

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792150

研究課題名(和文)悪性腫瘍の核内蛋白ダイナミクスと核医学の戦略的融合

研究課題名(英文)Strategic fusion of nuclear proteins dynamics of the malignant tumor and nuclear medicine

研究代表者

鬼頭 慎司(Kito, Shinji)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：80347682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト扁平上皮癌細胞や顎下腺癌細胞に紫外線でアポトーシスを誘導し、蛋白解析や免疫組織化学解析を行った。紫外線によるアポトーシス誘導で核内蛋白であるニュークレオリンやAgNORs 蛋白は大きくその量を変化させた。また蛍光顕微鏡による観察でその局在は激変した。核医学的には歯性感染による歯槽骨吸収が進行するにつれて18F-FDG集積の程度は強くなった。また、口腔癌の患者において悪性腫瘍以外の非特異的集積について調べた。悪性腫瘍の原発巣とこれまで報告されてきた舌下腺、口蓋扁桃、咽頭扁桃、舌扁桃以外にも舌前方の内舌筋に全患者の89%、口輪筋に64.6% 及び顎骨に多数の集積があった。

研究成果の概要(英文)：Dynamic alteration of nucleolin and AgNORs proteins in UV-induced SCC-25 and HSG cells were examined using Western blot analysis and histocytochemistry methods. Dynamic alteration of nucleolin and AgNORs proteins are observed. With regard to nuclear medicine, A significant correlation was found between the size of bone resorption area by periapical or periodontal inflammation and standardized uptake value with the highest point (SUVmax) of 18F-FDG accumulations. 18F-FDG accumulations could exactly reflect the extent of the dental inflammation. 18F-FDG-PET-positive areas, excluding primary tumors, included the front intrinsic muscles of the tongue (89.0%), upper and lower marginal parts of the orbicularis oris muscle (64.6%), sublingual glands, palatine tonsil, pharyngeal tonsil, and lingual tonsil. In addition, some areas in the jaws also showed accumulation.

研究分野：歯科放射線学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：nucleolin nucleophosmin アポトーシス 18F-FDG-PET-CT 辺縁性歯周炎 根尖性歯周炎 生理的集積 舌

1. 研究開始当初の背景

これまでにアポトーシスの動向を分子レベルで解明する研究が精力的に行われてきている。アポトーシスの基本的骨格が次々と明らかになり、その大筋は理解されてきている。ところが細胞腫による相違等、今なお不明な部分が多い。新規の関連遺伝子産物が同定され、新しいシグナル伝達経路が明らかになっている。我々はこれまでに特定分子の蛋白質リン酸化状態の変化に伴い培養細胞にアポトーシスが生じ、その誘導経路の一部においては FasL/Fas 系を含むアポトーシス関連遺伝子産物が関与していることを報告した(Morimoto Y., Kito S. et al.2000)。さらに蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤によるアポトーシス誘導細胞においてはカバーガラス上で鍍銀染色に陽性反応を示す AgNORs の局在が変化し、また蛋白質を転写したPVDF 膜上で抗体を用いず、鍍銀染色で強く反応する 110 kDa の核内蛋白質が消失し、新たに 80 kDa の蛋白質が出現してくることを発見した(Morimoto Y., Kito S. et al.2001)。さらにこの 80 kDa の蛋白質が抗体反応によりニュークレオリンの分解産物であり、鍍銀染色の結果と完全に一致することを世界で初めて明らかにした(Kito S. et al.2003)。この現象は抗癌剤処理を施した顎下腺癌由来細胞においても同様に認められ、ニュークレオリンと AgNOR proteins の変化が DNA の断片化とアポトーシスの最終実行機構に関与している可能性が示唆された(Kito S. et al.2005)。これらの現象は放射線や各種薬剤による細胞のアポトーシス誘導をより簡易に示すことの出来る指標の一つとして確立出来ると考えた。またニュークレオリン分解の調節機構がアポトーシスの実行機構や抗癌剤の細胞障害性を制御する可能性があるものとして、分

子イメージングの対象、新しい抗癌剤の開発、疾患治療の分子標的となりうると期待した。また、¹⁸F-FDG-PET-CTの臨床応用が進み、¹⁸F-FDG集積と細胞増殖能との関連の分析が可能となってきた。

2. 研究の目的

(1) 今回の研究において我々は UV 照射を行った悪性腫瘍細胞におけるアポトーシス関連遺伝子産物について細胞化学的及び生化学的に解明していく。特に鍍銀染色に対して強力な陽性反応を示す 110 kDa のニュークレオリンとその分解産物である 95 kDa と 80 kDa の蛋白質とその他の鍍銀染色陽性蛋白質も含め、これらの役割を解明していく。細胞増殖と密接に関与するニュークレオリンやニュークレオフォスミンといった核内蛋白質群が分子イメージングや治療上の分子標的の対象となる可能性を秘めるものであるのかを考察し、究極的には悪性腫瘍の予後の判定も含めて総合的な診断、治療法の構築を目的とするものである。

上記の歯科基礎医学的な研究と臨床核医学的な研究との融合を探る為の足がかりとして、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎と¹⁸F-FDG 集積との関係を調べる。また、口腔癌の患者において悪性腫瘍以外の非特異的集積について調べる。

3. 研究の方法

(1) 口腔扁平上皮癌細胞 (SCC-25) とヒト顎下腺癌由来唾液腺細胞 (HSG) を通法通り培養する。市販のUV 照射装置を工夫して用い、培養細胞の入ったシャーレに適正な量のUV 照射を行う。

細胞のアポトーシスを確認後、通法通りに SDS-PAGE 電気泳動法で蛋白質を分離し、PVDF 膜上に転写し、膜上で硝酸銀を用いた

独自の(Morimoto Y.,Kito S.et al.2001)、(Kito S.et al.2003)、(Kito S.et al.2005)鍍銀染色を行う。膜上の 110 kDa の蛋白とその分解産物である 95kDaと 80kDa の蛋白を検出する。抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロットティングを行い、これらの蛋白を検出する。さらにこのニュークレオリンの変化が遺伝子レベルで調節されているかどうかを調べるためPCR 法、ノーザンブロットティング を行い、mRNA の発現量の変化を蛋白量の変化と比較する。

ニュークレオリンとニュークレオフォスミンの siRNA を作製し、RNA 干渉を用いた遺伝子のノックアウトの系を構築し、核内蛋白の役割や機構を解明していく。

導き出された結果から NORs 構成蛋白の腫瘍細胞における意義を総括し、より正確で再現性のある診断と治療を行うことが出来る指標を作り出していく。

臨床核医学的には辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎と 18F-FDG 集積との関係を調べる。また、口腔癌の患者において悪性腫瘍以外の非特異的集積について調べる。18F-FDG 集積と細胞増殖能やブドウ糖代謝亢進部位との相関を見る事で基礎的実験との関連を探る。

4 . 研究成果

(1) 口腔扁平上皮癌細胞 (SCC-25) とヒト顎下腺癌由来唾液腺細胞 (HSG) を通法通り培養した。市販のUV 照射装置を工夫して用い、培養細胞の入ったシャーレに適正な量のUV 照射を行った結果、DNA ladder formation により細胞のアポトーシスを確認した。UV 照射量依存的にDNA ladder formationが認められた(Fig.1)。

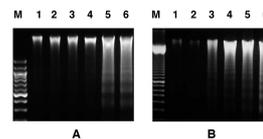


Fig. 1

Kito S et al.

(2) SDS-PAGE 電気泳動法で蛋白を分離し、PVDF 膜上に転写し、膜上で硝酸銀を用いた独自の鍍銀染色を行った。膜上の 110 kDa の蛋白は UV 照射量依存的に減少した。また新たに85-,95-,65 kDa の蛋白が現れ、UV 照射量依存的に増加した (Fig.3)。

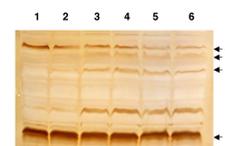


Fig. 3

Kito S et al.

(3) 次に抗ニュークレオリン抗体を用いてウエスタンブロットティングを行い、これらの蛋白を検出した。110 kDa の蛋白は UV 照射量依存的に減少した。また新たに85-,95-kDa の蛋白が現れ、UV 照射量依存的に増加した (Fig. 2)。鍍銀染色の結果と類似する点が多いものと考えられた。

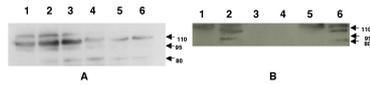


Fig. 2

Kito S et al.

(4) シャーレ上の培養細胞に鍍銀とHoechstの二重染色を行った。正常細胞ではドット状に局在したAgNOR蛋白がUV 誘導アポトーシス細胞ではその局在は劇的に変化した (Fig. 5)。

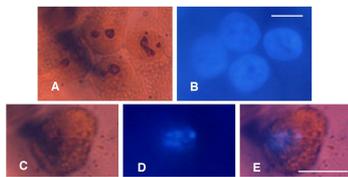


Fig. 5

Kito S et al.

(5) その他ニュークレオリンの mRNA 量は UV 照射により変化しなかった。このことはアポトーシスによるニュークレオリンの発現量の減少、あるいは分解は蛋白分解レベルで調節されており、転写量の減少ではないということを示唆する。さらに RNA 干渉を用いた系では細胞の増殖能が低下し UV 照射に対する感受性が増大することが示唆された。このように悪性腫瘍細胞におけるアポトーシスにおいて核内蛋白の1つであるニュークレオリンの役割の一端が解明されつつあることに本研究の意義がある。

18F-FDG-PET-CT を始めとする生体内の代謝画像について、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎と 18F-FDG 集積との関係を調べた。歯性感染による歯槽骨吸収が進行するにつれて 18F-FDG 集積の程度は強くなった。

また、口腔癌の患者において悪性腫瘍以外の非特異的集積について調べた。悪性腫瘍の原発巣以外にも舌前方の内舌筋、表情筋及び顎骨に多数の集積があった。口腔癌の画像診

断を行う上で、原発巣以外の非特異的集積についての可能性を考慮する事でより正確な診断システムを構築出来るものと考えた。また、長径 10 mm 以下の病変でも比較的明瞭に 18F-FDG 集積を分析出来る事が分かった。今後は臨床核医学と歯科基礎医学的研究との融合をはかる事が可能である事がわかった。

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)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Yoshioka I, Tanaka T, Habu M, Oda M, Kodama M, Kokuryo S, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Fukudome Y, Tominaga K, Sakoda S, Morimoto Y: Criteria and limitations for selecting a sagittal split ramus osteotomy for patients with skeletal mandibular prognathism and open bite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013; 115: 455-65.
2. Kito S, Koga H, Kodama M, Habu M, Kokuryo S, Yamamoto N, Oda M, Nishino T, Zhang M, Matsuo K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Yoshiga D, Kaneuji T, Nogami S, Yoshioka I, Yamashita Y, Tanaka T, Miyamoto I, Kitamura C, Tominaga K, Morimoto Y: Variety and complexity of ¹⁸F-FDG accumulations in oral cavity of patients with oral cancers. *Dentomaxillofac Radiol* 2013; 42: 20130014. doi: 10.1259/dmfr.20130014.
3. Yamamoto N, Yamashita Y, Yoshiga D, Ishikawa A, Matsuo K, Miyamoto I, Oda M, Tanaka T, Kito S, Seta Y, Takahashi T, Koga H, Kenji K, Morimoto Y: Occurrence of silk stitch abscess after surgery in patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18: e701-5. 10.4317/medoral.18792.
4. Oda M, Kito S, Tanaka T, Nishida I, Awano S, Fujita Y, Saeki K, Matsumoto-Takeda S, Wakasugi-Sato N, Habu M, Kokuryo S, Kodama M, Kaneuji T, Yoshiga D, Miyamoto I, Nishimura S, Yamashita Y, Maki K, Tominaga K, Yoshioka I, Ansai T, Morimoto Y: Prevalence and imaging characteristics of detectable tonsilloliths on 482 pairs of consecutive CT and panoramic radiographs. *BMC Oral Health* 2013; 13: 54. 10.1186/1472-6831-13-54.

- Oda M, Tanaka T, Yamashita Y, Kito S, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Nishimura S, Habu M, Kodama M, Uehara M, Kaneuji T, Kokuryo S, Miyamoto I, Yoshiga D, Seta Y, Tominaga K, Yoshioka I, Morimoto Y: Identification of peripheral vessels in oral and maxillofacial regions on magnetic resonance angiography obtained using a balanced steady-state free-precession sequence with a time-spatial labeling inversion pulse and using fresh blood imaging. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2013; 116: 791-7. doi: 10.1016/j.oooo.2013.09.016.
- Kito S, Koga H, Kodama M, Yamamoto N, Kokuryo S, Habu M, Matsuo K, Nishino T, Kubota K, Muraoka K, Oda M, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Tanaka T, Miyamoto I, Yamashita Y, Kitamura C, Nakashima K, Takahashi T, Tominaga K, Morimoto Y.: Reflection of (18)F-FDG accumulation in the evaluation of the extent of periapical or periodontal inflammation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol . 2012; 114 (6): e62-9.

総説及び著書

- Tanaka T, Shiiba S, Sakamoto E, Oda M, Kito S, Ono K, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Seta Y, Imamura Y, Watanabe S, Inenaga K, Morimoto Y: Significance and Utility of MR Cisternography for Diagnosis and Treatment of Trigeminal Neuralgia. J Biomed Sci Eng 2013; 6: 365-71.
- 鬼頭慎司、森本泰宏、田中達朗：「Q&A」で学ぶ歯科放射線学：SBOs 講義（金田隆編著）. 学建書院，2011 .

症例報告

- Matsuo K, Yamamoto N, Morimoto Y, Yamashita Y, Zhang M, Ishikawa A, Tanaka T, Kito S, Takahashi T: Multiple complex odontomas and subsequent occurrence of an ossifying fibroma at the same site as the removed odontoma. J Dent Sci 2013; 8: 189-95.
- 若杉（佐藤）奈緒，鬼頭慎司，小田昌史，田中達朗，松本（武田）忍，志岐一欣，大塚 梢，滝野正義，森本泰宏：顎下間隙に生じたリンパ節病変. 歯放 2013; 53: 1-3.

〔学会発表〕(計 16 件)

受賞講演

- 鬼頭慎司：日本歯科放射線学会優秀論文賞受賞講演 ^{18}F -FDGの集積は根尖性歯周炎や辺縁性歯周炎の程度を反映する. 第54回日本歯科放射線学会総会・学術大会，福岡県立ももち文化センター（6月1日-6月2日），2013.

特別講演

- 鬼頭慎司：歯科における現在の画像診断とその展望-インプラント・顎関節を中心として-. 第 60 回国立病院機構熊本医療センター 医歯連携セミナー 国立病院機構熊本医療センター 熊本（6月21日），2012.

一般講演

- Shinji Kito, Masafumi Oda, Nao Wakasugi-Sato, Shinobu Matsumoto-Takeda, Tatsuuro Tanaka, Yasuhiro Morimoto : Usefulness of ^{18}F -FDG accumulation in the evaluation of the extent of dental inflammation. ASIA-PACIFIC CONFERENCE in FUKUOKA 2013 International Symposium on Oral Education and Research in Kitakyushu Date: 26 January 2013 (Sat) : Kyushu Dental University, Kitakyusyu Japan.
- 鬼頭慎司，古賀博文，小田昌史，若杉（佐藤）奈緒，田中達朗，志岐一欣，森本泰宏：歯性感染症の程度の評価における ^{18}F -FDG 集積の意義. 第 54 回九州歯科学会総会，九州歯科大学（5月18日-5月19日），2013.
- 鬼頭慎司，古賀博文，小田昌史，若杉（佐藤）奈緒，田中達朗，志岐一欣，森本泰宏：口腔癌の患者における ^{18}F -FDG の非特異的集積. 第 54 回日本歯科放射線学会総会・学術大会，福岡県立ももち文化センター（6月1日-6月2日），2013.
- 鬼頭慎司，田中達朗，小田昌史，若杉（佐藤）奈緒，西村 瞬，松本（武田）忍，志岐一欣，森本泰宏： ^{18}F -FDG 集積は歯性感染症の程度を反映する. 第 25 回日本口腔診断学会・第 22 回日本口腔内科学会 合同学術大会，学術総合センター（9月13日-9月14日），2013.
- 鬼頭慎司，古賀博文，小田昌史，森本泰宏：口腔癌の患者における ^{18}F -FDG の生理的あるいは非特異的集積. 第 53 回日本核医学会学術総会，福岡国際会議場（11月8日-11月10日），2013.
- 鬼頭慎司，古賀博文，田中達朗，小田昌史，若杉（佐藤）奈緒，松本（武田）忍，西村 瞬，大塚 梢，内田朱美，広松辰巳，志岐一欣，森本泰宏：口腔顎顔面領域病変精査の過程で悪性リンパ腫の全身への浸潤が判明した3症例～ ^{18}F -FDG-PET-CTの有関係～. 日本歯科放射線学会 第33回関西・九州合同地方会，じゅうろくプラザ

(12月14日), 2013.

7. 鬼頭慎司, 若杉(佐藤)奈緒, 小田昌史, 松本(武田)忍, 田中達朗, 小菌孝彰, 森本泰宏: 下顎骨内側に存在する血管の走行を探る-安全なインプラント埋入の為に-. 第72回九州歯科学会総会, 北九州(5月19~20日), 2012.

8. 鬼頭慎司, 古賀博文, 田中達朗, 小田昌史, 志岐一欣, 松本(武田)忍, 若杉(佐藤)奈緒, 大塚 梢, 林 祐樹, 滝野正義, 広松辰巳, 森本泰宏: 根尖性歯周炎あるいは成人性歯周炎における骨吸収の程度と ^{18}F -FDG 集積との関連性. 第53回日本歯科放射線学会学術大会, 盛岡(5月31~6月1日), 2012.

9. 鬼頭慎司, 古賀博文, 小田昌史, 森本泰宏: 歯性感染症における骨吸収の程度と ^{18}F -FDG 集積との関連性. 第52回日本核医学会学術総会, 札幌(10月11~13日), 2012.

10. 鬼頭慎司, 古賀博文, 小田昌史, 若杉(佐藤)奈緒, 松本(武田)忍, 田中達朗, 志岐一欣, 森本泰宏: 歯列弓上における ^{18}F -FDG 高集積には注意が必要である. 日本歯科放射線学会第32回関西・九州合同地方会, 福岡(12月9日), 2012.

11. Kito S, Tanaka T, Wakasugi-Sato N, Matsumoto-Takeda S, Otsuka K, Oda M, Uchida A, Hiromatsu T, Goya T, Kozono T, Morimoto Y: A rare case of septic arthritis of the TMJ without malocclusion. The 18th International Congress of DentoMaxilloFacial Radiology, 第52回日本歯科放射線学会学術大会共催, 広島

(International Conference Center Hiroshima) (5月25~29日), 2011.

12. 鬼頭慎司, 田中達朗, 志岐一欣, 松本(武田)忍, 若杉(佐藤)奈緒, 小田昌史, 大塚 梢, 林 祐樹, 深井康弘, 時津高俊, 森本泰宏: パノラマエックス線画像上で下顎切痕部に不透過像として認められ, 様々な部位に存在した異所性石灰化物の3例. 日本歯科放射線学会第16回臨床画像大会, 新潟(チサンホテル&コンファレンスセン

ター新潟)(9月30~10月2日), 2011.

13. 鬼頭慎司, 古賀博文, 森本泰宏: 頭頸部悪性腫瘍術後における縫合糸膿瘍の診断に関する検討. 第51回日本核医学会学術総会, つくば(つくば国際会議場)(10月27~29日), 2011.

14. 鬼頭慎司, 小田昌史, 田中達朗, 志岐一欣, 松本(武田)忍, 大塚 梢, 林 祐樹, 滝野正義, 若杉(佐藤)奈緒, 廣松辰巳, 森本泰宏: 両側頬間隙に存在し, 軟組織濃度を呈する構造物の1症例. 日本歯科放射線学会第31回関西・九州合同地方会, 名古屋(今池ガスビル7階B会議室)(12月10日), 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 慎司 (KITO SHINJI)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 80347682