

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02999

研究課題名(和文) 癌骨破壊病変のHedgehogシグナルを起点とした癌代謝・癌免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) The study of the regulatory mechanisms of cancer bone destruction metabolism and immunity in Hedgehog signaling

研究代表者

志茂 剛 (SHIMO, Tsuyoshi)

北海道医療大学・歯学部・教授

研究者番号：40362991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Hedgehog下流シグナル分子NK-3RはStage IV顎骨浸潤を伴う歯肉癌患者の予後と関連し(Yoshida, Shimo et al. *Diagnostics (Basel)* 2021), Stage II内向型舌癌患者における腫瘍血管内皮細胞はHedgehogシグナルの発現の有意な亢進と腫瘍随伴マクロファージ(TAM)の集積と正の相関を認め(Takabatake, Shimo et al. *Int J Mol Sci* 2019), Gli-1, Gli-2 dual inhibitorのがin vitro並びにin vivo癌骨破壊マウスモデルに与える影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の顎骨浸潤は、化学療法の効果期待できず、高線量の放射線療法では放射線性顎骨壊死のリスクが高いため外科療法が選択される。しかしながら、機能温存の観点から問題点も多く、顎骨切除症例における歯肉癌骨髄浸潤は予後に独立して寄与し(Yoshida, Shimo et al. *Anticancer Res* 2018), 癌を取り巻く微小環境が薬剤耐性獲得に関与することから癌骨破壊微小環境は新たな治療標的となる可能性がわかってきた。癌骨破壊微小環境で活性化されるHedgehogシグナルを起点とした癌免疫の統合的な解析が必須である。

研究成果の概要(英文)：Hedgehog downstream signaling molecules deployed from a comprehensive pathway analysis in the cancer bone destruction microenvironment (Shimo et al. *PlosOne* 2016) are associated with prognosis in gingival cancer patients with Stage IV jaw bone invasion (Yoshida, Shimo et al. *Diagnostics (Basel)* 2021).

In addition, tumor vascular endothelial cells in patients with Stage II introverted tongue cancer showed significantly enhanced expression of Hedgehog signaling and a positive correlation with tumor-associated macrophage (TAM) accumulation (Takabatake, Shimo et al. *Int J Mol Sci* 2019). We also analyzed the histological and genetical effect of Gli-1 and Gli-2 dual inhibitor on the in vitro study and in vivo cancer bone destruction mouse model.

研究分野：口腔外科学

キーワード：癌 骨破壊

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の顎骨浸潤は、化学療法の効果が期待できず外科療法が選択されるが、機能温存の観点から問題点も多いのが現状である。これまでの我々の臨床研究から、顎骨切除症例における歯肉癌骨髄浸潤は生命予後に独立して寄与することから (Yoshida, [Shimo et al. *Anticancer Res* 2018](#)), 癌骨破壊微小環境は新たな治療標的となる可能性がわかってきた。Hedgehog シグナルは胎生期の発生段階で中心的な役割を担う一方で、大腸癌、肝臓癌、肺癌、乳癌、前立腺癌をはじめとする全身における種々の癌で活性化されていることが報告されている。癌骨破壊微小環境下で重要な役割を担う破骨細胞における網羅的なパスイ解析 ([Shimo et al. *PlosOne* 2016](#)) から展開された新規 Hedgehog 下流シグナル分子 NK-3R は顎骨浸潤を伴う扁平上皮癌細胞に高発現することが、歯肉癌顎骨切除標本を用いた免疫組織学的解析で明らかとなってきた (Obata, [Shimo et al. *Anticancer Res* 2016, 2017](#))。また、stage II 内向型舌癌患者における腫瘍血管内皮細胞は Hedgehog シグナルの発現が有意に亢進し、腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の集積と正の相関を認めることが明らかになり ([Takabatake, *Shimo et al. Int J Mol Sci* 2019](#)), 癌骨破壊微小環境における Hedgehog シグナルネットワークのさらなる解明が急務である。

2. 研究の目的

これまでの研究から顎骨破壊を伴う進行癌における初期耐性や獲得耐性に、癌細胞における Hedgehog シグナルが、癌骨破壊微小環境を変化させる可能性が示唆されてきた。本研究では、Hedgehog シグナル関連分子と臨床パラメーターとの相関、Hedgehog シグナルの要となる転写因子 glioma-associated oncogene 1 (Gli-1) と Gli-2 に対する分子標的薬を *in vivo* では癌骨破壊マウスモデルを、*in vitro* では癌細胞における遺伝子動態を解析し、癌骨破壊微小環境における Hedgehog シグナルネットワークを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本報告では、新規 Hedgehog 下流シグナル分子 NK-3R の臨床パラメーターとの相関は歯肉癌患者顎骨切除標本を用い、顎骨浸潤を伴うメラノーマの手術単独症例においても患者予後は有意に低下することから ([Br J Oral Maxillofac Surg 2020](#)), *in vivo* および *in vitro* 実験系ではマウスメラノーマ細胞を用いたデータを提示する。

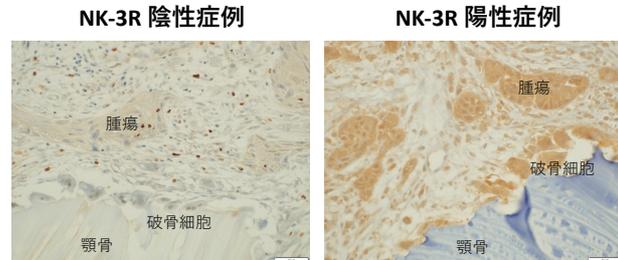
- (1) 手術単独を行った歯肉癌患者 27 症例顎骨切除標本における NK-3R 発現を免疫組織化学染色を行い、症例における臨床パラメーターとの相関を検討した。
- (2) ヒト皮膚メラノーマ臨床切除標本 (組織アレイ, 48 サンプル, M481 US Biomax) を用い Sonic Hedgehog (SHH) とそのシグナル発現の有無を免疫組織化学分析により検討した。
- (3) 腫瘍骨破壊モデルマウスは、マウス B16 メラノーマ 細胞を 5 週齢雌 C57BL マウス 右脛骨骨幹端骨髓腔に 1×10^5 個移植することにより樹立した。投与後 1 日目から 15 日目まで Gli-1 および Gli-2 dual inhibitor 低分子化合物 GANT61 (40mg/kg) またはコントロール溶液を隔日に腹腔内投与し (n=8/group), マイクロ CT および免疫組織化

学染色にて解析した。

- (4) In vitro における GANT61 の B16 細胞に対する生存率は、WST-1 (Sigma-Aldrich) アッセイ、アポトーシスはフローサイトメトリー、遺伝子発現解析はマウスマイクロアレイ(Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、リアルタイム RT-PCR, Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)を用いて Gene Ontology (GO) カテゴリと Gene set enrichment analysis (GSEA)を行った。

4. 研究成果

- (1) 顎骨浸潤した歯肉癌患者における NK-3R 陰性症例 (左写真) および陽性症例 (右写真)。腫瘍細胞, 破骨細胞, 顎骨は写真中に示す。



- (2) 歯肉癌手術単独症例における癌細胞に発現する NK-3R 症例と癌顎骨浸潤は有意な相関を示すことが明らかとなった (表 1)。一方で歯肉癌手術単独症例における NK-3R 陽性破骨細胞数と癌骨髄浸潤は有意に相関することが明らかとなった (表 2)。

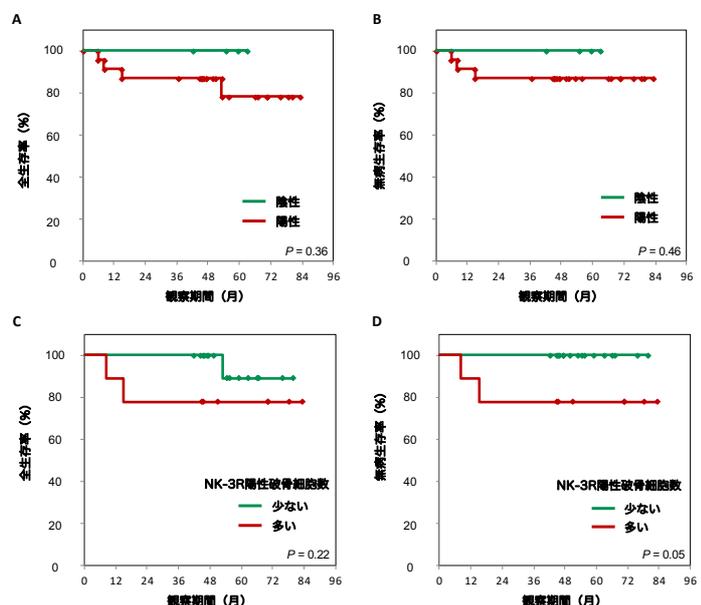
表 1 歯肉癌手術単独症例における癌細胞に発現するNK-3R症例と癌顎骨浸潤は相関する

Parameter	癌細胞におけるNK-3R発現		p-value
	陽性 (N=23)	陰性 (N=4)	
Age	<70 ≥70	2 2	0.41
Gender	Male Female	3 1	0.13
Tumor size	< 2 cm ≥ 2 cm, <4 cm ≥ 4 cm	1 1 2	0.08
N stage	N0 N1 N2	4 0 0	0.59
TNM Stage	I, II III, IV	3 1	0.49
Differentiation	Well Moderate-poor	4 0	0.08
顎骨浸潤	骨浸潤なし 皮膚骨 骨髄	4 0 0	0.03
Lymphovascular invasion	Absent Present	4 0	0.37
Perineural invasion	Absent Present	4 0	0.44
Primary recurrence	Absent Present	3 1	0.96
Secondary cervical lymph nodal metastasis	Absent Present	4 0	0.61

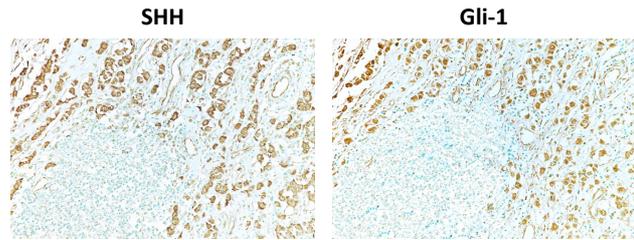
表 2 歯肉癌手術単独症例におけるNK-3R 陽性破骨細胞数と癌骨髄浸潤は有意に相関する

Parameter	NK-3R陽性破骨細胞数		p-value
	多い (N=9)	少ない (N=16)	
Age	<70 ≥70	2 7	0.28
Gender	Male Female	1 8	0.09
Tumor size	< 2 cm ≥ 2 cm, <4 cm ≥ 4 cm	2 4 3	0.49
N stage	N0 N1 N2	6 1 2	0.12
TNM Stage	I, II III, IV	3 6	0.016
Differentiation	Well Moderate-poor	5 4	0.97
顎骨浸潤	No bone invasion Cortical 骨髄	0 3 6	<0.001
Lymphovascular invasion	Absent Present	6 3	0.07
Perineural invasion	Absent Present	7 2	0.23
Primary recurrence	Absent Present	6 3	0.71
Secondary cervical lymph nodal metastasis	Absent Present	8 1	0.91
NK-3R expression in tumor cells	Positive Negative	9 0	0.10

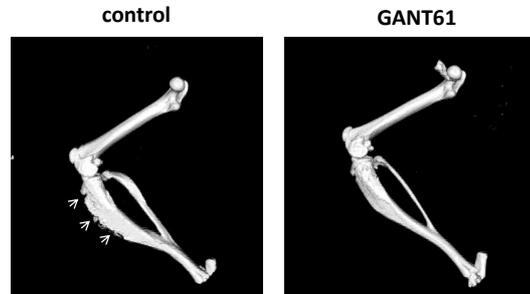
- (3) 歯肉癌手術単独症例における癌細胞に発現する NK-3R 症例と予後との関連は全生存率 (A), 無病生存率 (B) とも有意差は認められなかった。一方, 歯肉癌手術単独症例における NK-3R 陽性破骨細胞数と予後との関連は全生存率で有意差は認められなかったが (C, p=0.22), 無病生存率は予後と関連することが示唆された (D, p=0.05)。



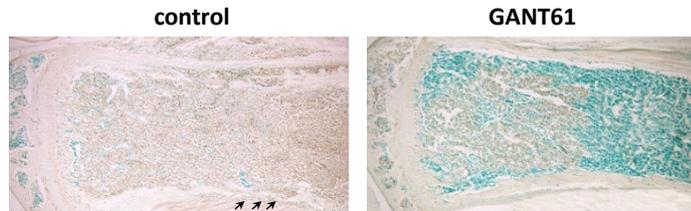
- (4) メラノーマにおける Hedgehog シグナルの解析を行うにあたり、最初に臨床切除標本における SHH および Gli-1, Gli-2 発現を確認した。SHH および Gli-1, Gli-2 発現は、正常皮膚ではほとんど発現を認めないが、メラノーマ細胞に強発現することがわかった。



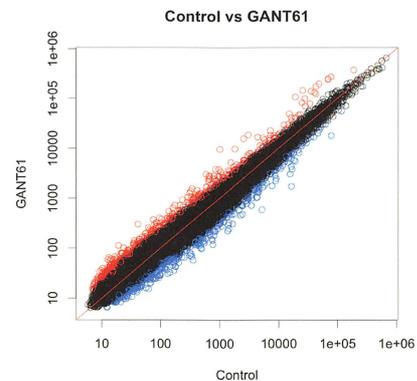
- (5) CT 解析にて、コントロール群では脛骨皮質骨の骨破壊を認めるが（左写真 矢頭）、GANT61 投与群（右写真）は皮質骨の骨破壊が認められず、保存されているのがわかる。



- (6) 腫瘍骨破壊モデルマウスに GANT61 を投与すると、腫瘍細胞は骨髄で増大し、皮質骨が破壊されていることが組織学的に観察され（左写真 矢印）、メラノーマ細胞をメラノーマ特異的抗原 Melan-A の免疫組織染色法で認識させると、コントロール群（左写真）と比較して GANT61 投与群（右写真）は有意に腫瘍細胞の抑制を認めることがわかった。



- (7) GANT61 を 48 時間暴露した B16 細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにするために、22,100 の遺伝子発現変化を全ゲノムマイクロアレイで解析した。その結果、1,091 個の遺伝子の発現に統計的に有意な変化が認められた（553 個が発現増加、1538 個が発現減少）。In vitro における GANT61 の B16 細胞に対する生存率は、GANT61 濃度依存的に減少し、フローサイトメトリー解析の結果、GANT61 処理 B16



細胞は、コントロール群と比較し後期アポトーシス細胞（PI 陽性、Annexin V 陽性）数を有意に増加させることが明らかになった。B16 細胞へ GANT61 を処理すると、コントロールと比較してアポトーシスシグナル伝達経路、PD-L1 発現・PD-1 チェックポイント経路、血管新生に関連する項目に有意差を認めることが GSEA 解析にて明らかとなった（藤井彩貴 データ解析一部担当）。一方、癌骨破壊微小環境で形成される腫瘍血管内皮細胞が Hedgehog シグナルを活性化している血管内皮細胞幹細胞から形成される可能性を、Gli1-creERT2; tdTomato マウス頭蓋骨癌骨破壊モデルに組織透明化技術を用いた 3 次元 in vivo イメージングで報告した（島谷真梨 第 47 回日本口腔科学会北日本支部学術集会 2021 口演発表）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 10件）

1. 著者名 Shimo Tsuyoshi, Takebe Hiroaki, Okui Tatsuo, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Obata Kyoichi, Kurio Naito, Shamsoun Karnoon, Fujii Saki, Hosoya Akihiro, Irie Kazuharu, Sasaki Akira, Iwamoto Masahiro	4. 巻 21
2. 論文標題 Expression and Role of IL-1 Signaling in Chondrocytes Associated with Retinoid Signaling during Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2365 ~ 2365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21072365	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 -

1. 著者名 Shimo Tsuyoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Hedgehog Signaling in Organogenesis and the Tumor Microenvironment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 2788 ~ 2788
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082788	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 -

1. 著者名 Hosoya Akihiro, Shalehin Nazmus, Takebe Hiroaki, Shimo Tsuyoshi, Irie Kazuharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Sonic Hedgehog Signaling and Tooth Development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1587 ~ 1587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21051587	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 -

1. 著者名 Takebe Hiroaki, Shalehin Nazmus, Hosoya Akihiro, Shimo Tsuyoshi, Irie Kazuharu	4. 巻 21
2. 論文標題 Sonic Hedgehog Regulates Bone Fracture Healing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 677 ~ 677
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21020677	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 -

1. 著者名 Sakamoto Yumi, Okui Tatsuo, Yoneda Toshiyuki, Ryumon Shoji, Nakamura Tomoya, Kawai Hotaka, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Masui Masanori, Ono Kisho, Obata Kyoichi, Shimo Tsuyoshi, Sasaki Akira	4. 巻 531
2. 論文標題 High-mobility group box 1 induces bone destruction associated with advanced oral squamous cancer via RAGE and TLR4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 422 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.120	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 -

1. 著者名 Nakamura Tomoya, Okui Tatsuo, Hasegawa Kazuaki, Ryumon Shoji, Ibaragi Soichiro, Ono Kisho, Kunisada Yuki, Obata Kyoichi, Masui Masanori, Shimo Tsuyoshi, Sasaki Akira	4. 巻 44
2. 論文標題 High mobility group box 1 induces bone pain associated with bone invasion in a mouse model of advanced head and neck cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2547 ~ 2558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2020.7788	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 -

1. 著者名 Hosoya Akihiro, Shalehin Nazmus, Takebe Hiroaki, Fujii Saki, Seki Yuri, Mizoguchi Toshihide, Shimo Tsuyoshi, Iijima Masahiro, Irie Kazuharu	4. 巻 62
2. 論文標題 Stem cell properties of Gli1-positive cells in the periodontal ligament	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 299 ~ 305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.job.2020.08.002	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 -

1. 著者名 Takabatake Kiyofumi, Shimo Tsuyoshi, Murakami Jun, Anqi Chang, Kawai Hotaka, Yoshida Saori, Wathone Oo May, Haruka Omori, Sukegawa Shintaro, Tsujigiwa Hidetsugu, Nakano Keisuke, Nagatsuka Hitoshi	4. 巻 20
2. 論文標題 The Role of Sonic Hedgehog Signaling in the Tumor Microenvironment of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5779 ~ 5779
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20225779	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 -

1. 著者名 Ryumon Shoji, Okui Tatsuo, Kunisada Yuki, Kishimoto Koji, Shimo Tsuyoshi, Hasegawa Kazuaki, Ibaragi Soichiro, Akiyama Kentaro, Thu Ha Nguyen, Monsur Hassan Nur, Sasaki Akira	4. 巻 42
2. 論文標題 Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effect of cisplatin via the suppression of ATPase copper transporting beta in head and neck squamous cell carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7367	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 -

1. 著者名 Shimo Tsuyoshi, Koyama Eiki, Okui Tatsuo, Masui Masanori, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Yoshioka Norie, Kurio Naito, Yoshida Shoko, Sasaki Akira, Iwamoto Masahiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Retinoic Receptor Signaling Regulates Hypertrophic Chondrocyte-specific Gene Expression	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 85 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.11443	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 -

1. 著者名 Shamsoon K, Saito T, Shimo T	4. 巻 3
2. 論文標題 Sonic hedgehog signaling pathway: Targeting in the treatment of cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pioneer Dental Journal	6. 最初と最後の頁 8-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Tsuyoshi Shimo
2. 発表標題 Misdiagnosis of gingival cancer as periodontitis - mechanism of cancer induced jaw bone destruction
3. 学会等名 Euro Dentistry, London, UK (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsuyoshi Shimo
2. 発表標題 Oral squamous cell carcinoma induced jaw bone destruction
3. 学会等名 International Dental Forum, London, UK (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島谷真梨, 志茂剛
2. 発表標題 透明化技術を用いた悪性黒色腫細胞骨浸潤のイメージング解析
3. 学会等名 第47回日本口腔科学会北日本支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井彩貴, 志茂 剛
2. 発表標題 抜歯窩治癒過程におけるGli1陽性歯根膜細胞の動態
3. 学会等名 第75回NPO法人日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井彩貴, 志茂 剛
2. 発表標題 Gli1陽性歯根膜細胞は抜歯窩治癒過程において歯槽骨形成に寄与する
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Karnoon Shamsoun, 平木大地, 横関健治, 堀江尚弘, 藤井彩貴, 斎藤隆史, 志茂 剛
2. 発表標題 癌微小環境におけるHedgehogシグナルの局在とその役割の解析
3. 学会等名 第66回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	佐々木 朗 (SASAKI Akira) (00170663)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	吉田 祥子 (YOSHIDA Shoko) (00616047)	岡山大学・歯学部・客員研究員 (15301)	
研究分担者	青山 絵理子 (AOYAMA Ekiko) (10432650)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	國定 勇希 (KUNISADA Yuki) (10779416)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	滝川 正春 (TAKIGAWA Masaharu) (20112063)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	奥井 達雄 (OKUI Tatsuo) (40610928)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	
研究分担者	長塚 仁 (NAGATSUKA Hitoshi) (70237535)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	高畠 清文 (TAKABATAKE Kiyofumi) (70736537)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	久保田 聡 (KUBOTA Satoshi) (90221936)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	

	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
研究協力者	谷村 明彦 (TANIMURA Akihiko)		
研究協力者	細矢 明宏 (HOSOYA Akihiro)		
研究協力者	建部 廣明 (TAKEBE Hiroaki)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	平木 大地 (HIRAKI Daich)		
研究協力者	堀江 尚弘 (HORIE Naohiro)		
研究協力者	横関 健治 (YOKOZEKI Kenji)		
研究協力者	藤井 彩貴 (FUJII Saki)		
研究協力者	島谷 真梨 (SHIMATANI Mari)		

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