

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893125

研究課題名(和文)顎骨腫瘍・嚢胞による顎骨破壊、吸収のメカニズムの解明

研究課題名(英文) TGF- $\beta$  in jaw tumor fluids induces RANKL expression in stromal fibroblasts.

## 研究代表者

山田 智明 (Yamada, Chiaki)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80548818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯源性腫瘍特にエナメル上皮腫や角化嚢胞性歯源性腫瘍は顎骨の吸収を伴い病変を増大させる。そのメカニズムとしては腫瘍増大による圧迫性骨吸収が広く受け入れられているに過ぎない。しかし初期病変での骨吸収機序を圧迫性骨吸収で説明することは困難である。本研究でサイトカインのTGF- $\beta$ 、IL-1 $\beta$ が歯源性腫瘍細胞に発現すること、病変内溶液に高濃度のTGF- $\beta$ を含有していること、TGF- $\beta$ とIL-1 $\beta$ が相乗的に間質線維芽細胞のRANKL発現を誘導することを見出しRANKL発現を介しての骨吸収を促進させる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Odontogenic tumor, especially Ameloblastomas and KCOT develop in the jaw bone along with bone resorption. The mechanism involves the wide reception of compression-induced bone resorption associated with tumor growth. However, the mechanism of bone resorption in early-stage lesions may not be caused by compression-induced bone resorption. We hypothesized that bone resorption occurs because of RANKL expression mediation in stromal fibroblasts in the jaw bone. In the present study, the expression of TGF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  in odontogenic tumor cells, high concentration of TGF- $\beta$  in lesion fluid, and synergistic induction of RANKL expression in stromal fibroblasts by TGF- $\beta$  and IL-1 $\beta$  have been observed. Our results revealed the following two mechanisms: in stromal fibroblasts, TGF- $\beta$  (1) promotes IL-1 $\beta$  signal-induced NF- $\kappa$ B phosphorylation and promotes RANKL expression and (2) promotes human RANKL transcription activity.

研究分野：顎骨良性腫瘍

キーワード：歯源性腫瘍 角化嚢胞性歯源性腫瘍 エナメル上皮腫 TGF- $\beta$  IL-1 RANKL

1. 研究開始当初の背景

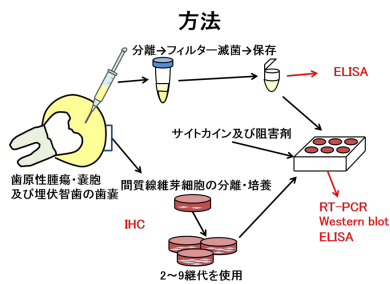
最近の研究から、炎症性・腫瘍性を問わず全ての骨吸収性疾患に破骨細胞の活性化を誘導する因子、Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL) の関与が示されている。しかしながら、口腔外科領域で最も頻度の高い疾患である顎骨嚢胞の増大と骨吸収の機序としては、古くから提唱されている嚢胞裏層上皮細胞の増殖と嚢胞内容液による圧迫性骨吸収が受け入れられているにすぎず、破骨細胞の活性化やその関与については検討されていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、臨床的に比較的多く認められる顎骨腫瘍・嚢胞のうちエナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍に特に着目して検討を行う。顎骨腫瘍、嚢胞上皮細胞が産生するサイトカイン、特に TGF- $\beta$ 1 に焦点を絞り、それらの破骨細胞形成促進機序、その後の顎骨吸収に至る分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

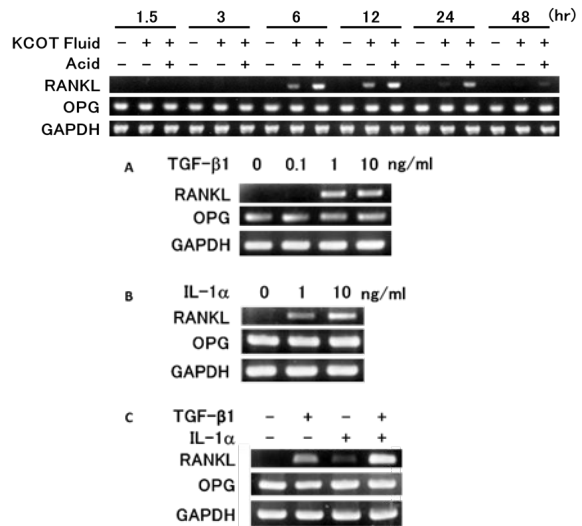
歯原性腫瘍・嚢胞 (KCOT, エナメル上皮腫) より生検術または摘出術施行の際に研究資料として腫瘍・嚢胞組織片を採取した。また、内容液を同時に穿刺吸引した。その後、間質線維芽細胞は explant 法により分離、培養した。組織片から out-growth した細胞を継代し、形態的に純粋な線維芽細胞を分離した。実験には 2~9 継代の間質線維芽細胞を使用した。穿刺吸引した内容液は、740 $\times$ g、4、10 分間の遠心分離を行い、上清を回収し更に 13,400 $\times$ g、4、10 分間の遠心分離を 2 回行った。その上清を回収し、ポアサイズ 0.45  $\mu$ m のフィルターで滅菌処理したそれらを用いて、PCR や western blot や ELISA 法等を用いて解析を行った。



4. 研究成果

KCOT 間質線維芽細胞を KCOT 内容液存在下で培養し RANKL, OPG の発現を RT-PCR で検討した。その結果、KCOT 内容液による RANKL 発現は 6 時間後に誘導され、12 時間後でピークとなった。その後、24 時間でその発現は減弱した。全ての培養時間で OPG 発現は変化しなかった。次に、内容液の物理化学的性質を探るために酸処理を行うと、培養 6 時間、12 時間、24 時間、48 時間で RANKL 発現は増強された。酸処理で生理活性が増強されたことから、その代表的サイトカインである TGF- $\beta$ 1 の存在が示唆されたため、その関与を検討した。ま

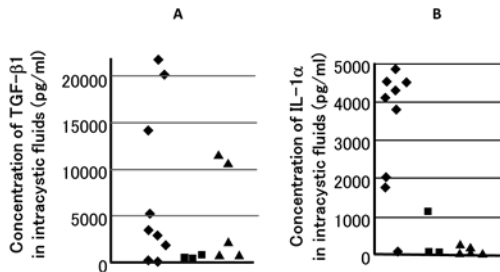
た、歯原性嚢胞中に存在する既知の RANKL 発現を誘導する因子である IL-1 の効果に合わせて検討した。KCOT 間質線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 あるいは IL-1 存在下で 12 時間培養し RANKL, OPG の発現を RT-PCR で検討したところ、TGF- $\beta$ 1、IL-1 共に濃度依存性に RANKL 発現を誘導した。そして、KCOT 間質線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 及び IL-1 存在下で 12 時間培養すると、RANKL 発現の誘導はさらに増強された。TGF- $\beta$ 1 あるいは IL-1 あるいはその両方で培養しても OPG 発現には影響しなかった (下図)。



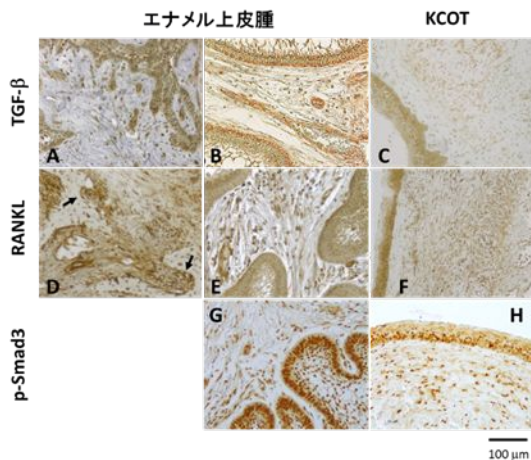
KCOT 内容液に TGF- $\beta$ 1 が含まれているか否かを検討する目的で、KCOT 間質線維芽細胞を KCOT 内容液で刺激した全細胞タンパク質を用いて Smad3 のリン酸化をウエスタンブロッティングで検討した結果、KCOT 内容液刺激後 5 分から Smad3 のリン酸化が認められ、60 分後もそのリン酸化は検出された。

KCOT 間質線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤あるいは IL-1 受容体拮抗剤あるいはその両方で前処理し、KCOT 内容液存在下で 12 時間培養し RT-PCR で RANKL, OPG 発現を検討した。その結果、TGF- $\beta$ 1 および IL-1 存在下で培養した時の RANKL 発現の誘導は、KCOT 内容液で培養した RANKL 発現の誘導と同程度であった。内容液で誘導される RANKL 発現は IL-1 受容体拮抗剤で部分的に抑制され、TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤で強く抑制され、そして、両者の併用により完全に抑制された。この結果から、KCOT 内容液中の TGF- $\beta$ 1 および IL-1 の 2 因子が間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導することが示唆された。

実際に歯原性腫瘍・嚢胞内容液中の TGF- $\beta$ 1、IL-1 濃度の測定を ELISA 法で行った (下図)。10 症例の KCOT 内容液の TGF- $\beta$ 1 濃度は平均 7820.6  $\pm$  8625.2 pg/ml と著しく高濃度であった。IL-1 濃度は平均 3410.8  $\pm$  1592.8 pg/ml と同様に著しく高濃度であった。エナメル上皮腫 3 症例の内容液の TGF- $\beta$ 1 濃度は平均 606.8  $\pm$  264.5 pg/ml、IL-1 濃度は平均 387.3  $\pm$  654.0 pg/ml であった。

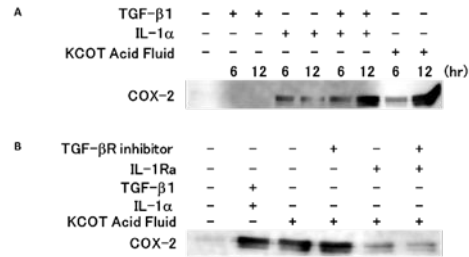


間質線維芽細胞での RANKL 発現を誘導する現象が実際の病変内でも観察される現象であるかを免疫組織化学染色で検討した(下図)。KCOT 組織での TGF- $\beta$ 1 の染色性は、嚢胞裏装上皮で強陽性、間質組織の浸潤リンパ球で陽性、血管内皮細胞で陽性、そして間質線維芽細胞で弱陽性を示した。エナメル上皮腫では、高円柱状上皮細胞に陽性、星芒状細胞で弱陽性、血管内皮細胞で陽性、間質線維芽細胞で弱陽性を示した。リン酸化 Smad3 の染色性は、KCOT では嚢胞裏装上皮全層、特に基底細胞の核に強陽性、間質線維芽細胞の核に陽性を示した。エナメル上皮腫では高円柱状上皮細胞、血管内皮細胞、および間質線維芽細胞に陽性を示した。KCOT 組織での RANKL の染色性は、浸潤リンパ球に強陽性を示し、嚢胞裏装上皮および間質線維芽細胞に陽性を示した。エナメル上皮腫では上皮細胞、間質線維芽細胞に弱陽性を示した。

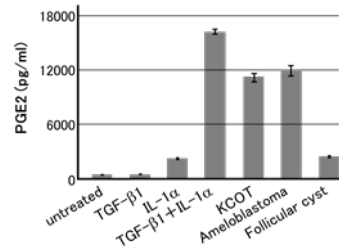


内容液中の TGF- $\beta$ 1 や IL-1 が間質線維芽細胞での RANKL 発現を誘導し、また TGF- $\beta$ 1 および IL-1 の併用で RANKL 発現の誘導は増強されることが示された。そこで、TGF- $\beta$ 1 も PGE2 合成促進に関与し、間質線維芽細胞における RANKL 発現誘導を促進するかを検討した。間質線維芽細胞を KCOT 内容液、TGF- $\beta$ 1、IL-1 および TGF- $\beta$ 1 と IL-1 の両者の存在下で 6 時間および 12 時間培養した際の COX-2 タンパク量を検討した。その結果 IL-1 は COX-2 タンパクを上昇させた。また TGF- $\beta$ 1 と IL-1 との併用で COX-2 タンパクを相乗的に上昇させた。KCOT 内容液は TGF- $\beta$ 1 と IL-1 の両者で培養した場合と同程度に COX-2 タンパクを上昇させた。次に KCOT 間質線維芽細胞を TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤あるいは IL-1 受容体拮抗剤、あるいはその両者で前処理し、KCOT 内容液存在下で 12 時間培養を行い COX-2 の発

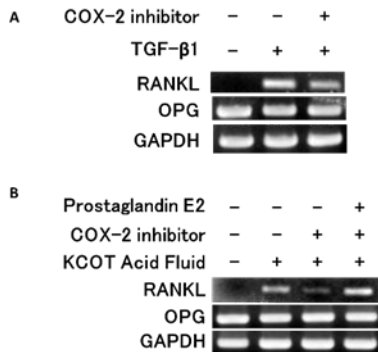
現を検討した。その結果、KCOT 内容液で誘導される COX-2 タンパクは TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤では抑制されず、IL-1 受容体拮抗剤ではほぼ完全に抑制された。TGF- $\beta$ 1 受容体阻害剤および IL-1 受容体拮抗剤を併用しても、IL-1 受容体拮抗剤による抑制以上の効果はみられなかった(下図)。



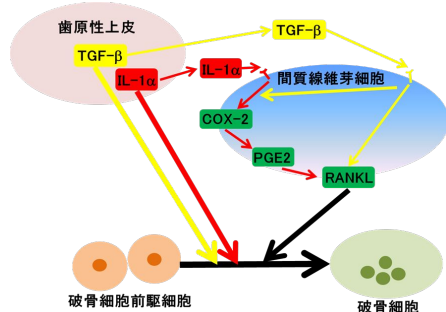
次に間質線維芽細胞を内容液、TGF- $\beta$ 1、IL-1 および TGF- $\beta$ 1 と IL-1 の両者の存在下で 6 時間培養し、その培養上清中の PGE2 濃度を測定した。その結果、培養液のみで培養した PGE2 濃度は平均  $313.0 \pm 142.38$  pg/ml であった。TGF- $\beta$ 1 存在下で培養した PGE2 濃度は平均  $403.3 \pm 83.28$  pg/ml であり、培養液のみで培養したものと比べ 1.3 倍の上昇にすぎなかった。IL-1 存在下で培養した PGE2 濃度は平均  $2160.4 \pm 65.04$  pg/ml であり、6.9 倍に上昇した。TGF- $\beta$ 1 及び IL-1 存在下で培養した PGE2 濃度は平均  $16046.2 \pm 264.87$  pg/ml で、51.3 倍に上昇した。KCOT 内容液存在下で培養した PGE2 濃度は平均  $10970.8 \pm 405.21$  pg/ml と 35 倍に、エナメル上皮腫内容液存在下で培養した PGE2 濃度は平均  $11683.2 \pm 602.28$  pg/ml と 37.3 倍に上昇した。COX-2 タンパク量の変化に一致して、TGF- $\beta$ 1 は PGE2 合成を促進せず、IL-1 は促進し、両者を併用すると PGE2 合成は相乗的に促進させた。また顎骨腫瘍、嚢胞内容液も PGE2 合成を強く促進することが示された(下図)。



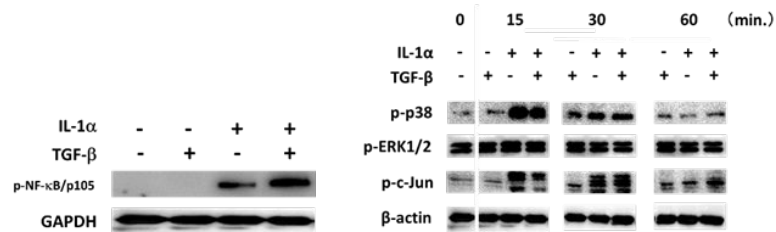
次に、COX-2 を介する間質線維芽細胞での RANKL 発現について検討した。KCOT 間質線維芽細胞を選択的 COX-2 阻害剤で前処理し、その後 TGF- $\beta$ 1 あるいは KCOT 内容液存在下で 12 時間培養し RT-PCR で RANKL 発現を検討した。その結果 TGF- $\beta$ 1 で誘導される RANKL 発現は選択的 COX-2 阻害剤による抑制効果はわずかであった。内容液で誘導される RANKL 発現は選択的 COX-2 阻害剤で強く抑制された。そしてその抑制は、COX-2 の下流因子である PGE2 存在下で培養することで回復した(下図)。



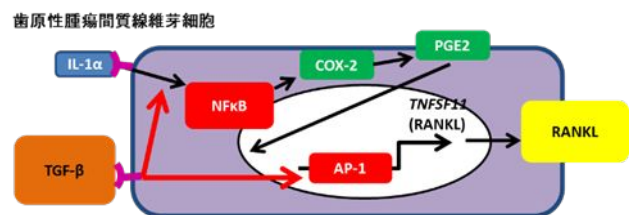
以上の実験結果より、KCOT、エナメル上皮腫、濾胞性歯嚢胞の上皮細胞が産生するサイトカイン、TGF- $\beta$  および IL-1 は、直接的に破骨細胞前駆細胞の破骨細胞形成を促進する潜在能力を有し、また間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し破骨細胞形成を促進することで、顎骨吸収に関与する可能性が示された（下図）。



IL-1 が受容体に結合し COX2 の転写促進や PGE2 合成を促進させる機序には、主として MAP キナーゼ経路と NF- $\kappa$ B を介した経路の 2 通りが報告されている。TGF- $\beta$  が IL-1 による RANKL 発現を増強させる機序を明らかにするために、MAP キナーゼ経路のリン酸化と NF- $\kappa$ B のリン酸化を指標に IL-1 と TGF- $\beta$  のシグナル伝達でのクロストークを検討した。IL-1 は刺激後 30 分で p38 のリン酸化亢進をみとめ、Jun-N-terminal kinase (JNK) の下流に存在する c-Jun のリン酸化は刺激後 15 分および 30 分で確認できた。しかし、IL-1 と TGF- $\beta$  で共刺激しても IL-1 単独刺激による p38 および c-Jun のリン酸化を増強させなかった。また、同時刺激による Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) のリン酸化亢進も観察されなかった。次いで、KCOT 間質線維芽細胞における NF- $\kappa$ B 経路について検討したところ、TGF- $\beta$  は NF- $\kappa$ B をリン酸化しなかったが、IL-1 と TGF- $\beta$  の共刺激後 30 分では、IL-1 単独刺激よりも強い NF- $\kappa$ B のリン酸化のバンドを認め、TGF- $\beta$  が IL-1 による NF- $\kappa$ B のリン酸化を増強させる機序が存在することが示唆された。



これらの結果より、顎骨腫瘍や嚢胞の顎骨内での増大や骨吸収には、嚢胞裏装上皮細胞の増殖と嚢胞内容液による圧迫性吸収による機序のみならず、本研究結果から顎骨腫瘍・嚢胞の上皮細胞が産生する TGF- $\beta$  や IL-1 が間質線維芽細胞の RANKL 発現を誘導し破骨細胞形成を促進する機序が関与することが示された。また、これらの知見により、初期病変での骨吸収機序を解明する一助にもなると考える。



## 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）

〔雑誌論文〕(計 0 件)

現在、投稿中である。

〔学会発表〕(計 2 件)

宮川和晃, 相川友直, 奥野恵実, 山田智明, 大倉正也, 古郷幹彦. 歯原性腫瘍の顎骨吸収の分子機序 - 腫瘍間質線維芽細胞の RANKL 発現を軸とした解析 -. 第 59 回日本口腔外科学会総会・学術大会, 千葉, 2014 年 10 月 17~19 日.

奥野恵実, 相川友直, 宮川和晃, 山田智明, 古郷幹彦. TGF- $\beta$  による歯原性腫瘍の骨吸収機序の解析. 第 68 回口腔科学会学術集会, 東京, 2014 年 5 月 7~9 日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 智明 (Yamada Chiaki)  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 顎  
口腔再建外科学 助教  
研究者番号：80548818