

氏 名	中村 友哉
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6389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 pain associated with bone invasion in a mouse model of advanced head and neck cancer (High mobility group box 1 は進行期頭頸部癌モデルマウスにおいて骨浸潤に伴う骨痛を誘発する)
論文審査委員	岡村 裕彦 教授 宮脇 卓也 教授 中野 敬介 准教授

学位論文内容の要旨

【緒 言】

進行期頭頸部癌，とりわけ口腔癌では腫瘍の顎骨浸潤により癌性骨痛 Cancer-induced bone pain (CIBP) を頻繁に経験する．CIBP はがん臨床における独立した予後不良因子であり，患者の QOL 向上を考える上でも解決すべき重要な課題である．

High mobility group box 1 (HMGB1) はほぼ全ての組織に発現する 25kDa の非ヒストン性クロマチンタンパクで，組織損傷に応じて細胞外へ放出され起炎性の作用を発揮する Damage associated molecular patterns (DAMPs) の代表的な分子である．特に癌細胞から放出された HMGB1 は自身あるいは微小環境における細胞群の Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) や Toll like receptor4 (TLR4) にリガンドとして作用し，癌の浸潤や転移に関わることが知られている．種々の癌種と同様に，頭頸部癌組織中においても HMGB1 が高発現することが報告されている．CIBP の病態生理は十分に解明されておらず，また進行期頭頸部癌の CIBP と HMGB1 の関係も未だ不明である．本研究では，頭頸部癌細胞が放出する HMGB1 と CIBP の関係について検討した．

【方法と結果】

1) 頭頸部癌組織と頭頸部正常組織における HMGB1 発現および細胞内局在の検討

頭頸部癌組織および頭頸部正常組織 array を用いて免疫学的染色を行った．正常組織に比較して癌組織では HMGB1 が高発現しており，また核内よりも細胞質へ移行した HMGB1 が高発現していた．

2) 口腔癌細胞株における HMGB1 の発現の検討，ならびに骨微小環境の構成細胞における RAGE, TLR4 の発現の検討

口腔癌細胞株である HSC-2, HSC-3, HSC-4, SAS, OSC-19 における HMGB1 発現を Western blotting 法 (WB) により検討した．SAS において HMGB1 が最も高発現していることを確認し，以下の実験は SAS を用いて行うこととした．次に骨細胞様細胞 MLO-A5, 骨芽細胞様細胞 OBC12, 破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7, 知覚神経細胞株 50B11 のそれぞれに HMGB1 receptor である RAGE, TLR4 の発現を確認した．

3) HMGB1 中和抗体が知覚神経および CIBP に与える影響

HMGB1中和抗体が知覚神経に与える影響を検討するために、ラット脊髄後根神経節 (DRG) の初代培養株をSASのconditioned medium含有培地で培養し、HMGB1中和抗体を添加した群と比較した。5日間培養後、カルセインで染色し蛍光により軸索伸長を測定したところ、HMGB1中和抗体添加群の軸索伸長は有意に抑制されていた。この結果を受けて *in vivo* においてBALB/c-nu/nu右脛骨骨髓腔にSASを移植することで癌骨破壊モデルを作製し、HMGB1中和抗体がCIBPに与える影響ならびに知覚神経の興奮に与える影響について検討を行った。術後10日目にHMGB1中和抗体を腹腔内投与し、6時間ごと24時間のvon Frey assayでCIBPを評価した。術後6時間目以降からHMGB1中和抗体を投与した群において腫瘍増大に伴うCIBPの有意な抑制が認められた。また、屠殺後にDRGを採取し、WBにてニューロン興奮マーカーであるpERK1/2の発現を検討した。HMGB1中和抗体を投与した群ではpERK1/2の発現が抑制されていた。

4) RAGE, TLR4 antagonist が CIBP に与える影響

前述の骨破壊モデルを作製し、術後 10 日目に RAGE, TLR4 それぞれの antagonist である FPS-ZM1 および TAK-242 の腹腔内投与を行い、3) と同様の検討を行った。FPS-ZM1, TAK-242 とともにCIBPの有意な抑制を認めた。WB および蛍光免疫学的染色にて DRG における pERK1/2 の発現を確認したところ、ニューロンの興奮は抑制されていた。

5) SAS HMGB1 発現抑制株の作製、および HMGB1 発現抑制が知覚神経に与える影響

Electroporation 法を用いて SAS に shRNA を導入し HMGB1 発現抑制細胞株 (sh HMGB1) および non-targeting である sh control を作製した。HMGB1 発現低下を WB で確認した。親株, sh control, sh HMGB1 の細胞増殖能に有意な差は認めなかった。それぞれの conditioned medium 中の HMGB1 濃度を ELISA 法で測定したところ、sh HMGB1 では HMGB1 濃度の減少傾向が認められた。HMGB1 発現抑制が知覚神経に与える影響を検討するために 3) と同様に軸索伸長について検討を行った。親株, sh control と比較して sh HMGB1 では軸索伸長が有意に抑制されていた。

6) SAS HMGB1 発現抑制株を用いた *in vivo* における検討

親株, sh control, sh HMGB1 をそれぞれ移植することで同様のマウス骨破壊モデルを作製し、偽手術群である sham を含めた 4 群で以下の項目を評価した。i) 腫瘍増大に与える影響: ImageJ により腫瘍面積を測定した。腫瘍増大に差は認めなかった。ii) 全身および局所血清中の HMGB1 濃度に及ぼす影響: 術後 10 日目に心採血と骨髓液採取を行い、それぞれの HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定した。全血清中では差を認めなかったが、腫瘍局所の HMGB1 濃度は、sh HMGB1 移植群で有意に低下していた。iii) CIBP に与える影響: 腫瘍移植後 1 日, 3 日, 5 日, 7 日, 9 日目に von Frey assay を行った。sh HMGB1 移植群では sh control 移植群と比較して、術後 5 日目以降で CIBP の有意な抑制を認めた。iv) 知覚神経に与える影響: WB および蛍光免疫学的染色にて DRG における pERK1/2 の発現を確認したところ、ニューロンの興奮は抑制されていた。

7) HMGB1 アイソフォームが知覚神経の興奮に与える影響

HMGB1 は 23 位, 45 位, 106 位のシステイン残基の酸化還元状態により、all-thiol, disulfide, terminal oxidized の 3 つのアイソフォームが存在する。知覚神経細胞株 50B11 に対しそれぞれの HMGB1 を添加し 24 時間培養した。WB では all-thiol, disulfide 添加群において pERK1/2 の発現が増強していた。次に all-thiol, disulfide HMGB1 ならびに HMGB1 中和抗体を添加し、酸感受性受容体 Transient receptor potential cation channel subfamily vanilloid member 1 (TRPV1) の発現を検討した。HMGB1 中和抗体を添加した群において TRPV1 の発現が抑制された。

【考察と結論】

骨内の腫瘍細胞から放出された HMGB1 は微小環境中の知覚神経を直接的に感作化することで CIBP を誘発していると考えられた。また RAGE antagonist が TLR4 antagonist に比較して疼痛を

抑制していたことから、知覚神経に発現する RAGE を介した経路が CIBP においてより重要な役割を果たしていると考えられた。HMGB1 は知覚神経に存在する TRPV1 の発現を亢進し、酸感受性を増強する可能性が示唆された。進行期頭頸部癌における CIBP 制御の新規治療として、HMGB1 がターゲットとなりうる可能性が示唆された。今後の研究課題として RAGE, TLR4 の下流シグナルの機能解析を行い、CIBP の治療標的としての有用性をさらに追究することが必要である。

論文審査結果の要旨

口腔癌を含む頭頸部癌 Head and neck cancer (HNC) は進行期において腫瘍の顎骨浸潤による癌性骨痛を誘発する。癌性骨痛は身体的・精神的に苦痛を及ぼすため、その制御は臨床上極めて重要な課題である。High mobility group box 1 (HMGB1) は組織損傷に応じて核から細胞外へ放出され起炎性の作用を発揮し、終末糖化産物受容体 (RAGE) や TLR4 を受容体として持つ。HNC における癌性骨痛の病態生理は十分に解明されておらず、また HMGB1 との関連も不明である。本研究では HNC 由来の HMGB1 が癌性骨痛に与える影響について検討した。研究結果は以下の通りである。

- 1) HNC 組織において HMGB1 は高発現しており、細胞質への局在が増加していた。
- 2) HMGB1 を高発現しているヒト HNC 細胞株 SAS を実験に用いることとした。骨微小環境の構成細胞における RAGE, TLR4 の発現を確認した。
- 3) HMGB1 中和抗体は *in vitro* における知覚神経軸索伸長を有意に抑制した。次に *in vivo* 骨破壊モデルマウスに中和抗体を投与したところ、癌性骨痛の有意な抑制を認めた。中和抗体投与群では脊髄後根神経節 (DRG) における神経活性の指標となる ERK1/2 活性の低下を認めた。
- 4) RAGE, TLR4 antagonist を投与した骨破壊モデルマウスで癌性骨痛および DRG における ERK1/2 活性の低下を認めた。特に RAGE antagonist において顕著に癌性骨痛の抑制を認めた。
- 5) HMGB1 発現抑制株 (sh HMGB1) を Electroporation 法で作製した。Conditioned medium (CM) 中の HMGB1 濃度を測定したところ、sh HMGB1 では濃度の減少傾向が認められ、sh HMGB1 の CM 含有培地で培養した DRG は対照群に比較して軸索伸長が有意に抑制されていた。
- 6) HMGB1 発現抑制株を用いた骨破壊モデルマウスでは腫瘍局所の HMGB1 濃度が有意に低下しており、術後 5 日目から癌性骨痛の有意な抑制を認めた。また DRG における ERK1/2 活性の低下を認めた。
- 7) 知覚神経細胞株 50B11 に対し異なるアイソフォーム HMGB1 を添加したところ、All-thiol, disulfide HMGB1 添加群で ERK1/2 活性化および酸感受性受容体 TRPV1 の発現増強を認めた。

本研究の結果は HNC 由来の HMGB1 が骨微小環境中の知覚神経を直接的に活性化し、酸感受性を増強することで癌性骨痛を誘発していることを示しており、特に RAGE を介した経路が癌性骨痛においてより重要であることを示唆する意義のある内容であった。今後の研究で RAGE, TLR4 の下流シグナル, HMGB1 アイソフォームと受容体との affinity を解析し、HNC おける癌性骨痛の治療として HMGB1 が新規標的となる展開が期待でき、高く評価できる。本論文はすでに

Oncology Reports;44(6):2547-2558/2020 Dec (IF: 3.417) 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。