

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11836

研究課題名(和文) Semaphorin 4Dが口腔癌骨浸潤に果たす役割とその発現制御機構

研究課題名(英文) Role and regulatory mechanisms of Semaphorin 4D in bone invasion of oral cancer.

研究代表者

伊原木 聡一郎 (Ibaragi, Soichiro)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80549866

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)：骨微小環境において、破骨細胞が軸索ガイダンス因子Semaphorin4D (Sema4D)を分泌し、骨形成を抑制することが報告された。またSema4Dは癌細胞でも発現を認め、腫瘍増殖に関与する。本研究では、口腔癌の骨浸潤におけるSema4Dの役割を検討した。口腔癌細胞の産生するSema4Dはオートクライン的に作用し細胞活性を亢進させた。またSema4Dは骨芽細胞のRANKL発現を上昇させ破骨細胞形成を促進し骨浸潤を促進していた。また破壊された骨組織から遊離されたIGF-1は口腔癌細胞のSema4D発現を増加させ、さらに腫瘍増殖と骨浸潤を促進する負の因子であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、口腔癌細胞の産生するSema4Dが口腔癌細胞の増殖と破骨細胞形成を促進し、骨浸潤を促進していることを明らかにした。さらに口腔癌細胞のSema4D発現を制御しているのは、破壊された骨組織から遊離されたIGF-1であることを突き止めた。本研究を進展させ抗Sema4D療法が臨床応用できれば、癌細胞および破骨細胞の両方を標的とした新規治療法の候補となると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the bone microenvironment, axon guidance molecule Semaphorin 4D (Sema4D) that was secreted by osteoclasts, suppressed bone formation. Sema4D was also identified in many cancer cells and plays a role in tumor growth. This research demonstrated the role of Sema4D in bone invasion of oral cancer.

Sema4D that was produced by oral cancer cells, increased cancer cell activity in an autocrine manner. Sema4D also regulated the expression of RANKL in osteoblasts, and which stimulated osteoclastogenesis and bone invasion of oral cancer cells. IGF-1 that was released from destructured bone tissue, regulated Sema4D expression and increased further tumor growth and bone invasion.

研究分野：口腔外科

キーワード：Semaphorin 4D 口腔癌骨浸潤

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、舌、歯肉歯槽粘膜、口底、硬口蓋、頬粘膜などの顎口腔領域に発生する悪性腫瘍で、その解剖学的特徴から周囲組織である顎骨にしばしば浸潤する。口腔癌の顎骨浸潤は、患者の予後に負の影響を及ぼす因子であり、それを制御することは重要な課題である。

癌の骨浸潤において、骨破壊の中心的な役割を担うのは破骨細胞である。癌細胞は骨組織に到達した際、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (Parathyroid hormone-related protein, PTHrP) などのサイトカインを放出し、骨芽細胞、骨細胞、骨髄間質細胞 (以下、骨芽細胞) に作用する。骨芽細胞は Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (以下 RANKL) 産生を高め、破骨細胞前駆細胞上に存在する RANKL の受容体である RANK と結合することにより破骨細胞形成を促進し骨破壊を促す。破壊された骨組織からは、Insulin-like growth factor-I (以下 IGF-I) などの増殖因子が遊離される。IGF-I が癌細胞表面の受容体 (IGF-IR) に結合すると、PI3K-AKT-mTOR, Ras-Raf-MEK-MAPK, などの細胞内シグナル伝達因子が活性化し、癌細胞の増殖を促進させる。このように骨微小環境においては、破骨細胞の骨破壊と癌細胞の増殖が繰り返される悪循環が起こっており、その悪循環を停止させる治療法の開発が望まれる。

Semaphorin 4D (Sema4D) は神経膠細胞から産生され、受容体 PlexinB1 を介して神経軸索の伸長方向を制御するガイダンス因子であり、中枢神経系に発現している。Semaphorin は、Sema ドメインと呼ばれる領域を保有する蛋白で、現在までに 25 種類のメンバーが同定されている。近年、中枢神経系にのみ発現していると考えられていた Semaphorin は、消化器系、免疫系、呼吸器系などの非神経系にも広く存在することが明らかになった。中でも Sema4D は T 細胞に高発現し、免疫系に必須の分子である。

最近、Sema4D は骨代謝にも関与することが明らかになった。骨微小環境においては、破骨細胞における Sema4D 発現と、骨芽細胞の PlexinB1 発現が確認されている。破骨細胞が Sema4D を発現し、骨芽細胞上の PlexinB1 と結合することで、骨芽細胞の分化シグナルである IGF-I シグナルを抑制し、骨形成を抑制することが報告された。

一方、Sema4D が破骨細胞に与える影響については全く分かっていない。研究開始までに申請者は、Sema4D が破骨細胞形成を促進する、ことを予備的実験で確認していた。しかし、その機序は不明であった。破骨細胞の PlexinB1 発現は確認されておらず、Sema4D が骨芽細胞に作用し RANKL 発現を高め、間接的に破骨細胞形成を促進していると予想していた。

また正常組織だけではなく、腫瘍組織においても Sema4D は発現を認め、乳癌、前立腺癌、肺癌に高発現している。Sema4D は癌細胞に直接作用し、乳癌細胞においては局所浸潤と肺転移を促進する。Sema4D の発現制御機構は不明である。

研究開始までに申請者は、口腔癌の骨浸潤部に Sema4D が高発現していること、また骨微小環境に豊富に存在する IGF-I が口腔癌細胞の Sema4D 発現を上昇させる、ことを予備的実験で確認していた。

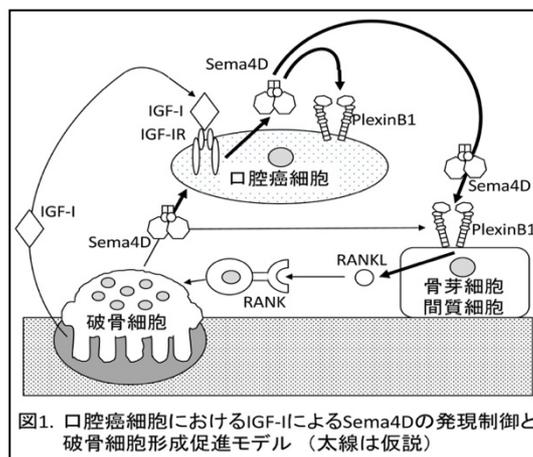


図1. 口腔癌細胞におけるIGF-IIによるSema4Dの発現制御と破骨細胞形成促進モデル (太線は仮説)

2. 研究の目的

- (1) 骨微小環境において口腔癌細胞が産生する Sema4D は骨破壊を促進しているか
 - (2) Sema4D-PlexinB1 系の阻害によって口腔癌の骨浸潤を制御できるか
- 以上の2点について申請期間中に、以下の方法でその解明を行った。

3. 研究の方法

- (1) Sema4D が破骨細胞と口腔癌細胞に与える影響の解析

平成 29 年度は、Sema4D が破骨細胞形成に与える影響の解析を行った。C57BL/6J マウス大腿骨から骨髄細胞を回収し、Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) および RANKL と Sema4D を添加し培養後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行い、破骨細胞数を計測した。破骨細胞の誘導系に RANKL のデコイ受容体 Osteoprotegerin (OPG) を添加し破骨細胞形成を抑制できるか調べた。頭蓋冠から単離した初代培養骨芽細胞を Sema4D で刺激し RANKL 発現を Real time RT-PCR と Western blot 法で調べた。破骨細胞の骨吸収能は

Pit formation assay を行い、吸収窩の面積を ImageJ で計測した。

平成 30 年度は、Sema4D が口腔癌細胞に与える影響の解析を行った。各種口腔癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS) を用いて、Sema4D 存在下と非存在下で培養し解析を行う。細胞増殖能を MTS assay, 遊走能を Migration assay, 浸潤能を Invasion assay で検討した。Sema4D, PlexinB1 発現は Western blot 法を用いて調べた。

平成 31 年度は、口腔癌細胞の Sema4D 発現制御機構を明らかにする事を目的とした。IGF-I が口腔癌細胞 HSC-2 の Sema4D 発現を上昇させることを確認した。IGF-IR 選択的阻害剤, ERK 阻害剤, Akt 阻害剤を用いて、IGF-IR 下流のシグナル伝達因子を阻害した。

(2) Sema4D が口腔癌骨浸潤に与える影響の解析

平成 29 年度は、ヌードマウス可移植性ヒト口腔扁平上皮癌の骨浸潤モデルの作製を行った。BALB/C 系 nu/nu ヌードマウスの脛骨骨幹端傍骨膜に HSC-2 細胞を移植し、口腔癌骨浸潤動物モデルを確立した。移植後は連日、腫瘍径を計測した。移植 4 週間後にマウスを屠殺し、脛骨および腫瘍を 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定後、10%EDTA で脱灰し、パラフィン包埋組織切片を作製し骨浸潤を評価した。浸潤面積を ImageJ で計測した。

平成 30 年度は、口腔癌細胞の Sema4D および PlexinB1 発現を抑制し、骨浸潤の抑制効果を調べた。Sema4D および PlexinB1 発現の抑制には、Sema4D shRNA, PlexinB1 shRNA を用いた。

平成 31 年度は、骨浸潤部の病理組織学的検討を行った。骨浸潤部における Sema4D および PlexinB1, IGF-I, IGF-IR, Ki-67, CD31 発現を免疫組織化学的に評価した。TRAP 染色を行い、骨吸収面あたりの破骨細胞数を計測した。

4. 研究成果

(1) 臨床献体における Sema4D, PlexinB1, IGF-I, IGF-IR の発現について

Sema4D は骨浸潤を伴う口腔癌において高発現していた。また Sema4D の発現は IGF-I と有意に関連していた。

(2) 口腔癌細胞における Sema4D, PlexinB1 の発現について

HSC-2, HSC-3, SAS 細胞における Sema4D, PlexinB1 の発現について Western blot 法により検討した。HSC-2, HSC-3, SAS 細胞は、すべて Sema4D および PlexinB1 を高発現していた。骨組織中に豊富に含有される成長因子 IGF-I が、HSC-2, SAS 細胞の Sema4D および PlexinB1 発現に与える影響について検討した。IGF-I 添加により Sema4D の発現は増加した。IGF-IR 阻害薬, ERK 阻害薬, Akt 阻害薬を作用させると、IGF-I 添加により上昇した Sema4D 発現は抑制された。PlexinB1 発現は、IGF-I 添加により発現の変化なかった。Sema4D 発現は IGF-IR 下流の ERK, Akt で制御されていると考えられた。

(3) Sema4D が HSC-2, SAS 細胞の細胞活性に与える影響について

細胞増殖能を MTS assay, 遊走能を Migration assay, 浸潤能を Invasion assay で検討した。MTS assay では、Sema4D 添加により細胞増殖の促進を認めた。Migration assay では、Sema4D 添加により細胞遊走能の促進を認めた。Invasion assay においても、Sema4D 添加により濃度依存的に細胞浸潤能の促進を認めた。

(4) Sema4D が破骨細胞形成と骨吸収能に与える影響について

マウス骨髄細胞から破骨細胞を分化させ、破骨細胞形成は Osteoclast formation assay, 骨吸収能は Pit formation assay で、それぞれ検討した。Sema4D 添加によって TRAP 陽性多核破骨細胞数の増加と吸収窩面積の増加を認めた。PlexinB1 は骨芽細胞に発現していることが明らかになっている。Sema4D の破骨細胞形成と骨吸収能の亢進は、骨芽細胞の PlexinB1 を介したものであると仮説を立てた。この仮説を検証するため Sema4D が ST-2 細胞およびの初代培養骨芽細胞の RANKL 発現に与える影響を検討した。Sema4D 添加により、RANKL 発現の上昇を認めた。Sema4D による破骨細胞形成における RANKL の役割を検証するため、RANKL を除去した Osteoclast formation assay に OPG を添加した。Sema4D は破骨細胞形成を促進したが、OPG は減少させた。Sema4D は骨芽細胞の RANKL 発現を上昇させていると考えられた。

(5) Sema4D ノックダウンがマウス骨浸潤モデルに与える影響について

shRNA を用いて HSC-2 細胞の Sema4D をノックダウンした。ヌードマウスの脛骨骨幹端傍骨膜に shRNA を導入した HSC-2 細胞を移植し、口腔癌骨浸潤動物モデルを確立した。この動物モデルを使用して Sema4D ノックダウンの効果を検討した。Sema4D をノックダウンした HSC-2 細胞の動

物モデルにおける腫瘍増殖は抑制された。

骨浸潤部における Sema4D および PlexinB1, IGF-I, IGF-IR, Ki-67, CD31 発現を免疫組織化学的に評価した。HSC-2 細胞における Sema4D 発現の低下および Ki-67 陽性細胞率の低下, CD31 陽性血管の減少を認めた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, Kuwajima D, Kodama S, Nishioka T, Okui T, Obata K, Takabatake K, Kawai H, Ono K, Okamoto K, Nagatsuka H, Sasaki A.	4. 巻 54
2. 論文標題 Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 283-294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2018.4631.	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 該当する

1. 著者名 Takada H, Ibaragi S, Eguchi T, Okui T, Obata K, Masui M, Morisawa A, Takabatake K, Kawai H, Yoshioka N, Hassan NMM, Shimo T, Hu GF, Nagatsuka H, Sasaki A.	4. 巻 51
2. 論文標題 Semaphorin 4D promotes bone invasion in head and neck squamous cell carcinoma.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International journal of oncology	6. 最初と最後の頁 625-632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2017.4050	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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	佐々木 朗 (Sasaki Akira) (00170663)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	