

平成 23 年 5 月 20 日現在

機関番号：13201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20592356
 研究課題名（和文） 口腔癌の顎骨浸潤の様態とそのメカニズムの解明-分子診断への応用-

研究課題名（英文） Type of bone invasion in human oral squamous cell carcinoma and its mechanisms; application for molecular diagnosis

研究代表者
 野口 誠 (NOGUCHI MAKOTO)
 富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・教授
 研究者番号：50208328

研究成果の概要（和文）：下顎歯肉扁平上皮癌における骨吸収様式と破骨細胞分化誘導因子関連サイトカインの発現状況を免疫組織学的に観察した。腫瘍細胞に明らかなRANKL、OPGの発現はみられなかった。腫瘍細胞にPTHrPが軽度に発現する例がみられたが、顎骨浸潤様式との関連は明らかではなかった。培養細胞を用いた実験系では、高浸潤性細胞株ではMMP9、Periostinなどの発現増強が観察された。高浸潤性細胞株に対するBP製剤の効果を検討した結果、Ca存在下での抗腫瘍効果の増強が確認された。

研究成果の概要（英文）：We immunohistochemically observed expression of various kinds of cytokines related to osteoclastic differentiation in human squamous cell carcinoma of the lower gum. Over-expression of RANKL or OPG could be barely seen in cancer cells, although PTHrP was slightly expressed. The relationship between type of bone invasion and expression of them has failed to clarify.

Using oral squamous cancer cell lines, over-expression of MMP9 or periostin was strongly observed in high invasive cell line (HSC4) compared with low invasive cell line (HSC3). Apoptosis was induced in HSC4 cells with low dose bisphosphonate. Moreover, induction of apoptosis in cell line was enhanced by addition to Ca.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：ライフサイエンス(共通基礎研究)

科研費の分科・細目：外科系・歯学

キーワード：口腔扁平上皮癌、顎骨浸潤、破骨細胞、破骨細胞分化誘導因子、ビスホスホネート製剤、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

歯肉・歯槽粘膜癌は、口腔癌の亜部位別発生頻度からみると、舌癌に次いで多い。我が国では高齢化社会を向かえ、増加傾向がみられる。歯肉・歯槽粘膜癌の予後因子として、顎骨浸潤が挙げられる。さらに、顎骨浸潤がみられる症例の中では、X線学的にみられる顎骨浸潤の様態により予後が異なる。すなわち、平滑型より虫食い型吸収を示す症例の予後は不良である。顎骨浸潤の有無は、腫瘍の進展度との関連が強いが、その様態は進展度とは内部相関がみられないことが多変量解析から示されている。このことは、顎骨浸潤の様態が、進展度とは独立して腫瘍特性を反映している可能性を示していると言える。

2. 研究の目的

口腔癌の顎骨浸潤の様態とそのメカニズムを探ることは、個別化診断とそれに基づくオーダーメイド医療の実現に向けて、臨床的意義が大きいと考え本研究を企図した。口腔癌の顎骨浸潤の様態と破骨細胞分化関連因子および浸潤関連因子などの発現との関連を明らかにし、分子診断と高浸潤性癌に対する新規治療法を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 臨床材料を用いた形態学的ならびに免疫組織学的研究

下顎歯肉・歯槽粘膜扁平上皮癌の臨床材料における顎骨浸潤の様態と破骨細胞の出現様相について形態学的に観察する。また、RANKL, OPG, PTHrT などの破骨細胞分化関連蛋白ならびに MMP などの基質分解酵素を免疫組織学的に観察する。

3-2. 口腔扁平上皮癌細胞株の顎骨浸潤能と各種蛋白の発現

HSC3 (human)、HSC4 (human)、SCC7 (mouse) の口腔内移植モデルにおける顎骨浸潤の様相を形態学的に観察する。おのおのの細胞株における顎骨浸潤関連蛋白の発現状況を評価する。

3-3. 高度浸潤癌細胞株における BP 製剤の抗腫瘍効果

口腔扁平上皮癌細胞株における低用量ゾロドロネートの効果を検討する。

4. 研究成果

4-1. 臨床材料を用いた形態学的ならびに免疫組織学的研究

下顎歯肉歯槽粘膜扁平上皮癌 30 例の X 線学的顎骨浸潤の様態と癌組織の形態学的悪性度との関連を検討した。X 線上骨吸収像を認めていないものでは悪性度 Grade I が 12/17 (71%) を占めており、浸潤様式においては 2 型～4D 型までばらつきがあった。虫食い型でも骨浸潤なし群と同様に浸潤様式は 2 型～4C 型までばらつきがあり、X 線下顎骨吸収像と病理組織所見との関連は認められなかった。

浸潤様式が 4C 型、4D 型で X 線下顎骨吸収のないものでは T1、T2 が 4/6 例と、腫瘍径の小さいものが多かった。(表 1)

X線下顎骨吸収像		なし	平滑型	中間型	虫喰い型	
		(n)	(n=17)	(n=1)	(n=5)	(n=7)
悪性度(WHO)	Grade I (19)	12	1	2	4	
	Grade II (9)	4	0	3	2	
	Grade III (2)	1	0	0	1	
浸潤様式(Y-K)	1型 (0)	0	0	0	0	
	2型 (7)	4	0	1	2	
	3型 (14)	7	1	4	2	
	4C型 (8)	5	0	0	3	
	4D型 (1)	1	0	0	0	

表 1

顎骨浸潤の様態と破骨細胞の出現状況を観察した。平滑型に比較して虫食い型では多くみられた。図 1

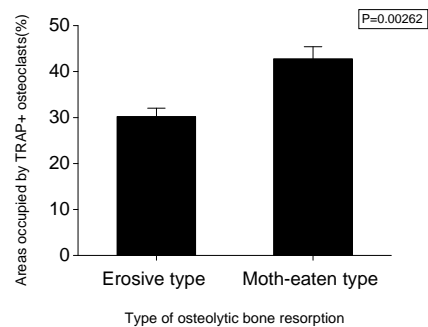
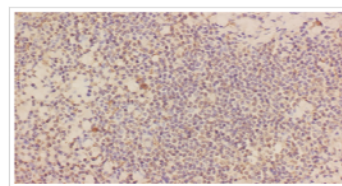
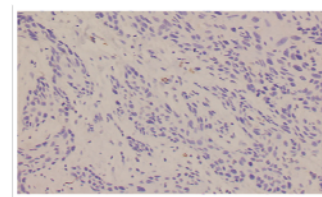


図 1

そこで、手術標本の中で 11 症例について、破骨細胞活性化因子として知られている、RANKL について免疫組織学的染色を行ったが、すべて陰性であった(図 2)。そこで、RANKL-RANK 系を介さずに、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導すると考えられている TNF α の発現を免疫組織学的染色を用いて解析したが、すべて陰性であった。今回の症例は、RANKL を発現しない腫瘍であったことが示唆される。TNF α は発現のある細胞を認めないため、染色方法の再検討が必要である。



間質細胞における RABKL の発現

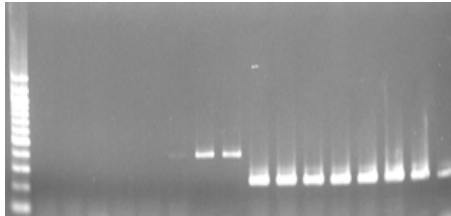


腫瘍細胞では RABKL の発現は認められない。

図 2

4-2. 口腔扁平上皮癌細胞株の顎骨浸潤能と各種蛋白の発現

ヒト口腔扁平上皮癌株 HSC3 と HSC4 をヌードマウス咬筋部へ移植し、下顎骨への浸潤を観察したところ、HSC4 は増殖が早く、比較的早期から顎骨浸潤が観察された。HSC3 に比較して、HSC4 では MMP9、perisostin の発現増強が示唆された。(図 3)



↑
HSC4

図 3 PCR による perisostin mRNA の発現状況
陽性コントロールとして歯根膜細胞を用いている

また、HSC4 において MMP9 の発現増強が示された。

4-3. 高度浸潤癌細胞株における BP 製剤の抗腫瘍効果

HSC4 に対する 10^{-6} M オーダーでのゾロデロネートの作用を検討した。濃度依存的に増殖抑制効果がみられた。 $3 \mu\text{M}$ での低濃度でも感受性を示した。FCM による細胞周期の解析では G2/M 期細胞の増加がみられたが、sub-G1 期細胞の増加は軽微であった。図 4、5

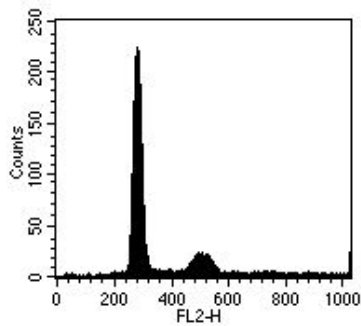


図 4 $0 \mu\text{M}$

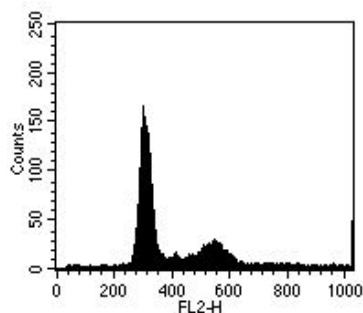


図 5 $3 \mu\text{M}$ ゾロデロネート添加主に G2/M 期集積が観察される

次いで、Ca 添加によるゾロデロネートの効果を観察したところ、増殖抑制効果の増強が

みられた。マイトキャプチャー法によるアポトーシス細胞の確認を行ったところ、HSC4 細胞におけるゾロデロネートによるアポトーシスの誘導が示唆された。図 6, 7

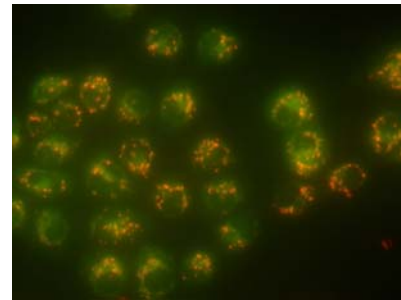


図 6 マイトキャプチャー法によるアポトーシスの観察 蛍光 MitoCapture がミトコンドリア内に取り込まれている

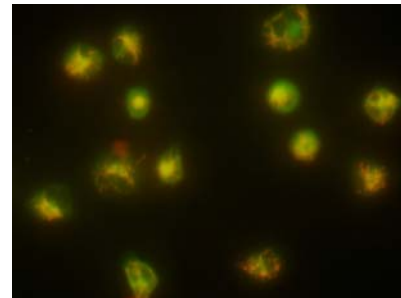


図 7 アポトーシスを生じている細胞 MitoCapture はミトコンドリアにとりこまれず細胞質で緑色蛍光が確認される

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 1 件)

1. Ueda K., Inoue S., Zhang Y., Kutsuna T., Inoue S., Noto K., Arai N., Noguchi M.: Heparin induces apoptosis through suppression of AKt in oral squamous cell carcinoma cells. Anticancer research 29: 1079-1088, 2009 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 井上さやか、新井直也、野口 誠: 口腔扁平上皮癌細胞株における低濃度ビスフォスフォの抗腫瘍効果. 第 65 回日本口腔科学会 学術集会 於東京 2011 年 4 月 22 日

2. Noguchi M., Tsuno H., Imaue S., Ohura T., Inoue S., Arai N.: A strategy for organ preservation in treating of locally advanced oral cancer. 9th Asian congress on oral & maxillofacial surgery Kuala Lumpur, Malaysia 26 November 2010

3. 井上さやか、朽名智彦、金 佳美、能登久美子、井上秀一、新井直也、野口 誠：上顎前歯部に発生した角化嚢胞性歯源性腫瘍の1例. 第33回日本口腔外科学会中部地方会於岐阜 2008年5月24日

4. 能登久美子、朽名智彦、金 佳美、上田耕平、井上さやか、野口 誠：下顎歯肉扁平上皮癌の臨床病理学的研究. 第26回日本口腔腫瘍学会総会 於大分 2008年1月25日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 誠 (Noguchi Makoto)

富山大学・

大学院医学薬学研究部(医学)・教授

研究者番号：50208328

(2) 研究分担者

新井 直也 (Arai Naoya)

富山大学・

大学院医学薬学研究部(医学)・准教授

研究者番号：80323723