

論文要旨等報告書

氏	小野 亜希子
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 5 6 4 号
学位授与の日付	平成 2 0 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	骨吸収関連因子を指標したin vitro 骨浸潤能評価モデルの開発に関する研究

論文審査委員 教授 山本 敏男 教授 永井 教之 教授 佐々木 朗

学位論文内容の要旨

現在、口腔癌の顎骨浸潤は画像診断により判断されているが、X線の骨吸収と病理組織学的な骨浸潤範囲は一致しているわけではない。術前に癌細胞の有する骨浸潤能を予測できれば、画像診断と組み合わせることで癌の骨浸潤能を考慮したより根治性の高い治療が可能となる。癌の骨浸潤においては、破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たすことが知られており、癌の骨浸潤先端部に形成される骨微小環境により癌細胞は様々な調節を受け、破骨細胞性骨吸収を活性化することにより癌の骨浸潤・骨破壊は進行してゆく。このように癌細胞は骨微小環境の影響を大きく受けて破骨細胞性骨吸収を誘導するため、癌細胞の持つ骨浸潤能を正しく評価するためには、骨微小環境を加味した評価システムの構築が必要と思われる。そこで本研究では、*in vitro*にて骨微小環境を再現したモデル(*in vitro*再現モデル)を作製し、9種類の口腔扁平上皮癌細胞株を使用して、この再現モデルにおける癌細胞の動態を検討した。さらに、各種口腔扁平上皮癌細胞の*in vitro*再現モデルにおける骨吸収関連因子の発現動態を検討し、この再現モデルが口腔癌の骨浸潤能を評価するモデルとなりうるかを検討した。

【材料および方法】

1. *in vitro*再現モデルの作製

マウス骨芽細胞様細胞をアスコルビン酸存在下で培養し、表面活性剤処理にて骨基質を培養シャーレ表面に固定して骨基質コートシャーレとした。これに非コラーゲン性骨基質蛋白(TGF- β 1, IGF-I, II, bFGF, PDGF-BB)を添加し、口腔扁平上皮癌細胞を播種して作製した。

2. 髓腔内における癌細胞による骨破壊の検討

各種口腔扁平上皮癌細胞 10 万個を、8 週齢ヌードマウスの大腿骨髓腔に直接注入して検討した。

1) X線学的検討

髓腔内注入 2 週間後、マウス大腿骨の X 線学的骨破壊部位の面積を画像解析システムにて計測した。

2) 組織学的検討

髓腔内注入 2 週間後、マウス大腿骨の HE 染色像における腫瘍面積、TRAP 染色陽性の破骨細胞数を計測した。

3. 破骨細胞形成誘導能の検討

癌細胞の破骨細胞形成誘導能は、*in vitro*再現モデルより回収した培養上清をマウス骨髓細胞培養系に添加し、TRAP 陽性多核細胞を測定し評価した。

4. 骨吸収関連因子の遺伝子発現

*in vitro*再現モデルにおける癌細胞の骨吸収関連因子の遺伝子発現は、定量的 RT-PCR を用いて測定した。

【結果】

1. *in vitro* 再現モデルにおける破骨細胞形成誘導能

HSC-2, HSC-3, SAS, Sa3において、通常のプラスチックシャーレで培養した癌細胞より回収した培養上清添加群と比較して *in vitro* 再現モデルで培養した癌細胞より回収した培養上清添加群の破骨細胞数が増加していた。

2. 癌による骨破壊の X 線学的検討

HSC-2, HSC-3, SAS の X 線学的骨破壊部位の面積は、HSC-4, T3M-1 Clone2, Sa3, HO-1-u1, HO-1-N1, SCCKN と比較して大きかった。

3. 癌による骨破壊の組織学的検討

HE 染色像では HSC-2, HSC-3, SAS において腫瘍細胞が周囲に多量の間質を伴い髄腔内にて増殖し、既存の骨梁が活発に破壊されていた。HSC-4, T3M-1 Clone2, Sa3 においては、HSC-2, HSC-3, SAS ほど大きな腫瘍組織を形成しておらず、既存の骨梁を残しながら増殖していた。HO-1-u1, HO-1-N1, SCCKN においては髄腔内での腫瘍細胞の増殖は認められなかった。HE 染色像における腫瘍面積は HSC-2, SAS, HSC-3 の順に大きく、HSC-4, T3M-1 Clone2, Sa3 と比較して大きい傾向が認められ、TRAP 染色像における腫瘍と骨梁とが接する部位の破骨細胞数も同様の結果であった。以上より、口腔扁平上皮癌細胞は X 線学的および組織学的に高い骨浸潤群(HSC-2, HSC-3, SAS), 中等度骨浸潤群(HSC-4, T3M-1 Clone2, Sa3), 非骨浸潤群(HO-1-u1, HO-1-N1, SCCKN)の 3 群に分類され、これは *in vitro* 再現モデルにおける破骨細胞形成誘導能と相関が認められた。

4. *in vitro* 再現モデルにおける骨吸収関連因子の遺伝子発現

そこで骨浸潤群と非骨浸潤群との間で、*in vitro* 再現モデルにおける癌細胞の骨吸収関連因子の発現動態にどのような相違があるのかを検討した。*in vitro* 再現モデルにおける骨吸収関連因子の mRNA 発現をプラスチックシャーレにおける mRNA 発現に対する変動率で検討したところ、HSC-2, HSC-3, SAS の骨浸潤群において種々の骨吸収関連因子の発現が増加している傾向が認められた。骨吸収抑制因子である OPG は骨浸潤群において発現の増加傾向は認められなかった。

【考察】

in vitro 再現モデルにおいて、癌細胞は通常のシャーレと比較して多くの骨吸収に関連する遺伝子群の変化を認めた。また、*in vitro* 再現モデル と髄腔内での癌細胞の動態に相関が認められた点より、この *in vitro* 再現モデルが、癌の骨浸潤先端部における癌細胞と骨微小環境との相互作用を再現したモデルであり、口腔癌の骨浸潤能評価に有用である可能性が示唆された。しかしながら、他の骨吸収促進因子のなかには骨浸潤を認めた細胞群にもかかわらず、*in vitro* 再現モデルにおいてその mRNA 発現に増加傾向を認めない因子もあった。このことは、*in vitro* 再現モデルにおいて癌細胞が産生する種々の骨吸収関連因子は単独で作用するわけではなく、複数の骨吸収関連因子の量的、質的变化と相互作用により破骨細胞性骨吸収に関与していると考えられた。

今後、癌細胞の骨浸潤により強く関連する因子を検索する上で、実際の臨床検体を使用し本研究の *in vitro* 再現モデルにおける骨吸収関連因子の発現解析を行うことが必要であると考えられた。

【結論】

本研究で示した *in vitro* で骨微小環境を再現したモデルにおける癌細胞の動態の解析は、口腔癌の骨浸潤能の評価に極めて有用と考えられた。

論文審査結果の要旨

現在、口腔癌の顎骨浸潤は画像診断により判断されているが、X線的骨吸収と病理組織学的な骨浸潤範囲は一致しているわけではない。術前に癌細胞の有する骨浸潤能を予測できれば、画像診断と組み合わせることで癌の骨浸潤能を考慮したより根治性の高い治療が可能となる。癌の骨浸潤においては、破骨細胞性骨吸収が重要な役割を果たすことが知られており、癌の骨浸潤先端部に形成される骨微小環境により癌細胞は様々な調節を受け、破骨細胞性骨吸収を活性化することにより癌の骨浸潤・骨破壊は進行してゆく。そのため、癌細胞の持つ骨浸潤能を正しく評価するためには、骨微小環境を加味した評価システムの構築が必要と思われる。そこで本研究では、*in vitro*にて骨微小環境を再現したモデル(*in vitro*再現モデル)を作製し、9種類の口腔扁平上皮癌細胞株を使用して、この再現モデルにおける癌細胞の動態を検討した。さらに、各種口腔扁平上皮癌細胞の*in vitro*再現モデルにおける骨吸収関連因子の発現動態を検討し、この再現モデルが口腔癌の骨浸潤能を評価するモデルとなりうるかを検討した。その結果、以下の結論を得た。

1. 口腔扁平上皮癌細胞はヌードマウスの大腿骨骨髓腔における骨の破壊程度により、高い骨浸潤群(HSC-2, HSC-3, SAS), 中程度骨浸潤群(HSC-4, T3M-1 Clone2, Sa3), 非骨浸潤群(HO-1-u1, HO-1-N1, SCCKN)の3群に分類され、これは *in vitro* 再現モデルにおける破骨細胞形成誘導能と相関が認められた。
2. *in vitro* 再現モデルにおける骨吸収関連因子の発現は、HSC-2, HSC-3, SASの骨浸潤群において種々の骨吸収関連因子の発現が増加している傾向が認められた。骨吸収抑制因子であるOPGは骨浸潤群において発現の増加傾向は認められなかった。

これらの知見は、*in vitro* 骨微小環境再現モデルが口腔癌の骨浸潤能を評価できるモデルとして有用である可能性を示唆するものとして価値のある研究業績である。したがって、審査員は一致して本学位申請論文は博士(歯学)の学位論文に値するものと判断した。