

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18716

研究課題名（和文）IGFBPsによる骨微小環境調節機構の解明と新規骨吸収性疾患治療への応用

研究課題名（英文）The elucidation of the bone microenvironment regulatory mechanism by IGFBPs and application to new treatment of bone-resorption disease

研究代表者

伊藤 良平（Ito, Ryohei）

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20638902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：骨関連細胞（骨芽細胞、破骨細胞）単独培養によるIGFBPsの発現解析では、ALPに代表される骨代謝活性因子の変化と同期し、IGFBP1～6が時間差で発現し骨微小環境内の濃度が変化し、骨形成の開始から収束までを制御するような挙動を示し、骨代謝制御をIGFBPsが担っている可能性が示唆された。次に口腔癌症例を対象として空間的遺伝子発現解析とクラスター解析により3次元的な骨代謝遺伝子発現を解析した。その結果、癌細胞と癌関連線維芽細胞、筋線維芽細胞のシグナルネットワークが増強され、癌浸潤層では相互作用を強め骨関連細胞の遺伝子発現に作用していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により骨微小環境はIGFBPsを調節することにより骨吸収性疾患と癌の骨浸潤・骨転移に関与する可能性が示唆された。さらに、癌の骨浸潤・骨転移には骨微小環境と癌微小環境という2つの微小環境の相互作用が影響していると考えられた。このことから、骨/癌微小環境を標的とした癌の骨浸潤・骨転移の新規治療法につなげていくことも可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：By the expression of IGFBPs analysis of bone associated cells, IGFBP1 - 6 developed with time lag, and concentrations changed in the bone microenvironment, in sync with the change of the bone metabolism activity factor represented by ALP. IGFBPs behaved that controlled convergence from ossiferous initiation, and the possibility that IGFBPs would control bone metabolism was suggested.

As a result, a cancer cell and cancer-related fibroblasts, a signal network of the myofibroblast were reinforced, and it was suggested interactions were strengthened in the carcinomatous infiltration layer, and to act for the gene expression of bone association cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：骨代謝 骨微小環境 癌微小環境 骨浸潤 骨吸収 空間的遺伝子発現解析

## 1. 研究開始当初の背景

骨代謝制御機構の破綻は、骨粗鬆症や歯槽骨萎縮による歯の喪失などの骨吸収性疾患へと繋がる。これらの疾患は健康寿命を短縮し、超高齢社会となった本邦では深刻な問題である。しかし、現在の骨吸収性疾患の治療は選択肢が少なく、効果も限定的であり新しい骨吸収性疾患の治療法や骨再生療法の開発が必要である。

我々は骨代謝が骨形成と骨吸収のどちらに進むかを決定するのは、骨微小環境の変化であると仮説を立て、研究を進めてきた。その過程で骨形成シグナルとして重要なインスリン様成長因子 (Insulin-like Growth Factor, IGF) に結合する蛋白である IGFBPs が骨代謝制御に深く関わることが示唆された。IGFBPs は、IGFBP1~6 のサブタイプがあり、機能が未解明だが、1~6 のサブタイプがそれぞれ IGF とは独立して骨代謝制御に深く関わると考えられている。そこで 2 つの仮説を立て研究計画を立案した。IGFBPs は骨微小環境を調節することで骨代謝を制御しているのではないかと IGFBPs の機能を解明することで新たな骨吸収性疾患治療の開発に繋がるのではないかと 2 つの仮説を立てた。

骨代謝制御においても骨微小環境が重要と考え、骨周囲細胞である線維芽細胞の骨代謝への関与を研究する過程で、個々の骨構成細胞ではなく、骨微小環境全体を調節する因子の究明は、新たな視点の骨代謝研究になり得るとの考えに至った。さらに、本研究の中心となる IGFBPs は、骨形成シグナルの IGF に高い親和性を有するが、IGF とは独立した多様な機能をもつことが明らかになってきているが、いまだ機能が不明な点が多い。しかし、申請者の先行実験の結果から、IGFBPs による骨微小環境の調節機構が存在する可能性は、非常に高いと考えられ、IGFBPs の骨代謝調節機序の解明することは骨吸収性疾患治療の展開に繋がると考える。

また、骨粗鬆症などの骨吸収性疾患の治療や、歯槽骨萎縮症などに対する骨再生療法においても、従来の治療のターゲットは破骨/骨芽細胞などの骨構成細胞であり、その治療選択肢は少ない。しかし、本研究により、IGFBPs による骨微小環境をターゲットとした骨吸収性疾患の革新的治療法と骨再生療法につながることを期待される。加えて、骨代謝の制御は癌の骨転移の抑制に応用されており、さらに骨代謝系と免疫系の密接な相互作用は骨免疫学として新たな学術分野として発展している。本研究による新たな骨代謝制御機構の解明は、癌研究・免疫学にも新たな展開をもたらすと考えられる。

## 2. 研究の目的

骨代謝で起こる現象を骨構成細胞 (骨芽細胞・破骨細胞・骨細胞) だけで説明することは不可能である。骨構成細胞と骨周囲細胞を包括した骨微小環境が骨代謝の方向性を決定する因子であると仮説を立てた。特に、骨周囲細胞として間質を形成する線維芽細胞が骨微小環境に強い影響を与え、骨代謝制御に関与していると考えられる。本研究の目的は、IGFBPs の骨微小環境調節機構を解明し、IGFBPs を応用し骨微小環境をターゲットとした新しい骨吸収性疾患および癌の骨浸潤・骨転移の治療法を見いだすことである。

## 3. 研究の方法

### IGFBPs の 6 つのサブタイプの骨代謝におけるそれぞれの機能分析

先行研究で IGFBP3,5,6 は骨形成を促進し、IGFBP1,2,4 は骨形成を抑制する可能性が示唆されている。これをもとに単独培養した骨芽細胞、破骨細胞にそれぞれリコンビナント IGFBP を添加しそれぞれのサブタイプで骨構成細胞の骨代謝活性の変化を検討する。骨代謝活性の変化は、ALP 染色、Alizarin Red 染色、TRAP 染色を行い、吸光度測定により検討する。また、特に大きな変化を誘導した IGFBP サブタイプを添加した試料から RNA を抽出し、real time PCR、Microarray で主要な骨代謝関連シグナル系 (BMP、WNT、IGF、RANK 等) の変化を検討し、IGFBPs の骨代謝制御機序を解明する。

### 骨芽細胞、破骨細胞、線維芽細胞の 3 種の細胞を用いた非接触共培養

共培養は 3 種のうち 2 種の 3 通りと、3 種とも共培養する計 4 通りで行う。半透膜トランスウェル (cell culture insert, BD 社) を用いて非接触共培養し、前項 1. で特に重要と考えられた IGFBP サブタイプのリコンビナント蛋白を添加する。real time PCR、Western blot、ELISA で前項 1. で同定した骨代謝シグナルに関わる分泌型シグナルを中心に分析する。骨代謝活性の変化を、ALP、Alizarin Red、TRAP 染色し、吸光度測定する。共培養時と単独培養時の IGFBPs による反応の違いを分析し、骨微小環境への IGFBPs の影響を明らかにする。

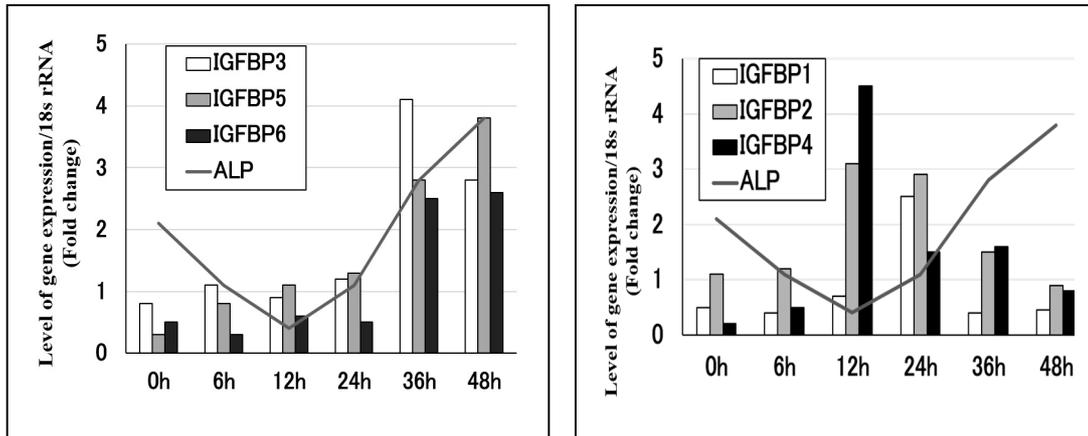
### 骨構成細胞の 3 次元培養による骨微小環境の再現と分析

骨微小環境では各種細胞の分泌型シグナルだけでなく、ギャップ結合などの細胞間接着を介した直接的シグナルも存在すると考えられるため、同様の試験を 3 次元共培養し分析する。複数の細胞種が混在するため、分析はフローサイトメーターで解析し、非接触共培養での反応と比較する。以上の結果から、IGFBPs の骨微小環境への影響を明らかにし、骨微小環境での骨代謝に特に重要な IGFBP サブタイプを同定、その骨代謝調節機序を解明する。

#### 4. 研究成果

IGFBPs の 6 つのサブタイプの骨代謝におけるそれぞれの機能分析を行った。先行研究で IGFBP3,5,6 は骨形成を促進し、IGFBP1,2,4 は骨形成を抑制する可能性が示唆されている。これをもとにシリコンチャンバー上で培養した骨芽細胞に力学的伸展刺激を加えて骨代謝活性の変化を検討した。骨代謝活性の変化は、ALP 染色、Alizarin Red 染色、TRAP 染色を行い、吸光度測定により検討した。また、特に大きな変化を誘導した IGFBP サブタイプを添加した試料から RNA を抽出し、real time PCR、Microarray で主要な骨代謝関連シグナル系 (BMP、WNT、IGF、RANK 等) の変化を検討し、IGFBPs の発現と骨代謝制御機序を解析した。

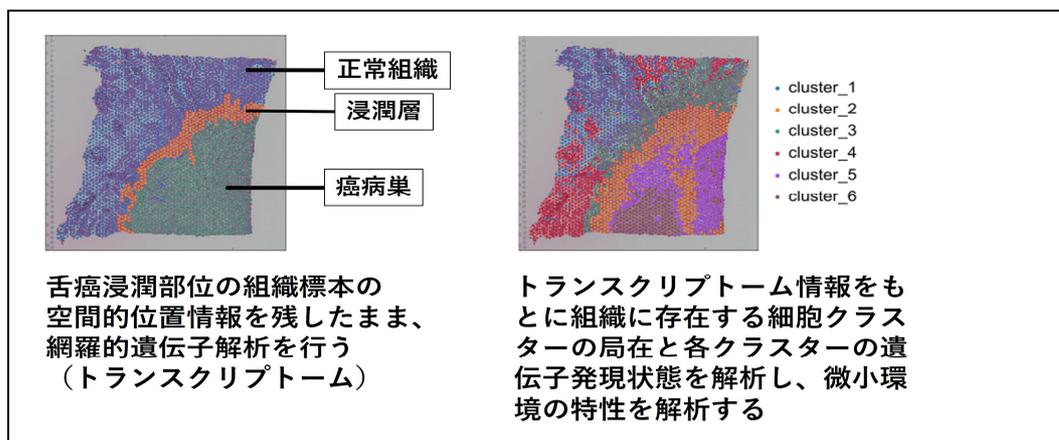
骨芽細胞への力学的負荷により誘導される骨代謝活性の変化と同期し、IGFBP1~6 が時間差で発現し微小環境内の濃度が変化し、骨形成の開始から収束までを制御するような挙動を示し、骨代謝制御を IGFBPs が担っている可能性が示唆された。



骨形成を促進するとされる IGFBP3,5,6 は ALP の上昇と同期するように発現が亢進し、骨形成を抑制するとされる IGFBP1,2,4 は ALP の上昇よりも先に発現が亢進していた。このことから IGFBPs は骨代謝の制御に関与することが示唆された。

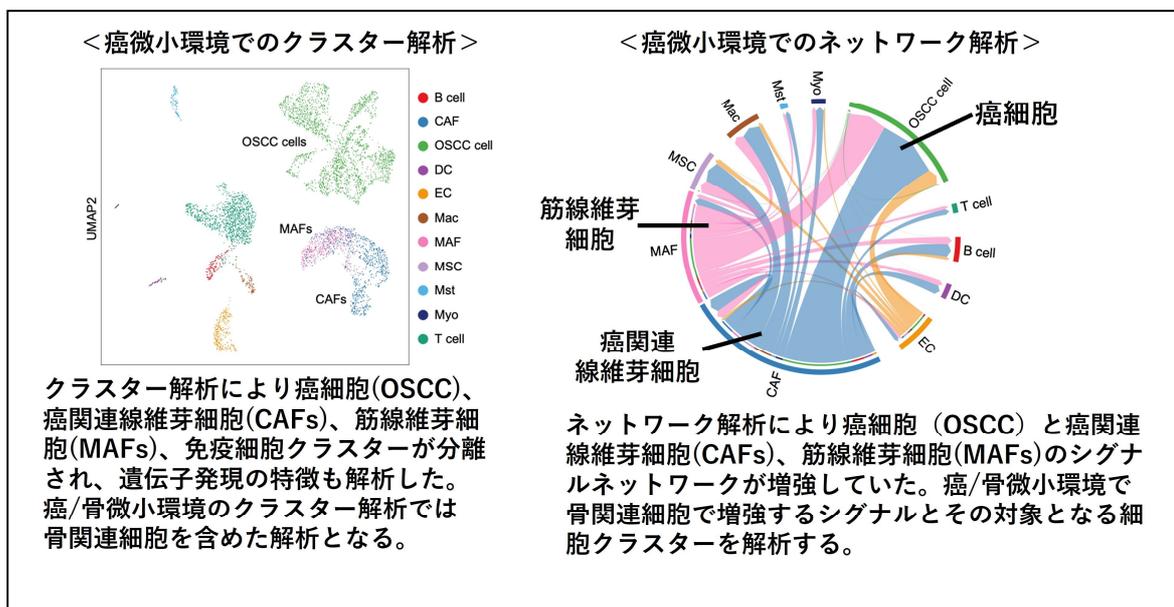
次に、骨構成細胞を 3 次元的共培養およびノックアウトマウスにより生体に近い骨代謝環境での分析を進める予定だったが、培養や遺伝子抽出に関する技術的な困難があり、当初の予定通りに進まなかった。細胞の抽出過程でも特定の細胞のみを抽出する際に十分な正確性を確保できない可能性があるため、異なる手法を検討する必要が生じた。そこで新たな解析手法として空間的遺伝子発現解析 (包括的パイオインフォマティクス解析) を取り入れて空間的、3 次元的な骨代謝遺伝子発現を IGFBPs を中心に解析する方針とした。これにより実際の生体内で癌病変と顎骨が近接し容易に骨浸潤が起こるといふ、特殊な条件を有する口腔癌を対象に癌/骨微小環境の相互作用を直接解明することとした。

当院倫理委員会承認のもと、実際の口腔癌症例数例を対象として、空間的遺伝子発現解析をおこなった。空間遺伝子解析で得られた網羅的、空間位置的な遺伝子情報をもとに癌細胞群、骨関連細胞群、間質細胞群のクラスター解析と、遺伝子間のネットワーク解析を行い、癌の骨浸潤層における癌/骨微小環境の特性、核心となるシグナルカスケードを解析した。



口腔癌浸潤層における空間的位置情報を残したまま網羅的遺伝子解析を施行 (トランスクリプトーム) し、その情報をもとに組織に存在する細胞クラスターの局在と各クラスターの遺伝子

発現状態を解析し微小環境の特性を解析した。空間的遺伝子発現解析、クラスター解析により癌細胞と癌関連線維芽細胞、筋線維芽細胞のシグナルネットワークが増強され、癌浸潤層では相互作用を強め骨関連細胞の遺伝子発現にも作用していることが示唆された。



以上の結果から、癌の骨浸潤・骨転移を制御する癌/骨微小環境という未解明な微小環境存在するという知見を得た。骨微小環境と癌微小環境の相互作用は学術的にほとんど研究されていないテーマであると考えられ、癌/骨微小環境を対象とした新規治療へとつなげていくことができると考えられ、今後さらに研究を続けていく予定である。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kubota K, Ito R, Narita N, Tanaka Y, Furudate K, Akiyama N, Chih CH, Komatsu S, Kobayashi W.	4. 巻 22
2. 論文標題 Utility of prognostic nutritional index and systemic immune-inflammation index in oral cancer treatment	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC cancer	6. 最初と最後の頁 368
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-022-09439-x.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古舘健, 伊藤良平, 久保田耕世, 小林恒
2. 発表標題 包括的なバイオインフォマティクス解析に基づく口腔癌微小環境における転移機構の解明
3. 学会等名 第67回口腔外科学会総会・学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------