

令和 3 年 5 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19639

研究課題名(和文)意図的細胞誘導による新規エナメル上皮腫治療法開発に向けた試み

研究課題名(英文)Trail toward development of new treatment for ameloblastoma by intentional cell differentiation

研究代表者

前田 健康(MAEDA, TAKEYASU)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40183941

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル芽細胞は、退縮期に入るとほとんどの活性を失い、歯の萌出とともに体外に排出される。エナメル上皮腫は、胎生期のエナメル器の細胞が残存し腫瘍化したものである。エナメル上皮腫の細胞を退縮エナメル上皮細胞に類似した細胞に分化誘導することによって、エナメル上皮腫の進行が抑制される可能性がある。しかしながら、退縮エナメル上皮の分子レベルでの知見はほとんどない。本研究では、退縮エナメル上皮は、老化シグナルを活性化させることによって活性を低下させ、萌出までエナメル表面にとどまることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫は、歯源性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患である。外科的処置しか選択肢がないことに加え、高い再発率から除去範囲が大きくなり術後の機能障害が強くなる。罹患部位によっては著しい審美障害も伴う。また、その多くが10代～20代で発症する。それは、その後の全ての生涯という長きにわたる機能的・審美的障害をも意味する。このようにエナメル上皮腫は、歯科において、克服すべき課題の極めて大きい腫瘍の一つといえる。本研究結果は、エナメル上皮腫細胞に老化シグナルを誘導することにより、腫瘍細胞を退縮エナメル上皮細胞へと分化誘導させるという新しい治療法への開発につながる。

研究成果の概要(英文)：At post-maturation stage in normal tooth development, ameloblasts differentiate into reduced enamel epithelial cells which exhibit low biological activity. These reduced enamel epithelial cells are fallen out during tooth eruption. It is believed that ameloblastoma is caused by tumorigenesis of enamel forming cells. It is possible that ameloblastoma become harmless when ameloblastoma differentiate into reduced enamel epithelial cells. However, the molecular mechanisms inducing reduced enamel epithelial cells are remained unclear. We found that reduced enamel epithelium decreased their biological activity by activating senescence.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：エナメル上皮腫 老化シグナル 退縮エナメル上皮

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は、歯源性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患である。良性腫瘍ではあるが、再発頻度が高いことに加え、組織の侵襲性も強く、悪性転化や遠隔転移などの報告もある。治療法としては、顎骨切除という外科的処置しか選択肢がない。さらに、悪性化の恐れや高頻度の再発から、健全な組織を含めた広範囲な切除を必要とする。切除範囲が広いことは、術後の QOL にも甚大な影響があることを意味する。さらに、この疾患は、10代から20代の若い世代に多く発症するため、術後の長きにわたる人生を機能的、審美的問題を抱えたまま過ごす事になる。つまり、治癒しても、さまざまな面で、長期にわたる観察やケアを余儀なくされる。このように、エナメル上皮腫は克服すべき課題が多く、歯科領域において解決に向けて最も取り組むべき腫瘍の一つといえる。

エナメル上皮腫は、胎生期のエナメル器の細胞によって生じる。通常、エナメル芽細胞は、分泌期、成熟期を経て、最終的に退縮エナメル上皮に分化する。エナメル形成が完了した後の退縮エナメル上皮細胞は、ほとんどの活性を失った細胞と考えられ、歯の萌出までエナメル質を保護するためにエナメル質表層に存在し、萌出によって体外に排出される。エナメル上皮腫は分泌期のエナメル器の細胞に類似しており、それらの細胞が残存し腫瘍化することでエナメル上皮腫が引き起こると考えられている。一方、退縮エナメル上皮に類似したエナメル上皮腫の報告はない。エナメル上皮腫の細胞を活性のない退縮エナメル上皮細胞へと分化誘導できれば、エナメル上皮細胞の組織侵襲性は停止する可能性が高い。しかし、エナメル形成研究は、エナメル形成に直結する分泌期、成熟期にのみ焦点が当てられ、エナメル形成が完了した後の退縮期における退縮エナメル細胞の研究はほとんど行われていない。そのため、退縮エナメル上皮の分子レベルでの知見はほとんど存在しない。

そこで本研究では、退縮エナメル上皮細胞の分子レベルでの解析と、その誘導メカニズムを解明し、新しいエナメル上皮腫治療へのアプローチを模索することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、退縮エナメル上皮細胞の分化レベルでの把握と、退縮エナメル上皮の誘導メカニズムの追求にある。

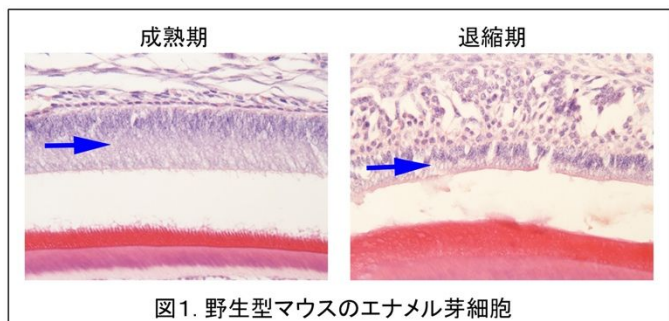
3. 研究の方法

退縮エナメル上皮に発現する分子を解析し、成熟期から退縮期への分化を誘導する因子を解明する。

4. 研究成果

エナメル形成は、分泌期、成熟期、退縮期が連続して進行する。背の高い成熟期のエナメル芽細胞は成熟期に入ると、背が低くなり、小型でほぼ立方状の形態となるため、分泌期と成熟期の境界における細胞変化に比べ、退縮期は形態的に顕微鏡レベルで容易に識別できる(図1)。

成熟期と退縮期での分子レベルでの相違点を探るために、radioactive *in situ* hybridization にて、さまざま分子の発現を比較した。分泌期、成熟期のエナメル芽細胞は、*amelogenin*、*amelioblastin*、*enamelin* といったエナメル形成に関わる遺伝子の発現を示す。それに対し、退縮エナメル上皮では、それらのエナメル関連タンパクの発現は著しく減弱していた(図2)。



胎生期の細胞の分化の制御は、Shh、Fgf、Wnt などのシグナルが担うことが多い。Shh シグナルは、エナメル上皮細胞の分化に必須のシグナルであることが報告されている (Gritli-Linde et al., Development 129, 5323-5337, 2002)。しかし、退縮エナメル上皮での活性の有無は報告がない。そこで、Shh シグナルの活性マーカーである Gli1 の発現を確認したところ、退縮期でも乳頭層には Shh シグナルの活性が維持されているのに対し、退縮エナメル上皮では、Shh シグナルの活性が消失していた (図3)。他のシグナル関連分子の発現も消失していた。このように、退縮エナメル上皮では、成熟期に認められた発現遺伝子の多くが減少していた。

退縮エナメル上皮の分子レベルでの活動性の低さは、他の分子の検索でも把握できた。一方で、多くの分子発現が減少する中、退縮エナメル上皮で p53 が上昇することを見出した (図4)。p53 の下流分子である p21 の上昇からも、p53 の上昇が確認された (図5)。p53 や p21 はアポトーシス関連のタンパクとして知られている。アポトーシスには、免疫系細胞によるアポトーシス細胞の除去が伴う。しかし、退縮エナメル上皮は、歯の萌出まで存在するため、退縮エナメル上皮での p53 や p21 の上昇はアポトーシスとは直結しにくい。一方で、p53 と p21 は、アポトーシス以外にも、老化の誘発に関連する分子としても知られている。興味深いことに、老化した細胞は、活発な活性を失うが、細胞死を起こさないため、免疫系細胞により除去されることもなく長期間体内にとどまる。このように、退縮エナメル上皮と老化細胞には、共通点が多い。老化細胞は機能不全ミトコンドリアが蓄積し、活性酸素 (ROS) のレベルが増加する。リソソーム内容物の増加とリソソーム活性の変化も見られ、これは pH 6.0 における β -ガラクトシダーゼの活性上昇に反映される。そのため、pH 6 で X-gal を基質として galactosidase を染色すると (senescence-associated

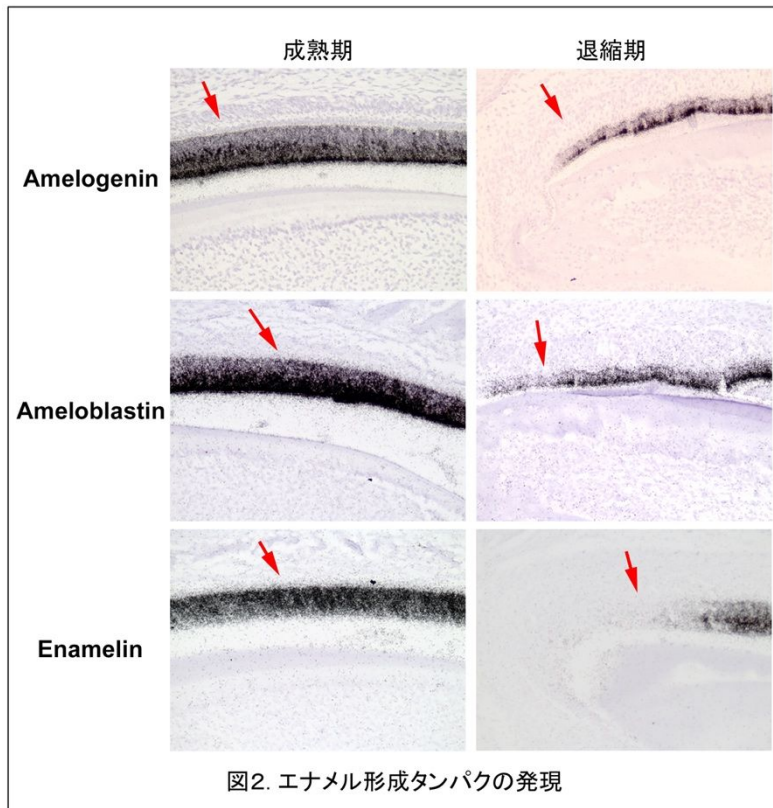


図2. エナメル形成タンパクの発現

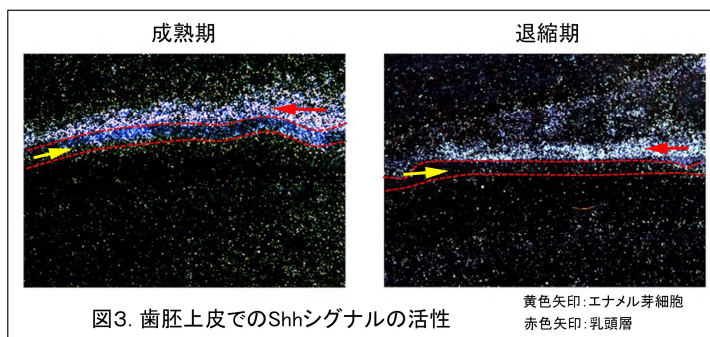


図3. 歯胚上皮でのShhシグナルの活性

黄色矢印: エナメル芽細胞
赤色矢印: 乳頭層

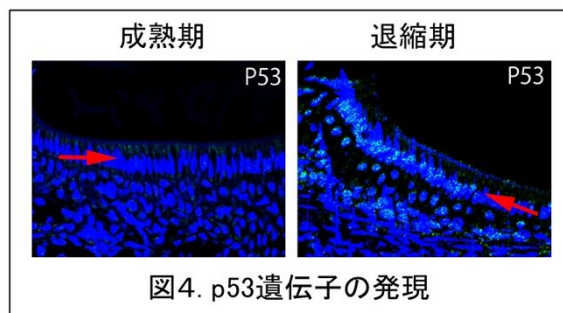


図4. p53遺伝子の発現

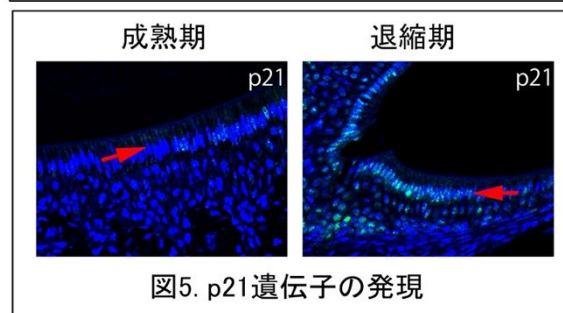
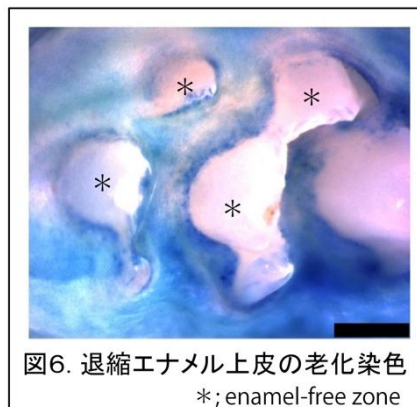


図5. p21遺伝子の発現

-galactosidase ; SA- β -Gal)、老化細胞を青色に染色できる。そこで、退縮期で、SA- β -Gal 染色を行った。SA- β -Gal 染色は、脱灰を伴う切片上では行えないため、退縮期のエナメル表層細胞ごと歯を取り出して、whole mount SA- β -Gal 染色を行なった。マウスの臼歯の咬頭頂は、エナメルが存在しないため (enamel-free zone)、その部位には細胞は存在するものの、退縮エナメル上皮は存在しない。咬頭頂に老化活性を示す青色は認められなかった。一方、enamel-free zone を除いた他の部位のエナメル表層の細胞は青色に染色されていた (図 6)。分泌期や成熟期の歯胚でも同様の SA- β -Gal 染色を行なったが、青く染色される細胞は認められなかった。



以上のことから、退縮エナメル上皮細胞は、老化シグナルを活性化させることで、細胞死を誘導することなく、代謝活性を減弱させ、歯の萌出までエナメルの表層に存在することが示された。

エナメル上皮腫の細胞にも老化シグナルを上昇させることで、退縮エナメル上皮細胞へと分化させ、エナメル上皮腫の組織侵襲性を抑制できる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Meguro F, Porntaveetus T, Kawasaki M, Kawasaki K, Yamada A, Kakihara Y, Saeki M, Tabeta K, Kessler JA, Maeda T, Ohazama A.	4. 巻 32
2. 論文標題 Bmp signaling in molar cusp formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gene Expr Patterns	6. 最初と最後の頁 67-71
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gep.2019.04.002	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Meguro F, Kakihara Y, Kawasaki M, Kawasaki M, Maeda T, Tabeta K, Saeki M, Ohazama A.
2. 発表標題 Bmp signaling regulates cusp formation
3. 学会等名 International Niigata-Taiwan Universities collaborative dental research symposium（国際学会）
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
研究分担者	大峽 淳 (Ohazama Atstushi) (40266169)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	
研究分担者	川崎 勝盛 (Kawasaki Katsushige) (40529640)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	川崎 真依子 (Kawasaki Maiko) (40584587)	新潟大学・医歯学系・准教授 (13101)	

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
---------	---------