

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861916

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌による顎骨破壊に關与する新規の因子の同定と新たな治療法の基盤構築

研究課題名(英文) Identification of osteoclastic bone resorption regulatory factors produced by oral squamous cell carcinoma

研究代表者

中本 えりか (NAKAMOTO (OUE), Erika)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30634092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：1、口腔扁平上皮癌細胞株HSC3から骨吸収能の高い細胞株と低い細胞株を単離同定し、両クローンの遺伝子発現を網羅的に解析・比較することによって、CXCL2を新たな骨吸収関連因子として同定することができた。

2、TGF- $\beta$ は癌周囲の微小環境において重要な役割を担っていることが報告されているが、口腔癌の骨破壊に關するTGF- $\beta$ の役割については不明な点が多い。そこで口腔癌におけるTGF- $\beta$ の役割について基礎的研究を行った。癌細胞と間質細胞から分泌されたTGF- $\beta$ が、口腔扁平上皮癌による骨吸収に關与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：1. Two clonal cell lines, HSC3-C13 and HSC3-C17, were isolated from the maternal oral cancer cell line, HSC3. The conditioned medium from HSC3-C13 cells showed the highest induction of Rankl expression in the mouse stromal cell lines ST2 and UAMS-32 as compared to that in maternal HSC3 cells and HSC3-C17 cells. Gene expression was compared between HSC3-C13 and HSC3-C17 cells by using microarray analysis, which showed that CXCL2 gene was highly expressed in HSC3-C13 cells as compared to HSC3-C17 cells. These results indicate that CXCL2 is involved in bone destruction induced by oral cancer.

2. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) plays a significant role in the regulation of the tumor microenvironment. We investigated the role of TGF- $\beta$  in oral cancer-induced bone destruction. We show that both cancer cells and stromal cells produce TGF- $\beta$  in the OSCC-induced bone destruction, and propose the role of TGF- $\beta$  produced by stromal fibroblasts in such bone destruction.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔癌 骨破壊

1. 研究開始当初の背景

癌関連骨破壊は、癌細胞による骨への直接浸潤や、骨転移の際に生じ、前者は口腔癌でしばしば認められる。口腔癌による骨破壊は、患者の予後を悪化させる因子の一つであるが、その分子メカニズムは明らかになっていない点も多い。我々の研究室では口腔癌による骨破壊においては癌と骨の間に存在する間質細胞が重要な役割を担っていることを報告した(BONE 43, 621, 2008)。間質細胞は破骨細胞分化因子である RANKL を産生し、その RANKL が破骨細胞前駆細胞上に存在する RANK と結合することにより破骨細胞形成が誘導される。一方で癌関連骨破壊は、癌細胞が産生する様々な因子によって制御されている。我々の研究室では癌細胞自身が IL-6 及び PTHrP を産生するとともに、癌細胞が間質細胞を刺激して IL-6 産生を促進させていること、そしてこれらの細胞から産生された IL-6 及び PTHrP が間質細胞の RANKL 発現を上昇させ、破骨細胞性骨吸収を促進していることを報告した(Am J Pathol 176, 968, 2010)。しかしながら、間質細胞の IL-6 発現を上昇させる癌由来の因子は同定されていない。

2. 研究の目的

(1) 新たな骨吸収関連因子を同定することを目的に、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 から限界希釈法を用いて単一細胞由来クローン化細胞株を作成した。骨浸潤能の高い細胞株と低い細胞株の遺伝子発現を網羅的に解析し比較することによって、新たな因子を同定し臨床応用への基盤を構築したいと考えた。

(2) TGF- $\beta$  は癌周囲の微小環境において重要な役割を担っていることが報告されているが、口腔癌の骨破壊に関する TGF- $\beta$  の役割については不明な点が多い。そこで口腔癌における TGF- $\beta$  の役割について基礎的研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 新たな骨吸収関連因子の同定について  
骨吸収能の高い細胞株と低い細胞株の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析・比較することによって骨吸収関連因子を抽出した。

抽出した新規の因子の各細胞株における発現を解析した。

抽出した新規の因子が破骨細胞形成に与える影響について調べるために、中和抗体やリコンビナントタンパクの添加によって破骨細胞形成数が変化するかを確認した。

CXCL2 が間質細胞の RANKL、OPG 発現に与える影響について調べるために、リコンビナント CXCL2 をマウス骨芽細胞様細胞 UAMS-32 細胞に添加し RT-PCR を行う。

(2) 口腔癌における TGF- $\beta$  の役割の解析について

口腔癌における TGF- $\beta$  の局在について把握するために、口腔扁平上皮癌症例、及び口腔扁平上皮癌 HSC3 をヌードマウス頭頂骨に移植したモデルについて TGF- $\beta$ 、リン酸化 Smad2 の免疫染色を行なった。

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 と骨髄由来の繊維芽細胞株 ST-2 の培養上清中の TGF-タンパクの量を測定し、その分泌量を定量化した。

HSC3 細胞の培養上清を ST-2 細胞に加えると、ST-2 細胞の Tgf- $\beta$  1 の mRNA 発現がどのように変化するか検証した。

TGF- $\beta$  1 が破骨細胞形成に与える影響について実験を行なった。リコンビナント TGF- $\beta$  1 を添加すると、RANKL によって誘発された RAW264 細胞の破骨細胞形成がどのように変化するか検証を行った。

ヌードマウス頭頂骨への HSC3 移植により、同部の骨吸収が生じるが、それは、TGF- $\beta$  型レセプター阻害薬を加えるとどのように変化するか検討する。

4. 研究成果

(1) 骨吸収能の高い HSC3-C13 と骨吸収能の低い HSC3-C17 の遺伝子発現をマイクロアレイを用いて網羅的に解析・比較したところ、HSC3-C13 で発現が上昇している HSC3-C17 で発現が低下している遺伝子で、その差が 5 倍以上ある遺伝子は 11 遺伝子存在し、IL-6、MFAP5、PDZK1IP1、FAM155A、PTGS2、CXCL2、AKAP12、DUSP1、NEK3、PLXNC1、SAM4A が抽出された。その中で最もシグナル強度が強かった CXCL2 について研究をすすめることとした。

Gene symbol	Gene name	Fold change C13 / C17	HSC3-C13 signal
IL6	interleukin 6	25.99	5411.3
MFAP5	microfibrillar associated protein 5	22.63	2664.7
PDZK1IP1	PDZK1 interacting protein 1	10.56	365.3
FAM155A	family with sequence similarity 155, member A	9.19	177.3
PTGS2	prostaglandin endoperoxide synthase 2	8.57	918
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	7.46	8315.4
AKAP12	A kinase (PRKA) anchor protein 12	6.96	5106.1
DUSP1	dual specificity phosphatase 1	6.50	3234.4
NEK3	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 3	6.06	146.1
PLXNC1	plexin C1	5.66	757
SAM4A	sterile alpha motif domain containing 4A	5.28	490.4

図 1 HSC3-C13 で発現が上昇している HSC3-C17 で発現が低下している遺伝子

マイクロアレイの結果を確認するために HSC3, HSC3-C13, HSC3-C17 の CXCL2 の発現を定量的 RT-PCR にて解析した。結果、マイクロアレイ解析と同様に HSC3-C13 における CXCL2 の発現は HSC3, HSC3-C17 と比較して有意に高かった。HSC3-C13 は HSC3-C17 の 12 倍の発現を認めた。

HSC3-C13 の培養上清によって誘導される破骨細胞形成に CXCL2 中和抗体が及ぼす影響を調べた。その結果、破骨細胞形成は CXCL2 中和抗体の濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。

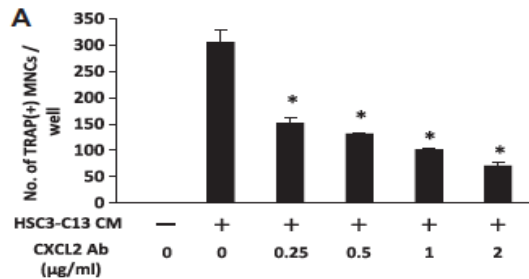


図2 CXCL2 中和抗体が破骨細胞形成に及ぼす影響

CXCL2 は UAMS-32 細胞の RANKL の発現を濃度依存的に上昇させ、OPG の発現を低下させた。

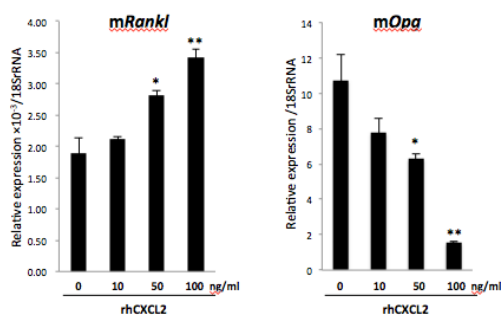


図3 CXCL2 が RANKL、OPG 発現に与える影響

以上①～④より、口腔癌が産生した CXCL2 が間質細胞や骨芽細胞の RANKL、OPG 発現に影響を与えることによって破骨細胞形成を制御していることを示唆している。

本研究によって、CXCL2 を新たな骨吸収関連因子として同定することができたと考える。

(2) 口腔癌における TGF-β の役割について基礎的研究を行った。

口腔扁平上皮癌 12 症例および、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 をヌードマウス頭頂骨に移植したモデルについて、TGF-β、リン酸化 Smad2 の免疫染色をおこなった。結果、癌細胞では全例に TGF-β、リン酸化 Smad2 の発現を認め、癌と骨の間にある繊維芽細胞では 10 例に TGF-β の発現、1 例にリン酸化 Smad2 の発現を認めた。いくつかの症例では骨と癌細胞の間に存在した破骨細胞にも発現を認

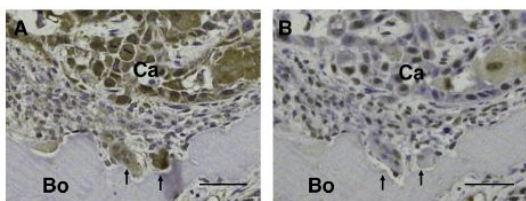


図4 TGF-β、リン酸化 Smad2 の発現

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC3 と骨髄由来の繊維芽細胞株 ST-2 は相当量の TGF-β を合成していた。

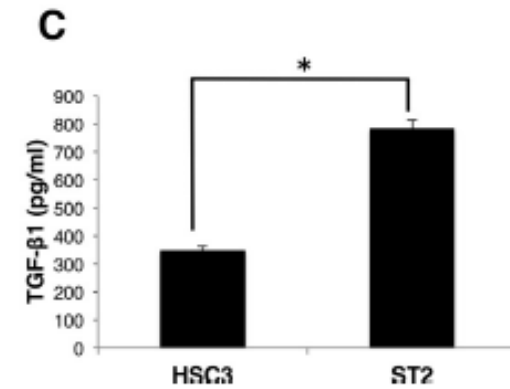


図5 TGF-β 1 の合成量

HSC3 細胞の培養上清を ST-2 細胞に加えると、ST-2 細胞の Tgf-β 1 の mRNA 発現を上昇させることが明らかとなった。

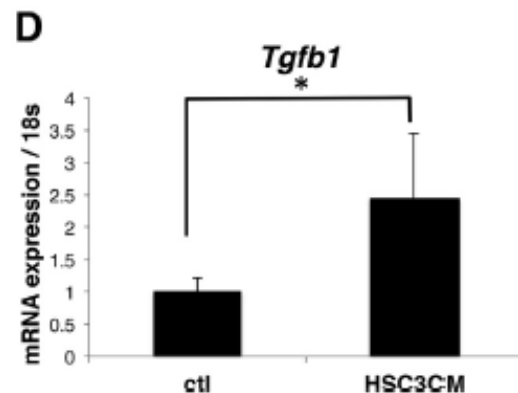


図6 HSC3 細胞の培養上清が Tgf-β 1 の mRNA 発現に与える影響

リコンビナント TGF-β 1 を添加すると、RANKL によって誘発された RAW264 細胞の破骨細胞形成が促進される。そしてそれは、TGF-β 型レセプター阻害薬により抑制された。

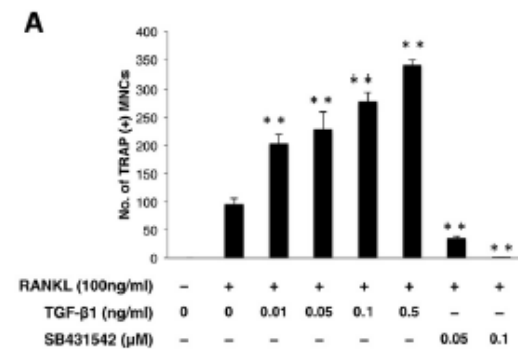


図7 TGF-β 1 による破骨細胞形成促進

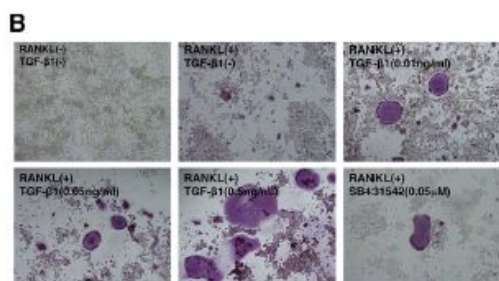


図8 TGF- 1による破骨細胞形成促進

ヌードマウス頭頂骨への HSC3 移植により、同部の骨吸収が生じるが、それは、TGF-型レセプター阻害薬により抑制された。

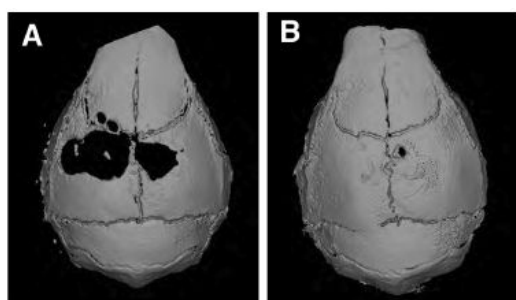


図9 ヌードマウス頭頂骨への HSC3 移植  
A:コントロール群  
B:TGF- 型レセプター阻害薬投与群

以上①～⑤より、癌細胞と、間質細胞両方から分泌された TGF- が、口腔扁平上皮癌による骨吸収に関与していることが明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

Ryosuke Nakamura , Kou Kayamori , Erika Oue , Kei Sakamoto , Kiyoshi Harada , Akira Yamaguchi、Transforming growth factor- $\beta$  synthesized by stromal cells and cancer cells participates in bone resorption induced by oral squamous cell carcinoma 、 Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、458、2015、pp.777-782、DOI:10.1016/j.bbrc.2015.02.013

〔学会発表〕(計1件)

大上えりか 他、当科過去10年間における粘液腫の臨床的検討、NPO 法人日本口腔科学会関東地方部会、2013年09月28日、東京医科歯科大学歯学部特別講堂(東京都文京区)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中本(大上) えりか

NAKAMOTO(OUE) Erika

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30634092

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：