

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18490

研究課題名（和文）エピゲノム異常がもたらすエナメル上皮癌発生機序の解明

研究課題名（英文）Analysis of ameloblastic carcinoma with focus on epigenomic alterations

研究代表者

吉本 尚平（Yoshimoto, Shohei）

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：70780188

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）：エナメル上皮癌は顎骨内に発生する歯原性の悪性腫瘍である。良性歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫からの再発・悪性転化が報告されているが、発症機序には不明な点が多い。顎骨切除手術が適用されるが、広範囲の切除が必要であり、かつ予後不良であるため、治療標的の検討及び悪性化の予防法・早期診断法の確立が求められている。

本研究ではエナメル上皮腫・エナメル上皮癌の病理組織標本を用いてDNAメチル化調節因子であるIDH1遺伝子の発現解析を行った。さらに、空間トランスクリプトーム解析を施行し、関連遺伝子の網羅的な発現検討を行った。加えて、エナメル上皮腫細胞株AM-1を用いて三次元培養実験系の確立を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮癌は歯原性悪性腫瘍の中で最も多いとされているものの、希少癌にあたるため、不明な点が多く、癌微小環境とエピゲノム異常に着目した研究は行われていない。現在発表されている論文は、症例報告がほとんどであり、発症機序や治療標的に関する研究はほとんど進んでいない。

従って、本研究はエナメル上皮癌の発症機序解明および早期診断法、治療法の開発に繋がる可能性のある先駆的な位置づけにあると考える。本研究成果はエナメル上皮癌の診断法および治療法の開発に繋がる可能性を秘めているため、学術的にも社会的にも意義深いと考える。

研究成果の概要（英文）：Ameloblastic carcinoma (AC) is a primary odontogenic carcinoma that histologically resembles Ameloblastoma (AM). Most AC arise de novo, but there may be a pre-existing AM. Clinical behavior of AC is more aggressive and invasive than that of AM. AC sometimes shows recurrence and metastasis and has a poor prognosis. However, the mechanisms of AC oncogenesis remain unclear. Thus, the discovery of useful biomarkers for AC has been strongly required not only for making a definite pathological diagnosis but also for developing a new clinical therapy for the prevention of AC. In this study, we analyzed the expression of the IDH1 gene, a regulator of DNA methylation, in AM and AC specimens. In addition, spatial transcriptome analysis was performed to comprehensively investigate the expression of related genes. In addition, we performed three-dimensional culture using AM cell line AM-1 to establish a cell experimental system that more closely resembles a living organism.

研究分野：口腔病理学

キーワード：エナメル上皮腫癌 エナメル上皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫 (ameloblastoma:AB)は本邦における歯原性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患である。良性腫瘍であるが、顎骨内において侵襲性の高い増殖を示す。治療にあたり顎骨切除等の外科手術が選択されるものの、術後の局所再発が起こりやすく、さらにはエナメル上皮癌(ameloblastic carcinoma:AC)へと悪性化したの再発も多数報告されている。

ACは悪性の歯原性腫瘍であり、顎骨の破壊吸収を伴いながら周囲組織へと急速に浸潤する。悪性度は高く5年生存率が72%、遠隔転移を伴った症例では21%と極めて予後不良な疾患である<sup>(1)</sup>。ACは主に顎骨から *de novo* に、あるいは、先行するABから二次的に発生するとされているが、ACの詳細な発生機序は不明であり、治療標的の検討もほとんど行われていない。

一般に、発がん及びがんの進展には、周囲組織を含めた微小環境が影響している<sup>(2,3)</sup>。がん微小環境で誘導される炎症や低酸素状態が、がん細胞の増殖・浸潤を促進するとされ<sup>(4,5)</sup>、そこにはDNAメチル化異常等、エピゲノム異常の関与が示唆されている。また、がん細胞の浸潤やその治療抵抗性において、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition:EMT)が重要な役割を果たし、微小環境中の炎症性サイトカインがEMTを誘導するとされている<sup>(6)</sup>。

口腔領域の悪性腫瘍、特に顎骨に発生する歯原性悪性腫瘍は、外科手術にあたり広範囲に顎骨の切除を行う必要がある。そのため、術後の機能回復は困難を極め、摂食・構音・審美的な観点から患者のQOLも著しく低下する。加えて、転移能の高い症例では予後不良であることから、ACの発生・増殖・浸潤機構等の病態を解明し、早期診断および再発・悪性化を起こさせない治療法へ結びつけることが急務である。

以上の背景より、エナメル上皮癌の発症に炎症や低酸素によるエピゲノム異常と、その表現型としてEMTが関与しているとの仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

本研究では病理組織標本を用いたエピゲノム変異解析およびエナメル上皮腫細胞株・組織からの癌化モデル構築と解析によって、AC発症機構の解明を目的とした。さらには治療標的の検討に繋げていくことを目的とした。

エナメル上皮癌は歯原性悪性腫瘍の中で最も多いとされているものの、希少癌にあたるため、不明な点が多く、癌微小環境とエピゲノム異常に着目した研究は行われていない。また、ACの実験系確立の報告は *in vitro*・*in vivo*ともない。実験系の構築およびその解析は独自性の高い研究であり、発癌機序解明および治療標的、薬剤治療の検討に必須と考える。

以上より、本研究はエナメル上皮癌の診断法および治療法の開発に繋がる可能性を秘めているため、創造性に富み、学術的にも社会的にも意義深いと考える。

### 3. 研究の方法

#### ① エナメル上皮腫(AB)、エナメル上皮癌(AC)の病理組織を用いたDNAメチル化関連分子の発現解析

ABの再発症例および、ABから二次的にACが発生した症例を対象として、パラフィン標本より、DNAメチル化に関わる分子の発現を解析する。病理組織(ホルマリン固定パラフィン標本)の組織構築を保ったまま、網羅的な遺伝子発現を解析できる空間トランスクリプトーム解析手法であるVisiumシステム(10xGenomics社)を一部の解析に用いた。

#### ② エナメル上皮腫細胞株(AM-1)を用いた三次元培養法の検討

エナメル上皮腫細胞株AM-1を用いてスフェロイド形成による三次元培養を行い、より生体に近い細胞実験系の確立を行う。

### 4. 研究成果

#### ① エナメル上皮腫(AB)、エナメル上皮癌(AC)の病理組織を用いたDNAメチル化関連分子の発現解析

【1 研究目的、研究方法など(つづき)】

福岡歯科大学医科歯科総合病院口腔外科にて 2011 年 4 月から 2020 年 3 月までの間に AB・AC の摘出手術を行った症例とし、AB: 40 件、AC: 6 件を抽出、パラフィンブロック検体および凍結試料より切片を作成し実験に用いた。組織標本を用いて DNA マイクロアレイ解析を行った結果、DNA メチル化調節因子であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH1) の有意な発現上昇を認めた(図 1)。この結果より、免疫染色にて AB、AC において IDH1 のタンパク発現を検討したところ、AC において、発現の増加を認めた。また、in situ ハイブリダイゼーション解析においても、同様の傾向が示された。

加えて、Visium を用いた空間トランスクリプトーム解析において DNA メチル化異常に関わる分子を検索した(図 2)。他の疾患において分子標的医薬品の対象となっている DNMT1、DNMT3A、DNMT3B、EZH2、TET2、HDAC の発現に変化がみられるかを検討した。しかしながら今回の解析においては、それら分子の AB、AC における顕著な変化は見られなかった。今後、解析対象症例数の増加を含め、追加の検討を行ってきたい。

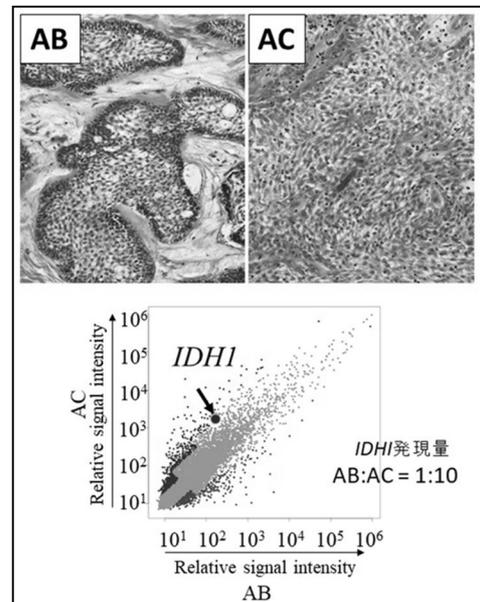


図 1. AB, AC における IDH1 の発現

② エナメル上皮腫細胞株 (AM-1) を用いた三次元培養法の検討

エナメル上皮腫細胞株 AM-1 を用いてスフェロイド形成による三次元培養を行い、より生体に近い細胞実験系の確立を行った。腫瘍間質を模した材料とともにスフェロイド培養を行うことで、エナメル上皮腫病理組織に類似した細胞塊を形成することができた(図 3)。さらに腫瘍間質である歯周組織線維芽細胞株との共培養系の確立を行った。加えて、スフェロイド等の組織学的解析を安定的かつ簡便に進めるための新技法を開発した。

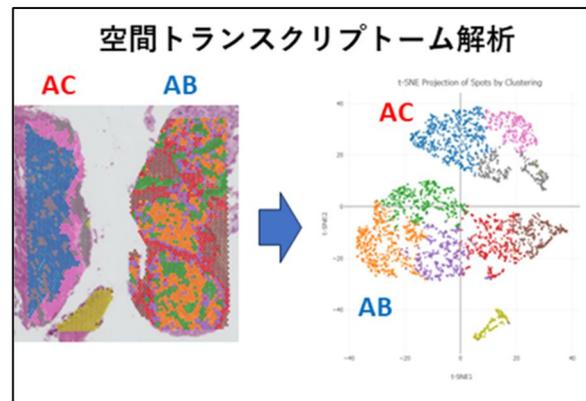


図 2. AB, AC での空間トランスクリプトーム解析

病理組織解析において日常的に用いられるホルマリン固定パラフィン包埋標本の作製法をスフェロイド等の微小構造体に適用するために、1.5ml のチューブ内で全工程を完了する手法である。

本手法により、スフェロイド体のタンパク・遺伝子発現解析を安定して行うことが出来た。

エナメル上皮腫細胞株のスフェロイドをラット下顎骨内に移植しモデル構築を図ったが、安定した結果は得られなかった。

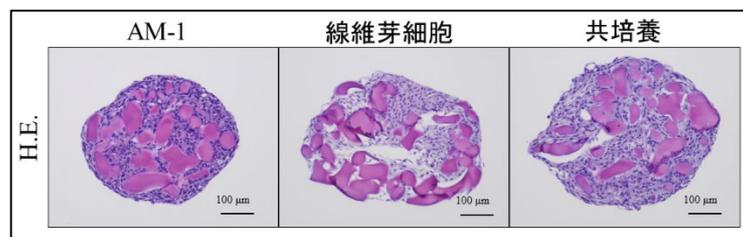


図 3. エナメル上皮腫細胞株 (AM-1) を用いた三次元培養

本研究において、エナメル上皮腫からエナメル上皮癌に至る過程でのエピゲノム異常の関与を検討した。得られた知見のさらなる解析を進めていきたい。

引用文献:(1) Yoon HJ,Hong SP, Lee JI 他:Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2009 (2) Zhou J, Schmid T, Schnitzer S 他: Cancer Lett, 2006 (3) Birsoy K, Possemato R, Lorbeer FK 他: Nature, 2014 (3) Zhou J., et al., Cancer Lett. 2006 (4) Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA 他: Nat Rev Cancer, 2013 (5) Oshima H, Nakayama M, Han TS 他: Cancer Res, 2015.(6) Thiery JP, Acloque H, Huang RY 他:Cell, 2009

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 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻 103
2. 論文標題 IL-6 Plays a Critical Role in Stromal Fibroblast RANKL Induction and Consequent Osteoclastogenesis in Ameloblastoma Progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2022.100023	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 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻 102
2. 論文標題 TAT1-induced tubulin acetylation promotes ameloblastoma migration and invasion	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 80 ~ 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00671-w	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 Yoshimoto Shohei, Morita Hiromitsu, Matsuda Miho, Katakura Yoshinori, Hirata Masato, Hashimoto Shuichi	4. 巻 101
2. 論文標題 NFAT5 promotes oral squamous cell carcinoma progression in a hyperosmotic environment	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 38 ~ 50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-00486-1	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 Anzai Hiromasa, Yoshimoto Shohei, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻
2. 論文標題 IDO1 mediated Trp kynurenine AhR signal activation induces stemness and tumor dormancy in oral squamous cell carcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Science International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/osi2.1109	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 Yoshimoto Shohei, Yoshizumi Junko, Anzai Hiromasa, Morishita Koichiro, Okamura Kazuhiko, Hiraki Akimitsu, Hashimoto Shuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of Alk signaling promotes the induction of human salivary-gland-derived organoids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Disease Models & Mechanisms	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/dmm.045054	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 Yoshimoto Shohei, Taguchi Masahide, Sumi Satoko, Oka Kyoko, Okamura Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Establishment of a novel protocol for formalin-fixed paraffin-embedded organoids and spheroids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/bio.059882	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 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 吉本尚平
2. 発表標題 口腔腫瘍における腫瘍微小環境がその進展に与える影響の解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉本尚平
2. 発表標題 Hypoxia induced HIF 1 and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF dependent EMT
3. 学会等名 第32回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉本尚平、田中文恵、森田浩光、平木昭光、橋本修一
2. 発表標題 HIF-1 and ZEB1 are critical for the malignant transformation of ameloblastoma via TGF- $\alpha$ dependent EMT
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shohei Yoshimoto
2. 発表標題 Three-dimensional (3D) Experimental Models in Oral Pathology
3. 学会等名 The 21st International Congress of Oral Pathology and Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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