

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03857

研究課題名(和文)破骨細胞前駆細胞から始まる全く新しい破骨細胞誘導機構と癌による骨吸収

研究課題名(英文) Analysis of the novel osteoclastogenesis system induced by oral squamous cell carcinoma cells

研究代表者

池田 通 (Ikeda, Tohru)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：00211029

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は破骨細胞前駆細胞を標的として口腔扁平上皮癌細胞が独自の機構で強力に破骨細胞を誘導することを発見し、この破骨細胞誘導にRANKL阻害薬が無効であるが、カンナビノイドの一種カンナビジオールが効果的に抑制することを見出した。本研究では、多くの口腔扁平上皮癌で高発現が認められるIL-1がRANKLによる生理的破骨細胞誘導のみならず、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞前駆細胞を標的とした破骨細胞誘導も促進することを示し、これが口腔扁平上皮癌の進展による骨の過剰吸収のメカニズムであるとする新たな仮説を世界に向けて提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の進展によって起こる過剰な骨吸収が生理的骨吸収が単に亢進したものなのか、口腔癌細胞による独自の破骨細胞誘導機構が存在するのかについては全く不明であった。我々の一連の研究により、口腔扁平上皮癌は破骨細胞への分化が決定づけられているがそのままでは破骨細胞に分化が進まない破骨細胞前駆細胞を標的として強力に破骨細胞を誘導することが示されたが、今回の研究結果はさらに、癌細胞が発現するIL-1が生理的骨代謝に加え、癌細胞による破骨細胞誘導機構もともに促進することが、口腔扁平上皮癌による骨吸収のメカニズムであることを示した。この成果によって口腔癌による骨吸収機構の全容解明に大きな進展をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Previously, we discovered that cancer cells derived from human oral squamous cell carcinoma (OSCC) induced many osteoclasts when cultured with osteoclast precursor cells but not from untreated bone marrow-derived macrophages. Osteoclast precursor cells fail to differentiate into osteoclasts without further treatment of RANKL. We also found that the OSCC-induced osteoclastogenesis did not correlate with the expression of NFATc1 and the osteoclastogenesis was resistant to denosumab but inhibited with CBD. In this study, we found that IL-1, that is widely expressed in OSCC stimulated both RANKL-induced osteoclastogenesis and OSCC-induced osteoclastogenesis independently. Our study suggests that bone resorption caused by infiltration of OSCC cells is induced by both IL-1-stimulated physiological bone resorption and IL-1-stimulated OSCC induced-induced osteoclastogenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：破骨細胞 口腔扁平上皮癌 破骨細胞前駆細胞 RANKL IL-1

1. 研究開始当初の背景

正常な骨代謝は骨形成と骨吸収が厳密にバランスを取って維持される。高齢者での骨代謝は形成に対して吸収優位になりやすく、その結果骨粗鬆症患者が増加する。生理的な骨代謝の乱れは、多分化能を有する幹細胞を用いた再生医療研究の進歩、bone morphogenetic protein (BMP)2 を代表とする骨芽細胞分化因子の発見と多くの研究、破骨細胞誘導因子 RANKL の発見と多くの関連研究により細胞生物学的に主要な部分が解明されている。現在に至るまでこれらに影響を及ぼす種々の薬物等の検討が幅広く行われてきたが、骨誘導には自家骨移植をはじめとして幹細胞を局所に移植する再生医療が、骨吸収抑制には破骨細胞誘導因子 RANKL に対する抗体製剤であるデノスマブ、または骨に集積して骨組織を吸収する破骨細胞を減少させるビスホスホネート製剤が極めて有効であり、臨床的に確固たる地位を確立している。一方、口腔領域では口腔癌がしばしば顎骨に進展し骨吸収を行うことで、予後の悪化や、顎骨の外科的切除に伴う機能的、美容的な問題を起こしている。UICC による世界標準のがん病期分類では、口腔癌が骨皮質を貫通して骨の髓室内に進展するとその時点でステージ 4 となり、進展範囲の大小にかかわらず最も進行したがんに分類されることとなっており、骨皮質の貫通が予後の悪化に直結することが示されている。また、骨皮質の貫通がなければ多くの場合顎骨の辺縁切除で外科処置を行うことができるのに対し、がんが骨皮質を貫通して骨髄質まで進展すると顎骨の区域切除が必要となるため、手術部位の機能的審美的な回復に非常に不利となる。しかしながら、口腔癌の進展によって起こる過剰な骨吸収が従来から知られている生理的骨吸収が単に亢進したものなのか、それとも口腔癌細胞による独自の破骨細胞誘導機構が存在するのかについては我々の研究が行われるまでは全く不明であり、研究の余地が大いに残されている。

2. 研究の目的

研究代表者池田は、口腔領域の悪性腫瘍の大半を占める扁平上皮癌が解剖学的な位置関係から容易に顎骨に進展し、浸潤先端で過剰な骨吸収を誘導し、生命予後および機能的、審美的な予後の悪化をもたらす原因となっていることに口腔病理専門医として心を痛めていた。これまで多くの悪性腫瘍において骨破壊のメカニズムに関する研究が行われてきたが、主要な問題点が骨転移であることから、口腔扁平上皮癌のように転移でなく骨への直接浸潤が主要な問題となる癌についての研究は必ずしも多くなかった。とはいえ、口腔扁平上皮癌細胞による過剰な骨吸収機構の研究はかなり以前から行われており、そのほとんどの研究において癌細胞が直接または間接的に発現上昇をもたらす炎症性サイトカインの作用により、破骨細胞誘導因子 RANKL の発現上昇を誘導し、その結果破骨細胞が誘導され、活性化された結果過剰な骨吸収をもたらすという結論に至っている。その一方で、ほとんどの口腔病理診断医が経験するように口腔扁平上皮癌の腫瘍間質の炎症の強さが必ずしも過剰な骨吸収と相関するとは言えないこと、また、各種炎症性サイトカインに対する阻害薬等の投与で口腔扁平上皮癌による骨吸収が劇的に改善されたという臨床的、または前臨床的な研究成果が出ていないことから、メカニズムはより複雑で、未知の機構が存在するのではないかと研究代表者池田は考えた。

これまで発表されてきた口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導研究は、そのほとんどが骨髄マクロファージと口腔扁平上皮癌細胞との共存培養、または口腔扁平上皮癌細胞の培養上清を用いたマクロファージの培養によって行われてきたが、ほぼ例外なくその破骨細胞誘導能は RANKL 蛋白を添加した陽性対照に比べて非常に低い。これは口腔扁平上皮癌細胞自体が高いレベルの RANKL を発現するのではなく、あくまでも炎症性サイトカインを発現することで骨芽細胞の RANKL 発現を刺激して従来の破骨細胞誘導を亢進しているからである、という仮説が広く信じられてきた。研究代表者池田は、口腔扁平上皮癌細胞による過剰な破骨細胞誘導の標的は骨表面のマクロファージであると考え、骨表面では RANKL を発現する骨芽細胞または骨細胞の影響を受けやすいことから、真の標的細胞は単なるマクロファージではなく、Takahashi らのグループが提唱した、弱い RANKL 刺激を受けて破骨細胞への分化が決定づけられたものの、そのままでは破骨細胞に分化できない、破骨細胞前駆細胞なのではないかと着想した。池田らは、マウス骨髄マクロファージを 24 時間 100 ng/mL の RANKL で処理することで破骨細胞前駆細胞をつくり、これと口腔扁平上皮癌細胞を共存培養すると、RANKL による破骨細胞誘導に迫る程多数の破骨細胞が誘導されること、この口腔扁平上皮癌細胞自体はほとんど RANKL の発現をしていないこと、同じ作用が口腔扁平上皮癌細胞の培養上清でも再現できることを世界で初めて示した (Biochem Biophys Res Commun 509:108, 2019; Int J Mol Sci 20:6211, 2019)。本研究は、破骨細胞前駆細胞を真の標的とした未知の破骨細胞誘導機構を細胞生物学的に明らかにすることを目的として行われた。

3. 研究の方法

破骨細胞誘導実験系の確立

これまでの研究で我々は主として口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の *in vitro* 実験系としてヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株とマウス骨髄由来マクロファージとの共存培養系と、口

腔扁平上皮癌細胞の培養上清を 40%含む培養液でマウス骨髄由来マクロファージを培養する実験系を用いてきた。マウスマクロファージを用いる理由としては、破骨細胞誘導効率が高いことがすでに認められている ddY マウス骨髄由来マクロファージを用いることで容易に解析ができること、安定した破骨細胞誘導系に有利とされるマウス由来マクロファージ細胞株 RAW264.7 が広く用いられているが、こちらは RANKL による破骨細胞誘導にだけ反応するとされ、今回の研究のように従来の破骨細胞誘導機構とは異なる新規破骨細胞機構の研究には向いていない可能性があること、癌細胞がヒト由来でもマウスマクロファージで問題なく破骨細胞を誘導することが挙げられる。本研究では口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の原因因子の探索を行うため、よりシンプルな培養上清を用いた実験系を用いる必要があった。しかし、癌細胞との共存培養と比較して培養上清による破骨細胞誘導は弱く、かつ不安定な傾向があった。本研究では、破骨細胞誘導能を最大限に発揮させるために最適な培養用ウシ胎児血清のスクリーニングからやり直し、かつ、培養上清採取の条件を再検討し、口腔扁平上皮癌の培養上清を用いて安定して多数の破骨細胞誘導が可能な方法を確立した。

生後 5 週齢オス ddY マウス骨髄由来マクロファージを 100 ng/mL の RANKL を添加した 10% ウシ胎児血清 (HyClone 社) 入り MEM- α 培養液で 24 時間処理することで、破骨細胞前駆細胞化した。ヒト口腔扁平上皮癌細胞 NEM-F または NEM-K を 3×10^4 個と作製した破骨細胞前駆細胞 3×10^4 個を混合し、共存培養する。または、上記破骨細胞前駆細胞をサブコンフルエントの状態 で 10% ウシ胎児血清入り MEM- α 培養液で 24 時間ないし 48 時間培養し、培養上清を採取、1500 rpm で 10 分遠心して細胞残渣を除去後、上記培養液に 40%の割合で混合した培養液中で培養する。培養 5 日目で形成された破骨細胞を酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色し、評価した。また、破骨細胞誘導能を有する多くのヒト口腔扁平上皮癌細胞株の中でも扱いやすい細胞である NEM 細胞のサブクローンから、破骨細胞誘導能の高い NEM-F と、破骨細胞誘導能を失った NEM-K の 2 種を選択し、これらの細胞を用いて一連の実験を行った。

口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導に関わる蛋白候補のスクリーニング

NEM-F および NEM-K 細胞から total RNA を抽出し、遺伝子発現マイクロアレイで発現遺伝子を比較し、破骨細胞誘導能のある NEM-F で高発現、破骨細胞誘導能がない NEM-K で低発現の遺伝子から、候補蛋白の選別を行った。これらの蛋白についてリコンビナント蛋白を購入し、上記破骨細胞培養系に添加し破骨細胞誘導への影響を確認することで候補蛋白を絞り込んだ。さらに、これらの蛋白の阻害分子が明らかにされている場合は、阻害分子を入手し、それを上記の実験系に添加することで候補蛋白の破骨細胞誘導への影響を裏付けた。

口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の阻害薬 CBD の作用機序の検討

我々はこれまでの研究で、精神神経作用のない大麻由来のカンナビノイドの一種、カンナビジオール (CBD) が、我々の発見した口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導を効果的に阻害することを見出していた。また、世界のこれまでの研究から、カンナビノイドが破骨細胞誘導に影響を及ぼすこと、その過程にカンナビノイド受容体の一種 GPR55 が関与し、GPR55 のアンタゴニストである CBD が影響を与えることを示唆する報告がなされている (Proc Natl Acad Sci USA 106:16511, 2009)。本研究では GPR55 と相互作用がある CBD 以外の分子、LPI、O-1602 および ABN-CBD を口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導系に添加することで、この破骨細胞誘導が GPR55 に関与するか否かを検討した。

破骨細胞誘導のマスター転写因子 NFATc1 発現の検討

我々はこれまでの研究で、RANKL の継続刺激による従来型の破骨細胞誘導では誘導される破骨細胞数に相関して NFATc1 の発現が上昇するが、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞前駆細胞を標的とした破骨細胞誘導では、多数の破骨細胞が誘導されても NFATc1 発現は破骨細胞数と相関せず、発現が低いままであることを示し、これが、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導が RANKL 継続刺激による従来型の破骨細胞誘導とは異なる新規の破骨細胞誘導機構によるものであることの傍証となっている。さらに、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導では RANKL の阻害薬であるデノスマブも OPG も全く無効であることも示してきたが、本研究では、絞り込んだ分子による破骨細胞誘導の促進作用が従来型の破骨細胞誘導機構を促進したものなのか、口腔扁平上皮癌細胞による新たな破骨細胞誘導機構を促進したものであるのかを検証するために NFATc1 の発現を定量的 PCR によって解析した。

口腔扁平上皮癌細胞により誘導された破骨細胞の機能解析

我々はこれまでの研究で口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導を示してきたが、誘導された破骨細胞様細胞が機能的にも RANKL 継続刺激により誘導された通常の破骨細胞と同様の骨吸収活性があるか否かは明らかにできていなかった。本研究では、ハイドロキシアパタイトコーティングディッシュ上で破骨細胞誘導実験を行い、吸収窩を定量評価することで口腔扁平上皮癌細胞により誘導された破骨細胞の機能を解析した。

4. 研究成果

多くの口腔扁平上皮癌細胞株は破骨細胞前駆細胞から多数の破骨細胞前駆細胞を誘導する

我々はこれまで NEM と 3A という 2 種類の人口腔扁平上皮癌細胞を用いて研究を進めてきたが、保有する他の人口腔扁平上皮癌細胞株、Ca、HSC-2、HSC-3、NA、NU、OMI および SH でも強い破骨細胞誘導能が見られる。本研究結果は、多くの口腔扁平上皮癌細胞が共通して破骨細胞前駆細胞から多数の破骨細胞を誘導する能力を有していることを強く示唆している。

口腔扁平上皮癌の多くが高い発現をしていることが示されている IL-1 が、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導と RANKL 継続刺激による従来型の破骨細胞誘導の双方を独立して促進する

破骨細胞誘導能を有する NEM-F が破骨細胞誘導能をもたない NEM-K の 4 倍以上高発現する遺伝子のうち、培養上清中にも活性分子が含まれることから、可溶性のサイトカインを指標としてスクリーニングしたところ、12 種類の候補遺伝子を抽出することができた。これらのうち、過去に破骨細胞誘導を促進するという報告が見られる IL-1 α 、IL-1 β 、IL-8 および CXCL1 と、間接的に破骨細胞誘導に関わるとの報告がある IL-6 を加えた 5 種類のサイトカインについて *in vitro* での破骨細胞誘導への影響を検討した。破骨細胞前駆細胞を破骨細胞誘導能を有さない NEM-K 細胞と共存培養する系にこれらのサイトカインを添加しても、破骨細胞は全く誘導されなかった。しかし、IL-1 α および IL-1 β だけは、NEM-F 細胞による破骨細胞誘導を有意に促進した。また、興味深いことに、IL-1 で促進した口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導は RANKL 阻害薬であるデノスマブの作用に対し耐性で、CBD により阻害された。IL-1 は RANKL による破骨細胞誘導を促進することが知られており、これらの結果は、IL-1 は口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導と RANKL 継続刺激による破骨細胞誘導の双方をそれぞれ独立したメカニズムで促進している可能性を示唆している。

IL-1 インヒビターは口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導および骨吸収を有意に阻害する

IL-1 α 、IL-1 β は同じ受容体を通して作用することから、IL-1 に対するインヒビターとして、IL-1 receptor antagonist (IL-1R) を用いることとした。また、IL-1 受容体を認識し、結合するが、阻害的に働くアンタゴニスティック抗体も用いた。これらの IL-1 阻害分子を口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導系に添加したところ、どちらも有意に破骨細胞誘導を阻害した。また、ハイドロキシアパタイトコーティングディッシュ上で同様の実験を行った結果、これらの阻害分子は誘導された破骨細胞による骨吸収量も有意に減少させた。これらの結果と、一般的に多くの口腔扁平上皮癌が高いレベルの IL-1 を発現している事実を合わせると、IL-1 は口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導を促進する分子として重要な働きをしていることが強く示唆されるとともに、IL-1 に対する阻害薬が口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導抑制薬として有効に働く可能性も示唆された。さらに、IL-1 の添加による口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の促進および IL-1RA による阻害は、破骨細胞誘導のマスター転写因子 NFATc1 の発現レベルに全く影響を与えず低いレベルが維持されたままであったことから、これらの促進、阻害効果は RANKL 継続刺激による破骨細胞誘導と異なる機構である口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導機構に対して独自に働いていると考えられた。

IL-1RA は口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導を有意に阻害するが、CBD と IL-1RA を加えても相加的阻害効果は得られない

我々はこれまでの研究で、カンナビノイドの一種、CBD が口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導を強く阻害することを発見した。今回の研究の結果から、IL-1 阻害薬と CBD をともに加えると相加的に破骨細胞誘導が阻害される可能性があると考えられた。しかし、IL-1 の添加によっても CBD による破骨細胞誘導の阻害効果の増強は見られなかった。この研究結果は、今後口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の阻害薬を開発するにあたり、重要な情報を提供していると思われる。

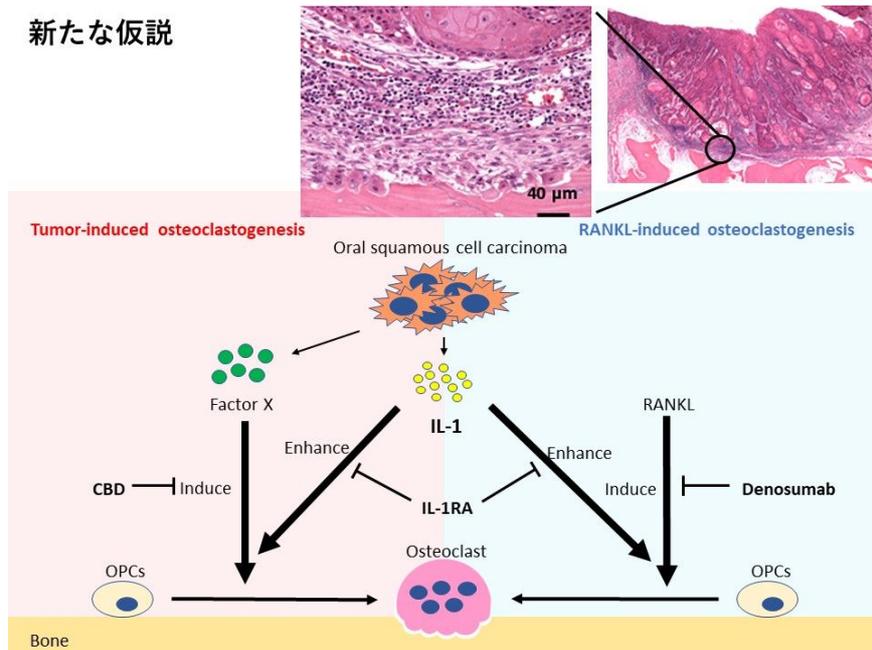
カンナビノイド受容体の一種 GPR55 は口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導に関与する

過去の報告から CBD がカンナビノイド受容体の一種 GPR55 と相互作用があり、かつ、GPR55 に対して阻害的に働くことが示唆されていた。そこで、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導に対する GPR55 の関与の有無を明らかにする目的で、GPR55 に対して機能促進作用を示すとされる分子、LPI、O-1602 および ABN-CBD を口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導系に添加する実験を行った。その結果、CBD は破骨細胞誘導を有意に阻害し、O-1602 および ABN-CBD は破骨細胞誘導を有意に促進した。これらの結果から、我々が発見した破骨細胞前駆細胞を標的とした口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導機構に GPR55 が何らかの関与をしていることが示唆された。

口腔扁平上皮癌による顎骨破壊機構の新たな仮説の提唱

IL-1 は多くの口腔扁平上皮癌で高い発現がみられること、IL-1 は RANKL 継続刺激による生理的破骨細胞誘導を促進することがすでに証明されていることから、口腔扁平上皮癌による顎骨破壊に IL-1 が関与していることが強く疑われ、最も重要な機構の一つとして広く受け入れられてきた。本研究成果はこれに加え、口腔扁平上皮癌細胞による独自の破骨細胞誘導機構があり、これに対しても IL-1 は独立して促進効果を発揮することを示した。これらを総合し、口腔扁平上皮癌細胞が発現する IL-1 が RANKL 継続刺激による生理的な破骨細胞誘導を促進するとともに、口腔扁平上皮癌細胞による独自の破骨細胞誘導も独立して促進し、総合的に顎骨の吸収、破壊を強力に促進するという新たな仮説を世界に示すことができた。

新たな仮説



今後の課題

本研究では、当初目指していた、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導の原因分子の特定には至らなかったが、多くの口腔扁平上皮癌で高い発現が見られる IL-1 に関する研究は非常に重要な意味を持つため、IL-1 の作用に集中してその後の研究を進めた。しかし、原因分子の特定を目指した研究は研究期間中継続されており、口腔扁平上皮癌細胞による破骨細胞誘導機構の全容解明が今後可能になると期待される。

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 Fukawa Y, Kayamori K, Tsuchiya M, Ikeda T.	4. 巻 24
2. 論文標題 IL-1 Generated by Oral Squamous Cell Carcinoma Stimulates Tumor-Induced and RANKL-Induced Osteoclastogenesis: A Possible Mechanism of Bone Resorption Induced by the Infiltration of Oral Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int. J. Mol. Sci.	6. 最初と最後の頁 688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms24010688.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 布川 裕規、栢森 高、池田 通
2. 発表標題 IL-1を介した口腔扁平上皮癌による破骨細胞誘導の促進
3. 学会等名 第33回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2022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	栢森 高 (Kayamori Kou) (10569841)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	
研究分担者	坂本 啓 (Sakamoto Kei) (00302886)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

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	布川 裕規 (Fukawa Yuki)		

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