

2013年 2月 15日

公益財団法人 笹川記念保健協力財団
理事長 紀伊國 献三 殿

所属機関・職 公立大学法人奈良県立医科大学
学内講師（整形外科学）
研究代表者氏名 城戸 順



2012年度研究助成に係る 研究報告書の提出について

標記について、下記のとおり報告いたします。

記

1 研究課題 骨転移を有する進行期癌患者のQOL向上と維持に関する前むき観察研究

2 研究期間 2012年 4月 1日 ~ 2013年 2月 15日

3 研究報告書 別紙のとおり

2013年 2月 15日

2012年度笹川記念保健協力財団

研究報告書

研究課題

骨転移を有する進行期癌患者のQOL向上と維持に関する前向き観察研究

所属機関・職 公立大学法人奈良県立医科大学

研究代表者氏名 城戸 顯



I 研究の目的・方法

従来、がんの骨転移は死の予兆であった。病的骨折は骨癒合を得られず、患者は寝たきりの状態でオピオイド抵抗性の痛みに耐えるしか無い。このように骨転移はただでさえ進行期がんに苦しむ患者の QOL を著しく損なう。われわれの施設では 2009 年より骨転移キャンサーボードを設置し、整形外科医と放射線治療医を中心にがん診療各科と連携して診療にあたり、がん患者の QOL 向上と維持につとめ、患者の社会復帰を支援してきた。本研究の目的は奈良医大附属病院にて骨転移診療を受ける進行期がん患者について、前むき観察研究の手法を用いて QOL 向上と維持に寄与する要因を明らかにすることである。登録期間を H24.4.1.-H24.6.31. とし、追跡期間を H24.7.1-H24.12.31. として目標症例数 40 名（実登録数 37 名）について、臨床所見の経過（原発がん治療科受診時、外来化学療法室受診時および骨転移外来（整形外科）定期受診時に所見採取）を当院キャンサーボードにて検討し、追跡終了後、データ解析を開始した。本研究は治療介入（治療選択肢による患者割り付け）を行わないので、研究参加によって患者が標準的な治療機会を失うことの無い臨床研究と考えられる。

II 研究の内容・実施経過

（1）申請時の計画に沿った遂行

本研究は登録・追跡期間を計 9 ヶ月間とする前向き観察研究である。研究は本学倫理委員会の承認後開始しインフォームドコンセントを得て行った。計画時に予定していた項目は観察・検査項目：患者背景情報、理学所見、画像診断、臨床検査（採血・尿）、病理診断、骨強度（骨密度と骨質：TRACP 5b, NTX, ICTP）

質問表: Visual Analogue Scale(VAS), EORTC QOL-BM22, McGill 疼痛質問表
(整形外来での質問表を用いて QOL の評価と痛みの評価を行う)、治療内容 (オピオイド、鎮痛補助薬、放射線治療・手術の有無) であった。また観察・検査スケジュールは i)初診時はキャンサーボードにて全項目を評価する。ii)以降 6 週間乃至は 8 週間ごとに骨転移外来 (整形外科) を定期受診し単純レ線撮影と臨床検査、質問表、骨強度、理学所見の採取を行う。データ解析については QOL と痛みの評価 (VAS, EORTC QOL-BM22, McGill 疼痛質問表) に影響を与える検査・観察項目を同定する。特に骨転移の部位、大きさ、骨破壊の状態や骨質の状態については詳細に検討する。本研究を通して、全患者において以上の計画通りに遂行し得た。別途にキャンサーボード出席簿と議事記録を添付する。

(2) 内容・実施経過、および経過の中で浮上した新しいサブグループ検討項目

本研究の内容、時系列に沿ったその実施経過は下記の通りである。

① 助成決定・倫理委員会申請・患者登録と追跡の開始

本研究の助成決定後、本学倫理委員会に申請を行い、これの承認を受けた (承認番号 542)。本年 4 月より患者登録を開始し、7 月末までに 37 名の登録を完了した。登録後患者追跡を開始、骨転移外来における定期フォロー (6 または 8 週間ごと) および骨転移キャンサーボード (月一回) を予定通りに遂行し (ボード参加者名簿あり、対象患者名記録あり。個人情報保護の観点から患者名を削除した資料を提出致します)、原発がん治療科の主治医、がん薬物療法担当医、緩和医療医および放射線治療医を交え、病勢の進行とともに骨転移に

起因する QOL 低下について検討を行った。

② 心理ストレス因子に関する仮説

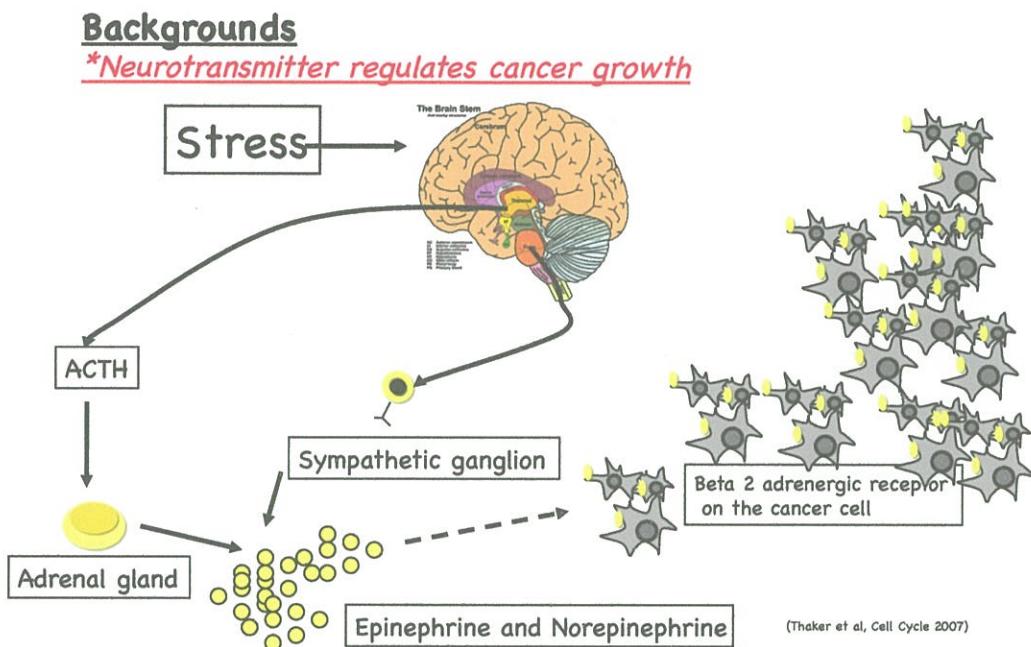


図1 ストレス伝達物質とがん細胞

並行して、基礎的な予備実験として心理ストレス関連因子の骨転移に与える影響について細胞実験を行いこれを第45回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会（7月、東京）で発表、さらに解析を進め、第10回日本臨床腫瘍学会（7月、大阪）、第22回 European Association of Cancer Research（7月、バルセロナ）にて発表を行った。以上の基礎実験及びストレス因子の蓄積に関する予備的な臨床アンケート研究から、心理ストレス因子が本研究対象の患者群の QOL に影響を与える可能性を考え、観察項目に心理ストレス反応（問診および末梢血液コーチゾル濃度：一部患者の採血項目に追加）を加えた。本基礎実験から、われわれはがん患者の心理ストレスは β 2 アドレナリン受容体刺激を介して骨病変を含むがん病変の病勢を促進する可能性がある一方

で、がん病巣で恒常に見受けられる低酸素状態ではこの β 2アドレナリン受容体の sensitivity が低下すること、しかしながら正常骨髄から炎症性サイトカイン等によって誘導されたと考えられる間葉系幹細胞が同じく β 2アドレナリン受容体経路を通してがん細胞に増殖効果を与え（間葉系幹細胞は低酸素条件でも β 2アドレナリン受容体の sensitivity が低下しない）、動員された間葉系幹細胞とがん細胞の heterogeneous な細胞環境が骨転移病巣の進展に寄与している可能性が高いと考えられた（詳細は III 研究の成果の項目に記す）。

③ 末梢血液からの間葉系幹細胞の検出と CFU-F アッセイ

以上の項目から、引き続いての臨床所見観察に加え、10月よりは採血標本からさらに分子生物学的解析、特に間葉系幹細胞の検出を追加し研究を続行した（本学倫理委員会承認済み）。具体的な手法としては、末梢血を遠心しひべクトンディイッキンソン社製 BD バティキュナ CPT 単核球分離用採血管にて遠心分離、分離した単核球分画を STEMCELL Technolog 社製 Mesencult 培地にて（場合により抽出時に RossetteSep カラムを用いて分離）培養し CFU-F アッセイの手法にて評価した。

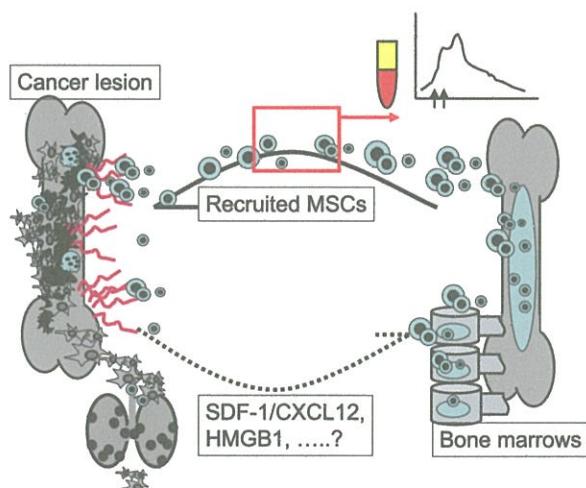
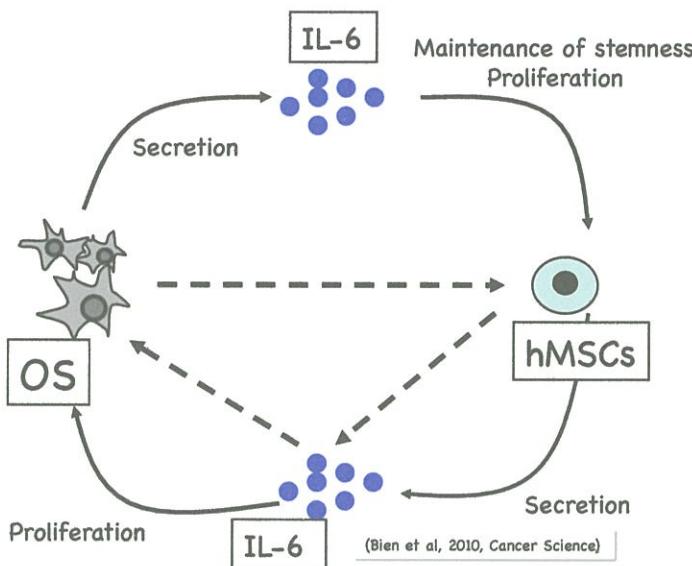


図 2 がん転移巣に動員される正常骨髄の間葉系幹細胞

図3 間葉系幹細胞と腫瘍細胞

の炎症性サイトカインを介した相互作用



④ 骨微小環境の可視域／近赤外域観察の試み

さらに複数例の患者について、病理診断の確定または病的骨折の緩和的固定の為の手術の機会を得た。この折に骨微小環境の非侵襲的検索方法の樹立を目指し、中判高精細フィルムカメラ（可視域フィルムおよび赤外域フィルム、イルフォード社製 SFX を使用）および赤外域撮影装置（ソニー社製 NEX-7 改）を用いた可視域／赤外域観察を行った。病巣部に対しては新生血管部位がインドシアニングリーン近赤外線励起によって発光（近赤外線蛍光）する性質を利用した蛍光観察を行った。生体に対してインドシアニングリーンを直接静脈投与または局所投与して微小病巣部を検出する手法が有用であり、皮膚科領域や頭頸部外科、腹部外科領域でも臨床応用されつつ有るが、未だ保険適応外の為、本研究においてはシリコンチューブ実験、動物実験ののち、切除後標本のみに試みている。ヒト生体に対するインドシアニングリーン投与については現在本学倫理委員会に追加申請中であり、（本助成期間は超える

が) 引き続いて本データに則った解析を行う予定である。

⑤ サブグループ解析 (CTIBL: がん治療関連骨量減少に関する後ろ向き研究)

37例の前向き登録の過程で、(骨転移ではないと考えられる対診症例なども含め) 明らかに骨関連事象の合併が多いと考えられる3つのがん種が浮上した。これらのがん腫にたいして骨量および骨マネジメントの治療体制に関する後ろ向き検討を追加して行った (詳細は III 研究の成果の項目に記す)。

● 子宮頸癌

(原発がんの治癒したなかにも) 歩行も不可能な程の重篤な放射線骨症進行例が少なからず見受けられた。この為、子宮頸がんの放射線骨症進行例の後ろ向き QOL 解析を行いこれを第1回 Fragility Fracture Network (2012年9月, ベルリン) にて発表、さらに骨折型の分類から大きく QOL 障害が異なってくる点をふまえて整形外科的サーベイランスの可能性を検討し、これを第24回 International Congress of AntiCancer Treatment (2013年2月, パリ) にて発表した

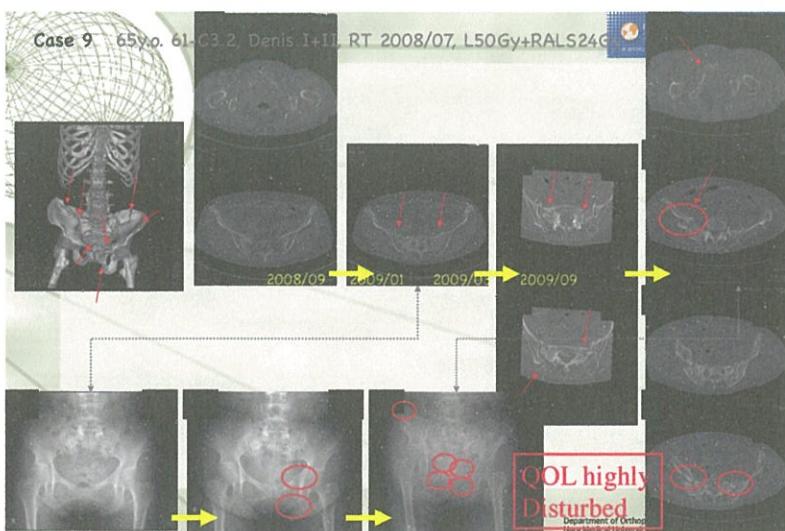


図 4 放射線骨症が著しく進行し QOL 障害を来たした子宮癌症例

● 乳癌

乳癌長期治療症例に骨関連事象の発症頻度が高くみられた。とくに乳癌ホルモン療法を受けた、または受けているすべての患者の診療録を調査し、高度な骨量減少の進行を呈する未治療群、骨マネジメント不良群の存在を明らかにした。

● 頭頸部がん

根治的放射線化学療法を行った群にて高率に著明な脊椎周囲構造の破壊、急速に進行する椎間板炎などを起こす群が存在することを明らかにした。

70歳 男性 上咽頭がんRT後

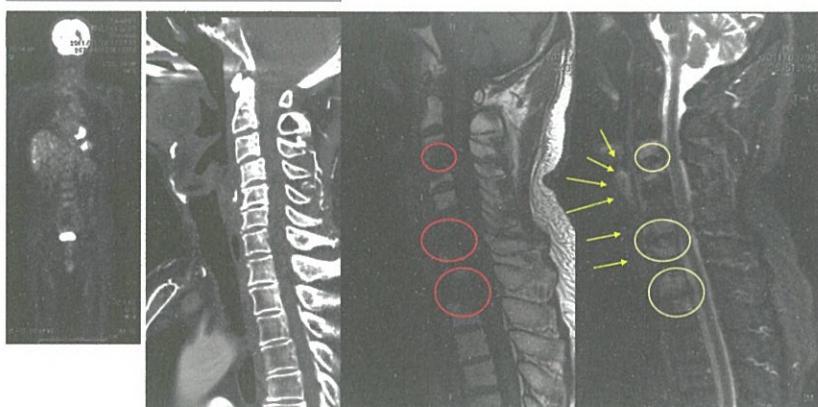


図 5 骨転移を疑わせた
がん治療関連骨症の頭
頸部がん症例

骨転移無し(PET negative)
放射線骨症→化膿性椎間板炎→**縦隔膿瘍**

III 研究の成果 (II の (2) の項目に沿って)

① 助成決定・倫理委員会申請・患者登録と追跡の開始

37例の全登録患者について9ヶ月間脱落無く定期フォロー及び骨転移キヤンサーボードにおける検討を続けることができた。また本9ヶ月間での原病による死亡例は見られなかった。37例中、ECOG-PSの改善を見たもの

は 2 例（初診時に疼痛制御がなされていなかった例）、変わらなかったものは 26 例、低下を見たものが 9 例であった。ただしこの低下を見た 9 例のうち 4 例は原病の進行によるものであり、骨転移に関する悪化は 5 例であった。5 例の内訳は、腫瘍実質による脊髄浸潤による痛み（4 例：胸椎 2 例、腰椎、仙椎各 1 例）、頸椎（C2）転移後の照射後骨折（病的骨折または放射線骨症か判別困難）によるものであった。一方で非常に興味深いことに、長管骨における治癒的固定および緩和的内固定が可能であった病的骨折については、たとい機能障害が残存しても（永続的な免荷を要するなど）ECOG-PS に変化はみられなかった。股関節臼蓋の広範囲な骨転移巣については、（ゾレドロネート製剤、外照射と共に）先述のごとく永続的な免荷、車いす生活を指導しているが、明らかに床上生活が増す傾向は見られなかった。また大腿骨近位または骨幹部の骨折は一時的には ECOG-PS 低下を見るが、長期的には（永続的な免荷、車いす生活などの制限を課しても）明らかに床上生活が増す傾向は見られなかった。骨転移の疼痛については、適正なタイミングでの外照射（従って定期的な whole body scan が有用と考えられた）とオピオイドコントロールにて制御可能なもののが多かった。本研究の 9 ヶ月と云う短い期間にあっては骨転移に関して ECOG-PS に影響を与える（QOL 低下に影響を与える）因子としては①腫瘍実質（骨性要素ではなく）の直接の脊髄浸潤による神経症状 ②麻痺（運動麻痺、膀胱直腸障害：腫瘍実質、骨性要素の双方の要因を含む）③放射線治療抵抗性の存在、が重要な因子であると考えられた。ただし ECOG-PS に変化なきもののなかにも、持続する疼痛で苦しむ患者は少なからず見受けられ、この中には後述するがん治療関連骨量

減少(CTIBL)の患者群が存在した。がん治療の進歩により原病制御が良好になりつつある現在、長期の骨転移／骨関連事象の制御が重要な課題となっている。統計学的検討について、従属変数を上記 ECOG 低下に取った場合は、上記 3 項目のうち ①、③が有意な結果を得た。すなわち、骨転移患者の PS 低下には腫瘍実質（骨性要素ではなく）の直接の脊髄浸潤による神経症状と放射線治療抵抗性の存在が有意に相關した。現在更に詳細に、痛みの評価 (VAS, EORTC QOL-BM22, McGill 痛み質問表) の経時変化も含めた詳細なロジスティック回帰分析を、統計学担当共同研究者とともにに行っている。

② 心理ストレス因子

血中コーチゾル値を経時的に測定し得た 11 患者で 7 ug/dL-40.3 ug/dL の幅を見たが、9 ヶ月の観察期間では明らかな骨転移の進展や病勢との相関は見なかった。患者の中に RA 合併ステロイド投与群（1 例）、クッシング症候群（1 例）なども見られ、また全身多発病巣を持つにもかかわらず、オピオイドによる良好な疼痛制御で正常域に近い患者も複数あり、多様な疾患背景を持つ進行がん患者の心理ストレス指標として血中コーチゾル値の利用は困難と思われた。ただし、既存の報告からもストレス状態ががんの患者の QOL に重要な因子であることは間違いない、この見地からは CES-D を用いた心理側面からの評価、或はより大規模、長期の観察によって患者背景を揃えて検討を行う必要があると思われた。

③ 間葉系幹細胞の検出と CFU-F アッセイ

6 名の患者検体を用いて末梢血単核球分画から CFU-F アッセイの手法を用いた間葉系幹細胞の検出を行った。広範囲の多発転移病巣を呈する患者二名

及び主科にて G-CSF を使用している患者二名に間葉系幹細胞コロニー検出されたが、比較的小さな転移病巣に外照射を終えた病勢制御良好の二名では間葉系幹細胞コロニーが検出されず、本アッセイは間葉系幹細胞動員を反映し、骨転移病勢に相関する可能性があると思われた。本アッセイはきわめて短時間に簡易な方法で間葉系幹細胞を "liquid biopsy" できる有用な手法と考えられ、向後さらに検体数を増し本手法の有用性を検証予定である。

④ 可視域／近赤外域観察

予備実験としてシリコンチューブ及びラット血管を用いたインドシアニングリーン近赤外線励起にて、赤外フィルムカメラ／赤外域撮影装置を用いた蛍光観察を行い、小型軽量の観察システムを樹立した。ヒト生体に対するインドシアニングリーン全身投与は現在本学倫理委員会申請中であり、今月より骨微小環境の可視域／近赤外域観察を開始予定である。現在骨転移の部位、大きさ、骨破壊の状態や骨質の状態の把握には造影 CT などが用いられるが、本手法は外来、病棟または手術室などあらゆる場所で可能であり、また造影剤よりも副作用リスクが低く、特に表層観察が可能な病変（例えば肺骨頭など）で有益な手法と成ることが期待出来る。

⑤ CTIBL：がん治療関連骨量減少に関する後ろ向き研究

子宮頸癌：根治的放射線化学療法を行った群に骨盤の脆弱性が亢進し、著明な PS 低下を来す群が存在する事を見出した。本学における治療症例では、2002 年-2009 年、130 症例中 15 例 (11.5%) に発症していた。疼痛などを訴える症例は 78.3% で 4 割は症状の改善をみなかった（本学婦人科吉田ら JSOG 2012）危険因子；年齢 ($p=0.047$)、体重 50kg 未満 ($p=0.080$)、閉

経後 ($p=0.049$)。

AO/OTA 骨折型分類では、15 例の患者のうち 13 例は type B (61-B2 が 5 例、61-B3 が 8 例, 2 例が Type C(61-C1.3, 61-C2.1)であった。これらのうち、両側型の B3.3 の 2 例および complete disruption を呈する C1.3 と C2.1 の 2 例が予後不良であった (城戸・吉田 FFN2012, ICACT2013)。

頭頸部がん：根治的放射線化学療法を行った群 (2007-2011, 118 例の解析) にて 8.4% (11 例) に著明な脊椎周囲構造の破壊、急速に進行する椎間板炎などを起こす群が存在した(本学耳鼻咽喉・頭頸部外科・太田、整形外科大学院生岩田、城戸)。

乳癌：本学にて乳癌ホルモン治療を受けた (または受けている) 外来フォロー中の乳癌患者 (2010-, 49 例) について 49 例中 BMD 測定されていた患者は 38 名 (77%)、骨量減少症 (T スコア <-1) は 11 名 (28%)、骨粗鬆症 (T スコア <-2.5) は 5 名 (13%) であった。ホルモン治療が長期にわたった患者の中には T スコアが -3 以下のものが 2 名見受けられ (-3.4, -3.6) BMD 減少率は平均 6.9%/年であった。またがん治療に対する CR 患者群 (いわゆるがんサバイバー) には未治療の骨粗鬆症例が半数以上見受けられ、向後の CTIBL に対する骨マネジメント (BMD モニタリング・検診率向上) の重要性を示唆させる結果であった (本学乳腺外科中村・城戸)。

IV 向後の課題

1. 成果 III-①について、既に記載した通り統計学的検討について、従属変数を上記 ECOG 低下に取った場合は、上記 2 項目が明らかな傾向がみ

られる点について報告、現在更に詳細に統計学的検討を担当共同研究者とともにに行っている。痛みの評価（VAS, EORTC QOL-BM22, McGill 痛み質問表）の経時変化も含めた要因との詳細なロジスティック回帰分析を完成する予定である。

2. 成果 III-③間葉系幹細胞の検出と CFU-F アッセイについて、検出手法とし樹立し病勢との相関の可能性を見出した。向後さらに検体数を増やし解析を進め本手法の有用性を検証予定である。
3. 成果 III-④可視域／近赤外域観察について、撮像システムと条件設定のための基礎実験を完了した。また本学倫理委員会への申請、事前ヒアリングを済ませた。近日中に裁可を受ける見込みであり、これを受けヒトにおけるインドシアニングリーン全身投与・骨病巣微小環境の観察を開始する予定である。

V 研究の成果等の公表予定

[発表済みの演題]

(proceedings, 会議録)

1. Kido A, Yoshida S, Hasegawa M, Sakamoto Y, Munemoto M, Tsukamoto S, Furukawa N, Kobayashi H, Honoki K, Tanaka Y. Pelvic insufficiency fracture after radiotherapy for cervical cancer: is routine orthopedic surveillance possible? International Congress on Anti-Cancer Treatment 5-7, February, 2013, Paris , Abstract Book p262-263.
2. Kido A, Yoshitan K, Shimiz T, Akahane M, Fujii H, Shinji Tsukamoto S,

Kondo Y, Honoki K, Imano M, Tanaka Y, Effect of mesenchymal stem cells on hypoxia-induced desensitization of beta-2 adrenergic receptors on rat osteosarcoma cells. 22nd Biennial Congres of the European Association for Cancer Research Proceedings Book S-36, 2012.

3. Kido A, Yoshida S, Hasegawa M, , Furukawa N, Kobayashi H, Honoki K, Tanaka Y. Pelvic insufficiency fracture after radiotherapy for cervical cancer: is routine orthopedic surveillance possible? 1st Fragility Fracture Network proceedings, p85, 2012.
4. 城戸 順, 朴木寛弥, 今野元博, 田中康仁 動員された間葉系幹細胞が骨肉腫細胞のストレス関連神経伝達因子に対する反応性に与える影響は酸素分圧により異なる 2012 第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会(抄録集) p235, 2012
5. 城戸 順, 芳谷和洋, 清水隆昌, 赤羽 学, 藤井宏真, 塚本真治, 近藤裕美子, 朴木寛弥, 田中康仁 間葉系幹細胞が骨肉腫細胞のストレス関連神経伝達因子に対する反応性に与える影響は酸素分圧により異なる 日本整形外科学会雑誌(0021-5325)86巻 6号 PageS964(2012.06)

(原著論文)

1. Kido A, Yoshitani K, Shimizu T, Akahane M, Fujii H, Tsukamoto S, Kondo Y, Honoki K, Imano M, Tanaka Y. Effect of mesenchymal stem cells on hypoxia-induced desensitization of $\beta 2$ -adrenergic receptors in rat osteosarcoma cells. Oncol Lett. 2012 Oct;4(4):745-750.
2. Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Tsujiuchi T, Kido A, Tsukamoto S, Mori T,

- Tanaka Y. Comparison of gene expression profiling in sarcomas and mesenchymal stem cells identifies tumorigenic pathways in chemically induced rat sarcoma model.
3. Shimizu T, Kido A, Honoki K, Murata K, Fujii H, Higuchi B, Ishihara T, Takeshita Y, Shima M, Yajima H, Akahane M, Tanaka Y. A successful reconstruction using a frozen autograft and a pedicled latissimus dorsi flap after a S12345B shoulder girdle resection in a patient with osteosarcoma. *J Reconstr Microsurg.* 2012 Mar;28(3):155-9.
 4. Tsukamoto S, Honoki K, Fujii H, Tohma Y, Kido A, Mori T, Tsujiuchi T, Tanaka Y. Mesenchymal stem cells promote tumor engraftment and metastatic colonization in rat osteosarcoma model. *Int J Oncol.* 2012 Jan;40(1):163-9.
 5. 城戸 顕, 富田恭治, 千福健夫, 宗本 充, 酒本佳洋, 岩田栄一朗, 赤羽 学, 田中康仁骨粗鬆症患者におけるビスホスホネート製剤の服薬嗜好とコンプライアンスに関する研究 新薬と臨床 (in press)

(講演)

1. 招待講演 城戸 顕 「がん診療に学ぶ骨マネジメントの未来・ビスホスホネート系薬剤の服薬実態調査結果」 NARA Osteoporosis seminar 2012 平成 24 年 11 月 18 日 奈良新公会堂
2. 招待講演 城戸 顕 「骨粗鬆症治療のUpdate・がんサバイバーおよび担がん患者の治療関連骨量減少(CTIBL)」 吉野郡医師会学術講演会 2012 平成 24 年

12月1日樋原ロイヤルホテル

[公表予定]

成果 III-① 骨転移に関して ECOG-PS に影響を与える得る（QOL 低下に影響を与える）因子としては①腫瘍実質（骨性要素ではなく）の直接の脊髄浸潤による刺激症状と麻痺（運動麻痺、膀胱直腸障害）②放射線治療抵抗性が重要な因子である点に関して、従属変数を検討した上で論文報告を行う予定です。

VI 謝辞

本研究課題に対して多大なる助成を賜りました公益財団法人笹川記念保健協力財団に心より感謝申し上げます。本前向き観察研究を出発点として骨転移患者の病態・病勢把握に関わる多岐にわたる可能性が生まれました。本研究グループ一同一層有意義な報告を引き続き継続して行っていく所存であります。