

|         |  |         |         |
|---------|--|---------|---------|
| 氏名      | 森澤 綾香  |         |         |
| 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5697号   |         |         |
| 学位授与の日付 | 平成30年3月23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<br>(学位規則第4条第1項該当)  |         |         |
| 学位論文の題目 | Ammonium tetrathiomolybdate enhances the antitumor effects of cetuximab via the suppression of osteoclastogenesis in head and neck squamous carcinoma<br>(Ammonium Tetrathiomolybdate は頭頸部扁平上皮癌において破骨細胞形成抑制を介し Cetuximab の抗腫瘍効果を高める) |         |         |
| 論文審査委員  | 飯田 征二 教授   | 長塚 仁 教授 | 上岡 寛 教授 |

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

近年、生体内微量元素である銅が新たな癌治療の標的として検討されており、臨床的にある種の銅キレート剤が乳癌、悪性中皮腫などの再発リスクを減少させることが報告されている。銅は生体内で約60%が骨、筋肉に貯蔵されており、骨代謝において重要な役割を果たすことが知られているが、口腔癌の顎骨浸潤、骨破壊における銅の役割は不明である。Lysyl oxidase (LOX) は銅依存コラーゲン合成酵素であり、近年、強力な破骨細胞誘導能を有し、癌骨転移を促進することが報告されている。しかしながら生体内の銅が LOX を介して癌の骨破壊に与える影響や、銅を標的とした治療についてはほとんど検討されていない。

銅キレート剤である Ammonium Tetrathiomolybdate (TM) はウィルソン病の治療薬であると同時に血管新生阻害薬である。本研究では TM を用いて、生体内の銅が骨微小環境における破骨細胞形成系に与える影響、口腔癌骨破壊モデルマウスにおける腫瘍増殖、骨破壊に与える影響を検討するとともに、既存の口腔癌治療薬との併用効果を検討した。

### 【方法と結果】

#### (1) TM の口腔扁平上皮癌細胞株に与える影響

口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2, HSC-3, SAS に TM を添加し、72 時間培養を行い増殖能の検討を行った。TM は口腔扁平上皮癌細胞株の増殖能を有意に抑制したが、線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、T 細胞の増殖能に影響を与えなかった。BALB/c-nu/nu マウス背部皮下に HSC-2 を移植した担癌モデルを作製し、TM の抗腫瘍効果を検討した。腫瘍移植 7 日後から TM (1mg / 日) および EGFR 阻害薬である Cetuximab (1mg / kg / 2 回 / 週) の投与を開始し、35 日後腫瘍体積を測定したところ、TM または Cetuximab 投与群ではコントロール群と比較して腫瘍体積が有意に減少した。摘出腫瘍を免疫組織化学

的に検討したところ、TM および Cetuximab 投与群では Ki-67 陽性腫瘍細胞数の有意な減少を示し、TM は Cetuximab の抗腫瘍効果を増強する傾向を示した。

#### (2) TM の破骨細胞形成に与える影響

C57BL/6J マウスより採取した骨髄細胞を TM の存在下または非存在下で 5 日間培養を行った。TM は破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した。また、培地中の  $\text{Cu}^{2+}$  濃度および骨髄細胞における Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand (RANKL) 発現は、TM の濃度依存的に低下した。しかし TM は C57BL/6J マウスより単離した CD11b<sup>+</sup>細胞の RANKL 依存性破骨細胞分化には影響を与えなかった。これらの結果から TM は前破骨細胞に直接的に影響するのではなく、骨芽細胞などの破骨細胞形成の支持細胞における RANKL 発現を介した間接的な影響により破骨細胞形成を抑制することが示唆された。

#### (3) TM の LOX 活性に与える影響

HSC-2, SAS を TM と  $\text{Cu}^{2+}$  存在下にて培養を行い LOX 活性の測定を行った。口腔扁平上皮癌細胞株が産生する LOX は  $\text{Cu}^{2+}$  存在下にて活性化し、LOX 活性に必要な  $\text{Cu}^{2+}$  を TM がキレートすることで LOX 活性は抑制された。また、TM 処理にて LOX 活性の低下した培養上清で骨芽細胞、骨細胞を処理し RANKL 発現を検討したところ、RANKL 発現は低下した。TM は口腔扁平上皮癌細胞株の LOX 活性を抑制することにより、骨芽細胞、骨細胞の RANKL 発現を抑制することが示唆された。

#### (4) 口腔扁平上皮癌骨移植モデルマウスにおける TM の効果の検討

これまでの結果を踏まえ、TM の癌骨破壊病変における効果を口腔扁平上皮癌骨移植モデルマウスを作製し *in vivo* にて検討を行った。BALB/c-nu/nu マウス右脛骨骨髄内に HSC-2 を移植し、移植 7 日後から TM, Cetuximab の投与を行い、35 日後に軟 X 線ならびにマイクロ CT 撮影を行った。その後、脱灰切片を作製し免疫組織学的に検討を行った。TM は本モデルマウスにおける骨髄内での LOX 活性、腫瘍増大、破骨細胞性骨吸収を抑制した。また TM は Cetuximab の抗腫瘍効果を増強した。

#### 【考察・結論】

LOX は骨芽細胞の RANKL 発現を誘導し、癌骨転移、骨破壊に関与していることが既に報告されている。本研究において、TM は口腔扁平上皮癌細胞株の増殖能を有意に抑制し、 $\text{Cu}^{2+}$  は口腔扁平上皮癌細胞株の LOX 活性を増加させ、TM は  $\text{Cu}^{2+}$  をキレートすることで LOX 活性を抑制した。TM の口腔扁平上皮癌細胞株の LOX 活性抑制は、癌細胞によって誘導される骨芽細胞、骨細胞からの RANKL 発現を抑制することが示唆された。これらの結果は、TM が腫瘍増殖を抑制するだけでなく、破骨細胞形成ならびに骨吸収を抑制する可能性が示唆された。この仮説を検証するため、癌骨移植モデルマウスを作製し TM の投与を行ったところ、TM は銅キレート効果により骨髄内の LOX 活性抑制を介し、骨芽細胞、骨細胞の RANKL 発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制することで骨破壊を抑制する事が示唆された。また、TM は Cetuximab の抗腫瘍効果を増強した。このことから、TM 療法または TM と Cetuximab などの併用療法は、進行した口腔扁平上皮癌の骨浸潤、骨破壊を制御する新たな治療法となる可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

近年、生体内微量元素である銅が新たな癌治療の標的として検討されており、臨床的にある種の銅キレート剤が乳癌、悪性中皮腫などの再発リスクを減少させることが報告されている。銅は骨代謝において重要な役割を果たすことが知られており、銅依存コラーゲン合成酵素である Lysyl oxidase (LOX) は、近年、強力な破骨細胞誘導能を有し癌骨転移を促進することが報告されている。しかしながら銅の頭頸部扁平上皮癌の腫瘍増殖、骨破壊に与える影響についてはほとんど検討されていない。本研究では、ウィルソン病の治療薬として開発された銅キレート剤である Ammonium Tetrathiomolybdate (TM) を使用し、頭頸部扁平上皮癌の腫瘍増殖、骨破壊に与える影響を検討し TM の新たな癌治療薬としての可能性を明らかにするとともに、既存の口腔癌治療薬 Cetuximab との関係を検討した。

まず TM の口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-2, HSC-3, SAS) に与える影響について検討を行ったところ、TM は HSC-2, HSC-3, SAS の増殖能を抑制した。BALB/c-nu/nu マウス背部皮下に HSC-2 を移植した担癌モデルを作製し TM の抗腫瘍効果を検討したところ、TM は腫瘍体積を有意に減少させ Cetuximab の抗腫瘍効果を増強する傾向を示した。次に TM の破骨細胞形成に与える影響について検討を行った。C57BL/6J マウスより採取した骨髄細胞を TM の存在下で培養したところ、TM は破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した。しかし、TM は C57BL/6J マウスより単離した CD11b<sup>+</sup>細胞の Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) 依存性破骨細胞分化には影響を与えなかった。TM は口腔扁平上皮癌細胞株が産生する LOX 活性に必要な Cu<sup>2+</sup> をキレートすることで LOX 活性を抑制した。また、TM 処理にて LOX 活性の低下した培養上清で骨芽細胞、骨細胞を処理し RANKL 発現を検討したところ RANKL 発現は低下した。TM は口腔扁平上皮癌細胞株の LOX 活性を抑制することにより、骨芽細胞、骨細胞の RANKL 発現を抑制することが示唆された。In vitro での結果を踏まえ、TM の癌骨破壊病変における効果を口腔扁平上皮癌骨移植モデルを作製し in vivo にて検討を行ったところ、TM は本モデルマウスにおける骨髄内での LOX 活性、腫瘍体積の増大、破骨細胞性骨吸収を抑制した。また TM は Cetuximab の抗腫瘍効果を増強した。

本論文により銅を標的とした TM 療法または TM と Cetuximab の併用療法が、頭頸部扁平上皮癌の腫瘍増殖、骨浸潤、骨破壊を制御する新たな治療法となる可能性を示した。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。