

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463088

研究課題名(和文) 歯源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の開発へ向けた研究

研究課題名(英文) A study of calcium sensing receptors in odontogenic tumors

## 研究代表者

窪田 泰孝 (Kubota, Yasutaka)

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60205151

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)：歯源性腫瘍から採取した線維芽細胞はカルシウム刺激で活性化されるカルシウム感受性受容体を発現しているが、その詳細な機能については理解されていない。本研究ではこの歯源性腫瘍由来線維芽細胞をカルシウムで刺激するとカルシウム濃度依存性に骨形成因子の1つであるBMP-2の遺伝子と蛋白の発現が増強されることが判明した。この結果からカルシウムによる安価で安全な骨形成に対する新規治療法の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The Fibroblasts isolated from odontogenic tumors express calcium sensing receptors. However, the precise function of the receptors is obscure. In this study, we showed that the expression of BMP-2 gene and protein was enhanced by calcium concentration dependent manner in the fibroblasts. These results may suggest the new methods for the bone formation by calcium which is cheap and safe.

研究分野：口腔外科学

キーワード：角化嚢胞性歯源性腫瘍由来線維芽細胞 カルシウム感受性受容体 BMP-2

### 1. 研究開始当初の背景

角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) やエナメル上皮腫 (AM) をはじめとする顎骨内腫瘍性病変や嚢胞性疾患は顎骨を大きく破壊吸収する疾患である。現在これらの病変に対する治療法としては腫瘍の摘出術が行われる。しかし、その治療により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 が著しく低下する場合もある。そのため、腫瘍に穴を開け、次第に縮小するのを待つ開窓術や腫瘍摘出後の骨欠損部へ自家骨を移植することなどが行われている。しかし、開窓術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吸収そのものを制御する安価で安全な新たな治療法を確立する必要がある。

われわれは過去に、KCOT 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 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ) が、裏層上皮細胞で強く発現していることを見出した。そこで、顎骨内における腫瘍の発育機序を解明する目的でこのサイトカインを中心に様々な検討を行った。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、(1) IL-1 $\alpha$  が KCOT 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 Matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) を発現させるとともに、MMP-2 を活性化すること (*J Dent Res* 81: 23-7, 2002)、(2) 破骨細胞の分化に対しては M-CSF や osteoprotegerin (OPG) の発現には影響を及ぼさないが、cyclooxygenase-2 (COX-2) の発現を増強することで Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) の産生を促進し、分泌された PGE<sub>2</sub> 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こと (*J Dent Res* 84: 913-8, 2005) 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遺伝子レベル、タンパク質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その受容体が活性化することを見出した (*BBRC351: 808-14, 2006*)。また KCOT から分離培養した KCOT 由来線維芽細胞 (KCOTFs) も CasR を発現していることを明らかにした。CasR は副甲状腺細胞ではじめて見いだされ、1993 年にクローニングされた蛋白で、細胞外 Ca<sup>2+</sup> によって活性化される 7 回膜貫通型の G 蛋白質共役受容体である。細胞外カルシウ

ムによってその受容体は活性化されるが、骨代謝においても重要な役割を演じているのではないかと推察できる。

KCOT において腫瘍周囲線維芽細胞は腫瘍壁の外層を形成し、周囲の骨と密接している。従って、本腫瘍の発育増大の際には骨吸収に伴い線維芽細胞周囲局所での細胞外カルシウム濃度が増大し、CaSR を介して腫瘍周囲線維芽細胞がなんらかの影響を及ぼすことが想定される。しかしながら、KCOT における CasR の機能、特に骨代謝における役割についてはまったく解明されていない。

### 2. 研究の目的

KCOT をはじめとする歯原性腫瘍は大きく顎骨を吸収破壊するが、その臨床的問題を解決するためには腫瘍による骨吸収そのものを制御する必要がある。我々の過去の研究では KCOT を病理組織学的に検索し、腫瘍組織の周囲線維芽細胞には CasR が強く発現されていることを明らかにした。また KCOT から分離培養した KCOT 由来線維芽細胞 (KCOTFs) にも CasR が発現されていることを明らかにした。CasR はカルシウムによって活性化するため、その CasR が KCOT による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想像される。従って、本研究では KCOT の骨吸収や骨形成における CasR の役割を解析し、そのことによって KCOT の発育増大を制御できる新たな治療法の開発をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞培養: KCOTFs は KCOT の摘出術または開窓術の治療により得られた組織を患者の同意の上で採取して分離培養した (九州大学大学院歯学研究院等倫理委員会 (#2007-15) で承認済み)。KCOTFs は 10% 牛胎児血清 (FCS) と抗生剤 (100 IU/ml ペニシリンと 100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン) を含む Dulbecco 変法 Eagle 液 (DMEM) で培養し、実験は無血清給培養液中で行った。

(2) siRNA 導入: human CaSR (5'-rGrCrArArCUrGrArGUrArArGrGrArGrCrArATT-3' と 5'-UUrGrCUrCrCUrArCUrCrArGUUrGrCTT-3') と scramble-siRNA、pmaxGFP Vector を electroporation (Amaxa Nucleofector) によって導入した。導入効果は pmaxGFP Vector の陽性細胞数から判定した。

(3) リアルタイム PCR: CasR mRNA、BMP-2 mRNA の発現量を CasR : 5'-ATGACTTCTGGTCCAATGAG-3' と 5'-TGCGGAACCTTGATAAACAC-3'、BMP-2 : 5'-CCCTACATGCTAGACCTGTATCG-3' と 5'-TCCTCCGTGGGGATAGAAC-3' を用いてリアルタイム PCR 法で測定した。

(4) ウェスタンブロッティング: サンプ

ルを 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転写し、各抗体を用いて蛋白発現量を測定した。抗体は抗 CasR 抗体、抗 BMP-2 抗体、抗 p-38MAPK 抗体、抗リン酸化 p-38 抗体、抗 JNK 抗体、抗リン酸化 JNK 抗体、抗 ERK1/2 抗体、抗リン酸化 ERK1/2 抗体、抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体を使用した。

細胞表面に発現した CasR の抽出には Pierce Cell Surface Protein Isolation kit を使用した。

(5) ELISA : BMP-2 分泌量は ELISA キットを用いて測定した。

#### 4. 研究成果

本研究では以下の結果を得た。

(1) KCOTFs では 1.8 mM  $Ca^{2+}$  濃度の培養液中では弱い BMP-2 mRNA の発現を認めしたが、その  $Ca^{2+}$  濃度を 3 mM、5 mM、10 mM にした場合、BMP-2 mRNA の発現量は、 $Ca^{2+}$  濃度依存性にそれぞれ  $6.9 \pm 2.1$  倍、 $9.4 \pm 3.3$  倍、 $16.8 \pm 2.0$  倍に増強した。また、CasR の刺激薬であるネオマイシン (0.3 mM) を作用させた場合、BMP-2 mRNA の発現は  $4.3 \pm 2.1$  倍に増加した。

(2) KCOTFs での BMP-2 の発現量も 5 mM  $Ca^{2+}$  やネオマイシンで増加した。また、培養液中の BMP-2 濃度も 1.8 mM  $Ca^{2+}$  の培養液中で KCOTFs を 24 時間培養した場合には  $47.3 \pm 2.9$  pg/ml/ $10^6$  cells であったが、CasR の刺激薬である R568 を作用させた場合には  $70.7 \pm 7.6$  pg/ml/ $10^6$  cells と有意に増加した。

(3) 5 mM  $Ca^{2+}$  刺激による BMP-2 mRNA 発現は PLC 阻害剤である U-73122 (10  $\mu$ M) や PKC 阻害剤であるスタウロsporin (2  $\mu$ M) で前処理すると、それぞれ  $0.13 \pm 0.05$  倍、 $0.02 \pm 0.01$  倍と有意に抑制された。

(4) KCOTFs の CasR 発現を siRNA を導入してノックダウンさせると  $Ca^{2+}$  刺激による BMP-2 mRNA 発現が  $0.44 \pm 0.05$  倍に抑制され、5 mM  $Ca^{2+}$  刺激による BMP-2 mRNA 発現も  $0.68 \pm 0.01$  倍に抑制された。一方、scramble-siRNA を導入した場合には抑制は生じなかった。

(5) KCOTFs を 5 mM  $Ca^{2+}$  で刺激すると、p38 MAPK、ERK1/2 及び JNK がリン酸化された。また、p38 MAPK、ERK kinase、JNK の各阻害剤 SB203580 (20  $\mu$ M)、PD98059 (20  $\mu$ M)、SP600125 (40  $\mu$ M) で前処理すると  $Ca^{2+}$  刺激による BMP-2 mRNA の発現がそれぞれ  $0.20 \pm 0.05$  倍、 $0.35 \pm 0.23$  倍、 $0.45 \pm 0.12$  倍に抑制された。

(6) KCOTFs を 5 mM  $Ca^{2+}$  で刺激すると、

NF- $\kappa$ B p65 の核内量が時間依存性に増加し、刺激 60 分後には  $1.89 \pm 0.02$  倍へ増加した。このことから、 $Ca^{2+}$  刺激により NF- $\kappa$ B p65 の核内移行が生じることが判明した。また、NF- $\kappa$ B の阻害剤 PDTC (20  $\mu$ M) で前処理によって 5 mM  $Ca^{2+}$  刺激による BMP-2 mRNA の発現が  $0.40 \pm 0.08$  倍に阻害された。

(7) 脂肪由来未分化間葉系細胞を BMP-2 で刺激すると骨芽細胞へ分化し、骨を形成させることが判明した

以上の結果から、KCOTFs を  $Ca^{2+}$  刺激すると CasR を介して BMP-2 を産生促進すること。また、産生された BMP-2 は脂肪由来未分化間葉系細胞の骨芽細胞へ分化させ、骨形成させる可能性が示された。これらのことから、全身に多量にある脂肪組織から得られる脂肪由来未分化間葉系細胞とカルシウムという安価で安全な薬物を用いることによって骨形成を誘導させることができる可能性が示唆された。

#### <引用文献>

- (1) Kubota Y, Oka S, Nakagawa S, Shirasuna K. 2002. Interleukin-1 $\alpha$  enhances type I collagen-induced activation of matrix metalloproteinase-2 in odontogenic keratocyst fibroblasts. J Dent Res 81:23-27.
- (2) Ogata S, Kubota Y, Satoh S, Ito S, Takeuchi H, Ashizuka M, Shirasuna K. 2006.  $Ca^{2+}$  stimulates COX-2 expression through calcium-sensing receptor in fibroblasts. Biochem Biophys Res Comm 351:808-814.
- (3) Ogata S, Kubota Y, Yamashiro T, Takeuchi H, Ninomiya T, Suyama Y, Shirasuna K. 2007. Signaling pathways regulating IL-1 $\alpha$ -induced COX-2 expression. J Dent Res 86:186-191.
- (4) Oka S, Kubota Y, Yamashiro T, Ogata S, Ninomiya T, Ito S, Shirasuna K. 2005. Effects of positive pressure in odontogenic keratocysts. J Dent Res 84:913-918.

#### 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 1 件)

Kubota Y, Imajo I, Itonaga R, Takenoshita Y. Effects of patient age and the size of primary lesions on the shrinking speed after marsupialization of keratocystic odontogenic tumors, dentigerous cysts, and radicular cysts. Br J Oral Maxillofac Surg 51: 358-362, (2013).

査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 矢内理沙、窪田泰孝、永田佳恵、森悦秀：脂肪幹細胞における細胞外カルシウムによる骨形成の検討。第59回日本口腔外科学会総会、(2014年10月17-19日)

(2) Yasutaka KUBOTA, Risa ITONAGA, Yoshie NAGATA  
Ca<sup>2+</sup> Stimulates the BMP-2 Expression via Calcium-Sensing Receptor in Fibroblasts  
IADR (ZAGREB, CROATIA, 2014/9/10-13)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

窪田 泰孝 (KUBOTA Yasutaka)  
九州大学・歯学研究院・共同研究員  
研究者番号：60205151

### (2) 研究分担者

梶岡 俊一 (KAJIOKA Shunichi)  
九州大学・医学研究院・準教授  
研究者番号：90274472

### (3) 連携研究者

( )  
研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )