

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11682

研究課題名(和文) 腫瘍による顎骨吸収の分子機序：RANKL遺伝子発現調節を軸とした解析

研究課題名(英文) A study of molecular mechanisms of jaw bone resorption by tumors: Focusing on regulation of RANKL expression.

研究代表者

相川 友直(Aikawa, Tomonao)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00362674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯源性腫瘍、歯源性嚢胞、および口腔がんは顎骨の吸収や破壊を伴い増大する代表的な疾患ですが、その骨吸収機序はわかっていません。今回の研究では歯源性腫瘍、嚢胞、口腔癌によって産生されるTransforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )に焦点を当て、間質性線維芽細胞での破骨細胞誘導因子RANKLの誘導機序を研究しました。さらに、口腔がんによる臨床的骨吸収の所見を模倣するマウス実験モデルの作成に成功しました。一つは重度の骨吸収であり、もう一つは同じ細胞株ですが異なる株細胞による軽度の骨吸収でした。このモデルを用いて骨吸収機序を研究した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯源性腫瘍、歯源性嚢胞は口腔がんは骨吸収と骨破壊をしながら増大しますが、どのように骨吸収されるかの分子機序がわかっていないため、どの分子を標的に治療するのが明らかではありません。今回の研究ではTransforming growth factor beta, Interleukin-1, Interleukin-6の相互作用で破骨細胞活性化因子であるRANKL発現の調整を研究しました。これらの基礎研究の成果の蓄積で、新たな治療標的となる分子が明らかになることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The odontogenic tumor, odontogenic cyst, and oral cancer are the representative diseases which grow with resorption and destruction of the jaw bone. However, the mechanisms of bone resorption and destruction by those disease are still unclear. We focused on Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) which were produced by odontogenic tumor, cyst, and oral cancer, we studied the mechanisms of induction of RANKL, an osteoclast inducing factor, in stromal fibroblasts. Furthermore, we successfully made the mouse experimental model which mimic the findings of clinical bone resorption by oral cancer, one was severe bone resorption by cancer cells, and the other was mild bone resorption by the same cell line cells but cells from different strain. We studied the mechanisms of bone resorption using the experimental model.

研究分野：歯学、外科系歯学、口腔外科学

キーワード：骨吸収 顎骨 腫瘍 RANKL TGF- $\beta$  IL-6

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年の破骨細胞研究成果の蓄積から、炎症性・腫瘍性を問わず全ての骨吸収性疾患に破骨細胞の活性化を誘導する因子、Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)の関与が示されている。しかしながら、口腔外科領域で頻度の高い疾患である顎骨嚢胞や顎骨腫瘍の骨吸収機序としては、古くから提唱されている歯原性上皮細胞の増殖と内容液による圧迫性骨吸収が受け入れられているにすぎず、破骨細胞の活性化やその関与については検討されていない。一方、歯胚発達や萌出に関わる研究は、歯原性上皮細胞が産生するサイトカイン (PTHrP) が歯胚周囲の RANKL 発現を促進し、破骨細胞を活性化することで歯胚への骨組織の侵入を防いだり、歯の萌出を制御したりするメカニズムを明らかにしている。さらに、歯胚由来線維芽細胞も種々のサイトカインによって RANKL 発現が調節されると報告されている。申請者は「歯原性上皮細胞は RANKL 発現を促進するサイトカインを産生し嚢胞や腫瘍性疾患に伴う骨吸収を制御する」という作業仮説のもと、エナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍 (角化嚢胞) の腫瘍組織と顎骨境界を解析した結果、1) 病変間質と骨吸収面の境界に破骨細胞が存在すること、2) 顎骨腫瘍の上皮細胞は Transforming Growth Factor-beta (TGF- $\beta$ ) および Interleukin-1 (IL-1) を産生し、腫瘍-骨境界周囲の腫瘍間質線維芽細胞は RANKL を発現していることを明らかにした。このことは腫瘍細胞が産生するサイトカインが間質線維芽細胞の RANKL 発現を増強させた結果、破骨細胞の活性化により骨吸収をきたすメカニズムを示唆している。

### 2. 研究の目的

本研究では、顎骨腫瘍や嚢胞、さらには悪性腫瘍による顎骨破壊・骨吸収の分子メカニズム明らかにするために、腫瘍細胞と間質線維芽細胞の相互作用に焦点をあてた。特に、腫瘍細胞が産生するサイトカインによる間質線維芽細胞の RANKL の発現調節機構と、破骨細胞活性化の機序を明らかにすることを目的とした。さらに、本研究で準備している研究ツールを口腔がん細胞の骨吸収機序の解析にも応用し、間質線維芽細胞の RANKL 発現や発現制御機序を解析し、普遍的な腫瘍-腫瘍間質-骨破壊の分子機序研究へ発展させることを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) 試薬: リコンビナントマウス TGF- $\beta$ 1、リコンビナントマウス IL-6 (ともに Biolegend)、Human Macrophage colony-stimulating factor: M-CSF (ロイコプロール: 協和発酵工業)、リコンビナントヒト可溶性 RANKL (ORIENTAL YEAST) を本実験に供した。

2) 細胞培養: 検体・試料の研究使用への供託について説明、同意の得られた患者の歯原性腫瘍 (エナメル上皮腫)、角化嚢胞の組織片および健常の歯嚢を採取した。線維芽細胞は explant 法にて培養し、形態的に純粋な間質線維芽細胞および歯嚢線維芽細胞を分離した。間質線維芽細胞は 10% FBS (HyClone)、2mM L-グルタミンを添加した Eagle's minimum essential medium alpha modification ( $\alpha$ -MEM) を培養液として使用し 37 $^{\circ}$ C、5% CO $_2$  存在下で培養した。実験には 4-9 継代の間質線維芽細胞を使用した。ヒト骨肉腫由来骨芽細胞株 MG-63 細胞 (Resource No.RBRC-RCB1890)、マウス骨髄由来ストローマ細胞 ST2 (Resource No.RBRC-RCB0224) は独立行政法人理化学研究所より購入し MG-63 細胞は 10% FBS を含む MEM 培地で、ST-2 細胞は 10% FBS を含む RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) で培養した。

マウス扁平上皮癌細胞株 SCC は九州大学 自見英治郎教授および大阪大学大学院歯学研究科口腔外科学第二教室 由良義明教授より分与された細胞株を使用した。SCC 細胞の培養には 10% FBS を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培養した。

マウス骨髄細胞は Takahashi らの方法に準じて分離培養した。すなわち、生後 4~6 週齢の野生型 C3H/HeNJeI 雌マウス大腿骨を 26 ゲージ針で洗浄して得られた骨髄液を 10% FBS および 50 ng/ml M-CSF, 2 mM L-glutamine を含む  $\alpha$ -MEM で 3 日間培養し、破骨細胞前駆細胞として実験に用いた。破骨細胞前駆細胞を 48 穴プレートに 5 x 10 $^5$  個/well の密度で播種した。可溶性 RANKL (25 ng/ml)、TGF- $\beta$  (1 ng/ml)、IL-6 (100 ng/ml) などの試薬の存在下あるいは非存在下で 7 日間培養した。培養液と試薬の交換は 3 日毎におこなった。一部実験では酸処理した無血清培養上清を (以下、CM) 加えて培養した。最終濃度 5% の CM および sRANKL (50 ng/ml) 存在下で破骨細胞前駆細胞を 7 日間培養した。培養終了後、10% ホルマリン溶液で細胞を固定し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を行った。核が 3 つ以上で TRAP 陽性の多核巨細胞数を破骨細胞として計測した。

3) シンジェニックマウスモデルの作成: 継代培養されている 4 系統の SCC 細胞 1 x 10 $^5$  個を、C3H/HeNJeI 雌マウスの頭蓋骨膜近傍に移植し、3 週間後に動物用マイクロ CT で骨吸収の程度を観察した。得られた DICOM データを TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング) にて三次元構築を行い、頭蓋骨の穿孔と骨の増生、骨表面の変形を評価し、骨吸収様式の異なる亜株 2 系統を選別し (亜株 A, B) 本研究に用いた。それぞれの SCC 亜株は継代培養における細胞選別と形質転換を避けるため、同一継代回数ストックをすべての実験に用いた。癌細胞移植後 2-3 週間飼育し実験に用いた。

4) 免疫組織染色: 免疫組織化学染色は Vectastain ABC キット (Vector Laboratories) を用いて行った。一次抗体として抗 TGF- $\beta$ 1 抗体 (R&D Systems: Clone 1D11, 希釈 1:10)、抗 RANKL 抗体 (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, 希釈 1:50)、抗リン酸化特異的 Smad3 抗体 (Rockland, 希釈 1:500) を用い、DAB 溶液で発色反応を行った。

5) RNAの抽出およびRT-PCR: 培養細胞のRNAはTRIzol®試薬(Thermo Fisher Scientific)を用いて抽出した。*In vivo*のSCC 亜株A, B 腫瘍のRNAは、頭蓋骨近傍に移植後3週の腫瘍から抽出した。全RNA 2 µgをRandom Primer (Promega)および逆転写酵素Super Script (Thermo Fischer Scientific)と42℃, 20分間逆転写反応させ、cDNAを合成した。定量的リアルタイムPCRにはStepOne Plus™ (Applied Biosystems)を使用した。合成したcDNAをKAPA SYBR FAST qPCRキット(日本ジェネティクス株式会社)とそれぞれのプライマーでPCR反応を行った。各遺伝子の発現は*Gapdh*をノーマライザーとして比較Ct法で解析した。本研究で用いたプライマーを右下に示す。一部のRT-PCR実験ではプライマーとして、ヒトRANKL(センス; 5'-ACC AAC GAG CTG AAG CAG AT-3', アンチセンス; 5'-TCC TTG ATG ATT CCC AGG AG-3')を用いた。

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	5'-AAGGTCATCCCAGAGCTGA-3'	3'-GTTCTCCACCACCTCGTC-5'
<i>Rankl</i>	5'-CAGCATCGCTCTGTTCTCTGTA-3'	3'-ACTCTGAGGACTCTTTGGCTC-5'
<i>Opg</i>	5'-AAGCACCTGTAGAAAAA-3'	3'-CTCACATCTCTCTATTTGGCC-5'
<i>Mmp2</i>	5'-CAAGTCCCGGCGATGTC-3'	3'-CTGTCACCTGGAAGTGTCT-5'
<i>Mmp9</i>	5'-CACCACCACAACCTGAACCC-3'	3'-GATGACGCCGAGAAAGACTC-5'
<i>Il-6</i>	5'-AAGTGATCATCGTTTTCATACA-3'	3'-CCAGCAACCTCACCATTAGAG-5'
<i>Il-10</i>	5'-GCCAGGCTTATCGAAATG-3'	3'-CGTAAACTAAGGACCCAC-5'
<i>Tgf-β</i>	5'-AACAACTCTGGCGTTACC-3'	3'-GTCACCTCAACCTGCCGTC-5'
<i>Pthrp</i>	5'-GTTGCGTGGAGGGCTTGGC-3'	3'-AACGCGCGCAAGAAGGA-5'
<i>Vegf</i>	5'-AGCGGAGAAAGCATTGTTTG-3'	3'-GTTTTGTGCTGAGCGCAAC-5'

6) ルシフェラーゼレポーターアッセイ: HEK293細胞のゲノムDNAを鋳型としてヒトRANKL遺伝子転写開始点上流2360 bp (NG\_008990, Version: NG008990.1)をもとにKOD-FX (TOYOBO)を用いて、PCR法(98℃, 10秒、進展反応68℃, 2.5分、40サイクル)にて増幅した。増幅後、全配列をシーケンスした。pCR4-TOPO® Vector (TOPO TA Cloning Kit For Sequencing; Thermo Fisher Scientific)にクローニングした後、pGL3-Basic Vector (Promega)にサブクローニングし、レポーターコンストラクトを構築した。制限酵素で切断した転写開始点より上流1254 bp, 1066 bp, 176 bpの配列もpGL3-Basic Vectorにてサブクローニングした。転写開始点より上流762 bp, 583 bp, 369 bpの配列のDNA断片はPCR増幅し、レポーターコンストラクトを構築した。細胞を12穴細胞培養皿に70%飽和状態で播種し、翌日OPTI-MEM培地でLipofectamine® LTX&Plus Reagent (Invitrogen)を用いてルシフェラーゼコンストラクトを遺伝子導入した。6時間培養後、通常培地に交換しさらに36時間培養した後、TGF-β1存在下でさらに6時間培養した。細胞溶解液を用いて、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミシイタケルシフェラーゼ活性をルミノメーター(Berthold Technologies)を用いて測定した。

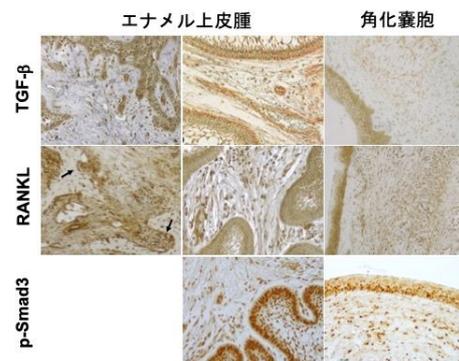
7) Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 濃度の測定: 24穴培養プレートに飽和状態に増殖した間質線維芽細胞を0.3% BSAを含む無血清α-MEM培養液試料を加えて培養した。培養上清中のPGE<sub>2</sub>濃度はPGE<sub>2</sub> ELISAキット(Cayman Chemical Co.)で測定した。

8) ウェスタンブロッティング: サイトカインを含む無血清培養液で間質線維芽細胞を培養した。培養終了後、間質線維芽細胞をプロテアーゼ阻害剤カクテルおよびフォスファターゼ阻害剤カクテルを含む細胞溶解液で氷上に20分間静置し細胞を溶解した。回収した細胞溶解液を試料として10% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ウェット式転写装置を用いてPVDFメンブレンに転写した。転写したメンブレンを洗浄後、イムノブロック(DSファーマバイオメディカル、大阪)でブロッキングを行った。一次抗体として抗リン酸化特異的p38抗体(Cell signaling, Beverly, 1:2000)、抗リン酸化特異的c-Jun抗体(Cell signaling, 1:1000)、抗リン酸化特異的ERK1/2抗体(Upstate Biotechnology)、抗リン酸化特異性NF-κB抗体(Cell signaling, 1:1000)、抗ヒトCOX-2抗体(Cayman Chemical, 希釈1:500)で4℃で16時間反応を行った。二次抗体反応後にAmersham™ ECL Plusキットで発光反応を行い、発光シグナルはKODAK Gel Logic 2200イメージングシステムで検出した。

#### 4. 研究成果

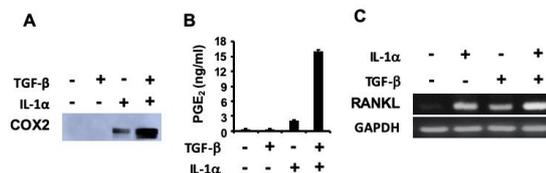
##### 1) 歯原性腫瘍、歯原性嚢胞における骨吸収機序

サイトカイン発現とRANKL発現: 代表的な顎骨歯原性腫瘍・嚢胞としてエナメル上皮腫組織と歯原性角化嚢胞におけるTGF-βとRANKL発現を免疫組織化学染色で検討した。代表的な染色例を右図に示す。TGF-β(上段)は叢状型エナメル上皮腫(パネル左列)、濾胞型エナメル上皮腫(パネル中央列)の高円柱上皮、血管内皮細胞に陽性で、間質線維芽細胞にも一部陽性であった。角化嚢胞(パネル右列)ではTGF-β(上段)は嚢胞裏装上皮、浸潤リンパ球に陽性で間質線維芽細胞にも弱陽性を示した。RANKLの染色性(中段)はエナメル上皮腫の高円柱上皮細胞や間質線維芽細胞、浸潤リンパ球に陽性を示した。病変内の骨組織の骨細胞、骨芽細胞はRANKL陽性であるが、周囲の間質線維芽細胞も同様に陽性を示し、骨吸収部周辺でより高いRANKLの染色性が認められた(矢印)。また、エナメル上皮腫と同様に角化嚢胞の基底細胞側の腫瘍上皮細胞もRANKL陽性であった。エナメル上皮腫、角化嚢胞ともに腫瘍上皮細胞のみならず、間質線維芽細胞の核内にもリン酸化Smad3(下段)は陽性で間質線維芽細胞においてTGF-βシグナルが活性化されていることが示された。

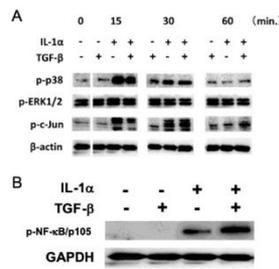


IL-1αとTGF-βの相互作用: 歯原性腫瘍の間質線維芽細胞でのRANKL発現の検討を行った。歯原性腫瘍・嚢胞に多く含有されているTGF-βとIL-1αの効果を検討した。IL-1αはCOX2を誘導し、TGF-β単独ではCOX2タンパク発現を誘導しなかったが、IL-1αとTGF-βは相乗的に

COX2 を誘導した (右下図 A)。IL-1 $\alpha$  は強力な RANKL 誘導因子である PGE<sub>2</sub> 濃度を増加させた (右下図 B)。また、IL-1 $\alpha$  により RANKL の遺伝子発現増加も RT-PCR で示された。さらに、IL-1 $\alpha$  と TGF- $\beta$  の存在下で培養すると、PGE<sub>2</sub> 合成と RANKL 発現は相乗的に促進された。IL-1 $\alpha$  は COX2 タンパク、その後の PGE<sub>2</sub> 合成を介し RANKL 発現誘導する機序が示唆された。さらに IL-1 $\alpha$  と TGF- $\beta$  の相互作用は相乗的であり、TGF- $\beta$  が IL-1 $\alpha$  の作用を増強していることが示唆された。

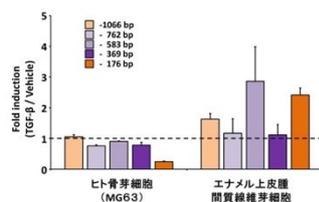
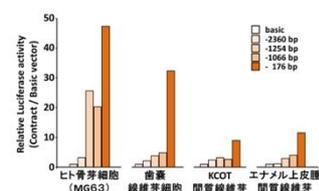
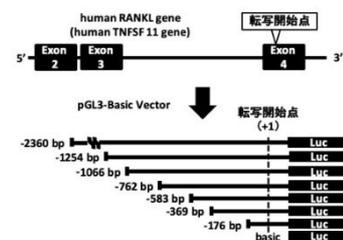


(右図 C) 右図 A に示すように IL-1 $\alpha$  刺激により MAP キナーゼ経路のリン酸化が観察された。一方、TGF- $\beta$  刺激も MAP キナーゼ経路をリン酸化させた。しかし、両因子刺激による相加的や相乗的な相互作用はなかった。右図 B に IL-1 $\alpha$  と TGF- $\beta$  刺激による NF- $\kappa$ B リン酸化を示す。TGF- $\beta$  は間質線維芽細胞の NF- $\kappa$ B リン酸化を惹起しなかった。IL-1 $\alpha$  は NF- $\kappa$ B をリン酸化し、IL-1 $\alpha$  と TGF- $\beta$  はさらに NF- $\kappa$ B をリン酸化のバンドを増強させた。TGF- $\beta$  が IL-1 $\alpha$  による NF- $\kappa$ B のリン酸化を増強させる機序が存在することが示唆された (右図 A、B)。



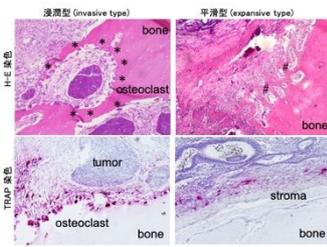
### TGF- $\beta$ による RANKL 遺伝子調節機構: ヒト RANKL 遺伝子のプロモーター領域としては、Kitazawa らが報告した転写開始点上流 1200 bp を拡大し 2300 bp をクローニングして、様々な長さのプロモーター配列を構築した (右図)。

骨芽細胞株 MG63 細胞、歯嚢線維芽細胞、間質線維芽細胞、エナメル上皮腫間質線維芽細胞にそれぞれの長さのプロモーター配列を含むコンストラクトをトランスフェクションさせた結果、MG63 細胞では転写開始点より上流 -1254 bp より短いプロモーター配列で高いルシフェラーゼ活性を示し、構築したコンストラクトはプロモーター配列として機能していることが示された。一方、歯嚢、角化嚢胞 (KCOT)、エナメル上皮腫由来のそれぞれの間質線維芽細胞では、最も短い -176 bp のプロモーターのみが高いルシフェラーゼ活性を示した。骨芽細胞株 MG63 細胞と歯原性線維芽細胞では、ヒト RANKL 遺伝子転写調整が異なる可能性も示唆された (右グラフ上)。次に -1066 bp と -176 bp 間に注目し、TGF- $\beta$  刺激によりルシフェラーゼ活性の変化を検討した。右図に示すごとく、MG63 細胞では TGF- $\beta$  刺激により -176 bp のコンストラクトにおいて有意にルシフェラーゼ活性の抑制を認め、エナメル上皮腫間質線維芽細胞では、TGF- $\beta$  により -176 bp のコンストラクトのルシフェラーゼ活性の亢進が認められた。TGF- $\beta$  刺激は間質線維芽細胞の RANKL 遺伝子発現を制御する可能性が示された。(右グラフ下)



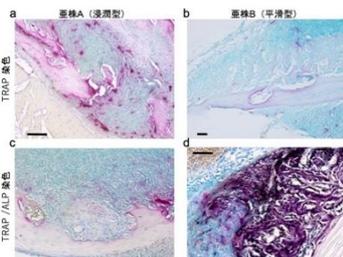
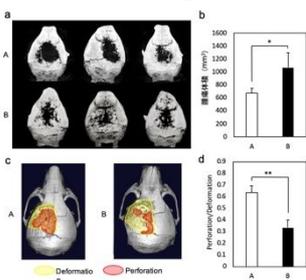
### 2) 扁平上皮癌細胞による骨吸収機序

口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤と骨吸収は、臨床的に浸潤型骨吸収、平滑型骨吸収、その混合型に分類される (右図)。浸潤型では骨吸収窩にそって多くの破骨細胞 (\*) が存在し、それらは TRAP 染色で染色される。一方、平滑型ではむしろ骨形成する部位もあり、TRAP 陽性の破骨細胞も乏しい。これらを模倣する実験モデルをかりつづるためにマウス SCC 細胞を選択した。複数系統で継代培養されている SCC 細胞をマウスに移植して浸潤型の細胞株、平滑型の細胞株を選択し、それぞれ A 株、B 株とした。



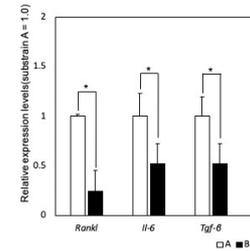
### シンジェニックマウスモデルの確立: SCC 亜株 A, B

それぞれ  $5 \times 10^5$  個の細胞を頭頂部に移植した結果を示す。亜株 A では腫瘍が頭蓋骨を広範に穿孔するような骨破壊をきたし、亜株 B の骨破壊は骨縫合部を中心に拡大し、その周囲には多くの小さい骨穿孔と骨の陥凹と骨の隆起が混在する変型領域を認めた (左図 a)。亜株 A, B の腫瘍体積は 3 週間の時点では亜株 B 腫瘍が有意に増大した (左図 b)。亜株 A, B の画像上の骨破壊様態の違いは骨穿孔部の大きさと表面圧迫と骨隆起であったため、骨吸収により穿孔した領域の割合を骨穿孔部の面積 / 骨の変形の面積として計算した。その結果、亜株 A では骨穿孔の面積が 63%であるのに対し、亜株 B では 33%と優位に低く、亜株 A は活発な骨破壊をきたし、亜株 B では骨変形を伴う緩慢な骨吸収をきたすことが示された (左図 c, d)。亜株 A で見られた骨破壊が破骨細胞を介して吸収されていることは TRAP 染色で、また亜株 B で見られた骨隆起や変形が骨新生を伴っているのかはアルカ



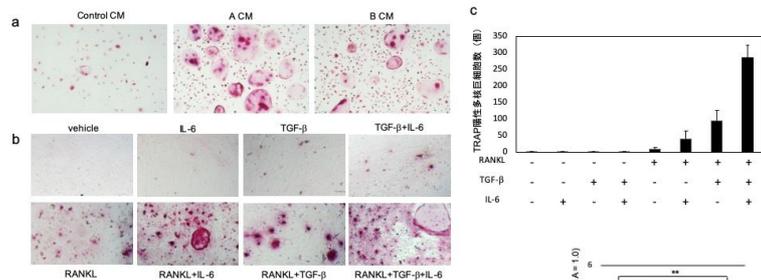
リフォスファターゼ染色で確認した。右上写真で、亜株 A では骨穿孔部に多数の TRAP 陽性破骨細胞 (赤) を認める一方で ALP 陽性細胞 (紫) をほとんど確認できず (右上図 a, c)、逆に亜株 B では TRAP 陽性破骨細胞の活性が乏しい一方、高い ALP 活性を認め造骨性変化がみられた (右上図 b, d)。今回作成したマウスモデルで亜株 A は破骨細胞を活性化させ著明な骨吸収をきたす浸潤型、亜株 B は破骨細胞の活性化は弱く部分的に骨新生をきたす平滑型骨吸収様式を模倣する実験モデルとして実験に用いた。

**in vivo** での骨吸収関連遺伝子発現：各亜株腫瘍の遺伝子発現、特に本研究で着目している TGF- $\beta$  や破骨細胞形成に関連する遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量的に比較した (右図)。その結果、亜株 A の腫瘍は *Rankl* で約 4 倍、*Il-6*、*Tgf- $\beta$*  で約 2 倍発現が高かった。



**腫瘍細胞のサイトカインによる破骨細胞形成**：各亜株の培養

上清 (CM) 存在下でマウス骨髄由来マクロファージを培養した。CM は酸処理したものをを用いた。その結果、亜株 A, B とともにコントロール CM と比較して破骨細胞形成を促進した。また亜株 A は亜株 B よりも破骨細胞形成を促進した (下図 a)。CM を酸処理することで破骨細胞形成が促進されたため、TGF- $\beta$  の関与が強く示唆された。TGF- $\beta$ 、IL-6 の破骨細胞形成に及ぼす効果を検討した。RANKL 非存在下では IL-6 と TGF- $\beta$  の破骨細胞形成は極めて低かった。一方で、25 ng/ml の低用量の RANKL 存在下に培養すると IL-6 および TGF- $\beta$  をそれぞれの共刺激することによって破骨細胞形成が強く促進することが示された (下図 b)。

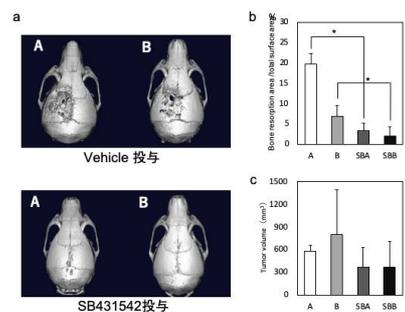


このことから IL-6 と TGF- $\beta$  が骨髄由来マクロファージの破骨細胞分化に相乗的作用を有することが示唆された。(右グラフ c)

**間質線維芽細胞株の Rankl 発現に対する TGF- $\beta$ 、IL-6 の効果**：マウス骨髄由来間質線維芽細胞株 ST2 細胞を IL-6 あるいは TGF- $\beta$  存在下で 3 時間培養し *Rankl* の発現についてリアルタイム PCR を用いて検討したところ、コントロールと比較して IL-6 で約 1.5 倍、TGF- $\beta$  で約 3.3 倍と *Rankl* 発現の上昇を認め、さらに、IL-6 および TGF- $\beta$  存在下で培養すると約 4.1 倍と *Rankl* 発現はさらに増強され、IL-6 と TGF- $\beta$  の *Rankl* 発現に及ぼす相加効果を認めた。(右上グラフ)

**TGF- $\beta$  阻害剤 SB431542 の骨吸収に与える影響**：

*in vivo* での TGF- $\beta$  シグナルの骨吸収に対する作用を確認するため、腫瘍近傍への TGF- $\beta$  型受容体選択的阻害剤である SB431542 投与を行った。亜株 A および B とともに骨吸収面積は SB431542 投与群で有意に縮小し (右図 a, c)、腫瘍体積は有意な差を認めなかった (右図 c)。SCC 細胞による骨破壊と骨吸収には TGF- $\beta$  シグナルが強く関与していることが明らかになった。



本研究では歯原性腫瘍、歯原性嚢胞、口腔扁平上皮癌による骨吸収の分子メカニズム明らかにするために、腫瘍細胞が産生するサイトカインと間質線維芽細胞の相互作用に焦点をあて、RANKL の発現調節機構と破骨細胞活性化機序を検討した。その結果、顎骨歯原性腫瘍・嚢胞での TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の発現と間質線維芽細胞での RANKL 発現を確認し、1) TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  は間質線維芽細胞の RANKL 発現を相乗的に誘導すること、2) TGF- $\beta$  は IL-1 $\alpha$  は RANKL 発現に相乗的な相互作用を有し、3) TGF- $\beta$  刺激はヒト RANKL 遺伝子のプロモーター活性を促進したこと示した。以上より、TGF- $\beta$  を中心とした顎骨歯原性腫瘍が産生するサイトカインの相互作用によって間質線維芽細胞での RANKL 遺伝子発現が上昇することが示唆された。

口腔扁平上皮癌による骨浸潤・骨吸収での間質線維芽細胞と RANKL 発現を検討するためにマウス骨吸収モデルを作成した。マウス扁平上皮癌細胞株 SCC から二つの亜株を選択し、腫瘍を頭蓋骨に移植するマウスモデルを作成した結果、一方の細胞株は著明な破骨細胞形成と骨破壊をきたし、もう一方は破骨細胞形成に乏しい圧迫型の骨吸収と骨形成をきたす、異なる 2 種類の骨吸収像を模倣した。この二つの細胞株の遺伝子発現、細胞特性を比較した結果、著しい破骨細胞形成をきたす細胞の TGF- $\beta$ 、IL-6、RANKL 発現は有意に高かった。TGF- $\beta$  は IL-6 と間質線維芽細胞株 ST-2 細胞の RANKL 発現を相加的に上昇させた。また、マウスモデルでの破骨細胞形成と骨吸収は TGF- $\beta$  阻害剤で抑制された。腫瘍による骨破壊・骨吸収に TGF- $\beta$  を軸とした RANKL 誘導機序があることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamakawa N, Kirita T, Umeda M, Yanamoto S, Ota Y, Otsuru M, Okura M, Kurita H, Yamada SI, Hasegawa T, Aikawa T, Komori T, Ueda M	4. 巻 119
2. 論文標題 Tumor budding and adjacent tissue at the invasive front correlate with delayed neck metastasis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 370-378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jso.25334	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Otsuru M, Ota Y, Yanamoto S, Okura M, Umeda M, Kirita T, Kurita H, Ueda M, Komori T, Yamakawa N, Kamata T, Hasegawa T, Shibahara T, Ohiro Y, Yamashita Y, Noguchi K, Noguchi T, Karakida K, Naito H, Aikawa T, Yamashita T, Kabata D, Shintani A.	4. 巻 26
2. 論文標題 A Multicenter Retrospective Study of Elective Neck Dissection for T1-2NOMO Tongue Squamous Cell Carcinoma: Analysis Using Propensity Score-Matching.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 555-563
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-018-07089-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kondo T, Sugauchi A, Yabuno Y, Kobashi H, Amano K, Aikawa T, Kogo M, Okura M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Performance status scale for head and neck scores for oral cancer survivors: predictors and factors for improving quality of life.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Oral Investig.	6. 最初と最後の頁 1575-1582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-018-2587-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada C, Aikawa T, Okuno E, Miyagawa K, Amano K, Takahata S, Kimata M, Okura M, Iida S, Kogo M.	4. 巻 49
2. 論文標題 TGF- in jaw tumor fluids induces RANKL expression in stromal fibroblasts.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 499-508
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2016.3548.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamada C, Aikawa T, Mizutani M, Usuki T, Takahata S, Yabuno Y, and Kogo M.	4. 巻 29
2. 論文標題 Giant odontogenic tumor invading bilateral maxillary sinuses.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology	6. 最初と最後の頁 146-150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) <a href="http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2016.09.009">http://dx.doi.org/10.1016/j.ajoms.2016.09.009</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanikawa C, Hirata K, Aikawa T, Maeda J, Kogo M, Iida S, Yamashiro T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Efficacy of Maxillary Anterior Segmental Distraction Osteogenesis in Patients With Cleft Lip and Palate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 1375-1381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1055665618758692	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakatsugawa K, Kurosaka H, Mihara K, Tanaka S, Aikawa T, Kogo M, Yamashiro T.	4. 巻 56
2. 論文標題 Orthodontic-Surgical Approach for Treating Skeletal Class III Malocclusion With Severe Maxillary Deficiency in Isolated Cleft Palate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Cleft Palate-Craniofacial Journal	6. 最初と最後の頁 400-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1055665618777573	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Murata Y, Kurosaka H, Ohata Y, Aikawa T, Takahata S, Fujii K, Miyashita T, Morita C, Inubushi T, Kubota T, Sakai N, Ozono K, Kogo M, Yamashiro T.	4. 巻 6
2. 論文標題 A novel PTCH1 mutation in basal cell nevus syndrome with rare craniofacial features.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Genome Variation.	6. 最初と最後の頁 e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41439-019-0047-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okura M, Yanamoto S, Umeda M, Otsuru M, Ota Y, Kurita H, Kamata T, Kirita T, Yamakawa N, Yamashita T, Ueda M, Komori T, Hasegawa T, Aikawa T	4. 巻 5
2. 論文標題 Prognostic and staging implications of mandibular canal invasion in lower gingival squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3378-3385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.899	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada SI, Kurita H, Kamata T, Kirita T, Ueda M, Yamashita T, Ota Y, Otsuru M, Yamakawa N, Okura M, Aikawa T, Umeda M.	4. 巻 106
2. 論文標題 Significant prognostic factors affecting treatment outcomes of salivary gland carcinoma: a multicenter retrospective analysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 96-102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-017-0318-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamada SI, Kurita H, Kamata T, Kirita T, Ueda M, Yamashita T, Ota Y, Otsuru M, Yamakawa N, Okura M, Aikawa T, Yanamoto S, Umeda M.	4. 巻 58
2. 論文標題 Clinical investigation of 38 cases of oral mucosal melanoma: A multicentre retrospective analysis in Japan.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Australasian Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e223-e227.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ajd.12603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高畑 惣介, 相川 友直, 増田 智丈, 宮川 和晃, 古郷 幹彦
2. 発表標題 扁平上皮癌骨吸収におけるTGF-bとIL-6の関与
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛利 真弥, 相川 友直, 宮川 和晃, 増田 智丈, 古郷 幹彦
2. 発表標題 抗RANKL抗体は骨細胞マーカー発現を上昇させる
3. 学会等名 第72回日本口腔科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高畑 惣介, 相川 友直, 宮川 和晃, 自見 英治郎, 古郷 幹彦
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌による顎骨進展様式は腫瘍内微小環境により異なる
3. 学会等名 第35回日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomonao Aikawa
2. 発表標題 Clinical features and Treatment Strategy of Facial Asymmetry with Unilateral Condylar Hyperplasia.
3. 学会等名 第64回口腔外科学会総会・学術大会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonao Aikawa
2. 発表標題 Orthognathic Surgery for Patients with Cleft Lip and Palate; Le Fort 1 osteotomy and maxillary anterior segmental distraction osteogenesis (MASDO).
3. 学会等名 23rd meeting of Korean Cleft Lip and Palate Association(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomonao Aikawa
2. 発表標題 Clinical features and Treatment Strategy of Facial Asymmetry with Unilateral Condylar Hyperplasia: From six cases by proportional condylectomy and bimaxillary orthognathic surgery.
3. 学会等名 The 57th congress of The Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomonao Aikawa, Yuko Shintaku, Susumu Tanaka, Kazuaki Miyagawa, Toshihiro Uchihashi, Tadataka Tsuji, Sousuke Takahata, Maya Mouri, and Mikihiko Kogo
2. 発表標題 Post-operative stability of simultaneous proportional condylectomy and bimaxillary orthognathic surgery for condylar hyperplasia.
3. 学会等名 The 57th congress of The Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuko Shintaku, Tomonao Aikawa, Susumu Tanaka, Kazuaki Miyagawa, Toshihiro Uchihashi, Tadataka Tsuji, Sousuke Takahata, Maya Mouri, and Mikihiko Kogo
2. 発表標題 Changes of midfacial soft tissue profile by bimaxillary orthognathic surgery: comparison of skeletal 3 with cleft lip and/or palate and non-cleft skeletal 3.
3. 学会等名 The 57th congress of The Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	宮川 和晃	大阪大学・歯学部附属病院・医員	
	(Kazuaki Miyagawa)		
	(50635381)	(14401)	

## 6. 研究組織 (つづき)

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河井 敬久  (Kawai Toshihisa)	米国ノバ サウスウエスタン大学 歯学部・ periodontology・教授	
研究協力者	山田 智明  (Yamada Chiaki)	米国ノバ サウスウエスタン大学 歯学部・ periodontology・研究員	
研究協力者	高畑 惣介  (Takahata Sousuke)		
研究協力者	奥野 恵美  (Okuno Emi)		
研究協力者	山下 翔平  (Yamashita Shyouhei)	大学院生	