

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592991

研究課題名(和文) エナメル上皮腫による新しい直接的骨溶解機構の解明

研究課題名(英文) Identification of novel mechanisms of direct bone demineralization by ameloblastoma

研究代表者

森田 浩光 (Morita, Hiromitsu)

福岡歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：30380463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫は日本で最も多い歯源性腫瘍であり、顎骨内での増殖・拡大は、腫瘍が放出するRANKLにより周囲の破骨細胞を活性化することにより起きると考えられてきた。しかしながら我々は、エナメル上皮腫自身が破骨細胞と同様にV-ATPase及びCLC-7を細胞膜表面に有し、それらを活性化することにより周囲骨組織を直接溶解し増殖・拡大していくことを、培養細胞(AM-1)を用いた各種実験手法及びエナメル上皮種の亜型である叢状型、濾胞型及び基底細胞型の各摘出病理組織切片を用いて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Ameloblastoma is the most common benign odontogenic tumor in Japan. It is believed that it expands in the jaw bone through peritumoral activation of osteoclasts by RANKL released from the ameloblastoma. However, we found that ameloblastoma cells (AM-1) formed resorption pits on calcium phosphate-coated plates by activation of V-ATPase and CLC-7 like osteoclasts. This demineralization activity was inhibited by application of bafilomycin A1, a typical V-ATPase blocker. Furthermore, V-ATPase and CLC-7 were detected on the surface of AM-1 cells by plasma membrane biotinylation and immunofluorescence analysis. Immunohistochemical analysis of clinical samples of ameloblastoma also showed plasma membrane-localized V-ATPase and CLC-7 in the epithelium of plexiform, follicular and basal cell types. These results suggest that the expansion of several typical types of ameloblastomas in jaw bone is attributable to its demineralization ability.

研究分野：イオンチャネル病態生理学

キーワード：口腔外科学一般 エナメル上皮腫 骨吸収 V-ATPase CLC-7

1. 研究開始当初の背景

エナメル上皮腫は、歯源性腫瘍の中で本邦では最も多く、ときに悪性化を引き起こす¹⁾。また治療としては外科的切除が第一選択であり、良性でありながらも術後のクオリティ・オブ・ライフ (QOL) は決して良いとはいえない。これまでエナメル上皮腫細胞は様々な蛋白分解酵素であるマトリックメタロプロテアーゼ (MMP) を複数 (タイプ1, 2, 7, 9, 26) 放出して腫瘍周囲のコラーゲン基質を破壊し^{2,3)}、Receptor Activated NF-kappa B Ligand (RANKL) を放出し、マクロファージを破骨細胞に分化させることにより骨吸収を促し、腫瘍周囲の骨組織を吸収していると考えられてきた⁴⁾。

しかし一方、エナメル上皮腫の代表的なX線所見の一つとして、ナイフカット様の歯根吸収像が挙げられる。この現象は歯根膜という破骨細胞が浸食できない一種の隔壁を侵害していること、また、腫瘍と異常吸収された歯根との間に破骨細胞が存在するスペースがないことから、腫瘍細胞自体が歯根膜の破壊と歯根吸収を引き起こしている可能性を強く示唆している。この仮説に基づき、我々は予備実験を行い、エナメル上皮腫自体による新たな骨溶解機構の一端を発見した。

2. 研究の目的

本研究はエナメル上皮腫細胞による新しい直接骨吸収とその機構を解明し、現在まで広く行われてきた外科的治療の補助もしくはそれに代わる新たな内科的治療法の開発を目的とした。このため、エナメル上皮腫細胞を用いた分子生物学的・免疫生化学的および電気生理学的解析を中心に、摘出エナメル上皮腫組織や口腔悪性腫瘍細胞・組織への分子生物学的・免疫生化学的解析を含めて総括的な実験を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

叢状型エナメル上皮腫由来の細胞株である AM-1、高転移性舌癌細胞株である HSC-3、正常皮膚角化細胞の HaCaT さらにはマウスマクロファージ細胞株 RAW264.7、ヒト破骨前駆細胞、マウス摘出骨髄を用いて、細胞増殖、骨器質であるリン酸カルシウムプレートを用いたピットアッセイ、一部ビオチン化を用いたウエスタンブロット、TRAP 染色などを各種受容体、トランスポーター、シグナル伝達に関わる阻害薬を用いて行った。さらに V-ATPase 及び CLC-7 について、免疫細胞染色及び叢状型、濾胞型、基底細胞型の各亜型の摘出病理組織切片を用いた免疫組織染色を行った。

なお、検定には t 検定及び一元配置分散分析を適時使用し、有意差を求めた。

4. 研究成果

エナメル上皮腫は、顎骨内で悪性腫瘍細胞と同様に receptor activator of nuclear

factor kappa-B ligand (RANKL) を発現し、破骨細胞を活性化させることにより骨吸収を行い増大していくと考えられている。しかし、臨床所見ではエナメル上皮腫と悪性腫瘍とでは腫瘍の増殖速度、骨浸潤の様式等異なる点が多く、骨吸収において異なる機序の存在も考えられる。したがって、本研究ではエナメル上皮腫の顎骨内での進展機構について検討した。

エナメル上皮腫細胞株 (AM-1) における RANKL 蛋白質の発現量は高転移性の舌癌由来口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3) に比べて極めて少ないことが、ウエスタンブロット法にて確認された (図1)。マウスマクロ

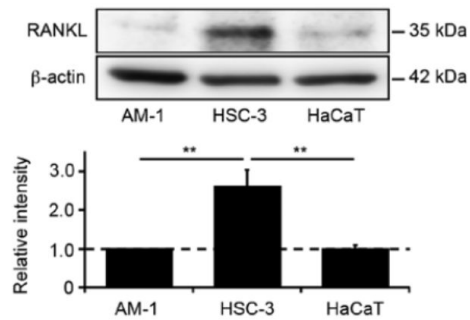


図1. AM-1、HSC-3、HaCaTにおけるRANKLの発現量の比較

ファージ細胞株 (RAW264.7) と AM-1 および HSC-3 との共培養実験において tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性多核細胞の計測により破骨細胞形性能を調べると HSC-3 との共培養では多くの TRAP 陽性多核細胞を認めたのに対し、AM-1 との共培養では TRAP 陽性多核細胞は殆ど認められなかった。このことは、低い RANKL 産生によるものと考えられた。そこで、エナメル上皮腫による直接的な骨吸収の可能性を検討した。AM-1 をリン酸カルシウムのコーティングされたプレート上で培養すると多くの吸収窩が形成された。この吸収窩は vacuolar-type H⁺-ATPase (V-ATPase) の阻害剤添加により抑制された (図2)。

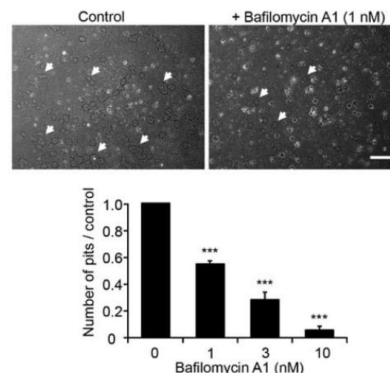


図2. AM-1による骨器質溶解とbafilomycin A1による抑制効果

さらに、AM-1 の細胞膜上への V-ATPase と H⁺/Cl⁻ exchange transporter 7 (CLC-7) の発現が膜蛋白質のビオチン化標識実験及び免疫蛍光染色にて認められた (図3)。エナメル上皮腫の病理組織切片を免疫蛍光

染色法にて観察すると培養細胞での所見と同様に V-ATPase と CLC-7 の細胞膜への局在が、叢状型、濾胞型、基底細胞型の組織切片において観察された。しかし、AM-1 の骨基質溶解活性は破骨細胞に比して 60 分の 1 程度であり、細胞増殖率も皮膚正常細胞株の HaCaT および HSC-3 に比して 5 分の 1 程度であった。

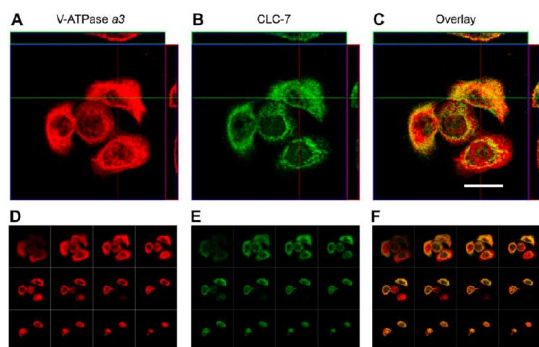


図3. AM-1におけるV-ATPase及びCLC-7の分布

以上の結果よりエナメル上皮腫の顎骨内での緩やかな進展は、緩徐な細胞増殖と骨基質溶解によりもたらされること、またこの骨溶解に関わる細胞膜上のトランスポーターの阻害薬により、内科的治療が適用できる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- 1) 柴原他. 口腔腫瘍 2008;20:245-54.
- 2) Ribeiro BF et al. Oral Diseases 2009;15: 472-7.
- 3) Freitas VS et al. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;108:417-24.
- 4) Sandra F et al. Oral Oncol 2008;41: 637-44.

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 9 件)

Yoshimoto S, Morita H, Matsubara R, Mitsuyasu T, Imai Y, Kajioka S, Yoneda M, Ito Y, Hirofuji T, Nakamura S, Hirata M. Surface vacuolar ATPase in ameloblastoma contributes to tumor invasion of the jaw bone. Int J Oncol, 査読有, 2016;48:1258-70
DOI:10.3892/ijo.2016.3350

Kato K, Okamura K, Hatta M, Morita H, Kajioka S, Naito S, Yamazaki J. Involvement of IP3-receptor activation in endothelin-1 -induced Ca²⁺ influx in rat pulmonary small artery. Eur J Pharmacol, 査読有, 2013;720:255-63

DOI:10.1016/j.ejphar.2013.09.076.

Bjorling K, Morita H, Olsen MF, Prodan A, Hansen PB, Lory P, Holstein-Rathlou NH, Jensen LJ. Myogenic tone is impaired at low arterial pressure in mice deficient in the low voltage-activated CaV3.1 T-type Ca²⁺ channel. Acta Physiologica, 査読有, 2013;207:709-20
DOI:10.1111/apha.12066

Kajioka S, Takahashi-Yanaga F, Shahab N, Onimaru M, Matsuda M, Takahashi R, Asano H, Morita H, 他 8 名. Sci Rep, 査読有, 2012;2:979
DOI:10.1038/srep00979

〔学会発表〕(計 26 件)

Morita H, Yoshimoto S, Matsuda M, Kajioka S, Yoneda M, Hirofuji T, Nakamura S, Hirata M. Interaction of TMEM16A and LRRC8A chloride channels regulates proliferation in human tongue cancer cells. The 63rd Annual Meeting of JADR, 2015年10月30~31日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Yoshimoto S, Morita H, Nakamura S, Hirata M. Intracellular trafficking of plasma membrane-bounded EGFR by high osmotic stress in squamous carcinoma cells. The 63rd Annual Meeting of JADR, 2015年10月30~31日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

吉本尚平, 森田浩光, 中村誠司, 平田雅人. 口腔扁平上皮癌細胞における圧受容による増殖制御機構. 第 57 回歯科基礎医学会, 2015年9月11~13日, 朱鷺メッセ(新潟県新潟市)

吉本尚平, 森田浩光, 中村誠司, 平田雅人. エナメル上皮腫細胞における NFATc1 および NFATc2 を介した増殖および形態変化制御機構. 第 56 回歯科基礎医学会, 2014年9月25~27日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Yoshimoto S, Morita H, Nagano K, Sugiyama G, Takeuchi H, Nakamura S, Hirata M. Altered intracellular translocation of EGFR by extracellular glucose concentration in squamous cell carcinoma cells. Experimental Biology 2014, 2014年4月26~30日, San Diego, CA, USA.

Morita H, Yoshimoto S, Sato K, Ito Y, Hirata M. Scorpion toxin modulates P2X receptor activation in rat cerebral artery myocyte. 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19~21 日, 仙台国際センター (宮城県仙台市)

森田浩光, 吉本尚平, 今井裕子, 平田雅人, 伊東祐之. 脳動脈平滑筋の低酸素刺激による P2X 受容体サブタイプの発現制御. 第 23 回日本循環薬理学会, 2013 年 12 月 6 日, 福大メディカルホール (福岡県福岡市)

森田浩光, 吉本尚平, 中村誠司, 平田雅人. エナメル上皮腫細胞の RANKL および細胞外 Ca²⁺による奇異な形態変化および形質転換. 第 55 回歯科基礎医学学会, 2013 年 9 月 20~22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

吉本尚平, 長野公喜, 杉山悟郎, 森田浩光, 中村誠司, 平田雅人. 扁平上皮癌における GLUT を介した EGFR の発現制御. 第 55 回歯科基礎医学学会, 2013 年 9 月 20~22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県岡山市)

Morita H, Yoshimoto S, Abe K, Hirata M, Inoue R, Ito Y. Identification of a nifedipine -insensitive high voltage-activated calcium channel widely distributed in mesenteric arterioles. 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 21~23 日, 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

Morita H, Yoshimoto S, Takeuchi H, Abe K, Hirata M, Ito Y. Intracellular ATP modulates vascular distinctive P2X receptors in rat arterial smooth muscle. Experimental Biology 2013, 2013 年 4 月 20~24 日, Boston, MA, USA.

森田浩光, 吉本尚平, 中村誠司, 平田雅人, 安部喜八郎. エナメル上皮腫細胞における新たな直接骨溶解機構. 第 54 回歯科基礎医学学会, 2012 年 9 月 14~16 日, 奥羽大学記念講堂 (福島県郡山市)

〔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〕

ホームページ (研究業績データベース): http://www.fdcnet.ac.jp/research/gyouseiki/personal.php?p_id=320&p_year=%&p_lang=%&

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 浩光 (MORITA, Hiromitsu)
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授
研究者番号: 30380463

(2) 研究分担者

光安 岳志 (MITSUYASU, Takeshi)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号: 00380519

中村 誠司 (NAKAMURA, Seiji)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 60189040

伊東 祐之 (ITO, Yushi)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号: 80037506

(3) 連携研究者

平田 雅人 (HIRATA, Masato)
九州大学・歯学研究院・教授
研究者番号: 60136471