

(別紙様式第3号)

論 文 要 旨

論 文 題 目

Growth Inhibition of Human Prostate Cancer Cells in Human Adult Bone Implanted into Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice by a Ligand-Specific Antibody to Human Insulin-Like Growth Factors

(ヒト IGF 阻害抗体による NOD/SCID マウスに移植したヒト成人骨内におけるヒト前立腺がん細胞に対する増殖抑制効果)

氏名 吳屋真人 

【目的】進行性前立腺がんは高率に骨転移することが知られている。破骨細胞抑制物質を用いた最近の骨転移抑制実験により、前立腺がん細胞の骨における増殖に骨内増殖因子の重要性が示唆された。我々は骨内に多く存在するIGFに注目し、ヒトIGF阻止抗体を作製し、IGFを阻害することによりヒト前立腺がんの骨での増殖が抑制されるかを検討した。

【方法】1) rhIGF-1に対するラットモノクローナル抗体 KM1468 を作製した。まず、競合性ELISA法により、KM1468がヒトIGF-1、ヒトIGF-2、マウスIGF-1、マウスIGF-2、ヒトTGF- β 1、ヒトEGF、ヒトPDGF-AB、ヒトbFGF、ヒトインスリンと交差性を有するかを確認する。2) 各種IGF刺激による1型IGF受容体の自己リン酸化に対するKM1468の抑制効果を抗1型IGF受容体抗体(α IR3)による免疫沈降後、ウェスタンブロット法にて解析する。3) NOD/SCIDマウス皮下にヒト成人骨を移植した骨転移モデルを用い、骨移植

4 週後にヒト前立腺がん細胞 MDAPCa2b (4×10^6 個) を移植片の骨髓腔内に注入する。これに対し KM1468 を用いた 2 つの実験プロトコール (早期治療群、後期治療群) により 4 週間治療後、抗 PSA 抗体による免疫組織化学染色を行い、腫瘍面積を画像解析ソフトを用い測定する。早期治療群 ($n = 9 \sim 10$) は KM1468 (0.01、0.1、2 mg/kg/週) をがん細胞注入直後より腹腔内投与し、後期治療群 ($n = 9$) ではがん細胞注入 4 週後より KM1468 (0.1、2、10 mg/kg/週) を腹腔内投与する。

【結果】 1) KM1468 はヒト IGF-1、ヒト IGF-2、マウス IGF-2 に特異的に結合したが、インスリン、EGF、TGF- β 、PDGF-AB、b-FGF とは結合しなかった。2) KM1468 はヒト IGF-1、ヒト IGF-2、マウス IGF-2 の刺激による 1 型 IGF 受容体の自己リン酸化を完全に抑制した。3) In vivo での検討では早期治療群、後期治療群の両群において骨腫瘍の発育はコントロール群 (ラットモノクローナル抗体 KM1762

投与) に比較して有意に抑制された ($p < 0.001$) が、マウス重量とマウス組織は治療群とコントロール群の間に有意差を認められなかった。

【考察】今回、前立腺がんの骨転移の発生機序において IGF の重要性を検証するために、ヒト成人骨にヒト前立腺がん細胞を接種し、ヒト IGF 阻害抗体を投与することにより骨内の腫瘍の増殖を抑制するかを実験した。実験プロトコールの早期治療群は臨床的に検出できない微小転移巣に対し、薬剤を投与する状況を想定した予防投与モデルであり、一方後期治療群は確立された転移巣に対して薬剤投与が有効であるかを検討した治療投与モデルである。KM1468 が各プロトコールにおいて腫瘍の増殖を有意に抑制した結果より、前立腺がん細胞の骨での増殖に IGF は重要であり、IGF 阻害が骨転移の成立を抑制するのみでなく、既存の転移巣の進展をも抑制しうる可能性が示唆された。

(別紙様式第7号)

論文審査結果の要旨

報告番号	*論文博第	号	氏名	呉屋 真人
論文審査委員	審査日	平成 18年 7月 4日		
	主査教授	金谷文則		○金
	副査教授	太田 孝男		○田
	副査教授	高須 信行		○須
(論文題目)				
Growth Inhibition of Human Prostate Cancer Cells in Human Adult Bone Implanted into Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient Mice by a Ligand-Specific Antibody to Human Insulin-Like Growth Factors.				
(論文審査結果の要旨)				
上記論文に関して、研究に至る背景と目的、研究内容、研究成果の意義と学術的水準について慎重に検討し、以下のような審査結果を得た。				
1. 研究の背景と目的				
前立腺がんは高率に骨転移を起こすが、転移機構は十分解明されてはいない。骨に貯蔵される豊富な増殖因子が転移したがん細胞の増殖に重要な役割を果たすことが示唆されているが、信頼しうる動物モデルの欠如のためその証明は困難であった。本研究は、ヒト成人骨を Nonobese Diabetic/Severe Combined Immunodeficient (NOD/SCID) マウスとラットの抗ヒト IGF 抗体を用いて、ヒト骨由来のインスリン様増殖因子 (IGF) が骨でのヒト前立腺がんの重要な増殖因子であることと、転移制御因子となりうることを証明する目的で行なわれたものである。				

備考 1 用紙の規格は、A4 とし縦にして左横書とすること。

2 要旨は 800 字～1200 字以内にまとめること。

3 *印は記入しないこと。

2. 研究内容

ヒト IGF-1 に対するラットモノクローナル抗体 (KM1468) を作製し、その IGF 特異性を確認するためヒトおよびマウス IGF-1、IGF-2、ヒトインスリン、その他骨に含まれる主要な増殖因子に対する競合抑制 ELISA 試験を行なった。KM1468 はヒト IGF-1、IGF-2、そしてマウス IGF-2 に用量依存性に結合したが、ヒトインスリンほかの増殖因子には結合しなかった。各種 IGF 刺激によるヒト 1 型 IGF 受容体のリン酸化阻害効果を免疫沈降法とウェスタンブロット法にて確認した。KM1468 はヒト IGF-1、IGF-2、そしてマウス IGF-2 による受容体のリン酸化を用量依存性に抑制し、その ND_{50} は各々 $0.201 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.024 \mu\text{g/mL}$ 、 $0.036 \mu\text{g/mL}$ であった。しかし、マウス IGF-1 による受容体のリン酸化は抑制しなかった。次に、オス NOD/SCID マウスの皮下にヒト成人骨を移植した前立腺がん骨転移モデルを用いて、移植後 4 週後にヒト前立腺がん細胞 (MDA PCA2b、 4×10^6 個) を移植骨に直接接種し、KM1468 による治療を行なった。治療は細胞接種と同時に開始する早期治療群 (投与量は 0.01 mg/kg ; 10 匹、 0.1 mg/kg ; 10 匹、 2 mg/kg ; 9 匹) と細胞接種後 4 週後より開始する晚期治療群 (投与量は 0.1 mg/kg ; 9 匹、 2 mg/kg ; 9 匹、 10 mg/kg ; 9 匹) の 2 群に分けて行なった。コントロール群にはラットモノクローナル抗体 (KM1762) を投与した。抗体は週 1 回の腹腔内投与を 4 週間行なった。治療開始 4 週後、血清 PSA 値の測定とヒト成人骨やマウス臓器を摘出し、組織学的検査を行なった。早期治療群と晚期治療群の両群ともコントロール群と比較し、用量依存性に有意な腫瘍増殖の抑制と血清 PSA 値の減少が認められた。さらに、治療群の病理組織像では多くの腫瘍細胞に核の濃縮化を認め、アポトーシスの誘導が示唆された。しかし、治療群とコントロール群においてマウスの体重や臓器 (肺、肝、脾、そして腎) の重量、そして組織所見に有意差は見られなかった。

3. 研究成果の意義と学術的水準

本研究では、ヒト成人骨、ヒト前立腺がん細胞による種特異的な環境を構築した骨転移モデルが用いており、抗ヒト IGF 抗体によって前立腺がんの骨での増殖抑制が示されたことにより、ヒト前立腺がんの骨での増殖機構が明らかになるだけでなく、IGF 阻害による前立腺がん骨転移抑制の可能性がはじめて示された。よって、この論文の研究内容は国際的に認められる高水準にあるものと判断される。

以上により、本論文は学位授与に十分に値するものであると判断した。