

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15694

研究課題名(和文) バイオイメージング技術を応用した口腔がん顎骨浸潤モデルマウスの開発

研究課題名(英文) Development of a novel mouse model that recapitulates bone invasion of oral cancer

研究代表者

波多 賢二 (Hata, Kenji)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：80444496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮がんは強い局所浸潤能を有しており、顎骨浸潤の有無が患者の予後を左右する臨床上的重要な問題点の一つとなっている。しかし、口腔がんの顎骨浸潤の臨床病理的特徴を再現するモデル動物が未だ確立されていないため、顎骨浸潤の分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、様々な蛍光たんぱく質でラベルした口腔がん細胞を樹立し、それらを用いた口腔がんの骨浸潤モデルを開発した。本研究により確立されたモデル動物は、口腔がんの顎骨浸潤の分子メカニズム解明と新しい分子標的治療の開発に貢献すると確信する。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma frequently invade the bone of mandible and maxilla and the bone invasion of oral cancer is a critical event that determines the patient poor prognosis. However, molecular mechanisms which regulate bone invasion are not fully understood. Here, we have established novel mouse model which recapitulates the bone invasion of oral squamous cell carcinoma. This model enables the dynamic imaging of bone invasion with high resolution. This mouse model will be a useful tool to understand the mechanism underlying bone invasion and contribute to the development therapeutic reagent for the treatment of bone invasion.

研究分野：口腔生化学

キーワード：口腔がん 骨浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

口腔がんの臨床的特徴の一つとして、顎骨浸潤があげられる。口腔は咀嚼、嚥下のみならず発音などの重要な機能を担うことから、手術療法による顎骨切除は様々な機能障害および顔貌の変形による審美障害も引き起こし、術後の社会復帰に大きく影響する。したがって顎骨浸潤はがん患者のQOLを著しく低下させマネジメントを困難にするため、有効な顎骨浸潤治療法の確立が強く望まれている。

様々な疾患の分子メカニズムを解明し治療戦略を開発するうえで、動物実験モデルは非常に有効、かつ必須のツールである。しかしながら、現在まで口腔がんの顎骨浸潤を再現する適切な動物実験モデルが確立されているとは言い難い。さらに、簡便で定量性のある顎骨浸潤評価方法が確立されていないため、開発された新規治療薬剤の効果を前臨床段階で評価できる動物実験系がない。これらの理由により、乳がんや肺がんなどの骨転移に見られる骨破壊に比較して、口腔がんの顎骨浸潤による骨破壊の研究が立ち遅れているのが現状である。したがって、定量的評価が可能でかつ再現性の高い口腔がんの顎骨浸潤動物モデルの構築が強く望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究では、口腔がんの頸部リンパ節転移モデル動物の構築ならびに骨転移研究の経験と知識を融合させ、さらに最新のバイオイメージング技術を応用することにより、ヒトの顎骨浸潤の病理的特性を再現する前臨床モデルマウスの構築と評価方法の確立にチャレンジする。さらに、このモデルマウスを用いて骨浸潤メカニズムの解明に取り組む。

## 3. 研究の方法

本研究では、まずレンチウイルスシステ

ムを用いて ffLuc 遺伝子または Zs-Green1 などのレポーター遺伝子を安定発現させた口腔がん細胞株を樹立する。

上記の方法で樹立した口腔がん細胞をヌードマウス頭頂部に接種し、骨浸潤を示す口腔がん細胞株を選択する。最も高い骨浸潤能を示した口腔がん細胞を用いて、マイクロ CT による骨浸潤評価ならびに、口腔がんの骨浸潤メカニズムの解明を行った。

## 4. 研究成果

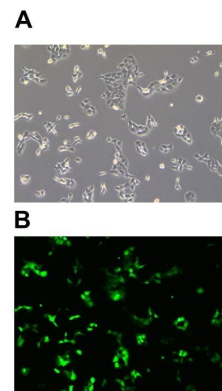
### (1) レポーター遺伝子を安定発現させた口腔がん細胞株の樹立

pLV5IN-CMV-Pur ベクター(TAKARA 社)に ffLuc 遺伝子および Zs-Green1 遺伝子をサブクローニングし、Lentiviral High Titer Packaging Mix とともに LentiX293T 細胞に遺伝子導入し、培養上清を回収しレンチウイルスパーティクルを作製した。口腔がん細胞株(HSC3, HO-1-u1, SAS:いずれも理研バイオリソースセンターより購入)にレンチウイルスを感染させ、ピューロマイシンを含む培養液で培養し、薬剤耐性遺伝子をピックアップし、最終的に安定発現細胞株をクローニングした。しかし、ffLuc 遺伝子 cDNA の長さが 2200bp と比較的大きい遺伝子のため、ZsGreen1 遺伝子と比較して発現量が低いこと、また GFP 遺伝

子と Luciferase 遺伝子の融合遺伝子であることから、樹立した安定発現細胞株の蛍光強度は低かった。そのため、以後の実験では ZsGreen1 遺伝子を安定発現する HSC3 および SAS

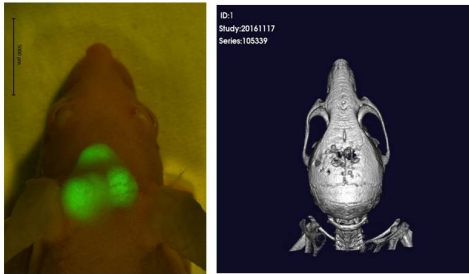
細胞を用いることとした。

< 図 1. SAS-ZsGreen1 の樹立 A は明視野画像、B は暗視野画像を示す。 >



## (2) 口腔がんの骨浸潤モデルの樹立

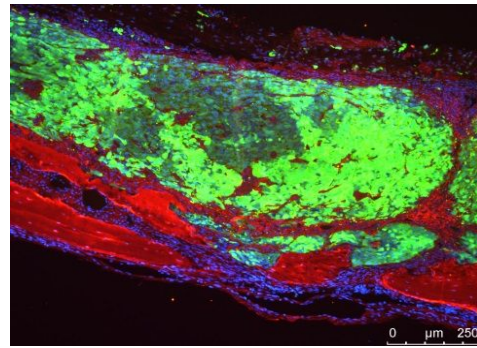
4週齢オスBalb/Cヌードマウス頭頂部を26G針でスクラッチした後、1000000個のSAS-ZsGreen1細胞およびHSC-3-ZsGreen1細胞を50 $\mu$ lの生理食塩水に懸濁し頭頂部接種した。携帯型フラッシュライトを用いて蛍光ラベルした口腔がん細胞の増殖を確認した結果、がん細胞接種後約3週間で直径5mm~10mmの腫瘍の増大を確認した。がん細胞を接種して3週間後にマイクロCT撮影を行い、がん細胞が骨浸潤しているか否かを検討した。その結果、SAS-ZsGreen1は摂取したすべてのマウスにおいて骨浸潤が認められた。(図2参照)



<図2.SAS-ZsGreen1 を接種し3週間後の写真。左は蛍光実態顕微鏡を用いた頭頂部の写真、右はそのマイクロCT画像を示す。マイクロCT画像において、骨吸収像が認められる。>

次に、骨浸潤部位の組織学的検討を行うために、パラフィン切片を作製した。Zs-Green1はパラフィン切片においても蛍光観察することが可能であることから、容易に口腔がんの細胞動態を観察することが可能である。骨組織を検出することが可能な抗型コラーゲン抗体を用いて骨組織を赤色蛍光で検出し、観察した結果、緑色蛍光陽性の口腔がん細胞と、赤色蛍光陽性の骨組織が観察され、骨浸潤口腔がん細胞の観察を容易に、かつ細胞レベルで検出することが可能になった。(図3参照)

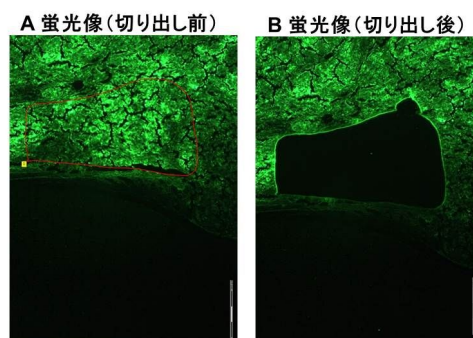
<図3.SAS-ZsGreen1 の骨浸潤像。緑色はSAS-ZsGreen1細胞、赤色は抗型コラー



ゲン抗体陽性の蛍光免疫染色画像を示す。骨吸収による頭蓋骨の断裂と口腔がん細胞の浸潤が認められる。>

## (3) 口腔がんの骨浸潤メカニズムの解明

最後に、本研究で確立したモデルマウスを用いて口腔がんの骨浸潤メカニズムの解明を行った。マウスを安楽死させた後、頭蓋部を液体窒素にて急速冷凍し骨浸潤サンプルとした。河本法によりマウス頭蓋骨の薄切切片を作製しレーザーマイクロダイセクション(LMD)フィルムに張り付けた。顕微鏡下にて頭蓋骨に直接接触し骨浸潤しているがん細胞を骨浸潤がん細胞、頭蓋と反対側で皮膚へと浸潤しているがん細胞を非骨浸潤がん細胞としてレーザーマイクロダイセクション法(LMD)により組織を回収し、RNAを精製した。(図4参照)



<図4.LMD法による骨浸潤がん細胞の切り出し。Aは切り出し前の蛍光画像、Bは切り出し後の蛍光画像を示す。>

逆転写酵素によりcDNAを作製しリアルタイムPCR法にてがんの浸潤に関与する遺伝子の発現を比較検討した結果、骨浸潤がん細胞でMMP2およびMMP9の発現が増加

していることが確認された。

以上の結果より、本研究で樹立した SAS-ZsGreen細胞は、口腔がん細胞の骨浸潤メカニズムを探索するうえで、有用なツールとなり得ることが明らかとなった。今後は、このモデルマウスを用いて、骨浸潤の分子メカニズム解明、ならびにメカニズムに基づいた骨浸潤治療戦略の開発に貢献していく予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

1. Wakabayashi H, Wakisaka S, Hiraga T, Hata K, Nishimura R, Tominaga M, Yoneda T. Decreased sensory nerve excitation and bone pain associated with mouse Lewis lung cancer in TRPV1-deficient mice. *J Bone Miner Metab* (in press).
2. Kawai S, Michikami I, Kitagaki J, Hata K, Kiyonari H, Abe T, Amano A, Wakisaka S. Syntaxin 4a Regulates Matrix Vesicle-Mediated Bone Matrix Production by osteoblasts *J Bone Miner Res*. 2017 Mar;32(3):440-448 doi: 10.1002/jbmr.3056.
3. Nakanshi M, Morita Y, Hata K, Muragaki Y. Acidic microenvironments induce lymphangiogenesis and IL-8 production via TRPV1 activation in human lymphatic endothelial cells *Exp Cell Res*. 2016 Jul 15;345(2):180-9. doi:10.1016/j.yexcr.2016.06.006.
4. Yoshida M, Hata K, Takashima R, Ono K, Nakamura E, Murakami T, Sainio K, Iseki S, Takano-Yamamoto T, Nishimura R, Yoneda T. A functional collaboration between Foxc1 and Gli2 controls endochondral ossification. *Nature Commun* 6:6653, 2015 DOI: 10.1038/ncommc7653.
5. Morita Y, Hata K, Nakanishi M, Yura Y, Nishimura R, Yoneda T. Cellular fibronectin1 promotes VEGF-C expression, lymphangiogenesis and lymph node metastasis associated with human oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metastasis* 32 (7):739-753, 2015, DOI 10.1007/s10585-015-9741-2
6. Morita Y, Morita N, Hata K, Nakanishi M, Kimoto N, Omata T, Nakamura Y, Yoneda T. Cyclooxygenase-2 Expression is Associated with Vascular Endothelial Growth Factor-C and Lymph Node Metastases in Human Oral Tongue Cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 117 (4):502-510 2014

<総説>

7. Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nishimura R. Transcriptional network controlling endochondral ossification *J Bone Miner Res* (in press)
8. Hata K, Epigenetic regulation of chondrocyte differentiation. *Japanese Dental Science Review*, Volume 51, Issue 4, November 2015, 105-113
9. 波多 賢二 「口腔疾患に対する PTH および BMP の臨床応用の可能性」 *Clinical Calcium* Vol26 No3 126-133 2016
10. 波多 賢二 10 章 軟骨領域での再生医療の現状と製品開発 第 1 節「軟骨細胞の分化誘導法」 2015 年 10 月 発刊 骨・関節・軟骨治療のための新製品開発と臨床ニーズ 技術情報協会 343-347-+
11. 波多 賢二 骨ペディア 骨疾患・骨

代謝・キーワード辞典 「がんの骨転移」 羊土社 2015年5月発刊 東京 260-261

〔学会発表〕(計4件)

1. 中西雅子、森田祥弘、波多賢二、村垣泰光 腫瘍巢の酸性微小環境はリンパ管内皮細胞の機能変化を介してリンパ節転移に関与する 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日(木)~10日(土) 名古屋国際会議場
2. Kenji Hata Transcriptional networks controlling endochondral bone formation The 28<sup>th</sup> Korean Society for Bone and Mineral Research Autumn Scientific Congress November 5 /2016 Seoul Republic of Korea
3. 波多賢二、吉田倫子、中村恵理子、高畑佳史、村上智彦、井関祥子、山本照子、西村理行、米田俊之 転写因子 Foxc1 と Ihh-Gli2 シグナルの機能的相互作用は骨格形成に重要である 第9回 骨・軟骨フロンティア 2015/11/7 東京
4. Kenji Hata A functional collaboration between Foxc1 and Ihh-Gli2 is critical for endochondral ossification 5th Japan-Thailand-Korea Joint Symposium 2015/12/3 Daegu ,Republic of Korea

〔図書〕(計件)

〔産業財産権〕

出願状況(計件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

波多 賢二 (HATA, Kenji )  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号： 80444496

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

米田 俊之 (YONEDA, Toshiyuki )  
大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員  
研究者番号：80142313

(4) 研究協力者

( )