

## マウス退縮型線維肉腫細胞の炎症による悪性化進展におけるサイモシン 4の役割(北海道大学博士論文の内容および審査の結果要旨(平成13年度))

著者名(日)	小林 徳栄
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	21
号	1
ページ	139-141
発行年	2002-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00008688/">http://id.nii.ac.jp/1145/00008688/</a>

Sinus Liftを行った場合、術後の治癒期間は少なくとも4～6カ月を必要とし、さらに、インプラントを埋入した後の免荷期間は6カ月以上が必要であるため、インプラントによる口腔機能の回復までに要する期間は、一般に1年以上とされている。

従来より、異所性に骨と軟骨を誘導する活性を有する骨形成タンパクは、この異所性骨誘導活性を薬理活性として捉え、歯科領域に応用することが考えられている。近年、BMP-2・7、GDF-5の組み換え体が大量生産可能となり、骨再生治療の薬剤として、その臨床応用は現実のものになりつつある。そこで本研究は、rhGDF-5のSinus Lift移植材料への臨床応用の可能性を検討する目的で、ラットにrhGDF-5を移植して異所性骨誘導活性を組織学的に検討、次にビーグル犬をSinus Liftを想定した実験モデルとし、前頭洞内にrhGDF-5を移植しその担体、骨形成状態について組織学的に検討を行い、以下の結果を得た。

1. ラットにおいてrhGDF-5が誘導した骨形成は筋肉内と骨膜下で確認され、その濃度に依存した異所性骨誘導活性があることが明らかになった。
2. rhGDF-5は、ビーグル犬前頭洞内に対して骨形成が

可能であった。

3. 担体にコラーゲンをを用いた場合には、骨形成の場を確保する必要性が考えられた。
4. rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、前頭洞内移植後1週間で幼若な骨組織が観察され、2週間で既存骨と連続した新生骨組織が観察された。
5. 生体内吸収性材料である $\beta$ -TCPは骨形成の場を確保するのに有効であった。

本研究結果より、rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、ヒト上顎洞内に対して、速やかに骨形成を誘導できることが推察された。rhGDF-5/ $\beta$ -TCP複合体は、従来からSinus Liftに使用されている自家骨、ハイドロキシアパタイト、凍結乾燥脱灰骨などの移植材料に比較して、骨採取や感染の危険性が無く、大量生産が可能であり、骨形成の場を確保できるため、従来のSinus Liftの問題点を解決する移植材料として、臨床応用の可能性が示唆された。

本研究は、骨誘導因子の基礎研究とその臨床応用において有益な貢献をし、歯科医学における骨組織再建の発展に寄与するところが大きい。

審査の結果、本論文は博士（歯学）の学位論文に値すると判定した。

氏名・(本籍)	小林 徳 栄 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第89号
学位授与の日付	平成13年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	マウス退縮型線維肉腫細胞の炎症による悪性化進展におけるサイモシン $\beta$ 4の役割
論文審査委員	主査 教授 有 末 眞 副査 教授 田 隈 泰 信 副査 教授 東 城 庸 介

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

口腔癌を含むヒト主要臓器の発癌要因に炎症の関与が、明らかにされつつある。今回、炎症がどのような機構で発癌、そしてその後に続く癌細胞の悪性化進展を促進するのかを明らかにするために、すでに確立されてい

るマウス退縮型線維肉腫細胞の炎症による悪性化進展モデルを用いて、悪性化に伴い発現増強する遺伝子の解析を行った。既に、differential display法を用いて炎症により悪性化進展した癌細胞には、サイモシン $\beta$ 4、カルサイクリン、ヴィメンチンの3つの遺伝子が、発現増強する予備成績を得た。そこで、この3つの遺伝子について

癌の悪性化進展との関連を解析した。

### [材料および方法]

1. 細胞：本実験に用いた癌細胞は、C57BL/6マウスのメチルコラントレン誘発線維肉腫の培養クローン (BMT-11cl-9) を突然変異原物質 (ケルセチン) にて処理後分離したQR-32癌細胞である。このQR-32癌細胞は、単独で同系マウスの皮下に  $2 \times 10^5$  個を、または尾静脈内に  $1 \times 10^6$  個を移植しても皮下に腫瘍形成はせず、また肺への転移も認められない退縮型の癌細胞である。
2. 悪性化進展モデル：QR-32癌細胞を炎症を惹起する異物である止血用ゼラチンスポンジと共に皮下移植すると腫瘍形成する。移植後21日目に増殖した腫瘍から培養細胞株を樹立し、これをQRsP癌細胞と呼称した。これらのQRsP癌細胞は、新たな正常同系マウスにゼラチンスポンジ非存在下での皮下移植により腫瘍形成し、尾静脈内移植では肺に転移結節を形成する悪性化形質を獲得した癌細胞株である。
3. Northern blotting法：親細胞QR-32癌細胞とそれから派生したQRsP癌細胞6株からTotal RNAを抽出しNorthern blottingにてサイモシン $\beta$ 4、カルサイクリン、ヴィメンチンの発現を比較検討した。
4. 遺伝子導入：Invitrogen社の発現ベクターpcDNA3.1(+/-)にマウスサイモシン $\beta$ 4 cDNAをsense及びantisense方向に組み込み、前者を元来サイモシン $\beta$ 4の発現がほとんどないQR-32癌細胞に、後者をサイモシン $\beta$ 4の発現が強く悪性化進展しているQRsP-30癌細胞株に各々lipofection法により遺伝子導入した。選択抗生剤geneticin添加培地にて遺伝子導入癌細胞を選択後、limiting dilutionによりsense遺伝子導入癌細胞24クローン、antisense遺伝子導入癌細胞20クローンを各々分離した。サイモシン $\beta$ 4発現をRT-PCR法、若しくはWestern blotting法にて検索し、目的とするクローンを各々4クローンずつ選択した。
5. 皮下増殖能及び転移能：それぞれのクローン癌細胞を新たな正常同系マウスに皮下及び尾静脈内に移植し、腫瘍形成能さらに肺及びその他臓器への転移能を検討した。
6. 細胞運動能：各クローン癌細胞をスライドガラス上に金コロイド液を敷き48時間培養し細胞の運動能を評価した(金コロイド法)。また、各クローン癌細胞をスライドガラス上にconfluentまで培養し一定の面積で細胞を剝離した後、細胞の運動能を評価した(scratch wound assay)。
7. アクチンフィラメントの形成：各クローン癌細胞を

48時間培養後、ホルマリンで固定後、TexasRed-X Phalloidinで染色したものを共焦点レーザー顕微鏡を用いて、アクチンフィラメントを観察した。

### [結果]

1. Northern blotting法：differential display法で候補に挙げられた3つの遺伝子の中で、サイモシン $\beta$ 4のみが炎症による悪性化進展に相関して発現増強したが、他の2つのカルサイクリンとヴィメンチンは悪性化進展と相関しなかった。
2. 皮下増殖能及び転移能：親QR-32癌細胞及びQR-32ベクターコントロール癌細胞は皮下移植または尾静脈内移植しても腫瘍形成せず、また肺への転移も認めなかった。一方サイモシン $\beta$ 4 sense transfectantは皮下での腫瘍原性が軽度増強し、肺への転移能が有意に亢進した。さらに肺以外の他臓器への転移するクローンも観察された。元来サイモシン $\beta$ 4の発現が強く悪性化進展しているQRsP-30癌細胞は、皮下移植においても尾静脈内移植においてもほぼ全てのマウスに腫瘍形成し肺に転移を認めた。またQRsP-30ベクターコントロールにおいても親細胞QRsP-30癌細胞とほぼ同じ腫瘍原性、肺転移能を示した。それに対しQRsP-30 antisense transfectantは4系中2系が皮下移植で増殖能が減弱した。さらに、尾静脈内においても4系中2系で肺への転移能が減弱することが明らかとなった。加えて今回の動物実験においてQRsP-30 antisense transfectantは肺以外の他臓器への転移能は消失した。このことよりサイモシン $\beta$ 4は癌の悪性化形質、特に転移能と密接に関わるものと推察された。
3. In vitroにおける細胞運動能：In vivoの転移能と相関してin vitroの細胞運動能が変動することが、金コロイド法及びscratch wound assayで観察された。
4. アクチンフィラメントの形成：サイモシン $\beta$ 4の発現が強く、転移能の強い細胞株では、F-actinが低染色性及び形成不全傾向にあり、また細胞形態も変化していた。

### [結語]

QR-32癌細胞から得られた転移能の亢進した癌細胞(悪性化進展癌細胞)でサイモシン $\beta$ 4が強発現されることが観察された。また、サイモシン $\beta$ 4発現がこれら癌細胞の転移能亢進に重要な役割を演じていることが、サイモシン $\beta$ 4のsense及びantisenseの導入実験で確認された。

## 学位論文審査の要旨

癌の転移、浸潤、造腫瘍性など悪性形質は、腫瘍増殖期における周囲微少環境との関連により獲得されるものと考えられている。この悪性化進展の機序として、発癌時の遺伝子変化に加え、増殖過程における更なる遺伝子変異が重積することにより生じるものと推察されている。先に岡田らによりマウス退縮型線維肉腫細胞（以下QR-32癌細胞）において、サイモシン $\beta 4$ の発現と悪性化進展に相関が見い出されているが、サイモシン $\beta 4$ の悪性化進展における役割は不明のままとなっていた。そこで、申請者は、遺伝子工学的手法を用い、サイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現とQR-32癌細胞の悪性形質獲得との関連について検討した。その結果、QR-32癌細胞株においてサイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現の亢進が炎症依存性悪性化進展株で認められ、遺伝子導入によるサイモシン $\beta 4$ の発現の調節により、悪性形質はセンス導入で亢進し、アンチセンス導入では低下を示した。また、サイモシン $\beta 4$ 遺伝子は、癌の悪性形質のうち特に転移能との関連が深く、ア

クチンフィラメントの制御を介して癌細胞の運動能に関与していることが示唆された。

本研究は、QR-32癌細胞の悪性化進展において、アクチン調節蛋白サイモシン $\beta 4$ 遺伝子の発現が、癌細胞の運動能やin vivoでの転移の亢進とサイモシン $\beta 4$ の発現が深く関与していることを、初めて立証し、癌細胞中のサイモシン $\beta 4$  mRNAの発現程度が癌細胞の悪性化進展の指標の一つとなり得ることを示したものである。またヒト口腔癌細胞株（HSC-3）においても、その発現が観察され、癌細胞中のサイモシン $\beta 4$ の発現の程度が口腔扁平上皮癌の悪性化進展度、治療法の選択ないし、予後因子の一つになる可能性を示唆した。

以上のことから、本論文は、癌の悪性形質の獲得の機序の一端を明らかにし、今後の口腔癌の研究、治療の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	牧 浦 哲 司 (奈良県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第90号
学位授与の日付	平成13年3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当(課程博士)
学位論文題目	<b>咬合支持と飼育飼料形態がラットの記憶・学習行動に及ぼす影響</b>
論文審査委員	主 査 教 授 平 井 敏 博 副 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 姜 英 男

## 論文内容の要旨

### I. 目 的

近年、咬合・咀嚼機能と全身の機能との密接な関連が報告されている。特に、歯の喪失が中枢神経系へ及ぼす影響が注目されており、ラットにおいては、臼歯切除による咬合支持の喪失は中枢神経系への求心性情報を障害し、コリン作動性ニューロンを脱落させ、アセチルコリ

ン合成能を低下させることが示唆されている。なお、AChは記憶・学習機能や、老年痴呆にコリン作動性ニューロンの破壊が深く関与していることがすでに報告されている。さらに、アルツハイマー型老年痴呆患者の死後脳におけるMeynert核のアセチルコリン合成酵素活性の低下が報告され、また、歯の喪失が本疾患の危険因子の一つとして挙げられている。一方、記憶機能を含む認知機