

令和 2 年 4 月 15 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17286

研究課題名(和文)新規治療薬開発に向けてのエナメル上皮腫増悪因子の分子生物学的解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of ameloblastoma exacerbation factor for development of new therapeutic agents

研究代表者

石河 太知(Ishikawa, Taichi)

岩手医科大学・歯学部・助教

研究者番号：10569247

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文): Laminin332 はエナメル上皮腫の上皮下への浸潤に関わっていることが示唆された。また口腔内細菌、特に歯周病原細菌が産生する酪酸がエナメル上皮腫からのEGFやTGF- $\beta$ 1の産生を促し、これらサイトカインがオートクラインにエナメル上皮腫に働くことによって浸潤に関わるLaminin332の発現を増加させる可能性が考えられた。したがって、エナメル上皮腫の浸潤(悪性化)において、酪酸産生菌の局所におけるコントロールが非常に重要であると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫の顎骨内の侵襲的な増大や、まれに見られる悪性化・転移には、増悪因子としてLaminin等の発現や、サイトカインの関与が示唆されてきた。しかし、腫瘍の部位により細胞に多様性のある本疾患の悪性化に関わるメカニズムについては不明な点が多かった。さらに、その増悪には歯周病原細菌の関与が疑われるものの、それらの影響はこれまで全く検討されていなかった。本研究では、同一のエナメル上皮腫組織から樹立された新たな3種の細胞株を用い、細胞接着因子、サイトカインに加え、細菌由来因子も含めた本疾患の増悪に関するメカニズムを分子生物学的観点から明らかにしたことで、新規治療薬開発の一助となると考えられる。

研究成果の概要(英文): It was suggested that Laminin332 is involved in subepithelial infiltration of ameloblastoma.

In addition, the possibility was considered that butyric acid produced by oral bacteria, especially periodontopathic bacteria, stimulates the production of EGF and TGF- $\beta$ 1 from ameloblastoma, and these cytokines increase the expression of Laminin332 involved in invasion by acting on autocrine ameloblastoma.

Therefore, it was suggested that local control of butyric acid-producing bacteria is very important in the infiltration (malignant transformation) of ameloblastoma.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：エナメル上皮腫 歯周病原細菌 酪酸

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は良性腫瘍であるが、顎骨内で侵襲的に増大し、まれに悪性化・転移を起こす疾患である。また、再発が多く治療に難渋し患者への負担が非常に大きい。そのため、患者への負担が軽減されるような新規治療法の開発が求められる。しかしながら、治療法の開発の基礎となる、本疾患の migration(増大や転移)に関して分子生物学的なメカニズムは不明な点が多い。現在までに、増悪因子として、1. 細胞接着因子、2. 液性因子(サイトカイン)が挙げられている。1. については Laminin111(LM111)や Laminin332(LM332), Fibronectin を発現することが腫瘍組織の免疫染色によって明らかにされている(Lapthanasupkul ら 2012)。2. については、細胞株を用いた実験系で上皮成長因子(EGF)がその migration に関わるという報告(Da Rosa ら 2014)や、他の腫瘍で増殖や浸潤に関わることが明らかにされつつある Wnt シグナル経路と、その標的遺伝子である MMPs の関連(Tanahashi ら 2008)が示唆されている。しかし、エナメル上皮腫の増悪について、これら細胞接着因子とサイトカイン、両者の関係を分子生物学的に検討した報告は認められていない。また、本疾患は歯根吸収を伴いながら増大することから、口腔細菌への曝露が想像出来るが、それら細菌との関連は検討されていない。2010 年に Miyazaki らによって、歯周病原細菌 (Porphyromonas gingivalis, Fusobacteriumnucleatum) が産生する ButyricAcid(BA)が口腔癌の進行に関連することが報告されている。これは、癌の進行する部位で発現が亢進する Podoplanin が、BA によって過剰発現することによる。Podoplanin は腫瘍の細胞骨格中の actin を変化させることにより、その運動性を亢進させる。加えて、同年 Gonzalez-Alva らによって免疫染色により、Podoplanin がエナメル上皮腫で過剰発現していることが明らかとなっている。これらの報告から、歯周病原細菌由来の BA がエナメル上皮腫の第 3 の増悪因子として働くのではないかと考えた。これら 3 種の増悪因子(細胞接着因子、サイトカイン、細菌由来因子)に着目し、分子生物学的に解析することは、本疾患の増悪メカニズムの解明のみならず、エナメル上皮腫の新たな治療薬の開発にも直結し、意義のあることだと考えた。

### 2. 研究の目的

エナメル上皮腫の増悪に関して細胞接着因子とサイトカイン、細菌由来因子の総合的な影響をシグナル伝達系も含めて明らかにし、さらに、腫瘍の部位特異的なメカニズムも明らかにすることを目的とする。本研究の実施によって、エナメル上皮腫の侵襲的な増大や悪性化・転移に関わる病態の一因を明らかとすることは、新たな治療薬の開発に直結する可能性があり、患者の負担を大きく軽減でき、多大な社会貢献となることが予想される。

### 3. 研究の方法

(1) 同一のエナメル上皮腫から分離、培養された 3 つの細胞株 (HAM1, HAM2, HAM3) を実験に使用した。

(2) Migration の検討(migration assay)

Pore size 8 $\mu$ m のトランスウェルカルチャーインサートを Laminin332 で下部のみコーティングする。その後、上部チャンバーに HAM1, 2, 3 細胞をそれぞれ播種し 18 時間培養後 membrane に付着した細胞を glutaraldehyde で固定する。その後、ヘマトキシリンで染色し、membrane 上部の細胞を取り除き、400 倍の顕微鏡下で計測した。

(3) 遺伝子発現量の解析

24 ウェルプレートに HAM1, 2, 3 細胞をそれぞれ播種し、前培養する。その後、様々な濃度の酪酸(細菌由来因子)や EGF, TGF 1(サイトカイン)により細胞を刺激する。6 時間後に total RNA を抽出、精製し逆転写反応により cDNA を

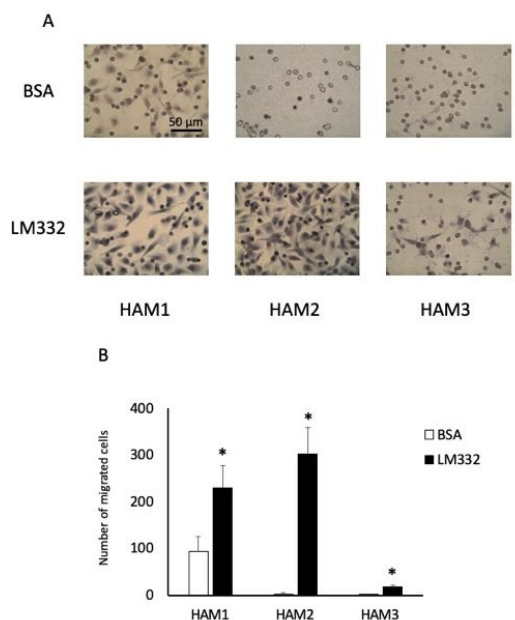


Fig.1

合成する。これをテンプレートとして定量的PCR法にて遺伝子発現の変化を解析した。目的の遺伝子は podoplanin, EGF, TGF 1, Laminin332 とした。

#### 4. 研究成果

(1) Laminin332 によるエナメル上皮腫 migration の誘導(Fig.1).

Migration assay において全ての細胞が Laminin332 により migration が誘導された。最も誘導されたのは HAM2 でコントロール群と比較すると 100 倍程度であった。

(2) 酪酸(細菌由来因子)刺激後の遺伝子発現の変化(Fig.2).

Podoplanin について

0.2 mM の酪酸刺激において HAM2 で弱いながら発現量が増加した。しかし 2 mM, 20 mM の酪酸刺激では全ての細胞で発現量が減少した。

Laminin 3 について

20 mM の酪酸刺激で HAM1, HAM2 の Laminin 3 発現が減少した。

EGF について

0.02 mM の酪酸刺激で HAM2 のまた 2 mM の酪酸刺激で HAM3 の EGF 発現が上昇した。

TGF 1 について

20 mM の酪酸刺激で HAM2 の TGF 1 発現が上昇した。

(3) EGF 刺激後の Laminin 3 発現の変化(Fig.3).

10 ng/ml, 100 ng/ml の EGF 刺激で HAM1 において Laminin 3 の発現が増加した。HAM2, HAM3 においても増加の傾向が認められた。

(4) TGF 1 刺激後の Laminin 3 発現の変化(Fig.4).

10 ng/ml, 50 ng/ml の TGF 1 刺激で全ての細胞において Laminin 3 の発現が増加した。HAM2, HAM3 においては 5 ng/ml の TGF 1 刺激でも Laminin 3 の発現が増加した。

以上のことから, Laminin332 はエナメル上皮腫の上皮下への浸潤に関わっていることが示唆された。また口腔内細菌、特に歯周病原細菌が産生する酪酸がエナメル上皮腫からの EGF や TGF 1 の産生を促し, これらサイトカインがオートクラインにエナメル上皮腫に働くことによって浸潤に関わる Laminin332 の発現を増加させる可能性が考えられた。したがって, エナメル上皮腫の浸潤(悪性化)において, 酪酸産生菌の局所におけるコントロールが非常に重要であると示唆された。

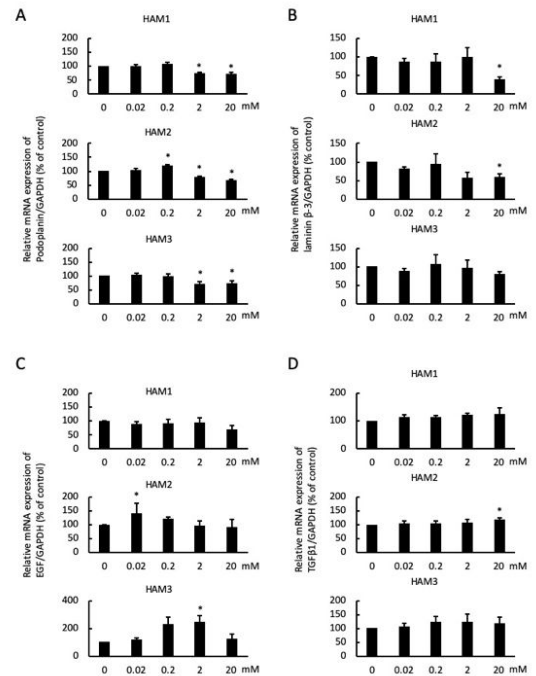


Fig.2

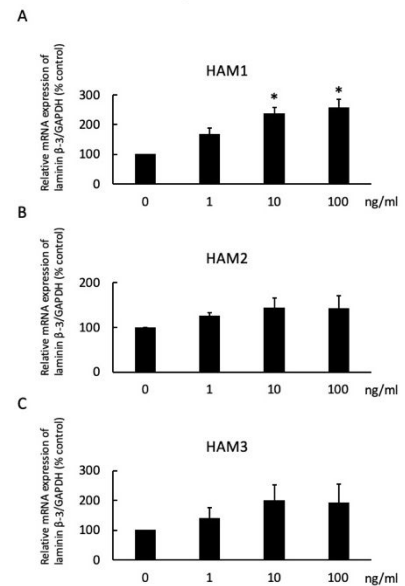


Fig.3

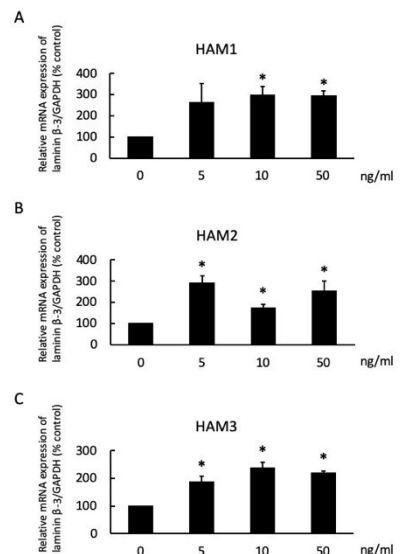


Fig.4

<引用文献>

Lapthanasupkul P, Poomsawat S, Chindasombatjaroen J (2012) Investigation of basement membrane proteins in a case of granular cell ameloblastoma. *Int J Oral Sci*, 4(1), 45-49.

Da Rosa MR, Falcão AS, Fuzii HT, da Silva Kataoka MS, Ribeiro AL, Boccardo E et al. (2014) EGFR signaling downstream of EGF regulates migration, invasion, and MMP secretion of immortalized cells derived from human ameloblastoma. *Tumour Biol*, 35, 11107-11120.

Tanahashi J, Daa T, Yada N, Kashima K, Kondoh Y, Yokoyama S (2008) Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of  $\beta$ -catenin. *J Oral Pathol Med*, 37, 565-570

Miyazaki Y, Kikuchi K, González-Alva P, Inoue H, Noguchi Y, Tsuchiya H et al. (2010) Association of butyric acid produced by periodontopathic bacteria with progression of oral cancer. *J Cancer Sci Ther*, 2(2), 026-032.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Taichi Ishikawa, Jun Terashima, Yu Shimoyama, Yu Ohashi, Toshinari Mikami, Yasunori Takeda, Minoru Sasaki	4. 巻 accepted
2. 論文標題 Effects of butyric acid, a bacterial metabolite, on the migration of ameloblastoma mediated by laminin 332.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Oral Sci. (accepted)	6. 最初と最後の頁 accepted
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石河太知、下山 佑、古玉芳豊、木村重信、佐々木実
2. 発表標題 Influences of the butyric acid produced by periodontopathic bacteria on ameloblastoma.
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石河太知、下山 佑、古玉芳豊、佐々木実
2. 発表標題 Butyric acid (Periodontopathic bacterial metabolite) effects on aggravation of ameloblastoma
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石河太知、下山 佑、古玉芳豊、佐々木実
2. 発表標題 A periodontopathic bacterial metabolite effects on exacerbation of ameloblastoma
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019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
研究協力者	寺島 潤 (Terashima Jun)		
研究協力者	大橋 祐生 (Ohashi Yu)		
研究協力者	三上 俊成 (Mikami Toshinari)		
研究協力者	武田 泰典 (Takeda Yasunori)		
研究協力者	下山 佑 (Shimoyama Yu)		
研究協力者	佐々木 実 (Sasaki Minoru)		
研究協力者	古玉 芳豊 (Kodama Toshitoyo)		