

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26861732

研究課題名(和文)エナメル上皮腫における奇異な形態変化・骨吸収機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the morphological change and resorption of bone mechanism in the ameloblastoma

研究代表者

今井 裕子(imai, yuko)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30592688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫の増殖・分化については未だに不明な点が多い。以前、我々は叢状エナメル上皮腫のセルラインであるAM-1を用いて、細胞膜上にV-ATPase、ClC-7が発現しH⁺、Cl⁻をそれぞれ放出することで腫瘍周囲の骨を直接溶解することを明らかにした。その後の研究で、細胞外Ca²⁺濃度変化・RANKL投与により、細胞形態変化・増殖促進が促されることが判明し、詳細を実験・検討した結果、TRPV2、V3、V4、TRPM7チャンネルが形態変化に関与するCa²⁺流入チャンネルの候補として有力であり、またRANKL投与による増殖促進はNFATc1およびc2の発現上昇・脱リン酸化を介することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of proliferation and differentiation in ameloblastoma, an odontogenic tumor, remain unclear. We previously reported that AM-1, a cell line of plexiform ameloblastoma, resorbed peritumoral bone by release of H⁺ from V-ATPase and Cl⁻ from ClC-7 on its plasma membrane. Moreover, we found that increasing extracellular Ca²⁺ concentration evoked morphological change and that administration of RANKL facilitated proliferation. Therefore, we aimed to clarify these mechanisms. We performed RT-PCR, Western blot, immunohistochemistry and cell counting using several modulators of RANK receptor signaling cascade and Ca²⁺ permeable channels. Our results show that TRPV2, V3, V4 and TRPM7 are candidates for Ca²⁺ influx channels, and that RANKL-induced facilitation of proliferation was caused by upregulation and dephosphorylation of NFATc1 and c2.

研究分野：有病者歯科

キーワード：ameloblastoma RANKL TRP channel

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は良性腫瘍であるが、顎骨内で発育を続け、有効な薬剤がないため内科的治療はなく、多くは切除や開窓療法といった外科的な処置が必要となり、術後に大きな歯牙および顎骨の欠損が生じるため、クオリティー・オブ・ライフ (QOL) は決して良いとはいえない。また、このエナメル上皮腫は歯源性腫瘍の中で、本邦では 38.2% (2005年) と最も多くときに悪性化を引き起こす¹⁾。

これまで、エナメル上皮腫細胞は Receptor Activated NF-kappa B Ligand (RANKL) を放出し、破骨前駆細胞を破骨細胞に分化させることにより骨吸収を促し、腫瘍周囲の骨組織を吸収していると考えられてきた²⁾。一方で、我々の研究結果として、エナメル上皮種細胞である AM-1³⁾ は、破骨細胞と同様に細胞膜上の液胞性プロトンポンプ (V-ATPase) および Cl^-/H^+ アンチポーター (ClC-7) といったトランスポーターを介し、 H^+ および Cl^- を放出させることで骨溶解を引き起こしていることが明らかにした⁴⁾。

その後の実験結果より、AM-1 は細胞外 Ca^{2+} が生理学的濃度付近 (1~2mM) になると、破骨細胞様に融合・多核化の様相を示し、さらに、低濃度 Ca^{2+} (100 μM) 存在下でも、リン酸カルシウムプレート上で発育させると同様の形態変化が見られること、さらに V-ATPase の阻害薬である bafilomycin A1 の投与によりこの形態変化および細胞増殖が抑制されたことから、自らが溶解した Ca^{2+} を感知もしくは細胞内流入により形態変化および細胞増殖が引き起こされていることが示唆された。

2. 研究の目的

上記の背景より、本研究では、AM-1 の細胞外 Ca^{2+} 感知もしくは細胞内流入に関与している受容体 (Ca^{2+} 感知受容体) もしくは Ca^{2+} 流入イオンチャネル (TRP チャネル等) の同定と選択的阻害薬の検索・細胞外 Ca^{2+} および RANKL 受容による AM-1 の形態変化に対するシグナル伝達機構を詳細に検討することにより、それらの形態変化機構の全容解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

叢状型エナメル上皮腫由来の細胞株である AM-1 および正常皮膚角化細胞の HaCaT を用いて、細胞培養、セルカウント、RT-PCR、ウエスタンブロット、免疫蛍光染色などを各種受容体、イオンチャネル、細胞内シグナル伝達に関わるタンパク等への作用薬 (阻害薬および活性化薬) を用いて行った。

4. 研究成果

1) 形態変化の原因となる細胞外 Ca^{2+} 流入経路の同定

細胞外 Ca^{2+} を培養条件である 100 μM から生理学的濃度付近の 1mM へと増加させると、AM-1 は凝集し、破骨細胞様に細胞融合・多核化の様相を表したが、その現象を引き起こす原因となる受容体もしくはイオンチャネルの同定をすべく実験を行った。まず、RT-PCR 法により、AM-1 における Ca^{2+} 感知受容体 (CaSR) の存在および Ca^{2+} 流入イオンチャネル (TRPC, M, V, P, ML, A) のそれぞれについて存在を確認した。すると、CaSR は検出されず、TRP チャネル群も TRPC1, V2, V3, V4, M7, P1 および P2 のみが検出された。一方、この現象はリン酸カルシウムプレート上でも観察されたことから、骨基質のもう一つの無機成分である無機リン酸についても実験を行った。その結果、 Na_2HPO_4 を 1mM 添加しても形態変化は起きず、さらにリン酸を感知する Na 依存性リン酸トランスポーター (SLC20, SLC37) の存在についても、RT-PCR 法により検出を認めなかった。

その後、TRP チャネルの作用薬 (阻害薬および活性化薬) である Gd^{3+} , La^{3+} , 2-APB, ruthenium red を各々投与し、細胞外 Ca^{2+} 濃度の上昇による形態変化への影響を観察すると、ruthenium red、 La^{3+} および 2-APB によりアポトーシスの誘導および形態変化の抑制が観察された。

結果として、AM-1 の形態変化には、TRPV2、V3、V4 および TRPM7 を介した細胞外 Ca^{2+} の流入が必要であることが示唆された。

2) RANKL、OPG 等の破骨細胞分化促進および抑制因子の AM-1 への関与の検討

RANKL は破骨前駆細胞から破骨細胞への分化を促進し、また osteoprotegerin (OPG) は RANKL の RANK への結合を阻害することが分かっている⁵⁾。一方、AM-1 にも RANK が発現していることが判明していることから、RANK 受容体を介した何らかの制御機構が存在することが示唆された。以上の背景から、AM-1 に RANKL (100 μM) を投与すると、細胞増殖が活性化することが判明した。さらに、この活性化には、NFATc1 および c2 の 2 つの転写因子の発現上昇と脱リン酸化が観察された。なお、これらの現象は OPG (100 μM) の前処置にて抑制された。さらに、細胞

外 Ca^{2+} 濃度を 1mM に上昇させた状態では、細胞の形態変化（凝集）とともに、NFATc1 および c2 のさらなる発現上昇がみられることが明らかとなり、この細胞外 Ca^{2+} 上昇による効果は、calmodulin を介した細胞内 Ca^{2+} 依存性の活性化を引き起こす calcineurin の阻害薬である FK506 (1 μM) の前処置により抑制された。以上の結果から、RANKL 投与による NFATc1 および c2 の発現上昇とリン酸化による細胞増殖、さらに細胞外 Ca^{2+} 流入から calcineurin を介した NFATc1 および c2 のさらなる脱リン酸化による形態変化が起きることが判明した。

3) 細胞外 Ca^{2+} 負荷による細胞融合に対する検討

破骨細胞の多核・巨大化といった分化は細胞融合に因ることが判明している⁶⁾。AM-1 の多核・巨大化も、破骨細胞と同様の細胞融合に因るのか、もしくは自己細胞増殖に因るものかは不明である。そこで、緑色と赤色の異なる二色の蛍光蛋白を用いた生細胞染色キット (PKH26 および PKH67) により、それぞれの色素タンパクを予め導入した AM-1 細胞を共培養した状態で、細胞外 Ca^{2+} (1mM) を負荷した。その結果を共焦点顕微鏡を用いて免疫蛍光染色にて検討すると、細胞の凝集は起きているが、融合はしていない可能性が示唆された。

4) 上皮 間葉および上皮 マクロファージ転換に関する検討

過去の報告および我々の予備実験結果により、AM-1 には上皮細胞のマーカーであるサイトケラチンのサブタイプが数種類発現していることが分かっている²⁾。上記の細胞外 Ca^{2+} 上昇 (1mM) による形態変化が、上皮系だけでなく、間葉系やマクロファージ系のマーカーを発現しているか否かをウエスタンブロットおよび免疫細胞染色を用いて検討した。その結果、細胞外 Ca^{2+} の上昇により、間葉系マーカーである vimentin および N-cadherin の発現上昇、さらには、マクロファージのマーカーである CD68 の発現上昇が観察された。以上の結果から、AM-1 の生育および形態変化には RANKL および細胞外 Ca^{2+} 流入が必須であることが明らかとなった。

今後は、以上の結果をさらに深く検討し、論文化していく予定である。

< 引用文献 >

- 1) 柴原他. 口腔腫瘍 2008;20:245-54.
- 2) Sandra F et al. Oral Oncol 2008;41: 637-44.
- 3) Harada et al., J Oral Pathol Med, 1998;27:207-12.
- 4) Yoshimoto S et al. Int J Oncol 2016;48:1258-70.
- 5) Edwards JR and Mundy GR, Nat Rev Rheumatol, 2011;4:235-43.
- 6) Chen EH et al., FEBS Lett, 581: 2007;2181-93.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Hiromitsu M., Imai Y., Yoneda M., Hirofujii T., Applying orthodontic extrusion for conservation of residual teeth in a patient treated with bisphosphonates, irradiation and immunosuppressants. Special care in Dentistry, 査読有, 37(1):43-46, 2017

Yoshimoto S., Morita H., Matsubara R., Mitsuyasu T., Imai Y., Kajiioka S., Yoneda M., Ito Y., Hirofujii T., Nakamura S., Hirata M., Surface vacuolar ATPase in ameloblastoma contributes to tumor invasion of the jaw bone, International Journal of Oncology, 査読有, 48(3):1258-1270, 2016

Morimoto Y., Yokoe C., Imai Y., Sugihara M., Futatsuki T., Tooth extraction in patients taking nonvitamin K antagonist oral anticoagulants, Journal of Dental Sciences, 査読有, 11(1):59-64, 2016

Itsuki K., Imai Y., Hase H., Okamura Y., Inoue R., Mori MX., PLC-mediated PI(4,5)P2 hydrolysis regulates activation and inactivation of TRPC6/7 channels., Journal of General Physiology, 査読有, 143(2):183-201, 2014

[学会発表] (計 11 件)

小林芳央、今井裕子、(他 6 名、2 番目) 遺伝性血管性浮腫の母子例における歯科治療経験 第 27 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会 2018

小林芳央、今井裕子、(他 9 名、6 番目) 補助人工心臓植込み術前後の抜歯後偶発症を生じた症例の報告 第 26 回日本有病者歯科医療学会総会・学術大会 2017

横江千寿子、今井裕子、(他 6 名、7 番目)補助人工心臓装着者の口腔機能管理のシステム化第 2 報 第 3 2 回日本障害者歯科学会総会・学術大会 2015

Yoshimoto S, Morita H, Imai Y, Nakamura S, Hirata M The roles of NFATc1 and NFATc2 in ameloblastoma cells Experimental biology 2014

他 7 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)

〔その他〕

ホームページ (研究業績データベース):
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K005537/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

今井 裕子 (IMAI, Yuko)
九州大学・病院・助教
研究者番号 : 30592688