

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462864

研究課題名(和文) FGF抑制因子Sprouty/SpreD によるエナメル上皮腫増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) A study of the involvement of Sprouty/SpreD, suppressor of FGF signal, in the control of ameloblastoma proliferation.

研究代表者

武富 孝治 (Taketomi, Takaharu)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：10553290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫細胞株 AM-1 細胞において、Sprouty2 は EGF 刺激時に強く誘導されることが分かった。一方、エナメル上皮腫の切除切片において Sprouty2 がその増殖活性に与える影響を解析したところ、Sprouty2 が強く発現している部位では Ki-67 の発現が抑制されていた。また、エナメル上皮腫の発生母地である骨における Sprouty2 の作用として、BMP2 刺激における増殖も抑制し、サイトカイン分泌も抑制した。

以上より、エナメル上皮腫において EGF に誘導された Sprouty2 が FGF 刺激を抑制的に制御して腫瘍増殖を抑制する事が分かった。

研究成果の概要(英文)：In the ameloblastoma cell line AM-1 cells, Sprouty 2 was found to be strongly induced upon EGF stimulation. On the other hand, when the influence of Sprouty 2 on its proliferation activity in resected sections of ameloblastoma was analyzed, the expression of Ki - 67 was suppressed in the site where Sprouty2 was strongly expressed. In addition, as an action of Sprouty 2 in the bone that is the origin of ameloblastoma, it inhibited proliferation by BMP 2 stimulation and suppressed cytokine secretion.

From the above results, it was found that EGF - induced Sprouty2 in enamel epithelioma suppresses tumor growth by controlling FGF stimulus suppressively.

研究分野：口腔外科

キーワード：シグナル伝達

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面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。

エナメル上皮腫は顎骨に発生する最も代表的な歯源性腫瘍の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源性上皮と歯源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。このエナメル上皮腫は良性腫瘍であるが、一部悪性化して転移など、がんと同じく生命を脅かす病態を示すことから、その増殖機構の解明や治療につながるメカニズムの解明は大いに期待されるものである。しかしながら、エナメル上皮腫の増殖・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

エナメル上皮腫の増殖・分化に関わる増殖因子が EGF もしくは FGF のどちらであるのかを調べるとともに、他の増殖因子の関わりについても検討する。また、MAPK 経路や PI3K 経路を介した増殖を中心に、Sprouty がその制御をどのように行っているのかを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

叢状型と濾胞型における各種 Sprouty の発現ならびに局在を調べるため、生検時・手術時において検体を採取。mRNAでの発現量を比較するため、採取した組織から Total RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて検討した。またパラフィン切片を用いて、Sprouty のみならず、EGF や FGF のタンパク質レベルでの発現・局在を免疫組織学的染色法にて検証した。

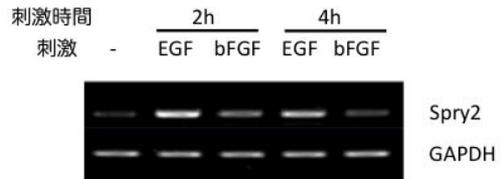
一方、エナメル上皮腫が増殖する“場”である骨組織において、骨形成にも Sprouty が関与することが分かってきたことから、マウスの頭蓋骨から骨芽細胞を初代培養して、real-time PCR 法を用いてその発現を調べ、Smad 経路における Sprouty の関与を調べるため、Sprouty2 を強制発現させた骨芽細胞の Smad の活性化を western blot 法を用いて解析した。さらに骨形成に関わる m-RNA の発現量を real-time PCR 法で解析し、石灰化への影響を von Kossa 染色で調べた。

4. 研究成果

1) エナメル上皮腫における Sprouty2 の発現と誘導

・RT-PCR 法による解析で、Sprouty2 が強く発現していたことが分かった。また、Sprouty2 は FGF 刺激により発現誘導がなされていることが判明した(図1)。

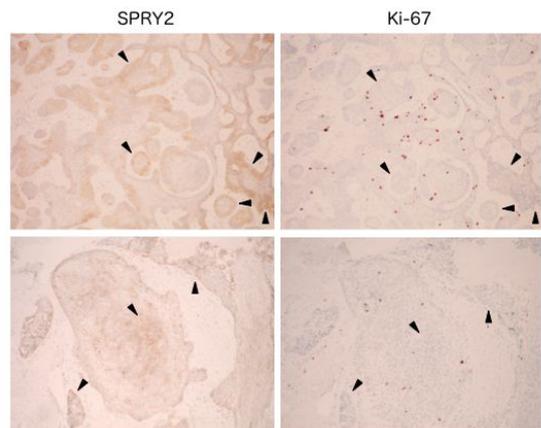
図1



2) エナメル上皮腫切除切片における Sprouty2 の発現と Ki-67 の発現

・Sprouty2 発現部位における Ki-67 陽性細胞の頻度は低い傾向があった(図2)。

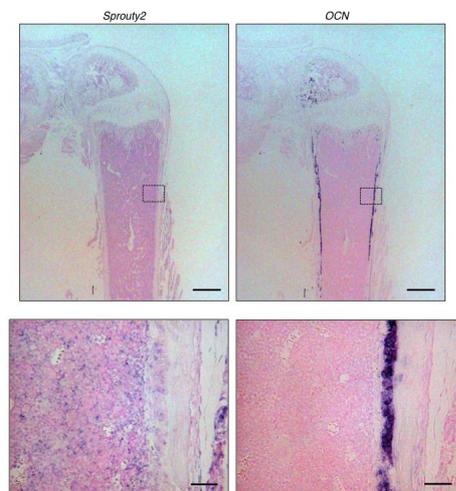
図2



3) 骨における Sprouty2 の発現

・骨における Sprouty2 の発現部位は図3に示すような局在を示した。

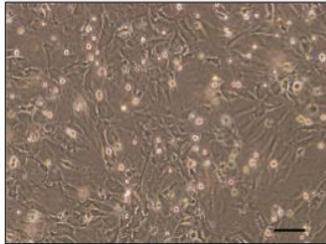
図3



この局在から、OCN は骨芽細胞のマーカーであり、Sprouty2 が骨芽細胞において何らかの機能を有していることが示唆された。

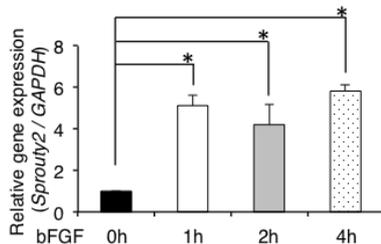
4) 骨芽細胞の初代培養と Sprouty2 の誘導・マウス頭蓋骨から骨芽細胞を単離し、初代培養を行った(図 4)。

図 4



この単離した骨芽細胞を bFGF で刺激して誘導される Sprouty2 を real-time PCR 法にて測定した。その結果、Sprouty2 が FGF 刺激で誘導されることが示された(図 5)。

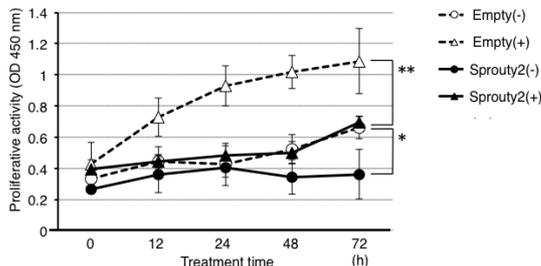
図 5



5) 骨芽細胞増殖における Sprouty2 の作用・骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞において Sprouty2 がどのような作用を有するかを調べるため、Sprouty2 を強制発現させ、FGF で刺激して WST-8 Assay を行った。

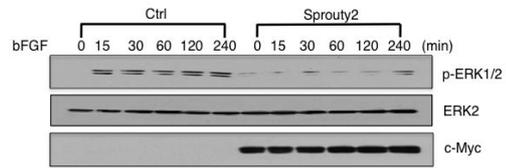
その結果、Sprouty2 を強制発現した群は Empty と比較して有意に細胞増殖が抑制され、FGF 刺激時にさらに顕著な抑制効果を示した(図 6)。

図 6



本結果をシグナル伝達機構の観点からも解析するため、古典的 MAPK 経路である ERK1/2 のリン酸化を western blot 法で解析した(図 7)。

図 7

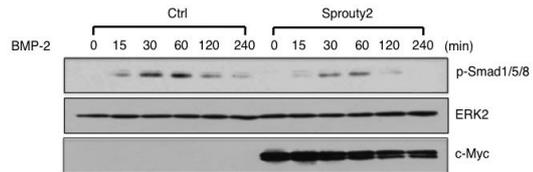


その結果、これまでの報告と同じく FGF 刺激において、Sprouty2 を強制発現させると ERK1/2 のリン酸化が抑制され、細胞増殖を抑制的に制御することが示唆された。

6) RTK 以外のシグナル伝達経路における Sprouty2 の作用 ~ BMP シグナルを中心に ~

これまで多くの研究が RTK (チロシンキナーゼ型受容体)の下流で、そのリガンドの作用を制御する報告がなされているが、Sprouty2 に関してそれ以外のシグナル伝達経路に影響するという報告はない。しかしながら、2016 年に Joo A. らが in vivo の解析で Sprouty2 が BMP シグナルに参与すると報告した。しかしながら、本報告では分子生物学的解析に乏しかった。そのため、Sprouty2 を強制発現させた MC3T3-E1 細胞を BMP で刺激して、下流の Smad のリン酸化を解析した(図 8)。

図 8



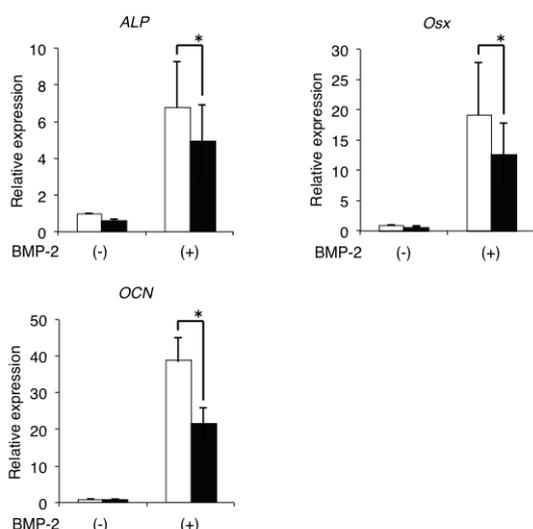
その結果、western blot で Sprouty2 が BMP シグナルを Smad1/5/8 のリン酸化を抑制することが判明した。本結果は、1990 年から続く Sprouty2 の機能解析の歴史において、in vitro の系で Sprouty2 が RTK 以外のシグナル伝達経路を制御することを世界で初めて証明する結果となった。

7) 骨マーカー発現と Sprouty2 の関係

・FGF シグナルが骨マーカーの発現を誘導することから、FGF シグナルを抑制する Sprouty2 が骨マーカーの発現抑制に作用することが考えられた。今回、BMP シグナルを抑制することが判明したことから、BMP 刺激で誘導された骨マーカーの発現にも Sprouty2 が関与するかどうかを調べた。

その結果、BMP2 で誘導された骨マーカー：アルカリフォスファターゼ (ALP)、オステリックス (Ox), オステオカルシン (OCN) の発現が、Sprouty2 によって抑制されていた(図 9)。

図 9

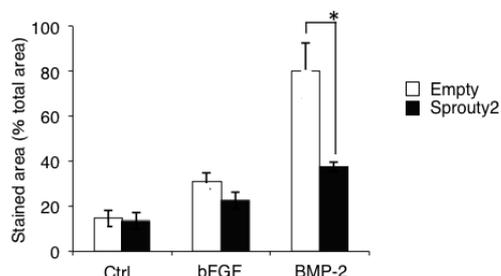


8) 骨組織の石灰化に及ぼす Sprouty2 の作用

・BMP シグナルによって制御される骨の石灰化に及ぼす Sprouty2 の作用を解析するため、von Kossa 染色を行い、染色面積の割合 (%) を調べた。

その結果、Sprouty2 の発現により、石灰化が抑制されることが分かった (図 10)。

図 10



以上の結果から、Sprouty2 がエナメル上皮腫の増殖に関して、腫瘍細胞内における発現で腫瘍の増殖を抑制する可能性が考えられ、それは FGF 刺激に依存した増殖に対して抑制していることが分かった。

また、今回新たにエナメル上皮腫の発生源地である骨において、その骨形成の主たる細胞である骨芽細胞において、これまで報告されていたシグナル伝達経路とは別の Smad 経路の抑制に関与していることが判明した。今回はマウスやラットでの結果なので、ヒトでも同じ作用を持つのか検証が必要である。

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 12 件)

Sprouty2 is involved in the control of osteoblast proliferation and differentiation through the FGF and BMP signaling pathways. Takeomi T, Onimura T, Yoshiga D, Muratsu D, Sanui T, Fukuda T, Kusakawa J, Nakamura S. *Cell Biology International*, ISSN 1065-6995, 2017. 査読有

Yamamichi Kensuke, Fukuda Takao, Sanui Terukazu, Toyoda Kyosuke, Tanaka Urara, Nakao Yuki, Yotsumoto Karen, Yamato Hiroaki, Takeomi Takaharu, Uchiyama Takeshi, Nishimura Fusanori, Amelogenin induces M2 macrophage polarisation via PGE2/cAMP signalling pathway., *Arch Oral Biol*, Vol.83, 241-251, 2017. 査読有

A case of the pleomorphic adenoma of minor salivary gland that resulted in maxillary metastasis 20 years after primary tumor resection. Takaharu Takeomi, Keita Todoroki, Kinuko Ogata, Yushi Abe, Makoto Koga, Jingo Kusakawa. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, (29) 2, 136-141, 2017. 査読有

軟口蓋に発生した基底細胞腺癌の 1 例. 武富 孝治, 轟 圭太, 中村 守蔵, 安 陪 由思, 古場 朗洋, 楠川 仁悟. 日本口腔腫瘍学会誌 29 巻 (2017) 2 号 p.53-58. 査読有

Microarray analysis of the effects of amelogenin on U937 monocytic cells.

Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Sangik C, Takeomi T,

Nishimura F. *American Journal of Molecular Biology* 2016. 査読有

Biological Effects of Sprouty2

Inhibition in Periodontal Ligament

Cells. Sanui T, Fukuda T, Yamamichi K, Toyoda K, Tanaka U, Takeomi T,

Nishimura F. *Journal of Cell Signaling* 1(3), 117, 2016. 査読有

New Therapeutic Strategy for

Regenerating Periodontal Tissue Based

on the Combination of Amelogenin and Reapplications of Existing Grp78

Inducer. Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Yamamichi K, Takeomi T,

Nishimura F. *Journal of Cell Signaling* 1(3), 118, 2016. 査読有
Glucose-Regulated Protein 78: A Novel Therapeutic Target for Amelogenin-Induced Periodontal Tissue Regeneration. Fukuda T, Sanui T, Toyoda K, Tanaka U, Yamamichi K, Taketomi T, Nishimura F. - *Single Cell Biology* 5(2), 137, 2016. 査読有
Inhibition of Sprouty2 polarizes macrophages toward an M2 phenotype by stimulation with interferon gamma and Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide. Atomura R, Sanui T, Fukuda T, Tanaka U, Toyoda K, Taketomi T, Yamamichi K, Akiyama H, Nishimura F. *Immunity, Inflammation and Disease* 4(1): 98-110, 2016. 査読有
Grp78 Is Critical for Amelogenin-Induced Cell Migration in a Multipotent Clonal Human Periodontal Ligament Cell Line. Toyoda K, Fukuda T, Sanui T, Tanaka U, Yamamichi K, Atomura R, Maeda H, Tomokiyo A, Taketomi T, Uchiumi T, Nishimura F. *Journal of Cellular Physiology* 231(2): 414-427, 2016. 査読有
Sprouty2 inhibition promotes proliferation and migration of periodontal ligament cells. Tanaka U, Sanui T, Fukuda T, Toyoda K, Taketomi T, Atomura R, Yamamichi K, Maeda H, Nishimura F. *Oral Diseases* 21(8): 977-986, 2015. 査読有
Mutation of Spry2 induces proliferation and differentiation of osteoblasts but inhibits proliferation of gingival epithelial cells. Sanui T, Tanaka U, Fukuda T, Toyoda K, Taketomi T, Atomura R, Yamamichi K, Nishimura F. *Journal of Cellular Biochemistry* 116(4): 628-639, 2015. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

MAPK 経路制御因子 Sprouty2 によるエナメル上皮腫増殖制御機構の解析 ・ 武富孝治, 轟 圭太, 宮園佳宏, 平嶋伸悟, 田上隆一郎, 光安岳志, 楠川仁悟 第 61 回日本口腔外科学会総会学術大会、2016 年。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

武富 孝治 (Taketomi Takaharu)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：10553290

(2)研究分担者

讃井 彰一 (Sanui Terukazu)
九州大学病院・講師
研究者番号：70507780

福田 隆男 (Fukuda Takao)
九州大学大学院・歯学研究院・助教
研究者番号：80507781

楠川 仁悟 (Kusukawa Jingo)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：30258412