

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592929

研究課題名(和文) エナメル上皮腫による骨破壊・浸潤に関わる細胞間シグナルの解明と治療戦略への展開

研究課題名(英文) Molecular analyses on the intercellular signaling relating to the bone destruction of ameloblastoma

研究代表者

中村 典史 (Nakamura, Norifumi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60217875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮細胞由来の不死化細胞株(MOE-1)と濾胞型エナメル上皮腫細胞由来の不死化細胞株(AM-3)を作成し、既存の網状型エナメル上皮腫由来不死化細胞株AM-1と生物学的特性を比較した。AM-3はAM-1と類似の増殖態度、上皮系マーカーの発現を呈した。AM-1、AM-3はMOE-1よりMMP-2、-9の発現、Wnt関連遺伝子Wnt-5aやその受容体の発現が多かった。また、AM-3ではWnt-3a刺激によってMMP-9の発現が上昇することが観察された。

これらのことから、エナメル上皮腫の局所浸潤性は、Wntシグナル経路を介したMMPの発現によって制御されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Immortalized epithelial cell line derived from oral mucosa (MOE-1), as control, and immortalized ameloblastoma cell line derived from follicular-type ameloblastoma (AM-3) were established and their biological characteristics were compared to AM-1, previously established immortalized ameloblastoma cells derived from prexiform-type ameloblastoma.

AM-1 and AM-3 demonstrated positive reaction to the epithelial markers and negative to the mesenchymal one maintaining the morphological characteristics of the epithelial cell. Expressions of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in AM-1 and AM-3 than MOE-1. Wnt-5a and Wnt signaling receptors, LRP and Frizzled, of both AM-1 and AM-3 were higher than MOE-1 in the mRNA level. Furthermore, expression and activity of MMP-9 in AM-3 increased dose- and time-dependently when stimulated with Wnt-3a protein. These results suggested that local invasiveness of ameloblastoma may be regulated by MMPs expression through the Wnt signaling pathway.

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：口腔外科一般 エナメル上皮腫 歯原性腫瘍 Wntシグナル

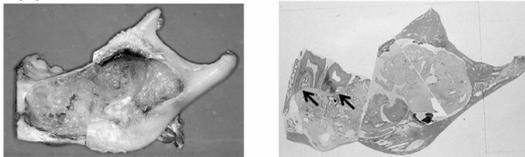
1. 研究開始当初の背景

歯原性腫瘍は口腔顎顔面領域の重要な疾患である。なかでも、エナメル上皮腫は毎年全国で300例以上の新規発症があり、周囲の顎骨への浸潤、破壊や歯根の吸収を特徴とすることから、顎顔面の変形や機能障害をおこし、QOL (quality of life) を著しく下げる。本腫瘍の治療としては、顎骨を含めた広範囲な外科的切除を行うが、術後の顔面容貌の変化および機能障害などに悩む患者も多い。また、海外、特に発展途上国では著しく腫大したエナメル上皮腫に対して適切な治療法がないのが現状である。

さまざまな腫瘍の骨破壊には、血液系幹細胞が RANKL や MCSF 刺激されて分化した破骨細胞が関与するとされているが、本腫瘍における骨破壊のメカニズムの詳細は不明である。エナメル上皮腫患者の QOL 向上のためには、腫瘍細胞が骨浸潤や歯根吸収する分子メカニズムを解明し、「根治性と機能温存の両方」を満たす治療を確立することが必要不可欠である。

われわれはエナメル上皮腫の顎骨内浸潤の病態を解析し、基底細胞に似た形態の腫瘍細胞が増殖した腫瘍では、顎骨に浸潤性に発育する傾向が強いことを見出した (代表者中村、日本口腔外科学会雑誌 37 巻: p30-45、1991 年) (図 1)。

図 1 エナメル上皮腫症例



矢印: 第一大臼歯、第二大臼歯の歯根が吸収している

さらに、エナメル上皮腫細胞の種々の性状を解析するため、初代培養を試みたが、増殖が緩やかで、最長3か月しか培養できず、再現性ある細胞生物学的解析を行うことが不可能だった。そこで、エナメル上皮腫細胞に、ヒトパピローマウイルス DNA を導入して、不死化した株 (AM-1) を作製した。AM-1 細胞の増殖が FGF によって促進されることから、エナメル上皮腫の増殖や浸潤は、細胞外からの液性のシグナル分子に依存することを見出した (代表者中村ほか、J. Oral. Pathol. Med. 27, p207-212, 1998)。

一方、近年、歯周病や整形外科疾患において MMP (マトリクスメタロプロテアーゼ) ファミリーが骨や結合組織に含まれるコラーゲンを分解して、骨の破壊や吸収に関わることが明らかにされつつあり、歯根の吸収との関連も示唆されている。

一方、MMP を標的遺伝子とする細胞内シグナル伝達系に Wnt (ウイント) シグナル経路がある。近年、大腸癌をはじめ、各種の癌で Wnt

シグナルの異常によって、細胞増殖や組織浸潤が起こり発癌にいたることが明らかにされている。Wnt は分子量約4万の分泌たんぱく質で、分泌されると周囲の細胞の受容体 Frizzled や LRP にリガンドとして結合し、細胞内の β -カテニンの分解を停止することにより、細胞内の β -カテニン・TCF 転写因子複合体の働きを活性化し、サイクリン D、MMP-9 (マトリクスメタロプロテアーゼ-9) などの標的遺伝子の発現を誘導する β -カテニン経路や、低分子量 G たんぱく質を活性化することにより細胞の形態や運動を制御する PCP 経路、細胞内 Ca^{2+} を動員して PKC (C キナーゼ) を活性化する Ca^{2+} 経路という3つの細胞内のシグナル経路を制御して、様々な細胞応答を起こすことが知られている。癌では β -カテニンや APC (Adenomatous Polyposis Coli) の変異により、 β -カテニンの分解が停止し、標的遺伝子の過剰な発現から細胞増殖の異常を来すと考えられている。

以上のことから、顎骨への浸潤、歯根吸収と特徴とするエナメル上皮腫の骨破壊のメカニズムにおける Wnt シグナルの関わりを解明することは、新たな治療法の確立へと発展することが期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、エナメル上皮腫の発症、進展に関わるシグナル伝達を解明し、新たな治療戦略確立に必要な知見を得ることである。本研究では、この疾患についてこれまで行われていた病理学や遺伝子変異の解析ではなく、エナメル上皮腫由来の不死化細胞株ならびに比較対照となる正常粘膜細胞をシステムティックに複数樹立し、本疾患であまり行われなかった細胞生物学的解析を行い、エナメル上皮腫細胞の生物学的特性を解明することを目指す。

さらに、臨床像と併せて検討することで、根拠ある骨浸潤リスクの評価システムの構築を目指すための基礎的知識を得るとともに、樹立した細胞を細胞バンクに登録し、世界中の研究者が容易にエナメル上皮腫の研究を容易に行えるようにすることも目的とする。

3. 研究の方法

1. エナメル上皮腫症例由来の不死化細胞株、正常口腔粘膜上皮由来の不死化細胞の樹立

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院口腔顎顔面外科にて採取したヒトエナメル上皮腫症例 (WHO 分類における濾胞型) の新鮮摘出材料、および正常口腔粘膜上皮組織をコラーゲナーゼで処理して、分散させ、初代培養を行った。いったん細胞を純化して凍結保存した後、国立がんセンターに送り、hTERT、CDK4、cyclinD1、ドミナントネガティブ型 p53 など

を種々の組み合わせで腫瘍細胞にウイルスで遺伝子導入し、もっとも効率よく細胞の不死化を行える条件を決定した。すでに、研究代表者らが作成していたエナメル上皮腫由来の不死化細胞 (AM-1) では、WHO 組織分類における網状型の腫瘍細胞にパピローマウイルス等の遺伝子導入で作成されたものであり、新規に作成したエナメル上皮腫細胞 (AM-3) は、パピローマウイルスや Sv40 といった癌化に関与する遺伝子を極力排除することで、より良性腫瘍としてのエナメル上皮腫のオリジナルな性格をもつ細胞株を作成することを目指した。

歯原性上皮由来のエナメル上皮腫 (AM-3)、および対照となるべき正常口腔粘膜上皮由来の各不死化細胞株 (MOE-1a, MOE-1b) については、形質転換を起こしていないか否かを以下の方法で解析した。

1) 不死化で得たエナメル上皮腫細胞株と正常口腔粘膜上皮由来細胞を長期培養し、細胞形態の観察、増殖カーブの観察を行った。

2) 上皮系マーカーのサイトケラチン-14、E-カドヘリン、ならびに間葉系マーカーであるビメンチンの発現について、免疫組織学的検索を行い、上皮細胞の特性を維持していることを確認した。

3) 癌化した細胞の特徴として、足場非依存性の増殖 (寒天培地でのコロニー形成) があるが、不死化させたエナメル上皮腫細胞および正常口腔粘膜上皮由来細胞について、この性質の有無を確認した。対照として口腔扁平上皮癌細胞 (SW480) とマウス線維芽細胞由来細胞 (L) を用いた。足場依増殖能では、 1×10^4 個の細胞を直径 60mm のディッシュで 2 週間培養しコロニー数のカウントを行った。さらに、癌化関連遺伝子の発現解析を行い、ケラチン-17、Wnt-5a、およびその受容体 (Frizzled-2)、VEGF (血管増殖因子) m-RNA 発現を観察し、癌化を起こしていないことを確認した。

4) 正常口腔粘膜上皮由来細胞 (MOE-1a, MOE-1b) については、LPS (リポリリサッカライド)、熱による死菌を用いた刺激による IL-1、IL-6、IL-8、TNF- α 、MMP-2、および MMP-9 の分泌をリアルタイム PCR で解析し、口腔粘膜上皮細胞としての特性を有していることを確認した。

5) さらに、エナメル上皮腫細胞 (AM-3) あるいは、口腔粘膜由来細胞 (MOE-1b) とマウス由来マクロファージ (RAW 細胞) との共培養を行い、RAW 細胞の破骨細胞分化の程度に差があるかエナメル上皮腫細胞 (AM-3) と口腔粘膜由来細胞 (MOE-1b) 間で比較を行った。

2. 不死化エナメル上皮腫株の Wnt、Wnt 受容

体ファミリーの発現解析、および口腔扁平上皮癌細胞株の MMP 発現の比較

過去に作成されたエナメル上皮細胞 (AM-1)、および新規に作成した不死化エナメル細胞株 (AM-3)、さらに新規口腔粘膜上皮由来細胞 (MOE-1) を用いて、Wnt-1, -2, -2b, -3, -3a, -4, -5a, -5b, -6, -7a, -8a, -8b, -9b, -10a, -10b, -11, -16 の発現を m-RNA レベルで比較した。また、Wnt 受容体の Frizzled-1, -2, -3, -4, -5, -6, 7, 7-8, -9, -10, LRP-5, LRP-6 についてリアルタイム PCR 解析で同様に発現を比較した。

さらに、エナメル上皮腫の特性は WHO 分類の濾胞型が網状型より顕著であることから、異なる組織型に由来するエナメル上皮腫細胞 Am-1 と AM-3、ならびに口腔扁平上皮癌細胞の MMP 発現の違いをリアルタイム PCR 解析で比較した。

3. Wnt 刺激による不死化エナメル上皮腫株の Wnt シグナルの活性化ならびに、MMP の活性化の解析

エナメル上皮腫細胞株が、Wnt、Wnt 受容体を発現することを確認した後、Wnt 依存性のシグナル伝達の関与について解析した。方法は、Wnt 刺激によって MMP の発現が誘導されるかどうかを確認するため、Wnt-3a 刺激による細胞質 β -カテニンの蓄積を調べた。細胞質の β -カテニンは Wnt シグナルの標的遺伝子 MMP に至までのセカンドメッセンジャーとして働くからである。

さらに、Wnt シグナルの標的分子である MMP-2, MMP-9 の発現、ならびに活性化についてゼラチンゼイモグラフィを用いたコラーゲン分解を観察し、AM-1 と AM-3 細胞間で比較した。

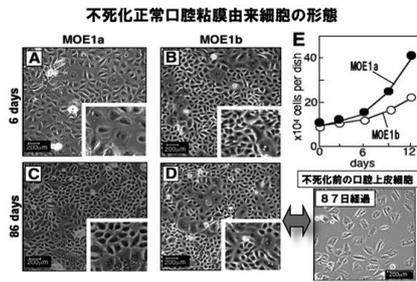
これらの研究結果をもとに、濾胞型、網状型エナメル上皮腫の臨床的、組織学的な病態の違いに Wnt シグナルを介した MMP の発現の関与について考察した。

4. 研究成果

1. エナメル上皮腫症例由来の不死化細胞株、正常口腔粘膜上皮由来の不死化細胞の樹立

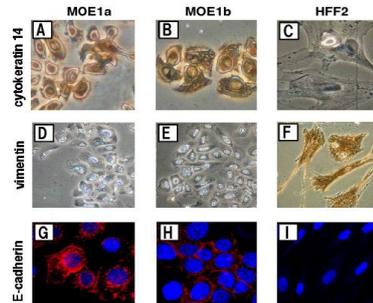
まず、正常口腔粘膜上皮由来細胞は、hTERT, CD4R24C, Cyclin D1、および p53c234 遺伝子を導入した MOE-1a 細胞と、hTERT, CD4R24C, Cyclin D1 のみを導入した MOE-1b 細胞の 2 種類を樹立した。いずれの細胞も不死化以前は 3 か月以上の継代は困難であったが、不死化することで、9 か月上の継代が可能となり、その細胞形態は、上皮細胞の特性を維持していた (図 2)。

図 2



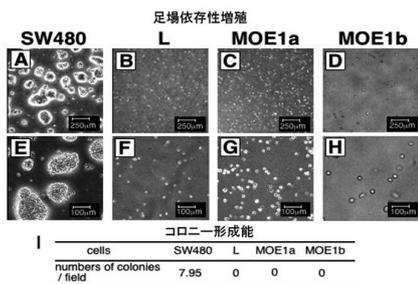
さらに、上皮系ならびに、間葉系マーカーの発現をみると、MOE-1a, MOE-1b 細胞はいずれも上皮系のサイトケラチン 14, E-カドヘリンを発現し、間葉系マーカーのビメンチンの発現はみられなかった (図 3)。

図 3 上皮マーカーの発現



また、足場依存性増殖実験においても、MOE-1a, MOE-1b 細胞、およびマウス線維芽細胞由来正常細胞 (L) はいずれも足場にならない寒天培地ではコロニー形成ができず、癌細胞 SW480 と異なっていた (図 4)。

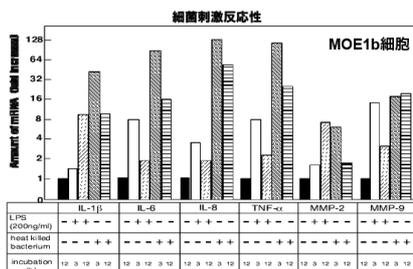
図 4



また、LPS、死菌による刺激では MOE-1a, MOE-1b 細胞いずれもサイトカインや MMP-2, MMP-9 を分泌した。

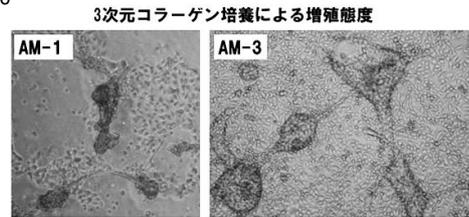
これらのことから、MOE-1a, MOE-1b 細胞いずれも癌細胞や間葉系細胞への形質転換を示さず、口腔上皮細胞としての機能を維持していることが分かった。また、より癌化に関わる遺伝子導入の少ない MOE-1b 細胞 (=MOE1) を今後の実験に使用することとした。(図 5)

図 5



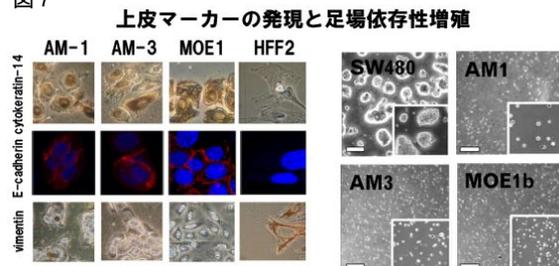
次いで、濾胞型エナメル上皮腫の抽出組織を用いて、hTERT, CD4R24C, Cyclin D1、および p53c234 遺伝子を導入した AM-3 細胞を作成した。エナメル上皮腫細胞は、不死化前は2か月しか継代できなかったが、不死化後は長期の継代が可能になった。AM-3 細胞の形態は、過去に作成した AM-1 と同様に、樹状を呈し、三次元コラーゲン培養にて AM-3 は足場を分解して浸潤するように、数珠状に連なって増殖していく様子がみられた (図 6)。

図 6



さらに、上皮系ならびに、間葉系マーカーの発現をみると、AM-1, AM-3 細胞は、MOE-1a, MOE-1b 細胞と同様に上皮系のサイトケラチン 14, E-カドヘリンを発現し、間葉系マーカーのビメンチンの発現はみられなかった。また、足場依存性増殖実験においても、AM-1, AM-3 細胞は、MOE-1b 細胞と同様に足場にならない寒天培地ではコロニー形成ができなかった。足場依存増殖の様子は、癌細胞 SW480 と明らかに異なっていた (図 7)。

図 7

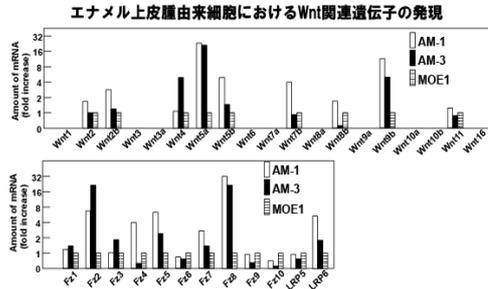


また、AM-3 と RAW 細胞 (マウス由来のマクロファージ) との共培養で RAW 細胞の破骨細胞分化が促進され、AM-3 と MOE-1b 細胞との比較では明らかに RAW 細胞との共培養の方が、破骨細胞分化を促進した。

2. 不死化エナメル上皮腫株の Wnt, Wnt 受容体ファミリーの発現解析、および口腔扁平上皮癌細胞株の MMP 発現の比較

AM-1, AM-3, MOE-1b を用いた Wnt ファミリーおよび、Wnt 受容体の Frizzled, LRP に関するリアルタイム PCR 解析の結果では、同様に発現を比較した。その結果では、エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 では Wnt-5a や Fz-2, Fz-8 の発現が多くみられた (図 8)。

図 8

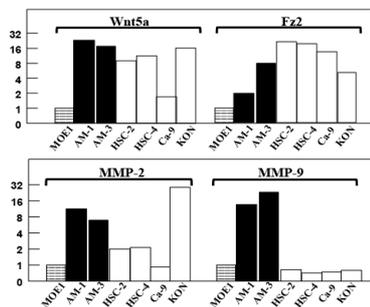


エナメル上皮腫細胞株の MMP-2、MMP-9 の発現をリアルタイム PCR で調べたところ、発現の亢進が認められた。そこで、エナメル上皮腫細胞株で発現の亢進が認められた Wnt-5a, Fz-2, MMP-2, MMP-9 について口腔がん細胞株と比較すると、複数の口腔がん細胞株と比較においても、エナメル上皮腫由来細胞は MMP-9 の高い値を示した。

MMP-9 は骨に含まれるコラーゲンを分解することが報告されており、Wnt の標的遺伝子である MMP-9 がエナメル上皮腫の局所浸潤に関与する可能性が伺えた (図 9)。

図 9

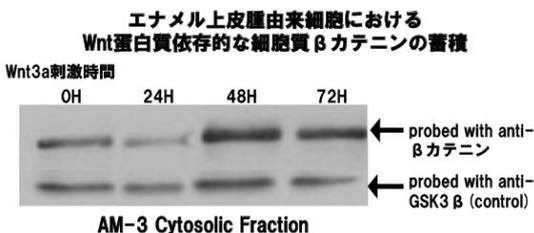
エナメル上皮腫細胞株での特異的 MMP-9 発現亢進



3. Wnt 刺激による不死化エナメル上皮腫株の Wnt シグナルの活性化ならびに、MMP の活性化の解析

AM-3 に Wnt-3a 刺激を加えた結果、刺激後 48 時間以降で細胞質 β -カテニンの蓄積が認められた。このことから、AM-3 では Wnt シグナル経路が機能して標的遺伝子の発現が起こる可能性が示された (図 10)。

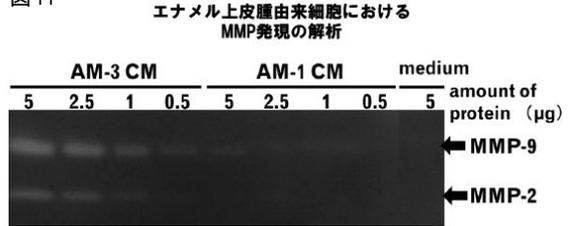
図 10



さらに、AM-1、AM-3 に Wnt3a 刺激を加えた際の、Wnt シグナルの標的遺伝子 MMP-2、MMP-9 の活性化をみると、AM-3 の方が AM-1 に比べ MMP-2、MMP-9 の活性が高く、AM-3 では MMP-2 よりも、MMP-9 の活性がより高いことが分か

った (図 11)。

図 11

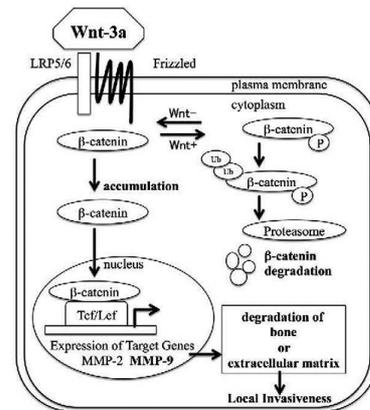


(考察)

以上の研究結果をもとに、エナメル上皮腫の骨浸潤の特性とそのメカニズムを考察すると、エナメル上皮腫は、Wnt ならびに、Wnt 受容体の発現を認め、口腔粘膜上皮と異なっていた。また、口腔扁平上皮癌との比較においても、エナメル上皮腫で明らかに MMP-2、MMP-9 の発現が多く、骨浸潤を特徴とする本腫瘍の病態と関連することが伺えた。

さらに、エナメル上皮腫細胞を Wnt-3a で刺激することにより、Wnt シグナルのセカンドメッセンジャーである β -カテニンの蓄積が促進され、Wnt-3a 蛋白依存的に骨破壊に関与し得る MMP-9 の活性化がみられたことから、本腫瘍の骨浸潤のメカニズムに Wnt シグナルが関与することが示された (図 12)。

図 12 Wnt シグナルを介したエナメル上皮腫浸潤メカニズム



一方、網状型エナメル上皮腫由来の AM-1 と濾胞型エナメル上皮腫由来の AM-3 の間で、この MMP 活性に違いがあることも興味深い結果であった。本腫瘍の複雑な病態にもこの Wnt シグナルが関与することを示唆する結果と思われた。

今後は、本課題研究によって得られた基礎的な知識をもとに、さらに複数のエナメル上皮腫由来不死化細胞株を作成して、異なる性状の研究モデルを作成しながら、臨床病態や三次元コラーゲン内、動物実験による in vivo での生物学的態度の違いを明確にしていく必要がある。そして、本腫瘍の浸潤性のリスク診断の確立、ならびに「根治性と機能温存の両方」を満たす治療を確立する研究へと結びつけていく計画である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Toshiro Kibe, Takao Fuchigami, Michiko Kishida, Mikio Iijima, Hiroshi Hijioka, Akihiko Miyawaki, Ichiro Semba, Norifumi Nakamura, Tohoru Kiyono, Shosei Kishida, A novel ameloblastoma cell line (AM3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology & Endodontics、査読有、115(6)、2013、780-788.

DOI:10.1016/j.oooo2013.03.005

Yu Nakao, Takeshi Mitsuyasu, Shintaro Kawano, Norifumi Nakamura, Shiori Kanda, Seiji Nakamura、Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. International Journal of Oncology、査読有、43(5)、2013、1377-1384.

DOI: 10.3892/ijo.2013.2081

Toshiro Kibe, Michiko Kishida, Masayuki Kamino, Mikio Iijima, Lin Clen, Mika Habu, Akihiko Miyawaki, Hiroshi Hijioka, Norifumi Nakamura, Tohoru Kiyono, Shosei Kishida、Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes. Oral Science International、査読有、8(1)、2011、20-28.

DOI:10.1016/S1348-8643(11)00009-7

〔学会発表〕(計 3件)

岐部俊郎、岸田昭世、比地岡浩志、宮脇昭彦、中村典史、エナメル上皮腫由来細胞株の浸潤能における Wnt シグナルの意義、第 66 回日本口腔外科学会学術集会、2013 年、5 月 17 日、広島

Toshiro Kibe, Shousei Kishida, Hiroshi Hijioka, Akihiko Miyawaki, Norifumi Nakamura、The role of Wnt signaling pathway in growth characteristics of Ameloblastoma cells.11th Annual Meeting of Indonesian Association of Oral and Maxillofacial Surgery、2011 年 9 月 21 日、Batam

岐部俊郎、比地岡浩志、宮脇昭彦、中村

典史、岸田昭世、新規口腔粘膜上皮細胞株 MOE1 の樹立-HPV や SV40 を用いない不死化-、第 65 回日本口腔科学会学術集会、2011 年 4 月 21 日、東京

〔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〕

日本口腔科学会学術奨励賞受賞:(平成 24 年 5 月 17 日)

6. 研究組織

研究代表者

中村 典史 (NAKAMURA NORIFUMI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号:60217875

研究分担者

岸田 昭世 (KISHIDA SHOUSEI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授
研究者番号:50274064

研究分担者

清野 透 (KIYONO TOHRU)

独立行政法人国立がんセンター・部長

研究者番号:10186356

(3)連携研究者

比地岡 浩志 (HIJIOKA HIROSHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師
研究者番号:70305150