

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 上田 綾子

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。近年ヒト OSA の病態において、破骨細胞 (OC) の役割が注目を集めている。OC の分化、成熟にはマクロファージコロニー刺激因子 (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 κ B ligand (RANKL) と receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) によって制御されている。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 ないし RANK, RANKL 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、イヌの自然発症 OSA 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。その結果、RANK と RANKL は、それぞれ 26 症例中 23 頭 (88.4%) と 20 頭 (84.6%) と高率に発現した。また RANKL 発現と組織中の OC 数には有意な相関を認めた。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 の結果から、その発現レベルは細胞間で異なっていた。

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、ヌードマウスの脛骨に移植した。その結果、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、CHOS 移植モデルでは、骨融解性病変を呈し、かつ腫瘍と皮質骨の境界部に明瞭な OC の増加が確認された。このことは、RANKL 高発現の CHOS では、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ことを示唆するものと考えられた。

第2章では、RANK 発現の意義を検討する目的で、RANKL 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 κ 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、HMPOS では細胞の移動能ならびに浸潤能が亢進したが、CHOS では変動がなかった。また RANKL 刺激下で、HMPOS では経時的に I κ B α および ERK1/2 のリン酸化の増加が認められた。さらに、RANKL 刺激後に MMP 2 と 7 の発現上昇が認められたことから、イヌ OSA 細胞株には機能的な 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、まず OSA 細胞株に発現する RANKL の破骨細胞分化誘導を検討した。初めに、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) から評価した。

イヌ BMCs に M-CSF および RANKL を添加すると 2 日目より多核巨細胞が出現し、これらの細胞は典型的な OC の特徴を有していた。さらに、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 分化誘導が認めなかったが、微量の RANKL と CHOS 培養上清を添加した BMCs で多くの 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。このことから、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。

最後に、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 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、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、腫瘍と皮質骨の境界部の OC 誘導も有意に低下していた。OYC1 には細胞培養下で増殖抑制効果がないことから、この腫瘍抑制効果は骨中の OC 誘導を抑制して骨吸収を減少させ、生じたものと示唆された。

以上要するに、本論文はイヌ OSA の骨病変における RANK/RANKL と破骨細胞の関与を証明したものであり、学術上、臨床その貢献するところは少なくない。よって審査委員一同は本論文が博士 (獣医学) の学位論文として価値あるものと認めた。