

Title	Monoclonal antibody to parathyroid hormone-related protein induces differentiation and apoptosis of chondrosarcoma cells
Author(s)	宮地, 高弘
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45369
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	宮地 高 弘
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18528 号
学位授与年月日	平成 16 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Monoclonal antibody to parathyroid hormone-related protein induces differentiation and apoptosis of chondrosarcoma cells (PTHrP モノクローナル抗体の軟骨肉腫細胞株に対する細胞死誘導作用と分化促進作用)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 野口眞三郎 教授 青笹 克之

論文内容の要旨

【目的】軟骨肉腫は骨肉腫、骨髄腫について頻度の高い原発性悪性骨腫瘍であるが、化学療法や放射線療法への感受性が低く、治療方法が外科的切除に限られる。そのため今後の治療成績の向上には外科的治療法に加えて他の新たな治療法の探索も不可欠と考えられる。Parathyroid Hormone-Related Protein=PTHrP (副甲状腺ホルモン関連蛋白) は発現過程において、その下流で Bcl-2 の発現を促進しており、細胞死を抑制する働きを有していることが報告されている。また骨格形成過程において前肥大軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化を抑制する作用も有しており、骨軟骨腫や軟骨肉腫においてその発現量が多いほど悪性度が増すことが報告されている。本実験はこの PTHrP に対する中和作用を有するヒト型化抗 PTHrP モノクローナル抗体 (anti-PTHrP MoAb) を用いて、軟骨肉腫細胞株 (HTB-94) に対する細胞死誘導作用および軟骨細胞分化促進作用の有無を確認することを目的としている。

【方法】ヒト軟骨肉腫細胞株である HTB-94 に anti-PTHrP MoAb を投与し (0、10、30、50、100、200 μ g/ml)、投与後 2 日目の細胞死、投与後 7 日目の細胞分化について Westernblot 法、免疫細胞染色、RT-PCR 法、DNA fragmentation 法を用いて検討した。細胞死については PARP cleavage、procaspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白の変化を、細胞分化についてはより分化の進んだ肥大軟骨細胞のマーカーである type X collagen 発現の変化を検討した。また caspase-3 inhibitor (DEVD-CHO、20 μ M) を anti-PTHrP MoAb 投与以前より添加して、HTB-94 細胞死および細胞分化への影響を検討した。

【成績】HTB-94 は PTHrP を発現、産生していた。anti-PTHrP MoAb 投与 2 日目の TUNEL 染色における細胞死の割合は投与濃度に依存して上昇した。また細胞死の割合は anti-PTHrP MoAb 投与前に、caspase-3 inhibitor をあらかじめ投与しておくことにより減少した。mRNA レベルでは、anti-PTHrP MoAb 投与 2 日目の Bcl-2 の発現は低下し、Bax の発現は増加していた。蛋白レベルでは投与 2 日目の functional PARP、procaspase-3、Bcl-2 の産生は減少し、non-functional PARP、Bax 蛋白の産生は増加した。Anti-PTHrP MoAb 投与 7 日目では mRNA、蛋白レベルでも type X collagen の発現が増加していた。caspase-3 inhibitor の投与により 7 日目の type X collagen の産生に大きな変化はみられなかった。

【総括】 anti-PTHrP MoAb 投与による軟骨肉腫細胞 HTB-94 の細胞死誘導作用は、Bcl-2/Bax/caspase-3 を介する経路にて遂行されていると考えられた。anti-PTHrP MoAb 投与でより分化の進んだ肥大軟骨細胞のマーカーである type X collagen の増加がみられ、通常、肥大軟骨より未分化な状態にある HTB-94 に対して、分化促進作用を有すると考えられた。これらの結果より anti-PTHrP MoAb 投与は軟骨肉腫細胞株 HTB-94 に対して *in vitro* において細胞死誘導、分化促進作用による抗腫瘍効果を持つと考えられた。anti-PTHrP MoAb は軟骨肉腫治療に対して新たな補助的治療法となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

軟骨肉腫は骨肉腫、骨髄腫について頻度の高い原発性悪性骨腫瘍であるが、化学療法や放射線療法への感受性が低く、今後の治療成績の向上には新たな治療法の探索が不可欠である。Parathyroid Hormone-Related Protein=PTHrP (副甲状腺ホルモン関連蛋白) は発現過程において、Bcl-2 の発現を促進しており、細胞死を抑制する働きを有している。また骨格形成過程において前肥大軟骨細胞から肥大軟骨細胞への分化を抑制する作用を有しており、軟骨肉腫において発現量に比例し悪性度が増す。本実験の目的はヒト型化抗 PTHrP モノクローナル抗体 (anti-PTHrP MoAb) を用いて、軟骨肉腫細胞株 (HTB-94) に対する細胞死誘導作用および軟骨細胞分化促進作用を確認することである。HTB-94 に anti-PTHrP MoAb を投与し、投与後 2 日目の細胞死、7 日目の細胞分化について Westernblot 法、免疫細胞染色、RP-PCR 法、DNA fragmentation 法を用いて検討した。また caspase-3 inhibitor を anti-PTHrP MoAb 投与以前より添加して、HTB-94 細胞死および細胞分化への影響を検討した。anti-PTHrP MoAb 投与 2 日目の細胞死の割合は投与濃度に依存して上昇した。また細胞死の割合は caspase-3 inhibitor の投与により減少した。mRNA レベルでは、anti-PTHrP MoAb 投与 2 日目の Bcl-2 の発現は低下し、Bax の発現は増加していた。蛋白レベルでは投与 2 日目の functional PARP、procaspase-3、Bcl-2 の産生は減少し、non-functional PARP、Bax 蛋白の産生は増加した。anti-PTHrP MoAb 投与による軟骨肉腫細胞の細胞死誘導作用は、Bcl-2/Bax/caspase-3 を介する経路にて遂行されていると考えられた。anti-PTHrP MoAb 投与 7 日目では mRNA、蛋白レベルでもより分化の進んだ肥大軟骨細胞のマーカーである type X collagen が増加しており、分化促進作用を有すると考えられた。これらの結果より anti-PTHrP MoAb 投与は軟骨肉腫細胞株 HTB-94 に対して *in vitro* において細胞死誘導、分化促進作用による抗腫瘍効果を持つと考えられた。anti-PTHrP MoAb は軟骨肉腫治療に対して補助的治療法となる可能性がある。

以上の研究論文は学位の授与に値すると考えられる。