

論文要旨等報告書

氏	合田健志
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3571号
学位授与の日付	平成20年3月25日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Transforming growth factor- β (TGF- β)シグナルを標的とした口腔癌の骨浸潤破壊の制御とそのメカニズムに関する研究
論文審査委員	教授 菅原 利夫 教授 佐々木 朗 助教授 長塚 仁

学位論文内容の要旨

【 緒言 】

口腔癌の顎骨への浸潤破壊は治療法の選択、手術範囲の決定、そして予後を左右する負の要因となっている。それゆえに癌の顎骨浸潤、骨破壊を制御する治療の開発は、重要な課題である。癌の骨破壊は、癌細胞の産生する種々のサイトカインによって惹起され、破骨細胞性骨吸収が生じる。破壊された骨からは様々な成長因子が骨浸潤先端部に遊離し、骨微小環境を破壊して、癌細胞の増殖をさらに促進するという悪循環が生じる。近年、骨から遊離する因子のうち、癌骨破壊においては骨基質中の transforming growth factor- β (以下 TGF- β)が注目されてきており、これらを標的とした骨転移治療が報告されている。癌の骨破壊により、骨基質に貯蔵されていた TGF- β が遊離され、その TGF- β は骨周囲の癌細胞に作用し、骨破壊を促進する。しかしながら、口腔癌の骨破壊機序における TGF- β シグナルの役割は未だ明らかになっていない。当科における下顎歯肉癌患者 21 名の下顎骨切除標本の検索結果から、圧迫型の骨破壊を認める標本では TGF- β ならびに TGF- β I 型受容体 (以下 TGF- β R)の発現はみられなかった。一方、浸潤型骨破壊を認める症例においては TGF- β ならびに TGF- β R 両者に有意な発現の亢進が認められた。このことから、口腔癌の骨浸潤、骨破壊においても TGF- β -TGF- β R シグナルが関与することが示唆される。そこで口腔扁平上皮癌マウス骨破壊モデルを用いて、TGF- β R の阻害剤となる TGF- β receptor I kinase inhibitor (以下 T β RI-I)の効果とその有用性を検討し、TGF- β シグナルの骨浸潤における役割について検討を行った。

【 材料ならびに方法 】

1. 手術材料の検討 : 1992~2003 年の当科における下顎歯肉癌患者の手術標本を用い、一次抗体として抗ヒト TGF- β ウサギポリクローナル抗体、抗ヒト TGF- β RI ウサギポリクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。
2. 口腔扁平上皮癌細胞株における TGF- β の発現 : 本実験で用いた口腔扁平上皮癌細胞株は、10%FBS 含有 D-MEM/F-12 培地にて 5%CO₂ 気相下にて培養し、それぞれの細胞株の TGF- β 、TGF- β R 蛋白の発現量はウエスタンブロット法にて検討を行った。
3. 癌骨浸潤モデルにおける検討 : 4 週齢雌マウス左大腿骨傍骨膜に癌細胞を 1x10⁶ 個注入し、翌日より T β RI-I (10mg/kg) を腹腔内に連日投与した。癌細胞の注入後 28 日目に骨破壊巣の状態を軟 X 線照射にて X 線学的に、H.E.染色を用いて組織学的に評価した。
4. 細胞増殖・遊走能試験 : 増殖能は、HSC2 細胞を播種し Recombinant Human TGF- β (5ng/ml)と T β RI-I (500nM)を加え、MTT アッセイを行った。遊走能は、ボイデンチャンパー法を用いメンブレン上部に HSC2 細胞と TGF- β 、T β RI-I を加え、10%FBS を走化因子としてメンブレン下層の細胞数を測定し、その平均により評価した。
5. 破骨細胞形成能の検討 : マウス大腿骨及び脛骨から採取した骨髄細胞を、TGF- β 及び T β RI-I で刺激し、6 日間培養後、TRAP 染色を行い、破骨細胞数の算定を行った。

6. TGF- β で誘導される因子の検討 : HSC2 細胞, HSC4 細胞を播種し, TGF- β , T β RI-I を加え 24 時間培養後, CM 中の各種因子の mRNA 発現量の測定を, リアルタイム RT-PCR 法を用いて行った。
7. 統計分析 : 免疫組織標本における相関関係の検討には χ^2 乗検定, 2 群の有意差検討には Fisher の PLSD 法を用いた。危険率 5% 未満を有意差ありと判定した。

【 結果 】

1. 手術材料の検討 : 免疫組織学的検討において, 圧迫型の骨破壊を認める標本では TGF- β ならびに TGF- β R の発現はみられなかったが, 浸潤型の骨破壊を示す標本では癌細胞の核において TGF- β , TGF- β R の発現が有意に上昇していた。
2. 各種口腔扁平上皮癌細胞株における TGF- β , TGF- β R の発現 : HSC2 細胞, HSC4 細胞共に TGF- β 発現は強く認められた。一方, HSC2 細胞では TGF- β R 発現は強くみられたが, HSC4 細胞においては TGF- β R 発現が殆どみられず, TGF- β 発現は同じであったが, TGF- β R に差がある HSC2 細胞と HSC4 細胞を TGF- β R の重要性に着目し, 以下の実験に用いた。
3. T β RI-I が HSC2 細胞における Smad2/3 のリン酸化に及ぼす影響の検討 : TGF- β を HSC2 細胞に添加すると, Smad2/3 のリン酸化は上昇し, HSC2 細胞を 100, 1000nM の T β RI-I で前処理後 TGF- β で刺激すると T β RI-I 濃度依存的に Smad2/3 リン酸化は減少した。このことから T β RI-I は Smad2/3 のリン酸化を抑制することによって TGF- β シグナルを阻害することが確認できた。
4. T β RI-I がマウスの癌骨破壊巣に与える影響 : 癌細胞を移植したマウスにおいて増殖した腫瘍体積は HSC2 細胞と HSC4 細胞を単独移植したもの間, HSC2 細胞のみ移植したマウスと HSC2 細胞移植後, T β RI-I を腹腔内に連日投与したマウスとの間に, 有意差は認められなかった。しかしながら, 癌骨破壊面積に関しては, HSC2 細胞移植後, T β RI-I を腹腔内に連日投与したマウスは HSC2 細胞のみ移植したマウスと比較して骨破壊が有意に抑制されていた。
5. TGF- β シグナルが腫瘍細胞自身に与える影響 : HSC2 細胞, HSC4 細胞共に TGF- β によって増殖能に変化は認めなかったが, HSC2 細胞においては TGF- β によって遊走能は濃度依存的に有意に促進され, また TGF- β によって促進された遊走能は T β RI-I によって濃度依存的に抑制された。
6. TGF- β シグナルが破骨細胞分化に与える影響, ならびに誘導する因子 : HSC2 細胞を T β RI-I で前処理後に TGF- β で刺激した CM では HSC2 細胞を TGF- β で単独処理した CM と比較して有意に TRAP 陽性多核細胞形成が抑制されることが確認できた。また, HSC2 細胞においては, TGF- β によって TNF- α , CCN2, RANKL mRNA 発現量の有意な上昇を認めた。

【 考察 】

手術材料での免疫組織学的検討により, 圧迫型を示す癌細胞に比べ, 浸潤型骨破壊を示す口腔癌は TGF- β , TGF- β R を高発現しており, 口腔癌は TGF- β シグナル伝達能力をあわせ持つことが示唆された。また, マウス癌骨破壊モデルにおいて, T β RI-I によって骨破壊が有意に阻害されたことより, TGF- β シグナルが T β RI-I によって阻害されることが推察される。これらのことと, *in vitro* において T β RI-I が Smad2/3 のリン酸化を抑制したことから, 口腔癌においては TGF- β で誘導した Smad2/3 のリン酸化によって種々の因子の産生が亢進し, 骨破壊を誘導することが推察された。また, T β RI-I は有意に TGF- β によって促進された遊走能を抑制することから, Smad2/3 を介した運動能に関する TGF- β 促進プロモーター活性を効果的に阻害することが示唆された。これらのことより, 口腔癌における TGF- β シグナルは破骨細胞を介した癌の骨破壊や, 癌細胞の骨への浸潤促進において重要な因子となることが示唆された。

【 結論 】

癌細胞に発現する TGF- β R は浸潤型骨破壊をおこす口腔扁平上皮癌の予測因子となる可能性が示唆され, TGF- β シグナルは口腔扁平上皮癌・顎骨浸潤に対して標的分子となる可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

口腔癌の顎骨への浸潤破壊は治療法の選択、手術範囲の決定、そして予後を左右する負の要因となっている。それゆえに癌の顎骨浸潤、骨破壊を制御する治療の開発は、重要な課題である。癌の骨破壊は、癌細胞の産生する種々のサイトカインによって惹起され、破骨細胞性骨吸収が生じる。破壊された骨からは様々な成長因子が骨浸潤先端部に遊離し、骨微小環境を破壊して、癌細胞の増殖をさらに促進するという悪循環が生じる。近年、骨から遊離する因子のうち、癌骨破壊においては骨基質中のtransforming growth factor- β (以下TGF- β)が注目されてきており、これらを標的とした骨転移治療が報告されている。癌の骨破壊により、骨基質に貯蔵されていたTGF- β が遊離され、そのTGF- β は骨周囲の癌細胞に作用し、骨破壊を促進する。しかしながら、口腔癌の骨破壊機序におけるTGF- β シグナルの役割は未だ明らかになっていない。本研究では下顎歯肉癌患者の下顎骨切除標本を用いて浸潤型骨破壊とTGF- β 及びそのレセプターの関連性を検討した。さらにTGF- β receptor I kinase inhibitor (T β RI-I)を用いてTGF- β シグナルと癌顎骨破壊のメカニズムについてin vivo, in vitroの検討を行った。その結果、癌細胞に発現するTGF- β Rは浸潤型骨破壊をおこす口腔扁平上皮癌の予測因子となる可能性が示唆された。またTGF- β シグナルは口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤に対して標的分子となる可能性が考えられた。これらの知見は口腔扁平上皮癌の骨破壊におけるTGF- β シグナルの役割を明らかにしたものであり、本研究は今後の癌骨破壊に対する治療の開発に重要な方向性を示唆するものである。