

氏名	坂本 裕美		
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6368号		
学位授与の日付	令和3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	High-mobility group box 1 induces bone destruction associated with advanced oral squamous cancer via RAGE and TLR4 (High-mobility group box 1 は RAGE および TLR4 を介して進行口腔扁平上皮癌に関連する骨破壊を誘発する)		
論文審査委員	岡村 裕彦 教授	長塚 仁 教授	山本 直史 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

口腔扁平上皮癌は解剖学的特徴により高頻度に顎骨に浸潤するが、癌の骨浸潤、骨破壊は臨床的、予後左右する負の要因である。骨に浸潤した癌細胞は種々のサイトカインを分泌し、骨芽細胞を刺激して Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) を発現させ、破骨細胞形成と骨吸収活性を促進し、骨破壊を促す。破壊された骨組織から骨微小環境下に放出された増殖因子により癌細胞の増殖は促進する。このように骨微小環境では、破骨細胞による骨破壊と癌細胞の増殖が繰り返される負の連鎖が起こっている。High mobility group box 1 (HMGB1) は 25kDa の非ヒストン核タンパク質であり、種々の癌細胞に発現が亢進している。また、HMGB1 は骨のリモデリングへの関与が知られているが、癌の骨破壊における HMGB1 の役割は不明である。本研究では、口腔扁平上皮癌の骨破壊における HMGB1 の役割を検討した。

【方法・結果】

1) ヒト口腔扁平上皮癌における HMGB1 発現の検討

口腔扁平上皮癌患者の手術材料を用いて、HMGB1 の発現を免疫組織染色により検討した。正常組織部と比較し癌組織部で HMGB1 の発現が亢進していた。

2) ヒト口腔扁平上皮癌細胞株、骨代謝細胞における HMGB1 および HMGB1 受容体発現の検討

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株における HMGB1 の発現をウエスタンブロット法により検討したところ、SAS 細胞において高発現を認めた。また、破骨細胞前駆細胞 (RAW264.7 細胞株)、骨芽細胞様細胞 (OBC12)、骨細胞様細胞 (MLO-A5) において HMGB1 受容体である receptor for advanced glycation end products (RAGE)、toll-like receptor 4 (TLR4) の発現をウエスタンブロット法により検討した。RAW264.7 に TLR4 の発現、MLO-A5 に RAGE の発現を認めたが、OBC12 にはいずれの発現も認めなかった。

3) HMGB1 阻害がヒト口腔扁平上皮癌細胞株および骨代謝細胞の細胞増殖に与える影響

SAS, HSC-2, HSC-3 と RAW264.7, OBC12, MLO-A5 に HMGB1 中和抗体、RAGE アンタゴニスト (FPS-ZM1) および TLR4 アンタゴニスト (TAK-242) を各々添加し、HMGB1 阻害が細胞増殖に与える影響を検討した。HMGB1 高発現の SAS では HMGB1 中和抗体と FPS-ZM1 を添加すると細胞増殖が有意に抑制された。また、RAW264.7 では HMGB1 中和抗体、FPS-ZM1, TAK-242 を添加すると細胞増殖が抑制されたが、OBC12 と MLO-A5 では有意な差を認めなかった。

4) HMGB1 阻害が破骨細胞形成と骨吸収活性に与える影響についての検討

口腔扁平上皮癌細胞が産生する HMGB1 が破骨細胞の形成と機能に与える影響について *in vitro* で検討し

た。C57BL/6Jマウスの大腿骨から採取した骨髄細胞から破骨細胞を形成させる系に、SASの培養上清を添加すると破骨細胞形成は促進され、HMGB1中和抗体あるいはFPS-ZM1, TAK-242を添加すると破骨細胞形成は抑制された。また、同様の条件で、骨吸収活性についてpit formation assayにより検討したところ、SASの培養上清を添加すると吸収窩形成は促進し、HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242を添加すると、吸収窩形成は有意に抑制された。

5) HMGB1が破骨細胞形成ならびに骨吸収を促進するメカニズムの検討

口腔扁平上皮癌細胞が産生するHMGB1が破骨細胞形成と骨吸収をどのように促進するのかを明らかにするため、RAW264.7, OBC12, MLO-A5にSAS培養上清, HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242をそれぞれ添加し培養後、タンパク質を回収し、ウエスタンブロット法により検討した。OBC12とMLO-A5において、SASの培養上清を加えるとRANKL発現が上昇し、HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242によってRANKL発現は抑制された。また、RAW264.7におけるNuclear factor-kappa B (NF- κ B) の発現は変化しなかった。

6) マウス骨破壊モデルにおいてHMGB1阻害が骨破壊ならびに骨内での腫瘍増殖に与える影響

BALB/c-nu/nuマウスの右脛骨骨髓内にSASを移植し、癌骨破壊モデルを作製した。移植後、7日目より対照群, HMGB1中和抗体投与群, FPS-ZM1投与群, TAK-242投与群の4群に分け、腹腔内に投与した。投与開始2週目にマウスを屠殺し、右脛骨を軟エックス線写真およびマイクロCT画像で評価した。HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242投与群では骨破壊が抑制された。次に、脛骨の標本を作製し、免疫組織染色によりRANKL発現を検討した。対照群の脛骨では骨破壊部においてRANKL発現は上昇し、HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242投与群ではRANKL発現は減少していた。TRAP染色では、対照群で腫瘍と骨の境界面に存在するTRAP陽性破骨細胞数は増加し、HMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242投与群では破骨細胞形成は抑制された。また、腫瘍増殖マーカーであるKi-67の発現もHMGB1中和抗体, FPS-ZM1, TAK-242投与群ではその発現が抑制された。

【考察】

本研究で口腔扁平上皮癌患者においてHMGB1の発現が亢進していること、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株SASでHMGB1が高発現していることが明らかになった。HMGB1を高発現するSAS細胞において、HMGB1中和抗体とHMGB1受容体のアンタゴニストによってHMGB1を阻害することにより、細胞増殖が有意に抑制されたことから、SAS細胞の産生するHMGB1が癌細胞の増殖にオートクライン的に作用する可能性が示唆された。*in vitro*の検討では、SAS細胞の産生するHMGB1が破骨細胞形成ならびに骨吸収活性を促進する可能性が考えられた。HMGB1のこれらの促進作用は、骨芽細胞と骨細胞におけるRANKLの発現の上昇が主なメカニズムであることが示唆された。また、HMGB1中和抗体とHMGB1受容体のアンタゴニストにより破骨細胞形成と骨吸収活性が抑制されたこと、骨芽細胞と骨細胞におけるRANKL発現が抑制されたことから、HMGB1の受容体であるRAGEとTLR4を介している可能性が示唆された。骨破壊動物実験モデルを用いた検討でも、HMGB1中和抗体, HMGB1受容体のアンタゴニストにより骨内での癌の増殖のみならず破骨細胞性骨吸収も抑制されていたことより、HMGB1は癌の骨破壊に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

論文審査結果の要旨

High mobility group box 1 (HMGB1) は25kDaの非ヒストン核タンパク質であり、種々の癌細胞で発現が亢進している。HMGB1は、骨のリモデリングへの関与が知られているが、癌の骨破壊におけるHMGB1の役割は不明である。本論文は、口腔扁平上皮癌の手術材料ならびにヒト口腔扁平上皮癌細胞株でHMGB1発現を調べ、口腔扁平上皮癌の骨破壊におけるHMGB1の役割を検討したものである。具体的には、HMGB1を高発現する口腔扁平上皮癌細胞株SASを用い、HMGB1中和抗体と受容体のアンタゴニストによるHMGB1阻害が細胞増殖に与える影響とSAS細胞が産生するHMGB1が破骨細胞形成と骨吸収活性に与える影響について調べた。さらに、癌骨破壊動物モデルにおいて、HMGB1阻害による癌の骨破壊制御の可能性についても検討した。

研究結果は以下の内容である。

- 1) 口腔扁平上皮癌の手術材料の癌組織部では、正常組織部に比べ、HMGB1の発現が亢進していた。また、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株のうち、SAS細胞でHMGB1の高発現が認められた。
- 2) HMGB1阻害は、SAS細胞の細胞増殖を抑制した。
- 3) SAS細胞の培養上清中のHMGB1により破骨細胞の分化と骨吸収活性が促進され、これらはHMGB1阻害により抑制された。HMGB1による破骨細胞に対する作用は骨芽細胞と骨細胞におけるRANKL発現の亢進によるものであった。また、HMGB1によるRANKL発現促進作用は受容体であるRAGEとTLR4を介していることが明らかとなった。
- 4) 癌骨破壊動物モデルにおいて、HMGB1阻害により癌の増殖抑制および破骨細胞数の減少が生じ、骨吸収が抑制された。

本研究の結果、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株の産生するHMGB1が骨芽細胞と骨細胞のRANKL発現を促進することで、破骨細胞の分化と骨吸収活性を促進することが明らかとなった。これらの所見は、HMGB1が口腔扁平上皮癌の骨破壊に重要な役割を果たすことを示している。また、癌骨破壊動物モデルにおいて、HMGB1阻害により骨破壊の抑制効果が認められたことは、口腔扁平上皮癌の骨破壊に対する新規治療の可能性を示唆している。癌の骨転移や高カルシウム血症など広く癌関連骨病変への分子標的治療の開発への展開も期待できる。本論文はすでに *Biochemical Biophysical Research Communications*, 第531巻, 第3号, 422頁~430頁 (2020年10月20日発行) に掲載されており、国際的にも評価されている。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。