

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11865

研究課題名(和文) 歯源性腫瘍の骨浸潤過程における間質細胞の関与とその機能解明

研究課題名(英文) Involvement and function elucidation of stromal cells in the process of bone invasion of odontogenic tumors

研究代表者

辻極 秀次 (Tsuji giwa, Hidetsugu)

岡山理科大学・理学部・教授

研究者番号：70335628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫に関しては、これまでに様々な研究が行われてきたが骨浸潤機構に関する詳細は依然として不明である。本研究では、エナメル上皮腫の腫瘍間質相互作用が骨浸潤に及ぼす影響について研究を行った。エナメル上皮腫では、腫瘍細胞が骨芽細胞分化に抑制的に作用する因子を産生していた。また腫瘍細胞がエナメル上皮腫由来の間質線維芽細胞に作用し、MMPsの産生と間質線維芽細胞の浸潤性を促進させていた。以上のことからエナメル上皮腫においては、特異的な腫瘍間質相互作用により骨浸潤が促進される可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エナメル上皮腫では腫瘍特異的な腫瘍間質細胞の相互作用により、骨芽細胞の分化抑制が生じ、骨組織の新生を阻害するとともに、間質線維芽細胞が腫瘍周囲組織に作用することで腫瘍細胞の浸潤を促進させている可能性が考えられた。

これらの研究成果は、エナメル上皮腫および、扁平上皮癌等エナメル上皮腫以外の腫瘍浸潤メカニズム解明に貢献すると考えられる。また、今後エナメル上皮腫の新規治療法開発に向けた基礎研究の発展に寄与することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Various studies have been conducted on ameloblastoma, however the details of their bone invasion mechanism remain unclear. In this study, we investigated the effects of tumor-stromal interactions in bone invasion of ameloblastoma. In ameloblastoma, tumor cells were thought to produce factors that suppress osteoblast differentiation. And also in ameloblastoma, it was considered that the stromal fibroblasts derived from tumor tissue was activated by tumor cells and promote to product MMPs, thus the stromal fibroblasts acquire the invasion bone ability. These results suggested that in ameloblastoma, bone invasion may be promoted by tumor-specific tumor-stromal interaction.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯源性腫瘍 骨浸潤 腫瘍間質相互作用

1. 研究開始当初の背景

歯原性腫瘍のなかで最も頻度の高いエナメル上皮腫は、歯を形成する組織に由来する良性腫瘍であり、顎骨およびその周囲に限局した領域に発生する。特に下顎骨の臼歯部や下顎枝に好発し、比較的若い年齢層での発症が認められる。エナメル上皮腫は組織学的には良性腫瘍に分類されるが、その多くは周囲骨組織に浸潤性に増殖、術後も再発を繰り返し、稀に悪性転化することから準悪性腫瘍として扱われる。エナメル上皮腫の治療法に関しては、顎骨切除や開窓術療法などの外科的手術しか選択できず、患者への負担の少ない新たな治療法の開発が望まれている。そのため、これまでにエナメル上皮腫に関する様々な研究が行われてきたが、依然としてエナメル上皮腫の骨浸潤機構の全体像は不明である。

一般的に、扁平上皮癌等の骨浸潤性の悪性腫瘍では、破骨細胞による骨吸収の活性化により骨浸潤が起こると報告されている。実際に骨浸潤性を有する扁平上皮癌では、腫瘍の骨浸潤先端部においてTRAP陽性の破骨細胞が多数認められる。しかしながら、我々の研究においてエナメル上皮腫では破骨細胞がほとんど認められないことを確認しており、現在報告されている悪性腫瘍の骨浸潤機構とは異なる機構が存在している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

近年の腫瘍進展に関する論文では、癌関連線維芽細胞が腫瘍の浸潤を先導するなど、腫瘍間質相互作用が重要な役割を果たすことが報告されている。我々の研究においても、エナメル上皮腫の間質細胞は、腫瘍細胞が産生する因子(CCN2)によって増殖が制御されているなど、エナメル上皮腫の進展にも腫瘍間質相互作用が関与している可能性が考えられる。

そこで本研究では、エナメル上皮腫の新規治療法開発に向けた基礎的研究の開拓を目的に、エナメル上皮腫の骨浸潤機構を解明するため、1)エナメル上皮腫腫瘍細胞が破骨細胞分化や骨芽細胞分化に与える影響について。2)腫瘍細胞が間質線維芽細胞の増殖能、および間質線維芽細胞の浸潤能におよぼす影響について。3)MMPsの免疫組織化学的染色解析、および間質線維芽細胞が産生するMMPsについて。以上の3点を中心に解析、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞が破骨細胞分化に与える影響

腫瘍細胞として、エナメル上皮腫由来細胞株(AM-1)またはヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株(HSC-2)を用いた。また間質線維芽細胞として、エナメル上皮腫患者由来細胞(ASF1104)および扁平上皮癌患者由来細胞(SCCst)を用いた。AM-1とASF1104またはHSC-2とSCCstは同細胞数を混和、24時間共培養を行い、上清を回収した。その後マウス骨髄由来細胞にM-CSFを添加3日間培養し、RANKLと腫瘍細胞および間質線維芽細胞の共培養上清を添加して4日間培養、TRAP染色を行った。

(2) 腫瘍細胞が骨芽細胞分化に与える影響

ST2またはMC3T3を96wellプレートで培養した。BMP-2(100 ng/mL)とAM-1またはHSC-2の培養上清を0、10、20、40%添加、経時的にALP性を測定した。

またKUSA-A1は24wellプレートに播種、 β -glycerophosphate 2 mM、アスコルビン酸 50 μ g/mL添加した石灰化誘導培地に、AM-1またはHSC-2の培養上清を0、10、20、40%添加し培養を行った。14日目にAlizarin red染色を施し、色素を溶出、405 nmで吸光度を測定し石灰化度を測定した。

(3) 腫瘍培養上清添加による間質線維芽細胞の細胞増殖能への影響

間質線維芽細胞に腫瘍培養上清を10%、20%、40%の濃度となるよう添加し1、3、5、7日間培養した。その後、MTT試薬を添加し細胞増殖能を評価した。

(4) 腫瘍細胞による間質線維芽細胞の浸潤能獲得

20%の腫瘍培養上清をサブコンフルエントに達した間質線維芽細胞に添加し48時間培養を行った。その後、間質線維芽細胞の細胞懸濁液を作製しatrigel™ Invasion Chamber 24-Well Plate上部のインサートに添加した。チャンパーの下部に20%の腫瘍培養上清を含む希釈調製培地にFBSの終濃度が12%なるように加え、24時間培養を行った後、Diff-Quick染色を施し浸潤能の評価を行った。

(5) 免疫組織化学的染色

エナメル上皮腫と扁平上皮癌の薄切標本に、一次抗体として抗MMP-1抗体、抗MMP-3抗体を100倍に希釈して用い、二次抗体としてPOD標識抗体を使用した。標本は反応終了後、DABを基質溶液として発色させた後、ヘマトキシリンにて対比染色を行い組織学的に観察した。

(6) ザイモグラフィーによる腫瘍間質線維芽細胞産生 MMP の検出

ゼラチンザイモグラフィーでは、腫瘍培養上清を間質線維芽細胞に添加、24 時間後に培養上清を回収した。回収した上清は限外濾過膜を用いて 10 倍に濃縮、0.1%ゼラチン含有アクリルアミドゲルで展開後、酵素反応を行い染色に続いて脱色し MMP 活性を評価した。ガゼインザイモグラフィーも同様に 0.05%ガゼイン含有アクリルアミドゲルを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) 腫瘍細胞が破骨細胞分化に与える影響について

エナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 とエナメル上皮腫間質線維芽細胞 ASF1104 の共培養上清をマウス由来骨髄細胞に添加したところ、破骨細胞分化に変化は認められなかった。しかし扁平上皮癌培養細胞 HSC-2 と扁平上皮癌患者由来細胞 SCCst の共培養上清を添加したところ、破骨細胞数の増加が認められた。扁平上皮癌では間質を介して破骨細胞分化を促進するが、エナメル上皮腫では腫瘍細胞に破骨細胞分化を促進させる作用がない可能性が考えられた。

(2) 腫瘍細胞が骨芽細胞分化に与える影響

AM-1 培養上清を添加した BMP-2 誘導 ST2 細胞では対照群と比較して ALP 活性に及ぼす変化は認められなかった。しかし MC3T3、KUSA 培養細胞では AM-1 培養上清の添加により ALP 活性の著しい抑制が認められた。また KUSA 細胞の石灰化についても検討を行ったところ、AM-1 培養上清の添加により著しい石灰化抑制が観察された。扁平上皮癌の骨芽細胞分化におよぼす影響について解析を行った結果、HSC-2 では ST2、MC3T3、KUSA の全ての細胞において強い骨芽細胞分化抑制が認められた。実験に用いた骨芽細胞様細胞の反応性の違いから、エナメル上皮腫と扁平上皮癌では、異なる因子が骨芽細胞分化抑制に関与している可能性が考えられた。

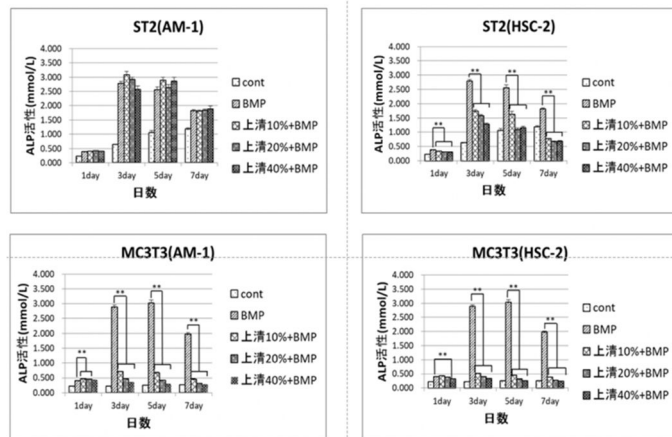


図1 腫瘍細胞が骨芽細胞に与える影響

実験に用いた骨芽細胞様細胞の反応性の違いから、エナメル上皮腫と扁平上皮癌では、異なる因子が骨芽細胞分化抑制に関与している可能性が考えられた。

(3) 腫瘍培養上清添加による間質線維芽細胞の細胞増殖能への影響

間質線維芽細胞である ASF1104 および SCC-st に、腫瘍細胞の AM-1、HSC-2 のそれぞれの培養上清を添加したところ、全ての組み合わせにおいて増殖活性の増加が認められた。

(4) 腫瘍による間質線維芽細胞の浸潤能獲得への影響

ASF1104 に腫瘍培養上清を添加すると、浸潤する細胞数が増加する傾向が認められた。AM-1 と HSC-2 では、AM-1 の方が浸潤細胞数が多い傾向が認められた。SCC-st に腫瘍培養上清を添加すると、HSC-2 では殆ど細胞の浸潤が認められなかったが、AM-1 では浸潤細胞数の増加が認められたことから、AM-1 は間質線維芽細胞の種類に関係なく、浸潤性を促す可能性が考えられた。

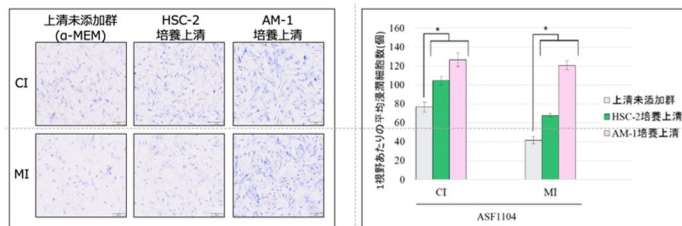


図2 腫瘍細胞による間質線維芽細胞の浸潤能獲得

(5) 免疫組織化学的染色

エナメル上皮腫の骨浸潤と MMPs の関連性について免疫組織化学的染色的に解析したところ、エナメル上皮腫および扁平上皮癌ともに腫瘍胞巣を形成する細胞に MMP-1 および MMP-3 の陽性所見が認められた。扁平上皮癌およびエナメル上皮腫では間質の線維芽細胞で陽性所見が観察され、特にエナメル上皮腫の骨周辺部でシグナルが増強する傾向が認められた。

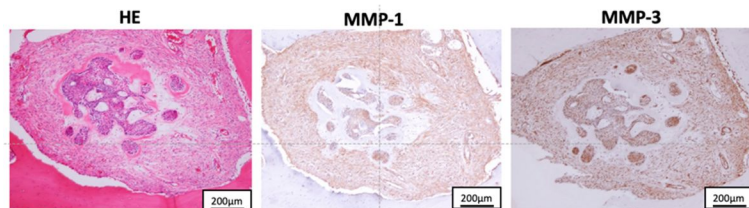


図3 免疫組織化学的染色

(6) ザイモグラフィーによる腫瘍間質線維芽細胞産生 MMP の検出

扁平上皮癌では、腫瘍細胞産生因子により間質線維芽細胞の種類にかかわらず MMPs が活性化する傾向が認められたが、エナメル上皮腫では、エナメル上皮腫由来の間質線維芽細胞と腫瘍細胞の組み合わせにより MMPs が活性化する傾向が認められた。エナメル上皮腫では腫瘍特異的な相互作用により間質線維芽細胞から MMP が産生される可能性が考えられた。

以上の実験結果から、エナメル上皮腫では、扁平上皮癌で認められるような破骨細胞主体による骨組織吸収ではなく、1)腫瘍産生因子が骨芽細胞分化を抑制することにより骨リモデリングバランスが崩壊する。2)腫瘍産生因子により間質線維芽細胞の増殖促進および浸潤性促進が生じる。3)腫瘍産生因子により腫瘍周囲の間質線維芽細胞が活性化

MMPs を産生する。これら腫瘍間質相互作用の結果、間質線維芽細胞が腫瘍周囲間質に作用することにより、エナメル上皮腫の骨浸潤および進展に与える可能性が示唆された。

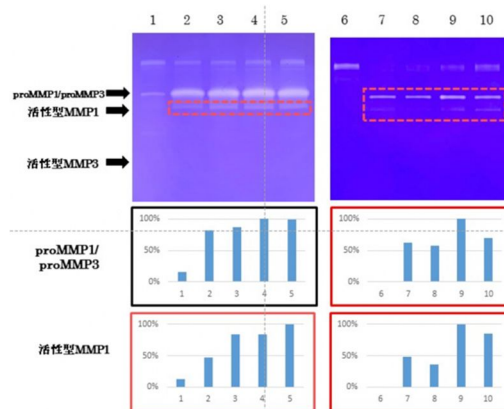


図4 ゼイモグラフィー

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 澄 文香、阪上峻基、浜田芽衣、高畠清文、長塚 仁、辻極秀次
2. 発表標題 エナメル上皮腫および間質との相互作用が骨組織におよぼす影響について
3. 学会等名 第27回硬組織再生生物学会学術大会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阪上 峻基、澄 文香、浜田 芽衣、長塚 仁、辻極 秀次
2. 発表標題 エナメル上皮腫および腫瘍間質線維芽細胞におよぼす影響について
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澄 文香、阪上峻基、浜田芽衣、長塚 仁、辻極秀次
2. 発表標題 エナメル上皮腫細胞と骨芽細胞の細胞間相互作用解析
3. 学会等名 日本組織培養学会 第90回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山近 英樹 (Yamachika Eiki) (10294422)	岡山大学・大学病院・講師 (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	長塚 仁 (Nagatsuka Hitoshi) (70237535)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関