

氏 名 ・ (本籍)	高山 孝一朗 (青森県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 946 号
学位授与の日付	平成 29 年 9 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科 ・ 専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Inhibition of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer (Osteoprotegerin による RANK/RANKL シグナルの阻害は去勢抵抗性前立腺癌における去勢の骨転移促進効果を抑制する)
論文審査委員	(主査) 教授 柴田 浩行 (副査) 教授 田中 正光      教授 南谷 佳弘

## 学位論文内容要旨

Inhibition of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer  
(Osteoprotegerin による RANK/RANKL シグナルの阻害は去勢抵抗性前立腺癌における去勢の骨転移促進効果を抑制する)

申請者氏名 高山 孝一朗

### 研究目的

転移性あるいは局所進行性前立腺癌に対する治療として一般的であるアンドロゲン遮断療法 (ADT) は、癌治療効果の傍ら、有害事象として骨芽細胞の Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) の産生を亢進させ、RANK シグナルを刺激し、破骨細胞を活性化させることで骨密度を減少させることが報告されている。しかし、骨密度減少が去勢抵抗性前立腺癌の骨転移を促進する可能性についてはこれまで明らかでなかった。本研究は、ヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞株を用いて ノードマウスを用いた前立腺癌骨転移モデルを作成し、去勢ならびに RANKL の decoy receptor である Osteoprotegerin (OPG) の骨転移への影響を検討した。

### 研究方法

Balb/c ノードマウスを非去勢群、去勢群、去勢+OPG (2mg/kg、週 2 回静注) 群に分け、micro-CT で骨密度を経時的に測定した。  
3 $\times$ 10<sup>6</sup>個の luciferase を発現させたヒト去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PC3M-luc-C6 をマウスの左心室内に投与し、去勢抵抗性前立腺癌骨転移モデルを作成した。心注 3 週間後に骨転移を形成した個体数、骨転移数、および各転移巣の photon counts を luciferin 投与後に *in vivo* imaging system (IVIS) で測定した。  
またマウス安楽死時の血清を採取し、テストステロン、TRAP-5b、RANKL 濃度を ELISA 法で測定した。さらにマウス下肢骨を採取し、骨組織の TRAP および RANKL 免疫染色を行い、破骨細胞および骨芽細胞における陽性細胞数を計測して各群で比較した。

### 研究成績

去勢前の膝周囲全骨密度は平均 534.3 mg/cm<sup>3</sup> であり、非去勢群、去勢群、去勢+OPG 群における去勢 2 週後の平均全骨密度は 498.6 mg/cm<sup>3</sup>、414.8 mg/cm<sup>3</sup>、492.9 mg/cm<sup>3</sup> であった。膝周囲全骨密度において、去勢群は非去勢群に比べ骨密度が有意に減少した ( $p = 0.034$ )。膝周囲海綿骨密度において、去勢+OPG 群では去勢の効果が抑制された ( $p = 0.010$ )。

PC3M-luc-C6 心室内投与 3 週後に骨転移を形成した個体数は、非去勢群 11/21 例 (52.4%)、去勢群 17/20 例 (85%) と去勢群で有意に多かった ( $p = 0.024$ )。去勢群+OPG 群 10/19 例 (52.6%) は、去勢群に比べて骨転移形成個体数は有意に少なかった ( $p = 0.028$ )。また平均骨転移数は、去勢群に比べて去勢+OPG 群で有意に少なく ( $p = 0.020$ )、骨転移巣の平均 photon counts も去勢群に比べて去勢+OPG 群のほうが有意に低かった ( $p = 0.041$ )。去勢によって骨転移の発症が促進し、OPG 投与によりその効果が抑制された。

血清 TRAP-5b 濃度は、非去勢群  $1.39 \pm 0.15$  U/L、去勢群  $1.87 \pm 0.08$  U/L、去勢+OPG 群  $1.72 \pm 0.14$  U/L で、去勢群は非去勢群および去勢+OPG 群に対して有意に高かった ( $p < 0.001$ ,  $p = 0.013$ )。一方、血清 RANKL 濃度は、非去勢群  $43.0 \pm 39.9$  pg/ml、去勢群  $72.8 \pm 33.9$  pg/ml、去勢+OPG 群  $52.9 \pm 42.5$  pg/ml であり、去勢群は非去勢群に対して有意に高かった ( $p = 0.041$ )。

大腿骨遠位部骨組織を免疫染色し、皮質骨で囲まれた部分の TRAP 陽性破骨細胞数および RANKL 陽性骨芽細胞数を比較した。平均 TRAP 陽性破骨細胞数は、非去勢群  $30.4 \pm 13.3$  個、去勢群  $52.5 \pm 17.2$  個、去勢+OPG 群  $39.6 \pm 15.7$  個であり、去勢群は非去勢群に対して有意に増加した ( $p = 0.007$ )。また、去勢+OPG 群は去勢群に対して TRAP 陽性破骨細胞数が減少している傾向を認めた ( $p = 0.133$ )。一方、平均 RANKL 陽性骨芽細胞数は、非去勢群  $42.5 \pm 5.2$  個、去勢群  $59.9 \pm 4.1$  個、去勢+OPG 群  $63.4 \pm 5.1$  個であり、非去勢群に対し、去勢群と去勢+OPG 群では有意に増加した ( $p = 0.037$ ,  $p = 0.033$ )。

### 結論

マウス去勢抵抗性前立腺癌骨転移モデルにおいて、去勢は骨転移の発症を促進させ、OPG による RANK/RANKL シグナルの抑制は骨転移の発症を抑制したことから、去勢抵抗性前立腺癌における去勢による骨転移促進効果は、RANK/RANKL シグナルを介した破骨細胞活性化によることが示唆された。ADT 開始時からの RANK/RANKL シグナル抑制が、特に非転移性局所進行性前立腺癌の骨転移発症予防に有効である可能性がある。

## 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査：柴田浩行

申請者：高山孝一朗

論文題名：Induction of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer  
(Osteoprotegerin による RANK/RANKL シグナルの阻害は去勢抵抗性前立腺癌における去勢の骨転移促進効果を抑制する)

### 要旨

転移性、または局所進行前立腺癌の一次治療であるアンドロゲン遮断療法（去勢療法）には Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（RANKL）シグナルの活性化による破骨細胞刺激による骨粗鬆症が知られている。去勢療法の、去勢抵抗性前立腺癌骨転移への影響については詳細が不明であった。本研究ではヒトの去勢抵抗性前立腺癌細胞株 PC-3M-luc-C6 を用いて、ヌードマウスの転移モデルを作成し、去勢療法の骨転移への影響、および RANKL のデコイレセプターである Osteoprotegerin による RANKL シグナルの遮断による骨転移への影響を検討した。オスの Balb/cヌードマウスを非去勢群、去勢群、去勢+ Osteoprotegerin 群の3群に分け、PC-3M-luc-C6 を Balb/c の左心室に注入して転移モデルを作成した。リコンビナント Osteoprotegerin は週に2回、静脈内投与した。IVIS イメージングシステムを用いて PC-3M-luc-C6 の骨転移を可視化した。骨転移の出現は非去勢群や去勢+ Osteoprotegerin 群に比して、去勢群で有意に高かった。RANKL 陽性の骨芽細胞数や血清中の RANKL のレベルも非去勢群に比して、去勢群で有意に高かった。RANKL シグナルによる破骨細胞の活性化は去勢+ Osteoprotegerin 群で減弱していた。これらの結果は去勢抵抗性前立腺癌において去勢療法による骨転移の増悪には RANKL シグナルが関与していることを示唆している。

### 1) 研究の斬新性

進行前立腺癌の治療におけるアンドロゲン遮断療法と骨転移増悪の関連について RANKL シグナルの関与を実験的に明らかにし、動物実験において RANKL のデコイレセプターである

Osteoprotegerin の投与によって去勢抵抗性前立腺癌の骨転移を阻害することを示した。前立腺癌の骨転移においてはアンドロゲン遮断療法と抗 RANKL 抗体やゾレドロン酸などの骨修飾薬の使用を、どうすべきかについては議論の分かれるところである。本研究は、骨転移の去勢抵抗性の増悪には RANKL 阻害療法が有効であることを明確に示したという点において十分な斬新性が認められる。

### 2) 研究の重要性

前述の通り、去勢抵抗性前立腺癌の骨転移に RANKL 阻害療法が有効であることを明確に示した去勢抵抗性前立腺癌に対する去勢療法の継続についても、その意義について実証している。このような動物モデルを用いた前臨床的な検証結果は臨床への応用性を含めて、その重要性が高く評価される。

### 3) 研究方法の正確性

本研究では Balb/cヌードマウスを用いた去勢抵抗性前立腺癌骨転移の治療モデルの作成、Osteoprotegerin の投与による治療実験、治療効果の免疫組織化学的、病理学的な解析、血中のテストステロン、TRAP-5b、RANKL 濃度測定などバイオマーカー解析を行っている。実験、データの統計学的処理は正確に行われたと評価される。また、動物実験はガイドラインや倫理指針に則って実施された。

### 4) 論旨の明瞭性

本論文「Induction of the RANK/RANKL signaling with osteoprotegerin prevents castration-induced acceleration of bone metastasis in castration-insensitive prostate cancer」は論旨に矛盾や錯誤、また結果解釈の誇張はなく、データに沿って明瞭に記載されている。本論文は Cancer Letters 誌に 2017 年 4 月に受理、掲載されるなど外部査読においても十分な評価を得ている。

以上の観点から、本論文は学位を授与するに十分な条件を備えているものと判定された。