

口腔癌顎骨浸潤の早期診断法の開発

出山 義昭 [北海道大学大学院歯学研究科／助教授]

背景・目的

口腔内の各組織は解剖学的に顎骨組織に近接しており、口腔癌は多くの場合に顎骨に浸潤し、骨離断による治療が行われる症例も多い。この場合、患者の顔面の審美性や機能性に多大な障害を生じ、治癒後の社会生活やQOLに大きな影響を及ぼす。そのため、腫瘍の顎骨浸潤を早期に診断し、骨浸潤抑制法の開発が求められている。本研究は口腔癌における破骨細胞の分化誘導・活性化に関与する因子を解明し、診断マーカーとしての可能性を検討するとともに、抗体などを用いて破骨細胞を抑制し、癌細胞増殖を間接的に阻害する治療法の開発を目的として行った。

内容・方法

①口腔癌細胞株における破骨細胞関連遺伝子mRNAの発現の検討

ヒト口腔癌細胞BHY細胞より全RNAを抽出し、cDNAを合成してGM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、OPG/OCIF、PTHrP、RANKL/ODF、TGF- β 、TNF- α 、VEGF mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検討した。

②破骨細胞誘導系に対する口腔癌細胞株培養上清の添加の影響

骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にBHY細胞の培養上清を添加して6日間培養し、TRAP陽性多核細胞の数を測定した。

③口腔癌細胞株培養上清による骨芽細胞におけるRANKL/ODF mRNA発現変化の検討

BHY細胞の培養上清を骨芽細胞に作用させ、RANKL/ODF mRNA発現をRT-PCR法を用いて検討した。

④口腔癌組織におけるPTHrP mRNA発現の検討

口腔癌患者より摘出された組織より全RNAを抽出し、PTHrP mRNAの発現をRT-PCR法を用いて検討した。

結果・成果

骨浸潤能が高いとされるヒト口腔癌細胞株BHY細胞が前駆細胞から破骨細胞への分化に影響を与えるか否かを明らかにするため、BHY細胞の培養上清を骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系に添加して6日間培養後、酒石酸耐性酸性ホスマーカー(TRAPE)染色を行った。その結果、BHY細胞の培養上清添加により破骨細胞と推測されるTRAP陽性多核細胞の数が培養上清非添加群と比較して有意に増加した。また、

最もTRAP陽性多核細胞誘導効率が高かったのは、培養上清：培地=1:2の場合であった。次に、破骨細胞の分化・活性化に関与することが知られているGM-CSF、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、OPG/OCIF、PTHrP、RANKL/ODF、TGF- β 、TNF- α 、VEGFをBHY細胞が産生しているかを調べるためにこれらの遺伝子のmRNAの発現をRT-PCR法により検討した。その結果、GM-CSF、IL-6、TNF- α は検出されなかった。TGF- β は検出されたが、発現量は対照として用いた正常歯肉細胞と同程度であった。PTHrPとVEGFは明らかな発現の増加が認められた。続いて、BHY細胞が産生する因子がパラクライント作用して骨芽細胞に破骨細胞分化を促進する因子が発現している可能性について調べるために、BHY細胞の培養上清を骨芽細胞に作用させてmRNAの発現をRT-PCR法により検討した。その結果、BHY細胞の培養上清は骨芽細胞におけるIL-6とRANKL/ODF mRNAの発現を増加させた。BHY細胞が産生しているか、BHY細胞の培養上清により骨芽細胞に発現する因子が実際に破骨細胞を誘導することを確認するために、骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系にIL-1 β 、IL-6、IL-8、VEGF、PTHrPを添加してTRAP染色を行った。その結果、IL-8以外は添加によりTRAP陽性多核細胞数の増加が認められた。最後に臨床的に摘出された正常歯肉ならびに歯肉癌組織を用いて、in vitroにおいて検討した遺伝子の発現を検討した。正常歯肉組織においてIL-1 β 、IL-6、IL-8、VEGFおよびPTHrP mRNAの発現は認められなかった。検討したすべての歯肉癌組織においてIL-1 β 、IL-6、IL-8およびVEGF mRNAの発現が認められたが、病理組織的に顎骨浸潤の存在したもののみにPTHrP mRNAの発現が認められた。以上の結果から、PTHrPの発現を検討することで口腔癌の骨浸潤を予測し、抗PTHrP抗体を局所に投与することで骨浸潤を抑制することが可能になると推測された。

今後の展望

本研究により、PTHrPが口腔癌の顎骨浸潤のマーカーとなり、その作用を阻害することにより口腔癌顎骨浸潤を抑制することが明らかになった。今後は、臨床検体のサンプル数をさらに増やすことよりのマーカーとしての確実性を増すとともに、ヌードマウスを用いた口腔癌移植実験により抗PTHrP抗体の局所投与の有効性さらには副作用などについても調べ、実際の治療に応用可能かどうか検討を加えることが必要である。

口腔癌はその発生部位から、機能的・審美的障害を生ずる可能性が高い。癌の顎骨浸潤を抑制することで術後における患者のQOLの向上に大いに寄与することができる。