

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09811

研究課題名(和文) 口腔癌の骨浸潤・骨転移において神経ペプチドCGRPが果たす役割と骨破壊制御機構

研究課題名(英文) The role of neuropeptide CGRP and regulatory mechanism for bone destruction in bone invasion and bone metastasis of oral cancer

研究代表者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA, NORIE)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：50362984

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)：カルシトニン遺伝子関連ペプチド(Calcitonin gene-related peptide: CGRP)は知覚神経のマーカーであると同時に神経興奮時に知覚神経軸索の末梢から放出される神経ペプチドである。本研究では知覚神経由来のCGRPが癌の骨破壊機構における癌細胞の増殖に果たす役割について調べた。CGRPは癌骨破壊病変において酸性環境は知覚神経を活性化させ、疼痛を惹起すると同時に、知覚神経から放出されるCGRPは血管新生を介して間接的に癌細胞の増殖を誘導すること、あるいはCGRP受容体を介して直接的に癌細胞の増殖を促進する可能性があ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

近年では癌性骨痛の発現へのCGRPの関与を示唆する報告や前立腺癌においてCGRPは骨転移を促進するとの報告もあり、口腔癌の骨浸潤、骨転移においてもCGRPは促進的作用を有することが考えられる。本研究からCGRPは直接的にも間接的にも癌細胞の増殖を促進することが示唆され、この結果はCGRPを標的とした癌誘発の骨破壊や癌性骨痛に対する新たな治療法の開発が期待できる可能性を有している。

研究成果の概要(英文)：Calcitonin gene-related peptide (CGRP) is a 37-amino acid neuropeptide and a marker of sensory nerve. CGRP is released from the periphery of sensory axons during neural excitation. In the present study, we investigated the role of CGRP derived from sensory nerves on cancer cell proliferation in bone destruction mechanism. We found that sensory nerve was activated under acidic environment and induced pain in bone destruction lesions of cancer. Also, it was suggested that CGRP released from sensory nerves may induce cancer cell proliferation directly through CGRP receptors or indirectly through angiogenesis.

研究分野：口腔外科学分野

キーワード：CGRP 癌性骨痛 癌骨微小環境 口腔癌

## 1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療において、癌の顎骨への浸潤・骨破壊の有無およびその浸潤範囲は治療法の選択や手術範囲の決定に大きく影響し、患者の予後を左右する負の要因である。顎骨への浸潤は疼痛や摂食障害の原因となり、また、癌の骨転移においては直接的にがん患者の生命を脅かすことはないが、疼痛や病的骨折を引き起こすなど、患者のQOLは著しく低下する。従って、顎骨浸潤あるいは骨転移した癌細胞の骨内での増殖の制御は、患者のQOLを維持するためには極めて重要な課題である。

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (Calcitonin gene-related peptide: CGRP) は37個のアミノ酸からなる神経ペプチドであり、知覚神経のマーカーであると同時に神経興奮時に知覚神経軸索から放出され、血管拡張などを誘導することが知られている。CGRP受容体はRAMP1 (receptor activity modifying protein1), CLR (calcitonin receptor-like receptor), RCP (receptor component protein) の3つから構成されており、CGRPがCGRP受容体に結合するとcAMPが上昇し、遺伝子発現、受容体やイオンチャネルの調整が行われる。CGRPは最も強力な血管拡張作用をもつペプチドであり、神経系において痛覚伝達や血管平滑筋の弛緩などの作用を有し、片頭痛の病態で重要な役割を担っており、治療の新たな標的として注目されている。

近年、自律神経系が癌の増大を促進することが明らかとなってきたが、癌性疼痛を受容、惹起する知覚神経が癌細胞に与える影響は不明であり、また癌の骨破壊機構においてCGRPが果たす役割も不明である。

## 2. 研究の目的

癌誘発の骨破壊は、癌骨微小環境において、癌細胞と骨芽細胞、骨細胞、骨髄間質細胞、癌関連線維芽細胞、血管内皮細胞などの癌間質を構成する細胞、そして破骨細胞のクロストークによって生じた癌と骨との間に成立する悪循環 (osteocrine system) から、破骨細胞性骨吸収が進行し、形成・進展していく。この悪循環には、癌細胞が産出するPTHrP, IL-6などの骨吸収促進サイトカインにより刺激を受けた骨芽細胞、骨髄間質細胞から産生されるRANKLや骨細胞からのRANKL、あるいはTGF- $\beta$ やIGFなどの骨からのサイトカインやカドヘリン、インテグリンなどの接着・増殖因子が関与している。

CGRPはサブスタンスPなどと同様に疼痛に関与する神経ペプチドであるが、癌骨微小環境においては、癌細胞の刺激を受けた知覚神経のCGRP発現が増加し、血管新生促進因子や癌細胞の増殖を促進する因子に作用し、ひいては破骨細胞性骨吸収を亢進させ、骨破壊や骨転移を促進している可能性が考えられる。そこで、本研究の目的を癌骨微小環境において知覚神経由来のCGRPが口腔癌細胞の増殖に与える影響について明らかにすることとした。

## 3. 研究方法

本研究は以下の項目について実験を行った。

- 1) 知覚神経細胞におけるCGRPの発現、口腔癌細胞におけるCGRP受容体の発現の検討。
- 2) 知覚神経細胞株F11細胞の酸性環境下における神経興奮の評価。
- 3) 血管内皮細胞の管腔形成におけるCGRPの影響に関する検討。
- 4) 口腔癌細胞株の細胞増殖能に対するCGRPの影響に関する検討。

## 4. 研究成果

- 1) 知覚神経細胞におけるCGRPの発現、口腔癌細胞におけるCGRP受容体の発現について。細胞株は口腔癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS), 知覚神経細胞株F11細胞を使用した。ウェスタンブロット法を用いて、口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS) がカルシトニン作動性である乳癌細胞株MDA-MB-231と同様にCGRPのレセプターの一つであるRAMP-1を発現していることを確認した(図1)。また、F11細胞が初代培養細胞知覚神経細胞DRG(dorsal root ganglion)と同様にCGRPが発現していることも確認できた(図2)。

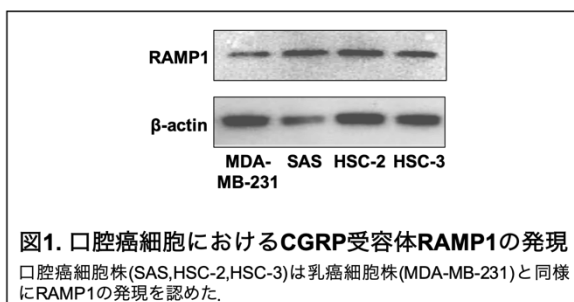


図1. 口腔癌細胞におけるCGRP受容体RAMP1の発現  
口腔癌細胞株(SAS, HSC-2, HSC-3)は乳癌細胞株(MDA-MB-231)と同様にRAMP1の発現を認めた。

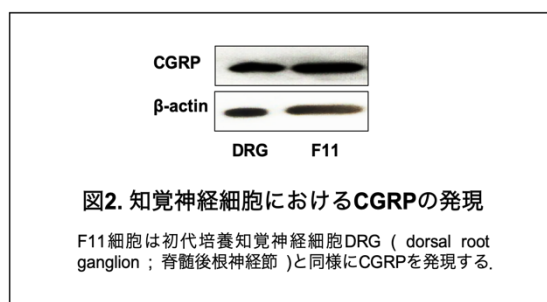
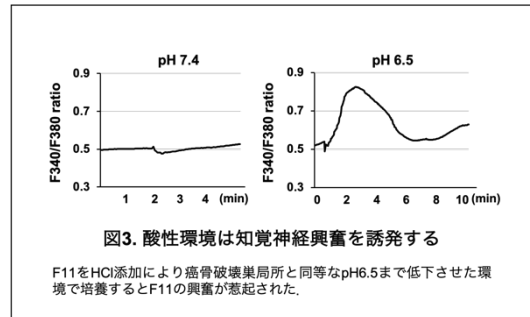


図2. 知覚神経細胞におけるCGRPの発現

F11細胞は初代培養知覚神経細胞DRG (dorsal root ganglion; 脊髄後根神経節)と同様にCGRPを発現する。

2) 知覚神経細胞株F11細胞は酸性環境下で活性化されるか？

癌骨破壊病変に特徴的な侵害刺激として癌細胞、破骨細胞が産生するプロトンが関与することが知られている。そこで、F11細胞がDRGと同様にプロトンによる刺激により活性化されるか検討した。F11細胞をあらかじめFura2蛍光色素でラベリングし、細胞興奮マーカーである細胞内カルシウム濃度を蛍光比で評価した。HCLを添加し細胞培養液注のpHを低下させると細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度が上昇し、細胞興奮が惹起されることを確認した(図3)。このことからF11細胞は少なくともin vitroにおいて知覚神経としての細胞興奮性を有していることが明らかとなった。

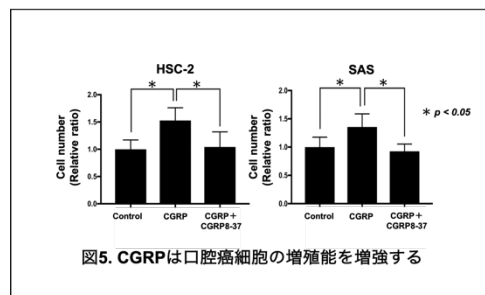
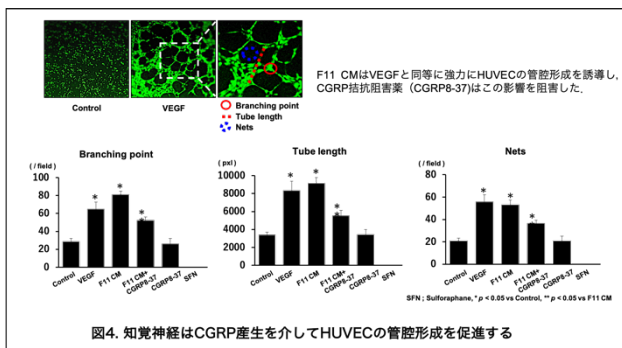


3) 血管内皮細胞の管腔形成におけるCGRPの影響に関する検討。

F11細胞の培養上清が血管新生を促進するか、Tube formation assayを用いて検討した。Matrigel上に血管内皮細胞HUVECを播種し、F11 condition medium (F11 CM), CGRP拮抗阻害薬(CGRP8-37)を添加し培養後、Branching point, Tube length, Netsを測定した。F11 CMは血管新生因子であるVEGFと同等に強力にHUVECの管腔形成を誘導し、CGRP8-37はこの影響を阻害することを確認した(図4)。このことから、知覚神経はCGRP産生を介してHUVECの管腔形成を促進する可能性が示唆された。

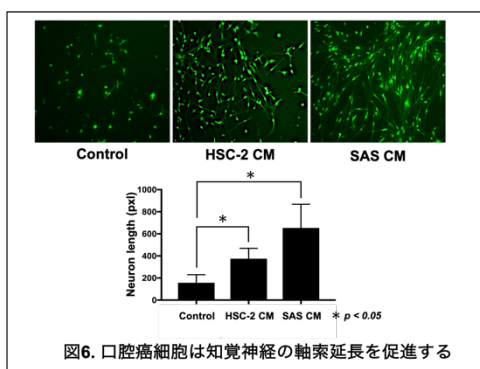
4) 口腔癌細胞の増殖能に対するCGRPの影響に関する検討。

口腔癌細胞株HSC-2, HSC-3, SASはCGRP受容体RAMP-1を発現していることから、CGRPによりシグナルが惹起する可能性が考えられた。そこで、HSC-2とSASをCGRPあるいはCGRP8-37の存在下で培養し細胞増殖能を調べたところ、HSC-2, SASともにCGRP添加により細胞増殖は促進し、CGRP8-37添加により細胞増殖は阻害された(図5)。以上の結果は、知覚神経由来のCGRPが直接的、間接的に口腔癌の増大を促進することが示唆するものであった。



5) 口腔癌細胞の培養上清が知覚神経に与える影響に関する検討。

DRGは神経培養培地中で軸索延長を示す。この実験系において、DRGにHSC-2およびSASの培養上清を添加して培養し、軸索延長が誘導されるか確認した。神経軸索はCalcein-AMで蛍光ラベルし、延長された軸索を計測した。HSC-2, SASの培養上清は知覚神経の軸索延長を誘導することが明らかとなった(図6)。



以上の結果から、癌骨破壊病変において酸性環境は知覚神経を活性化させ、疼痛を惹起すると同時に知覚神経から放出されるCGRPが血管新生を介して間接的に癌細胞の増殖を誘導すること、あるいはCGRP受容体を介して間接的に癌細胞の増殖を促進する可能性があることが示唆された。今後はCGRPが癌骨微小環境において癌細胞をとりまく細胞群（骨細胞、破骨細胞、血管内皮細胞、骨髄間質細胞など）に与える影響を明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 坂本裕美, 吉岡徳枝, 奥井達雄, 竜門省二, 伊原木聡一郎, 佐々木 朗
2. 発表標題 癌骨微量環境における神経ペプチドCGRPの役割に関する検討
3. 学会等名 第64回（公社）日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019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・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究分担者	奥井 達雄  (OKUI TATSUO)  (40610928)	岡山大学・大学病院・助教   (15301)	変更; 2020年12月1日 島根大学

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