

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592231

研究課題名(和文)炎症性サイトカイン抑制による骨肉腫肺転移の制御

研究課題名(英文)Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits lung metastasis in an osteosarcoma cell line.

研究代表者

若林 弘樹 (HIROKI, WAKABAYASHI)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50362687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉腫は肺転移合併例の予後は悪く、新たな治療法が望まれる。Tumor necrosis factor(TNF)-阻害薬の骨肉腫肺転移抑制効果について検討した。

ヒト骨肉腫細胞143Bをマウス脛骨に移植した骨肉腫自然肺転移モデルにTNF-阻害薬であるInfliximab(IFX)を4週間腹腔内投与したところ、肉眼的・組織学的に肺転移を抑制した。IFX 30µg/ml以上で143Bの運動能抑制および浸潤能抑制が認められたが、細胞増殖抑制効果はなかった。また、IFX添加にてCXCR4、Rhoの蛋白発現が抑制された。IFXは骨肉腫治療の新しい選択肢の1つとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Osteosarcoma is the most common primary malignancy of bone, and patients often develop pulmonary metastases. In a previous study, tumor necrosis factor (TNF)-treatment of human osteosarcoma cells increases their metastatic ability in an animal model. TNF- can act as a tumor necrosis factor and also as a tumor-promoting factor. In the present study, the effect of a TNF-inhibitor on osteosarcoma aggressiveness and pulmonary metastases was investigated in vitro and in vivo. An orthotopic xenograft model of 143B cell growth and spontaneous metastasis in SCID mice was used to assess the in vivo effect of infliximab, a TNF-inhibitor. Infliximab greatly reduced cell motility and pulmonary metastases in 143B cells. The mechanism of pulmonary metastasis inhibition involved decreased expression of CXC chemokine receptor 4 (CXCR4), Rho (small GTPase protein), and its effector. TNF-inhibition may become a preventive therapeutic option for the pulmonary metastases of osteosarcoma.

研究分野：転移性腫瘍、骨代謝

キーワード：肺転移 骨肉腫 TNF阻害剤

1. 研究開始当初の背景

骨肉腫は原発性骨悪性腫瘍の中で最も発生頻度が高く、10歳代の若年者に好発する。近年、集学的治療法の発展によりその生命予後は大幅に改善され、5年生存率は70%前後まで改善してきた。しかしながら、骨肉腫は肺転移を起こし易く、肺転移を合併した症例では生命予後は低く、5年生存率は30%前後と大きな差がある。現在、骨肉腫肺転移に対しては切除可能なものは開胸手術による摘出、切除不能例に対しては化学療法を選択するのが一般的で、その他ラジオ波凝固療法や胸腔鏡手術なども行われている。しかしながら、初回手術で肺転移巣をすべて切除できた例でも5年生存率40%と不良であり、更なる新たな治療法の開発が望まれている。

Tumor necrosis factor (TNF) はマウスに移植した腫瘍に対して出血性壊死を誘発させる因子として1975年に単離され、1984年に遺伝子がクローニングされ、主にマクロファージにより産生される。固形がんに対して出血性の壊死を生じさせるサイトカインとされていたが、近年の研究において、TNFは悪性腫瘍において、腫瘍の浸潤・転移を促進することが見出されてきた。Malikらは、ヒトTNFをChinese hamster ovary cellsに遺伝子導入し、ヌードマウスに腹腔内投与すると腹膜浸潤、肝・肺転移が促進する、と報告している。Oroszらは、ヒトTNFを線維肉腫自然肺転移モデルマウスに腹腔内投与すると肺転移が促進する、と報告している。

2. 研究の目的

悪性腫瘍におけるTNFの関与は、腫瘍周囲に集積している腫瘍関連マクロファージ(Tumor associated macrophage)や悪性腫瘍自体がTNFを産生、放出している。これらのTNFは腫瘍細胞に作用し、NF κ Bシグナル伝達系により、腫瘍の増殖、遊走、接着等に作用すると考えられている。また、TNFにより産生されるInterleukin-6(IL-6)や他のサイトカイン、ケモカイン、血管新生因子により血管新生、腫瘍転移が促進されると考えられている。つまり、TNFを抑制することで骨肉腫の肺転移が抑制される可能性がある、と考え、骨肉腫自然肺転移モデルマウスを作成し、TNF阻害剤を投与し、骨肉腫の肺転移抑制効果をin vivoおよびin vitroにて検討した。

3. 研究の方法

骨肉腫細胞株143BにおけるTNFの発現の検討
骨肉腫細胞株143BからmRNAをISOGEN(Nippon gene社)を用いて抽出し、1st strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (Roche社)

を用いてcDNA作成した。cDNAを作成後にTNF、およびその受容体と、housekeeping geneにはGAPDHをPCRを施行して発現の有無を検討した。

骨肉腫自然肺転移モデルマウスの確立

5週齢雄SCIDマウスの脛骨にヒト骨肉腫細胞株143Bを 2.0×10^5 個を移植し、移植後、2週から1週毎に6週まで肉眼的な肺転移の有無とその頻度を検討した。肉眼的検討は両側の肺表面の結節数を評価し、至適週数を決定し、自然肺転移モデルを確立した。

TNF阻害剤投与による肺転移抑制効果の検討

5週齢雄SCIDマウスの脛骨にヒト骨肉腫細胞株143Bを 2.0×10^5 個を移植し、移植後より抗TNF抗体であるInfliximabを10mg/kg/週で、4週間腹腔内投与した。コントロール群は生食を腹腔内投与した。4週後、安楽死させて下肢骨の原発巣および肺転移巣を肉眼的、組織学的に評価した。下肢骨移植腫瘍は腫瘍短径 $^2 \times$ 腫瘍長径/2の近似式で算出した。肺肉眼的評価は両側の肺表面の結節数を、組織学的評価はヘマトキシリン-エオジン染色(HE染色)を施行し、最大断面での肺結節数を評価した。

ヒト骨肉腫細胞株143BにおけるTNF阻害剤添加による抗腫瘍効果の検討

肺転移抑制のメカニズムを検討するため、TNF阻害剤(Infliximab)を至適濃度投与による143B細胞の抗腫瘍効果の有無を検討した。増殖能をWST-1 assayで、運動能および浸潤能の評価をdouble chamber法で行った。内側chamberのporeを通過して移動した細胞の個数をカウントし、運動能を評価した。浸潤能は、matrigelでコートされたchamberを用いて評価した。

ヒト骨肉腫細胞株143BにおけるTNF阻害剤添加による転移関連因子発現の検討

ヒト骨肉腫細胞株143Bに至適濃度のinfiximabを投与し、至適時間経過後lysis bufferにて蛋白質を採取し、ウエスタンブロット法にて転移関連因子発現を検討した。検討蛋白はTNFの下流シグナルとしてNF κ B、JNK、運動能としてRac/cdc、ROCK、RhoAを、ケモカインレセプターとしてCXCR4の発現を検討した。

4. 研究成果

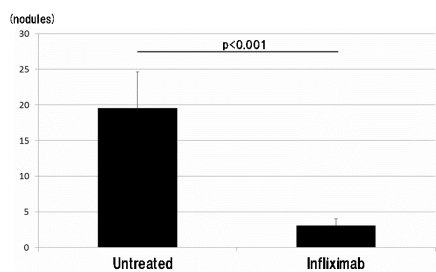
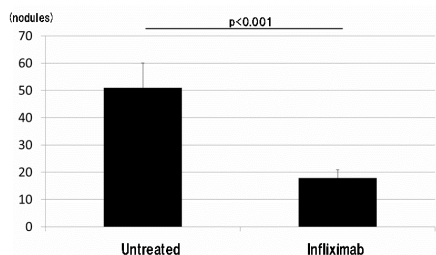
骨肉腫細胞株143BにおけるTNFの発現の検討

143B細胞ではTNFおよびTNFR1は発現していたがTNFR2は発現していなかった。

骨肉腫自然肺転移モデルマウスの確立
移植後 3 週より肺転移が観察され、移植 4 週後では全例で肉眼的肺転移が認められた。移植 4 週後と 5 週後では転移数に有意差はなく、5 週を超えると腫瘍死するマウスがみられ、移植 6 週後では全例腫瘍死した。よって移植後の評価週数として至適週数は 4 週とした。

TNF 阻害剤投与による肺転移抑制効果の検討

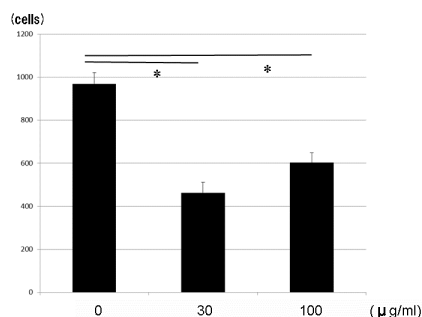
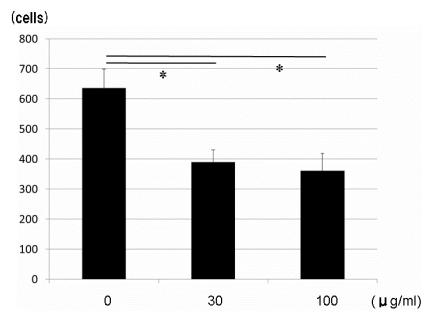
腫瘍を移植した脛骨は Infliximab 投与群が



・組織学的 (下段) 共に Infliximab 投与群が有意に低下していた。

ヒト骨肉腫細胞株 143B における TNF 阻害剤添加による抗腫瘍効果の検討

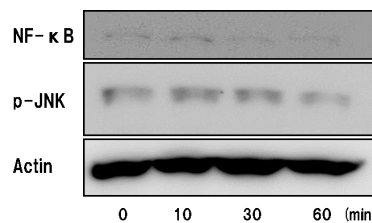
infliximab 投与では細胞増殖抑制効果は 100



30 μg/ml 以上の添加で有意に運動能・浸潤能は低下した。

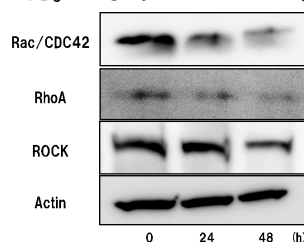
ヒト骨肉腫細胞株 143B における TNF 阻害剤添加による転移関連因子発現の検討

Infliximab 添加にて 143B における NF-κB、



JNK、Rac/cdc、ROCK、Rho A、CXCR4 の発現はいずれも低下して

いた。つまり Infliximab 添加により TNF 下



流シグナルは抑制され、また、細胞運動能関連因子が抑制されていた。

以上の結果から TNF を阻害することにより、細胞運動能・浸潤能が抑制されることで骨肉腫細胞株を用いた自然肺転移モデルで肺転移が抑制されることを見出した。

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 18 件)

1. Kato H, Wakabayashi H, Naito Y, Kato S, Nakagawa T, Matsumine A, Sudo A. Anti-tumor necrosis factor therapy inhibits lung metastasis in an osteosarcoma cell line. *Oncology*. 88(3):139-146. 2015. 査読有 DOI:10.1159/000368414.
2. Aota T, Naitoh K, Wada H, Yamashita Y, Miyamoto N, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Asanuma K, Matsumoto T, Ohishi K, Shimokariya Y, Yamada N, Nishikawa M, Katayama N, Uchida A, Sudo A. Elevated soluble platelet glycoprotein VI is a useful marker for DVT in postoperative patients treated with edoxaban. *Int J Hematol*. 100(5):450-456. 2014. 査読有 DOI:10.1007/s12185-014-1676-x.
3. Hasegawa M, Miyamoto N, Miyazaki S, Wakabayashi H, Sudo A. Longitudinal magnetic resonance imaging of pseudotumors following metal-on-metal total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 29(12):2236-2238. 2014. 査読有 DOI: 10.1016/j.arth.2014.05.006.
4. Wakabayashi H, Takigawa S, Hasegawa M, Kakimoto T, Yoshida K, Sudo A. Polyarticular late infection of

- total joint arthroplasties in a patient with rheumatoid arthritis treated with anti-interleukin-6 therapy. *Rheumatology* (Oxford). 53(6):1150-1151. 2014. 査読有
DOI: 10.1093/rheumatology/ket379.
5. Wakabayashi H, Hasegawa M, Yoshida K, Nishioka K, Sudo A. Hip score and disease activity correlation in patients with rheumatoid arthritis after total hip arthroplasty. *Int Orthop*. 37(7):1245-1250. 2013. 査読有
DOI:10.1007/s00264-013-1900-y.
 6. Wakabayashi H, Hasegawa M, Nishioka Y, Minami Y, Nishioka K, Sudo A. Clinical outcome in patients with rheumatoid arthritis switched to tocilizumab after etanercept or infliximab failure. *Clin Rheumatol*. 32(2):253-259. 2013. 査読有
doi: 10.1007/s10067-012-2118-x.
 7. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Prevalence of adverse reactions to metal debris following metal-on-metal THA. *Orthopedics*. 36(5):e606-612. 2013. 査読有
doi: 10.3928/01477447-20130426-23.
 8. Hasegawa M, Horiki N, Tanaka K, Wakabayashi H, Tano S, Katsurahara M, Uchida A, Takei Y, Sudo A. The efficacy of rebamipide add-on therapy in arthritic patients with COX-2 selective inhibitor-related gastrointestinal events: a prospective, randomized, open-label blinded-endpoint pilot study by the GLORIA study group. *Mod Rheumatol*. 23(6):1172-1178. 2013. 査読有
doi: 10.1007/s10165-012-0819-2.
 9. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Cutting and implanting errors in minimally invasive total knee arthroplasty using a navigation system. *Int Orthop*. 37(1):27-30. 2013. 査読有
doi: 10.1007/s00264-012-1688-1.
 10. Ishiguro S, Asano N, Yoshida K, Nishimura A, Wakabayashi H, Yokochi A, Hasegawa M, Sudo A, Maruyama K. Day zero ambulation under modified femoral nerve block after minimally invasive surgery for total knee arthroplasty: preliminary report. *J Anesth*. 27(1):132-134. 2013. 査読有
doi: 10.1007/s00540-012-1479-2.
 11. Asanuma K, Wakabayashi H, Okamoto T, Asanuma Y, Akita N, Yoshikawa T, Hayashi T, Matsumine A, Uchida A, Sudo A. The thrombin inhibitor, argatroban, inhibits breast cancer metastasis to bone. *Breast Cancer*. 20(3):241-246. 2013. 査読有
doi: 10.1007/s12282-012-0334-5.
 12. Wakabayashi H, Sudo A, Nishioka Y, Hasegawa M, Minami Y, Nishioka K. Repeat etanercept administration restores clinical response of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int*. 32(11):3675-3678. 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00296-011-2124-3.
 13. Wakabayashi H, Hasegawa M, Nishioka Y, Sudo A, Nishioka K. Which subgroup of rheumatoid arthritis patients benefits from switching to tocilizumab versus etanercept after previous infliximab failure? A retrospective study. *Mod Rheumatol*. 22(1):116-121. 2012. 査読有
doi: 10.1007/s10165-011-0485-9.
 14. Wakabayashi H, Naito Y, Hasegawa M, Nakamura T, Sudo A. A tumor endoprosthesis is useful in elderly rheumatoid arthritis patient with acute intercondylar fracture of the distal femur. *Rheumatol Int*. 32(5):1411-1413. 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00296-011-1897-8
 15. Nishimura A, Hasegawa M, Wakabayashi H, Yoshida K, Kato K, Yamada T, Uchida A, Sudo A. Prevalence and characteristics of unilateral knee osteoarthritis in a community sample of elderly Japanese: do fractures around the knee affect the pathogenesis of unilateral knee osteoarthritis? *J Orthop Sci*. 17(5):556-561. 2012. 査読有
doi: 10.1007/s00776-012-0263-3.
 16. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Cobalt and chromium ion release after large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*. 27(6):990-996. 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.arth.2011.12.016.
 17. Hasegawa M, Yoshida K, Wakabayashi H, Sudo A. Pseudotumor with dominant B-lymphocyte infiltration after metal-on-metal total hip arthroplasty with a modular cup. *J Arthroplasty*. 27(3):493.e5-7. 2012. 査読有
doi: 10.1016/j.arth.2011.05.005.
 18. Yoshida K, Wada H, Hasegawa M, Wakabayashi H, Matsumoto T, Shimokariya Y, Noma K, Yamada N, Uchida A, Nobori T, Sudo A. Increased

fibrinolysis increases bleeding in orthopedic patients receiving prophylactic fondaparinux. *Int J Hematol.* 95(2):160-166.2012. 査読有 doi: 10.1007/s12185-012-1004-2.

〔学会発表〕(計 26 件)

1. 若林弘樹、長谷川正裕、西岡洋右、西岡久寿樹、須藤啓広 関節リウマチ患者におけるセルトリズマブ・ペゴルの治療効果 中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 平成 26 年 4 月 11-12 日 岡山コンベンションセンター(岡山)
2. 若林弘樹、西岡洋右、長谷川正裕、西岡久寿樹、須藤啓広 生物学的製剤 naive 関節リウマチ患者における TNF 阻害剤とトシリズマブの治療効果 日本リウマチ学会 平成 26 年 4 月 24-26 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
3. Wakabayashi H, Hasegawa M, Niimi R, Sudo A CLINICAL ANALYSIS OF PREOPERATIVE DEEP VEIN THROMBOSIS RISK FACTORS IN PATIENTS WITH TOTAL HIP ARTHROPLASTY EULAR (June 11-14, 2014 Paris, France)
4. 若林弘樹、長谷川正裕、宮本憲、宮崎晋一、須藤啓広 ゆるみのないインプラントの温存を行った感染性人工股関節の治療成績 日本骨・関節感染症学会 平成 26 年 6 月 21 日 京王プラザホテル(東京)
5. Wakabayashi H, Hamaguchi T, Nakagawa T, Iino T, Matsumine A, Sudo A Interleukin-6 receptor inhibitor suppresses bone metastases in a breast cancer cell line ASBMR (September 12-15, 2014 Huston, USA)
6. 若林弘樹、中村知樹、萩 智仁、西村明展、須藤啓広 軟部腫瘍との鑑別を要した近位脛腓関節に発症した若年性特発性関節炎の 1 例 日本小児リウマチ学会総会・学術集会 平成 26 年 10 月 3-5 日 仙台市情報・産業プラザ(仙台)
7. 若林弘樹、長谷川正裕、宮本憲、宮崎晋一、須藤啓広 インプラント維持を試みた感染性人工股関節の治療成績 日本股関節学会学術集会 平成 26 年 10 月 31 日-11 月 1 日 京王プラザホテル(東京)
8. 若林弘樹、長谷川正裕、西岡洋右、西岡久寿樹、須藤啓広 抗リウマチ薬の併用で治療効果が得られたアバタセプトへの切替え患者の 1 例 日本関節病学会 平成 26 年 11 月 6-7 日 虎ノ門ヒルズフォーラム(東京)
9. 若林弘樹、西岡洋右、長谷川正裕、西岡久寿樹、須藤啓広 Bio naive 関節リウマチ患者におけるセルトリズマブ・ペゴルの治療成績 日本臨床リウマチ学会 平成 26 年 11 月 29-30 日 福岡国際会議場(福岡)
10. 若林弘樹、長谷川正裕、新美 壘、宮本憲、刀根慎恵、須藤啓広 人工股関節全置換術前患者の深部静脈血栓症の有病率と既往症 第 43 回日本人工関節学会 平成 25 年 2 月 22-23 日 国立京都国際会館(京都)
11. 若林弘樹、長谷川正裕、宮本 憲、吉田格之進、須藤啓広 インプラント温存を試みた感染性人工股関節の治療成績 第 120 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会 平成 25 年 4 月 5-6 日 和歌山県民文化会館(和歌山)
12. 若林弘樹、須藤啓広、長谷川正裕、西岡洋右、西岡久寿樹 アバタセプトの治療効果 生物学的製剤初回患者と切替患者との比較検討 第 57 回日本リウマチ学会総会・学術集会 平成 25 年 4 月 18-20 日 国立京都国際会館(京都)
13. Wakabayashi H, Hasegawa M, Miyamoto N, Yoshida K, Sudo A. Minimum 5-year results of modular Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty. EFORT(June 5-8, 2013 Istanbul, Turkey)
14. 若林弘樹、長谷川正裕、須藤啓広 関節リウマチ患者におけるゴリムマブの疾患活動性維持効果について 第 121 回中部日本整形外科災害外科学会学術集会 平成 25 年 10 月 3-4 日 名古屋国際会議場(愛知)
15. 若林弘樹、長谷川正裕、須藤啓広 高齢関節リウマチ患者におけるタクロリムスの効果 第 41 回日本関節病学会 平成 25 年 11 月 2-3 日 ウィンクあいち(愛知)
16. 若林弘樹、長谷川正裕、宮本 憲、宮崎晋一、須藤啓広 関節リウマチ患者におけるセメントレス THA の中間成績の検討 第 40 回日本股関節学会学術集会 平成 25 年 11 月 29-30 日 広島国際会議場(広島)
17. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、西岡久寿樹、須藤啓広 THA 後関節リウマチ患者における ADL と股関節機能の検討 第 42 回日本人工関節学会 平成 24 年 2 月 24-25 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄)
18. 若林弘樹、長谷川正裕、鈴木慶亮、吉田格之進、新谷健、宮崎晋一、稲田均、三枝ふみの、須藤啓広 当科における感染性人工股関節の治療成績 第 42 回日本人工関節学会 平成 24 年 2 月 24-25 日 沖縄コンベンションセンター(沖縄)
19. 若林弘樹、長谷川正裕、須藤啓広 関節リウマチ患者におけるアバタセプトの短期治療成績 第 118 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 平成 24 年 4 月 6-7 日 大阪国際会議場(大阪)

20. 若林弘樹、須藤啓広、長谷川正裕、西岡洋右、西岡久寿樹 生物学的製剤初回患者および切替患者におけるアバタセプトの治療効果 第 56 回日本リウマチ学会総会・学術集会 第 21 回国際リウマチシンポジウム 平成 24 年 4 月 26-28 日 グランドプリンスホテル新高輪(東京)
21. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、西岡久寿樹、須藤啓広 THA 後関節リウマチ患者における疾患活動性と股関節機能の検討 第 85 回日本整形外科学会学術総会 平成 24 年 5 月 17-20 日 国立京都国際会館(京都)
22. 若林弘樹、濱口貴彦、内藤陽平、松峯昭彦、須藤啓広 TNF 阻害剤は乳癌細胞株の骨転移を抑制する 第 71 回日本癌学会学術総会 平成 24 年 9 月 19-21 日 ロイトン札幌(北海道)
23. 若林弘樹、長谷川正裕、須藤啓広 インフリキシマブ効果不十分関節リウマチ患者における生物学的製剤切り替え治療の成績 第 119 回中部日本整形外科学会・学術集会 平成 24 年 10 月 5-6 日 福井市フェニックス・プラザ(福井)
24. Wakabayashi H, Hasegawa M, Yoshida K, Nishioka K, Sudo A. Hip Score and Disease Activity Correlation in Patients with Rheumatoid Arthritis After Total Hip Arthroplasty. Combined 33rd SICOT & 17th PAOA Orthopaedic World Conference (November 28-30, 2012 Dubai, UAE)
25. 若林弘樹、長谷川正裕、西岡洋右、西岡久寿樹、須藤啓広 エタネルセプト効果不十分関節リウマチ患者におけるトシリズマブへの切り替え治療成績 第 40 回日本関節病学会 平成 24 年 11 月 8-9 日 鹿児島市民文化ホール(鹿児島)
26. 若林弘樹、長谷川正裕、吉田格之進、宮本 憲、須藤啓広 トシリズマブ投与後、同時に人工関節 3 関節の遅発性感染を発症した関節リウマチ患者の 1 例 第 40 回日本関節病学会 平成 24 年 11 月 8-9 日 鹿児島市民文化ホール(鹿児島)

〔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：
 出願年月日：
 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

若林 弘樹(WAKABAYASHI, Hiroki)
 三重大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：50362687

(2) 研究分担者

松峯 昭彦(MATSUMINE, Akihiko)
 三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
 准教授
 研究者番号：00335118

(3) 連携研究者

須藤 啓広(SUDO, Akihiro)
 三重大学・医学(系)研究科(研究院)・
 教授
 研究者番号：60196904