

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
佐々木 朗 印	学位論文指導全般
印	
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野	病態制御科学専攻 口腔顎顔面外科学分野	身分	大学院生	氏名	坂本 裕美
論 文 題 名	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)				
論文内容の要旨 (2000字程度)	<p>【緒言】</p> <p>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、骨破壊は临床上、予後を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。</p> <p>【方法・結果】</p> <p>1) <u>ヒト口腔扁平上皮癌における HMGB1 発現の検討</u> 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。</p> <p>2) <u>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</u> 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。</p> <p>3) <u>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</u> 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。</p>				

論文内容の要旨（2000字程度）

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マウスの右脛骨骨髄内に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。

【結語】

HMGB1の阻害は腫瘍増殖を抑制するのみならず破骨細胞性骨吸収に対しても抑制効果を示しており、口腔扁平上皮癌の骨破壊に対する新規治療の可能性が示唆された。