

平成 22 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2009

課題番号：19592341

研究課題名(和文) 歯原性腫瘍の病態解析および局所注入療法の開発

研究課題名(英文) Pathobiological Analysis of Odontogenic Tumors and Development of Local Injection Therapy

研究代表者

二宮 史浩 (NINOMIYA TOMOHIRO)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：10346801

研究成果の概要(和文): 本研究の目的は、歯原性腫瘍内に直接注射を打つ程度の簡単な処置を施すだけで、腫瘍の発育に大きく関与している因子を取り除くまたは不活化させ、大きな外科的侵襲を加える事なく、この腫瘍を縮小ないし消滅させる事を可能にすることである。そのためにまず発育増大因子として IL-1 を特定し、腫瘍の成長に大きく関与していることがわかった。現在、これを用いて中和抗体の作成に取りかかっているところである。

研究成果の概要(英文): The purpose of this study is to analyze odontogenic tumors pathobiologically and then, we try to develop the new therapy with local injection. In our study suggested that Interleukin-1 α (IL-1 α) play a crucial role in the growth of keratocystic odontogenic tumors (KCOTs). Now, we try to make an antisense of IL-1 α for the new therapy with local injection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：口腔外科

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：歯学、歯原性腫瘍、角化嚢胞

1. 研究開始当初の背景

歯原性角化嚢胞はこれまで嚢胞に分類されていたが、その高い増大活性や再発率などから、2005年より角化嚢胞性歯原性腫瘍と名称が変わり、エナメル上皮腫等と同じ歯原性腫瘍に属する。顎骨内において骨を吸収しながら増大するこれらの疾患は他の歯原性腫瘍と

比べて異なる特徴を示す。

従来、歯原性腫瘍の治療には顎切除術あるいは腫瘍周囲の顎骨を含めた根絶的摘出術など徹底した病巣除去を目的とした外科的手術が行われてきた。しかしながらこの方法では術後に麻痺が起きたり、顎骨に大きな骨欠損が生じたりするため、形態や機能の回復が困

難な場合もみられる。また食事の際に強い咬合力が加わったり、外力が加わったりした場合、術後に骨折を起こす例もある。このため近年では、大きな角化嚢胞性歯原性腫瘍やエナメル上皮腫においては前もって開窓療法を行って、ある程度の大きさまで縮小させてから摘出を行う方法が取られるようになってきた。開窓療法は有効な治療法ではあるが、2度（開窓時と摘出時）の外科的侵襲を伴い、この間の治療が長期（半年以上）を要し、その間の口腔ケアに大変手間のかかることが短所である。

2. 研究の目的

そこでこれらの短所を解消すべく、新しい治療法の開発が必要と思われた。具体的には、歯原性腫瘍内に直接注射を打つ程度の簡単な処置を施すだけで、腫瘍の発育に大きく関与している因子を取り除くまたは不活化させ、大きな外科的侵襲を加える事なく、この腫瘍を縮小ないし消滅させる事を可能にするという方法である。そのためにはこの発育因子を特定し増大機構を解明する事が、新しい治療法を確立する上で極めて重要である。

3. 研究の方法

まず、歯原性腫瘍の病態解析を行う。具体的には、角化嚢胞性歯原性腫瘍や含歯嚢胞などの摘出標本を用いて、パラフィン切片を作り、免疫染色を行う。特異的なタンパクの発現がみられれば、in situ hybridizationを用いてmRNA産生細胞の同定を行う。さらに二重免疫染色等も行い、タンパクやmRNAと増殖活性との関連も調べる。

嚢胞の発育増大に大きく関与しているタンパクやmRNA、さらにそれらの産生細胞が同定されれば、中和抗体を作製する。具体的にはmRNAが放出されると、receptorにくっついて核内に情報が伝達されて細胞の増殖がおこる。これらのreceptor特有の塩基配列を大量に組み込んだペースト状もしくはカプセル状の徐放型中和抗体を作成し、mRNA産生細胞の近隣にこの中和抗体を投与することで、細胞から放出されたmRNAが中和抗体とくっつき、細胞内のそれぞれのreceptorにくっつく可能性がほとんどなくなることが期待できる。このようにして放出されたmRNAの働きを無効にする事で発育増殖を妨げる事が可能となる。この状態では核内に情報が伝達されず、細胞増殖がおこらない。

E. Coli（大腸菌）に組み込んで繁殖させて中和抗体を作成することは、容易かつ安全でしかも低コストであることから、この方法で作成する。

4. 研究成果

研究代表者らはこれまでも歯原性嚢胞の病態解析を行って来た。歯原性嚢胞の内容液を測定したところ、角化嚢胞性歯原性腫瘍において特に interleukin-1 (IL-1) が多く含まれていた。そこで免疫染色ならびに in situ hybridization を行ったところ、IL-1 のタンパクや mRNA の発現が嚢胞上皮の基底層に多くみられた。この IL-1 と増殖活性を示す Ki-67 免疫染色とを比較したところ強い相関関係がみられた。

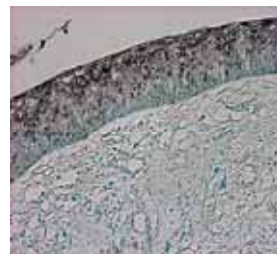
また開窓時と摘出時の歯原性嚢胞における IL-1 のタンパクおよび mRNA の発現を調べたところ、開窓時に多くみられた IL-1 が摘出時には有意に減少していることがわかった。

角化嚢胞性歯原性腫瘍より分離した上皮細胞を無血清DMEMにてフィブロネクチンでコーティングした皿上で培養したところ、リコンビナントヒトIL-1 (rhIL-1) の濃度依存性に細胞は自発的な潜在型 matrix metalloproteinase-9(MMP-9)を分泌した。またプラスミノゲン存在下に上皮細胞を培養したところ、経時的に潜在型MMP-9が活性化した。以上のことから角化嚢胞性歯原性腫瘍の発育増大にIL-1 が強く関わっている事が示唆された。

また、陽圧刺激を与えることが可能な実験用加圧チャンバーを開発し、角化細胞株に対して陽圧刺激を加えることによりIL-1 α が発現することを明らかにし、歯原性嚢胞の発育増大に強く関与している事も確認済みである。



KGF 免疫染色



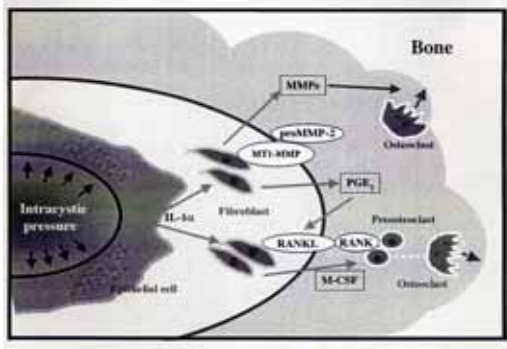
KGFR 免疫染色

さらに嚢胞上皮における増殖活性を調べるために、Keratinocyte growth factor (KGF)および KGF receptor(KGFR)の抗体を用いて開窓時と摘出時の歯原性嚢胞における KGF、KGFR 蛋白の発現を調べたところ、角化嚢胞性歯原

性腫瘍は含歯性嚢胞と比較して線維芽細胞から KGF が産生される傾向が高いことがわかった。これに対して KGFR は上皮、特に上皮の上層部に多くみられたが、角化嚢胞性歯原性腫瘍と含歯性嚢胞との間に発現頻度の差はなかった。加えて開窓時と摘出時の発現頻度もほぼ同じで、開窓後に減少する IL-1 とは大きく異なっていた。このことから KGF は上皮細胞の増殖活性にはあまり関与せず、細胞の分化やアポトーシスの抑制に関わっている可能性が高く、このことによって相対的に角化嚢胞性歯原性腫瘍の発育増大に関与していることが示唆された。

これらのことを受けて中和抗体の作成には IL-1 を用いて作製することとした。

現在、E.Coli (大腸菌) に IL-1 特有の塩基配列を組み込んで、繁殖させて中和抗体を作成しているが、導入効率を上げるために最適濃度を検討中である。



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2件)

Suyama Y, Kubota Y, Ninomiya T, Shirasuna K. Immunohistochemical analysis of interleukin-1, its type I receptor and antagonist in keratocystic odontogenic tumors. Journal of Oral Pathology and Medicine. 査読あり、37 巻、2008、560-564

Suyama Y, Kubota Y, Yamashiro T, Ninomiya T, Shirasuna K. Expression of KGF and its receptor in odontogenic keratocysts. Journal of Oral Pathology

and Medicine. 査読あり、38 巻、2009、476-480

〔学会発表〕(計4件)

今城育美、二宮史浩、窪田泰孝、岡正司、山城崇裕、陶山曜子、矢原佳枝、竹之下康治. 歯原性顎骨嚢胞の開窓効果. 第54回日本口腔外科学会総会・学術大会. 2009年10月9日.札幌.

中村和弘、窪田泰孝、山城崇裕、岡正司、二宮史浩、陶山曜子、矢原佳枝、白砂兼光. 角化嚢胞性歯原性腫瘍再発症例の検討. 第53回日本口腔外科学会総会. 2008年10月20日.徳島.

二宮史浩、陶山曜子、窪田泰孝、山城崇裕、矢原佳枝、岡正司、菱川善隆、小路武彦、白砂兼光. 角化嚢胞性歯原性腫瘍における interleukin-1 と keratinocyte growth factor の発現に関する検討. 第49回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2008年10月6日.長崎.

陶山曜子、窪田泰孝、二宮史浩、山城崇裕、矢原佳枝、岡正司、白砂兼光. 角化嚢胞性歯原性腫瘍におけるインターロイキン-1 とケラチノサイト増殖因子の発現に関する研究. 第62回日本口腔科学会学術集会. 2008年04月18日.福岡.

〔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
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

二宮 史浩 (NINOMIYA TOMOHIRO)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号: 10346801

(2)研究分担者

窪田 泰孝 (KUBOTA YASUTAKA)

九州大学・大学病院・講師
研究者番号：60205151
白砂 兼光 (SHIRASUNA KANEMITSU)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号：30093420
(H19～H20)

(3)連携研究者
なし