

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293428

研究課題名(和文) 口腔癌顎骨破壊病変におけるSHHを標的とした新規治療法の開発と個別化医療への応用

研究課題名(英文) Development of new therapies targeting SHH in oral cancer jaw bone destruction and its application to personalized medicine

研究代表者

志茂 剛 (Tsuyoshi, Shimo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：40362991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌が顎骨へ浸潤すると生命予後が低下する。本研究で胎生期の形態形成に重要な役割を担うソニックヘッジホッグ(SHH)が、正常下顎歯肉には発現しないが、顎骨浸潤部位における癌細胞に高発現し、その受容体およびシグナル分子は骨破壊部における破骨細胞前駆細胞、成熟破骨細胞に認められることが明らかとなった。SHHは破骨細胞前駆細胞に直接的に作用し、破骨細胞分化、骨吸収を促進させ、そのシグナルにGPCRが関与することがわかってきた。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma frequently invades into the maxilla and the mandible, and that is associated with a worse prognosis. Sonic hedgehog (SHH) signaling contributes to the development, we found that SHH was not expressed in normal oral gingiva, but highly expressed in tumor cells that had invaded the bone matrix. On the other hand, the hedgehog receptor and the signaling molecule were highly expressed in the osteoclasts and the progenitor cells. SHH stimulated osteoclast formation and pit formation, and the GPCR is involved in the signaling.

研究分野：口腔外科学

キーワード：口腔扁平上皮癌 破骨細胞 ヘッジホッグ

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の骨髄浸潤は独立した予後因子であることが、近年の大規模な後ろ向き研究で明らかとなってきた。それゆえ骨髄浸潤を伴う進展症例における新たな治療法の開発は急務である。浸潤型骨破壊を呈する口腔癌細胞は、ソニックヘッジホッグ (SHH) を高発現しすることがわかってきた。癌骨微小環境下におけるヘッジホッグシグナルネットワークの活性化を癌骨微小環境において誘発し、多様な分子間相互作用を通じ癌骨破壊の悪循環が成立されると推察する。

2. 研究の目的

顎骨へ浸潤、増大した進行癌は、顎骨の合併切除を必要とし、患者の咀嚼機能などの QOL ならびに、生命予後が有意に低下する。従って癌の骨への浸潤、癌の骨内での増殖を抑制することは、臨床上極めて重要な課題である。我々は、SHH シグナルの癌骨破壊部での発現ならびに、骨破壊のメカニズムを明らかとし、これらの分子を標的とした治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 顎骨切除標本における組織学的、免疫組織学的解析

当科における化学療法を行っていない下顎歯肉癌顎骨切除症例を用いた。切除標本におけるヘッジホッグシグナルネットワーク分子 (SHH, Patched-1, Gli-2, CD68) の発現細胞を、免疫組織化学染色を行いその局在を明らかにした

(2) 破骨細胞の培養

RAW264.7 マウスマクロファージ細胞および C57BL/6 マウス, floxed Smoothed mice (*Smotr^{2Ainc/J}*) から単離した骨髄細胞より単離した CD11b⁺細胞を使用した。

(3) 破骨細胞分化, 吸収活性の検討

RAW264.7 細胞は 50 ng/ml RANKL と, CD11b⁺ は 30 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml RANKL と共存下で行い TRAP 染色で分化能を、デンチンスライスで SEM を使用し解析した。

(4) Immunoblot analysis

RAW264.7 細胞, CD11b⁺細胞を使用し ice-cold phosphate buffered saline (PBS) と lysed in an ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, containing 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% NP-40, 10 mM NaF, 100 mM leupeptin, 2 mg/ml aprotinin, and 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride) を使用し回収した。10 μ g のタンパク質を 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gels に泳動しナイロンメンブレンに転写し、シグナル分子に対する抗体を作用させ、ECL プロトコルに従って可視化した。

(5) 定量的 RT-PCR

RT-qPCR は SsoAdvanced Universal SYBR

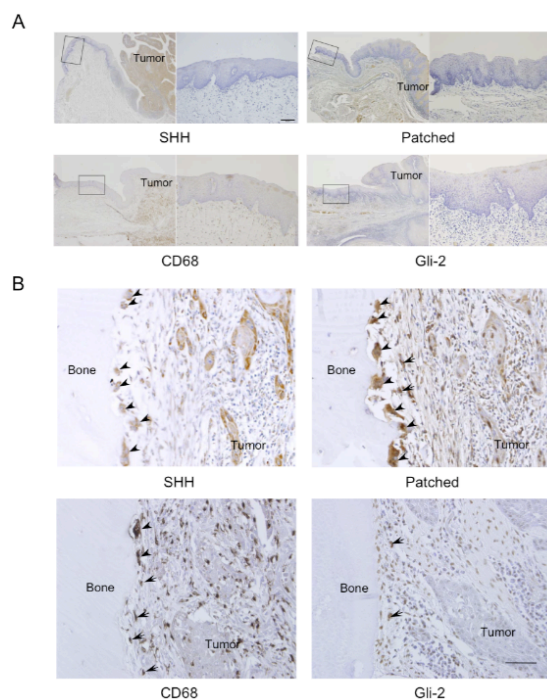
Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) を用い, chromo4 (MJ Research, Waltham, MA, USA) で行った。データ解析は $\Delta\Delta$ CT methods を使用した。

(6) マイクロアレイ解析

RAW264.7 細胞を 50 ng/ml RANKL を 3 日間存在下で培養後, 5 μ M smoothed アゴニスト (SAG) を用い 24 h 処理した。total RNAs w miRNeasy Mini Kit (Qiagen) で単離し, Genome-wide 遺伝子発現解析は SuperPrint G3 Mouse GE 8x60K 2 color (Agilent Technologies) を用いて行った。アレイは Agilent Feature Extraction 10.7.3.1 software (Agilent Technologies) を用い数値化し, GeneSpring GX v.13 (Agilent Technologies) を用い解析した。

4. 研究成果

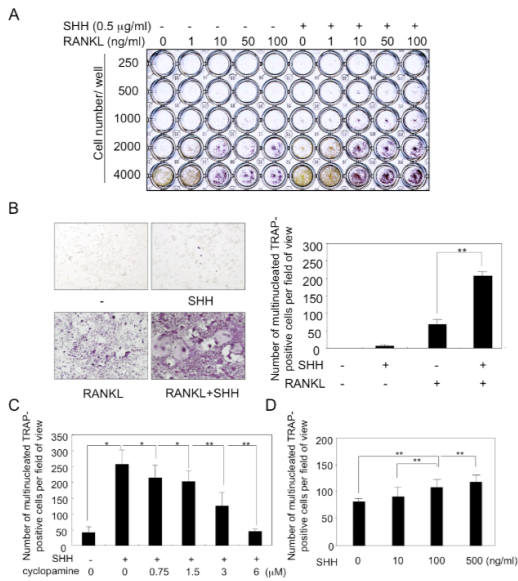
(1) 正常歯肉, 下顎歯肉癌顎骨浸潤部における Sonic hedgehog (SHH), Patched, CD68 and Gli-2 発現の免疫組織学的検討
下写真の説明 (A) 下顎区域切除標本における腫瘍切除断端の正常下顎歯肉における SHH, Patched, CD68 and Gli-2 の発現を示す。それぞれの右の写真は左写真の四角枠の拡大写真を示す。(B) 顎骨腫瘍浸潤部における SHH, Patched, CD68 and Gli-2 の発現を示す。Scale bar, 50 μ m. 矢印: 破骨細胞, 矢頭: 破骨細胞前駆細胞を示す。



これらの結果から口腔癌細胞の癌化に伴い腫瘍細胞に SHH の発現を認め、癌顎骨浸潤部でその発現は亢進することが明らかとなった。一方で SHH 受容体およびそのシグナルは破骨細胞および破骨細胞前駆細胞で高発現することが明らかとなった。

(2) ヘッジホッグは RAW264.7 細胞, CD11b⁺細胞分化を促進する。

下写真の説明 (A) : RAW264.7 細胞, (B) CD11b⁺ 細胞, (C, D) Bone marrow macrophages

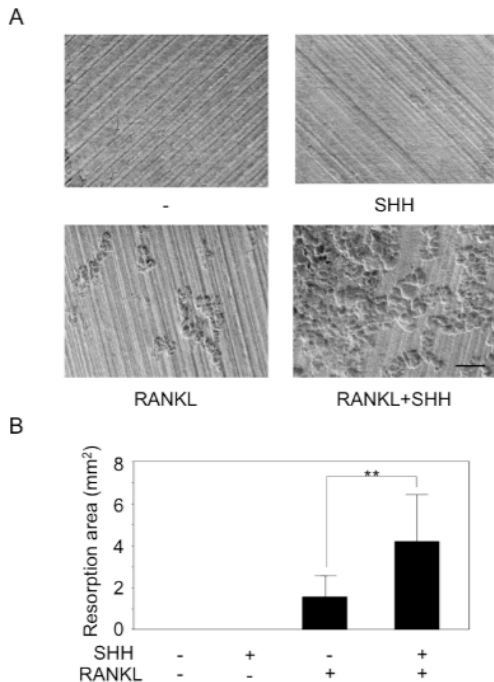


これらの結果から, SHHはRANKL共存下にて破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。図には示していないが, floxed Smoothenedマウス骨髄細胞から単離したCD11b⁺にCre recombinase encoding adenovirusを感染させ, SHHで刺激しても破骨細胞分化が促進されないことを確認している。

(3) SHHは成熟破骨細胞における骨吸収能を促進する。

下写真の説明 (A) : CD11b⁺細胞を成熟破骨細胞に分化させ, SHHをRANKL共存下にて培養後のデンチンスライス上のSEMによる写真。

(B) : 骨吸収面積の検討

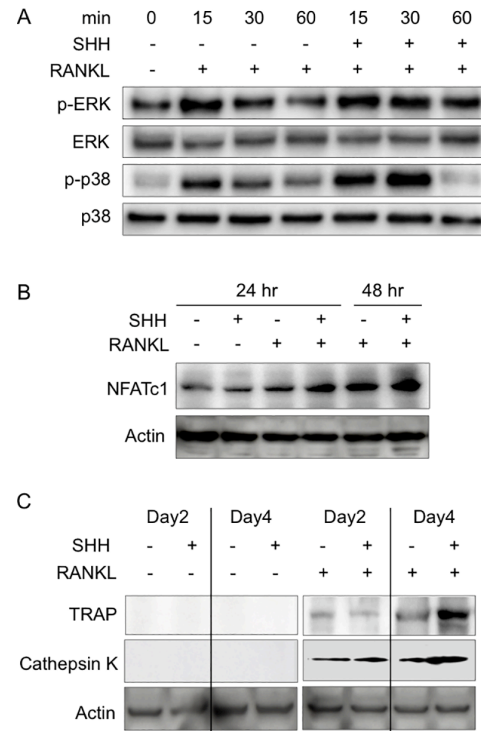


これらの結果から SHHは直接的に破骨細胞吸収活性をRANKL依存的に促進することが明らかとなった。

(4) SHHが破骨細胞におけるMAP kinase,

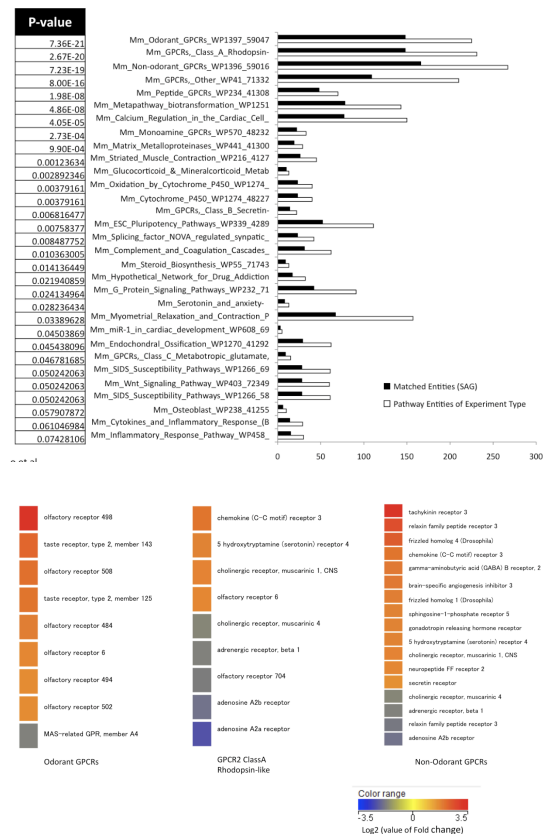
細胞分化に与える影響。

下写真の説明 (A) : RAW264.7細胞をSHHで刺激後, p-ERK, ERK, p-p38, and p38発現をimmunoblotにて解析。(B, C) : NFATc1, TRAP, Cathepsin K発現を検討



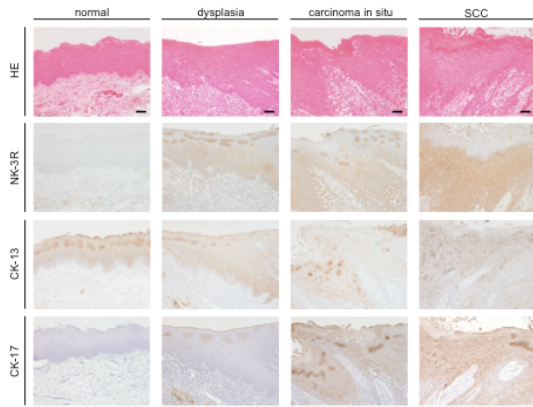
SHHはRAW264.7細胞における破骨細胞分化を促進し, ERK1/2, P38のリン酸化が関与することが示唆された。

(5) SHHシグナルアゴニストでRAW264.7細胞を刺激し, マイクロアレイ解析を行った。



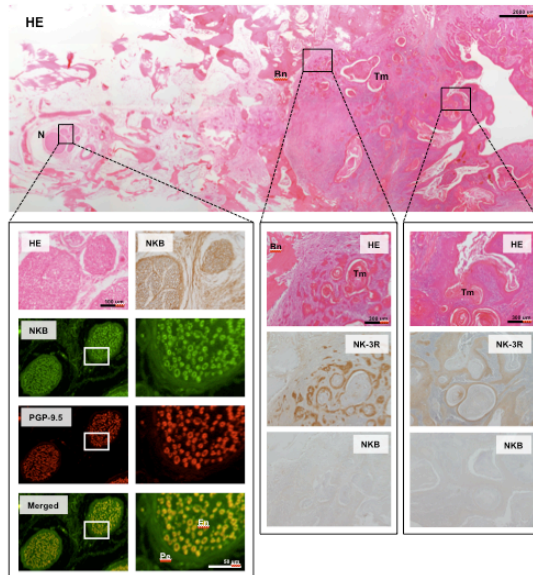
pathway 解析の結果から, G protein-coupled receptor (GPCR) pathways が上位を占め, tachykinin receptor 3 が最も上昇することが明らかとなった。

(6) 下顎歯肉癌顎骨切除標本における tachykinin receptor 3 (TACR3) の発現。下写真の説明: 写真左側から正常歯肉, 異形成, 上皮内癌, 口腔扁平上皮癌へ移行。



TACR3 の発現は SHH の発現パターンと類似しており, 正常粘膜では発現しないが, 癌に移行するに従ってその発現が亢進することがわかった。

(7) 下顎歯肉癌顎骨切除標本における tachykinin receptor 3 (TACR3) の発現。下写真の説明: 写真上段左側が深部, 右側が口腔側。N: 下歯槽神経, Bn: 顎骨, Tm: 腫瘍, TAC3: tachykinin 3。癌顎骨浸潤部における癌細胞で TACR3 の発現はさらに増強し, TACR3 リガンド TAC3 は顎



骨骨髓中に存在する知覚神経線維にその発現を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Tsuyoshi Shimo, Kenichi Matsumoto, Kiyofumi Takabatake, Eriko Aoyama, Yuichiro Takebe, Soichiro Ibaragi, Tatsuo Okui, Naito Kurio, Hiroyuki Takada, Kyoichi Obata, Pai Pang, Masahiro Iwamoto, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki, The role of Sonic hedgehog signaling in osteoclastogenesis and jaw bone destruction, PLoS One. 査読有, 11 (3), 2016, e0151731
DOI:org/10.1371/journal.pone.0151731
- ② Kyoichi Obata, Tsuyoshi Shimo, Tatsuo Okui, Kenichi Matsumoto, Hiroyuki Takada, Kiyofumi Takabatake, Yuki Kunisada, Soichiro Ibaragi, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki, Tachykinin Receptor 3 Distribution in human oral squamous cell carcinoma, Anticancer Res. 査読有, 36(12), 2016, 6335-6341
DOI: 10.21873/anticancerres.11230
- ③ Yuki Kunisada, Tsuyoshi Shimo, Masanori Masui, Norie Yoshioka, Soichiro Ibaragi, Kenichi Matsumoto, Tatsuo Okui, Naito Kurio, Shohei Domae, Koji Kishimoto, Akiyoshi Nishiyama, Akira Sasaki, Detection of sonic hedgehog in a patients undergoing with orthognathic surgery, International Journal of Surgery Open, 査読有, 5, 2016, 1-4
doi.org/10.1016/j.ijso.2016.09.002
- ④ Masanori Masui, Tatsuo Okui, Tsuyoshi Shimo, Kiyofumi Takabatake, Takuya Fukazawa, Kenichi Matsumoto, Naito Kurio, Soichiro Ibaragi, Yoshio Naomoto, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki. Novel Midkine Inhibitor iMDK Inhibits Tumor Growth and Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma. Anticancer Res. 査読有, 36(6), 2016, 2775-2781
- ⑤ Kenichi Matsumoto, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Kyoichi Obata, Masanori Masui, Pai Pang, Yuu Horikiri, Akira Sasaki, Expression and role of sonic hedgehog in the process of fracture healing with aging, In Vivo, 査読有, 30 (2), 2016, 99-105
- ⑥ Pai Pang, Tsuyoshi Shimo, Hiroyuki Takada, Kenichi Matsumoto, Norie Yoshioka, Soichiro Ibaragi, Akira Sasaki, Expression Pattern of Sonic Hedgehog Signaling and Calcitonin Gene Related Peptide in the Socket Healing Process after Tooth Extraction, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有, 467(1), 2015, 21-26
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.09.139
- ⑦ Ishida N, Fukazawa T, Maeda Y,

Yamatsuji T, Kato K, Matsumoto K, Shimo T, Takigawa N, Whitsett JA, Naomoto Y. A novel PI3K inhibitor iMDK suppresses non-small cell lung Cancer cooperatively with A MEK inhibitor. Exp Cell Res. 査読有, 335(2), 2015, 197-206

DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.03.019

- ⑧ Tsuyoshi Shimo, Eiki Koyama, Naito Kurio, Kenichi Matsumoto, Tatsuo Okui, Soichiro Ibaragi, Norie Yoshioka, Akira Sasaki. Expression and roles of CCN2 in dental epithelial cells, In Vivo, 査読有, 29(2), 2015, 189-195

[学会発表] (計 7 件)

- ① Tsuyoshi Shimo, Kenichi Matsumoto, Eriko Aoyama, Yuichiro Takebe, Takabatake Kiyofumi, Soichiro Ibaragi, Tatsuo Okui, Naito Kurio, Pang Pai, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki, Hedgehog signaling in jawbone invasion of oral squamous cell carcinoma, ASBMR 2015 Annual Meeting Sep 9-12 Seattle, WA, USA
- ② Kenichi Matsumoto, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Tatsuo Okui, and Akira Sasaki The mechanical stimulation mediate the osteoblast differentiation through hedgehog signaling, ASBMR 2015 Annual Meeting Sep 9-12 Seattle, WA, USA
- ③ Pai Pang, Tsuyoshi Shimo, Hiroyuki Takada, Kenichi Matsumoto, Norie Yoshioka, Soichiro Ibaragi, Akira Sasaki, Expression Pattern of Sonic Hedgehog Signaling and Calcitonin Gene Related Peptide in the Socket Healing Process after Tooth Extraction, 12th National Conference on Oral and Maxillofacial Surgery in Conjunction with joint of China-Japan Joint Conference on Oral and Maxillofacial Surgery 2015, Sep 24-26 Shanghai China, Second Prize in the E-poster Presentation
- ④ Yuki Kunisada, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Masanori Masui, Norie Yoshioka, Soichiro Ibaragi, Tatsuo Okui, Akiyoshi Nishiyama and Akira Sasaki. Detection of sonic hedgehog in a patient with orthognathic surgery. ASBMR 2014 Annual Meeting Sep 12-15 Houston, TX, USA poster
- ⑤ Kenichi Matsumoto, Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Tatsuo Okui, Yuu Horikiri, and Akira Sasaki. Role of sonic hedgehog in the process of fracture healing with aging ASBMR 2014 Annual Meeting Sep 12-15 Houston, TX, USA poster
- ⑥ Naito Kurio, Tsuyoshi Shimo, Hiromasa Kuroda, Kenichi Matsumoto, Tatsuo Okui, and Akira Sasaki The role of Insulin-like

growth factor-I and Focal adhesion kinase in angiogenesis of tumor induced bone metastasis ASBMR 2014 Annual Meeting Sep 12-15 Houston, TX, USA poster

- ⑦ Tsuyoshi Shimo, Naito Kurio, Masahiro Iwamoto, Tatsuo Okui, Hiromasa Kuroda, Kenichi Matsumoto, Soichiro Ibaragi, Norie Yoshioka, Yuichirou Takebe, Hitoshi Nagatsuka, and Akira Sasaki Expression and role of sonic hedgehog in oral squamous cell carcinoma induced jaw bone destruction ASBMR 2014 Annual Meeting Sep 12-15 Houston, TX, USA poster

[図書] (計 2 件)

- ①. Tsuyoshi Shimo, Norie Yoshioka, Masaharu Takigawa, Akira Sasaki, Analysis of pathological activities of CCN proteins in bone metastasis, Methods Mol Biol. 1489, 505-512, 2017
- ②. Tsuyoshi Shimo, Masaharu Takigawa, Protocol for measuring angiogenic activities of CCN proteins, Methods Mol Biol. 1489, 239-249, 2017

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

日本骨代謝学会 1st author

http://www.jsbmr.jp/1st_author/196_tshimo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志茂 剛 (SHIMO Tsuyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 40362991

(2) 研究分担者

吉岡 徳枝 (YOSHIOKA Norie)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 50362984

(3) 連携研究者

栗尾 奈愛 (KURIO Naito)

岡山大学・大学病院・医員
研究者番号：80622141

(4) 研究協力者

長塚 仁 (NAGATSUKA Hitoshi)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70237535