



Title	扁平上皮癌骨浸潤に関わる分子群の網羅的研究 : インターロイキン 7 の骨吸収への関与
Author(s)	山下, 翔平
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82135
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 山 下 翔 平 ）	
論文題名	扁平上皮癌骨浸潤に関わる分子群の網羅的研究 -インターロイキン 7 の骨吸収への関与-
論文内容の要旨 ＜背景と目的＞ 歯肉扁平上皮癌は顎骨に浸潤し、骨破壊をきたす。扁平上皮癌による顎骨の吸収様式は、破骨細胞の活性化によって顎骨が虫喰い状に骨吸収される病態（浸潤型）と破骨細胞の誘導は少ないが腫瘍拡大に伴って緩慢に骨吸収が進行する病態（圧迫型）に大別される。腫瘍細胞の性質や、腫瘍宿主応答がそれぞれ異なることで骨吸収や骨破壊の浸潤様式が変わることは理解できるが、それぞれの骨吸収様式を分ける分子メカニズムの違いは明らかにされていない。当教室ではこれまで、マウス扁平上皮癌細胞株 SCCVII 由来の異なる表現型をあらわす 2 系統の細胞株を用いて、一方は浸潤型の、もう一方は圧迫型の 2 つの骨吸収様式を再現するシンジェニックマウスモデルを作成し、その差異を見いだすことで、骨吸収の分子機序を腫瘍細胞と腫瘍間質線維芽細胞の相互作用に焦点を絞り検討してきた。 本研究では扁平上皮癌の骨吸収の分子機序を解明するため、浸潤型および圧迫型それぞれのシンジェニックマウスの腫瘍組織をもとに、RNA シークエンス（RNA-Seq）の手法を用いて、それぞれの表現型に特異的な遺伝子発現を網羅的に解析した。RNA-Seq 解析の結果から、本研究では Interleukin-7 (IL-7) に焦点をあてた。IL-7 は T 細胞の RANKL 発現を促進し、破骨細胞の分化と活性化を促進するなど、破骨細胞に関連する作用が報告されているため、本研究では扁平上皮癌による骨吸収への IL-7 の関与を検討した。 ＜方法＞ 1. RNA-Seq 解析 著しい骨吸収をきたす SCCVII 細胞株 A を浸潤型、骨吸収に乏しく骨形成をきたす SCCVII 細胞株 B を圧迫型とし、それぞれの細胞 5×10^5 個を正常な免疫機構を有する C3H 系マウス頭頂部に移植した。移植 2 週間後、それぞれに特徴的な組織形態、すなわち A 株では強い骨吸収像、B 株では骨添加像をマイクロ CT 画像で確認した。実体顕微鏡下にそれぞれの特徴的な部位を同定し、腫瘍骨境界からおおよそ $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ の腫瘍組織を採取し、全 RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて RNA-Seq 解析を行った。 2. SCCVII 細胞における遺伝子発現差解析 SCCVII 細胞亜株 A, B における全 RNA を抽出しリアルタイム PCR 法を用いて、IL-7 発現を定量的に解析した。 3. 組織染色 細胞株 A, B によるマウスモデルの扁平上皮癌組織における T 細胞の浸潤と局在は抗 CD3 抗体を用いた免疫組織化学染色で検討し、腫瘍中の CD3 陽性細胞数をそれぞれ測定した。また、T 細胞の RANKL 発現は抗 CD3 抗体と抗 RANKL 抗体の蛍光二重染色で検討した。 4. ノードマウスにおける骨吸収の検討 C3H 系マウスと T 細胞の機能不全している Balb/c 系ノードマウスのそれぞれの頭蓋骨骨膜近傍に SCCVII 細胞亜株 A を移植し、2 週間後にマイクロ CT 撮影し、骨表面の穿孔領域および腫瘍領域の面積を Image J にて算出し、腫瘍領域に対する骨穿孔領域の割合を計測した。 5. IL-7 の機能抑制による浸潤型骨吸収の変化 SCCVII 細胞亜株 A を C3H 系マウス頭頂部に移植後、3 日目、7 日目、11 日目に抗 IL-7 中和抗体を投与した。中和抗体投与は腫瘍近傍局所投与 ($50 \mu\text{g}$/マウス、$n=4$, LA 群)あるいは腹腔内 ($100 \mu\text{g}$/マウス、$n=4$, IP 群)で行った。コントロール群には IgG2a 抗体を投与した (C 群)。移植後 14 日目にマイクロ CT にて撮影し、Image J にて腫瘍面積と骨穿孔面積を算出し、腫瘍面積に対する骨吸収面積の割合を計測した。摘出した頭蓋骨腫瘍組織に TRAP 染色を行い、LA 群、C 群で TRAP 陽性細胞の集積を比較した。また、LA 群、IP 群、C 群で頭頂部	

にできた腫瘍組織から全 RNA を抽出し、リアルタイム PCR 法によって、破骨細胞形成カップリング因子である *Rankl* と *Opg* を破骨細胞分化マーカーである *Ctsk* と *Acp5* の発現量を比較した。

6. 骨髄細胞培養系における破骨細胞形成実験

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。sRANKL および IL-7 試薬の存在下あるいは非存在下で 3 日間培養した。培養終了後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。核が 3 個以上で TRAP 陽性の多核巨細胞数を破骨細胞として計測した。

<結果>

1. RNA-Seq 解析

解析できた遺伝子数は 24,347 あった。その中で亜株 A, B の発現量が他方の2倍以上高値であった遺伝子数はそれぞれ 792 個、987 個あった。Gene Ontology 解析によって亜株 A, B において特徴的な分子機能群について検討したが両方で大きな差は認められなかった。A 株に有意に高く発現する分子群の中で IL-7 の発現量は B 株に比べて 7.7 倍高かった。IL-7 はリンパ球による破骨細胞の活性化に関与していることをふまえて、本研究では IL-7 に焦点をあて、腫瘍微小環境での骨吸収への関与を検討した。

2. *in vitro* における IL-7 発現量

リアルタイム PCR 法における遺伝子発現解析の結果、*in vitro* での細胞株 A の IL-7 の遺伝子発現は、細胞株 B より 5.0 倍高かった。

3. 免疫組織化学染色

マウスモデル扁平上皮癌組織において、腫瘍組織内に浸潤する CD3 陽性細胞は、圧迫型亜株 B より浸潤型亜株 A の方に多く観察された。また、蛍光染色にて抗 RANKL 抗体と抗 CD3 抗体で二重染色を行ったところ、浸潤型亜株 A では骨近傍に RANKL と CD3 の共染色が多く観察された。

4. ノードマウスにおける骨吸収の影響

ノードマウスの腫瘍面積は C3H マウスを用いたシンジェニックマウスよりも有意に増大する一方、骨穿孔領域は 50% 以上、狭小化した。そして、ノードマウスでの腫瘍の骨穿孔率は C3H マウスよりも約 25% に減少した。

5. 抗 IL-7 中和抗体が破骨細胞形成と骨吸収に与える影響

LA 群、IP 群共に抗 IL-7 中和抗体投与群の骨吸収面積の比率は C 群より有意に低下した。組織化学的には、抗 IL-7 中和抗体投与群の TRAP 陽性破骨細胞数は減少した。腫瘍組織の破骨細胞関連遺伝子の発現を検討すると、C 群と比較して LA 群と IP 群では、*Rankl* 発現、*Ctsk* 発現、*Acp5* 発現が有意に低下し、*Opg* 発現は LA 群で上昇した。

6. 骨髄細胞培養系における破骨細胞活性化の検討

sRANKL 存在下で IL-7 は骨髄由来破骨細胞前駆細胞の破骨細胞分化を促進した。

<考察>

IL-7 が T 細胞を活性化させ、破骨細胞分化の促進に関与する報告はあるが、腫瘍性骨吸収に関与することを示す実験モデルは今まで報告されていない。また、扁平上皮癌による骨吸収と IL-7 の関連性についても報告はない。そこで本研究では、腫瘍細胞が産生する IL-7 が T 細胞など腫瘍間質での RANKL を上昇させ、破骨細胞の活性化と、浸潤型の骨吸収に関与するという仮説を考えた。仮説を検証するために、シンジェニック扁平上皮癌マウスモデルの骨吸収における IL-7 の関与を検討した。抗 IL-7 中和抗体の投与は、骨吸収を強く抑制し、腫瘍組織内の *Rankl* 発現を減少させた。一方、抗 IL-7 中和抗体投与は *Opg* 発現を上昇させ、*Rankl/Opg* 比を著しく低下させた。この *Rankl/Opg* 比の低下が破骨細胞形成と骨吸収を抑制した一因と考えられた。

CD3 と RANKL の蛍光二重染色の結果およびノードマウスでは骨吸収が減少したことから、シンジェニックマウスモデルにおける浸潤型骨吸収に T 細胞が産生する RANKL が関与している可能性が示唆された。

以上から 扁平上皮癌において IL-7 が T 細胞の浸潤や RANKL 発現を促進し、骨吸収に関与することが示唆された。

<結語>

シンジェニック扁平上皮癌マウスモデルにおいて、IL-7 は腫瘍微小環境での RANKL 発現を促進し、破骨細胞の活性化と浸潤型骨吸収に関与することが、明らかとなった。IL-7 を高発現する浸潤型腫瘍では RANKL 陽性の T 細胞浸潤が観察され、T 細胞を含めた腫瘍微小環境が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 (山 下 翔 平)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	古郷 幹彦
	副 査	教授	野田 健司
	副 査	准教授	松永 和秀
	副 査	講師	村上 智彦
論文審査の結果の要旨 本研究は、シンジェニック扁平上皮癌マウスモデルの腫瘍組織をもとに、RNA シークエンスを用いて網羅的に遺伝子発現の解析を行い、得られた結果から Interleukin-7 (IL-7) に焦点をあて、扁平上皮癌において IL-7 の腫瘍性骨吸収への関与について検討したものである。扁平上皮癌マウスモデルにおいて、IL-7 は腫瘍微小環境での RANKL 発現を促進し、破骨細胞の活性化と浸潤型骨吸収に関与することが明らかとなった。 本研究は、扁平上皮癌による骨吸収に IL-7 が関与することを明らかにした観点で有意義であり、博士（歯学）の学位に十分値するものであると認める。			