

論 文 要 旨

Analysis of the Wnt signaling pathway in ameloblastoma local invasiveness using novel established ameloblastoma- and normal oral epithelium-derived cell lines.

新規エナメル上皮腫および正常口腔粘膜細胞株の樹立と
エナメル上皮腫の局所浸潤における Wnt シグナル経路の解析

岐 部 俊 郎

【序論および目的】

歯原性腫瘍は口腔顎顔面領域の重要な疾患である。なかでもエナメル上皮腫は若年者の顎骨に好発する歯原性腫瘍の一つである。エナメル上皮腫は良性腫瘍に分類されているにもかかわらず高度の骨浸潤能があり、高い再発率を有する。治療法としては広範囲な外科的切除もしくは保存療法が選択されるが、それぞれ患者の QOL (quality of life) の低下や局所再発などの問題点も多い。これまでにエナメル上皮腫では高度に顎骨に浸潤するのは皮膚の基底細胞に似た形態の腫瘍細胞であることやエナメル上皮腫の組織型と浸潤様式との関連が報告されているが、エナメル上皮腫研究のための細胞株がわずかしかないために、エナメル上皮腫の浸潤の分子生物学的メカニズムはいまだ不明の点が多い。

そこで、我々は新たに HPV や SV40 を用いない手法でエナメル上皮腫と正常口腔粘膜上皮細胞の不死化株を作成し、エナメル上皮腫について細胞生物学的実験系の確立を行った。さらに、エナメル上皮腫は歯原性上皮の増殖を起原とするとされていることから、歯の発生にかかわる Wnt シグナルがエナメル上皮腫の性状においてどのような役割を持つかどうか調べた。Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白質ファミリーで、ある種のがんでは細胞の増殖や、細胞遊走能、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の分泌亢進による組織浸潤能に関わっていることが報告されている。しかし、エナメル上皮腫においてはこれらの機能はいまだ不明のままである。

本研究では、上記の新たに作成した細胞株を用いて、エナメル上皮腫における Wnt シグナルの役割を調べ、Wnt シグナルが浸潤などに関与しているかを検討した。

【材料および方法】

1. エナメル上皮腫症例及び、正常口腔粘膜上皮由来の不死化細胞株の樹立

鹿児島大学病院口腔顎顔面外科にて採取したヒトエナメル上皮腫症例、および正常口腔粘膜上皮の新鮮摘出材料をコラゲナーゼで処理して、分散させ初代培養をおこなった。初代培養細胞に hTERT、hCDK4、cyclinD₁、ドミナントネガティブ型 p53 などを種々の組み合わせレンチウイルスベクターを用いて、細胞に遺伝子導入し不死化を行い、新規エナメル上皮細胞株 (AM-3) と口腔粘膜上皮細胞株 (MOE1) を樹立した。上記細胞株を既存のエナメル上皮腫細胞株 AM-1 や口腔がん細胞株などと、形態、増殖速度、遺伝子発現、上皮マーカーの発現、足場依存性の増殖を確認し、樹立した細胞株が

それぞれエナメル上皮腫由来、正常口腔粘膜上皮由来であることを確認した。

2. AM-1、AM-3、及びMOE1細胞を用いたWntシグナル経路関連分子の発現

新たに樹立した上記細胞株及び、既存のエナメル上皮腫細胞株（AM-1）からRNAを抽出して、Wntシグナル経路関連遺伝子の発現をreal-time-RT-PCRで解析を行った。

3. MMP-2、MMP-9の発現と口腔がん細胞との比較

HSC-2、HSC-4、Ca-9、KONの4種類の口腔がん細胞株と、AM-1、AM-3、MOE1細胞からRNAを抽出して、Wnt-5a、Fz-2、MMP-2、MMP-9の発現をreal-time-RT-PCRで解析を行った。

4. MMP-2、MMP-9の酵素活性の解析

AM-1、AM-3細胞におけるMMP-2、MMP-9の酵素活性を解析するために、AM-1、AM-3の培養上清を濃縮して、ゼラチンゼイモグラフィを行った。

5. Wnt-3a蛋白質刺激時のMMP-2、MMP-9の酵素活性の解析

Wnt-3a蛋白質を用いてAM-1、AM-3細胞を刺激したにおけるMMP-2、MMP-9の酵素活性を解析するために、ゼラチンゼイモグラフィを行った。

【結果】

1. 正常口腔粘膜上皮由来細胞の不死化とその特性の解析

1.1. HPVを用いない新たな方法を用いて正常口腔粘膜上皮細胞株（MOE）を樹立した。樹立した細胞の形態は不死化前と大きな変化はなく上皮マーカーを発現しており、EMTや足場非依存性の増殖などのがん化の特徴は認められなかった。

1.2. MOE細胞は細菌刺激やLPS刺激反応性にサイトカインやMMP-2、MMP-9の発現の上昇が認められた。

2. エナメル上皮腫由来細胞の不死化とその特性及びWntシグナル経路の解析

2.1. MOE細胞を作製した方法を用いて、新規エナメル上皮腫由来細胞株（AM-3）の樹立に成功した。樹立した細胞の形態は不死化前と大きな変化はなく上皮マーカーを発現しており、EMTや足場非依存性の増殖などのがん化の特徴は認められなかった。

2.2. エナメル上皮腫ではWnt-5a、Frizzled (Fz) -2、Fz-6、MMP-2、MMP-9などのいくつかのWnt関連遺伝子が正常口腔粘膜上皮と比べて発現が亢進していた。

2.3. 口腔扁平上皮癌細胞株との比較では、エナメル上皮腫由来細胞のMMP-9発現の亢進が見られた。

2.4. エナメル上皮腫由来細胞ではWnt-3a蛋白質刺激により、細胞質βカテニンの蓄積が認められた。

2.5. エナメル上皮腫由来細胞におけるMMP-9の活性及び発現はWnt-3a蛋白質依存性に亢進した。

【結論及び考察】

本研究では、HPVを用いない手法でエナメル上皮腫（AM-3）と正常口腔粘膜上皮由来細胞株（MOE）の樹立を行い、エナメル上皮腫における再現性のある細胞生物学的実験系を確立した。MOE1細胞株はエナメル上皮腫などの歯原性腫瘍だけではなく、口腔がんを含む他の口腔疾患の研究においても有用な細胞株であると思われる。

エナメル上皮腫由来細胞ではいくつかのWntとWntレセプターの発現の亢進が認められた。また、Wnt-3a蛋白刺激によって細胞内βカテニンの蓄積、MMP-9の活性及び発現はWnt-3a蛋白依存性に亢進することが認められた。この結果から、エナメル上皮腫においてWntシグナルの活性化がMMP-9の発現や活性上昇を引き起こし、局所浸潤を引き起こしている可能性があることが示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 176号	学位申請者	岐部 俊郎
審査委員	主査	仙波 伊知郎	学位
	副査	杉原 一正	副査
	副査	佐藤 強志	副査
			博士 (歯学)
			松口 徹也
			山中 淳之

Analysis of the Wnt signaling pathway in ameloblastoma local invasiveness using novel established ameloblastoma- and normal oral epithelium-derived cell lines.

(新規に樹立したエナメル上皮腫由来細胞株および正常口腔粘膜上皮由来細胞株を用いたエナメル上皮腫の局所浸潤における Wnt シグナル経路の解析)

エナメル上皮腫は良性腫瘍に分類されているが高度の骨浸潤能があり、再発率も高い。そのため、広範囲な外科的切除もしくは保存療法が選択されるが、局所再発などの問題点も多い。一方、これまで樹立されたエナメル上皮腫由来の細胞株はわずかしがなく、エナメル上皮腫の浸潤の分子生物学的メカニズムはいまだ不明の点が多い。そこで学位申請者らは、HPV や SV40 などの癌原性ウイルスを用いない手法で新たにエナメル上皮腫 (AM-3) と正常口腔粘膜上皮 (MOE1) に由来する不死化細胞株を作成し、既存のエナメル上皮腫由来細胞株 (AM-1) と AM-3 及び MOE1 細胞株を用いた細胞生物学的実験系を確立した。さらに、この実験系を用いて、エナメル上皮腫由来細胞における Wnt シグナル関連分子の発現をリアルタイム PCR で解析するとともに Wnt 蛋白刺激を行い、Wnt シグナルの標的遺伝子である MMP-9 が Wnt 依存性に誘導されるか否かをゼラチンゼイモグラフィ法にて検討した。

その結果、本研究では以下の知見が明らかにされた。

1. レンチウイルスベクターを用いた新たな遺伝子導入方法を用いて正常口腔粘膜上皮由来細胞株 (MOE1) と濾胞型エナメル上皮腫由来細胞株 (AM-3) を樹立した。樹立した細胞は不死化前の性質を維持しており、がん化の兆候は認められなかった。
2. エナメル上皮腫由来細胞株 (AM-1, AM-3) では正常口腔粘膜上皮細胞株 (MOE1) と比較して Wnt-5a, Frizzled-2, Frizzled-6, MMP-2, MMP-9 などの Wnt シグナル関連遺伝子の発現亢進を認めた。
3. 口腔扁平上皮癌由来細胞株に比べ、エナメル上皮腫由来細胞株では MMP-9 の発現亢進が見られた。
4. エナメル上皮腫由来細胞株では Wnt-3a 蛋白質依存性の細胞質 β カテニンの蓄積、MMP-9 の発現と分泌の亢進が認められた。

本研究では、口腔腫瘍のリスク因子といわれる HPV を用いない手法でエナメル上皮腫と正常口腔粘膜上皮に由来する細胞株を樹立し、エナメル上皮腫における再現性のある細胞生物学的実験系を確立できた。エナメル上皮腫由来細胞株では複数の Wnt と Wnt 受容体の発現の亢進が認められ、細胞内 β カテニンの蓄積と MMP-9 の発現分泌は Wnt-3a 蛋白質依存性に亢進することが認められた。この結果は、エナメル上皮腫では Wnt シグナルの活性化が MMP-9 の発現や活性上昇を誘導し、局所浸潤を引き起こしている可能性を示唆した。今後、より詳細なエナメル上皮腫の局所浸潤メカニズムの解明が期待される。

本研究は、従来困難とされてきたエナメル上皮腫の細胞株を樹立し、エナメル上皮腫の局所浸潤における Wnt シグナル経路の役割を検討したものであり、その結果 Wnt-3a 依存性に MMP-9 の発現が誘導されることが示された。利用可能な細胞株が少なく、エナメル上皮腫の細胞生物学的解析が困難な状況を改善し、さらに Wnt ファミリーが MMP-9 を誘導して局所浸潤に関与する可能性を示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 176 号		学位申請者	岐部 俊郎
審査委員	主査	仙波 伊知郎	学位	博士(歯学)
	副査	杉原 一正	副査	松口 徹也
	副査	佐藤 強志	副査	山中 淳之
<p>主査および副査の5名は、平成24年2月7日、学位申請者 岐部俊郎 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 叢状型エナメル上皮腫由来の AM-1 細胞と今回作成した濾胞型エナメル上皮腫由来の AM-3 細胞ではどのような性質の違いがみられるのか。 (回答) 細胞の増殖能、MMP-2、-9 産生能、Wnt-3a 刺激反応において、AM-3 細胞の方が高かった。</p> <p>質問2) エナメル上皮腫との比較に用いるのであれば歯胚などの歯原性上皮の不死化株を作製し比較するのが良いのではと思われるが検討はしてみたのか。 (回答) 下顎智歯の歯嚢から歯原性上皮の不死化を試みた。しかし、培養が困難で、それに加えて歯原性上皮の不死化株を作製した場合、作成した不死化株が歯原性上皮由来である証明をすることも困難と判断したので、今回は口腔粘膜上皮の不死化株を作製しコントロールとした。</p> <p>質問3) 今回のデータによると MOE1a 細胞と MOE1b 細胞では E-カドヘリン発現に少し違いが認められるが、この他に何か違いが認められたのか。 (回答) p53 を抑制している MOE1a 細胞の方が MOE1b 細胞よりも増殖速度が早い結果以外には、表現型では目立った変化は認められなかった。</p> <p>質問4) エナメル上皮腫は Wnt-3a を発現していないようであるが、エナメル上皮腫の骨浸潤と Wnt-3a はどのように関与すると考えているのか。 (回答) AM-3 細胞では Wnt-3a は発現していないがレセプターである Fz2 や LRP6 の発現は認められるため、エナメル上皮腫の周囲の組織から Wnt が分泌されてエナメル上皮腫に刺激を与えているのではないかと推測している。</p> <p>質問5) AM-3 細胞株では Wnt-5a と Wnt-9b の発現が多く、Wnt-1、Wnt-3a の発現は認められない結果が出ているが、これらはエナメル上皮腫の性格とどのように関連していると考えているのか。 (回答) Wnt-5a などの non-canonical 経路は細胞運動に関与することが報告されているので、エナメル上皮腫の浸潤能に関わっているのではないかと考えている。</p> <p>質問6) これまでのエナメル上皮腫における免疫染色やマイクロアレイの報告では Wnt-1 や Wnt-10a の発現が報告されているが、今回の結果ではそれらの発現がほとんど見られないのはどうしてか。 (回答) エナメル上皮腫は細胞や組織の形態によって多くの分類があるため、研究報告によって発現しているタンパクや遺伝子にばらつきがみられる。そのため、今回の結果も過去の報告と結果が一致しないものと思われる。</p> <p>質問7) canonical 経路のリガンドとなる Wnt はエナメル上皮腫周囲の細胞から分泌されてエナメル上皮腫に作用し、MMP-2、MMP-9 の発現が起こると考えているのか。 (回答) オートクライン的な発現は認められないため、エナメル上皮腫周囲の間葉系細胞からの Wnt 刺激によって MMP-2、MMP-9 の発現が起こると考えられる。</p> <p>質問8) 一般に、エナメル上皮腫は再発を繰り返すと悪性度が高くなるといわれる。今回株化した AM-3 細胞は3回目の再発症例から採取したとのことであるが悪性度が高いような所見を何か認めたのか。 (回答) AM-3 細胞では高い MMP-9 の発現と Wnt-3a タンパクに対して反応性を示したが、一般的な悪性腫瘍にみられる EMT や足場非依存性の増殖などは認められなかった。</p> <p>質問9) AM-3 細胞の不死化前と不死化後を比較してどのような変化が認められたか。 (回答) 不死化後の方が細胞の増殖スピードがやや早くなった。</p>				

最終試験の結果の要旨

- 質問 10) ゼラチンザイモグラフィでは AM-3 は AM-1 よりも MMP-2、MMP-9 の活性が高い結果が出ているが、これは悪性度の指標ととらえてもよいのか。
 (回答) 現段階では断言はできないが、将来的には悪性度の指標になりうると考えている。
- 質問 11) エナメル上皮腫は骨と腫瘍の境界は明瞭であるが何が理由であると考えられるのか。
 (回答) エナメル上皮腫の骨と腫瘍の境界では破骨細胞やプロテアーゼによる骨や歯根の吸収・破壊が起きているが、腫瘍の増殖は非常に緩慢であるので新しい骨の再生が腫瘍周囲に起きていると考えられる。そのため、境界明瞭な臨床像が認められると考えられる。
- 質問 12) エナメル上皮腫でエナメル質を形成した症例はあるのか。
 (回答) 私の調べた限りでは、エナメル質を形成した症例はない。
- 質問 13) 樹立した AM-3 細胞株がエナメル上皮腫であるという証明をするのは困難と思われるが、エナメル上皮が発現するようなエナメルタンパクなどの発現がエナメル上皮腫由来の AM-3 細胞では認められるのか。
 (回答) 一般的に生体内のエナメル上皮腫は歯の発生にみられるエナメルタンパクは認められず、AM-3 細胞においても発現は認められなかった。
- 質問 14) AM-3 細胞はヌードマウスに移植して腫瘍形成を示すのか。
 (回答) AM-3 細胞では試みていないが、過去に AM-1 細胞で移植実験をしたが生着しなかったという報告がある。エナメル上皮腫の増殖速度が悪性腫瘍に比べて非常に緩慢なことが生着しない理由だと考えられる。
- 質問 15) MMP-2、MMP-9 以外のほかの MMP については検討してみたか。
 (回答) MMP-13、MMP-20 については定量をしたが、ほかの細胞と比較しても差はほとんど認められなかった。それ以外の MMP については、今回は検討を行っていない。
- 質問 16) 一般的にエナメル上皮腫ではどの MMP が発現亢進しているのか。
 (回答) 多くの報告では MMP-2 と MMP-9 の発現亢進が報告されている。
- 質問 17) β カテニンの蓄積の実験で、Wnt-3a 刺激後の β カテニン蓄積反応が遅いように感じるが、理由はあるのか。また、GSK-3 β のリン酸化などを調べてはみたか。
 (回答) β カテニンの蓄積を検出しているの、ウエスタンブロットで差が確認できるまでに β カテニンが蓄積するまではある程度の時間が必要であったのだと考えられる。今回は GSK-3 β のリン酸化の状態の解析は行っていない。
- 質問 18) β カテニン蓄積の実験は MOE 1 細胞でも実施したか。
 (回答) β カテニン蓄積実験をほかの細胞で実施していない。ほかの細胞と比較したときにエナメル上皮腫では β カテニンの合成速度が遅い可能性が考えられる。
- 質問 19) 遺伝子導入するときのプロモーターはどのようなものを使用したのか、どのような理由で選んだのか。
 (回答) プロモーターはサイトメガロウイルスのものを使用し、共同研究先である国立がんセンターのこれまでの実績から効率の良い組み合わせで行った。
- 質問 20) 4 種類の遺伝子を導入しているが、それぞれの発現頻度は同じなのか。
 (回答) もともとの発現頻度には差が見られるので、4 種の遺伝子が最も効率よく導入されるために遺伝子を導入するウイルスの比率を変化させてもっとも効率の良い比率で行った。
- 質問 21) 口腔粘膜上皮である MOE 1 細胞の形態をみると、敷石状の細胞のなかに巨大細胞が見られ分化傾向があるように思える。エナメル上皮腫由来細胞の AM-3 細胞でも長期培養すると細胞の形態変化などの分化傾向を示すのか。
 (回答) AM-3 細胞ではディッシュの中の細胞密度が増してくると、敷石状の形態の細胞の中から紡錘状の突起を伸ばすような形態を示す細胞の出現を確認している。
- 質問 22) AM-3 細胞の形態の変化は密度などに関与しているのか。
 (回答) 細胞密度により AM-3 細胞は形態の変化を示した。また、培養環境を 3 次元培養のコラーゲンシート上に変えると濾胞様のコロニー形態を示した。
- 質問 23) MOE-1 では細菌刺激による反応性がみられたが、AM-3 細胞でも何か刺激反応性を示すのか。
 (回答) 今回はデータとして載せてはいないが、AM-1 細胞と AM-3 細胞でも LPS 刺激実験を行い各種サイトカインや MMP-2 と MMP-9 の発現の亢進が細菌刺激反応性に起こることを確認している。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。