

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659900

研究課題名(和文) 共培養実験系を用いたエナメル上皮腫による骨破壊の分子機構解明とリスク判定への応用

研究課題名(英文) The analysis of molecular mechanism of bone destruction using invitro cocultivation assay and application to a risk management in ameloblastoma

研究代表者

藤井 智美 (FUJII, Tomomi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教務職員

研究者番号：90305152

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エナメル上皮腫患者の病変部と健常者の口腔粘膜より採取した細胞を不死化し、新規エナメル上皮腫細胞株AM-3と正常口腔粘膜上皮細胞株MOE-1を樹立した。これらの新規細胞株と既存のエナメル上皮腫細胞株AM-1を用いて研究を行った。その結果、エナメル上皮腫細胞株(AM-3)では、正常口腔粘膜上皮細胞株(MOE-1)と比較してWnt5a、Fz-2、MMP-2、-9の高発現をみとめた。また、Wnt3aで刺激したAM-3はMMP-9の発現が著明に亢進した。さらに、AM-3と破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞を共培養すると破骨細胞分化が誘導されることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we immortalized cells which we obtained from the lesion of ameloblastoma and the oral mucosa of the healthy subject and established new ameloblastoma cell line (AM-3) and normal oral mucosa epithelium cell line (MOE-1). The expression of Wnt5a, Fz-2, MMP-2, -9 was higher remarkably in ameloblastoma cell line than normal oral mucosa epithelium cell line. Also, Wnt-3a treatment activated expression of MMP-9 of AM-3. Furthermore, osteoclasts differentiation was induced when we cocultivated with AM-3cells and RAW 264.7 cells which were osteoclastic precursors.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：国際情報交換 インドネシア エナメル上皮腫

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は歯原性腫瘍の一種で、毎年全国で 300 例以上の新規発症があり、アジア・アフリカなどの一部の発展途上国では治療困難な疾患の一つである。この腫瘍は良性腫瘍であるにもかかわらず、浸潤性に発育し、顎骨の破壊、吸収を伴う容貌の変化を起こし、患者の QOL を著しく損なう。治療としては外科的に顎骨を含めた腫瘍の広範囲切除が行われてきた。根治性を求めた広範囲切除の結果、手術後の容貌の変化および咀嚼、発音の障害などに悩む患者も多かった。近年、本邦では縮小手術が試みられているが、今度は再発が問題となっている。エナメル上皮腫患者の QOL 向上のためには、腫瘍の発育や浸潤メカニズムを解明し、症例ごとに「根治性と機能温存の両方」を満たす治療を開発する必要がある。

申請者は、過去にエナメル上皮腫(濾胞型)症例から採取した新鮮摘出材料を hTWRT, hCDK4, cyclinD, ドミナントネガティブ p53 などを組み合わせで腫瘍細胞に遺伝子導入し、不死化エナメル上皮腫細胞(AM-3)を作成した(Kibe, et al, 2013)。また、同様な手法で、対照となる健常口腔粘膜上皮細胞の不死化(MOE-1)に成功している(Kibe, et al, 2012)。これにより、複数種の細胞の Co-Culture により生体内により近い環境でエナメル上皮腫の振る舞いを明らかにする実験系を確立することやプロテオーム的解析によりエナメル上皮腫細胞が分泌する(あるいは周囲の細胞がエナメル上皮腫細胞に対して分泌する)シグナル分子やプロテアーゼを同定することが可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、歯原性良性腫瘍でありながら高い骨浸潤能のため、顎顔面の変形や機能障害を引き起こすエナメル上皮腫について、新たな治療戦略確立に必要な知見を得ることを目的とする。これまで本疾患で行われていた病理学的解析に加え、あまり行われなかった培養細胞(エナメル上皮腫細胞単独、及び病変周囲に存在する細胞との co-culture)の実験系を用いて、本疾患において特徴的な骨浸潤に関わる分子を特定するとともに、組織型の違いによる増殖や骨浸潤の違いについても解析する。その結果を、臨床材料、病理所見と併せて総合的に検討し、本疾患の骨への浸潤能を直接反映するリスク因子の同定を行う。最終的にはエナメル上皮腫治療での根拠ある客観的な骨浸潤リスクの迅速判定法の構築を目指すことを目標とする。

近年、様々なシグナル分子の働きが、歯の発生の段階で細胞増殖や分化の重要な因子であることが明らかにされている。Wnt もその一つで、Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白質で、分泌されると周囲の細胞の受容体 Frizzled や LRP にリガンドとして結合し、細胞内の β -カテニンの分解を停止するこ

とにより、細胞内の β -カテニン・TCF 転写因子複合体の働きを活性化し、細胞増殖にかかわるサイクリン D1、や骨のコラーゲンを分解する MMP-9 などの標的遺伝子の発現を誘導する β -カテニン経路や、低分子量 G 蛋白質 Rho を活性化することにより細胞の形態や運動を制御する PCP 経路、細胞内 Ca^{2+} を動員して C キナーゼ、カルモジュリン依存性キナーゼを活性化する Ca^{2+} 経路という 3 つの細胞内のシグナル経路を制御して、様々な細胞応答を起こす。我々は、Wnt シグナルが腫瘍の進展に関与するという知見を得ており、エナメル上皮腫における Wnt シグナルの役割についても着目し、本研究にて調査を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1、AM-3 と正常口腔粘膜細胞株 MOE-1 の遺伝子発現の比較

エナメル上皮腫細胞に発現する特異的な因子や骨吸収に関与する因子の発現を調査するため、過去に作成された不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1 と我々が樹立した不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-3 と、同じく我々が樹立した正常口腔粘膜上皮細胞株 MOE 1 の遺伝子発現について、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。

(2) 不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1、AM-3 および正常口腔粘膜上皮細胞株 MOE-1 における Wnt (ウイント) ファミリー Wnt 受容体および MMP の発現解析

AM-1、AM-3 および MOE-1 における Wnt-1, -2, -2b, -3, -3a, -4, -5a, -5b, -6, -7a, -8a, -8b, -9b, -10a, -10b, -11, -16 の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて解析した。また、Wnt 受容体である Frizzled(Fz)-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, LRP-5, -6 の遺伝子発現を同様にリアルタイム RT-PCR で解析した。

(3) Wnt 刺激による不死化エナメル上皮腫細胞株の Wnt シグナルの活性化ならびに MMP の活性化の解析

エナメル上皮腫細胞株が、Wnt、Wnt 受容体を発現することを確認した後、Wnt 依存性のシグナル伝達の関与について解析した。方法は、Wnt 刺激による MMP の発現誘導を確認するため、Wnt-3a 刺激による細胞質内の β -カテニンの蓄積を調べた。細胞質内の β -カテニンは Wnt シグナルの標的遺伝子である MMP に至るまでのシグナルメッセンジャーとして働く。さらに、MMP-2, -9 の発現ならびに活性化についてゼラチンゼイモグラフィーを用いたコラーゲン分解を観察し、AM-1 と AM-3 で比較した。

(4) 異なる腫瘍型由来の不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1、AM-3 の破骨細胞誘導能の

比較

AM-1, AM-3 はそれぞれ叢状型と濾胞型、異なる型のエナメル上皮腫症例に由来している。濾胞型は叢状型よりも骨浸潤を起こしやすく、しばしば再発を起こす特徴がある。両細胞株の持つ破骨細胞分化能・活性化能について比較を行った。

破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞と AM-1, AM-3 との共培養を 7 日間行い、分化した破骨細胞数を TRAP 染色にて評価する。多核細胞の発現量の比較から破骨細胞分化誘導能を AM-1, AM-3 間で比較した。

さらに、分化した破骨細胞のすべてが骨吸収能を持つわけではなく、そのためには破骨細胞の活性化の評価が必要である。AM-1, AM-3 両者の破骨細胞活性化能の評価はオステオアッセイにて行い、リン酸カルシウムでコーティングされたディッシュ上で AM-1, AM-3 と RAW を 7 日間共培養し、形成された吸収窩の数を評価した。

4. 研究成果

(1) 不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-3 と正常口腔粘膜細胞株 MOE-1 の遺伝子発現の比較

今回、エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 と正常口腔粘膜上皮細胞株 MOE-1 の遺伝子発現についてマイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、AM-1, AM-3 では LPS 受容体 (Toll-Like Receptor 4) の高発現をみると、エナメル上皮腫は感染に対する感受性が高く、感染が病態増悪のリスク因子の一つである可能性が示された。また、AM-3 は MOE-1 と比較して、IL-3 のようなサイトカインや MMP-3 のような酵素の高発現をみとめた。これらの因子は骨吸収に関与することが伺われる。

(2) 不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 および正常口腔粘膜上皮細胞株 MOE-1 における Wnt (ウイント) ファミリー Wnt 受容体および MMP の発現解析

AM-1, AM-3 および MOE-1 における Wnt ファミリーの遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて解析を行った。その結果、AM-1, AM-3 は MOE-1 と比較して、特に Wnt-5a, Fz-2, Fz-8 が高発現していた。また、AM-1, AM-3 の MMP-2, MMP-9 の遺伝子発現は MOE-1 と比べ著明に高かった。

(3) Wnt 刺激による不死化エナメル上皮腫細胞株の Wnt シグナルの活性化ならびに MMP の活性化の解析

AM-3 に Wnt-3a 刺激を加えた結果、刺激後 4 8 時間以降に細胞質内の カテニンの蓄積をみとめた。さらに、AM-1, AM-3 に Wnt-3a 刺激を加えた際の Wnt シグナルの標的遺伝子 MMP-2, -9 の活性化をみると、AM-3 の方が AM-1 に比べて MMP-2, -9 の活性が高かった。また、AM-3 では MMP-2 よりも MMP-9 の活性が高いことが分かった。

(4) 異なる腫瘍型由来の不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 の破骨細胞誘導能の比較

両細胞株の持つ破骨細胞分化能・活性化能について検討を行った。まず、破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞と AM-1, AM-3 との共培養を 7 日間行い、分化した破骨細胞数を TRAP 染色にて評価した。その結果、AM-3 は AM-1 と比較してより強い破骨細胞誘導を示した。

AM-1, AM-3 の破骨細胞活性化能の評価は Osteo Assay にて行い、その結果、AM-3 の方が AM-1 よりもより多くの吸収窩を形成した。

以上の結果より、エナメル上皮腫細胞は骨基質のコラーゲンを吸収する働きを担う MMP-2, -9 を高発現していることがわかった。また、エナメル上皮腫細胞と破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞を共培養した結果、エナメル上皮腫細胞は破骨細胞分化を誘導することがわかった。AM-1 と AM-3 は異なる組織型のエナメル上皮腫由来の不死化細胞であり、AM-1 は叢状型エナメル上皮腫、AM-3 は濾胞型エナメル上皮腫由来の細胞である。一般的に濾胞型エナメル上皮腫は叢状型よりも骨破壊能が高いことが知られている。AM-3 は AM-1 に比べ、MMP-2, -9 の発現が高く、破骨細胞誘導能が高いことが示された。このような結果は、叢状型と濾胞型の病態を考えるにあたり有用な知見であると考えられる。

今後は、エナメル上皮腫細胞と病変部に存在する複数の細胞種との相互作用について、共培養系を用いて、遺伝子発現の変化や細胞動態について解析を進める予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Hirano H, Yonezawa H, Yunoue S, Habu M, Uchida H, Yoshioka T, Kishida S, Kishida M, Oyoshi T, Fujio S, Sugata S, Yamahata H, Hanaya R, Arita K. Immunoreactivity of Wnt5a, Fzd2, Fzd6, and Ryk in glioblastoma: evaluative methodology for DAB chromogenic immunostaining. *Brain Tumor Pathol.* 31(2):85-93, 2014. (査読あり) (doi: 10.1007/s10014-013-0153-1)

Habu M, Koyama H, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Fuchigami T, Tokimura H, Ueda M, Tokudome M, Koriyama C, Hirano H, Arita K, Kishida S. Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. *J Biochem*, in press, 2014. (査読あり)

Toshiro Kibe, Takao Fuchigami, Michiko Kishida, Mikio Iijima, Hiroshi Hijioka, Akihiko Miyawaki, Ichiro Senba, Tooru Kiyono, Norifumi Nakamura, Shosei Kishida A novel ameloblastoma cell line (AM3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 115(6):

780-788, 2013. (査読あり)
(doi: 10.1016/j.oooo.2013.03.005.)

[学会発表](計1件)

岐部俊郎、岸田昭世、比地岡浩志、宮脇昭彦、中村典史：エナメル上皮腫由来細胞株の浸潤能における Wnt シグナルの意義．第 66 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2012 年 5 月 17-18 日,広島市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 智美(FUJII, Tomomi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教務職員
研究者番号：90305152

(2)研究分担者

岸田 昭世(KISHIDA, Shosei)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50274064

仙波 伊知郎(SENBA, Ichiro)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60145505

中村 典史(NAKAMURA, Norifumi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60217875

小松澤 均(KOMATSUZAWA, Hitoshi)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：90253088

岐部 俊郎(KIBE, Toshiro)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・
医員
研究者番号：50635480