OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	癌の顎骨浸潤メカニズムに関する細胞生物学的研究
Author(s)	北川, 泰司
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44000
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	北川泰司（きたがわやすし）
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学位記番号	第 17739 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	**癌の顎骨浸潤メカニズムに関する細胞生物学的研究**
論文審査委員	（主査） 教授 米田 俊之 （副査） 教授 由良 義明　助教授 大倉 正也　講師 久保 和子

論文内容の要旨

＜目的＞

口腔癌は高頻度に下顎骨に浸潤する。口腔癌の顎骨への進展は治療を困難にし、患者の生命予後にも重大な影響を与える。したがって口腔癌の下顎骨への浸潤メカニズムの解明は、口腔癌の進展制御ならびに口腔癌患者の予後改善に極めて重要である。本研究においては口腔癌の顎骨への浸潤メカニズムの解明と、その制御のための指針を得ることを目的として、1）癌による下顎骨破壊動物モデルの樹立、2）癌の増大、進展に不可欠である血管新生において主要な役割を演じる血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor、VEGF）の関与、ならびに3）骨吸収抑制作用を有するビスフォスフォネート（BP）の効果、について検討した。

＜材料と方法＞

1．下顎骨破壊動物モデルの樹立

4週齢の雄性ヌードマウスの左側下顎角傍骨膜に咬筋を経由してA375ヒト悪性黒色腫細胞を5×10^6個接種した。

1）担癌マウスの体重測定

細胞接種同日より上皿バネ計りを用いて体重を連日測定した。

2）腫瘍体積の計測

細胞接種5日後よりノギスを用いて腫瘍の長径と短径を連日計測した。腫瘍体積は(体積)＝(長径)×(短径)^2×1/2として算出した。

3）組織学的検索と組織形態計測

細胞接種12日後に、マウスを10%中性ホルマリンにて灌流固定した後、腫瘍を含めて下顎を一塊として摘出した。10%EDTAにて脱灰、通法に従い後臼歯部冠状断パラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色および酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ（TRAP）染色を行い、光学顕微鏡で観察した。組織形態計測には画像解析ソフトImage Proを用いた。

2．ビスフォスフォネート（BP）の効果

1）BP投与

細胞接種同日よりインカドロネート（INC, 1.0 mg/kg/day）を12日間連日皮下投与した。コントロール群にはPBSを投与した。

2）アポトーシスの検出

破骨細胞、および腫瘍細胞のアポトーシスの検出には、HE 染色を施した組織切片を用い、細胞縮小、単一細胞の周囲組織からの遊離ならびに核クロマチンの凝集の全てを示す細胞をアポトーシス細胞として、その数を算定した。

3．副甲状腺ホルモン関連タンパク（Parathyroid Hormone-related Protein、PTH-rP）発現

A375 細胞における PTH-rP の発現を RT-PCR 法により検討した。

4．VEGF 産生

培養上清中に分泌された VEGF 濃度を ELISA 法により測定した。

5．統計処理

Student-t 検定を用いた。

＜結果＞

1．細胞接種約５日後より接種部位に肉眼的に腫瘍形成が認められ、経時的に腫瘍は増大した。組織学的検索により腫瘍直下の下顎骨皮質骨に TRAP 陽性破骨細胞の増加を伴う骨吸収が見られ、骨髄腔内への癌細胞の浸潤も静められた。これらの組織学的所見は口腔癌患者において見られる顎骨浸潤、破壊と類似していた。

2．RT-PCR 法により A375 細胞は PTH-rP mRNA を発現していることが判明した。マウス骨髄細胞の培養において A375 細胞の培養上清および PTH-rP は共に破骨細胞形成を促進した。

3．ELISA 法より A375 細胞は他の様々な癌細胞と同程度の VEGF を産生していることが示された。A375 細胞の VEGF 産生はインシュリン様増殖因子-1（Insulin-like Growth Factor-1、IGF-1）およびトランスフォーミング増殖因子ベータ（Transforming Growth Factor-β，TGFβ）の刺激により濃度依存性に増加した。また、VEGF はマウス骨髄細胞の培養において破骨細胞形成を増強させた。

4．INC は腫瘍の下顎骨浸潤に伴う破骨細胞数の増加を有意に抑制し、同時にアポトーシスを増加させることにより骨吸収を抑制した。また、下顎骨に近接する部位に存在する腫瘍細胞のアポトーシスを増加させた。さらに、INC 投与群では腫瘍内の血管数が有意に減少していた。それに伴って INC は顎骨上での腫瘍の経時的増大を抑制し、癌細胞の骨髄腔内への浸潤を阻害した。また、興味あることに INC は担癌マウスの体重減少（悪疫質）を有意に抑制した。

＜考察＞

本研究で樹立した下顎骨破壊動物モデルは高率に再現性高く口腔癌患者に見られると同様の下顎骨の吸収、および浸潤を示し、口腔癌の下顎骨破壊を検討するうえで有用なモデルであることが示された。A375 細胞の下顎骨への浸潤には破骨細胞による骨吸収が重要な役割を演じており、このような破骨細胞の増加には A375 細胞が産生する PTH-rP が関与していることが示唆された。さらに A375 細胞は強力な血管新生促進作用を有する VEGF を産生することにより、腫瘍の増大、進展を図ることが示唆された。A375 による VEGF 産生は骨基質中に豊富に存在し、骨吸収により放出される IGF-1 および TGFβにより促進されることから、破骨細胞による骨吸収は腫瘍細胞の下顎骨への浸潤ならびに増大をポジティブフィードバック性に促進すると推測される。この考えを支持する結果として、破骨細胞による骨吸収を特異的に阻害する BP の一つである INC が A375 細胞のアポトーシスの誘導、ならびに血管新生の抑制により、腫瘍の増大と顎骨への浸潤を抑制した。したがって、BP はメカニズムに立脚した癌の下顎骨浸潤制御薬剤として有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は口腔癌の顎骨への浸潤の細胞生物学的メカニズムの解明と、その治療法開発のための指針を得ることを目的として行われたものである。

本研究において、口腔癌患者に類似の顎骨浸潤モデルが樹立され、そのモデルを用いることにより、破骨細胞による骨吸収、癌細胞が産生する血管新生促進因子 VEGF および骨吸収促進因子 PTH-rP が癌の顎骨への浸潤に重要な役割を演じていることが明らかとなった。さらに、骨吸収阻害剤ビスホスホネートが癌の顎骨への浸潤を抑制することが示された。本研究の結果は口腔癌患者の治療に対して有用な科学的情報を提供するものであり、博士（歯学）を授与するに値するものと認める。