

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17230

研究課題名(和文)動物移植モデルを用いたエナメル上皮腫の浸潤形態の多様性に関わる因子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of factors related to diversity of invasive form of ameloblastoma using animal transplantation model

研究代表者

淵上 貴央 (FUCHIGAMI, Takao)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：40772439

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エナメル上皮腫の浸潤発育に関わる因子について、独自に構築した三次元培養実験系と動物実験系を用いて解明し、同因子を標的とした分子標的療法などの新規治療法の実現の一助となる知見を得ることを目的とした。異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株であるAM-1(叢状型由来)、AM-3(濾胞型由来)を免疫不全マウスヘマトリゲルとともに移植し、エナメル上皮腫の安定した動物実験モデルを確立した。これにより、今まで困難であった実際の病変に近い環境でのエナメル上皮腫の動態評価が可能となり、病態の異なる様々なタイプのエナメル上皮腫に対する戦略的な治療法の実現に向けた実験を進めることが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫の安定した動物実験モデルは世界的にも報告がなく、その実現は今まで困難であった生体内でのエナメル上皮腫の動態評価を可能とし、本腫瘍の病態解明に非常に有益なものになると考える。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、病態の異なる様々なタイプのエナメル上皮腫に対する戦略的な治療法の実現が可能であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study plan was to obtain novel findings that would help on realizing new treatment strategy for ameloblastoma. Immortalized human ameloblastoma cell lines derived from two pathological types, AM-1 (plexiform) and AM-3 (follicular), were transplanted with Matrigel into immunodeficient mice, and we established stable animal experimental model of ameloblastoma. This model enables the evaluation of ameloblastoma in an environment close to the actual lesion, and enables experiments to develop a novel strategic treatment for various types of ameloblastoma.

研究分野：口腔外科学

キーワード：エナメル上皮腫 歯源性腫瘍 動物モデル 三次元培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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にも関わらず高い骨浸潤能を有し、治療後の再発率も高いため、治療法として広範な顎骨切除が選択されることも少なくない。しかし、本腫瘍の成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。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を特徴とし、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浸潤する特徴(集団的細胞浸潤)が伺えるが、その多様な浸潤発育様式の要因は未解明である。その理由として、エナメル上皮腫は比較的稀な疾患であり、初代培養や細胞株化が難しいため不死化細胞株の報告は少なく、細胞生物学的解析による各組織型の比較が困難であるからだと考えられる。また、本腫瘍の生体内での動態を追究するには動物移植モデルを用いた実験系が不可欠であるが、同様の理由により安定した動物実験モデルは世界的にも報告がない。

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 AM-1 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由来の AM-3 と混合型由来の AM-4 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。

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の着想に至った。その研究結果として、Double-Layered コラーゲンゲル 半球 (DL-CGH) 培養法により、各組織型由来の腫瘍細胞株は異なる集団的細胞浸潤形態を示し、線維芽細胞の存在は腫瘍細胞の集団的細胞浸潤形態に影響を及ぼすことを見出した。これにより、腫瘍細胞と腫瘍間質に豊富に存在する線維芽細胞の相互作用が腫瘍の浸潤発育様式に影響する可能性が示唆された。しかし、浸潤形態の多様性を引き起こす生理活性因子の詳細は不明であり、今後は構築した三次元培養実験系や動物移植モデルによる検証が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株である AM-1(叢状型由来)、AM-3(濾胞型由来)、AM-4(混合型由来)および、ヒト線維芽細胞株を用いた三次元培養実験系による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因子の候補の同定を目指した。さらに各組織型の細胞株を免疫不全マウスに移植し、本腫瘍の生体内での動態を評価できるような動物移植モデルを確立した上で、細胞実験系で得た結果の検証を行う計画であった。本研究で用い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。さらに、本研究では、生体内での詳細な病態解析を行うため安定したエナメル上皮腫の動物移植モデルの確立を目指した。複数の組織型のエナメル上皮腫細胞株を樹立した研究グループは世界的に類がなく、これらの細胞株やその他の細胞種を用いた実際の病変に近い環境を再現した三次元培養法を用いた実験系は我々の知る限り報告がない。また、エナメル上皮腫の安定した動物移植モデルは世界的に見ても報告がない。従って、本研究計画における三次元培養実験系や動物実験系の確立は、本腫瘍の病態解明する上で非常に有意義であると考えられる。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。

3. 研究の方法

本研究計画で用いた DL-CGH 法は、細胞の集団的な浸潤形態を評価するのに優れた三次元培養法である(Cell Commun Adhes, 2007、真庭ら)。我々は、DL-CGH 法に独自の工夫を加え、異なる蛍光蛋白質で標識した複数種の細胞を共培養することで、エナメル上皮腫細胞の集団的細胞浸潤の評価を簡便に行うことを可能とした(FEBS Open Bio, 2017、洲上ら)。

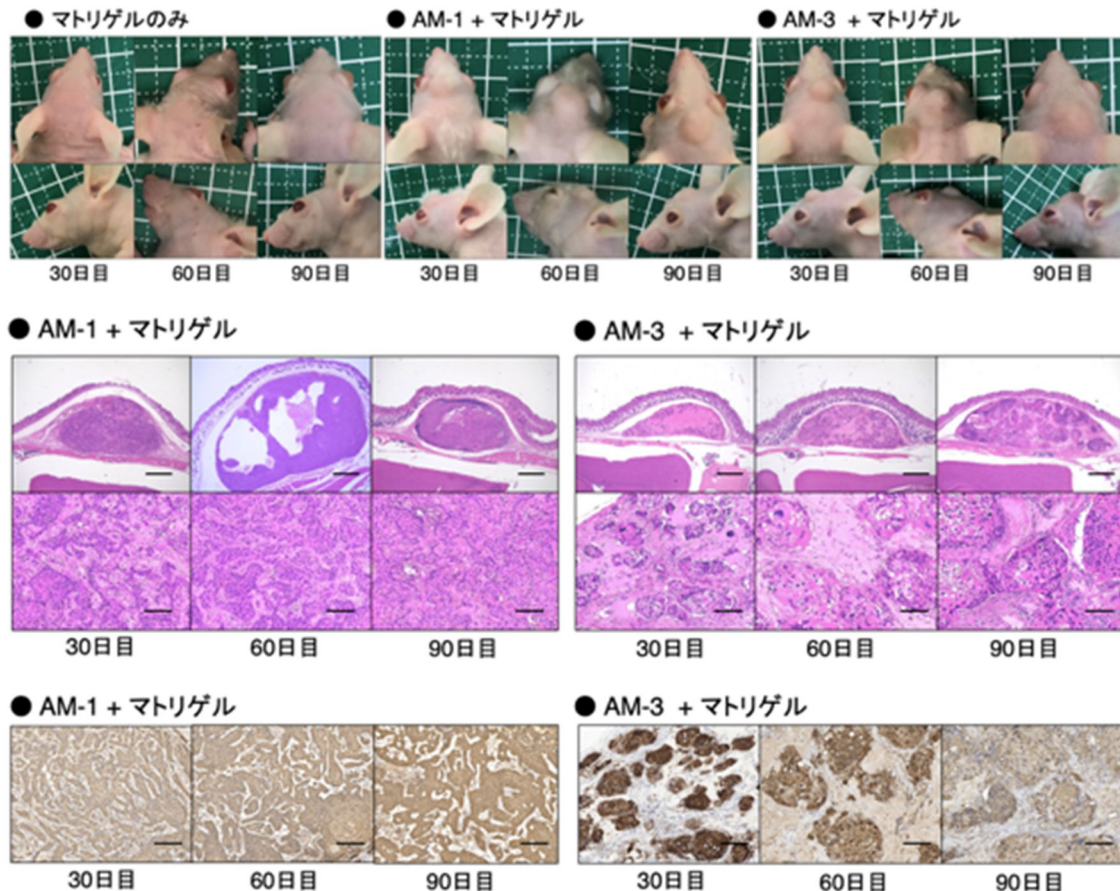
我々は、異なる組織型由来の腫瘍細胞株 AM-1、AM-3、AM-4 について DNA マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を済ませており、細胞骨格や細胞接着に関わる因子について調査することで腫瘍細胞の集団的細胞浸潤形態の変化に影響を与える因子の候補を挙げる事が可能であった。緑色蛍光蛋白質(GFP)で標識した各エナメル上皮腫細胞株と赤色蛍光蛋白質(DsRED)で標識したヒト線維芽細胞株 HFF-2 を単独または共培養による DL-CGH 法を行い、前述の候補因子の中から数種類の因子を選定し、細胞刺激や抗体による中和を行った上で、集団的細胞浸潤の形態変化について評価した。また、エナメル上皮腫の動物移植モデルの確立を目指し、樹立した異なる組織型のヒトエナメル上皮腫不死化細胞株である AM-1(叢状型由来)、AM-3(濾胞型由来)を細胞の足場と成るコラーゲン(マトリゲル)と併せ免疫不全マウス(BULB-c/nu)への移植(頭部、背部の皮下)を行った(右図)。移植後観察し、腫瘍定着後の移植部組織の切り出しを行った後、ホルマリン固定し組織切片の切り出しを行った。切片を作成後に H-E 染色による組織学的な評価を行い、また、免疫組織化学染色による蛋白発現評価を行った。



4. 研究成果

前項で記述した通り、DL-CGH 法による三次元培養法を用いて、いくつかの腫瘍細胞の集団的細胞浸潤形態の変化に影響を与える候補因子に着目し、同因子による刺激や抗体によるエナメル上皮腫細胞の浸潤様式の変化を調べた。その結果、複数のサイトカインを含めた、腫瘍細胞の浸潤様式に影響を持つ可能性のある因子が同定された。今後は同因子に注目し、同因子がエナメル上皮腫の浸潤発育に与える影響について三次元培養や動物移植実験系も用いた検証実験を重ね報告する予定である。

また、AM-1 (叢状型由来)、AM-3 (濾胞型由来) を免疫不全マウスの頭部皮下にマトリゲルに懸濁して移植したところ、すべてのマウスにおいて腫瘍の生着を認めた。移植後 30、60、90 日にマウスを屠殺し、頭部の病変組織を採取した。採取した組織はホルマリン固定後に切片化し、組織学的評価を行ったところ、コントロールとしてマトリゲルのみ頭頂部に注射したマウスでは腫瘍形成は認めなかったのに対し、腫瘍細胞の移植を行ったすべての個体にて頭頂部に腫瘍細胞の生着を示す腫瘍形成を認めた (写真上段)。また、採取した組織を組織学的に評価した結果、AM-1、AM-3 移植群はそれぞれ異なる組織像を示し、AM-1 移植群は叢状型 (写真中断左)、AM-3 移植群は濾胞型 (写真中断右) に似た組織像を示した。さらに、AM-1 移植群では移植病変内に嚢胞形成を認めた。移植したエナメル上皮腫細胞には GFP 遺伝子が導入されており、組織学的に移植した腫瘍細胞であることを確認するため、免疫組織化学染色による GFP 発現を確認したところ、形成された腫瘍の実質部分は移植した腫瘍細胞であることが確認できた (写真下段)。本結果は各腫瘍細胞が生体内にてそれぞれの由来に近い発育形態を示すことを表している。本研究により、エナメル上皮腫の代表的な 2 つの組織型である叢状型と濾胞型の安定した動物実験モデルを確立することができた。本実験モデルは、異なる組織型のエナメル上皮腫の特性を生体内で比較検討することが可能であり、本腫瘍の特異な病態を解明する糸口となり得ると考える。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takao Fuchigami, Hajime Suzuki, Takuya Yoshimura, Toshiro Kibe, Elissa Chairani, Tohru Kiyono, Michiko Kishida, Shosei Kishida, Norifumi Nakamura	4. 巻 -
2. 論文標題 Ameloblastoma cell lines derived from different subtypes demonstrate distinct developmental patterns in a novel animal experimental model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Oral Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 淵上貴央, 鈴木 甫, 吉村卓也, 岐部俊郎, 岸田昭世, 中村典史
2. 発表標題 エナメル上皮腫の病態解明に向けた新規動物実験モデルの確立
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takao Fuchigami, Hajime Suzuki, Takuya Yoshimura, Toshiro Kibe, Michiko Kishida, Shosei Kishida, Norifumi Nakamura
2. 発表標題 Establishment of novel animal experimental model for elucidation of the pathology in ameloblastoma
3. 学会等名 13th Asia Congress of Oral and Maxillofacial Surgery（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----