

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 19 日現在

機関番号： 14101  
 研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2010 ~ 2012  
 課題番号： 22591654  
 研究課題名 (和文) がんの骨転移に対する物理化学的および分子生物学的治療の開発に関する研究  
 研究課題名 (英文) Development of novel physicochemical and molecular biological therapy for the metastatic bone tumors  
 研究代表者  
 加藤 公 (KATO KO)  
 三重大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号： 20303729

## 研究成果の概要 (和文)：

転移性骨腫瘍に対して複合治療の臨床応用の可能性を検討した。まず、炎症性サイトカインや細胞接着因子を著しく抑制する NF-kappaB decoy による骨転移の浸潤能、増殖抑制を乳癌細胞株を用いて in vitro, in vivo で確認できた。次に、nano-particle を用いた磁性体交流磁場温熱療法による転移病巣の制御に可能性について in vivo で確認できた。さらに、アクリジンオレンジ光線力学療法は癌の骨転移にも有用であることを細胞株で確認し、実際の臨床応用により minimum invasive surgery を確立した。温度感受性リポソームを用いたラジオ波焼却術 (radiofrequency ablation: RFA) により、脊椎転移の RFA がより安全に行えることを確認した。

## 研究成果の概要 (英文)：

We developed the novel physicochemical and molecular biological therapy for the metastatic bone tumors. First, we showed that NF-kappaB decoy suppress the cell invasion and cell growth of breast cancer cell line at the bone metastatic site, by inhibiting the expression of VCM-1 and ICAM-1. Second, we demonstrated the effect of hyperthermic treatment strategy with magnetic nano-particle. Third, Photodynamic therapy (PDT) using acridine orange is proved to be effective treatment not only for the sarcoma, but also for metastatic bone tumors. Actually we started clinical application of PDT for the bone metastases. Finally, we developed the radiofrequency ablation (RFA) combined with thermo-sensitive liposome-embedding doxorubicin in an effort to safe and effective RFA treatment for the metastatic spinal tumor. Further investigation is necessary.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：整形外科

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：骨転移・磁性体温熱療法・アクリジンオレンジ・ラジオ波焼灼術・NF $\kappa$ B decoy

## 1. 研究開始当初の背景

がんの原発巣に対する治療成績は、化学療法や放射線療法を補助療法とした外科的切除術により飛躍的に向上してきたが、一方、がんの治療成績の向上に相俟って骨転移患者数は著しく増加している。骨転移は骨腫瘍の中で圧倒的多数の症例を締め、がん登録から推計すると年間10万人以上の患者が存在すると考えられる。一端、骨転移に犯されると病的骨折や脊髄麻痺による機能障害は個人のQOLを著しく障害する。しかし、生命予後の改善することはもとよりQOLの向上についても体系化された治療法を確立するには至っていない。これまでの治療法の改善や新しい治療法の開発が急務であり、そのことにより多くの患者が高いQOLを維持でき多大な社会貢献をなし得るものと考えられる。

転移性骨腫瘍の包括的で安全な次世代治療法として期待されているのは最小侵襲の外科手術 (Minimum Invasive Surgery) と骨転移機序に基づく生物物理学的治療を組み合わせた複合治療である。

## 2. 研究の目的

我々はこれまで、光線力学、磁性体温熱療法、ラジオ波などの物理化学的方法、NF- $\kappa$ B decoy の投与による転移促進サイトカインの制御などにより、転移病巣のコントロールが可能であることを基礎的研究を繰り返すことにより示してきた。本研究の目的は、転移性骨腫瘍に対して複合治療の臨床応用の可能性を示すことである。具体的には以下に挙げる項目について明らかにする。

- (1)炎症性サイトカインや細胞接着因子を著しく抑制する NF- $\kappa$ B decoy による骨転移の浸潤増殖抑制を動物実験での確認と臨床応用への展開
- (2)磁性体交流磁場温熱療法による転移病巣の制御とその臨床応用
- (3)アクリジンオレンジ光線力学療法による minimum invasive surgery(最小侵襲手術)の確立
- (4)ラジオ波焼却法(radiofrequency ablation: RFA)による脊椎転移の制御とその臨床応用

## 3. 研究の方法

- (1)in vitro,in vivo におけるヒト乳癌細胞株への NF $\kappa$ B デコイ導入効果の検討  
NF $\kappa$ B デコイ導入により、MDA231 細胞株が発現する炎症性サイトカイン (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ )、細胞外基質分解酵素 (MMP-1, 3, 7, 9, 13)、細胞接着因子(VCM-1, ICAM-1)

の mRNA レベルでの発現の違いを Real time-PCR にて定量化する。そのため、最も導入効率の良い細胞培養方法を検討する。培養細胞に交流電磁場を負荷して高い導入効率の細胞を得ることが出来ないか検討する。次に、NF $\kappa$ B デコイ導入に対する MDA231 細胞の細胞接着能、細胞運動能 (ボイデンチャンバー法および金コロイド法)、細胞浸潤能の変化を解析する。NF $\kappa$ B デコイを導入した MDA231 細胞株をヌードマウスに心室内注射し、骨転移形成に対する影響を観察する。

## (2)磁性体交流磁場温熱療法併用による骨転移の最小侵襲手術の確立

より、低侵襲な磁性体温熱療法の開発を目指して、中部大学応用生物学部の小林猛教授より供給されたチタン合金製 nano-particle を用いた磁性体温熱療法を開発する

まず、nano-particle を我々が開発した磁場発生装置から発生する交流電磁場に暴露し、その発熱効率を検討する。

実験動物に作成した乳癌骨転移モデルに nano-particle を注射し、交流磁場に暴露することにより、腫瘍の縮小効果を確認する。

平成18年度科学研究費により購入した新しい交流磁場発生装置により、臨床応用を推進する。

## (3)アクリジンオレンジによる光力学療法併用低侵襲手術法の開発

我々が、これまで研究してきたアクリジンオレンジを用いた光線力学的療法を骨転移治療にも安全に使用できるかどうかを in vitro, in vivo で確認する

まず、アクリジンオレンジが、上皮系癌細胞に対しても殺細胞効果を有していることを、様々な癌細胞株を用いて検討する

家兎に作成した骨転移に対して病巣内切除を行い、その際アクリジンオレンジ光線力学療法を併用する。腫瘍の再発率を評価することにより併用療法の効果を確認する。

アクリジンオレンジ療法を実際に、三重大学倫理委員会の承認の元に、臨床応用することによりその有用性を検討する。

## (4)ラジオ波焼却術 (RFA) による脊椎転移の制御

脊椎は骨転移発生部位として最も多い部位であり、臨床的には脊椎転移の制御は担癌患者の QOL を維持するためにも非常に重要である。RFA は近年癌治療の新しい modality として注目を浴びているが、脊椎転移への応用に関しては、神経の近傍であるため、安全性に関しては議論がある。

脊髄への影響を軽減する目的に、低温で RFA の効果が得られるように、RFA の増感剤に関する基礎的研究を行う。特に、新たに開発された温度感受性リポゾームを用いた *in vitro*, *in vivo* の研究を行う。

三重大学放射線科/IVR 科と協力して、脊椎転移病巣に対する RFA の有用性を検討する。特に、手術療法との比較は、脊椎転移に対する治療の有用性、安全性を検討する上で重要である。

#### 4. 研究成果

##### (1) *in vitro*, *in vivo* におけるヒト乳癌細胞株への NF $\kappa$ B デコイ導入効果の検討

これまでの予備実験 (Nishimura A et al: *Cancer Gene Ther.*;18:250-9, 2011.) とその後の試行錯誤により、アルジネートビーズによる三次元浮遊培養細胞が本研究に最も適した培養であることがわかった。さらに、我々が新たに開発した交流電磁場発生装置を用いることによる NF $\kappa$ B デコイ導入効率の向上を試みたが、残念ながら明らかな有意差を持つ導入効率の効率化は得られなかった。

次に、NF $\kappa$ B デコイ導入による MDA231 細胞の遺伝子発現の変化を検討したところ ICAM-1, VEGF の発現量の有意な増加を認めた。

NF $\kappa$ B デコイ導入により、MDA231 細胞株の細胞接着能が亢進し、細胞運動能と浸潤能が低下することが明らかになった。

さらに NF $\kappa$ B デコイを導入した MDA231 細胞株をヌードマウスに心室内注射し、その後の骨転移病巣の発現率を検討したところ、骨転移巣の出現が明らかに抑制されていることがわかった (現在投稿中)。

##### (2) 磁性体交流電磁場温熱療法併用による骨転移の最小侵襲手術の確立

チタン合金製 nano-particle を我々の装置から発生する交流電磁場に暴露し、その発熱効率を検討したところ、43°C にまで加温されることがわかった。そこで、ヌードマウスに作成した乳癌骨転移モデルに nano-particle を注射し、交流磁場に暴露したところ、腫瘍の縮小効果を確認した。しかし、その縮小効果は臨床応用するためにはまだ十分なものとは言えないため、現在、さらに条件を変えて検討中である。これまでの成果に関しては現在論文執筆中である。

平成 18 年度科学研究費により購入した新しい交流電磁場発生装置により、臨床応用をさらにすすめた。現在 27 例 29 肢に対して磁性体温熱療法を行い、38% の症例で骨病変の改善を、59% で病変の進行の抑制を得られた。臨床上問題となる副作用は認めなかった。磁性体温熱療法は手術+放射線治療とほぼ同等

の効果を有していることがわかった。

##### (3) アクリジンオレンジによる光力学療法併用低侵襲手術法の開発

アクリジンオレンジが、上皮系癌細胞に対しても殺細胞効果を有していることを、前立腺癌細胞株、乳癌細胞株、肺癌細胞を用いて確認した。

株家兔に作成した骨転移に対してアクリジンオレンジ光線力学療法を併用した病巣内切除を行ったところ、腫瘍が残存しているにもかかわらず、再発が抑制されることが明らかとなった。

現在まで、アクリジンオレンジ療法を、骨転移症例 8 例に臨床応用した。局所再発を 1 例に認めたが、臨床的に問題となる副作用は認めていない。

##### (4) ラジオ波焼却術による脊椎転移の制御

単層培養した MDA231 乳癌細胞株にドキシソルビン封入温度感受性リポゾームを添加し、45°C に加温したところ、ドキシソルビンが溶出し、癌細胞は細胞死することを確認した。

ヌードマウス皮下に作成した MDA231 乳癌細胞株にドキシソルビン封入温度感受性リポゾームを局所投与し、RFA を行ったところ、45°C という低い温度で、腫瘍を壊死に導くことが出来ることがわかった。

上記のことから、ドキシソルビン封入温度感受性リポゾームに使用により、脊椎転移に対してより安全な RFA 治療が行うことが出来る可能性が示唆された (現在、論文作成中) さらに、研究を進める必要がある。

また、脊椎転移に対する手術療法、放射線治療、RFA の使い分けを明らかにするために骨転移合同カンファレンスを開催し、診療科横断的に脊椎転移の治療法について議論している。

さらに、IVR 科、放射線科、整形外科で、「脊椎転移に関する治療法の検討—手術+放射線治療 vs RFA」の Phase II study を計画しており、脊椎転移に対する低侵襲治療としての RFA の有用性、安全性を客観的に検討する準備を進めている。

#### 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 43 件)

① Niimi R, Matsumine A, Hamaguchi T, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. Prosthetic limb salvage surgery for bone and soft tissue tumors around the knee. *Oncol Rep.* 査読有 28(6):1984-90, 2012

②Atsumi S, Matsumine A, Toyoda H, Niimi R, Iino T, Nakamura T, Matsubara T, Asanuma K, Komada Y, Uchida A, Sudo A. Oncolytic virotherapy for human bone and soft tissue sarcomas using live attenuated poliovirus. *Int J Oncol*. 査読有 41(3):893-902, 2012

③ Kusuzaki K, Hosogi S, Ashihara E, Matsubara T, Satonaka H, Nakamura T, Matsumine A, Sudo A, Uchida A, Murata H, Baldini N, Fais S, Marunaka Y. Translational research of photodynamic therapy with acridine orange which targets cancer acidity. *Curr Pharm Des*. 査読有 18(10):141-20, 2012

④ 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*. 査読有 掲載決定

⑤ Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Uchida A, Sudo A. Clinical significance of pretreatment serum C-reactive protein level in soft tissue. *Cancer*. 査読有 118(4):1055-61, 2012

⑥ Fukuda A, Nishimura A, Kato K, Sudo A. Arthroscopically assisted minimally invasive plate osteosynthesis for posterior fracture-dislocation of the shoulder. *J Orthop Sci*. 査読有 掲載決定

⑦ Satonaka H, Kusuzaki K, Akeda K, Tsujii M, Iino T, Uemura T, Matsubara T, Nakamura T, Asanuma K, Matsumine A, Sudo A. Acridine orange inhibits pulmonary metastasis of mouse osteosarcoma. *Anticancer Res*. 査読有 31(12):4163-8, 2011

⑧ Nishimura A, Matsumine A, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Uchida A, Kato K, Sudo A. The adverse effect of an unplanned surgical excision of foot soft tissue sarcoma. *World J Surg Oncol*. 査読有 9:160, 2011

⑨ Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Uchida A, Sudo A. Clinical impact of the tumor volume doubling time on sarcoma patients with lung metastases. *Clin Exp Metastasis*. 査読有 28(8):819-25, 2011

⑩ Hamaguchi T, Wakabayashi H, Matsumine A, Sudo A, Uchida A. TNF inhibitor suppresses bone metastasis in a breast cancer cell line. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 407(3):525-30, 2011

⑪ Matsumine A, Ueda T, Sugita T, Yazawa Y, Isu K, Kawai A, Abe S, Yakushiji T, Hiraga H, Sudo A, Uchida A. Japanese

Musculoskeletal Oncology Group. Clinical outcomes of the KYOCERA Physio Hinge Total Knee System Type III after the resection of a bone and soft tissue tumor of the distal part of the femur. *J Surg Oncol*. 査読有 103(3):257-63, 2011

⑫ Matsumine A, Takegami K, Asanuma K, Matsubara T, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. A novel hyperthermia treatment for bone metastases using magnetic materials. *Int J Clin Oncol* 査読有 16(2):101-8, 2011

⑬ Satonaka H, Kusuzaki K, Matsubara T, Shintani K, Nakamura T, Matsumine A, Iino T, Uchida A. In vivo anti-tumor activity of photodynamic therapy with intravenous administration of acridine orange, followed by illumination with high-power flash wave light in a mouse osteosarcoma model. *Oncol Lett* 査読有 1:69-72, 2010

⑭ Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Murata H, Nakamura T, Uchida A, Sudo A. Clinical outcomes of minimally invasive surgery using acridine orange for musculoskeletal sarcomas around the forearm, compared with conventional limb salvage surgery after wide resection. *J Surg Oncol* 査読有 102:271-5, 2010

[学会発表] (計 67 件)

① Acridine Orange Therapy as a New Less-invasive Limb Salvage Surgery for Rhabdomyosarcomas and Synovial Sarcomas. Matsubara T, Kusuzaki K, Matsumine A, Asanuma K, Nakamura T, Sudo A. American Academy of Orthopaedic Surgeons Mar 19-23, 2013 Chicago

② C-reactive Protein Level May be a Marker of Tumor Aggressiveness in Soft Tissue Sarcoma Patients. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. American Academy of Orthopaedic Surgeons Mar 19-23, 2013 Chicago

③ Thrombomodulin and Tissue Factor mRNA Expression in 62 Soft Tissue Sarcoma Patients. Asanuma K, Matsumine A, Matsubara T, Nakamura T, Yoshikawa T, Sudo A. American Academy of Orthopaedic Surgeons Mar 19-23, 2013 Chicago

④ Analysis of Tumor Metastatic Factor Using Coagulation Activity Model in Mice. Asanuma K, Matsumine A, Asanuma Y, Akita N, Yoshikawa T, Matsubara T, Nakamura T, Okamoto T, Sudo A. Orthopaedic Research Society Jan 26-29, 2013 San Antonio

⑤ Interleukin-6 Receptor Suppresses the Bone Metastasis in Breast Cancer Cell Line.

Wakabayasi H, Hamaguchi T, Naito Y, Matsumine A, Sudo A. Orthopaedic Research Society Jan 26-29, 2013 San Antonio

⑥ K Asanuma, A Matsumine, Y Asanuma, T Yoshikawa, K Yoshida, T Matsubara, T Nakamura, A Uchida, A. Sudo. The inhibition of lung metastasis by inactivation of coagulation activity may lead to dissemination of tumor cells. EUROPEAN ORTHOPAEDIC RESEACH SOCIETY Sept 1-2, 2011 Austria

⑦ A Matsumine. Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials. Connective Tissue Oncology Society Meeting Nov 11-13, 2010 France

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 公 (KATO KO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号： 20303729

### (2) 研究分担者

松峯 昭彦 (MATSUMINE AKIHIKO)

三重大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号： 00335118

中村 知樹 (NAKAMURA TOMOKI)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号： 50467362

里中 東彦 (SATONAKA HARUHIKO)

三重大学・大学院医学系研究科・リサーチアソシエイト

研究者番号： 60515485

### (3) 連携研究者

内田 淳正 (UCHIDA ATSUMASA)

三重大学・学長

研究者番号： 40176681