HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Immunolocalization of FGF23 in bone metastasis of human breast carcinoma MDA231 cells [an abstract of entire text]
Author(s)	横山, 亜矢子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13489号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74105
Type	doctoral thesis
File Information	Ayako_Yokoyama_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

Immunolocalization of FGF23 in bone metastasis of human breast carcinoma MDA231 cells

（乳がん MDA231 細胞の骨転移巣における FGF23 の免疫局在について）

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　横山　亜矢子

乳がんは最も骨転移の頻度が高い腫瘍の一つであり、乳がんの骨転移巣では破骨細胞の分化・形成が誘導され骨吸収が生じること、また、これに伴って血中カルシウム濃度が上昇することが知られている。悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症では倦怠感、吐き気、意識障害を誘導することが知られているが、乳がんの骨転移による血中リン濃度への作用については報告が少ない。一般に、血中リン濃度は骨細胞から分泌される fibroblast growth factor 23 (FGF23)が腎臓のFGFR1c/αklotho受容体に作用し調節されることが報告されているが、近年、腫瘍がFGF23を過剰産生することで低リン血症性くる病・骨軟化症を発症する腫瘍随伴症候群(Tumor induced osteomalacia:TIO)が報告されている。また、正常組織で骨細胞が産生する FGF23 は、腎臓に作用するだけでなく、骨芽細胞や骨細胞にも autocrine/paracrine 的に作用する可能性が示されている。そこで、本研究では、乳がん細胞から産生されるFGF23が血中リン濃度を低下させることで、がん細胞に都合の良い環境を作りだすのか、あるいは、乳がん細胞からの FGF23 が骨転移巣において局所的に作用することで腫瘍性環境を作りだしているのかを明らかにするため、乳がん骨転移モデルマウスを作成し、血中リン・カルシウム濃度とFGF23濃度を計測するとともに、転移巣における FGF23, FGFR1, αklotho の局在、および、局所的なリン酸イオン合成に関わる tissue non-specific alkaline phosphatase (TNALP)、ectonucleotide pyrophosphatase/phospho diesterase 1 (ENPP1)、PHOSPHO1 について組織化学的に解析した。

生後 4 週齢の雌性 *nu/nu* マウスにヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を心臓注入し、乳がんの骨転移モデルを作成した。4 週間後に大腿骨または脛骨への転移を軟エックス線で確認し、麻酔下で全血採血を行った後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した。大腿骨・脛骨を摘出後、通法にて EDTA 脱灰およびパラフィン包埋・切片の作成を行った。その後、パラフィン切片を用いて HE 染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP) 酵素組織化学、および、FGF23, αklotho, FGFR1, TNALP, ENPP1 PHOSPHO1, osteopontinの免疫組織化学を行った。血清リン・カルシウム、FGF23濃度の計測においては、乳がん骨転移モデル(骨転移群)の対照群として、乳腺に MDA-MB-231 細胞を注入した原発巣モデル(原発巣群)と、生理食塩水を心臓注入したコントロールモデル(コントロール群)を用いた。

MDA-MB-231 乳がん細胞を心臓注入した *nu/nu* マウスの大腿骨では、骨幹端に広範囲にわたり転移巣が形成されており、わずかな骨梁と皮質骨が観察された。乳がん転移巣周囲の骨基質表面には多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在し、骨基質内部に多数の osteopontin 陽性セメントラインが観察されたことから、転移巣周囲の骨は高代謝回転型の骨吸収を示すことが推測された。培養条件下では、若干数の MDA-MB-231 細胞が FGF23 弱陽性を示しただけであったが、骨転移巣では、ほぼ全ての MDA-MB-231 細胞が FGF23 強陽性を示していた。また、腫瘍巣から離れた部位の骨梁・皮質骨に存在する骨細胞は DMP1 および FGF23 の強陽性反応を示したが、腫瘍

巣に隣接した骨梁や皮質骨の骨細胞はDMP1陽性を示すにも関わらずFGF23陽性を示さなかった。このことから、乳がん細胞からFGF23が過剰産生される環境では、骨細胞によるFGF23産生を抑制される可能性が推測された。血清リン・カルシウム・FGF23 濃度を検討したところ、骨転移群の血清 FGF23 濃度はコントロール群および原発群と比較して、優位に高い値を示していた。ところが、血清カルシウムおよびリン濃度は骨転移群・原発巣群・コントロール群間で優位差を認めなかった。従って、乳がんの骨転移巣で過剰産生された FGF23 は低リン血症を誘導するに至っていないことが明らかとなった。そこで、腫瘍巣の FGF23 が局所的に作用する可能性を検索するため、FGF23受容体の免疫局在を観察したところ、腫瘍巣内部の主に間質系細胞に FGFR1 およびαklotho 陽性反応を認めた。以上の結果から、腫瘍巣で産生されたFGF23は、全身的に血中リン濃度を低下させるよりも、乳がん骨転移巣において paracrine/autocrine 的に作用し、乳がん細胞に対して都合のよい環境を形成している可能性が推察された。

さらに、乳がんの骨転移巣において、局所的にリン酸イオンの産生に関わる膜輸送体・酵素の局在、特に、細胞外 ATP などからピロリン酸を産生するENPP1、ピロリン酸からモノリン酸を産生するTNALP、そして、基質小胞においてモノリン酸産生を行うPHOSPHO1の局在を検索した。その結果、乳がんの骨転移巣において、腫瘍巣内部に ENPP1 強陽性反応が認められたが、TNALPやPHOSPHO1は、腫瘍巣内部には認められず、腫瘍周囲に残存する骨梁表面の骨芽細胞に観察された。近年、ENPP1 はピロリン酸合成だけではなく、腫瘍の転移促進や腫瘍細胞の維持に寄与する可能性が報告されていることから、今回の結果から、TNALPやPHOSHO1は骨転移巣の腫瘍細胞に直接、作用するものではなく、一方、ENPP1 は局所的にリン酸イオン産生とは別の経路で、乳がんの骨転移巣における腫瘍性環境の維持に影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上より、乳がんの骨転移モデルを用いた検索では、乳がん細胞から FGF23 が過剰産生される環境では骨細胞からの FGF23 産生が抑制される可能性、また、乳がん細胞からの FGF23 は血中リン濃度を低下させることよりも、腫瘍巣の乳がん細胞に対して paracrine/autocrine 的に作用する可能性が推察された。