

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10145

研究課題名（和文）独自の動物実験モデルを用いたエナメル上皮腫の治療標的因子の同定

研究課題名（英文）Identification of therapeutic target factors for ameloblastoma using animal transplantation model

研究代表者

淵上 貴央（Fuchigami, Takao）

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：40772439

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株や腫瘍間質に豊富に存在する線維芽細胞やマクロファージといった腫瘍周囲に存在する細胞を使用した三次元培養実験系および独自に構築した動物実験系により、エナメル上皮腫の浸潤発育様式の多様性をもたらす因子の候補の同定を目指した。研究の結果、エナメル上皮腫細胞から分泌されるIL-1alphaが線維芽細胞やマクロファージといった周囲の間質細胞と相互作用し、腫瘍の浸潤能やその様相の変化に影響することが分かった。この結果からIL-1alphaがエナメル上皮腫の治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で用いた実際の病変に近い環境を再現した三次元培養法と動物実験モデルは、今まで困難であった実際の病変に近い環境でのエナメル上皮腫の動態評価を可能とし、本腫瘍の病態を解明する上で非常に有益である。本研究によりエナメル上皮腫の浸潤発育に強く関連する因子を同定することができれば、病態の異なる様々なタイプのエナメル上皮腫に対する戦略的な治療法の実現が可能であると考えられる。今回の研究成果ではIL-1alphaが腫瘍の浸潤発育に影響を与えることが示唆され、今後さらなる検証により新規治療法の糸口となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to identify factors that cause the diversity of invasive growth patterns of ameloblastoma using an original three-dimensional culture method using immortalized human ameloblastoma cell lines of different histological types, fibroblasts, and macrophages. As a result of this study, we found that IL-1alpha secreted by ameloblastoma cells interacts with stromal cells such as fibroblasts and macrophages, and affects the invasive ability and form of tumor cells. These results suggest that IL-1alpha may be a therapeutic target for ameloblastoma.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エナメル上皮腫 歯源性腫瘍 三次元培養

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にも関わらず高い骨浸潤能を有しており治療後の再発率も高いため、治療法として広範な顎骨切除が選択されることも少なくない。しかし、本腫瘍の成因や病態は未解明な点が多く、治療方針は経験的な見地から決定されるに過ぎない。また、エナメル上皮腫は病理組織像にて濾胞型や叢状型といった異なる組織型を示すことを特徴とし、いずれの組織型も腫瘍細胞が細胞間の接着を維持したまま集団的に浸潤する特徴(集団的細胞浸潤)が伺えるが、その多様な浸潤発育様式の要因は未解明である。

我々の研究グループは、叢状型エナメル上皮腫の不死化細胞株 **AM-1 (J Oral Pathol Med, 1998)** および濾胞型エナメル上皮腫の不死化細胞株 **AM-3 (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2013)**の樹立に成功した。これにより、主要な組織型のエナメル上皮腫細胞株を用いた、各組織型の病態の違いに関する分子生物学的な比較解析を安定して行うことが可能となった。

申請者は、「腫瘍細胞由来の液性因子や間質細胞との相互作用が腫瘍細胞の性質に影響し、本腫瘍の浸潤形態の多様性をもたらす要因となる」との仮説を立て、その解明は腫瘍の特性診断による治療方針決定や治療標的としての活用など、根拠に基づいた治療法の発展に繋がるとの着想に至った。その研究結果として、**Double-Layered** コラーゲンゲル半球(**DL-CGH**)培養法により、各組織型由来の腫瘍細胞株は異なる集団的細胞浸潤形態を示し、線維芽細胞の存在は腫瘍細胞の集団的細胞浸潤形態に影響を及ぼすことを見出した(**Biochem Biophys Res Commun, 2014**)。DL-CGH 培養法は、細胞の集団的な浸潤形態を評価するのに優れた三次元培養法である(**Cell Commun Adhes, 2007**、真庭ら)。我々は、DL-CGH 培養法に独自の工夫を加え、異なる蛍光蛋白質で標識した複数種の細胞を共培養することで、腫瘍細胞の集団的細胞浸潤の評価を簡便に行うことを可能とした。これにより、腫瘍細胞と腫瘍間質に豊富に存在する線維芽細胞の相互作用が腫瘍の浸潤発育様式に影響する可能性が示唆された。また、本腫瘍の生体内での浸潤発育動態を追究するには動物移植モデルを用いた実験系が不可欠であるが、これまでエナメル上皮腫の安定した動物実験モデルは世界的にも報告がなかった。申請者は、免疫不全マウスに複数の組織型由来のエナメル上皮腫細胞株を細胞の足場としてのマトリゲルと併せて移植し、生体内での浸潤発育動態を評価可能な複数の組織型の動物移植モデルの確立に成功した(**J Appl Oral Sci, 2020**)。これにより、異なる組織型由来の細胞株を用いた三次元培養系と動物実験系を用いた、実際の病変に近い環境での検証が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株や腫瘍間質に豊富に存在する線維芽細胞やマクロファージといった腫瘍周囲に存在する細胞を使用した三次元培養実験系により、本腫瘍の浸潤発育様式の多様性をもたらす因子の候補の同定を目指した。さらにすでに確立したエナメル上皮腫の動物実験モデルを使用し、細胞実験系で得た結果の検証を行う計画であった。複数の組織型のエナメル上皮腫細胞株を樹立した研究グループは世界的に類がなく、これらの細胞株やその他の細胞種を用いた実際の病変に近い環境を再現した三次元培養法を用いた実験系は我々の知る限り報告がない。また、エナメル上皮腫の動物実験モデルの報告は過去に存在するものの、複数の組織型の安定した動物移植モデルについては三次元培養実験系同様に世界的に見ても報告がない。従って、本研究計画における三次元培養実験系や動物実験系の確立は、本腫瘍の病態解明する上で非常に有意義であると考え。本研究の成果から、エナメル上皮腫の浸潤発育様式に関わる因子を同定できれば、本腫瘍の病態に対する理解を深め、病態の異なる様々なタイプのエナメル上皮腫に対してより戦略的な治療法の工夫をもたらすことが可能であると考え。

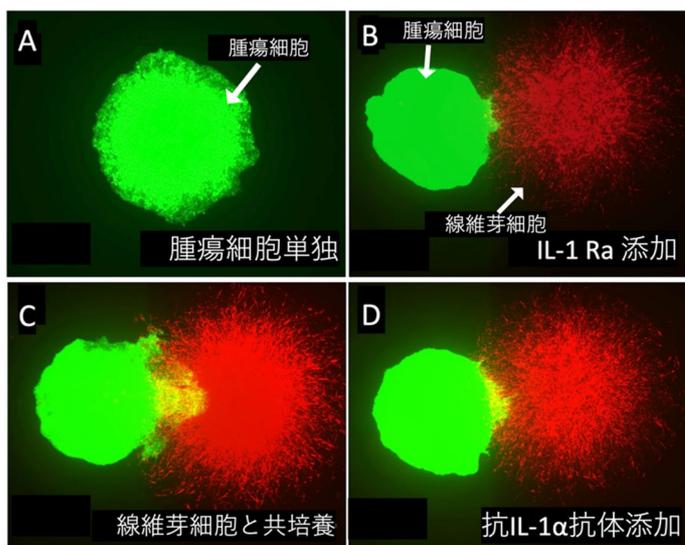
3. 研究の方法

本研究では、エナメル上皮腫由来の因子が、エナメル上皮腫細胞自身もしくは間質細胞に影響を与えることで、腫瘍細胞の浸潤を制御する可能性について着目した。実験には異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株である **AM-1(叢状型由来)**、**AM-3(濾胞型由来)**および、間質に存在する細胞との相互作用を評価するためにヒト線維芽細胞 **HFF-2** やマクロファージ株 **RAW264.7** を用いた。過去に行った複数のエナメル上皮腫細胞株の網羅的遺伝子解析から得られた結果から、腫瘍の浸潤能や増殖能に影響し得る因子を選定し、候補因子の蛋白による細胞刺激や抗体による中和を行った上で、浸潤能や浸潤形態の変化について評価した。また、**Matrix Metalloproteinase(MMP)** といった骨吸収や腫瘍の浸潤に深く関わる消化酵素の発現変化につ

いてもその発現を評価した。さらに、緑色蛍光蛋白(GFP)で標識した各エナメル上皮腫細胞株と赤色蛍光蛋白(DsRED)で標識した線維芽細胞株 **HFF-2** を単独または共培養による **DL-CGH** 培養法を行い前述の因子による集団的細胞浸潤の様相の変化について評価した。当初の研究計画では、三次元培養実験系で得られた結果を考察した上で、動物実験モデルでの検証を行う予定であったが、残念ながら研究期間内での検証を行うことはできなかった。

4. 研究成果

当初、研究計画通りエレクトロポレーション法などの遺伝子導入法を用いて各エナメル上皮腫細胞株でノックダウンや高発現させ、浸潤能や増殖能についての影響について評価する予定であった。しかし、エレクトロポレーション法をはじめとした各種遺伝子導入法を試みたが腫瘍細胞への遺伝子導入効率が上がらず、導入後も細胞が不安定であったため、遺伝子導入による細胞株の性格の変化については評価困難であった。そのため、候補因子の蛋白や中和抗体を用いてエナメル上皮腫細胞株の細胞浸潤能、増殖能、**MMP** といった骨吸収や腫瘍の浸潤に深く関わる消化酵素の発現変化について調べた。その結果、候補因子の中でも **Interleukin (IL)-1 alpha** が各種エナメル上皮腫細胞株の浸潤能や増殖能および **MMP-2, MMP-9** 等の消化酵素の発現に関わっている可能性が高いことが分かった。そこで、前述の三次元培養評価方法 (**DL-CGH** 培養法) にて、**IL-1alpha** による刺激や抗体による中和を行った状態でエナメル上皮腫細胞の三次元的な動きを評価したところ、同因子は腫瘍細胞の集団的な浸潤形態の変化に影響を与えていることが判明した。エナメル上皮腫細胞株は **IL-1alpha** の刺激により、**MMP-9** の発現が有意に上昇することがわかった。さらに、これらの反応は **IL-1 Receptor antagonist(IL-1 Ra)** および抗 **IL-1alpha** 抗体により抑制された。また、エナメル上皮腫細胞の運動能や浸潤能は **IL-1alpha** によって有意に亢進し、**IL-1 Ra** および抗 **IL-1alpha** 抗体によって抑制された。次に、腫瘍間質に存在すると考えられるマクロファージへの影響を調べた結果、その遊走能はエナメル上皮腫細胞由来の **IL-1alpha** により促進され、その反応は **IL-1 Ra** および抗 **IL-1alpha** 抗体によって抑制された。さらに、エナメル上皮腫細胞株と線維芽細胞株を使用した独自の三次元培養法を用いて腫瘍の浸潤動態を評価したところ、エナメル上皮腫細胞株は線維芽細胞の存在により浸潤形態変化や浸潤能の促進が引き起こされた。特に腫瘍細胞の集団は線維芽細胞の集団に引き寄せられ浸潤する傾向を示し、その影響は **IL-1Ra**、抗 **IL-1alpha** 抗体により有意に抑制された(図参照)。これにより本腫瘍の示す局所浸潤には腫瘍細胞から分泌される **IL-1alpha**、あるいは **IL-1alpha** 刺激により間質細胞から分泌される因子が関与している可能性が示唆された。以上の結果をまとめた上で英文雑誌に投稿し、採択を受けることができた。



三次元培養実験 (DL-CGH法) による腫瘍浸潤の評価

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 2件）

1. 著者名 Chairani Elissa, Fuchigami Takao, Koyama Hirofumi, Ono Yusuke, Iijima Mikio, Kishida Michiko, Kibe Toshiro, Nakamura Norifumi, Kishida Shosei	4. 巻 30
2. 論文標題 Intercellular signaling between ameloblastoma and osteoblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101233 ~ 101233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2022.101233	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 -

1. 著者名 Takao Fuchigami, Yusuke Ono, Shosei Kishida, Norifumi Nakamura	4. 巻 57
2. 論文標題 Molecular biological findings of ameloblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 27-32
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2020.12.003	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 -

1. 著者名 Yusuke Ono, Takao Fuchigami, Michiko Kishida, Hirofumi Koyama, Mikio Iijima, Kazuki Oishi, Toshiro Kibe, Kiyohide Ishihata, Yoshiaki Nishizawa, Tohru Kiyono, Norifumi Nakamura, Shosei Kishida	4. 巻 21
2. 論文標題 Interleukin-1 promotes matrix metalloproteinase-9 expression, cellular motility, and local invasiveness of ameloblastoma cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 112-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/osi2.1193	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	鈴木 甫 (Suzuki Hajime) (10623340)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
研究分担者	吉村 卓也 (Yoshimura Takuya) (30726758)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	
研究分担者	岸田 想子 (Kishida Michiko) (40274089)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	
研究分担者	岸田 昭世 (Kishida Shosei) (50274064)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授 (17701)	
研究分担者	岐部 俊郎 (Kibe Toshiro) (50635480)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教 (17701)	
研究分担者	中村 典史 (Nakamura Norifumi) (60217875)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	

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