

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 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：25893141

研究課題名(和文)エナメル上皮腫腫瘍微小環境の解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文)Analysis of ameloblastoma tumor microenvironment and development of novel therapies

研究代表者

武部 祐一郎 (Takebe, Yuichiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：00714677

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)：エナメル上皮腫35例において、腫瘍実質細胞が間質に及ぼす影響について検討した。間質に影響を及ぼす因子としてTGF- β 、BMP4、CCN2、CD68、RANKLの発現と局在を免疫組織化学的に検討した。さらに、エナメル上皮腫摘出物から間質線維芽細胞を初代培養して得たASF0000、ASF0111細胞にエナメル上皮腫由来細胞株AM-1細胞の培養上清やrhCCN2を加え、細胞増殖や形態への影響を観察した。エナメル上皮腫では、成長因子の発現量の差異が、間質の性状に関与する可能性が示された。特にCCN2は間質の性状を変化させ、骨関連因子の発現に影響を与え、間接的に骨吸収に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：35 paraffin-embedded ameloblastoma cases, ameloblastoma-derived cell lines (AM-1) and primary cultures of ameloblastoma stromal fibroblasts were used. Immunohistochemistry, Western blot and RT-PCR were performed. Parenchyma-stromal CCN2 overexpression correlated significantly with fibrous-type compared to myxoid-type stroma, suggesting a role in fibrosis. Recombinant CCN2 induction of enhanced ASF proliferation in AM-1 medium supports this view. Results suggest that effects of secreted growth factors are governed by ameloblastoma parenchyma-stromal interactions. CCN2 promotes fibrogenesis independent of TGF- β signaling. Its ablation is associated with a phenotypic switch to a myxoid-type microenvironment, conducive for TGF- β /BMP4 signaling to promote osteoclastogenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：エナメル上皮腫 CCN2

1. 研究開始当初の背景

代表的な歯源性腫瘍であるエナメル上皮腫は、20～30歳の若年者や小児にも発症し、下顎骨大臼歯部から下顎枝部に好発する。初期には無症状であるため、歯科治療の際のエックス線撮影で偶然発見されることも多い。エナメル上皮腫は発育緩慢な良性腫瘍でありながら局所浸潤性、特に高い骨浸潤性を有する特徴があり准悪性腫瘍として扱われる。エナメル上皮腫の治療に関しては、開窓術や顎骨切除術が選択されることが多い。しかし、いずれの治療法も患者への負担が大きく、また再発頻度も高い。さらに希ではあるが悪性転化や転移を示す症例も報告されている。

エナメル上皮腫に関しては現在までに様々な研究が行われてきたが、エナメル上皮腫の生物学的特性や骨浸潤性増殖を理解し、新規治療法に応用するには至っていない。

2005年改訂WHO分類では、エナメル上皮腫は病理組織学的に、充実性/多嚢胞型、類臍型、周辺型、単嚢胞型に分類されるが、基本的な構成成分としては、歯胚に類似した索状から小さな島状の腫瘍胞巣を形成し、腫瘍実質の周囲には膠原線維からなる線維性間質が認められる。

エナメル上皮腫に関する研究では、主に腫瘍実質に注目した検討が行われてきた。これまでに、細胞周期、アポトーシスの異常、TP53の遺伝子変異、Pten、P16などの癌抑制遺伝子のアレルの欠失、MMPやheparanaseによる細胞外マトリクスの分解、PTCH、SHHなどのシグナルの異常などが報告されているが、いずれもエナメル上皮腫の特性や骨浸潤性増殖を説明するには充分とはいえない。

一方、申請者は腫瘍周囲の腫瘍微小環境の重要性に着目し、これまでに歯源性腫瘍の腫瘍間質に着目した研究を行ってきた。その結果エナメル上皮腫では腫瘍実質細胞から分泌される因子が腫瘍間質の線維芽細胞の性状および増殖活性を変化させ、骨吸収に影響を与える事を示唆する研究成果を得ている。

2. 研究の目的

本研究では腫瘍微小環境の分子メカニズムを解明、腫瘍間質細胞だけではなく腫瘍実質細胞との成長に関与する因子やそれを制御する因子を同定し、外科的手法を用いないエナメル上皮腫の新規治療法開発に向けた基礎的研究を行う。

3. 研究の方法

エナメル上皮腫間質線維芽細胞の樹立とAM-1細胞を用いた共培養実験

腫瘍-間質細胞相互作用解析に用いるためのエナメル上皮腫間質線維芽細胞の樹立を行う。腫瘍細胞としてはエナメル上皮腫由来腫瘍細胞AM-1(岩手医科大学 原田英光教授 供与)を用い、間質線維芽細胞との共培養実験を行った。

・間質線維芽細胞の樹立: エナメル上皮腫間

質を無菌的に摘出、滅菌PBSで洗浄する。腫瘍組織塊は細切後Collagenase Dispase(各1mg/ml)溶液にて37℃1時間処理を行う。その後、10%FBS D-MEM培地に懸濁37℃濃度5%で培養する。細胞は数世代培養継代を行い安定化させ、形態変化、増殖能、細胞分化能等について検討する。間質線維芽細胞は複数の患者からの樹立を行う。

・共生培養: AM-1上精を間質線維芽細胞に添加、もしくはセルカルチャーインサートを用いた共培養実験を行い、間質線維芽細胞の増殖能、細胞形態、細胞遊走能等に与える影響について検討する。

エナメル上皮腫の組織学的機能解析

エナメル上皮腫間質線維芽細胞に生じた変化および作用因子候補を、組織学的に観察し確認するため、エナメル上皮腫手術摘出材料における蛋白質局在の観察を行う。

・免疫組織化学的検出: 組織を固定後、パラフィンブロック切片を作成する。動態変化に関与する蛋白質および作用因子候補抗体を用いた免疫組織化学的染色を行う。

間質線維芽細胞への作用因子添加と機能解明

間質線維芽細胞へ作用因子候補を添加し、間質線維芽細胞の動態について解析する。同時にRT-PCR、Western Blotting等で確認を行う。

・動態解析: 間質線維芽細胞の解析は前年度研究によって判明した、間質線維芽細胞の増殖能、細胞形態、細胞遊走能等に与える影響について検討する。

各種抗体を用いた阻害共生培養実験による作用因子同定

腫瘍細胞が産生する因子によって間質線維芽細胞が影響を受けたのか、またどのような作用因子が関与していたかを確認するためAM-1間質線維芽細胞共生培養系へのsiRNA導入および抗体添加実験により証明する。

4. 研究成果

エナメル上皮腫の間質の性状による分類

組織学的にエナメル上皮腫を検討したところ、間質には線維の増生が強い部位と、浮腫状または粘液腫状を呈する部位が混在することが明らかとなった。本研究ではこの間質の性状の違いに着目し、前者の「腫瘍周囲に密な膠原線維の増生を伴い部位により硝子化を伴う」間質をFibrous type、後者の「粘液腫状の形態で毛細血管に富む疎な結合組織からなる」間質をMyxoid typeとして分類した。これらの性状の異なる二種類の間質は、同一の症例の中に混在して存在していた。以下、これらの間質の性状の違いに基づき、各種の成長因子、骨関連因子の発現パターンについて詳細に検討した。

エナメル上皮層における CCN2, BMP4, TGF- の発現

CCN2 タンパクは胞巣辺縁部に位置する立方状ないし円柱状の形態を示す細胞、胞巣内部の星芒状または紡錘形を示す細胞の細胞質に陽性を示した。CCN2 タンパク発現は、特に胞巣辺縁部の間質に出芽する部位で強い傾向が認められた。間質の性状による、実質での CCN2 発現の差異については、Fibrous type が Myxoid type に比較して陽性率が高い傾向を示した。

BMP4 も CCN2 と同様に、胞巣の外層および内層の上皮細胞に陽性像がみられた。BMP4 の発現パターンおよび陽性率は Fibrous type, Myxoid type とともにほぼ同様であり、明瞭な差異は認められなかった。

TGF- β については、腫瘍細胞実質では発現が弱く、胞巣外層および内層の細胞の細胞質に弱陽性像が広く認められた。TGF- β タンパク発現は Fibrous type でも Myxoid type でも同様であり、間質性状の差異との関連性は見られなかった。

腫瘍間質での CCN2, BMP4, TGF- β 発現

CCN2, BMP4, TGF- β は腫瘍細胞のみならず、腫瘍周囲の間質にも発現していた。間質性状の差異に注目しながら、各因子の発現を検討したところ CCN2, BMP4, TGF- β は Fibrous type の間質の線維芽細胞様細胞や、Myxoid type の間質内に疎に分布する紡錘形細胞に陽性像が認められた。

間質での CCN2 タンパク発現は、Myxoid type に比較して Fibrous type の間質の線維芽細胞の細胞質で陽性率が高かった。一方、Myxoid type では間質での陽性率が Fibrous type に比較して低かった。腫瘍実質での発現と間質性状の関連については、腫瘍細胞での CCN2 発現が高い部位では間質は Fibrous type を呈し、逆に腫瘍細胞での CCN2 発現が低い部位では間質が Myxoid type を呈する傾向を示した。また、腫瘍実質での発現と間質性状の差異について、CCN2 で特徴的な所見が認められた。Fibrous type の間質では、腫瘍胞巣周辺に著明な硝子化を伴う部位がみられ、同部の腫瘍細胞における CCN2 陽性率は極めて高かった。

間質での BMP4, TGF- β 発現は、CCN2 とは異なるパターンを示した。BMP4 は Fibrous type の間質内の線維芽細胞では、ほとんど陽性像がみられなかったが、Myxoid type では間質内の紡錘形細胞に陽性像を示した。TGF- β も同様に Fibrous type では間質内の線維芽細胞にはほとんど陽性像を認めなかったのに対し、Myxoid type では間質内の紡錘形細胞が陽性像を示した。

間質性状の違いと骨吸収関連因子の発現

間質性状の差異による、腫瘍と骨の界面における骨関連因子の発現について検討した。RANKL は、Fibrous type の間質では陽性細胞

が認められなかったのに対し、Myxoid type では腫瘍間質内の類円形細胞に陽性像が散見された。

CD68 は、間質内の類円形細胞や骨表面の破骨細胞に陽性像が認められた。骨表面の破骨細胞を除いた腫瘍間質における陽性細胞数のカウントでは、Fibrous type は 18.95 ± 11.89 、Myxoid type では 28.26 ± 13.06 であり、有意に陽性細胞数が多かった ($p < 0.01$)。

間質性状の違いと Ki-67 陽性率

間質性状の差異と腫瘍細胞の増殖、間質細胞の増殖との関連を検討するために、細胞の増殖性を示す Ki-67 について検討した。Ki-67 陽性細胞は Fibrous type, Myxoid type とともに腫瘍実質と腫瘍間質に散在性にみられた。Fibrous type では、Ki-67 LI は腫瘍実質で 3.62 ± 1.82 を示し、間質では 3.85 ± 0.01 であった。一方で、Myxoid type では陽性細胞数は少なく、Ki-67 LI は腫瘍実質で 0.67 ± 2.05 を示し、間質では 0.77 ± 0.51 を示した。実質、間質いずれについても、Fibrous type での Ki-67 LI は高値を示していた。(いずれも $p < 0.01$) 以上の免疫組織化学的染色結果を表 4 に示す。

AM-1 培養上清による ASF 細胞増殖および形態への影響

エナメル上皮腫の腫瘍細胞が産生する因子が間質の性状および増殖能に影響を与える可能性を検討するため、エナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 の培養上清を、エナメル上皮腫から初代培養した間質線維芽細胞の ASF0000, ASF0111 に加え、細胞増殖能の変化を MTT アッセイで検討した。

ASF0000 では、培養 3 日目の段階で AM-1 上清を加えた群はコントロールに比較して細胞増殖が増加しはじめ、10% 上清添加では $p = 0.08$ で有意差は認めなかったが、20%、30%、40%、50% では $p < 0.01$ で、有意に細胞増殖が増加していた。培養 7 日目では上清を加えたすべての群で細胞増殖が有意に増加していた。ASF0111 では、培養 3 日目の段階では AM-1 上清を加えた群とコントロールの間に差異はほとんど認められなかったが、培養 7 日目では上清を加えたすべての群で細胞増殖が有意に増加した。

さらに、AM-1 の上清に含まれる因子が線維芽細胞の形態に与える影響を確認するため、ASF0000 に AM-1 培養上清を 10~50% の濃度で加えた。1~7 日で細胞の形態変化を観察したところ、細胞が増殖するにつれ、上清を加えた群では線維芽細胞の錯綜が強まり、細胞の増殖能が高くなる傾向を認めた。この変化は上清の濃度に依存して増強された。

AM-1 での CCN2 発現と rhCCN2 による ASF 細胞増殖への影響

これまでの結果から、エナメル上皮腫からの因子が間質線維芽細胞の形態変化や増殖に影響する可能性が示唆され、免疫組織化学的検索の結果から間質線維芽細胞の増殖には特に CCN2 が重要と考えられた。そこで、in vitro で AM-1 での CCN2 mRNA 発現およびタンパク発現を RT-PCR、ウェスタンブロッティングで検討した。RT-PCR では 329 bp のバンドが、ウェスタンブロッティングでは 38kDa のバンドが検出され、AM-1 が CCN2 の mRNA、タンパクを発現していることが確認された。次いで、CCN2 が ASF0000、ASF0111 の増殖への影響を検討する為に rhCCN2 を加え MTT アッセイを行ったところ、ASF0000 でも ASF0111 でも rhCCN2 を加えた群では培養 7 日目で有意に細胞増殖が増加した。

本研究結果では、エナメル上皮腫間質での Ki-67 LI が Fibrous type で有意に高かったことから、Fibrous type における間質線維芽細胞の増殖の高さが示唆された。すなわち、エナメル上皮腫において CCN2 を高発現している部位では、CCN2 は線維芽細胞を活性化し、Fibrous type の間質が誘導され、逆に、腫瘍細胞の CCN2 発現量が低い場合には Myxoid type の間質が誘導される可能性が考えられた。また、CCN2 による間質性状の変化は、間質からの TGF- β 、RANKL 発現に影響を与え、間接的に骨吸収に影響を与えていることが示唆された。

以上の事から、エナメル上皮腫では腫瘍実質から様々な成長因子が発現しているが、特に CCN2 発現の差異が間質の性状および間質線維芽細胞の増殖活性に影響を与える可能性が示唆された。さらに、CCN2 が間質の性状に影響を与えることで、間接的に骨吸収に影響を与えている可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tsuyoshi Shimo, Mayumi Yao, Yuichiro Takebe, Yuko Ono, Kyoichi Obata, Naito Kurio, Soichiro Ibaragi, Norie Yoshioka, Koji Kishimoto, Yoshinobu Yanagi, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki, A case of adenoid cystic carcinoma associated with Ig4-related disease, Int J Surg Case Rep, peer-reviewed, vol.10,2015,12-16 doi:10.1016/j.ijscr.2015.01.022

Tsuyoshi Shimo, Eiki Koyama, Yuu Horikiri, Tatsuo Okui, Naito Kurio, Naoki Katase, Shoko Yoshida, Yuichiro

Takebe, Koji Kishimo, Norie Yoshioka, Hitoshi Nagatsuka, Akira Sasaki, Expression and roles of CCN2 in dental mesenchymal cells in primary culture-With findings in a case of odontogenic myxofibroma, Oral Sci Int, peer-reviewed, vol.20,2014,8-14 doi:10.1016/S1348-8643(13)00008-6

〔学会発表〕(計 4 件)

武部祐一郎, 河合穂高, 藤井昌江, 高島清文, 辻極秀次, 長塚仁, エナメル上皮腫における CCN2 および YAP の局在とその役割, 岡山歯学会, 2014 年 10 月 26 日, 岡山大学, 岡山

TAKEBE Yuichiro, KAWAI Hotaka, TAKABATAKE Kiyofumi, SONG Yu, ITO Satoshi, FUJII Masa, TSUJIGIWA Hidetsugu, NAGATSUKA Hitoshi, Analyze of variation of the tumor stroma by ameloblastoma cells. Annual meeting of society for regenerative hard tissue biology, 2014/8/21, Chung Shan Medical University, Taiwan

TAMAMURA Ryo, KANNO Takeshi, TAKEBE Yuichiro, KAWAI Hotaka, OKADA Hiroyuki, NAGATSUKA Hitoshi, LOH analysis in 1p36 region and the immunohistochemical analysis of RIZ1 expression in oral squamouscell carcinoma, Annual meeting of society for regenerative hard tissue biology, 2014/8/21, Chung Shan Medical University, Taiwan

河合穂高, 武部祐一郎, 片瀬直樹, 于湊, 藤井昌江, 高島清文, 辻極秀次, 長塚仁, エナメル上皮腫における CCN2 の発現解析, 日本病理学会, 2014 年 4 月 24 日 ~ 平成 14 年 4 月 26 日, 広島国際会議場, 広島

〔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

武部 祐一郎 (TAKEBE, Yuichiro)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 714677