

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10137

研究課題名（和文）新規破骨細胞形成促進因子Angiogeninが口腔癌骨浸潤に果たす役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of the novel osteoclast formation promoting factor Angiogenin in oral cancer bone invasion

研究代表者

伊原木 聡一郎（Ibaragi, Soichiro）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：80549866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：血管新生因子Angiogenin(ANG)は様々な癌細胞から産生され、血管内皮細胞表面の受容体PlexinB2を介して血管新生を促進する。最近我々は、口腔癌の骨浸潤部にANGが高発現していること、ANGが破骨細胞形成を促進することを確認した。これらの知見より生じる疑問である、骨微小環境において口腔癌細胞が産生するANGは、破骨細胞形成を促進し、顎骨破壊を促進しているかという点について、口腔癌骨浸潤動物モデルを用いてその解明を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で骨破壊におけるANGの機能を解析することによって、今まで未知であった骨代謝疾患の原因が見つかるかもしれない。また骨粗鬆症の治療法や乳癌や前立腺癌の骨転移の制御へ応用できる。ANG受容体であるPlexinB2は神経軸索ガイダンス因子Semaphorinの受容体でもある。骨微小環境における血管新生と神経新生のクロストークの一部をANGが担っていると考えられ、新たな学術的潮流を作り出せる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Angiogenin (ANG), an angiogenic factor, is produced by various cancer cells and promotes angiogenesis via the receptor Plexin B2 on the surface of vascular endothelial cells. We recently confirmed that ANG is highly expressed in bone invasion areas of oral cancer and that ANG promotes osteoclast formation. The question that arises from these findings is whether ANG produced by oral cancer cells in the bone microenvironment promotes osteoclast formation and jaw bone destruction. We aim to elucidate this using an oral cancer bone invasion animal model.

研究分野：口腔外科

キーワード：Angiogenin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、その解剖学的特徴から周囲組織の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 (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 (RANKL) 産生を高め、破骨細胞前駆細胞上に存在する RANKL 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増殖因子が遊離され、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。

Angiogenin (ANG) は HT-29 ヒト大腸癌細胞株の培養上清から単離された血管新生因子である。ANG の発現は、乳癌、子宮頸癌、胃癌、肝癌、腎癌、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、膀胱癌において亢進している。癌細胞の産生する ANG は、血管内皮細胞に作用し腫瘍血管新生に重要な役割を果たす。ANG は血管内皮細胞表面の受容体に結合すると、シグナル伝達因子 ERK と Akt を活性化させると同時に、ANG 自体も直接核に移行する。核内の ANG は核小体に集積し、リボソーム DNA のプロモーター領域に結合し、rRNA の転写を促進し血管内皮細胞の増殖を促進する。我々は癌細胞の産生する ANG はオートクライン的に作用し、癌細胞の rRNA 転写も促進させ、直接的に、癌細胞の増殖を促進することを明らかにした (Ibaragi et al., 2009, *Clin Cancer Res* 15, 1981-8; Ibaragi et al., 2009, *Mol Cancer Res* 7, 415-24)。

1985 年に ANG が発見されて以降、その受容体の構造は長年不明であった。最近、ANG 受容体が PlexinB2 であると同定された (Yu et al., 2017, *Cell* 171, 849-864)。同定したのは研究代表者が留学していた米国 Harvard 大学医学部病理学講座 Prof. Hu, Guo-fu の研究室 (現 Tufts 大学) である。PlexinB2 は神経軸索ガイダンス因子 Semaphorin の受容体でもある。受容体が同定されたことで、停滞していた ANG の機能解析が今後大きく進むと考えられる。我々は、口腔癌の骨浸潤部に ANG が高発現していることを確認した。また ANG が破骨細胞形成を促進することを予備的な実験で確認していた。

これらの知見より生じる疑問は、(1) 口腔癌細胞の産生する ANG は、破骨細胞形成を促進し、顎骨破壊を促進しているか、(2) ANG-PlexinB2 系を阻害することで口腔癌の骨浸潤を制御できるか、という 2 点である。申請期間中にその解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下のとおりである。

1. ANG が破骨細胞形成および口腔癌細胞に与える影響を明らかにする。
2. ANG-PlexinB2 系の阻害が口腔癌骨浸潤動物モデルに与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(目的 1) ANG が破骨細胞形成および口腔癌細胞に与える影響の解析

ANG が破骨細胞形成に与える影響の解析を行った。マウス大腿骨から骨髄細胞を回収し、Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) と ANG を添加し培養後、TRAP 染色を行い、破骨細胞数を計測した。

野生型および ANG KO マウスから、それぞれ採取した頭蓋骨由来骨芽細胞と脾臓由来破骨細胞

前駆細胞の共存培養を行った。破骨細胞前駆細胞における ANG 遺伝子の欠損が破骨細胞形成に与える影響を検討した。また野生型および KO マウスの脾臓から単離した初代培養破骨細胞前駆細胞を ANG で刺激し RANK 発現を調べた。

破骨細胞前駆細胞の PlexinB2 発現をノックダウンし、破骨細胞数が減少するか検討した。破骨細胞の骨吸収能は Pit formation assay で評価した。

ANG が口腔癌細胞に与える影響の解析を行った。口腔癌細胞の ANG および PlexinB2 発現を調べた。口腔癌細胞を ANG 存在下と非存在下で培養し増殖能と浸潤能の解析を行った。

(目的2) ANG-PlexinB2 系の阻害が口腔癌骨浸潤動物モデルに与える影響の解析

BALB/C 系 nu/nu ノードマウスの大腿骨骨髓腔内に口腔癌細胞を移植し、口腔癌骨浸潤動物モデルを確立した。各種口腔癌細胞株を移植し、浸潤面積を計測し骨浸潤を評価した。口腔癌細胞の ANG 発現を抑制し、骨浸潤の抑制効果を調べた。ANG および PlexinB2 発現をノックダウンした。骨浸潤部における ANG および PlexinB2, RANK 発現を免疫組織化学的に評価した。

4. 研究成果

口腔癌骨破壊動物モデルにおいて ANG の発現抑制が腫瘍増殖に与える影響を検討した。対照群では腫瘍増殖の著明な増大を認め、TRAP 染色で腫瘍周囲の骨面に沿って多数の破骨細胞形成と骨吸収窩の形成が認められた。一方、ANG 発現をノックダウンした口腔癌細胞を移植した群では腫瘍増殖が抑制され、TRAP 染色で破骨細胞形成も抑制されていた。また骨破壊面積を解析した結果、ANG 発現を抑制すると、骨破壊面積の有意な減少が認められた。

口腔癌細胞株の ANG 発現をノックダウンすると、口腔癌細胞の増殖も抑制された。

マウス大腿骨骨髓細胞における破骨細胞形成系に対する ANG の影響を検討した結果、ANG は濃度依存的に破骨細胞形成を促進した。また ANG は濃度依存的に骨吸収活性も促進した。マウス大腿骨骨髓細胞の ANG 発現をノックダウンすると、破骨細胞形成も抑制された。

また野生型および ANG KO マウスから、それぞれ採取した頭蓋骨由来骨芽細胞と脾臓由来破骨細胞前駆細胞の共存培養を行ったところ、脾臓由来破骨細胞前駆細胞における ANG 遺伝子の欠損は破骨細胞形成を阻害した。ANG が破骨細胞前駆細胞の RANK 発現を上昇させ、破骨細胞形成を誘導していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yang H, Yuan L, Ibaragi S, Li S, Shapiro R, Vanli N, Goncalves KA, Yu W, Kishikawa H, Jiang Y, Hu AJ, Jay D, Cochran B, Holland EC, Hu GF.	4. 巻 127
2. 論文標題 Angiogenin and plexin-B2 axis promotes glioblastoma progression by enhancing invasion, vascular association, proliferation and survival	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 British journal of cancer	6. 最初と最後の頁 422-435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-01814-6	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 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・特命教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Tufts University		