

氏 名	吉谷 菜々
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7442号
学位授与の日付	令和 8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	口腔扁平上皮癌由来 Angiogenin による顎骨破壊部の破骨細胞分化促進機構の解明
論文審査委員	HARA EMILIO SATOSHI 教授 沢 禎彦 教授 中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

【背景】

顎骨に浸潤した口腔扁平上皮癌 (OSCC) は、広域な外科的切除を伴うため患者の QOL を著しく低下させ、治療抵抗性や予後不良に深く関連している。しかし、OSCC に伴う顎骨浸潤の分子機構や、臨床病理学的特徴と密接に関連する因子については、未だ十分に解明されていない。我々は、この新たな分子機構の一端を担う因子として、血管新生因子 Angiogenin (ANG) に注目してきた。ANG は受容体分子 Plexin-B2 (PLXNB2) に結合し、骨微小環境における血管新生を促進するほか、悪性腫瘍における増殖・血管新生・浸潤・免疫応答調節を包括的に制御することが報告されている。我々は ANG が OSCC の増殖に関与すること、*in vitro* において破骨細胞形成を促進することを報告した。これらの研究から、ANG が OSCC に伴う顎骨浸潤に関与している可能性が考えられる。本研究では、ANG が破骨細胞分化を促進する分子メカニズムと OSCC に伴う顎骨浸潤における役割について解明することを目的とした。

【材料と方法】

マウス骨髄由来マクロファージおよびマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞を用いた破骨細胞分化系に Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF) , Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) およびリコンビナントヒト ANG (rhANG) を添加し、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色により破骨細胞形成を評価した。RANKL の下流シグナルである NF- κ B inhibitor alpha (I κ B α) の分解、Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) および p38 のリン酸化はウエスタンブロット法により解析した。また、ANG による RANK (RANKL の受容体) の発現誘導については、Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) およびウエスタンブロット法により評価し、RANK の誘導と関連するシグナルである I κ B α 、ERK、Protein Kinase B (Akt) はウエスタンブロット法により評価した。さらに、破骨細胞形成に対する PLXNB2 の役割を明らかにするため、siRNA によるノックダウン解析を行った。OSCC 由来 ANG の影響を検討するため、マウス口腔扁平上皮癌細胞株 MOC2 細胞の ANG 発現を抑制した細胞 (shANG 細胞) を樹立し、回収した conditioned medium (CM) を用いて破骨細胞誘導能および RANK 発現誘導能を解析した。さらに、shANG 細胞および形質導入陰性対照となる shCtrl 細胞をマウス咬筋内に移

植することで OSCC 移植モデルマウスを構築し、顎骨部のマイクロ CT 解析、および摘出した組織の TRAP 染色により顎骨破壊の程度について評価した。

【結果】

1. ANG は RANKL による破骨細胞形成を増強した

hrANG はマウス初代骨髄細胞および RAW264.7 細胞において、TRAP 陽性多核細胞数を濃度依存的に増加させた。

2. ANG は破骨細胞分化シグナル経路を活性化した

ANG 存在下では RANKL 刺激による I κ B α の分解、ERK/p38 のリン酸化が増強した。

3. ANG は RANK の発現を誘導した

hrANG 刺激により RANK 発現が増加し、I κ B α の分解、ERK、Akt のリン酸化が亢進した。

4. PLXNB2 は ANG の破骨細胞誘導作用を媒介した

PLXNB2 をノックダウンした RAW264.7 細胞では ANG による破骨細胞誘導が著しく減弱した。

5. OSCC 由来 ANG は破骨細胞形成と RANK 発現を促進した

shCtrl 細胞の CM は破骨細胞形成および RANK 発現誘導を増強したが、shANG 細胞の CM は shCtrl に比べ、破骨細胞形成および RANK 発現誘導が有意に低下した。

6. マウス OSCC 移植モデルにおいて ANG は破骨細胞形成を増強した

shCtrl 細胞移植部では TRAP 陽性の破骨細胞の増加と広範な骨破壊が認められたが、shANG 細胞移植部では両者が有意に抑制された。

【考察】

本研究では、ANG が破骨細胞前駆細胞の PLXNB2 を介して Akt、ERK、NF- κ B を活性化し、RANK の発現を増加させることを明らかにした。また、RANK 発現の増加による RANKL に対する感受性の増加は、I κ B α の分解、p38、ERK のリン酸化を亢進し、破骨細胞形成を促進していた。さらに、OSCC 細胞の ANG を抑制することで *in vivo* において破骨細胞の誘導と骨破壊が抑制された。これらの結果から、ANG の作用は破骨細胞前駆細胞の PLXNB2 を介しており、腫瘍微小環境における骨破壊因子として知られている PTHrP や IL-6 とは異なる新たな破骨細胞活性化経路をもつことが示された。以上より、OSCC 由来の ANG は、破骨細胞分化誘導と顎骨破壊の促進に重要な役割を果たし、OSCC のさらなる進展を促す、悪循環のトリガー的因子である可能性が示唆された。

ANG 阻害は腫瘍増殖・血管新生抑制に加え、破骨細胞活性化抑制という二重の効果を持ち、既存の破骨抑制薬とは異なる新規治療標的となりうる。他細胞系への影響や PLXNB2 以外の受容体の関与、臨床検体での検証など今後の課題も残されているものの、ANG または PLXNB2 を標的とした治療戦略は、OSCC による顎骨破壊を抑制する新規治療アプローチとして有望であり、今後の臨床応用に向けたさらなる研究が期待される。

論文審査結果の要旨

【緒言】顎骨に浸潤した口腔扁平上皮癌（OSCC）の治療は広域な外科的切除を伴い、患者のQOLを著しく低下させる。そのため、早期発見・低侵襲治療の開発が喫緊の課題である。しかし、OSCCに伴う顎骨浸潤の臨床病理学的特徴やその分子機構と密接に関連する因子については不明な点が多い。一方、血管新生因子Angiogenin（ANG）は *in vitro* において破骨細胞分化を促進することが報告された。本研究では、ANGが破骨細胞分化を促進する分子メカニズムとOSCCに伴う顎骨浸潤における役割について解明することを目的とした。

【方法】まず、ANGの破骨細胞形成への影響を検討するため、マウス初代骨髄細胞およびマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 に対し、Macrophage Colony-Stimulating Factor（M-CSF）および Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand（RANKL）存在下で ANG を作用させ、破骨細胞形成について酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（TRAP）染色により評価した。また、ANGによる RANKL 下流シグナルのリン酸化促進についてウエスタンブロット法で、Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B（RANK）発現についてウエスタンブロット法および quantitative polymerase chain reaction（qPCR）により解析した。次に、既報の ANG 受容体である Plexin-B2（PLXNB2）との関与を検討するため、PLXNB2 のノックダウン（KD）を行い、ANG 存在下での破骨細胞形成を TRAP 染色にて評価した。最後に、口腔癌細胞由来 ANG の顎骨破壊への関与を検討するため、マウス口腔扁平上皮癌細胞株 MOC2 について恒常的に ANG の発現を抑制した KD 細胞を樹立し、*in vitro* における破骨細胞形成誘導能、および *in vivo* における OSCC 移植モデルマウスでの顎骨破壊について解析を行った。

【結果】ANG 処理により濃度依存的に TRAP 陽性の破骨細胞様細胞数が増加し、RANKL 下流シグナルのリン酸化が亢進した。また、ANG 単独処理により RANK 発現が増加した。PLXNB2 の KD 細胞では対照群と比較して ANG による破骨細胞分化誘導が著しく減弱した。さらに、ANG の KD 細胞の培養上清は対照群と比べて破骨細胞誘導能が低かった。OSCC 移植モデルマウスでは ANG の KD 細胞移植側では、対照群と比較し破骨細胞の出現と顎骨破壊が有意に抑制された。

【考察】本研究では、ANGが破骨細胞前駆細胞のPLXNB2を介して、RANKの発現を増加させることを明らかにした。RANK発現の増加によるRANKLに対する感受性の増加はシグナルの活性化を亢進し、破骨細胞分化を促進すると考えられた。また、OSCC細胞のANGを抑制することで *in vivo* において破骨細胞の誘導と骨破壊が抑制された。以上より、OSCC由来のANGは、破骨細胞分化誘導と顎骨破壊の促進に重要な役割を果たし、OSCCのさらなる進展を促す、悪循環のトリガー的因子である可能性が示唆された。

本研究で得られた成果は新規性に富み、新規癌治療薬や新規腫瘍マーカーを開発するうえでの基盤的知見を提供するものである。以上から、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。