

平成 30 年 4 月 30 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462274

研究課題名(和文) 転移性骨腫瘍に対する局所制御と骨形成促進を目的とした非手術的新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of non-operative treatment for local control and new bone formation against metastatic bone tumors

研究代表者

村田 博昭 (MURATA, Hiroaki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：90360031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：転移性骨腫瘍の局所制御方法として局所のビスホスホネート(BPs)の濃度を高めるために骨セメントやハイドロキシアパタイト(HA)を用いてBPsの徐放剤を作製し、*in vitro*の効果を確認後、実験動物を用いて転移病巣に徐放剤を留置することで局所ならびに全身への抗腫瘍効果を検証した。結果はBPs徐放剤としてはHAよりは骨セメントの方が適しており、*in vivo*の結果では血液生化学的異常を示すことなく、局所での細胞増殖抑制と肺転移抑制効果を認めた。

研究成果の概要(英文)：Bisphosphonates (BPs) show anti-tumor effects against many malignant tumors. However, for clinical applications, a novel approach is needed to maintain a high concentration of BP for prolonged tumor exposure. Hydroxyapatite (HA) and bone cement are used in orthopedic surgery as a sustained-release system for drugs. Therefore, the present study assessed the effects of BPs-loaded HA and bone cement in metastatic sites of malignant tumor cells *in vitro* and *in vivo*. The antitumor effects of BPs-loaded HA were less potent compared with those of BPs-loaded bone cement in several malignant tumor cell lines. Moreover, BPs-loaded bone cement also exerted antitumor effects against pulmonary metastases and primary lesions, without exhibiting systemic toxicity *in vivo*.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ビスホスホネート 転移性骨腫瘍 骨肉腫 軟部肉腫

1. 研究開始当初の背景

ビスホスホネート(bisphosphonates: BPs)は、骨吸収阻害剤として、骨粗鬆症などの骨代謝疾患に対してのみならず、種々のがん腫に抗腫瘍効果を有することが報告されている。われわれはこれまでに、骨肉腫細胞と線維肉腫細胞を用いて BPs の抗腫瘍効果とその機序について報告した。その結果、他のがん腫と比較して少量の BPs でこれらの細胞の細胞周期を S 期で停止させ、Ras 関連蛋白のプレニル化を阻害し、アポトーシスを誘導することを明らかにした(Horie N, Murata H et al. Cancer Lett, 2006. Koto K, Murata H et al. Oncol Rep, 2010)。さらに、種々の抗癌剤と BPs の併用療法を検討し、種々の抗癌剤と BPs は相乗もしくは相加効果を示すことを明らかにし、P 糖蛋白高発現株に対して併用療法により耐性克服可能であることについても明らかにした(Horie N, Murata H et al. Br J cancer, 2007)。

また、*in vivo* では BPs 単独投与でも骨肉腫原発巣のみならず転移巣に対しても腫瘍縮小効果が得られた(Koto K, Murata H, Cancer Lett. 2009)。しかし、BPs は投与後速やかに骨のハイドロキシアパタイト(HA)へ移行するため血中半減期は短く、また血中最大濃度も低いことから、臨床応用するためにはいかに長時間薬剤を腫瘍に接触させるかが課題であった。

がんをはじめとする悪性腫瘍は抗腫瘍薬の進歩により原発腫瘍での死亡は低下している。これに対して転移性骨腫瘍は様々ながん腫で増加し、腫瘍の進行とともに骨破壊が進み骨折などの骨関連事象を引き起こす。このため著しく activities of daily living (ADL) や quality of life (QOL) の低下をもたらす、予後の悪化につながっている。近年ではこのような患者に対していかにして ADL や QOL を高め、維持することができるかが重要な課題となっている。根治的治療が困難な場合、少しでも現状を悪化させない治療法を考える必要がある。転移性骨腫瘍は腫瘍細胞が増殖し骨組織が減少する状態であり、腫瘍細胞の増殖を抑え、骨折しないよう骨量を増やす治療が可能となれば上記問題を解決できる。転移性骨腫瘍では骨と腫瘍が共存する状態であり、われわれのこれまでに研究から BPs が骨との親和性が高いこと、抗腫瘍効果を認めることから、これらの結果を骨転移病巣に生かせないかと考えた。そのためには局所濃度を高める必要があり、BPs の徐放剤の作製が必要と考え、これを転移巣に留置することで局所治療や骨再生、さらには全身への抗腫瘍効果が期待できないかと考えた。

2. 研究の目的

局所制御方法として局所の BPs の濃度を高めるためには臨床で骨補填材料として用いられている骨セメントや HA を用いて BPs の徐放剤を作製し、*in vitro* の効果を確認後、

実験動物を用いて局所ならびに全身への抗腫瘍効果を検証することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) BPs 含有骨セメントと HA の抗腫瘍効果
細胞株は骨肉腫、線維肉腫、滑膜肉腫、腎がん、前立腺がん、肺がんを用いた。BPs 含有骨セメント/HA は各 1.5ml に対して BPs (zoledronic acid: ZOL) 2mg の濃度で作製した。各腫瘍細胞を培養しその中に骨セメント/HA (ZOL 含有有無) を留置しコントロール群 (ZOL 含まない) と ZOL 含有骨セメント/HA 群で増殖抑制効果を MTT assay 法を用いて検討した。

(2) BPs 含有骨セメントの *in vivo* での効果

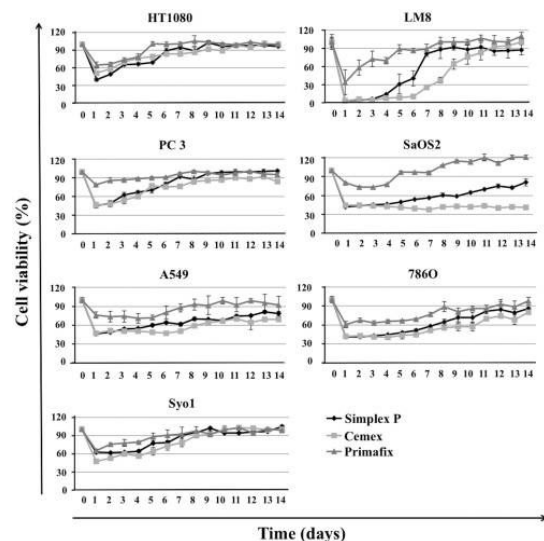
骨肉腫細胞株 (LM8) をマウス腰部に移植し腫瘍作製する。腫瘍を搔爬後骨セメント移植群と ZOL 含有骨セメント移植群に分け、5 週後の抗腫瘍効果 (再発腫瘍の大きさ、組織学的所見、肺転移の個数) を両群で比較検討した。

(3) BPs 含有骨セメントの移植周囲骨、血液生化学的検査への影響

Rabbit の脛骨に 1.5cm 開窓部を作製し、そこに ZOL 含有骨セメントを留置し骨の変化をレントゲン像と組織学的検査で比較検討した。また、血液検査で生化学的異常所見の有無を調べた。

4. 研究成果

(1) BPs 含有骨セメントと HA の抗腫瘍効果
すべての細胞株に対して ZOL を含まない骨セメント/HA のコントロール群では腫瘍増殖抑制効果はなかった。ZOL 含有骨セメント/HA 群ではともに抗腫瘍効果を認めしたが、骨セメント群の方が HA 群と比べ抗腫瘍効果が高かった (図 1)。持続効果時間にはばらつきがあった。

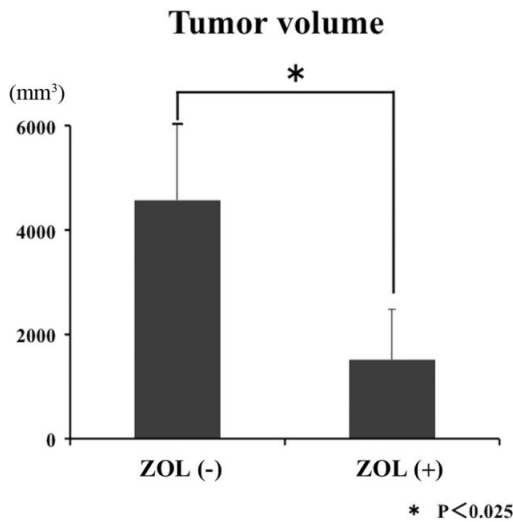


(図 1) 骨セメント: Simplex P, Cemex, HA: Primafix

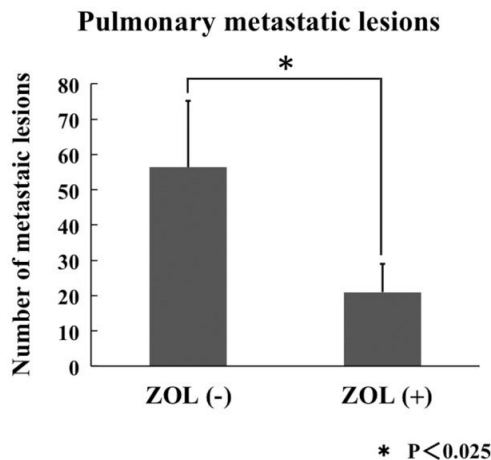
(2) BPs 含有骨セメントの *in vivo*での効果

ZOL 含有骨セメント群の方が有意に腫瘍再発増殖を抑制した(図 2)。組織学的には腫瘍壊死が ZOL 含有骨セメント周囲に認められた。

肺転移は全例に生じたが、骨セメント移植後 3 週ではコントロール群と比べ ZOL 含有骨セメント群は有意に肺転移の数の減少を認めた(図 3)。



(図 2)



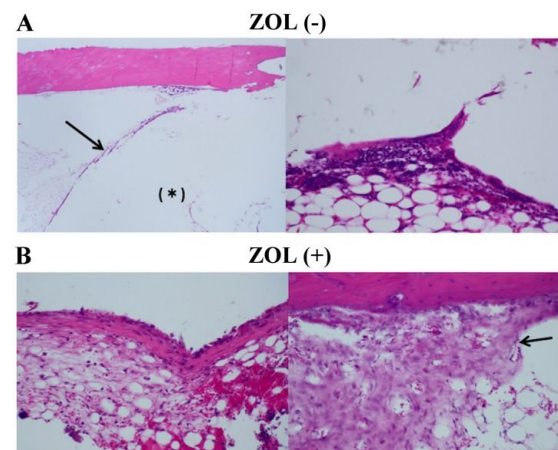
(図 3)

(3) BPs 含有骨セメントの移植周囲骨、血液生化学的検査への影響

レントゲン像ではコントロール群と ZOL 含有骨セメント群で骨セメント周囲に骨硬化像や骨溶解像などの明らかな違いは認めなかった。

ZOL 含有骨セメント群では組織学的には線維性組織、多核巨細胞やリンパ球の浸潤、類骨形成を認めた(図 4)。また、骨セメント周囲には壊死も生じていた。しかし、コントロール群と比べ有意な差は認めなかった。

1 週ごとの 4 週間の採血結果では、BUN、CRE、Na、Cl、K、ALP、AST、ALT、-GTP、Ca、P については両群間で明らかな差は示さなかった。



(図 4)

現在、実臨床では転移性骨腫瘍に対して搔爬・骨セメント充填術を行うことがある。今回の結果から骨セメントに BPs を混入して治療することで局所、全身の治療効果を上げることができる可能性が示唆された。また、診断が確定しない際に骨生検術を施行することもあり、その際にこの方法を応用することも可能であり、今後の臨床現場でのさらなる治療応用が期待できると考える。

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 2 件)

Koto K, Murata H, Sawai Y, Ashihara E, Horii M, Kubo T. Cytotoxic effects of zoledronic acid-loaded hydroxyapatite and bone cement in malignant tumors. *Oncol Lett*, 査読有, 14(2):1648-1656, 2017, doi: 10.3892/ol.2017.6355. Epub 2017 Jun 8

Fukuda H, Nakamura S, Chisaki Y, Takada T, Toda Y, Murata H, Itoh K, Yano Y, Takata

K, Ashihara E. Daphnetin inhibits invasion and migration of LM8 murine osteosarcoma cells by decreasing RhoA and Cdc42 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 26;471(1):63-7, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.179. Epub 2016 Feb 1.

〔学会発表〕(計 2 件)

Murata H, Koto K, Sawai Y, Horii M, Kubo T. Zoledronic acid significantly enhances radiation-induced cement on several cancer cell lines. 11th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society 2016.4.21 Singapore

Koto K, Murata H, Sawai Y, Horii M, Kubo T. Cytotoxic effects of zoledronic acid-loaded hydroxyapatite/bone cement on several cancer cell lines. 11th Asia Pacific Musculoskeletal Tumor Society 2016.4.21 Singapore

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 博昭 (MURATA Hiroaki)
京都府立医科大学・医学研究科・客員講師
研究者番号：90360031

(2) 研究分担者

小藤 和孝 (KOTO Kazutaka)
明治国際医療大学・公私立大学の部局等・
准教授
研究者番号：50649340

芦原 英司 (ASHIHARA Eishi)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70275197