

神経軸索ガイダンス因子 Semaphorin4D の
口腔癌骨浸潤に果たす役割に関する研究

高田 紘行

The role of Semaphorin4D in bone invasion by oral cancer.

Hitoyuki TAKADA

(平成 27 年 12 月 15 日受付)

緒 言

口腔癌は、舌、歯肉、口底、硬口蓋、頬粘膜などの顎口腔領域に発生する悪性腫瘍で、その解剖学的特徴から周囲組織である顎骨にしばしば浸潤する。口腔癌の顎骨浸潤は、患者の予後に負の影響を及ぼす因子であり¹⁾、それを制御することは重要な課題である。

癌の骨浸潤において、骨破壊の中心的な役割を担うのは破骨細胞である。癌細胞は骨組織に到達した際、副甲状腺ホルモン関連蛋白 (parathyroid hormone-related protein) などのサイトカインを放出し、骨芽細胞に作用する。骨芽細胞は receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (以下 RANKL) 産生を高め、破骨細胞前駆細胞上に存在する RANKL の受容体である RANK と結合することにより破骨細胞形成を促進し骨破壊を促す。破壊された骨組織からは、transforming growth factor- β (以下 TGF- β) や insulin-like growth factor-I (以下 IGF-I) などの増殖因子が遊離され、癌細胞の増殖を促進する²⁾。このように骨の微小環

境においては、破骨細胞の骨破壊と癌細胞の増殖が繰り返される悪循環が起こっており、その悪循環を停止させる治療法の開発が望まれる。

Semaphorin は神経軸索の伸長方向を制御するガイダンス因子であり、中枢神経系に発現している。Semaphorin は、Sema ドメインと呼ばれる領域を保有する膜貫通型もしくは分泌型の蛋白で、現在までに約 20 種類のメンバーが同定されており^{3,4)}、Sema ドメインに続く構造の違いから 8 つのサブクラスに分類されている。Semaphorin の受容体である Plexin の N 末端もセマフォリンと同様に Sema ドメインとなっており、Semaphorin 同様に Sema ドメインに続く構造の違いから A から D の 4 つのサブクラスに分類される。Semaphorin と Plexin は双方の Sema ドメインを介して認識し、それぞれのメンバー同士が特異的に結合する。最近、中枢神経系にのみ発現していると考えられていた Semaphorin は、心血管系⁵⁾、内分泌系⁶⁾、消化器系⁷⁾、免疫系⁸⁾、呼吸器系⁹⁾などの非神経系にも広く存在することが明らかになった。

Semaphorin4D (以下 Sema4D) はグリア細胞の 1 種である乏突起膠細胞から分泌される軸索ガイダンス因子である¹⁰⁾。近年、骨組織においては破骨細胞が Sema4D を分泌し、骨芽細胞上の PlexinB1 と結合することで、骨芽細胞の分化シグナルである IGF-I シグナルを抑制し、骨形成を抑制することが報告された¹¹⁾。

また正常組織だけではなく、腫瘍組織にも Sema4D は発現を認め、口腔癌の 82.7%、前立腺癌の 90.2%、大腸癌の 92.7%、乳癌の 80.6%、肺癌の 56.3%、卵巣癌の 16.3%に発現している¹²⁾。

骨組織および口腔癌組織において Sema4D 発現を認めることがそれぞれ報告されており、口腔癌が骨浸潤をきたした際に Sema4D が口腔癌の増殖や骨破壊に何らかの影響を与えていることが推察されるが、その役割については不明である。そのため本研究では、口腔癌の骨浸潤における Sema4D の役割を検討したので報告する。

材料ならびに方法

1. 臨床検体

岡山大学病院口腔外科（病態系）で顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌症例のうち、術前化学療法を行っていない手術材料を無作為に抽出した。手術材料を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 48 時間浸漬固定後、ギ酸で 2 週間脱灰し、冷エタノール系列で脱水して、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μ m の切片を作製し、免疫組織化学的に検討した。本実験は、岡山大学倫理審査委員会の承認（承認番号 1949）のもと行った。

2. 口腔扁平上皮癌の骨浸潤モデルの作製

口腔扁平上皮癌の骨浸潤モデルは、合田らの方法に準じ HSC-2 細胞を 5 週齢雄 Balb/C 系 nu/nu ノードマウス（日本クレア，東京）の大腿骨膜近傍に移植することにより作製した¹³⁾。麻酔は、ネブタール（大日本製薬，大阪）を腹腔内注射（0.05mg/g 体重）で行った。27G の注射針をマウス左側大腿骨骨幹端の遠位端傍骨膜に刺入し、リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate Buffered Saline, 以下 PBS）で希釈した癌細胞浮遊液（ 5.0×10^6 個/ml）を 100 μ l 注入した。移植 4 週後、マウスを屠殺し、大腿骨を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で 48 時間浸漬固定後、10%EDTA で 2 週間脱灰した。続いて、冷エタノール系列で脱水後、パラフィンに包埋した。厚さ 5 μ m の切片を作製し、組織学的に検討した。動物実験は、岡山大学動物実験管理委員会の指針に従って行った。

3. 組織学のおよび免疫組織化学的染色

切片をキシレンで脱パラフィンし、100%から 70%エタノールで再水和後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。70%から 100%エタノールおよびキシレンで脱水・透徹を行った後、Entellan（Merk, Darmstadt, Germany）で封入し組織学的観察を行った。酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（Tartrate-resistant acid phosphatase, 以下 TRAP）染色は、TRAP kit（和光純薬工業株式会社，大阪）を用い、プロトコールに従い行った。免疫組織化学染色には、間接酵素抗体法

(Envision system, Dako, Carpinteria, CA, USA) を使用した。切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った。抗原性の再賦活化法として 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブ処理を行った。1次抗体には、抗ヒト Sema4D ウサギポリクローナル抗体 (abcam, Cambridge, MA, USA) と抗ヒト PlexinB1 ウサギポリクローナル抗体 (abcam) をそれぞれ 100 倍に希釈して反応させた。

4. 細胞培養

口腔扁平上皮癌細胞株には、HSC-2, HSC-3, SAS 細胞 (RIKEN より供与, 茨城) を使用した。細胞の培養には、Dulbecco's modified Eagle's medium と Ham F-12 medium の等量混合培地 (以下 DMEM/F12 : Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA) を用い、非動化 10%ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, 以下 FBS : JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA) および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン液 (Invitrogen) をそれぞれ混合し、5%CO₂, 37°Cで培養した。マウス骨髄間質細胞株 ST-2 細胞 (RIKEN) および破骨細胞形成系に用いた 5 週齢雄 C57BL/6J マウス (日本クレア) より回収した骨髄細胞は、 α -modified Eagle minimum essential medium (以下 α -MEM : Sigma, St. Louis, MO, USA) を用い、10%FBS および 1%ペニシリン・ストレプトマイシン液をそれぞれ混合し、5% CO₂, 37°C で培養した。

5. 細胞増殖能の検討

96 穴プレートに HSC-2, HSC-3, SAS 細胞を 3×10^3 個ずつ播種し、24 時間後培地を交換して種々の濃度 (1, 10, 100ng/ml) の recombinant human Sema4D (R&D, Minneapolis, MN, USA) を添加した。陰性対照として PBS を使用した。48 時間培養後、生細胞数に比例して呈色を示す 3- (4, 5-dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-carboxymethoxyphenyl) -2- (4-sulfophenyl) -2H-tetrazolium salt (以下 MTS) 液 (Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kit, Promega, Madison, WI, USA) を 20 μ l ずつ各ウェルに添加し、3 時間 5% CO₂, 37°C でイ

ンキュベートし、マイクロプレートリーダー (Biorad, Hercules, CA, USA) を用いて 490nm の吸光度を測定した。

6. 細胞運動能の検討

Wound healing assay を用いて、細胞運動能の検討を行った。HSC-2 細胞を 6 穴プレート上でコンフルエント状態になるまで培養した後、無血清培地に交換し、滅菌したピペットチップの先で 1.0mm となる引っ掻き傷を入れて細胞の存在しない面積を測定した。Sema4D を添加して 24 時間培養を行い、再度面積を測定し、傷つけ直後の面積との差の割合を計算し評価した。

7. 細胞遊走能および浸潤能の検討

細胞遊走能の検討には 24 穴マトリゲルインベージョンチャンバー (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) のノンコートインサートを、浸潤能の検討にはマトリゲルのコートインサートをそれぞれ使用した。ポアサイズ 8 μ m のメンブレン上層に HSC-2 細胞を 3×10^4 個ずつ播種し、下層には Sema4D を添加して、24 時間後にメンブレン下層に付着した細胞を遊走した細胞および浸潤した細胞として計測した。付着した細胞は Diff-Quik (国際試薬株式会社, 兵庫) で固定・染色した。

8. ウェスタンブロット法

各口腔扁平上皮癌細胞株の Sema4D と PlexinB1 の発現をウェスタンブロット法で検討した。各口腔扁平上皮癌細胞株を 6cm ディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行い、培地を交換した。翌日、細胞溶解液 [50mM Tris (pH7.2), 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% dexycolate, 1mM sodium vanadate, 20mM leupeptin, 1mM phenylmethyl sulfonyl fluoride, 1% aprotinin] で細胞を可溶化しタンパクを回収した。タンパク濃度は、Protein Assay System (Thermo. Rockford, USA) を用いて定量を行った。10 μ g のタンパクを含む各サンプルを Sample Buffer (Biorad) と β -メルカプトエタノール (Sigma) と混合して 95 $^{\circ}$ C, 5 分間の加熱によって還元した後、泳動用緩衝液 [0.25M Tris, 1.92M glycine, 1%SDS] を用いてポリアクリルアミドを 10%含有するゲル (Biorad) で 100V の

定電圧下で約 60 分間泳動することでタンパクを分画した。分画したタンパクは転写用緩衝液 [0.25M Tris, 1.92M glycine, 20%methanol] 中 100V の定電圧下で 90 分間 PVDF 膜 (MILLIPORE, Tullagreen, Carrigtwohill, Co., Ireland) へ転写した。その PVDF 膜を 5%BSA 溶液 (Sigma) に 60 分間浸漬してブロッキング操作を行った。その後, 1 次抗体として抗ヒト Sema4D ウサギポリクローナル抗体と抗ヒト PlexinB1 ウサギポリクローナル抗体を Can get signal Solution 1 (TOYOBO, 大阪) でそれぞれ 1000 倍に希釈して, 4°C で overnight にて反応させた。2 次抗体には, HRP 標識ポリクローナル抗体 (Amersham Phamacia Biotec, Buckinghamshire, UK) を Can get signal 2 (TOYOBO) に 1000 倍で希釈し, 90 分間反応させた後, ECL システム (Amersham Phamacia Biotec) を用いて X 線フィルム (GE Healthcare, Buckingham, UK) に化学発光させた。

9. 破骨細胞の形成能および骨吸収能の検討

マウス大腿骨骨髓細胞を使用し, 破骨細胞の形成能の検討を行った^{14,15)}。5 週齢雄 C57BL/6J マウス (日本クレア, 東京) の大腿骨から骨髓細胞を回収し, 10cm ディッシュに播種して macrophage colony-stimulating factor (以下 M-CSF: PeproTec EC, Ltd, London, UK) 10ng/ml を添加した。翌日, 浮遊細胞のみを回収し, M-CSF30ng/ml を添加して 3 日間培養を行った。その後, 浮遊細胞は洗い流し接着細胞のみを再度回収して, Bone marrow macrophages (以下 BMMs) として 4×10^4 個ずつ 48 穴プレートに播種し, M-CSF30ng/ml と RANKL (PeproTec EC) 50ng/ml および Sema4D を添加して 6 日間培養した。培養液は 2 日おきに交換を行った。培養後, TRAP 染色 (Leukocyte acid phosphatase kit, Sigma) を行った。Citrate buffer (pH5.5) 添加 60%アセトン, 0.8%ホルマリンを含む固定液で固定を行い, 酒石酸を含む反応液に遮光下で 37°C, 30 分間反応させ, 水洗, 乾燥後, 光学顕微鏡下で観測した。破骨細胞数の評価として, 3 核以上をもつ TRAP 陽性の細胞を破骨細胞として計測した。なお, 形成された破骨細胞を Envision system を用いて免疫組織化学染色を行い, Sema4D および PlexinB1 の発現の検討も行った。また, 破骨細胞の骨吸収活性能を Pit formation assay で検討した。上記と

同様に破骨細胞を分化培養させる際、ハイドロキシアパタイトでコーティングされた培養プレート (Corning Osteo Assay Surface 24well plate, Corning, Inc., NY, USA) に BMMs を 1×10^5 個ずつ播種した。培養後、次亜塩素酸ナトリウム溶液 (Wako) で細胞除去を行い、水洗、乾燥し、吸収窩の面積を計測して評価した。面積の測定は画像解析ソフト ImageJ (Version1.49, NIH, Bethesda, MD, USA) を用いた。

10. Sema4D が骨髄間質細胞株 ST-2 細胞に与える影響の検討

ST-2 細胞を 6cm ディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行い、5%FBS 含有の培地に交換し、1, 10, 100ng/ml の recombinant human Sema4D を添加した。24 時間後、タンパクを回収し、破骨細胞分化調節因子として RANKL と osteoprotegerin (以下 OPG) の発現をウエスタンブロット法により解析した。1 次抗体には、抗マウス RANKL ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) と抗マウス OPG ウサギポリクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。

11. 骨組織中の成長因子 IGF-I が口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D および PlexinB1 発現に与える影響の検討

各口腔扁平上皮癌細胞株を 6cm ディッシュに播種し、サブコンフルエントになるまで培養を行い、0.5%FBS 含有の培地に交換し、IGF-I receptor (以下 IGF-IR) のインヒビター Linsitinib (Medchemexpress, Princeton, NJ, USA) , ERK1/2 のインヒビター SCH772984 (Medchemexpress) , および Akt1/2/3 のインヒビター MK2206 (Medchemexpress) をそれぞれ終濃度 $1.0 \mu\text{M}$ となるように添加した。その 15 分後 recombinant human IGF-I 100ng/ml (Sigma) を添加した。48 時間後、タンパクを回収し、ウエスタンブロット法により Sema4D と PlexinB1 の発現を解析した。

12. 統計分析

有意差検討には Student's t 検定を用いた。危険率 5%未満を有意差ありと判定した。

結 果

1. In vitro および In vivo における Sema4D と PlexinB1 の発現

In vitro では各口腔扁平上皮癌細胞株, HSC-2, HSC-3, SAS 細胞のタンパクを回収し, Sema4D とその受容体 PlexinB1 の発現をウエスタンブロット法により検討した。Sema4D と PlexinB1 発現の陽性対照として, それぞれ高発現していることが知られているヒト T 細胞株 Jurkat 細胞と正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (normal human umbilical vein endothelial cells, 以下 HUVEC) を使用した。HSC-2, HSC-3, SAS 細胞は, すべて陽性対照と同等の Sema4D および PlexinB1 を発現していた (図 1A)。

In vivo においては, マウス骨浸潤モデルを作製して Sema4D と PlexinB1 の発現を検討した¹³⁾。HSC-2 細胞移植 4 週後の骨浸潤モデルでは, 一部大腿骨は破壊され, 癌細胞に置換されていた。TRAP 陽性の破骨細胞は, 破壊された骨表面上に位置していた。Sema4D と PlexinB1 は, 骨破壊部位に一致した腫瘍組織に強発現していた (図 1B)。

臨床検体では, 骨の破壊部位を中心に Sema4D と PlexinB1 の強発現を認めていたが, 骨の破壊が起こっていない部位では骨と腫瘍組織の間に線維組織が介在しており, Sema4D と PlexinB1 の発現は軽度であった (図 1C)。破骨細胞にも Sema4D と PlexinB1 の発現を認めた。

2. Sema4D が口腔扁平上皮癌細胞に与える影響

Sema4D が口腔扁平上皮癌細胞に与える影響として, 細胞増殖能を MTS assay, 運動能を Wound healing assay, 遊走能を Migration assay, 浸潤能を Invasion assay で検討した。

MTS assay では, HSC-2, HSC-3, SAS 細胞のすべてにおいて, Sema4D 添加により細胞増殖の促進を認めた (図 2A)。

HSC-2 細胞を用いた Wound healing assay では, Sema4D 添加により濃度依存的に創傷面積の縮小を認め, 有意に細胞運動能を促進していた (図 2B, C)。

Migration assay では, Sema4D 添加により濃度依存的に遊走した細胞の増加を認め, 細胞遊走能の促進を認めた (図 2D, E)。

Invasion assay においても, Sema4D 添加により濃度依存的に浸潤した細胞の増加を認め, 細胞浸潤能の促進を認めた (図 2F, G)。

3. 破骨細胞における Sema4D と PlexinB1 の発現および Sema4D が破骨細胞に与える影響

マウス骨髄細胞から破骨細胞を分化させ, 免疫組織化学染色により Sema4D および PlexinB1 の発現を検討した。Sema4D と PlexinB1 は, ともに細胞膜表面上に強発現していた (図 3A)。

Sema4D が破骨細胞に与える影響として, 破骨細胞の形成能を Osteoclast formation assay, 破骨細胞性骨吸収能を Pit formation assay で検討した。

Osteoclast formation assay では, Sema4D100ng/ml 添加群において TRAP 陽性である破骨細胞数は有意に増加した (図 3B, C)。

Pit formation assay では, Sema4D 添加により濃度依存的に吸収窩の増加を認め, 破骨細胞の骨吸収能の促進を認めた (図 3D, E)。

4. Sema4D が骨髄間質細胞株 ST-2 細胞に与える影響

支持細胞における破骨細胞分化誘導因子発現に対する影響として, Sema4D が ST-2 細胞の RANKL および OPG 発現に与える影響を検討した。Sema4D 添加により, RANKL および OPG の発現は影響を受けなかった (図 3F)。

5. 骨組織中の成長因子 IGF-I が口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D および PlexinB1 発現に与える影響

骨組織中に豊富に含まれている成長因子 IGF-I が, 口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D および PlexinB1 発現に与える影響について検討した。特に HSC-2 細胞と SAS 細胞では, IGF-I 添加により有意に Sema4D の発現は増加した (図 4)。しかしながら, IGF-IR のインヒビターおよび IGF-I 下流シグナルである ERK,

Akt のインヒビターの共存下においてはその増加は抑制された。PlexinB1 の発現に関しては、IGF-I 添加により発現量の変化は認められなかった。

考 察

神経軸索ガイダンス因子 Sema4D は近年、腫瘍との関連が報告されている。癌細胞の産生する Sema4D は、血管内皮細胞の細胞膜上の Plexin B1 と結合し、血管内皮細胞の細胞遊走および管腔形成を促進し血管新生を惹起することが報告されている¹⁶⁾。Sema4D は癌細胞にも直接作用し、乳癌細胞^{17,18)}、卵巣癌細胞¹⁹⁾において浸潤と転移を促進する。

頭頸部扁平上皮癌細胞においては Sema4D の発現を認めることが報告されている^{12,20)}。また口腔扁平上皮癌の手術標本の組織学的検索においては 8 割以上に Sema4D の発現を認める。本研究においても、口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D の発現を確認した。口腔扁平上皮癌細胞の Plexin B1 発現については、発現を認める報告²⁰⁾と認めないとする報告¹²⁾があり、明らかではなかった。本研究において用いた口腔扁平上皮癌細胞株においては、すべての細胞で Plexin B1 の強発現を認めた。Sema4D が口腔扁平上皮癌細胞に与える影響については、血管新生を介して腫瘍増殖を促進することは報告されているが²¹⁾、口腔扁平上皮癌細胞に対する Sema4D の直接的影響を検討した報告はなかった。本検討では、Sema4D が口腔扁平上皮癌細胞の細胞増殖、細胞遊走および浸潤を促進することを明らかにした。Sema4D は細胞骨格の再構築や接着斑の形成に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質である RhoA を活性化させることが報告されている²²⁾。Sema4D は PlexinB1 を介して細胞運動に関与する非受容体型チロシンキナーゼである PYK2 を活性化する²³⁾。またアポトーシスを抑制するシグナル伝達因子である Akt および細胞増殖を促進する MAPK のリン酸化を促進することが報告されている^{23,24)}。本研究においては Sema4D の刺激によって口腔扁平上皮癌細胞の著

明な形態的变化は認めなかったが、Sema4D が上記のシグナル伝達因子を活性化することで細胞増殖や運動能を促進した可能性がある。

骨微小環境においては、破骨細胞における Sema4D 発現と、骨芽細胞の PlexinB1 発現が確認されている¹¹⁾。癌の骨破壊における Sema4D の役割を検討した報告は今までにない。顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌の手術標本では、骨破壊部位に一致した腫瘍組織に Sema4D および PlexinB1 の発現を認めた。そこで Sema4D による破骨細胞の分化と骨吸収活性に与える影響について検討した。マウス骨髄細胞を M-CSF および RANKL で刺激し、さらに Sema4D を添加すると破骨細胞の分化と骨吸収活性が促進された。Sema4D が破骨細胞において、インテグリン $\beta 3$ と共発現しており骨吸収に影響を与えている可能性を示唆する報告もあるが²⁵⁾、Sema4D は骨芽細胞の骨形成を抑制し、破骨細胞には影響を与えないと報告されていた¹¹⁾。本研究においては、破骨細胞が PlexinB1 を発現していること、また機序は不明であるが Sema4D が破骨細胞の分化と骨吸収活性を促進することを明らかにした。

Sema6D の受容体である PlexinA1 の欠損マウスは、破骨細胞分化が阻害され大理石骨病となることが報告されている²⁶⁾。Sema6D が PlexinA1 に結合すると、PlexinA1 は TREM-2 および DAP12 と複合体を形成し (PlexinA1-TREM-2-DAP12 複合体)、破骨細胞の分化を促進する。このような複合体を PlexinB1 が形成し破骨細胞の分化を促進する可能性が考えられる。

一方で、骨芽細胞の産生する Sema3A は、破骨細胞前駆細胞において、いずれも Sema 3A の受容体である PlexinA1 と neuropilin1 からなる Sema3A 受容体複合体を形成し、PlexinA1-TREM-2-DAP12 複合体の形成を阻害して、破骨細胞の分化を抑制する。しかし RANKL 刺激により、neuropilin 1 発現は低下するため、RANKL 刺激の後には PlexinA1-TREM-2-DAP12 複合体が形成され、Sema6D 下流のシグナル伝達が行われ、破骨細胞の分化が促進される²⁷⁾。

今回、骨髄間質細胞株 ST-2 細胞を Sema4D で刺激しても、RANKL 発現には影響がなかった。上記のような骨芽細胞や骨髄間質細胞を介した間接的な作用ではなく、Sema4D は破骨細胞に直接的に作用しているのかもしれない。

Sema4D 発現の調節因子については全く分かっていない。本研究では、IGF-I 添加により口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D 発現が増加した。骨浸潤した癌細胞は骨組織から遊離した成長因子を受け取り、腫瘍増殖を加速させる。骨組織から遊離した IGF-I が Sema4D 発現を調節していると考えられた。

現在、癌の高カルシウム血症や骨転移に対して bisphosphonate 系薬剤²⁸⁾や抗 RANKL 抗体 (デノスマブ)^{29,30)}などが広く臨床応用されている。これらは、破骨細胞を標的とした薬剤であり、癌細胞に対して抗腫瘍効果を期待するものではない。今回、Sema4D が口腔扁平上皮癌細胞の増殖と破骨細胞性骨吸収を促進することを明らかにした。抗 Sema4D 療法は、癌細胞および破骨細胞の両方を標的としており、口腔癌の骨浸潤に対する治療薬の有望な候補となると考えられた。

結 語

口腔扁平上皮癌細胞の産生する Sema4D は、オートクライン的に作用して腫瘍増殖に関与し、また破骨細胞に対しては分化形成および骨吸収活性を促進して骨浸潤を促進していると考えられた。破壊された骨組織から遊離された IGF-I は、口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D 発現を増加させ、腫瘍増殖と骨浸潤を促進する負の因子であると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な機会を与えて頂き，御懇切なる御指導と御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野，佐々木 朗教授に深甚なる感謝の意を表します。また，本研究の遂行に際し，御指導いただきました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野，伊原木 聰一郎博士，吉岡 徳枝博士に深く感謝いたします。また，様々な面で多くの貴重な御援助と御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔顎顔面外科学分野および岡山大学病院口腔外科（病態系）の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Nakazawa, M., Kano, Y., Sumi, T., Atsumi, Y., Iwai, S., Tamura, H., Nakagawa, S., Sakuda, M. and Kawai, T. : The Relationship between Prognosis and the Mode of Bone Resrptions by Carcinomas Involving Mandible. *J. Jpn. Stomatol. Soc.*, 40, 589–599, 1991.
- 2) Weilbaecher, K. N., Guise, T. A. and McCauley, L. K. : Cancer to bone: a fatal attraction. *Nature. Revew. Cancer.*, 11, 411–425, 2011.
- 3) Kolodkin, a L., Matthes, D. J. and Goodman, C. S. : The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell.*, 75, 1389–1399, 1993.
- 4) Luo, Y., Raible, D. and Raper, J. a. : Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell.*, 75, 217–227, 1993.
- 5) Epstein, J. A., Aghajanian, H. and Singh, M. K. : Semaphorin signaling in cardiovascular development. *Cell Metab.* 21, 163–173, 2015.
- 6) Messina, A. and Giacobini, P. : Semaphorin Signaling in the Development and Function of the Gonadotropin Hormone-Releasing Hormone System. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 4, 1–12, 2013.

- 7) Kang, S., Okuno, T., Takegahara, N., Takamatsu, H., Nojima, S., Kimura, T., Yoshida, Y., Ito, D., Ohmae, S., You, D., Toyofuku, T., Jang, M. H. and Kumanogoh, A. : Intestinal Epithelial Cell-Derived Semaphorin 7A Negatively Regulates Development of Colitis via α 1 Integrin. *J. Immunol.* **188**, 1108–1116, 2012.
- 8) Mizui, M., Kumanogoh, A. and Kikutani, H. : Immune semaphorins: Novel features of neural guidance molecules. *J. Clin. Immunol.* **29**, 1–11, 2009.
- 9) Shanks, K., Nkyimbeng-Takwi, E. H., Smith, E., Lipsky, M. M., DeTolla, L. J., Scott, D. W., Keegan, A. D. and Chapoval, S. P. : Neuroimmune semaphorin 4D is necessary for optimal lung allergic inflammation. *Mol. Immunol.* **56**, 480–487, 2013.
- 10) Moreau-Fauvarque, C., Kumanogoh, A., Camand, E., Jaillard, C., Barbin, G., Boquet, I., Love, C., Yvonne Jones, E. Kikutani, H., Lubetzki, C., Dusart, I. and Che'dotal, A. : The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion. *J. Neurosci.* **23**, 9229–9239, 2003.
- 11) Negishi-Koga, T., Shinohara, M., Komatsu, N., Bito, H., Kodama, T., Friedel, R.H. and Takayanagi, H. : Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature. Medicine.*, **17**, 1473–1480, 2011.
- 12) Basile, J. R., Castilho, R. M., Williams, V. P. and Gutkind, J. S. : Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 9017–9022, 2006.
- 13) Goda, T., Shimo, T., Yoshihama, Y., Hassan, N.M.M., Ibaragi, S., Kurio, N., Okui, T., Honami, T., Kishimoto, K. and Sasaki, A. : Bone destruction by invading oral squamous carcinoma cells mediated by the transforming growth factor-beta signalling pathway. *Anticancer Res.*, **30**, 2615–23, 2010.
- 14) Ha, H., Lee, J.-H., Kim, H.-N., Kim, H.-M., Kwak, H. B., Lee, S., Kim, H. and Lee, Z.H. : alpha-Lipoic acid inhibits inflammatory bone resorption by suppressing prostaglandin E2 synthesis. *J. Immunol.*, **176**, 111–117 (2006).

- 15) Lee, J. H., Kim, H. N., Yang, D., Jung, K., Kim, H. M., Kim, H. H., Ha, Ha. and Lee, Z.H. : Trolox prevents osteoclastogenesis by suppressing RANKL expression and signaling. *J. Biol. Chem.*, **284**, 13725–13734, 2009.
- 16) Sakurai, A., Doçi, C. and Gutkind, J. S. : Semaphorin signaling in angiogenesis, lymphangiogenesis and cancer. *Cell Res.*, **22**, 441–441, 2012.
- 17) Swiercz, J. M., Worzfeld, T. and Offermanns, S. : ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J. Biol. Chem.*, **283**, 1893–1901, 2008.
- 18) Worzfeld, T., Swiercz, J. M., Looso, M., Straub, B. K., Sivaraj, K.K. and Offermanns, S. : ErbB-2 signals through Plexin-B1 to promote breast cancer metastasis. *J. Clin. Invest.*, **122**, 1296–305, 2012.
- 19) Ye, S., Hao, X., Zhou, T., Wu, M., Wei, J., Wang, Y., Zhou, L., Jiang, X., Ji, L., Chen, Y., You, L., Zhang, Y., Xu, G., Zhou, J., Ma, D. and Wang, S. : Plexin-B1 silencing inhibits ovarian cancer cell migration and invasion. *BMC Cancer.*, **10**, 611, 2010.
- 20) Binmadi, N. O., Yang, Y.-H., Zhou, H., Proia, P., Lin, Y.-L., De Paula, A. M. B., Guimarães, A. L. S., Poswar, F. O., Sundararajan, D. and Basile, J. R. : Plexin-B1 and semaphorin 4D cooperate to promote perineural invasion in a RhoA/ROK-dependent manner. *Am. J. Pathol.*, **180**, 1232–42, 2012.
- 21) Zhou, H., Yang, Y.-H., Binmadi, N. O., Proia, P. and Basile, J. R. : The hypoxia-inducible factor-responsive proteins semaphorin 4D and vascular endothelial growth factor promote tumor growth and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Exp. Cell Res.*, **318**, 1685–98, 2012.
- 22) Capparuccia, L. and Tamagnone, L. : Semaphorin signaling in cancer cells and in cells of the tumor microenvironment--two sides of a coin. *J. Cell Sci.*, **122**, 1723–1736, 2009.
- 23) Basile, J. R., Afkhami, T. and Gutkind, J. S. : Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 6889–98, 2005.
- 24) Aurandt, J., Li, W. and Guan, K.-L. : Semaphorin 4D activates the MAPK pathway downstream of plexin-B1. *Biochem. J.*, **394**, 459–64, 2006.

- 25) Dacquin, R., Domenget, C., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Jurdic, P. and Machuca-Gayet, I. : Control of bone resorption by semaphorin 4D is dependent on ovarian function. *PLoS One.*, **6**, e26627, 2011.
- 26) Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D. V. R., Suzuki, K., Ishii, M., Terai, K., Moriya, M., Nakatsuji, Y., Sakoda, S., Sato, S., Akira, S., Takeda, K., Inui, M., Takai, T., Ikawa, M., Okabe, M., Kumanogoh, A. and Kikutani, H. : Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature. Cell Biol.*, **8**, 615–622, 2006.
- 27) Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A. and Takayanagi, H. : Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature.*, **485**, 69–74, 2012.
- 28) Ressler, S., Mlineritsch, B. and Greil, R. : Zoledronic acid for adjuvant use in patients with breast cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther.*, **11**, 333–349, 2011.
- 29) Stopeck, A. T., Lipton, A., Body, J.-J., Steger, G. G., Tonkin, K., de Boer, R. H., Lichinitser, M., Fujiwara, Y., Yardley, D. A., Viniegra, M., Fan, M., Jiang, Q., Dansey, R., Jun, S. and Braun, A. : Denosumab compared with zoledronic acid for the treatment of bone metastases in patients with advanced breast cancer: a randomized, double-blind study. *J. Clin. Oncol.*, **28**, 5132–5139, 2010.
- 30) Fizazi, K., Carducci, M., Smith, M., Damião, R., Brown, J., Karsh, L., Milecki, P., Shore, N., Rader, M., Wang, H., Jiang, Q., Tadros, S., Dansey, R. and Goessl, C. : Denosumab versus zoledronic acid for treatment of bone metastases in men with castration-resistant prostate cancer: a randomised, double-blind study. *Lancet.*, **377**, 813–22, 2011.

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 口腔顎顔面外科学分野

(主任：佐々木 朗教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 60 回日本口腔外科学会総会 (2015 年 10 月)

第 63 回日本口腔科学会中国・四国地方部会 (2015 年 11 月)

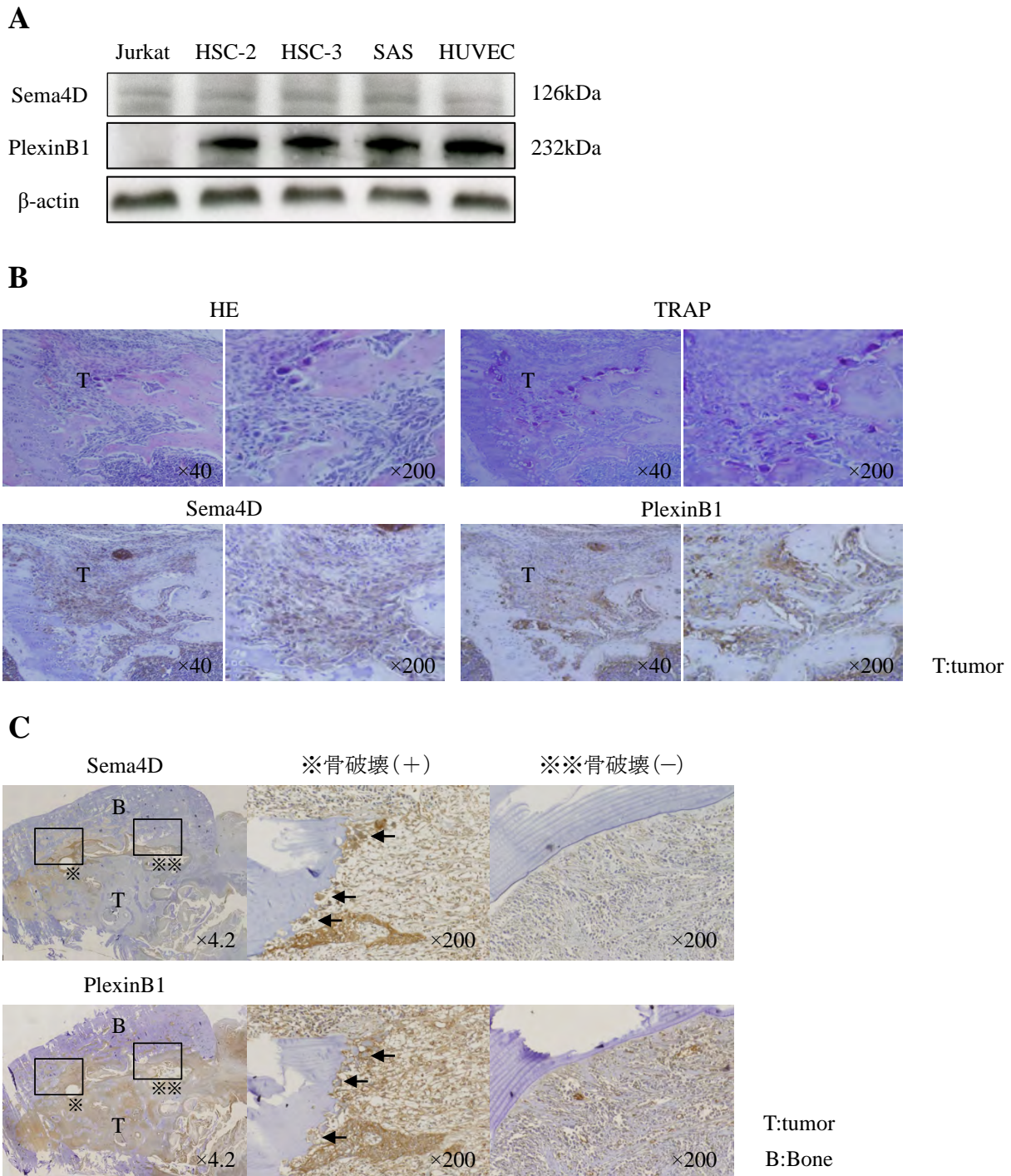


図1. in vitroおよびin vivoにおけるSema4DとPlexinB1の発現

A: 各口腔扁平上皮癌細胞株のSema4DとPlexinB1の発現。JurkatとHUVECをそれぞれSema4DとPlexinB1発現の陽性対照とした。どの口腔扁平上皮癌細胞株においても陽性対照と同等のSema4DとPlexinB1の発現を認めた。

B: マウス骨浸潤モデルにおけるSema4DとPlexinB1の発現。HE染色像; マウス大腿骨の一部は破壊され、癌細胞に置換されていた。TRAP染色像; 破骨細胞は破壊された骨表面上に位置していた。Sema4D抗体およびPlexinB1抗体による免疫組織化学染色像; Sema4DとPlexinB1は骨破壊部位に一致した腫瘍組織に強発現していた。

C: 口腔癌の臨床検体におけるSema4DとPlexinB1の発現。骨破壊が起きている部位を中心にSema4DとPlexinB1の強発現を認め、破骨細胞にもその発現を認めた。破骨細胞を矢印で示す。骨破壊が起こっていない部位では、腫瘍組織と骨との間に線維組織が介在しており、Sema4DとPlexinB1の発現は軽度であった。

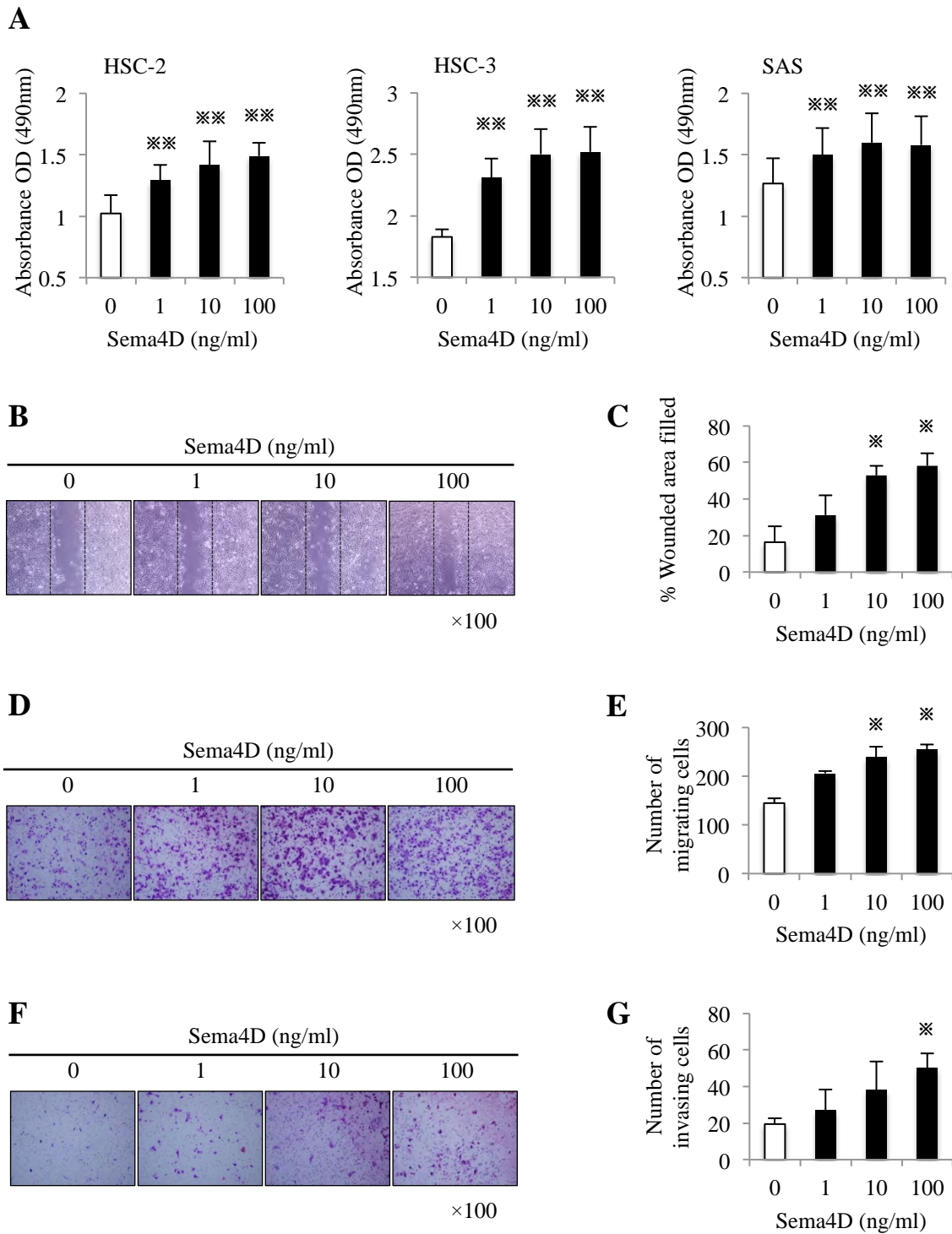


図2. Sema4Dが口腔扁平上皮癌細胞に与える影響

A: MTS assayによる口腔扁平上皮癌細胞の増殖能についての検討。すべての細胞株においてSema4D添加により細胞増殖を認めた。

B: Wound healing assayによる24時間培養後の細胞遊走の写真。引っ掻き傷をつけた直後の細胞の位置を黒の点線で示した。

C: Wound healing assayによるHSC-2細胞の運動能についての検討。Sema4D添加により濃度依存的に運動能の増加を認めた。

D: Migration assayによる24時間後のメンブレン下層の細胞の染色像。

E: Migration assayによるHSC-2細胞の遊走能についての検討。Sema4D添加により濃度依存的に遊走した細胞数が増加した。

F: Invasion assayによる24時間後のメンブレン下層の細胞の染色像。

G: Invasion assayによるHSC-2細胞の浸潤能についての検討。Sema4D添加により濃度依存的に遊走した細胞数が増加した。対照群に対するSema4D添加群の統計的有意差を示す(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

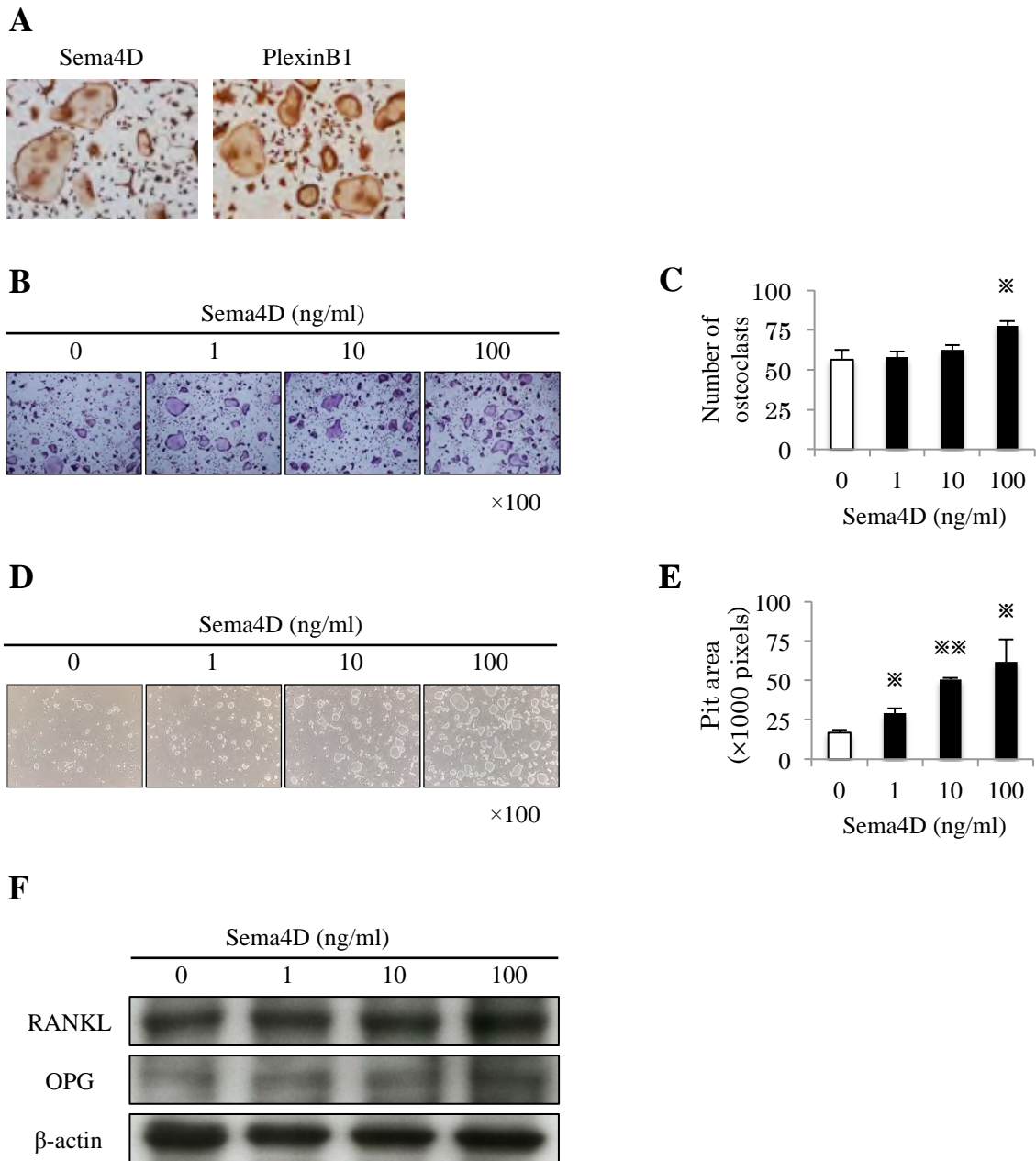


図3. Sema4Dが破骨細胞および骨髄間質細胞株ST-2細胞に与える影響

A: 破骨細胞におけるSema4D抗体およびPlexinB1抗体による免疫組織化学染色像。Sema4DとPlexinB1は細胞膜上に強発現していた。

B: Osteoclast formation assayによるTRAP染色像。

C: Osteoclast formation assayによる破骨細胞の形成能についての検討。Sema4D100ng/ml添加群において破骨細胞数の有意な増加を認めた。

D: Pit formation assayによるOsteo plate上の吸収窩の写真。

E: Pit formation assayによる破骨細胞の吸収能についての検討。Sema4D添加により濃度依存的に吸収窩の増加を認めた。

F: Sema4D添加によるST-2細胞のタンパク発現。Sema4D添加によるRANKLとOPGの発現の変化は認めなかった。対照群に対するSema4D添加群の統計的有意差を示す(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

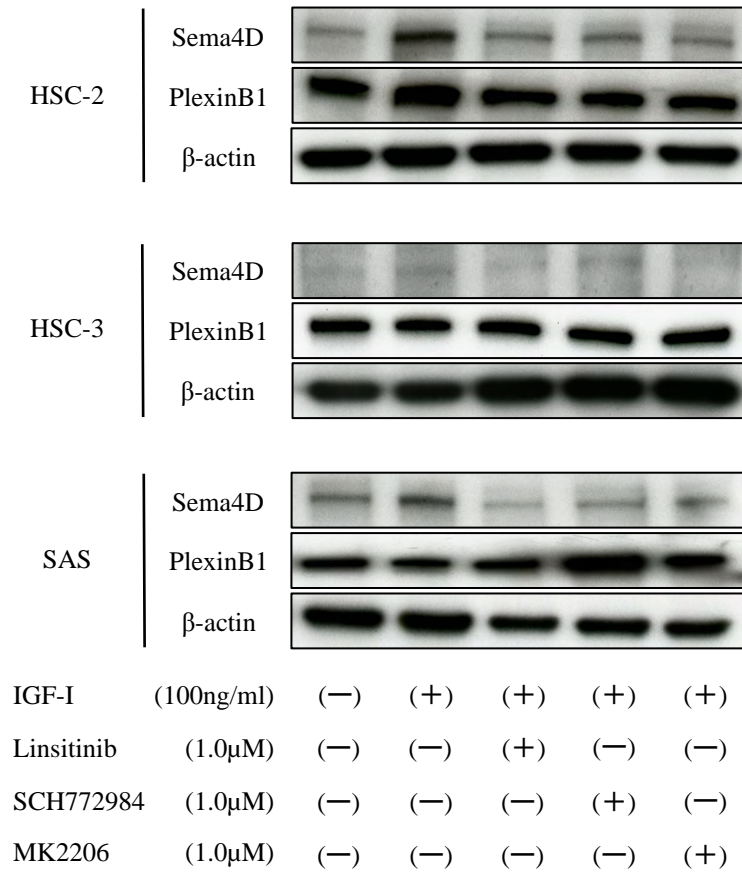


図4. IGF-Iが口腔扁平上皮癌細胞のSema4DとPlexinB1発現に与える影響

IGF-I 添加による各口腔扁平上皮癌細胞株におけるSema4DとPlexinB1の発現。特にHSC-2細胞とSAS細胞においてIGF-I添加によりSema4Dの発現が増加した。IGF-Iのレセプターおよび下流シグナルのインヒビターとの共存下ではその増加は抑制された。IGF-I添加によるPlexinB1の発現の変化は認めなかった。