

## 口腔扁平上皮癌によるインターロイキン-6の 産生と顎骨浸潤との関連

### 学位論文内容の要旨

【目的】 骨浸潤や骨転移を生ずる癌としては乳癌、前立腺癌、口腔癌などが知られているが、骨浸潤あるいは骨転移における骨破壊の機序については未だ不明な点が多い。これまでに癌細胞が産生するサイトカインやホルモンによって破骨細胞が活性化されることにより骨破壊性に骨転移巣が形成されることが報告されており、口腔癌の顎骨浸潤においても破骨細胞が重要な役割を担っていることが推測される。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞が産生し、破骨細胞を活性化するサイトカインの一つであるインターロイキン-6 (IL-6)に着目し、IL-6 の産生と腫瘍の顎骨浸潤との関連について検討をおこなった。

【材料と方法】 ヒト口腔扁平上皮癌細胞 TYS 細胞およびヒト正常歯肉由来線維芽細胞を 10%牛胎児血清 (FBS)添加 D-MEM にてコンフルエンスまで培養後、培養液を  $\alpha$ -MEM に交換して更に 48 時間培養し、培養上清を回収して上清中の IL-6 量を測定した。また、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞と 4 週齢マウス的大腿骨から採取した骨髓細胞の共存培養系に各種濃度の IL-6、抗マウス IL-6 抗体あるいは TYS 細胞の培養上清を添加し、6 日間培養して酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP)陽性の多核細胞を破骨細胞として数を計測した。さらに、real-time PCR を行い線維芽細胞、TYS 細胞および口腔扁平上皮癌と診断され摘出された臨床検体における IL-6 mRNA 発現を定量的に計測した。

【結果と考察】 本研究では破骨細胞を活性化させるサイトカインの一つである IL-6 に着目し、微少量の組織や細胞から短時間に定量的に mRNA を測定可能な定量 real-time PCR を用いて、培養細胞および臨床検体における IL-6 mRNA を検索した。

IL-6 の破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化誘導への影響を調べるために、E1 細胞と骨髓細胞との共存培養系に IL-6 を添加して TPMC 数を計測した。IL-6 非添加群と比較して IL-6 添加群ではその濃度依存的に TPMC 数は増加した。この結果から IL-6 が破骨細胞分化誘導する因子であることが確認された。

次に TYS 細胞培養液中に破骨細胞分化を誘導する因子が放出されていると推測して、E1 細胞と骨髓細胞との共存培養系に TYS 細胞の CM を添加して TPMC 数を計測した。CM 非添加群と比較して CM 添加群では 1/10~1/3 倍希釈まで TPMC 数は濃度依存的に増加したが、1/2, 1 倍希釈を加えた場合は抑制された。この結果から TYS 細胞は何らかの因子を放出し、破骨細胞の分化を誘導する可能性があることが示され

た。また、1/2 および 1 倍希釈で誘導が抑制されたのは、癌細胞により FBS 中の増殖因子が消費され、CM として添加した共存培養系に用いた培養液中の FBS の最終濃度が低下したためと推測される。

ここまでの結果から TYS 細胞の放出している IL-6 が破骨細胞誘導に関与していると推測して、E1 細胞と骨髓細胞との共存培養系を用いて  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  添加群と非添加群に分けて、TYS 細胞の CM を添加し、さらに抗マウス IL-6 抗体を添加して TPMC 数を計測した。  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  添加群と非添加群のいずれにおいても TYS 細胞の CM を添加した場合、TPMC 数は有意に増加した。この結果より、TYS 細胞が破骨細胞の誘導を促進させる因子を産生していることが推測される。また、いずれの群においても抗マウス IL-6 抗体添加により TPMC 数増加は有意に抑制された。  $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は骨芽細胞における RANKL の発現を促進させることが知られている。非添加群において TYS 細胞の CM が誘導される TPMC 数を増加させ、その効果が抗マウス IL-6 抗体を作用させることにより、ほぼ完全に抑制された。これらの結果は TYS 細胞の産生する IL-6 が骨芽細胞における RANKL の発現を促進することを示唆している。

線維芽細胞と TYS 細胞における IL-6 mRNA 発現は対照群である線維芽細胞が  $0.005 \pm 0.001$  に対して、TYS 細胞が  $0.031 \pm 0.003$  であり有意に増加していた。

この結果からも TYS 細胞が放出する IL-6 が、破骨細胞分化誘導に関与していることが示唆された。次に歯肉線維芽細胞と TYS 細胞をコンフルエンスまで培養し IL-6 産生量を定量した。線維芽細胞と比較して TYS 細胞の IL-6 産生量はいずれの時間においても有意に増加していた。以上の結果より遺伝子発現のみならず、タンパク質レベルにおいても TYS 細胞は破骨細胞を誘導する能力が高いことが示された。

in vitro 実験の結果を in vivo で確認するために、正常歯肉粘膜 3 例と口腔扁平上皮癌組織 12 例を用い、real-time PCR により IL-6 mRNA 発現の検討を行った。IL-6 mRNA 発現量は対象群である正常歯肉粘膜が  $0.043 \pm 0.010$  に対して、口腔扁平上皮癌組織が  $0.185 \pm 0.100$  であり有意に増加していた。正常歯肉粘膜での IL-6 mRNA の発現は 3 例とも低く、生理的状态での発現は低いことが示された。一方、正常歯肉粘膜 3 例と比較して口腔扁平上皮癌組織では 12 例中 8 症例で IL-6 mRNA の有意な発現亢進が認められ、腫瘍細胞の IL-6 産生も亢進していると推測された。これまで腫瘍のサイズと骨浸潤の程度は関連があるとされているが、本研究においても腫瘍の T 分類において T1 および T2 症例と比較して T3 および T4 症例では、IL-6 mRNA の発現が有意に亢進しており、前述の説を支持する結果となった。また浸潤型増殖を示すものは悪性度が高く、骨浸潤や転移の危険性が高いとされているが、本研究においても浸潤様式が浸潤型症例の方が膨張型症例よりも IL-6 mRNA の発現が有意に亢進していた。この結果より浸潤型の増殖をする癌細胞は IL-6 を産生することで、破骨細胞の形成を誘導し、骨を破壊しながら骨組織内に浸潤して行くことが推測される。

本研究の結果は口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤には癌細胞によって産生される IL-6 が関与している可能性を示唆しているが、破骨細胞活性化能を持つ他のサイトカインである M-CSF, RANKL, TNF- $\alpha$  については本研究では関連性は認められなかった (Data 非掲載)。IL-6 発現の検討による診断や治療方針の決定、また抗 IL-6 抗体を用いた骨浸潤の抑制などの臨床応用の可能性への検討を今後さらに続ける必要があると思われる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 戸 塚 靖 則

副 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

## 口腔扁平上皮癌によるインターロイキン-6の 産生と顎骨浸潤との関連

審査は、審査員全員出席の下に、申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問により行われた。

審査論文の概要は、以下の通りである。

本研究は、口腔扁平上皮癌細胞が産生するサイトカインの1つであるインターロイキン-6 (IL-6)と腫瘍の顎骨浸潤との関連について検討したものである。

まず、IL-6の破骨細胞分化に与える影響を調べるために、骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 (E1) 細胞とマウスの大腿骨から採取した骨髓細胞との共存培養系に IL-6 を添加して 6 日間培養し、酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ (TRAP)陽性の多核細胞を破骨細胞 (TPMC) として、その数を計測した。結果は、IL-6 添加群では非添加群に比較して、TPMC 数は濃度依存的に増加しており、IL-6 は破骨細胞の分化誘導因子であることが確認された。

次に、E1 細胞と骨髓細胞との共存培養系に TYS 細胞の上清 (CM) を添加して TPMC 数を計測した。CM 添加群では非添加群と比較して  $1/10 \sim 1/3$  倍希釈まで TPMC 数は濃度依存的に増加しており、TYS 細胞は破骨細胞を分化誘導する何らかの因子を放出している可能性が示唆された。なお、 $1/2$  および 1 倍希釈では誘導は抑制されたが、その原因は癌細胞により FBS 中の増殖因子が消費され、CM として添加した共存培養系に用いた培養液中の FBS 最終濃度が低下したためと考えられた。

TYS 細胞の放出している物質が IL-6 であることを確認するため、E1 細胞と骨髓細胞との共存培養系を用いて  $1\alpha$ ,  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  添加群と非添加群に分けて、TYS 細胞の CM を添加し、さらに抗マウス IL-6 抗体を添加して TPMC 数を計測した。 $1\alpha$ ,  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  添加群と非添加群のいずれにおいても、TYS 細胞の CM を添加した場合には、TPMC 数は有意に増加した。また、いずれの群においても抗マウス IL-6 抗体添加により TPMC 数の増加は有意に抑制された。 $1\alpha$ ,  $25(\text{OH})_2\text{D}_3$  は骨芽細胞における RANKL の発現を促

進させることが知られていることから、 $1\alpha, 25(\text{OH})_2\text{D}_3$  非添加群において TYS 細胞の CM が TPMC 数を増加させ、その効果が抗マウス IL-6 抗体の作用でほぼ完全に抑制されたことは、TYS 細胞の産生する IL-6 が骨芽細胞における RANKL の発現を促進させたことを示唆している。

線維芽細胞と TYS 細胞における IL-6 mRNA 発現は、前者が  $0.005 \pm 0.001$  に対し、後者は  $0.031 \pm 0.003$  であり、TYS 細胞で有意に増加していた。歯肉線維芽細胞と TYS 細胞をコンフルエンスまで培養し IL-6 産生量を定量した結果でも、TYS 細胞の IL-6 産生量は有意に増加していた。

in vitro 実験の結果を in vivo で確認するために、正常歯肉粘膜 3 例と口腔扁平上皮癌組織 12 例を用い、real-time PCR により IL-6 mRNA 発現の検討を行った。IL-6 mRNA 発現量は、正常歯肉粘膜では 3 例とも低く、 $0.043 \pm 0.010$  であったのに対して、口腔扁平上皮癌組織では 12 例中 8 例で有意な発現亢進が認められ、全体で見ても  $0.185 \pm 0.100$  と、正常歯肉粘膜に比べて有意に増加していた。腫瘍の大きさでみると T1 および T2 症例と比較して T3 および T4 症例で、IL-6 mRNA の発現が有意に亢進していた。また浸潤様式では、浸潤型症例の方が膨張型症例よりも IL-6 mRNA の発現が有意に亢進していた。

論文の審査にあたって、論文申請者による研究の要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。

主な質問事項は、1) IL-6 mRNA の発現と腫瘍の発生部位、分化度との関係、2) 正常な細胞における IL-6 mRNA の発現と年齢との関係、3) IL-6 の主な作用、4) 破骨細胞の分化を誘導する物質について、5) 破骨細胞の分化に骨髄細胞との共存培養が必要な理由、6) 腫瘍細胞が産生する物質が直接骨を吸収することがあるのか、7) 腫瘍細胞が直接破骨細胞の分化を誘導するのかなどであった。いずれの質問についても、論文申請者から明快な回答が得られ、また将来の研究の方向性についても具体的に示された。本研究は、口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤に、がん細胞が産生するサイトカインの 1 つである IL-6 が深く関与していることを明らかにした点が高く評価された。本研究の業績は、口腔外科の分野はもとより、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認められた。