

## 論文要旨等報告書

氏	奥井 達雄
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 4 3 3 8 号
学位授与の日付	平成 2 3 年 3 月 2 5 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)
学位論文題名	Antitumor Effect of Temsirolimus against Oral Squamous Cell Carcinoma Associated with Bone Destruction (骨破壊を誘導する口腔扁平上皮癌に対するテムシロリムスの効果の検討)
論文審査委員	教授 長塚 仁 教授 佐々木 朗 准教授 高木 慎

### 学位論文内容の要旨

#### 緒言

口腔癌、前立腺癌、乳癌などで頻繁に認められる癌骨破壊は、癌細胞による骨芽細胞、破骨細胞の活性化により誘導される。癌細胞が産生する PTHrP(Parathyroid hormone-related Peptid:副甲状腺ホルモン関連蛋白)などの破骨細胞誘導因子は骨芽細胞の RANKL( Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand )発現を上昇させることにより破骨細胞形成を誘導し、骨吸収を活発化させる。Mammalian Target of Rapamycin(mTOR)は約 290kDa の phosphatidylinositol 3-related kinase ファミリーのリン酸化酵素で、翻訳の制御を介し細胞の生存、増殖を調整している。mTOR は種々の癌腫において高発現しており、癌細胞の生存、増殖を促進することが報告されている。また近年、mTOR は骨破壊の主導的な役割を持つ破骨細胞の分化、成熟に促進的な影響を持つ事が報告されており、癌に誘発される骨浸潤、骨破壊に対する有効な分子標的として期待されている。しかし口腔扁平上皮癌の骨浸潤、骨破壊における mTOR の役割、mTOR 阻害薬による抗腫瘍効果の検討は行われていない。そこで我々は、新規 mTOR 阻害薬 Temsirolimus を用い、口腔扁平上皮癌細胞による癌骨破壊に対する効果を検討した。

#### 材料と方法

mTOR 阻害薬は Temsirolimus ( TORISEL® ) : ( Wyeth Pharmaceuticals より購入 ) を使用した。口腔扁平上皮癌細胞株は HSC-2 細胞ならびに SAS 細胞を使用した。破骨細胞前駆細胞として RAW264.7 細胞ならびに 4 週齢 C57 Black マウス大腿骨の骨髓細胞よりソーティングした CD11b 陽性細胞を使用した。支持細胞としてマウス骨髓間質細胞 ST2 を使用した。細胞増殖能は MTS assay にて評価を行った。タンパク発現は western blot 法にて評価を行った。Temsirolimus の破骨細胞形成に対する影響について TRAP (tartarate-resistant acid phosphatase) 染色を行い評価した。破骨細胞の骨吸収活性に対する Temsirolimus の影響について骨基質シャーレの吸収窩面積を測定し評価した。Temsirolimus の軟組織腫瘍増殖に対する影響については、4 週齢 BALBc-nu/nu マウス背部皮下に HSC-2 細胞を移植し作製したモデルに対し、Temsirolimus を投与し評価した。腫瘍細胞と破骨細胞の相互作用により誘導される骨髓腔内での腫瘍増殖、骨破壊に対する Temsirolimus の影響を評価するため、4 週齢 BALBcnu/nu マウス大腿骨骨髓内に HSC-2 細胞を移植し作製したモデルに対して Temsirolimus を投与し、組織化学的、X 線学的に検討を行った。全身的な骨吸収に対する Temsirolimus の影響を評価するため C57black マウス背部皮下に PTHrP 含有薬剤徐放性ポンプを留置し作製した高カルシウム血症マウスに対し Temsirolimus を投与し、血中カルシウム濃度、体重を測定し評価を行った。

## **結果と考察**

### **口腔扁平上皮癌の増殖能に対する Temsirolimus の影響**

口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2、SAS)に対し、Temsirolimus は濃度依存的に増殖を抑制した。また western blot 法により mTOR、Akt、S6 のリン酸化が Temsirolimus 濃度依存的に抑制されることを確認した。HSC-2 細胞の皮下移植モデルにおいて、Temsirolimus 投与群では control 群と比較し有意に腫瘍体積の抑制が認められた。これらの in vivo、in vitro における癌細胞の増殖抑制は、mTOR を介した Akt、S6 といった増殖シグナル関連タンパクのリン酸化を Temsirolimus が抑制することにより誘導されると考えられた。

### **破骨細胞の分化、骨吸収活性に対する Temsirolimus の影響**

western blot 法より Temsirolimus は破骨細胞前駆細胞における mTOR ならびに  $I\kappa B\alpha$  のリン酸化を濃度依存的に抑制することが確認された。また Temsirolimus は破骨細胞形成を濃度依存的に抑制し、破骨細胞の骨基質シャーレにおける骨吸収活性を濃度依存的に抑制した。これは破骨細胞前駆細胞における RANKL- $NF\kappa\beta$  シグナルの活性化を Temsirolimus が mTOR 阻害を介し抑制した事を示唆する。

### **骨芽細胞と破骨細胞の相互作用により誘導される高カルシウム血症に対する Temsirolimus の影響**

癌細胞が産生する PTHrP は骨芽細胞の RANKL 発現を介し、破骨細胞形成を誘導する。PTHrP による高カルシウム血症モデルマウスにおいて Temsirolimus 投与群では control 群と比較し有意に血中カルシウム濃度の上昇が抑制された。また Temsirolimus は骨髄間質細胞 ST2 の PTHrP による RANKL 発現を濃度依存的に抑制すると同時に、RANKL の decoy receptor である OPG の発現を上昇させることが western blot 法ならびに RT-PCR 法にて確認された。以上の結果より、高カルシウム血症モデルマウスにおける血清カルシウムの是正は Temsirolimus による RANKL 発現抑制ならびに OPG の発現増強によっておこる事が示唆された。

### **マウス大腿骨骨髓腔内腫瘍細胞移植モデルに対する Temsirolimus の影響**

癌骨破壊モデルマウスに対し Temsirolimus を投与すると control 群と比較し、有意に骨髓腔内での癌細胞の増殖ならびに骨破壊が抑制された。この結果は mTOR 阻害による癌細胞の直接的な増殖抑制と、骨芽細胞を介した破骨細胞誘導の抑制という二つの異なる効果から引き起こされると考察された。

結果より Temsirolimus による mTOR 阻害が口腔癌骨破壊病変に対し以下の効果を持つ事が示された。

- ① 癌細胞の増殖抑制
- ② 骨芽細胞の破骨細胞誘導抑制 (RANKL 発現の抑制、OPG の発現増強)
- ③ 破骨細胞前駆細胞の成熟破骨細胞への分化抑制
- ④ 上記①②③の効果による動物実験での癌骨破壊の抑制

この見地は Temsirolimus による mTOR 阻害は癌細胞を直接的に抑制するだけでなく、同時に癌骨破壊を制御する新たな治療戦略となる可能性を示唆している。