

氏名	吉岡 徳枝
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2488号
学位授与の日付	平成15年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症に対する血管新生阻害剤TNP-470の効果に関する基礎的研究
論文審査委員	教授 菅原 利夫 教授 北山 滋雄 教授 松村 智弘

学位論文内容の要旨

【 緒言 】

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症 (humoral hypercalcemia of malignancy, 以下 HHM) は、癌細胞が産生する液性因子である PTH-related protein (以下 PTHrP) により全身的な骨吸収が亢進して誘発され、患者の QOL を低下させる大きな負の要因であり、破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たす。近年、新たな癌治療として血管新生阻害剤が注目されている。Sasaki らは骨転移動物実験モデルを用いてフマギリン誘導体である血管新生阻害剤 TNP-470 が血管新生阻害作用による抗腫瘍効果のみならず骨吸収抑制作用を有し、骨転移巣での局所的な骨破壊を抑制することを報告した。このことは、TNP-470 が HHM に対しても有効であることを示唆するがその効果は不明であり、TNP-470 の骨代謝系への作用機序に関しても明らかではない。本研究では、PTHrP 産生ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 OCC-1 を移植して作製した HHM 実験動物モデルに対する TNP-470 の有用性を検討した。さらに、TNP-470 の破骨細胞性骨吸収抑制機構の解析を行った。

【 材料および方法 】

1. 高カルシウム血症に対する TNP-470 の治療的効果に関する検討

1) HHM モデルの作製: OCC-1 細胞をヌードマウスの背部皮下に移植し、腫瘍が生着し HHM が発症する前からの TNP-470 の投与 (予防的投与) と HHM 発症後の投与 (治療的投与) について、血中 Ca 値、腫瘍体積、生存率、および腎機能について検討し、頭蓋冠・腫瘍の組織学的評価を行った。

2) 悪性腫瘍を伴わない高カルシウム血症の作製: PTHrP と IL-1 β を入れた浸透圧ポンプをマウス皮下に埋入し、高カルシウム血症を誘発させ、TNP-470 の効果を検討した。

2. *In vitro* における TNP-470 の破骨細胞性骨吸収抑制機構に関する検討

1) 破骨細胞形成系に対する影響: マウス骨髄細胞を $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (以下 VD_3) あるいは PTHrP の存在下で培養する系とマウス脾細胞を soluble receptor activator NF- κ B ligand (以下 sRANKL) と M-CSF を添加し培養する系の 2 種類の破骨細胞形成系に対して、各濃度の TNP-470 を添加して培養し、破骨細胞のマーカーである TRAP 陽性多核細胞数をカウントし破骨細胞形成の評価を行った。

2) 破骨細胞の骨吸収活性に対する影響: 骨芽細胞様細胞とマウス骨髄細胞を VD_3 存在下で共存培養して誘導した破骨細胞を回収して象牙質片上に播種し、各濃度の TNP-470 を添加し 24 時間後に形成された吸収窩を測定した。

3) 破骨細胞形成調節因子への影響: 破骨細胞形成支持細胞が発現する破骨細胞形成調節因

子であるM-CSF, RANKL, osteoprotegerin (以下OPG) と破骨細胞前駆細胞におけるそれらの受容体である*c-fms*, RANKのm-RNA発現に対するTNP-470の影響についてRT-PCR法を用いて検討した。

4) TNP-470の細胞増殖および細胞障害性に関する検討: 破骨細胞形成に関与する細胞(ST2, 骨芽細胞様細胞, 破骨細胞前駆細胞)に各濃度のTNP-470を添加し72時間培養後, 細胞増殖抑制効果に関しては生細胞数を, 細胞障害性に関してはLDH活性を指標に検討した。

【 結果 】

1. 高カルシウム血症に対するTNP-470の効果

TNP-470は治療的投与および予防的投与の両者において血中Ca値の上昇と腫瘍の増殖を抑制し, マウスの生存を延長した。悪性腫瘍を伴わない高カルシウム血症に対してもTNP-470は血中Ca値の上昇を抑制した。組織学的には, 頭蓋冠において対照群では活発な破骨細胞性骨吸収を認めたが, TNP-470投与群では著明に抑制され, 腫瘍においてはTNP-470投与群で腫瘍中心部の壊死の拡大を認めた。

2. In vitroにおけるTNP-470の破骨細胞性骨吸収に対する影響

in vitroにおいてTNP-470は 10^{-2} ~ 10^2 ng/mlの濃度で破骨細胞の形成および成熟破骨細胞の骨吸収活性を抑制した。TNP-470は破骨細胞形成支持細胞におけるM-CSF, RANKL, OPGの発現, および破骨細胞前駆細胞における*c-fms*, RANKの発現に影響を与えなかった。また破骨細胞形成に関与する細胞の増殖抑制や障害性も認めなかった。一方, TNP-470はsRANKLとM-CSFを添加して破骨細胞前駆細胞から誘導される破骨細胞形成を抑制した。

【 考察 】

近年, 血管新生を標的とした新たな癌治療が注目されているが, 血管新生と破骨細胞による骨吸収との関連性を示唆する報告があり, 癌に誘発される骨病変に対する血管新生阻害剤の有用性が期待できる。

本研究では, PTHrPを産生する癌細胞をヌードマウスに皮下移植して作製したHHMモデルに対するTNP-470の治療効果について, 臨床における治療に即したHHM発症後からの投与(治療的投与)とHHM発症前からの投与(予防的投与)を設定して検討し, TNP-470が両投与方法において血中Ca値の上昇と腫瘍の増殖を抑制することを明らかにした。また頭蓋冠の組織学的検討から, TNP-470が癌細胞の産生するPTHrPに誘発された破骨細胞性骨吸収を抑制することが示唆された。TNP-470のHHMに対する抑制機序として, 1)血管新生阻害作用を介する抗腫瘍効果により腫瘍が産生するPTHrPが減少したことによる二次的効果, 2) TNP-470が直接, 破骨細胞性骨吸収を抑制することが考えられ, 悪性腫瘍を伴わない高カルシウム血症を作製し, TNP-470の効果を検討したが, TNP-470は血中Ca値の上昇を抑制した。このことから, TNP-470が直接的に破骨細胞性骨吸収を抑制してHHMを改善することが示唆された。またin vitroの解析から, TNP-470が破骨細胞の形成および骨吸収活性を抑制することが明らかになった。TNP-470は破骨細胞形成調節因子の発現に影響を与えず, 破骨細胞形成に関与する細胞に対して増殖抑制や障害性を示さなかった。一方, 破骨細胞前駆細胞から誘導される破骨細胞形成系に対して抑制的に働いたことから, RANKL/RANKシグナルを阻害することにより破骨細胞性骨吸収抑制効果を示すことが示唆された。

【 結論 】

血管新生阻害作用による抗腫瘍効果と破骨細胞性骨吸収抑制作用を併せ持つTNP-470は, 高カルシウム血症をはじめ癌の骨浸潤・骨転移など, 癌に誘発される骨病変の治療に有用である。

論文審査結果の要旨

悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症は、癌細胞が産生する液性因子である PTH-related protein (PTHrP) により全身的な骨吸収が亢進して誘発され、その機序に破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たすことが知られている。近年、血管新生を標的とした新たな癌治療が注目されているが、血管新生と破骨細胞性骨吸収との関連を示唆する様々な報告があり、癌に誘発される骨病変に対する血管新生阻害剤の有用性が期待できる。

本研究では、PTHrP 産生ヒト口腔扁平上皮癌細胞株を移植して作製した高カルシウム血症動物実験モデルに対する血管新生阻害剤 TNP-470 の治療的効果について検討し、さらに TNP-470 が骨代謝系に及ぼす影響を明らかにするために破骨細胞性骨吸収抑制機構の解析を行っている。その結果、TNP-470 は担癌マウスにおける血中カルシウム値の上昇ならびに腫瘍の増殖を抑制したのみならず、PTHrP と IL-1 β により誘発させた非担癌の高カルシウム血症をも抑制した。このことは TNP-470 が直接的に破骨細胞性骨吸収を抑制して高カルシウム血症を改善することを示唆する。さらに *in vitro* の解析により、TNP-470 が破骨細胞形成および破骨細胞による骨吸収活性を抑制することを明らかにし、その抑制効果は RANKL/RANK シグナル伝達系を阻害することによる可能性を示唆している。

これらの結果は、血管新生阻害作用による抗腫瘍効果と破骨細胞性骨吸収抑制作用を併せ持つ TNP-470 が、高カルシウム血症をはじめ癌の骨浸潤・骨転移など、癌に誘発される骨病変の治療に有用であることを示唆する重要な知見であると考えられる。

従って、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものであると判定した。