

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

従来より食物咀嚼に関する研究は数多くなされてきたが、ほとんどの研究は正常な鼻呼吸を営む者を対象に行われたものである。ヒトが日常行っている食物咀嚼は永い間に学習し、習得した個人固有の咀嚼機能である。一方、長期にわたる鼻疾患を持ち、鼻呼吸が阻害され、口呼吸が惹起されている者では、齶蝕や歯周疾患、歯列や咬合異常などの歯科疾患はもとより、咀嚼機能にも種々の異常や変化を生じさせているものと推察される。しかし、鼻呼吸阻害が咀嚼機能にどのような影響をおよぼすかについての報告はほとんど見られない。そこで本研究は、鼻閉に着目し、鼻閉による食物咀嚼の影響を明らかにする目的で行われたものである。正常時と人為的に鼻閉状態にした時の同一被験者を対象に、形態、物性、水分含有量の異なる4種の食物を試料として選択し、食物咀嚼実験、および筋電図学的分析を行い、以下の結果を得た。

①正常時と等しい一口量の試料を咀嚼させた場合には、鼻閉時の一口量咀嚼時間（以下一口時間）が、有意に延長した。②一口時間の延長した鼻閉時の場合は、嚥下時の食塊水分量と咀嚼時唾液分泌量には、正常時との

間に有意差が認められなかった。③水分量の少ない試料では唾液分泌量が嚥下の誘発に影響を与えることが鼻閉時でも示唆された。④鼻閉時には正常時に比べて、咀嚼周期が有意に延長した。⑤鼻閉時の筋放電持続時間は延長する例、短縮する例、変わらない例があったが、いずれの場合でも正常時との間に有意差を認めなかった。⑥鼻閉時の筋放電間隔は正常時に比べて、有意な延長を認めた。⑦鼻閉時の咀嚼周期の延長は筋放電間隔の延長によることが明らかになった。⑧鼻閉時の筋放電間隔の変動係数は正常時に比べて高い値を示し、咀嚼リズムは正常時のそれと比較して不規則であった。

以上のことより、鼻閉時の咀嚼時間の延長は筋放電間隔の延長による咀嚼周期の延長ならびに咀嚼回数増加が要因であると推測される。また、鼻閉時の唾液分泌量の低下は、咀嚼周期の乱れも要因の一つであることが推察される。

本研究により得られた結果は、鼻疾患を持つ口呼吸者の咀嚼機能の特徴を生理学的に把握し、解明しており、歯科医学の発展に寄与するところ大であり、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	中 井 一 元 (北海道)
学位の種類	博 士 (歯科)
学位記番号	甲 第51号
学位授与の日付	平成9年3月21日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当 (課程博士)
学位論文題目	Manganese superoxide dismutase遺伝子導入による マウス退縮型癌細胞の悪性化進展の抑制
論文審査委員	主 査 教 授 有 末 眞 副 査 教 授 市 田 篤 郎 副 査 教 授 賀 来 亨

論 文 内 容 の 要 旨

目 的
癌細胞の持つ造腫瘍性および浸潤・転移能などの悪性

形質は、発癌当初より具備されているものではなく、その発生・増殖の過程において癌細胞を取り巻く周囲環境との関わりによって獲得されてゆくものと考えられてい

る。現在、その要因のひとつとして活性酸素が注目されている。これまで活性酸素が発癌におよぼす影響を検討した報告は多いが、癌細胞側の活性酸素抵抗能、すなわち抗酸化酵素誘導能の増殖が悪性化進展にもたらす影響を検討したものはみられない。

岡田らは、C57BL/6マウス線維肉腫BMT-11から正常同系宿主で自然退縮するQR癌細胞を分離し、このQR癌細胞がゼラチンスポンジなどの異物と共に皮下移植することで強い増殖能および転移能を獲得することを示し、悪性化進展モデルを確立した。また、この悪性化進展に活性酸素が深く関与していることも示した。

そこで、この実験モデルを用い、活性酸素がQR癌細胞の悪性化進展の要因であること、および、癌細胞の悪性化進展感受性に対する癌細胞内の抗酸化酵素の役割を明らかにするためにMnSOD遺伝子をQR-32癌細胞に導入し過剰発現させ、こらがゼラチンスポンジとの同時皮下移植によって起こる悪性化進展に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

1. 動物

SLC (浜松) より購入し、SPF環境で飼育した7~10週令のメスC57BL/6マウスを用いた。

2. 細胞

C57BL/6マウスの線維肉腫BMT-11の培養系クローン9をquercetin処理後、再クローニングして樹立したQR-29癌細胞およびQR-32癌細胞を用いた。

3. 癌細胞の移植と観察

C57BL/6マウス背部皮下に10×5×3mmのゼラチンスポンジを皮下移植し、同時にゼラチンスポンジ内に癌細胞1×10⁵個を移植した。その後経日的に皮下腫瘍の増殖を観察した。

4. 培養株の樹立と悪性化進展の判定

癌細胞とゼラチンスポンジを同時皮下移植して21日目に、増殖してきた腫瘍から培養株を樹立した。新たなマウスに2×10⁶個単独皮下移植し皮下増殖を観察した。また、1×10⁶個尾静脈内移植し、肺転移巣のコロニー数を算定した。悪性化進展の判定は親株癌細胞の皮下増殖能または肺転移能と比較し、どちらか一方でも有意に増強しているものを悪性化進展を起こしたものと判定した。

5. MnSOD発現ベクターの作製

rat MnSOD cDNAを発現ベクターpDGLに挿入し作製した。

6. 遺伝子の導入

作製したMnSOD発現ベクターおよび発現ベクターのみをlipofectin法にてQR-32癌細胞に導入、MnSOD発現

ベクター導入クローン癌細胞およびベクターのみの導入クローン癌細胞を得た。

7. MnSOD, GPx, Cu, ZnSOD蛋白の検出

培養癌細胞よりcell lysateを調製し、Western blotting法によって検出した。また、この結果をDensitometerにて測定し、定量化した。

8. MnSOD活性の測定

nitroblue tetrazolium (NBT) 法にてMnSOD活性を測定した。また、サンプルの総蛋白量はLowry法にて定量化した。

9. MnSOD遺伝子導入の確認

RT-PCR法によって導入した遺伝子の発現を確認した。

結 果

1. QR癌細胞の悪性化進展の頻度と細胞内抗酸化酵素量の関係

QR-32癌細胞をゼラチンスポンジと同時皮下移植して起こる悪性化進展頻度は7/10であったのに対し、QR-29癌細胞では1/10と有意に低かった。また、QR-29癌細胞のMnSOD量およびGPx量は、QR-32癌細胞のそれに比較して高値を示し、悪性化進展頻度と、MnSOD量およびGPx量には逆相関が認められた。

2. MnSOD高発現クローン癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植による悪性化進展の検討

QR-32癌細胞にMnSODcDNAを遺伝子導入し、細胞内のMnSOD活性が約2倍の値のMnSOD高発現クローン癌細胞(QR-32 SOD-23, 24)を得て、これら癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植で起こる悪性化進展を検討した。元のQR-32癌細胞やベクターのみを導入した癌細胞の悪性化進展頻度はそれぞれ7/10であったのに対し、QR-32SOD-23およびQR-32SOD-24の悪性化進展頻度はそれぞれ2/10と有意に抑制された。

考 察

QR癌細胞をゼラチンスポンジと同時皮下移植することによって起こる癌細胞の悪性化進展が、遺伝子導入によって癌細胞内に抗酸化酵素MnSODを過剰に発現させることにより有意に抑制された。このことから、QR癌細胞の悪性化進展にはゼラチンスポンジに集積する炎症反応細胞が産生する活性酸素が深く関与していること、また、癌細胞内の抗酸化酵素が悪性化進展の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

しかし、遺伝子導入を行いMnSODを高発現したにもかかわらず、増殖した腫瘍より得た培養株では2系ともに悪性化の進展が観察された。この2系の培養株にrat

MnSODcDNAの欠落は認められなかったことから、MnSODを高発現したにもかかわらず、悪性化の進展が観察された要因には、

1) 周囲炎症細胞より産生された O_2^- が過剰であり、相対的にMnSOD活性が不足した可能性、2) MnSOD発現増強により O_2^- が速やかに H_2O_2 に変換され、その結果二次的に H_2O_2 が作用した可能性、3) O_2^- が $NO\cdot$ と反応し $ONOO^-$ が合成されこれらが作用し遺伝子障害が生じ悪性化進展が生じた可能性など、活性酸素とその代謝に関与するMnSODを含む抗酸化酵素の活性のバランスが

関連していると考えられるが以前不明な点も多く、今後更に検討すべき課題と思われる。

結 語

QR癌細胞のゼラチンスポンジとの同時皮下移植によって起こる悪性化進展がMnSOD遺伝子導入によって有意に抑制された。このことより、活性酸素がQR癌細胞の悪性化進展の要因であること、癌細胞内の抗酸化酵素活性が悪性化進展に強く影響することを明らかにした。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

癌細胞の造腫瘍性、浸潤、転移能などの悪性形質は、発癌後の増殖過程において周囲の環境との関わりによって獲得されていくものと考えられており、その要因の一つに活性酸素があげられている。また癌細胞の悪性形質獲得機構の解明およびその抑制は口腔癌の研究、治療においても重要な今日の課題である。これまで活性酸素が癌細胞におよぼす影響を検討したものが多いが、癌細胞側の活性酸素抵抗能、すなわち抗酸化酵素誘導能の増強が悪性化進展にもたらす影響を検討したものはみられない。そこで、岡田らにより悪性化進展モデルとして確立され、悪性化進展に活性酸素の関与が深く示唆されたQR癌細胞(QR-32, QR-29)を用い、活性酸素がQR癌細胞の悪性化進展の要因であること、および癌細胞内の抗酸化酵素の役割を明らかにするためにMnSOD遺伝子をQR-32癌細胞に導入し過剰発現させ、これがゼラチンスポンジとの同時皮下移植によって起こる悪性化進展に及ぼす影響を検討した。

研究結果は以下のごとくである。

1) 悪性化進展を起こす頻度の低いQR-29癌細胞のMnSOD量およびGPx量は、悪性化進展を起こす頻度の高いQR-32癌細胞に比較して高値を示し、これに逆相関

してQR-32癌細胞の悪性化進展は有意に低値を示した。2) QR-32癌細胞にMnSODcDNAを遺伝子導入し、細胞内のMnSOD活性が約2倍の値のMnSOD高発現クローン癌細胞のゼラチンスポンジと同時皮下移植によって起こる悪性化進展頻度は元のQR-32癌細胞やベクターのみを導入した癌細胞のそれと比較し有意に抑制された。

3) 遺伝子導入により得られたMnSOD高発現クローン癌細胞の10系中2系に悪性化進展がみられたが、増殖した腫瘍には遺伝子の欠落はみられなかった。

本研究から活性酸素がQR癌細胞の悪性化進展の要因であること、癌細胞内の抗酸化酵素活性が悪性化進展の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。しかし悪性化進展を示すものもみられ、このことは活性酸素とその代謝に関与するMnSODを含む抗酸化酵素の活性のバランスが関連していると考えられるが不明な点も多く、今後更に検討すべき課題と思われる。

以上の結果から、本論文は、口腔癌の研究、治療の進歩発展に寄与するところが大きであり、審査の結果、学位授与に値すると判断した。