

# 遺伝子工学の技法を用いての 高カルシウム血症惹起因子の同定

( 課題番号 : 62570521 )

昭和 62, 63 年度 科学研究費補助金  
一般研究 (C) 成果報告書

平成元年 3 月 1 日

研究代表者 佐藤幹二  
(東京女子医科大学 内分泌センター内科)



## はしがき

### 研究組織

研究代表者： 佐藤幹二

（東京女子医科大学 内分泌センター 内科 助教授）

研究分担者：

加園 恵三（東京女子医科大学 内分泌センター 内科 助手）

韓 斗喆（同上、現 埼玉大学医療センター 第一内科助手）

### 研究経費

昭和 62 年度 1,600 千円

昭和 63 年度 500 千円

合計 2,100 千円

## 研究発表

### (1) 学術誌など

1. Sato K, Fujii Y, Kasono K, Saji M, Tsushima T, & Shizume K : Stimulation of prostaglandin E<sub>2</sub> and bone resorption by recombinant human interleukin 1 alpha in fetal mouse bones. *Biochem Biophys Res Commun* 138 : 618 - 624, 1986.
2. Sato K, Mimura H, Han D, Kakiuchi T, Ueyama Y, Ohkawa H, Okabe T, Kondo Y, Ohsawa N, Tsushima T, Shizume K: Production of bone-resorbing activity and colony-stimulating activity in vivo and in vitro by a human squamous cell carcinoma associated with hypercalcemia and leukocytosis. *J Clin Invest.* 78 : 145 - 154, 1986.
3. Sato K, Kasono K, Ohba Y, Yashiro T, Fujii Y, Yoshida MA, Tsushima T, Shizume K; Establishment of a parathyroid hormone-like factor-producing esophageal carcinoma cell line (EC-GI), *Jpn J Cancer Res.* 78 : 1044 - 1048, 1987.
4. Sato K, Fujii Y, Kakiuchi T, Kasono K, Shizume K : Production of interleukin 1 $\alpha$ -like activity and colony-stimulating activity by clonal squamous cell carcinomas derived from patients with hypercalcemia and leukocytosis. In Cohn DV, Martin TJ, Meunier PJ, (eds) *Calcium Regulation and Bone Metabolism: Basic and Clinical Aspects.* Elsevier, Amsterdam, vol.9 : 149 - 154, 1987.
5. Sato K, Fujii Y, Ono M, Nomura H, Shizume K : Production of interleukin 1 $\alpha$ -like factor and colony-

- stimulating factor by a squamous cell carcinoma of the thyroid (T3M-5) derived from a patient with hypercalcemia and leukocytosis. *Cancer Res* 47 : 6474 - 6480, 1987.
6. Sato K, Han D, Fujii T, Tsushima T, Shizume K : Thyroid hormone stimulates alkaline phosphatase activity in cultured rat osteoblastic cells (ROS 17/2.8) through 3,5,3'-triiodo-L-thyronine nuclear receptors. *Endocrinology* 120 : 1873 - 1881, 1987.
  7. Sato K, Han D, Ozawa M, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K : A highly sensitive bioassay for PTH using ROS 17/2.8 subclonal cells. *Acta endocrinol.* 116 : 113 - 120, 1987.
  8. Sato K, Fujii Y, Kasono K, Tsushima T, Shizume K : Production of interleukin-1 alpha and a parathyroid hormone-like factor by a squamous cell carcinoma of the esophagus (EC-G1) derived from a patient with hypercalcemia. *J Clin Endocrinol Metab* 67 : 592 - 601, 1988.
  9. Kasono K, Sato K, Han D, Fujii Y, Tsushima T, Shizume K : Stimulation of alkaline phosphatase activity by thyroid hormone in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) : a possible mechanism of hyperalkaline phosphatasia in hyperthyroidism. *Bone & Mineral* 4 : 355 - 363, 1988.
  10. Ozawa M, Sato K, Han D, Kawakami M, Tsushima T, Shizume K : Effects of tumor necrosis factor- $\alpha$  / cachectin on thyroid hormone metabolism in mice. *Endocrinology* 123 : 1461 - 1467, 1988.
  11. Fujii T, Sato K, Ozawa M, Kasono K, Imamura H, Kanaji Y,

- Tsushima T, Shizume K : Effect of interleukin-1 (IL-1) on thyroid hormone metabolism in mice: Stimulation by IL-1 of iodothyronine-5'-deiodinating activity (type I) in the liver. *Endocrinology* 124 : 167 - 174, 1989.
12. Sato K : Lecture of "Morning Star Award"  
A Paraneoplastic syndrome of Hypercalcemia and Leukocytosis associated with Solid Tumors : Production of Interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) and Granulocyte Colony-stimulating Factor (G-CSF) by Clonal Squamous Cell Carcinoma Cells. *Folia Endocrinol.* 64 : 1223 - 1227, 1988.
13. 佐藤幹二 : 悪性腫瘍と高カルシウム血症。日本骨代謝学会誌 第6巻 第5号、1 - 11、1988。

## 2) 口頭発表

1. 藤井裕子、佐藤幹二、加園恵三、対馬敏夫、鎮目和夫。  
Recombinant human interleukin  $1\alpha$  および  $\beta$  の骨吸収活性の発現機序。第60回 日本内分泌学会、昭和62年6月。  
日本内分泌学会雑誌 63: p. 362, 1987.
2. 加園恵三、佐藤幹二、藤井裕子、対馬敏夫、鎮目和夫。  
Tumor necrosis factor alpha (TNF) の骨芽細胞に対する作用。第60回 日本内分泌学会、昭和62年6月。  
日本内分泌学会誌 63: p. 362, 1987.
3. 佐藤幹二、藤井裕子、古谷泰治、山田正明、加園恵三、鎮目和夫：悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の成因に関する研究（第14報）PTH 様因子および IL- $1\alpha$  産生腫瘍（EC-G1）。第60回 日本内分泌学会、昭和62年 6月。日本内分泌学会雑誌 63 : p. 363, 1987.
4. 佐藤幹二：ワークショップ『悪性腫瘍の高カルシウム血症』Interleukin- $1\alpha$  様因子を産生する高カルシウム血症惹起性ヒト扁平上皮癌について。第60回 日本内分泌学会、昭和62年6月、日本内分泌学会誌 63: 305、1987。
5. 佐藤幹二、藤井裕子、加園恵三、古谷泰治、山田正明、鎮目和夫。高カルシウム血症惹起性ヒト食道癌細胞株（EC-G1）の産生する骨吸収促進因子：PTH 様因子と interleukin 1 alpha (IL- $1\alpha$ )。第5回日本骨代謝学会、昭和62年7月、日本骨代謝学会誌 第5巻 抄録集 プレナリー 6、p. 55, 1987。
6. 加園恵三、佐藤幹二、藤井裕子、韓斗吉、対馬敏夫、鎮目和夫：甲状腺ホルモンによるマウス骨芽細胞（MC3T3-E1）アルカリフォスファターゼ(AL-P) 活性増強作用。  
日本骨代謝学会誌 第5巻 抄録集、p. 77, 1987.
7. 加園恵三、佐藤幹二、藤井裕子、対馬敏夫、鎮目和夫：  
Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の骨芽細胞に対する作用。

日本骨代謝学会誌 第5巻 抄録集、p. 99, 1987.

8. 佐藤幹二、藤井裕子、加園恵三、古谷泰治、山田正明、  
鎮目和夫：高カルシウム血症惹起性ヒト食道癌細胞（EC-G1）  
の産生する骨吸収促進因子の解明。第46回 日本癌学会総会、  
昭和62年9月、抄録 691, 1987.
9. 佐藤幹二：「インターロイキン 1」 IL-1 による colony-  
stimulating factor (CSF) と prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の  
産生誘導。第 7 回日本炎症学会 ワークショップ、  
昭和 62 年 7 月。
10. 佐藤幹二、加園恵三、小沢稔、今村英仁、藤井徹、金地嘉春、  
藤井裕子、対馬敏夫、鎮目和夫。Interleukin 1 $\alpha$  と PTH-  
related protein 産生腫瘍（EC-G1）による高カルシウム血症  
の発現機序について。第6回 日本骨代謝学会、発表。  
日本骨代謝学会誌 第6回 抄録集 プレナリー 9、p. 75, 1988。
11. 加園恵三、佐藤幹二、大村栄治、鈴木智春、出村黎子、  
出村博、対馬敏夫、鎮目和夫。RIA による血中副甲状腺ホル  
モン測定値が見かけ上高値を示した副甲状腺機能低下症の  
一症例。日本骨代謝学会誌 第6巻 抄録 100, 1988.
12. 藤井裕子、佐藤幹二、加園恵三、藤井徹、対馬敏夫、  
鎮目和夫。Interferon  $\gamma$  の 非選択的な骨吸収抑制作用に  
ついて。日本骨代謝学会誌 第6巻 抄録 119、1988。
13. 佐藤幹二：『教育講演』悪性腫瘍と高カルシウム血症  
第6回日本骨代謝学会、昭和63年7月。
14. 今村英仁、佐藤幹二、加園恵三、小沢稔、滝沢憲、藤井裕子、  
対馬敏夫、鎮目和夫。高カルシウム血症を呈した卵巢癌の  
一例：移植ヌードマウスにおける尿中PTH 様因子の免疫学的  
検討。第64回日本内分泌学会、昭和63年11月、日本内分泌学  
会誌 64巻、p. 783, 1988.
15. 佐藤幹二：炎症性骨吸収因子とその作用機序：インターロ

- イキン 1, 第 9 回 日本炎症学会 ワークショップ。  
日本炎症学会、昭和 63 年 7 月、抄録 190 (W-11)。
16. Fujii Y, Sato K, Kasono K, Ozawa M, Kakiuchi T, Tsushima T, Shizume K: Syndrome of hypercalcemia and leukocytosis induced by squamous cell carcinomas producing interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) and colony-stimulating factor (CSF). 8th International Congress of Endocrinology, June 1988, abstract No. 18-21-019.
  16. Fujii T, Sato K, Fujii Y, Kasono K, Tsushima T, Shizume K : Recombinant mouse interferon- $\gamma$  almost equipotently inhibits bone resorption induced by interleukin 1 $\alpha$ , hPTH(1-34), and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in fetal mouse forearm bones. 8th International Congress of Endocrinology, June 1988, Kyoto, Japan abstract 18-21-021.
  17. Sato K, Fujii Y, Kasono K, Furutani Y, Yamada M, Shizume K : Interleukin 1 $\alpha$  and PTH-like factor are responsible for humoral hypercalcemia associated with esophageal carcinoma cells (EC-G1). The Ninth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, Indianapolis, June 1987, abstract # 387.
  18. Sato K, Kasono K, Ozawa M, Imamura H, Fujii T, Fujii Y, Shizume K : Human IL-1 and parathyroid hormone synergistically stimulate bone resorption in vitro and cause hypercalcemia in vivo. The Tenth Annual Meeting of the American Society for Bone and Mineral Research, June 1988, New Orleans, abstract # 15.
  19. Sato K : Interleukin 1 and hypercalcemia. The International Symposium on Calcium Regulating System -



Vith Fuji Hormone Conference, Hakone, Japan, July 1988.

## 研究成果

### はじめに

悪性腫瘍は種々の骨吸収促進因子を産生することにより、高カルシウム血症を惹起する。最近、高カルシウム血症惹起因子として PTHレセプタ-刺激性の parathyroid hormone-related protein (PTH-rP) が明らかにされた。我々は 以前より、ある種の扁平上皮癌細胞は 非 PTH-rP 性の骨吸収促進因子を産生していることを見いだしていたが (Sato K et al. : J Clin Invest, 1986), 今回、遺伝子工学の技法を用いて、それが interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) であることを見いだした。

### IL-1 $\alpha$ は 破骨細胞刺激因子であることの証明

我々は interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) が IL-1 $\beta$  にほぼ匹敵する強力な骨吸収促進因子であることを見いだしており (Sato K, et al. Biochem Biophys Res Commun. 1986)、また このようなサイトカインは PTH レセプタ- 非刺激性であることも確認している (Sato K et al. : Acta endocrinol. 1987)。

### 高カルシウム血症を惹起するヒト扁平上皮癌細胞株の樹立

我々は 高カルシウム血症で死亡した患者より採取した扁平上皮癌を ノードマウスに移植し、担癌ノードマウスにも高カルシウム血症を惹起する扁平上皮癌細胞株を樹立している。このような細胞 (T3M-1, T3M-5) は PTH レセプタ- を刺激しないタイプの骨吸収促進因子を産生しており (Sato K et al., J Clin Invest. 1986)、それが interleukin 1 alpha (IL-1 $\alpha$ ) と酷似していることを見いだした (Sato K, et al. Cancer Res. 1987)。

また我々は 高カルシウム血症で死亡した食道癌患者から PTH-rP 産生性の扁平上皮癌細胞 (EC-GI) を樹立している (Sato K., et al. Jpn J Cancer Res. 1987)。

### 骨吸収促進因子が IL-1 $\alpha$ であることの遺伝子工学的証明

この EC-GI 細胞は PTH-rP のみならず、T3M-5 細胞のようにマウス胸腺リンパ球の増殖刺激因子を産生しており、それが IL-1 $\alpha$  であることを Northern blot hybridization 法により遺伝子工学的に証明した (Sato K, et al. J Clin Endocrinol Metab, 1988)。

興味ぶかいことに、これらの腫瘍を移植されたヌードマウスは高カルシウム血症を呈しているにもかかわらず、尿中 cyclic AMP 排泄は亢進しておらず、正常範囲にある。したがって腎原性 cyclic AMP 排泄量が増加していないタイプの高カルシウム血症は、悪性腫瘍細胞が少なくとも 2 種類の骨吸収促進因子 (PTH-rP + 非 PTH-rP) を産生することにより、高カルシウム血症を惹起しているものと推測される。

### まとめ と将来の展望

以上のごとく、我々は ある種の悪性腫瘍は PTH レセプターを刺激しないタイプの骨吸収促進因子を産生しており、それが IL-1 $\alpha$  であることを見いだした。我々の見いだした新知見は 腎原性 cyclic AMP 排泄の亢進していないタイプの高カルシウム血症の一成因を解きあかしたのものとして、世界的にも評価されている。詳細は 日本骨代謝学会誌 (教育講演「悪性腫瘍腫瘍と高カルシウム血症」) を参照されたい。

向後は 抗 IL-1 モノクローナル抗体や 抗 PTH-rP モノクローナ

ル抗体を作成して、このようなタイプの高カルシウム血症に対する特異的な治療法を開発していきたい。

### 補遺

この研究を通して、PTH に対する高感度の バイオアッセイが必要であることを痛感し、骨芽細胞様細胞 (ROS 17/2.8) を用いる バイオアッセイ系を確立した (Sato K, et al : Acta endocrinol. 1987). この際、ROS 17/2.8 細胞を subclone 化する必要性があり、これらの細胞を用いて、骨芽細胞の アルカリフォスファターゼ活性は 生理的濃度の甲状腺ホルモンにより刺激されること見いだした (Sato K, et al. : Endocrinology 1987). この新知見は トランスフォームしていない 骨芽細胞 (MC3T3-E1) 細胞でも見いだされた (Kasono K, et al. : Bone & Mineral 1988)。これは バセドウ病患者でしばしばみられる高アルカリフォスファターゼ血症の成因を説明するものである。