

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463019

研究課題名(和文)エナメル上皮腫の骨浸潤メカニズムにおける上皮-間葉クロストーク

研究課題名(英文) Epithelial and mesenchymal cross-talk on mechanism of bone invasion of ameloblastoma

研究代表者

中村 典史 (NAKAMURA, Norifumi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：60217875

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エナメル上皮腫細胞(AM-3)と線維芽細胞(HFF-2)の相互作用を解析することにより、AM-3が分泌するIL-1に刺激されたHFF-2のIL-6, IL-8の発現を促進すること、両者を共培養するとAM-3の遊走能を高めることが分かった。このことはエナメル上皮腫細胞はIL-1分泌を介して間質線維芽細胞と相互的に働き、腫瘍の浸潤発育に有利な微小環境を構築することを示唆した。

2層コラーゲンゲル半球培養において、AM-3単独培養に比べ線維芽細胞の存在下ではAM-3は浸潤突起を積極的に形成し集団として浸潤することが伺えた。また、その浸潤突起の先端では、線維芽細胞が浸潤を誘導する様子が認められた。

研究成果の概要(英文)：Analyses of the interaction, cross-talk, between ameloblastoma cell (AM-3) and fibroblast cell (HFF-2) revealed that AM-3 secreted IL-1 and facilitated of IL-6 and IL-8 secretion of HFF-2 fibroblasts, and stimulation by the cocultured supernatant of both cells accelerated the migration activity of AM-3. These findings suggest that the ameloblastoma cells and stromal fibroblasts behave interactively via cytokines to create a microenvironment that leads to the extension of ameloblastomas.

Three dimensional observation using double layered collagen gel hemisphere culture revealed that AM-3 cells formed tuft-like invasive processes and collectively invaded into outer layer. These findings were more apparent under the presence of HFF-2 fibroblasts when compared to the single culture of AM-3. HFF-2 fibroblasts localized to the tips of the invasive tumor processes, suggesting that tumor-associated cells assist tumor cell invasion.

研究分野：口腔顎顔面外科

キーワード：歯源性腫瘍 上皮-間葉相互作用 エナメル上皮腫 骨浸潤

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、わが国では最も発現頻度が高く、周囲顎骨への浸潤・破壊や歯根の吸収を特徴とし、再発も多いことから、顎骨を含めた広範囲切除が推奨される。しかし、術後の顔面容貌の変化および発音障害などに悩む患者も多い。

近年、各種の疾患で局所の細胞同士の相互作用(クロストーク)が病態生理に関わる事が明らかになり注目を集めている。多くのがんでは腫瘍細胞と間質線維芽細胞のクロストークが、腫瘍の増殖や浸潤に関わる。関節リウマチにおいても滑膜線維芽細胞からのサイトカイン分泌や RANKL 発現がマクロファージの破骨細胞への分化、骨破壊を促進することが報告されている。これらの疾患と同様に、エナメル上皮腫細胞は、いわば「司令塔」として様々な生理活性因子を分泌し、周囲の線維芽細胞の活性化を介して、破骨細胞や破歯細胞を誘導し、浸潤性病態を呈している可能性が高い。我々は、エナメル上皮腫細胞をマウスに接種した動物モデルを作成して、腫瘍-間質のクロストークの解析を試みたが、過去に樹立したエナメル上皮腫細胞株 (AM-1) (文献 1) はヌードマウスに接種しても生着せず、細胞生物学的解析が行えなかった。これは合理的な治療を開発しようとする研究を進める上で、大きな支障だった。

そこで我々は、エナメル上皮腫の不死化細胞株と間葉系、血球系の細胞を共培養して解析することで、「実験動物を使わずとも、腫瘍が周囲の細胞に働きかける分子機構を詳しく解明できるのではないか?」と考えるに至った。申請者は、平成 23 年度-平成 25 年度の科学研究費基盤(C)により、エナメル上皮腫(濾胞型)症例から採取した新鮮摘出材料を hTERT、hCDK4、cyclinD、ドミナントネガティブ p53 などを組み合わせて腫瘍細胞に遺伝子導入し、新規に不死化エナメル上皮腫細胞(AM-3)を作成した(文献 2)。さらに、同様な手法で、対照となる健常口腔粘膜上皮細胞の不死化(MOE-1)に成功した(文献 3、図 1)。

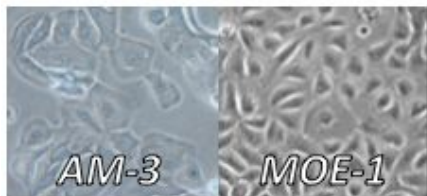


図 1 不死化新規エナメル上皮腫株 (AM-3)と口腔扁平上皮株(MOE-1)

さらに、我々は、AM-3 株が Wnt-5a やマトリクスメタロプロテアーゼ(MMP-9)を多量に分泌することやマクロファージ

との共培養で破骨細胞分化を誘導すること、RANKL を多量に分泌することも判明した。すなわち、動物モデルがなくてもエナメル上皮腫の病巣周囲の細胞間クロストークを解析する実験系が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、申請者等が過去に樹立した不死化エナメル上皮腫細胞株 AM-1, AM-3 を用いて、エナメル上皮腫の腫瘍上皮細胞と間質細胞との相互作用(クロストーク)が本腫瘍細胞の浸潤性発育、ならびに骨吸収破壊するメカニズムを明らかにする。さらに、臨床所見との関連も総合的に判断して、エナメル上皮腫の新たな診断や治療の開発につながる知見を得ることを目的とするものである。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現

エナメル上皮腫細胞の分泌する液性因子が線維芽細胞の遺伝子発現に与える影響を検討した。まず、破骨細胞の分化・活性化と関連のあるサイトカインを候補に挙げ、Realtime RT-PCR や ELISA 法による分泌状況の評価を行った。検索内容は、各種 IL、TNF、RANKL、また、数種の MMP (マトリクスメタロプロテアーゼ) についても AM-3 と AM-1 間で比較した。AM-1、AM-3 の培養上清で線維芽細胞株 HFF-2 を刺激し、遺伝子発現の変化を Realtime RT-PCR にて比較した。

(2) 線維芽細胞で発現上昇が認められた因子が腫瘍細胞に与える影響の解析

エナメル上皮腫は、歯原性組織に類似した腫瘍実質と、それを裏打ちする腫瘍間質からなっている。間質には、線維芽細胞、マクロファージ、骨芽細胞などが含まれる。エナメル上皮腫の間質線維芽細胞がエナメル上皮腫の病態に対する影響について検討した。

まず、AM-3 の培養上清の刺激を受けた線維芽細胞で発現上昇するサイトカインが、腫瘍細胞の遊走能に与える影響について Migration Assay を行った。AM-3 培養上清で刺激した線維芽細胞で著しく発現上昇していたサイトカインを同定し、そのサイトカインで AM-3 を刺激して遊走能が著明に促進するか否かを解析した。また、マトリゲルコートチャンバーを用いた Invasion Assay により、腫瘍細胞の浸潤能の変化についても評価を行った。

(3) 三次元コラーゲン培養法におけるエナメル上皮腫細胞と間葉系線維芽細胞の相互作用の解析

腫瘍細胞と間質細胞との相互作用がエナメル上皮腫の浸潤能に及ぼす影響について解明するために、マトリゲル上培養法や Double-Layered コラーゲンゲル 半球培養法 (DL-CGH 法 図 2) による三次元培養実験を用いて、エナメル上皮腫細胞と間葉系

線維芽細胞の相互作用を解析した。その際、AM-1 および AM-3 に緑色蛍光蛋白質 (GFP) を遺伝子導入した細胞株と HFF-2 に赤色蛍光蛋白質 (DsRED) を遺伝子導入した細胞株を作製した。

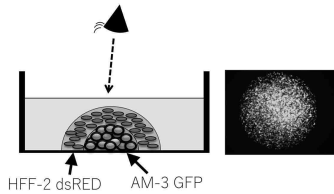


図2 エナメル上皮腫株 (AM-3) と間葉系線維芽細胞株 (HEF-2) の Double-Layered コラーゲンゲル 半球培養法

また、これらのエナメル上皮腫細胞と線維芽細胞を共培養することで、腫瘍細胞と間質細胞の相互作用が腫瘍細胞の集団的な動態にどのような影響を与えるのかについて評価した。

4. 研究成果 (1) 遺伝子発現

エナメル上皮腫細胞株 AM-3 ならびに線維芽細胞株 HFF-2 から分泌される各種インターロイキン (IL) の遺伝子発現を観察したところ AM-3 は著明に IL-1 を発現していた (図3)。

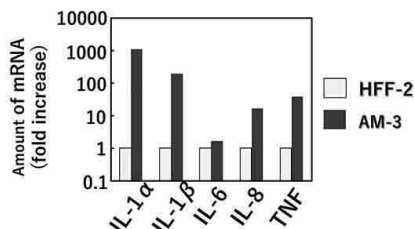


図3 AM-3 と HFF-2 の遺伝子発現

また、臨床研体のエナメル上皮腫内の嚢胞腔内容液においても、IL-1、IL-6、IL-8 が高濃度に観察された (表1)。

表1 エナメル上皮腫嚢胞腔内様液および培養上清のサイトカイン濃度

ELISA	各種サイトカイン濃度 (pg/mL)				
	IL-1α	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF
嚢胞腔内容液	218.91	688.47	13602.96	9220.11	139.84
AM-3 培養上清	61.02	11.44	596.20	619.97	57.77
HFF-2培養上清	3.72	N.D.	2527.73	106.92	15.65
病変部線維芽細胞培養上清	N.D.	N.D.	1686.64	79.59	N.D.

(2) 線維芽細胞で発現上昇が認められた因子が腫瘍細胞に与える影響の解析

AM-3 上清によって刺激された線維芽細胞は IL-6、IL-8 を高度に分泌していた。また、

上清に IL-1 の中和抗体を同時に作用させると、IL-6、IL-8 の発現は減少し、IL-1 を介してエナメル上皮腫細胞が間葉系線維芽細胞のサイトカイン発現に作用していることが分かった (図4)。

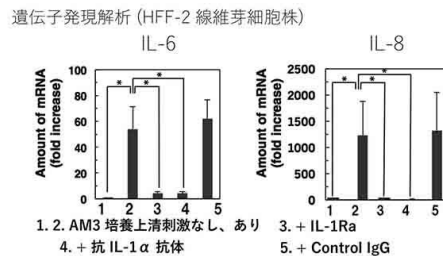


図4 AM-3 培養上清で刺激された HFF-2 の IL-6、IL-8 発現変化

さらに、IL-6、IL-8 を多く含む線維芽細胞と共培養された AM-3 の上清でエナメル上皮腫細胞を刺激した場合に、AM-3 細胞運動能は有意に高くなった。また、これに抗 IL-6 抗体、抗 IL-8 抗体をそれぞれ作用させるとエナメル上皮腫細胞の遊走能は有意に低下した (図5)。

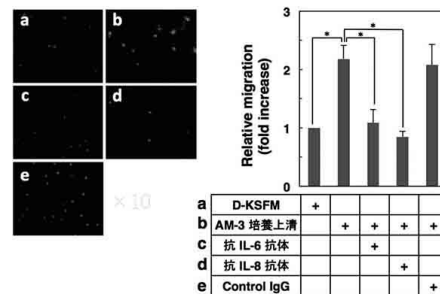


図5 共培養された上清で刺激したエナメル上皮腫上皮の遊走能の変化 (Migration Assay)

このことから、エナメル上皮腫の IL-1 分泌を介して間質線維芽細胞と相互的に働き、腫瘍の浸潤発育に有利な微小環境を構築する可能性を明らかとした。これらの結果は BBRC(2014) に掲載された。

(3) 三次元コラーゲン培養法におけるエナメル上皮腫細胞と間葉系線維芽細胞の相互作用の解析

腫瘍細胞と間質細胞との相互作用がエナメル上皮腫の浸潤能に及ぼす影響について解明するためコラーゲンゲル内三次元培養実験において、緑色蛍光蛋白質 (GFP) を遺伝子導入したエナメル上皮腫細胞株 AM-1 および AM-3 と赤色蛍光蛋白質 (DsRED) を遺伝子導入した線維芽細胞株 HFF-2 を共培養することで、腫瘍細胞と間質細胞の相互作用が腫瘍細胞の集団的な動態にどのような影響を与えるのかについて評価することが可能となった。

その結果、マトリゲル上共培養法では、

DsRED 発現線維芽細胞が腫瘍細胞間の接触を支持するとともに、腫瘍細胞の遊走を誘導している像が得られた。

また、DL-CGH 法では、腫瘍細胞と線維芽細胞がお互いに集団的に引き合いながら、腫瘍細胞が手指を伸長するように発育するエナメル上皮腫に特異な細胞遊走形態を示していた。すなわち、AM-3 単独培養では細胞間接着を保ったまま平滑な浸潤辺縁を維持しながら拡大したのに対し、線維芽細胞存在下では複数の腫瘍細胞が細胞間接着を維持したまま浸潤突起を形成し、積極的に周囲に浸潤する様子が伺えた。(図6)。

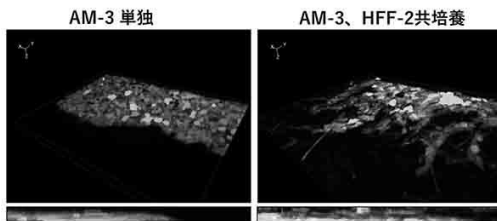


図6 DL-CGH 法による AM-3 単独培養と HFF-2 コーティング下での AM-3 三次元発育の観察

AM-1 と AM-3 の挙動を DL-CDH 法で比較すると、特に濾胞型由来である AM-3 においてその変化は著明であった。前述のように、AM-3 単独では平滑な浸潤辺縁を維持しながら拡大したのに対し、線維芽細胞存在下では複数の腫瘍細胞が細胞間接着を維持したまま浸潤突起を伸長しながら周囲に浸潤する様子が伺えた。この像は、生体内でエナメル上皮腫が樹状に腫瘍細胞突起を伸長しながら発育浸潤する像に似ていた。

一方、AM-1 は腫瘍実質細胞巢が小胞巢を形成し、母集団から散乱するように拡大し、良性腫瘍であるエナメル上皮腫の性質とは異なる挙動を示していた。しかし、いずれの細胞も、その浸潤突起の先端には線維芽細胞が存在し、浸潤を誘導する様子が認められた(図7)。これらの知見は、エナメル上皮腫の浸潤形態の変化には間質線維芽細胞が関与している可能性を示していた。以上の内容は FEBS Open Bio(2017)に掲載された。

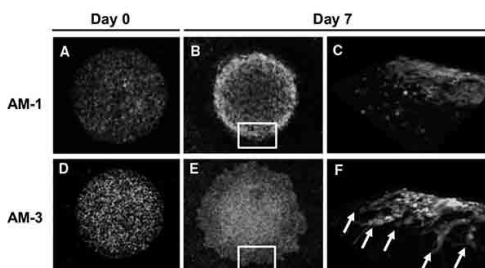


図7 DL-CGH 法による AM-3 と AM-1 の浸潤発育様相の観察

また、DL-CGH 法において MMP (マトリクスメタロプロテイナーゼ)-9 阻害剤を添加すると、腫瘍細胞の集団的な浸潤が著明に抑制されることが分かり、MMP-9 の発現は他の腫瘍細胞に比べてエナメル上皮腫では特に強い発現を示していることをこれまで報告していることと合わせて、MMP-9 はエナメル上皮腫の浸潤に深く関わる因子であることが考えられた。さらに、エナメル上皮腫細胞株に抗 IL-1 抗体を加えると、腫瘍細胞の MMP-9 の発現が有意に抑制されることが分かった。

これらの一連の研究で得られた新たな試験や研究手法は、今後エナメル上皮腫の更なる病態解明ならびに新規治療の効果判定など多方面で活用されることが期待できる。

<引用文献>

Harada H, Mitsuyasu T, Nakamura N, Higuchi Y, Toyoshima K, Taniguchi A, Yasumoto S: Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1, J Oral Pathol Med 27 巻、1998、207-212
Kibe T, Fuchigami T, Kishida M, Iijima M, Hijioka H, Miyawaki A, Senba I, Kiyono T, Nakamura N, Kishida K: A novel ameloblastoma cell line (AM3) secretes MMP-9 in response to Wnt3a and induces osteoclastogenesis, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 115 巻、2013、780-788
Kibe T, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Chen L, Habu M, Miyawaki A, Hijioka H, Nakamura N, Kiyono T, Kishida S: Immortalization and characterization of normal oral epithelial cells without using HPV and SV40 genes, Oral Science International 8 巻、2011、20-28

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 4 件)

Fuchigami T, Kishida M, Koyama H, Iijima M, Nishizawa Y, Kibe T, Ueda M, Kiyono T, Maniwa Y, Nakamura N, Kishida S, Fibroblasts promote the collective invasion of ameloblastoma tumor cells in a 3D coculture model, FEBS Open Bio、査読有、7 巻、2017、2000-2007

DOI: 10.1002/2211-5463.12313

野添悦郎、石畑清秀、大河内孝子、下松孝太、松本幸三、窪田健司、国則貴玄、宮脇正一、中村典史、エナメル上皮腫に対する顎骨切除・腸骨移植による下顎骨再建後に下顎骨後方移動術を行った 1 例、日本顎変形症学会誌、査

読有、26 巻、2016、220-227
DOI:https://doi.org/10.5927/jjdd.26.220

Hijioka H, Suzuki H, Nishihara K, Miyawaki A, Ishida T, Semba I, Nakamura N, Primary intraosseous squamous cell carcinoma in association with recurrent ameloblastoma of the mandible: A case report, Oral Maxillofacial Surgery Medicine and Pathology、査読有、27 巻、2015、693-697

DOI:org/10/1016/j.1joms.2015.02.004

Fuchigami T, Kibe T, Koyama H, Kishida S, Iijima M, Nishizawa Y, Fujii T, Ueda M, Nakamura N, Kiyono T, Kishida M, Regulation of IL-6 and IL-8 production by reciprocal cell-to-cell interaction between ameloblastoma and stromal fibroblasts through IL-1、Biochemical and Biophysical Research Communications、査読有、451 巻、2014、491-496

DOI: org/10.1016/j.bbrc.2014.07.137

〔学会発表〕(計 8 件)

淵上貴央、岸田昭世、岐部俊郎、石畑清秀、中村典史、エナメル上皮腫細胞における IL-1 依存性の MMP-9 は腫瘍細胞の浸潤に重要である、第 71 回日本口腔科学会学術集会、愛媛、2017

Fuchigami T, Kishida S, Kibe T, Nakamura N: The presence of stromal fibroblasts affect the collective cellular migration of tumor cells in ameloblastoma、23rd International Conference on Oral and Maxillofacial Surgery, Hong Kong、2017

淵上貴央、岸田昭世、岐部俊郎、中村典史、エナメル上皮腫の病態解明に有用な蛍光蛋白質安定発現細胞株を用いた新規三次元培養、第 70 回日本口腔科学会学術集会、福岡、2016

Nakamura N, Ameloblastoma -Diagnosis and treatment based on the growth characteristics-、Invited lecture at Dental Faculty of Airlangga University、Surabaya、2016

中村典史、エナメル上皮腫の開窓術、第 69 回日本口腔科学会学術集会ワークショップ、大阪、2015.

淵上貴央、岐部俊郎、小山浩史、岸田想子、中村典史、岸田昭世、歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫における IL-1 を介した間質線維芽細胞との相互作用、第 37 回日本分子生物学会年会、横浜、2014

淵上貴央、岐部俊郎、小山浩史、岸田想子、中村典史、岸田昭世、エナメル上皮腫の微小環境の解明-IL-1 を介した間質線維芽細胞との相互作用-、第 59 回日本口腔外科学会学術大会、千葉、2014

Nakamura N、Ameloblastoma-Diagnosis and treatment based on the growth characteristics、Invited Seminar at University of Indonesia、Jakarta、2014

〔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

中村 典史 (NAKAMURA Norifumi)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授
研究者番号：60217875

(2) 研究分担者

岸田 昭世 (KISHIDA Shosei)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：502740645

(3) 連携研究者

岐部 俊郎 (KIBE Toshiro)
鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教
研究者番号：50635480

(4) 研究協力者

岸田 想子 (KISHIDA Michiko)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教
研究者番号：40274089