

ヒト骨髄腫細胞株における副甲状腺ホルモン関連蛋白とそのレセプター発現の解析

大槻 剛巳, 紅林 淳一*, 鎌尾 浩行**, 谷本 大吾**, 藤野 豊寿**, 江原 睦子**, 森瀬 博子**, 高橋 和子**, 山田 治***, 八幡 義人***, 植木 絢子

多発性骨髄腫に合併する高カルシウム血症の発生機転を検討する目的で, 本学にて樹立された7系のヒト骨髄腫由来細胞株を用いて副甲状腺ホルモン関連蛋白(PTHrP)ならびにそのレセプターの発現を, 逆転写ポリメラーゼチェーンリアクション(RT-PCR)にて検討した. その結果, 7株中6株で, 程度の差は存在するもののPTHrPの発現が認められ, 3株ではレセプターの発現も認められた. また, 両者の発現の度合は, PTHrP発現の強い細胞株ではレセプターの発現が無く, 弱いか無い細胞株ではレセプター発現が強いという傾向が認められた. この結果は直接的に骨髄腫における高カルシウム血症の発生機序を説明するものではないが, 種々の破骨細胞活性化因子とPTHrPとの相互作用を今後検討する上で基礎的所見となる.

(平成10年1月27日受理)

Expression of Parathyroid Hormone-related Protein and Its Receptor in Human Myeloma Cell Lines

Takemi OTSUKI, Junichi KUREBAYASHI*, Hiroyuki KAMAŌ**, Daigo TANIMOTO**, Toyohisa FUJINO**, Mutsuko EHARA**, Hiroko MORISE**, Kazuko TAKAHASHI**, Osamu YAMADA***, Yoshihito YAWATA*** and Ayako UEKI

To analyze the mechanisms involved in hypercalcemia in multiple myeloma, the reverse transcriptase-polymerase chain reaction for parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and its receptor (PTH/PTHrP-R) was performed using seven human myeloma cell lines established at Kawasaki Medical School. The expression of PTHrP was found in six out of seven lines and PTH/PTHrP-R was detected in three of these lines. In addition, although the lines which strongly expressed PTHrP showed less expression of PTH/PTHrP-R, low or negative lines for PTHrP expression exhibited controversial PTH/PTHrP-R expression. These results may contribute to the examination of the cell biological interactions between cytokines which

川崎医科大学 衛生学教室
〒701-0192 倉敷市松島577
* 同 外科乳腺甲状腺部門
** 同 第2学年学生
*** 同 内科血液部門

Department of Hygiene, Kawasaki Medical School : 577
Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192 Japan
Department of Breast and Thyroid Surgery
2nd year medical student
Division of Hematology, Department of Internal Medicine

2. PTH/PTHrP-R の遺伝子発現

Figure 1 に示すように、用いた細胞株における PTH/PTHrP-R の発現は、非骨髄腫造血細胞由来悪性細胞株群では、KMS-15にて非常に薄いバンドの検出を認めた以外陰性であり、乳癌由来細胞株 7 株では、T47D 株が非常に薄いバンドであった以外は明らかなバンドの検出が可能であり、特に MDA-MB-231 および KPL-1 では強く発現していた。

一方、骨髄腫由来 7 細胞株では、KMS-12-BM で比較的強い発現を、また、KMS-12-PE、KMS-18 と KMS-20 では弱いながら充分量の発現を認めた。残る KMM-1 では検出できず、KMS-11 は非常に薄いバンドであった。

3. PTHrP および PTH/PTHrP-R の相対的発現度

Table 2 に算定された各細胞株の PTHrP/ β -actin [A] 比および PTH/PTHrP-R/ β -actin

Table 2. The relative expression levels for PTHrP/ β -actin [A], PTH/PTHrP-R/ β -actin [B], and the balances between [A] and [B] in all cell lines studied.

relative expression level	myeloma cell lines							breast cancer cell lines							non-myeloma hematological cell lines						
	KMM-1	KMS-11	KMS-12-PE	KMS-12-BM	KMS-18	KMS-20	KMS-21	KPL-1	KPL-4	MDA-MB-231	MCF7	KPL-3C	T47D	SkBr3	KMS-9	KMS-15	SU-DHL-4	SU-DHL-5	SU-DHL-6	Raji	HL-60
PTHrP/ β -actin [A]	0.20	0.33	0.07	0	0.41	0.08	0.27	0.83	0.74	0.74	0.55	0.86	0.36	0.10	0	0	0.04	0.09	0	0	0.11
PTH/PTHrP-R/ β -actin [B]	0	0.06	0.58	0.85	0.14	0.23	0	0.82	0.22	1.27	0.29	0.27	0.07	0.50	0	0.05	0	0	0	0	0.05
[A]-[B]	0.20	0.27	-0.51	-0.85	0.27	-0.15	0.27	-0.19	0.52	-0.53	0.26	0.59	0.29	-0.40	0	-0.05	0.04	0.09	0	0	0.06

The abbreviations used in this Table are: PTHrP, parathyroid hormone related protein; PTH/PTHrP-R, parathyroid hormone/parathyroid hormone related protein-receptor.

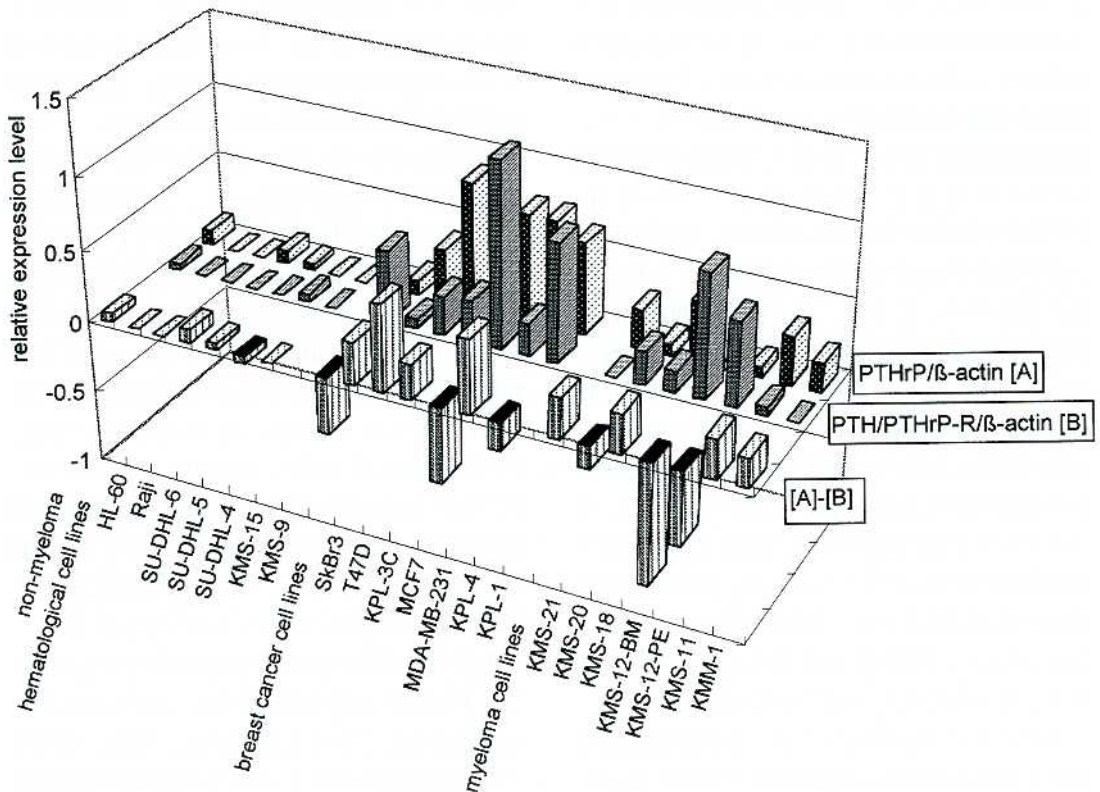


Fig. 2. The relative expression levels of PTHrP/ β -actin [A], PTH/PTHrP-R/ β -actin [B], and a value of [A] minus [B] in each cell line were visualized.

[B]比,並びに[A]から[B]を引いた値を示す.また,これらの値を総括的に見る目的で,Figure 2にTable 1の結果を図示した.骨髄腫細胞株のうちPTHrPの発現が比較的強かったKMM-1, KMS-11, KMS-18およびKMS-21では,[A]-[B]の値はプラスになっており,逆にレセプターの発現が比較的強かった残る3株(KMS-12-PE, KMS-12-BMおよびKMS-20)ではマイナスであった.この傾向は乳癌由来細胞株7株でも認められ,レセプターの相対的発現度が0.5を越えていた,すなわちレセプター発現が比較的強かった3株(KPL-1, MDA-MB-231およびSkBr 3)では,[A]-[B]の値はマイナスであった.

考 察

近年,PTHrPは悪性腫瘍の高Ca血症の発生要因の中心的役割を担っていると考えられるようになった.特に,乳癌・頭頸部や肺の扁平上皮癌・腎癌・卵巣癌等では,高Ca血症の合併が高頻度で起ることが知られており,PTHrPの役割にも種々の検討がなされている^{5)~7)}.一方,造血器腫瘍においては成人T細胞性白血病(ATL)に合併する高Ca血症については,PTHrPの増加がその本体と考えられ,症例血清中の高PTHrP血症や実験的な検討も,多数の報告がある^{25)~27)}.しかし,多発性骨髄腫におけるPTHrPの関与に関しては,それほど多くの検討がなされていないのが現状である.これは,骨髄腫細胞や腫瘍細胞が局在する骨髄のstromal cellが産生する種々のOAFと,抜打ち像で知られる骨破壊が基本的にはその主体を成していることによると思われるが^{1)~4)},臨床で,打ち抜き像の変化が乏しいにもかかわらず,高Ca血症の増悪が起る場合もあり,多発性骨髄腫での高Ca血症においてPTHrPは従来考えられているよりも,大きな影響を与えている可能性がある.

本邦における症例報告では,多発性骨髄腫に合併した高Ca血症の症例に高PTHrP血症が認められたものや^{8)~10)},60例の多発性骨髄腫の検

討で,26例に高Ca血症が認められそのうち27%に高PTHrP血症が認められたとの報告がある¹¹⁾.これらの報告では,骨髄腫細胞でのPTHrPの発現を,免疫組織化学的あるいはRT-PCR法にて確認している.また,海外でも同様の報告が散見される^{12)~13)}.加えて,細胞株を用いた検討では,6株を用いてRT-PCR法にて全株で検出可能であったとの報告もあり¹⁴⁾,これらは多発性骨髄腫におけるPTHrPの関与を示唆するものである.

我々の結果では,7株中6株に発現が認められ,うち2株(KMS-11とKMS-18)では,乳癌由来細胞株に匹敵する程度の発現であった.また,興味深いことに,PTH/PTHrP-Rの発現は,PTHrPの発現の無かった1株(KMS-12-BM)に最も強く,PTHrP発現の比較的弱い細胞株群(KMS-12-PEとKMS-20)で,それに次ぐ発現を認めた.このことは,相対的発現比の解析の結果からも想定され,PTHrPを主に発現している細胞株群とレセプター発現がより強い群に分けられた.このPTHrPとそのレセプターの逆相関的な発現の傾向は,乳癌細胞株の相対的発現度の結果からも観察され,レセプター発現の強い株では,相対的PTHrP発現が減弱している傾向が伺われた.この現象の持つ細胞生物学的な意味付けは現時点では不明なるも,腫瘍細胞の産生するPTHrPは自己の細胞のレセプターの発現を抑制しているような機構も存在するのかも知れない.いずれにしても骨髄腫細胞でのPTH/PTHrP-Rの発現は,これまで報告されていないものであり,今後,PTHrP発現株(例えばKMS-11)とPTH/PTHrP-R発現株(例えばKMS-12-BM)の細胞生物学的差異をOAF等のサイトカインに関連して明確にすることは,多発性骨髄腫における高Ca血症の解明に役立つものと思われる.

生体内では種々のOAF活性を持つサイトカインとPTHrPは相互作用を有しながらそれぞれの活性を表していると想定され,今後,今回用いた細胞株群におけるこれらの相互作用を解明することが,実際の多発性骨髄腫の症例におけ

る高Ca血症の発症機転を明らかにする一助となると考えられる。

本研究の一部は平成9年度2学年Self-Developed

Learningにおける授業・実習の一環として行われ、また、本研究の一部は、「1996年度佐川がん研究助成」ならびに川崎医科大学プロジェクト研究費(No.9-310)の援助によって行われたものである。

文 献

- 1) Cherng NC, Asal NR, Kuebler JP, Lee ET, Solanki D: Prognostic factors in multiple myeloma. *Cancer* 67: 3150-3156, 1991
- 2) Bataille R, Chappard D, Klein B: Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 285-295, 1992
- 3) 梅田正法, 高田雅史, 津布久雅彦: 免疫グロブリン異常症の主要症候の病態と対策. 1. 骨病変. *日内誌* 84: 1070-1074, 1995
- 4) 高橋隆幸: 多発性骨髄腫. 主要症候と対策. 高カルシウム血症. *日本臨床* 53: 710-714, 1995
- 5) Moseley JM, Gillespie MT: Parathyroid hormone-related protein. *Crit Rev Clin Lab Sci* 32: 299-343, 1995
- 6) Mundy GR: Incidence and pathophysiology of hypercalcemia. *Calcif Tissue Int* 46: S3-S10, 1990
- 7) Rosol TJ, Capen CC: Mechanisms of cancer-induced hypercalcemia. *Lab Invest* 67: 680-702, 1992
- 8) 森田三雄, 田尻淳一, 野口志郎, 村上 司, 村上信夫, 片上秀喜, 松倉 茂: 高カルシウム血症で発見され、血中のPTHrP様免疫活性が高値を示した多発性骨髄腫の一例. *日内分泌誌* 66: 913, 1990
- 9) 金重勝博, 若杉正清, 遠藤登代志, 多和田真人, 女屋敏正: 血中PTHrPが高値を示した多発性骨髄腫の一例. *日骨代謝誌* 10: 311, 1992
- 10) Kuribayashi H, Kubota K, Tamura K, Take H, Shirakura T: Ultrastructure of myeloma cells producing parathyroid hormone-related peptide. *Clin Lab Haem* 19: 153-154, 1997
- 11) 片上秀喜, 山口一成, 日高博之, 井口東郎, 小鶴三男, 田村和夫, 野口史郎, 高橋隆幸, 長村義之, 松倉茂: 多発性骨髄腫(MM)におけるPTH関連蛋白質(PTHrP)の産生について. *日癌学会総会記事* 284, 1992
- 12) Kremer R, Shustik C, Tabak T, Papavasiliou V, Goltzman D: Parathyroid-hormone-related peptide in hematologic malignancies. *Am J Med* 100: 406-411, 1996
- 13) Firkin F, Seymour JF, Watson AM, Grill V, Martin TJ: Parathyroid hormone-related protein in hypercalcaemia associated with haematological malignancy. *Br J Haematol* 94: 486-492, 1996
- 14) Suzuki A, Takahashi T, Okuno Y, Tsuyuoka R, Sasaki Y, Fukumoto M, Katakami H, Kita K, Shibuya T: Production of parathyroid hormone-related protein by cultured human myeloma cells. *Am J Hematol* 45: 88-90, 1994
- 15) 大槻剛巳, 八幡義人, 難波正義: 5系のヒト骨髄腫細胞株の樹立とその細胞学的特性. *Human Cell* 2: 297-303, 1989
- 16) Otsuki T, Yawata Y, Wada H, Sugihara T, Mori M, Namba M: Two human myeloma cell lines, amylase-producing KMS-12-PE and amylase-non-producing KMS-12-BM, were established from a patient, having the same chromosome marker, t(11;14)(q13;q32). *Br J Haematol* 73: 199-204, 1989
- 17) Shirato L, Otsuki T, Yamada O, Namba M, Nakajima H, Nozawa Y, Ueki A, Yawata Y: Down regulation of protein kinase C during growth enhancement induced by interleukin-6 on a human myeloma cell line, KMS-11. *Cancer Lett* 107: 131-136, 1996
- 18) Otsuki T, Nakazawa N, Taniwaki M, Yamada O, Sakaguchi H, Wada H, Yawata Y, Ueki A: Establishment of a new human myeloma cell lines, KMS-18, having t(4;14)(p16.3;q32.3)

- derived from a case who phenotypically transformed from $\text{Ig A-}\lambda$ to $\text{BJP-}\lambda$, and associated with hyperammonemia. *Int J Oncol* 12 : 545-552, 1998
- 19) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H : A new human breast cancer cell line, KPL-1 secretes tumour-associated antigens and grows rapidly in female athymic nude mice. *Br J Cancer* 71 : 845-853, 1995
 - 20) Kurebayashi J, Kurosumi M, Sonoo H : A new human breast cancer cell line, KPL-3C, secretes parathyroid hormone-related protein and produces tumours associated with microcalcifications in nude mice. *Br J Cancer* 74 : 200-207, 1996
 - 21) Kurebayashi J, Tang CP, Kurosumi M, Sonoo H : Establishment of a new human breast cancer cell line, KPL-4, overexpressing three member of ErbB family. *Proc AACR* 38 : 236, 1997
 - 22) Wang X, Thomsen JS, Santostefano M, Rosengren R, Safe S, Perdew GH : Comparative properties of the nuclear aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex from several human cell lines. *Eur J Pharmacol* 293 : 191-205, 1995
 - 23) Daly JM, Jannot CB, Beerli RR, Graus-Porta D, Maurer FG, Hynes NE : Neu differentiation factor induces ErbB 2 down-regulation and apoptosis of ErbB 2-overexpressing breast tumor cells. *Cancer Res* 57 : 3804-3811, 1997
 - 24) Otsuki T, Yano T, Clark HM, Bastard C, Kerckaert JP, Jaffe ES, Raffeld M : Analysis of LAZ 3 (BCL-6) status in B-cell non-Hodgkin's lymphomas : Results of rearrangement and gene expression studies and a mutational analysis of coding region sequences. *Blood* 85 : 2877-2884, 1995
 - 25) Prager D, Rosenblatt JD, Ejima E : Hypercalcemia, parathyroid hormone-related protein expression and human T-cell leukemia virus infection. *Leuk Lymphoma* 14 : 395-400, 1994
 - 26) Yamaguchi K, Kiyokawa T, Watanabe T, Ideta T, Asayama K, Mochizuki M, Blank A, Takatsuki K : Increased serum levels of C-terminal parathyroid hormone-related protein in different diseases associated with HTLV-2 infection. *Leukemia* 8 : 1708-1711, 1994
 - 27) Ikeda K, Okazaki R, Inoue D, Ohno H, Ogata E, Matsumoto T : Interleukin-2 increases production and secretion of parathyroid hormone-related peptide by human T cell leukemia virus type I-infected T cells : Possible role in hypercalcemia associated with adult T cell leukemia. *Endocrinol* 132 : 2551-2556, 1993