

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 1日現在

機関番号：17102
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21792012
 研究課題名（和文）
 エナメル上皮腫細胞株を用いた浸潤機構の解明—3次元浸潤増殖モデルによる解析—
 研究課題名（英文）
 Elucidation of invasion mechanism using ameloblastoma cell line
 研究代表者
 中尾 祐（NAKAO YU）
 九州大学大学院歯学研究院・助教
 研究者番号：70457430

研究成果の概要（和文）：

エナメル上皮腫切除材料とエナメル上皮腫細胞株 AM-1 において、Shh signaling 群が認められ Shh signaling pathway の活性化が示唆された。また、Shh signaling 経路の阻害剤である cyclopamine を添加することにより細胞増殖が抑制されたことから、Shh signaling 分子が細胞増殖に関与していることが示唆され、今後の研究発展により、この signal を阻害することにより、エナメル上皮腫の治療戦略となりうる。

浸潤に関与する、MMP および TIMP の発現や、サイトメガロウイルスプロモーターに Green Fluorescence Protein (GFP) タンパクの cDNA をつないだプラスミドを AM-1 に遺伝子導入し、安定して蛍光を発する細胞株を用いた、3次元浸潤モデルについては現在取り組み中である。

研究成果の概要（英文）：

shh signaling was expressed in ameloblastoma tissues and AM-1 cells. AM-1 cells showed decreased cell proliferation by using cyclopamine, which was inhibitor of shh signaling. In the future, inhibition of shh signaling in ameloblastoma will become treatment strategy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

研究費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：エナメル上皮腫、浸潤機構、FGF、Shh

1.研究開始当初の背景

エナメル上皮腫の浸潤発育機構に関する研究は、国内外ともその実験系が確立されておらず、また免疫組織学的研究においては、悪性腫瘍の浸潤メカニズムと同様の観点からの探索を試みたものがほとんどである。その意味で、本研究のごとく、歯の発生過程における、発生期における歯原性上皮細胞の発育誘導因子に着目して、エナメル上皮腫の浸潤発育機構を解明する研究は極めて独創的と言える。さらに、本研究での注目すべき点は、世界で初めて樹立され、実験系で唯一使用され数々の論文でも発表されているエナメル上皮腫由来細胞株（AM-1）を用いることであり、われわれ以外の施設で本腫瘍の浸潤発育機構の解明は不可能であると考えられる。これによりマトリジェル（仮想結合組織）内での細胞浸潤発育モデルの確立および浸潤機の解明が可能となる。さらに、浸潤抑制実験やアポトーシス誘導による増殖抑制実験など新たな研究へと展望が広がる。その結果、現在まで不明であったエナメル上皮腫の細胞生物学的特性が明らかとなり、その他種々の歯原性腫瘍の細胞生物学的特性の解明にも新たな展開をもたらすことが期待でき、より患者のQOLを考慮した保存的治療、さらには遺伝子治療の発展へと期待ができる。

2.研究の目的

エナメル上皮腫細胞の浸潤増殖を引き起こす発育誘導因子を解明し、細胞浸潤発育モデルの確立さらには、浸潤発育抑制について基礎的研究を行うことである。すなわち、歯の発生初期に発現し歯原性上皮の細胞増殖に関与する線維芽細胞増殖因子（FGF）、発芽の形態形成に関与する因子 sonic hedgehog (Shh)および細胞周囲の結合織分解に関与する因子マトリックスメタプロテアーゼ（MMP）の発現について、当科で収集し得た切除材料(140例)を用い解析を行う。さらに、われわれが樹立した世界で唯一のエナメル上皮腫由来細胞株である AM-1 を用い、それらの因子が腫瘍細胞へ与える影響と因子間で作用する機能について解析を行う。さらにマトリジェル（仮想結合組織）を使用した細胞浸潤発育モデルの確立を行い、エナメル上皮腫細胞浸潤発育機構を解明する。

3.研究の方法

①エナメル上皮腫浸潤にかかわるタンパク発現と機能解析

(1) エナメル上皮腫における Shh の発現の検索

エナメル上皮腫切除材料とエナメル上皮腫細胞株 AM-1 において、Shh とその特異的レセプターである patched の発現を RT-PCR 法を

用い検索を行い、免疫組織学的手法によりそれらの局在の解析を行う。

(2) エナメル上皮腫における MMP の発現の検索

エナメル上皮腫細胞株である AM-1 が、コラーゲンを分解しながらマトリジェル中を増殖することを既に確認しているため、コラーゲン分解因子である MMP について、その発現を次の方法で検出する。AM-1 について、1) ザイモグラムによるゼラチナーゼ/タイプⅡコラーゲナーゼ活性の検索を行い、2) RT-PCR 法にて MMP-1、2、3、7、9、10、12 遺伝子およびその抑制遺伝子である TIMP-1、2、3 遺伝子の発現についての検索を行う。さらに、以上で得られた結果をもとに、3) 腫瘍先端部での局在を免疫組織学的手法を用い解析を行う。

(3) FGF7 および FGF10 が Shh および MMP の発現に及ぼす影響についての検索

先に述べたように FGF は、歯の発生において細胞の増殖のみならずシグナル伝達物質としての機能を持っていることが判明している。そこで、AM-1 細胞に FGF7 および FGF10 を添加し Shh、先の研究で発現が認められた MMP および TIMP の発現に及ぼす影響について RT-PCR 法、ノーザンブロット法およびウエスタンブロット法にて検索し、さらに細胞運動に関与する Rho タンパクの発現に及ぼす影響についてもウエスタンブロット法を用い解析を行う。

② 3次元浸潤増殖モデルの構築

われわれは、既にマトリジェルを用いたエナメル上皮腫の2次元浸潤増殖モデルを完成させている。そこで、本研究ではそれをさらに3次元浸潤増殖モデルへと発展させる。サイトメガロウイルスプロモーターに Green Fluorescence Protein (GFP)タンパクの cDNA をつないだプラスミドを AM-1 に遺伝子導入し、安定して蛍光を発する細胞株を作成する。この細胞株を、マトリジェルを用い培養することにより、3次元浸潤増殖像を立体顕微鏡にてリアルタイムで観察することが可能となる。

③ 遺伝子治療に向けての解析

(1) FGF7 と FGF10 および Shh が AM-1 の浸潤増殖に与える影響についての解析

平成 21,22 年度の研究で確立する3次元浸潤増殖モデルで、FGF7 と FGF10 および Shh を添加し、AM-1 の浸潤増殖像を観察する。さらに、FGF7、FGF10、Shh および平成 21,22 年度の研究で発現が確認された MMP の中和抗体を用い、AM-1 細胞の浸潤増殖像を観察する。さらに、先に確立した細胞株にリポフェクション法により FGF7、FGF10、Shh それぞれの過剰発現プラスミドを導入した細胞株を作成し、同様に浸潤増殖像の観察を行う。

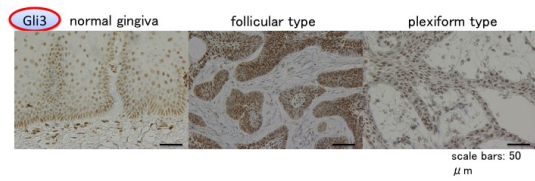
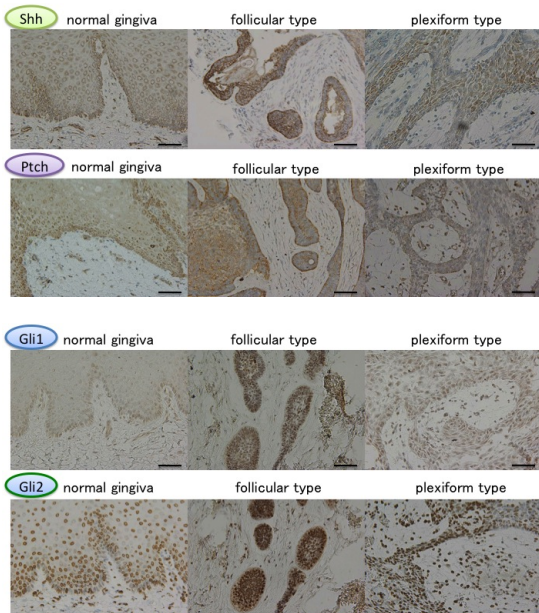
(2) アデノウイルスベクターを用いた遺伝子治療にむけての解析

平成 21,22 年度の研究で発現が確認された MMP を特異的に抑制する TIMP をアデノウイルスの発現ベクターに組み込んで、マトリジェル中の AM-1 に感染させる。TIMP の持続的発現により、AM-1 の浸潤増殖を抑制できるかを 3 次元腫瘍浸潤増殖モデルで解析を行う。

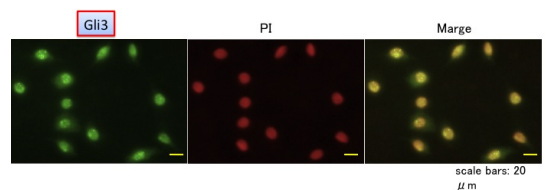
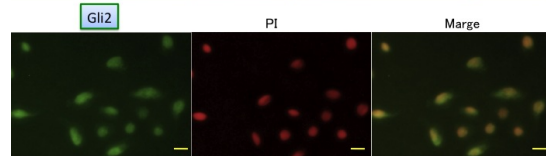
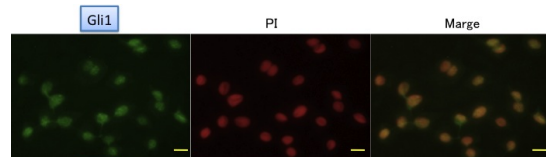
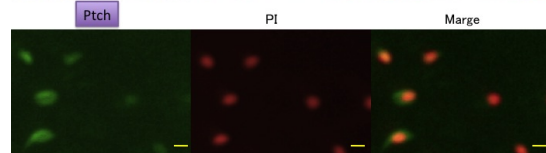
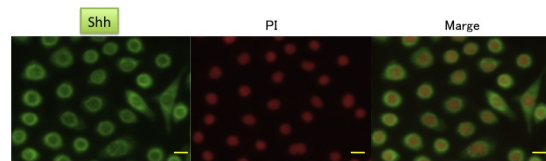
(3) ヌードマウスを用いた *in vivo* における解析

AM-1 をヌードマウスの顎骨骨髓内に注射器にてインジェクションし *in vivo* 腫瘍モデルを作成する。インジェクション周囲の腫瘍組織に、MMP を特異的に抑制する TIMP をアデノウイルスの発現ベクターに組み込んで感染させ腫瘍の浸潤増殖能について解析を行う。

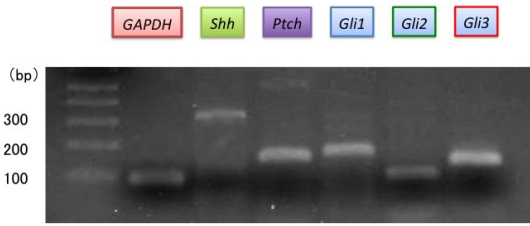
4. 研究成果



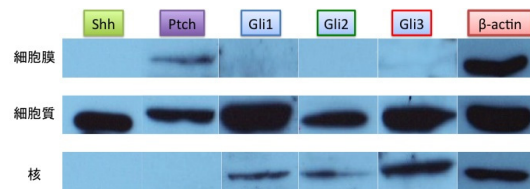
1) 免疫組織学的染色にて、120 例すべての症例で、shh signaling 分子である、Shh、patched、Gli1、Gli2、Gli3 の発現を認めた。



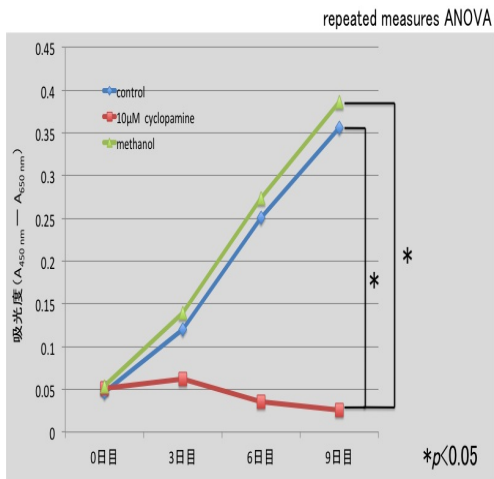
2) エナメル上皮腫細胞株 AM-1 においても shh signaling 分子である、shh、patched、Gli1、Gli2、Gli3 の発現を認めた。



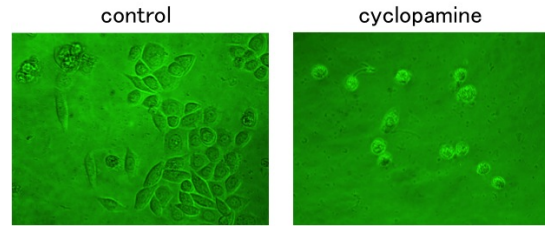
3) RT-PCR 法にて、shh signaling 分子である、shh、patched、Gli1、Gli2、Gli3 の mRNA の発現を認めた。



4) AM-1 を細胞膜、細胞質、核に分画し、western blotting 法にて、shh は細胞質に、patched は細胞膜に、Gli1、Gli2、Gli3 は細胞質および核に発現を認めた。



5) shh signaling のインヒビターであるシクロパミンを AM-1 の medium 中に添加すると、AM-1 の増殖が抑制された。



6) シクロパミン添加した AM-1 は、紡錘形から円形に細胞形態が変化していた。

結果のまとめ

エナメル上皮腫において、Shh が発現し、さらに Gli 群の核での発現も認められたことより、Shh signaling pathway の活性化が示唆された。また、Shh signaling 分子である Smo の阻害剤である cyclopamine を添加することにより細胞増殖が抑制されたことから、Shh signaling 分子が細胞増殖に関与していることが示唆され、今後の研究発展により、この signal を阻害することにより、エナメル上皮腫の治療戦略となりうる。

5. 主な発表論文等

- [雑誌論文]
- なし
- [学会発表]
- なし
- [図書]
- なし
- [産業財産権]
- なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 祐 (NAKAO YU)

九州大学大学院歯学研究・助教

研究者番号：70457430