

令和元年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17256

研究課題名(和文)エナメル上皮腫の増殖機構の解明と分子標的薬を用いた治療戦略

研究課題名(英文) Treatment strategy using the molecular target medicine and elucidation of the growth mechanism of ameloblastoma

研究代表者

鳴瀬 貴子 (NARUSE, Takako)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：20795489

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)：エナメル上皮腫由来細胞はTNF- α を産生し、さらに外的TNF- α の刺激によってNF- κ Bを介した骨吸収性因子IL-6, MMP9の発現が誘導されることからエナメル上皮腫の増殖、浸潤、細胞死にはオートクライン機構を介した様々なシグナル伝達を経由する分子標的蛋白が関与していることが考えられる。EGFR経路はJAK/STAT経路に何らかの影響を与え、相乗的に細胞が障害され、細胞死が起こる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫は良性歯原性腫瘍であるが、高度の浸潤能のため、高い再発率を有することが知られている。初代培養を行っても、長期培養が難しく、樹立された細胞株も少ないため、分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。今回の研究によってエナメル上皮腫の増殖、細胞死に關与する新規細胞シグナル機構を解明することができれば、それら経路の阻害をターゲットとした新しい治療法の解明につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We reported that AMB cell produces TNF- α and induce expression of bone resorption-related factor IL-6, MMP9 via NF- κ B by stimulation of external TNF- α . It is thought that molecular target protein via various signal transmission through autocrine mechanism participates growth, invasion and death of AMB cell. The EGFR pathway have some kind of influences on the JAK/STAT pathway, and cell death was caused by synergistically cell disorder.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エナメル上皮腫 AMBcell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は良性歯原性腫瘍であるが、高度の浸潤能のため、高い再発率を有することが知られている。初代培養を行っても、少ない継代数で増殖を停止するため、長期培養が難しく、樹立された細胞株も少ないため、分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。

近年、申請者らは、テロメラーゼ活性を担う h-TERT 遺伝子をウイルスベクターを用いることなく、導入することでエナメル上皮腫由来の不死化細胞株 (AMB cell) を樹立した。(Fig. 1, 2) AMB cell は歯原性上皮マーカーを発現し(Fig. 3)、コラーゲンゲルへの浸潤能をもつ。さらに申請者らは AMB cell は TNF- α 、TGF- β 、IFN- γ を産生していること、さらに外的 TNF- α の刺激によって NF- κ B を介した骨吸収性因子 IL-6、MMP9 の発現が誘導されることを報告している。これらのことからエナメル上皮腫の増殖、浸潤、細胞死にはオートクライン機構を介した様々なシグナル伝達を経由する分子標的蛋白が関与していることが考えられる。

Janus Kinase (JAK) のリン酸化と転写因子 STAT を介する JAK/STAT 経路は炎症関連遺伝子の誘導に関与しており、近年では JAK 阻害剤が新規リウマチ薬として自己免疫疾患の治療に用いられている。申請者らは AMB cell に JAK2 選択的阻害剤 (AG490) を添加すると、細胞増殖が抑制されることを予備実験で発見したこれらのことから、JAK/STAT 経路はエナメル上皮腫特異的な細胞増殖に関与している経路と考えられる。

EGF 受容体 (EGFR) を介した経路は腫瘍増殖、転移に関与していることが報告され、近年では、EGFR 中和抗体や阻害剤が肺癌、口腔癌の治療に用いられている。EGFR 経路は P13K/Akt を介する古典的経路以外にリガンドが受容体に結合後、細胞膜から核内移行し、シグナル伝達に機能する経路も報告されている。近年、エナメル上皮腫の核内 EGFR の発現と EGFR 阻害剤耐性化も報告されている。申請者は興味深いことに EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (AG1478) がエナメル上皮腫の増殖や、障害にほとんど影響を示さないが、JAK 阻害剤を同時添加した際に相乗的に細胞障害が起こることを予備実験で発見した(Fig. 4)。この結果は JAK 経路が、EGFR 経路に影響を与え、相乗的に細胞が障害されることを考えている。今回の研究は当科で樹立した不死化エナメル上皮腫細胞を用いて、エナメル上皮腫の増殖、細胞死に関与する新規細胞シグナル機構を解明することによってそれら経路の阻害をターゲットとした新しい治療法を検討することである。

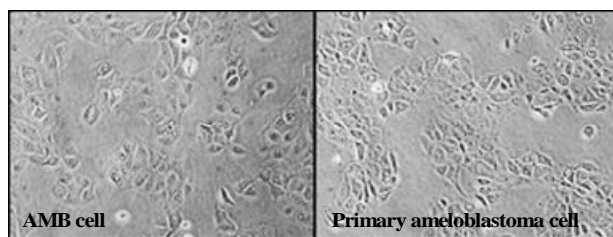


Fig1 不死化エナメル消費腫 AMB cell の形態

AMB cell は初代培養エナメル上皮腫細胞と同様に上皮様形態を示した。

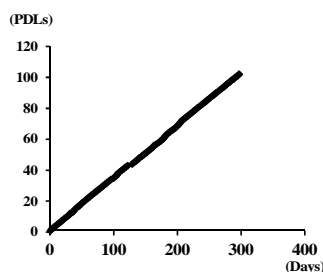


Fig2 AMB cell の培養継代数

AMB cell は 100 継代数以上に達した。

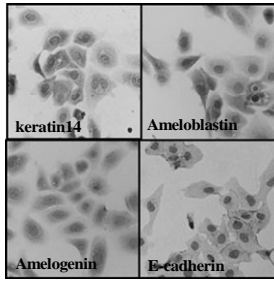


Fig. 3 歯原性上皮マーカーの発現

AMB cell は歯原性上皮マーカーを発現していた。

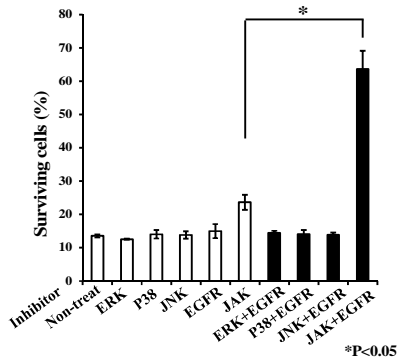


Fig.4 各種阻害剤と同時添加による細胞障害効果

2. 研究の目的

エナメル上皮腫は樹立された細胞株が少なく分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。近年、申請者は、h-TERT 遺伝子を用いてエナメル上皮腫由来の不死化細胞株 (AMB cell) を樹立した。今回の予備実験で AMB cell において JAK, EGFR を介した経路が増殖や細胞死に関与することを発見した。今回の研究は AMB cell を用いて、エナメル上皮腫の増殖、細胞死に関する新規細胞シグナル機構を解明し、それら経路阻害による新しい治療法を検討することである。

3. 研究の方法

エナメル上皮腫の増殖、浸潤、細胞死のメカニズムを解明し、その経路を標的とした分子標的治療を検討するために、以下の研究計画を行った。不死化エナメル上皮細胞 AMB cell, 不死化口腔粘膜上皮細胞 RT7 を上皮細胞増殖培地 (Lonza, Walkersville, MD) にて 96 well-multi well plate にコンフルエンスに培養した後、各種シグナル伝達阻害剤 (SB20358, AG490, SP600125, PD98059, AG1478), EGFR antibody を様々な濃度で単独、あるいは同時添加をし、培養後、培養上清を採取し、LDH 法で細胞障害を検討した。AMB cell における AG490, AG1478 単独添加、同時添加に対する細胞増殖効果を検討するために、MTT assay を行った。AMB cell における AG490, AG1478 単独添加、同時添加に対する増殖、細胞死の影響を検討するために TUNEL 法を行った。

4. 研究成果

AMB cell に各種シグナル伝達阻害剤、あるいは EGFR antibody を単独添加したところ、JAK 阻害剤である AG490 によって最も増殖が抑制された。一方、RT7 の増殖に対して AG490 は影響しなかった。AMB cell に 各種シグナル伝達阻害剤、あるいは EGFR 抗体を単独添加したところ、AG490 を含めた各種シグナル伝達阻害剤単独では細胞障害作用を誘発されなかった。一方、AG490 と EGFR antibody, また AG490 と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AG1478 の組み

合わせによって細胞障害が誘発された(Fig. 5) . また AG490 と EGFR antibody, また AG490 と EGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AG1478 の組み合わせは DNA の断片化が認められ, アポトーシスによる細胞死が起こっている可能性が示された . 今回の結果から, エナメル上皮細胞において JAK/STAT 経路が細胞増殖に重要な役割を担っていることが示唆された . さらに EGFR 経路は JAK/STAT 経路に何らかの影響を与え, 相乗的に細胞が障害され, 細胞死が起こる可能性が示唆された . EGFR, JAK 同時阻害による細胞死関連の PCR アレイを行い, 影響される遺伝子の網羅的解析を行い, パスウェイ解析から標的蛋白を決定しているところである .

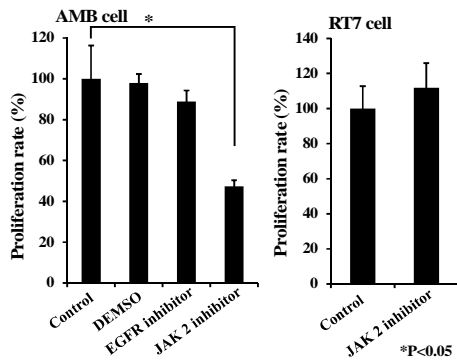


Fig.5 JAK2 選択的阻害剤による増殖阻害効果
JAK2 阻害剤は AMB cell の増殖を抑制した .

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1) *Candida albicans* β -Glucan-Containing Particles Increase HO-1 Expression in Oral Keratinocytes via a Reactive Oxygen Species/p38 Mitogen-Activated Protein Kinase/Nrf2 Pathway. (査読あり)

Ishida Y, Ohta K, Naruse T, Kato H, Fukui A, Shigeishi H, Nishi H, Tobiume K, Takechi M.

Infect Immun. 2018 Mar 22;86(4). pii: e00575-17. doi: 10.1128/IAI.00575-17. Print 2018 Apr.

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチド LL-37 による核酸依存性炎症応答の活性化
加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
第 63 回日本口腔外科学会総会・学術大会 2018.11.2 幕張
- 2) 口腔粘膜上皮細胞における抗菌ペプチド LL-37 の核酸導入能力を介した炎症誘導機構の解明
加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
先端歯学スクール 2018 2018.8.23 東京
- 3) Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 promotes exogenous nucleic acid-mediated immune response via RIG-I/NF- κ B axis
Hiroki KATO, Kouji OHTA, Takako NARUSE, Yoko ISHIDA, Hideo SHIGEISHI, Masaaki TAKECHI
第 51 回広島大学歯学会総会 2018.6.9 広島
- 4) 抗菌ペプチド LL-37 の核酸導入能力と細胞内受容体 RIG-I を介した炎症誘導機構
加藤大喜, 太田耕司, 鳴瀬貴子, 石田陽子, 福井暁子, 重石英生, 武知正晃
第 72 回 NPO 法人日本口腔科学会学術集会 2018.5.12 名古屋