

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592222

研究課題名（和文）角化嚢胞性歯原性腫瘍におけるカルシウム感受性受容体の解析と新規治療への応用

研究課題名（英文）Study of calcium-sensing receptor in keratocystic odontogenic tumors and development of new therapy

研究代表者

葦原 慎一（KURAHARA SHINICHI）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：20304818

研究成果の概要（和文）：

角化嚢胞性歯原性腫瘍の嚢胞壁線維芽細胞におけるカルシウム感受性受容体の解析を行った。その結果、細胞外カルシウムはカルシウム感受性受容体を活性化し、骨形成因子である BMP-2 mRNA の発現を増強させることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

We studied calcium-sensing receptor in the fibroblasts isolated from keratocystic odontogenic tumors. In this study, it was shown that extracellular calcium activated calcium-sensing receptor and induced the expression of BMP-2 mRNA in the fibroblasts isolated from keratocystic odontogenic tumors,

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：カルシウム感受性受容体、角化嚢胞性歯原性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

角化嚢胞性歯原性腫瘍やエナメル上皮腫をはじめ顎骨腫瘍性病変や嚢胞性疾患では顎骨の連続性や大きな実質欠損が生じ、咀嚼機能や構音機能など顎口腔機能の喪失により日常生活のQOLが著しく低下する。罹患する患者数も多く、当科でも年間200例を越える。現在、これらの病変による骨欠損に対する治療法としては開窓術や自家骨移植術などが行われている。しかし、これらの治療法では治療期間の長期化による精神的負担や時間的負担が大きいばかりか最終的な補綴

処置開始時期が遅延する。また、自家骨移植術ではdoner側の犠牲など様々な問題がある。よって、これらの問題を解決するためには骨破壊病変による骨吸収そのものを制御する新たな治療法を確立させる必要がある。

破骨細胞の分化誘導には破骨細胞膜上に発現しているRANKやc-fmsの活性化が必要で、その各受容体のリガンドとしてRANKLやM-CSFが重要である。

われわれは角化嚢胞性歯原性腫瘍において多くの検討をおこなってきた。その結果、炎症性サイトカインであるインターロイキン

IL-1α (IL-1α) が、またエナメル上皮腫では IL-6 が裏層上皮細胞や腫瘍細胞で強く発現していることを見出した。そこで、これらのサイトカインの顎骨内における腫瘍発育機序を解明する目的で、様々な検討を行ってきた。まず、腫瘍周囲組織の線維芽細胞を分離して、同線維芽細胞における骨吸収活性化に及ぼす影響について検討を行った。その結果、IL-1α が角化嚢胞性歯原性腫瘍においては I 型コラーゼン存在下で線維芽細胞に膜結合型 MT1-MMP を発現させるとともに、MMP-2 を活性化すること、破骨細胞の分化に対しては M-CSF や OPG の発現には影響を及ぼさないが、COX-2 の発現を増強することで PGE₂ の産生を促進し、分泌された PGE₂ が autocrine / paracrine 的に作用して同線維芽細胞での RANKL 発現を増強させ、破骨細胞の分化を促進する (*J Dent Res* 84: 913-8, 2005)、ことを明らかにした。さらに興味ある知見として、腫瘍周囲線維芽細胞にはタンパク質レベル、遺伝子レベルにおいてカルシウム感受性受容体 (CaSR) を発現しており、カルシウム刺激によって活性化することを見出した。

2. 研究の目的

現在、角化嚢胞性歯原性腫瘍をはじめとする顎骨を大きく破壊吸収する嚢胞性疾患の臨床的問題を解決するためには骨破壊病変による骨吸収そのものを制御する必要がある。最近、カルシウム感受性受容体 (CaSR) が骨代謝において重要な役割を演じているのではないかと推察されている。われわれは本腫瘍周囲線維芽細胞に CaSR が発現していることを見出した。本研究は角化嚢胞性歯原性腫瘍の骨吸収や骨形成における CaSR の役割を解析し、新たな治療法の展開を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

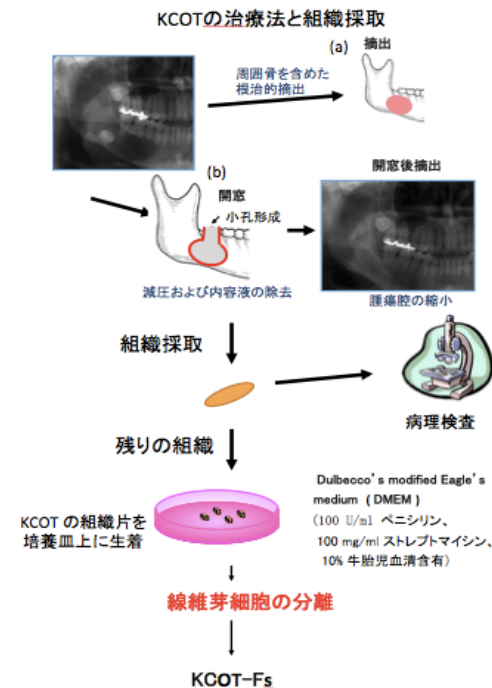
本研究では角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞による骨吸収制御機構における CaSR の役割を解析する。まず初めに角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞におけるカルシウム感受性受容体の、1) 骨基質蛋白分解酵素の産生に対する影響、2) 破骨細胞分化誘導因子発現への影響、3) 骨形成因子発現への影響、を分子生物学的手法を用いて検討し、同細胞の骨吸収への関わりを推定するため、以下のような実験を行った。

(1) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞の採取と培養

角化嚢胞性歯原性腫瘍の組織生検時に採取した生検材料の一部を患者同意のもと培養を行い、角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞 (KCOT-Fs) を得た (九州大学大学院歯学

研究院等倫理委員会 #2007-15)。

1) KCOT-Fs 培養



(2) 免疫細胞化学的染色

カバーガラス上に播種した細胞を 10% FCS を含む DMEM で 24 時間培養後、固定。続いて 0.1% TritonX-100 (Sigma) を含有した PBS にて 20 分間前処理を行い、その後ヤギ正常血清でブロッキングを行った。ウサギ抗ポリクローナル CaSR 抗体 (Affinity Bipreagents) を加え室温で 1 時間反応させた。その後二次抗体として ENVISION (DAKO) を室温で 1 時間処理し、FUCHSIN SUBSTRATE CHROMOGEN (DAKO) で発色させた。

(3) Western blotting

各反応後に培養中の細胞を溶解。15% または 7.5%、10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、ニトロセルロース膜に 100 mA で 18 時間転写した。

(4) Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

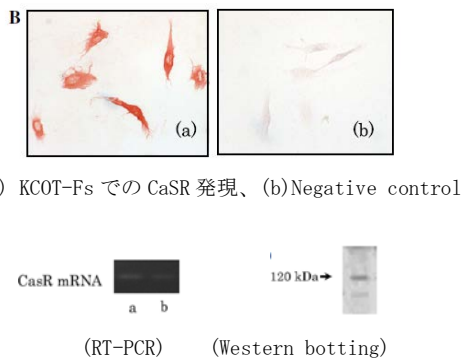
増殖遺伝子	プライマーの塩基配列
COX-2	5' -TCAAAATGAGATTGTGGGAAAAT-3' 5' -AGATCATCTCTGCTGAGTATCTT-3'
CaSR	5' -CCATCATCAACTGGCACC-3' 5' -GCAGTTGGAGAAGGGCAC-3'
β-actin	5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'

(5) Quantitative Real time-PCR

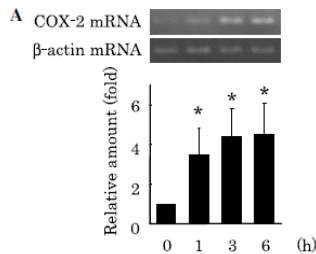
増殖遺伝子	プライマーの塩基配列
BMP-2	5'-CAACCATGTCTGATAGTTCT-3' 5'-GGACACGCCAACCATCCATT-3'
β -actin	5'-GTGGGGCGCCCAAGGCACCA-3' 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

4. 研究成果

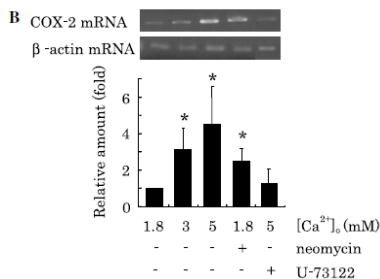
(1) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞において CaSR mRNA およびタンパクの発現がみられた。



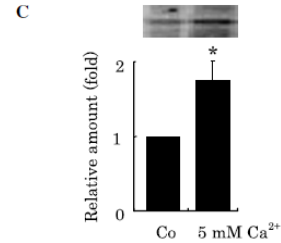
(2) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞において Ca²⁺刺激により COX-2 mRNA およびタンパクの発現が増加し、PGE₂分泌も増加した。



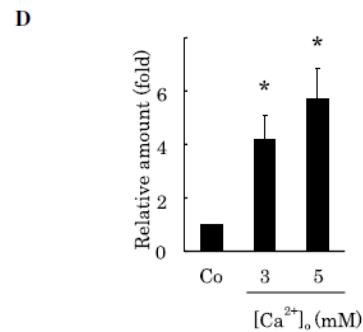
KCOT-Fs に 5 mM Ca²⁺ 刺激を加えると、刺激後 1 時間から 6 時間の間で COX-2 mRNA の発現が増強した。



CaSR アゴニストであるネオマイシン (0.3 mM) 刺激によっても COX-2 mRNA の発現は増加した。また、phospholipase C 阻害剤である U-73122 存在下で Ca²⁺ 刺激による COX-2 mRNA の発現増強は抑制された。

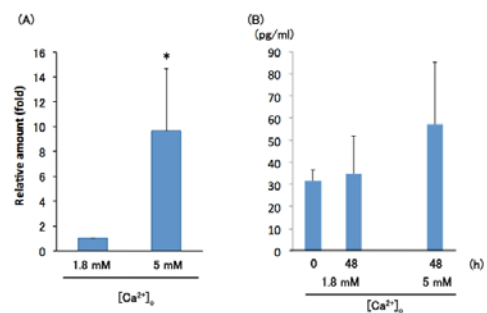


KCOT-Fs に 5 mM Ca²⁺ 刺激を 24 時間行い、ウェスタンブロットを行った。COX-2 発現は非刺激群に比べ有意に増加した。



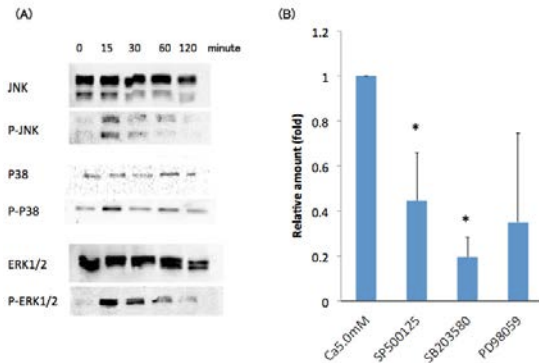
KCOT-Fs に 3 mM, 5 mM Ca²⁺ 刺激を 24 時間加えたところ、上清中の PGE₂ 濃度は濃度依存性に増加した。

(3) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞において Ca²⁺刺激により BMP-2 mRNA およびタンパクの発現が増加した。



(A) KCOT-Fs で、DMEM S(-)にて 12 時間培養後、5 mM Ca²⁺ で 7 時間刺激し、BMP-2 mRNA の発現を real-time PCR で測定したところ、BMP-2 mRNA の発現が有意に増加した。(縦軸は DMEM 0h に対する相対値)。(B) Ca²⁺ 刺激 48 時間後の培養上清中の BMP-2 濃度を ELISA 法で計測したところ、培養上清中の BMP-2 濃度の上昇が認められた。

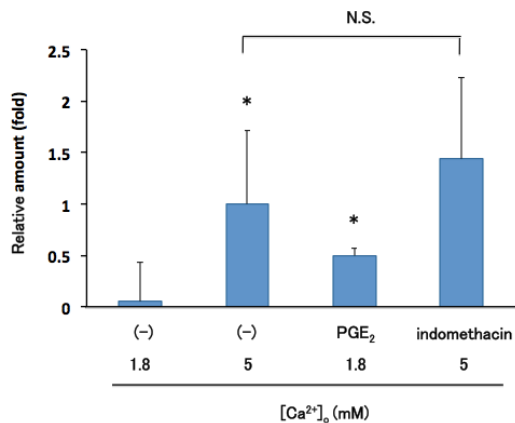
(4) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞において Ca^{2+} 刺激により p38 MAPK, JNK, ERK1/2 のリン酸化がみられた。



(A) KCOT-Fs で、5 mM Ca^{2+} 刺激により、刺激後 15 分にピークを持つ JNK、P38 MAPK、ERK1/2 のリン酸化が Western blotting で認められた。

(B) JNK、P38 MAPK、ERK1/2 の各阻害剤である、SP600125 (40 μ M)、SB203580 (20 μ M)、PD98059 (20 μ M) でそれぞれ 1 時間前処理を行ったところ、5 mM Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA の発現は、JNK、P38 MAPK 阻害剤によって有意に抑制された。

(5) 角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞において Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現は、p38 MAPK, JNK 阻害剤で抑制された。



KCOT-Fs では、PGE₂ 刺激によって BMP-2 mRNA 発現の有意な増加を認めたが、インドメタシンでの前処理は Ca^{2+} 刺激による BMP-2 mRNA 発現に影響を及ぼさなかった。

以上より、KCOT-Fs では、CaSR を刺激することによって、PGE₂ 発現とは関係なく、p38 MAPK、JNK の活性化を介して BMP-2 mRNA 発現を増加させることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

蔵原慎一 (KURAHARA SHINICHI)

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号: 20304818

(2) 研究分担者

窪田泰孝 (KUBOTA YASUTAKA)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号: 60205151

(3) 研究分担者

梶岡俊一 (KAJIOKA SHUNICHI)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号: 90274472