

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890185

研究課題名（和文）MAPK 経路制御因子 Sprouty によるエナメル上皮腫増殖・分化抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of inhibition mechanism of ameloblastoma growth・differentiation by Sprouty regulating MAPK cascade.

## 研究代表者

武富 孝治 (TAKETOMI TAKAHARU)

九州大学大学院・歯学研究院・助教

研究者番号：10553290

## 研究成果の概要（和文）：

エナメル上皮腫細胞株 AM-1 に Sprouty2 を強制発現させ MAPK のリン酸化を調べたところ、FGF 刺激による MAPK のリン酸化は抑制するものの、EGF 刺激ではむしろ MAPK のリン酸化を増強した。また Akt のリン酸化や BCL-xL の発現は EGF 刺激で増強し、FGF 刺激では逆に抑制する結果を得た。このように Sprouty2 は FGF 刺激により細胞増殖を抑制する一方で EGF 刺激では抗アポトーシスに作用する。

以上より、エナメル上皮由来のエナメル上皮種の増殖・分化に EGF 刺激が深く関与しており、Sprouty2 により増強されていることが示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

AM-1 cells stimulated with EGF were shown ERK activation strongly compared to FGF stimulation. Forced expression of Spry2 inhibited FGF-induced ERK activation, but accelerated EGF-induced ERK activation adversely.

On the other hand, in terms of an anti-apoptotic signaling, Akt activation and BCL-xL expression were enhanced by EGF stimulation. Spry2 induced by Ras-ERK signal cascade was negative regulator for ERK activation by FGF signaling, but accelerated it by EGF signaling in AM-1 cells. Spry2 might be associated with the growth of ameloblastoma through the promotion of EGF signaling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学 / 歯科放射線学

キーワード：MAPK, Sprouty, EGF/FGF 刺激, エナメル上皮腫

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖や分化は、多くの細胞外刺激が細胞表層にあるチロシンキナーゼ型受容体を活性化することにより制御されている。Sprouty/Spred ファミリーは、こうしたチロシンキナーゼ型受容体からの刺激により転写・誘導される負の調節因子で、今回着目した Sprouty に関しては、哺乳類で現在までに 4 種類同定されている。その機能として、これまでの多くの報告から FGF シグナルの抑制因子であることが明らかになっている。

一方、エナメル上皮腫は顎骨に発生する最も代表的な歯原性腫瘍の 1 つで、顎顔面領域に発生する良性腫瘍として知られている。エナメル上皮腫の発生はエナメル芽細胞に分化する前のエナメル上皮に由来することから、歯の発生期における歯原性上皮と歯原性間葉組織の相互誘導に基づいていると考えられており、FGF ならびに EGF が深く関与しているとの報告がある。またエナメル上皮腫の増殖・分化の過程が、MAPK 経路と PI3K-Akt 経路によって制御されていることが多くの報告でなされている。しかしながら、エナメル上皮腫の発生および増殖・分化を制御する分子についての報告はなく、現在、分子を標的とした腫瘍の制御機構は解明されていない。

## 2. 研究の目的

FGF や EGF 刺激により MAPK 経路と PI3K-Akt 経路を介した増殖・分化と深く関わっているエナメル上皮腫が、Sprouty によってその発生・発育がどのように制御されているかを調べることを目的にした。

## 3. 研究の方法

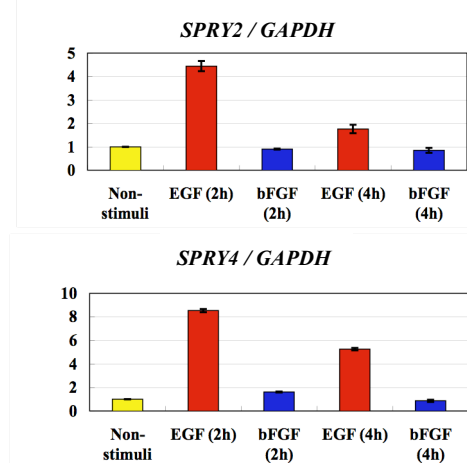
2005 年の WHO の分類により、エナメル上皮腫は 1) 充実型/多嚢胞型、2) 骨外型/周辺型、3) 類腱型、4) 単嚢胞型 に分けられているが、その中でも最も代表的な充実型/多嚢胞型の組織型を濾胞型 (follicular type) と叢状型 (plexiform type) に大別し、それぞれの組織における各種 Sprouty の発現を Real-time PCR 法や western blotting 法にて調べた。また各種 Sprouty の局在を in situ hybridization 法および免疫組織学的染色法により調べた。

また、in vitro における研究として、既に所有しているエナメル上皮腫細胞株 AM-1 における各種 Sprouty の発現を EGF、FGF 刺激下で調べ、各種 Sprouty とそのドミナントネガティブ変異体を遺伝子導入し、細胞

増殖能や抗アポトーシスの状態を分子生物学的・生化学的手法を駆使して調べた。

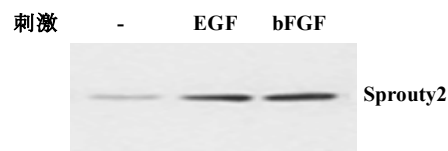
## 4. 研究成果

(1) AM-1 における Sprouty mRNA の発現  
AM-1 における Sprouty mRNA の発現を Real time RT-PCR によって調べた。



その結果、上図にあるように、EGF 刺激により MAPK 経路を介して Sprouty2, 4 がそれぞれ誘導されていることが分かった。

(2) AM-1 における Sprouty2 の発現 mRNA において、EGF 刺激で強く誘導される Sprouty2 について、そのタンパク質レベルでの発現を Western blot 法を用いて調べた。



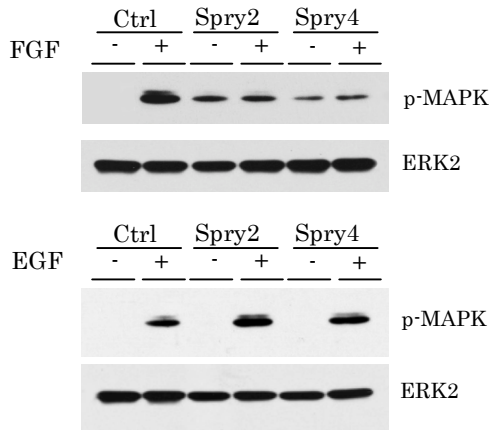
その結果、上図に示すように、タンパク質レベルでも Sprouty2 は EGF や FGF により MAPK 経路を介して誘導されていることが確認できた。

(3) Sprouty2, 4 による MAPK 活性化への影響

AM-1 における Sprouty2, 4 の MAPK の活性化への影響を調べるため、Sprouty2 および Sprouty4 のプラスミドを作成し、AM-1 に強制発現させた後、EGF と FGF で刺激して MAPK のリン酸化を Western blot 法にて調べた。

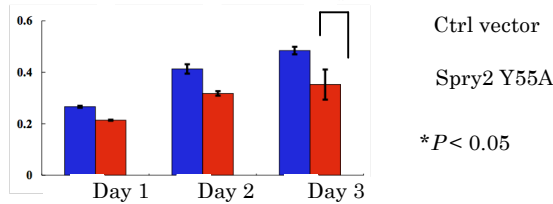
その結果、Sprouty2, 4 ともに FGF 刺激による MAPK のリン酸化を抑制するものの、その程度は Sprouty4 の方が強かった。一方、EGF 刺激による MAPK のリン酸化は Sprouty2 の強制発現により強くなり、EGF

刺激を増強することが示唆された。



(4) AM-1 の細胞増殖能に関する Sprouty の機能

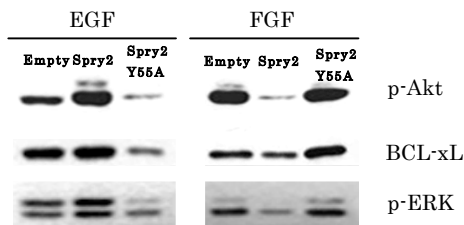
AM-1 の細胞増殖に Sprouty2 がいかに関与しているかを調べるために、Sprouty2 ドミナントネガティブ変異体 Sprouty2 Y55A を作成し、強制発現した後 MTT アッセイを行った。



その結果、EGF 刺激下において Spry2 Y55A を強制発現させた群における細胞増殖が Control 群と比較して抑制される結果となった。

(5) AM-1 における Sprouty2 の抗アポトーシス作用

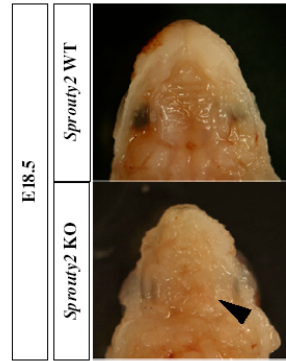
AM-1 におけるアポトーシスへの Sprouty2 の関与を調べるため、EGF および FGF で各々刺激して、Akt のリン酸化ならびに BCL-xL の発現を調べた。



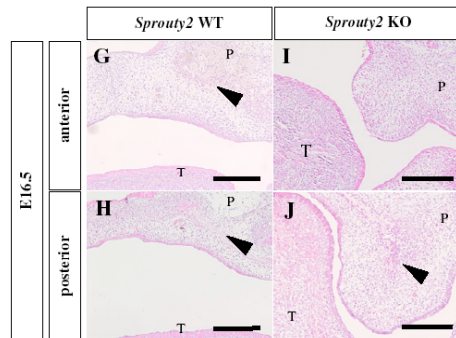
その結果、AM-1 に Sprouty2 を作用させることで、EGF 刺激により抗アポトーシスに作用し、細胞の生存を維持していることが分かった。

(6) Sprouty2 の in vivo における機能解析 ~ sprouty2 KO マウスの解析 ~

次に、in vivo における Sprouty2 の機能を解析するために、Sprouty2 KO マウスの解析を行った。その結果、sprouty2 KO マウスの表現型として、顎口腔領域において口蓋裂を呈することが分かった (下写真)。

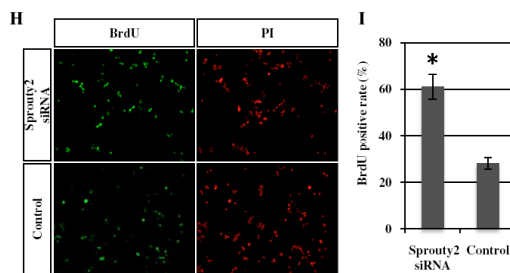


また、口蓋裂を呈した部分の組織を HE 染色にて確認したところ、胎生 16.5 日において野生型 (WT) マウスの口蓋は左右の上顎突起 (P) が癒合しているのに対し、KO マウスでは舌 (T) の下方もしくは側方に留まっており、癒合できていなかった。



(7) 上顎突起部分間葉系細胞の増殖における Sprouty2 の関与

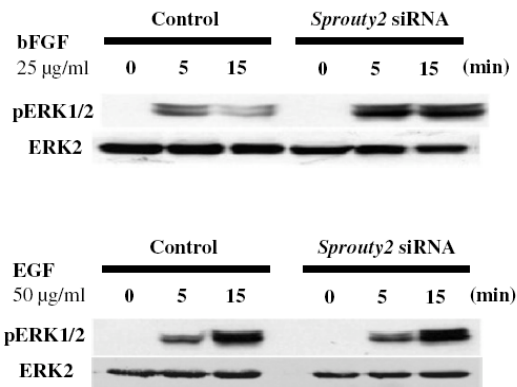
Sprouty2 KO マウス (E 16.5) で上顎突起が舌の下方に存在する理由として、間葉系細胞の増殖が考えられたため、WT の上顎突起の間葉系細胞に Sprouty2 siRNA を導入して Sprouty2 を Knock down した細胞の増殖を BrdU の取り込みを指標に解析した。



その結果、Sprouty2 を Knock down した細胞群では BrdU の取り込みが上昇し、細胞増殖能が強いことが分かった。

(8) 口蓋間葉系細胞における Sprouty2 の機能と EGF/FGF シグナル

口蓋間葉系細胞の増殖が EGF/FGF シグナルのいずれによるものかを解析するため、WT マウスから採取した口蓋間葉系細胞に Sprouty2 siRNA を導入した細胞を用いて、EGF および FGF で刺激して、MAPK (ERK1/2)



のリン酸化を調べた。

その結果、FGF 刺激による ERK のリン酸化は、Sprouty2 を Knock down した細胞で強くなり、EGF 刺激を行った細胞では Control 群と siRNA 群とでリン酸化の程度に違いは認めなかった。このことから、口蓋裂を呈するという Sprouty2 KO マウスの表現型は FGF シグナルが強くなることによるものであることが明らかになった。

以上の結果から、in vitro および in vivo において Sprouty2 は EGF シグナルは増強する一方で、FGF シグナルは抑制し、両シグナルが深く関わるエナメル上皮種の増殖・分化にも、両シグナルとくに EGF 刺激による MAPK 経路の活性化を促し、また抗アポトーシスな作用を呈していることが分かった。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

- (1) Matsumura K, Taketomi T, Yoshizaki K, Arai S, Sanui T, Yoshiga D, Yoshimura A, Nakamura S.  
Sprouty2 controls proliferation of palate mesenchymal cells via fibroblast growth factor signaling. *Biochem Biophys Res Commun.*, Volume 404, Issue 4, 28 January 2011, Pages 1076-1082, 2011. 01.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Takaharu Taketomi, Daigo yoshiga, Kaori matsumura, Takeshi Mitsuyasu, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Akihiko Yoshimura, Seiji Nakamura.  
Sprouty2 accelerates the growth of ameloblastoma with EGF stimulation. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010. 07. 15.
- (2) K. Matsumura, T. Taketomi, K. Yoshizaki, D. Yoshiga, T. Maehara, S. Arai, T. Sanui, A. Yoshimura, and S. Nakamura.  
Sprouty2 Deficient Mice Exhibit Cleft Palate. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010. 07. 16.
- (3) D. Yoshiga, T. Taketomi, D. Muratsu, T. Onimura, H. Shiraishi, T. Sanada, T. Kobayashi, and S. Nakamura.  
RNF135, a RING finger protein, negatively regulates RAS/MAPK signaling. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010. 07. 16.
- (4) T. Sanui, T. Fukuda, T. Taketomi, T. Hamachi, and K. Maeda.  
Suppression of Sprouty2 Induces Periodontal Tissue Regeneration. 88th General Session and Exhibition of the IADR, 2010. 07. 16.
- (5) Takao Fukuda, Terukazu Sanui, Takaharu Taketomi, Takafumi Hamachi, Katsumasa Maeda.  
Analysis of the molecular mechanisms of periodontal regeneration by EMD. The 5th International Symposium on Dental and Craniofacial Morphogenesis and Tissue Regeneration: A View from Stem Cell Research, 2010. 02. 05.
- (6) Kaori Matsumura, Takaharu taketomi, Masaaki Sasaguri, Takeshi Mitsuyasu, Tomomi Tsujiguchi, Shinsaku Arai, Daigo Yoshiga, Terukazu Sanui, Akihiko Yoshimura, Seiji Nakamura.  
Sprouty2 Deficient Mice Exhibit Cleft

Palate.  
The 6th Congress of International  
Cleft Palate Foundation in  
Conjunction with 14th national  
Congress of Korean Cleft Lip and  
Palate Association, 2010.06.10.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武富 孝治（ TAKETOMI TAKAHARU ）  
九州大学大学院・歯学研究院・助教  
研究者番号：10553290

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし