

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462622

研究課題名(和文) 下顎骨肉癌における発現分子の網羅的解析とネトリン1の関与の解明

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of expressed molecules in mandibular gingival cancer and elucidation of involvement of netrin 1

研究代表者

中平 光彦 (NAKAHIRA, MITSUHIKO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：10253353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：骨肉癌組織において腫瘍が発現する分子を免疫染色法で調べたところ、MICA/MICBの陽性度が高かった。また、netrin-1の骨代謝における機能を調べたところ、骨芽細胞分化を抑制し、破骨細胞分化を促進させた。骨肉癌組織においてはMICA/MICBが腫瘍の進展に、またnetrin-1が骨破壊に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：We found that all cases of gingival cancers were positive for MICA/MICB immunostaining. We also showed that netrin-1 inhibits osteoblast differentiation and promotes osteoclast differentiation. These results suggest that MICA/MICB and netrin-1 are involved in the development of tumor and bone destruction, respectively.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：骨肉癌 NKG2Dリガンド netrin-1

### 1. 研究開始当初の背景

下顎骨肉癌は早期に下顎骨に浸潤し、骨破壊を呈する。特に下顎骨内に深く浸潤した場合は放射線治療が期待できず、高線量では放射線性骨壊死といった副作用も考慮する必要がある (Notani K, *Head Neck* 2003)。また、抗腫瘍薬の骨への移行が悪いことから外科的切除が基本となる。下顎骨内に進展した腫瘍は直接触知できないために手術範囲の設定において、X線やCT、MRなどの画像診断により、腫瘍の骨吸収の深達度・骨吸収型・周囲軟組織への進展状況を正確に把握し、治療計画を立てる必要がある (Totsuka Y, *Head Neck* 1991)。下顎骨肉癌の下顎骨浸潤の深達度は手術法を選択する上で重要な要因であるが、画像診断では骨吸収の範囲しか明らかではなく、癌浸潤の最先端は把握できない。

下顎骨肉癌は、下顎骨への浸潤形式により手術方法が決定されるため、癌浸潤がどこまですすんでいるかを診断することは非常に重要である。病理組織学的には下顎骨への浸潤様式として erosive pattern および infiltrative pattern に分類されている (Wong RJ, *Laryngoscope* 2000)。erosive pattern では癌と骨組織の境界に線維が介在し、平滑で連続的なパターンをとり骨吸収が癌浸潤よりも先行する。一方、infiltrative pattern では癌と骨組織の境界線が不整かつ不連続で癌が骨梁間へ浸潤するパターンをとり、癌浸潤が骨吸収よりも先行する。病理学的には infiltrative pattern では erosive pattern よりも骨吸収が著しいため破骨細胞が多いとされてきたが、定量的解析は行われていなかった。Ishikuro らは骨形態計測法により破骨細胞数を定量し、infiltrative pattern のほうが erosive pattern より破骨細胞数が多いという特徴を見出している (Ishikuro M, *Bone* 2008)。infiltrative pattern では破骨細胞数が多いため、破骨細胞分化促進因子の発現が上昇していると考えられ、骨髄への浸潤が起こっていることから、癌細胞から産生される血行性転移に関わる因子あるいは浸潤に関与する因子の発現亢進も考えられる。しかしながら、両方の pattern が混在するケースも存在し、分類が困難な場合も少なくない。骨吸収および癌浸潤がどのようにして起こるか、という問題は癌細胞による攻撃あるいはそれに対する宿主細胞の免疫応答が関与しており、さまざまなサイトカインが骨吸収・癌浸潤に関わる (Weilbaeher KN, *Nat Rev Cancer* 2011)。われわれは癌組織には豊富な血管が認められることから、血管形成を制御するサイトカインである netrin family に着目している (Arakawa H, *Nat Rev Cancer* 2004)。netrin family は神経突起を制御する因子として発見されたが、近年、発癌に関わる知見が散見されている。胃癌患者において血中 netrin-1 濃度が上昇しており、化学療法後に低下すること (Kefeli U, *Biomarkers* 2012)、乳癌・腎臓癌・前立腺癌などで血中 netrin-1 濃度が上昇していること (Ramesh G,

*Biomarkers* 2011) などが報告されている。また、netrin-1 は受容体 Unc5b と転写因子 p53 を介してアポトーシスを抑制することが *in vitro* で示されている (Tanikawa C, *Nat Cell Biol* 2003)。netrin-4 については乳癌で発現が亢進していること (Esseghir S, *Clin Cancer Res* 2007)、netin-4 が膠芽腫細胞の増殖を促進することが報告されている (Hu Y, *Neoplasia* 2012)。一方で、netrin の受容体の1つである deleted in colorectal cancer (DCC) のシグナルを介してアポトーシスが誘導されること (Mehlen P, *Nature* 1998)、乳癌モデルマウスにおいて DCC が p53 非依存性に転移を抑制する機能を有することが報告されている (Krimpenfort P, *Nature* 2012)。口腔癌と DCC との関係はいくつか報告がある。例えば、口腔癌細胞株で DCC の変異が見出されており (Kim MS, *Anticancer Res* 1993)、口腔癌患者において DCC の DNA メチル化が起こっていることが明らかとなっている (Schussel J, *Clin Cancer Res* 2013)。しかしながら、netrin family が骨肉癌に関与するかどうかはいまだ不明である。netrin-1 は前述のように癌化に関わる分子のため、骨肉癌における netrin-1 の関与を検討する価値があると考えた。さらに、口腔癌領域において報告されている癌細胞で発現する分子として natural killer 細胞に発現する NKG2D 受容体のリガンド、カドヘリンファミリーの骨肉癌組織における発現検討も重要と考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、骨肉癌検体において発現する分子を調べ、netrin-1 の骨代謝における役割を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組織学的観察および免疫組織化学的観察

筋を含む腱組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて 48 時間固定し、エタノール系列にて脱水後、パラフィン包埋とした。滑走式マイクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織に対し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い光学顕微鏡にて観察した。また、免疫組織化学的観察において、組織学的観察と同じパラフィン包埋標本を使用し、滑走式マイクロトームで厚さ 2.5 μm に薄切した組織を使用した。腱分化に関与するとされる因子のマーカーとして、抗 E-Cadherin 抗体、抗 N-Cadherin 抗体、抗 MICA/MICB 抗体 (いずれも Santa Cruz Biotechnology 社製) を用いた。ヒストファイブ シンプルステイン MAXPO(G) (ニチレイ・バイオサイエンス社製) による免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。なお、陰性対象 (Negative control) には、一次抗体として使用した各抗体の代替に mouse IgG を使用し、同様の手順で染色を行った。

#### (2) 定量 PCR

細胞を氷冷 PBS で洗浄し ISOGEN(Nippon Gene, Tokyo, Japan)を 1 ml 加えてスクレイパー (AGC TECHNO GLASS, Shizuoka, Japan) で回収し、プロトコールに従って全 RNA を抽出し、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan)により SYBR 法で定量 PCR を行った。定量 PCR の分析に関して、比較 Ct 法を用いて beta-actin を内部標準とした。

### (3) 遺伝子導入

細胞を 24 well plate に  $6 \times 10^4$  個/well で播種し、Lipofectamine 2000 を用いて、目的の発現ベクターを遺伝子導入した。

### (4) 細胞増殖試験

細胞を 96 well plate に  $5 \times 10^3$  個/well で播種し、リコンビナントマウス SEMA 3A (15, 31, 62, 125, 250, 500, 1000 ng/ml)あるいは PBS と共に 48 時間血清存在下で培養した。Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, Fitchburg, WI, USA)を用いて、各 well に Cell Titer 96 Aqueous One Solution を添加してから 3 時間後にマイクロプレートリーダー (Bio Rad, Redmond, WA, USA)にて 490 nm の吸光度測定を行った (N=6 にて定量)。データは相対比で示した。

### (5) 細胞

骨芽細胞として MC3T3-E1 を用いた。

### (6) RNA 干渉

siRNA として Stealth Select RNAi siRNA for murine Ntn1 (MSS207200, MSS207201, MSS207202)、Stealth RNAi Negative Control Duplex (si-CTL) を用いて、細胞への導入は Lipofectamine RNAi MAX で行った。

### (7) 破骨細胞培養および TRAP 染色

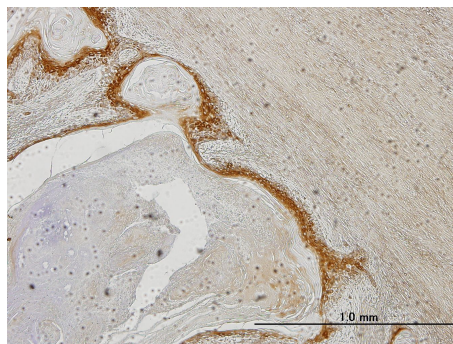
マウス破骨細胞は *in vitro* における培養プロトコールに従い分化させた。8~10 週齢の雌の C57BL/6 マウスの脛骨から採取した骨髄細胞を 10% FBS 1% penicillin/streptomycin を添加した培養液 (MEM) で 16~20 時間培養した。培養後、上清に含まれた非接着細胞を  $1 \times 10^5/cm^2$  で播種し、10ng/ml の M-CSF (Peprotech 社)を添加し、48 時間培養した。培養後の接着細胞を骨髄マクロファージ (BMMs) として使用し、10ng/ml の M-CSF と 100ng/ml の RANKL (Oriental Yeast 社) を加えて培養した。組み換え型マウス Ntn1 は RANKL を添加した際に同時に添加した。5 日間の培養後、10% ホルマリンで 5 分間固定し、エタノールおよびアセトン (容量 50:50) にて 1 分間再固定した。破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) を検出するために、naphthol AS-MX phosphatase (Sigma-Aldrich 社)と fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich 社) を添加した 50mM の酒石酸含有緩衝液にて室温で染色 (TRAP 染色) した。3 核以上の TRAP 陽性細胞を pOCLs として計算した。

## 4. 研究成果

(1) 歯肉癌組織 (30 検体) における発現分子の解析

まず、HE 染色により組織学観察を行った。次に、natural killer 細胞に発現する NKG2D 受容体のリガンドである MICA/MICB、カドヘリンファミリーである E-Cadherin, N-Cadherin について免疫染色による観察を行った。その結果、全ての検体において MICA/MICB が強陽性であることが示された (図 1)。

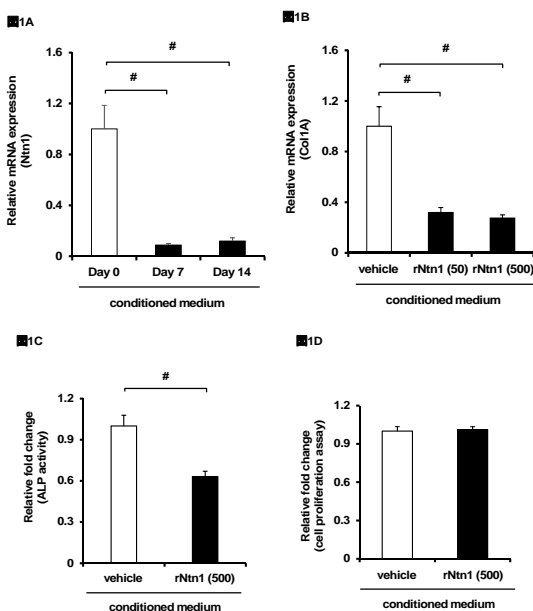
写真1



MICA/MICB染色

(2) netrin-1 の骨芽細胞の分化・増殖に対する作用の解析

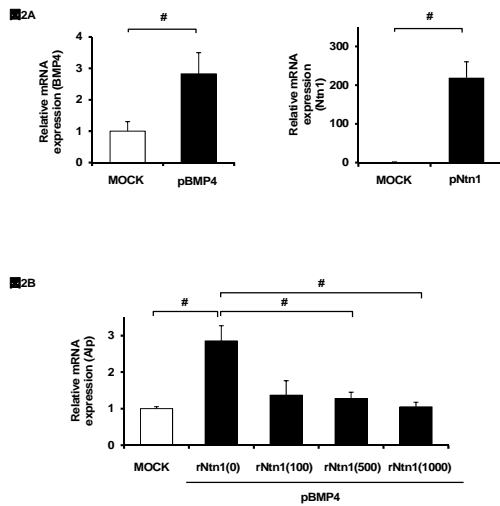
次に、netrin-1 の骨芽細胞に対する作用を調べた。骨芽細胞分化が促進される培養条件において、骨芽細胞における netrin-1 の発現は経時的に低下していた (図 1 A)。また、netrin-1 タンパク質を細胞に作用させると骨芽細胞分化を示す collagen 1alpha(Coll1A)および alkaline phosphatase(ALP)遺伝子の発現が低下していた (図 1 B, 図 1 C)。一方、netrin-1 は骨芽細胞の増殖に対して促進あるいは抑制の作用を及ぼさなかった (図 1 D)。



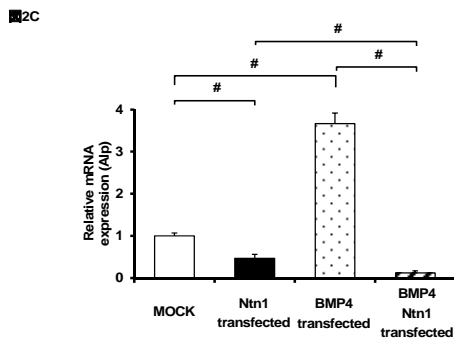
(3) netrin-1 の骨芽細胞の分化・増殖に対する作用の解析

骨芽細胞分化を促進させる bone morphogenetic proteins (BMP) 存在下で netrin-1 は骨芽細胞分化を抑制するかどうか

検討するために、BMP-4 の発現ベクターを遺伝子導入した骨芽細胞に netrin-1 を作用させた。その結果、netrin-1 濃度依存的に ALP が低下しており、骨芽細胞分化を抑制した (図 2 A, B)。

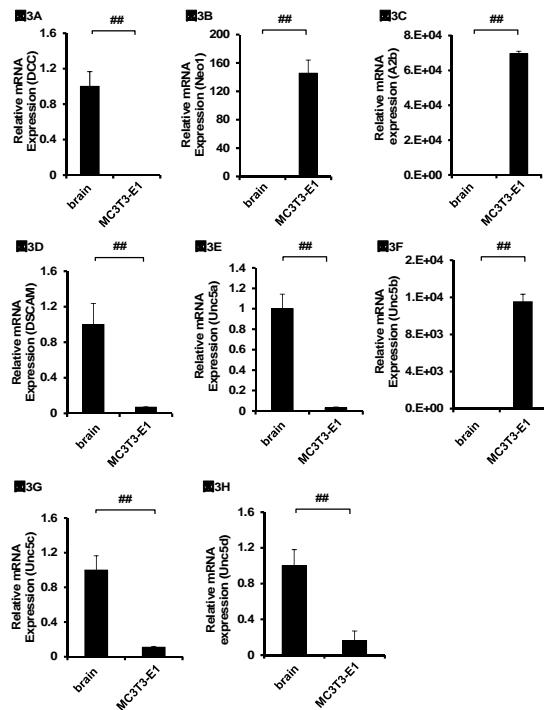


また、骨芽細胞に netrin-1 発現ベクターを遺伝子導入したところ、Colla および ALP 遺伝子発現を抑制した。さらに、骨芽細胞に BMP-4 発現ベクターおよび netrin-1 発現ベクターを同時に遺伝子導入したところ、ALP 遺伝子発現を抑制した。以上のことから netrin-1 は骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなった (図 2 C)。



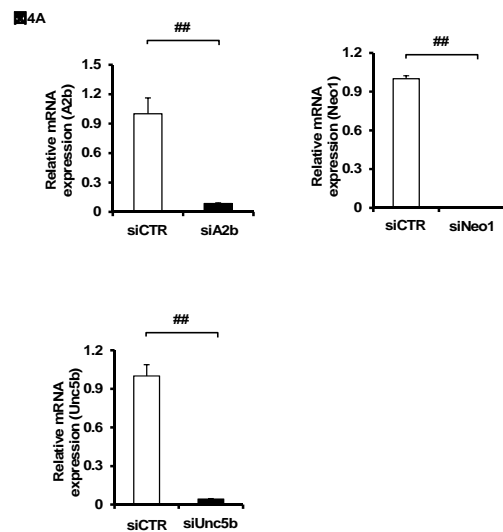
#### (4) 骨芽細胞における netrin 受容体発現の検討

骨芽細胞に発現している netrin 受容体について定量 PCR を行った。マウス脳と比較して neogenin (Neo 1)、ADORA2B (A2b)、Unc5b の発現が有意に上昇していた (図 3 A - H)。

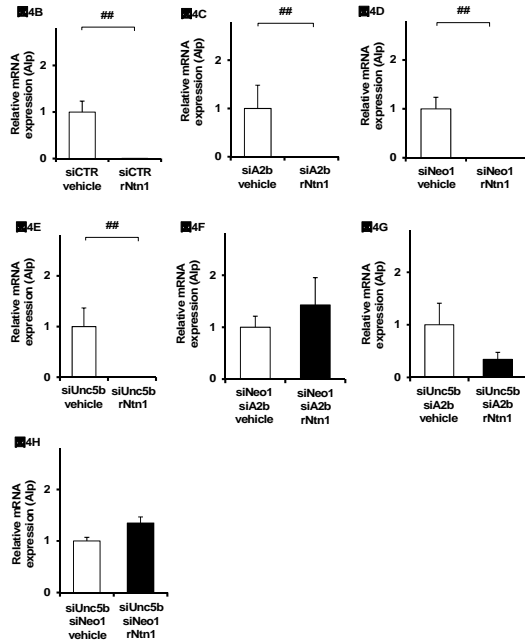


#### (5) 骨芽細胞分化を抑制する netrin 受容体の解析

それぞれの netrin 受容体に対する RNA 干渉 (siRNA) を用いて netrin-1 による骨芽細胞分化抑制に重要な役割を果たす netrin 受容体を調べた。Neo1, A2b, Unc5b について RNA 干渉がされているかを調べたところ、いずれの遺伝子発現も低下していた (図 4 A)。

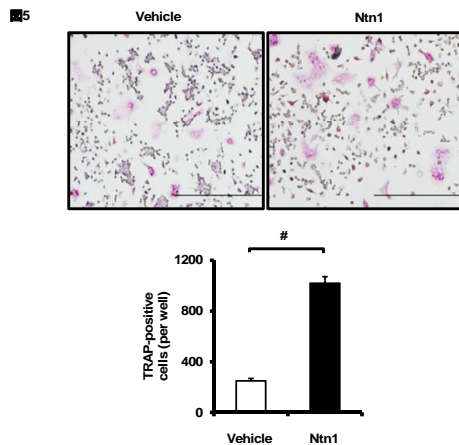


次に、Neo1, A2b, Unc5b をそれぞれの siRNA を骨芽細胞に導入したところ、ALP 遺伝子発現は低下していた。しかしながら、2つの組合せでそれぞれの siRNA を骨芽細胞に導入したところ、ALP 遺伝子発現の低下は解除された。以上のことから、Neo1, A2b, Unc5b の2種類が netrin-1 による骨芽細胞分化抑制に重要であることが示唆された(図4B-H)。



#### (6) 破骨細胞分化における netrin-1 の作用の解析

最後に破骨細胞に対して netrin-1 (500 ng/ml) を処理したところ、破骨細胞形成が促進された(図5)。



これらの結果から歯肉癌組織においては、MICA/MICB の発現が認められ、netrin-1 は骨吸収を促進する可能性が示唆された。

#### 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1件)

1. Sato T, Kokabu S, Enoki Y, Hayashi N, Matsumoto M, Nakahira M, Sugasawa M, Yoda T. Functional roles of netrin-1 in osteoblast differentiation. *In Vivo* 2017 May-Jun;31(3):321-328. doi:10.21873/invivo.11062 (査読有)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中平光彦 (NAKAHIRA, Mitsuhiro)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号: 10253353

##### (2) 研究分担者

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 60406494

古株 彰一郎 (KOKABU, Shoichiro)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 30448899

自見英治郎 (JIMI, Eijiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 40276598