

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792180

研究課題名(和文) 新たな顎骨浸潤モデルの構築と TNF- α インヒビターを利用した新規治療法の開発研究課題名(英文) Construction of a new model of osteo invasion and a new technology by TNF- α inhibitor

研究代表者

友松 伸允 (Tomomatsu, Nobuyoshi)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30613591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌は強い局所浸潤能を有し、特に顎骨への浸潤は臨床的に重要な問題点となる。そこで本研究目的は、マウス下顎切歯抜歯モデルを用いて、口腔扁平上皮癌 顎骨浸潤モデルを構築し、破骨細胞を誘導する TNF- α シグナルを抑制することにより顎骨浸潤を抑制することである。マウスは10週令の雄のヌードマウス(KSN)を用いて行い、切歯抜歯窩に癌細胞(HSC-3細胞をコラーゲンに浸したものを)を注入し、4週間後にマウスを屠殺した。下顎骨を採取し、 μ CTなどで3次元画像を確認し、顎骨浸潤による骨吸収を評価したが、残念ながら顎骨浸潤を認めず、顎骨浸潤モデルを作成する自体が困難であった。

研究成果の概要(英文)：Oral squamous cell carcinoma has strong local permeation ability and it is clinically important problems for the permeation to jawbone in particular. Therefore, using a mouse lower incisor tooth extraction model, we tried to build an jawbone permeation by oral squamous cell carcinoma model, and the purpose of this study is to restrain jawbone permeation by restraining a TNF-alpha signal deriving osteoclast. We performed the mouse using male nude mouse (KSN) of 10-weeks age and injected thing which dipped the cancer cell (HSC-3) cell into the collagen in the incisor extraction socket, and killed a mouse four weeks later. We gathered mandibular bone and confirmed a three-dimensional image in micro-CT and evaluated bone resorption by the jawbone permeation. However the jawbone permeation model was not to recognize jawbone permeation unfortunately.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：顎骨浸潤 マウス抜歯窩骨新生モデル

1. 研究開始当初の背景

口腔癌、特に扁平上皮癌の顎骨浸潤は、放射線抵抗を示す上に、術後の放射線性骨髄炎を引き起こすことや、画像検査では正確な浸潤範囲を予測することが困難なこともあり、顎骨を大きく切除せざるを得ないことから、患者の生命予後、術後の患者の QOL に大きく関わっている。顎骨の過剰な切除は、咀嚼機能が失われるばかりでなく、顔貌の変形、発音障害もきたし社会復帰を妨げる大きな要因にもなる。過去の顎骨切除症例を見返してみると、辺縁切除を行わなくても、骨膜の切除までの切除で制御できたであろう症例や、逆に切除量が少なく腫瘍の取り残しを生じ、再発の要因になってしまった症例も見られる。必要最低限の顎骨切除量は、患者の QOL 向上に寄与することにつながると期待できる。

顎骨浸潤の動物実験モデルは顎骨で行うほうが臨床的にも有効な知見が得られると考え、申請者が大学院時代に作成したマウス下顎切歯抜歯窩の骨新生モデル (JBMR 24(10) page 1770-1781, 2009) を改良して、顎骨浸潤モデルを作成し、新たな動物実験モデルとして確立できないかと考えた。

近年、骨浸潤、骨転移における骨破壊は癌細胞により直接引き起こされるのではなく破骨細胞を介して起こる破骨細胞性骨吸収が重要な役割を演じていることが明らかとなっている。一方骨・骨代謝研究において、骨芽細胞と破骨細胞をとりまくサイトカイン・ネットワークや分化の調節にかかわる転写因子の解明が基礎分野で進んでいる。また破骨細胞の活性を抑制する特異的な作用を有する Bisphosphonate 製剤を Paget 病や高カルシウム血症、さらには乳癌の骨転移治療薬として臨床応用され、その成果が報告されている。顎骨浸潤の分野においても、Bisphosphonate 製剤と投与すると顎骨浸潤を抑制することが動物実験で確かめられ、報告されている (Cancer Research 70(21):8607-8616, 2010)。しかし、Bisphosphonate 製剤により破骨細胞を抑制することは、顎骨壊死などを引き起こすリスクが高く (J Oral Maxillofac Surg 61:1115-1117, 2003)、臨床応用するには難しいことが予想される。そこで破骨細胞誘導因子である TNF- α を抑えることで、顎骨壊死を起こすことなく、破骨細胞誘導を抑制し、顎骨浸潤を抑えることができなかと考えた。マウス下顎切歯抜歯窩の顎骨浸潤モデルを用いて、顎骨内に癌細胞を注入したマウスに TNF- α シグナルのインヒビター (例えば抗 TNF- α 抗体、NEMO Binding Peptide など) を投与することで顎骨浸潤が抑制できることが確認できれば、画期的な治療法の発見へ

とつながる。

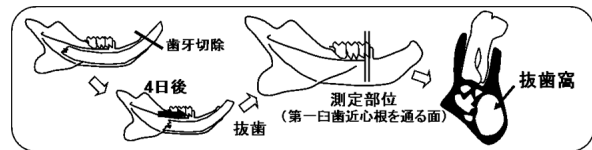
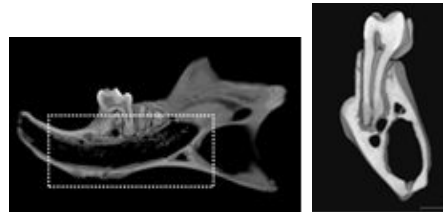
2. 研究の目的

口腔扁平上皮癌は強い局所浸潤能を有し、特に顎骨への浸潤は臨床的に重要な問題点となる。顎骨に浸潤した扁平上皮癌は、顎骨を大きく切除をせざるを得ないことが多い。顎骨浸潤についてマウスを用いた動物実験はこれまでも散見されるが、顎骨と長管骨では、その性状が異なり、顎骨を用いた実験を行った方が望ましい。そこで本研究の目的は、申請者が考案したマウス下顎切歯抜歯モデルを用いて、口腔扁平上皮癌顎骨浸潤モデルを構築し、破骨細胞を誘導する TNF- α シグナルを抑制することにより顎骨浸潤を抑制できないかを考察することにある。また、破骨細胞を誘導する遺伝子を特定し、どのようなタイプの扁平上皮癌が顎骨浸潤しやすいのかを検索し、今後の研究へとつなげていきたい。

3. 研究の方法

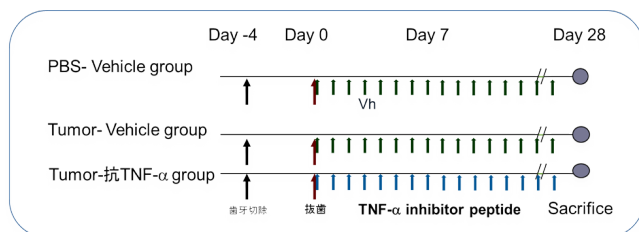
マウス下顎切歯抜歯モデルを用いて顎骨浸潤モデルを構築する。

申請者が大学院時代に考案したマウス下顎切歯抜歯窩骨新生モデル (J Bone Miner Res, Vol.24(10), pp1770-1781, 2009) をアレンジし、抜歯窩に扁平上皮癌細胞を注入することにより、実験の基本となる顎骨浸潤モデルを構築することとした。



マウスは 10 週令の雄のヌードマウスを用いて行い、下顎切歯を抜歯して翌日 (これは抜歯後の出血により注入した癌細胞が流出するのを防ぐためである) 抜歯窩に癌細胞 (HSC-3 など) を注入後 4 週間で、マウスを屠殺する。下顎骨を採取し、 μ CT などで 3 次元画像を確認し、顎骨浸潤による骨吸収を評価した。画像検索後、Villanueva bone 染色した後、MMA レジン切片を作成し顎骨浸潤を確認することとした。抜歯後 7 日後にほとんど破骨細胞を認めない系であったが、扁平上皮癌細胞により破骨細胞が多く発生し、顎骨浸潤が起

っていると予測される。破骨細胞は TRAP 染色により確認することとした。



顎骨浸潤マウスに抗 TNF- α インヒビターを投与する in vivo 実験

破骨細胞誘導能が高い数種の細胞株を用いて、マウス顎骨浸潤モデルにて動物実験を行う。コントロール群で顎骨浸潤が起きていることを確認した後、抗 TNF- α インヒビターを投与することで、顎骨浸潤を抑制できるかを検証する本実験を行う予定であった。評価法は、 μ CT による画像撮影、MMA レジン切片による骨形態計測（破骨細胞数/骨表面、腫瘍浸潤範囲など）、RT-PCR による抜歯窩内部の mRNA レベルの測定（ALP, osteocalcin, RANKL, OPG など）多角的に検索する。また、細胞株による相違を検索し、破骨細胞誘導能の違いにより、顎骨浸潤の進行度が異なることを検討することとした。

4. 研究成果

μ CT において顎骨浸潤が明らかでなく、顎骨浸潤モデルを構築することができなかった。最初に行った実験では、切歯を抜歯することでできた抜歯窩に留置針をもちいて癌細胞を注入した。しかし、抜歯直後もしくは翌日においても抜歯窩からの出血のため注入した癌細胞が押し出され、確実に癌細胞が抜歯窩にとどまっているという状態ではなかった。そのため癌細胞をコラーゲンスポンジに浸して注入するという方法で行ったが、それもうまくいかなかった。次に行った実験では癌細胞を注入するのにそのままではなく、癌細胞を in vitro で培養した Dish から膜で剥がし細胞の塊とすることで抜歯窩に入れ込みコラーゲンスポンジで癌細胞が流出しない方法で癌細胞を注入した。マウスを 3 週間で屠殺するも顎骨浸潤が確認できなかったため、4 週間に延長して実験を行った。下の図は 4 週間後に屠殺した下顎骨の断面画像である。癌細胞注入群とコントロール群はほぼ同様の抜歯窩の状態を呈しており、顎骨浸潤が起きているとはいえない状態であった。

この抜歯窩モデルの欠点として、抜歯窩の入り口が狭くうまく細胞を注入できな

μ CT 画像

コントロール群



コラーゲン注入群



癌細胞注入群



い点、注入しても抜歯窩からの出血により癌細胞が流出してしまい、細胞数などを一定にすることが困難であることが今回の実験をとおして分かった。顎骨浸潤モデルを構築することが困難であったことから、今回の目的である顎骨浸潤に対する新たな治療法の開発についても新たな知見を得るに至らなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

友松 伸允 (NOBUYOSHI TOMOMATSU)
東京医科歯科大学 歯学部附属病院 医員
研究者番号：30613591

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：