する報告はマウス骨肉腫モデルでの治療実験の結果が2報あるのみである(Lamoureux F, Mol Cancer Ther. 2008, Lamoureux F, Cancer Res. 2007)。そのいずれもがウイルスベクターを使用して遺伝子治療を行っているため、現段階では安全性の面から臨床応用することは不可能である。

我々は今すぐに臨床応用可能な製剤としてRANK-Fcに注目した。RANK-FcはRANKL受容体RANKのRANKL結合領域とヒトIgGのFc鎖からなる融合タンパクであり、RANKLに直接結合してRANKLを阻害する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RANKシグナルの骨肉腫進展への関与とそのメカニズムを明らかにすることによって、新規治療法の可能性を検討し、その基盤を確立することである。

3. 研究の方法

RANK-Fcの骨肉腫腫瘍細胞に対する直接効果と骨肉腫進展支持細胞としての破骨細胞に対する効果を検討した。

1)破骨細胞の分化・生存・骨吸収に対するRANK-Fcの効果の検討

マウスより採取した骨髄細胞をRANKL存在下で培養・分化させる実験系に、RANK-Fc

を添加し、破骨細胞分化阻害効果を解析した。また、成熟破骨細胞に RANKL ならびに RANK-Fc を各種濃度添加し、添加後 24 時間の破骨細胞数を添加時の破骨細胞数と比較して、生存率を解析した。破骨細胞骨吸収能の解析として、成熟破骨細胞をハイドロキシアパタイトコートディッシュ上に播き、RANKL ならびに RANK-Fc を各種濃度添加 48 時間後に骨吸収窩を計測した。

2) RANK-Fc の骨肉腫由来細胞の腫瘍原性に対する効果の検討

腫瘍原生として接着非依存性、増殖能、局所侵入能の三つの項目を検討した。接着非依存性の解析として poly-HEMA コートディッシュを使用した細胞浮遊実験とコラーゲンゲル培地におけるコロニー形成実験を行った。増殖能の解析として RANK-Fc と RANKL 添加後、48、72 時間の時点での細胞増殖を MTT アッセイ法によって解析した。局所侵入能の解析として Boyden chamber 法と scraping assay 法を用いた遊走能の解析、そしてマトリゲルコートディッシュによる invasion assay 法を用いた組織分解能の解析を行った。

4 . 研究成果

1)破骨細胞の分化・生存・骨吸収に対する RANK-Fc の効果

RANKL 存在下で、RANK-Fc は濃度依存的に破骨細胞の分化・生存・骨吸収を抑制し、骨肉腫進展支持細胞としての破骨細胞に作用することが示された。

2) RANK-Fc の骨肉腫由来細胞の腫瘍原性に対する効果

RANK-Fc は骨肉腫細胞株における 1 : 接着非依存性、2 : 無限増殖能、3 : 局所侵入能の 3 者に対し抑制効果を持つことが示された。

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 . Ogura K, Kawano H(他 5 名、ラスト) :

Impact of hospital volume on postoperative complications and in-hospital mortality after musculoskeletal tumor surgery: analysis of a national administrative database. *J Bone Joint Surg Am* 95(18):1684-91. (2013) 査読あり

2 . Ogura K, Kawano H(他 3 名、ラスト) : Incidence and risk factors for pulmonary embolism after primary musculoskeletal tumor surgery. *Clin Orthop Relat Res.* 471(10):3310-6. (2013) 査読あり

3 . Ogura K, Kawano H(他 9 名、ラスト) : Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with modified mesna, adriamycin, ifosfamide, and decarbazine (MAID) regimen for adult high-grade non-small round cell soft tissue sarcomas. *Int J Clin Oncol* 18(1):170-6. (2013) 査読あり

4 . Saita K, Kawano H. (他 4 名、3 番目) : Chest wall deformity found in patients with primary spontaneous pneumothorax. *Asian Cardiovascular & Thoracic Annals.* published online 11 July 2013 査読あり

5 . Tsuda Y, Kawano H. (他 7 名、7 番目) : Incidence of, and risk factors for, postoperative venous thromboembolism in patients with benign or malignant musculoskeletal tumors. *J Orthop Sci.* 2013 Jul;18(4):613-7. 査読あり

6 . Yamamoto Y, Kawano H(他 19 名、8 番目) : Vitamin D receptor in osteoblasts is a negative regulator of bone mass control. *Endocrinology.* 2013 Mar;154(3):1008-20. 査読あり

7 . Ogura K, Kawano H. (他 9 名、ラスト) : Neoadjuvant and adjuvant chemotherapy with modified mesna, adriamycin, ifosfamide, and decarbazine (MAID) regimen for adult high-grade non-small round cell soft tissue sarcomas. *Int J Clin Oncol.* 2013

- Feb;18(1):170-6 査読あり
- 8 . Matsumoto T, Kadono Y (他 8 名、6 番目) : Regulation of bone-resorption and sealing zone formation in osteoclasts occurs through Akt-mediated microtubule stabilization. *J Bone Miner Res.* 28(5):1191-202. (2013) 査読あり
- 9 . Ogura K, Kawano H. (他 6 名、7 番目) : Alveolar soft part sarcoma: a single-center 26-patient case series and review of the literature. *Sarcoma.* 2012; 2012:907179. 査読あり
- 10 . Ogura K, Kawano H. (他 5 名、6 番目) : Extraskelletal myxoid chondrosarcoma: a review of 23 patients treated at a single referral center with long-term follow-up. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012 Oct;132(10):1379-86. 査読あり
- 11 . Ogura K, Kawano H. (他 7 名、ラスト) : Bone radiofrequency ablation combined with prophylactic internal fixation for metastatic bone tumor of the femur from hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol.* 2012 Aug;17(4):417-21. 査読あり
- 12 . Ogura K, Kawano H. (他 4 名、ラスト) : Recurrent epithelioid hemangioma: therapeutic potential of tranilast and indomethacin. *J Orthop Sci.* 2012 Mar;17(2):194-8. 査読あり
- 13 . Ogura K, Kawano H. (他 3 名、ラスト) : Periosteal osteoblastoma of the distal femur: a case report and a review of the literature with special emphasis on the MR features. *Int Canc Conf J.* 2012 1:103 107 査読あり
- 14 . Shinohara M, Kadono Y(他 12 名、5 番目) : Class IA phosphatidylinositol 3-kinase regulates osteoclastic bone resorption through Akt-mediated vesicle transport. *J Bone Miner Res.*27(12):2464-75. (2012) 査読あり
- 15 . Shoda N, Kadono Y(他 5 名、6 番目) : Risk factors affecting inhospital mortality after hip fracture: retrospective analysis using the Japanese Diagnosis Procedure Combination Database. *BMJ Open.*4;2. (2012) 査読あり
- 16 . Matsumoto T, Kadono Y(他 6 名、6 番目) : Distinguishing the pro-apoptotic and anti-resorptive functions of risedronate in osteoclasts: Role of the Akt pathway and the Erk/Bim axis. *Arthritis Rheum* 63(12):3908-17. (2011) 査読あり
- 17 . Yasui T, Kadono Y(他 10 名、2 番目) : Regulation of RANKL-induced osteoclastogenesis by TGF- β through molecular interaction between Smad3 and TRAF6. *J Bone Miner Res* 26(7):1447-56. (2011) 査読あり
- [学会発表](計 5 件)
- 1 . Kawano H, Shinoda Y et al.: Clinical outcome of surgical treatment for tumor induced osteomalacia with phosphaturic mesenchymal tumor, mixed connective tissue variant. 2013 . 9. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting (Bologna, Italy)
- 2 . Shinoda Y, Kawano H, et al.: Prediction of pathologic fracture risk in stance and fall loading configurations for metastases in the proximal femur, using CT-based finite element method. 2013 . 9. International Society of Limb Salvage 17th General Meeting (Bologna, Italy)
- 3 . Tsuda Y, Kawano H, et al.: A retrospective analysis of gemcitabine and docetaxel combination on neoadjuvant and adjuvant therapy compared with modified mesna, adriamycin, ifosfamide, and dacarbazine for adult soft tissue non-metastatic sarcomas. 2013 . 9. International

Society of Limb Salvage 17th General Meeting (Bologna, Italy)

- 4 . Shinoda Y, Kawano H, et al.: Fenestration of lateral cortex at proximal femur had smaller effect on fracture risk.- The analysis by CT-based finite element method- 2013 . 10. 18th The Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (New York, USA)
- 5 . Tsuda Y, Kawano H, et al.: A retrospective analysis of gemcitabine and docetaxel combination on neoadjuvant and adjuvant therapy compared with modified mesna, adriamycin, ifosfamide, and dacarbazine for adult soft tissue non-metastatic sarcomas 2013 . 10. 18th The Connective Tissue Oncology Society Annual Meeting (New York, USA)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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・准教授
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・講師
研究者番号：70401065
平田 真 (HIRATA MAKOTO)
東京大学・医学部附属病院・届出診療医
研究者番号：50401071
中川 匠 (NAKAGAWA TAKUMI)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：90338385