



Title	口腔扁平上皮癌の骨病変に出現する破骨細胞の制御と由来
Author(s)	簗原, 雅人
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/95982
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 (簗原 雅人)	
論文題名	口腔扁平上皮癌の骨病変に出現する破骨細胞の制御と由来
【研究背景・目的】 歯肉癌などの口腔扁平上皮癌の骨病変では乳癌や前立腺癌の骨転移巣と同様に、破骨細胞が主体となる骨吸収が生じており、悪性腫瘍と骨微小環境の相互作用で成立している。破骨細胞は生理状態ではミエロイド前駆細胞(CMP)を起源とする単球・マクロファージより分化される。しかし、生体環境に応じて、同じCMPを起源とする骨髄由来免疫抑制細胞(MDSC)や樹状細胞などから破骨細胞形成が起こることが分かっており、破骨細胞形成は環境によって複雑で不均一な制御で成立していることが近年示されている。悪性腫瘍が形成する腫瘍微小環境の免疫機構において、ミエロイド系細胞(樹状細胞やマクロファージなどの)とリンパ系細胞(T細胞やB細胞など)は相互に影響し重要な役割を果たしている。多発性骨髄腫や関節リウマチの骨病変では、リンパ系細胞が産生するRANKLが破骨細胞の分化形成を促進し、異常な骨吸収を引き起こしていることが報告されている。 歯肉癌の骨病変の分類として、破骨細胞の活性化によって急速に骨吸収が進行する病態（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）に分けられる。このような病態の違いは、臨床において悪性度の指標や腫瘍切除範囲の決定、生命予後の予測などに関係しており重要な要素の一つであると言われている。しかし、それぞれの病態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。当教室の先行研究では、骨吸収様式の異なる2種類のモデルマウスを用いて口腔扁平上皮癌で認められる骨病変の病態を解析し、腫瘍内に誘導されたT細胞が破骨細胞の分化を促進し骨吸収を促進することを明らかにした。そこで本研究では、「扁平上皮癌の骨病変の表現型出現において、T細胞と破骨細胞前駆細胞との疾患特異的な相互関係が存在する。」という仮説を立て、モデルマウスを用いて立証を試みた。 【方法と結果】 ① モデルマウス細胞株の解析 マウス扁平上皮癌由来細胞株SCCVIIは、C3H系マウスの骨膜近傍に細胞株を移植するとマウス正常免疫を維持しながら骨吸収を示すシンジェニックマウスを作成することができる。先行研究ではC3H/HeNマウスの頭頂骨にSCCVIIの2種類の亜株（低吸収型株・高吸収型株）を移植し、骨吸収様式の異なるシンジェニックマウスを作成した。低吸収型腫瘍（低吸収型株）は圧迫型の骨病変に、高吸収型腫瘍（高吸収型株）は浸潤型の骨病変に、それぞれ類似している所見を得ている。今回2種類の細胞亜型間の相同性を明らかにするためShort tandem repeat(STR)分析を行なった。SCCVII所有元の施設で長期維持保存されていたSCCVII細胞株（control）のDNAを基準として亜株のDNAを比較したところ、両者とも基準を満たしており、SCCVIIの亜株であることを客観的に確認した。また、本研究で用いるマウスの雌雄決定のため、細胞株からゲノムDNAを抽出してPCR解析を実施し、両者とも雌マウス由来であることを確認した。遺伝的背景を合わせるために雌マウスを用いた。 ② 腫瘍内における樹状細胞より分化する破骨細胞の解析 乳癌の骨転移モデルより単離したMDSCはRANKLおよびM-CSF存在下にてマクロファージより分化した破骨細胞と同等の大きさを持つTRAP陽性細胞が形成される報告があることから、モデルマウスの腫瘍組織中に含まれるMDSC(CD11b+Gr1+分画)の相対的な数をフローサイトメトリーにて比較した。腫瘍間でMDSCに関して有意な差は認めなかったが、マクロファージや樹状細胞が含	

まれる分画(CD11b+Gr1-)が高吸収型腫瘍で有意に高値を示した。そこで、腫瘍組織中のマクロファージや樹状細胞の遺伝子発現解析を実施した。樹状細胞のサブセットであるcDC2(標準型2型樹状細胞)およびpDC(形質細胞様樹状細胞)が低吸収型腫瘍と比較し高吸収型腫瘍で高発現していた。

以上の結果より、本研究のマウスモデルにおける高吸収型腫瘍に出現する破骨細胞の一部は樹状細胞由来であるとする仮説を設定した。本研究において高吸収型腫瘍のTRAP染色画像では、骨表面だけでなく骨吸収が完了している箇所にもTRAP陽性多核巨細胞が比較的特異的に存在していた。関節リウマチでは骨近傍には存在しないTRAP陽性多核巨細胞は樹状細胞由来の破骨細胞の可能性を示している(Narisawa et.al., Bone, 2021)。モデルマウスの腫瘍組織における病理組織学的検討(各群n=5)においては、CD86(樹状細胞マーカー)陽性TRAP陽性の破骨細胞を高吸収型腫瘍において多く認めた。またシンジェニックマウス扁平上皮癌骨吸収モデルにT細胞遊走を抑制する目的でIL7中和抗体を投与すると高吸収型腫瘍において骨表面以外に存在するTRAP陽性細胞の数が減少した。

④ RANKLを発現するT細胞サブセットの解析

シンジェニックマウスで形成された腫瘍組織のRNA-seqや細胞性免疫不全マウス、中和抗体を用いた先行研究により、高吸収型腫瘍の病態形成に腫瘍細胞より産生したIL-7がT細胞の遊走を促進させた結果、破骨細胞形成が活性化した知見を得ている。しかしながら、腫瘍内へのどのようなT細胞浸潤が破骨細胞形成を促進させるのかは不明である。そこで我々は、T細胞が発現するRANKLが骨病変の病態形成に関与していると仮定し、モデルマウスの腫瘍組織より抽出したtotal RNAを用いた遺伝子解析(各群n=6)、腫瘍細胞のフローサイトメトリー、組織学的検討を行なった。フローサイトメトリーによる解析ではCD4陽性T細胞の中にRANKL陽性細胞が多く含まれており、組織学的検討では高吸収型腫瘍において破骨細胞に近接する部分にCD4陽性RANKL陽性細胞を認めた。CD4陽性T細胞はさらにTh1、Th2そしてTh17に分類される。関節リウマチや歯周病などの炎症性骨病変ではTh17がRANKL産生T細胞であることが示されている。しかしながら、本研究における遺伝子発現解析ではTh17マーカー(RoR γ t)では高吸収型腫瘍・低吸収型腫瘍の間で発現差は認めず、Th1マーカーであるTbetの発現量が高吸収型の方が低吸収型よりも有意に高かった。

③ 腫瘍内における骨芽細胞と破骨細胞のカップリングの動態の解析

RANKLによる破骨細胞形成は生理状態では骨芽細胞に由来する。そこで、骨病変の骨芽細胞の動態を確認するため、それぞれの腫瘍組織より抽出したtotal RNAから骨芽細胞分化マーカーを中心に遺伝子発現解析(各群n=6)を行った。骨芽細胞の分化に必須である転写因子(Runx2,Osterix)においては両者に有意な遺伝子発現の差は認められなかった。

【考察】

シンジェニックマウスモデルを用いた扁平上皮癌骨病変モデルの結果では、「CD4陽性RANKL陽性T細胞(Th1)→樹状細胞→破骨細胞」軸が高吸収型腫瘍の表現型形成に寄与している可能性が示唆される。実際に口腔扁平上皮癌における浸潤型の骨病変は圧迫型と比較して巨大で多核の破骨細胞が広範囲にわたって観察されており、本研究で得られた知見は実際の表現型にも関与する可能性を含んでいる。そして、本研究は既存の骨吸収抑制薬(ビスフォスフォネート製剤や抗RANKL抗体)とは異なる病的な破骨細胞を特異的に抑制する創薬へ至る知見の一端を明らかにした。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (簗 原 雅 人)			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	教授	田中 晋
	副 査	教授	鵜澤 成一
	副 査	准教授	波多 賢二
	副 査	講師	宇佐美 悠
論文審査の結果の要旨 本研究は、扁平上皮癌による骨浸潤部における破骨細胞前駆細胞と T 細胞との関係性について、シンジェニックマウスモデルを用いて検討を行った。 その結果、扁平上皮癌においては CD4 陽性 T 細胞が RANKL を発現することで、樹状細胞より破骨細胞が分化して骨浸潤に関与している可能性が示唆された。 以上の結果は扁平上皮癌による骨浸潤に関与する分子メカニズムと病態解明に寄与するものであり、よって博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。			