

論文要旨等報告書

氏名	伊原木 聡一郎
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 3347 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	骨破壊部における癌細胞のMMP-13の発現制御機構に関する研究

論文審査委員 教授 佐々木 朗 教授 菅原 利夫 助教授 長塚 仁

学位論文内容の要旨

【緒言】

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。

Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) は骨転移巣において骨芽細胞によって産生され、骨の I 型コラーゲンを分解し、破骨細胞性骨吸収と共役的役割を果たす。I 型コラーゲンは骨基質の 90 %以上を構成しその主要な受容体は $\alpha 1\beta 1$ インテグリンと $\alpha 2\beta 1$ インテグリンである。インテグリンは細胞外領域で細胞外基質と結合し、細胞内領域で様々なシグナル伝達因子と結合し、細胞の増殖、分化、生存、細胞骨格などに関与するシグナルを細胞内へと伝える。インテグリンを介したシグナル伝達には、FAK (Focal Adhesion Kinase) のリン酸化が深く関与している。

これまでの研究からMMP-13は、I型コラーゲンと線維芽細胞との接着で強力に誘導されることや、骨芽細胞においてPTHによって強く誘導されることが報告されている。これらの一連の研究から、PTHrPおよびI型コラーゲンは癌骨破壊部におけるMMP-13産生に深く関与している可能性が示唆されるが、その発現誘導機構についての詳細は不明である。そこで本研究では、癌骨破壊部におけるMMP-13の発現制御機構を明らかにすることを目的に、癌骨破壊部においてPTHrPとI型コラーゲンがMMP-13発現へ与える変化、およびこれに関わるシグナル伝達因子について検討した。

【材料および方法】

1) 癌骨転移モデルの作成

癌骨転移モデルは乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞をヌードマウスの心腔内注入にて作製した。25 日後マウスを屠殺し、癌骨破壊部における MMP-13 および PTHrP と PTHIR また I 型コラーゲンの発現を、共焦点顕微鏡 (Bio Rad) を用いて免疫組織学的に評価した。

2) In vitro における MMP-13 発現の検討

MDA-MB-231細胞にPTHrPを添加し、MMP-13の発現をウエスタンブロット法 (以下WB法)、免疫沈降法、定量的リアルタイムRT-PCR法 (以下定量的PCR法) を用いて検討した。またI型コラーゲンをコートしたシャーレにMDA-MB-231細胞を播種し、MMP-13発現をWB法、定量的PCR法を用いて検討した。さらに抗インテグリン抗体を添加し、その効果について検討を行った。

3) MMP-13 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 PKA, PKC, ERK, p38, JNK 阻害剤をそれぞれ MDA-MB-231 細胞に添加し, MMP-13 の発現への影響を WB 法, 定量的 PCR 法を用いて検討した。さらに PTHrP 刺激後のそれらのシグナル伝達因子のリン酸化を WB 法にて調べた。I 型コラーゲン下流のシグナル伝達因子である FAK, PKC, ERK, p38, JNK 阻害剤また抗インテグリン抗体をそれぞれ添加し, MMP-13 発現への影響を検討した。さらに I 型コラーゲン刺激後のそれらのシグナル伝達因子のリン酸化を WB 法にて調べた。PTHrP と I 型コラーゲン下流のシグナル伝達因子の細胞内局在を, 共焦点顕微鏡を用いて免疫蛍光抗体法にて検討した。

【結果および考察】

1) 癌骨破壊部における PTHrP-PTH1R, インテグリン α 1, α 2, β 1, I 型コラーゲンおよび MMP-13 の発現

癌骨破壊部における, MMP-13 と PTHrP の発現および PTHrP と PTH1R の発現はそれぞれ癌細胞に一致して高発現していた。また, インテグリン α 1, α 2, β 1 の発現は骨破壊部の癌細胞に高発現しており, I 型コラーゲンの発現は骨および骨細胞に発現していた。また MMP-13 とインテグリン α 1, α 2, β 1 の発現はそれぞれ一致していた。これらの結果から, 骨微小環境における癌細胞の MMP-13 の発現は, PTHrP と I 型コラーゲンが制御していることが示唆された。

2) PTHrP が培養癌細胞における MMP-13 の発現に与える影響

MDA-MB-231 細胞を PTHrP で刺激すると, MMP-13 の培養液中への産生量と細胞質への蓄積が亢進した。これまでの研究から PTHrP は様々な細胞培養系において PKC と MAPK を制御することが報告されている。本研究において PKC 阻害剤, MEK1/2 阻害剤, PKA 阻害剤は PTHrP によって誘導された MMP-13 発現を阻害した。また PKC 阻害剤は PTHrP によって誘導された ERK1/2 の活性化を阻害した。PTHrP によって PKC と ERK1/2 のリン酸化が起こり, それぞれ細胞膜と核への移行が確認された。これらの結果より, PTHrP 下流の PKA, PKC-ERK1/2 経路が MMP-13 発現において重要な役割を果たすことが示唆された。

3) I 型コラーゲンが培養癌細胞における MMP-13 の発現に与える影響

MDA-MB-231 細胞を I 型コラーゲンで刺激すると, MMP-13 の細胞質への蓄積が亢進し, その効果は α 1, α 2, β 1 それぞれのインテグリンに対する抗体で阻害されたことから I 型コラーゲン依存的な MMP-13 発現は α 1 β 1 と α 2 β 1 インテグリンを経由するシグナルの活性化が重要であることが明らかとなった。I 型コラーゲンとの接着によって FAK, ERK1/2, p38 および JNK のリン酸化が起こり, FAK 阻害剤によって ERK1/2, p38, JNK のリン酸化は阻害された。さらに I 型コラーゲン依存的な MMP-13 発現は FAK 阻害剤, p38 阻害剤によって阻害され, PKC 阻害剤, MEK1/2 阻害剤によって促進された。I 型コラーゲンで刺激すると p38 のリン酸化が起こり, 核への移行が確認された。これらの結果より骨破壊部における癌細胞は I 型コラーゲンとの接着により ERK1/2 と p38 の活性化のバランスで MMP-13 発現を調節していることが示唆された。

【結 論】

癌骨破壊部における癌細胞は MMP-13 を高発現し, その発現は, 癌細胞の産生する PTHrP のオートクライン作用と, α 1 β 1, α 2 β 1 インテグリンを介した骨の I 型コラーゲンとの接着によって制御され, それぞれ PKA, PKC-ERK MAPK シグナルと, FAK-p38 MAPK シグナルを介していることが明らかとなった。これらの結果より MMP-13 を制御している PTHrP とその下流のシグナル伝達因子, さらにインテグリンとその下流に関わるシグナル伝達因子を分子標的とした治療法が, 癌の骨転移や骨浸潤の治療に非常に有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) は骨破壊部において骨芽細胞によって産生され、骨の I 型コラーゲンを分解し、破骨細胞性骨吸収と共役的役割を果たす。

MMP-13 は、I 型コラーゲンと線維芽細胞との接着で強力に誘導されることや、骨芽細胞において副甲状腺ホルモン (PTH) によって強く誘導されることが報告されている。これらの一連の研究から、副甲状腺ホルモン関連タンパク (PTHrP) および I 型コラーゲンは骨破壊部における癌細胞の MMP-13 産生に深く関与している可能性が示唆されるが、その発現制御機構についての詳細は不明である。

そこで本研究では、骨破壊部における癌細胞の MMP-13 の発現制御機構を明らかにすることを目的に、骨破壊部において PTHrP と I 型コラーゲンが癌細胞の MMP-13 の発現へ与える影響、およびこれに関わるシグナル伝達機構について検討し、以下の結論を得た。

- 1) MMP-13 は骨破壊部において骨芽細胞のみならず癌細胞によっても産生されていた。
- 2) 癌細胞の MMP-13 の発現は、癌細胞の産生する PTHrP のオートクライン作用と、骨の構成成分である I 型コラーゲンと接着する $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ インテグリンを介して制御されていた。
- 3) さらに PTHrP と I 型コラーゲンによる MMP-13 の発現は、それぞれ PKA, PKC-ERK MAPK シグナルと、FAK-p38 MAPK シグナルを介して制御されていた。

これらの知見は骨破壊部における癌細胞の MMP-13 の発現制御機構を明らかにし、MMP-13 を制御している PTHrP とその下流のシグナル伝達因子、さらにインテグリンとその下流に関わるシグナル伝達因子を分子標的とした新たな癌の骨転移や骨浸潤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。