

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23024

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌の骨破壊における癌-間質相互作用

研究課題名(英文) Diversity of cancer-mediated bone destruction in oral squamous carcinoma

研究代表者

宮川 和晃 (Miyagawa, Kazuaki)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50635381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の顎骨内浸潤は、破骨細胞の異常な活性化によりが虫喰い状の骨吸収を示す病態と、緩慢に骨吸収が進行するものに大別される。本研究は口腔扁平上皮癌の骨吸収様式を決定する分子機序を解明するために病態モデルマウスによる解析を行った。マウス扁平上皮癌細胞株(SCC VII)の2亜株をC3Hマウスの頭頂骨骨膜近傍に播種し、腫瘍(破壊型、緩慢型)が形成されるシンジェニック担癌モデルマウスを作成・表現型を比較した。その結果、細胞性免疫に関与する液性因子Xの浸潤型における発現が圧迫型よりも多く、液性因子Xを高発現する腫瘍細胞は腫瘍組織内Tリンパ球に依存した骨吸収を促進させる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我が国における口腔がんの患者数は近年急増している。歯肉癌と呼ばれる口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤には浸潤型と圧迫型に大別され、治療法の選択や予後の予測に重要である。本研究は骨破壊の表現型によって腫瘍内に起きている状況を探した結果、破骨細胞形成に関わる免疫機構に違いがあることを見出した。この結果は顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌の新規治療や予後を予測するための検査に応用することができる可能性を含んでいる。

研究成果の概要(英文)：Bone invasions by oral squamous cell carcinoma (OSCC) are classified into two types: one is the invasion type which abnormal activation of osteoclasts causes bone resorption, and the other is the compressive type which is slowly progressive bone resorption. In this study, we investigated the molecular mechanisms that determine the bone resorption phenotypes by OSCC using syngeneic mouse models of OSCC. Syngeneic carcinoma-bearing mouse models in which tumors (destructive and compressive types) were formed were generated due to seed two subtypes of a murine squamous cell carcinoma cell line near parietal periosteum in calvaria of C3H mice. These were compared to bone phenotypes. The results showed that factor X, which is involved in cellular immunity, was higher gene expression in the invasive type than in the compressed type. This study suggested that tumor cells expressing high levels of factor X may promote bone resorption dependent on T lymphocytes in the tumor tissue.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 骨破壊 破骨細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国における口腔がんの患者数は、最近の30年で4倍(約8000人)に急増しており、今後さらに増加することが予測されている。口腔は摂食・嚥下・呼吸・会話などの多くの複雑な機能を持つ領域であることから、口腔がんは治療を行ったとしても大幅なQOLの低下が生ずることが問題であり、口腔外科領域においてもがん研究は重要である。

歯肉上皮に発生する扁平上皮癌、すなわち歯肉癌の原発巣は内向性に進展すると歯肉直下の顎骨を破骨細胞の活性化によって破壊する。その顎骨への進展様式は病理組織学的に積極的な骨破壊を伴う浸潤型と腫瘍増大に伴って骨が圧迫されるように吸収される圧迫型に大別される。浸潤型歯肉癌に見られる顎骨内浸潤はエックス線上では境界不明瞭で、病理像では異常な破骨細胞形成が先行する。口腔がんに関わるガイドラインでは、この進展様式による分類は歯肉癌の有用な組織学的悪性度分類であり、浸潤型の歯肉癌の方が圧迫型よりも予後不良とされている。しかし、歯肉癌の病型に関連した生物学的特性がいまだ解明されていないため、病態に対応した歯肉癌への標準的な治療戦略は見いだされていない。

申請者は、先行研究においてマウス扁平上皮癌細胞株 SCC の2種類の亜株(浸潤型・圧迫型株)を正常なマウス免疫機構を有する C3H/HeN マウスの骨膜近傍に播種することで口腔扁平上皮癌の骨病変を模したシンジェニック担癌マウスの作成に成功した。これらの腫瘍性骨病変は組織学的に浸潤型・圧迫型を示す口腔扁平上皮癌患者の骨病変に類似しており、この担癌マウスを腫瘍モデルとして骨吸収型を決定する機序解明に取り組んできた。骨破壊型が異なる分子生物学的要因を検討している。研究当初、インターロイキン(IL)-6や副甲状腺ホルモン関連タンパク質といった炎症性骨病変や転移性骨腫瘍において破骨細胞の分化・成熟に深くかわる液性因子の腫瘍内濃度を検討していた。しかし、これらの液性因子の産生量の差だけでは骨破壊型の違いを説明するには至っていなかった。

これらのことから、申請者は浸潤型腫瘍における異常な破骨細胞形成に関わるメカニズムをより詳細に解明してゆこうと考えた。

2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌の基礎研究は血管新生や転移に関するものが多いが、本研究は骨破壊に着目する。また、我々は正常の免疫機能を持つマウスに癌細胞株を播種することで歯肉癌に近似した病態を再現することに成功しており、患者検体での検討と合わせることで詳細なエビデンスを得ることができると考える。また、得られる成果は歯肉癌の腫瘍微小環境の多様性や治療抵抗性との関連を解明するのに重要な基盤となり、診断や新規治療への応用が期待される。そこで、2種類(浸潤型および圧迫型)の骨吸収型を示す口腔扁平上皮癌の骨病変モデルを模したシンジェニック担癌マウスを作成し、骨吸収型を決定する分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌の骨病変を模したシンジェニック担癌マウスの作成

マウス口底癌より樹立された扁平上皮癌細胞株(SCC)を通常の免疫機構を有する近交系(C3H/HeN)マウスの骨膜近傍に播種すると骨吸収を伴う腫瘍を形成したシンジェニック歯肉癌モデルマウスを作成することができる。申請者は、SCCより得た2種類の亜株(A・B)を保有しており、細胞株Aは浸潤型の歯肉癌に類似した積極的な骨吸収を、細胞株Bは圧迫型に類似した緩慢な骨吸収を示す腫瘍を形成させた。本研究では、細胞株AをC3H/HeNマウス頭蓋骨または顎骨への播種より得た腫瘍を歯肉癌「浸潤型モデル」、細胞株Bの播種より得た腫瘍を「圧迫型モデル」として扱った。

(2) RNA シーケンス

SCC細胞移植2週間後に腫瘍の浸潤先端部の組織を摘出し、全RNAサンプルをRNA-Seq解析(Hi-Seq 3000、イルミナ社)に用いた。シーケンスデータはウェブツールのiDEP.91(<http://bioinformatics.sdstat.e.edu/idep/>)を用いて遺伝子発現差解析を行った。また、亜株A、Bでそれぞれ2.0倍以上有意に高発現している遺伝子を抽出し、Gene Ontology解析(Unifying Biology, <http://geneontology.org/>)によって特徴的な分子機能群についてクラスタリング解析を行った。また、播種前の亜株A・Bについても同様の方法でRNA-Seq解析をおこなった。

(3) 組織学的解析

摘出した腫瘍及び骨組織を10%中性緩衝ホルマリン液(和光8純薬工業株式会社)に48時間浸漬固定後、15%EDTA水溶液にて14日間脱灰後パラフィン包埋を行った。薄切切片はヘマトキシリン-エオジン染色(H-E染色)、免疫組織化学染色、免疫組織化学蛍光二重染色、頭蓋骨腫瘍組織は酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色に用いた。作成した組織切片は顕微鏡(BZ-X800、KEYENCE、大阪、日本)にて観察し、写真撮影した。

(4) ノードマウスを用いた解析

扁平上皮癌の骨吸収におけるT細胞の関与を検討するため、C3H/HeN/Jel雌マウスとT細胞の機能不全しているBALB/cSlc-nu/nu雌ノードマウスのそれぞれの頭蓋骨骨膜近傍にSCC細胞4亜株Aを移植し、2週間後に動物用マイクロCT撮影し、両者の骨吸収程

度を解析し、扁平上皮癌の骨吸収における T 細胞の関与を検討した。3 次元構築画像を頭頂部真上から撮影し、2 次元化した写真の骨表面の穿孔領域および腫瘍領域の面積を Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) にて算出し、腫瘍領域に対する骨穿孔領域の割合を計測した。

(5) 統計解析

実験結果は以下の方法で統計学的に比較検討した。3 群以上の分析では一元配置の分散 (ANOVA) 後、Turkey-Kramer test を用いて多重比較を行った。またその他すべての二群間の有意差検定はマンホイットニー検定を用いて行い、図中の表記は、測定結果の p 値に応じて、*、 $p < 0.05$ 、**、 $p < 0.01$ とした。

4. 研究成果

(1) RNA-seq 解析による液性因子 X への注目

扁平上皮癌マウスモデルの浸潤型腫瘍、圧迫型腫瘍 においてそれぞれ特徴的な部位での腫瘍組織から得られた転写産物の総リード数は亜株 A は約 2500 万リード、亜株 B は約 3000 万リードであった。ウェブツールサイト iDEP.91 で遺伝子発現の解析をおこなったところ、24,347 遺伝子が 同定された。その中で浸潤型および圧迫型における発現量が他方の 2 倍以上高値であった遺伝子はそれぞれ 792 個 (浸潤 > 圧迫)、987 個 (浸潤 < 圧迫) あった。Gene Ontology 解析によってそれぞれの腫瘍において特徴的な分子機能群について検討したが両者で大きな差は認められなかった。そこで浸潤型に有意に高く発現する分子群の中で、骨吸収に関与する液性因子に対する遺伝子を探索した。その結果、リンパ球の遊走・分化に関与し、かつ、破骨細胞の分化成熟に関与する液性因子 X に注目し、浸潤型における遺伝子発現量が圧迫型と比較して約 7.8 倍高いことを見出した。細胞株のみの RNA-seq 解析においても浸潤型腫瘍を形成する A 株における発現が圧迫型腫瘍を形成する B 株よりも 7.1 倍高く、また、リアルタイム PCR 解析でも A 株は B 株より 5.5 倍高いことを確認した。興味深いことに破骨細胞の分化成熟に直接関与するとされた IL-6 や PTHrP、RANKL などの液性因子に関しては RNA-seq 解析では発現差を見出さなかった。

これらの網羅的解析の結果から腫瘍細胞より産生される液性因子 X に注目した解析を進めることとなった。

(2) 液性因子 X による腫瘍組織の細胞性免疫の変容と骨表現型との関連の解明

実際に浸潤型腫瘍ではリンパ球浸潤が多いのかを確認するために、CD3 陽性細胞の腫瘍内浸潤を免疫組織化学染色にて確認した。CD3 陽性細胞は浸潤型モデルにおいて高度集積を認め、定量化すると浸潤型モデルでは圧迫型モデルよりも明らかな高値を示した。また、腫瘍内に浸潤した T 細胞が RANKL 発現しているのかを検討するため浸潤型腫瘍および圧迫型腫瘍における蛍光二重染色を行った。CD3 陽性 T 細胞は浸潤型腫瘍と骨の境界領域に観察され、圧迫型腫瘍ではごくわずかに観察されるのみであった。浸潤型腫瘍では RANKL も腫瘍と骨の境界に観察され、腫瘍内にも類円形の細胞が陽性を示した。これらを Marge すると、CD3 陽性細胞と RANKL 陽性細胞が腫瘍骨領域に存在することが明らかとなった。一方、圧迫型腫瘍では RANKL 陽性の T 細胞はほとんど観察されなかった。この結果から、RANKL 陽性 T 細胞が浸潤型骨吸収に関与する可能性が示唆された。

A 株の播種が腫瘍内への T 細胞浸潤を促進させるのかを機能的に検討するため、細胞性免疫不全状態を模した Balb/c 系ヌードマウスの頭部への細胞株移植実験をおこなった。移植 2 週間後にマイクロ CT 撮影による骨に接している腫瘍の面積および骨吸収面積の検討および組織学的検討 (TRAP 染色) による破骨細胞の出現度を検討した。その結果、ヌードマウスの腫瘍面積は C3H マウスを用いたシンジェニックマウスよりも有意に増大する一方、骨穿孔領域は 50 % 以上狭小化した。そして、腫瘍面積あたりの骨吸収面積の割合を計算すると、ヌードマウスでの腫瘍の骨穿孔率は C3H マウスよりも約 25% に減少した。組織学的検討では腫瘍先端における破骨細胞形成数も著しく減少していることを確認した。これらの結果から T 細胞を欠く、ヌードマウスでは骨吸収が低下することから、腫瘍内 T 細胞が骨吸収に関与することが強く示唆された。

(3) 中和抗体を用いた腫瘍性骨吸収の抑制作用によって液性因子 X の作用を検討

液性因子 X が、マウスモデルの骨吸収に関与するかを検討するために、浸潤型腫瘍モデルに対して液性因子 X に対する中和抗体を腫瘍近傍 (局所投与：腫瘍への直接投与) および腹腔内 (全身投与) に投与し、マイクロ CT 撮影による腫瘍や骨吸収の程度ならびに定量的 PCR による骨吸収や破骨細胞マーカー発現を検討した。

対照群はコントロール IgG2a 抗体の全身投与とした。浸潤型腫瘍の大きさ・骨に接している腫瘍の面積はいずれの群も差を認めなかったが、骨吸収面積ならびに腫瘍面積あたりの骨吸収面積の割合に関しては中和抗体の局所投与・全身投与群の両方において、対照群と比較して 60% 以上減少した。TRAP 染色による組織学的検討でも破骨細胞の誘導が中和抗体によって抑制されていることを認めた。

次に、各群の腫瘍組織での破骨細胞形成に関連する遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量的に比較した。その結果、腫瘍内の Rankl 発現は対象群に対して局所投与群では 35% まで、全身投与群では 56% まで減少した。破骨細胞形成と活性化に関与する Rankl/Opg 比は、局所投与群で 8%、全身投与群で 76% に低下した。また、破骨細胞マーカーである TRAP

をコードする Acp5 遺伝子発現量は局所投与群で 8%、前肢投与群で 7%に有意に低下していた。破骨細胞の活性を表す Ctsk 発現量は局所投与群で 18%、全身投与群で有意 21%に低下した。

(4) 本研究の成果の国内外における位置付けとインパクト、その後の展望

研究当初は、先行研究や乳癌の骨病変を中心とした病的な骨吸収研究から、浸潤型腫瘍の出現には破骨細胞の分化・成熟に直接関与する液性因子群 (IL-6、PTHrP、TNF- など) が深く関与しているものと考えていた。しかしながら、これらの液性因子群は浸潤型・圧迫型いずれにおいても骨吸収が生じている段階で高発現しており、かならずしも骨吸収の病態を決定する要因ではないことが考えられた。その結果、RNA-Seq 解析を中心とした網羅的遺伝子解析を行うこととなり、液性因子 X を注目するに至った。

液性因子 X については免疫賦活化作用などで注目されている因子であるが、生理状態と病的状態における挙動が異なることが生物学的作用への理解を困難にさせている。国内外の論文を渉獵すると、液性因子 X には特に細胞性免疫の賦活化を促進させることから生体恒常性を調整する因子としてポジティブに捉える報告がある一方、悪性腫瘍における液性因子 X は予後不良症例に高く発現することも示唆されている。そして、本研究では口腔扁平上皮癌における骨病変において液性因子 X を注目し、浸潤性の骨吸収型の出現には液性因子 X によるリンパ系細胞の遊走による破骨細胞の活性化機序を見出した。すなわち、本研究で見出された液性因子 X は扁平上皮癌に出現した骨病変の病態を制御する重要な因子として将来の口腔がんの治療ならびに悪性度診断や治療効果を判定するためのマーカーになりうる可能性を含んでいるものと思われる。

本研究では口腔扁平上皮癌の腫瘍微小環境において「液性因子 X-細胞性免疫-破骨細胞誘導」という軸を見出した。しかし、細胞性免疫を担当して腫瘍内に浸潤する細胞は多岐にわたり、本研究期間中にはその点の解明は行われていない。先述の治療や診断への応用へはさらなる検討が必要と考え、現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagata Yuki, Miyagawa Kazuaki, Ohata Yasuhisa, Petrusca Daniela N., Pagnotti Gabriel M., Mohammad Khalid S., Guise Theresa A., Windle Jolene J., David Roodman G., Kurihara Noriyoshi	4. 巻 122
2. 論文標題 Increased S1P expression in osteoclasts enhances bone formation in an animal model of Paget's disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cellular Biochemistry	6. 最初と最後の頁 335 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jcb.29861	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 該当する

1. 著者名 MIYAGAWA Kazuaki, TANAKA Susumu, HIROISHI Sachie, MATSUSHITA Yutaka, KOGO Mikihiro	4. 巻 66
2. 論文標題 Comparative evaluation of bone microstructure in alveolar cleft repair by cone beam CT: influence of different autologous donor sites and additional application of <i> </i>- tricalcium phosphate	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 660 ~ 668
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5794/jjoms.66.660	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 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮川和晃
2. 発表標題 アメリカ留学報告 -インディアナ大学での研学生活-
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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