

令和元年6月10日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11076

研究課題名(和文) ヘッジホッグ経路抑制によるエナメル上皮腫の新規治療法の探索

研究課題名(英文) The search for the new treatment method for ameloblastoma by the hedgehog signal inhibition

研究代表者

光安 岳志 (Mitsuyasu, Takeshi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00380519

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫をはじめとする歯源性腫瘍ではソニックヘッジホッグ(SHH)を腫瘍細胞に発現している。本研究ではこのヘッジホッグ(HH)のシグナル経路に着目した。エナメル上皮腫細胞株を用いてHHシグナル経路阻害薬による影響を調べたところ、腫瘍細胞の増殖は抑制され、同時に細胞死を誘導されることが明らかになった。またエナメル上皮腫の原因遺伝子と考えられているBRAF遺伝子の変異を有している細胞株においても、HHシグナル阻害薬は増殖抑制と細胞死誘導を示した。以上の結果よりHHシグナル経路阻害薬が本腫瘍の治療薬として有力な候補であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫の治療法は外科手術に限定されていることから、薬物治療が選択肢として増えることは多くの患者にとっての朗報となる。本研究によりエナメル上皮腫に対してヘッジホッグシグナル抑制薬がその候補として可能性をもつことが示された。

研究成果の概要(英文)：Sonic Hedgehog (SHH) is expressed in tumor cells in the odontogenic tumors, including ameloblastoma. In this study, we focused on the signal pathway of this hedgehog (HH). The effects of the HH signaling pathway inhibitor using ameloblastoma cell lines were investigated, the proliferation of tumor cells was suppressed, and apoptosis was induced at the same time. In addition, in cell lines that have mutations in the BRAF gene, which is thought to be the causative gene of ameloblastoma, HH signal inhibitors showed growth inhibition and cell death induction. It has been suggested that the HH signaling pathway inhibitor is a potent candidate as a therapeutic agent for this tumor

研究分野：口腔外科

キーワード：エナメル上皮腫 ヘッジホッグシグナル経路 歯源性腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は歯原性上皮細胞からなる歯原性腫瘍である。顎骨への浸潤、破壊そして再発しやすいという性質をもっており、その治療は時として顎骨の切除を必要とするために患者のQOLは低下を余儀なくする。特に上顎の進展例では治療が困難であることが多い。

エナメル上皮腫の細胞生物学的特徴については主に免疫組織化学的手法や組織での遺伝子発現の検索を中心に進められてきた。これは悪性腫瘍と比較して初代培養細胞の取り扱いや細胞株の樹立が困難であったためである。申請者らは本腫瘍細胞の動的な解析を行う目的で、世界で初めてエナメル上皮腫細胞株 AM-1 (Harada H, Mitsuyasu T, et al, J Oral Pathol Med, 27(5):207-12, 1998) を樹立した。これにより、状況証拠しか得られなかった研究から、検証実験を行える状況を得るに至った。

SHH(sonic hedge hog)はヘッジホッグシグナル経路を介して種々の遺伝子が発現し、歯の発生や種々の器官形成において重要な役割を担っていることで知られている。申請者らはエナメル上皮腫における腫瘍上皮細胞と AM-1 での SHH, SHH の受容体である PTCH (patched) の発現と SHH シグナル経路の下流に位置する GLI1, GLI2 と GLI3 の発現を確認した。そして AM-1 において SHH の中和抗体あるいは SHH シグナリング分子の SMO (Smoothened) の阻害剤であるシクロパミンの添加による SHH シグナル経路の阻害により増殖の抑制、さらにアポトーシスを誘導することを確認した(Kanda S, Mitsuyasu T, et al Int J Oncol 43: 695-702, 2013)。

2. 研究の目的

エナメル上皮腫は良性の歯原性腫瘍であるが局所的に顎骨に浸潤増殖し、しばしば再発するため、顎骨切除といった根治的な治療により QOL を低下させる。それゆえ新規の治療法の開発が望まれている。その候補として Sonic hedgehog(SHH)シグナル経路の阻害薬に着目した。

SHH は胎生期の細胞の分化や組織の形態形成に関与している。また、近年 SHH シグナル経路の異常が基底細胞癌や髄芽腫などの悪性腫瘍の発生へ関与していることが明らかになった。申請者らはエナメル上皮腫においても同様に SHH シグナル経路が腫瘍の増殖に重要な役割を担っており、その阻害による増殖の抑制が可能であることを明らかにした。本研究では SHH シグナル経路阻害による増殖抑制とアポトーシス誘導により新たな治療法を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

<材料>

エナメル上皮腫細胞株

AM-1 (HPV16DNA 導入により不死化)、AM-3 (変異型の CDK4、cyclinD1, TERT(human telomerase reverse transcriptase)とドミナントネガティブ型の p53 遺伝子を初代培養細胞に導入)

<方法>

各細胞株における HH シグナル経路遺伝子およびタンパクの発現の検索

HH シグナル経路遺伝子: SHH, SMO, PTCH, GLI1, GLI2, GLI3

各 HH シグナル経路阻害薬が各細胞株における増殖に与える影響についての検索

1. 細胞増殖実験

WST アッセイ

各 HH シグナル経路阻害薬によるアポトーシス誘導能の検索

1. アポトーシス誘導の確認

1) TUNEL 法によるアポトーシス陽性細胞率の比較

2) Annexin V 陽性細胞率の比較を行い、アポトーシスに与える影響を観察する。

2. アポトーシス関連遺伝子発現の検索

各 HH シグナル経路阻害薬がアポトーシス関連遺伝子である Bcl-2、BAX について mRNA、タンパク発現に与える影響を観察する。

4. 研究成果

エナメル上皮腫細胞株における HH シグナル経路遺伝子およびタンパクの発現の検索

エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 を用いて、HH シグナル経路遺伝子およびタンパクの発現を検索し、SHH, PTCH, SMO, GLI1, GLI2, GLI3 の発現を確認した。

各 HH シグナル経路阻害薬が各細胞株における増殖に与える影響についての検索

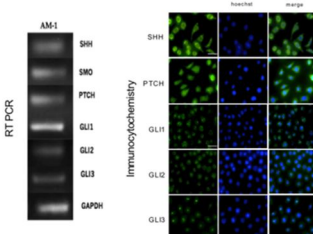
1. 細胞増殖実験

WST アッセイ

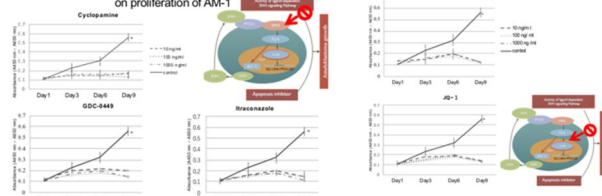
HH シグナル経路阻害薬として

SMO を抑制する Cyclopamine, GDC-0449(vismodegib), Itraconazole, GLI1 の拮抗薬である Gant-61, GLI1 の核への移行を阻害する JQ1 を用いた。いずれの阻害薬も AM-1 の増殖を抑制した。

Expression of SHH signaling pathway molecules



Effects of SHH signaling pathway inhibitors on proliferation of AM-1



各 HH シグナル経路阻害薬によるアポトーシス誘導能の検索

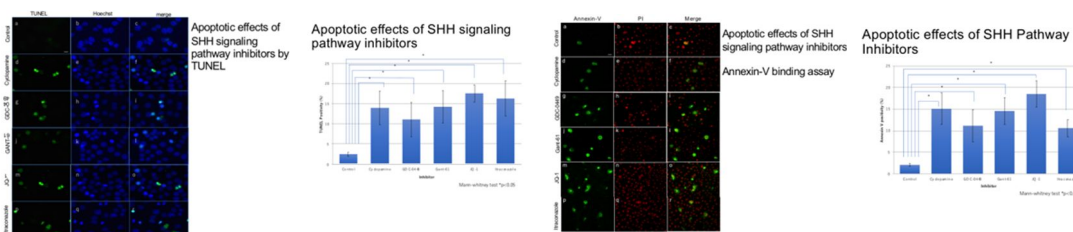
1 . アポトーシス誘導の確認

1) TUNEL 法によるアポトーシス陽性細胞率の比較

Cyclopamine, GDC-0449(vismodegib), Itraconazole, Gant-61GL11, JQ1 いずれの阻害薬もコントロールに比較して TUNEL 細胞の陽性率が有意に上昇した。

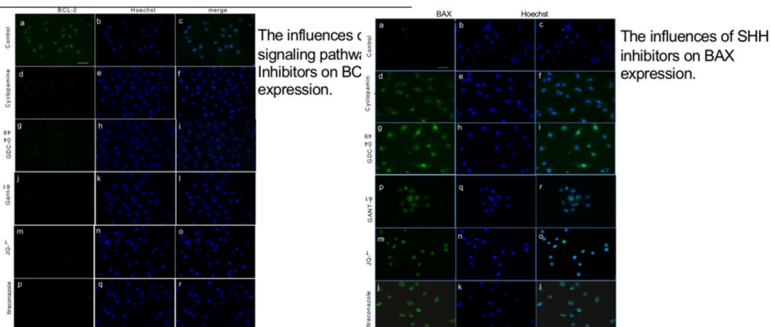
2) Annexin V 陽性細胞率

Cyclopamine, GDC-0449(vismodegib), Itraconazole, Gant-61GL11, JQ1 いずれの阻害薬もコントロールに比較して TUNEL 細胞の陽性率が有意に上昇した。



2 . アポトーシス関連遺伝子発現の検索

Cyclopamine, GDC-0449(vismodegib), Itraconazole, Gant-61GL11, JQ1 いずれの阻害薬もコントロールに比較して細胞死抑制タンパクの BCL-2 の発現は消失し、細胞死誘導タンパクである BAX の発現が亢進した。



結果のまとめ

エナメル上皮腫細胞株において HH シグナル経路阻害薬は、増殖抑制効果と同時に、細胞死誘導タンパクの発現上昇および細胞死抑制タンパクの発現が消退し、細胞死が起こっていた。本研究で用いた細胞株はエナメル上皮腫の原因遺伝子である BRAF の変異を有している。しかし、その細胞株においても HH シグナル経路阻害薬は増殖抑制と細胞死誘導効果を示した。このことは HH シグナル経路阻害薬の本腫瘍に対する薬物治療への応用の重要な基礎データとなったと考えられる。また他の歯原性上皮が原因となる嚢胞や腫瘍への応用も期待できる。新規の治療法応用への足がかりとなる研究である。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

S.N.A. Zam, T. Mitsuyasu, S. Kanda, S. Kawano, S. Nakamura, Induction of apoptosis by inhibition of sonic hedgehog signalling pathway in ameloblastoma cell line: a pilot study for novel therapeutic approach, International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 10.1016/j.ijom.2017.02.748, 46, 1, 221-221, 2017.03

[学会発表](計3件)

Takeshi Mitsuyasu: The Hedgehog Signaling Pathway in Ameloblastoma: SHH targeted Therapy, 日本歯科医学会総会, 福岡, 2016年10月21日~2016年10月23日

Syarifah Nova Amiza Zam, Takeshi Mitsuyasu, Kaori Matsumura, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura: Effects of Sonic Hedgehog Signaling Pathway Inhibitors on Ameloblastoma Cell-lines: 94th General session & Exhibition of the IADR(国際学会), Seoul, Republic of Korea, 2016年06月22日~2016年06月25日

Syarifah Nova Amiza Zam, Takeshi Mitsuyasu, Shire Kanda, Shintaro Kawano, Seiji Nakamura, Inhibition of hedgehog signaling in ameloblastoma cell line by binding of GDC-0449 to smoothened: the 22nd International Oral and Maxillofacial Surgery, 2015.10.27-30, Melbourne Australia.

[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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：中村 誠司

ローマ字氏名：Seiji Nakamura

所属研究機関名：九州大学

部局名：歯学研究院

職名：教授

研究者番号（8桁）：60189040

研究分担者氏名：中村 典史

ローマ字氏名：Norifumi Nakamura

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域歯学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：60217875

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。