

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20612

研究課題名(和文) NKG2Dリガンド制御による歯肉癌の骨吸収抑制の可能性の検討

研究課題名(英文) Possible regulation of bone resorption in gingival cancer by NKG2D ligands

研究代表者

岩崎 良恵 (Iwasaki, Yoshie)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30750880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000 円

研究成果の概要(和文)：生理的なリモデリングの状態では、破骨細胞分化を促進するRANKLの主要な供給源は骨芽細胞・骨細胞と考えられているが、癌の場合には、骨吸収に隣接してRANKL陽性の線維芽細胞様細胞が存在していることから、歯肉癌上皮細胞のRANKL産生が促進することで著しい骨吸収を示すのではないかと考えた。検討の結果、歯肉癌上皮細胞にMICAを過剰発現させることでRANKL発現が誘導され、培養上清を破骨細胞前駆細胞に作用させることで破骨細胞の形成が促進された。

研究成果の概要(英文)：Physiologically, in bone remodeling, the source of RANKL is osteoblast and osteocyte. However, we hypothesized that RANKL expression derived from gingival epithelial carcinoma cells may be increased in gingival cancer. As a result, overexpression of MICA in gingival epithelial carcinoma cells induced RANKL expression and the supernatant of these cells promoted osteoclastogenesis.

研究分野：口腔外科学

キーワード：MICA RANKL 歯肉癌

1. 研究開始当初の背景

歯肉癌は早期に顎骨に浸潤し、骨破壊を呈する。特に顎骨内に深く浸潤した場合は放射線治療が期待できず、高線量では放射線性骨壊死といった副作用も考慮する必要がある。また、抗腫瘍薬の骨への移行が悪いことから外科的切除が基本となる。顎骨内に進展した腫瘍は直接触知できないために手術範囲の設定において、X線やCT、MRなどの画像診断により、腫瘍の骨吸収の深達度・骨吸収型・周囲軟組織への進展状況を正確に把握し、治療計画を立てる必要がある。顎歯肉癌の顎骨浸潤の深達度は手術法を選択する上で重要な要因であるが、画像診断では骨吸収の範囲しか明らかではなく、癌浸潤の最先端は把握できない。

顎歯肉癌は、顎骨への浸潤形式により手術方法が決定されるため、癌浸潤がどこまですすんでいるかを診断することは非常に重要である。病理組織学的には顎骨への浸潤様式として **erosive pattern** および **infiltrative pattern** に分類されている。**erosive pattern** では癌と骨組織の境界に線維が介在し、平滑で連続的なパターンをとり骨吸収が癌浸潤よりも先行する。一方、**infiltrative pattern** では癌と骨組織の境界線が不整かつ不連続で癌が骨梁間へ浸潤するパターンをとり、癌浸潤が骨吸収よりも先行する。病理学的には **infiltrative pattern** では **erosive pattern** よりも骨吸収が著しいため破骨細胞が多いとされてきたが、定量的解析は行われていなかった。Ishikuro らは骨形態計測法により破骨細胞数を定量し、**infiltrative pattern** のほうが **erosive pattern** より破骨細胞数が多いという特徴を見出している。**infiltrative pattern** では破骨細胞数が多いため、破骨細胞分化促進因子の発現が上昇していると考えられ、骨髄への浸潤が起こっていることから、癌細胞から産生される血行性転移に関わる因子あるいは浸潤に関与する因子の発現亢進も考えられる。しかしながら、両方の **pattern** が混在するケースも存在し、分類が困難な場合も少なくない。骨吸収および癌浸潤がどのようにして起こるか、という問題は癌細胞による攻撃あるいはそれに対する宿主細胞の免疫応答が関与しており、さまざまなサイトカインが骨吸収・癌浸潤に関わる。癌細胞では **NKG2D** リガンドが発現しており、**NKG2D** リガンドの受容体である **NKG2D** は **NK** 細胞・**T** 細胞などに発現している。癌が免疫機構を回避できる理由として考えられているのは、癌細胞が **NKG2D** リガンドを恒常的に発現していることで、**NK** 細胞・**T** 細胞における **NKG2D** の **downregulation** が引き起こされ、細胞障害活性作用が抑制されるというメカニズムである。ヒト癌細胞の **NKG2D** リガンドとして、**MHC class I chain-related protein A (MICA)**, **MICB**, **HCMV UL16-binding proteins (ULBP) 1-6** が知られており、口腔扁平上皮癌患者では血中の **MICA**, **MICB** レベルが高いことが報告されているが、

実際の **NKG2D** リガンドが歯肉上皮癌細胞において発現しているのかを検討した報告はない。一方で、**T** 細胞において **NKG2D** の活性化により炎症性サイトカインが産生されることが報告されており、炎症性サイトカインが2次的に他のサイトカインの産生を引き起こす可能性も考えられる。

生理的なリモデリングの状態では、破骨細胞分化を促進する **RANKL** の主要な供給源は骨芽細胞・骨細胞と考えられている。しかしながら、癌の場合には、Ishikuro らの報告のように、骨吸収に隣接して **RANKL** 陽性の線維芽細胞様細胞が存在していることから、歯肉癌上皮細胞の **RANKL** 産生を促進することで **infiltrative pattern** のような著しい骨吸収を示すのではないかとわれわれは推測している。

2. 研究の目的

本研究では、歯肉癌上皮細胞に **MICA** を過剰発現させることで **RANKL** 発現が誘導されるかどうかを検討した。また、**MICA** を過剰発現させた歯肉癌上皮細胞の培養上清を破骨細胞前駆細胞に作用させることで破骨細胞の形成にどのような影響を与えるか、を検討した。ヒト歯肉癌組織検体での **MICA** などの **NKG2D** リガンド発現を調べた。

3. 研究の方法

（1）組織学的観察および免疫組織化学的観察

筋を含む腱組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて 48 時間固定し、エタノール系列にて脱水後、パラフィン包埋とした。滑走式ミクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織に対し、**Hematoxylin-Eosin (H-E)** 染色を行い光学顕微鏡にて観察した。また、免疫組織化学的観察において、組織学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用し、滑走式ミクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織を使用した。腱分化に関与するとされる因子のマーカーとして、抗 **ULBP-4** 抗体、抗 **VCAM-1** 抗体、抗 **N-Cadherin** 抗体、抗 **MICA** 抗体を用いた。ヒストファイン シンプルステイン **MAXPO(G)**（ニチレイ・バイオサイエンス社製）による免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。なお、陰性対象 (**Negative control**) には、一次抗体として使用した各抗体の代替に **mouse IgG** を使用し、同様の手順で染色を行った。

（2）Western Blot 分析

細胞を氷冷 PBS で洗浄し lysis バッファー (1% Triton-X 100, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinin, 0.1 M NaF, 2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF) にて溶解した。サンプルは 20 分間氷上に置き、5 分間 4°C で 15,000 $\times$ g にて遠心した。抽出したタンパク質を 8-16% の Mini-Protean Gel TGX に SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離後、30 分間 200V でトランスブロット転写システ

ムにてミニポリフッ化ビニリデン転写膜へ転写した。非特異的結合を防ぐため膜を 5% のスキムミルクに浸した後、それぞれの抗体を用いて検出した。化学発光検出試薬として Clarity Western ECL Substrate を使用し、Chemi-Doc XRS System にて検出した。1 次抗体としてマウスポリクローナル抗 RANKL 抗体、ラビットポリクローナル抗 MICA 抗体を使用した。また、2 次抗体として、抗マウス IgG horseradish peroxidase (HRP) 標識抗体、抗ラビット IgG HRP 標識抗体、を使用した。内部標準としてマウスモノクローナル抗 β -actin 抗体を使用した。

(3) 細胞

plat E 細胞、ヒト歯肉癌上皮細胞として Ca9-22 細胞を用いた。また、マウスマクロファージ細胞として RAW264.7 細胞を用いた。

(4) 発現ベクター

遺伝子導入の確認のため、レトロウイルス発現ベクターである pMX-GFP を用いた。また、MICA のレトロウイルス用発現ベクターとして Vector Builder より human MICA [NM_000247.1]を購入した (下図)。



powered by cyagen

www.vectorbuilder.com

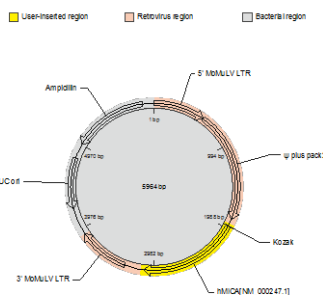
Vector Summary

Vector ID	VB160d16-1002dvw
Vector Name (official)	pMDL.V[Exp]-hMICA[NM_000247.1]
Date Created (Pacific Time)	2016-06-15
Size	5964 bp
Vector Type	3xFLAG retrovirus gene expression vector
Inserted ORF	hMICA[NM_000247.1]
Copy Number	High
Bacterial Resistance	Ampicillin
Cloning Host	Stbl3

User Annotation of Vector

Vector alias (from user)	None
Comment (from user)	None

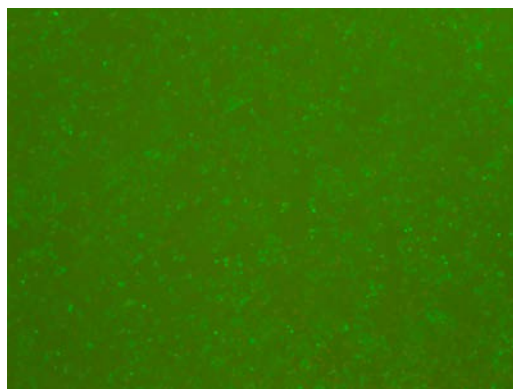
Vector Map



Page 1 of 5

Version 1.0

(5) レトロウイルス感染による遺伝子導入
plat E 細胞を 24 well plate に 6×10^4 個/well で播種し、ScreenFect A (WAKO 社)を用いて、レトロウイルス発現ベクターである pMX-GFP 並びに human MICA [NM_000247.1] を plat E 細胞に遺伝子導入した。pMX-GFP が導入されたかどうかの確認は蛍光顕微鏡にて行った (下図)。



次に、plat E 細胞の培養上清にウイルス粒子が含まれているため、遠心により濃縮し、ポリブレン溶液を混合してフィルター滅菌を行い、これをあらかじめ 6 well plate に播種した Ca9-22 細胞に添加し、3 日間培養を行った。

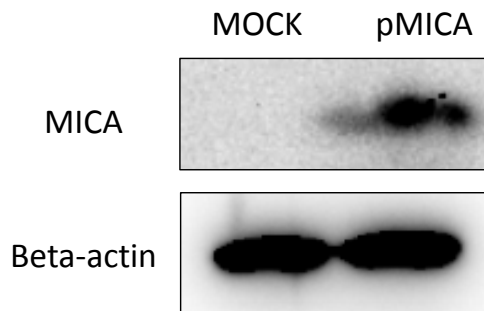
(6) 破骨細胞培養および TRAP 染色

マウス破骨細胞は RAW264.7 細胞に 100ng/ml の RANKL (Oriental Yeast 社)を加えて培養した。MICA を強制発現させた Ca9-22 細胞の培養上清をあらかじめ採取しておき、RANKL を添加した際に同時に添加した。5 日間の培養後、10% ホルマリンで 5 分間固定し、エタノールおよびアセトン (容量 50:50) にて 1 分間再固定した。破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) を検出するために、naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich 社) と fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich 社) を添加した 50mM の酒石酸含有緩衝液にて室温で染色 (TRAP 染色) した。3 核以上の TRAP 陽性細胞を pOCLs として計算した。

4. 研究成果

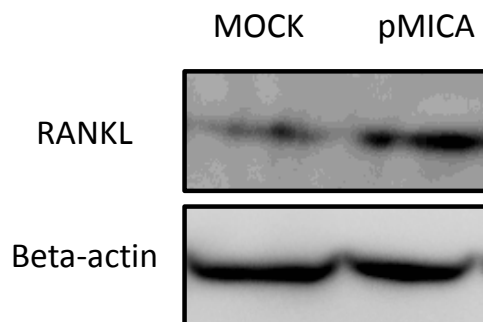
(1) 歯肉癌上皮細胞における RANKL 発現の解析

歯肉癌上皮細胞 Ca9-22 細胞に MICA を過剰発現させた。タンパク質発現を確認した (下図)。MOCK はコントロールで pMICA は human MICA [NM_000247.1]のベクターを発現させたものである。結果は、MICA を過剰発現させた Ca9-22 細胞では MICA タンパク質の上昇を認めた。



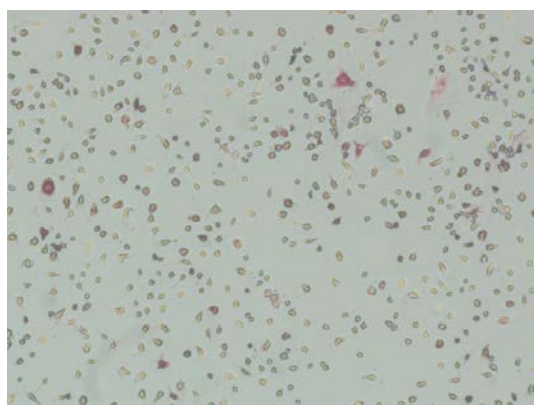
次に、MICA を過剰発現させた Ca9-22 細胞における RANKL 発現の誘導を検討した。その結果、MICA を過剰発現させた Ca9-22 細胞

では RANKL 発現が上昇していた（下図）。

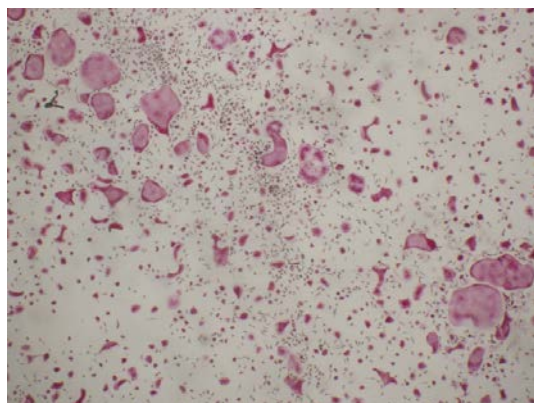


（２）歯肉癌上皮細胞による破骨細胞形成の検討

次に、MICA を過剰発現させた Ca9-22 細胞の培養上清をマウスマクロファージ細胞 RAW264.7 細胞に添加して破骨細胞形成を TRAP 染色で調べた。その結果、コントロールを遺伝子導入した Ca9-22 細胞の培養上清である MOCK 上清ではほとんど破骨細胞形成が認められなかったが、pMICA を遺伝子導入した Ca9-22 細胞の培養上清である pMICA 上清では破骨細胞形成が促進された（下図）。



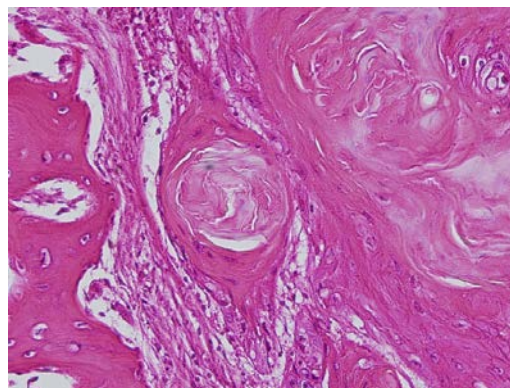
MOCK上清



pMICA上清

（３）ヒト歯肉癌組織における発現分子の解析

まず、HE 染色により組織学観察を行った（下図）。

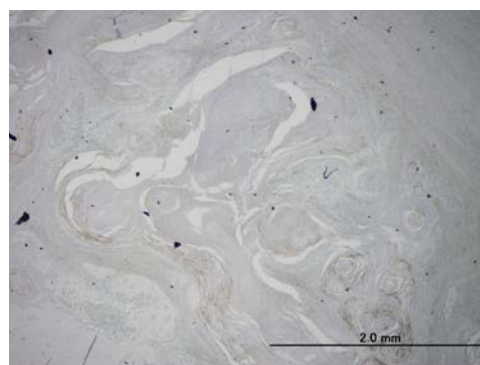


HE染色

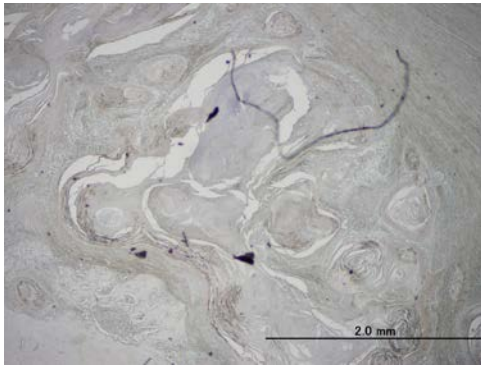
次に、natural killer 細胞に発現する NKG2D 受容体のリガンドである MICA、カドヘリンファミリーである N- Cadherin、接着因子である VCAM-1、ULBP-4 について免疫染色による観察を行った。その結果、全ての検体において MICA が強陽性であることが示された（下図）。



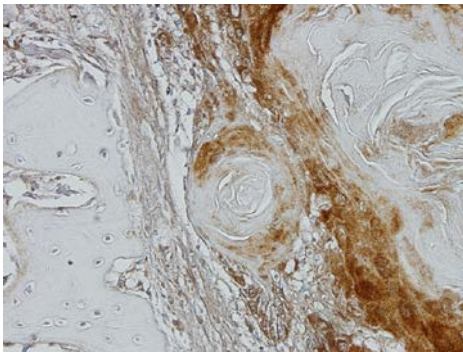
免疫染色 抗N-cadherin抗体



免疫染色 抗VCAM-1抗体



免疫染色 抗ULBP4抗体



免疫染色 抗MICA抗体

これらの結果から歯肉癌組織においては、**MICA** の発現が認められ、歯肉癌上皮細胞の産生する **RANKL** は破骨細胞形成を促進することが示された。歯肉癌上皮細胞自身が骨吸収を促進する可能性があり、**MICA** をターゲットとした治療薬の開発への可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩崎 良恵 (IWASAKI, Yoshie)

埼玉医科大学・医学部・助教

研究者番号：30750880