

論文要旨等報告書

氏 磯和幸子
授与した学位 博士
専攻分野の名称 歯学
学位授与の番号 博 甲 第 3346 号
学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件 医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名 骨破壊部において癌細胞自身の産生する副甲状腺ホルモン関連蛋白による血管内皮増殖因子の制御およびその作用に関する研究

論文審査委員 教授 佐々木 朗 教授 山本 敏男 助教授 久保田聡

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨組織は、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成が絶え間なく繰り返され、動的に均衡した共役状態に保たれている。骨組織に浸潤した癌細胞は副甲状腺ホルモン関連タンパク（以下PTHrP）を産生することによってそのバランスを崩し、破骨細胞の分化、骨吸収を促進する。その結果、癌細胞は進展する場を得ると同時に、骨吸収により骨から骨微小環境に遊離してきた成長因子によって癌細胞の増殖は促進され、さらに骨吸収が促進される。

最近になり、血管新生において中心的役割を果たすVEGF（血管内皮増殖因子）の骨代謝への深い関わりが明らかになりつつある。骨芽細胞からのVEGF産生、VEGFがRANKL（Receptor Activator of NF- κ B Ligand）と共役的に破骨細胞の分化を促進し、成熟破骨細胞の骨吸収を促進すること、さらに骨転移巣ではPTHrPとVEGFが軟組織に存在する腫瘍巣と比較して高発現していることが報告されている。

これらのことから、PTHrPおよびVEGFは癌骨破壊巣における、破骨細胞形成や血管新生に深く関与している可能性があり、PTHrPとVEGFの間には生物学的、機能的な相互関係があることが示唆される。そこで本研究では、癌骨破壊部におけるVEGFの役割とその発現制御機構を明らかにすることを目的に、PTHrPがVEGF発現へ与える影響、およびこれに関わるシグナル伝達因子およびPTHrPによって発現誘導されたVEGFの血管新生、破骨細胞誘導、骨吸収活性へ与える影響について検討した。

【材料および方法】

1) 癌骨転移モデルの骨破壊部における観察

乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスに心腔内注入し、25 日後マウスを屠殺し、骨破壊部における VEGF・PTHrP・PTHIR の発現を、共焦点顕微鏡を用いて免疫組織学的に評価した。

2) In vitro における VEGF 発現の検討

MDA-MB-231 細胞に PTHrP を添加し、VEGF の発現をウエスタンブロット法（以下 WB 法）、ELISA 法、RT-PCR 法を用いた。さらに抗 PTHrP 中和抗体を添加し、抑制効果についても検討した。

3) PTHrP-CM の血管新生に与える影響の検討

PTHrP を添加した癌細胞の培養上清（PTHrP-CM）の血管新生能は、HUVEC（ヒト臍帯静脈内皮細胞）を用いた³Hトリチウムチミジンの取り込みを指標にした増殖能、とポイデンチャンパー法による遊走能、さらに6週齢 Wister Rat 大動脈のコラーゲンゲル三次元培養にて検討した。

4) PTHrP-CM の破骨細胞形成能および骨吸収能に与える影響の検討

5 週齢 C57BL/6 マウスの骨髄細胞より Magnetic cell sorting system を使い、破骨細胞前駆細胞マーカーである CD11b 陽性細胞を分取し、M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) RANKL および PTHrP-CM を加えて 6 日間培養し、破骨細胞形成能の検討を酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色により評価した。骨吸収能の検討は CD11b 陽性細胞を象牙切片上に撒き、象牙切片上の吸収窩の面積を測定した。

5) VEGF 発現におけるシグナル伝達因子の検討

PTHrP 下流のシグナル伝達因子である PKC, ERK, p38 の siRNA と阻害剤をそれぞれ MDA-MB-231 細胞に添加し、VEGF の発現への影響を RT-PCR 法、ルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。さらに PTHrP 刺激後のシグナル伝達因子のリン酸化を WB 法にて調べた。

【結果および考察】

1) 癌骨破壊部における VEGF, PTHrP, PTH1R の発現

癌骨破壊部における VEGF と PTH1R の発現は癌細胞に一致しており、また PTHrP と PTH1R も骨吸収先端部の癌細胞に一致して認められた。このことから、骨破壊部の癌細胞から産生される VEGF は PTHrP により制御されている可能性が示唆された。

2) In vitro における VEGF 発現

MDA-MB-231 細胞を PTHrP で刺激すると、培養上清、細胞質への VEGF の蓄積が亢進し、その効果は抗 PTHrP 中和抗体によって完全に阻害された。

3) PTHrP-CM の血管新生に与える影響

PTHrP-CM は HUVEC の増殖能、遊走能やラット大動脈の血管新生を促進させ、その効果は抗 VEGF 中和抗体によって抑制されたことから、癌骨破壊部において PTHrP は癌細胞に作用し VEGF 発現を誘導することによって、間接的に血管新生を促進することが明らかとなった。

4) PTHrP-CM の破骨細胞形成能および骨吸収能に与える影響

PTHrP-CM を CD11b 陽性細胞に加えると対照群と比較して破骨細胞形成能、骨吸収活性が有意に上昇し、この効果は抗 VEGF 中和抗体にて阻害された。これらより、PTHrP-CM の破骨細胞への影響は、VEGF を介していることが示唆された。

5) PTHrP による VEGF 発現におけるシグナル伝達因子の検討

MDA-MB-231 細胞を PTHrP で刺激すると、VEGF mRNA, VEGF プロモーターは活性化された。しかし、PTHrP による VEGF mRNA 発現は PKA, PKC, MEK1/2, p38 の阻害剤によりそれぞれ阻害され、PTHrP によるプロモーター活性の亢進は、PKC, ERK, p38 の siRNA で抑制された。また、PTHrP により ERK1/2, p38 のリン酸化は亢進し、その効果は PKC siRNA により阻害された。癌骨破壊部における PTHrP による VEGF 発現は、PTHrP のオートクライン作用による、PKA, PKC-ERK MAPK, PKC-p38 MAPK シグナルを介して促進され、さらに癌骨破壊部で亢進した VEGF は血管新生と破骨細胞性骨吸収を亢進させる事が明らかとなった。

【結論】

結果より VEGF や、それを制御している PTHrP と下流のシグナル伝達因子を分子標的とした治療法が、破骨細胞性骨吸収と血管新生を同時に阻害し、癌の骨破壊の治療に非常に有用であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

骨組織に浸潤した癌細胞は副甲状腺ホルモン関連蛋白 (PTHrP) を産生し、破骨細胞の分化および骨吸収を促進する。その結果、癌細胞は進展する場を得ると同時に、骨吸収により骨から骨微小環境に遊離してきた成長因子によって癌細胞の増殖は促進され、さらに破骨細胞性骨吸収が促進される。

腫瘍血管新生において中心的な役割を果たす血管内皮増殖因子 (VEGF) は近年、破骨細胞前駆細胞の分化を促進し、また成熟破骨細胞の骨吸収を促進することが報告され、骨代謝への深い関与が明らかになりつつある。

骨破壊部では PTHrP と VEGF が軟組織に存在する腫瘍巣と比較して高発現していることが報告されており、両者は癌の骨破壊部における骨破壊と血管新生において生物学的、機能的な相互関係があることが示唆される。そこで本研究では、癌の骨破壊部における VEGF の発現制御機構とその役割を明らかにすることを目的に、PTHrP が VEGF 発現へ与える影響、およびこれに関わるシグナル伝達因子および PTHrP によって発現誘導された VEGF の血管新生および破骨細胞の分化と骨吸収活性へ与える影響について検討し、以下の結論を得た。

- 1) 骨破壊部における PTHrP による VEGF 発現は、PTHrP のオートクライン作用による PKA, PKC-ERK, PKC-p38 MAPK シグナルを介して促進されていた。
- 2) 骨破壊部で亢進した VEGF は、血管新生と破骨細胞性骨吸収を促進させていた。

これらの知見は、癌の骨破壊部における VEGF の発現制御機構とその役割を明らかにし、VEGF を制御している PTHrP と下流のシグナル伝達因子を分子標的とした新たな癌の骨破壊の治療法の開発に重要な方向性を示すものとして価値のある研究業績である。したがって、本申請論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものと判断した。