

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

厚生労働科学研究費補助金（がん臨床研究事業）
分担研究報告書

生きたマウスにおいて蛍光標識された癌細胞を用いた
血管内移動・血管外脱出・微小転移巣形成のリアルタイム画像解析

分担研究者 土屋 弘行 金沢大学大学院医学系研究科機能再建学 准教授

研究要旨 今回我々は、癌細胞が血管内を移動し、壁に接着した後に血管外に脱出し、その血管周囲で増殖する様子をリアルタイムに捉えることを可能としたモデルを樹立した。ヒト線維肉腫（HT-1080）とマウス乳癌細胞（MMT）の核に緑色蛍光蛋白（GFP）を、細胞質に赤色蛍光蛋白（RFP）を導入し、2つの蛋白を同時に発現する株を得た。マウスの腹部の皮膚をフラップ状に開いた後、この細胞を皮静脈に注射しリアルタイムに観察を行った。癌細胞が大きい血管内を流れるときは球形となり、血 vessel 壁に接着した後さらに塞栓を起こす様子が観察された。また18時間頃より、皮静脈に塞栓していた腫瘍細胞が徐々に血管外に脱出をしていくのが観察された。120時間後には血管外脱出し、その血管の周囲で増殖していた。GFPとRFP、2つの蛍光蛋白で標識された癌細胞をスキンプラップモデルに応用し観察することで、生体内における癌細胞の血管内移動や血管外脱出、微小転移巣形成の様子を視覚的に捉えることができた。今後このモデルは、癌血行性転移の詳細なメカニズムを視覚的に解明していくことに応用される可能性がある。

A. 研究目的

新規抗癌剤の開発や、従来の抗癌剤の効果を増強する新規薬剤などの登場により、これまででは治癒が望めなかった担癌症例でも長期の無病期間や十分な延命効果が得られるようになった。しかし一旦肺や肝臓など重要臓器に癌が転移すると、その予後は極めて不良である。現在の癌医療においては、癌の転移のメカニズムを解明し、転移を抑制することが生存率向上にとって必須である。癌の転移はいくつかの過程で構成されており、それぞれの過程には癌細胞・ホスト細胞の相互作用のみならず、多くの遺伝子が深く関わっている。これらの転移関連遺伝子の発現に注目し癌転移の分子機構をより深く理解し有効な治療法を開発することが、今後の新しい抗癌剤開発の方向性と考えられる。そのためには癌血行性転移の過程を視覚的に捉えることが重要である。本研究では、蛍光蛋白で標識した癌細胞をマウスに移植することで、今まで見ることの出来なかった癌の血行性転移をリアルタイムで視覚的に捉えることを可能とする。

B. 研究方法

ヒト線維肉腫（HT-1080）とマウス乳癌細胞（MMT）の核に緑色蛍光蛋白（GFP）を、細胞質に赤色蛍光蛋白（RFP）を導入し、2つの蛋白を恒常的に発現する株を得た。ひとつの細胞が2色で標識さ

れているため、その癌細胞が塊になっても、一つ一つを識別することが可能であった。また核内のみならず発現しているGFPによって、細胞全体のみならず、核の動態までも視覚的に捉えることが可能であった。マウスの腹部の皮膚をフラップ状に開いた後、この細胞を皮静脈に注射した。その後オリンパスOV100ホールマウスイメージングシステムで観察を行った。

C. 研究結果

大きい血管内を流れるとき癌細胞は球形となっており、時に血管壁に接着した。またその接着した細胞に、さらに癌細胞が接着し腫瘍塞栓を形成した。細い血管では、癌細胞は核も細長く伸び血管内を滑るように移動した。注射後18時間頃より、皮静脈に塞栓していた癌細胞が徐々に血管外に脱出をしていくのが観察された。最初に細長く伸びた細胞質が穿孔するように血管外に脱出し、それを核が追いかけるようにして細胞全体が脱出した。120時間後には血管外脱出した癌細胞がその血管の周囲で増殖していた。多くの細胞が細長く変形しており、細胞分裂をしている様子も観察できた。

D. 考察

GFPとRFP、2つの蛍光蛋白で標識された癌細胞をスキンプラップモデルに応用し、オリンパス

OV100 ホールマウスイメージングシステムで観察することによって、生体内における癌細胞の血管内移動や血管外脱出、微小転移巣形成の様子を視覚的に捉えることができた。他施設では内臓器における癌細胞の動態を観察しているが、胸壁を空けることで気胸が起こりマウスは死に至る。腹膜を開ける方法では、すぐにはマウスにとって致命的とはならないものの、長時間の観察はマウスにとって負担の大きい手技である。本研究では dual-color 細胞をマウス腹部の皮静脈に移植することで単一細胞レベルで癌血行性転移を視覚化した。このモデルは致死的な手技ではなく、いままでの in vivo imaging のなかでも全く独創的であり、新しい分野のひとつとなり得た。

E. 結論

今後このモデルは、癌血行性転移のどの段階においてどの遺伝子が関与し、もしくは抗癌剤などの治療が効果を示し、その結果として転移が促進・抑制された、という判断を視覚的に行うことに応用される可能性がある。転移をただひとつの現象と捉えることは今後の癌治療に大きな足枷となり、いくつかの段階を別々のものとして考えることで、新しい癌治療の道が開けると考える。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawai A, Tsuchiya H, et al. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a study of 75 patients. *Cancer*, 109(1): 109-116, 2007

Obata H, Tsuchiya H, et al. Clinical outcome of patients with Ewing sarcoma family of tumors of bone in Japan: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group cooperative study. *Cancer*, 109(4): 767-775, 2007

Hayashi K, Tsuchiya H, et al. Dual-color imaging of angiogenesis and its inhibition in bone and soft tissue sarcoma. *J Surg Res*, 140(2): 165-170, 2007

Ji Y, Tsuchiya H, et al. The camptothecin derivative CPT-11 inhibits angiogenesis in a dual-color imageable orthotopic metastatic nude mouse model of human colon cancer. *Anticancer Res*, 27(2): 713-718, 2007

Murakami H, Tsuchiya H, et al. Invasive features of spinal osteosarcoma obtained from whole-mount sections of total en bloc spondylectomy. *J Orthop Sci*, 12(3): 311-315, 2007

Takeuchi A, Tsuchiya H, et al. Endogenous secretory receptor for advanced glycation endproducts as a novel prognostic marker in chondrosarcoma. *Cancer*, 109(12): 2532-2540, 2007

Gong M, Tsuchiya H, et al. Association of gene FN1 with pulmonary metastasis of human fibrosarcoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 29(1): 14-16, 2007

Tsuchiya H, et al.

Treatment of benign bone tumours using external fixation. *J Bone Joint Surg Br*, 89(8): 1077-1083, 2007

Hayashi K, Tsuchiya H, et al. Real-time imaging of tumor-cell shedding and trafficking in lymphatic channels. *Cancer Res*, 67(17): 8223-8228, 2007

Yamauchi K, Tsuchiya H, et al. Imaging of nuclear dynamics during the cell cycle of cancer cells in live mice. *Cell Cycle*, 6(21): 2706-2708, 2007

Takeuchi A, Tsuchiya H, et al. Caffeine-potentiated chemotherapy for patients with high-grade soft tissue sarcoma: long-term clinical outcome. *Anticancer Res*, 27(5B): 3489-3495, 2007

Taki J, Tsuchiya H, et al. Prediction of final tumor response to preoperative chemotherapy by Tc-99m MIBI imaging at the middle of chemotherapy in malignant bone and soft tissue tumors: Comparison with Tl-201 imaging. *J Orthop Res*, 26(3):411-418, 2007

丹沢義一, 土屋弘行, 他. 移植6年後に切除された液体窒素処理骨の組織学的検討. *中部整災誌*, 50: 9-10, 2007

松原秀憲, 土屋弘行, 他. 原発性骨腫瘍による病的骨折に対する創外固定器を用いた治療. *整・災外*, 50: 361-365, 2007

松原秀憲, 土屋弘行, 他. 手術加療を要した原発性骨腫瘍による四肢長管骨病的骨折症例の検討. *中部整災誌*, 50: 521-522, 2007

高田宗知, 土屋弘行, 他. 骨腫瘍の搔爬後におけるリン酸カルシウム骨ペーストの使用経験.
中部整災誌, 50: 625-626, 2007

丹沢義一, 土屋弘行, 他. 悪性骨腫瘍に対する有茎液体窒素処理自家骨による再建術の検討.
中部整災誌, 50: 703-704, 2007

山内健輔, 土屋弘行, 他. 下肢悪性軟部腫瘍に対する神経温存と腫瘍再発についての検討.
中部整災誌, 50: 1121-1122, 2007

武内章彦, 土屋弘行, 他. 中空ピンによる骨嚢腫の治療. 別冊整形外科 整形外科 office-based surgery - 1人でできるテクニック, No.51: 178-183, 2007

土屋弘行. 通常型骨肉腫, 最新整形外科学体系, 骨・軟部腫瘍および関連疾患, 第2章 骨腫瘍各論-骨肉腫, pp 264-268, 中山書店, 東京, 2007

2. 学会発表

Tsuchiya H.

Bone transport with bone morphogenetic protein loaded hydroxyapatite

The Specialty Day (Limb Reconstruction and Lengthening Society)

The 68th (2007) Annual Meeting of American Academy of Orthopaedic Surgeons
(2007.2.13-18 San Diego, USA)

Tsuchiya H.

#1 Biological reconstruction for limb-saving surgery

#2 Innovative bone transport with frozen devitalized bone and BMP-loaded hydroxyapatite

チェコ整形外科学会

(2007.3.15-16 Kralove, Czech Republic)

Tsuchiya H.

#1 Basic concepts and principles for segmental defects of the femur, tibia, and humerus

#2 Tumor reconstruction with distraction osteogenesis

#3 Faculty panel discussion/Survey: Choosing the best option for each patient

17th Annual Baltimore Limb Deformity Pre-Course
Management of Segmental Bone Defects
(2007.8.31 Baltimore, USA)

Tsuchiya H.

Biological reconstruction: Over view and Kanazawa experience

14th International Symposium of Limb Salvage

(2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Tsuchiya H.

#1 Tumor reconstruction using distraction osteogenesis

#2 Innovative bone transport with devitalized bone

The 2nd World Congress of External Fixation

(2007.10.17-19 Cairo, Egypt, October 17-19, 2007)

Takeuchi A, Tsuchiya H., et al.

Low molecular weight heparin inhibits RAGE-induced human fibrosarcoma cell growth and metastasis

American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS)
74th Annual Meeting (2007.2.14-18 San Diego, CA)

Yamauchi K, Tsuchiya H., et al.

Real-Time Dual-Color Imaging of Cellular Dynamics of Lung Metastasis in Live Mice

First JCA-AACR Special Joint Conference

(2007.3.12-14 名古屋)

Yamauchi K, Tsuchiya H., et al.

Real-time multicolor imaging of two different micrometastases formations of sarcoma cells in live mice

14th International Symposium on Limb Salvage

(2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Nishida H, Tsuchiya H., et al.

Anti-tumor effect of destructive tumor tissue treated by liquid nitrogen on mouse osteosarcoma

14th International Symposium on Limb Salvage

(2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Matsubara H, Tsuchiya H., et al.

Correction and lengthening for deformities of the forearm in multiple cartilaginous exostoses

14th International Symposium on Limb Salvage

(2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Tanzawa Y, Tsuchiya H., et al.

Histological examination of frozen autograft containing tumor treated by liquid nitrogen removed after implantation 6 case study 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Takeuchi A, Tsuchiya H, et al.

Low molecular weight heparin inhibits RAGE-induced human fibrosarcoma cell growth and metastasis

14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Takeuchi A, Tsuchiya H, et al.

Long-term results of function-preserving surgery with distraction osteogenesis following tumor excision

14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14 Hamburg, Germany)

Takata M, Tsuchiya H, et al.

Deformity correction followed by bone transport using frozen autograft for recurrent osteofibrous dysplasia

2nd World Congress on External Fixation (2007.10.17-19 Cairo, Egypt)

土屋弘行

最近の整形外科診断と治療

石川県国民健康保険団体連合会審査業務担当者研修会 (2007.3.1 金沢市)

土屋弘行

ここまで来た骨腫瘍の治療：良性から悪性まで

富山県整形外科医会 (2007.4.21 富山市)

土屋弘行

骨軟部腫瘍の化学療法

日本薬剤師会薬剤師研修講義 (2007.7.5 金沢市)

土屋弘行

骨軟部腫瘍の化学療法

日本薬剤師会薬剤師研修講義 (2007.10.31 金沢市)

Yamauchi K, Tsuchiya H, et al.

Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging in live mice

金沢がん生物学国際シンポジウム 2007 (2007.1.25 金沢)

當銘保則, 土屋弘行, 他.

左大腿骨巨細胞腫膝関節固定後の偽関節に対して術後 41 年で人工膝関節置換を行った 1 例

第 176 回北陸整形外科集談会 (2007.3.4 金沢)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

脛骨骨腫瘍の 1 例

第 19 回骨軟部肉腫外科研究会 (2007.3.31-4.1 東京)

山内健輔, 土屋弘行, 他.

下肢悪性軟部腫瘍に対する神経温存と腫瘍再発についての検討

第 108 回 中部日本整形外科災害外科学会 (2007.4.13-14 広島)

丹沢義一, 土屋弘行, 他.

悪性骨腫瘍に対する有茎液体窒素処理自家骨による再建術の検討

第 108 回中部日本整形外科災害外科学会 (2007.4.13-14 広島)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

悪性軟部腫瘍切除後の広範軟部組織欠損に対する閉鎖療法の有用性

第 108 回中部日本整形外科災害外科学会 (2007.4.13-14 広島)

高田宗知, 土屋弘行, 他.

骨腫瘍の搔爬後におけるリン酸カルシウム骨ペーストの使用経験

第 108 回中部日本整形外科災害外科学会 (2007.4.13-14 広島)

Takeuchi A, Tsuchiya H, et al.

Long-term follow-up of caffeine-potentiated chemotherapy for high-grade soft tissue sarcoma

第 54 回日本整形外科学会学術集会 (2007.5.24-27 神戸)

丹沢義一, 土屋弘行, 他.

第 1 趾基節骨に発生した Primitive neuroectodermal tumor の 1 例

第 32 回日本足の外科学会 (2007.6.22-23 長崎)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

踵骨に発生した良性骨腫瘍の検討

第 32 回日本足の外科学会 (2007.6.22-23 長崎)

山内健輔, 土屋弘行, 他.

生きたマウスにおける癌細胞の血管外脱出と微小転移巣の画像解析

第 40 回 日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13 甲府)

西田英司, 土屋弘行, 他.

マウス骨肉腫に対する液体窒素処理による抗腫瘍効果の増強

第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13 甲府)

丹沢義一, 土屋弘行, 他.

Reconstruction using a pedicle frozen autograft for malignant bone tumor

第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13 甲府)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

再発をきたした骨巨細胞腫の治療経過の検討

第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13 甲府)

高田宗知, 土屋弘行, 他.

線維性骨異型性症に対して変形矯正および Frozen Autograft を用いた Bone Transport を施行した 1 例

第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13 甲府)

當銘保則, 土屋弘行, 他.

左大腿骨巨細胞腫膝関節固定後の偽関節に対して術後 41 年で人工膝関節置換を行った 1 例

第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13 甲府)

山内健輔, 土屋弘行, 他.

非常に稀な早老症患者 (Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome) に発症した脛骨骨肉腫の治療経験
骨軟部腫瘍セミナー (2007.8.25 倉敷)

木村浩明, 土屋弘行, 他.

大腿骨近位部骨腫瘍の 2 例

骨軟部腫瘍セミナー (2007.8.25 倉敷)

Yamauchi K, Tsuchiya H, et al.

Pretreatment with Cyclophosphamide increases intravascular proliferation of HT1080 human fibrosarcoma cells in nude mice

第 66 回日本癌学会 (2007.10.3-5 横浜)

白井寿治, 土屋弘行, 他.

悪性腫瘍と鑑別を要する Ischemic fasciitis

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

西田英司, 土屋弘行, 他.

悪性骨腫瘍に対する液体窒素処理骨再建後の免疫増強の臨床学的検討

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

丹沢義一, 土屋弘行, 他.

好酸球性肉芽腫に対し生検術のみで経過観察を行った 4 例

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

骨延長術による骨腫瘍切除後の患肢機能温存手術の長期成績

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

木村浩明, 土屋弘行, 他.

肺転移出現期別に見た骨肉腫肺転移症例の検討

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

當銘保則, 土屋弘行, 他.

悪性腫瘍と鑑別を要した Gossypiboma (ガーゼオーマ) の 4 例

第 109 回中部日本整形外科学会災害外科学会
(2007.10.4-5 奈良)

山内健輔, 土屋弘行, 他.

マウス生体内での免疫反応や化学療法における癌細胞死のリアルタイム画像解析

第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26 浜松)

西田英司, 土屋弘行, 他.

マウス骨肉腫に対する液体窒素処理による抗腫瘍効果の増強

第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26 浜松)

武内章彦, 土屋弘行, 他.

内在性分泌型 RAGE (esRAGE) の軟骨肉腫における新たな悪性度判定、予後予測因子としての有用性

第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26 浜松)

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

磁性体含有リン酸カルシウム骨ペーストを用いた骨腫瘍に対する温熱療法

分担研究者 内田 淳正 三重大学医学部整形外科 教授

研究要旨 リン酸カルシウム骨ペーストはペースト状あるいは粘土状で使用することができるために、さまざまな臨床応用が可能である。我々は、発熱体として磁性体含有リン酸カルシウム骨ペーストを用いた磁性体温熱療法を開発したので治療成績について報告する。

A. 研究目的

近年、画像診断技術の向上、骨腫瘍に対する臨床病理学的知見の蓄積、術前・術後補助化学療法の進歩、外科的手技の改良、放射線治療の進歩、重粒子線治療をはじめとする新しい治療体系の出現などを背景に、骨軟部腫瘍の治療成績は、急速に向上しつつある。しかしながら、現在においても未解決な臨床的課題が多く残されている。たとえば 1) 骨巨細胞腫のように局所活動性の高い良性骨腫瘍の治療法 2) Grade 1 軟骨肉腫のような臨床病態の明らかとなっていない低悪性度の骨腫瘍の治療法 3) 転移性骨腫瘍の効果的な治療法 などは治療者により大きく見解の分かれるところであり、標準的治療法の確立は未だなされていない。

我々は、磁性体含有リン酸カルシウム骨ペースト (calcium phosphate cement: CPC) を用いた、磁性体温熱療法を開発し、三重大学倫理委員会の承認を得て、2003 年 3 月より倫理委員会の承認のもと骨腫瘍に対して臨床試験を行っているので、その治療成績を報告する。

B. 研究方法

我々が行った磁性体温熱療法 24 例のうち発熱体として磁性体含有 CPC を用いた 14 例 15 肢を対象とした。手術時年齢は 16-69 歳 (中央値 55 歳)、経過観察期間は 3 か月-47 か月 (中央値 12 か月) である。治療部位は上腕骨 6 肢、大腿骨 3 肢、脛骨 3 肢、橈骨 3 肢であった。病理組織学的診断は骨巨細胞腫 4 例 (うち再発性骨巨細胞腫 2 例)、Grade 1 軟骨肉腫 3 例、転移性骨腫瘍 7 例 (腎癌: 2 例、肺癌、肝癌、膀胱癌、肉腫、骨髄腫: 各 1 例) である。手術は、腫瘍内病巣搔爬を行った後磁性体含有 CPC を骨欠損部に充填した。磁性体は特殊表面加工した Fe_3O_4 である。手術時、必要に応じて髓内釘またはプレートを用いて補強を行った。温熱療法は、交流磁場発生装置のシリンダー状のコイル内で、1.5MHz/4kW

の電磁場に 15 分間患肢を暴露することにより行った。温熱療法は術後 1 週より開始し、週 3 回、計 10 回行った。術後 3 ヶ月の時点で臨床および画像評価を行った。術後患肢機能は Musculoskeletal Tumor Society の患肢機能評価法により評価した。画像評価は X 線で病変の進行と骨形成を評価することにより行った。

(倫理面への配慮)

2003 年 3 月三重大学倫理委員会の承諾を得て臨床研究を開始した。治療対象者に対しては、事前に書面で十分な説明を行った上で、対象者の自由意志に基づく同意を得、各人の署名入りの同意書を保管した。また、同意しなかった場合、何らかの不利益を被るものではないことを十分に説明した。被験者各人の署名入りの同意書は、三重大学医学部整形外科 (研究責任者) が保管し、同意を得た旨を診療録に記載した。

C. 研究結果

全例術後疼痛および患肢機能の改善が得られ、術後 3 ヶ月の時点での患肢機能は上肢が 90~100% (平均 97%)、下肢が 67~100% (平均 79%) であった。X 線による画像評価は Excellent が 4 肢 (27%)、Good 11 肢 (73%) Poor 0 肢 (0%) であった。合併症として磁場暴露中の熱感を 3 例に認めたが磁場強度を減弱させることで速やかに熱感は消失した。肺癌症例で再発を 1 例に認めたが、放射線治療で局所コントロールが可能であった。

D. 考察

腫瘍に対する温熱療法は 1950 年代の初頭から主に進行癌の治療方法として盛んに研究されてきた。現在では再発性の直腸癌、前立腺癌、子宮癌、頭頸部癌、肺癌、乳癌などに臨床応用されその有用性が立証されている。温熱療法による腫瘍細胞死のメカニズムは未だ不明な点が多いが、40℃から 45℃に

加温すると多くの腫瘍細胞はアポトーシスを来すことが実験的に証明されている。癌腫への加温方法はマイクロウェーブ、超音波、温水槽などの外部熱源を用いていることが多い。しかし、これら外部熱源による骨腫瘍の加温は、1)骨は体の深部に位置していること 2) 骨髄は血流が多いため十分に加温することが困難であること 3)腫瘍周辺組織へのダメージも大きいこと 等の理由から効果的な治療効果を得ることは困難だと考えられてきた。

京大の小久保らは磁性体に交流磁場を加えるとエネルギー転換が生じ発熱する現象を応用して、加温処理し析出させたガラスセラミックに交流磁場を加える局所温熱療法を開発し最初に報告した。一方、我々は熱源である磁性体 (Fe_3O_4) と混和する基材として当初可塑性にすぐれた BIS-GMA-based resin に注目し、動物実験で転移性骨腫瘍に対する抗腫瘍効果を示した。その後、臨床に応用するため交流磁場派生装置の小型化に着手し、磁性体と混和する基材として CPC に注目して発熱による抗腫瘍効果、強度などの基礎的実験を進めた。CPC はペースト状あるいは粘土状で使うことができるために、操作性が良く、骨欠損部に隙間無く充填でき、高い圧縮強度と優れた骨親和性を有した骨充填剤であり、すでに骨腫瘍の領域においても広く用いられていることから磁性体と混和する基材として最も適した基材と考えられた。そこで我々は、磁性体含有 CPC を用いた骨腫瘍に対する温熱療法を、2003年3月より倫理委員会の承認のもと開始した。

今回の臨床研究の結果、患肢機能、X線評価は良好であり、臨床上問題となる合併症は認めなかったことから、磁性体含有 CPC を用いた温熱療法は骨腫瘍に対して有効な治療法と考えられた。今後この温熱療法が標準的治療となるには、よりコンパクトな磁場発生装置の開発、より長期にわたる経過観察が必要であると考えられる。

E. 結論

我々は、発熱体として磁性体含有 CPC を用いた温熱療法を開発し、14例15肢の骨腫瘍に臨床応用した。術後患肢機能、X線評価は良好であり、臨床上問題となる合併症は認めなかった。骨腫瘍に対する磁性体含有 CPC を用いた温熱療法は、安全で有望な治療法である。

F. 健康危険情報

特に健康に危険と思われる情報は発生しなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hoki Y, Uchida A, et al.

iNOS-dependent DNA damage in patients with malignant fibrous histiocytoma in relation to prognosis.

Cancer Sci. 98(2): 163-168, 2007

Erratum in: Cancer Sci, 98(3): 464, 2007

Kusuzaki K, Uchida A, et al.

Review. Acridine orange could be an innovative anticancer agent under photon energy.

In Vivo, 21(2): 205-214, 2007

Matsumine A, Uchida A, et al.

Novel hyperthermia for metastatic bone tumors with magnetic materials by generating an alternating electromagnetic field.

Clin Exp Metastasis, 24(3): 191-200, 2007

Maeda M, Uchida A, et al.

Soft-tissue tumors evaluated by line-scan diffusion-weighted imaging: influence of myxoid matrix on the apparent diffusion coefficient.

J Magn Reson Imaging, 25(6): 1199-1204, 2007

Matsumine A, Uchida A, et al.

Expression of decorin, a small leucine-rich proteoglycan, as a prognostic factor in soft tissue tumors.

J Surg Oncol, 96(5): 411-418, 2007

Miyazaki S, Uchida A, et al.

Methylthioadenosine phosphorylase deficiency in Japanese osteosarcoma patients.

Int J Oncol, 31(5): 1069-1076, 2007

Hoki Y, Uchida A, et al.

8-Nitroguanine as a potential biomarker for progression of malignant fibrous histiocytoma, a model of inflammation-related cancer.

Oncol Rep, 18(5): 1165-1169, 2007

Satonaka H, Uchida A, et al.

Flash wave light strongly enhanced the cytotoxic effect of photodynamic therapy with acridine orange on a mouse osteosarcoma cell line.

Anticancer Res, 27(5A): 3339-3344, 2007

Niimi R, Uchida A, et al. Primary osteosarcoma of the lung: a case report and review of the literature. Med Oncol, in press

2. 学会発表

Wakabayashi T, Uchida A, et al.

Fibulin-3 suppresses the synthesis cartilage matrix in chondrogenic cell line ATDC5 in vitro. 53rd Annual Meeting Orthopaedic Research Society(2007.2.11-14)

Satonaka H, Uchida A, et al.

Photodynamic detection of mouse osteosarcoma in the soft tissues utilizing fluorovisualization effect of acridine orange. 53rd Annual Meeting Orthopaedic Research Society (2007.2.11-14)

Kusuzaki K, Uchida A, et al.

Acridine Orange could be an innovative anticancer agent under photon energy. 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14)

Atsumi S, Uchida A, et al.

A case of Ewing's sarcoma of the scapula, accompanying with diffuse osteosclerotic lesion of the pelvis 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14)

Matsumine A, Uchida A, et al.

Novel hyperthermia for metastasis bone tumors with magnetic materials by generating an alternating electromagnetic field 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14)

Satonaka H, Uchida A, et al.

Extracorporeal Photodynamic Image Detection of Mouse Osteosarcoma in Soft Tissue Utilizing Fluorovisualization Effect of Acridine Orange. 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14)

Satonaka H, Uchida A, et al.

Flash Wave Light Strongly Enhanced the Cytocidal Effect of Photodynamic Therapy with Acridine Orange on a Mouse Osteosarcoma Cell Line. 14th International Symposium on Limb Salvage (2007.9.11-14)

松原孝夫, 内田淳正, 他.

磁性体含有リン酸カルシウム骨ペーストを用いた転移性骨腫瘍に対する温熱療法 第108回中部日本整形外科災害外科学術集会 (2007.4.13-14)

松峯昭彦, 内田淳正, 他.

体外交流電磁場発生装置を用いた転移性骨腫瘍に対する磁性体温熱療法 第80回日本整形外科学会学術総会(2007.5.24-27)

松原孝夫, 内田淳正, 他.

前腕・手部悪性骨・軟部腫瘍に対する広範切除術と低侵襲手術の治療成績の比較 第80回日本整形外科学会学術総会 (2007.5.24-27)

里中東彦, 内田淳正, 他.

骨・軟部肉腫に対するストロボ光を用いたアクリジンオレンジ光線力学的療法の抗腫瘍効果 第80回日本整形外科学会学術総会 (2007.5.24-27)

渥美寛, 内田淳正, 他.

骨軟化を伴う多発性骨腫瘍の1例 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13)

松峯昭彦, 内田淳正, 他.

仙骨脊索腫の外科的治療成績 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13)

松原孝夫, 内田淳正, 他.

大腿骨遠位骨腫瘍に用いたセメントレス KLS Knee System の治療成績 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13)

新美壘, 内田淳正, 他.

下腿遠位に発症した骨・軟部肉腫に対する患肢温存手術の有用性 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13)

里中東彦, 内田淳正, 他.

マウス骨肉腫に対するストロボ光を用いたアクリジンオレンジ光線力学的療法の in vivo における抗腫瘍効果 第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12-13)

若林徹, 内田淳正, 他.

Ewinb 肉腫/PNET の治療成績の検討
第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13)

植村剛, 内田淳正, 他.

上腕部に発生した Extranodal Follicular Dendritic Cell
Sarcoma の 1 例
第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会
(2007.7.12-13)

若林徹, 内田淳正, 他.

Fibulin-3 タンパクはマウス軟骨前駆細胞株: ATDC5
の分化を抑制する
第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26)

松原孝夫, 内田淳正, 他.

悪性骨・軟部腫瘍に対する核酸製剤注入療法の開発
第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26)

里中東彦, 内田淳正, 他.

マウス骨肉腫に対するアクリジンオレンジ光線力
学療法の肺転移抑制効果
第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会
(2007.10.25-26)

松原孝夫, 内田淳正, 他.

アクリジンオレンジを用いた光線力学的療法の腫
瘍外科手術への応用 第 22 回日本整形外科学会基
礎学術集会 (2007.10.25-26)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

骨肉腫に対する抗血管新生治療としてのメトロノーム化学療法の有用性に関する研究

分担研究者 矢部 啓夫 慶應義塾大学医学部整形外科 講師

研究要旨 骨肉腫の治療成績は、近年の化学療法の進歩により著しい改善がみられた。しかし、保険適応薬剤に対する反応不良例や入院医療費の包括化に伴う現行化学療法プロトコルへの経済的制約など、様々な問題点もある。通常、抗癌剤の抗腫瘍効果は薬剤の血中濃度に依存するといわれている。しかし、その副作用発現も同様であり、多くの癌患者は抗癌剤治療に伴う副作用に苦しんでいるのが現状である。近年、各種癌組織に比較的特異性を持って発現し、腫瘍の悪性度に関連する分子を標的とした分子標的治療が注目されている。われわれ整形外科領域の腫瘍においても、分子標的治療薬が徐々に導入されつつあるが、いまだ十分な効果は得られていない。最近、既存の抗癌剤を低濃度で腫瘍組織に接触させることで、抗血管新生作用を発揮する可能性がいわれている。この概念を利用し、低用量の抗癌剤を繰り返し投与するメトロノーム化学療法が注目されている。今回このメトロノーム化学療法が、骨肉腫に対する抗血管新生療法となりうるか明らかにするため、低濃度抗癌剤の血管新生阻害作用を中心に研究を行った。

A. 研究目的

骨肉腫に対する低用量既存抗癌剤を用いた抗血管新生療法の臨床応用をめざし、低濃度の既存抗癌剤が血管新生に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

ヒト骨肉腫細胞株として MG63 と HOS を、また血管内皮細胞として HUVEC を使用し、抗癌剤は、MTX と ADM を用いた。腫瘍細胞の増殖に与える影響は XTT assay を用いて検討した。また血管新生に与える影響は腫瘍細胞が産生する VEGF を ELISA 法で、また HUVEC の増殖・tube formation に与える影響を、線維芽細胞と HUVEC の重層培養法・イメージアナライザーを用いて定量評価した。

（倫理面への配慮）

本研究は、主に骨肉腫細胞株を用いた基礎的研究であり、人又は実験動物を研究対象としていない。

C. 研究結果

MTX は $10^{-7}M$ 、ADM は $10^{-8}M$ 以下の濃度では MG63・HOS いずれの細胞増殖にも影響を与えなかった。しかし、MTX は同濃度で MG63・HOS における VEGF 産生を抑制し、ADM を併用した場合 $10^{-8}M$ でも同様の効果がみられた。また ADM は、 $10^{-9}M$ の濃度において HUVEC の増殖・tube formation を阻害し、同濃度の MTX を併用することでこの効果は促進された。また血管新生阻害作用のあるエンドスタチン $1\mu g/ml$ やビスフォスフォネート製剤で

あるアレンドロネート $1\mu M$ にさらに低濃度の $10^{-10}M$ の MTX+ADM を加えると、エンドスタチンとアレンドロネートの血管新生抑制効果は増強された。これらの研究結果についてまとめと若干の補足をを行うと以下ようになる。

MTX および ADM の既存抗癌剤は、殺腫瘍効果を目的とした通常投与量の 1/10 から 1/100 の濃度で抗血管新生作用を示した。またこれらの低濃度抗癌剤は、腫瘍細胞における VEGF の発現をタンパクレベルで低下させた、線維芽細胞と血管内皮細胞の重層培養系では、血管内皮細胞の増殖を抑制した。実験データは示さなかったが、VEGF の発現については遺伝子レベルでも低下させた。またこれらの濃度では、用いた抗癌剤は腫瘍細胞の増殖に影響を与えなかった。

D. 考察

骨肉腫の予後改善のためには、肺転移をいかにコントロールするかが重要な因子と考えられている。肺転移の形成には血管新生が重要なステップである。実際、骨肉腫においては腫瘍内血管密度と予後に相関が見られることが報告されている。つまり、腫瘍血管新生の盛んな腫瘍は、腫瘍内血管密度が高まり遠隔転移をきたしやすいことになる。現行の化学療法は、腫瘍細胞そのものを標的にした治療であり、化学療法感受性のある腫瘍では高い腫瘍壊死率が得られる。しかし、化学療法感受性の低い腫瘍や再発・転移例などでは化学療法抵抗性であることが

多く、治療に対する新しいアプローチが必要である。抗血管新生療法は腫瘍細胞の血管新生因子発現やそれにより増加する腫瘍血管を標的としており、これに関しては薬剤耐性が存在しないといわれている。1997年 Folkman らは内在性血管新生阻害因子であるエンドスタチンを担癌マウスに投与し、腫瘍血管新生の制御により腫瘍増殖を抑制しうることを示した。しかし、臨床試験ではエンドスタチン単剤での有効性は確認されなかった。われわれは以前からこの点に着目し、既存の血管新生阻害剤であるエンドスタチンや血管新生阻害作用のある化合物ビスフォスフォネートを用いた *in vitro* および *in vivo* の実験を行ってきた。しかし、これらの薬剤単独では臨床応用できる十分な効果は発揮できないと考えている。そこで、低用量抗癌剤を用いたメトロノーム化学療法単独または既存の血管新生阻害剤との併用により、既存の血管新生阻害剤単独に比較して強い腫瘍転移抑制を発揮できるのではないかと考えている。今回の研究により直接腫瘍細胞を殺傷しない低濃度の既存抗癌剤が血管新生阻害作用を有することを示し、また既存の血管新生阻害剤との併用による抗血管新生作用の相乗効果を明らかにした。この概念に基づいた化学療法は、いわゆる肉眼的担癌状態に対する抗腫瘍効果は低いと思われるが、転移抑制などの術後化学療法として外来治療可能かつ安全な維持化学療法となる可能性がある。

E. 結論

骨肉腫細胞株を用いた本研究により、直接腫瘍細胞を殺傷しない低濃度の既存抗癌剤が血管新生阻害作用を示すことが明らかとなった。またこれらの作用は既存の血管新生阻害剤との併用により相乗的に増加することが明らかとなった。この研究結果に基づいた化学療法は、いわゆる肉眼的担癌状態に対する抗腫瘍効果は低いと思われるが、転移抑制などの術後化学療法として有用となる可能性が示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kawai A, Yabe H, et al. Clear cell sarcoma of tendons and aponeuroses: a study of 75 patients. *Cancer*, 109: 109-116, 2007

Akatsu T, Yabe H, et al. Pancreatic metastasis from musculoskeletal sarcoma: a case report with malignant fibrous histiocytoma and review of the literature. *Dig Dis Sci*. 52: 1958-1963, 2007

Yabe H, Yabe H, et al. Overexpression of papillomavirus binding factor in Ewing's sarcoma family of tumors conferring poor prognosis. *Oncol Rep*.19(1):129-134, 2008

Obata H, Yabe H, et al. Clinical outcome of patients with Ewing sarcoma family of tumors of bone in Japan: the Japanese Musculoskeletal Oncology Group cooperative study. *Cancer*. 109(4): 767-75, 2007

Hashimoto J, Yabe H, et al. Japanese Committee on Clinical Guidelines of Diagnosis and Treatment of Paget's Disease of Bone of the Japan Osteoporosis Society. Prevalence and clinical features of Paget's disease of bone in Japan. *J Bone Miner Metab*, 24:186-190, 2007

吉山 晶, 矢部啓夫, 他. 腎細胞癌骨転移に対する外科的治療. *東日本整災誌*, 19: 53-56, 2007

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他. 「運動器の10年」運動器移植・再生医療の現況と展望: 全国アンケート調査を含めて. 骨腫瘍切除後再建材料としての同種骨移植の意義と問題点. *日整会誌*,81(12): 1032-1038, 2007

鈴木禎寿, 矢部啓夫, 他. 転移性骨腫瘍による病的骨折の治療. 四肢転移性骨腫瘍の外科的治療—術後機能および予後から見た手術適応を中心に— *日整会誌* 81(5), 330-334, 2007

2. 学会発表

Kikuta K, Yabe H, et al. Clinical outcome of 27 constrained hip prostheses for reconstruction after resection of malignant pelvic tumors. 14th International Symposium on Limb Salvage. (2007. 9.11-14 Hamburg. Germany)

Susa M, Yabe H, et al. Surgical treatment for low grade chondrosarcoma. 14th International Symposium on Limb Salvage. (2007. 9.11-14 Hamburg. Germany)

Anazawa U, Yabe H, et al. Dedifferentiated liposarcoma of the extremities: A study of 45 patients.
14th International Symposium on Limb Salvage.
(2007. 9.11-14 Hamburg. Germany)

Nakayama R, Yabe H, et al.
Association of polymorphisms in DNA repair genes with susceptibility of bone and soft tissue sarcomas.
14th International Symposium on Limb Salvage.
(2007. 9.11-14 Hamburg. Germany)

Yabe H, Yabe H, et al. linical outcomes of bone and soft tissue sarcoma of the foot and ankle.
14th International Symposium on Limb Salvage.
(2007. 9.11-14 Hamburg. Germany)

松本守雄, 矢部啓夫, 他.
原発性仙骨腫瘍の手術成績と問題点.
第 36 回日本脊椎脊髄病学会 (2007.4. 金沢)

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他. 類骨骨腫に対する CT ガイド下経皮的切除 その適応と手技に関する問題点.
第 80 回日本整形外科学会学術集会 (2007. 5. 神戸)

鈴木禎寿, 矢部啓夫, 他. 仙骨巨細胞腫の治療成績.
第 80 回日本整形外科学会学術集会 (2007. 5. 神戸)

矢部啓夫, 他.
骨・軟部腫瘍に関する多施設共同研究における骨軟部肉腫治療研究会の役割. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : シンポジウム (2007.7. 甲府)

渡部逸央, 矢部啓夫, 他. 腹壁外デスマイドの治療成績. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : パネル (2007.7. 甲府)

須佐美知郎, 矢部啓夫, 他. Hemipelvectomy 施行後の広範な皮膚欠損部の切断肢を用いた再建法. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : パネル (2007.7. 甲府)

森岡秀夫, 矢部啓夫, 他. 悪性骨・軟部腫瘍診療における DPC 導入の影響について.
第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : パネル (2007.7. 甲府)

奥山訓子, 矢部啓夫, 他. 多発性骨軟骨腫により生じた前腕変形の再建. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : パネル (2007.7 甲府)

鈴木禎寿, 矢部啓夫, 他. 悪性骨腫瘍切除後広範囲骨欠損に対する同種骨移植の適応と問題点. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : シンポジウム (2007.7. 甲府)

穴澤卯圭, 矢部啓夫, 他. 粘液型脂肪肉腫の切除縁の検討. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : シンポジウム (2007.7. 甲府)

須佐美知郎, 矢部啓夫, 他. 低悪性度軟骨肉腫に対する外科的治療. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 : シンポジウム (2007.7. 甲府)

宮本裕也, 矢部啓夫, 他. 慢性骨髄炎に続発した骨盤部扁平上皮癌の 1 例. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

下沢 寛, 矢部啓夫, 他. 脊髄円錐部に発生した骨外性 Ewing 肉腫/PNET の 1 例. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

吉山 晶, 矢部啓夫, 他. 胞巣状軟部肉腫の治療成績. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

穴澤卯圭, 矢部啓夫, 他. 脱分化型脂肪肉腫の治療成績 JMOG 多施設共同研究. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

鈴木禎寿, 矢部啓夫, 他. 骨・軟部腫瘍診療における拡散強調 MR 画像の有用性の検討. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

竹内克仁, 矢部啓夫, 他. 骨肉腫に対するメトロノーム化学療法の抗血管新生作用. 第 40 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (2007.7. 甲府)

高橋洋平, 矢部啓夫, 他. 大腿骨線維性異形成に続発した 2 次性骨肉腫の 1 例. 第 56 回東日本整形災害外科学会 (2007.9.21-22 軽井沢)

清木祐子, 矢部啓夫, 他. 悪性骨・軟部腫瘍に対する化学療法後の感染対策マニュアルの作成. 第 56 回東日本整形災害外科学会 (2007.9.21-22 軽井沢)

西村空也, 矢部啓夫, 他. 恥骨に発生した骨膜性軟骨肉腫の 1 例. 第 640 回整形外科集談会 東京地方会 (2007.9.29 東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

進行期肉腫に対するイリノテカンを用いた化学療法

分担研究者 横山 良平 九州がんセンター整形外科（骨軟科） 医長

研究要旨 肉腫に対するイリノテカンの有用性を検討することを目的として、標準的治療終了後に転移あるいは切除不可能な再発を来した肉腫患者を対象としてイリノテカンを投与した。19人に対して投与し、評価可能であった17人中、4人でPRが得られ、6人はSDであった。成人型軟部肉腫11例に限っても、PR2例、SD5例であり、比較的良好な反応であったと考えられる。有害事象では下痢と白血球減少、好中球減少の頻度が高かったが、1例を除き投与規制因子とはならなかった。今後、肉腫を対象とした第Ⅲ相臨床試験を行う価値があると考えられた。

A. 研究目的

塩酸イリノテカンは肺癌、大腸癌、卵巣癌など幅広い癌腫に対して用いられ、神経芽腫などの小児腫瘍でもその有用性が認められているが、成人型肉腫に対しての有用性は明らかにされていない。そこで、肉腫に対するイリノテカンの有用性を検討することを目的として研究を行った。

B. 研究方法

2003年1月以降に再発や転移を有する患者の中で、既に標準的な化学療法が施行された者を対象とした。対象は19人で、年齢は17歳から69歳、平均35.4歳、中央値32歳であった。男11、女8人であった。診断は、悪性線維性組織球腫（MFH）4例、滑膜肉腫3例、Ewing肉腫ファミリー腫瘍（ESFT）3例、悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）2例、骨肉腫2例、平滑筋肉腫、粘液型脂肪肉腫、間葉性軟骨肉腫、横紋筋肉腫、傍神経節腫が各1例であった。塩酸イリノテカンの投与方法は、円形細胞肉腫や年齢が20歳未満の患者に対しては原則として1日20mg/m²の5日間投与を2週連続で行い、1~2週間の休薬の後これを繰り返すこととした。一方成人型肉腫の患者には100mg/m²を第1、8日に投与し、3週ごとにこれを繰り返すこととした。2コース終了後に効果判定し、奏効（CRおよびPR）もしくは進行が見られない（SD）者には投与を継続した。既に標準的治療が施行されたあとの状態で有効性が期待される治療がないこと、考えられる副作用を説明した後、同意が得られた患者に対して治療を行った。

C. 研究結果

19人中17人で効果判定が可能であった。PR4人、SD6人、PD7人であった。PRが得られたのは、ESFT

とMFHがそれぞれ2人であった。評価可能であった17例からESFTおよび横紋筋肉腫と骨肉腫を除いた成人型軟部肉腫は11例であり、そのうち2例がPRであり、5例がSDであった。腫瘍の縮小はSDもしくはPDの患者のうち3人では腹水の減少や、腫瘍に起因する疼痛が減少した。有害事象では下痢と血液毒性が主であった。嘔りは13人に見られ、CTCAE ver3.0のgradeで、1が5人、2が4人、3が4人であり、全コースを通じてほぼ同じであった。白血球および好中球減少は14人に見られたが、前治療として骨髄抑制が強い化学療法を長期に受けていた患者3人と全身状態が悪かった（PS3）の1人がgrade4であったが、grade1が4人、grade2が5人、grade3が1人であった。Grade3以上の血小板減少が3人に見られたが、これも白血球・好中球減少がgrade4であった患者に限られていた。副作用による投与中止はPS3であった患者のみであった。

D. 考察

ESFTを含む小児腫瘍ではイリノテカンの有用性が示唆されており、今回ESFT4例中2例に効果が見られたことは、この知見に合致するものと思われる。しかし成人型軟部肉腫11例中MFHの2例がPRを示しており、SDも5例であった。これらの患者が前治療としてIfosfamideとAdriamycin、その他の抗がん剤を投与されていたことを考慮すると比較的良好な結果と考えられる。

E. 結論

イリノテカンは成人型軟部肉腫に対しても有効である可能性が高く、今後軟部肉腫を対象とした臨床試験を行う価値があると考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Oda Y, Yokoyama R, et al.

Diffuse-type giant cell tumor/pigmented villonodular synovitis arising in the sacrum: Malignant form.

Pathol Int , 57(9): 627-631, 2007.

Takahashi D, Yokoyama R, et al.

Primary Ewing's Sarcoma Family Tumors of the lung.

A case report and review of the literature.

Jpn J Clin Oncol, 37(11):874-877, 2007

横山良平. (分担執筆)

骨腫瘍.

別所文雄, 杉本徹, 横森欣司 (編)

新小児がんの診断と治療. pp 307-310.

診断と治療社, 東京, 2007

斎藤祐介, 横山良平, 他.

ホジキンリンパ腫瘍の治療後に発症した二次がんの2例. 日小血会誌 21 : 172-175, 2007

2. 学会発表

横山良平.

シンポジウム「整形外科医のための骨・軟部腫瘍」:

悪性軟部腫瘍の診断と治療.

第80回日本整形外科学会総会, 神戸, 2007.

横山良平, 他.

限局性 Ewing 肉腫ファミリー腫瘍に対する集学的治療—日本 Ewing 肉腫研究グループ (JESS) の設立と現状報告.

第40回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会, 甲府, 2007

木村岳弘, 横山良平, 他.

当院における Ewing 肉腫ファミリー腫瘍の治療成績. 第114回西日本整形・災害外科学会, 鹿児島, 2007

飯田圭一郎, 横山良平, 他.

PETにて原発巣が判明した明細胞肉腫の一例.

第114回西日本整形・災害外科学会, 鹿児島, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし

高悪性度軟部腫瘍に対する標準的治療法の確立に関する研究

分担研究者 戸口田 淳也 京都大学再生医科学研究所 組織再生応用分野 教授

研究要旨 前年度までの研究により、紡錘形細胞肉腫遺伝子の生命予後関連遺伝子として単離同定した C7059 (仮称) 遺伝子に関する研究を引き続いて行った。C7059 蛋白はアクチンと結合する細胞質蛋白であり、免疫組織染色では、特に血管周囲から内腔へ浸潤しようとする細胞で強陽性であった。siRNA による発現抑制及び発現ベクターによる強制発現実験の結果より、C7059 は細胞運動及び浸潤能に関連した機能をもつと考えられ、結合が判明した蛋白の機能からもこの仮説は支持されるものであった。

A. 研究目的

紡錘形肉腫の多くは、現行の化学療法に対して抵抗性であり、転移を予防する有力な手段は無い。治療の標的となる因子を同定するために、網羅的遺伝子発現解析を行い、予後とその発現が相関する遺伝子として C7059 (仮称) を同定した。今年度は C7059 蛋白の機能解析を試みた。

B. 研究方法

C7059 タンパクの N 端ポリペプチドを抗原として作成したポリクローナル抗体を用いて、免疫細胞染色及び免疫組織染色を行い、C7059 蛋白の局在と組織内での陽性細胞の動態を観察した。培養肉腫細胞における発現を解析し、高発現株に対して、siRNA による発現抑制の影響を解析した。更に研究者らが樹立した不死化ヒト間葉系幹細胞に導入し、安定発現株を得て、その生物学手表現型を *in vitro* 及び *in vivo* で解析した。機能的に関連する蛋白の同定を目的に、候補蛋白との結合を免疫共沈降法により解析した。

倫理面への配慮：ヒト肉腫組織からの RNA 抽出及び発現解析実験は、京都大学医学部医の倫理委員会により承認された実験として行った。

C. 研究結果

1) C7059 蛋白の局在

作成した抗体により、C7059 蛋白は細胞質と核に陽性であったが、染色性に腫瘍内での多様性が認められ、特に血管周囲にあり、腔内に突出しようとする部位で強陽性であった。予後との相関を見ると、細胞質陽性の腫瘍が予後不良の傾向が認められた。

2) C7059 蛋白の機能解析

C7059 陽性培養肉腫細胞において、特異的 siRNA に

よりその発現を抑制すると増殖能は影響されないが、浸潤能が抑制されることが判明した。逆に陰性肉腫細胞において一過性に過剰発現させると浸潤能が亢進した。更にレンチウィルスベクターにより不死化ヒト間葉系幹細胞に導入し、得られた安定発現細胞株は、細胞浸潤能が著しく亢進し、足場非依存性増殖能も獲得された。陰性肉腫細胞及び不死化ヒト間葉系幹細胞により作成した安定発現細胞株を免疫不全マウスに接種したところ、対照と比較して造腫瘍能が亢進していた。

3) C7059 結合蛋白の同定

免疫細胞染色及び免疫沈降法により Src 結合蛋白であることが判明していたが、更に偽足において、細胞運動に関連する蛋白と結合する事が判明し、細胞運動、浸潤との関連性を示唆する結果が得られた。

D. 考察

免疫組織染色により、同一腫瘍内で発現レベルに相違がある場合があることは、全体として発現レベルが高くない腫瘍において、転移浸潤に関与している場合もありうることを示すものである。転移に関連していることを示す *in vivo* の結果は、まだ得られていないが、細胞内局在及び結合する蛋白から、細胞運動、浸潤に関連する機能をもつことは明らかであり、機能ドメインの検索から、治療につながる知見を得ることを目標としている。

E. 結論

紡錘形細胞肉腫の生命予後に関連する遺伝子を同定し、その機能解析を行ったところ、規定する蛋白は、細胞浸潤能に関与する蛋白であることが判明し、機能抑制による治療への応用を検討している。

F. 健康危険情報

手術切除標本を用いた解析であり、関連する健康危険情報は無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

Shima Y, Toguchida J, et al.

In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-ras^{Val12}.

Biochem Biophys Res Commun, 353(1): 60-66, 2007

Kageyama S, Toguchida J, et al.

A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma.

Proteomics Clin Appl, 1: 192-199, 2007

Shibata K, Toguchida J, et al.

Expression of the p16INK4A gene is associated closely with senescence of human mesenchymal stem cells, and potentially silenced by DNA methylation during in vitro expansion. Stem Cells, 25(9): 2371-2382, 2007

Aoyama T, Toguchida J, et al.

Cell-specific epigenetic regulation of ChM-I gene expression: crosstalk between DNA methylation and histone acetylation.

Biochem Biophys Res Commun, 365(1): 124-130, 2008

Fukiage K, Toguchida J, et al.

Expression of vascular cell adhesion molecule-1 indicates the differentiation potential of human bone marrow stromal cells.

Biochem Biophys Res Commun. 365(3): 406-412, 2008

Osone S, Toguchida J, et al.

A case of a Ewing sarcoma family tumor in the urinary bladder after treatment for acute lymphoblastic leukemia.

J Pediatr Hematol Oncol, 29(12): 841-844, 2007

2. 学会発表

Fukiage K, Toguchida J, et al.

Identification of the CD marker associated with differentiation potential of human bone marrow stromal cells.

第5回 ISSCR (2007.6.17 Cairns)

Otsuka S, Toguchida J, et al.

Some osteosarcomas have multidirectional differentiation potential suggested that these cells may derive directly from mesenchymal stem cells.

第5回 ISSCR (2007.6.19 Cairns)

Aoyama T, Toguchida J, et al.

Chondrogenesis is induced by TGFβ3 positive-feedback mechanism in human mesenchymal stem cells.

第5回 ISSCR (2007.6.20 Cairns)

Shibata K, Toguchida J, et al.

Expression of p16INK4A is a key regulator of cell growth in mesenchymal stem cells.

第5回 ISSCR (2007.6.20 Cairns)

Furu M, Toguchida J, et al.

Isolation and functional analysis of a novel protein identified as the prognostic factor in spindle cell sarcomas. 第5回 SIROT (2007.8.31 Marrakech)

Kohno Y, Toguchida J, et al.

Relationship among CLDN7, ELF3, and Snail in the formation of the epithelial structures in synovial sarcomas. 第5回 SIROT (2007.8.31 Marrakech)

Furu M, Toguchida J, et al.

Isolation and functional analysis of a novel protein associated with the distant metastases of spindle cell sarcomas. 第13回 CTOS (2007.11.2 Seattle)

Otsuka S, Toguchida J, et al.

Multidirectional differentiation property like mesenchymal stem cells of osteosarcomas in vitro and in vivo. 第13回 CTOS (2007.11.2 Seattle)

Kohno Y, Toguchida J, et al.

Snail is negative regulator controlling the construction of epithelial structures in SS.

第13回 CTOS (2007.11.2 Seattle)

大塚聖視, 戸口田淳也, 他.

多分化能からみた骨肉腫細胞の起源.

第14回小児固形腫瘍研究会 (2007.4.27 京都)

布留守敏, 戸口田淳也, 他.

紡錘形軟部肉腫における生命予後因子 C7059 の解析. 第28回近畿肉腫研究会 (2007.6.9 京都)

戸口田淳也, 他.

網羅的遺伝子発現解析からの紡錘形細胞肉腫における生命予後関連因子の単離. 第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12 甲府)

嶋靖子, 戸口田淳也, 他.

間葉系幹細胞初代培養系における癌化関連遺伝子の変異解析.

第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2006.7.6 札幌)

布留守敏, 戸口田淳也, 他.

紡錘形軟部肉腫における生命予後関連因子としての新規遺伝子 C7059 の単離と機能解析.

第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12 甲府)

大塚聖視, 戸口田淳也, 他.

培養骨肉腫細胞のもつ間葉系幹細胞様の多分化能.

第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12 甲府)

光野芳樹, 戸口田淳也, 他.

滑膜肉腫の上皮構造形成における CLDN7、ELF3 および Snail の関連性について.

第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2007.7.12 甲府)

中山富貴, 戸口田淳也, 他.

四肢骨巨細胞腫の治療成績.

第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 (2007.7.13 甲府)

福川千香子, 戸口田淳也, 他.

イットリウム 90-抗 FZD10 モノクローナル抗体による滑膜肉腫抗体治療の検討.

第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.3 横浜)

大塚聖視, 戸口田淳也, 他.

Some osteosarcomas have multidirectional differentiation potential like mesenchymal stem cells in vitro and in vivo.

第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.3 横浜)

布留守敏, 戸口田淳也, 他.

Isolation and functional analysis of a novel protein associated with the distant metastases of spindle cell sarcomas.

第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.4 横浜)

光野芳樹, 戸口田淳也, 他.

Snail is negative regulator controlling the construction of epithelial structures in SS.

第 66 回日本癌学会総会 (2007.10.4 横浜)

布留守敏, 戸口田淳也, 他.

紡錘形軟部肉腫における生命予後因子 C7059 と細胞浸潤能の解析. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2007.10.25 浜松)

光野芳樹, 戸口田淳也, 他.

滑膜肉腫の上皮構造形成における CLDN7、ELF3 および Snail の関連性について. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2007.10.26 浜松)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

「肉腫予後判定因子及び移転阻害薬」出願中
(特願 2007-145827)

2. 実用新案登録

特になし

3. その他

特になし