

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 24日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791979

研究課題名（和文） 口腔癌の骨浸潤・骨破壊に対する angiogenin を標的とした治療法の基礎的検討

研究課題名（英文） angiogenin as a target for the treatment of bone invasion and bone destruction in oral cancer

研究代表者

吉岡 徳枝（YOSHIOKA NORIE）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50362984

研究成果の概要（和文）：血管新生蛋白である angiogenin は、癌の進展過程において腫瘍血管のみならず癌細胞の増殖に重要な役割を果たしている。angiogenin の発現をノックダウンした口腔癌細胞株を用いて作製した骨破壊動物モデルでは、angiogenin をノックダウンした群は対照群と比較して骨破壊の抑制、骨浸潤部の破骨細胞数の減少、腫瘍血管新生の抑制を認めた。また、angiogenin は破骨細胞形成のみならず吸収活性をも促進し、angiogenin の発現を一時的に抑制すると破骨細胞形成は抑制された。作製した angiogenin ノックアウトマウスの骨髄細胞や脾細胞から破骨細胞を形成させると、野生型と比べて破骨細胞形成が抑制された。以上の結果から、angiogenin が癌誘発の骨破壊の治療に対して新たな分子標的になりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Angiogenin, which is an angiogenic factor, has an important role in angiogenesis and cancer cell proliferation in the progression of cancer. We established the bone destruction animal model induced by injection of oral squamous cell line HSC2, which has been knocked down the expression of angiogenin, to the tibiae of nude mice. Knocking down angiogenin expression in HSC2 cells suppressed not only tumor growth in the tibia, osteoclastic bone resorption but tumor angiogenesis. Angiogenin stimulated osteoclast formation and osteoclastic bone resorption in vitro. Down-regulating of angiogenin expression decreased osteoclast formation in vitro. Moreover, osteoclast formation in the angiogenin knock out mice was suppressed compared with wild type. In conclusion, these results suggest that angiogenin could be a new molecular target for the treatment of cancer induced bone destruction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：angiogenin, 癌の骨浸潤, 破骨細胞性骨吸収, 腫瘍血管新生

1. 研究開始当初の背景

血管新生は癌の増殖，浸潤，転移の過程において必要不可欠なステップであり，近年では様々な血管新生阻害剤ががん治療の新たな戦略として広く使われている。

口腔癌において癌細胞はしばしば顎骨に浸潤し，癌誘発の骨破壊病変は患者の QOL を低下させる主因の一つである。従って，癌の骨への浸潤や浸潤した癌細胞の骨内での増殖の制御は臨床上きわめて重要な課題である。癌誘発の骨破壊は破骨細胞性骨吸収に引き続いて起こるが，申請者らは血管新生阻害による破骨細胞性骨吸収の制御に関わる研究を行い，その有用性を示唆する結果を得ている。

angiogenin は 1985 年に HT-29 大腸癌細胞株の培養上清から分離された，分子量 14.2kDa のリボヌクレアーゼ活性をもつ血管新生蛋白であり，前立腺癌，乳癌などの様々な癌組織でその発現が亢進している。申請者は，angiogenin が癌の進展過程において腫瘍血管のみならず癌細胞の増殖に重要な役割を果たすことを明らかにしており，これらの背景から，angiogenin を標的とした治療は，癌の骨浸潤・骨破壊においても，①癌細胞の増殖抑制，②血管新生阻害，③破骨細胞性骨吸収の抑制という 3 つの効果を組み合わせた治療が期待できる。しかしながら，癌の骨浸潤，骨転移といった臓器特異的な病態に対する angiogenin の関係については全く明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

本研究では，癌の顎骨浸潤などの癌誘発性骨破壊に対する angiogenin の役割ならびに angiogenin を標的とした治療の可能性をさぐることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 癌誘発の骨破壊病変に対する angiogenin の発現制御による治療効果に関する検討。

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 に対して，angiogenin siRNA 発現プラスミド DNA ならびに vector control プラスミド DNA を Effectene Transfection Reagent(QIAGEN, Hilden, Germany)を使用して遺伝子導入後，puromycin で 2~3 週間選択して angiogenin RNAi transfectant(ANG-RNAi) および vector control transfectant (Vector-CNTL) を作製した。これらの細胞を *bulb C nu/nu* スードマウスの大腿骨に注射後 3 週目に骨内での増殖について対照群と比較検討した。

①エックス線学的評価：現有の SOFRON を用いて摘出したサンプルの写真を撮影し，デジタル化した画像をコンピューターで腫瘍面積の測定を行い，治療効果を評価した。

②免疫組織学的評価：血管新生については，抗 CD34 抗体を用いて，破骨細胞については TRAP 染色にて骨浸潤部の TRAP 陽性多核細胞を染色し，対照群と比較した。

(2) 破骨細胞の分化・形成過程における angiogenin の影響についての検討。

C/57 black マウスから回収した骨髓細胞に $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し破細胞形成を誘導する系に angiogenin(0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を添加し，形成された破骨細胞数を TRAP 染色してカウントした。

また，C/57 black マウス骨髓細胞に Lipofectamine RNAi MAX(Invitrogen)を使用して遺伝子導入し，ANG-RNAi および Block-iT transfectant (CNTL-RNAi) を作製し，同様に $1\alpha 25(\text{OH})_2\text{D}_3$ を添加し破細胞形成を誘導させ，TRAP 染色にて破骨細胞数を測定した。

(3) 破骨細胞吸収活性に対する angiogenin

の影響についての検討.

C/57 black マウス骨髄細胞を Osteoclast Activity Assay Substrate (OAAS™)上に播種し, angiogenin(0.5, 1.0µg/ml)を添加して培養後, 形成された吸収窩の面積をデジタル画像として記録し, 画像解析ソフトウェア(Luminavision®)を用いて面積の測定を行った.

(4) RANK/RANKL システムに対する angiogenin の影響についての検討.

破骨細胞形成支持細胞に対する angiogenin の影響を検討した. マウス骨髄間質細胞である ST2 細胞をディッシュに播種し, サブコンフルエントに達した時点で各濃度(0, 0.5, 1.0µg/ml)の angiogenin を添加し, 24 時間培養後に total RNA を回収した. RT-PCR を行い RANKL, osteoprotegerin(OPG), M-CSF の発現を調べた. プライマーを以下に示す.

RANKL;

F;5'-ACACCTCACCATCAATGC-3'

R;5'-GTACGCTTCCCGATGTTT-3'

OPG;

F;5'-ACCAAAGTGAATGCCGAGAG-3'

R;5'-TCTGTGGTGAGGTTTCGAGTG-3'

M-CSF;

F;5'-GCCTTTGAATTTGTAGACCA-3'

R;5'-TTGTTCTGCTCCTCATAGTC-3'

GAPDH;

F;5'-TGAACGGGAAGCTCACTGG-3'

R;5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

(5) angiogenin ノックアウトマウス(ANG KO マウス)における破骨細胞形成系に対する検討.

海外共同研究者である Hu Guo-fu より供与された ANG KO マウスから骨髄細胞, 脾細胞を回収し, それぞれ 1α25(OH)2D3 あるいは RANKL, M-CSF を添加し培養後,

TRAP 染色を行い, 形成された破骨細胞数を野生型マウス(WT マウス)と比較した. マウス ANG-1 はヒト ANG と最も相同性が高く, 組織分布(主に肝臓)が同じであり, 血管新生能をもつ. ANG KO マウスは Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いて ANG-1 遺伝子をノックアウトしたものである.

4. 研究成果

(1) 癌誘発の骨破壊動物モデルに対する angiogenin の発現制御による治療効果に関する検討.

RNAi 法を用いて angiogenin の発現を抑制した口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 を大腿骨骨髄腔内注入法により癌誘発の骨破壊動物モデルを作製し, X 線学的, 組織学的に評価した. Vector-CNTL 群では骨破壊を示す虫食い状の骨吸収像を多数認めたのに対し, ANG-RNAi 群では骨吸収像を認めるものの, 骨破壊は著明に抑制していた(図 1-A). 骨吸収部位を定量化して測定すると, ANG-RNAi 群では Vector-CNTL 群と比較して有意に骨破壊面積が減少していた(図 1-B).

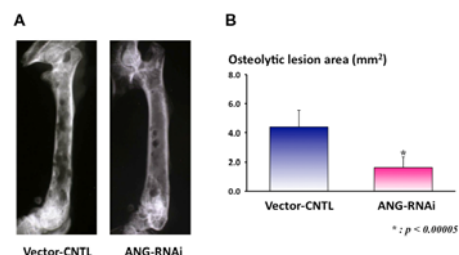


図1 癌誘発の骨破壊動物モデルに対するX線学的検討

A. 腫瘍注入後3週目のX線像. Vector-CNTL群では骨破壊を示す虫食い状のX線透過像が多数認められたが, ANG-RNAi群では著明に減少していた.
B. 骨破壊面積. Vector-CNTL群と比較し, ANG-RNAi群では骨破壊面積に有意な減少が認められた. *: $p < 0.00005$.

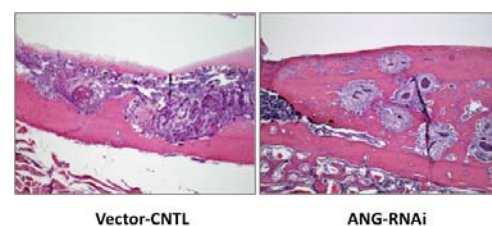


図2 癌誘発の骨破壊動物モデルの組織像(H&E染色)

Vector-CNTL群では骨髄内での腫瘍増殖を認めたが, ANG-RNAi群ではその増殖が抑制された。(x200)

組織所見では、Vector-CNTL 群では骨髄内での腫瘍増殖の増大を認めたが、ANG-RNAi 群では腫瘍の増殖は抑制された (図 2)。

また、Vector-CNTL 群では腫瘍周囲の骨面に沿って多数の TRAP 陽性破骨細胞と骨吸収窩の形成を認めたが、ANG-RNAi 群では TRAP 陽性破骨細胞が減少していた (図 3A, B, 図 4)。腫瘍血管新生については、新生血管のマーカーである CD34 の発現を免疫組織学的に検討した。Vector-CNTL 群では腫瘍間質の血管様構造に CD34 の発現を認めたが、ANG-RNAi 群では腫瘍周囲での CD34 発現が顕著に抑制されていた (図 3C, D)。

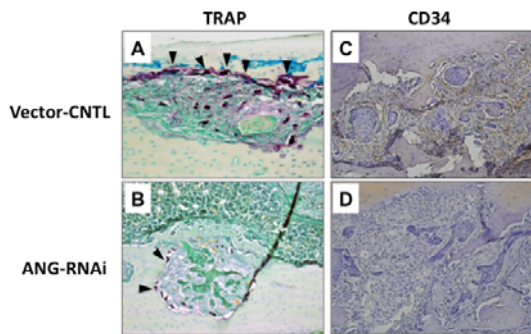


図3 癌誘発の骨破壊動物モデルにおける免疫組織学的検討
Vector-CNTL群では腫瘍周囲の骨面に沿って多数のTRAP陽性破骨細胞形成とその周囲に骨吸収窩の形成を認めた。腫瘍間質の血管様構造にCD34の発現を認めた(C)。一方、ANG-RNAi群ではTRAP陽性破骨細胞数が著明に減少し(B)、腫瘍周囲でのCD34の発現も著明に抑制されていた(D)。(×200)

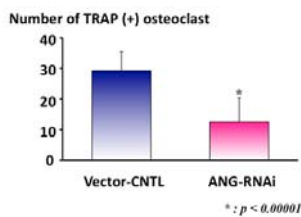


図4 癌誘発の骨破壊における破骨細胞形成について

Vector-CNTL群と比較して、ANG-RNAi群では腫瘍周囲の骨面に沿って形成されるTRAP陽性破骨細胞数が著明に減少していた。

(2) 破骨細胞性骨吸収に対する angiogenin の影響についての検討。

マウス骨髄細胞より破骨細胞を形成させる系に各濃度の angiogenin を添加し、培養したところ、angiogenin は濃度依存的に破骨細胞形成ならびに骨吸収活性を促進した (図 5)。また、マウス骨髄細胞に siRNA を

用いて、一過性に angiogenin の発現を抑制すると、破骨細胞形成は抑制された。(図 6)

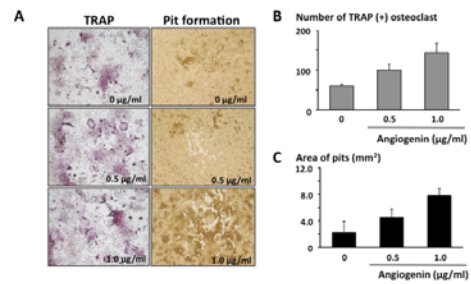


図5 破骨細胞性骨吸収に対するAngiogeninの影響

マウス骨髄細胞において、angiogeninは濃度依存的に破骨細胞形成および骨吸収活性を促進した。A: TRAP染色。B: Pit formation assay。C: TRAP陽性破骨細胞数。D: 吸収窩面積。

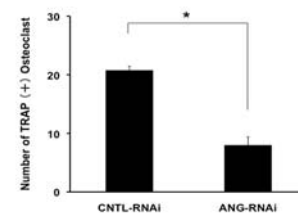


図6 angiogenin-siRNAによる破骨細胞形成系への影響

マウス骨髄細胞にANG-siRNAを遺伝子導入して、破骨細胞形成を誘導したところ、angiogeninをノックダウンすると破骨細胞形成が抑制した。

*: CNTL-RNAiに対する統計学的有意差 (p<0.01)。

(3) RANK/RANKL システムに対する angiogenin の影響についての検討。

骨髄間質細胞 ST2 細胞に angiogenin を濃度依存的に添加し、RT-PCR 法にて RANKL, OPG, M-CSF の mRNA の発現を検討したが、その発現に有意な増減は認めなかった (図 7)。

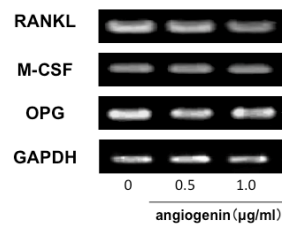


図7 angiogeninが破骨細胞形成支持細胞に与える影響

(4) ANG KO マウスにおける破骨細胞形成系に対する検討。

ANG-KO マウスの骨髄細胞および脾細胞から破骨細胞を形成させると、野生型マウス (WT) と比較してともに破骨細胞の形成が抑制された。骨髄細胞を用いた実験系では、angiogenin を添加しても破骨細胞の形成はレスキューされなかったが、脾細胞の場合、angiogenin を添加すると破骨細胞の形成が

レスキューされた (図 8).

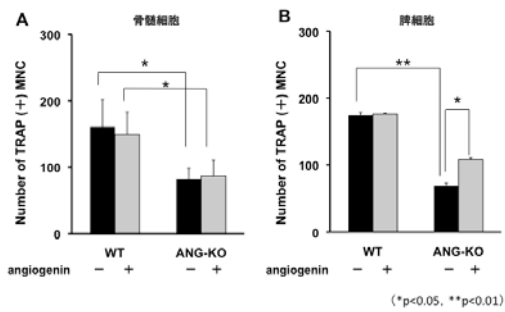


図 8 ANG-KOマウスにおける破骨細胞形成

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

①青木香澄, 吉岡徳枝, Nur Mohammad Monsur HASSAN, 岸本晃治, 志茂 剛, 帆波辰基, 江藤 司, 佐々木 朗. 口腔扁平上皮癌における癌の骨破壊に対する Angiogenin の役割, 第 55 回日本口腔外科学会総会・学術集会, 2010 年 10 月 16-17 日, 幕張.

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA NORIE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 50362984

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

青木 香澄 (AOKI KASUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生