

中学1年生 総合学習

マウスを使った実験

2017年1月18日

デンタルオフィスみなと

露木 良治

自己紹介



静岡県沼津市 デンタルオフィスみなと

内 容

1. なぜ歯科医師がマウスの実験を？
2. 遺伝子とは
3. マウスについて
4. マウスを使った実験
5. マウスに舌がんを作って治療する
6. まとめ

1

なぜ歯科医師が
マウスの実験を？

口腔外科を学ぶため横浜へ (こうくう)



高校 3年

大学歯学部 6年

歯科医師となって

それから

横浜市立大学大学院
医学研究科 口腔外科を
卒業しました。

横浜市立大学 附属病院



横浜八景島シーパラダイスの近くです。

数々の医療ドラマの舞台に



チームバチスタの栄光
2008年 関西テレビ



附属病院と研究棟をつなぐ通路は、
「バチスタ通り」と呼ばれています。

口腔外科(こうくうげか)



あごの骨折、あごの化膿、あごのできもの、舌・唇・歯ぐきのがんの治療などを行う診療科です。

口腔外科の手術



外来での治療だけでなく、入院して全身麻酔をかけて、お口の中の手術をします。



舌がんの治療

手術

放射線

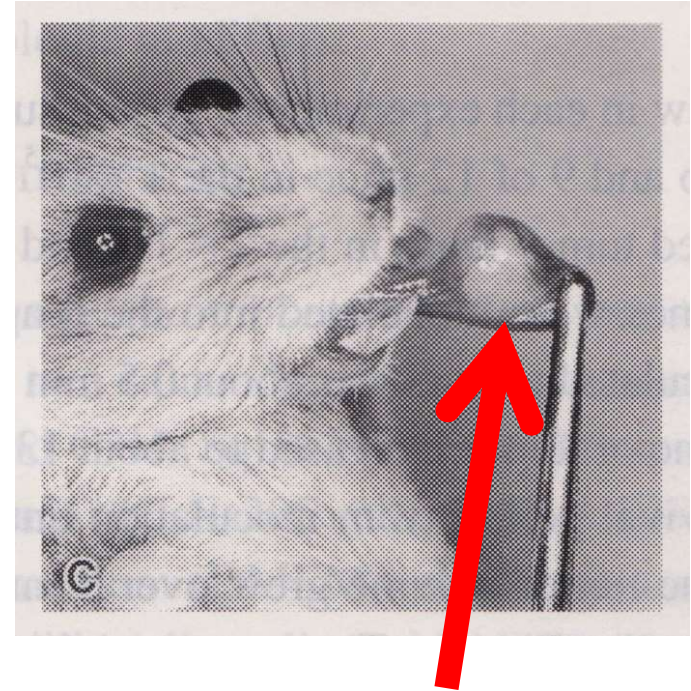
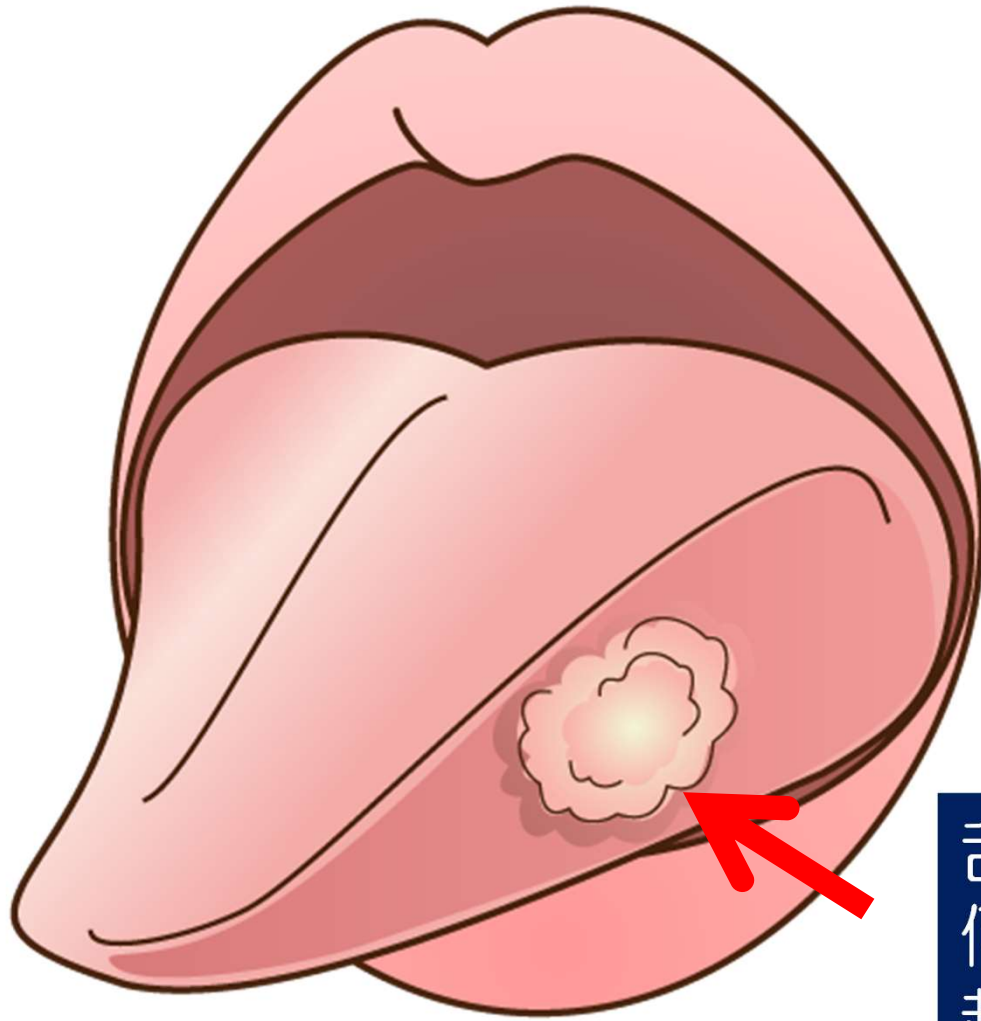
抗がん剤

免疫療法
など



いくつかの治療法を組み合わせることで治療します。

舌がんって何？



舌にできる悪性のできもの。
何らかの刺激で細胞の異常が
起きて、がんができると考え
られています。

舌がんを治したい

そう思って、
実験を始めました。



2

遺伝子とは

子が親に似る



遺伝と呼びます。

DNAの二重らせん

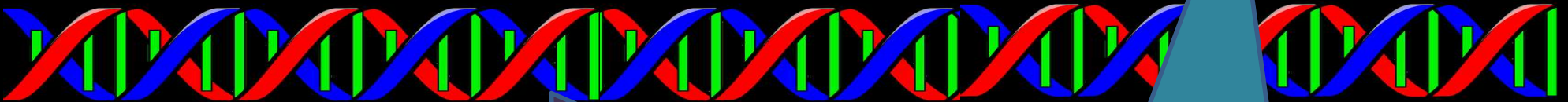
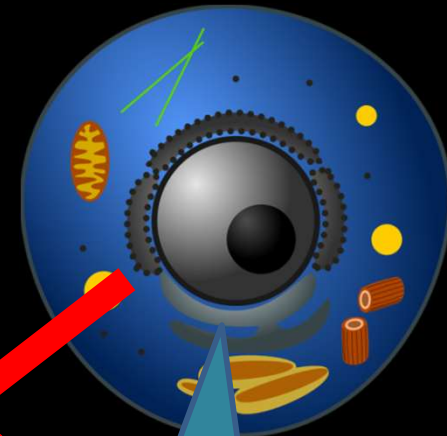


生物の設計図であり、この中に**遺伝子**があります。

DNAはどこにある？

ヒトは60兆の細胞からできています。

細胞の大きさは
0.01~0.05mm



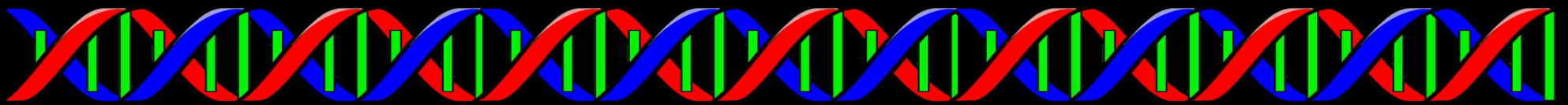
DNAの長さは
細胞あたり約2m

細胞の核の中にDNAが
入っています。

DNAの長さ

ヒト一人分のDNAを合計すると、

$2\text{m} \times 60\text{兆} = 1200\text{億 km}$

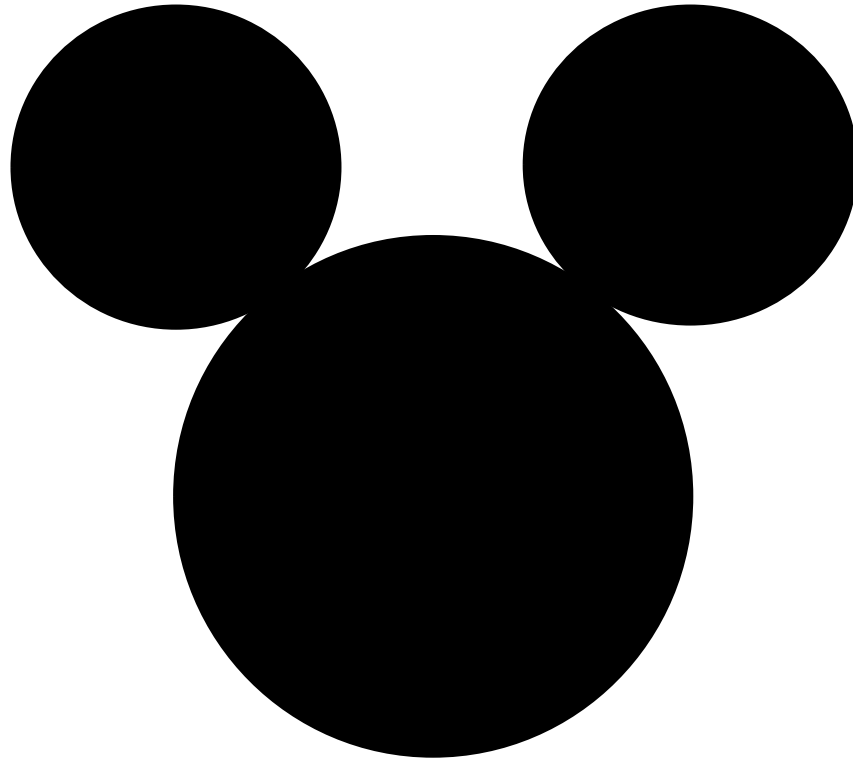


太陽系の直径が約100億 km

3

マウスについて

有名なマウス



いろいろなマウス



マウスの子ども



実験に使われるマウス



野生のマウス

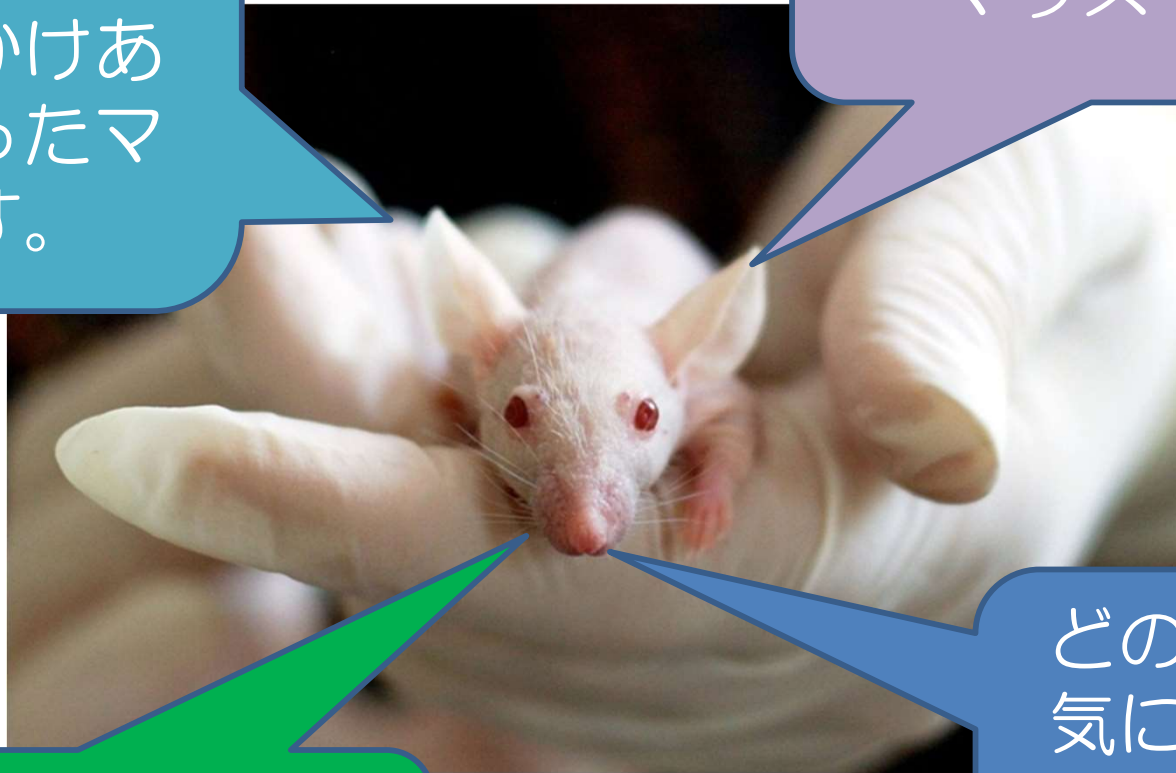
ハツカネズミを改良したものがマウス

- 妊娠して約20日で子どもを産むため、ハツカネズミとよばれます。
- 日本では、実験用に改良されたものをマウスと呼ぶことが多いようです。
- 体重は10～25g
- 2～3か月でおとなになって子どもを産みます。
- 夜行性なので目はあまり良くないのですが、エサを採るために臭いの感覚が優れています。

実験用のマウス

数匹のマウスを
20世代以上繰
り返してかけあ
わせて作ったマ
ウスです。

僕はBALB/cという
マウスです。



体重や大きさや性質や遺
伝子がどれも同じです。

どのような病
気にかかりや
すいか分かっ
ています。

C57BL/6

ブラックシックスと呼ばれています。

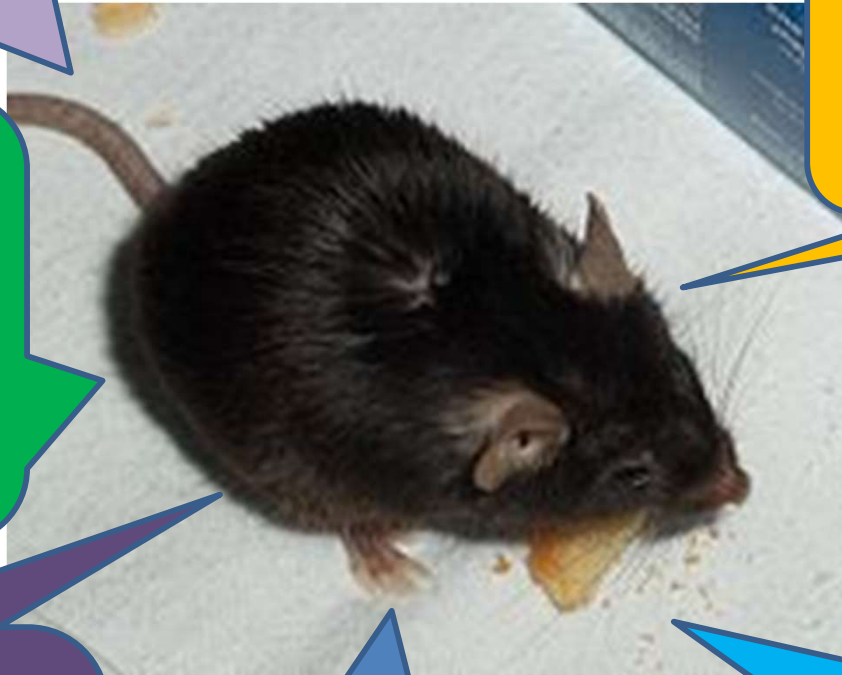
1921年
Code No. 57
雌マウスに
由来します。

強いものが
弱いものの毛を
むしる性質が
あります。

すばしっこい

凶暴であり、噛み
つきます。

哺乳類でヒト
の次にDNAの
解析が終わっ
た動物です。



グランビーのマウス好き！

Abbie Lathrop 1868-1918

マウスが大好きだったアビー・ラスロップさん



アメリカ・グランビーの農場に住み、マウスなどをたくさん飼育して、研究所に売りました。

彼女の飼育施設は、マウスファームとよばれ、11,000匹ものマウスを飼っていたそうです。

C3H

シースリーエイチ
と呼ばれています。

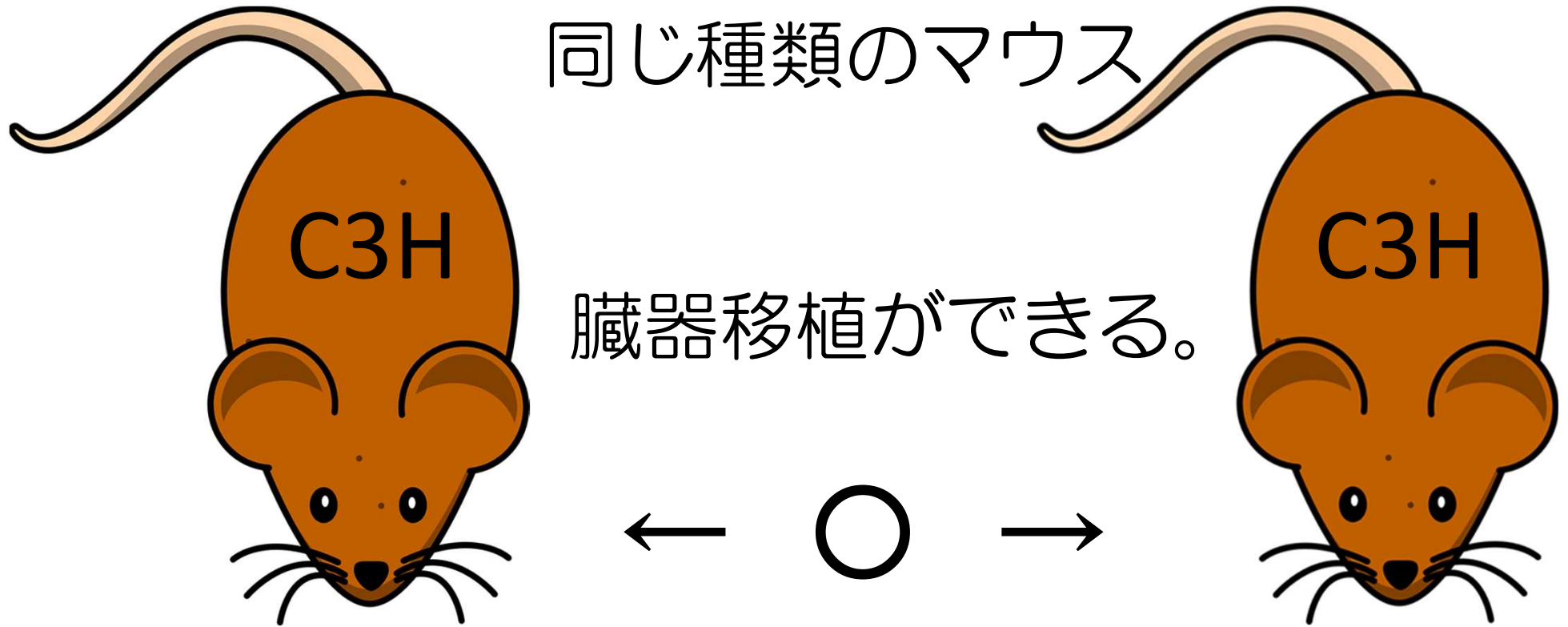
生まれつき
目が見えま
せん。



手にのせると
しがみついて
離れません。

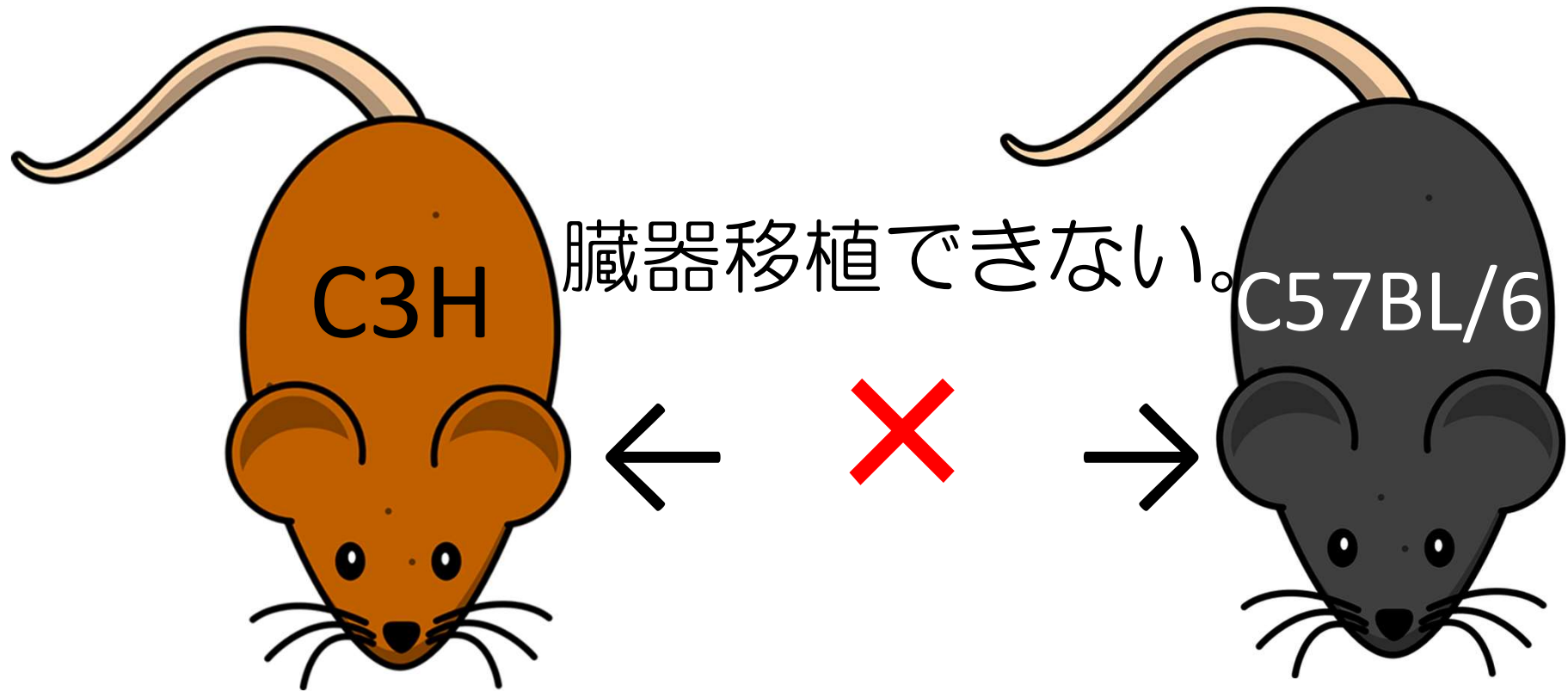
おとなしい性質
噛みつきません。

実験用マウスの特徴



遺伝子が同じであるため

マウスの中でも種類が違くと



遺伝子が違うため拒絶反応を起こす

ヒトと同じ遺伝子を持っている割合

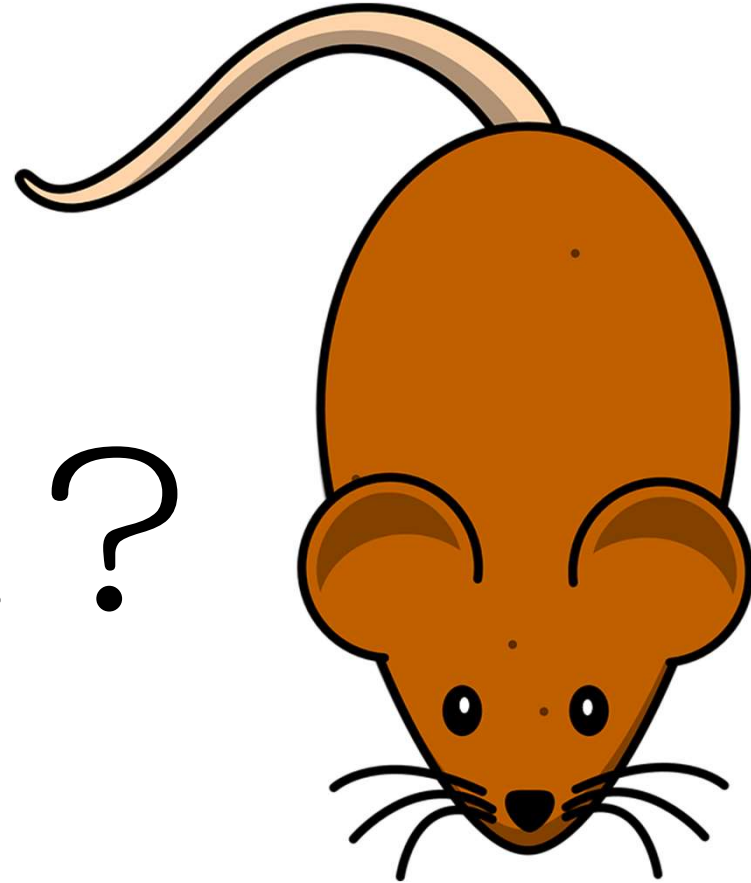
ヒト同士	99.9%
チンパンジー	98%以上
マウス	88%
ニワトリ	60%

nature(oct.2005)などから引用。
文献によって数値が多少異なります。

ヒトとマウスは遺伝子的には近い存在



え？



10数%の違いしかないの？



ヒトとマウスは、
遺伝子的には
とても近いのです。

ヒトではできない実験をマウスで行います。

4

マウスを使った実験

動物実験センターへ

研究棟

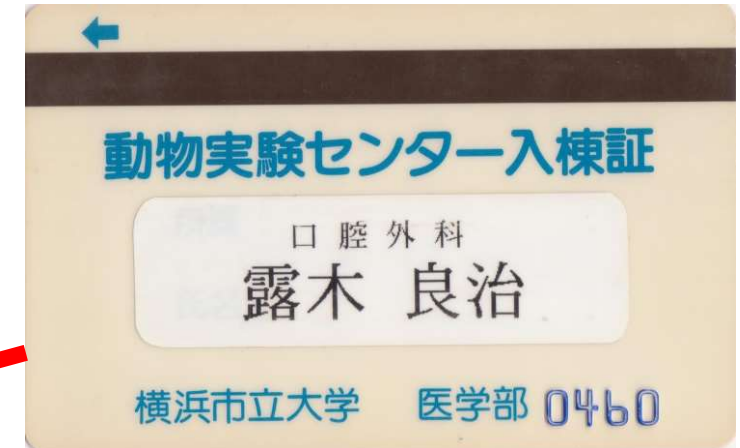
大学病院



研究棟に入り、動物センターのある建物へ歩いて行きます。

附属病院から研究棟に向かいます。

動物実験センターの入口



IDカードをカード
リーダーに入れて、
ドアを開けます。

中で専用の白衣に
着替えます

動物実験センターの中



温度や湿度は一定に保たれています。



病気や実験のエラーを防ぐため、清潔に保たれています。

実験動物の飼育の様子



数匹ごとに専用の
容器で飼育されて
います。

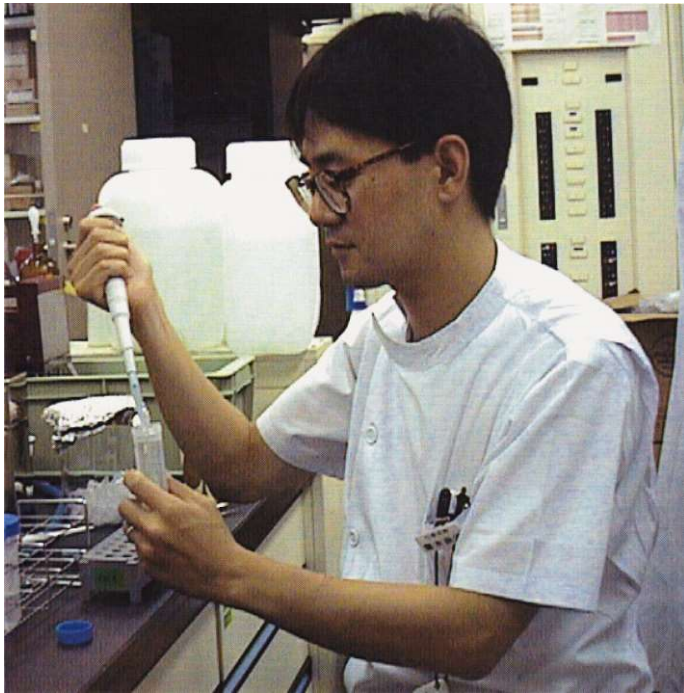
SPF(特定病原体
なし)の動物たち
だけが飼育されて
います。



外部からやたらに
動物を持ち込むこと
はできません。



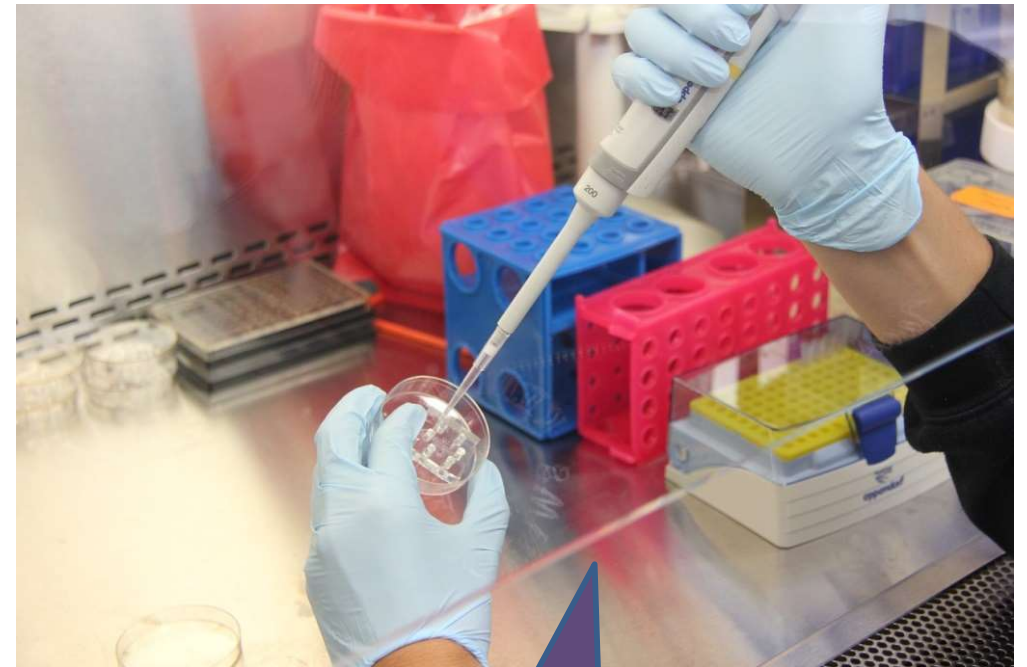
大学の実験室



病原体や細菌を扱うため、
BIOHAZARDを掲示
しています。

クリーンベンチ内での実験

清浄な空気が循環しています。



ガラスごしに
実験をします。

5

マウスに舌がんを
作って治療する

私の研究グループ



李先生
中国河北省省立病院



武川寛樹 博士
筑波大学
口腔外科教授

私の研究グループのテーマ

1

がん細胞を移植して
舌がんのマウスを
作る

今回はこちらを紹
介いたします。

2

舌がんのマウス
を治療する

人工的にがんを作る実験

1915年 山極勝三郎 博士

世界で初めて人工的にがんを作りました。
コールタールを用いた**化学的な発がん**です。



山極 勝三郎 博士
(やまぎわ かつさぶろう)

ウサギの耳に根気強くコールタールを塗り続けました。3年以上も実験を続け、発がんに成功しました。

ノーベル賞にノミネート

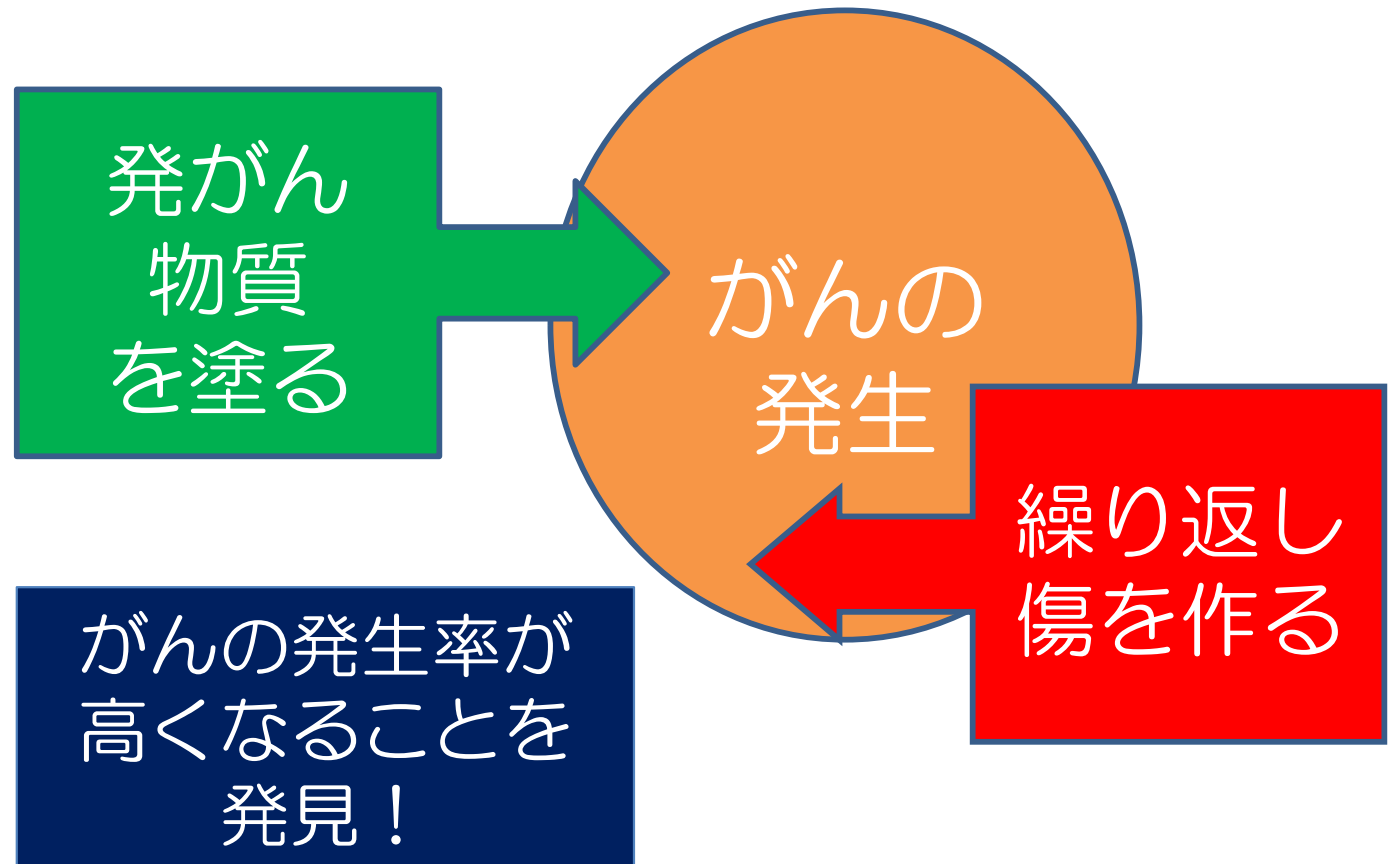
山極博士の研究は、ノーベル賞にノミネートされましたが、受賞には至りませんでした。

しかし現在では、世界初の発がん成功した山極博士の功績は、世界に認められています。

藤田博士の方法



1973年 藤田浄秀博士の方法



藤田浄秀博士は、横浜市立大学医学部口腔外科の元教授。私の恩師です。

実験に時間がかかりすぎる

藤田博士の方法は、ハムスターの舌がんとして、口腔外科の実験で広く用いられています。
しかし、欠点がありました。

実験用動物の
30~40%し
かできない。

がんの大きさ
がばらばら

がんができる
までに
3~4か月
かかる。

時間をかけずに一定の大きさのがんを実験対象
の動物すべてに作りたい。

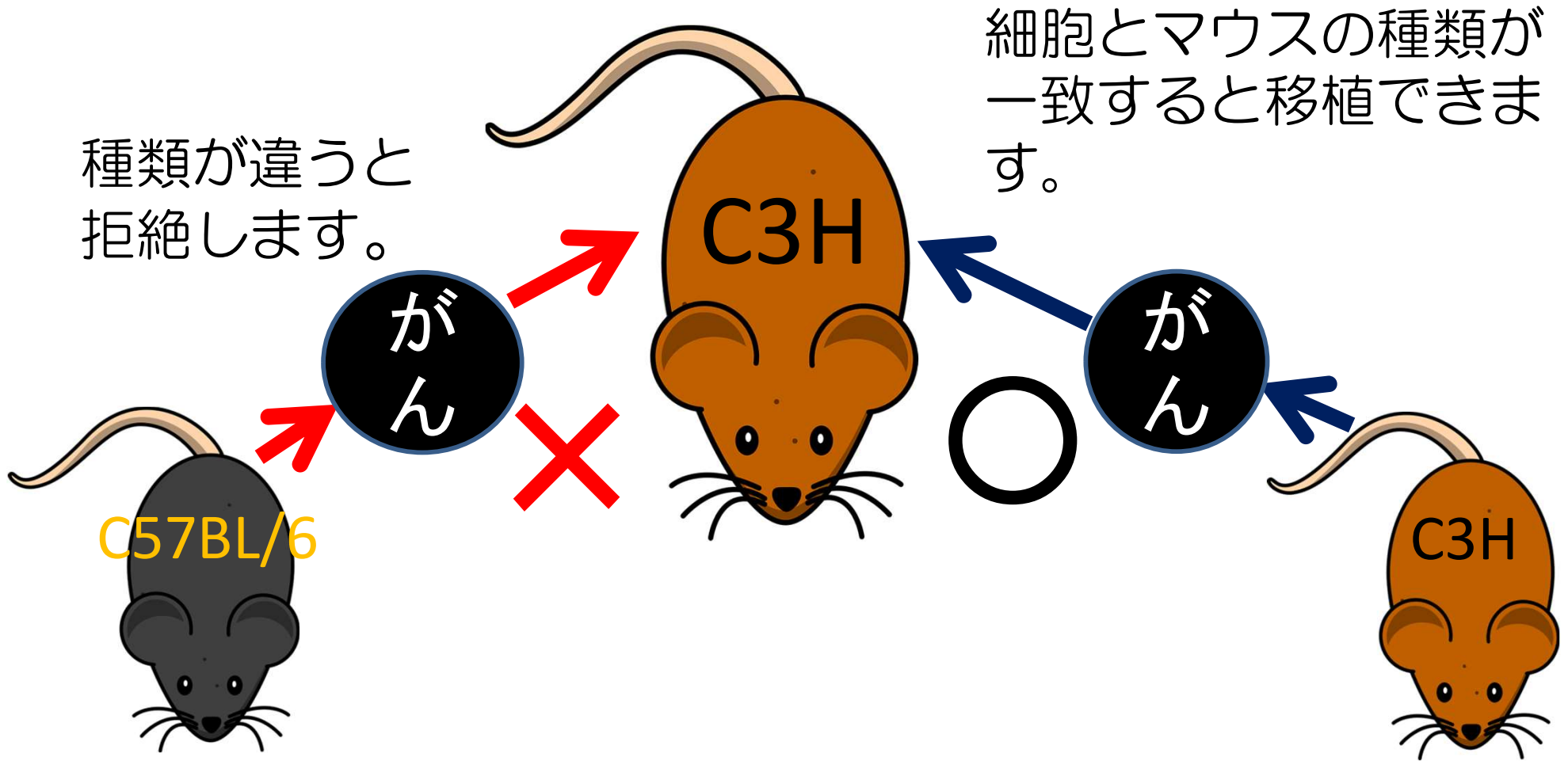
マウスの舌にがん細胞を
移植したらどうだろうか？

でも、

まだ誰も成功して
いない方法です。



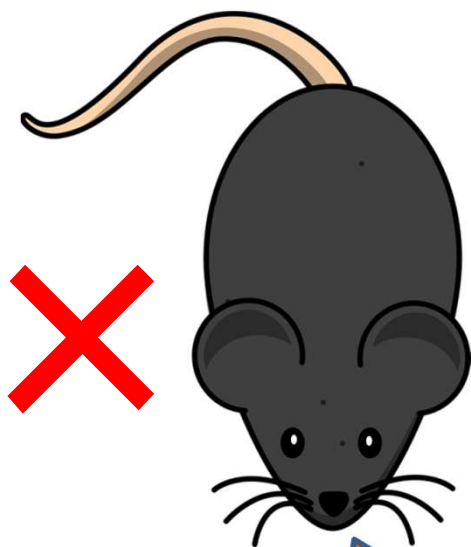
がん細胞の移植



ところが、実際にやってみると…

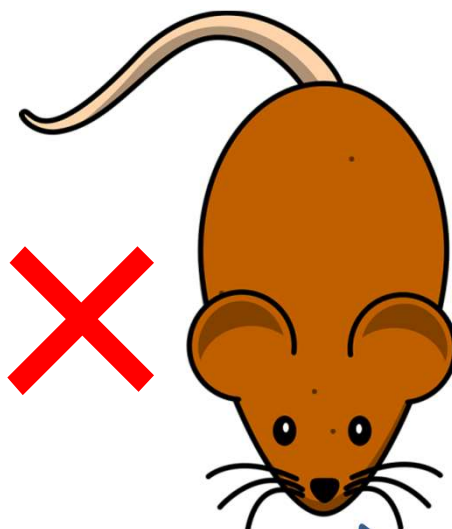
舌がんのマウスをつくる予備実験

C57BL/6



舌がんに適した
細胞がない。

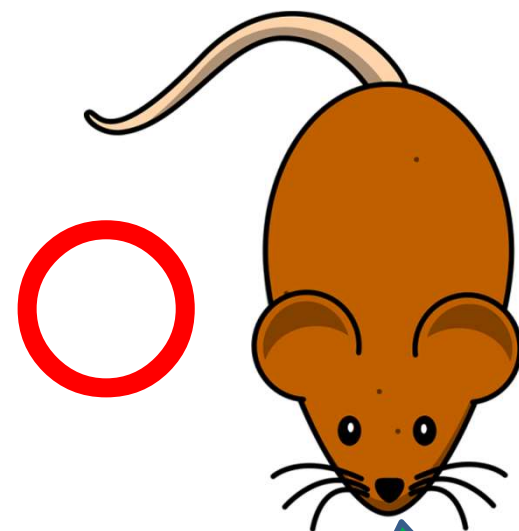
C3H



なぜか、がんが大
きくならない。

がん細胞 Sq1979

DBA/2



がんが適度な速さ
で大きくなる。

がん細胞 KLN205

舌がんができた

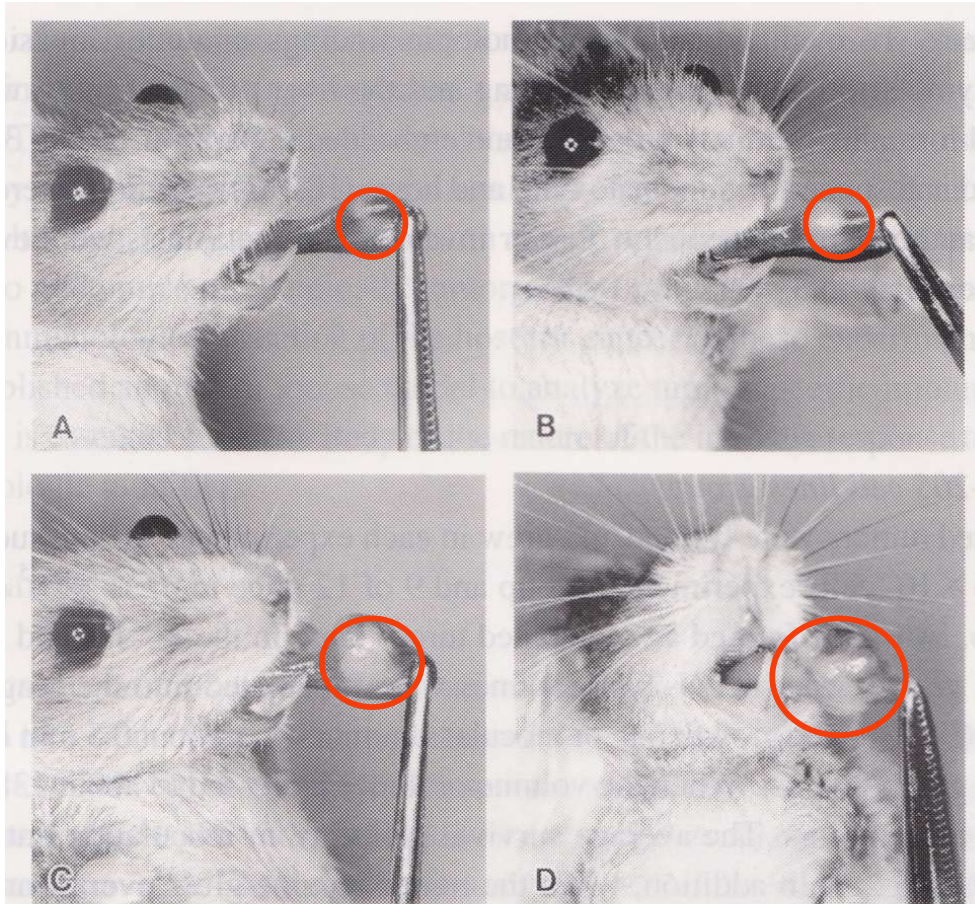


Fig. 2 KLN-205 tumor inoculated into the tongue of DBA/2 mice. A: the first week, B: the second week, C: the third week, D: the fourth week after KLN-205 inoculation.

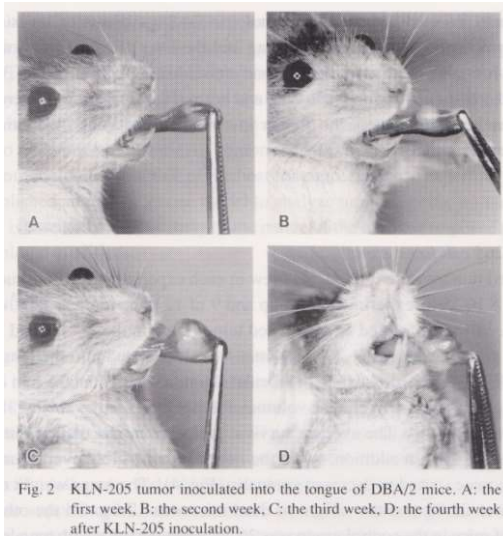
がん細胞を培養し、細胞数と濃度を変えて、20匹のマウスの舌に注射しました。

数か月間の実験の結果、最適ながん細胞数と濃度が判明し、**100%の割合**で**一定の大きさ**のがんを作ること**に成功**しました。

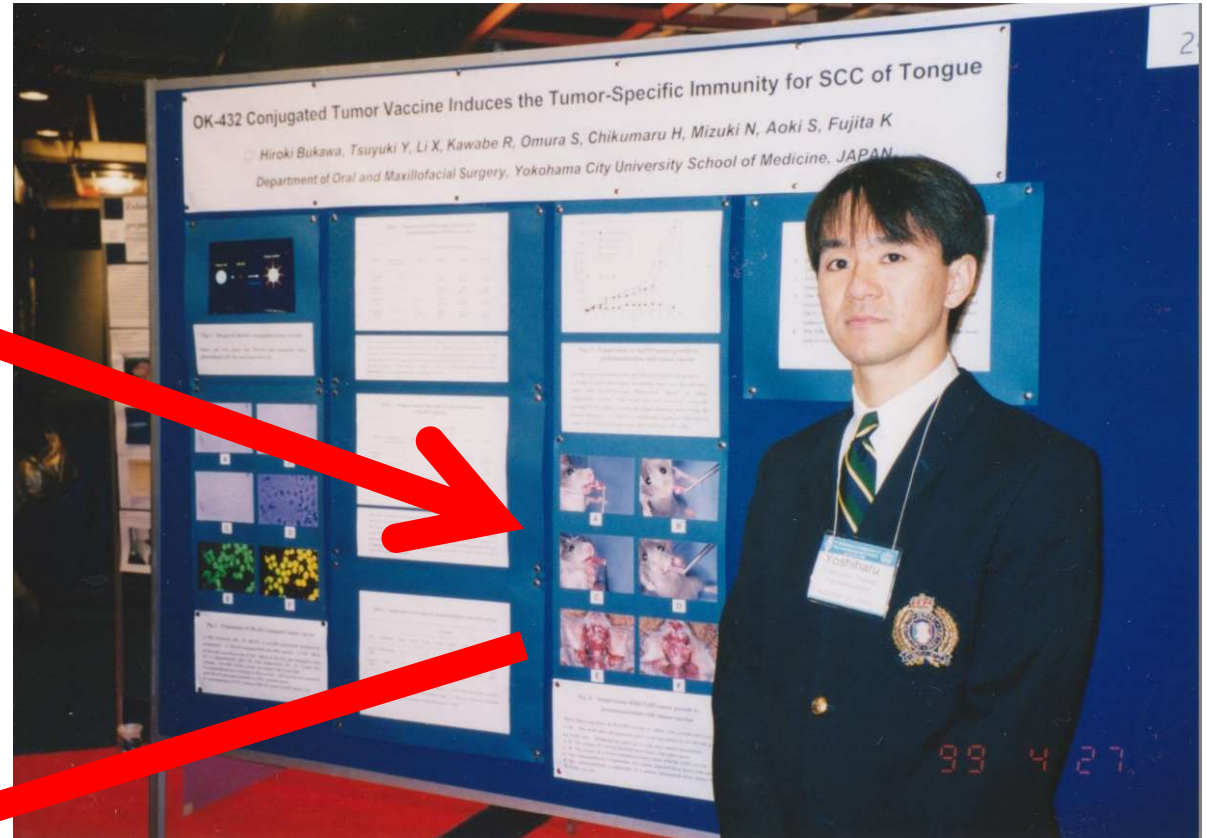
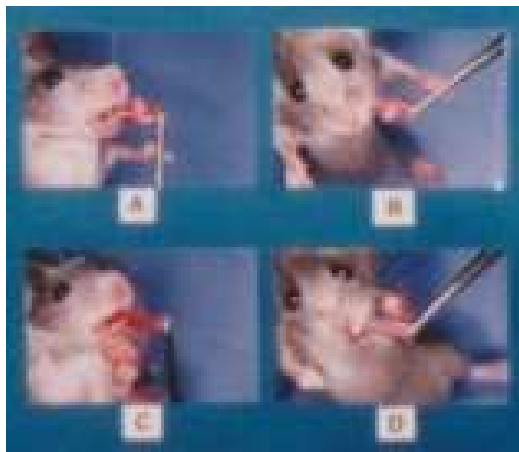
舌がんのマウス

舌がん治療の実験

舌がんのマウス



治療の実験



この舌がんのマウスを使って、治療をする実験を行いました。

実験結果を論文にする

Original Article

Yokohama Med. Bull., Vol. 49, pp. 25–33, (2002)

Experimental Mouse Model with Tongue Cancer Produced by KLN-205 Cell Line Inoculation for Development of Tumor Vaccine

Xianqi LI, Hiroki BUKAWA, Yoshiharu TSUYUKI,
Susumu OMURA, Kiyohide FUJITA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Yokohama City University School of
Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan

Key words: KLN-205 cell line, experimental mouse model, tongue cancer, inoculation,
lymph node metastasis

ABSTRACT

We developed a mouse model with tongue cancer, which was useful to evaluate the induction of tumor-specific immunity. We used two kinds of squamous cell carcinoma (KLN-205 and Sq-1979) derived from mice and examined appropriate doses of each cell line for inoculation. When 2×10^5 KLN-205 cells were inoculated into the tongue of the mouse, 100% of tumor incidence occurred and all mice were killed by KLN-205 tumor about 23 days after tumor inoculation, and therefore, 2×10^5 KLN-205 cells were determined to be the optimal choice for inoculation into the tongue of the mouse. However, when 5×10^5 Sq-1979 cells were injected into the tongue, there were some cases of tumor regression. Our newly developed mouse tongue cancer model seems to be adequate for the assessment of standard therapy against tongue cancer and to be valuable for experiments in tumor vaccine therapy.

INTRODUCTION

The effective treatment of squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity is a worldwide health care issue¹. Lundy *et al.*² verified that patients with oral cancer have impaired immune function, and demonstrated decreased delayed hypersensitivity reactivity (DTH). Immune dysfunction in patients suffering from oral cancer is of prognostic importance, and the direct correlation with disease-free survival has been established. To increase and induce tumor-specific immunity, and to reduce a tumor's propensity for invasion is of significant importance in the research and development of current medicine.

Address for reprint:

Xianqi LI, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Yokohama City University School of medicine,
3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan

李 憲起, 横浜市金沢区福浦3-9 (〒236-0004) 横浜市立大学医学部 口腔外科学講座

RESEARCH REPORTS

Biological

X. Li¹, H. Bukawa^{1,2*}, M. Hirota¹,
Y. Tsuyuki¹, S. Omura¹, and K. Fujita¹

¹Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Yokohama City University School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan; and ²Division of Oral Surgery, Chiba University Hospital, 1-8-1 Inohana, Chuo-ku, Chiba 260-8677, Japan; *corresponding author, bukawah-cuh@umin.ac.jp

J Dent Res 82(8):636–640, 2003

ABSTRACT

Priming with tumor antigens is one of the most important strategies in cancer immunotherapy. To enhance tumor antigenicity, OK-432, a streptococcal preparation, was coupled to squamous cell carcinoma (KLN-205) by means of a 0.2% glutaraldehyde method. The purpose of this study was to investigate whether OK-432-conjugated tumor vaccines could induce tumor-specific immunity. Our originally developed mouse tongue cancer model was used throughout this work for the analysis of antitumor effects. Prepared OK-432-conjugated KLN-205 vaccines were immunized 3 times to DBA/2 mice. The results showed that the KLN-205 vaccines induced cytolytic activity and strongly suppressed both KLN-205 tumor incidence and growth, and survival of the mice was improved. Moreover, the histological results showed that a greater number of lymphocytes had infiltrated around tumor cells by 24 hours after tumor inoculation in the vaccine group. These results suggest that immunizations with KLN-205 vaccines increase the antitumor effects against tongue cancer.

KEY WORDS: OK-432, tumor vaccine, glutaraldehyde, conjugation, tongue cancer.

Novel OK-432-conjugated Tumor Vaccines Induce Tumor-specific Immunity against Murine Tongue Cancer

INTRODUCTION

The induction of tumor-specific immunity is currently one of the most important fields in medical research and development. To date, although some kinds of immunotherapy—such as an adoptive immunotherapy and a peptide vaccine from a tumor-associated antigen (TAA) (Rosenberg *et al.*, 1986; Nestle *et al.*, 1998; Shichijo *et al.*, 1998)—have been developed, there remains no appropriate and effective tumor-specific immunotherapy.

The most important strategy for the induction of tumor-specific immunity seems to be the priming of tumor antigens. It is widely accepted that a low level of tumor antigenicity is one of the mechanisms by which a tumor escapes from the host immune system. Cell-based tumor vaccines seem to be more effective on some tumor antigens than single-peptide-based tumor vaccines; however, there are only a few papers describing cell-based tumor vaccine development. Recently, we developed a novel method to increase tumor-specific antigenicity for effective priming. Complexes of tumor cells and other foreign bodies having strong antigenicity for the host immune system may have the potential to increase immunogenicity of the tumor-specific antigen. OK-432, a streptococcal preparation (Okamoto *et al.*, 1966; Saito *et al.*, 1988), was used as the foreign antigen for coupling to the tumor. To evaluate the effects of the newly developed OK-432-conjugated tumor vaccines, we used an experimental murine tongue cancer model (Li *et al.*, 2002). The objective of this study was to examine the feasibility of this vaccine candidate against tongue cancer.

MATERIALS & METHODS

Animals and Tumor Cells

Six-week-old female DBA/2 mice were purchased from Japan SLC, Inc. (Hamamatsu, Japan) and raised in pathogen-free conditions. Tumor cells derived from the squamous cell carcinoma cell lines of DBA/2, C57BL/6, and C3H mice were KLN-205, B16 melanoma, and Sq1979 cell lines, respectively. They were obtained from Riken Cell Bank (Tsukuba, Japan). The KLN-205 and Sq1979 cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), and B16 melanoma cell lines were maintained in RPMI 1640. The murine tongue cancer model developed by the authors was used throughout this experiment (Li *et al.*, 2002).

The Institutional Animal Care and Use Committee of Yokohama City University School of Medicine approved all procedures for use and care of the mice.

Preparation of the OK-432-conjugated Tumor Vaccines

OK-432, kindly provided by Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan), was used as a binding antigen. The conjugation method with glutaraldehyde (GA) was performed as previously described (Bukawa *et al.*, 1995a,b). Briefly, GA (20%) was diluted to 2.0% with PBS at pH 7.4. KLN-205 cell lines ($5 \times 10^5/350 \mu\text{L}$) were mixed to OK-432 (0.7 KE/100 μL), followed by

636

舌がんのマウスを作る実験

舌がんのマウスを治療する実験

学術誌



学術誌に論文が掲載されると、実験結果が世の中に認められます。

学術誌へ掲載されるためには、実験のやり方や結果に誤りがないかなどの厳しい審査があります。

外国の雑誌に投稿するためには、英語で論文を書く必要があります。

イギリスの学術誌 ネイチャー

Experimental Mouse Model with Tongue Cancer Produced by KLN-205 Cell Line Inoculation for Development of Tumor Vaccine

INTRODUCTION

目的

The effective treatment of squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity is a worldwide health care issue¹. Lundy *et al.*² verified that patients with oral cancer have

MATERIALS AND METHODS

材料と方法

Squamous cell carcinoma cell lines and mice

We used two squamous cell carcinoma cell lines, which were derived from DBA/2 (KLN-205) and C3H (Sq-1979) mice. These lines were obtained from Riken Cell Bank

RESULTS

結果

In KLN-205 cell lines groups

Inoculated tumors were formed and grew in each experimental group, such as 8 of 12 mice in the 5×10^4 cells experimental group and 9 of 12 mice in the 1×10^5 cells experi-

DISCUSSION 考察

In recent years, a great deal of attention has been paid to the study of the development of tumor immunity in the oral cavity^{9~11}. Investigation into tumor immunity for oral cancer

CONCLUSIONS まとめ

1. It was recognized that inoculation of 2×10^5 KLN-205 cells into the tongue of DBA/2 mice formed invasive tumors at 100 percent.

参考文献

REFERENCES

1. Vokes EE, Weichelbaum RR, Lippman RR, Hong WK, 1993. Head and neck cancer. N Engl J Med **328**: 184-91.
2. Lundy J, Wanebo H, Pinsky C, et al., 1974. Delayed hypersensitivity reactions in patients with squamous cell

6

まとめ

実験動物への感謝

動物実験で使われた動物たちの霊をなくさめるため、年に1回、実験動物の慰霊祭が行われます。



横浜市立大学内にある実験動物慰霊碑

ノーベル生理学・医学賞

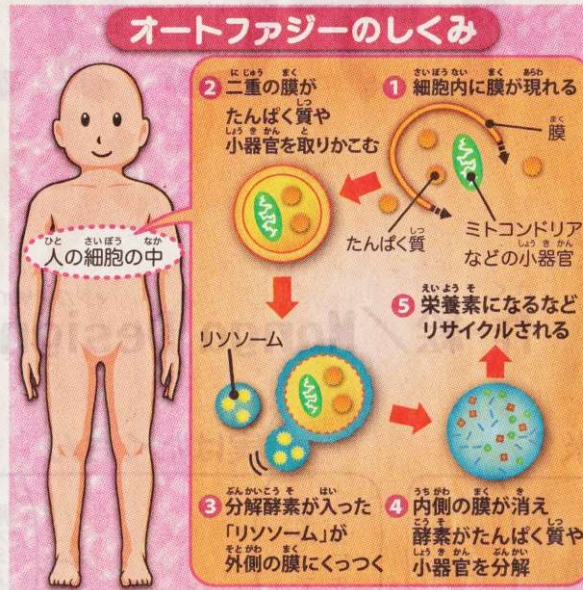
大隅良典さんにノーベル賞



東京工業大学
Tokyo Institute of Technology

業大学
chnology

記者会見で、受賞決定の喜びを語る大隅良典さん
＝3日、東京都目黒区の東京工業大学



イラスト・やないゆうじ

医学生理学賞

オートファジーは、ギリシャ語で「自分を食べる」という意味です。生物を形づくる細胞の中で、自分自身のたんぱく質をリサイクルするしくみのことです。

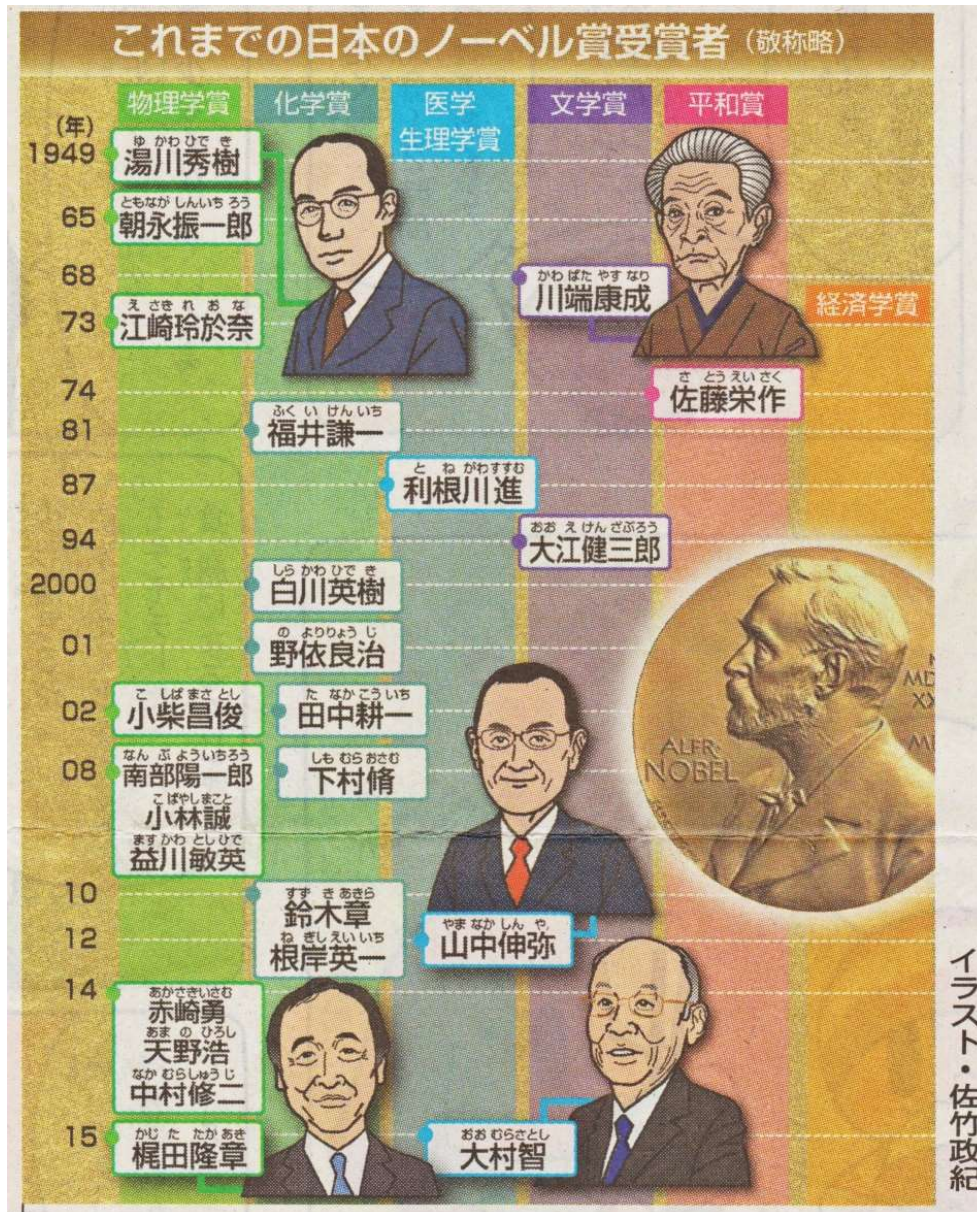
たんぱく質は、呼吸をしたり体を動かしたりするのに使われ、生物が生きるうえで欠かせないものです。たんぱく質が足りなくなると「リサイクル」が始まります。細胞の中をきれいに保つたり、悪い菌をやっつける役割もあります。小さな菌類からヒトま

今年のノーベル医学生理学賞が3日に発表され、東京工業大学栄誉教授の大隅良典さん(71歳)が選ばれました。授賞理由は「オートファジーのしくみの発見」。一人で日本人が受賞するのは、自然科学系では1987年の利根川進さん以来のことです。日本のノーベル賞受賞は、3年連続で25人目、医学生理学賞は2年続けて4人目になります。

おおすみ・よしのり 1945年、福岡県生まれ。東京大学教養学部卒業後、74年に同大学院で理学博士を取得し、アメリカ・ロックフェラー大学研究員に。東大教養学部助教授に就任した88年、オートファジーの観察に世界で初めて成功した。東京工業大学特任教授をへて2014年、同大栄誉教授。

サイエンスにゴールはない。特に生命科学は、これがわかっただらすべてがわかった、というようなことはないと思う。(大隅良典博士)

日本の生物学は世界でトップクラス



マウスの
実験

利根川進 博士
1987年 遺伝子の再編成

マウスの
実験

山中伸弥 博士
2012年 iPS細胞

大村智 博士
2015年 線虫感染症の治療薬

大隅良典 博士
2016年 オートファジー

学問はレンガを積むようなもの。

一つずつ
ていねいに
確実に。

基礎によって
できあがる建物
が違ってきます。

中学1年生は
このあたり
でしょうか。

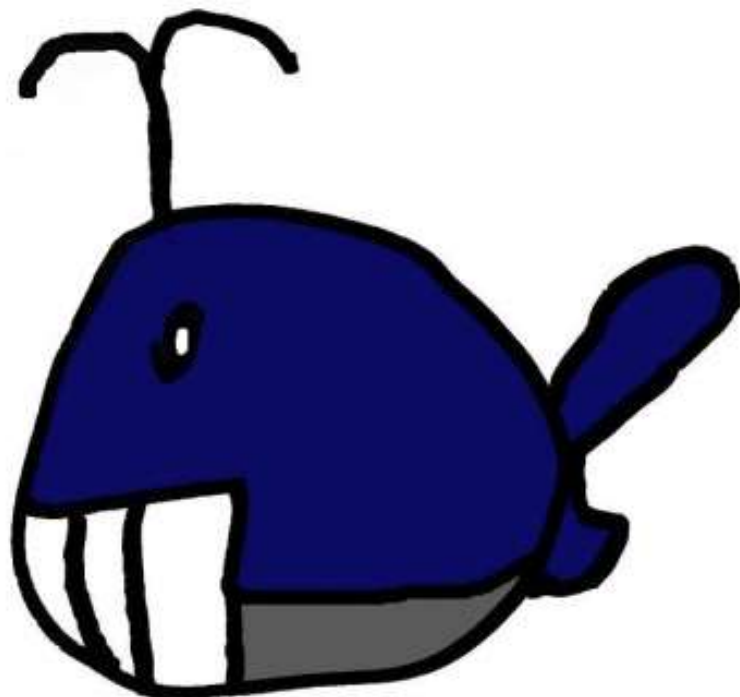
基礎がしっかりし
ていないとレンガ
が崩れます。



今日の私のお話で、みなさんが

科学＝サイエンス

に興味を持ってもらえるといいな
と思います。



ご清聴ありがとうございました。