

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592945

研究課題名(和文) 口腔癌の顎骨浸潤・骨破壊に対するPTH・COX-2による新たな治療戦略

研究課題名(英文) A research for new treatment with parathyroid hormone and cyclooxygenase-2 for mandibular bone invasion by oral squamous cell carcinoma

研究代表者

里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70276921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の顎骨浸潤におけるcyclooxygenase-2 (COX-2)を介するシグナルによって調節される parathyroid hormone (PTH)の作用を解析し、新たな治療法について検討した。PTHrP, COX-2 の発現量の異なる2種類のマウス扁平上皮癌細胞株(NR-S1, SCC)を用いて顎骨浸潤モデルを作製してCOX-2 inhibitorの投与実験を行った。腫瘍体積、破骨細胞数、マイクロCT解析および破骨細胞関連サイトカインの定量を行った。破骨細胞関連サイトカインの解析が顎骨浸潤の評価に有用であり、COX-2・PTHrPの抑制は新たな顎骨浸潤の治療になりえると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aims of this study were to investigate the role of parathyroid hormone (PTH) up regulation by the cyclooxygenase-2 (COX-2) signaling pathway in bone invasion using oral squamous cell carcinoma (OSCC) mouse bone invasion model and to clarify new treatments of OSCC invasion into the jaw bone. We used 2 mouse SCC lines (NR-S1, SCC7) with different expressions of PTHrP and COX-2. C3H/HeN mice were inoculated with these cells in the masseter region to establish an animal model of mandibular invasion by OSCC. We measured tumor sizes of the mice, analyzed mandibular invasion by OSCC using micro-CT, then examined the TRAP staining and number of osteoclasts, and determined the mRNA expression of osteoclast-related cytokines by real-time PCR. We suggest that osteoclast-related cytokines play important roles in the bone invasion by OSCC cells. Consequently, PTHrP inhibition by COX-2 signaling is expected to be a therapeutic target to prevent bone invasion by OSCC cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔癌 顎骨浸潤 PTH COX-2

1. 研究開始当初の背景

口腔癌、なかでも歯肉癌では比較的早期に癌細胞の顎骨への浸潤による骨破壊が認められる。この骨浸潤・骨破壊は、治療法の選択、手術範囲の決定、そして予後を左右する大きな要因となっている。また、骨浸潤・骨破壊による癌性疼痛は患者のQuality of Lifeを著しく低下させる。従って、癌の骨への浸潤、あるいは浸潤した癌細胞の骨内での増殖を制御することは临床上極めて重要な課題である。癌細胞の顎骨への浸潤、増殖は、破骨細胞性骨吸収に引き続いて起こることが知られている。すなわち、癌細胞が直接、骨を破壊し進展して行くのではなく、癌により誘発された破骨細胞が活発に骨吸収を起こし、骨吸収によって生じた部分に癌細胞が進展していく。これは骨に特異的な病態であり、骨に対する臓器特異的治療である破骨細胞性骨吸収阻害を中心とした新たな治療が癌の骨破壊や骨内での腫瘍増殖を抑制する可能性が示唆される。骨代謝において重要な mediator である prostaglandin(PG)は constitutive enzyme の cyclooxygenase-1(COX-1)と cytokine や hormone などの刺激により誘導される inducible enzyme の COX-2 が存在する。COX-2 ノックアウトマウスを用いた *in vitro* および *in vivo* の実験系で、PTH 刺激による破骨細胞形成は、ノックアウトマウス骨髄培養において野生型マウスよりも 70%低下し、この破骨細胞形成の低下は PGE₂ 投与によって消失すること、PTH の頭蓋骨への 3 日間投与により野生型マウスでは高 Ca 血症をきたしたが、ノックアウトマウスでは血清 Ca 上昇が認められなかったことなどから、PTH 投与による骨代謝回転が COX-2 を介していることが示唆されている(Okada et al. JBO, 2003)。COX-2 の過剰発現は、アポトーシス抵抗性の獲得、血管新生促進、宿主の免疫力低下に加え、癌の浸潤・転移に関与することが報告されている。特に COX-2 と癌浸潤の関係につい

ては、細胞外基質を分解し癌の浸潤・転移に関与することが知られている基質分解酵素 matrix metalloproteinase-2(MMP-2)や MMP-9 の発現を選択的 COX-2 阻害剤が抑えることで癌の浸潤能を抑制するといわれ、また、COX-2 阻害剤は、破骨細胞数を減少させ、癌細胞のアポトーシスを誘導することで骨転移を抑制するともいわれている(Tang et al. Cancer Res, 2002; Leung et al. Int J Oncol, 2003; Yao et al. Br J Cancer, 2004)。PTH の骨組織に対する多彩な作用は、COX-2 を介するシグナルによって調節されている可能性が高いが、COX-2 を介したシグナルによる骨形成作用や顎骨浸潤について十分に検討されていない。これに対し、われわれはこれまでの担癌マウスモデルや COX-2 ノックアウトマウスを用いた実験アプローチで口腔癌の顎骨浸潤における COX-2 を介するシグナルによって調節される PTH の作用を解明し、口腔癌の顎骨浸潤・骨破壊を抑制する新たな治療法の可能性について検討する。

2. 研究の目的

口腔癌の顎骨浸潤・骨破壊における cyclooxygenase-2 (COX-2)を介するシグナルによって調節される parathyroid hormone (PTH)の作用を解明する。そして最終的には、患者の QOL 低下を招く顎骨壊死を誘発する破骨細胞性骨吸収阻害剤 Bisphosphonate(BP)製剤に替わる新たな COX-2 阻害剤と PTH による治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 2 種類のマウス扁平上皮癌の比較

(*in vitro*)

マウス扁平上皮癌である NR-S1 細胞株と SCC 細胞株を Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)に 10% fetal bovine serum (FBS)とペニシリン G 100U/ml とストレプトマイシン 100 µg/ml を加えた培地を用いて、37 °C 5%CO₂ の条件下で培養して、PTHrP

mRNA と COX-2 mRNA の発現量を比較検討した。

(2) マウス扁平上皮癌移植の顎骨浸潤モデルの作製と薬物投与 (in vivo)

体重 2.0g 前後の雄性 C3H/HeN マウスに、NR-S1 細胞、SCC 細胞を 1×10^7 cells/ml に調整した SCC 細胞をマウスの左側咬筋内に 0.1ml 注入し、3 週間通常飼育を行った。実験動物の取り扱いには東京医科大学動物実験指針に従った。

・ COX-2 阻害剤投与

COX-2 阻害剤 (Celecoxib: Pfizer, USA) の原末を 20mg/kg に調整した 0.2ml 懸濁液として実験に使用した。投与開始は腫瘍移植後 4 日目とし、連日 14 日間の経口投与を行った。同様に対照群は生理食塩水を腫瘍移植後 4 日目から連日 10 日間投与した。実験群は、NR-S1 群 (n=10)、NR-S1 + COX-2 inhibitor 投与群 (n=10)、SCC 群 (n=10)、SCC + COX-2 inhibitor 投与群 (n=10) とした。

(3) 抗腫瘍効果

経時的な体重変化と腫瘍体積を算出した。腫瘍体積は (長径) \times (短径)² \times 0.5 で求めた。

(4) マイクロ CT による 3 次元的形態計測

(5) 病理組織学的顎骨浸潤の評価と破骨細胞数の比較、COX-2, PTHrP の発現に関する免疫組織化学的解析および破骨細胞関連サイトカインの定量解析

H E 染色および Tartrate Resistant Acid Phosphatases (TRAP) 染色を行った。TRAP 染色は 10% EDTA 水溶液で脱灰した後パラフィン包埋し、TRAP Kit (和光純薬社製) を用いて行った。その後、画像解析システム (Tissue Studio Ver3.5; Definiens社製) を用いて顎骨浸潤部における破骨細胞数を計測した。また、抗マウス COX-2、PTHrP モノクローナル抗体

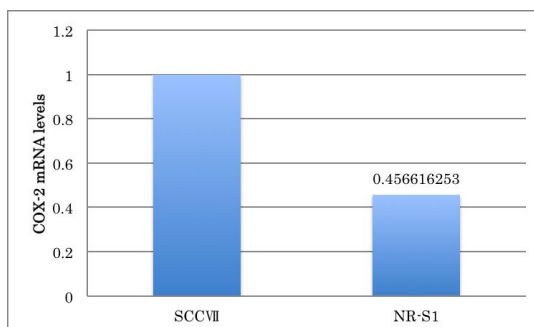
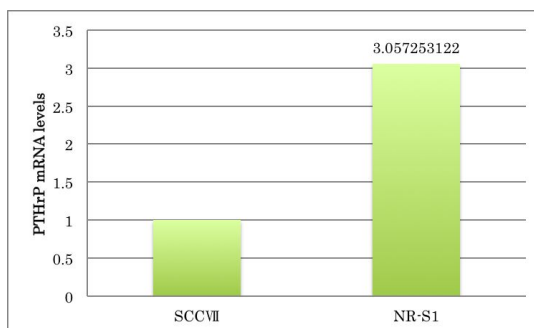
(Santa Cruz社製) と LSAB kit (DAKO社製) を用いて免疫組織化学的染色を行った。

その後、腫瘍細胞より産生する COX-2、IL-6、PTHrP、TNF- α 、RANK、RANKL、および osteoprotegerin の mRNA 量を real-time PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) 2 種類のマウス扁平上皮癌の PTHrP mRNA と COX-2 mRNA の発現量 (in vitro)

マウス扁平上皮癌である NR-S1 細胞株と SCC 細胞株を培養して、PTHrP mRNA と COX-2 mRNA の発現量を比較検討した結果、NR-S1 細胞株は SCC 細胞株より、約 3 倍の PTHrP mRNA を発現し、COX-2 mRNA の発現は、SCC 細胞株の方が、NR-S1 細胞株より約 2 倍高かった。



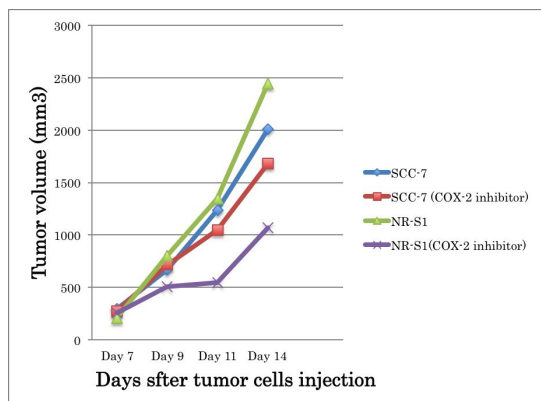
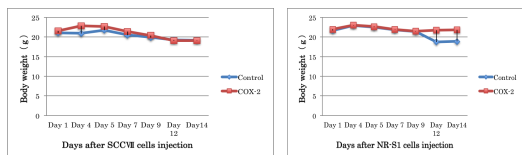
(2) マウス扁平上皮癌移植の顎骨浸潤モデル NR-S1 細胞株、SCC 細胞株とも移植 2 週後に著明な腫瘍の増殖が認められた。

(3) 体重変化と抗腫瘍効果

NR-S1、SCC の両移植群とも COX-2 inhibitor 連日投与による体重減少は認められなかった。

腫瘍体積は、移植 14 日目の平均で NR-S1 群 2442.04 mm³、NR-S1 + COX-2 inhibitor 投与群

1070.16 mm³、SCC 群 2012.26 mm³、SCC + COX-2inhibitor投与群 1681.68 mm³であった。NR-S1, SCC の両移植群ともCOX-2 inhibitor投与群が、非投与群に比較して腫瘍増殖の抑制が認められた。



(4) マイクロCTによる3次元形態解析

NR-S1群、SCC 群において下顎骨や顔面骨に対し著明な骨吸収を認めた。



顎骨浸潤モデルの3D-μCT画像
左側下顎骨や頬骨弓に骨吸収像が認められる

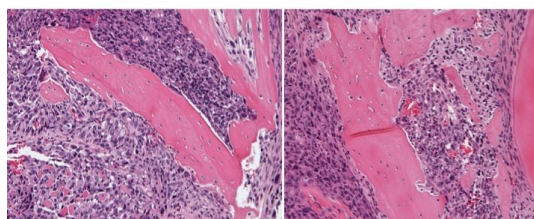
COX-2inhibitorを投与群でPTHrP低発現のSCC 移植群において腫瘍は増大しているにもかかわらず顎骨浸潤は抑制されていた。(未発表)

(5) 病理組織学的顎骨浸潤と破骨細胞数およびCOX-2, PTHrPの発現量および破骨細胞

関連サイトカインの比較

病理組織学的所見では、すべての腫瘍移植群で顎骨内に腫瘍細胞が索状に浸潤し、据歯状の骨吸収像を示していた。TRAP染色の所見では、吸収した顎骨周囲に破骨細胞の集積を認めた。各群における破骨細胞数の平均値(破骨細胞数/2500 μm²)を比較するとNR-S1群 10.5 cells、NR-S1 + COX-2inhibitor投与群 4.5 cells、SCC 群 5.7 cells、SCC + COX-2inhibitor投与群 3.5 cellsであった。NR-S1, SCC の両移植群ともCOX-2 inhibitor投与で破骨細胞数が減少した。COX-2 inhibitorを投与し、COX-2の発現を抑制した状態で、PTHrP産生能の違いのみで比較すると、PTHrP高発現のNR-S1移植群は低発現のSCC 移植群に比して破骨細胞数の増加と顎骨浸潤の形成がより多く認められた。

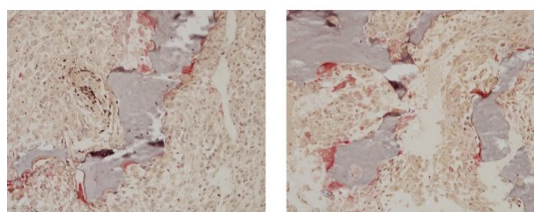
H-E染色 (Original magnification ×200)



SCCVII NR-S1

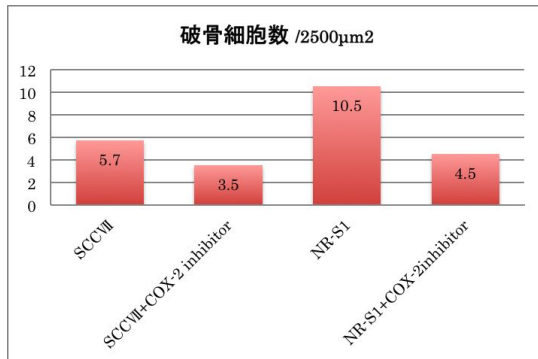
腫瘍細胞の顎骨浸潤を認める

TRAP染色 (Original magnification ×200)

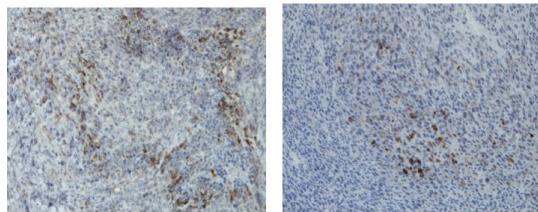


SCCVII NR-S1

腫瘍の顎骨浸潤部に破骨細胞の集積を認める



COX-2 (Original magnification \times 200)



SCCVII

NR-S1

腫瘍細胞のCOX-2発現

COX-2inhibitorの投与による破骨細胞数の減少は認められたが、PTHrP発現量の変化については、現在、real-time PCRでmRNA量を解析中である。また、PTHrP高発現のNR-S1移植群のCOX-2inhibitor非投与群においてRANKL, RANK, IL-6, TNF- α のmRNA発現量がPTHrP低発現のSCC 移植群のCOX-2inhibitor投与群に比較してやや高い傾向がみられているが、再現性のある結果を得られていないため、現在、再実験中である。以上より、破骨細胞関連サイトカインの発現解析が口腔癌における顎骨浸潤能の評価に有用と思われた。また、PTHrPの低発現は高発現に比して破骨細胞数の減少と顎骨浸潤の抑制が認められ、かつ、COX-2inhibitorの投与で、更に破骨細胞数の減少が認められたことで、COX-2とPTHrPの発現を抑制することは新たな顎骨浸潤の治療になりえると考えられた。

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)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Satomi T, Kohno M, Enomoto A, Abukawa H, Fujikawa K, Koizumi T, Chikazu D, Matsubayashi J, Nagao T. Solitary myofibroma of the mandible: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. Med Mol Morphol 2014. in press.
DOI:10.1007/s00795-013-0062-8
(査読有)
2. Satomi T, Hasegawa O, Abukawa H, Kohno M, Enomoto A, Chikazu D, Matsubayashi J, Nagao T. Exceptionally large solitary fibrous tumor arising from the cheek: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. Med Mol Morphol 47(2): 108-116, 2014. (査読有)
3. Kohno M, Watanabe M, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Chikazu D, Cyclo-oxygenase-2 expression is associated with vascular endothelial growth factor C expression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg 71(10):1694-1702, 2013. (査読有)
4. Fujikawa K, Abukawa H, Hasegawa O, Satomi T, Odan N, Matsuo A, Chikazu D. Clinical application of polyglycolic acid sheet after resection of tongue squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 25(3): 221-225, 2013. (査読有)
5. Satomi T, Kaneko T, Abukawa H, Hasegawa O, Watanabe M, Matsubayashi J, Nagao T, Chiba H, Chikazu D. : Chondrosarcoma of the maxilla extending to the pterygomandibular space: A case report and review of the literature. J

Maxillofac Oral Surg 2012
DOI:10.1007/s12663-012-0367-5

(査読有)

6. Satomi T, Watanabe M, Kaneko T, Matsubayashi J, Nagao T, Chiba H. : Radiation-induced malignant fibrous histiocytoma of the maxilla. Odontology 99: 203-208, 2011. (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 里見 貴史: 日常臨床における口腔がんへの対処のしかた; 埼玉県日本歯科大学校友会「埼玉富士見クラブ」主催学術講演会, 2012年12月2日, 埼玉県大宮歯科医師会会館, 大宮
2. 河野通秀, 渡辺正人, 長谷川 温, 虻川 東嗣, 里見貴史, 近津大地: 口腔扁平上皮癌における Cyclooxygenase2(COX2)発現とリンパ節転移について. 2012年6月7-8日, 島根県民会館, 松江
3. 里見 貴史: 知っていますか? 口の中のがんのこと~口腔がんの予防と早期発見; 第65回東京医科大学病院市民公開講座, 2012年4月16日, 東京医科大学病院6F臨床講堂, 東京
4. Masato Watanabe, Michihide Kohno, On Hasegawa, Harutsugi Abukawa, Takafumi Satomi, Tadayosi Kaneko, Akira Matsuo, Daichi Chikazu: Effects of metabolic enzymes associated with fluoropyrimidine sensitivity in oral squamous cell carcinoma. IA00 3rd World Congress, 2011.7.14-17, Singapore

〔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

6. 研究組織
(1)研究代表者
里見 貴史 (SATOMI, TAKAFUMI)
東京医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70276921

(2)研究分担者
續 雅子 (TSUZUKI, MASAKO)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40385092

虻川 東嗣 (ABUKAWA, HARUTSUGI)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50453717

渡辺 正人 (WATANABE, MASATO)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40349460

長谷川 温 (HASEGAWA, ON)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号: 50424619

水口 純一郎 (MIZUGUCHI, JUNICHIROU)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 20150188

近津 大地 (CHIKAZU, DAICHI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30343122

(3)連携研究者

()

研究者番号: