

別 紙

論 文 の 内 容 の 要 旨

獣医学 専 攻  
平成 20 年度博士課程 入学  
氏 名 上田 綾子  
指導教員名 佐々木 伸雄

論文題目

**Studies on the role of RANK/RANKL expression for the skeletal lesions and the effect of anti-RANKL neutralizing antibody in a canine osteosarcoma xenograft model**

(イヌ骨肉腫における RANK/RANKL 発現と骨病変との関連ならびに移植マウスモデルにおける抗 RANKL 中和抗体の抗腫瘍効果に関する研究)

骨肉腫 (OSA) は、骨原発性腫瘍の中で最も発生頻度が高く、転移性の高い予後不良の腫瘍である。ヒトでは化学療法と外科療法の併用により、5 年生存率も飛躍的に改善されたが、その一方で、過去 20 年間の生存率はプラトーに達しており、新たな治療法の開発が必要とされている。また獣医療では、徹底的な術前化学療法は副作用の面から困難であり、新たな集学的治療法は確立されていない。

近年ヒト OSA 細胞ならびに病態において、破骨細胞 (OC) の役割が注目を集めており、OC を標的とした新規治療の可能性が検討されている。OC の分化、成熟は、M-CSF ならびに骨髄間質細胞や骨芽細胞が産生する receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B ligand (RANKL) と receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B (RANK) によって制御されている。また、OC は骨吸収により骨に含まれる種々の成長因子を放出させ、かつ腫瘍細胞の増殖に必要なスペースを提供する形で、骨転移機構および腫瘍増殖に大きく関与していると考えられている。しかしイヌにおける OC と腫瘍増殖や骨破壊との関連は不明である。

そこで本研究では、イヌ OSA の腫瘍増殖および骨吸収における RANK/RANKL の役割を明らかにするとともに、移植マウスモデルにおいて抗 RANKL 中和抗体の効果についても検討した。

第 1 章では、まずイヌの自然発症 OSA の 26 症例の原発巣組織ならびにイヌ OSA 細胞株 4 株(HMPOS, POS, OOS, CHOS)における、RANK/RANKL の発現を免疫細胞化学およびウェスタンブロット法 (WB) により検討した。

RANK と RANKL の発現は、それぞれ 26 症例中 23 頭 (88.4%) と 20 頭 (84.6%) と高率に認められた。RANKL 発現と組織中の OC 数には有意な相関を認めた一方で、症例数が少ないこともあり、いずれの発現も各症例の臨床所見 (年齢, 性別, 品種, 病理学的分類など) や生存曲線との間には統計学的な相関関係が認められなかった。

イヌ OSA 細胞株では、RANK と RANKL の発現が細胞質と細胞膜に認められ、WB の結果ではそれぞれ POS (>OOS> HMPOS>CHOS) , CHOS (>OOS>POS>HMPOS) に強い発現が確認された。

次に、これら細胞株のうち RANKL 低発現細胞株 (HMPOS) と高発現細胞株 (CHOS) を選択し、移植マウスモデルにおける腫瘍動態と RANK/RANKL 発現の関連を検討した。Balbc nu/nu マウス(n=5)の脛骨に細胞株を移植し、マウスモデルを作製した。これらのマウスを用い、病理組織学ならびに  $\mu$ -CT を用いて評価した。

HMPOS 移植モデルでは、軟部組織への浸潤を伴った顕著な腫瘍増大と肺転移が認められた。しかし、骨病変部には OC は認められなかった。一方 CHOS 移植モデルでは、骨に局限した骨融解性病変を呈し、腫瘍と皮質骨の境界部で明瞭な OC の増加が確認された。以上より、RANKL 低発現の HMPOS ではより激しい腫瘍増殖が見られること、RANKL 高発現の CHOS では強い骨吸収が見られることが明らかとなり、これは RANKL が誘導する OC の活性化により骨融解型病変が出現している可能性を示唆するものと考えられた。

第 2 章では、これらの 2 つの細胞株における RANK 発現の意義を検討する目的で、RANKL (100ng/ml) 刺激後の細胞移動能/浸潤能の解析を行うと同時に、RANK 下流シグナル (NF $\kappa$ B, ERK1/2, p-38, JNK, c-Fos) を WB により解析した。さらに、腫瘍細胞の浸潤転移能に関与している matrix metalloproteinases (MMPs) の mRNA 発現を定量的リアルタイム PCR 法にて測定した。

RANKL 刺激後、細胞の移動能は HMPOS で有意に亢進し、CHOS では変動がなかった。浸潤能は HMPOS で有意に亢進し、CHOS では逆に有意な抑制効果が認められた。RANKL 刺激下で、HMPOS では経時的に I $\kappa$ B $\alpha$  および ERK1/2 のリン酸化の増加が認められた。CHOS でも同様に I $\kappa$ B $\alpha$  の経時的なリン酸化が認められた一方、ERK1/2 の脱リン酸化が刺激後速やかに生じた。p-38, JNK のリン酸化および c-Fos

の発現レベルは刺激前／後で差を認めなかった。さらに、RANKL 刺激後の MMPs 発現は、MMP 2 の発現上昇、ならびに HMPOS における MMP 7 の発現上昇が認められた。以上から、イヌ OSA 細胞株においては機能的な RANK 発現があり、これらの細胞の浸潤、移動能は主に MMP 2 と 7 が関与している可能性が示唆された。

第 3 章では、OSA 細胞株に発現する RANKL の破骨細胞分化誘導ならびにマウスモデルにおける抗 RANKL 中和抗体の腫瘍増殖ならびに骨病変に対する効果を検討した。

まず、*In vitro* で腫瘍性 RANKL の OC 分化誘導能を検討することを目的とし、イヌの骨髄間質細胞 (BMCs) からの OC 分化誘導系の確立を試みた。OC の証明は TRAP 染色、Actin Ring 形成評価、pit formation assay ならびに OC 特異的マーカーの mRNA 発現 (NFATc1, Calcitonin-R, RANK, MMP9) を評価した。

イヌ BMCs に M-CSF (100ng/ml) および RANKL (10ng/ml) を添加すると 2 日目より多核巨細胞が出現した。これらの分化した細胞は、典型的な OC の特徴を有していた。一方 RANKL 非刺激下では、分化した細胞は OC の特徴的な性質を示さず、イヌ OCs 分化誘導においても M-CSF と RANKL が必須因子であると考えられた。

さらに第 1 章の結果を基に、RANKL 発現の異なる HMPOS と CHOS の培養上清を用い、イヌ BMCs からの OC 分化誘導能を検討した。いずれの培養上清も単独では、OC 分化誘導が認めず、微量の RANKL と CHOS 培養上清を添加した BMCs で最も多くの OC が誘導され、さらに RANKL 濃度依存性により多くの OC 形成が認められた。一方、HMPOS 培養上清を添加した BMCs で最も OC の誘導数が少なかった。以上より、CHOS 腫瘍細胞が産生する RANKL は、OC 分化能を有することが示唆された。

次に、高 RANKL 発現株である CHOS 移植マウスモデルを用い、抗 RANKL 中和抗体 (OYC1) の効果を検討した。OYC1 (5mg/kg) を腫瘍細胞移植後 2 週目に、マウスに皮下投与 (単回) した。その結果、抗体投与マウスでは腫瘍増殖が有意に抑制され、また、骨融解も抑制された。さらに、腫瘍形成部位の組織において、腫瘍と皮質骨との境界部の OC 誘導も有意に低下していた。また OYC1 は *in vitro* の細胞培養下では腫瘍細胞増殖抑制がないことから、腫瘍抑制効果は骨環境中の OC 誘導を抑制して骨吸収を減少させた結果、腫瘍の増殖、進展を防止したものと示唆された。

以上から、イヌ OSA 細胞に発現する RANK/RANKL は、NF $\kappa$ B と ERK1/2 のリン酸化を介し、MMP 2 および 7 の発現を通して腫瘍細胞の移動能、浸潤能に影響を与えると同時に、破骨細胞の分化に関与し、OSA の増殖ならびに骨病変に関与することが示された。今後抗 RANKL 抗体治療の開発が強く望まれる。