

学 位 論 文 題 名

PTHrP promotes malignancy of human oral cancer
cell downstream of the EGFR signaling

(EGFR シグナル伝達経路の下流で産生された PTHrP は
ヒト口腔癌細胞の悪性化に関与する)

学位論文内容の要旨

扁平上皮癌は口腔領域の悪性腫瘍の中で最も頻度が高く、著明な局所浸潤能を示すことが少ない。口腔扁平上皮癌が近接する顎骨に広範囲に浸潤した際には外科的骨離断術を施行せねばならないことが多く、術後の患者の quality of life (QOL) に多大なる影響を及ぼす。こうした患者の QOL の保持・向上のためには、骨離断術に代わる低侵襲性の保存的治療法の確立が急務である。

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) は破骨細胞性骨吸収を誘導する因子として同定され、近年、悪性腫瘍存在下における高カルシウム血症の誘導因子であることが明らかとなっている。また、PTHrP は乳癌・大腸癌・前立腺癌などにおいて、癌細胞の増殖・生存・接着・移動・浸潤等の悪性形質発現に関与していることが報告されている。しかし、口腔癌においては、PTHrP の発現の有無について報告したものはほとんどなく、悪性形質との関連性についても不明な点が多い。そこで本研究では、口腔扁平上皮癌の悪性形質発現と PTHrP との関わりについて検索し、さらに PTHrP の発現メカニズムを解明することを目的として実験を行なった。

実験には、5 種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4) を用い、ヒト正常歯肉線維芽細胞 (HGF) をコントロールとして使用した。これらの細胞株における PTHrP の mRNA 及びタンパクの発現を解析したところ、SAS を除く全ての癌細胞株で PTHrP の mRNA とタンパクの発現が認められた。とくに、HSC-2 および HSC-4 細胞では PTHrP の発現が著しく亢進していた。PTHrP の発現は、骨転移や骨浸潤を高頻度に引き起こす前立腺癌や骨肉腫等で亢進していることが報告されているが、口腔癌細胞株での PTHrP の発現量はそれらの細胞株よりも著しく高いことが明らかとなった。

次に、PTHrP の発現制御メカニズムについて検討した。口腔内環境には上皮細胞増殖因子 epidermal growth factor (EGF) が豊富に存在し、また口腔癌細胞は通常 EGF 受容体 (EGFR) を高発現していることから、EGF-EGFR シグナル伝達経路が口腔癌の悪性形質に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されている。そこで、EGF-EGFR シグナル伝達経路の下流で PTHrP の発現が制御されているのではないかと推察し、その可能性を検証し

た。上述の細胞を EGF で刺激し、PTHrP mRNA の発現誘導をリアルタイム RT-PCR 法にて解析したところ、EGF 刺激後、時間依存的な発現誘導が認められた。この発現誘導は EGFR の阻害薬 AG1478 処理によって抑制された。これらの結果より、PTHrP の発現は EGFR シグナル伝達経路の下流で制御されていることが明らかとなった。EGFR の下流には ERK1/2、p38 MAPK、SAPK/JNK 等の MAPK シグナル伝達経路の存在が知られているため、次に MAPK のどの経路が PTHrP の発現に関与しているかについて検討した。ERK1/2 阻害薬 U0126、p38 MAPK 阻害薬 SB203580、SAPK/JNK 阻害薬 SP600125 で前処理した口腔癌細胞株の EGF 刺激時の PTHrP の発現量を検討したところ、ERK1/2 と p38 MAPK を阻害した場合にのみ PTHrP の発現が抑制された。以上の結果より、PTHrP の発現は、EGFR シグナル伝達経路の下流で ERK1/2、p38 MAPK を介して制御されていることが明らかとなった。

次に、EGFR シグナル依存的に産生された PTHrP が口腔癌細胞の悪性形質発現に影響を及ぼしているかについて検討した。RNA 干渉法を用いて PTHrP の発現を抑制したところ、がん細胞の悪性形質の指標である細胞増殖能・運動能・浸潤能の全てにおいてその抑制効果が認められた。また、AG1478 処理による PTHrP の発現抑制によっても同様の効果が認められた。これらの結果から、EGFR の下流で発現した PTHrP は口腔癌細胞株の悪性形質の発現を亢進していることが明らかとなった。

最後に、PTHrP による悪性形質の誘導メカニズムを解析した。PTHrP はその受容体である PTH1R に作用し、シグナル伝達経路を制御することが報告されている。そこで、口腔癌細胞株における PTH1R の発現をウエスタンブロッティング法で検索したところ、全ての細胞株において PTH1R の発現が認められた。さらに、口腔癌細胞を PTHrP で刺激すると、ERK1/2 および Akt のリン酸化が亢進されることが明らかとなった。一方、PTHrP ノックダウン口腔癌細胞においては、これらのリン酸化が抑制され、細胞増殖、細胞運動および細胞浸潤活性が低下した。

以上の結果から、口腔癌細胞において EGFR シグナル伝達経路の下流で産生された PTHrP は、自身の PTH1R に自己分泌的に作用して ERK1/2 及び AKT 経路を活性化し、細胞の増殖能・運動能・浸潤能を亢進させることにより、癌細胞の悪性化に関与することが推察された。

現在、乳癌等においては中和抗体や RNA 干渉を利用した PTHrP をターゲットとする治療（分子標的治療）が試みられており、癌細胞の増殖抑制やアポトーシスの誘導、さらに生命予後の延長などが報告されている。本研究において、RNA 干渉法や AG1478 による PTHrP の発現抑制により口腔癌細胞の悪性形質の発現を抑制できたことから、PTHrP および EGFR シグナル伝達経路は口腔癌治療においても有効な分子標的となり得る可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 進 藤 正 信

副 査 教 授 網 塚 憲 生

副 査 准教授 大 場 雄 介 (医学研究科)

学 位 論 文 題 名

PTHrP promotes malignancy of human oral cancer cell downstream of the EGFR signaling

(EGFR シグナル伝達経路の下流で産生された PTHrP は
ヒト口腔癌細胞の悪性化に関与する)

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。審査論文の概要は以下の通りである。

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP)は、乳癌や大腸癌、前立腺癌などにおいて、癌細胞の増殖・生存・接着・移動・浸潤等の悪性形質発現に関与していることが知られているが、口腔癌では PTHrP に着目した研究はほとんど行われていない。本研究は、口腔扁平上皮癌の悪性形質発現と PTHrP との関係、ならびに PTHrP の発現メカニズムの解明を目的に行われた。

実験には 5 種類のヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, Ca9-22, HSC-2, HSC-3, HSC-4)を用い、ヒト正常歯肉線維芽細胞(HGF)をコントロールとして使用した。まず、これらの細胞株における PTHrP mRNA とそのタンパクの発現について検討し、SAS を除く全ての癌細胞株において発現が認められ、とくに HSC-2 と HSC-4 細胞で発現が著しく亢進していること、また口腔癌細胞株における PTHrP の発現量は前立腺癌や骨肉腫の細胞株よりも著しく高いことを明らかにした。

次に PTHrP の発現制御メカニズムについて検討した。口腔癌の悪性形質の発現に EGF-EGFR シグナル伝達経路が何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆されていることから、EGF-EGFR シグナル伝達経路の下流で PTHrP の発現が制御されているのではないかと推察し、その可能性を検証した。上述の細胞を EGF で刺激後、real-time RT-PCR 法により解析し、PTHrP mRNA の発現は時間依存的に認められること、またこの発現誘導は EGFR 阻害薬の AG1478 処理によって抑制されることを示し、PTHrP の発現は EGFR シグナル伝達経路の下流で制御されていることを明らかにした。さらに PTHrP の

発現は、EGFR の下流に存在する MAPK シグナル伝達経路のうち、いずれの経路に関与しているかを明らかにするため、ERK1/2 阻害薬 U0126, p38 MAPK 阻害薬 SB203580, SAPK/JNK 阻害薬 SP600125 で前処理した口腔癌細胞株を EGF 刺激し、PTHrP の発現量を検討した。その結果、ERK1/2 と p38 MAPK を阻害した場合にのみ発現が抑制されることを示し、PTHrP の発現は EGFR シグナル伝達経路の下流で ERK1/2, p38 MAPK を介して制御されることを明らかにした。

次に、RNA 干渉法を用いて PTHrP の発現を抑制し、PTHrP の悪性形質発現への影響を検討した。その結果、がん細胞の悪性形質の指標である細胞増殖能・運動能・浸潤能が全て抑制され、また AG1478 処理による PTHrP の発現抑制によっても同様の効果が認められることを明らかにし、EGFR の下流で発現した PTHrP が口腔癌細胞株の悪性形質の発現を亢進していることを示した。

最後に、PTHrP による悪性形質の誘導メカニズムについて解析した。口腔癌細胞株における PTH1R の発現をウェスタンブロッティング法で検索し、全ての細胞株において PTH1R が発現していることを明らかにした。さらに口腔癌細胞を PTHrP で刺激すると ERK1/2 および Akt のリン酸化が亢進されること、一方 PTHrP ノックダウン口腔癌細胞においてはこれらのリン酸化が抑制され、細胞増殖、細胞運動および細胞浸潤活性が低下することを明らかにした。これらの結果から、口腔癌細胞において、EGFR シグナル伝達経路の下流で産生された PTHrP は自身の PTH1R に自己分泌的に作用して ERK1/2 及び AKT 経路を活性化し、細胞の増殖能や運動能、浸潤能を亢進させることにより、癌細胞の悪性化に関与すると考察した。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、以下の通りである。

1. PTHrP の蛍光免疫染色の結果からみて、PTHrP の細胞内局在はどこと考えるか？
2. EGFR 阻害剤 AG1478 により PTHrP の発現レベルは減少しているが、そのレベルは basal level よりも減少しているのか？
3. EGFR の下流で産生される PTHrP のプロモーター解析は行なったか？ もし行なっているとしたら、正常の細胞と癌細胞の間に相違はあったか？
4. PTHrP の発現ががんの悪性化に関与するということは普遍的なことか？
5. PTHrP ががんの悪性化に関与する際、in vivo では、癌細胞が産生する PTHrP が癌細胞自身に作用することと、周囲環境に作用することのいずれが重要と考えるか？
6. EGFR 阻害剤 AG1478 の使用により十分に癌細胞自身の悪性化を抑制できるのに、今回の研究で EGFR の下流で産生される PTHrP をターゲットとしたのは何故か？

いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、口腔癌細胞において、EGFR シグナル伝達経路の下流で産生された PTHrP は自身の PTH1R に autocrine 的に作用して ERK1/2 及び AKT 経路を活性化し、細胞の増殖能や運動能、浸潤能を亢進させることにより、癌細胞の

悪性化に関与することを明らかにしている。また、PTHrP および EGFR シグナル伝達経路は口腔癌治療において有効な分子標的となり得る可能性を示したことが高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。