

氏名 松村 晋輔

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 2971 号

学位授与の日付 平成 17 年 3 月 25 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 ERK 1/2 MAPK を分子標的としたヒト骨肉腫細胞の分化誘導治療に関する基礎的研究

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 佐々木 朗 教授 菅原 利夫

学位論文内容の要旨

[緒言]

骨肉腫は、骨悪性腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり、集学的治療により治癒率は、向上するものの難治性の腫瘍の一つである。したがって現在行われている治療で、抵抗性を示す骨肉腫には異なった角度からの治療戦略が必要であると考えられるが癌細胞の特性を利用した分化誘導療法の開発は、新たな癌の治療法の 1 つとして期待される。ところで骨芽細胞、軟骨細胞の分化は多様なシグナリング伝達経路を介した制御にて引き起こされる。最近の研究で、骨の成長または骨の分化マーカー遺伝子を制御する転写因子の発見により骨芽細胞の増殖、分化のメカニズムが明らかとなってきたが、その上流に存在するシグナル伝達因子の制御メカニズムはいまだに良く分かっていない。本研究では、同じ間葉系由来の骨肉腫細胞における増殖、分化に関する MAPK (mitogen-activated-protein-kinases) シグナル伝達機構を明らかにし、これらの MAPK を分子標的とした骨肉腫の分化誘導療法の確立を目指し、その可能性について検討した。

[材料ならびに方法]

1. 細胞培養

ヒト骨肉腫細胞株 SaOS-2 細胞株を 10% ウシ胎児血清 (FBS) 含有 α -MEM 培地を用い 5% CO₂ の条件下で培養した。

2. DNA 合成能の測定

DNA 合成能は、SaOS-2 細胞を [³H] チミジン (10 μ Ci/ml) にて 4 時間パルスラベル後、その放射活性をマイクロプレート用シンチレーションカウンターで測定した。

3. アルカリホスファターゼ (ALPase) 活性の測定

ALPase 活性の測定は、Bessey らの方法に準じて行い、細胞可溶化後、上清を回収し、0.5mM パラニトロフェニルリン酸 2 ナトリウムによる発色反応を分光光度計で 410nm の波長における吸光度を測定した。

4. MAPK シグナル伝達系における各タンパク発現の検討

一次抗体は、ERK, pERK (リン酸化 ERK), p38, pp38 (リン酸化 p38) 抗体を用いウエスタンブロット法にて行った。

5. 定量的 RT-PCR

SaOS-2 細胞より Trizol を用いて total RNA を抽出し、逆転写を行った後、Light Cycler にて定量的 PCR を行った。

6. 免疫染色

SaOS-2 細胞を -20 °C に冷却したメタノールにて細胞の固定を行い、一次抗体 (pERK MAPK, pp38 MAPK) 反応を 4°C にて over night 行った。FITC 又は Rodamin を付加した二次抗体を反応させ共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

[結果]

1. SaOS-2 細胞における MAPK 阻害剤の増殖能に対する影響
10% FBS で刺激した SaOS-2 細胞の増殖能の亢進は PD98059, SB203580 添加で共に阻害され、その効果は 20 μ M で有意差を認めた。
2. Saos2 細胞における MAPK 阻害剤の ALP 活性に与える影響
10% FBS で刺激した SaOS-2 細胞に PD98059 を添加すると, ALP 活性の上昇を認めた。一方 SB203580 添加で有意に低下が認められた。
3. SaOS-2 細胞における MAPK 阻害剤の各種分化マーカーに対する影響
 - 1) I 型コラーゲン mRNA は、コントロールと比較して PD98059 添加で有意に上昇することがわかった。一方 SB203580 添加では濃度依存的に抑制された。
 - 2) ALP mRNA の発現は、コントロールと比較して、PD98059 添加で濃度依存的に発現の上昇を認め、SB203580 添加にて有意に発現の低下を認めた。
 - 3) オステオポンチン mRNA 発現は、コントロールと比較して、PD98059 添加で濃度依存的に発現の上昇を認め、SB203580 添加にて有意に発現の低下を認めた。
 - 4) オステオカルシン mRNA 発現は、コントロールと比較して、PD98059 添加で濃度依存的に発現の上昇を認め、SB203580 添加にて有意に発現の低下を認めた。
4. BMP-2 mRNA 発現は、コントロールと比較して、PD98059 添加で濃度依存的に発現の上昇を認め、SB203580 添加にて有意に発現の低下を認めた。
5. Runx2 mRNA 発現は、コントロールと比較して、PD98059 添加で濃度依存的に発現の上昇を認め、SB203580 添加にて有意に発現の低下を認めた
6. SaOS-2 細胞における MAPK 阻害剤の ERK, p38 リン酸化に対する影響について
 - 1) SaOS-2 細胞を 10% FBS にて刺激後、PD98059 を添加すると 10 分後より有意に ERK リン酸化抑制が起こり、その効果は、PD98059 濃度依存的であった。興味深いことに、ERK リン酸化は、SB203580 添加で時間濃度依存的に上昇することが明らかとなった。
 - 2) SaOS-2 細胞を 10% FBS にて刺激後、SB203580 を添加すると、p38 のリン酸化は発現は時間依存的に抑制を認め、その効果は SB203580 濃度依存的であった。興味深いことに、p38 のリン酸化の発現量は、PD98059 で、時間依存的に濃度依存的に上昇することが明らかとなった。
 - 3) それぞれの MAPK 阻害剤を添加し、30 分後、ERK, p38 MAPK のリン酸化を共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。PD98059 添加にて pERK の発現は低下したが、一方 pp38 の発現は上昇が認められた。さらに、SB203580 を FBS で刺激した SaOS-2 細胞に添加すると pp38 の発現は低下し、一方で pERK の発現は、上昇を認め、核に集積することが認められた。

[考察]

これらの結果から、血清で刺激した SaOS-2 細胞において ERK MAPK シグナル伝達系は細胞増殖に、p38 MAPK は分化に大きく関わっていることが示唆された。ERK MAPK シグナル伝達を PD98059 を用いて選択的に阻害することで、SaOS-2 細胞の増殖能を阻害するだけでなく、p38 MAPK のリン酸化を促進させ、p38 MAPK シグナル下流に存在する I 型コラーゲン、ALP、オステオポンチン、オステオカルシン、BMP-2、Runx2 発現を上昇させ、SaOS-2 細胞を分化の方向へ直接的、間接的に誘導することが明らかとなった。したがって、ERK 1/2 MAPK を PD98059 阻害剤を用いて分子標的することで、骨肉腫細胞の分化誘導療法への可能性が示唆された。

[結論]

ERK MAPK シグナル伝達を分子標的とすることで、ヒト骨肉腫細胞株の増殖能を抑制すると共に、その分化形質の発現を促進することが明らかとなり、悪性腫瘍の分化誘導療法への応用、骨肉腫の治療、再発、転移阻止に期待できると思われる。

論文審査結果の要旨

骨肉腫は骨悪性腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍であり、治癒率も上がってきているものの予後不良の悪性疾患の一つである。近年、癌治療において癌細胞の分化能を促進させる分化誘導療法が注目されているが、骨肉腫においても細胞の分化の調節機構を解析することにより、分化誘導療法の開発が期待できる。骨の成長や分化の表現型を示す遺伝子を制御する転写因子の発見などにより骨芽細胞の増殖、分化のメカニズムが明らかとなってきたが、その上流に存在するシグナル伝達系の制御機構に関しては今だ不明な点も多い。本研究では、骨肉腫の分化誘導療法の開発を目的に、骨肉腫細胞の細胞増殖・分化を調整する細胞内シグナル伝達系を *in vitro* で明らかにし、さらにその制御により骨肉腫細胞の分化を促進しうるか否かについて検討した。特に軟骨細胞などの間葉系細胞の増殖、分化に重要な働きをすることが明らかにされてきている MAPK (mitogen-activated protein-kinases)のうち、ERK MAPK および p38 MAPK に着目し、ヒト骨肉腫細胞株(SaOS-2)におけるこれらのシグナル伝達系と細胞増殖・分化との関連を各種 MAPK 阻害剤を用いて解析し、その結果、以下の結論を得ている。

1. SaOS-2 細胞において ERK MAPK および p38 MAPK は、それぞれの阻害剤添加により細胞増殖能は有意に抑制されているが、増殖抑制の効果はあまり強いものではなかった。
2. ERK MAPK シグナル伝達をその選択的阻害剤である PD98059 で阻害すると SaOS-2 細胞の ERK MAPK のリン酸化が抑制されるだけでなく、p38 MAPK のリン酸化が亢進した。さらに骨の分化マーカー(I 型コラーゲン, ALP, オステオポンチン, オステオカルシン, BMP-2, Runx2) の発現が上昇し、SaOS-2 細胞は分化の方向へ直接的、間接的に誘導されることが明らかとなった。また p38 MAPK 阻害剤である SB203580 を添加すると、p38 MAPK のリン酸化が抑制されるだけでなく、ERK MAPK のリン酸化が亢進し、骨の分化マーカーの発現抑制を認めた。これにより、p38 MAPK シグナル伝達は、分化能に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに ERK MAPK と p38 MAPK との間にはシーソークロストークがあるという興味ある結果が示された。

これらの知見は骨肉腫細胞の MAPK シグナル伝達機構と細胞分化との関連を明らかにしたものであり、これらの MAPK シグナル伝達系の制御は、新たな癌治療法の開発に重要な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。