

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11077

研究課題名(和文) 口腔癌の骨浸潤モデルにおけるカテプシンK阻害剤の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of cathepsin K inhibitor in murine jaw bone metastasis model of oral cancer

研究代表者

檀上 敦 (DANJO, Atsushi)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：80452712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨への浸潤を伴う局所進行口腔癌の治療は、顎骨切除が必要となり、術後に顔面の変形、咀嚼機能の低下などの機能障害を来す。口腔癌の顎骨浸潤を抑制するためには骨吸収を行う破骨細胞を制御する必要がある。本研究では骨吸収を調整する因子であるカテプシンKを標的に今回口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤モデルを用いて、その効果を分析した。in vitroの実験ではカテプシンK阻害剤は骨芽細胞や破骨細胞の増殖に影響を与えなかったが、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制した。in vivoの実験ではカテプシンK阻害剤の骨吸収阻害効果は薬剤による差があり、有意な差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：The treatment of local progress oral cancer with invasion to jawbone causes the functional disorder such as the deformity of the face or chewing ability, because of resection of the jaw bone. It is necessary to control the osteoclast functions which performs bone resorption to control jawbone invasion of oral cancer. We analyzed the effect of cathepsin K inhibitors which control bone resorption activities in osteoclasts using a jawbone invasion experimental model of oral squamous cell carcinoma in this study. The cathepsin K inhibitors did not affect the increase of osteoblasts and the osteoclasts by the in vitro experiment, but decreased the number of the human oral squamous cell carcinoma cells. There was the difference with the drug in the bone resorption inhibition effect of the cathepsin K inhibitors by the in vivo experiment, and the significant difference was not recognized.

研究分野：骨代謝、口腔癌

キーワード：口腔癌 顎骨浸潤 カテプシンK シスタチンC

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は、近接臓器である顎骨への浸潤がよく見られる。顎骨への浸潤を伴う進行した口腔癌の治療は、顎骨切除を伴う手術が必要となり、術後に顔面の変形、咀嚼嚥下機能の低下などの障害を来す。また、その予後は不良であることが多く、口腔癌の顎骨浸潤を抑制することは、癌患者の QOL の向上や予後に貢献すると考えられる。

骨浸潤を伴う癌組織では骨を吸収する破骨細胞が活性化されているため、骨浸潤を抑制するためには、破骨細胞を制御する必要がある。現在、破骨細胞の働きを阻害する薬剤で世界的に広く用いられているのはビスフォスフォネート系薬剤 (BP) や RANKL 阻害剤等の骨代謝調整薬 (BMA) である。BMA は破骨細胞に特異的に作用して、その機能を抑制する優れた薬剤である。乳がん等の骨転移を起こしやすい腫瘍では他の抗がん剤と併用することで優れた抗腫瘍効果を持つことがわかっている。しかし、顎骨壊死などの重篤な副作用が起るため、顎骨切除が必要な口腔癌の治療では治療に用いにくく、新たな治療法の開発が必要とされている。

破骨細胞を阻害する研究は大きく分けて、RANKL 等に代表される増殖や分化を調節する因子を標的としたものと、カテプシン K に代表される骨吸収の機能を調節する因子を標的としたものにわかれる。最近、骨粗鬆症の治療薬として分子標的薬であるカテプシン K 阻害剤が開発され、臨床試験で良好な成績を上げており、注目を浴びている。そこでわれわれは、破骨細胞の骨吸収機能を調節するタンパクであるカテプシン K に着目した。

カテプシン K は、破骨細胞に特異的に強く発現し、骨基質の I 型コラーゲンを分解するのに必須なタンパクである。カテプシン K 阻害剤は、骨芽細胞が産生する骨型

ALP、I 型コラーゲン、オステオカルシン等の骨形成性タンパクの産生に影響を与えないことから、骨代謝回転に悪影響を与えずに骨量を維持できることが期待されている。

シスタチン C は、生体内に存在するシステインプロテアーゼ阻害物質であり、特に強くカテプシン K を阻害することで知られている (Lerner UH., 1997, 2002)。過去にわれわれは破骨細胞内でカテプシン K とシステインプロテアーゼ阻害剤であるシスタチン C が産生され、シスタチン C によってカテプシン K が制御されることを示した (Yamaza T., 2001)。このことは、他の研究者によっても確認されている (Lerner UH., 1997, 2002)。また、われわれはシスタチン C を骨粗鬆症モデルマウスへ投与することで骨粗鬆症が改善されることも証明した (特別研究促進費、課題番号 19599018)。さらにわれわれは、シスタチン C が骨芽細胞の分化を促進することを報告した (Danjo A., 2007) が、これは世界で初めてシスタチン C が骨芽細胞の分化に関与していることを示した成果である。つまり、われわれの成果によって、シスタチン C はカテプシン K 阻害剤として骨吸収を抑制するばかりでなく、骨形成能を促進することによって骨を増量させる別な機能を持つタンパク質であると確認できたことになる。

そこで、骨浸潤をきたした口腔癌細胞に対してカテプシン K 阻害剤やシスタチン C を投与することで、骨浸潤が制御できるのではないかと考えて本研究課題を立案した。また骨芽細胞に影響を与えないカテプシン K 阻害剤と骨芽細胞に対して骨形成促進効果も併せ持つシスタチン C を比較し、骨浸潤抑制効果に変化があるかどうかを確認していきたいと考えた。

2. 研究の目的

上述のように、口腔癌の骨転移は、腫瘍

細胞が直接骨を破壊するのではなく、破骨細胞を介して骨を破壊することが知られている。しかしながらそのメカニズムは不明である。われわれはこれまでにカテプシン K 阻害物質であるシスタチン C が骨代謝に与える影響について報告してきた。そこで本研究は、破骨細胞が骨を吸収する際に不可欠なカテプシン K を阻害する薬剤が、口腔癌の骨浸潤にどのように関与しているかを明らかにすることを目的とした。さらにカテプシン K 阻害剤と生体内に存在するカテプシン K 阻害剤であるシスタチン C の骨浸潤抑制効果について解析を行った。これらの研究によって口腔癌の骨浸潤モデルにおけるカテプシン K 阻害剤の機能解析を行いたいと考えた。

3. 研究方法

・骨芽細胞、破骨細胞、口腔がん細胞におけるカテプシン K 阻害剤の効果

マウス骨芽細胞 MC3T3E1 細胞に vehicle (DMSO), odanacatib を 0.1nM, 0.5nM, 1nM の濃度で添加し、24h, 48h, 72h 後の細胞増殖を WST-8 法で比色定量した。同様の実験をマウス骨髄細胞、ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC3, HSC4 でも行った。

・口腔癌細胞の骨浸潤モデルマウスの作製 Balb/c-nu ノードマウスへヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC3(舌由来、RCB1975), HSC4(舌由来、RCB1902) (RIKEN Cellbank) を、骨浸潤様式が形態学的にヒトの顎骨浸潤様式と類似している Nomura ら(Oral Oncology, 2007)の報告に従って 1.0×10^6 cells、8 週齢の Balb/c-nu ノードマウスの咬筋へ注射した。2 週間待機して腫瘍の骨浸潤を確認した。骨浸潤の成立頻度は 40%であった。

HE 染色、TRAP 染色、抗カテプシン K、抗シスタチン C 抗体を用いた免疫染色を行い、組織学的に口腔がん細胞の浸潤様式を評価した。また、骨吸収の状態を X 線学的

に評価した。

カテプシン K 阻害剤やシスタチン C を顎骨浸潤モデルの腫瘍に投与し、病変サイズの変化、顎骨浸潤様式の変化を評価した。

顎骨浸潤をきたしたヒトの口腔癌組織およびその周囲組織におけるシスタチン C、カテプシン K の発現を免疫組織学的手法で確認した。

投与濃度：骨粗鬆症モデルにおいて効果が発揮できたシスタチン C の濃度は 0.1mM 程度であり、その濃度を使用した。odanacatib に関しては IC50 が 0.2nM - 1nM であることを参考にして 0.5nM を投与濃度とした。

評価時期：本モデルのマウスは腫瘍細胞注入後約 2 週間で浸潤成立し、その後約 3 - 4 週間生存可能である。そこで、腫瘍浸潤成立後すぐにカテプシン K 阻害剤を投与し、2 週、3 週、4 週でそれぞれ肉眼的、組織学的に腫瘍サイズを図り腫瘍の縮小効果を判定した。

4. 研究成果

In vitro の結果から、odanacatib は骨芽細胞、骨髄細胞の細胞増殖に影響は与えず、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の増殖を抑制することがわかった。

口腔癌の顎骨浸潤モデルマウスにおいては、odanacatib 投与による顎骨浸潤抑制効果は認められなかった。シスタチン C 投与群においては、抑制効果は認められたが、結果が安定しておらず、有意差は得られなかった。投与濃度が低かった可能性もあり、今後検討の余地があると考えられる。

2016 年の ASBMR で、odanacatib の第 3 相試験において、その骨粗鬆症患者における骨折抑制効果の高さは認められたが、有意に脳卒中の発症率が高いことが報告され、薬剤の臨床開発が中止された。

本研究で用いた odanacatib は、臨床の

薬剤としては利用できなくなったが、本研究では、カテプシンKを阻害することで口腔扁平上皮癌細胞自体の抑制効果があることが示された。今後そのメカニズムを in vitro, in vivo の両方で検証、分析を続けていきたいと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 12 件)

1. Shimohira D., Yamashita Y., Aijima R., Danjo A., Katsuki T., Goto M. Change in the length over time to the triangular flap in the Cronin method. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol. 29(5) 411-414, 2017
2. Uchida Y, Yamashita Y, Danjo A, Shibata K, Kuraoka A Computed tomography and anatomical measurements of critical sites for endosseous implants in the pterygomaxillary region: a cadaveric study. Int J Oral Maxillofac Surg. 46(6):798-804, 2017
3. 檀上敦、森啓輔、合島怜央奈、下平大治、靄岡祥子、山下佳雄 画像診断で頸部リンパ節転移を強く疑ったが組織学的に否定された舌癌の 1 例 日本口腔腫瘍学会誌 29 巻 3 号 p.141-145, 2017
4. 檀上敦、山下佳雄、山口能正、合島怜央奈、野口信宏、井原功一郎、後藤昌昭 レーザー溶接型エピテックシステムを使用した眼窩欠損症例の長期経過 顎顔面補綴 第 39 巻第 2 号 38-43, 2016
5. 金森修一、平岡真寛、福原昇、大泉幸雄、檀上敦、他 放射線照射による白血球減少症に対するセファランチンの臨床効果および有害事象の多施設後方視的共同研究 癌と化学療法 第 43 巻 9 号 1075-1079, 2016
6. Yamashita Y, Inoue M, Aijima R, Danjo A, Goto M Three-dimensional evaluation of healing joint morphology after closed treatment of condylar fractures. Int J Oral Maxillofac Surg. 45(3):292-6, 2016
7. 内田雄基、野口信宏、檀上敦、山下佳雄、後藤昌昭. 下顎の歯科インプラント手術精度向上のためのドリリング技能の評価: 予備的研究 日本顎顔面インプラント学会誌 Vol.14(1),41-46, 2015
8. Uchida Y, Goto M, Danjo A, Yamashita, Shibata, Kuraoka A Anatomical relationship between the sublingual fossa and the lateral lingual foramen. Int J Oral Maxillofac Surg Vol 44, 1146-1151, 2015
9. 山下佳雄、檀上敦、後藤昌昭 保険診療でインプラント治療を行った口腔がん症例 頭頸部癌 Vol.41(4): 432-436, 2015
10. Yoneme H, Hatakeyama J, Danjo A, Oida H, Yoshinari M, Aijima R, Murata N, Watanabe T, Oki Y, Kido MA Milk basic protein supplementation enhances fracture healing in mice Nutrition 31(2): 399-405, 2015
11. 檀上敦、山下佳雄、下平大治、進藤岳郎、内橋和芳、後藤昌昭 Numb chin 症候群として発症したびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫(DLBCL)の 1 例 日本口腔外科学会雑誌 61(1):10-14, 2015
12. 檀上敦、山下佳雄、近藤成智、下平大治、後藤昌昭 外傷による上顎前歯部欠損に対して便宜抜去歯を移植し、矯正治療にて咬合を再構築した 1 例 口腔顎顔面外傷 14:26-31, 2015

[学会発表](計 24 件)

1. 檀上敦、森啓輔、合島怜央奈、靄岡祥子、下平大治、山下佳雄 口腔がん術後に癌性胸膜炎から急速に DIC をきたした 1 例 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017
2. 檀上敦、合島怜央奈、靄岡祥子、近藤成智、隅康二、山下佳雄 超音波骨切削器具と回転切削器具によって生じた骨欠損部の修復様式の比較検討 第 27 回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会, 2017
3. 檀上敦、下平大治、森啓輔、合島怜央奈、山下佳雄 過去 10 年間の当科におけるチタン製再建プレートによる下顎再建症例の検討 第 21 回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2017
4. 下平大治、森啓輔、合島怜央奈、靄岡祥子、檀上敦、山下佳雄 当科におけるインプラント症例の臨床統計 - 使用したインプラント体毎の比較検討 - 第 47 回公益社団法人日本口腔インプラント学会・学術大会, 2017
5. 靄岡祥子、森啓輔、合島怜央奈、下平大治、檀上敦、山下佳雄 歯性感染症が原因で膿胸を併発し不慮の転帰となった症例 第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会, 2017
6. 靄岡祥子、山口能正、合島怜央奈、檀上敦、山下佳雄 終末期患者に対して審美的回復を考慮して作製した顎義歯について 一般社団法人日本顎顔面補綴学会

- 第34回総会・学術大会, 2017
7. 靄岡 祥子, 森 啓輔, 合島 怜央奈, 下平大治, 檀上 敦, 山下 佳雄 上下顎骨骨折患者に対し顎内シーネを用いて咬合再建し観血的整復固定を行った症例 第62回(公社)日本口腔外科学会総会・学術集会, 2017
 8. 山下佳雄, 合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 檀上 敦 大気圧プラズマを用いた口腔がん治療法開発のための基礎研究 第35回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2017
 9. 山下佳雄, 合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦 口腔癌に対する外科手術時に同時インプラント埋入手術は妥当か? 第41回日本頭頸部癌学会, 2017
 10. 檀上 敦, 山下佳雄, 後藤昌昭 口蓋形成術後に抜管困難と判断し人工呼吸管理を要した2例 第40回日本口蓋裂学会総会・学術集会, 2016
 11. 檀上 敦, 合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 下平大治, 山下佳雄 超音波骨切削器具を用いて切削したラット頭蓋骨のX線学的評価 第61回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016
 12. 下平大治, 合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 檀上 敦, 山下佳雄 佐賀大学医学部歯科口腔外科における25年間のインプラント症例の臨床経過 第20回公益社団法人日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会, 2016
 13. 靄岡祥子, 合島怜央奈, 森 啓輔, 下平大治, 檀上 敦, 山下佳雄 口腔粘膜病変に対する臨床的診断の妥当性についての検討 第61回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016
 14. 山下佳雄, 合島怜央奈, 森 啓輔, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦 ヒト口腔癌細胞株に対するプラズマの抗腫瘍効果の検討 第61回公益社団法人日本口腔外科学会総会・学術大会, 2016
 15. 吉武憲子, 檀上 敦, 西村賢二, 隅 康二, 後藤昌昭, 山下佳雄 両側臼歯部咬合支持を喪失した骨格性下顎前突症に対して外科矯正とインプラント補綴で咬合改善を行った1例 第26回特定非営利活動法人日本顎変形症学会総会・学術大会, 2016
 16. Danjo A, Yamashita Y, Aijima R, Katsuki T, Goto M Histological Evaluation of the Bone Healing by Osteotomy with Ultrasonic Osteotomy Devices 22nd International Conference on Oral & Maxillofacial Surgery, 2015
 17. 檀上 敦, 山下佳雄, 下平大治, 靄岡祥子, 井上将成, 後藤昌昭 佐賀大学医学部歯科口腔外科外来を受診した骨代謝調整薬(BMA)使用患者の臨床的検討 第69回日本口腔科学会学術集会, 2015
 18. 下平大治 山下雄平 靄岡祥子 檀上敦 山下佳雄 後藤昌昭 口腔内症状が契機となった多発血管炎性肉芽腫症の一例 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015
 19. 靄岡祥子, 檀上 敦, 下平大治, 山下佳雄, 後藤昌昭 口腔扁平上皮癌におけるEMT関連因子発現の検討 第60回日本口腔外科学会総会・学術大会, 2015
 20. 内田雄基, 檀上敦, 重松正仁, 山下佳雄, 後藤昌昭 上顎骨から蝶形骨翼状突起領域に歯科インプラントを埋入する時の解剖学的危険性: CT計測による研究 第45回日本口腔インプラント学会学術大会, 2015
 21. 山下雄平, 山下佳雄, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦, 後藤昌昭 顎顔面外傷症例に対するインプラント補綴の臨床的検討 第19回日本顎顔面インプラント学会学術大会, 2015
 22. 山下佳雄, 蒲原麻菜, 檀上 敦, 後藤昌昭 口腔腫瘍患者への広範囲顎骨支持型装置および広範囲顎骨支持型補綴の使用について 第33回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会, 2015
 23. 山下佳雄, 下平大治, 檀上 敦, 後藤昌昭 初回口唇形成術時の三角弁の経時的变化 第39回日本口蓋裂学会学術集会, 2015
 24. 山下佳雄, 井上将成, 山下雄平, 靄岡祥子, 下平大治, 檀上 敦, 後藤昌昭 保存的治療後の関節突起骨折部位の3次元の形態評価 第60回日本口腔外科学会学術大会, 2015
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況(計0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:
- 取得状況(計0件)
- 名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:
- 〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檀上 敦 (DANJO, Atsushi)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号：80452712

(2) 研究分担者

山下 佳雄 (YAMASHITA, Yoshio)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：50322300

下平 大治 (SHIMOHIRA, Daiji)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：70594844

靄岡 祥子 (TSURUOKA, Shoko)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：30612353

井上 将成 (INOUE, Masanari)

佐賀大学・医学部・助教

平成 27 年 8 月 24 日削除

研究者番号：10720203

後藤 昌昭 (GOTO, Masaaki)

佐賀大学・その他部局等・理事

研究者番号：10145211

(3) 連携研究者

()

該当者なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

該当者なし