

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21071

研究課題名（和文）FLRT2を介した癌骨浸潤・転移機構の解明とその制御による骨転移予防の可能性

研究課題名（英文）Elucidation of cancer bone infiltration and metastasis via FLRT2 and evaluation of possibility of bone metastasis prevention by Flrt2 control.

研究代表者

白川 純平（Shirakawa, Jumpei）

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：90782996

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：骨芽細胞においては、分化誘導実験においてFlrt2の発現低下を認めた。腫瘍組織検体を用いたRNAシーケンスでは、脈管浸潤を示すグループで発現に変化を認めた遺伝子の解析から、FLRT2の有意な発現増加が見られた。数種の口腔扁平上皮癌細胞株内における発現を再検した結果、細胞株ごとに大きく発現、分泌型タンパク質が異なっていた。骨芽細胞株MC3T3E1及び癌細胞株SKN3にFLRT2を過剰発現させた結果、骨芽細胞では増殖および分化の減少を、癌細胞では増殖の亢進を認めた。以上の結果から、FLRT2は破骨細胞では促進的に、骨芽細胞では抑制的に作用することが示され、癌細胞では増殖に寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FLRT2の発現は癌の種類によって異なり口腔癌における検討は多くはなされていなかった。今回の研究で脈管浸潤を示した検体でその発現の増加が見られたことは本研究の仮説と合致する。既報の破骨細胞における作用に加え骨芽細胞ではその発現が分化の過程で減少していくこと、過剰発現により分化を抑制することが明らかとなったことで癌細胞により分泌されるFLRT2が骨代謝細胞に作用する可能性が示唆された。これはFLRT2が癌の予後因子の候補となるだけでなく分子標的治療の対象としても大変重要であり今後の口腔癌治療に寄与することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In osteoblasts, Flrt2 expression significantly decreased in differentiation induction experiments. RNA-sequencing of tumor tissue from clinical specimens showed several up and down regulating genes. And significant up regulation of FLRT2 by analysis of genes whose expression was altered in the group showing vascular invasion was detected. As a result of reexamination of the expression in several oral squamous cell carcinoma cell lines, the expression and secretory proteins differed greatly depending on the cell line. Over expression of FLRT2 in osteoblast cell line MC3T3E1 and cancer cell line SKN3 resulted in decreased proliferation and differentiation in osteoblasts and increased proliferation in cancer cells. These results indicate that FLRT2 promotes osteoclasts and suppresses osteoblasts, and contributes to the proliferation of cancer cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：口腔扁平上皮癌 局所骨浸潤 遠隔骨転移 破骨細胞 骨芽細胞 FLRT2 分泌タンパク質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

国内の癌患者のうち口腔癌の占める割合は 2~5%程度で希少癌とされ認知度は高くない。初期に発見できれば外科手術が有効だが、実際には自覚症状に乏しく発見が遅れ、顎骨への浸潤が高頻度にみられる。進展例ではその浸潤範囲を同定するのに難渋し、外科的切除範囲の拡大や組織再建に加え、放射線療法・化学療法などの術後補助療法が必要となり、患者の QOL は急激に低下する。骨浸潤・転移において癌細胞は骨表面に到達すると周囲の骨代謝細胞（骨芽細胞及び破骨細胞）に働きかけ骨基質を破壊させ内部へと浸潤していくとされているがその機序の多くは明らかにされていない。そのため、骨浸潤・転移に対する治療は、ビスフォスフォネート製剤または抗 RANKL 抗体（デノスマブ）により破骨細胞による骨吸収を阻害することで間接的に癌細胞の骨内浸潤・進展に対抗するしかない。しかしこれらは、正常な骨代謝も著しく阻害してしまい、顎口腔領域にける顎骨壊死のリスクを増加させる。口腔癌細胞が骨浸潤・転移するうえで骨代謝細胞に直接作用し正常な骨代謝機構を破綻させる新たな機序を解明することは、その機序を標的とした癌骨浸潤・転移に対する有効な治療法を確立するうえで重要な課題である。

2. 研究の目的

2011 年に細胞膜より切断、分泌されるタンパク質として報告された FLRT2—(Fibronectin leucine-rich repeat transmembrane protein 2) (1)の機能として、2019 年に申請者は破骨細胞の成熟が FLRT2 により調節されることを明らかにした(2)。2020 年、重度の疼痛を訴え早期にリンパ節転移を伴った口腔癌患者の癌細胞における FLRT2 の発現増加が報告された(3)。これは、癌細胞の分泌する FLRT2 が神経、リンパ管などの周囲組織への浸潤に寄与する可能性を示唆していた。一方いくつかの報告では Flrt 2 が腫瘍細胞の抑制因子として働く可能性を報告しておりその機能に関しては完全には明らかとなっていない(4)。これらの報告を基に、局所に発生した癌細胞が骨へ浸潤・転移する機構として『癌細胞が FLRT2 を発現・分泌することにより周辺及び遠隔の骨代謝細胞に働きかけ、骨浸潤・転移に都合の良い環境を作り出す』という新規病態仮説を立てその検証を目的とした。

3. 研究の方法

『FLRT2 高発現癌細胞による骨代謝機構の破綻』の検証ともいえる本研究での命題として

: FLRT2 はどのような分子細胞学的メカニズムで癌細胞・骨芽細胞を制御しているのか？

: FLRT2 を高発現・分泌する癌細胞の近傍の細胞はどのような挙動を示し、制御されるのか？

その検証のために以下の解析を行った。

【口腔癌細胞及び骨芽細胞における Flrt2 遺伝子の発現解析】

が口腔癌細胞及び骨芽細胞における FLRT2 遺伝子の発現解析と癌細胞の差異による発現傾向の変化を解析する。

【口腔癌細胞及び骨芽細胞における Flrt2 機能の解析】

FLRT2 遺伝子過剰発現が骨芽細胞、口腔癌細胞に及ぼす影響を細胞増殖、遊走能、分化能について遺伝子発現変化を含めて検討する。

4. 研究成果

臨床腫瘍組織検体を用いた RNA シーケンスでは、脈管浸潤を示すグループ(図 1)がクラスターを作り(図 2)、特徴的な遺伝子発現を示し(図 3)発現に変化を認めた遺伝子の解析(図 4)から、FLRT2

Seq ID	Pt ID	Age	Sex	YK	Ly	V	Pn
FU_2456_002	1717262	88	F	3	0	0	0
FU_2456_004	3633615	68	F	3	0	0	0
FU_2456_005	3637719	84	M	4C	0	0	0
FU_2456_007	3607298-0610	55	F	4C	1	2	2
FU_2456_013	146185	54	F	3	0	0	0
FU_2456_015	2917570	64	M	4C	0	0	0
FU_2456_016	3624493	40	M	3	0	1a	1a
FU_2456_017	3603381	64	M	4C	1a	1a	1a
FU_2456_018	3576687	64	F	4C	1	1	3

図1) RNAシーケンス依頼検体
#007, 016, 017, 018に血管及び神経浸潤を認める。

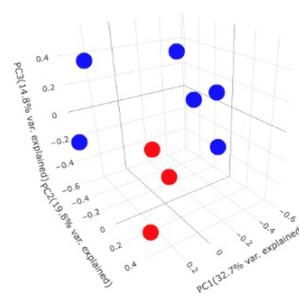


図2) PCA Analysis
#007, 016, 018にがクラスターを形成している。

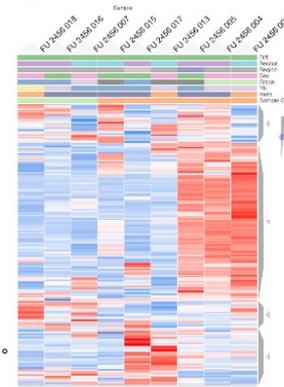


図3) Heat map Analysis
#007, 016, 018に遺伝発現の類似を認める。

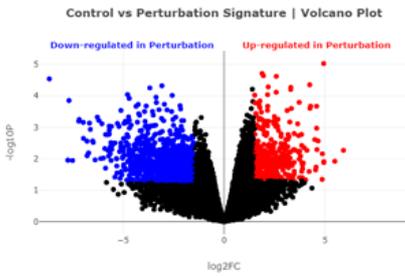


図4) Volcano plot Analysis
#007, 016, 018とその他で遺伝子発現の変化を示している。

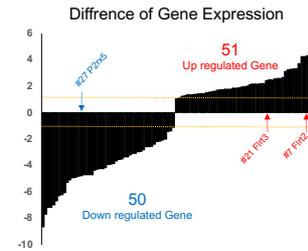


図5) DEG Analysis Plotting
#007, 016, 018とその他での遺伝子発現量を比較し、有意差が大きいものから配置した。

の有意な発現増加が確認された(図 5)。

そこで、臨床腫瘍組織検体の詳細は遺伝子発現を比較検討及び確認するため、リアルタイム PCR を行った。その結果、RNA シーケンスで得られた結果と同様に、脈管浸潤を伴う検体に、他の検体と比較して Flrt2 の高い遺伝子発現を認めた(図 6)。

さらに、Flrt2 遺伝子の正常ヒト口腔扁平上皮細胞株とヒト扁平上皮癌細胞株での発現を比較検討したところいくつかの癌細胞株で正常上皮細胞株比較して 100 倍以上の上昇を認めた(図 7)。

さらに、同遺伝子の特徴である細胞膜に誘導された後、切断されて細胞外へ分泌される(パラクライン)メカニズムが存在するのかをレクチンによる免疫沈降を用いて細胞及び細胞外液のウエスタンブロットで検討した。その結果、Hacat(正常粘膜細胞株)、SAS(Flrt2 非発現扁平上皮癌細胞株)ではほとんど FLRT2 の生成は確認できなかったのに対し SCC4 (Flrt2 高発現扁平上皮癌細胞株)の細胞懸濁液及び培養液中に著明な FLRT2 タンパクの分泌を確認した(図 8)。上記の結果から口腔扁平上皮癌細胞において、脈管浸潤と Flrt2 発現には高い相関関係を認めた。さらに、腔扁平上皮癌の細胞株であっても Flrt2 遺伝子の発現にはばらつきがあり、これはタンパク質生成にも反映されていた。この発現の違いが細胞株間の性質の違いにも影響している可能性が示唆された。

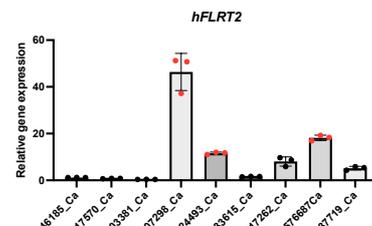


図6) 臨床検体におけるFlrt2遺伝子発現(Real time-PCR)
#007, 016, 018とその他でFlrt2遺伝子の発現量を比較、検討した。

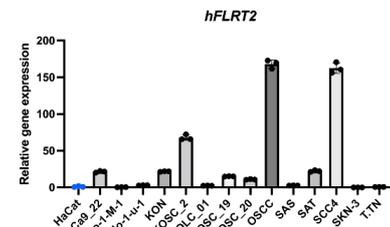


図7) ヒト正常及扁平上皮癌細胞株におけるFlrt2遺伝子発現(Real time-PCR)
Hacat(正常粘膜細胞株)と比較してOSCC及びSCC4で100倍以上の高発現を示した。

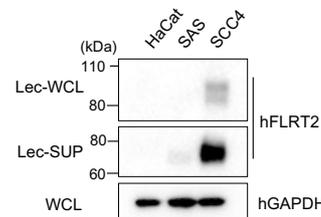


図8) レクチン沈降を用いたウエスタンブロット
Hacat(正常粘膜細胞株)、SAS(Flrt2非発現扁平上皮癌細胞株)、SCC4(Flrt2高発現扁平上皮癌細胞株)の細胞懸濁液及び培養液中のFLRT2タンパク量を定量し比較した。

次に、Flrt2 発現が口腔癌細胞の性質にどのよう
 に影響するかを検討するため SKN3(Flrt2 非発現扁平上皮癌細胞株)に Flrt2 を過剰発現させ、その性質の変化を検討した。まず、過剰発現の程度をリアルタイム PCR で確認したところ正常細胞の 500 倍以上の発現を示すことが確認された(図 9A)。さらに、培養液中への FLRT2 タンパク

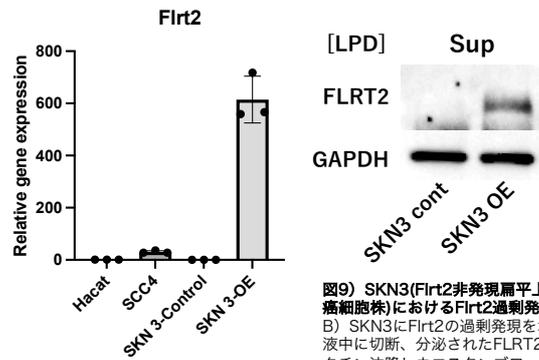


図9) SKN3(Flrt2非発現扁平上皮癌細胞株)におけるFlrt2過剰発現
 A) SKN3にFlrt2の過剰発現を行いその発現レベルをリアルタイムPCRで確認した。

図9) SKN3(Flrt2非発現扁平上皮癌細胞株)におけるFlrt2過剰発現
 B) SKN3にFlrt2の過剰発現を培養液中に切断、分泌されたFLRT2をレクチン沈降しウエスタンブロットで確認した。

細部膜上の FLRT2 タンパク切断には特定の酵素を必要とするのではなく、一般的に細胞が合成しているもので細胞膜上 FLRT2 タンパクの切断、分泌が行われたと推察できる。これに関してはいくつかの報告があるが、破骨細胞、骨芽細胞そして口腔扁平上皮癌細胞における FLRT2 タンパクの切断、分泌に関わる特定の酵素は同定できておらず今後検討が必要である。Flrt2 を過剰発現させた口腔扁平上皮癌細胞の性質をまず細胞増殖について検討した。その結果、Flrt2 を過剰発現により口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖が促進されることが明らかとなった(図 9C)。今後は、遊走能及び抗癌剤への耐性について検討を行った上で、骨代謝細胞との共培養を行い、口腔扁平上皮癌細胞が分泌する Flrt2 がどのように周囲の細胞に影響を与えるかを検討する。

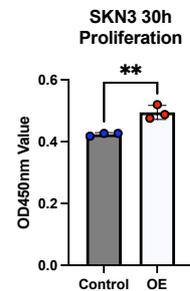


図9C) SKN3(Flrt2非発現扁平上皮癌細胞株)におけるFlrt2過剰発現
 SKN3にFlrt2を過剰発現し細胞増殖について30時間の培養後に比較検討した。

本実験以前に行われた骨芽細胞の実験において、コントロール群として解析された、骨芽細胞系細胞株 MC3T3E1 の分化誘導による遺伝子発現変化のマイクロアレイを用いた網羅的解析結果および、マウス初代培養骨芽細胞(頭蓋骨より分離培養)の分化誘導による遺伝子発現変化の RNA シーケンスデータより骨芽細胞においては分化の過程で Flrt2 及びその受容体である Unc5b の発現が低下することが確認された。そこで、前述の癌細胞と同様に Flrt2 を過剰発現させた MC3T3E1 細胞の性質を検討した。まず、トランスフェクション後、培養液中への FLRT2 タンパクの分泌を確認した(図 10A)。これにより、細胞膜上の FLRT2 タンパク切断には特定の酵素を

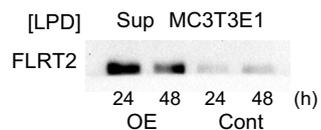


図10) MC3T3E1(骨芽細胞株)におけるFlrt2過剰発現

A) MC3T3E1細胞にFlrt2を過剰発現し培地液中に切断、分泌されたFLRT2をレクチン沈降しウエスタンブロットで確認した。

必要とせず、一般的に細胞が合成しているもので細胞膜上 FLRT2 タンパクの切断、分泌が行われたと推察できる。次に、Flrt2 を過剰発現させた MC3T3E1 細胞の性質を細胞増殖及び初期の分化マーカーである ALP の発現について検討した。その結果、Flrt2 を過剰発現により MC3T3E1 細胞

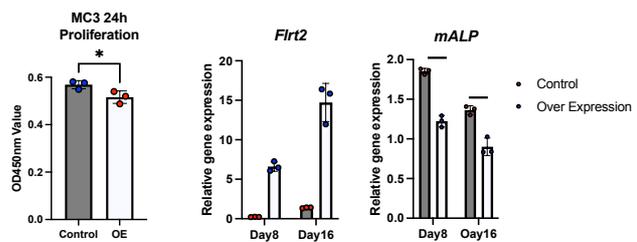


図10) MC3T3E1(骨芽細胞株)におけるFlrt2過剰発現
 B) MC3T3E1細胞にFlrt2を過剰発現させた後、正常培養にて24時間培養した上で細胞増殖能を比較検討した。
 C)長期培養した上でFlrt2及び骨芽細胞初期分化マーカーであるALP遺伝子の発現を比較検討した。

細胞の細胞増殖が抑制され、初期の分化マーカーである ALP の発現の低下が起こることが明らか

となった(図 10B, C)。以上の結果から骨芽細胞では Flrt2 の発現が骨芽細胞の増殖及び分化に対して抑制的に作用することが示唆された。これまでの研究結果により、癌のステージ分類や YK 分類とは相関がなく、一方で病理組織学的な脈管浸潤に相関のある遺伝子として Flrt2 を同定することに成功した。これはすでにいくつかの報告で指摘されていたが、ランダムに抽出された臨床検体を用い、脈管浸潤の有無による比較検討ではっきりと示されたのは今回が初めてでありその意義は大きい。この遺伝子の発現増加が何を意味するのかについては、今後更なる検討が必要であるが、現在までに口腔扁平上皮癌細胞株の細胞増殖に影響することが示された。その機能としてどのような分子メカニズムが関与しているかは今後の検討課題である。同様に骨芽細胞株でも細胞動態への影響は一部示されたもののそのメカニズムについては明らかではなくこちらも今後の検討課題と言える。最も重要なのは、この分泌タンパク質を介して両者(口腔癌細胞と骨代謝細胞)が相互作用するのかについてでありこれは現在までに検討されていない。今後、石灰化物の生成や細胞の遊走能における作用を検討する。その上で前述した様に、口腔扁平上皮癌細胞が分泌する Flrt2 が骨芽細胞を含む骨代謝細胞にどのように影響を与えるかリコンビナント Flrt2 の作用実験、細胞の共培養実験を通して細胞間相互作用に関わる分泌型 FLRT2 の機能の検討を進めていく。

<引用文献>

- 1: FLRT2 and FLRT3 act as repulsive guidance cues for Unc5-positive neurons
Satoru Yamagishi, Falko Hampel, Katsuhiko Hata, Daniel Del Toro, Manuela Schwark, Elena Kvachnina, Martin Bastmeyer, Toshihide Yamashita, Victor Tarabykin, Rüdiger Klein, Joaquim Egea. *EMBO J*, 2011 Jun 14;30(14):2920-33. doi: 10.1038/emboj.2011.189. PMID: 216736552
- 2: Flrt2 is involved in fine-tuning of osteoclast multinucleation
Jumpei Shirakawa, Noriko Takegahara, Hyunsoo Kim, Seoung Hoon Lee, Kohji Sato, Satoru Yamagishi, Yongwon Choi. *BMB Rep*, 2019 Aug;52(8):514-519. doi: 10.5483/BMBRep. 2019. Aug 52. 8. 116. PMID: 31383250
- 3: Oncogenes overexpressed in metastatic oral cancers from patients with pain: potential pain mediators released in exosomes
Aditi Bhattacharya, Malvin N Janal, Ratna Veeramachaneni, Igor Dolgalev, Zinaida Dubeykovskaya, Nguyen Huu Tu, Hyesung Kim, Susanna Zhang, Angie K Wu, Mari Hagiwara, A Ross Kerr, Mark D DeLacure, Brian L Schmidt, Donna G Albertson. *Sci Rep*, 2020 Sep 7;10(1):14724. doi: 10.1038/s41598-020-71298-y. PMID: 32895418
- 4: FLRT2 functions as Tumor Suppressor gene inactivated by promoter methylation in Colorectal Cancer.
Guo X, Song C, Fang L, Li M, Yue L, Sun Q. *J Cancer*. 2020 Oct 23;11(24):7329-7338. doi: 10.7150/jca.47558. PMID: 33193897

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 白川 純平
2. 発表標題 RNAシーケンスによる口腔癌脈管浸潤に関連する因子の探索
3. 学会等名 第67回 公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
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
---------------------------	-----------------------	----

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