

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20596

研究課題名(和文)エナメル上皮腫の多様な浸潤発育機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the mechanism of various forms of collective cellular invasion in ameloblastoma

研究代表者

淵上 貴央 (FUCHIGAMI, Takao)

鹿児島大学・鹿児島大学病院・助教

研究者番号：40772439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は異なる組織型のエナメル上皮腫細胞株AM-1(叢状型)とAM-3(濾泡型)の集団的浸潤形態を比較評価するため、Double Layered Collagen Gel Hemisphere 培養法(DL-CGH法)による3次元培養実験を行った。また、線維芽細胞の存在が腫瘍細胞の浸潤形態に与える影響についても調べた。腫瘍細胞単独では、それぞれの細胞株は異なる浸潤形態を示した。すなわち、AM-1は浸潤突起を積極的に形成して叢状に浸潤するのに対し、AM-3は細胞集団が互いの細胞接着を保ちながら平滑に浸潤していた。また、線維芽細胞の存在は腫瘍細胞の浸潤形態に影響を及ぼすことが分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to compare the collective invasive forms of ameloblastoma cell lines AM-1 (plexiform type) and AM-3 (follicular type) of different tissue types, we performed 3D culture using Double Layered Collagen Gel Hemisphere culture (DL-CGH) method. Moreover, collective cellular invasion of ameloblastoma cells was assessed in the presence or absence of fibroblasts. Notably, without fibroblasts, AM-1 cells formed sharp, plexiform-like invasive processes, whereas AM-3 cells formed a series of blunt processes often observed during collective migration. In comparison, we could find that the presence of fibroblasts affected the invasive form of ameloblastoma cells.

研究分野：口腔顎顔面外科

キーワード：エナメル上皮腫 歯源性腫瘍 間質線維芽細胞 3次元培養 集団的細胞浸潤

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は代表的な歯原性良性腫瘍であり、良性腫瘍であるものの高い骨浸潤能を有するため治療後の再発率も高く、治療法として腫瘍を含めた広範な顎骨切除が選択されることも少なくない。そのため、術後の顔貌変化や咀嚼、構音障害が患者にとって大きな問題となる。これまで、本腫瘍に関する研究は数多くされてきたが、その多くは病理標本を用いた免疫組織化学的な方法であり、エナメル上皮腫細胞を用いた細胞生物学的研究は多くはない。したがって、本腫瘍の成り因や病態は未解明な点が多く、治療方針は経験的な見地から決定されるに過ぎないのが現状である。本腫瘍の細胞生物学的な病態解明は外科的治療以外の新しい治療戦略の確立の一助となる可能性がある。本腫瘍は、病理組織像にて濾胞型や叢状型といった異なる組織型を示すことで知られ、各組織型は周囲組織への浸潤発育様式や腫瘍実質および間質成分の違いを有する。また、いずれの組織型も腫瘍細胞が細胞間の接着を維持したまま集団的に遊走し浸潤する特徴(集団的細胞遊走)が伺える。各組織型エナメル上皮腫の特性について細胞実験系による比較解析を行った研究は、我々の知る限り存在せず、その多様な浸潤発育様式の要因については明らかとされていない。その理由は、エナメル上皮腫は比較的稀な疾患であり、不死化細胞株の報告は少なく、初代培養や細胞株化も難しいため、細胞生物学的解析による各組織型の比較は非常に困難であるからだと考えられる。

我々の研究グループは1998年に、叢状型エナメル上皮腫の不死化細胞株を樹立した(J Oral Pathol Med, 1998, 中村ら)。さらに近年、申請者により濾胞型(Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, 2013)と混合型(2015年、投稿準備中)の株化に成功した。それにより、主要な組織型のエナメル上皮腫細胞株を用いた、各組織型の病態の違いに関する分子生物学的な比較解析を安定して行うことが可能となった。

2. 研究の目的

申請者は、「腫瘍細胞由来の液性因子や間質細胞との相互作用が腫瘍細胞の性質に影響し、本腫瘍の浸潤形態の多様性をもたらす要因となる」との仮説を立て、その解明は腫瘍の特性診断による治療方針決定や、治療標的としての活用など、根拠に基づいた治療法の発展に繋がると考えた。そこで本研究では、異なる組織型エナメル上皮腫の摘出病変由来の不死化細胞株および、間質に豊富に存在する線維芽細胞を用いた細胞生物学的実験により、本腫瘍の浸潤発育様式(組織型)の多様性をもたらす要因の解明を目的とした。

現在までエナメル上皮腫の不死化細胞株は報告が少なく、申請者の研究グループが樹立したエナメル上皮腫不死化細胞株である

AM-1(ヒト叢状型エナメル上皮腫由来)とAM-3(ヒト濾胞型エナメル上皮腫由来)は、今まで困難だった各組織型のエナメル上皮腫細胞の性質を細胞生物学的実験により比較解析することを可能にした。また、本研究で用いる三次元半球状コラーゲンゲル培養法(後述)をはじめとした実際の病変に近い環境を再現した三次元培養法は、本疾患の病態を解明する上で非常に有意義であると考えた。

本研究の成果から、エナメル上皮腫の浸潤発育様式に関わる因子を同定できれば、本腫瘍の病態に対する理解を深め、病態の異なる様々なタイプのエナメル上皮腫に対してより戦略的な治療法の工夫をもたらすことが可能であると考えられる。すなわち、骨浸潤が高度な症例においても、現在は「術者の感覚」で決めている骨切除の範囲の決定において、術前、術中に切除した組織サンプルでの分子マーカーを利用した客観的な判断要素を導入できる点や、臨床像と分子生物学的指標を組み合わせた「根拠ある治療法の確立」へと発展する可能性がある点は大変意義があると考えられる。

3. 研究の方法

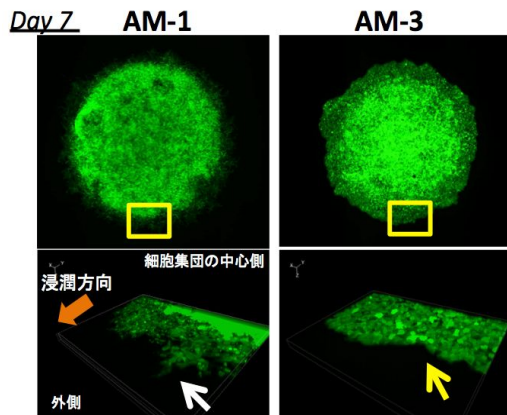
エナメル上皮腫は腫瘍細胞が細胞間接着を維持したまま集団的に遊走する特徴的な浸潤形態を示す。本研究では、エナメル上皮腫細胞の集団的細胞浸潤を評価できるように、Double-Layered コラーゲンゲル半球培養法(DL-CGH法)を参考に三次元培養実験を行った。本法は、細胞の集団的浸潤形態を評価するのに優れており(Cell Commun Adhes, 2007, 真庭ら)、本研究ではエナメル上皮腫細胞株と線維芽細胞の相互作用が腫瘍細胞の集団的浸潤形態に与える影響について評価できるように若干の改変を加えて実験を行った。実験にはエナメル上皮腫細胞株であるAM-1(ヒト叢状型エナメル上皮腫由来)とAM-3(ヒト濾胞型エナメル上皮腫由来)およびヒト線維芽細胞株 HFF-2を用いた。まず、共培養において、各種細胞の動態の評価を容易にするため、各エナメル上皮腫細胞株を緑色蛍光蛋白(GFP)で、線維芽細胞株 HFF-2を赤色蛍光蛋白(dsRED)で標識した細胞を作製し、腫瘍細胞と間質線維芽細胞の相互作用が浸潤様式へ及ぼす影響について、三次元共培養による評価を可能とした。続いて、二層の半球状コラーゲンゲル内で腫瘍細胞単独あるいは間質線維芽細胞との三次元共培養を複数パターン行い、腫瘍細胞の集団的細胞浸潤の形態評価を行った。

4. 研究成果

Double Layered Collagen Gel Hemisphere 培養法(DL-CGH法)を用いた3次元培養実験系を応用し研究を進めた。まず、エナメル上皮腫細胞株であるAM-1(ヒト叢状型エナメル上皮腫由来)とAM-3(ヒト濾胞型エナメル上皮腫由来)とAM-3(ヒト濾胞型エナメル上皮腫由来)とAM-3(ヒト濾胞型エナメル上皮腫由来)

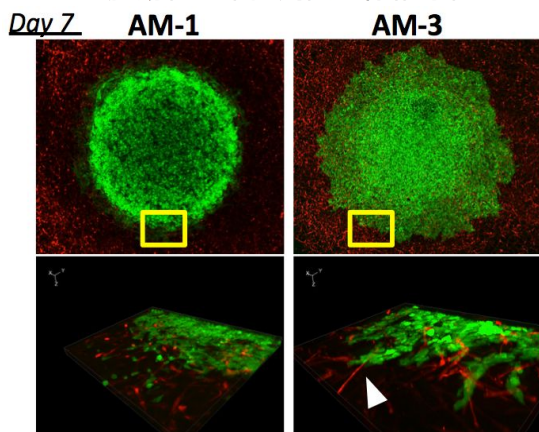
由来)の集団的浸潤形態を比較評価するため、腫瘍細胞単独での DL-CGH 法を行った。その結果、異なる腫瘍型由来のエナメル上皮腫細胞株である AM-1 と AM-3 では異なる細胞浸潤形態を示すことが分かった。すなわち、叢状型由来の AM-1 は叢状の浸潤形態を示し、AM-3 は平滑な浸潤辺縁を保ったまま緩徐な浸潤を示した(図1)。

図 1. 腫瘍細胞単独での培養



さらに、エナメル上皮腫細胞集団の周囲を線維芽細胞を含んだコラーゲングルでコーティングすると、腫瘍細胞集団の浸潤形態は著明に変化した。特に AM-3 では、AM-3 単独では細胞間接着を保ったまま平滑な浸潤辺縁を維持し浸潤したのに対し、線維芽細胞存在下では複数の腫瘍細胞が細胞間接着を維持したまま浸潤突起を顕著に形成し、積極的に周囲に浸潤する様子が伺えた(図2)。

図 2. 腫瘍細胞集団周囲に線維芽細胞



また、その浸潤突起の先端には線維芽細胞が存在し、腫瘍細胞の形成する浸潤突起の浸潤を誘導する様子が認められた。さらに別の培養方法として、腫瘍細胞と線維芽細胞を混合して DL-CGH 法による培養を行った所、AM-1、AM-3 共に、細胞集団の中心部ではそれぞれ叢状型、濾胞型に近い顕微鏡像が得られた。最終年度では、初年度に得られた結果を複数回の実験にて再確認した上で、研究成果を英

論文雑誌 (FEBS Open Bio, 2017.) に投稿し採択された。また、前述の集団的細胞浸潤の形態変化に影響する因子の候補を挙げた上で、蛋白や抗体の存在下での三次元培養を行い、細胞集団浸潤形態に強く影響する因子の同定を進め、いくつかの候補因子を得た。今後は、エナメル上皮腫の示す集団的細胞浸潤形態の多様性に係る因子について三次元培養や動物実験系を用いたより詳細な解析を行う予定である。

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 2 件)

Takao Fuchigami, Hirofumi Koyama, Michiko Kishida, Yoshiaki Nishizawa, Mikio Iijima, Toshiro Kibe, Masahiro Ueda, Tohru Kiyono, Yoshimasa Maniwa, Norifumi Nakamura, and Shosei Kishida. Fibroblasts promote the collective invasion of ameloblastoma tumor cells in a 3D coculture model. FEBS Open Bio, 7:2000-2007, 2017. (査読有り)

Toshiro Kibe, Takashi Koga, Kazuhide Nishihara, Takao Fuchigami, Takuya Yoshimura, Tetsushi Taguchi, and Norifumi Nakamura. Examination of the early wound healing process under different wound dressing conditions. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology, 123:310-319, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 3 件)

淵上貴央、岸田昭世、岐部俊郎、中村典史：エナメル上皮腫における IL-1 依存性の MMP-9 分泌は腫瘍細胞の浸潤に重要である。第 71 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2017 年 4 月 26-28 日。

T. Fuchigami, S. Kishida, T. Kibe, N. Nakamura. The presence of stromal fibroblasts affect on the collective cellular migration of tumour cells in ameloblastoma. 23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, 2017, 31 March-3 April.

淵上貴央、岸田昭世、岐部俊郎、中村典史：エナメル上皮腫の病態解明に有用な蛍光蛋白質安定発現細胞株を用いた新規三次元共培養実験系の構築。第 70 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会、2016 年 4 月 16-18 日。

〔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〕
特記事項なし

6．研究組織

(1)研究代表者

淵上 貴央（FUCHIGAMI, Takao）
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号：40772439

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし