

Title	腫瘍による骨吸収の分子機序の研究
Author(s)	高畑, 惣介
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/69483">https://hdl.handle.net/11094/69483</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏名 ( 高畑 惣介 )

論文題名 腫瘍による骨吸収の分子機序の研究

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

歯肉癌による顎骨吸収様式は浸潤型と平滑型に大別され、治療予後にも影響する。しかし、その分子機序は明らかにされておらず、さらに口腔扁平上皮癌の骨吸収様式を模倣する *in vivo* 実験系の報告もない。そのため、実験モデルの確立と病態を解明する研究の意義は大きい。当教室では、歯原性腫瘍細胞においてTGF- $\beta$ とIL-1が相乗的に間質線維芽細胞のRANKL発現を誘導していることを見出してきた。本研究では、1) マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII 由来の2系統の亜株を用いて異なる骨吸収型を再現するシンジェニックマウスモデルを作成し、2) *in vivo, in vitro* で腫瘍細胞、腫瘍間質線維芽細胞のその差異を見いだすことで骨吸収様式の分子的メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。

## 【材料および方法】

1. 細胞培養と細胞特性：マウス扁平上皮癌細胞株SCCVIIの骨吸収様式の異なる亜株2系統を選別し、著しい破骨細胞の活性化を伴う浸潤型の骨吸収を呈する細胞を亜株A、破骨細胞活性化に乏しく骨新生を伴う平滑型の骨吸収を呈する細胞を亜株Bとして実験に用いた。細胞増殖能は細胞増殖曲線にて、細胞遊走能は wound healing assay およびmigration assay にて、細胞浸潤能は invasion assay にて検討した。
2. 全RNAの抽出及びReverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)：培養終了後のSCCVII細胞、骨髄由来間質線維芽細胞株 ST2、および *in vivo* マウスモデルにおける腫瘍の全RNAを回収し、定量的 PCR法を用い骨吸収関連分子の遺伝子発現を検討した。
3. 破骨細胞形成実験：マウス骨髄細胞をM-CSF存在下で培養した骨髄マクロファージ細胞を、破骨細胞形成実験に用いた。各亜株の培養上清 (CM) や RANKL、TGF- $\beta$ 、IL-6 を含む培地で培養した後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。形成された破骨細胞数は、TRAP染色陽性、3個以上の多角巨細胞としてカウントした。
4. シンジェニックマウスモデル作成：マウス扁平上皮癌細胞株SCCVIIの亜株A、B細胞をC3H/HeNJe1の骨近傍（下顎枝近傍咬筋、頭頂部）に移植することで骨吸収マウスモデルを作成した。また一部実験では、TGF- $\beta$  I 型受容体選択的阻害剤である SB431542 を腫瘍近傍に投与した。移植2週間後マイクロCT 撮影を行い、骨吸収面積及び腫瘍体積を評価した。
5. 免疫組織化学染色及びTRAP染色：本学歯学部附属病院にて下顎歯肉扁平上皮癌と診断され、顎骨切除された浸潤型、平滑型それぞれの症例の病理組織検体およびマウスモデルを用いて、TRAP/ALP 染色、p-Smad3、RANKL の局在を免疫組織化学染色で検討した。
6. 破骨細胞の供給源の検討：SCCVII亜株A、B移植骨吸収モデルから腫瘍塊を摘出し、単細胞化した後、PE、FITCそれぞれで標識したCD11b およびGr-1 で染色し、FACS解析した。

## 【結果】

1. 細胞特性：増殖能は差を認めず、浸潤能は亜株Aが、遊走能は亜株Bが有意に高かった。
2. SCCVII 亜株の遺伝子発現：亜株Aでは *IL-6* が有意に高い発現を示す一方、亜株Bでは *Pthrp*、*Mmp2*、*Mmp9* の発現が有意に高かった。*Rankl*、*Opg* の発現は亜株Bで有意に高い値を示したが、*Rankl/Opg* 比では亜株Aが有意に高かった。また *Tgfβ*、*Vegf*、*IL-10* 発現には有意な差を認めなかった。
3. 破骨細胞形成能の検討：破骨細胞前駆細胞をSCCVII亜株A, B CMを含む培地で培養すると、コントロールCMと比較してTRAP 陽性細胞を有意に増加させた。またTGF-β、IL-6 単独の添加では、破骨細胞形成能は強くないがRANKL存在下での共刺激によって破骨細胞形成が相乗的に促進された。
4. マウス腫瘍の分析：腫瘍体積は亜株Bで有意に大きいのに対して、CTによる骨吸収面積は亜株Aの方が有意に大きい結果となった。腫瘍全体の *Rankl*、*Tgfβ*、*IL-6* 発現は亜株Aで高かった。亜株A、Bの骨吸収は SB431542 投与により抑制された。
5. 臨床検体およびマウスモデルの破骨細胞形成と p-Smad と RANKL 局在：マウスモデルおよび平滑型、浸潤型下顎歯肉扁平上皮癌の臨床検体において、腫瘍細胞のみならず腫瘍間質線維芽細胞の核内に p-Smad3 陽性を示した。また RANKL は腫瘍細胞、腫瘍間質線維芽細胞に陽性を示した。さらに浸潤型臨床検体試料においては破骨細胞の核内にもp-Smad3 陽性を認めた。
6. 腫瘍間質細胞の Rankl 発現：IL-6、TGF-β は ST2 細胞の *Rankl* 発現を上昇させ、さらに共刺激によって相加効果を認めた。
7. 破骨細胞供給についての検討：腫瘍組織を構成する細胞のFACS 解析にてMDSC を示す、CD11b陽性、Gr-1陽性細胞はそれぞれの亜株間で差がなかった。一方で、CD11b陽性の骨髄マクロファージ由来の細胞は亜株Aで2倍程度多かった。

## 【考察】

臨床検体試料を用いた研究で、浸潤型骨吸収を示す腫瘍組織は平滑型骨吸収と比較して IL-6 や RANKL などの産生量が増加する傾向にあることが報告されている。今回作成した2系統の亜株を用いたシンジェニックマウスモデルはこれらの点からもヒト口腔扁平上皮癌による浸潤型及び平滑型骨吸収様式を模倣していると考えられた。

また破骨細胞分化に必須であるRANKLの 供給源として1) 腫瘍細胞自身、2) 腫瘍間質線維芽細胞、3) 骨芽細胞、が考えられ、破骨細胞分化の調整には IL-6、TGF-β の直接作用ということも考えられる。本研究の亜株Aによる浸潤型骨吸収モデルから IL-6、TGF-β による間質線維芽細胞での RANKL 発現上昇、IL-6 と TGF-β による直接的な破骨細胞形成促進作用が主要な骨吸収を担っていることが示唆された。一方、骨芽細胞の RANKL 発現は TGF-β で抑制されることが *in vitro* の実験系で報告されることが多いが、間質線維芽細胞や細胞種によっては RANKL 発現を上昇させることも報告されている。今回の実験系でも IL-6 と TGF-β は骨髄由来マウス間質線維芽細胞株 ST2 の RANKL 発現の上昇に相加効果を与えたことから、サイトカイン発現などの微小環境が腫瘍間質や破骨細胞形成に関与している可能性が示唆された。

## 【結語】

扁平上皮癌の産生するサイトカイン、TGF-β およびIL-6 は破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を直接促進する相乗作用を有し、また間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進し破骨細胞形成を促進することで、浸潤型骨吸収に関与する可能性が示唆された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 高 畑 惣 介 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 古郷 幹彦
	副 査 教授 鶴澤 成一
	副 査 准教授 波多 賢二
	副 査 講師 佐藤 淳
<b>論文審査の結果の要旨</b> <p>本研究は、口腔扁平上皮癌における浸潤型、平滑型の骨吸収機序を解明する目的で、異なる骨吸収様式を示すマウス扁平上皮癌細胞株 SCCVIIを用いて検討をしたものである。</p> <p>その結果、扁平上皮癌の産生する TGF-<math>\beta</math> および IL-6 は、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化を直接促進する相乗作用を有し、また、腫瘍間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進し、破骨細胞形成を相加的に促進することで浸潤型骨吸収に関与する可能性が示された。</p> <p>本研究は、扁平上皮癌の骨吸収様式を理解する上で、有用な知見を得たことから博士（歯学）の学位に十分値するものであると認める。</p>	