

令和元年6月10日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11505

研究課題名(和文) 口腔癌顎骨浸潤モデルの確立と、顎骨浸潤評価を目的としたCT検査の開発

研究課題名(英文) establishment of oral cancer animal model with bone invasion and development of clinical computed tomography examination which enable assessing mandibular invasion caused by oral cancer

研究代表者

高橋 章 (TAKAHASHI, Akira)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：30252688

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)：口腔癌による顎骨浸潤状況を正確に評価できるCT検査法を開発した。また、扁平上皮癌細胞およびマウスを用いて口腔癌顎骨浸潤モデルを確立した。

- 1)臨床評価：顎骨浸潤を伴う口腔癌症例に対し、CTボリュームスキャンを造影直前および造影中の2回行って非線形サブトラクション画像を作成し、高精度な浸潤範囲の判定が可能になった。
- 2)口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤動物モデルの確立：ヌードマウスの顎骨骨膜を注射針でスクラッチさせながらヒト由来扁平上皮癌細胞を接種した。CAL27細胞による腫瘍の顎骨浸潤モデル、およびB88細胞による骨造成モデルを確立できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は顎骨に容易に浸潤し、生命予後への影響が大きいため、顎骨浸潤の評価と制御は口腔癌研究における重要なテーマである。顎骨に浸潤した口腔癌の治療では外科的切除が第一選択であり、腫瘍遺残あるいは過剰な切除を防ぐために、浸潤範囲を正確に評価する必要がある。今回の臨床評価により、正確な顎骨浸潤範囲の評価が可能になり、患者に最適な治療範囲を決定することができるようになった。また顎骨浸潤モデルを確立できたことにより、化学療法をはじめとする顎骨浸潤の制御実験を行う基礎が構築できた。

研究成果の概要(英文)：We established computed tomography examination which could assess mandibular invasion by oral cancer accurately. We also established bone invasion model using oral cancer cell and mouse.

- 1)clinical assessment: To the patients with bone invasion by oral cancer, we took computed tomography before and after administration of contrast medium. We made dynamic subtraction and we could access the extent of bone invasion accurately.
- 2)establishment of bone invasion model: We injected human origin squamous cell carcinoma cells to the mandible of nude mice with scratching the periosteum. we established bone invasion model by using CAL27 cells, and bone formation model by using B88cells.

研究分野：歯科放射線学

キーワード：口腔癌 骨浸潤 画像検査 CT 動物モデル 骨造成

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 口腔癌は顎骨に容易に浸潤し、生命予後への影響が大きいため、顎骨浸潤の評価と制御は口腔癌研究における重要なテーマである。顎骨に浸潤した口腔癌の治療では外科的切除が第一選択であり、腫瘍遺残あるいは過剰な切除による QOL 低下を防ぐために、浸潤範囲を正確に評価する必要がある。しかし、顎骨内組織は迅速病理診断ができないため、術前に浸潤範囲を高精度に評価できる画像診断法が必須である。顎骨浸潤を評価するに当たって現状では、検査モダリティごとに限界がある。すなわち、MRI、FDG-PET、骨シンチグラフィは空間分解能が低く、腫瘍周囲の骨髄浮腫の影響で、浸潤範囲が過大評価される傾向があり、CT は造影しても骨内の腫瘍そのものを観察できないため、海綿骨破壊範囲のみで評価としていたために過小評価される傾向にあった。これらの問題を解決する新たな技法が必要であった。

(2) 研究者らはヌードマウスに造腫瘍性のあるヒト口腔扁平上皮癌細胞を咬筋内に接種し、癌細胞が顎骨浸潤能を示すことを明らかにしていた。このシステムを発展させて、腫瘍の顎骨浸潤が確実に生じる動物モデルを確立できれば、顎骨浸潤範囲の正確な評価方法の確立、および将来的に腫瘍の顎骨浸潤を制御できる実験系の基礎となることが期待出来た。

### 2. 研究の目的

(1) 面検出器型 X 線 CT および非線形の位置合わせをしたサブトラクション技法を用いて、顎骨に浸潤した口腔癌の骨内での造影効果を可視化し、より正確な顎骨浸潤を評価できる CT 検査法を開発することを目的とする。そのために、以下の 2 点を研究目的とした。①扁平上皮癌の顎骨浸潤動物モデルを確立する。②顎骨浸潤を伴う口腔癌症例に対して、面検出器型 CT によるボリュームスキャンと非線形サブトラクションを実施し、造影 CT による口腔癌の顎骨浸潤範囲の評価基準を確立する。

### 3. 研究の方法

(1)扁平上皮癌の顎骨浸潤モデルの確立：ヒト口腔扁平上皮癌細胞株である B88 と、CAL27 を用いた。細胞  $2 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  を  $50 \mu\text{l}$  の生理食塩水に懸濁し、8 週齢雌性ヌードマウス(Balb/c nu/nu)をイソフルラン麻酔下に下顎枝頰側に接種した。下顎枝骨膜を穿刺針でひっかけながら（スクラッチ法）接種した。接種後一週ごとに動物用 CT で頭部撮影し、骨変化を観察した。十分な骨変化が観察された時点でマウスを sacrifice し、固定、脱灰、包埋薄切して組織学的検討を行った。

(2)造影 CT ならびにサブトラクションによる顎骨浸潤範囲評価法の確立：徳島大学病院口腔外科を受診した口腔癌患者のうち、検査に同意した患者を対象として、術前評価として面検出器型 CT 装置によって経静脈造影検査を行った。造影操作時の体動を最小限にするために、造影剤が灌流される前のボリュームスキャン（単純撮影）とし、造影剤注入後の撮影（造影撮影）を行った。両者から非線形サブトラクション画像表示を行い、良好なサブトラクション効果が得られる造影剤投与速度および撮影タイミングについての検討を行った。また同症例は同時期に MRI、FDG-PET 検査も行われている。術前評価をもとにして切除された顎骨は、H-E 染色もしくは TRAP 染色によって腫瘍の浸潤範囲を確定した。この病理組織学的検索結果と画像検査法による顎骨浸潤範囲の判定との比較を行い、画像検査の正診性を求めた。

### 4. 研究成果

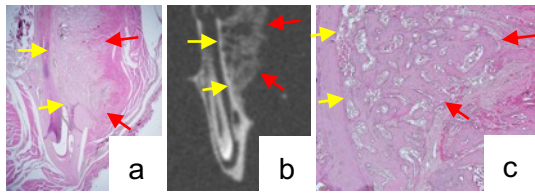


図1 B88 細胞による顎骨浸潤状況 (接種32日目)  
a: HE 染色 b: CT c: HE 染色 (拡大)

(1)B88 細胞による顎骨浸潤モデル：動物用 CT では、接種後2週以降に顎骨の骨変化がみられた。この細胞は顕著な骨形成傾向を有していた (図1、赤矢印)。骨皮質の断裂はなく (黄矢印)、骨髄浸潤はみられなかった。追試験として、大腿軟組織内に接種した (図2)。脛骨 (黄矢印)、腓骨 (緑矢印) の他に腫瘍内に骨化がみられた (青矢印)。cytokeratin 陽性であり、上皮系細胞であることが確認された。この骨造成能を有する上皮系細胞は特異的であり、細胞の characterization について検討を行っている。

(2)CAL27 による顎骨浸潤モデル：動物用 CT では、接種後2週以降に腫瘍によって (図3、赤矢印) 下顎枝類側皮質骨の断裂が生じ (黄矢印)、経時的に断裂が拡大した。cytokeratin 陽性であり、上皮系細胞であることが確認できた (青矢印)。すなわち、上皮系癌細胞により純粋な骨破壊モデルを確立できた。なお、細胞数  $2 \times 10^5$  では腫瘍増殖がきわめて速く、接種20日までに全例死亡していたため、今後は接種細胞数の調整が必要と考えられた。

(3) 造影CTならびにサブトラクションによる顎骨浸潤範囲評価法の確立：CT 撮像条件は、造影剤 100ml を 2ml/秒で注入し、1回目の単純撮影は注入開始7秒後、造影撮影は60秒後が至適であった。この条件を用いて、研究期間中に40例程度に対して顎骨浸潤状況の検討を行った。代表例を図4に示す。切除後の病理組織判定を基準とすると、MRI T2強調像では広範囲に信号異常が観察され、腫瘍 (赤矢印) と周囲の骨髄浮腫 (黄矢印) との区別が困難であった。MRI 造影像では腫瘍 (赤矢印) は骨髄浮腫と区別しやすくなったが、病理組織判定よりも広範囲に腫瘍の骨浸潤があると判定される傾向にあった。FDG-PET は SUV 閾値

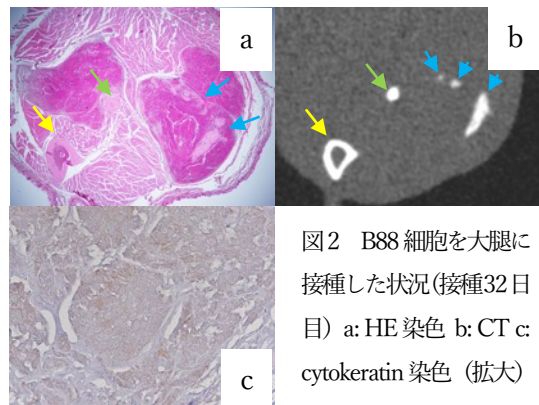


図2 B88 細胞を大腿に接種した状況 (接種32日目)  
a: HE 染色 b: CT c: cytokeratin 染色 (拡大)

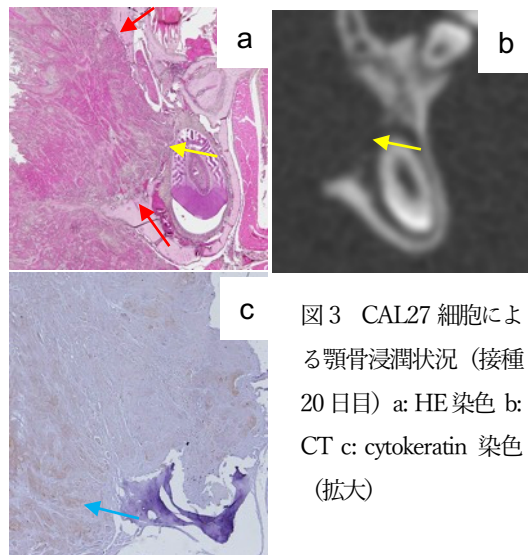


図3 CAL27 細胞による顎骨浸潤状況 (接種20日目)  
a: HE 染色 b: CT c: cytokeratin 染色 (拡大)

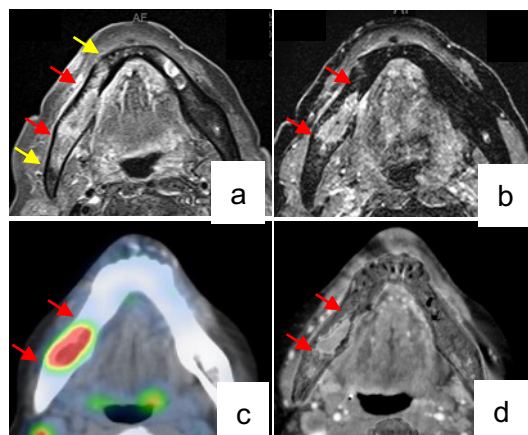


図4 下顎歯肉癌症例における顎骨浸潤状況 a: MRI T2強調 b: 造影MRI c: FDG-PET d: 造影CT サブトラクション

により判定が異なるが、病理組織判定よりもやや広めに腫瘍の骨浸潤範囲がある（赤矢印）と判定される傾向にあった。CT サブトラクション画像では腫瘍の骨浸潤範囲（赤矢印）は病理組織判定とほぼ一致している症例が多く、骨浸潤範囲の判定に最も有効であった。CT サブトラクションを行ったうち、いくつかの症例は単純撮影と造影撮影との間で体動が大きく、非線形サブトラクションで十分に補正することができず、判定困難であり、本法の限界と考えられた。

## 5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計1件)

①玉谷哲也、高丸 菜都美、大江 剛、高橋 章、藤澤 健司、宮本 洋二: 早期口腔扁平上皮癌患者における ABCG2, ALDH1, Bmi-1, CD24 および CD44 発見に関する検討、第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2017 年。

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：工藤 隆治

ローマ字氏名： (KUDOH, Takaharu)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：助教

研究者番号：10263865

研究分担者氏名：宮本 洋二

ローマ字氏名： (MIYAMOTO, Youji)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：大学院医歯薬学研究部（歯学域）

職名：教授

研究者番号：20200214

研究分担者氏名：玉谷 哲也

ローマ字氏名： (TAMATANI, Tetsuya)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号：30274236

研究分担者氏名：大江 剛

ローマ字氏名： (OHE, Go)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：講師

研究者番号：60432762

(2)研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。