

氏名	横山 尚史
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 2165号
学位授与の日付	平成13年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ヒト口腔扁平上皮癌の選択的骨転移能を有する細胞株の樹立とその性状
論文審査委員	教授 菅原 利夫 教授 永井 教之 教授 松村 智弘

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

骨は肺、肝に続く癌の好発転移臓器である。骨転移は癌性疼痛、病的骨折、高カルシウム血症など患者のQOLを著しく低下させるため、その克服は临床上重要な課題である。

癌転移に臓器特異性があることは広く認識されているが、この癌の転移臓器特異性を説明する説として、血管系の解剖的条件が転移臓器の決定に重要だとするanatomical mechanical説と、転移臓器の環境が癌細胞の増殖に適しているからだとするseed and soil説が広く支持されている。しかしながら、この2つの説だけでは説明できない点もあり、骨転移においても全ての癌腫で骨転移形成を起こすわけではないことから、癌細胞自身に転移臓器を決定する要因があることが示唆される。この解析を行う上で、異なる転移臓器特異性を有する細胞株の生物学的性状などを比較検討することは、有用な方法である。

我々は、ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2を心腔内注射法すると骨及び筋・筋膜の2つの臓器にのみ転移をおこすことを既に報告している。本研究では骨への転移臓器特異性を解析することを目的に、選択的に骨及び筋・筋膜に転移する細胞株の樹立を試みた。

### 【実験材料及び方法】

#### 1. *In vivo* 選択法による選択的骨転移能及び筋・筋膜転移能を有する細胞株の樹立

*in vivo* 選択法により細胞株の樹立を試みた。すなわちHSC-2をヌードマウスに心腔内注射し骨転移及び筋・筋膜転移を誘発し、それぞれの転移巣より無菌的に腫瘍を取り出し、*explant*法を用いて細胞を回収した。それぞれの細胞を再度心腔内注射して骨あるいは筋・筋膜に転移を誘発させ、同様の操作を繰り返しそれぞれの臓器に選択的に転移する細胞株の樹立を試みた。

#### 2. 骨細胞外基質への接着能に関する検討

マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を6穴プレートに播種して、アスコルビン酸、TGF- $\beta$ 存在下で14日間培養し、Triton-X, NH<sub>4</sub>OHにて処理し骨細胞外基質をコートしたプレート(BECMプレート)を作製した。BECMプレートに各癌細胞株を播種し、3時間培養後に接着した細胞数を算定した。

#### 3. 骨転移関連因子の検討

骨転移との関連が今までに報告されているE-カドヘリン、インテグリン $\alpha 2\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ , MMP-2, 9, PTHrPについて検討した。E-カドヘリンの発現はウエスタンブロット法にて、インテグリン $\alpha 2$ ,  $\alpha 4$ の発現は培養細胞を免疫組織化学染色にて、MMP-2, 9の発現は各癌細胞株のconditioned medium (CM)を用いてゼラチンザイモグラムにて、PTHrP発現量をIRMA法にてそれぞれ検討した。

#### 4. 各癌細胞株が骨形成系，骨吸収系に及ぼす影響

##### 1) 骨芽細胞様細胞に及ぼす影響

MC3T3-E1を各癌細胞株のCMにて培養し，経時的細胞数を検討した．またMC3T3-E1をアスコルビン酸， $\beta$ -glycerophosphate存在下で培養し，アリザリンレッド染色を行い石灰化能を検討した．

##### 2) 破骨細胞形成に及ぼす影響

マウス骨髄細胞を各癌細胞株のCM存在下で培養し，7日目の酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ陽性の多核細胞の数を破骨細胞として算定した．

##### 3) 骨芽細胞のODF，OCIF発現に及ぼす影響

マウスストローマ細胞ST2を培養2日目より各癌細胞株のCMにて培養して，破骨細胞分化誘導因子(ODF)，破骨細胞形成抑制因子(OCIF) m-RNAの発現に及ぼす影響をRT-PCR法にて検討した．

#### 5. プロスタグランジンE<sub>2</sub>の発現

各癌細胞株CM中のプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)濃度をEIA Kit(Amersham)を用いて定量的に分析した．

##### 【結果と考察】

##### 1. 選択的骨転移能を有する細胞株の樹立

6回の選択で，選択的に骨転移能を有する骨吸収型転移細胞株HSC-OLを樹立した．また7回の選択で造骨型転移像を示した部位より，造骨型転移細胞株HSC-BFを得た．一方，筋・筋膜のみに転移する細胞株は8回目までの選択では得られなかった．8回目に回収した細胞をHSC-Mとして以降の検討に用いた．

##### 2. 各癌細胞株の骨細胞外基質(BECM)への接着能の検討

通常の培養用プレートへの接着細胞数は，HSC-OLで軽度の亢進を認めたが，全ての癌細胞株でほぼ同程度だった．一方，BECMプレートへの接着細胞数はHSC-2に対してHSC-OLで大幅に増加しており，HSC-Mでは逆に減少していた．これらの結果より，HSC-OLでは筋・筋膜への転移能を失い骨のみへの選択性を獲得する過程で，骨細胞外基質への接着能が亢進したものと思われた．

##### 3. 骨転移関連因子の検討

HSC-OLは，親株であるHSC-2に比べてE-カドヘリン発現の低下，インテグリン $\alpha 4 \beta 1$ の発現，BECM上でのMMP-2の上昇を認めた．また，PTHrPの発現はHSC-OLにおいてはHSC-2の約3割の発現量であった．これらのことより，選択的骨転移能を有するHSC-OLでは，今回検討を行ったPTHrP以外の骨転移関連因子が促進に働いていることが示唆された．

##### 4. 各癌細胞株が骨形成系，骨吸収系に及ぼす影響

HSC-OLのCMはMC3T3-E1の増殖，石灰化能を抑制し，HSC-BFのCMはMC3T3-E1の石灰化能を促進していた．このことからHSC-OLからMC3T3-E1の増殖，石灰化能を抑制する因子の産生，HSC-BFからMC3T3-E1の石灰化能を増強する因子の産生が示唆された．また，HSC-OLのCMにおいてのみ破骨細胞形成を濃度依存的に認めた．さらに，HSC-OLのCMはODF m-RNAの発現を増強した．一方，HSC-BFのCMはOCIF-mRNAの発現を増強した．これらの結果より，HSC-OLからPTHrP以外の骨吸収因子の産生が示唆された．

##### 5. プロスタグランジンE<sub>2</sub>の発現

HSC-OLのCM中にPGE<sub>2</sub>が親株であるHSC-2の約2倍の濃度で発現していた．また，PGE<sub>2</sub>阻害剤であるインドメタシンはHSC-OLにおける破骨細胞形成を抑制した．この結果から，HSC-OLの破骨細胞形成にPGE<sub>2</sub>が関与していることが示唆された．

##### 【結論】

ヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2より選択的骨転移能を有する細胞株HSC-OLを樹立した．また，その過程で造骨型転移細胞株HSC-BFを同時に樹立した．現在まで造骨型骨転移モデルの報告は殆どないことから，HSC-BFは造骨型骨転移機構の解析や治療法の検討に非常に有用なモデルになると考えられた．また，HSC-OLの骨転移巣での骨破壊にPGE<sub>2</sub>が関与していることが示唆された．

## 論文審査結果の要旨

癌転移に臓器特異性があることは広く知られているが、骨転移においても全ての癌腫で骨転移形成が生じるわけではないことなどから、癌細胞自身に転移臓器を決定する要因があることが示唆される。この解析を行う上で、異なる臓器転移特異性を有する細胞株の生物学的性状や遺伝子変化を比較検討することは、非常に有用な方法である。

本研究においては、骨及び筋・筋膜に転移するヒト口腔扁平上皮癌細胞株HSC-2より選択的に骨転移能を有する転移細胞株HSC-OLの樹立に成功した。またその選択過程で、選択的に骨転移能を有する造骨型転移巣を形成する細胞株HSC-BFも樹立し、これらの生物学的性状及び骨代謝系に及ぼす影響について検討した。その結果、HSC-OLは本研究で検討をおこなった骨転移関連因子において親株であるHSC-2に比べていくつかの遺伝子変化が認められた。また、HSC-OLの骨転移巣における骨破壊にプロスタグランジンE<sub>2</sub>の関与が、HSC-BFの造骨型骨転移巣の形成には、骨芽細胞様細胞の石灰化の促進と、骨芽細胞のOCIF発現の増強が関与していると推察された。

本研究において樹立したHSC-OLは、*in vivo*における選択過程で遺伝子的な変化を起こしていると考えられ、今後親株であるHSC-2とHSC-OLの遺伝子変化の比較を行うことは、骨転移の臓器特異性に関わる因子同定の可能性を示唆している。これらの点から本研究内容は価値あるものである。

したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。