

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25年 5月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592220

研究課題名（和文） 歯原性腫瘍の病態解析および RNAi 法やアンチセンス法を用いた遺伝子治療の開発

研究課題名（英文） Clinical analysis of Odontogenic tumors and Development of gene therapy using RNAi and anti-sense methods.

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）：歯原性腫瘍の病態解析を行ったところ、interleukin-1 α (IL-1 α) や keratinocyte growth factor (KGF) が発育増大に大きく関与していることが示唆された。開窓療法によって角化嚢胞性腫瘍のサイズが半分になるのに 239 日を要することがわかった。アンチセンス法による遺伝子制御能を上げて行くことが今後の課題である。

研究成果の概要（英文）：It is strongly suggested that interleukin-1 α (IL-1 α) and keratinocyte growth factor (KGF) may play an essential role in regulating the odontogenic tumor growth within the jaw. The volume of marsupialised keratocystic odontogenic tumors was reduced by half over a 239 day cycle. For the new therapy of odontogenic tumors, we are testing the effect of anti-sense methods.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：歯原性腫瘍、アンチセンス、角化嚢胞性歯原性腫瘍、RNAi、遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

(1) 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治的摘出術な

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た。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った。

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

小さくし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。

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。

(2) 我々はこれまでも歯原性顎嚢胞の病態解析を行って来た。歯原性顎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 α (IL-1 α) 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 α 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。これと増殖活性を示す 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。

(3) 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 α (rhIL-1 α) 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 α が強く関わっている事が示唆された。

(4) 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 が発現し、歯原性顎嚢胞の発育増大に強く関与している事が示唆された。さらに keratinocyte growth factor (KGF) が IL-1 α に与える影響も明らかにし、歯原性顎嚢胞の発育増大機構は徐々に明らかになりつつあるところである。

2. 研究の目的

(1) 近年、大きな角化嚢胞性歯原性腫瘍やエナメル上皮腫の治療は、前もって開窓療法を行って、ある程度の大きさまで縮小してから摘出を行う方法が取られている。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、この間の治療が半年以上を要することが短所である。

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。

(2) 新しい治療法を確立する上で極めて重要なのは歯原性腫瘍の病態解析である。歯原性腫瘍の発育増大因子を特定し、これらの遺伝子制御を行うことを目指す。

(3) 近年行っている開窓療法の効果および開窓療法の十分な効果が得られるまでにかかる期間を臨床的に検討する。

3. 研究の方法

(1) 歯原性腫瘍の発育増大因子を特定する。発育増大因子は多数あると思われる。これまでの研究で IL-1 α や KGF が発育増大に大きく関与していることがわかっているが、それ以外の因子についても引き続き調査を行う。具体的には手術時に採取した標本を用いて、免疫染色や in situ hybridization、細胞培養を行い、その他の発育増大因子の発見に努める。

(2) IL-1 α や KGF のレセプターと同じ塩基配列を持つアンチセンスを数種類作り、培養細胞上で遺伝子発現制御能の確認を行う。

歯原性腫瘍の発育増大に大きく関与しているものがさらに見つかれば、これについてもアンチセンスを作製する。アンチセンス法による遺伝子発現制御能が十分でない場合には、RNAi 法を用いて遺伝子発現制御能を調べて行く。

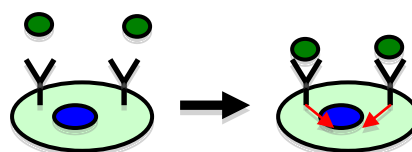


図1 核内への情報伝達

発育増大に関与している因子の mRNA が放出されると、それぞれのレセプターにくっつき、核内に情報が伝達されて細胞の増殖がおこる（図1）。

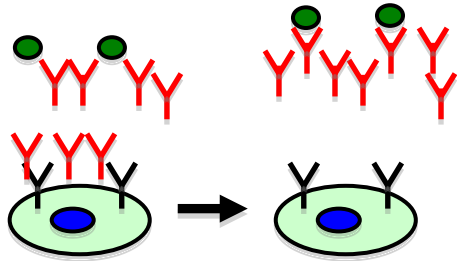


図2 核内への情報伝達不可

発育増大に関与している因子の mRNA のレセプター特有の塩基配列を調べ、レセプターと同じ塩基配列を持つアンチセンスを作成する。発育増大に関与している因子産生細胞の近隣にこのアンチセンスを大量に投与することで、発育増大に関与している因子が細胞内のそれぞれのレセプター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。このようにして発育増大に関与している因子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(図2)。

アンチセンスの作成は合成オリゴDNAで作成する事も可能であるが、コストがかかる。E. Coli (大腸菌) に組み込んで繁殖させてアンチセンスを作成することは、容易かつ安全でしかも低コストであることから、この方法で作成した。

(3) アンチセンスによる IL-1 α や KGF の細胞増殖阻害の確認を行う。

上皮細胞と線維芽細胞は生検された角化嚢胞性歯原性腫瘍より分離する。角化嚢胞性歯原性腫瘍の組織片を 2 mm² の大きさに細片した後、10% の牛胎児血清と抗生剤 (100 IU/ml ペニシリンと 100 mg/ml ストレプトマイシン) 含有 DMEM 中で、37°C、95% 空気、5% 二酸化炭素の条件下で培養する。この方法により上皮細胞と線維芽細胞が 1 週間以内に組織片周囲に現れる。上皮細胞の分離には、human keratinocyte growth supplement (表皮成長因子、ハイドロコルチゾン、インシュリン、牛下垂体後葉エキスを含む) と抗生剤 (100 IU/ml ペニシリンと 100 mg/ml ストレプトマイシン) を含有する無血清低カルシウム角化細胞成長培養溶液を用いる。約 80% の群生に達した単層の細胞を 0.05% トリプシン / 500 mM EDTA によって処理した後、無血清低カルシウム KGM で継代する。線維芽細胞は 10% 牛胎児血清と抗生剤を含む DMEM で群生させる。

上皮細胞と線維芽細胞の実験への使用は第 3 から第 7 代目のものを用い、これにアン

チセンスを投与し、細胞の増殖能を検討する。どの程度増殖を抑えられるか、あるいは死滅させる事が出来るのかを確認し、アンチセンスの最適濃度を選定する。

(3) 開窓療法の効果および開窓療法の十分な効果が得られるまでにかかる期間等について、CT を用いて臨床的に検討する。

4. 研究成果

(1) 歯原性腫瘍の発育増大因子は多数あると思われた。これまでの研究で IL-1 α や KGF が発育増大に大きく関与していることがわかってきた。それ以外の因子についても手術時に採取した標本を用いて、免疫染色や in situ hybridization、細胞培養を行って、その他の発育増大因子の発見に努めてきた。しかしながら interleukin-6 (IL-6)、interleukin-1 β (IL-1 β)、TNF- α (tumor necrosis factor- α) などのタンパクや mRNA の発現量はごくわずかで発育増大に大きく関与しているとは言えなかった。よって現段階において、歯原性腫瘍の発育増大に大きく関与していると思われるものは IL-1 α や KGF であるということが言える。今後もその他の因子についても調べていく予定である。

(2) アンチセンスの作成には現段階において、歯原性腫瘍の発育増大に大きく関与しているとわかっている IL-1 α と KGF を用いた。E. Coli (大腸菌) に組み込んで繁殖させてアンチセンスを作成したが、導入効率を上げるべく、様々な条件を調整しながら、至適条件を探っている状況である。

(3) アンチセンスによる IL-1 α や KGF の細胞増殖阻害をみるために、培養細胞にアンチセンスを投与してみたところ、培養細胞の死滅には至っていないが、細胞増殖能の減弱を確認することは出来た。今後は上述のように導入効率を上げることで、細胞増殖能をさらに抑えることが期待出来る。

(4) 角化嚢胞性歯原性腫瘍における開窓療法の効果について、CT を用いて 3 次元的に解析したところ、239 日で腫瘍の体積が半減することがわかった。これにより、現在行っている開窓療法の予測が出来、今後の治療計画や患者への説明に新たなエビデンスが加わることになった。

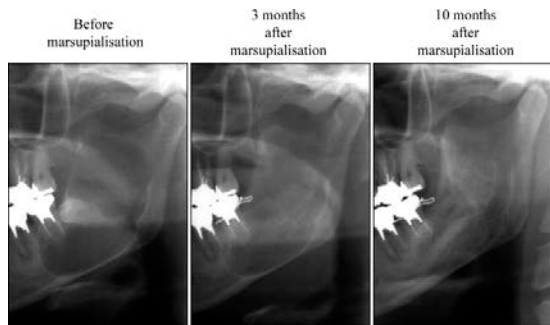


図3 パノラマX線写真における開窓療法の効果

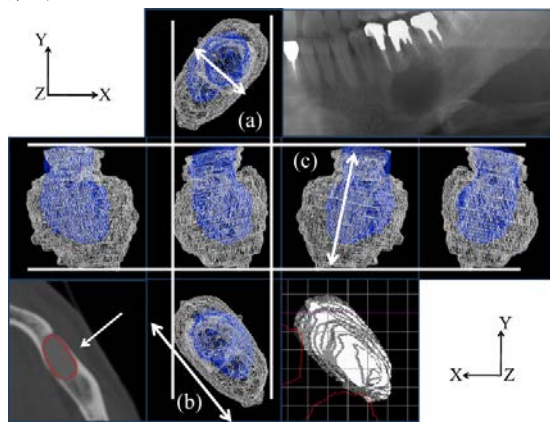


図4 CTによる計測
(a)幅、(b)深さ、(c)高さ

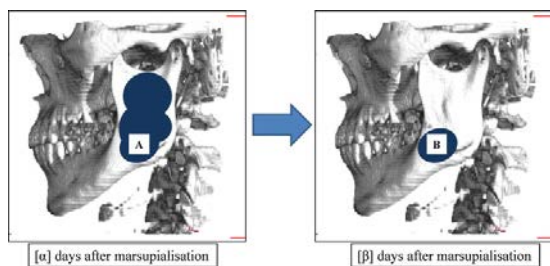


図5 開窓前後の3DCTイメージ

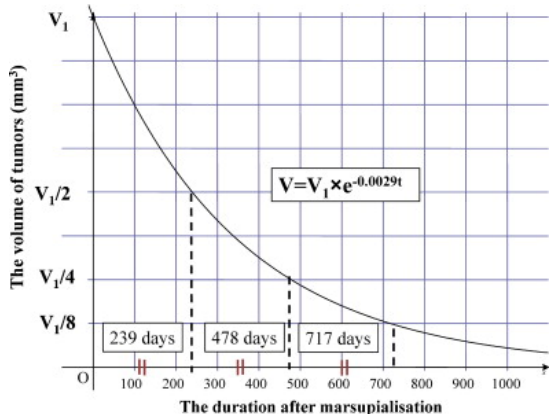


図6 腫瘍サイズと開窓期間

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 1件)

Shudou H, Sasaki M, Yamashiro T, Tsunomachi S, Takenoshita Y, Kubota Y, Ninomiya T, Kawazu T, Mori Y, : Marsupialisation for keratocystic odontogenic tumours in the mandible: longitudinal image analysis of tumour size using 3D visualised CT scans. International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 査読あり、41(3):290-296, 2012.

[学会発表] (計 1件)

首藤肇、佐々木匡理、山城崇裕、角町鎮男、杉友貴、恒吉隆典、窪田泰孝、竹之下康治、吉浦一紀、今城育美、二宮史浩
CTを用いた三次元構築画像による角化嚢胞性歯原性腫瘍開窓効果の法則性について
第55回日本口腔外科学会総会・学術大会
2010年10月 千葉

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