

学位論文

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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

病態制御科学専攻

口腔顎顔面外科学分野

吉谷 菜々

(令和 7 年 12 月 4 日受付)

緒 言

進行口腔扁平上皮癌 (以下, OSCC) において高頻度に生じる顎骨浸潤は, 癌治療に対する抵抗性や予後不良の大きな要因である¹⁾. 骨浸潤を伴う OSCC の治療の第一選択は外科的切除であるものの, 広範な顎骨および周囲軟組織の切除は咀嚼・嚥下機能障害や顔貌変形を引き起こし, 患者の QOL を著しく低下させる²⁾. 一方で, OSCC における骨浸潤を制御する分子機構や, 治療にあたり重要な臨床病理学的特徴と密接に結びつく関連因子については, 未だ十分に解明されていない.

これまで, 悪性腫瘍に伴う骨破壊機構に関しては, 腫瘍細胞由来の Parathyroid Hormone-related Protein (PTHrP), Interleukin-6 (IL-6) などが Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) の発現を誘導し, Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) や Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) の経路を介して Nuclear Factor of Activated T-cells, cytoplasmic 1 (NFATc1) を誘導することで破骨細胞分化を促進することが報告されており, 骨肉腫や乳癌骨転移モデルにおいて詳細に解析されてきた^{3,4)}. これらの骨転移を生じる腫瘍では, 腫瘍細胞が血行性に骨髓内に定着し, 骨髓微小環境において破骨細胞を誘導・活性化しながら骨破壊を惹起する⁵⁾. 一方, OSCC は骨髓側ではなく皮質骨側から直接浸潤することを起点として骨破壊を生じるという特徴的な病態を示す⁶⁾. このことは, OSCC の骨破壊には他の癌種とは異なる分子機構が関与していることを示唆しているが, その詳細は明らかとなっていない.

我々は, この新たな分子機構の一端を担う候補因子として血管新生因子 Angiogenin (以下, ANG) に注目してきた. ANG はヒト結腸癌細胞株 HT-29 の培養上清から単離された血管新生因子であり, リボヌクレアーゼスーパーファミリーに属する分泌性糖タンパク質である⁷⁾. ANG は 123 アミノ酸から構成され, リボヌクレアーゼ A (RNase A) と約 33% の相同性を有する⁸⁾. ANG は RNase 活性を介して tRNA を切断し, 細胞ストレス応答や翻訳抑制を誘導し, 自然免疫や細胞の生存にも関与する⁹⁾. また, ANG は細胞内に取り込まれた後に核へ移行し, rRNA 転写を促進することで細胞増殖や血管新生を誘導する¹⁰⁾. さらに近年では, ANG がその受容体である 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ことや, 癌細胞において Phosphoinositide 3-Kinase/ Protein Kinase B (PI3K/Akt) や Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) 経路などの細胞内シグナル伝達を活性化することで, 細胞の生存・遊走・分化, 血管新生を制御することが報告されている¹¹⁻¹³⁾.

ANG の高発現は前立腺癌, 肺癌, 膀胱癌など多くの固形腫瘍で報告されている^{14,15)}. 特に, 血清 ANG 濃度は大腸癌, 急性骨髄性白血病, 多発性骨髄腫などで上昇しており, 腫瘍進展や転移能と相関する¹⁶⁾. さらに, ANG は腫瘍細胞の浸潤・遊走能を亢進させることや, 腫瘍微小環境における血管新生および免疫回避にも関与することが報告されている^{15,17-19)}. これらの知見から, ANG は腫瘍増殖・血管新生・浸潤・免疫応答調節を包括的に制御する枢軸的な因子であり, 癌治療の有望な分子標的として注目されてい

る.

我々は、OSCC 細胞株において ANG の発現が顕著に高いこと、ANG の発現抑制により OSCC 細胞の増殖能が低下することを見出した¹⁴⁾。さらに、ANG は *in vitro* において破骨細胞分化を促進することを報告した²⁰⁾。これらの知見は、ANG が腫瘍自身の増殖や血管新生を促進するのみならず、PLXNB2 を介して破骨細胞を活性化し、腫瘍の骨浸潤を促進する可能性を示唆している。したがって、ANG を分子標的とした新たな治療戦略は、腫瘍の増殖抑制および血管新生阻害に加え、破骨細胞活性を抑えることで骨破壊を制御する効果が期待される。しかし、ANG がどのような分子経路を介して破骨細胞分化を促進するのか、また OSCC 由来 ANG が骨破壊にどのように寄与するのかについては、依然として不明な点が多い。

本研究では、OSCC 由来 ANG が PLXNB2 を介して破骨細胞分化を促進する分子メカニズムを解明し、OSCC に伴う骨浸潤におけるその役割について検討を行った。

材料と方法

1. 試薬

本研究で使用した抗 I κ B α 抗体 (ウサギポリクロナール抗体)、抗 p-p38 抗体 (ウサギモノクロナール抗体)、抗 p38 抗体 (ウサギポリクロナール抗体)、抗 p-ERK 抗体 (ウサギモノクロナール抗体)、抗 ERK 抗体 (ウサギポリクロナール抗体)、抗 GAPDH 抗体 (ウサギモノクロナール抗体)、抗 RANK 抗体 (ウサギポリクロナール抗体)、抗 p-Akt 抗体 (ウサギモノクロナール抗体)、抗 Akt 抗体 (ウサギポリクロナール抗体)、HRP 標識 anti-rabbit IgG 抗体は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より購入した。抗 ANG 抗体 (ウサギポリクロナール抗体) は Proteintech Group (Rosemont, IL, USA) より購入した。Anti-rabbit Alexa Fluor® 555-conjugated secondary antibody は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。

2. 細胞培養

本研究は、岡山大学動物実験委員会承認 (承認番号: OKU-2025462) のもと実施した。骨髄由来マクロファージ (bone marrow-derived macrophages; BMM) は、6 週齢 C57BL/6J 系雄マウス (CLEA Japan, Tokyo, Japan) の大腿骨および脛骨骨髄内から採取した。具体的に、骨髄腔を、Alpha Minimum Essential Medium (α -MEM; Thermo Fisher Scientific) に 10% ウシ胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific) および 1% ペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (P/S; Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を添加した培地にてフラッシュアウトして骨髄細胞を回収し、一日培養後、非接着性細胞のみを回収し、BMM として用いた。

マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞 (JCRB Cell Bank, National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition, Osaka, Japan) は、 α -MEM に 10% FBS および 1% P/S を添加した培地にて培養した。

マウス OSCC 細胞株 MOC2 (Kerafast, Boston, MA, USA) は、628 mL Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Cytiva, Marlborough, IL, USA) , 313 mL Ham's F-12 (Cytiva) , 50 mL FBS, 2 mL P/S, 1 mL insulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) , 800 μ L hydrocortisone (Sigma-Aldrich) , 4.4 μ L Epidermal Growth Factor (EGF; MilliporeSigma, Burlington, MA, USA) を混合した培地にて培養した。

ヒト胎児腎臓由来 HEK293T 細胞 (RIKEN BRC, Ibaraki, Japan) は High glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Thermo Fisher Scientific) に 10% FBS, 1% P/S, 1% Non-Essential Amino Acids (NEAA; Thermo Fisher Scientific) を加えた培地にて培養した。いずれの細胞も、37°C, 5% CO₂加湿インキュベーターで維持した。

3. 破骨細胞分化

大腿骨および脛骨骨髓より採取した BMM を 2×10^6 cells/mL となるよう希釈し、96 well plate に 200 μ L ずつ播種し、10 ng/mL Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF; FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan)存在下で 3 日間培養した後、25 ng/mL RANKL (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)および 10 ng/mL M-CSF 存在下で 7 日間培養した。RAW264.7 細胞は 5×10^3 cells/mL となるよう調整し 96 well plate に 150 μ L ずつ播種した後、25 ng/mL RANKL および 10 ng/mL M-CSF 存在下で 4 日間培養した。培養期間中、リコンビナントヒト ANG (rhANG; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を BMM には 0, 0.25, 0.5 μ g/mL, RAW264.7 細胞には 0, 0.5, 1.0 μ g/mL の濃度で添加した。破骨細胞は、Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) 染色キット (Sigma-Aldrich) を用いて染色を行った。TRAP 陽性細胞のうち 3 核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。細胞は Nikon Microphot FX (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて観察・撮影した。各実験は独立して 3 回繰り返し、再現性を確認した。

4. ウェスタンブロット法

細胞を Phosphate-buffered saline (PBS) で洗浄後回収し、ホスファターゼ阻害剤カクテル (Nacalai Tesque) を添加した RIPA Lysis Buffer System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) に懸濁した。タンパク質濃度は DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories) により定量し、調整後、10 μ g のタンパク質を Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels (Bio-Rad Laboratories) にて分離し、Trans-Blot® Turbo™ PVDF Transfer Pack (Bio-Rad Laboratories) へ転写した。PVDF 膜を 5%スキムミルク含有 Tris-Buffered Saline with Tween 20 (以下、TBS-T) で 1 時間ブロッキングを行い、一次抗体 (1:1000 希釈) と 4°Cで一晩反応させた。翌日、TBS-T で洗浄後、二次抗体 (1:1000 希釈) を室温で 2 時間反応させた。検出は Immobilon® Forte Western HRP Substrate (MilliporeSigma) を用いた化学発光法で行った。各実験は独立して 3 回繰り返し、再現性を確認した。

5. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) 解析

TriReagent (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, USA) により全 RNA を抽出し, PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio, Shiga, Japan) により逆転写を行った. qPCR 解析は Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) を用いて One Step Plus (Thermo Fisher Scientific) により実施した. 相対的 mRNA 発現量は β -actin を内因性コントロールとして, $\Delta\Delta C_t$ 法により算出した. qPCR に用いたプライマー配列は表 1 に示す. 各実験は独立して 3 回繰り返し, 再現性を確認した.

6. small interfering PLXNB2 (siPLXNB2) トランスフェクション

RAW264.7 細胞を 6 well plate に播種し, 翌日 3.75 μ L Lipofectamine® 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific), 2.5 μ L siPLXNB2 RNAi (Thermo Fisher Scientific, 5'-CCGCACGACAAU GGUAUCAUCGUGA-3') を溶解した 500 μ L Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) に置換し 3 時間培養した. その後 10% FBS 添加 α -MEM に置換し, 14 時間培養した. コントロール (siCtrl) は 3.75 μ L Lipofectamine® 3000 Reagent (Thermo Fisher Scientific) を溶解した 500 μ L Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) で同様の処理を行ったものとした.

7. short hairpin ANG (shANG) トランスフェクション

本研究は, 岡山大学組み換え DNA 実験安全管理委員会承認 (承認番号: 24168) のもと実施した. 表 2 に示すレンチウイルスベクターを, 50 μ L 大腸菌 (*Escherichia coli*, E.coli DH5 α 株; TOYOBO, Osaka, Japan) にプラスミド 3 μ L を混和し, 氷上にて 30 分インキュベートした. 42°C で 2 分加熱し, LB 培地 (Thermo Fisher Scientific) を 300 μ L 加えて 37°C で 1 時間インキュベートした. その後 100 μ g/mL ampicillin (Sigma-Aldrich) 添加 LB 寒天培地 (Thermo Fisher Scientific) に播種し, 翌日コロニーをピックアップすることでシングルクローン化した. ピックアップしたコロニーを LB 培地で 18 時間培養し, Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Venlo, The Netherlands) にてプラスミドを回収した. HEK293T 細胞を 4×10^5 cells で 60 mm dish に播種し, ベクターおよびパッケージングベクター (pMDLg/pRRE, pRSV-Rev, VSVG; Addgene, Watertown, MA, USA) を PEI-MAX (Polysciences, Warrington, PA, USA) を用いてトランスフェクションした. 24 時間後に培地を交換し, さらに 24 時間後と 48 時間後に培養上清を回収した. 回収した培地を 0.45 μ m のフィルターに通し, Lenti-X GOSTix plus (Takara Bio) にてウイルス生成を確認した. その後, 8 μ g/mL 臭化ヘキサジメトリン (Sigma-Aldrich) とウイルス液 2 mL を混合し, MOC2 細胞に添加し, 1200 $\times$ g で 1 時間プレート遠心を行った. 翌日培地を通常に戻し, 2 μ g/mL puromycin (Thermo Fisher Scientific) を用いセクションを 4 日間行った. 形質導入の陰性対照として shCtrl ベクターを使用した. shANG 導入について qPCR, 蛍光免疫染色にて確認した. 各実験は独立して 3 回繰り返し, 再現性を確認した.

8. 免疫蛍光染色

shCtrl および shANG トランスフェクションを行った MOC2 細胞をカバーガラス上に播種し、一日培養を行った。カバーガラスを PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde (以下, PFA) にて 10 分間固定した。PBS で洗浄し、氷上で 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) を 2 分間処理した。PBS で洗浄後、5% BSA (Nacalai Tesque) にて 2 時間ブロッキングを行った。一次抗体 (1:200 希釈) と 4°C で一晩反応させた。翌日 PBS で洗浄後、二次抗体 (1:200 希釈) を室温で 2 時間反応させた。SlowFade™ Glass Soft-set Antifade Mountant, with DAPI (Thermo Fisher Scientific) により核染色し、封入を行った。All-in-one Fluorescence Microscope BZ-X 810 (KEYENCE, Osaka, Japan) を用いて撮影した。各実験は独立して 3 回繰り返し、画像データについては 3 回のうち最も代表的なものを掲載した。

9. MOC2 conditioned medium (CM) の作製と CM による破骨細胞形成

MOC2 細胞を 35 mm dish に 6.5×10^4 cells で播種し、2 日間培養した。得られた CM を回収し、RAW264.7 細胞を用いた破骨細胞分化系に最終濃度 7% となるよう添加し、4 日間培養後 TRAP 染色を行った。各実験は独立して 3 回繰り返し、再現性を確認した。

10. マウス OSCC 移植モデルの作製とマイクロ CT および組織学的解析

本研究は、岡山大学動物実験委員会承認 (承認番号: OKU-2025462) のもと実施した。shCtrl および shANG MOC2 細胞をそれぞれ C57BL/6J 雄マウス (7 週齢) の片側咬筋内に 1.0×10^4 cells を Hank's Balanced Salt Solution (Thermo Fisher Scientific) で懸濁し注入した。生着後 2 週間飼育した後、頭部を摘出し、4% PFA にて 2 週間浸漬固定を行った。固定後、マウス頭部組織をマイクロ CT (Latheta LCT-200, ALOKA, Tokyo, Japan) にて撮影を行った。撮影後の DICOM データを 3D Slicer (version 5.8.1; 3D Slicer community, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA, USA) にて stl データに変換し、Blender (Blender Foundation, Amsterdam, Netherlands) にて 3D 構築した。その後、組織切片作成のため、マウス頭部組織を 10% EDTA・2Na 液 (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) に 2 週間浸漬し、脱灰を行い、前頭断のパラフィン切片を作製した。作製した切片は TRAP 染色を行い、All-in-one Fluorescence Microscope BZ-X 700 (KEYENCE) を用いて撮影した。各実験は独立して 3 回繰り返し、画像データについては 3 回のうち最も代表的なものを掲載した。

11. 統計学的解析

データは平均値 $\pm$ SD で表した。統計的有意差は EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を使用した一元配置分散分析 (one-way ANOVA) にて判定した。2 群間の比較は Turkey 法にて解析し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. ANG は RANKL による破骨細胞形成を増強する

ANG の破骨細胞形成における影響を検討するため、BMM を用いた RANKL 誘導破骨細胞形成系に rhANG を添加した。RANKL 非存在下では TRAP 陽性多核細胞の形成はほとんど認められなかったが、RANKL 存在下では rhANG 添加量に依存して TRAP 陽性多核細胞数が有意に増加した (図 1-A) 。 具体的には、0.25 $\mu\text{g/mL}$ rhANG でコントロールの 3.0 倍、0.5 $\mu\text{g/mL}$ rhANG で 5.0 倍の TRAP 陽性細胞を認めた (図 1-B) 。 また、RAW264.7 細胞においても BMM と同様に rhANG により破骨細胞形成が促進され、0.5 $\mu\text{g/mL}$ rhANG でコントロールの 2.1 倍、1.0 $\mu\text{g/mL}$ rhANG で 2.3 倍の TRAP 陽性細胞を認めた (図 1-C, D) 。 以上の結果から、ANG は RANKL による破骨細胞分化を増強する因子であることが示唆された。

2. ANG は破骨細胞分化シグナル経路を活性化する

ANG が破骨細胞分化を増強するメカニズムを明らかにするため、RANKL により誘導される細胞内シグナル伝達への影響をウェスタンブロット法により解析した。ANG 非存在下において RANKL 刺激により $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解および $\text{p38} \cdot \text{ERK}$ のリン酸化が誘導されたが、rhANG を前処理した細胞ではこれらの変化がいずれも増強された (図 2) 。 以上の結果より、ANG は RANKL 関連シグナル伝達をさらに誘導し、破骨細胞分化を促進することが示唆された。

3. ANG は RANK の発現を誘導する

ANG が RANKL により誘導されるシグナルを増強することから、RANKL の受容体である RANK の発現に対する ANG の役割について検討を行った。RAW264.7 細胞に rhANG を添加し 24 時間培養したところ、濃度依存的に RANK の発現を遺伝子レベルから誘導した (図 3-A, B) 。 また、RANK 発現には $\text{NF-}\kappa\text{B}$, ERK, Akt 経路の関与が報告されているため²¹⁻²³⁾、これらの経路における ANG の作用を検討した。その結果、ANG が $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ の分解や ERK, Akt のリン酸化を誘導することが明らかとなった (図 3-C) 。 以上より、ANG はこれらのシグナルを介して RANK 発現を誘導し、RANKL に対する感受性を高めることで破骨細胞形成を促進することが示唆された。

4. ANG による破骨細胞誘導作用は PLXNB2 を介する

ANG による破骨細胞形成誘導が PLXNB2 を介するか検討するため、Raw264.7 細胞に Ctrl および PLXNB2 siRNA を導入し、RANKL による破骨細胞形成を行った。siCtrl 細胞においては、RANKL により破骨細胞形成が誘導され、さらに ANG 処理では大型の破骨細胞形成が認められ (図 4-A 上段) 、 その数も増加していた (図 4-B) 。 一方 siPLXNB2 細胞では RANKL により破骨細胞形成が誘導されるものの、ANG によるさらなる破骨細胞形成誘導は認められなかった (図 4-A 下段, B) 。 以上より、ANG による破骨細胞形成誘導は PLXNB2 を介することが示唆された。

5. OSCC 由来 ANG は RANK 発現を誘導し破骨細胞形成を促進する

OSCC 由来 ANG の破骨細胞形成への役割を検討するために、MOC2 細胞を用いて、恒常的に ANG の発現を抑制した shANG 細胞および対照群となる shCtrl 細胞を樹立した。qPCR により shANG 細胞では ANG mRNA 発現が shCtrl 細胞と比較して約 90% 抑制されていた (図 5-A)。免疫蛍光染色においても shANG 細胞における ANG の蛍光強度の低下を認めた (図 5-B)。腫瘍由来 ANG の破骨細胞形成における役割を検討するために、shCtrl 細胞および shANG 細胞の CM を回収し、RAW264.7 細胞の破骨細胞分化系に添加した。その結果、shCtrl CM は破骨細胞形成を 2.9 倍に促進した一方で、shANG CM は 1.7 倍の促進にとどまり、shCtrl CM と比較して有意に低値であった (図 5-C,D)。また、RAW264.7 細胞にそれぞれの CM を添加し、RANK の発現を検討したところ、shCtrl CM は 3.0 倍の発現誘導を示した一方で、CM は 1.6 倍にとどまり、有意に低値であった (図 5-E)。これらの結果より、OSCC 由来 ANG が RANK 発現を誘導し、破骨細胞分化を促進することが示された。

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する

OSCC の骨破壊に対する ANG の影響を調べるため、マウス咬筋に shCtrl または shANG 細胞を移植したマウス OSCC 移植モデルを作製し、組織学的解析および X 線学的解析を行った (図 6-A)。その結果、shCtrl 細胞移植部では大型の TRAP 陽性の多核の細胞を多く認め、骨吸収像も顕著に認められた。一方、shANG 細胞移植部では TRAP 陽性細胞は認められるものの、shCtrl 細胞移植部と比較してそのサイズは小さく、顕著な骨吸収像も認められなかった (図 6-B,C)。さらに、マイクロ CT 解析では、shCtrl 細胞移植部において虫食い状の広範な骨破壊が認められたのに対し、shANG 細胞移植部では、骨破壊が明らかに抑制されていた (図 6-D)。

考 察

本研究では、OSCC 細胞由来の ANG が破骨細胞分化を促進し、顎骨浸潤を増強することを明らかにした。また、OSCC 由来 ANG は破骨細胞前駆細胞において、PLXNB2 を介して RANK の発現を誘導し、RANKL に対する感受性を高め、RANKL 依存的な破骨細胞分化を促進することが明らかとなった。さらに *in vivo* のマウス OSCC 移植モデルにおいても ANG ノックダウン腫瘍移植部では TRAP 陽性破骨細胞と骨破壊が顕著に減少し、腫瘍細胞由来 ANG が骨破壊の促進因子として作用していることが明らかとなった。以上より、ANG は、顎骨浸潤能を示す OSCC に対する治療の分子標的となると考えられる。

先行研究において、ANG が腫瘍細胞や血管内皮細胞において ERK や Akt を活性化し、細胞増殖や血管新生を促進することが報告されているが¹¹⁻¹³⁾、ANG が破骨細胞分化に直接作用し RANKL シグナルを増強させることで腫瘍による骨破壊に関与する役割を示唆した研究は、これまで報告されていない。Aoki らは ANG による破骨細胞誘導を示しているが²⁰⁾、

本研究においてはその詳細な機序として、RANK–RANKL シグナルを ANG が増強している点を分子レベルで明らかにした。特に、ANG が RANK の発現を誘導するという知見は、RANK の感受性を増強する新たな機構であり、PTHrP や IL-6 など既知の腫瘍性破骨促進因子とは一線を画す特徴を示す。そして、PLXNB2 ノックダウンにより ANG の破骨促進作用が消失したことから、破骨細胞前駆細胞においても ANG–PLXNB2 シグナル軸が機能することを初めて実証した。

本研究では、ANG 刺激により破骨細胞前駆細胞において NF- κ B, ERK, Akt の活性化が認められた。これらのシグナル経路は、破骨細胞前駆細胞における RANK 発現を誘導し、RANKL に対する感受性を高めることが報告されている²¹⁻²³⁾。本研究において ANG 刺激により RANK 発現が濃度依存的に上昇していたことから (図 3-A, B), ANG により誘導されるこれらのシグナルの活性化は、RANK 発現を上昇させるための上流経路として機能していると考えられる。すなわち、RANKL シグナル伝達の起点となる RANK の発現量が増加することで、前駆細胞の RANKL 応答性が高まり、わずかな RANKL 刺激や生理学的な RANKL 濃度でも破骨細胞分化が惹起されやすい“高感受性状態”が形成されると推察される。これらの知見から、ANG は破骨細胞前駆細胞 RANKL 感受性を高める **priming factor** として作用する可能性が示唆される。さらに、腫瘍細胞由来 ANG が *in vivo* において強力な骨破壊促進作用を示した点は、腫瘍細胞が分泌する ANG が破骨細胞分化を増強する外因性因子として中核的な役割を果たしていることが示唆される。

OSCC はしばしば顎骨へ直接浸潤し重篤な骨破壊を生じるが、ANG は腫瘍細胞と周囲破骨細胞の両方に作用するため、ANG を標的とする治療は腫瘍増殖抑制のみならず骨破壊抑制も併せ持つ効果が期待できる。さらに、PLXNB2 阻害が破骨細胞における ANG の作用を特異的に阻害しうることから、従来のビスフォスフォネートや抗 RANKL 抗体といった骨吸収抑制薬とは異なる新規治療戦略として発展する可能性がある。また、OSCC 細胞における ANG 発現量が OSCC の骨浸潤リスクを反映する指標となり得る可能性も示唆される。将来的には、血清あるいは唾液中の ANG を、OSCC の病態・予後・治療応答性を反映し得るバイオマーカーとして応用できる可能性がある。

本研究では、破骨細胞系に対する ANG の作用を中心に解析したが、骨髄間質細胞、骨芽細胞、血管内皮細胞や免疫系細胞など、他の骨微小環境構成細胞に対する影響については十分に検討されていない。したがって、ANG の微小環境全体の包括的理解にはさらなる検討が必要である。また、ANG は PLXNB2 に加えて、Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) を認識することが報告されており²⁴⁾、破骨細胞においても PLXNB2 以外の受容体経路が作用している可能性がある。この点については、ANG の上流シグナルの詳細な解明が今後必要と考える。さらに、腫瘍微小環境においては IL-6, PTHrP, Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) のような複数の骨破壊誘導因子が存在しており^{25,26)}、これらとの相互作用の中で ANG がどの程度、貢献しているのかについては、より詳細な解析が必要と考える。加えて、*in vivo* 解析では MOC2 細胞を用いた単一の OSCC モデルでのみ解析しており、他の

OSCC 細胞株を用いた検証や患者検体を対象とした病理学的解析を行うことで、得られた知見の普遍性と臨床的妥当性をより高める必要がある。また、OSCC 細胞由来 ANG の骨浸潤促進作用が、腫瘍量そのものの差異とどの程度独立しているのかについても、より定量的な腫瘍体積補正解析や、骨に対する腫瘍接触面を揃えた条件下での解析が必要である。

本研究は、OSCC 由来 ANG が PLXNB2 を介して RANKL シグナルを増強し、破骨細胞分化と腫瘍による骨破壊を促進することから、ANG は腫瘍および周囲骨微小環境において骨破壊の中核を担う因子として作用することが明らかとなった。以上より、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。

結 論

OSCC 由来 ANG は PLXNB2 を介して破骨細胞分化を促進することで、OSCC による顎骨破壊病変を増悪させる可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、懇篤なるご指導とご校閲を賜りました岡山大学学術研究院歯薬学域口腔顎顔面外科学分野伊原木聡一郎教授に深甚なる感謝の意を表します。また、懇切なるご校閲と本研究の遂行に際しご指導いただきました岡山大学学術研究院歯薬学域口腔形態学分野岡村裕彦教授、岡山大学学術研究院歯薬学域口腔機能解剖学分野寺町順平准教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、本研究に際し多くのご配慮、ご助言をいただきました岡山大学学術研究院歯薬学域口腔形態学分野の池亀美華准教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Hong WJ, Shieh LT, Yen CY, Lin CY, Chang MT, Yu HC, et al. The significance of the depth of invasion and tumor size in resected pathologic T4a gingivobuccal squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2025;15 (1) :14618.
2. van der Lely JN, Chin D, van der Lubbe LMH, Tonsbeek AM, Verduijn GM, Hundepool CA, et al. Long-term health-related quality of life following segmental mandibulectomy and osseous reconstruction. *Oral Oncol.* 2025;170:107762.
3. Park JH, Lee NK, Lee SY. Current Understanding of RANK Signaling in Osteoclast Differentiation and Maturation. *Mol Cells.* 2017;40 (10) :706-13.
4. Wang M, Xia F, Wei Y, Wei X. Molecular mechanisms and clinical management of cancer bone metastasis. *Bone Res.* 2020;8 (1) :30.
5. Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Ruger R. Molecular Mechanisms of Bone

Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016;13 (1) :1-12.

6. Yoshida S, Shimo T, Murase Y, Takabatake K, Kishimoto K, Ibaragi S, et al. The Prognostic Implications of Bone Invasion in Gingival Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res*. 2018;38 (2) :955-62.
7. Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al. Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry*. 1985;24 (20) :5480-6.
8. Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, et al. Amino acid sequence of human tumor derived angiogenin. *Biochemistry*. 1985;24 (20) :5486-94.
9. Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol*. 2003;4 (3) :269-73.
10. Li S, Hu GF. Emerging role of angiogenin in stress response and cell survival under adverse conditions. *J Cell Physiol*. 2012;227 (7) :2822-6.
11. Yu W, Goncalves KA, Li S, Kishikawa H, Sun G, Yang H, et al. Plexin-B2 Mediates Physiologic and Pathologic Functions of Angiogenin. *Cell*. 2017;171 (4) :849-64 e25.
12. Liu X, Chai Y, Liu G, Su W, Guo Q, Lv X, et al. Osteoclasts protect bone blood vessels against senescence through the angiogenin/plexin-B2 axis. *Nat Commun*. 2021;12 (1) :1832.
13. Toledano S, Neufeld G. Plexins as Regulators of Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasivity. *Cancers*. 2023;15 (16) .
14. Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Yoshioka N, Okui T, Hu GF, et al. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. *Oral Oncol*. 2012;48 (11) :1120-7.
15. Wang J, Shan A, Shi F, Zheng Q. Molecular and clinical characterization of ANG expression in gliomas and its association with tumor-related immune response. *Front Med*. 2023;10:1044402.
16. Yu D, Cai Y, Zhou W, Sheng J, Xu Z. The Potential of Angiogenin as a Serum Biomarker for Diseases: Systematic Review and Meta-Analysis. *Dis Markers*. 2018;2018:1984718.
17. Sheng J, Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2016;48 (5) :399-410.
18. Li S, Shi X, Chen M, Xu N, Sun D, Bai R, et al. Angiogenin promotes colorectal cancer metastasis via tiRNA production. *Int J Cancer*. 2019;145 (5) :1395-407.
19. Yang H, Yuan L, Ibaragi S, Li S, Shapiro R, Vanli N, et al. Angiogenin and plexin-B2 axis promotes glioblastoma progression by enhancing invasion, vascular association, proliferation and survival. *Br J Cancer*. 2022;127 (3) :422-35.

20. Aoki K, Yoshitani N, Kurio N, Yoshioka N, Teramachi J, Ikegame M, et al. Angiogenin-induced Osteoclastogenesis Mediates Bone Destruction in Oral Squamous Carcinoma. *Anticancer Res.* 2025;45 (3) :1025-33.
21. Cao H, Zhu K, Qiu L, Li S, Niu H, Hao M, et al. Critical role of AKT protein in myeloma-induced osteoclast formation and osteolysis. *J Biol Chem.* 2013;288 (42) :30399-410.
22. Oh JH, Lee NK. Up-Regulation of RANK Expression via ERK1/2 by Insulin Contributes to the Enhancement of Osteoclast Differentiation. *Mol Cells.* 2017;40 (5) :371-7.
23. Luo G, Li F, Li X, Wang ZG, Zhang B. TNF-alpha and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF-kappaB pathway. *Mol Med Rep.* 2018;17 (5) :6605-11.
24. Wang YN, Lee HH, Chou CK, Yang WH, Wei Y, Chen CT, et al. Angiogenin/Ribonuclease 5 Is an EGFR Ligand and a Serum Biomarker for Erlotinib Sensitivity in Pancreatic Cancer. *Cancer Cell.* 2018;33 (4) :752-69 e8.
25. Tang CH, Chuang JY, Fong YC, Maa MC, Way TD, Hung CH. Bone-derived SDF-1 stimulates IL-6 release via CXCR4, ERK and NF-kappaB pathways and promotes osteoclastogenesis in human oral cancer cells. *Carcinogenesis.* 2008;29 (8) :1483-92.
26. Diamond P, Labrinidis A, Martin SK, Farrugia AN, Gronthos S, To LB, et al. Targeted disruption of the CXCL12/CXCR4 axis inhibits osteolysis in a murine model of myeloma-associated bone loss. *J Bone Miner Res.* 2009;24 (7) :1150-61.

脚注

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
(指導：伊原本聰一郎教授)

図の説明

図 1. ANG による破骨細胞形成促進効果

(A) BMM を RANKL (50 ng/mL) 存在下で培養し, rhANG (0, 0.25, 0.5 µg/mL) を添加して 7 日間培養した後, TRAP 染色を行った (スケールバー : 200 µm) . 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (B) 3 核以上の TRAP 陽性破骨細胞数を計測した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (C) RAW264.7 細胞を RANKL (25 ng/mL) 存在下で培養し, rhANG (0, 0.25, 0.5 µg/mL) を添加して 4 日間培養した後, TRAP 染色を行った (スケールバー : 200 µm) . 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (D) RAW264.7 細胞由来の 3 核以上の TRAP 陽性細胞を計測した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載.

図 2. ANG による破骨細胞分化シグナル経路の活性化

RAW264.7 細胞を rhANG (1.0 $\mu\text{g/mL}$) で 24 時間前処理した後, RANKL (25 ng/mL) を 0, 5, 10, 15 分間刺激し, 細胞から蛋白質を抽出した. 抽出した蛋白質を SDS-PAGE 後, I κ B α , p-ERK, ERK, p-p38, p38 に対する抗体でウエスタンブロットを行った. GAPDH はローディングコントロールとして用いた. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載.

図 3. ANG による RANK 発現誘導と下流シグナルの活性化

(A) RAW264.7 細胞に rhANG (0, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/mL}$) を添加し, 24 時間後に *Rank* mRNA 発現を qPCR で解析した. 発現量は β -actin で正規化した. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (B) 同条件で蛋白質を抽出し, SDS-PAGE 後, RANK 抗体を用いてウエスタンブロットを行った. GAPDH をローディングコントロールとした. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (C) RAW264.7 細胞に rhANG (1.0 $\mu\text{g/mL}$) を添加し, 0, 5, 10, 15 分で蛋白質を抽出し, SDS-PAGE 後, I κ B α , p-ERK, ERK, p-Akt, Akt に対する抗体を用いてウエスタンブロットを行った. GAPDH をローディングコントロールとした各群. N=3. 代表的な結果を掲載.

図 4. PLXNB2 ノックダウンによる ANG 依存的破骨細胞形成の抑制

(A) siCtrl または siPLXNB2 を導入した RAW264.7 細胞を RANKL (25 ng/mL) および rhANG (1.0 $\mu\text{g/mL}$) を添加し, 4 日後に TRAP 染色を行った (スケールバー: 200 μm). (B) 3 核以上の TRAP 陽性細胞数を計測した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載.

図 5. MOC2 細胞由来 ANG の破骨細胞形成への貢献

(A) shCtrl および shANG 導入 MOC2 細胞の *Ang* mRNA 発現を qPCR で解析した. 発現量は β -actin で正規化した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (B) 同細胞に対し ANG に対する免疫蛍光染色を行った. 赤: ANG, 青: DAPI (スケールバー: 100 μm). 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (C) RAW264.7 細胞を用いた RANKL 誘導破骨細胞分化系に, shCtrl CM または shANG CM を添加し, 4 日後に TRAP 染色を行った (スケールバー: 200 μm). 各群 N=3. (D) 3 核以上の TRAP 陽性細胞数を計測した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載. (E) RAW264.7 細胞に shCtrl CM または shANG CM を添加し 24 時間培養後, *Rank* mRNA 発現を qPCR で解析した. 発現量は β -actin で正規化した. *は $P < 0.05$ を示す. 各群 N=3. 代表的な結果を掲載.

図 6. マウス OSCC 移植モデルにおける腫瘍由来 ANG の骨破壊促進作用

(A) MOC2 shCtrl 細胞および shANG 細胞を咬筋内に移植した OSCC マウスモデルの概念図. (B) 移植部の頭部前頭断パラフィン切片に TRAP 染色を行った全体像 (スケールバー: 250 μm). 各群 N=5. 代表的な結果を掲載. (C) 図 B の黒枠部分の拡大像. 腫瘍 (Tumor) と骨 (Bone) の境界を破線で示した (スケールバー: 40 μm). 各群 N=5. 代表的な結果を掲

載. (D) マイクロ CT 画像の 3D 再構築像. 赤矢頭は顎骨の骨破壊部位を示す. 各群 N=5.
代表的な結果を掲載.

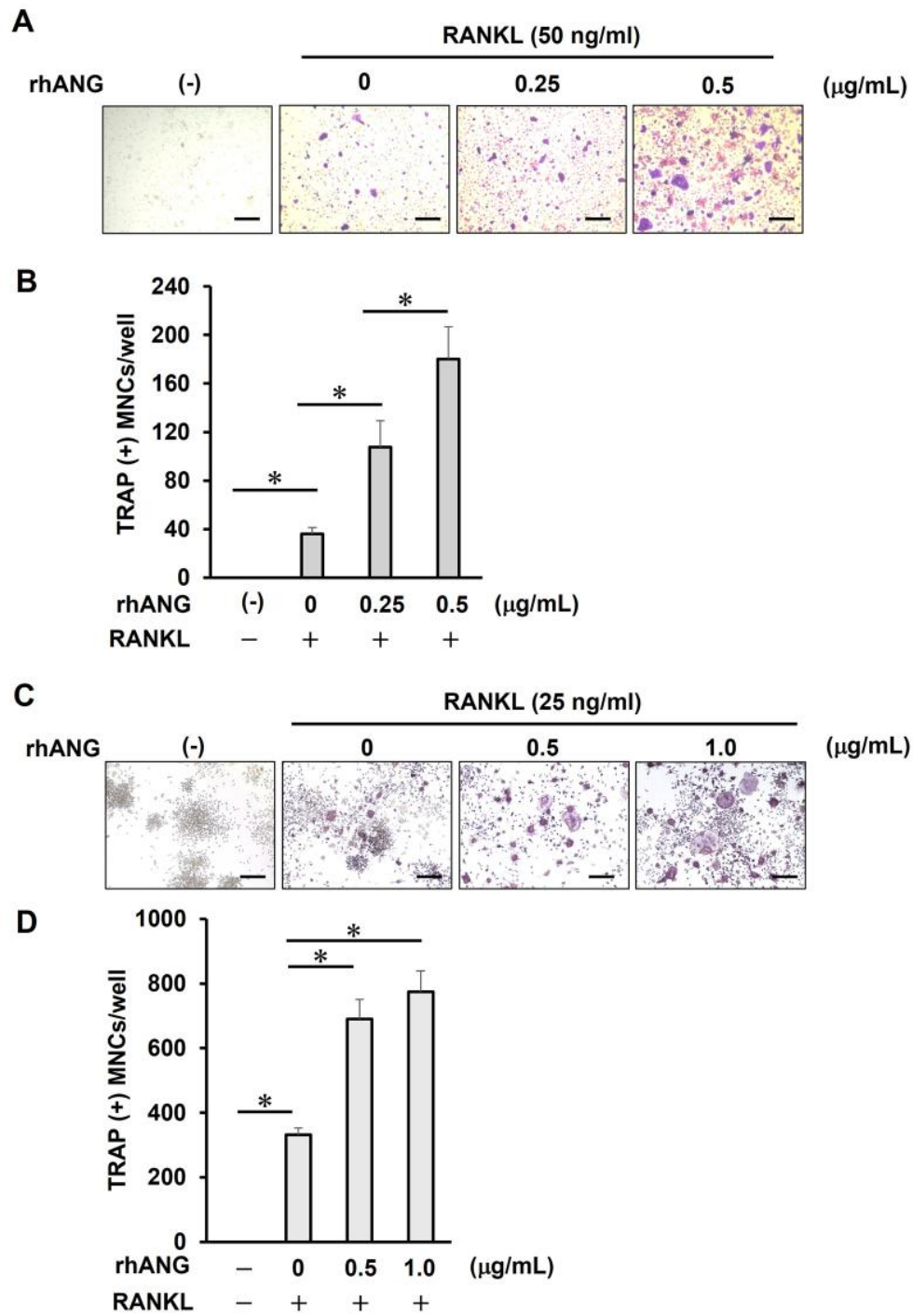


图2

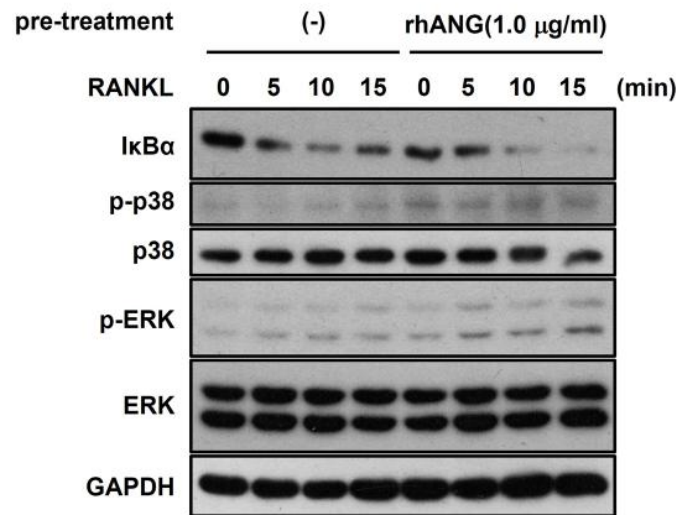
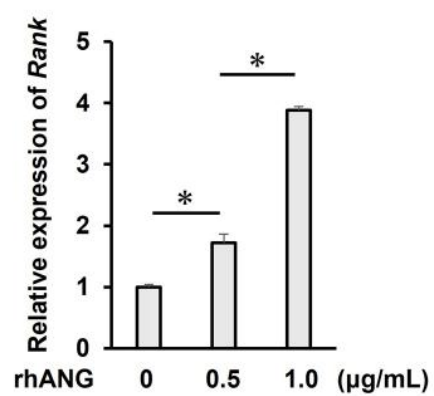
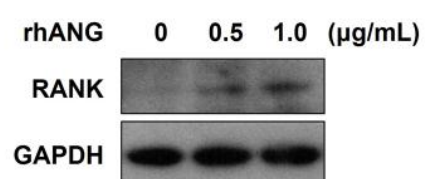


图3

A



B



C

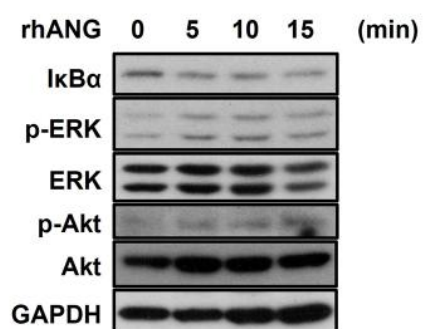
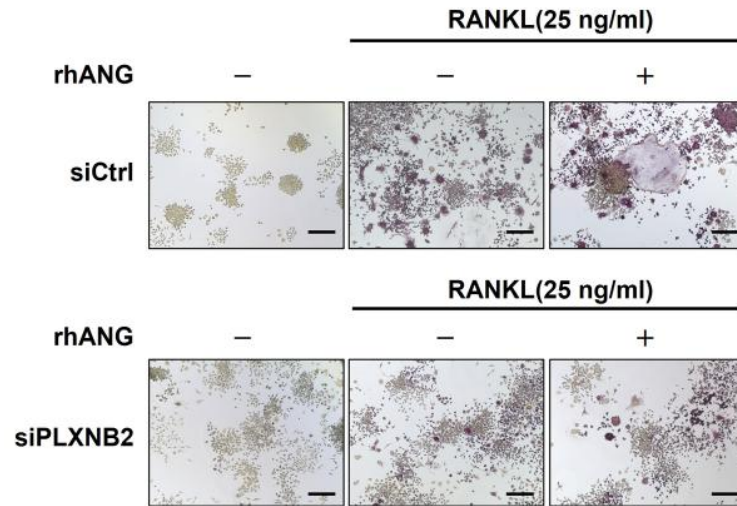


图4

A



B

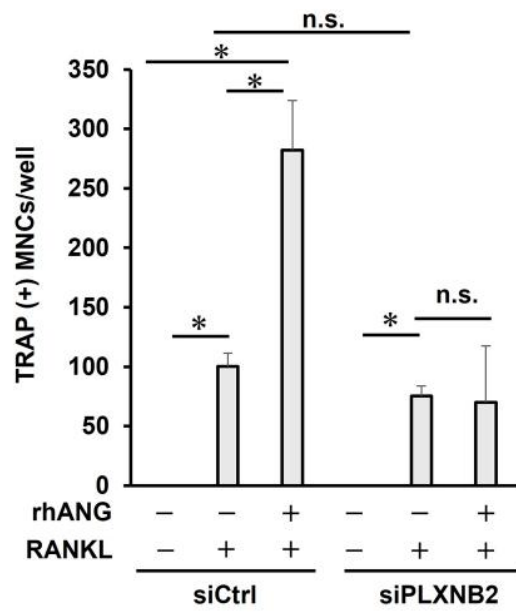


图5

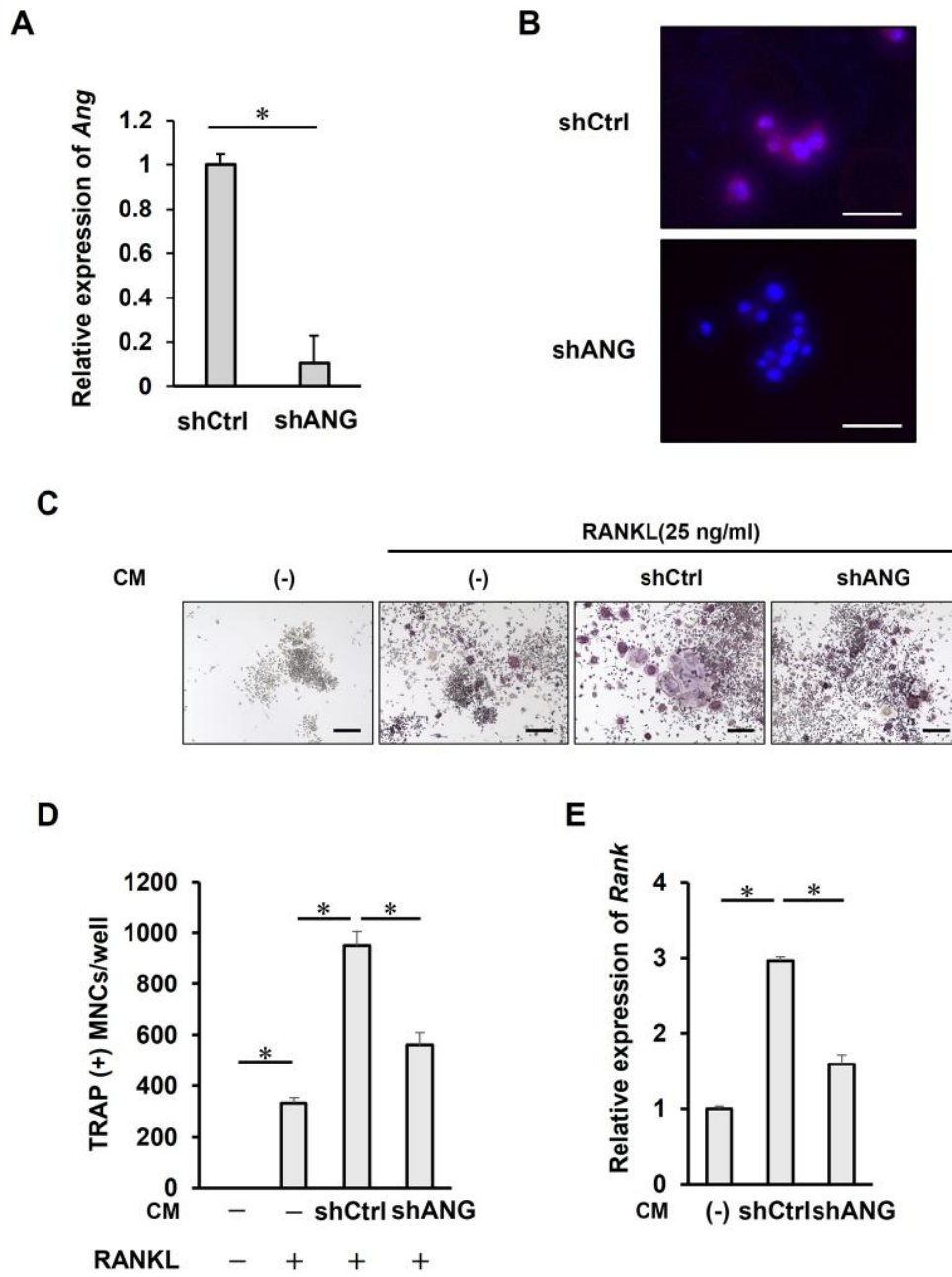


图6

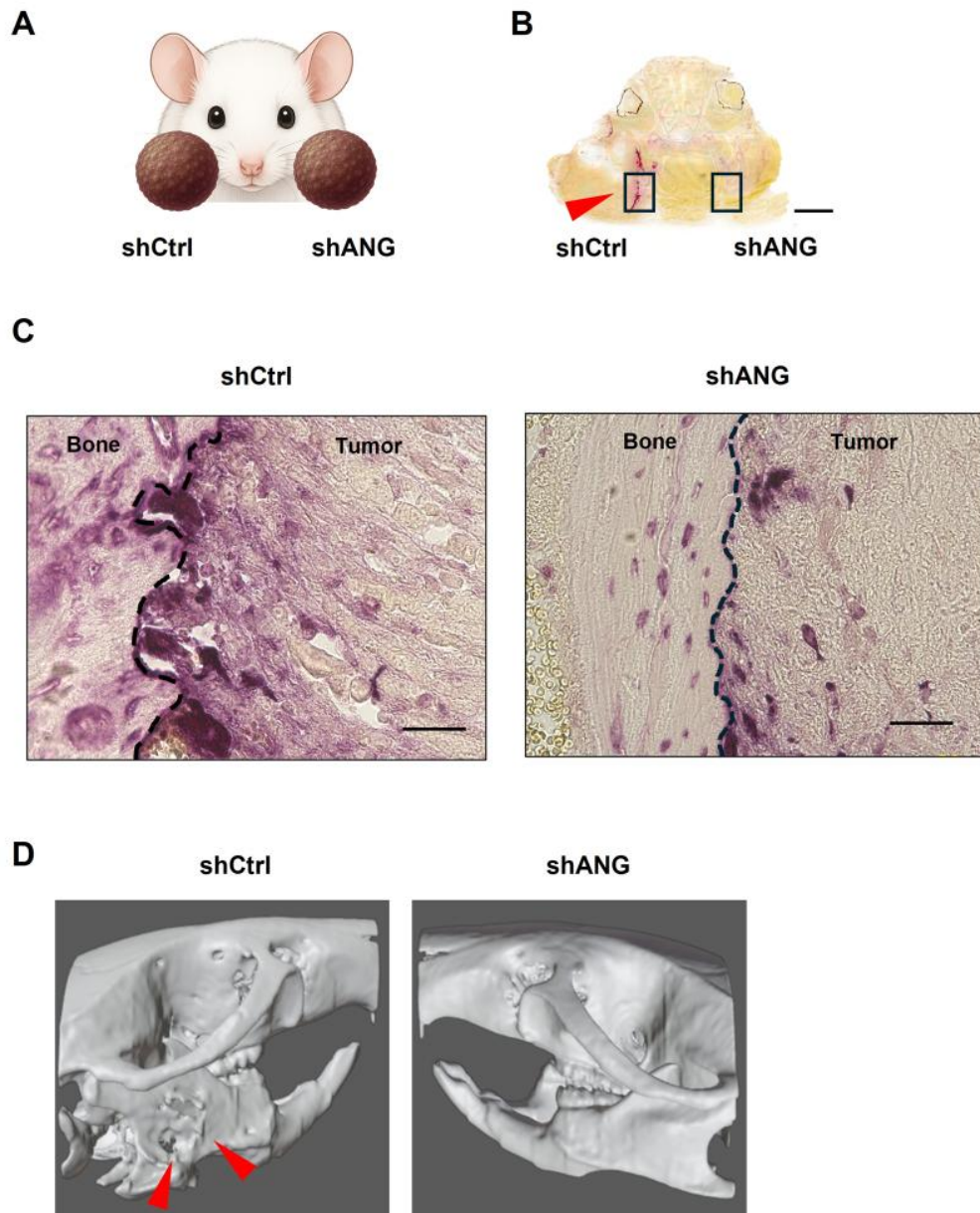


表1

gene	accession number	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
mouse Rank	NM_009399.5	CGGAGCTCAGCATCCCTC	CCCCTGGTGTGCTTCTAGC
mouse Ang	NM_001161731.3	AAAGCTGCCGCCTCCAGTT	TTTGGCTTGGCGTCATGGT
mouse β -actin	NM_007393.5	GAGAAGATCTGGCACCACACC	GCATACAGGGACAGCACAGC

表2

