

平成 27 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2014
課題番号：25861961
研究課題名(和文)エナメル上皮腫におけるTTSPとHAI-1の機能解析

研究課題名(英文)Role of HAI-1 and TTSP in Ameloblastoma

研究代表者

馬場 貴 (BABA, Takashi)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：70626051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：不死化エナメル上皮腫細胞株AM-1、AM-3においてsi RNAをもちいてHAI-1の一過性ノックダウンを行うことにより細胞増殖能が低下し、細胞遊走能が亢進することが明らかになった。また、エナメル上皮腫の臨床検体を用いた免疫染色を行った結果、今回免疫染色を行った14例中12例でHAI-1は細胞膜に陽性であった。

研究成果の概要(英文)：HAI-1 expression knock-down (KD) in immortalized ameloblastoma cell lines, AM-1 and AM-3, reduced the growth of both lines in vitro. Both HAI-1 KD cell lines also exhibited significantly enhanced migratory capability.
In 85.7% (12/14) of Ameloblastoma cases, membranous HAI-1 immunoreactivity was positive in tumor cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：エナメル上皮腫

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は歯原性の良性腫瘍の一つで、歯原性腫瘍の中で発生頻度の高い腫瘍である。成長が遅いため発症に気付かず、顔面や顎骨に深刻な損傷を与えることがある。また稀ではあるが悪性形質を示し、転移をきたすこともある。エナメル上皮腫の治療は切除が原則であるが、反復処置法や摘出搔把術などの顎骨の保存的療法も行われている。しかし、単純な摘出や搔把では再発の危険性が高い。その理由としては、腫瘍細胞が簡単に浸潤し、骨組織を破壊することがあげられる。エナメル上皮腫の治療は外科的手術が基本であり、多くの検討が過去に行われてきたが、いまだ一定の見解が得られていないのが現状である。また、分子標的治療をはじめとする外科的切除以外の治療法は、まったく確立されていない。

エナメル上皮腫は顎骨内で周囲マトリックスを分解しながら浸潤していくのだが、その際に重要な役割を果たすのが蛋白分解酵素（プロテアーゼ）である。これまで腫瘍浸潤におけるプロテアーゼの研究は主にマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）と線溶系のセリンプロテアーゼ（SP）を対象になされてきた。ところが、近年になり細胞質内にN末を持つII型膜貫通蛋白構造を有するSP群（TTSP）が20種類ほど同定された。細胞膜上のプロテアーゼ活性は様々な細胞機能や細胞周囲の基質再構成において強い影響を与え得ることから、それぞれのTTSPは癌をはじめとする種々の病態において重要な意義を有することが想定できる。実際、一部のTTSP（matriptase、hepsin、TMPRSS4など）においては、その発癌や癌進展における意義が報告されるようになってきた。

Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) は2個の細胞外Kunitz型SPインヒビタードメインを有する細胞膜結合型

SPインヒビターであり、細胞膜上における重要なTTSP活性制御因子である。HAI-1の標的TTSPとしては、matriptase、hepsin、TMPRSS4、TMPRSS13、human airway trypsin-like proteaseなどが知られている（図1）。申請者はこれまでに、口腔扁平上皮癌（OSCC）におけるHAI-1とTTSP（特にmatriptase）の働きについて研究を行い、細胞膜結合HAI-1が欠失することによりTTSPの活性が亢進し、細胞遊走能と浸潤能が亢進することなどを明らかにしてきた（研究業績1）。そこで、不死化エナメル上皮腫細胞株AM-1を入手し（岩手医科大学解剖学講座 原田英光教授のご厚意による）、予備実験としてAM-1細胞における種々のTTSPとHAI-1の発現を検討した。その結果、AM-1細胞株がHAI-1と3種類のTTSP（matriptase、TMPRSS13、DESC1）を発現している事を確認した（図2）。これらのうち、matriptaseとTMPRSS13はHAI-1の標的プロテアーゼであることが既に報告されている。また、HAI-1は癌細胞の浸潤における最も重要なMMPであることが知られているMT1-MMPによって細胞膜上から切り出され、その細胞膜上における機能を喪失することが分かっているが、AM-1細胞株におけるMT1-MMPの発現も確認した。エナメル上皮腫の顎骨内での浸潤性増殖に関して、過去にMMPとそのインヒビターが関与しているとする報告はあるが、SPの関与については不明であり、TTSPの意義については全く報告されていない。エナメル上皮腫におけるSP、特にTTSPの意義を検討することで、エナメル上皮腫の顎骨内での浸潤分子機構に新たな知見を持ち込み、更に、分子標的療法のための重要な標的分子を特定できるかもしれない。

2. 研究の目的

歯原性良性腫瘍の一つであるエナメル上皮

腫は、良性腫瘍と位置付けられているが、顎骨内で局所浸潤し、高頻度に再発する。

しかしながら、エナメル上皮腫の顎骨内局所浸潤のメカニズムや再発メカニズムは明らかになっていない部分が多い。

本研究では、不死化エナメル上皮腫細胞株 (AM-1) や外科切除されたエナメル上皮腫組織を用いて、細胞膜結合型セリンプロテアーゼやその制御因子 HAI-1 の発現と機能解析を行い、これらの分子のエナメル上皮腫局所浸潤とその予後因子としての意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)

エナメル上皮腫の手術標本を用いて HAI-1 の局在並びに発現の有無について免疫組織化学的検討を行う。

(2)

AM-1 細胞株において、HAI-1、MMP および TTSP の発現を RT-PCR で発現の確認を行う。

(3)

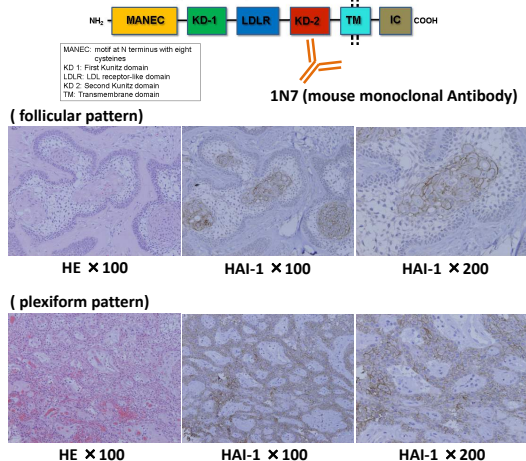
エナメル上皮腫における HAI-1 の詳細な機能解析の為、AM-1 細胞株に siRNA (一過性ノックダウン) を用いて検討を行う。

4. 研究成果

(1)

エナメル上皮腫の手術標本を用いて HAI-1 の免疫染色を行った 14 例中、12 例で腫瘍細胞の 20%以上で HAI-1 陽性であった。

<Immunohistochemical assessment of HAI-1 protein>

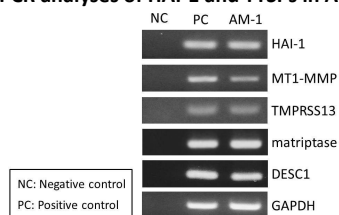


Case no	Age	Sex	Location	Histological type	Immunoreactivity location
1	37	M	Mandible	follicular	membrane
2	26	M	Mandible	follicular	membrane
3	53	M	Mandible	follicular	membrane
4	30	F	Mandible	follicular	membrane
5	21	M	Mandible	follicular	membrane
6	36	M	Mandible	follicular	membrane
7	74	F	Mandible	follicular	membrane
8	30	F	Mandible	follicular	cytoplasm
9	48	M	Mandible	plexiform	membrane
10	65	F	Mandible	plexiform	membrane
11	17	F	Mandible	plexiform	membrane
12	17	M	Mandible	plexiform	membrane
13	61	F	Mandible	plexiform	membrane
14	11	M	Maxilla	plexiform	cytoplasm

(2)

AM-1 細胞株は RT-PCR 上、HAI-1、MT1-MMP、TMPRSS13、matriptase、DESC1 に陽性であった。

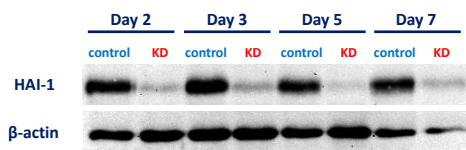
<RT-PCR analyses of HAI-1 and TTSPs in AM-1 cell lines>



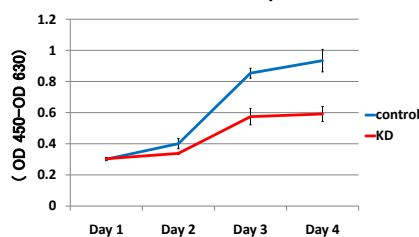
(3)

si RNA を用いて AM-1 細胞株の HAI-1 を一過性にノックダウンすることで細胞増殖は低下し細胞遊走能は亢進する事が明らかになった。

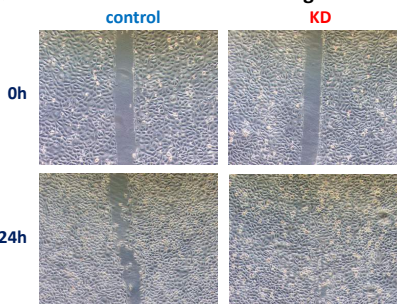
<Knock Down (KD) efficiency of HAI-1 in AM-1 cells analysed by immunoblot using anti-HAI-1 polyclonal antibody>



<Effect of HAI-1 KD on cellular proliferation in vitro>



<Effect of HAI-1 KD on cellular migration in vitro>



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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 貴 (BABA Takashi)
宮崎大学 医学部 感覚運動医学講座
顎顔面口腔外科学分野 助教

研究者番号：70626051