

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15838

研究課題名(和文)小児期の抗癌剤使用に関する小児歯科領域からの提言作成を目指した臨床的・基礎的研究

研究課題名(英文)Clinical and basic investigations for proposal regarding chemotherapy use in pediatric dentistry

研究代表者

仲野 道代(松本道代)(NAKANO, MICHIO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30359848

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文):小児がん患者における永久歯胚形成障害は、歯胚形成時期における抗がん剤の投与が原因であると示唆されている。本研究では、臨床的および基礎的に抗癌剤による歯の形成への影響について検討を行った。乳幼児期に抗癌剤の投与を受けた患者39名のうち、永久歯胚形成障害が認められたのは32名で、短根が最も多く認められた。さらにマウス歯胚を用いて抗癌剤の影響を免疫組織学的に検討したところ、抗癌剤を作用させた歯胚ではサイトケラチンおよびビメンチンの発現が濃度依存的に減少していることが明らかとなった。以上の結果より、抗癌剤が上皮系および間葉系細胞に与える影響により形成障害を発症することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文):Several case reports have described dental anomalies in permanent teeth caused by chemotherapy administration during tooth germ development. In the present study, clinical and basic examinations were performed to investigate the correlation between chemotherapy and dental abnormalities in children. For the clinical research portion, detailed of 39 patients were collected and dental abnormalities determined by viewing orthopantomograph images, which showed their occurrence in 32 cases, with atypical root formation most commonly noted. To investigate the effects of chemotherapy on dental development, immunohistological examinations of tooth germs in a mouse model treated with cyclophosphamide were done. Cytokeratin and vimentin expression levels were decreased in a cyclophosphamide dose-dependent manner, and defective root formation was seen. These results suggest that chemotherapy is strongly correlated with dental abnormalities.

研究分野：小児歯科学

キーワード：抗癌剤 化学療法 永久歯胚 歯科的晩期合併症

## 1. 研究開始当初の背景

乳児期に抗癌剤の投与を受けた小児では、永久歯の欠損、歯根の短小化、歯冠の矮小化、永久歯の萌出遅延および顎の発育不全など、様々な歯科的な晩期合併症が生じる可能性が報告されている。一般的に小児科領域で使用されている現在のガイドラインには、「化学療法を受けていると歯科異常が起こりやすい」と記述されている。「起こりやすい」という曖昧な表現になっているのは、この表現はごく限られた症例報告に基づいた一見解に過ぎず、学術的な検証がなされていないことに起因していると思われる。これまでに、小児癌の治療に用いられている様々な抗癌剤のうち、その全てが歯科異常の原因となるのか、それとも一部のものなのか、時期や量は関連するか等の検討がなされておらず、現時点ではその全容解明には程遠い状況にある。抗癌剤は、その作用機序として DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、DNA 損傷、代謝拮抗、および栄養阻害と様々であり、日常臨床では、ブスルファン、シクロフォスファミド、メルファラン等が用いられており、これらの薬剤を症例に応じて組み合わせた多剤併用療法によるプロトコールによる治療が行われているのが現状である。これまでの限られた知見では、このような多岐にわたるプロトコールの完全把握が困難である。そのため、本研究では、抗癌剤治療を行う医師と連携し、各患児に対する詳細な治療プロトコールの情報を得ることにより歯科的晩期合併症の発症と抗癌剤の関連を明らかにしようとする発想に至った。さらにこの臨床研究において原因となる抗癌剤の特定を行うことができれば、歯の形成に影響を与えると推定される抗癌剤を作用させた状態で、影響を受けた遺伝子およびタンパクの特定を組織学的、分子生物学的に分析を行い、さらに細胞レベルで評価することにより、そのメカニズムの詳細を追究できると考え、本研究を立案するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、全国的な大規模調査を実施し、日常臨床で用いられている各種の抗癌剤が引き起こす各種の歯の形成障害について包括的に検討することである。

(1)大規模全国調査により抗癌剤の種類およ

び投与時期、投与期間、投与量等の各種データを集積し、歯科所見との関連性を検討する。

(2)マウスモデルを用いて抗癌剤の歯胚形成に与える影響を検討する。

(3)マウス歯胚の器官形成における抗癌剤の影響を検討する。

抗剤を作用させた歯胚における歯の形成を確認

歯胚形成において抗癌剤の阻害を受ける遺伝子の特定

免疫組織学的手法による歯胚形成における抗癌剤の阻害を受けるタンパク部位の同定

## 3. 研究の方法

(1)大規模臨床調査

小児白血病研究会に所属する全国 102 施設にご協力いただき、症例および医科調査票を提供してもらうことによりデータを集積する。

歯科調査票およびパノラマエックス線写真の画像分析

歯科における分析は、永久歯胚の欠損部位、歯根の形成状態、歯冠の石灰化と形態、永久歯の萌出遅延（歯牙年齢より算出）を記録する。

歯科的障害を起こす抗癌剤の種類、期間、組み合わせ、投与時期を特定

まず、日常臨床で頻繁に用いられているブスルファン、シクロフォスファミド、メルファランの投与の有無と総投与量についてのデータを分析し、これらのうち、最も永久歯胚の形成に影響を与えている薬剤を特定する。また、これらの組み合わせについても検討を行う。さらに投与期間および投与時期についても影響を与えている薬剤との相関関係を分析する。その他の薬剤に関しても、分析が可能な症例数が集まったものに関して検討する。

(2)器官培養による検討

抗癌剤を作用させた歯胚における歯の形成に關与する遺伝子分布の検討

胎生 17 日の ICR マウス胎仔の下顎第一臼歯胚を実体顕微鏡下にて摘出する。摘出した歯胚を Trowell 変法で、14 日間培養を行う。その際、抗癌剤を歯胚摘出翌日に添加した群と添加しない 2 群に分けて培養を行う。培養

後、組織切片を作製し、歯の形成を組織学的および Cytokeratin、Vimentin、Collagen type I、および Fibronectin に対する抗体を用いて免疫染色を行い観察する。

歯胚形成において抗癌剤の阻害を受ける遺伝子の特定

胎生 17 日の ICR マウス胎仔の下顎第一臼歯胚を実体顕微鏡下にて摘出する。摘出した歯胚を Trowell 変法で、14 日間培養を行う。その際、抗癌剤を歯胚摘出翌日に添加した群と添加しない 2 群に分けて培養を行う。Acid-guanidinium-phenol-chloroform 法に基づき、全 RNA を抽出する。Cytokeratin、Vimentin、Collagen type I、および Fibronectin についてそれぞれコードする遺伝子に特異的なプライマーを設計し、それらを用いて Real-Time RT-PCR を行う。これにより歯胚の分化に特異的な遺伝子の定量を行い、抗癌剤が影響する歯の形成に関連する遺伝子を特定する。

#### 4 . 研究成果

##### (1)大規模調査の結果

乳幼児期に抗癌剤の投与を受けた患者39名のうち、永久歯胚形成障害が認められたのは32名で、82%であった。歯科的晩期合併症の種類としては短根が最も多く、続いて矮小歯、先天欠損、形成不全歯が認められた。矮小歯の発症部位は、第2小臼歯が最も多く、続いて第2大臼歯、第1小臼歯であった。これらの歯種は、出生後から2歳までに歯胚が形成されることから、乳幼児に受けた抗がん剤治療の影響によることが示唆された。また使用された抗がん剤はすべての症例においてシクロフォスファミドであった。さらに造血幹細胞移植を行ったすべての患児で重度の歯科的晩期合併症が発症していた。

(2)臨床研究で得られたデータをもとにシクロフォスファミドの影響について検討した。胎生17日のICRマウス胎仔の下顎第一臼歯胚を実体顕微鏡下にて摘出し、シクロフォスファミドを作用させ、Trowell変法で、21日間培養を行った。その際、抗癌剤を歯胚摘出翌日に添加した群と添加しない2群に分けて培養を行い、培養後14日めおよび21日めの歯胚の組織切片を作製し、歯の形成をH-E染色にて組織学的に観察した。シクロフォスファミドを作用させた群では、作用させていない群と比較して、濃度依存的に内エナメル上皮細胞の

形態が変化しており、同時に外エナメル上皮細胞の配列の乱れも認められた。さらにシクロフォスファミドを高濃度で作用させた場合には、エナメル質の形成量の低下が認められた。さらに歯牙形成に関連する各種タンパクの抗体を用いた免疫染色では、シクロフォスファミドを作用させた歯胚ではサイトケラチンおよびビメンチンの発現が濃度依存的に減少していることが明らかとなった。さらにサイトケラチンおよびビメンチンのRNA発現量はコントロールと比較して有意に減少していた。以上の結果より、シクロフォスファミド上皮系および間葉系細胞におけるタンパクの発現を阻害し、形成障害を発症することが明らかとなった。

#### 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)

[学会発表](計6件)

角田陽子、大川玲奈、高島由紀子、仲周平、仲野和彦、仲野道代、マウス歯胚の歯根形成における遺伝子発現への抗がん剤の影響、第55回日本小児歯科学会、2017年5月25日、西日本総合展示場(福岡県小倉市)

仲野道代、ALLにおける歯科的晩期合併症の臨床的・基礎的研究、第21回JACLS総会、2017年5月27日、大阪大学病院オンコロジセンター(大阪府吹田市)

角田陽子、吉田衣里、森川優子、森本節代、吉田翔、松三友紀、高島由紀子、平野慶子、仲周平、稲葉裕明、仲野道代、小児がん治療において化学療法を施行された患児の実態調査、第38回岡山歯学会、2017年10月1日、岡山大学歯学部(岡山県岡山市)

仲野道代、小児がん患者における口腔ケア、第59回日本小児血液・がん学会、2017年11月11日、ひめぎんホール(愛媛県松山市)

Tsunoda Y, Hirano K, Takashima Y, Okawa R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M, Correlation between chemotherapy for childhood cancer and dental developmental defects, 94<sup>th</sup> International Association of Dental research, June 23, 2016, (Seoul,

Korea)

森本節代、高島由紀子、平野慶子、吉田衣里、森川優子、仲野道代、小児がん治療における化学療法が歯牙形成に与える影響、第 63 回日本小児保健学会、2016 年 6 月 25 日、大宮ソニックシティ(埼玉県大宮市)

〔図書〕(計 1 件)

仲野道代 他、永末書店、がん口腔支持療法、2017 年、261-269

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

仲野道代(松本道代)(NAKANO, Michiyo)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：3 0 3 5 9 8 4 8

### (2)研究分担者

平野慶子(HIRANO, keiko)  
岡山大学病院・助教  
研究者番号：5 0 3 3 5 6 1 8

大川玲奈(OKAWA, Rena)  
大阪大学歯学部附属病院・講師  
研究者番号：8 0 4 3 7 3 8 4