

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17225

研究課題名（和文）知覚神経におけるHMGB1シグナルを標的とした新規口腔癌骨破壊病変治療の開拓

研究課題名（英文）HMGB1 induces bone pain associated with colonization of oral cancer in bone

研究代表者

奥井 達雄 (Okui, Tatsuo)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40610928

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）：組織アレイを用いた正常口腔組織と口腔癌組織におけるHMGB1発現の検討により、HMGB1は癌細胞、特に細胞質での発現が増加していた。HMGB1高発現口腔癌細胞SASをマウス脛骨骨髓に注入すると溶骨性の増大を示し骨髓内の痛覚神経の増成ならびに骨痛を示した。HMGB1中和抗体ならびにHMGB1受容体阻害薬はSAS担癌マウスの骨痛を緩和した。またshRNAによるHMGB1発現抑制も同様に骨痛を抑制した。癌細胞が産出するHMGB1は痛覚神経を興奮させ骨痛を誘導することが明らかになった

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床的にがんの大きさとがん性疼痛強度は相関しない場合が多く、また神経浸潤(PNI)を示すがん患者は予後不良であることから神経とがんの相互作用は予想されていたが、がん性疼痛の分子生物学的な検索は、実験手技の複雑さや電気生理学的な実験手技と分子生物学的な実験手技の差異からピットフォールになっている分野であった。報告者の検討により腫瘍細胞が産生するHMGB1により神経細胞の興奮が惹起され骨痛が増強されることを分子生物学、電気生理学的手法を用いて世界で初めて報告し、研究結果は社会的に重要なインパクトを持つと予想できる。

研究成果の概要（英文）：Oral cancer (OCa) invades to bone and causes bone pain. bone pain thus poses a significant challenge to the quality of life of patients presenting with OCa-BP. Here we studied OCa bone pain (OCa-BP) in an intratibial mouse xenograft model that uses a BCa cell line (SAS cells). These mice develop OCa-BP associated with an upregulation of phosphorylated ERK1/2 pERK1/2), which is a molecular indicator of neuron excitation in the dorsal root ganglia (DRGs) of sensory nerve cell bodies. Our experiments demonstrated that inhibition of High mobility group box1 (HMGB1) by short hairpin (shRNA) transduction, HMGB1 neutralizing antibody and HMGB1 receptor antagonist suppressed the OCa-BP and the pERK1/2 expression in DRG. Collectively, our results show that HMGB1 originating Bca evokes BCa-BP via direct HMGB1 signaling and hypersensitization for acid environment in SNS.

研究分野：癌性疼痛

キーワード：HMGB1 がん性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は高頻度に骨に浸潤し、骨痛により患者のQOLを著しく低下させる。癌が骨へ進展する過程には破骨細胞による骨破壊が必須であるが、骨膜に分布し骨形成を制御する神経線維とその興奮が、癌の増大に果たす役割は、全く解明されていない。申請者は米国インディアナ大学血液腫瘍内科、米田俊之研究室で癌と神経の相互作用に関する研究に従事し、癌細胞が産生する神経誘導因子が骨髄内における神経軸索の伸長、知覚神経の興奮を介して癌の増大を促進することを報告した(Cancer Research 2017)。本研究では多数の神経終末を有する骨における癌の浸潤、転移能獲得に対する痛覚神経の関与を神経誘導因子であるHigh mobility Group Box1 (HMGB1)に着目し検討する。申請者は、正常組織と比べ癌組織においてHMGB1の発現が増大すること、HMGB1が神経細胞の軸索伸長能を有することを報告してきた(図1,2)。またHMGB1中和抗体が転移性乳癌の骨痛を抑制することを報告している(ASBMR, 2016)。しかしながら口腔癌におけるHMGB1シグナルの重要性は不明である。本研究は口腔癌の増大、骨痛における知覚神経のHMGB1シグナルの役割を解明し、口腔癌に対する新たな分子標的治療法を確立することを目的に行う。

2. 研究の目的

HMGB1は正常細胞の核内に恒常的に発現しているが、癌細胞では細胞質における発現が増大しさらに細胞質外に能動的に産生されることが知られている。HMGB1は関節リウマチ、敗血症、自己免疫疾患などの炎症疾患において重要な役割を担い、いわゆるサイトカインストームを誘導する因子であることが知られている。HMGB1はReceptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)とToll Like Receptor 4(TLR4)を受容体とし、この受容体は癌細胞、神経細胞、破骨前駆細胞に高発現することが示されている。HMGB1の関節リウマチにおける慢性疼痛増強メカニズムは炎症性サイトカインの誘導だけでなく、破骨細胞誘導ならびに直接的な神経軸索の興奮によって引き起こされると考えられている。口腔癌におけるHMGB1発現量は正常口腔粘膜と比較し高く、口腔癌患者の血清HMGB1濃度は生命予後と関連があるとする報告があり、HMGB1シグナルが口腔癌進展を促進する事が予測される。本研究の特色は口腔癌細胞が産生するHMGB1が知覚神経興奮を介した骨内での癌増大に対する治療法の確立である。現在癌性疼痛は患者のQOL回復のための対処療法として行われているが、本研究により知覚神経の興奮つまり癌性疼痛自体が癌の増大を促進することが明白になれば、知覚神経が治療のターゲットとなる全く新しい癌分子標的治療開発の可能性がある。

3. 研究の方法

(1). 各種癌細胞における HMGB1、TLR4、RAGE、TLR2 発現量の比較検討

口腔扁平上皮癌細胞株(HSC2、HSC3、HSC4、SAS、OSC19、OSC20)また対照として HMGB1 高発現乳癌細胞株 4T1 を用いこれらの癌細胞における HMGB1、TLR4、RAGE、TLR2 の 発現量を western blot 法により測定し HMGB1 関連シグナル分子高発現群と低発現群に分ける。

(2). HMGB1 中和抗体ならびに各種阻害剤が癌細胞増殖ならびに知覚神経軸索伸長、細胞興奮に与える影響の検討

① HMGB1 中和抗体ならびに各種阻害薬の各種細胞に対する IC50 の測定: 各種口腔扁平上皮がん細胞株, HMGB1 高発現乳がん(4T1)、マウス知覚神経細胞体(DRG)、マウス 知覚神経細

細胞株(F11, 50B11)、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、血管内皮細胞(以下各種細胞と略)における HMGB1 中和抗体、各種阻害薬の IC50 測定をトリパンブルー法で行う。

②HMGB1 中和抗体ならびに各種阻害薬が各種細胞(2. i)における NF- κ B、p-ERK、p-CREB ならびに種々の骨代謝関連タンパクの発現に及ぼす影響:各種細胞(2.i)を 10%ウシ胎児血清(FBS)添加 α MEM または神経細胞専用培地で培養し中和抗体、各種阻害薬を添加し 15、60、120、360 分後に細胞を可溶化しタンパク質を回収、上記タンパクに対する抗体を用いてウェスタンブロット法にて解析する。

③ 細胞増殖能に与える影響:DRG、F11、50B11、各種細胞(2. i)を中和抗体ならびに各種阻害薬存在下 α MEM 培地で 72 時間培養し、MTT assay を行い細胞増殖能を測定する

④HMGB1 高発現口腔癌細胞株における HMGB1 タンパクの発現を shRNA システムを用い発現抑制株(v)を作成し増殖能を検討する。

⑤ DRG 神経細胞をラミニンコーティングディッシュ上で各種細胞(2. i) (2. iv) 培養上清で刺激し、神経軸索伸長能に関して検討する。これに対し HMGB1 中和抗体、各種阻害薬を添加し軸索伸長の変化を測定する。

(3). 口腔癌骨破壊モデルマウスにおける HMGB1 中和抗体、各種阻害剤の効果 HMGB1 高発現口腔癌細胞株、発現抑制株を 5 週齢雌 BalbCnu/nu 系ヌードマウス脛骨骨髓内に $1.0 \times 10^5/10 \mu l$ の濃度で打ち込み HMGB1 中和抗体、各種阻害薬を腹腔内投与する。適宜 Von Frey assay を行い癌性骨痛の評価を行う。4 週間後に X 線写真撮影を行い腫瘍増大を評価すると共に、屠殺し肺への転移を評価する。摘出した骨髓内腫瘍は知覚神経を PGP9.5 または CGRP 抗体を用いて、また新生血管を CD31 抗体を用いて染色することで定量化すると同時に ki67 にて免疫染色を行い腫瘍増殖能を評価する。

4. 研究成果

(1)口腔癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS)を用い、これらの癌細胞における HMGB1 の発現量を Western blot 法にて検討した。HSC-2,3 は HMGB1 低発現株、SAS は高発現株であった。

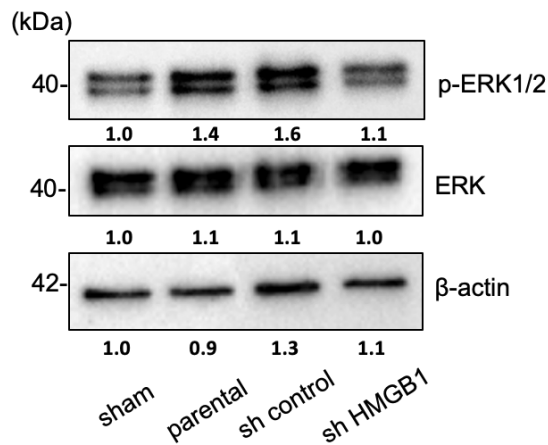
(2) RAGE アンゴニスト(FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト(TAK-242)は SAS, HSC-2 細胞の増殖抑制効果を示さなかった。マウス知覚神経細胞株(F11, 50B11)に対しても増殖抑制効果を示さなかった。

(3)知覚神経細胞(DRG)をラミニンコーティングディッシュ上で培養し神経これに対し(1)で検討した HMGB1 高発現癌細胞株 SAS の培養上清を添加し神経軸索の変化を測定すると HMGB1 高発現株 SAS 培養上清添加により知覚神経軸索伸張が著明に増加した。またこの効果は HMGB1 中和抗体ならびに RAGE 阻害薬の添加により阻害された。

(4)口腔癌細胞における HMGB1 発現が知覚神経興奮マーカーである p-ERK, p-CREB の発現に及ぼす影響: DRG 細胞 10%ウシ胎児血清(FBS)添加 Neuro basal media で培養し HMGB1 高発現群である SAS の培養上清また SAS の HMGB1 を shRNA を用いて発現抑制した培養上清を添加し 30 分後、細胞を可溶化させタンパク質を回収し上記抗体を用いてウェスタンブロ

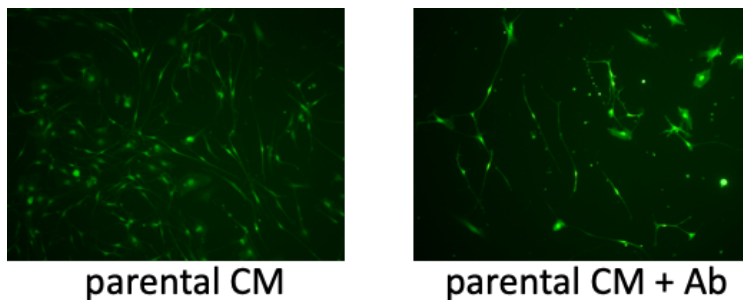
ット法にて解析を行った。

SAS 培養上清あるいはコントロール shRNA を導入した SAS の培養上清では DRG 細胞の p-ERK, p-CREB 発現が増強していることが明らかになった。対照的に 4T1 の HMGB1 を抑制すると DRG の p-ERK, p-CREB が共に抑制されることが明らかになった。(下図)



(5) DRG 神経細胞をラミニンコーティングディッシュ上で培養することで神経軸索伸長能を測定した。この培養系に対して、HMGB1 高発現群である SAS の培養上清、HMGB1 中和抗体を添加し 3 日後、神経軸索の変化を測定した。

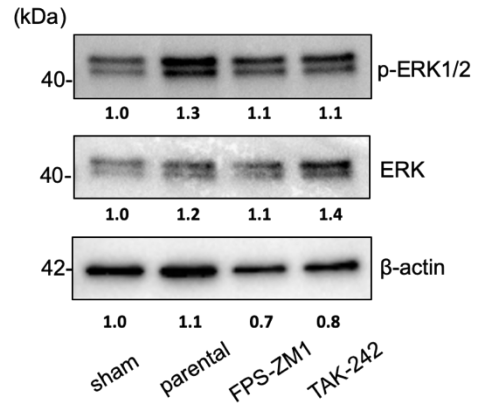
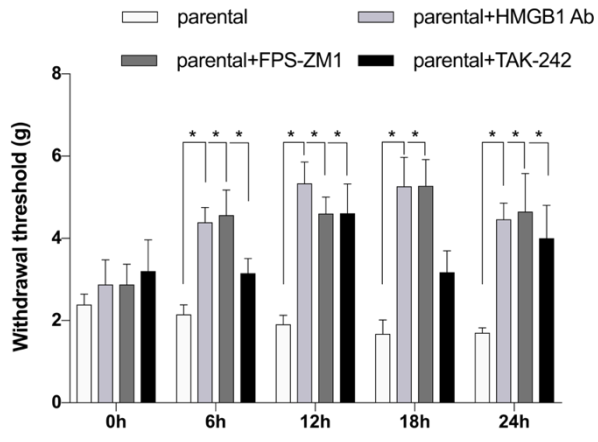
4T1 培養上清は神経軸索の伸張を有意に促進した。HMGB1 中和抗体を添加するとこの作用が阻害された。(下図)



(6). HMGB1 中和抗体, RAGE アンゴニスト (FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト (TAK-242) がマウス癌性骨痛に与える影響の検討.

HMGB1 高発現癌細胞株 SAS を 5 週齢雌 BalbCnu/nu 系ヌードマウス脛骨骨髓内に打ち込み癌性骨痛を誘導した。このマウスに RAGE アンゴニスト (FPS-ZM1), TLR4 アンタゴニスト (TAK-242) を投与し Von Frey assay をにて癌性骨痛に対する影響を評価した。

SAS 移植によって誘導された癌性骨痛は HMGB1 中和抗体投与、RAGE 阻害薬投与によって減弱した。しかしながら TLR4 阻害薬の投与は有意な疼痛減弱効果を示さなかった。また同マウスの DRG を摘出し神経細胞マーカー発現を western blot にて検討すると HMGB1 中和抗体、RAGE 阻害薬投与マウスでは ERK のリン酸化癌性骨痛による神経興奮が抑制されることが明らかになった。(下図)



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 Hasegawa Kazuaki, Okui Tatsuo, Shimo Tsuyoshi, Ibaragi Soichiro, Kawai Hotaka, Ryumon Shoji, Kishimoto Koji, Okusha Yuka, Monsur Hassan Nur, Sasaki Akira | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Lactate Transporter Monocarboxylate Transporter 4 Induces Bone Pain in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 3317 ~ 3317 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms19113317 | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|