

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592707

研究課題名(和文) 口腔癌による顎骨浸潤モデルの確立とNF- $\kappa$ B阻害剤による顎骨浸潤抑制効果の検討研究課題名(英文) Establishment of bone invasion model by oral cancer and effects of NF- $\kappa$ B inhibitor on bone invasion.

研究代表者

松尾 拓(Matsuo, Kou)

九州歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：70238971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌の顎骨浸潤における転写因子NF- $\kappa$ Bの役割について検討した。顎骨浸潤を伴う口腔扁平上皮癌ではNF- $\kappa$ Bの核移行が認められた。マウス口腔扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をマウス下顎角部より接種した後、NF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤NBDペプチドを投与すると、頬骨弓と下顎骨の破壊は抑制された。さらにNBDペプチドはSCCVII細胞および宿主ストローマ細胞のRANKL発現を抑制し、破骨細胞形成を抑制した。またNBDペプチドは腫瘍細胞の増殖を抑制し、アポトーシスを誘導した。以上の結果より、NF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤は、口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤を抑制すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) is constitutively activated in many cancers, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). However, the cellular mechanism underlying NF- $\kappa$ B's promotion of bone invasion by OSCC is unclear. Therefore, we investigated the role of NF- $\kappa$ B in bone invasion by OSCC in vivo. Immunohistochemical staining of OSCC invading bone in 10 patients indicated that the nuclear translocation of NF- $\kappa$ B was increased in OSCC compared with normal squamous epithelial cells. We next injected mouse OSCC SCCVII cells into the masseter region of C3H/HeN mice. Treatment with NBD peptide, a selective NF- $\kappa$ B inhibitor, decreased zygoma and mandible destruction by SCCVII cells, reduced number of osteoclasts by inhibiting RANKL expression in osteoblastic cells and SCCVII cells, increased apoptosis and suppressed the proliferation of SCCVII cells. Taken together, our data clearly indicate that inhibition of NF- $\kappa$ B is useful for inhibiting bone invasion by OSCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔癌 顎骨浸潤 NF- $\kappa$ B

## 1. 研究開始当初の背景

日本における口腔扁平上皮癌の発症率は全悪性腫瘍の1~2%程度であるが、世界では6番目に発症率の高い癌であり、年間約30万人が新たに口腔扁平上皮癌と診断され、約7千人が口腔扁平上皮癌で死亡している。口腔扁平上皮癌の好発部位は舌と歯肉であるが、歯肉癌が顎骨に浸潤すると、顎骨の切除を伴うことが多い。このように口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤は患者のQuality of Lifeも左右する重要な要因であるにもかかわらず、顎骨浸潤の程度は画像診断と臨床病理診断に委ねるしかない。このような理由から、顎骨浸潤の治療や予後の予測を遺伝子・分子レベルで客観的に評価できる方法の確立が急務である。

さらに正常組織と比較して癌組織では恒常的にNF- $\kappa$ Bが活性化されていること、NF- $\kappa$ B阻害剤が癌細胞のサイトカイン産生や浸潤能を抑制すること、さらにRANKの下流シグナルを阻害するNF- $\kappa$ B阻害剤が破骨細胞形成を抑制することから、NF- $\kappa$ Bを抑制することで、口腔癌細胞と破骨細胞をターゲットとした顎骨浸潤の治療が可能になると考えて本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の3点を目標とした。

- (1) 再現性の高い口腔癌の顎骨浸潤モデルの確立。
- (2) 口腔扁平上皮癌細胞の機能におけるNF- $\kappa$ Bの役割の解明。
- (3) 確立した動物モデルを用いたNF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤による顎骨浸潤の抑制効果の検証。

## 3. 研究の方法

- (1) 再現性の高い口腔癌の顎骨浸潤モデルの確立：マウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をC3H/HeNマウス右咬筋部から移植し、顎骨浸潤の評価は $\mu$ CT撮影を行い、骨破壊の状況を3次元的に評価し、さらに骨破壊が認められた部位を横断面で組織切片を作成した。
- (2) NF- $\kappa$ B阻害剤の効果の検討：マウス扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をC3H/HeNマウス右咬筋部から移植し、NF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤NBDペプチドを1匹当たり100 $\mu$ g、週3回、3週間投与し、同様に $\mu$ CT撮影および組織学的に解析した。
- (3) 免疫組織学的解析：破骨細胞の同定は酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ(TRAP)染色、癌細胞および宿主のストローマ細胞のRANKLの発

現は抗RANKL抗体、癌細胞の増殖は抗Ki-67抗体を用いた免疫染色、および癌細胞のアポトーシスはTUNEL染色で検討した。

## 4. 研究成果

マウス口腔扁平上皮癌細胞株SCCVII細胞をC3H/HeNマウス下顎角部より接種すると $\mu$ CT撮影により、3週間後には著明な頬骨弓および下顎骨の破壊が確認された。そこで、SCCVII細胞接種1週間後からNF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤NBDペプチドを1匹当たり100 $\mu$ g、週3回、3週間投与したところ、頬骨弓と下顎骨の破壊は抑制された。さらに組織学的解析により、NBDペプチドを投与するとSCCVII細胞および宿主ストローマ細胞のRANKL発現を抑制することにより、破骨細胞形成が抑制された。またNBDペプチド投与群では腫瘍細胞の増殖が抑制されるだけでなく、アポトーシスの誘導が認められた。以上の結果より、NF- $\kappa$ Bの選択的阻害剤は、口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤を効果的に抑制する可能性が考えられた。

## 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. Jimi E, Shin M, Furuta H, Tada Y, Kusukawa J. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol* 2013 Mar;42(3):803-9.
2. 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: 189-195
3. Akasaka Y, Matsuo K, Adachi K, Ishikawa A, Zhang M, Hosokawa R. Effects of thymosin  $\beta$ 10 and  $\beta$ 15 on wound healing in rat tooth extraction sockets. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 2013, 10.1016/j.ajoms.2013.02.007
4. Adachi K, Matsuo K, Akasaki Y, Kanao M, Maeda T, Ishikawa A, Hosokawa R. Effects of thymosin  $\beta$ 4 on the healing process of calvarial defects in rat. *J Prosthodont Res* 2013, 57: 162-168

5. 松本ゆかり、村岡宏祐、松尾 拓、中島啓介. ラット抜歯窩の治癒に対するウシラクトフェリンの効果. 九州歯会誌 2013, 67 (1): 5-12

6. Matsuo K, Akasaki Y, Adachi K, Zhang M, Ishikawa A, Jimi E, Nishihara T, Hosokawa R. Promoting effects of thymosin  $\beta 4$  on granulation tissue and new bone formation after tooth extraction in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2012, 114: 17-26.

7. Furuta H, Osawa K, Shin M, Ishikawa A, Matsuo K, Kahn M, Aoki K, Ohya K, Okamoto M, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O, Jimi E. Selective inhibition of NF- $\kappa$ B suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma *in vivo*. **Int J Cancer** 2011,131:E625-635.

8. Shin M, Matsuo K, Tada T, Fukushima H, Furuta H, Ozeki S, Kadowaki T, Yamamoto K, Okamoto M, Jimi E. The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. **Carcinogenesis** 2011, 32:1634-1640.

9. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases** 2011 17:462-468.

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 多田幸代、福島秀文、大澤賢次、渡邊誠之、自見英治郎 : NF- B 選択的阻害剤による口腔扁平上皮癌顎骨浸潤抑制の分子メカニズム解析」第 73 回九州歯科学会総会学術大会、平成 25 年 5 月 18-19 日、九州歯科大学講堂

2. 多田 幸代、福島 秀文、大澤 賢次、自見英治郎 : 新規 NF- B 選択的阻害剤は口腔癌による顎骨浸潤を抑制する 第 55 回歯科基礎医学会学術大会、平成 25 年 9 月 20-22 日、岡山コンベンションセンター

3. Tada Y, Sugiyama G, Watanabe S, Jimi E : New selective inhibitor of NF- B inhibits bone invasion by oral squamous cell carcinoma ASIA-PACIFIC CONFERENCE、平成 26 年 1 月 25 日、九州歯科大学講堂

4. 多田幸代、古田弘之、自見英治郎 : 口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤における NF- B の役割 第 72 回九州歯科学会、平成 24 年 5 月 18,19 日、北九州

5. 自見英治郎、古田 弘之、松尾 拓、富永和宏、高橋 哲、仲西 修 : 口腔扁平上皮癌の顎骨浸潤モデルの確立と NF- B 阻害剤による顎骨浸潤抑制効果の検討 第 72 回九州歯科学会、平成 24 年 5 月 18,19 日、北九州

6. 松尾 拓、鷺尾絢子、北村知昭、自見英治郎、西原達次 : Beta-thymosins の歯科臨床応用を目指す基礎的研究. 第 72 回九州歯科学会、平成 24 年 5 月 18,19 日、北九州

7. 張 皿、松尾 拓、中道郁夫、自見英治郎 : 糖尿病性歯周炎発症の分子機構の解明と治療薬開発のための基礎研究. 第 72 回九州歯科学会、平成 24 年 5 月 18,19 日、北九州

8. 多田幸代、福島秀文、大澤賢次、自見英治郎 : 口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤における NF- B の役割, 第 54 回日本歯科基礎医学会、平成 24 年 9 月 15 日、奥羽大学、福島

9. 自見英治郎 : 口腔扁平上皮癌細胞による顎骨浸潤における NF- B の役割と NF- B の選択的阻害剤を用いた顎骨浸潤抑制効果 第 15 回癌と骨病変研究会、平成 24 年 11 月 2 日、千代田放送会館、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等

6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
松尾 拓 (MATSUO Kou)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号 : 70238971

(2)研究分担者

自見 英治郎 (JIMI Eijiro)  
九州歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：40276598

(3)連携研究者

青木 和広 (AOKI Kazuhiro)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・准教授  
研究者番号：40272603