

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 27日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592523

研究課題名（和文） 顎骨嚢胞内溶液の破骨細胞活性化作用に関する分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Study of molecular mechanisms of osteoclast-activation by jaw cyst fluids.

研究代表者

飯田 征二 (IIDA SEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40283791

研究成果の概要（和文）：顎骨に発生する嚢胞や良性腫瘍は骨を吸収しつつ顎骨内で増大する。その過程で、いかにして骨を吸収する破骨細胞形成が活性化されるのかについて研究を行った。その結果、病変が産生するサイトカインが周囲の細胞で破骨細胞活性化因子発現を促進することが明らかとなった。この機序により、病変周囲の骨が吸収され、病変の増大の一つの機序になることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Jaw cyst and jaw benign tumor grow within a jawbone, resorbing surrounding jawbone. We studied how the osteoclast formation was activated which absorbs a bone how being activated in the process. As a result, it became clear that the cytokine, expressed by those lesions, induced promotes the osteoclast activating factor of the stromal fibroblasts. This pathway was suggested to be one of the mechanisms of the jawbone resorption and lesion-growth into the bone.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯科・外科系歯学

キーワード：顎骨嚢胞・顎骨腫瘍・破骨細胞・RANKL・TGF- $\beta$

1. 研究開始当初の背景

最近の骨代謝研究から、炎症性・腫瘍性を問わず全ての骨吸収性疾患に破骨細胞の活性化を誘導する因子、Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)の関与が示されている(Kong YY., et al. Nature 1999;402:304-9)。しかしながら、顎骨嚢胞や顎骨腫瘍の増大と周囲顎骨の吸収のメカニズムは、古くから提唱されている嚢胞裏層上皮細胞の増殖と嚢胞

内容液による圧迫性骨吸収が受け入れられてきている。一方で、歯牙発達や萌出に関わる発生物学の研究結果からは、歯原性上皮細胞が産生するParathyroid hormone related peptid (PTHrP)などのサイトカインが歯胚周囲に存在する骨芽細胞のRANKL発現を促進し、破骨細胞を活性化することにより、形成過程の骨組織から歯胚の保護し、萌出方向の骨を吸収するメカニズムも報告されている

(Philbrick WM., et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998; 95:11846-51, Kitahara Y. et al., Bone 2002;30:48-56). これらの背景から、研究者らは「歯原性上皮細胞あるいは病変がその周囲でのRANKL発現を促進する因子(サイトカイン)を産生し、嚢胞や腫瘍性疾患に伴う骨吸収を促進する」作業仮説を得るにいたった。

本研究では、まず嚢胞上皮細胞の産生するサイトカインが破骨細胞形成を促進して顎骨吸収に関与することを明らかにし、さらに、炎症性サイトカインなどのその他の液性因子の破骨細胞形成・顎骨吸収への関与をも検討し、歯原性嚢胞や歯原性腫瘍による骨吸収の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、いままで明らかになっていない「顎骨嚢胞あるいは顎骨腫瘍などの病変による周囲顎骨吸収の分子メカニズムを明らかにし、病変増大や顎骨破壊の知見を深める」ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 顎骨嚢胞・顎骨腫瘍と骨境界での破骨細胞活性化の検討

同意の得られた患者により摘出された骨病変移行部を EDTA 脱灰しパラフィン切片を作成した。切片での TRAP 活性染色を行い、病変骨境界での破骨細胞の活性化を検討した。

### (2) 細胞培養及び内容液の分離

大阪大学歯学部附属病院 口腔外科 1 (制御系) で外科的手術を行う患者に対し検体・試料の研究使用への供託について説明し、同意の得られた患者の歯原性腫瘍・嚢胞より腫瘍・嚢胞組織片を採取した。また内容液を同

時に穿刺吸引した。間質線維芽細胞は explant 法により分離、培養した。

内容液は最終濃度 0.5 M HCl となるように、内容液に 12 M HCl を加えて、4°C で 30 分間酸処理した。その後中和して実験に用いた。

### (3) 全 RNA の抽出及び Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

間質線維芽細胞を 6 穴培養プレートに播種し飽和状態まで増殖させ、試料を含む培養液で培養し全 RNA を抽出した。

一部の実験では、抗 TGF- $\beta$ 1,2,3 マウスモノクローナル中和抗体で内容液を室温で 1 時間反応させ、あるいは TGF- $\beta$  受容体阻害剤、IL-1 受容体拮抗剤、あるいは COX-2 阻害剤で間質線維芽細胞を前処理し、その後、培養液を交換せずに試料または試薬存在下で間質線維芽細胞を培養し、全 RNA を抽出し RT-PCR を行った。

### (4) 全細胞タンパク質の抽出及びウエスタンブロットティング

間質線維芽細胞を 60 mm 細胞培養皿に播種し飽和状態まで増殖させ、0.3% BSA を含む無血清培養液に交換し 16 時間培養した。その後、試料を含む 0.3% BSA を含む無血清培養液で培養し、細胞溶解液を回収し、ウエスタンブロット解析を行った。

### (5) 免疫組織化学染色法

歯原性腫瘍および嚢胞組織のパラフィン切片を作製し、免疫組織化学染色に用いた。1 次抗体として、抗 TGF- $\beta$ 1,2,3 マウスモノクローナル中和抗体 (R & D Systems) (希釈 1 : 10)、抗ヒト RANKL マウスモノクローナル抗体 (Sigma-Aldrich) (希釈 1 : 50)、ウサギ抗リン酸化特異性 Smad3 抗体 (Rockland) (希釈 1 : 500)、ヤギ抗ヒト COX-2 抗体 (Cayman Chemical Co.) (希釈 1 : 500) を用いた。

(6) TGF- $\beta$ , IL-1 $\alpha$ , PTHrP 濃度の測定

歯原性腫瘍・嚢胞内容液中の TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\alpha$  濃度を ELISA キットを用いて定量した

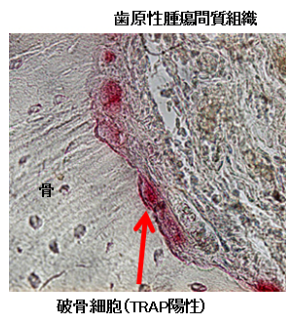
(7) prostaglandin E2 (PGE2)濃度の測定

24 穴培養プレートに飽和状態に増殖した間質線維芽細胞を試料を含む無血清  $\alpha$ -MEM 培養液で 6 時間培養し、その培養上清中の PGE2 濃度 ELISA キットを用いて定量した。

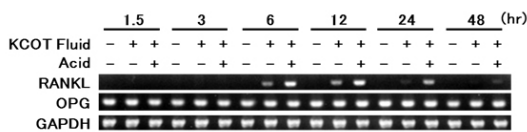
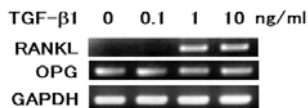
#### 4. 研究成果

(1) 角化嚢胞性

歯原性腫瘍 (KCOT)、濾胞性歯嚢胞、エナメル上皮腫、などの代表的な顎骨腫瘍、嚢胞病変の間質線維芽細胞と顎骨境界では破骨細胞が活性化されていた。



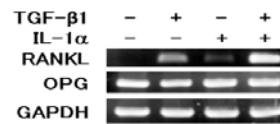
(2) KCOT、エナメル上皮腫、濾胞性歯嚢胞の内容液は、それぞれの病変から分離した間質線維芽細胞での破骨細胞活性化因子 RANKL



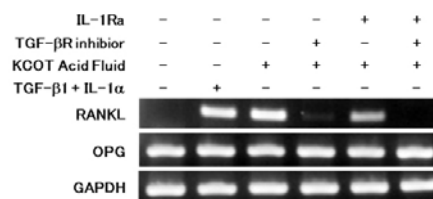
発現を促進し、破骨細胞抑制因子 OPG 発現には影響しなかった。この作用は内容液の酸処理で増強された。(図)

そこで、一般的に酸処理で作用増強されるサイトカインの代表である TGF- $\beta$  の存在が示唆された。TGF- $\beta$  は間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導、促進し、(右上図) 臨床資料の KCOT 内容液による RANKL 発現の誘導は抗 TGF- $\beta$  中和抗体あるいは TGF- $\beta$  受容体阻害剤で抑制さ

れた。



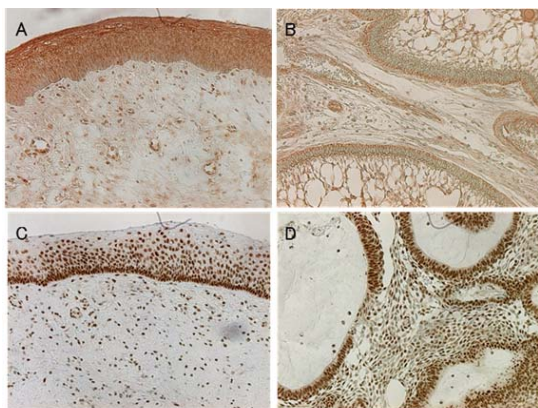
(3) 顎骨腫瘍・嚢胞の内容液中に含まれるサイトカインを定量したところ、病変中には、この TGF- $\beta$ をはじめ、IL-1 $\alpha$ , PTHrP が大量に含有されていた。このうち、先に示したごとく、TGF- $\beta$  は間質線維芽細胞の RANKL 発現を促進し、IL-1 $\alpha$  もまた RANKL 発現を促進し、TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の RANKL 誘導効果は相乗的であった (図)。しかし、PTHrP は骨芽細胞の RANKL 発現を促進したが、間質線維芽細胞の RANKL 発現には影響しなかった。そこで、顎骨病変が産生し、間質での破骨細胞活性化因子発現を誘導するサイトカインは TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  と考え、そのメカニズムを検討した。実際、KCOT 内容液で誘導される RANKL 発現は TGF- $\beta$  受容体阻害剤と IL-1 受容体拮抗剤の共処理で完全に抑制された (図) つまり、顎骨腫瘍・嚢胞内容液中の TGF- $\beta$  と IL-1 が間質線維芽細胞の RANKL 発現を相乗的に誘導することが明らかとなった。



(4) エナメル上皮腫と KCOT では TGF- $\beta$  は歯原性上皮細胞に発現し、そのシグナルを受けて歯原性上皮細胞と間質線維芽細胞にリン酸化 SMAD3 の核内移行が確認された (下図)。すなわち、歯原性上皮細胞で産生された TGF- $\beta$  が間質線維芽細胞にも作用していることが明らかとなった。図の A, B は TGF- $\beta$  免疫染色を、C, D はリン酸化 Smad2 の免疫染色

を示し、A, CはKCOT組織、B, Dはエナメル上皮腫組織での結果を示す。

(5) TGF- $\beta$  および IL-1 による間質線維芽細胞での RANKL 発現誘導の分子機序を COX2 タンパク、プロスタグランジン E2 (PGE2) 経路を検討した。その結果、TGF- $\beta$  は間質線維芽



細胞の COX2 タンパクを上昇させなかったが、IL-1 $\alpha$  は上昇させた。興味深いことに、TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  を同時に作用させると COX2 タンパクは相乗的に上昇した。この COX2 レベルに一致して、培養液中の PGE2 濃度は TGF- $\beta$  処理で変化せず、IL-1 $\alpha$  で 6 倍に上昇、そして TGF- $\beta$  と IL-1 $\alpha$  の同時処理で 40 倍に上昇し、相乗効果が観察された。そして、臨床材料の KCOT 内容液による RANKL 発現誘導は COX2 阻害薬で部分的に抑制された

つまり、TGF- $\beta$  は単独で COX2, PGE2 を介さない経路で間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し、さらに、IL-1 $\alpha$  による COX2, PGE2 を介する経路による RANKL 発現を相乗的に上昇させる効果があることが明らかとなった。

現在までに、骨芽細胞による破骨細胞促進因子 RANKL 発現調整の研究が多くなされているが、それらの結果は TGF- $\beta$  は骨芽細胞の RANKL 発現を抑制させる結果を示すものばかりである。その一方で、歯の萌出などにかかわる歯原性線維芽細胞などでは TGF- $\beta$  がその

RANKL 発現を促進する可能性も示唆されている。今回の研究結果から、歯原性組織を由来とする顎骨嚢胞や腫瘍が産生する TGF- $\beta$  がその間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し破骨細胞形成を促進する機序が明らかとなった。そのことは病変の骨内での骨破壊、骨吸収に関与し、その結果、病変増大につながるものと考えられる。

この結果は、内外問わず新しい知見であり、病態の解明や骨破壊を抑える治療戦略につながるのみならず、歯の発達や萌出にも保存された細胞・組織特異的な分子機序である可能性もある。その面での研究の発展を期待している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

1) 相川友直, 山田智明, 天野克比古, 木全正彰, 難波範行, 飯田征二, 古郷幹彦: 顎骨腫瘍・嚢胞が産生する TGF- $\beta$  および IL-1 $\alpha$  は間葉系線維芽細胞の RANKL 発現を誘導する. 第 29 回日本骨代謝学会学術大会・総会 2011/7/28 大阪府

2) 山田智明, 相川友直, 辻本育子, 天野克比古, 木全正彰, 飯田征二, 古郷幹彦: 歯原性腫瘍・嚢胞が産生する TGF- $\beta$  および IL-1 $\alpha$  は間質線維芽細胞の破骨細胞促進因子発現を促進する. 第 65 回日本口腔科学会学術集会 2011/4/22 東京都江戸川区

3) Aikawa T, Yamada C, Tsujimoto I, Amano K, Namba N, Iida S, Kogo M: TGF- $\beta$  and IL-1 $\alpha$  in Jaw Tumor Fluids Participate in Bone Resorption Through the Stimulation of

Osteoclastogenesis. 示説 ASBMR (American Society for Bone and Mineral Research) 2010 Annual Meeting 2010/10/17 Toronto, Ontario, Canada

4) 山田 智明、相川 友直、辻本 育子、天野 克比古、飯田 征二、古郷 幹彦:顎骨腫瘍内に含まれる TGF- $\beta$  の破骨細胞形成への影響. 一般口演 第 55 回 日本口腔外科学会総会・学術大会 2010/10/17 幕張メッセ 千葉

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

飯田 征二 (IIDA SEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 40283791

### (2) 研究分担者

相川 友直 (AIKAWA TOMONAO)

大阪大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号 : 00362674

山近 英樹 (YAMACHIKA EIKI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号 : 10294422

(H22 年度～H23 年度)

高尾 香名 (TAKAO KANA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 00448151

(H22 年度～H23 年度)

増田 智丈 (MASUDA TOMOTAKE)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

(H21 年度のみ)

## (3) 連携研究者