

# 論 文 要 旨

透明化技術を用いた

扁平上皮癌の骨破壊と骨浸潤のイメージング解析

令和5年度

北海道医療大学大学院歯学研究科

島谷 真梨

## 【緒言】

口腔悪性腫瘍の90%以上は口腔粘膜の上皮から発生する口腔扁平上皮癌であり、顎骨浸潤をしばしば起こすことが知られている。また口腔扁平上皮癌を含む多くの癌において認められる骨浸潤や骨破壊には、癌細胞によって誘導された破骨細胞が深く関与することが報告されている。この破骨細胞の誘導には、癌細胞や骨芽細胞が放出する局所因子が関与すると考えられている。一方で、癌細胞による直接的な骨破壊が起こる可能性も報告されている。しかし、口腔扁平上皮癌の癌骨破壊微小環境において癌細胞と宿主細胞の関係は未だよくわかっていないのが現状である。したがって、扁平上皮癌細胞の骨破壊メカニズムの解明は、外科的治療を考える上で重要な因子となると期待される。

## 【方法】

本研究では、骨形成部の  $\text{Ca}^{2+}$  に結合する蛍光色素である Calcein, Alizarin Red, および Tetracycline をマウス腹腔内に投与して頭蓋骨を経時的に染色した。実験では、4週齢雄 C3H マウスに Calcein と Alizarin Red を投与した後、頭頂骨の骨膜上にマウス扁平上皮癌細胞 (SCC7,  $1 \times 10^6$  cells) を移植し、その2日から14日後に Tetracycline を投与して癌移植モデルマウスを作成した。このマウスから頭蓋骨を切除して10%ホルマリンで固定し SCALEVIEW で透明化したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いて頭蓋骨の蛍光を3次的に解析した。この実験では、SCC7の移植前に投与した Calcein 層と Alizarin Red 層の消失を骨破壊の指標、SCC7移植後に投与した Tetracycline 層の消失を骨形成抑制の指標とした。さらに自家蛍光を使って SCC7 を含む骨表面の細胞を可視化した。

## 【結果】

外表からの観察では、癌細胞移植後7日目から移植部に明瞭な膨隆を認めた。切除した頭蓋骨でも7日目から腫瘍組織が確認でき、10日目では腫瘍組織の可動性を認めたが、14日目から全てのマウスにおいて腫瘍組織は頭蓋骨へ癒着した。SCC7移植後7日目の頭蓋骨を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、Alizarin Red層に消失部がみられたが、より深部の Calcein層には消失部がみられなかった。また Tetracycline層が大きく消失しており、SCC7移植7日目で既に骨形成抑制が広い範囲で生じていた。骨破壊がより進行した SCC7移植10日後の頭蓋骨では、自家蛍光で観察される癌細胞が Calcein層を突き抜けて深部に浸潤していた。さらに骨破壊が進んだ SCC7移植14日目の頭蓋骨にみられる大きな骨消失部では、Alizarin Red層が消失して Calcein層が残存する部分に加えて、Calcein層が消失して Alizarin Red層が残存する部分が観察された。

TRAP 染色で頭蓋骨における破骨細胞の分布を調べると、正常マウスの頭蓋骨では、縫合部や骨髄に TRAP 陽性部位がみられ、縫合部から離れた板状部分には TRAP 陽性部位がみられなかった。それに対して SCC7 を移植したマウスの頭蓋骨では、縫合部のみならず頭頂結

節付近の板状部分にも顕著な TRAP 陽性部位が認められた。腫瘍が形成された反対側（硬膜側）に顕著な TRAP 陽性部位がみられたのに対して、形成された腫瘍組織直下では TRAP 陽性部位が骨破壊部の辺縁部に限局していた。

TRAP染色を行なった頭蓋骨のCalcein蛍光を観察すると、腫瘍組織から離れた部位にみられる小さな穿孔状の骨破壊部位に、TRAP陽性細胞と蛍光の消失が観察された。一方、腫瘍組織直下の骨破壊部位では明瞭なTRAP陽性細胞は確認されず、骨破壊辺縁部に薄いTRAP染色がみられた。また共焦点レーザー顕微鏡観察では、透過像による骨破壊部の周辺のより広い範囲にCalcein層の消失が確認された。

GFPマウスを用いた解析の結果、腫瘍の細胞塊の周囲には、GFP蛍光をもつ宿主に由来する血管新生が観察された。Alizarin Red層が消失した骨破壊部位には、自家蛍光のみで強く光る癌細胞に加えて、突起をもつ骨細胞と思われる細胞がみられた。2光子レーザー顕微鏡の第2高調波発生（SHG）を用いて、SCC7を移植したGFPマウスのAlizarin Red層の消失部位におけるコラーゲンの分布を可視化した。その結果、破骨細胞と思われる宿主由来の細胞が浸入した骨破壊部位の周辺に大きなAlizarin Red層の消失部が形成され、そこにはコラーゲン線維や突起をもつ骨細胞と思われる細胞が残存していた。

癌による骨破壊および骨浸潤の分子機構を明らかにするために、ヒト由来舌扁平上皮癌細胞である SAS をヌードマウスに移植したサンプルを使って次世代シーケンシング（Next Generation Sequencing, NGS）による網羅的 RNA 発現解析（RNA-sequencing, RNA-seq）を行った。

腫瘍組織、頭蓋骨に浸潤した癌、移植前の SAS から得られた RNA をヒト遺伝子のデータベースに照合させることで同定された遺伝子断片のリード数は、宿主であるマウス組織である頭蓋骨に浸潤した癌において、移植前の SAS や腫瘍組織と比較して若干低い値を示した。比較対象である、腫瘍組織と頭蓋骨に浸潤した癌の間では、108 遺伝子に腫瘍組織で 2 倍以上、113 遺伝子に頭蓋骨へ浸潤した癌で 2 倍以上の統計的に有意（ $P < 0.05$ ）な発現上昇がみられた。GO Biological Process を使った Enrichment 解析の結果、頭蓋骨に浸潤した癌細胞（SAS）では腫瘍組織の癌細胞（SAS）に比べて、細胞突起の形成に関与する遺伝子と細胞内情報伝達や成長因子の調節に関与する遺伝子の増加が認められた。発現上昇を示した遺伝子を詳しくみると、細胞突起形成に関与する myosin heavy chain 1, 2, 4 や、受容体チロシンキナーゼを介する情報伝達に関与する protein tyrosine phosphatase receptor type D, neurotrophic receptor tyrosine kinase 3 が上位 15 遺伝子に含まれ、それ以外に interleukin 7 (IL7) 受容体や transforming growth factor beta 3 (TGF $\beta$ ) といった成長因子に関与する遺伝子に加えて、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) に関与する遺伝子の上昇がみられた。一方、発現低下を示した遺伝子を詳しくみると、受容体チ

ロシンキナーゼ関連としては fibroblast growth factor 8 (FGF8), neurotrophic receptor tyrosine kinase 1 が上位 15 遺伝子に含まれ, それ以外に mitogen-activated protein kinase kinase kinase 5 の発現低下が認められた. また, 癌細胞にはマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) や calpaine (CAPN), cathepsin (CTS) の発現が確認された. これらの中で cathepsin B と D の発現量が特に高く, 各々 GAPDH の 87 倍と 35 倍のリード数であり, 発現上位の 100 遺伝子に含まれた. これらの遺伝子の発現量は, 骨浸潤による有意の変化は示さなかった.

正常頭蓋骨, 癌浸潤頭蓋骨, 腫瘍組織から RNA を抽出し, マウス遺伝子のデータベースに照合させることで同定された遺伝子断片のリード数では, 正常頭蓋骨の RNA は全てマウス由来であるのに対し, ヒト由来の SAS を含む癌浸潤頭蓋骨や腫瘍組織のリード数は低い値を示した. 本研究における比較対象である, 正常頭蓋骨と癌浸潤頭蓋骨の間では, 556 遺伝子に正常頭蓋骨で 2 倍以上, 546 遺伝子に癌浸潤頭蓋骨で 2 倍以上の発現量である統計的に有意 ( $P < 0.05$ ) な変化がみられた. GO Biological Process を使った Enrichment 解析の結果, 正常頭蓋骨に比べ癌浸潤頭蓋骨における細胞呼吸や酸化的リン酸化に関与する遺伝子群が顕著な低下と, 細胞接着や細胞外マトリックス, 血管新生の増加が認められた. 特にケラチン遺伝子に注目して解析すると, 同定された 74 のケラチンおよびケラチン関連遺伝子の中で, 減少傾向を示したのは 3 遺伝子 (KRT2, 20, 222) のみで, 他の 71 遺伝子で増加あるいは増加傾向を示した. また, 骨吸収促進作用を持つ delta like non-canonical Notch ligand 1, 破骨細胞分化に抑制的に作用する leucine rich repeat containing 17 と F-box and WD-40 domain protein 7, follistatin-like 3, 骨形成に関与する dymeclin 遺伝子の増加がみられた. また, TNF  $\alpha$  シグナルに関連する C1q and tumor necrosis factor related protein 2 と tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a (TNF  $\alpha$  11) の発現増加がみられた. さらに, insulin-like growth factor binding protein (IGF-BP) 3, 4, 7 や, リソゾームに関与する transmembrane protein 175, RAB20, member RAS oncogene family, VPS26 retromer complex component A, sorting nexin 12 に有意な発現増加が認められた.

#### 【考察】

本研究では, Calcein, Alizarin Red, Tetracycline の経時的投与したマウスに SCC7 を移植して作成した癌移植モデルマウスの頭蓋骨を用いて, 組織透明化技術と共焦点レーザー顕微鏡による骨破壊の過程の 3 次元的な解析法を確立した. この解析によって, 骨表面か

ら深部へ向かう骨破壊が起きることが明確に示された。さらに大きな骨破壊部では、水平方向での骨破壊の進行によってCalcein層の消失が大きい部分とAlizarin Red層の消失が大きい部分が観察された。また、投与した腫瘍組織の直下におけるTetracycline層の大きな消失が観察されたことから、骨形成抑制作用が明らかになった。癌による骨破壊ではコラーゲンの分解に先立って脱灰が起こる場合があることが明らかになった。これは一般的な破骨細胞の吸収窩による骨吸収とは異なることから、破骨細胞以外の細胞が関与する可能性が考えられた。

扁平上皮癌を含む多くの癌の骨浸潤において破骨細胞が大きく関与していることは明らかにされており、それには癌細胞が放出する局所因子が重要な役割を果たすと考えられている。本研究では、RNA-seqの結果から、骨に浸潤したSASでは細胞外マトリックスの分解に関与するcathepsin BとDの遺伝子の発現量が顕著に多く、浸潤による骨破壊に関与する可能性が考えられた。また、細胞突起やフィロポディアの形成に関与する遺伝子群の増加がみられたことから、癌浸潤能が上昇していることが示唆された。

癌浸潤が起きた頭蓋骨では、TNF $\alpha$ やNotchシグナルに関与する遺伝子や癌細胞の増殖、遊走、浸潤に影響を与える可能性が指摘されている IGF-BP 遺伝子の発現レベルの上昇がみられた。これらの分子が癌細胞による微小環境の構築に関与すると考えられるが、その具体的な役割に関しては今後の検討が必要である。また Lysosome やエンドソームの機能に関連する遺伝子の発現増加がみられた。これは主に誘導された破骨細胞に由来するものと予想されるが、今後の免疫組織化学的解析等による発現部位や発現細胞の同定によってそれらの役割が明らかになることが期待される。さらに、これらは癌細胞の影響によって変化した遺伝子であることから、癌細胞から放出される局所因子の機能解析の指標としても利用できると思われる。

## 【結論】

Bone Metabolism Tracing 法を用いることで、扁平上皮癌による骨破壊および骨形成抑制を視覚的に描出することができた。さらに、癌細胞による骨破壊に関して、骨のコラーゲンなどの骨基質の消失に先立って脱灰が起こる部位が存在すると考えられた。また、NGSの結果から、様々な局所因子の遺伝子発現の変化が明らかになった。さらに、癌細胞におけるMMPやcathepsinの発現上昇が確認されたことから、癌細胞が分泌するこれらのタンパク質分解酵素による直接的な骨破壊の可能性が示唆された。