

## 論文要旨等報告書

氏名	栗尾 奈愛
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 4 0 9 4 号
学位授与の日付	平成 2 2 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬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	FAK阻害が癌骨破壊病変に与える影響

論文審査委員 教授 佐々木 朗 教授 長塚 仁 教授 滝川 正春

### 学位論文内容の要旨

#### 【 緒言 】

骨を転移標的臓器とする悪性腫瘍は乳癌、前立腺癌、肺癌、甲状腺癌、腎癌、悪性黒色腫、口腔癌などが知られている。骨転移が直接生命を脅かすことは少ないが、著しい骨痛、病的骨折、高カルシウム血症などを合併し患者の QOL を著しく低下させる。また骨に転移した癌に対しては既存の抗癌剤療法が奏功しにくい。そのため骨微小環境下での癌細胞の増殖を制御する分子メカニズムを明らかにすることが癌骨転移治療の新たな治療法の開発に不可欠である。

接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase ; FAK) は 125kD の非受容体型チロシンキナーゼであり細胞増殖、生存、移動における重要なメディエーターである。FAK は悪性腫瘍、特に浸潤転移能の高い細胞において高発現しているが癌骨転移病変に関する報告はない。また近年 FAK 選択的分子標的薬である TAE226 による腫瘍増殖抑制効果や転移抑制効果が報告されているが癌骨転移病変における TAE226 の有効性については明らかとなっていない。本研究ではヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスの心腔内に投与して作製した癌骨転移モデルに対する TAE226 の有効性を検討し、さらに破骨細胞性骨吸収に与える影響について検討した。

#### 【 材料および方法 】

##### 1. 癌骨転移に対する TAE226 の治療効果に関する検討

1) 癌骨転移モデルの作製：ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスに心腔内投与して作製した骨転移、破壊モデルに TAE226 を経口投与し、その効果に対して X 線学的、病理組織学的な評価をおこなった。

##### 2. TAE226 の抗腫瘍効果に対する検討

1) TAE226 の細胞増殖、細胞遊走、細胞形態に与える影響に関する検討：MDA-MB-231 細胞に各濃度の TAE226 を添加し細胞増殖はトリチウムチミジンの取り込み量、細胞遊走に関しては scratch assay、細胞形態に関しては免疫蛍光染色でアクチンの形態について評価した。

2) In vivo における TAE226 の腫瘍増殖に与える影響：MDA-MB-231 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍生着後に TAE226 を経口投与し、腫瘍重量、腫瘍体積について検討した。

##### 3. In vitro における TAE226 の破骨細胞性骨吸収抑制機構に関する検討

1) 破骨細胞形成系に与える影響：マウス破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞に soluble receptor activator NF $\kappa$ -B ligand (以下 sRANKL) を添加し培養する破骨細胞分化系に対し各濃度の TAE226 を添加して培養し、破骨細胞マーカーである TRAP 陽性多核細胞数をカウントし、破骨細胞形成の評価をおこなった。

2) TAE226 が破骨細胞分化シグナルに与える影響：RANKL で誘導される AKT,ERK,p38I $\kappa$ -B のリン酸化, 分化のマスターレギュレーターである NFATc1 の発現に TAE226 が与える影響をウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

3) 破骨細胞の骨吸収活性に与える影響：RAW264.7 細胞を OAAS 骨基質プレート上で成熟破骨細胞へ分化させた後, 各濃度の TAE226 を添加し, 5 日後に形成された骨吸収窩の面積を測定した。また免疫蛍光染色をおこないアクチンリング形成に与える TAE226 の効果も同時に検討した。

4) 成熟破骨細胞の骨吸収活性化シグナルへの影響：成熟破骨細胞の骨吸収マーカーである NFATc1, カテプシン K, TRAP の発現に与える影響をウエスタンブロッティング法を用いて検討した。

5) TAE226 の細胞増殖能, 細胞遊走能, 接着能に与える影響：RAW264.7 細胞に各濃度の TAE226 を添加し細胞増殖能についてはトリチウムチミジンの取り込み量を, 遊走能, 接着能に関しては scratch assay, adhesion assay をおこない検討した。

## 【 結果 】

### 1. 骨転移モデルに対する TAE226 の効果

TAE226 は X 線学的, 病理組織学的に対照群と比較し有意に骨転移ならびに骨髄内での腫瘍細胞の増殖を抑制した。また対照群と比較し TAE226 投与群において破骨細胞性骨吸収を示す TRAP 陽性多核細胞の出現の有意な減少が確認された。

### 2. TAE226 の抗腫瘍効果に対する影響

TAE226 は *in vitro* において 0.01  $\mu$ M より濃度依存的な腫瘍増殖抑制効果を示し, アクチン線維の構造変化とともに細胞遊走を抑制した。*in vivo* において腫瘍体積, 腫瘍重量の増大を抑制した。

### 3. *In vitro* における TAE226 の破骨細胞性骨吸収に与える影響

*In vitro* において TAE226 は 0.1  $\mu$ M の濃度から濃度依存的に RAW264.7 細胞の細胞増殖能, 細胞遊走能, 細胞接着能を抑制し, 破骨細胞の分化および成熟破骨細胞の骨吸収活性を抑制した。TAE226 は RANKL 下流の破骨細胞分化シグナルを濃度依存的に抑制し, また骨吸収マーカーのタンパク発現も濃度依存的に抑制した。

## 【 考察 】

本研究では高転移性乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスに心腔内投与して作製した骨転移モデルに対して TAE226 を経口投与する事による治療的效果について検討し, TAE226 が骨転移における骨髄内での腫瘍細胞の増殖を抑制し, 破骨細胞性骨吸収を抑制する事を明らかにした。TAE226 の破骨細胞性骨吸収抑制機構としては, 1) 腫瘍細胞の FAK のリン酸化を抑制する事による, 抗腫瘍効果により MDA-MB-231 細胞が産生する PTHrP 等のサイトカインが減少することによる二次的な破骨細胞性骨吸収抑制効果, 2) TAE226 が破骨細胞性骨吸収を直接的に抑制することが考えられた。MDA-MB-231 細胞に対する *in vitro*, *in vivo* での検討から TAE226 が腫瘍細胞の増殖, 接着, 遊走を阻害する事による抗腫瘍効果が確認された。また RAW264.7 細胞に対する *in vitro* の解析から, RAW264.7 細胞に対しても細胞増殖, 接着, 遊走能を抑制することにより RANKL/RANK シグナル経路を抑制し, RANKL 下流の破骨細胞分化シグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制し, 骨吸収活性マーカーである NFATc1, カテプシン K, TRAP の発現を阻害する事により骨吸収活性を抑制する事が明らかとなり, 破骨細胞性骨吸収を直接的に抑制する可能性が示唆された。

## 【 結論 】

TAE226 による FAK 阻害は抗腫瘍効果, 破骨細胞性骨吸収抑制作用をともに併せ持ち, 癌骨転移に対し FAK が有用な治療標的となる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

骨を転移標的臓器とする悪性腫瘍は乳癌、前立腺癌、肺癌、甲状腺癌、腎癌、悪性黒色腫、口腔癌などが知られている。骨転移が直接生命を脅かすことは少ないが、著しい骨痛、病的骨折、高カルシウム血症などを合併し患者のQOLを著しく低下させる。また骨に転移した癌に対しては既存の抗癌剤療法が奏功しにくい。そのため骨微小環境下での癌細胞の増殖を制御する分子メカニズムを明らかにすることが癌骨転移治療の新たな治療法の開発に不可欠である。

接着斑キナーゼ ( focal adhesion kinase ; FAK ) は 125kD の非受容体型チロシンキナーゼであり細胞増殖、生存、移動における重要なメディエーターである。FAK は悪性腫瘍、特に浸潤転移能の高い細胞において高発現しているが、癌骨転移病変に関する報告はない。また近年 FAK 選択的分子標的薬である TAE226 による腫瘍増殖抑制効果や転移抑制効果が報告されているが、癌骨破壊病変における TAE226 の有効性については明らかとなっていない。

本研究ではヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスの心腔内に投与して作製した癌骨転移モデルに対する TAE226 の有効性を検討し、さらに破骨細胞性骨吸収に与える影響について、マウス破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を用いて検討することにより、以下の結論を得ている。

1. マウス骨転移モデルにおいて TAE226 は X 線学的、病理組織学的に対照群と比較し有意に骨髄内での腫瘍細胞の増殖を抑制した。また対照群と比較し TAE226 投与群において破骨細胞の存在を示す TRAP 陽性多核細胞の出現の有意な減少が確認された。
2. TAE226 はマウス破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞の細胞増殖能、細胞遊走能、細胞接着能を抑制し、RANKL 下流の破骨細胞分化シグナルを濃度依存的に抑制した。また成熟破骨細胞における骨吸収マーカータンパク発現も濃度依存的に抑制した。

以上の結果から、癌骨破壊病変において、TAE226 による FAK 阻害が腫瘍増殖抑制効果のみならず、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化や破骨細胞の骨吸収活性を直接的に抑制する可能性が示唆された。

これらの知見は癌骨破壊病変の新たな治療法の開発に対し一つの方向性を示唆するものである。

よって、本論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと認めた。