

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 16 日現在

機関番号：32404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791968

研究課題名(和文) 歯原性腫瘍の発生・局所侵襲性獲得メカニズムにおける erbB および AID の関与

研究課題名(英文) Interaction of erbB and AID in development/local invasion of odontogenic tumor

## 研究代表者

宮崎 裕司 (Miyazaki, Yuji)

明海大学・歯学部・助教

研究者番号：40526547

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)：エナメル上皮腫の発生および局所侵襲メカニズムを明らかにすることを目的に、遺伝子編集酵素AIDならびに膜貫通型タンパク質erbBの関与を調べた。免疫染色を行ったところ、erbB3、AIDが叢状型エナメル上皮腫において強陽性を示した。erbB遺伝子のメチル化の有無を確認するためにエナメル上皮腫の薄切切片よりDNAを回収し、バイサルフェート処理後にPCRを行ったが、明瞭な結果は得られなかった。ついで歯原性上皮様細胞を作成し、AID強制発現、サイトカイン共培養の実験を行った。その結果、AIDとインターフェロン $\gamma$ によってアメロジェニンおよびアメロプラスチンの発現量が亢進する傾向にあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to reveal the mechanism of occurrence and local invasion on ameloblastoma, the interaction of gene editing enzyme AID and transmembrane protein erbB were studied. Immunohistochemistry showed that erbB2, AID and 5-mc express strongly in plexiform type of ameloblastoma. To confirm the DNA methylation, bisulfate-PCR reaction against the isolated DNA from segments were performed. However, this experiment did not show the clear result. Then, odontogenic like epithelial cells were produced and incubated with AID overexpressed plasmid or chronic inflammatory cytokines. This study suggested that AID and interferon-gamma tended to up-regulate the expression of amelogenin and ameloblastin. These results may imply the possibility that gene mutation on odontogenic epithelial cells by AID causes the abnormal signal transduction and upregulates the expression of ameloblastin, amelogenin and/or erbB.

研究分野：分子生物学

キーワード：歯原性腫瘍 エナメル上皮腫 erbB AID 局所侵襲

1. 研究開始当初の背景

歯原性上皮は歯の発生に関わるとされる組織・細胞であり、歯原性嚢胞や歯原性腫瘍の発生母体になるとも考えられている。口腔内でみられる代表的な歯原性腫瘍はエナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍であるが、これら病変は局所侵襲性を有し、良性腫瘍でありながら周囲の組織を徐々に浸食していく。Kumamoto はエナメル上皮腫において、病変組織におけるアポトーシス関連因子の発現量あるいはアポトーシスを生じている細胞数が、正常な歯原性上皮より多いことを報告している (Kumamoto, J Oral Pathol Med, 1997)。しかしながら、この報告は、腫瘍化による細胞の異常増殖ならびに局所侵襲性を示す形質と矛盾するものと考え、増殖細胞数が死亡細胞数より圧倒的に多いのではないかとの見解を得るに至り、上皮成長因子群およびその受容体である erbB の歯原性上皮の腫瘍化への関与を探ることとした。

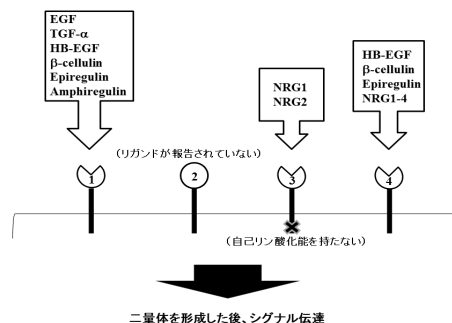
erbB は細胞増殖を司る受容体型のチロシンキナーゼであり、erbB1 から 4 までの分子からなる family を形成している。リガンドは Epithelial Growth Factor (EGF) family { EGF、Transforming Growth Factor (TGF) - $\alpha$ 、Heparin-binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF)、 $\beta$ -cellulin、epiregulin、amphiregulin } および Neuregulin (NRG) family (NRG1- $\alpha$ 、- $\beta$ 、NRG2、NRG3、NRG4) であり、このリガンドとの結合を介してホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し、細胞内シグナル伝達経路を順次活性化していく。

この、リガンドとレセプターの組み合わせ、並びに erbB 同士のダイマー形成時の組み合わせは厳密に制御されており、それぞれ異なる作用をもたらすと考えられる (右図参照)。例えば、Eckert らは末梢神経鞘腫瘍において NRG1- $\beta$  はシグナル伝達経路を活性化するが、NRG1- $\alpha$  は全く影響を与えないことを報告しているほか (Eckert et al., Glia, 2009) マウス胎仔唾液腺の初期発生においては、NRG1- $\alpha$  は唾液腺腺房数を増加させ、一方 NRG1- $\beta$  は減少させるという真逆の作用を示すことを申請者はこれまでに明らかにしている (Miyazaki et al., Dev Dyn, 2004)。erbB に関してはこのほかにも、PI3K や PLC $\gamma$ 、Src、Rho といった細胞内シグナル分子を介して細胞の移動能を高めること (Feldner and Brandt, Exp Cell Res, 2002)、integrin との相互作用を介して PI3K 依存的な移動を誘導すること (Gambaletta et al., J Biol Chem, 2000) が示されているとともに、乳癌や肺癌、大腸癌において、STAT-1、AP-1、ERK を活

性化することで、matrix metaroprotease (MMP)-1 や-7、-13 といったいくつかの MMP 産生に関わっていることも報告されている (Yuan et al., Cell Signal, 2008; Kim et al., Cancer Lett, 2009; Bao et al., Arch Biochem Biophys, 3010)。

一般的に、癌浸潤の際には MMP による間質の分解が生じると考えられているが、これは局所侵襲においても同様であると思われる。これまでに、MMP-1、-2、-9 の発現がエナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍において発現していることが報告され (Ribeiro et al., Oral Dis, 2009; Qian and Huang, J Oral Pathol Med, 2010; Ghada et al., J Egypt Natl Canc Inst, 2010) 申請者らもまた、エナメル上皮腫でヘパリン分解酵素 (heparanase) の発現がみられることを示している (González-Alva et al., J Oral Sci, 2010)。しかしながら、現在のところ、MMP あるいは heparanase 発現・産生メカニズムは未知である。加えて、エナメル上皮腫や角化嚢胞性歯原性腫瘍において、膜貫通型の糖タンパク質である podoplanin が発現していることもこれまでに申請者らは示している (González-Alva et al., J Oral Pathol Med, 2009; Okamoto et al., J Oral Pathol Med, 2009)。Podoplanin は small GTPase の一つである RhoA を活性化することで、アクチンフィラメント再構成による細胞移動あるいは上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) に関わるタンパクであり (Wicki et al., Cancer Cell, 2006; Martín-Villar et al., J Cell Sci, 2006) Src や Fos、AP-1 により発現亢進あるいは活性化を受けることが報告されている (Shen et al., J Biol Chem, 2010; Durchdewald et al., Cancer Res 2008; Kunita et al., Am J Pathol, 2011)。

以上の知見より、erbB-リガンドを介したシグナル伝達が、歯原性上皮の増殖、細胞移動能の亢進、MMP 産生等を通じ、歯原性腫瘍の発生から局所侵襲性獲得に至るまでに関与している可能性が示唆される。



## 2. 研究の目的

歯原性腫瘍の一つであるエナメル上皮腫の発生および局所侵襲への erbB タンパクならびに遺伝子編集酵素 AID の関与を調べ、そのメカニズムを特定することを目的としている。

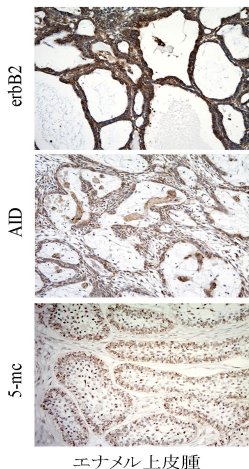
## 3. 研究の方法

まず、エナメル上皮腫、角化嚢胞性歯原性腫瘍、歯根嚢胞における erbB 分子および AID の発現を免疫染色により調べ、さらに、エピジェネティクスの影響を調べるために、5-mc に対する抗体も用いて免疫染色を行い、各病変での発現の違いを比較する。また、組織切片より DNA を回収し、遺伝子変異の有無を確認する。

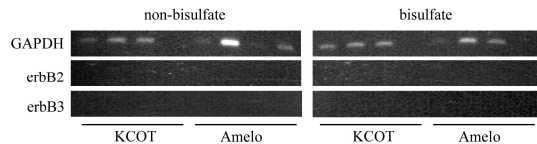
次いで、ヒト正常歯肉前駆細胞細胞 (HGEP) に対し、thymosin  $\beta$ 4 を組み込むことで歯原性細胞様細胞を作製し、AID 強制発現や炎症性サイトカイン存在下での培養を行った後、erbB やアメロジェニン、アメロプラスチン発現への影響を免疫染色およびウエスタンブロット法により調べるとともに、細胞移動能への影響も調べていく。

## 4. 研究成果

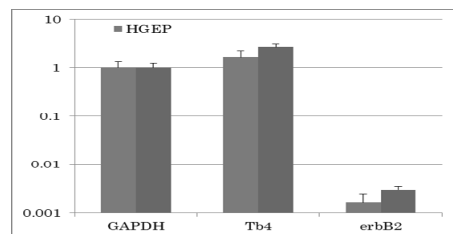
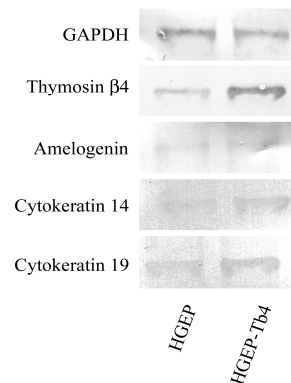
エナメル上皮腫 40 症例、角化嚢胞性歯原性腫瘍 40 症例、歯根嚢胞 20 症例に対して、各 erbB 分子 (erbB1-4)、AID、5-mc (DNA のメチル化を確認するため) を認識する抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、エナメル上皮腫において erbB2 および AID の発現が他の病変(角化嚢胞性歯原性腫瘍、歯根嚢胞)より強いこと、メチル化 (5-mc) の程度はエナメル上皮腫と角化嚢胞性歯原性腫瘍で非常に高いが歯根嚢胞ではそれほど高くないことが示された。この結果は、エナメル上皮腫においては AID による遺伝子変異が頻繁に起こっていること、erbB2 の発現亢進が導かれていること、さらに、これらの変異・異常がメチル化による保護を受けていること等の可能性を伺わせる。



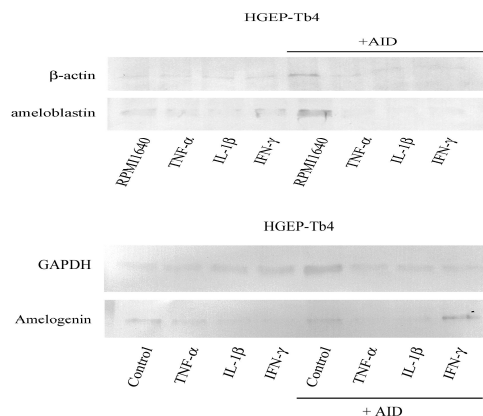
erbB 遺伝子におけるメチル化の有無を確認するために、40 症例のエナメル上皮腫の組織片より DNA を回収して bisulfate 法により処理をし、各 erbB 分子に特異的なプライマーを用いて PCR を行ったが、バンドを確認することが出来なかった。この結果は、免疫染色でみられたメチル化は erbB 以外の遺伝子に生じている可能性、もしくは、パラフィン包埋切片では遺伝子の切断が生じやすいため、プライマー設計した範囲の遺伝子が無傷な状態では存在していなかった可能性を伺わせる。



九州大学歯学部の藤原、染矢らにより、アクチン重合阻害作用を示す thymosin  $\beta$ 4 (Tb4) を正常細胞に導入することで、歯原性上皮様細胞を作り出せることが示唆された。この報告をもとに、ヒト歯肉上皮前駆細胞 (human gingival epithelial progenitor cell: HGEP cell) に Tb4 を導入して歯原性上皮様細胞 (HGEP-Tb4) を作成した。HGEP との相違を確認するために、いくつかの因子に対する抗体を用いて western blotting を行ったところ、HGEP-Tb4 では Tb4 の発現量が上昇していることが確認されるとともに、サイトケラチン (CK) 14 ならびに CK19 の発現量も上昇していることが示された。また、Tb4 あるいは erbB に特異的なプライマーを用いて real-time RT-PCR をを行い、Tb4 および erbB2 の発現量がわずかながら上昇する傾向にあることが示され、歯原性細胞では通常の細胞に比べて増殖能が高いことが考えられた。

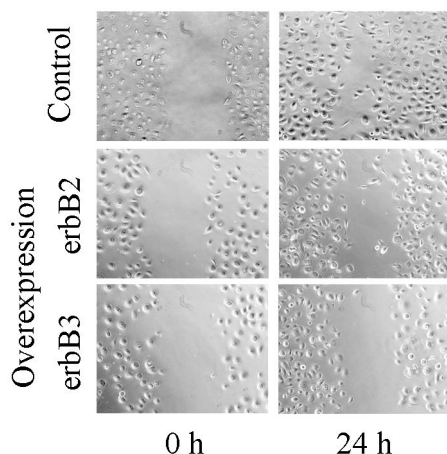


HGEP-Tb4 を炎症性サイトカイン存在下で培養し、もしくはAID 強制発現条件下で培養し、その影響を調べたところ、AID 強制発現によりアメロプラスチンの発現が亢進し、AID 強制発現に加えてインターフェロン- $\gamma$ の刺激によりアメロジェニンの発現が亢進することが示唆された。



これらの結果より、erbB は歯原性上皮の異常増殖に関与して歯原性腫瘍の発生に関わっている可能性が示され、また、エナメル上皮腫に特徴的な病変像の獲得にはAID によるアメロプラスチンやアメロジェニンの遺伝子編集 (変異) が関与している可能性が考えられた。

細胞移動能 (局所侵襲性) への erbB ならびに AID の影響を調べるために、HGEP-Tb4 に対して erbB あるいは AID の強制発現下でスクラッチ法を行った。しかしながら、これら遺伝子の強制発現は細胞移動を阻害する傾向を示し、局所侵襲には関与しないことが考えられた。



本実験にてエナメル上皮腫の発生ならびに局所侵襲メカニズムを明らかにすることは出来なかったが、歯原性上皮細胞のある遺伝子へ変異がおきることでシグナル伝達に異常が生じ、アメロジェニンやアメロプラスチン、さらには erbB の発現亢進が生じている可能性が考えられた。

## 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 1 件)

第 55 回 歯科基礎医学会学術大会・総会  
「エナメル上皮腫およびの角化嚢胞性歯原性腫瘍に関する研究 -エピジェネティック解析も含めて」  
宮崎裕司、井上ハルミ、菊池建太郎、草間薫

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 裕司 (MIYAZAKI, Yuji)  
明海大学・歯学部・助教  
研究者番号：4 0 5 2 6 5 4 7

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：