

令和 5 年 5 月 7 日現在

機関番号：17102
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20K09906
研究課題名(和文) エナメル上皮腫を引き起こす新しい分子基盤の解明とがんゲノム医療に向けた臨床応用

研究課題名(英文) Elucidating the mechanisms to induce ameloblastoma and its trial for the clinical setting

研究代表者
藤井 慎介 (Fujii, Shinsuke)
九州大学・歯学研究院・講師

研究者番号：60452786
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫は歯源性腫瘍の中で最も発生頻度が高い。エナメル上皮腫は歯源性上皮由来の良性腫瘍だが、再発したり、しばしば広範に顎骨吸収を呈するため、臨床的にも重要な腫瘍である。しかし、その病因は不明である。最近、エナメル上皮腫においてBRAF V600E変異に依存したMAPKシグナルの異常活性化について報告されたが、細胞増殖や顎骨吸収における機能は不明である。本研究では、低分子量Gタンパク質ADP-ribosylation factor (ARF)-like 4c (ARL4C) がエナメル上皮腫に高発現しており、その発現がエナメル上皮腫の腫瘍細胞増殖および破骨細胞形成を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメル上皮腫は口腔特有の良性腫瘍であるが、臨床的には良性腫瘍の範疇をこえるような病態を呈することがある。本研究において、エナメル上皮腫では、少なくとも2種類のシグナル伝達が活性化していることを見出した。本研究結果より、臨床的病態に関連するエナメル上皮腫の新たな病因論が明らかになったと考えられた。BRAF V600E阻害剤はすでに皮膚癌に応用されており、エナメル上皮腫にも適応されつつある。より効果的な治療効果をもたらすためには、RAF1阻害剤の併用が望まれる。本研究成果はエナメル上皮腫の新たな診断方法や予後の判定法の確立および治療への応用に発展できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ameloblastoma is an odontogenic neoplasm characterized by slow intraosseous growth with progressive jaw resorption. Recent reports revealed that ameloblastoma harbors an oncogenic BRAF V600E mutation with MAPK pathway activation. However, the precise mechanism by which MAPK pathway induces ameloblastoma is unclear. In immunohistochemical analyses of tissue specimens obtained from ameloblastoma patients, ARL4C was frequently expressed with both BRAF V600E and RAF1. ARL4C-depleted tumour cells exhibited decreased proliferation and migration capabilities. Finally, when ameloblastoma cells were co-cultured with mouse bone marrow cells and primary osteoblasts, ameloblastoma cells induced osteoclast formation. ARL4C elevation in ameloblastoma further promoted its formation capabilities. These results suggest that the RAF1-MEK/ERK-ARL4C axis, which may function in cooperation with the BRAF V600E-MEK/ERK pathway, promotes ameloblastoma development.

研究分野：口腔病理学

キーワード：Ar14c エナメル上皮腫 BRAF V600E Raf1

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 患者の約 6 割において、ゲノム異常 (*BRAF* V600E 遺伝子変異) に依存して MAPK 経路が活性化していることが報告された (Kurppa et al., J Pathol. 232, 492, 2014.)。この新たな分子基盤の解明は注目され、WHO の教科書にも記載された (WHO Classification 215, 2017.)。一方で、*BRAF* V600E は極めて悪性度の高い悪性黒色腫や大腸癌に認められる遺伝子変異であることから、この変異が良性腫瘍であるエナメル上皮腫の主な病因であるとは考えにくい。

エナメル上皮腫は歯源性腫瘍 (歯の発生に関与する組織に由来する腫瘍の総称) の中で最も発生頻度が高い (歯源性腫瘍の中で 33.4%)。エナメル上皮腫は良性腫瘍に分類されるが、再発率が高く、間質への浸潤能が高い (顕著な顎骨の破壊を伴う) ため、悪性腫瘍に準じた外科手術が行われる。そのため、発症の分子基盤に基づいた新規治療法の開発が待望されている。

研究代表者らは、*BRAF* V600E 遺伝子変異の他に、エナメル上皮腫の病因に関わる新規分子基盤があるのではないかと考え、本研究において、エナメル上皮腫の病因に関わる新たな分子基盤の解明を開始した。

また、研究代表者らは、発癌過程における低分子量 G 蛋白質 Arf-like protein 4c (ARL4C) の重要性に気づき、三次元培養系を構築してその機能解析を行ってきた。ARL4C は、MAPK 経路および Wnt 経路に発現制御され、様々な癌において腫瘍形成を促進すること (Matsumoto et al., EMBO J. 33, 702, 2014. 4) Fujii et al., Oncotarget. 7, 81571, 2016.)、ARL4C 経路はがん治療における新規の分子標的となりうること (Fujii et al., Oncogene. 34, 4834, 2015. 7) Harada et al., Mol Cancer Ther. 18, 602, 2019.) を明らかにした。

BRAF V600E 遺伝子変異の下流シグナルとして MAPK 経路が活性化することから、エナメル上皮腫において ARL4C が発現することが予測されたが、その発現やその機能は不明であった。

2. 研究の目的

エナメル上皮腫における Arl4c の発現、機能解析とその臨床応用を目的として、エナメル上皮腫の腫瘍形成・破骨細胞誘導における Arl4c の機能の解明、および Arl4c を標的とするエナメル上皮腫の抗腫瘍効果の解析、を計画した。

3. 研究の方法

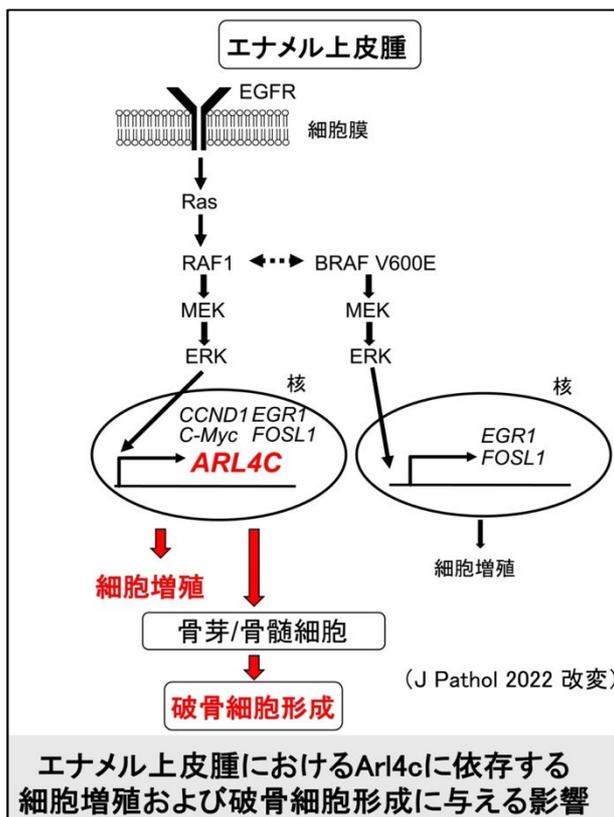
- ヒトエナメル上皮腫病理症例における Arl4c、*BRAF*V600E および Raf1 の発現について、免疫組織化学的に検討する。また、その陽性率と病理標本内の破骨細胞数を計測する
- Arl4c を高発現するヒトエナメル上皮腫細胞株 (AM-1) において CRISPR/Cas9 法を用いて Arl4c をノックアウトし、これらの細胞株を用いて腫瘍形成 (増殖能・運動能) に与える影響について検討する。
- マウス骨芽細胞と骨髄細胞の初代培養にエナメル上皮腫細胞を共存培養し、エナメル上皮腫細胞における ARL4C の発現量に依存して破骨細胞形成が亢進するか検討する。

4. 研究成果

- ヒトエナメル上皮腫の病理組織標本を用いて ARL4C の発現を免疫組織学的に検討したところ、73% の症例において、エナメル上皮腫細胞特異的に ARL4C が発現していた。ARL4C の発現は、*BRAF*V600E および Raf1 と共存する傾向にあった。

また、ARL4C 陽性症例では、多数の破骨細胞が観察された。

- 機能抑制実験 (CRISPR-Cas9 法、siRNA 法、特異的阻害剤を用いた実験) にて、エナメル上皮腫細胞株における ARL4C は RAF1-MAPK シグナルに依存しており、ARL4C の発現は細胞株の細胞増殖および運動に必要であった。また、*BRAF*V600E-MAPK シグナルと RAF1-



MAPK シグナルは独立して AM-1 の細胞増殖を制御していた。

- ・ マウス骨芽細胞と骨髄細胞の初代培養にエナメル上皮腫細胞を共存培養したところ、エナメル上皮腫細胞における ARL4C の発現量に依存して破骨細胞形成が亢進した。
また、この破骨細胞形成はRAF1およびMAPK阻害剤、または抗マウスRANKL抗体の添加により抑制された。

このように、エナメル上皮腫における RAF1-MAPK シグナル依存性の ARL4C 発現は、エナメル上皮腫の腫瘍細胞増殖と破骨細胞形成に必要であることが示唆された（図参照）。この結果、ARL4C の発現がエナメル上皮腫の新たな病因となることが明らかとなった。

これらの結果は、英国病理学会が発行する専門誌 The Journal of Pathology (Fujii et al., J Pathol. 256, 119, 2022) に掲載された。特に、破骨細胞活性化メカニズムの解明は重要な知見として、日本骨代謝学会の 1st author (http://www.jsbmr.jp/1st_author/466_sfujii.html) にも紹介された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujii Shinsuke, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 In press
2. 論文標題 The role of Wnt, ARL4C, and Sema3A in developmental process and disease pathogenesis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13325	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Alkhatib Dania Zuhier Ragheb, Thi Kim Truong Thinh, Fujii Shinsuke, Hasegawa Kana, Nagano Ryoko, Tajiri Yudai, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 246
2. 論文標題 Stepwise activation of p63 and the MEK/ERK pathway induces the expression of ARL4C to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154493 ~ 154493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2023.154493	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Fujii Shinsuke, Fujimoto Tatsufumi, Hasegawa Kana, Nagano Ryoko, Ishibashi Takuma, Kurppa Kari J., Mikami Yurie, Kokura Megumi, Tajiri Yudai, Kibe Toshiro, Wada Hiroko, Wada Naohisa, Kishida Shosei, Higuchi Yoshinori, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 236
2. 論文標題 The Semaphorin 3A-AKT axis-mediated cell proliferation in salivary gland morphogenesis and adenoid cystic carcinoma pathogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 153991 ~ 153991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.153991	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagano Ryoko, Fujii Shinsuke, Hasegawa Kana, Maeda Hidefumi, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 630
2. 論文標題 Wnt signaling promotes tooth germ development through YAP1-TGF- signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.09.012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hasegawa Kana, Fujii Shinsuke, Kurppa Kari J., Maehara Takashi, Oobu Kazunari, Nakamura Seiji, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 235
2. 論文標題 Clear cell squamous cell carcinoma of the tongue exhibits characteristics as an undifferentiated squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 153909 ~ 153909
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2022.153909	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Nagano Ryoko, Fujii Shinsuke, Wada Hiroko, Matsumura? awashima Mayu, Mikami Yurie, Moriyama Masafumi, Chikui Toru, Yoshiura Kazunori, Nakamura Seiji, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 24
2. 論文標題 Lipomatous mixed tumor of the skin with cystic formation affecting the upper lip: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 664-664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2022.11600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Shinsuke, Ishibashi Takuma, Kokura Megumi, Fujimoto Tatsufumi, Matsumoto Shinji, Shidara Satsuki, Kurppa Kari J, Pape Judith, Caton Javier, Morgan Peter R, Heikinheimo Kristiina, Kikuchi Akira, Jimi Eijiro, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 256
2. 論文標題 RAF1-MEK/ERK pathway-dependent ARL4C expression promotes ameloblastoma cell proliferation and osteoclast formation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 119 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5814	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hasegawa Kana, Fujii Shinsuke, Matsumoto Shinji, Tajiri Yudai, Kikuchi Akira, Kiyoshima Tamotsu	4. 巻 253
2. 論文標題 YAP signaling induces PIEZO1 to promote oral squamous cell carcinoma cell proliferation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 80 ~ 93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5553	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 藤井 慎介、自見 英治郎、清島 保
2. 発表標題 エナメル上皮腫における低分子量Gタンパク質ARL4Cの発現は腫瘍細胞増殖と破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井 慎介、自見 英治郎、清島 保
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質ARL4Cの発現はエナメル上皮腫における腫瘍細胞増殖と破骨細胞形成を促進する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinsuke Fujii, Eijiro Jimi, Tamotsu Kiyoshima
2. 発表標題 RAF1-MEK/ERK pathway-dependent ARL4C expression promotes ameloblastoma cell proliferation and osteoclast formation
3. 学会等名 Kyudai Oral Bioscience&OBT Research Center 6th Joint International Symposium 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shinsuke Fujii, Takuma Ishibashi, Megumi Kokura, Tatsufumi Fujimoto, Shinji Matsumoto, Satsuki Shidara, Kari J Kurppa, Judith Pape, Javier Caton, Peter R Morgan, Kristiina Heikinheimo, Akira Kikuchi, Eijiro Jimi, Tamotsu Kiyoshima
2. 発表標題 RAF1-MEK/ERK pathway-dependent ARL4C expression promotes ameloblastoma cell proliferation and osteoclast formation
3. 学会等名 TMD 2022 14th Tooth Morphogenesis and Differentiation (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤井慎介
2. 発表標題 口腔腫瘍において 異常活性化したシグナル伝達とその機能解析
3. 学会等名 第41回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 慎介
2. 発表標題 口腔がんにおいて 異常活性化したシグナル伝達とその機能解析
3. 学会等名 学術研究賞(A演説)（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における「腫瘍実質-間質連関」による細胞増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会, 2021.10.（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 慎介、長谷川 佳那、清島 保
2. 発表標題 YAP-PIEZO1シグナルは口腔扁平上皮癌の細胞増殖を制御する
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 口腔扁平上皮癌における増殖および分化転換の新規分子基盤の解明
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 歯原性腫瘍におけるWntシグナルネットワークの破綻
3. 学会等名 第109回日本病理学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsufumi Fujimoto, Shinsuke Fujii, Tamotsu Kiyoshima
2. 発表標題 Sema3A-AKT Axis In Salivary Gland And Adenoid Cystic Carcinoma Developments
3. 学会等名 第68回JADR学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤本 龍史、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 軸索ガイダンス因子Sema3aによる唾液腺発生制御メカニズムの解明
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 拓馬、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 新規癌関連遺伝子のエナメル上皮腫における高発現とその機能解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田尻 祐大、藤井 慎介、清島 保
2. 発表標題 ヒト口腔扁平上皮癌に高発現した機械受容器TRPV4はCaMK II/AKTシグナル伝達を介して癌細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学研究成果プレスリリース https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/671 口腔顎顔面病態病理学分野(九州大学) http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/about/field/field4/field4_01/

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
研究分担者	清島 保 (Kiyoshima Tamotsu) (20264054)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	臨床病理学的な解析を分担した。

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	自見 英治郎 (Jimi Eijiro) (40276598)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	骨破壊への影響の検討を分担した。

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	University College London			
フィンランド	University of Turku			
スペイン	University Complutense Madrid			