

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 西 森 光

本研究は前立腺がんの骨転移において重要な役割を果たすと考えられる、がん細胞と骨間質細胞の相互作用の分子メカニズムを解明するため、ヒト前立腺がん細胞 (LNCaP) とマウス骨間質細胞 (MC3T3-E1) を共培養する系にて、BMP が及ぼす両細胞の相互作用における制御機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 骨形成に重要なサイトカイン BMP による Hh 発現制御を解析した。各種がん細胞株を用いて qRT-PCR と ELISA で解析した結果、造骨性骨転移を示す前立腺がん細胞株特異的な SHH の発現誘導を認めた。他の TGF- β ファミリーのサイトカインでは SHH の発現誘導は認められなかった。またノックダウンと阻害剤による検証から、BMP による SHH の発現誘導は *de novo* タンパク質合成を介した Smad 依存的な誘導機構である可能性が高いことを見出した。
2. MC3T3-E1 細胞における BMP シグナル伝達を BMP 応答性レポーターで評価したところ、SHH で刺激することでレポーター活性が増強することが示された。BMP シグナル伝達構成因子の発現を qRT-PCR で検討したところ、SHH により *Smad1* と *Acvr2b* の発現が増加することが示された。Immunoblotting を用いてタンパクレベルで解析したところ、SHH 刺激による Smad1 タンパク質発現の増加、BMP-4 による Smad1 の C 末端領域のリン酸化の増強が明らかとなった。
3. BMP による MC3T3-E1 細胞の骨芽細胞分化を qRT-PCR で評価した。BMP-4 と SHH の共刺激により、Alp や Bsp をはじめとした骨分化マーカーの誘導を認めた。ALP 酵素活性を検討したところ、BMP-4 と SHH の協調的な ALP 活性増加作用が示された。
4. Cell culture insert を用いて LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞の separate co-culture 実験を実施したところ、上層の LNCaP 細胞から BMP-4 に応答して分泌された SHH タンパク質が下層に播種した MC3T3-E1 細胞に作用し、Gli1 や骨分化マーカーの発現が誘導された。LNCaP 細胞と MC3T3-E1 細胞を単一ディッシュ内で共培養した mixed co-culture 条件において Hh シグナル阻害剤を添加したところ、BMP-4 による MC3T3-E1 細胞での骨分化マーカーの発現誘導が Hh シグナル依存的であることを示した。

5. LNCaP 細胞を BMP-4 で刺激すると増殖抑制効果が確認されたが、MC3T3-E1 細胞と mixed co-culture したところ、BMP-4 による LNCaP 細胞の増殖促進効果を示した。qRT-PCR により細胞増殖関連因子の発現を定量化したところ、mixed co-culture 条件で、LNCaP 細胞での BMP-4 による *CDKN1A* や *CDKN2B* の発現誘導の減弱と、MC3T3-E1 細胞での *Fgf2* と *Egf* の発現誘導が認められた。阻害剤を用いた実験から、BMP-4 と MC3T3-E1 細胞による LNCaP 細胞の増殖に対する協調的な亢進作用は、FGF-2 と EGF に依存している可能性が示唆された。

以上、本論文は前立腺がん細胞 LNCaP と骨間質細胞 MC3T3-E1 において、共培養実験系の解析から、両細胞の相互作用の役割を明らかにした。本研究は骨微小環境での各細胞間相互作用が、BMP を媒介してお互いの生存や活性に適した環境を提供している可能性を示唆するものであり、骨転移の形成機序の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。