

氏 名	高田 紘行
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第5313号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬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)
学位論文の題目	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
論文審査委員	長塚 仁 教授 杉本 朋 貞 教授 佐々木 朗 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔癌は、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、それを制御することは临床上重要な課題である。

本研究では、骨組織および腫瘍組織において発現を認める Semaphorin4D (Sema4D) に注目した。中枢神経系において軸索ガイダンス因子として発見された Sema4D は、近年破骨細胞も分泌し、骨芽細胞上の PlexinB1 と結合することで骨形成抑制を引き起こすことが報告された。さらに、前立腺癌、大腸癌、乳癌、肺癌にも発現を認め、腫瘍増殖に関与することも報告されている。口腔癌にもその発現を認めることから、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。

【材料・方法】

1.口腔癌における Sema4D と PlexinB1 の発現

In vitro では、ヒト口腔癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS) を培養しウエスタンブロット法により Sema4D とその受容体である PlexinB1 の発現を解析した。In vivo では、ヌードマウス大腿骨傍骨膜に口腔癌細胞を移植し、骨浸潤モデルを作製した。4週後に大腿骨を摘出し Sema4D と Plexin-B1 の発現を免疫組織化学的に解析した。また、岡山大学病院口腔外科 (病態系) で手術を施行した顎骨浸潤を伴う口腔癌症例の臨床検体を免疫組織化学的に解析した。

2.Sema4D が口腔癌細胞に与える影響

各口腔癌細胞株に Sema4D を添加し、MTS assay を行い増殖能の影響を検討した。また、HSC-2 細胞に Sema4D を添加し、wound healing assay で運動能、migration assay で遊走能、invasion assay で浸潤能の影響を検討した。

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

5週齢 C57BL/6J マウスの骨髄細胞に M-CSF, RANKL を添加して培養し、破骨細胞の分化培養を行い、Sema4D と PlexinB1 の発現を免疫組織化学的に解析した。また Sema4D 存在下でも破骨細胞の分化培養を行い、形成能を酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色により評価した。骨吸収活性能に対しては、ハイドロキシアパタイトコーティングされた吸収活性プレートを用いて検討した。

4.Sema4D が骨髄間質細胞 ST-2 細胞に与える影響

支持細胞としてマウス骨髄間質細胞 ST-2 細胞を Sema4D 存在下で培養し、破骨細胞の分化調節因子である RANKL と OPG の発現をウェスタンブロット法により解析した。

5.Insulin-like Growth Factor-I (IGF-I) が口腔癌細胞の Sema4D と PlexinB1 発現に与える影響

骨組織中に豊富に含まれる成長因子として IGF-I を各口腔癌細胞株に添加して培養し、Sema4D と PlexinB1 の発現をウェスタンブロット法により解析した。また、IGF-I receptor のインヒビターである Linsitinib と、IGF-I の下流シグナルである ERK と Akt のインヒビターである SCH772984 と MK2206 を用いて抑制効果についても検討した。

【結果】

1.口腔癌における Sema4D と PlexinB1 の発現

In vitro では、すべての口腔癌細胞株において同等の Sema4D と PlexinB1 の発現を認めた。マウス骨浸潤モデルにおいては、骨破壊部位に一致した腫瘍組織に Sema4D と PlexinB1 の強発現を認めた。また、口腔癌の臨床検体では、骨破壊の進んだ部位に Sema4D と PlexinB1 の強発現を認め、骨破壊がまだ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、Sema4D と PlexinB1 の発現は軽度であった。

2.Sema4D が口腔癌細胞に与える影響

MTS assay では、Sema4D 添加によりすべての口腔癌細胞株において細胞増殖の促進を認めた。HSC-2 細胞を用いた wound healing assay, migration assay, invasion assay では、Sema4D 添加により濃度依存的に運動能、遊走能、および浸潤能の促進を認めた。

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

Sema4D と PlexinB1 は破骨細胞の細胞膜表面上に強発現していた。破骨細胞形成能については、Sema4D100ng/ml 添加群において、対照群と比較して優位に破骨細胞数の増加を認めた。骨吸収活性能については、Sema4D 添加により濃度依存的に吸収窩の増大を認めた。

4.Sema4D が骨髄間質細胞 ST-2 細胞に与える影響

Sema4D 添加群においても ST-2 細胞における RANKL と OPG の発現は影響を受けなかった。

5.IGF-I が口腔癌細胞の Sema4D と PlexinB1 発現に与える影響

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。しかしながら IGF-I receptor およびその下流シグナルのインヒビターである Linsitinib, SCH772984, および MK2206 との共存下においてはその増加は抑制された。PlexinB1 の発現については、IGF-I 添加により影響を受けなかった。

【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。本研究でも、口腔癌細胞に対する Sema4D の直接的な影響を検討し、Sema4D が口腔癌細胞の細胞増殖、細胞遊走および浸潤を促進することを明らかにした。これまで Sema4D が PlexinB1 を介して、低分子量 GTP 結合蛋白質 RhoA を活性化させることが報告されている。さらには、非受容体型チロシンキナーゼ SYK2 の活性化や、アポトーシス抑制を行う 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も報告されている。口腔癌細胞においても、Sema4D の刺激により上記シグナル伝達因子が活性化されたことにより細胞増殖や運動能を促進した可能性がある。

顎骨浸潤を伴う口腔癌の手術標本では、骨破壊部位に Sema4D と PlexinB1 の強発現を認めた。そこで Sema4D による破骨細胞の分化形成能と骨吸収活性能に与える影響を検討したところ、Sema4D が破骨細胞の分化形成

と骨吸収活性の両方を促進することを明らかにした。骨髄間質細胞 ST-2 細胞を Sema4D で刺激しても RANKL 発現には影響がなかったことから、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 が破骨細胞に直接的に作用しているかもしれない。

これまで 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、骨組織から遊離され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。

以上のことから、口腔癌細胞の産生する 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 は口腔癌細胞の Sema4D 発現を増加させ、さらに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。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。

論文審査結果の要旨

Semaphorin4D (Sema4D) は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。近年、骨リモデリングにおいて破骨細胞が Sema4D を分泌し、骨芽細胞の骨形成を抑制することや、Sema4D が前立腺癌、大腸癌、乳癌、肺癌の腫瘍増殖に関与することが報告された。従って癌の骨浸潤においても Sema4D が関与する可能性が示唆されるが、Sema4D と癌の骨浸潤・骨破壊における役割については不明である。本研究では、口腔癌の骨浸潤・骨破壊における Sema4D の役割について検討した。

まず、ヌードマウス大腿骨膜近傍にヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2) を移植し、骨浸潤モデルを作製した。移植 4 週後に大腿骨を摘出し、Sema4D とその受容体 PlexinB1 の発現を免疫組織化学的に検討した。同様に、顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌症例の臨床検体を用いて、Sema4D と PlexinB1 の発現を同様に検討した。骨浸潤モデル、臨床検体ともに、骨浸潤部周囲の腫瘍組織に Sema4D と PlexinB1 の強発現を認めた。次に *in vitro* において、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS) の Sema4D と PlexinB1 の発現と細胞増殖能に対する Sema4D の影響を検討した。全ての細胞株において、Sema4D と PlexinB1 の発現が認められ、Sema4D は細胞増殖能を促進した。また、HSC-2 細胞を用いて運動能、遊走能、浸潤能に対する Sema4D の影響を検討したところ、Sema4D は運動能、遊走能、浸潤能全てを促進した。さらに Sema4D のマウス骨髄細胞の破骨細胞分化形成ならび骨吸収活性、形成された破骨細胞での Sema4D と PlexinB1 の発現を検討した。破骨細胞は Sema4D ならびに PlexinB1 を発現し、Sema4D は破骨細胞の分化形成および骨吸収活性を促進した。しかし、Sema4D は骨髄間質細胞株 (ST-2) の receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) および osteoprotegerin (OPG) の発現に影響を与えなかった。また、insulin-like growth factor-I (IGF-I) は、HSC-2, HSC-3, SAS 細胞の Sema4D 発現を増加させた。

以上の結果から、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腫瘍増殖に関与し、また破骨細胞の分化形成および骨吸収活性を促進することにより、骨浸潤での骨破壊を促進していると考えられた。また骨破壊により骨微小環境に遊離された IGF-I は口腔扁平上皮癌細胞の Sema4D 発現を増加させ、さらに腫瘍増殖と骨浸潤・骨破壊を促進することが示唆された。これらの研究結果より Sema4D を分子標的とした治療は、口腔扁平上皮癌細胞の腫瘍増殖と破骨細胞性骨吸収の両方を制御できる可能性が示された。

本論文は、Sema4D の口腔癌の骨浸潤・骨破壊における促進的な役割を新知見として示しており、Sema4D を分子標的とした癌の骨破壊病変に対する新規治療開発への展開が期待できる。よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。