



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	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69483
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

腫瘍による骨吸収の分子機序の研究

2018 年 3 月

大阪大学大学院歯学研究科
口腔科学専攻 顎顔面口腔外科学
(口腔外科学第一教室)

高畑 惣介

緒言

歯肉癌など口腔癌が顎骨周囲に及んだ場合、歯槽骨や顎骨に浸潤するため、顎骨を含めた外科的切除が必要になることが多い。そのため、癌細胞の顎骨への浸潤の程度は切除範囲や治療内容に影響を与え、さらに、治療予後にも影響すると報告されている¹⁻³⁾。顎骨浸潤を抑制する薬物療法の確立には、口腔癌、口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤がいかに成立しているか、いかなる制御を受けているのかなど、その分子機序を明らかにする必要がある。一般に、口腔癌による顎骨吸収様式は、浸潤型と平滑型(圧迫型)に大別される。腫瘍細胞の性質や腫瘍宿主応答が異なることで骨吸収や骨破壊の様態が異なるであろうことは理解できるが、二つの骨吸収様式を分ける腫瘍細胞あるいは腫瘍間質細胞の相互作用の分子機序の差異は明らかにされていない。さらに、扁平上皮癌による異なる骨吸収様式を模倣する *in vivo* での実験系の報告もなく、実験モデルを確立し病態解明する意義は大きい。

すべての骨吸収疾患に破骨細胞活性化因子である receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の関与が示唆されている⁴⁾。生理的な骨代謝では、RANKL は骨芽細胞で産生され、破骨細胞前駆細胞に存在する受容体 receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK) シグナルを介して破骨細胞分化を促進する。しかし、RANKL の産生は歯の萌出に関わる歯胚上皮細胞⁵⁻⁹⁾ など骨芽細胞に限られるものではなく、病的な骨吸収においてさまざまな細胞でも報告されている。例えば、関節リウマチにおける関節滑膜線維芽細胞¹⁰⁾、¹¹⁾が、炎症性疾患におけるリンパ球が¹²⁾ RANKL の供給源となりうることが報告されている。ま

た、RANKL は悪性腫瘍による骨溶解などの病的骨代謝にも関与することが示されており¹³⁾

¹⁴⁾、腫瘍細胞自体も RANKL を発現し、骨吸収に関与することも示されている。そして、さまざまな細胞で RANKL 発現を制御するサイトカインシグナルの研究がなされている。

一方、口腔癌による破骨細胞の活性化と骨吸収に関して、Kayamori らはヒト口腔扁平上皮

5 癌標本を用いたマイクロアレイ分析で、副甲状腺関連ペプチド(PTHrP)および Interleukin-6

(IL-6)の高発現と癌細胞及び間質線維芽細胞の高い RANKL 発現に関連があり、骨吸収への関与を報告している¹⁵⁾。また Nakamura らはヒト扁平上皮癌細胞をヌードマウスに移植した

実験系で Transforming growth factor-beta (TGF- β)が破骨細胞を活性化し骨吸収に関与していること¹⁶⁾を報告している。また、これまでに当教室の Yamada らは歯原性腫瘍が産生す

10 る Interleukin-1 alpha (IL-1 α) と TGF- β が相乗的に間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し、腫瘍による顎骨吸収に関与する可能性を示してきた¹⁷⁾。TGF- β は、細胞膜上に存在する

TGF- β II 型受容体に結合し、TGF- β I 型受容体のリン酸化をきたし、Smad2/3 を活性化して

細胞内シグナル伝達を引き起こす¹⁸⁾ 多機能なサイトカインである。また、IL-1 α および IL-6

は多機能な炎症性サイトカインである^{19, 20)}。TGF- β , IL-1 α および IL-6 は破骨細胞前駆細胞

15 の破骨細胞分化を直接促進する機序が報告されており^{21~23)}、骨吸収の複数のステップに影響していることが示唆されている。さらに、先行研究で集積された TGF- β とインターロイキンの

相互作用と RANKL 発現を介した骨吸収機序の知見を踏まえて、本研究では、TGF- β および

IL-6 に焦点をあてて扁平上皮癌による顎骨吸収の分子機序を検討した。

これまで口腔癌の顎骨浸潤の機序を解析する目的で、B88²⁴⁾、BHY²⁾、HSC3^{14, 16, 25)}、HO-1-N-1¹⁴⁾などのヒト由来扁平上皮癌細胞株を用いて、移植モデルがいくつか作成されてきた。しかしこれらの異種移植モデルは免疫不全動物を使用していることから、病態解明には免疫系が完全に保持されているシンジェニックモデルがより適していると考えた。そのため、本

- 5 研究では、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浸潤型および平滑型様の骨吸収シンジェニックマウスモデルを作成し、それぞれの破骨細胞活性化の機序とその差異を検討した。

研究方法

1. 実験試薬

リコンビナントマウス TGF- β 1 (Biolegend, San Diego, CA, USA) 、リコンビナントマウス IL-6 (Biolegend)、Human Macrophage colony-stimulating factor:M-CSF (ロイコプロール:協和発

5 酵工業、東京、日本)、リコンビナント可溶型 RANKL (ORIENTAL YEAST、東京、日本)を本実験に用いた。

TGF- β I 型受容体であるアクチビンレセプター様キナーゼ (ALK) の選択的阻害剤には、SB-431542 (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)を使用した。

抗体には、抗 RANKL ヤギポリクローラ抗体 (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX,

10 USA)、抗リン酸化特異的 Smad3 ウサギポリクローナル抗体 (#600-401-919S, Rockland, Gilbertsville, PA, USA)を使用した。

2. 細胞培養

マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVIIは九州歯科大学 自見英治郎教授および大阪大学大学院歯学研究科口腔外科学第二教室 由良義明教授より分与された。マウス骨髄由来間質線

15 維芽細胞 ST2 (Resource No.RBRC-RCB0224)は独立行政法人理化学研究所より購入した。

SCCVII細胞の培養には 10% ウシ胎仔血清 (FBS;HyClone, Logan, UT, USA)、抗生物質 (100 Units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を培養液として使用し 37°C、

5% CO₂ 気相下で 100 mm 細胞培養皿 (Corning, Corning, NY, USA) で培養した。また ST2 細胞には、10% FBS を含む RPMI 1640 培地 (Thermo Fisher Scientific) を培養液として使用し、37°C、5% CO₂ 気相下で 100 mm 細胞培養皿 (Corning) で培養した。

3. SCCVII のマウス骨吸収モデルを用いた亜株細胞の選別

- 5 継代培養されている 4 系統の SCCVII 細胞 1×10^5 個を、C3H/HeNJeI 雌マウス (日本クレア、大阪、日本) の頭蓋骨骨膜近傍に移植し、3 週間後に動物用マイクロ CT (R.mCT2: 株式会社リガク、東京、日本)、管電圧 90 kV, 160 μ A, ボクセルサイズ 40 μ m x 40 μ m x 40 μ m で頭蓋骨部分を撮影し、骨吸収の程度を観察した。マイクロ CT にて得られた DICOM データを TRI/3D-BON (ラトックシステムエンジニアリング株式会社、東京、日本) にて三次元構築を行い、頭蓋骨の穿孔と骨の増生、骨表面の変形を評価し、骨吸収様式の異なる亜株 2 系統を選別し (亜株 A, B) 本研究に用いた。それぞれの SCCVII 亜株は継代培養における細胞選別と形質転換を避けるため、同一継代回数のストックをすべての実験に用いた。
- 10

4. 細胞特性

- 細胞増殖: SCCVII の亜株 A, B を 100 mm 細胞培養皿 (Corning) に播種し、80% 飽和状態まで増殖させた後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて洗浄後、0.05% Trypsin-0.02% EDTA 溶液 (以下 EDTA/Trypsin 溶液) にて回収し、Coulter Counter (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) にて細胞数を測定した。6 穴培養プレート (Corning) に 1.0×10^5 個ずつ各細胞株を播種、37°C、5% CO₂ 気相下で 100 mm 細胞培養皿で培養を行った。細胞が定着した時点を day
- 15

0 とし、day 1 から day 5 まで細胞数を計測した。培養液は 3 日毎に交換した。細胞数の計測は、EDTA/Trypsin 溶液にて回収し、Coulter Counter (Beckman Coulter) にて細胞数を測定した。

細胞遊走能は Wound healing assay は Liang らの方法 ²⁶⁾ に準じて行った。すなわち、SCC

- 5 VIIそれぞれの亜株 A, B を 60 mm 細胞培養皿に播種し、コンフルエントな状態で実験に使用した。PBS にて細胞を洗浄後、10 μ l ピペットチップの先端を細胞層に対して直角に圧接し、一定の力で一定の幅の wound を形成した。その後、十分に PBS にて洗浄し、浮遊細胞を可及的に除去した。細胞が欠失した wound 方向へ細胞が遊走する過程を位相差顕微鏡で経時的に観察し、wound の幅に対する修復距離を計測して修復率を求めた。

- 10 Migration assay は Calvin らの方法 ²⁷⁾ に準じて行った。すなわち、ポアサイズ 8 μ m ケモタキセル (KURABO、東京、日本)を用い、ケモタキセル下面を Cultrex Mouse Laminin I (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)にてコートし、24 穴細胞培養皿にセットした。上層チャンバーに 0.3% BSA を含む無血清 DMEM で細胞を 1.0×10^5 個/ml の密度で懸濁させ、200ml を播種した。下層チャンバーには 10% FBS 含有 DMEM を 700 μ l 加え、37°C、5% CO₂

- 15 気相下にて 18 時間培養後、上層チャンバーに残存している細胞を綿棒で完全に除去した後、10% ホルマリン溶液にて固定し、ヘマトキシリンにて染色を行った。その後、メンブレンを外してスライドガラス上に封入した。顕微鏡下に無作為 5 点を撮影し、メンブレンを通過した細胞数を同一範囲視野内で計測した。

Invasion assay も同様に Calvin らの方法²⁷⁾を一部変更し行った。すなわち、ポアサイズ 8 μm ケモタキセル (KURABO) に 1 mg/ml のマトリゲルを 100 μl ずつ入れ 4°C、16 時間静置した。ケモタキセル上層に PBS を 100 μl で洗浄後、すぐにマトリゲルの層を傷つけないように溶液を吸引し、24 穴細胞培養皿にセットした。以後は Migration assay と同様に上層に細胞を、

5 下層に培養液をそれぞれ加え 24 時間培養した。培養終了後、上層チャンバーのマトリゲルと細胞を除去し、10% ホルマリン溶液で固定、染色、封入し、メンブレン上の細胞数を計測した。計測は無作為 5 点を撮影し、同一範囲視野内で行った。

5. 全 RNA の抽出および Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

- 80% 飽和状態まで増殖させた SCCVII 亜株 A および B の全 RNA は TRIzol[®] 試薬
- 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて抽出した。ST2 を 80% 飽和状態まで増殖させ、0.3% BSA を含む無血清 DMEM 培養液に交換し、16 時間培養した。100 ng/ml の IL-6 ある
- いは 1 ng/ml の TGF- β を含む培地でさらに 6 時間培養後、全 RNA を TRIzol[®] 試薬を用いて抽出した。*In vivo* の SCCVII 亜株 A, B 腫瘍の RNA は、頭蓋骨近傍に移植後 3 週の腫瘍から抽出した。すなわち、腫瘍周囲の骨や軟組織を含まないように腫瘍塊を摘出し、液体窒素で
- 15 凍結、クライオプレス(マイクロテック・ニチオン、千葉、日本)を用いて粉碎、TRIzol[®]試薬を用いて全 RNA を抽出した。RNA の濃度は超微量分光光度計 Nano Drop 1000 (Thermo Fischer Scientific)で測定した。全 RNA 2 μg を Random Primer (Promega, Madison, WI, USA)および逆転写酵素 Super Script II (Invitrogen)と 42°C、20 分間逆転写反応させ、cDNA を合成した。

定量的リアルタイム PCR には StepOne Plus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。合成した cDNA を KAPA SYBR FAST qPCR キット (日本ジェネティクス株式会社、東京、日本) とそれぞれのプライマーで PCR 反応を行った。PCR 反応は 95°C、3 秒間の熱変性と 60°C、30 秒間のアニーリングを 40 サイクル行い、得られたデータは StepOne Plus™

- 5 Real Time PCR System (Applied Biosystems) を使用し分析した。各遺伝子の発現は *Gapdh* をノーマライザーとして比較 Ct 法で解析した。本研究で用いたプライマーを表 1 に示す。

6. in vitro での破骨細胞形成実験

- マウス初代骨髄細胞は Takahashi ら²⁸⁾ の方法に準じて分離培養した。すなわち、生後 4～6 週齢の野生型 C3H/HeNJeI 雌マウス (日本クレア) 大腿骨を 26 ゲージ針で洗浄して得られた骨髄液を、PBS で洗浄、200 x g で 5 分間遠心、10% FBS、1% ペニシリン/ストレプトマイシンおよび 50 ng/ml M-CSF, 2 mM L-glutamine を含む alpha modified Eagle's Minimum Essential Medium (α -MEM) 中で 37°C、5% CO₂ 気相下にて培養した。3 日間培養し、破骨細胞前駆細胞として実験に用いた。破骨細胞前駆細胞を EDTA/Trypsin 溶液で回収し、48 穴プレートに 5 x 10⁵ 個/well の密度で播種した。sRANKL (25 ng/ml)、TGF- β (1 ng/ml)、IL-6 (100 ng/ml) などの試薬の存在下あるいは非存在下で 7 日間培養した。培養液と試薬の交換は 3 日毎におこなった。一部実験では細胞の無血清培養上清を (以下、CM) 加えて培養した。最終濃度 5% の CM および sRANKL (50 ng/ml)、存在下で破骨細胞前駆細胞を 7 日間培養した。対照には ST2 の CM を 5% 濃度で用いた。培養終了後、10% ホルマリン溶液で細
- 10
- 15

胞を固定し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase: TRAP) 染色を行った。TRAP 染色には TRAP/ALP 染色キット(和光純薬)を用いた。核が 3 つ以上で TRAP 陽性の多核巨細胞数を破骨細胞として計測した。

7. シンジェニックマウスモデルの作成

- 5 5×10^5 個のマウス扁平上皮癌細胞株 SCC7 亜株 A, B を 20 μ l の無血清 DMEM に希釈し、26G 針を用いて生後 4~6 週齢の野生型 C3H/HeNJel 雌マウス(日本クレア)の骨近傍(下顎枝近傍咬筋、頭頂部)に移植し 3 週間飼育した。マウスの実験ではミダゾラム(ドルミカム 4 mg/kg: アステラス製薬)、塩酸メデトミジン(ドミツール 0.75 mg/kg: 日本全薬工業)、酒石酸ブトルファノール(ベトルファール 5 mg/kg: Meiji Seika ファルマ株式会社)、の三種混合溶液を腹腔内麻酔し処置を行った。また一部実験では、TGF- β I 型受容体の選択的阻害剤である SB431542(和光純薬工業株式会社) 10 mg/kg を移植 3 日および 10 日後に腫瘍近傍に投与した。癌細胞移植後 3 週間飼育し、ペントバルビタールの腹腔内過量投与で安楽死させ、以後の実験に用いた。腫瘍体積はノギスを用いて計測し $V = W^2 \times L \times 0.52$ (V; 体積、W; 短径、L; 長径)にて計算した²⁹⁾。骨破壊の評価には動物用マイクロ CT を用い、得られた DICOM
- 15 データを TRI/3D-BON にて三次元構築を行った。頭頂部移植実験では3次元構築画像を真上から撮影し、2次元化した写真の骨表面の穿孔部および変性部の面積を Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) にて算出した。本動物実験は大阪大学歯学研究科動物実験委員会で承認されたプロトコールに従い実施した(承認番号: 動歯-27-017-0)。

8. 組織染色

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、治療により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 SCCVII各亜株を移植したマウスモデルにて作成した検体を用いて、組織化学染色を行った。すなわち、大阪大学歯学部附属病院

- 5 口腔外科 1<制御系>で治療を行う患者に対し、検体試料の研究使用への供託について説明し、同意を得られたものを用いた。治療により摘出後速やかに 10% ホルマリン溶液で 48 時間固定した。固定後、15% EDTA 水溶液で 60 日間脱灰後パラフィン包埋を行った。包埋後 4 μm の薄切切片を作製し、脱パラフィン処理をした切片をヘマトキシリン-エオシン染色 (H-E 染色)、免疫組織化学染色、TRAP/ALP 酵素染色に用いた。

- 10 H-E 染色はマイヤーのヘマトキシリン溶液 (武藤化学、東京、日本) および 1% エオシンアルコール (武藤化学) を用いて通法に従い染色した。

免疫組織化学染色は Vectastain ABC キット (Vector Laboratories, CA, USA) を用いて行った。

0.01 M クエン酸緩衝液 pH 6.0 で 10 分間のマイクロウェーブ処理により抗原賦活処理を行い、0.3% 過酸化水素水を含むメタノールに 15 分間浸漬させ内因性ペルオキシダーゼ活性

- 15 を阻害した。ブロッキングは 0.3% BSA を含む PBS に付属の正常血清を希釈し 30 分室温で反応させた。一次抗体には抗 RANKL ヤギポリクローナル抗体 (sc-7628, Santa Cruz Biotechnology) (希釈 1:500)、抗リン酸化特異的 Smad3 ウサギポリクローナル抗体 (#600-401-919S, Rockland) (希釈 1:500) をブロッキング溶液で希釈し 4°C で 16 時間反応させた。

PBS にて 3 回洗浄後、ブロッキング溶液にて希釈した二次抗体を室温で 1 時間反応させた。

PBS にて洗浄後、ABC 試薬を 30 分室温で反応させ、HISTOFINE-シンプルステイン DAB 溶液(ニチレイバイオサイエンス、東京、日本)で発色反応を行った。対比染色にはマイヤーのヘマトキシリン溶液(武藤化学)を用いた。

- 5 TRAP/ALP 酵素染色は TRAP/ALP 染色キット(和光純薬工業株式会社)を用い、プロトコールに従い染色を行った。

マウス頭蓋腫瘍組織は、頭蓋骨を摘出し直ちに 4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業株式会社)に 24 時間浸漬し固定した。固定後、15% EDTA 水溶液で 14 日間脱灰後パラフィン包埋を行った。以後は臨床検体と同様に染色を行った。

10 9. Fluorescence-activated cell sorting(FACS)解析

in vivo の SCCVII 亜株 A, B 腫瘍組織周囲の骨や軟組織を含まないように腫瘍塊を摘出し、15 ml の PBS/BSA バッファー(1% BSA を含む PBS、pH 7.4)中で組織片を細切した。細切した組織を 10 ml 注射シリンジおよび 26 Gy 注射針を用いて細胞を還流させ、単細胞化した。

40 μ m ナイロンセルストレーナー(Corning)に通過させた細胞懸濁液を 200 x g、5 分間遠心、

- 15 PBS/BSA にて洗浄を行い、単細胞を分離した。細胞ペレットに 10 ml の RBC Lysis Buffer (ライフテクノロジーズジャパン、東京、日本)を加え 2 分間常温で静置して赤血球を溶解した。再度遠心、洗浄を行い、35 μ m セルストレーナキャップ付き 5 ml ラウンドチューブ(Corning)に 1.0×10^7 個/ml の密度となるように細胞懸濁液を調整した。30 分室温で静置の後、1 ml ずつ

4 つの試料に分けた。試料はネガティブコントロールとしての未染色、Phycoerythrin (PE) 標識した抗体による単一染色、FITC 標識した抗体による単一染色、両抗体を用いた二重染色とした。抗体は FITC で標識した抗マウス Ly-6G/Ly-6C (Gr-1) 抗体 (Biolegend) (希釈 1:50)、PE で標識した抗マウス CD11b 抗体 (Biolegend) (希釈 1:50) を使用し、室温で 30 分間反応させた。反応後、PBS/BSA バッファーで二回洗浄し、ペレットを 1 ml の PBS/BSA バッファーで懸濁した後、BD FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, USA) を用いて測定した。分析は BD Cell Quest™ を (Becton Dickinson) 用いた。

10. 統計分析

実験結果は平均値±標準偏差 (S.D.) でグラフ化し、以下の方法で統計学的に比較検討した。間質線維芽細胞の *Rankl* 発現実験では、一元配置の分散 (ANOVA) 後、Turkey-Kramer test を用いて多重比較を行った。またその他のすべての二群間の有意差検定は Student's t-test を用いて行い、*P* 値 0.05 未満を有意とし、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。

結果

1. SCCVII 亜株の細胞特性

SCCVII 亜株 A, B の細胞特性を検討比較した(図 1)。細胞形態はともに多角形で敷石状の分布を示し(図 1 a)、亜株間に差を認めず、細胞増殖に関しても有意な差は認められなかった(図 1 b)。細胞遊走能は、Wound Healing Assay(図 1 c)および Migration Assay(図 1 d)ともに亜株 B の方が高い傾向を示した。一方、細胞浸潤能は亜株 A で有意に高い傾向を示した(図 1 e)ことから亜株 A, B の細胞特性は増殖能に差はなく、亜株 A は浸潤能が高く、亜株 B は遊走能が高い細胞であることが示された。

2. シンジェニックマウスモデルとしての妥当性の検討

- 10 SCCVII 亜株 A, B それぞれ 5×10^5 個の細胞をマウス咬筋部に移植したところ移植 3 週間後のマイクロ CT 3 次元画像で、亜株 A では下顎骨広範囲に多数の骨穿孔する骨破壊を認め、頬骨弓の菲薄化も見られた。一方、亜株 B では下顎骨を穿孔する骨破壊は少数にとどまり、主に皮質骨の陥凹を示す変形を認めた(図 2 a)。同様に頭頂部に移植した実験では、亜株 A では腫瘍が頭蓋骨を広範に穿孔するような骨破壊をきたし、亜株 B の骨破壊は骨縫合
- 15 部を中心に拡大し、その周囲には多くの小さい骨穿孔と骨の陥凹と骨の隆起が混在する変型領域を認めた(図 2 b)。亜株 A, B の腫瘍体積は 3 週間の時点では亜株 B 腫瘍が有意に増大した(図 2 c)。亜株 A, B の骨破壊様態の画像上の違いは、骨穿孔部の範囲と表面圧迫と骨隆起であったため、骨穿孔部の面積／骨の変形の面積を骨吸収により穿孔した領域の割

合として計算した。その結果、亜株 A では骨穿孔の面積が 63% であるのに対し、亜株 B では 33% と優位に低く、亜株 A は活発な骨破壊をきたし、亜株 B では骨変形を伴う緩慢な骨吸収をきたすことが示された(図 2 d, e)。頭頂部移植実験は評価も簡便で、再現性が高かったため以下の実験は全て頭頂部移植モデルを用いた。

- 5 亜株 A で見られた骨破壊が破骨細胞を介して吸収されているのか、また亜株 B で見られた骨隆起や変形が骨新生を伴っているのかを確認するために TRAP/ALP 酵素染色を行った。その結果、亜株 A では骨穿孔部に多数の TRAP 陽性破骨細胞を認める一方で ALP 陽性細胞をほとんど確認できず(図 3 a, c)、逆に亜株 B では TRAP 陽性破骨細胞の活性が乏しい一方、高い ALP 活性を認め造骨性変化がみられた(図 3 b, d)。以上のことから今回作成したマウスモデルは、亜株 A は破骨細胞を活性化させ著名な骨吸収を引き起こす浸潤型、亜株 B は破骨細胞の活性化は A より弱く、部分的に骨新生をきたす平滑型骨吸収様式を模倣する実験モデルとして実験に用いた。

3. in vivo での骨吸収関連遺伝子発現の差異

- 15 亜株 A と B の腫瘍での遺伝子発現、特に本研究で着目している TGF- β , IL-6 や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(図 4)。全 RNA は骨や周囲の軟組織を含まない腫瘍組織から抽出した RNA を用いて解析した。その結果、*Rankl* で約 4 倍程度、*Il-6*、*Tgf- β* では約 2 倍程度亜株 A の腫瘍で高い発現を示した。一方、タンパク分解酵素である *Mmp2*、*Mmp9*、RANKL のデコイレセプターである *Opg* の発現には有意な

差を認めなかった。

4. in vitro での骨吸収関連遺伝子発現の差異

SCCVII 亜株 A, B の *in vitro* 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(図 5)。それぞれの細胞がサブコンフルエントの状態 で RNA を抽出し、解析に用いた。その結果、亜株 A では *Il-6* が約 2 倍高い発現を示す一方で、亜株 B では *Pthrp* が約 3.2 倍、*Mmp-2*、*Mmp-9* の発現が約 2 倍高く、*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 が有意に高い傾向となった。また *Tgf-β*、*Vegf*、*Il-10* の発現には有意な差を認めなかった(図 5)。

5. 破骨細胞活性化の検討

- 10 各亜株の産生する液性因子が破骨細胞形成を促進するか否か検討するために各細胞の CM 存在下でマウス大腿骨骨髓由来マクロファージを培養した。CM の対照には破骨細胞形成支持能がある ST2 細胞の CM を用いた³⁰⁾。その結果、亜株 A, B ともにコントロール CM と比較して破骨細胞形成を促進した。また亜株 A は亜株 B よりも破骨細胞形成を促進した(図 6 a)。次に *in vivo*, *in vitro* で亜株間に発現の差を認めた *IL-6*、*in vivo* で発現の差がみられた *TGF-β* の破骨細胞形成に及ぼす効果を検討した。
- 15

RANKL 非存在下では *IL-6* と *TGF-β* の破骨細胞分化能は極めて低く、両因子存在下で培養するとわずかに TRAP 陽性細胞が観察できた。一方で、25 ng/ml の低用量の RANKL 存在下に培養すると *IL-6* および *TGF-β* をそれぞれの共刺激することによって破骨細胞の分化

形成が促進することが示された(図 6 b)。この IL-6 や TGF- β による破骨細胞形成の促進は多く報告されているが^{21, 23)}、興味深いことに RANKL 存在下において IL-6 と TGF- β 共刺激を行うと破骨細胞数がそれぞれの約 3~5 倍と相乗効果を示した。このことから IL-6 と TGF- β がマウス大腿骨由来マクロファージに対する破骨細胞分化形成能に相乗的作用を有することが示唆

5 された。(図 6 c)

6. ヒト下顎歯肉癌およびマウスモデルにおけるリン酸化 Smad3, RANKL の局在の検討

ヒト下顎歯肉扁平上皮癌組織における TGF- β シグナル伝達の活性化および RANKL の局在について免疫組織化学染色にて検討を行った。図 7 は本研究で用いた検体試料の代表的な組織像を示す。浸潤型を示す標本は骨梁間に癌細胞が存在し、骨表面には多数の破骨細胞

10 胞形成が見られ(図 7 a)、TRAP 染色では癌間質線維芽細胞と骨との境界に多数の破骨細胞

が存在していた(図 7 c)。一方、平滑型(圧迫型)を示す標本では、H-E 染色では明らかな破骨細胞の形成は見られず、骨新生像が見られた(図 7 b)。TRAP 染色でも癌間質内に破骨細胞

形成を認めるが、その数は著しく少なかった(図 7 d)。浸潤型、平滑型ともに腫瘍間質線維

芽細胞のみならず扁平上皮癌細胞にも RANKL の染色性を認め、浸潤様式での染色性に明

15 らかな差は見られなかった。また、平滑型では骨表面に増生した RANKL 陽性の骨芽細胞を

認めた(図 8 b)。リン酸化 Smad3 の免疫組織化学染色では RANKL の染色性同様、浸潤型、

平滑型ともに腫瘍細胞の核内のみならず腫瘍間質線維芽細胞の核内に陽性を認め、浸潤型

では破骨細胞の核内にも陽性を示しており、TGF- β シグナルが作用していることが示唆された

(図 8 c, d)。骨吸収マウスモデルでの RANKL 染色性は臨床検体試料と同様に亜株 A、B ともに腫瘍細胞のみならず腫瘍間質線維芽細胞に陽性を認め、亜株 B においては増生した骨芽細胞にも陽性を示した(図 9 a, b)。リン酸化 Smad3 染色性も臨床検体試料と同様に腫瘍細胞、腫瘍間質線維芽細胞、とくに亜株 B では新生骨表面の骨芽細胞の核内に陽性を示し、

5 TGF- β シグナルが作用していることが示唆された(図 9 c, d)。

7. 間質線維芽細胞株(ST2)の *Rankl* 発現に対する TGF- β , IL-6 の効果の検討

マウス骨髄由来間質線維芽細胞株、ST2 細胞を IL-6 あるいは TGF- β 存在下で 3 時間培養し *Rankl* の発現についてリアルタイム PCR を用いて検討したところ、コントロールと比較して

IL-6 で約 1.5 倍、TGF- β で約 3.3 倍と *Rankl* 発現の上昇を認めた。そして ST2 細胞を IL-6

10 および TGF- β 存在下で 3 時間培養すると、約 4.1 倍と *Rankl* 発現はさらに増強され、IL-6 と TGF- β の *Rankl* 発現に及ぼす相加効果を認めた(図 10)。

8. TGF- β 受容体阻害剤 SB431542 の骨吸収に与える影響

ヒトやマウスモデルの扁平上皮癌骨吸収部位での TGF- β シグナルの骨吸収に対する作用を検討するために、腫瘍近傍への TGF- β I 型受容体選択的阻害剤である SB431542 投与を

15 行った。対象には溶媒のみの投与を行った(図 11 a)。その結果、亜株 A および B ともに骨吸収面積は SB431542 投与群で有意に縮小した(図 11 b)。また、腫瘍体積は有意な差を認めなかった(図 11 c)。

9. 破骨細胞の供給についての検討

骨吸収では一般的に骨髄由来マクロファージが破骨細胞の前駆細胞となることが多いが、末梢血に存在する MDSC (Myeloid derived Suppressor cells; 骨髄由来免疫抑制細胞) も乳癌、前立腺癌、肺癌の骨転移巣および多発性骨髄腫などの腫瘍組織内に動員され破骨細胞に分化することが報告されている^{31, 32)}。そこで、MDSC の腫瘍内への動員について検討を行っ

- 5 た。マウス MDSC は Gr-1 陽性、CD11b 陽性細胞として認められ、腫瘍組織を構成する細胞の MDSC のマーカーを FACS 解析した。その結果、亜株 A、B ともに約 15% の細胞が Gr-1 陽性、CD11b 陽性の MDSC 由来であることが示され、亜株間での差はなかった。一方、骨髄マクロファージ由来の CD11b 陽性細胞は亜株 A では約 40%、亜株 B では約 21% で、亜株 A 腫瘍内にはより多くの骨髄由来マクロファージが動員されていることが明らかとなった(図 12)。

考察

近年の研究からすべての骨吸収疾患に RANKL の関与が示唆されている⁴⁾。当教室では歯原性腫瘍・嚢胞が産生するサイトカインが RANKL を介した破骨細胞の形成を促進させ、骨吸収や骨破壊をきたし腫瘍や嚢胞の増大のメカニズムの一つになると考え、これまでに、角化

5 嚢胞性歯原性腫瘍やエナメル上皮腫が産生し含有する IL-1 や TGF- β が間質線維芽細胞の RANKL 発現を上昇させ、興味深いことにその相互作用は相乗的であった。また、リウマチ性関節炎における関節吸収、骨吸収にも IL-6 や TGF- β の関与が研究されている。本実験では、これまでの結果や背景をふまえ、扁平上皮癌細胞から産生される TGF- β およびインターロイキンに着目し、RANKL 依存性の破骨細胞形成機序について検討を行った。

10 口腔扁平上皮癌の骨吸収は、乳癌の骨転移³³⁾、前立腺癌の骨転移³⁴⁾などにおける骨吸収機序と同様に腫瘍細胞あるいは癌間質線維芽細胞から産生される RANKL の関与が示唆されている¹⁴⁾。臨床検体において、浸潤型骨吸収部での破骨細胞の著しい活性化や、腫瘍細胞および癌間質線維芽細胞の RANKL 発現はその関与を支持する所見である(図 7 c, d)。

さらに Shibahara らは³⁵⁾ 口腔扁平上皮癌の臨床検体を用いた免疫染色による研究から、浸潤

15 型骨吸収の破骨細胞形成には、IL-6、IL-11、PTHrP、腫瘍壊死因子 α (TNF- α) などのサイトカインも関与している可能性が報告されている。しかし、口腔扁平上皮癌の骨吸収病態の差異がいかなる機序で成り立つのか、その病態には不明な点が多く、また、模倣する *in vivo* で

の実験系の報告もない。実験モデルを確立しその病態を解明する意義は大きいと考え、本研究を行なった。

まず実験モデル確立のため、扁平上皮癌細胞株である SCCVIIを使用した。臨床において担癌状態では種々の免疫機構が働いている。そのため本研究のように腫瘍による骨吸収の病

- 5 態解析には、免疫機構の存在するシンジェニックマウスモデルが適していると考えた。SCCVII細胞株の起源は古く 1970 年代にマウス腹壁に自然発生したと報告³⁶⁾されており、過去の報告において扁平上皮癌骨吸収マウスモデルに SCCVIIが使用されてきた^{37~40)}。今回 2 つの研究室で使用されていた4系統の SCCVII細胞の骨吸収を検討したところ、一つは緩慢な骨吸収をきたす細胞株で、一部に骨新生を伴う骨変形(図 3 b, d)を示した(亜株 B)。そして、別の
- 10 亜株は急速に骨を穿孔する著しい骨吸収をきたし、腫瘍と骨の界面には多数の破骨細胞形成(図 3 a, c)を認めた(亜株 B)。この亜株間で見られた破骨細胞の活性化および骨新生という差異は臨床で見られる浸潤型と平滑型骨吸収の差異と類似しており、扁平上皮癌における浸潤型、平滑型骨吸収の実験モデルとして、亜株 A, B の同継代のストックを用いた。本研究では骨吸収様式の違いとして破骨細胞の活性という点に着目し、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、検討した。
- 15

SCCVII各亜株のそれぞれの特性として、細胞遊走能は亜株 B が有意に高く、細胞浸潤能は亜株 A で有意に高い結果となったが細胞形態および細胞増殖には差がなかった(図 2)。また *in vitro* において遺伝子発現の比較では、亜株 A において *Il-6* の発現が約 1.5 倍高い、

一方で亜株 B では *Pthrp* が約 3 倍、*Mmp2*、*Mmp9* の発現が約 2 倍高く、*Rankl/Opg* では亜株 A で有意に高い値を示した(図 5)。しかし、*in vivo* の腫瘍全体の遺伝子発現では *Rankl* で約 4 倍、*Il-6*、*Tgf-β* では約 2 倍亜株 A で高い発現を示し、タンパク分解酵素である *Mmp2*、*Mmp9*、RANKL のデコイレセプターである *Opg* の発現に有意な差は認めなかった。*in vivo* で

5 は免疫応答や、腫瘍内外の周囲組織との相互関係が構築されている影響であると推察した。

今回使用した各亜株の由来は共に同じ SCCVIIであるが、このように亜株ごとで性質の異なる結果を示した。これは癌細胞のように多様な特性を持つ細胞集団が長年それぞれの研究室で継代培養を繰り返されることで選別された結果、今回のような遺伝子発現の違いや、骨吸収様式の違いになったと考える。

10 腫瘍細胞、腫瘍間質線維芽細胞の産生する TGF-β、IL-6 は、それぞれ単独で破骨細胞前駆細胞に直接作用し、破骨細胞分化を促進することが報告されている^{21, 23)}。実際に本研究においても TGF-β、IL-6 は低濃度の RANKL 存在下で破骨細胞分化を強く促進することが示された。さらに、TGF-β、IL-6 共刺激を行うことで破骨細胞分化形成が相乗的に促進することが明らかとなった(図 6 b, c)。次に亜株 A, B の産生する液性因子が破骨細胞形成に与える影響

15 を *in vitro* で比較した。今回用いた破骨細胞形成実験系では CM は一様に破骨細胞の分化形成に抑制的に働いたため、破骨細胞支持能をも有する ST2 細胞をコントロール CM として使用した。各亜株の無血清培養上清(CM)を含む培地で培養することでコントロール CM 添加と比較して SCCVII亜株 A, B の CM はともに破骨細胞分化形成を促進した(図 6 a)。また、

TGF- β を活性化させるため酸処理した CM で培養したところ、亜株間の差は消失した(データ示さず)。この結果から、酸処理を行うことで TGF- β は活性化されたが、破骨細胞分化に作用する他の因子の活性が低下した可能性が推察される。つまり、*in vitro* では亜株間に TGF- β 発現に差がないことに矛盾しない。SCCVII 亜株 A の腫瘍では、多数の破骨細胞形成、著しい骨

- 5 吸収、および TGF- β , IL-6 の発現上昇がみられ、これらが破骨細胞形成に相乗的に作用する機序が考えられた。

免疫組織化学染色での RANKL の染色性は歯肉扁平上皮癌検体、骨吸収マウスモデルともに腫瘍細胞、間質線維芽細胞に陽性であった。腫瘍細胞の RANKL が骨吸収に関与しているのか、間質線維芽細胞の RANKL が骨吸収関与しているのか、についてはヒト扁平上皮

- 10 癌細胞をヌードマウス移植する実験系で Tohyama らは²⁵⁾、間質線維芽細胞の RANKL が有意に骨吸収に関与しているが、腫瘍細胞の RANKL を過剰発現させることで骨吸収はより増強されることから、共に関与しうることを報告している。また、Jimi らは²⁾、扁平上皮癌の微小環境で腫瘍細胞と間質線維芽細胞の RANKL 発現や RANKL/OPG 比など複雑なバランスをもって制御される、としている。本研究での亜株 B は OPG 発現が高く、RANKL/OPG 比で
- 15 は亜株 A は B の 4 倍高かった(図 5)。この RANKL/OPG 比も骨吸収様式を分ける一因となっている可能性が考えられる。浸潤型骨吸収の臨床検体では、腫瘍骨界面の破骨細胞(図 8 a 中の*)と RANKL 陽性の間質線維芽細胞は近接しており、間質線維芽細胞が産生する RANKL が破骨細胞形成に関与していることを強く示唆する所見で、過去の報告^{14, 25)} と矛盾

しない。リン酸化 Smad-3 の染色性も同様に腫瘍細胞、間質線維芽細胞の核に陽性で、浸潤型骨吸収の臨床検体においてはさらに破骨細胞の核内にも陽性を示した(図 8 c 中の*)。

すなわち、TGF- β シグナル伝達が間質線維芽細胞で活性されていることが示され、さらに、間質線維芽細胞での RANKL 産生を介した破骨細胞の活性化機序に加えて、破骨細胞前駆

5 細胞に直接作用していることを示している。

当教室の Yamada らは歯源性腫瘍の TGF- β や IL-1 シグナルが間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導すること、さらに両因子は相乗作用を有することを報告した¹⁷⁾。TGF- β が RANKL 発現を促進する報告は、歯胚線維芽細胞⁷⁾や骨髓由来内皮細胞⁴¹⁾ などであるが、TGF- β は正常な骨代謝での RANKL 供給源である骨芽細胞の RANKL 発現を抑制する⁴²⁾。また、IL-6 が病的状態、例えば関節リウマチの滑膜線維芽細胞の RANKL 発現を促進することは報告されているが⁴³⁾、骨芽細胞の RANKL 発現を誘導することは明らかではない。また、TGF- β と IL-6 のシグナル伝達のクロストークや RANKL 発現への相互作用については明らかにされていない。そこで、浸潤型モデルである亜株 A に発現が高い TGF- β と IL-6 が間質線維芽細胞の RANKL 発現に影響しているか、また、それらの相互作用を明らかにするために、ST2 細胞の RANKL 発現を指標に *in vitro* で検討した。その結果、図 10 のごとく、IL-6 による ST2 細胞の RANKL 発現促進は約 1.5 倍、TGF- β は約 3.3 倍、その相互作用は 4.1 倍と相加的効果が確認された。一方、SCCVII細胞の RANKL 発現に対する IL-6 と TGF- β の作用は見られなかった(データ示さず)。これらの結果から腫瘍微小環境で、腫瘍細胞や

間質線維芽細胞から産生される TGF- β や IL-6 は間質線維芽細胞の RANKL 発現上昇に寄与していることが強く示唆された。IL-6 と TGF- β シグナルのクロストークは細胞種により異なる報告がある。例えば、大腸癌細胞では TGF- β が IL-6 シグナルを阻害し腫瘍増殖を抑制すること⁴⁴⁾ やヒト表皮角化細胞で IL-6 シグナル下流の STAT3 が Smad3 と選択的に結合し TGF- β に拮抗することが示唆されている⁴⁵⁾。一方、肺癌細胞と間質線維芽細胞の相互作用においては IL-6 により TGF- β シグナル伝達が増強されるなど、反する報告もなされている⁴⁶⁾。このことから間質線維芽細胞におけるシグナル伝達は癌など腫瘍細胞や骨芽細胞とは異なることが推察され、分子メカニズムの解明のため今後さらなる検討が必要であると考えられた。

- 本研究を通して、扁平上皮癌細胞 SCCVII の骨吸収に TGF- β と IL-6 が関与していること、
- 10 その機序は、1) 間質線維芽細胞の RANKL 発現を上昇させること、2) 破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化への相乗作用、の二つの機序が示された。この TGF- β シグナルが扁平上皮癌の骨吸収への関与を確認するために、TGF- β I 型受容体選択的阻害剤である SB431542 をマウス骨吸収モデルに投与した。亜株 A および B の腫瘍サイズの増大には有意差はなかったが、両細胞株の骨吸収は著明に抑制されたことから、TGF- β が骨吸収に強く関与していることが明らかとなった。本研究での TGF- β の阻害は破骨細胞前駆細胞から破骨細胞分化を抑制しているのか、間質線維芽細胞の RANKL 発現を抑制しているのか、を区別することはできないため、今後の詳細な解析も必要と考えた。
- 15

生理的な骨吸収過程で破骨細胞は骨髄マクロファージに由来し、骨の微小環境において外部から種々の刺激を受けることにより破骨細胞へと分化する。各亜株の骨吸収マウスモデルで明らかに破骨細胞数に違いがあり、破骨細胞は腫瘍と骨境界面のみならず腫瘍実質内にも観察する事ができた。これらの腫瘍微小環境に誘導される破骨細胞の由来を検討するために、

- 5 MDSC の割合を FACS 解析した。MDSC は、近年乳癌の骨転移などで注目されており、破骨細胞への分化が示唆されている^{31, 32)}。その結果、亜株 A, B ともに約 15% が CD11b 陽性、Gr-1 陽性の MDSC であった。一方、CD11b 陽性の骨髄由来マクロファージ骨髄の割合は亜株 A で 40%、亜株 B で 20% と有意に A で高い割合となった。このことから破骨細胞の由来は一部に MDSC によるものも認めるものの、一方で大部分は骨髄由来マクロファージであり
- 10 MDSC が骨吸収様式を分ける一因とはならないことが示唆された。このことは、MDSC を動員するサイトカインである IL-10 や VEGF の発現が亜株 A と B で差がなかった結果(図 5)にも関連すると考えられる。

結語

本研究ではヒト口腔扁平上皮癌の骨吸収、骨浸潤のマウスモデルとして、マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVIIの浸潤型骨吸収をきたす亜株と、圧迫型骨吸収をきたす亜株を用いた実験モデルを作成し、骨吸収に関わる分子機序を検討した。本研究から得られた知見を図 13 の模

5 式図で示す。

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された。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究を行う機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)古郷幹彦教授に深甚なる謝意を表します。

- 5 また、本研究の立案ならびに進行にあたり、終始御教示、御指導頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)相川友直 講師、宮川和晃 医員に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため、特別な御配慮、御協力を頂きました大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔外科学講座(口腔外科学第一教室)の教室員の皆さまに厚く御礼申

- 10 し上げます。

参考文献

1. Izumo, T. (2001) : Surgical pathology of squamous cell carcinoma in the mandibular gingiva: Mode of mandibular invasion. (in Japanese). *J Jpn Soc Oral Tumor*. 13. 223-228.
2. Jimi, E. Furuta, H. Matsuo, K. Tominaga, K. Takahashi, T. Nakanishi, O. (2010) : The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Diseases*. 17. 462-468
3. Wong, R.J. Keel, S.B. Glynn, R.J. Varvares, M.A. (2000) : Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 110. 65-72.
4. Kong, Y.Y. Feige, U. Saroi, I. Bolom, B. Tafuri, A. Morony, S. Capparelli, C. Li, J. Elliott, R. McCabe, S. Wong, T. Campagnuolo, G. Moran, E. Bogoch, E.R. Van, G. Nguyen, L.T. Ohashi, P.S. Lacey, D.L. Fish, E. Boyle, W.J. Penninger, J.M. (1999) : Activated T cell regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 402. 304-309.
5. Philbrick, W.M. Dreyer, B.E. Nakchbandi, I.A. and Karaplis, A.C. (1998) : Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95. 11846-11851.
6. Kitahara, Y. Suda, N. Kuroda, T. Beck, F. Hammond, V.E. and Takano, Y. (2002) : Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone*. 30. 48-56.
7. Wise, G.E. Frazier-Bowers, S. and D'Souza, R.N. (2002) : Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 13. 323-334.
8. Yao, S. Ring, S. Henk WG and Wise GE: In vivo expression of RANKL in the rat dental follicle as determined by laser capture microdissection. *Arch Oral Biol*. 49. 451-456.
9. Liu, D. Yao, S. Pan, F. and Wise, G.E. (2005) : Chronology and regulation of gene expression of RANKL in the rat dental follicle. *Eur J Oral Sci*. 113. 404-409.
10. Takayanagi, H. Oda, H. Yamamoto, S. Kawaguchi, H. Tanaka, S. Nishikawa, T. Koshihara, Y. (1997) : A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis : synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 240. 279-286.
11. Takayanagi, H. Iizuka, H. Juji, T. Nakagawa, T. Yamamoto, A. Miyazaki, T. Koshihara, Y. Oda, H. Nakamura, K. Tanaka, S. (2000) : Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 43. 259-269.

12. Kawai, T. Matsuyama, T. Hosokawa, Y. Makihiro, S. Seki, M. Karimbux, N.Y. Goncalves, R.B. Valverde, P. Dibart, S. Li, Y.P. Miranda, L.A. Ernst, C.W. Izumi, Y. and Taubman, M.A. (2006) : B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 169. 987-998.
13. Jimi, E. Shin, M. Furuta, H. Tada, Y. Kusakawa, J. (2013) : The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 42. 803-809.
14. Sato, K. Lee, J.W. Sakamoto, K. Iimura, T. Kayamori, K. Yasuda, H. Shindoh, M. Ito, M. Omura, K. Yamaguchi, A. (2013) : RANKL synthesized by both stromal cells and cancer cells plays a crucial role in osteoclastic bone resorption induced by oral cancer. *Am J Pathol.* 182. 1890-1899.
15. Kayamori, K. Sakamoto, K. Nakashima, T. Takayanagi, H. Morita, K. Omura, K. Nguyen, S.T. Miki, Y. Iimura, T. Himeno, A. Akashi, T. Yamada-Okabe, H. Ogata, E. Yamaguchi, A. (2010) : Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 176. 968-80.
16. Nakamura, R. Kayamori, K. Oue, E. Sakamoto, K. Harada, K. and Yamaguchi, A. (2015) : Transforming growth factor- β synthesized by stromal cells and cancer cells participates in bone resorption induced by oral squamous cell carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 458. 777-782.
17. Yamada, C. Aikawa, T. Okuno, E. Miyagawa, K. Amano, K. Takahata, S. Kimata, M. Okura, M. Iida, S. Kogo, M. (2016) : TGF- β in jaw tumor fluids induces RANKL expression in stromal fibroblasts. *Int J oncol.* 49. 499-508.
18. Miyazono, K. Dijke, P. and Heldin, C.H. (2000) : TGF-beta signaling by Smad proteins. *Adv Immunol.* 75. 115-157.
19. Allan, S.M. Tyrrell, P.J. and Rothwell, N.J. (2005) : Interleukin-1 and neuronal injury. *Nat Rev Immunol.* 5. 629-640.
20. Tanaka, T. Narazaki, M. Kishimoto, T. (2014) : IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 6. 1-16.
21. Fox, S.W. and Lovibond, A.C (2005) : Current insights into the role of transforming growth factor-beta in bone resorption. *Mol Cell Endocrinol.* 243. 19-26.

22. Kim, J.H. Jin, H.M. Kim, K. Song, I. Youn, B.U. Matsuo, K. and Kim, N. (2009) : The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. *J Immunol.* 183. 1862-1870.
23. Kudo, O. Sabokbar, A. Pocock, A. Itonaga, I. Fujikawa, Y. Athanasou, NA. (2003) : Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL-independent mechanism. *Bone.* 32. 1-7.
24. Shin, M. Matsuo, K. Tada, T. Fukushima, H. Furuta, H. Ozeki, S. Kadowaki, T. Yamamoto, K. Okamoto, M. Jimi, E. (2011) : The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 11. 1634-40.
25. Tohyama, R. Kayamori, K. Sato, K. Hamagaki, M. Sakamoto, K. Yasuda, H. Yamaguchi, A (2016) : Establishment of a xenograft model to explore the mechanism of bone destruction by human oral cancers and its application to analysis of role of RANKL. *J Oral Pathol Med.* 45. 356-364.
26. Liang, C.C. Park, A.Y. Guan, J.L. (2007) : In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2. 329-333.
27. Calvin R, Justus. Nancy, Leffler. Maria, Ruiz-Echevarria. and Li, V. Yang. (2014) : In vitro Cell Migration and Invasion Assays. *J Vis Exp.* 88. doi:10.3791/51046
28. Takahashi, N. Yamana, H. Yoshiki, S. Roodman, G.D. Mundy, G.R. Jones, S.J. Boyde, A. Suda, T. (1988) : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology.* 122. 1373-1382.
29. Shin, M. Kadowaki, T. Iwata, J. Kawakubo, T. Yamaguchi, N. Takii, R. Tsukuba, T. Yamamoto, K. (2007) : Association of cathepsin E with tumor growth arrest through angiogenesis inhibition and enhanced immune responses. *Biol Chem.* 388. 1173-81.
30. Udagawa, N. Takahashi, N. Akatsu, T. Sasaki, T. Yamaguchi, A. Kodama, H. Martin, T.J. Suda, T. (1989) : The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cocultures with mouse spleen cells. *Endocrinology.* 125. 1805-1813.
31. Sawant, A. Deshane, J. Jules, J. Lee, C.M. Harris, B.A. Feng, X. Ponnazhagan, S. (2013) : Myeloid-derived suppressor cells function as novel osteoclast progenitors enhancing bone loss in breast cancer. *Cancer Res.* 73. 672-82.
32. Sawant, A. Ponnazhagan, S. (2013) : Myeloid-derived suppressor cells as osteoclast

- progenitors: a novel target for controlling osteolytic bone metastasis. *Cancer Res.* 73. 4606-4610.
33. Cross, S.S. Harrison, R.F. Balasubramanian, S.P. Lippitt, J.M. Evans, C.A. Reed, M.W. Holen, I. (2006) : Expression of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) and tumour necrosis factor related, apoptosis inducing ligand (TRAIL) in breast cancer, and their relations with osteoprotegerin, oestrogen receptor, and clinicopathological variables. *J Clin Pathol.* 59. 716-720.
 34. Pérez-Martínez, F.C. Alonso, V. Sarasa, J.L. Nam-Cha, S.G. Vela-Navarrete, R. Manzarbeitia, F. Calahorra, F.J. Esbrit, P. (2007) : Immunohistochemical analysis of low-grade and high-grade prostate carcinoma: relative changes of parathyroid hormone-related protein and its parathyroid hormone 1 receptor, osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor-kB ligand. *J Clin Pathol.* 60. 290-294.
 35. Shibahara, T. Nomura, T. Cui, N.H. Noma, H. (2005) : A study of osteoclast-related cytokines in mandibular invasion by squamous cell carcinoma *Int J Oral Maxillofac Surg.* 34. 789-793.
 36. Olive, P.L. Chaplin, D.J. Durand, R.E. (1985) : Pharmacokinetics, binding and distribution of Hoechst 33342 in spheroids and murine tumours. *Br J Cancer.* 52. 739-746.
 37. O'Malley, B.W. Cope, K.A. Chen, S.H. Li, D. Schwarta, M.R. Woo, S.L. (1996) : Combination gene therapy for oral cancer in a murine model. *Cancer Res.* 56. 1737 -1741.
 38. O'Malley, B.W. Jr Li, D. (1988) : Combination gene therapy for salivary gland cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 842. 163-170.
 39. Cui, N. Nomura, T. Noma, H. Yokoo, K. Takagi, R. Hashimoto, S. Okamoto, M. Sato, M. Yu, G. Guo, C. Shibahara, T. (2005) : Effect of YM529 on a model of mandibular invasion by oralsquamous cell carcinoma in mice. *Clin Cancer Res.* 11. 2713-2719.
 40. Tada, Y. Kokabu, S. Sugiyama, G. Nakatomi, C. Aoki, K. Fukushima, H. Osawa, K. Sugamori, Y. Ohya, K. Okamoto, M. Fujikawa, T. Itai, A. Matsuo, K. Watanabe, S. Jimi, E. (2014) : The novel IκB kinase β inhibitor IMD-0560 prevents bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 23. 12317-12330
 41. Ishida, A. Fujita, N. Kitazawa, R. Tsuruo, T. (2002) : Transforming growth factor-beta induces expression of receptor activator of NF-kappa B ligand in vascular endothelial cells derived from bone. *J Biol Chem.* 277. 26217-26224.

42. Quinn, J.M. Itoh, K. Udagawa N. Hausler, K. Yasuda, H. Shima, N. Mizuno, A. Higahio, K. Takahashi, N. Suda, T. Martin, T.J. Gillespie M.T. (2001) : Transforming Growth Factor b Affects Osteoclast Differentiation via Direct and Indirect Actions. *J Bone Miner Res.* 16. 1787-1794.
43. Hashizume, M. Hayakawa, N. Mihara, M. (2008) : IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology.* 47. 1635-40.
44. Becker, C. Fantini, M.C. Schramm, C. Lehr, H.A. Wirtz, S. Nikolaev, A. Burg, J. Strand, S. Kiesslich, R. Huber, S. Ito, H. Nishimoto, N. Yoshizaki, K. Kishimoto, T. Galle, P.R. Blessing, M. Rose-John, S. Neurath, M.F. (2004) : TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity.* 21. 491-501
45. Wang, G. Yu, Y. Sun, C. Liu, T. Liang, T. Zhan, L. Lin, X. Feng, X.H. (2016) : STAT3 selectively interacts with Smad3 to antagonize TGF- β . *Oncogene.* 35. 4388-98.
46. Abulaiti, A. Shintani, Y. Funaki, S. Nakagiri, T. Inoue, M. Sawabata, N. Minami, M. Okumura, M. (2013) : Interaction between non-small-cell lung cancer cells and fibroblasts via enhancement of TGF- β signaling by IL-6. *Lung Cancer.* 82. 204-213.

表1 リアルタイムPCRに使用されたプライマー

遺伝子	Forward primer	Reverse primer
<i>Gapdh</i>	5'- AAGGTCATCCCAGAGCTGA -3'	3'-GTTCTTCCACCACTTCGTC-5'
<i>Rankl</i>	5'- CAGCATCGCTCTGTTCTGTA-3'	3'-ACTCTGAGGGTACTTTTGCGTC-5'
<i>Opg</i>	5'- AAGCACCTGTAGAAAACA -3'	3'-CTCACATCTCTCCTATTTTGCC-5'
<i>Mmp2</i>	5'- CAAGTTCCCCGGCGATGTC -3'	3'-CTGTCCACTGGAAGTGGTCTT-5'
<i>Mmp9</i>	5'- CACCACCACAACCTGAACCAC -3'	3'-GATGACGCCCCGAGAAGACTC-5'
<i>Il-6</i>	5'- AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA -3'	3'-CCAGACAACCCTCACCATAGGAG-5'
<i>Il-10</i>	5'- GCCAGGCCTTATCGGAAATG -3'	3'-CGTAAACTTAAGGGACCCAC-5'
<i>Tgf-b</i>	5'- AACAATTCCTGGCGTTACC -3'	3'-GTCACCTCAACATGCCGTC-5'
<i>Pthrp</i>	5'- GTTCGGTGGAGGGGCTTGGC -3'	3'-AACGCGGCGGCAAAGAAGGA-5'
<i>Vegf</i>	5'- AGCGGAGAAAGCATTTGTTTG -3'	3'-GTTTTTGTGTCTGAGCGCAAC-5'

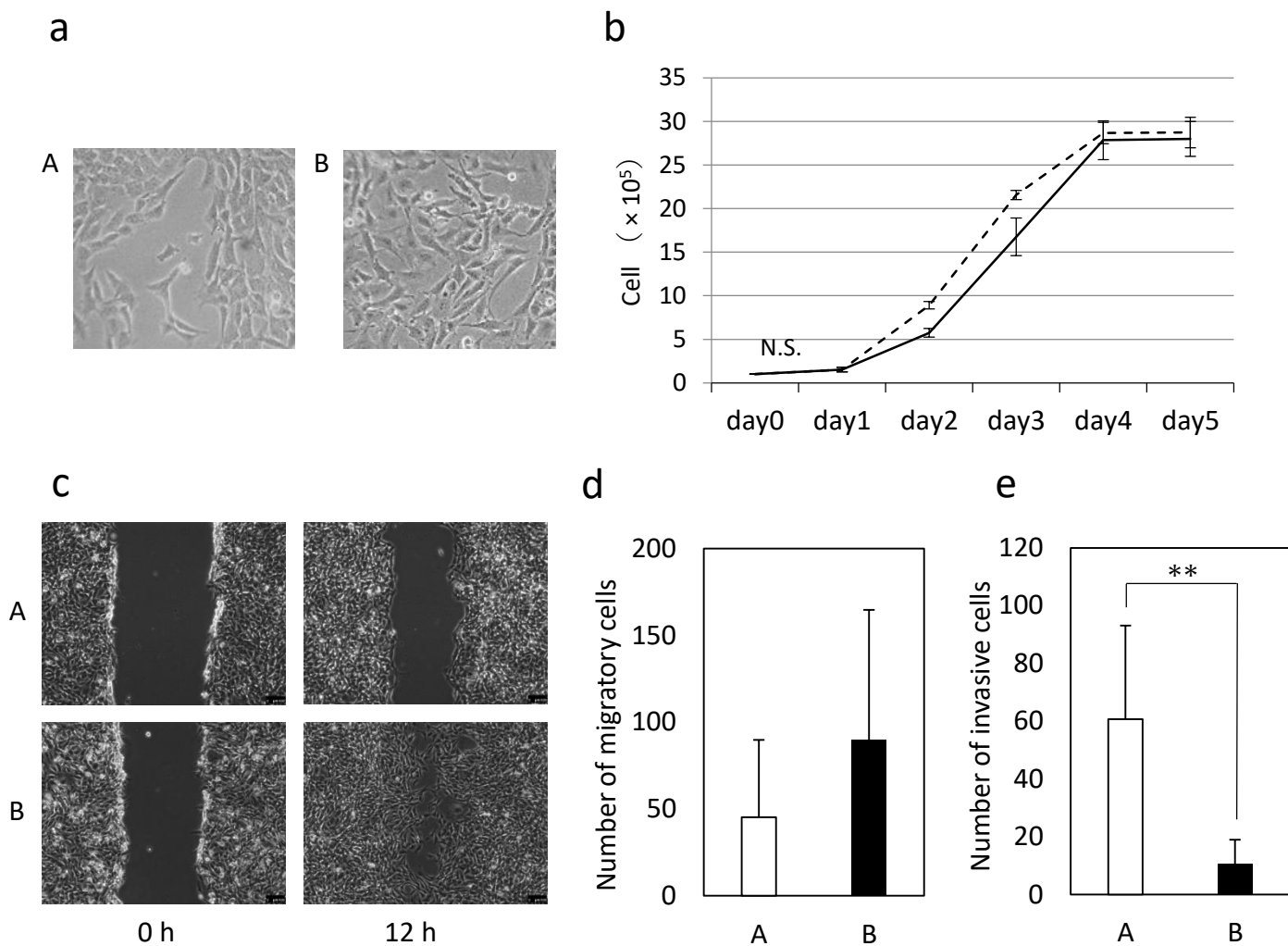


図1 SCCVII 亜株A, B の細胞特性

(a) それぞれの亜株の細胞形態を示す。ともに多角形を呈し、細胞間橋があり敷石状の分布を示す。(b) 細胞増殖曲線を示す。破線は亜株Aを、実線は亜株Bを示す。亜株間に有意な差を認めない。(c) Wound Healing Assay による細胞遊走能を示す。亜株Bにおいて有意に高い遊走能を示した。(d) Laminin Migration Assay による細胞遊走能を示す。有意差はないものの亜株Bが高い遊走能を示した。(e) マトリゲルを用いた細胞浸潤能を示す。亜株Aは有意に高い浸潤能を示した。

Bar S,D N.S. not significant **: $p < 0.01$ (by Student's t test)

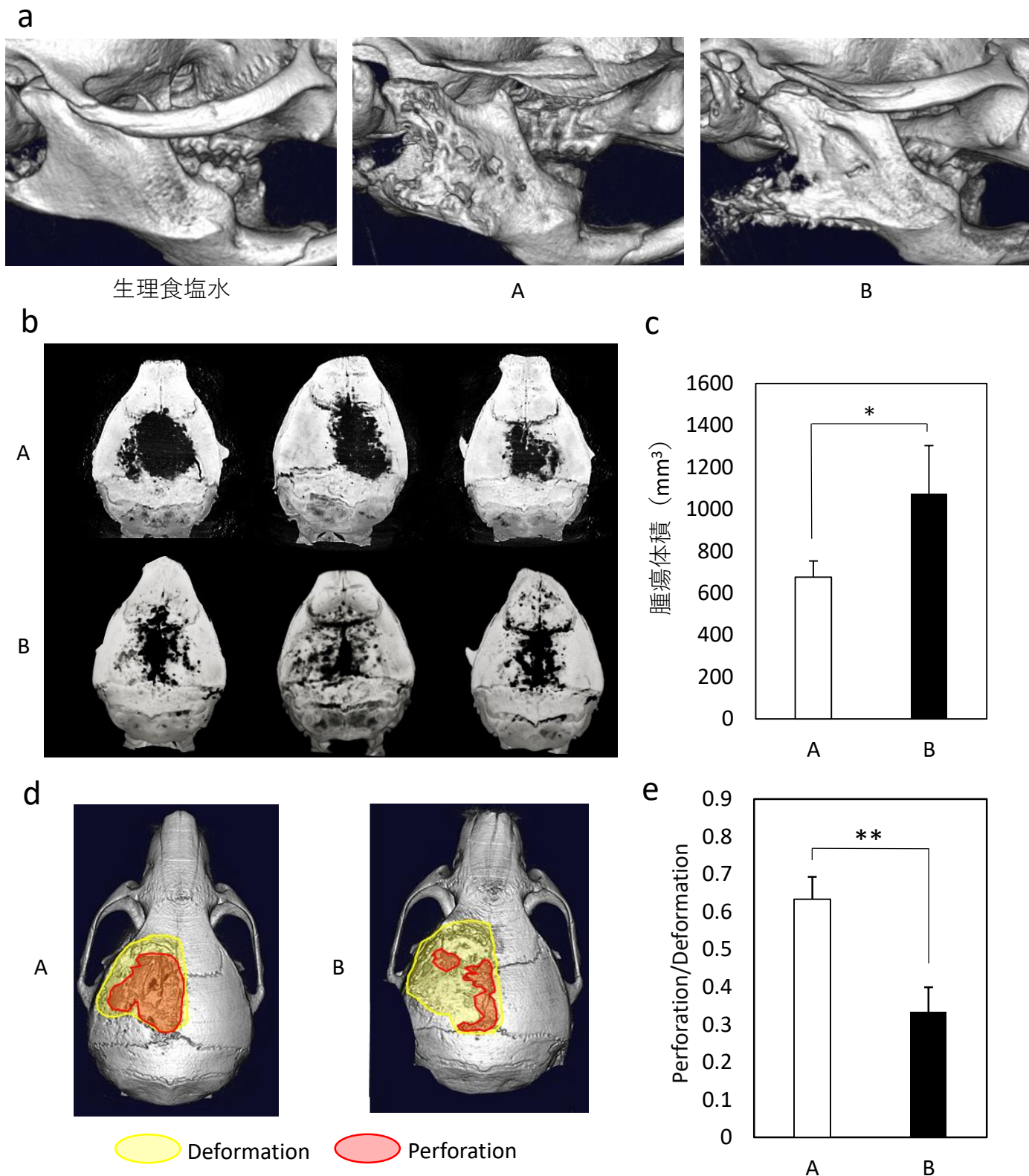


図2 骨破壊能及び腫瘍体積の比較

(a,b) 各亜株 5×10^5 個をマウス咬筋部 (a) および頭頂部 (b) に移植、移植3週間後のマイクロCT 3次元画像を示す。(a) 亜株Aでは下顎骨の穿孔する広範な骨破壊を認めた。一方、亜株Bでは下顎骨を穿孔する骨破壊は一部にとどまり、主に皮質骨の陥凹を示す変形を認めた。(b) 亜株Aでは腫瘍が頭蓋骨を穿孔するような骨破壊をきたし、亜株Bの骨破壊は縫合部を中心として生じており、その周囲には多くの小さい穿孔と骨の陥凹と骨の隆起が混在する変型領域を認めた。(c) 頭頂部に移植した腫瘍体積を示す。亜株B腫瘍は有意に増大した。(d,e) 骨変形領域に対する骨穿孔領域の割合を評価した。亜株Aでは活発な骨破壊が行われている、一方で亜株Bでは骨変形を伴う緩慢な骨吸収が行われていることが確認された。

Bar S,D *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ (by Student's *t* test)

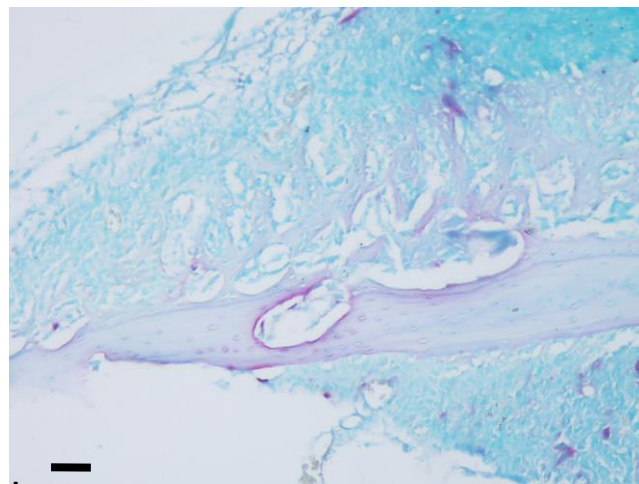
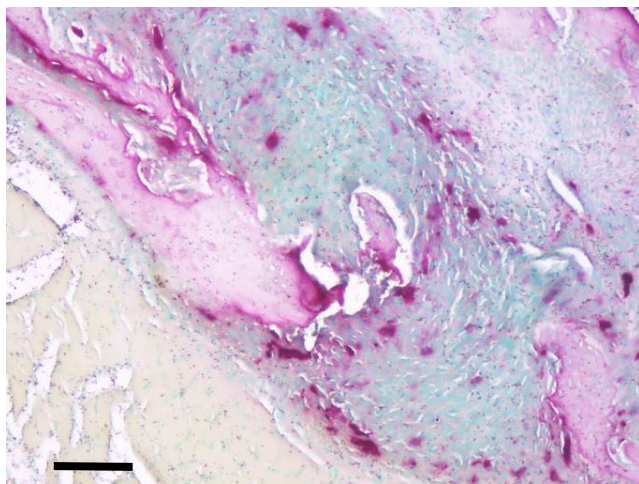
a

亜株A（浸潤型）

b

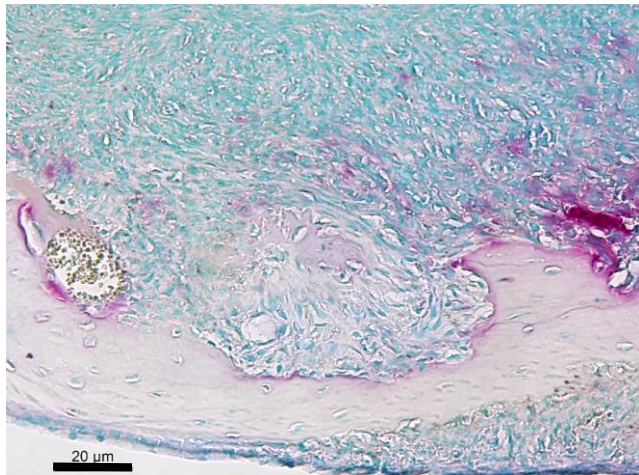
亜株B（平滑型）

TRAP 染色



c

TRAP / ALP 染色



d

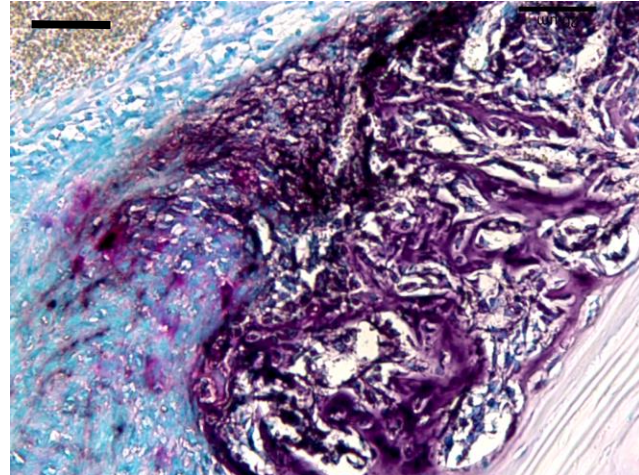


図3 シンジェニックマウスモデルの染色性の比較

マウス頭頂部に移植した亜株A (a, c)、亜株B (b, d) のTRAP染色 (a, b) およびTRAP/ALP (c, d) 染色を示す。

(a) 亜株Aでは骨穿孔部に多数のTRAP陽性破骨細胞が存在し、(b) 亜株BではTRAP陽性破骨細胞は骨表面に少量しか存在せず、骨増生を認める。(c) 亜株AではALP活性をほとんど認めず、(d) 亜株Bでは高いALP活性が確認され、骨増生を認めた。Bar は20 μm を示す。

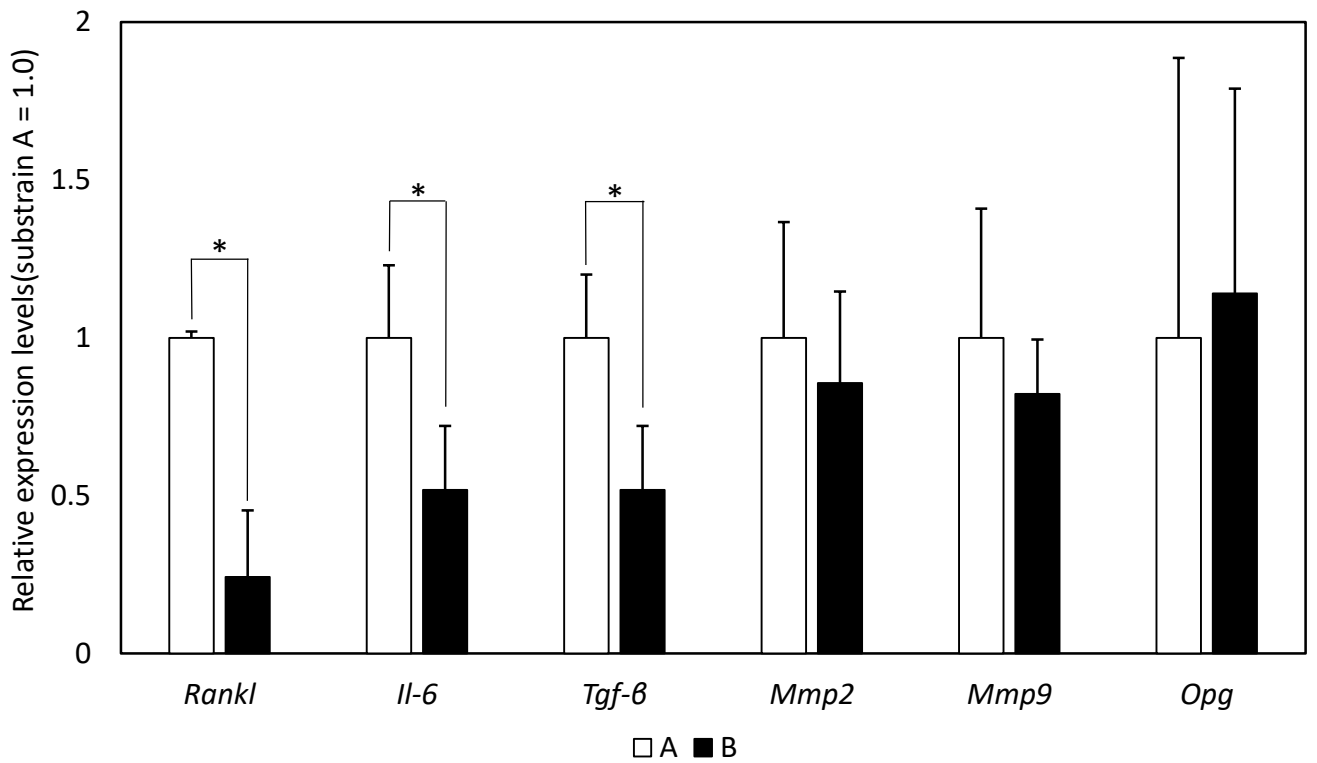


図4 *in vivo*における腫瘍遺伝子発現比較

マウスモデルにおける腫瘍全体の遺伝子発現をリアルタイムPCRを用いて定量的に比較した結果を示す。

*Rankl*で約4倍、*Il-6*、*Tgf-β*では約2倍亜株Aで高い発現を示した。

Mmp2、*Mmp9*、*Opg*の発現に有意な差は認めない。実験は亜株A, B それぞれN=5で、PCRは重複サンプルを用い、同様の実験を3回繰り返した代表的な結果を示す。

Bar S,D *: $p < 0.05$ (by Student's *t* test)

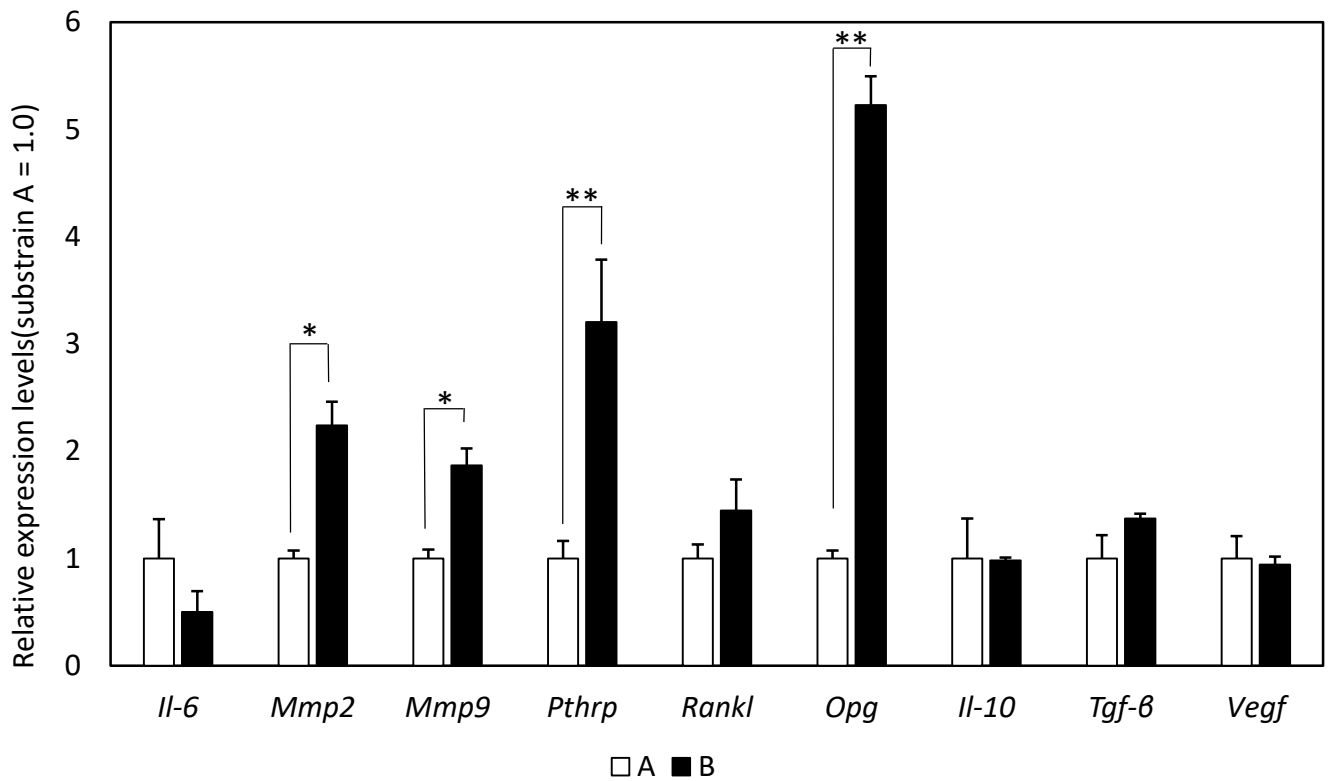


図5 *in vitro*における腫瘍遺伝子発現比較

*In vitro*における各亜株の遺伝子発現をリアルタイムPCRを用いて定量的に比較した結果を示す。

SCCVII亜株A,Bをそれぞれ6穴培養プレートに播種し、80% 飽和状態まで増殖させ、RNAを回収した。遺伝子発現を比較すると、亜株Aでは*Il-6*が約1.5倍程度高い発現を示す一方、亜株Bでは*Pthrp*で約3倍、*Mmp2*、*Mmp9*で約2倍程度発現が高く、*Rankl*、*Opg* の発現は亜株Bで高い値を示した。実験は亜株A, B それぞれN=4で、PCRは重複サンプルを用い、同様の実験を3回繰り返した代表的な結果を示す。

Bar S.D *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ (by Student's *t* test)

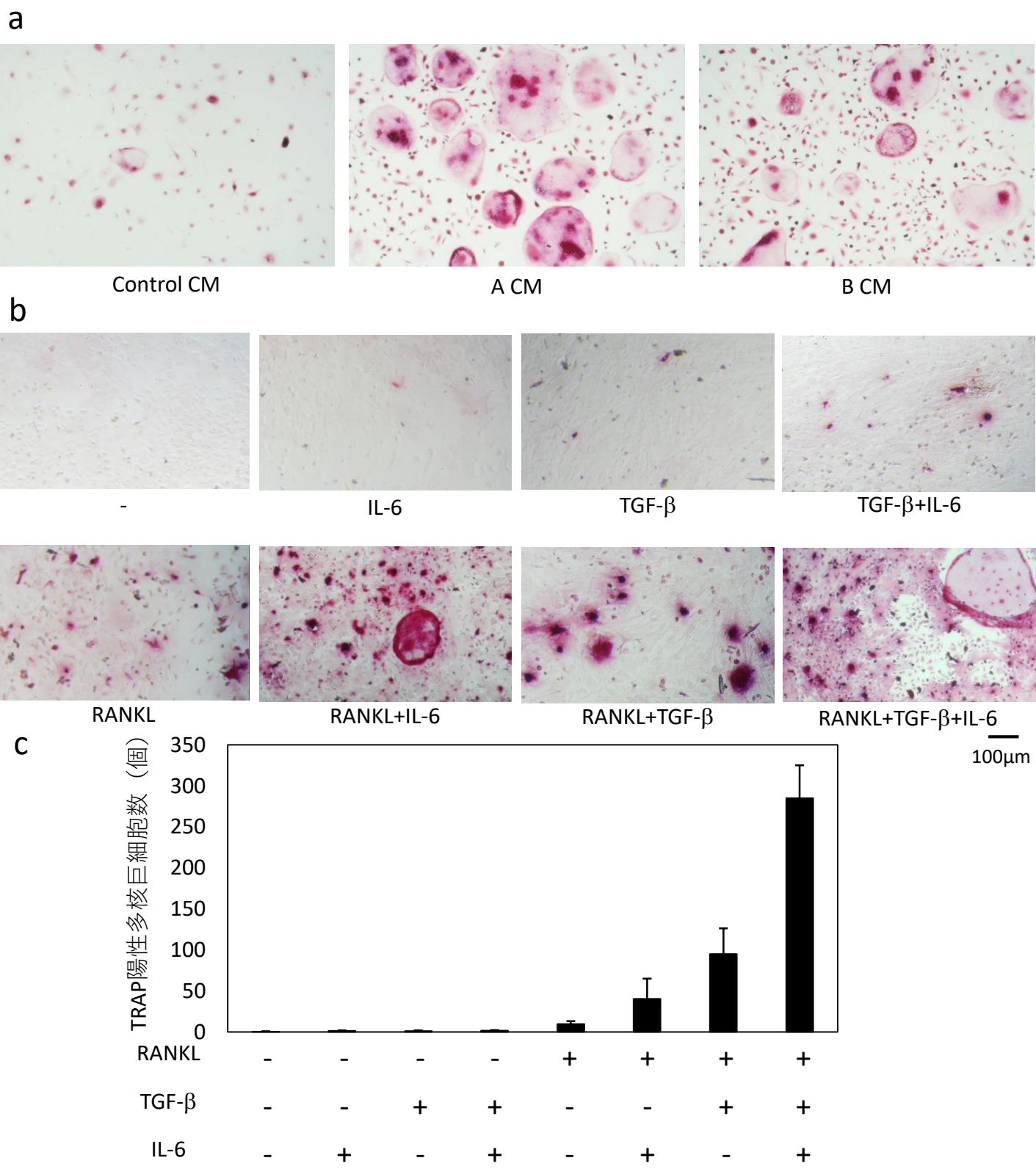


図6 破骨細胞形成能の検討

マウス大腿骨より採取した骨髓液を、M-CSFを添加した培養液で3日間培養することで破骨細胞前駆細胞とし、48穴プレートに 5×10^5 個/wellの濃度で播種しrRANKL (50ng/ml) 及び各垂株の培養上清 (CM) を最終濃度5%になるように添加 (a)、rRANKL (25ng/ml)、rTGF-β (1ng/ml)、rIL-6 (100ng/ml) それぞれに添加後 (b)、7日間培養した。その後TRAP染色を行い、TRAP陽性多核巨細胞数 (c) を検討した。

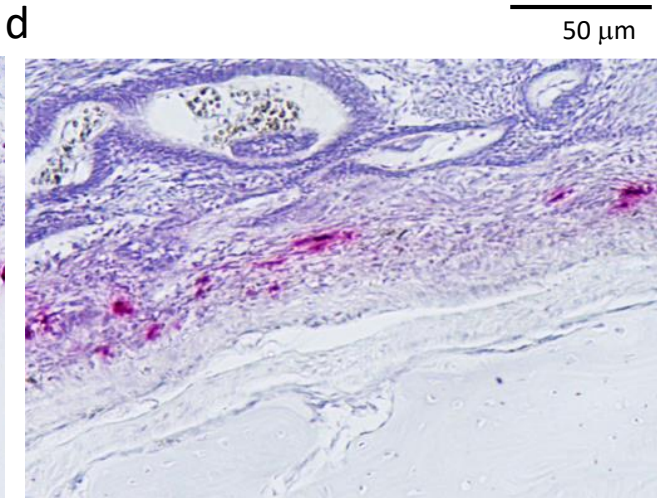
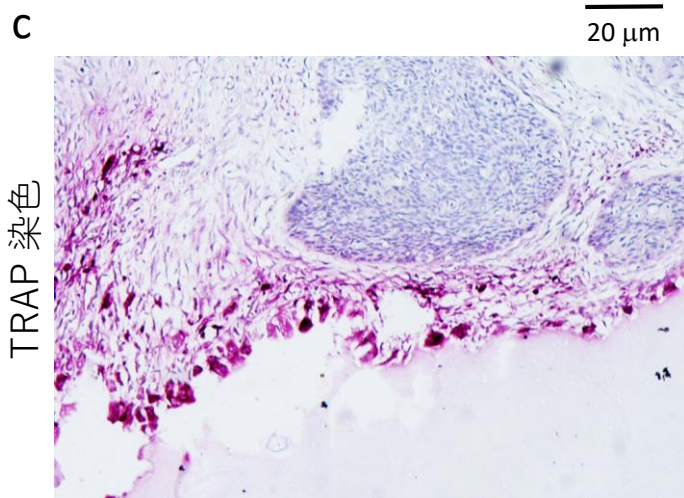
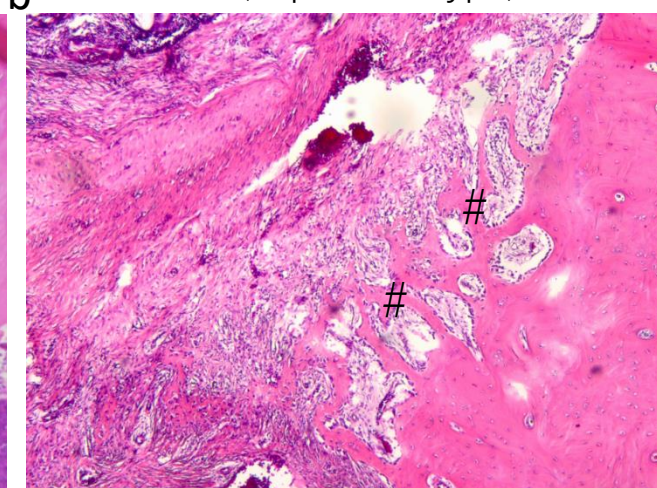
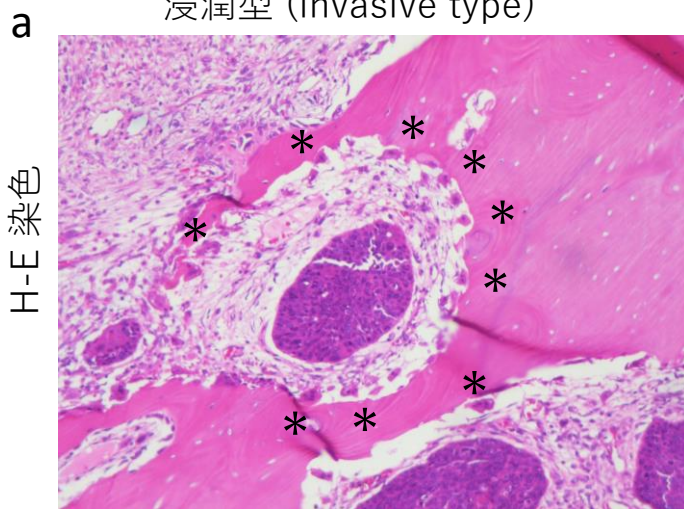
(a) controlと比較してSCCVII各垂株のCMを添加することで破骨細胞分化形成に促進を認めた。

(b) IL-6, TGF-β単独での直接的な破骨細胞分化能は極めて低い一方で、少量のRANKL存在下にIL-6及びTGF-βをそれぞれの共刺激することによって破骨細胞の分化形成が促進することが示された。

(c) RANKL存在下においてIL-6,TGF-β共刺激を行うと破骨細胞数がそれぞれの約3～5倍程度になった。Bar S,D

浸潤型 (invasive type)

平滑型 (expansive type)



20 μm

50 μm

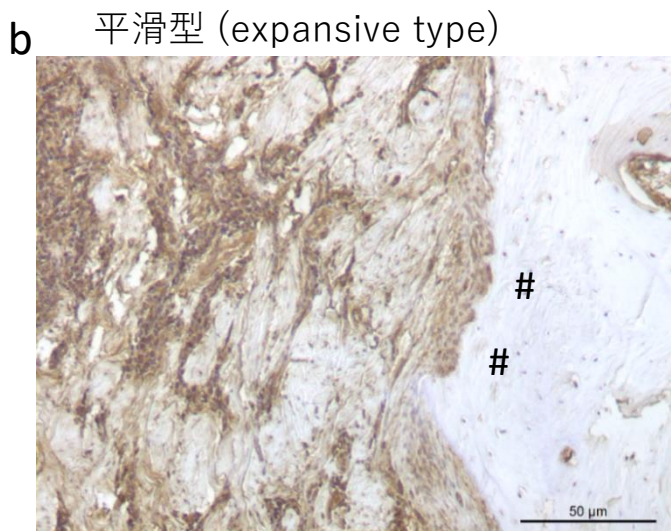
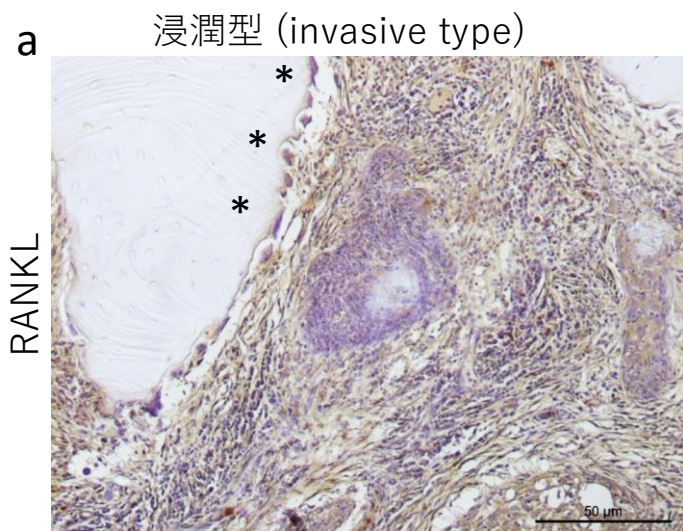
20 μm

20 μm

図7 歯肉扁平上皮癌浸潤型骨吸収 (a, c) 平滑型骨吸収 (b, d) における染色特性の比較

写真aの*は破骨細胞を示す。写真bの#は増生した骨組織を示す。歯肉扁平上皮癌浸潤型骨吸収では、H-E染色でも確認できるほど破骨細胞の活性を認める (a)。腫瘍間質線維芽細胞と骨との境界に破骨細胞を多数認め、骨組織との境界面は不整かつ不連続となっている (c)。

骨表面の破骨細胞の形成は乏しく、腫瘍間質細胞中に少量の破骨細胞の活性化を認めるものの骨組織との境界面は比較的スムーズ (d) で一部で逆に骨の増生を認める (b)。



50 μm
*: Osteoclast
#: Osteoblast

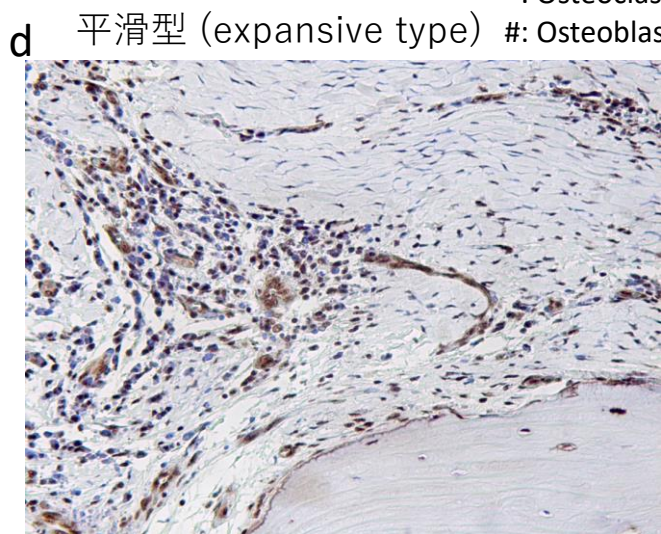
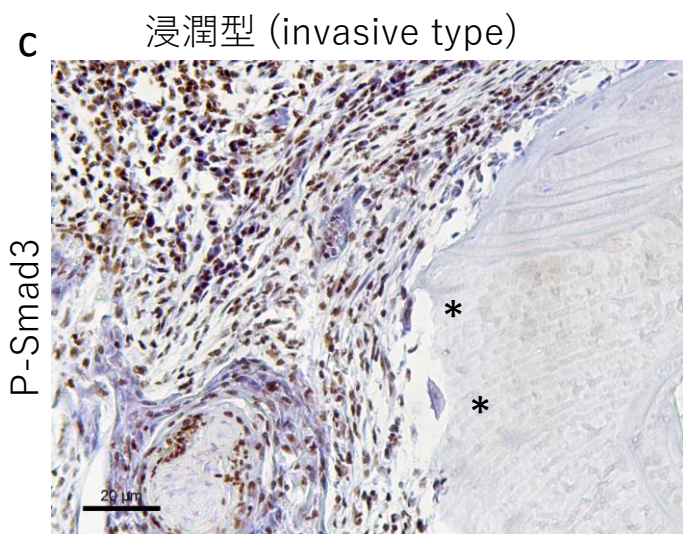


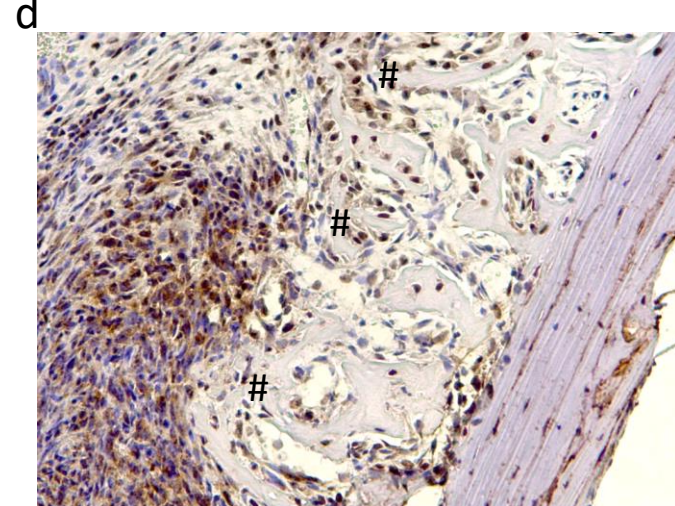
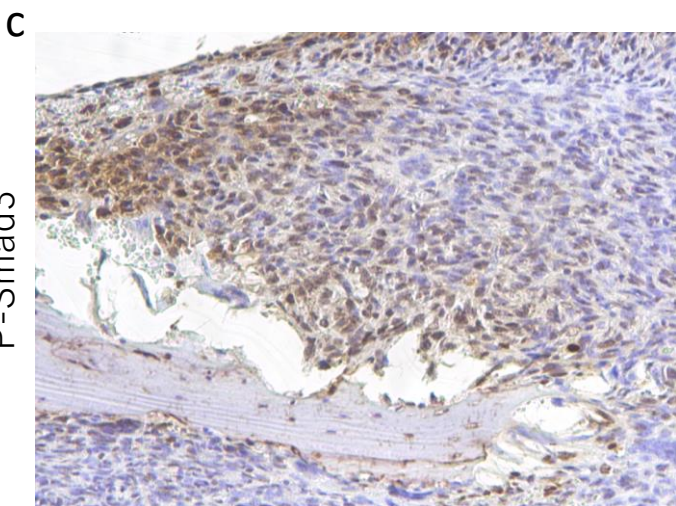
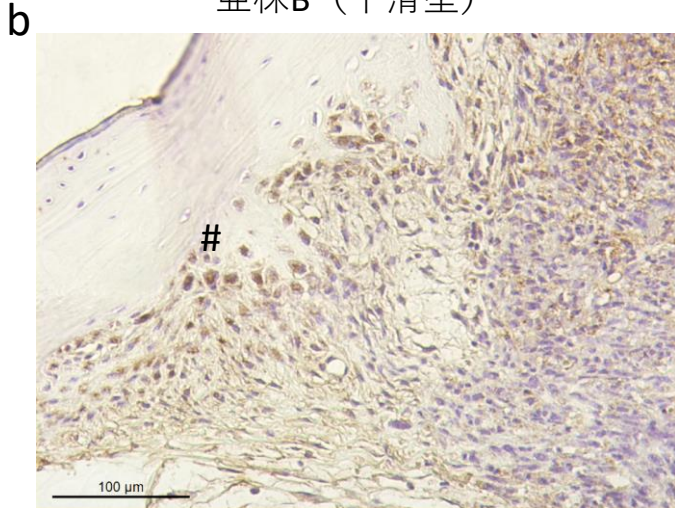
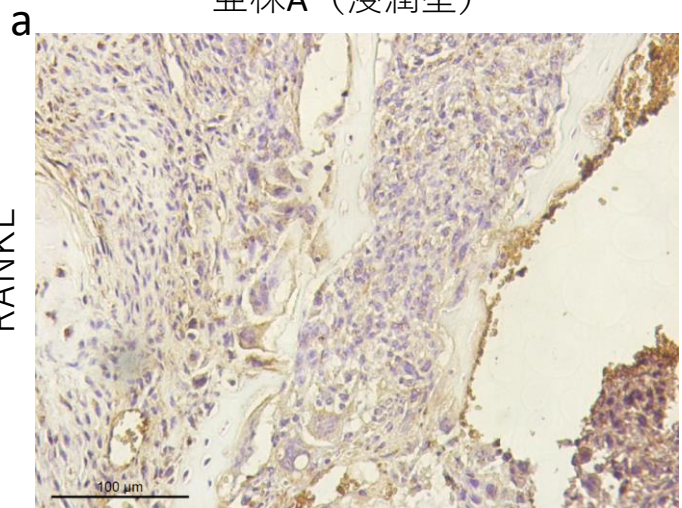
図8 RANKL及びP-Smad3の染色性

臨床検体を用いた免疫組織化学染色結果を示す。

(a, c) 歯肉扁平上皮癌浸潤型骨吸収、(b, d) 平滑型骨吸収で、(a, b) RANKLの染色性を、(c, d) P-Smad3の染色性を示す。染色したもののうち代表的な結果を示す。

垂株A（浸潤型）

垂株B（平滑型）



100 μm

#: Osteoblast

図9 RANKL及びP-Smad3の染色性

シンジェニックマウスモデルを用いた免疫組織化学染色を示す。

骨吸収マウスモデル垂株A（a, c）垂株B（b, d）でのRANKLの染色性を（a, b）に、P-Smad3の染色性を（c, d）に示す。染色したもののうち代表的な結果を示す。

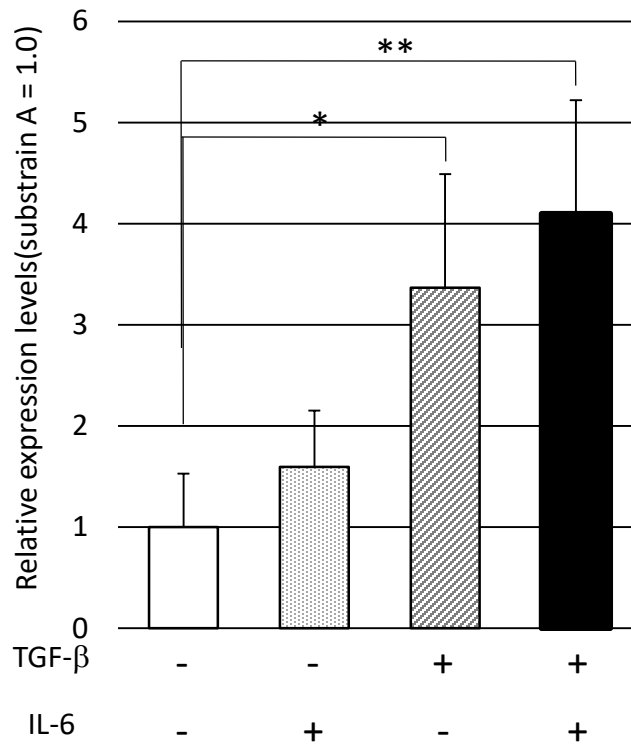


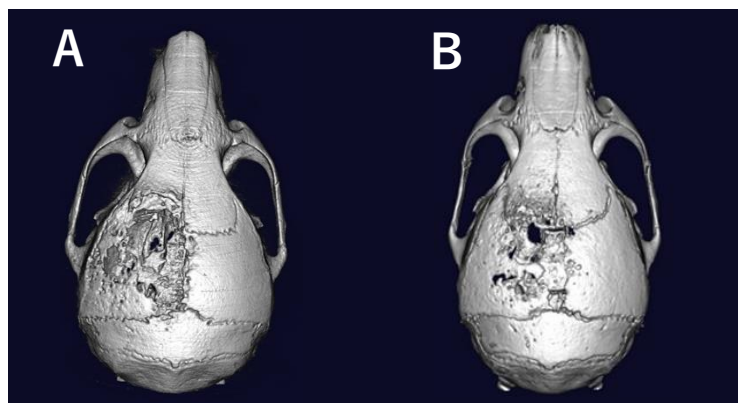
図10 間質線維芽細胞株（ST2）のRANKL発現、TGF- β 及びIL-6の効果

マウス骨髄由来間質線維芽細胞株（ST2）の遺伝子発現を示す。

TGF- β 、IL-6存在下で3時間培養しリアルタイムPCRで*Rankl*発現を検討した。TGF- β 及びIL-6の刺激で*Rankl*発現の誘導を認めた。また両者による共刺激で*Rankl*発現は増強された。実験はそれぞれN=3で、PCRは重複サンプルを用い、同様の実験を3回繰り返した代表的な結果を示す。

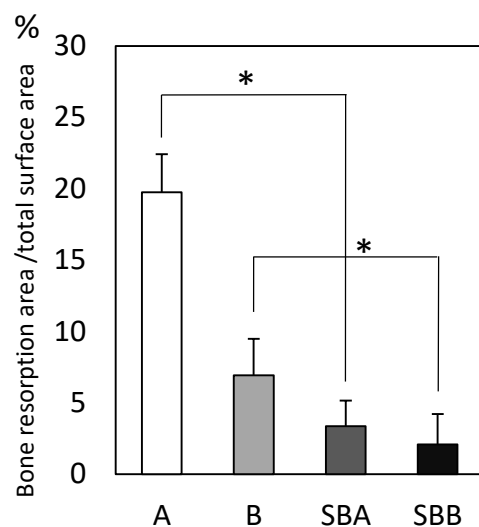
Bar S,D *: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$ (by Turkey-Kramer test)

a



Vehicle 投与

b



c

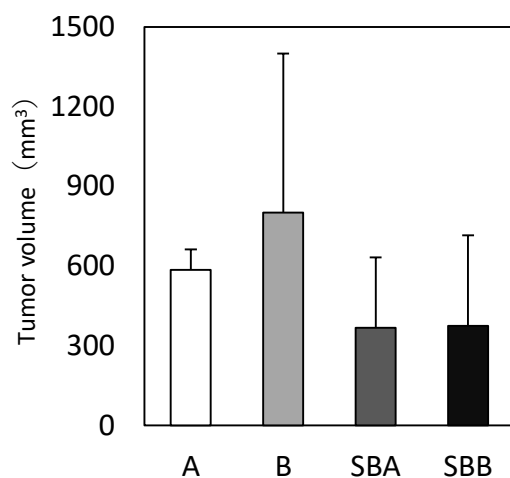


図11 TGF- β 阻害剤SB431542 の骨吸収に与える影響

マウス頭頂部にSCCⅦ亜株A, Bを 5×10^5 個を移植し、移植後3日目にTGF- β 1型受容体選択的阻害剤 (SB431542) を腫瘍近傍に投与。移植3週間後に骨吸収面積及び腫瘍体積の評価を行った。亜株A, Bともに骨吸収面積はSB投与群で有意に縮小し、腫瘍体積も小さくなる傾向を示した。Bar S,D *: $p < 0.05$ (by Student's t test)

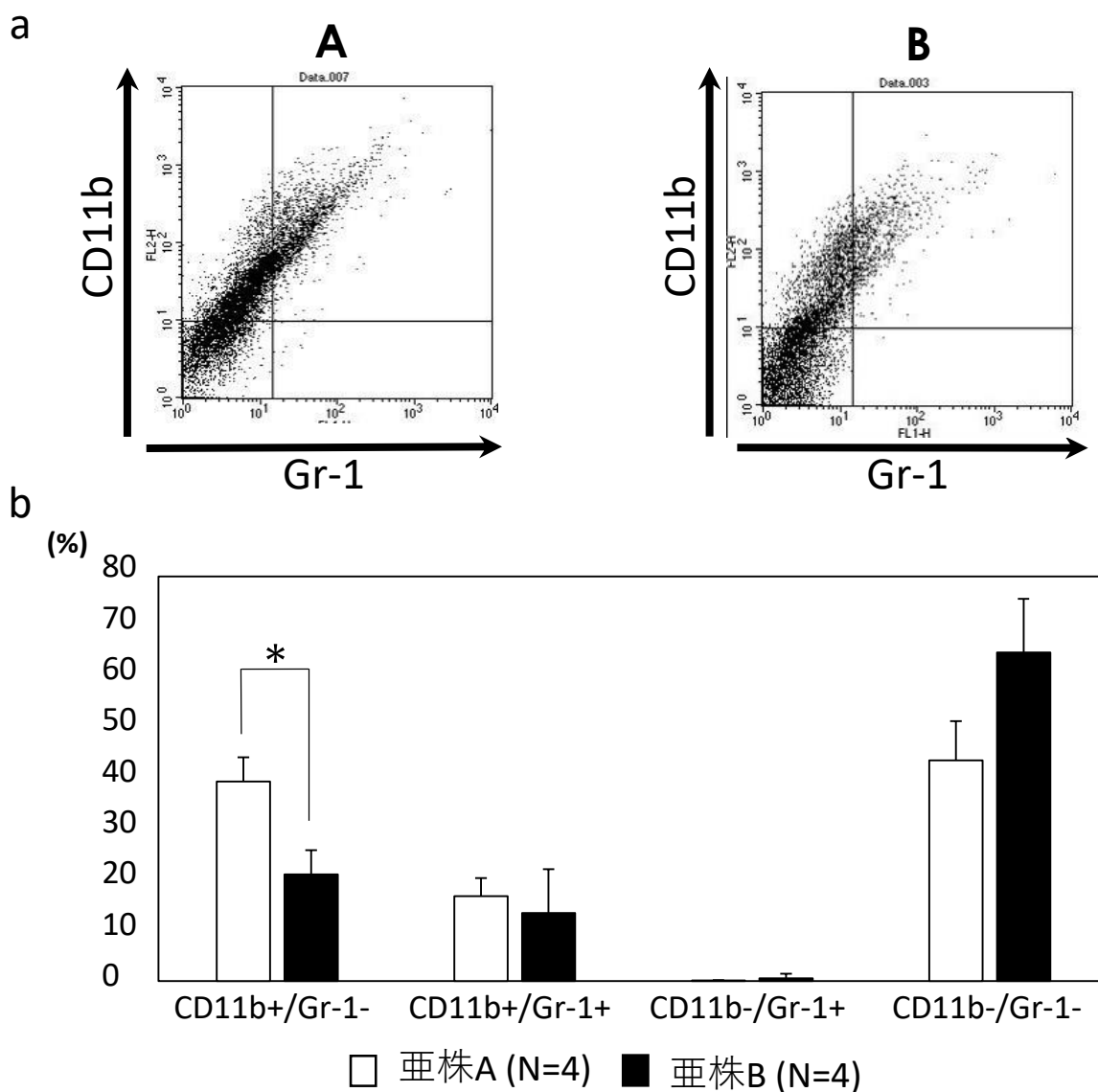


図12 FACS解析による破骨細胞供給の検討

頭頂部に移植した各亜株の骨吸収マウスモデルの骨組織を含まない腫瘍組織を採取し、細胞懸濁液を調整、FITCで標識したGr-1及びPEで標識したCD11bにて染色し、FACS解析を行った。FACS解析時の各亜株における代表的なヒストグラム (a)、各ポピュレーションの割合 (b) を示す。Bar S,D *: $p < 0.05$ by Student's *t* test

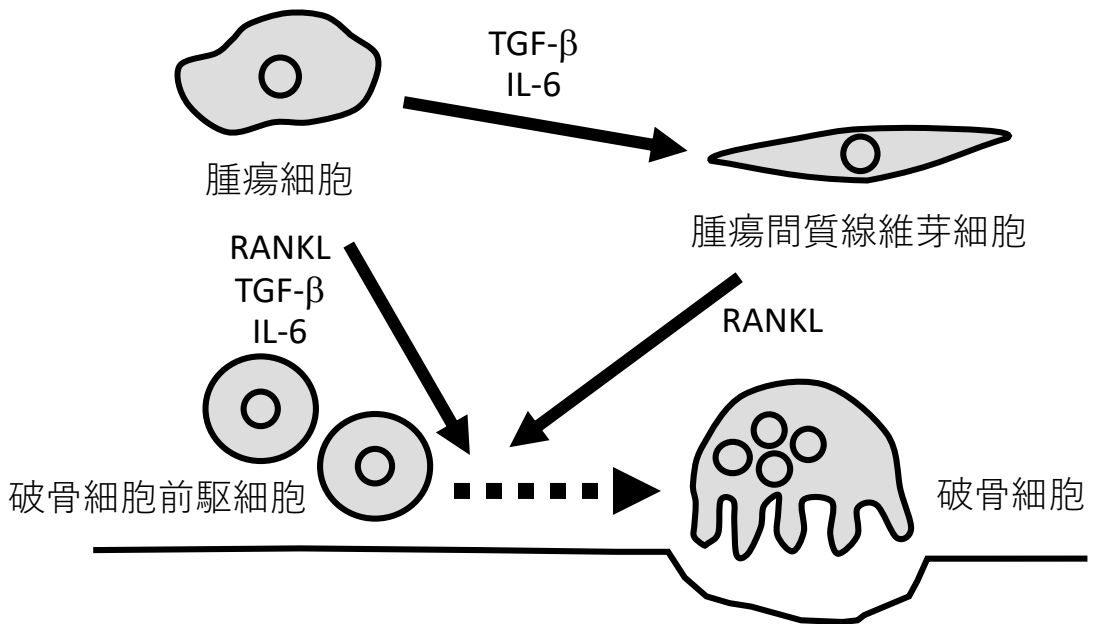


図13 腫瘍及び腫瘍間質線維芽細胞におけるRANKL発現促進の機序

腫瘍から産生されたTGF- β 及びIL-6は、直接的に破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を促進する潜在能力を有し、また腫瘍間質線維芽細胞のRANKL発現を誘導し破骨細胞形成促進することで、骨吸収に関与している可能性が示された。