

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592497

研究課題名（和文）放射線療法を受けた顎骨組織のインプラント補綴による力学的反応

研究課題名（英文）Response of irradiated tissue supporting implant prosthesis under the compressing force.

研究代表者

友竹 偉則（TOMOTAKE YORITOKI）

徳島大学・病院・講師

研究者番号：70263853

研究成果の概要（和文）：放射線治療後のインプラント補綴治療における力学的負荷の影響を検討することを目的として、マウス骨芽細胞様細胞株に放射線を照射後、圧縮力を加えて、アポトーシス経路に関与する遺伝子発現状態を検討した。Caspase 活性は放射線強度を増加させると有意に増加し、メカニカルストレスの負荷により減少した。放射線照射後のメカニカルストレスの負荷によりアポトーシスを回避する遺伝子発現の上昇が認められた。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to estimate the response of the irradiated tissue added the compressing force. Mouse osteoblast-like cells were compressed directly after the irradiation, gene expression of apoptosis channel was examined. Activation of caspase significant increased with stronger radiation, and decreased with the compressed force. It was recognized that gene expression related to prevention of apoptosis were increased under the compressing force.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯学，インプラント補綴，放射線障害，骨芽細胞様細胞，持続的圧縮力

1. 研究開始当初の背景

口腔領域の悪性腫瘍などで顎骨を切除することを余儀なくされた患者にとって、再建は唯一の救いであり、QOL（生活の質）の維持を考える上からは顎骨－歯槽骨－歯列の再建に骨移植や骨造成を併用したインプラント補綴治療の有用性は非常に高い。

口腔領域の悪性腫瘍の治療法には、主たる

外科治療とともに放射線療法、化学療法が行われている。周知のように放射線治療では外科的切除の縮小が期待でき、形態の維持と機能の温存が図れる。しかし、照射野に含まれる正常組織は線量に応じて放射線の影響を受け、放射線による障害の種類や程度は、放射線治療の方法や線量に依存する。また、正常組織や臓器に対する放射線の影響、すなわち放射線障害は、早期障害（急性期反応）と

晩発性障害に分けられる。

腫瘍に対する治療後の補綴治療と密接に関わる晩発性障害については、①粘膜の非薄化と毛細血管拡張症、②骨露出と放射線骨壊死、③皮膚・粘膜下組織の繊維化、④唾液腺障害、が挙げられる。放射線治療を受けた患者には、このような障害が潜在的に存在するため、放射線治療後の補綴治療に移行するには長期間の経過観察が必要とされているが、このような障害は時間的経過によっても修復されるものでないため、いわゆる補綴治療に移行する「安全な時期」は存在しないものと考えられる。特にインプラント治療にとって骨のリスクは重要な問題である。放射線骨壊死や骨髄炎は顎骨では下顎に多く、照射完了から数週、さらには10年までの間に生ずるといわれている。術後経過の良好な時点で補綴処置による機能回復を図ったとしても骨露出や骨壊死が生じることもあるため、潜在的な障害が顕在化しないように細心の注意を払いながら経過を追う必要がある。このような臨床的背景を踏まえた上で、放射線照射を受けた細胞への力学的負荷（メカニカルストレス）が与える影響を考察していく必要があると考えられる。

我々はこれまでに骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）にガラスシリンダーを用いて直接細胞に持続的圧縮力を加える実験系を用い、マイクロアレイ法により発現の上昇する遺伝子を網羅的に解析した。その結果、プロスタグランジン合成酵素である COX-2 遺伝子やアルカリフォスファターゼ遺伝子（ALP）、Bone Morphogenetic protein（BMP）などの骨芽細胞の分化に関係する遺伝子の発現が上昇し、圧縮力により骨芽細胞様細胞の分化が促進されることを示した。さらに、インテグリンが圧縮力を感知し、FAK（focal adhesion kinase）を活性化し MAPKinase シグナル伝達系である MEK から ERK を介して Hsp25（heat shock protein 25）の発現を誘導していることも見出してきた。

2. 研究の目的

本研究では、直接細胞に持続的圧縮力を加える実験系を用いて、放射線を照射した細胞の遺伝発現を解析することで、放射線治療後のインプラント補綴治療における力学的負荷の影響を検討することを目的とした。

マウス骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）に実験から設定した線量の放射線を照射後、一定範囲の荷重条件でメカニカルストレスを加

えて、照射前・後の細胞から抽出したタンパク質より、アポトーシス経路に関するタンパク発現を検討した。

これらのタンパク発現のうちの Hsp25 は、細胞に熱や放射線などの物理学的ストレスや、亜ヒ酸やシンバスタチンなどの化学物質、活性酸素などの化学的ストレスが加わることにより誘導され、再度のストレスに対する耐性の獲得や細胞機能の制御に関与すると考えられている。これまでの我々の実験系において、特異的に発現上昇することを見出している。この Hsp25 に着目し、本研究において、メカニカルストレスの指標として成りえるかについても検討した。

3. 研究の方法

1) 至適放射線量の測定

実験条件の設定の検索では、マウス骨芽細胞株（MC3T3-E1）を 100mm プラスチックシャーレにおいて $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ を 5% CO₂、37°C 条件下で 24hr 培養した。

照射線量の設定実験として、0、1、2、5、10Gy の放射線を照射し、更に 24hr 培養した後に、細胞数のカウントを行い、生育能への影響が比較的少ない照射量を決定した。

2) メカニカルストレスの負荷

MC3T3-E1 を 6 well dish 又は 100mm プラスチックシャーレで各々 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 、 $1.0 \times 10^6/\text{ml}$ 、5% CO₂、37°C 条件下で 24hr 培養し、設定した放射線を照射した後、更に 24hr 培養し、その後 294Pa の荷重を 24hr 負荷した。control としては負荷を与えずそのまま 24hr 培養を行った。

3) アポトーシス関連タンパク質の測定

メカニカルストレスを負荷した後、trypan blue 染色を行い生細胞及び死細胞のカウントを行った。同時に、Caspase-Glo™ Assay を用いて Caspase 活性をルミノメーターにて測定した。

同様の条件で、タンパク質を Whole Protein、Cytosolic Protein、Nuclear Protein に分け抽出した後、ウエスタンブロッティング（Western blotting; WB）を行い、アポトーシス関連タンパク質である Hsp25、AKT、PTEN、ERK、p38 等を検討した。

4) 放射線照射によるメカニカルストレスシグナル伝達経路への影響

メカニカルストレスシグナルであるインテグリン-FAK(focal adhesion kinase)-

MEK-ERK-Hsp25 経路が放射線照射後にどのように変化するかを検討するため、qRT-PCR では、Hsp25、COX-2、c-fos、Bax といった遺伝子についての解析を行った。

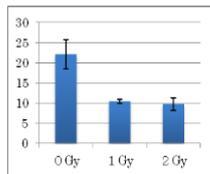
さらに、抗リン酸化 Hsp25 抗体を用いたウェスタンブロッティング法により、Hsp25 活性を検討した。

4. 研究成果

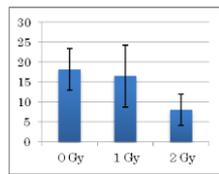
実験条件の設定の検索では、MC3T3-E1 を 24hr 培養し、0、1、2、5、10Gy の放射線を照射し、更に 24hr 培養した細胞数をカウントしたが、5Gy 以上の線量では細胞の生存が過少であった。その結果から、5Gy 以上の線量では細胞の生存が過少であり、これらの試験に対する照射条件には適さなかったことから、実験での至適照射量としては 2Gy までとした。

細胞数 (IR のみ)

全細胞数



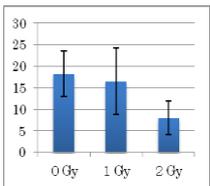
死細胞数



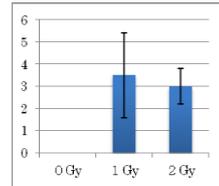
放射線強度を増加させると細胞数が減少し、死細胞数は、0Gy と 2Gy で有意差が認められた。メカニカルストレスの付与により細胞数に有意差は認められなかったが、死細胞数は減少傾向にあった。

細胞数 (IR + Compressed Force)

全細胞数



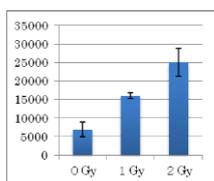
死細胞数



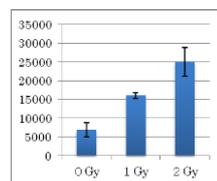
Caspase-Glo™ Assay を用いて Caspase 活性をルミノメーターにて測定した。Caspase 活性は放射線強度を増加させると有意に増加し、メカニカルストレス負荷により減少した。

Caspase 活性 (IR 時)

Caspase3/7

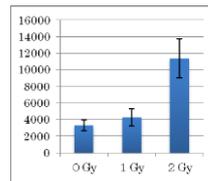


Caspase9

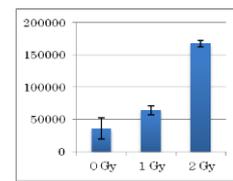


Caspase 活性 (IR + Compressed Force)

Caspase3/7



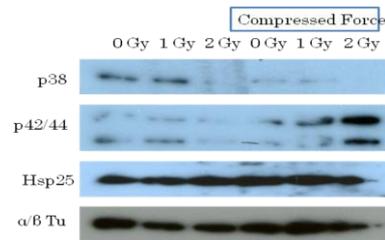
Caspase9



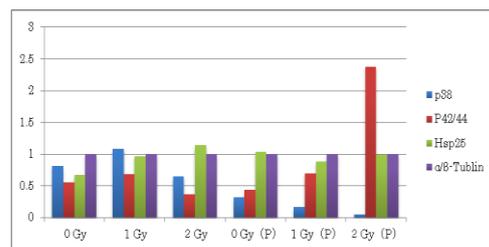
一方、Caspase 活性は放射線強度を増加させると有意に増加し、メカニカルストレス負荷により減少した。同様の条件で、タンパク質を Whole Protein、Cytosolic Protein、Nuclear Protein に分け抽出した後、ウェスタンブロッティング (Western blotting; WB) を行い、アポトーシス関連タンパク質である Hsp25、AKT、PTEN、ERK、p38 等を検討した。

どのタンパク質も発現は認められたものの、その差は小さかった。しかし、その中において Whole Protein、2Gy、294Pa 加圧条件下において ERK の発現上昇が認められた。活性化型タンパク質であるリン酸化分子は認められなかった。

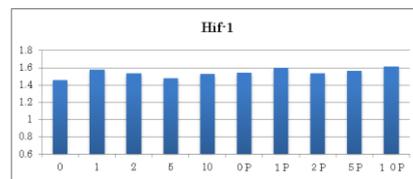
WB (Whole Protein 2)



WB (Whole Protein 2)

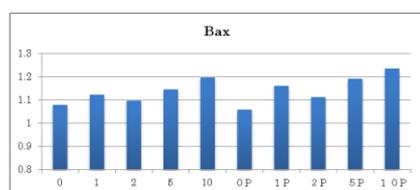
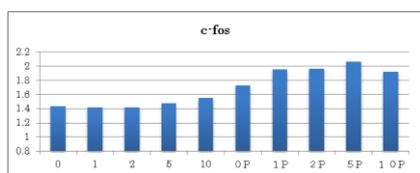
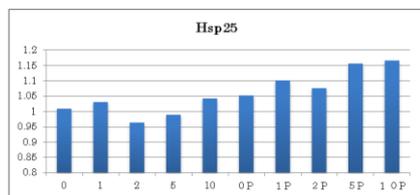


qRT-PCR に関しては、対象が少量でも可能なことから、条件設定における細胞数カウントが過少であった 5、10Gy の放射線照射群についても解析を行った。



Hif-1 の発現上昇が認められなかったため、圧縮時に生じる無酸素状態の影響は少ないと考えられる。GAPDH が安定せず、WB で骨格系タンパクが不安定であったため、TBP の発現を内部コントロールとした。

アポトーシスに關与する Hsp25、COX-2、c-fos、Bax といった遺伝子発現についての解析を行った。



結果は、加圧群において、アポトーシスを回避する働きの遺伝発現である Hsp25、c-fos の発現が上昇し、照射線量が増加すると共に上昇していくことが認められた。COX-2 も同様の傾向を示したが、発現の程度にばらつきがあった。Bax はコントロール群、加圧群ともに照射線量の増加によって遺伝発現が上昇していた。今回の実験では、Hif-1 の発現上昇は認められなかったため、圧縮時に生じると考えられる無酸素状態の影響は少ないと考えられる。また、GAPDH が安定せず、WB で骨格系タンパクが不安定であったため、TBP の発現を内部コントロールとした。

本研究の結果から、本実験系においては放射線照射によってダメージを受けた細胞にメカニカルストレスを付与することで細胞活性が高まる可能性が示唆された。

しかしながら、本実験では MC3T3-E1 に直接刺激を付与することから、細胞の育成管理に問題も多かった。今後も継続して放射線照射の条件とメカニカルストレスの負荷条件、ならびに時間的な条件も加味して、放射線照射及びメカニカルストレス負荷時におけるアポトーシスのシグナル伝達について明らかにしていく。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友竹 偉則 (TOMOTAKE YORITOKI)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：7 0 2 6 3 8 5 3

(2) 研究分担者

長尾 大輔 (NAGAO DAISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス

研究部・助教

研究者番号：9 0 4 3 2 7 4 9

研究分担者

内藤 禎人 (NAITOU YOSHIHITO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：2 0 5 0 9 7 7 3