九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

口腔領域における腫瘍の進展・増殖機構に関する研究

吉本，尚平

https://hdl.handle.net/2324/1654804

出版情報：九州大学，2015，博士（歯学），課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

（様式３）

氏　　名　：　吉 本　　尚 平

論 文 名　：　口腔領域における腫瘍の進展・増殖機構に関する研究

区　　分　：甲

論 文 内 容 の 要 旨

口腔は、摂食、構音など、人間が生活を営むにあたり不可欠な機能を担っている。したがって、その機能が損なわれることは、生活の質の著しい低下につながる。加えて、口腔領域は、骨、歯などの硬組織および筋、粘膜などの軟組織が限られた空間の中に機能的に混在しており、極めて特殊な環境であると言える。種々の疾患が起こるが、臨床的に問題になるのは腫瘍性疾患である。そこで本研究では、口腔領域に発生する良性および悪性腫瘍の増殖様式について検討した。

第一部では良性歯原性腫瘍であるものの、術後の再発が多く、顎骨吸収を伴いながら拡大するエナメル上皮腫の骨吸収機構について検討した。エナメル上皮腫は本邦における良性歯原性腫瘍の中で最も頻度の高い疾患であり、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。

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、ウエスタンブロッティング法にて確認された。マウスマクロファージ細胞株 (RAW 264.7) 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。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。

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。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が示唆された。

第二部では口腔内の悪性腫瘍のうち最も高頻度で発生する扁平上皮癌について、浸透圧受容に伴う細胞増殖機構の検討を行った。口腔扁平上皮癌細胞では上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor：EGFR) が過剰に発現しており、細胞増殖に重要な働きをしている。そのため、口腔扁平上皮癌治療の標的分子とされ EGFR 阻害剤が臨床応用されている。一方、慢性炎症状態と発癌との関わりは種々の癌において報告されており、炎症における絶え間ない浸透圧の変化が癌細胞の増殖、浸潤に影響を与えることが想像できる。

このような背景のもと、口腔扁平上皮癌細胞株 (HSC-3) において、圧受容に関する実験を行い、高浸透圧により活性化された転写因子、nuclear factor of activated T-cells 5 (NFAT5) が EGFR の糖鎖修飾を伴う細胞膜移行とそれによる細胞増殖の亢進に関わっているという結果を得た。

まず HSC-3 を用い、低グルコース含有培地で培養した。この培地にマンニトールを添加し浸透圧を約 20 % 上昇させると、NFAT5 の発現亢進とともに、EGFR の細胞膜移行および糖鎖付加が免疫蛍光染色および細胞膜分画のウエスタンブロットにより確認された。この結果を受け、細胞内脱水素酵素活性測定および BrdU 取り込み試験による細胞増殖の検討をおこなうと、約 20 % の浸透圧上昇で、著明な増殖亢進を認めた。この増殖亢進は、培地に EGFR 阻害剤である CP380736 およびチロシンキナーゼ阻害剤である genistein を添加することにより抑制された。浸透圧上昇による EGFR を介する細胞増殖制御機構の存在が考えられたため、shRNA を用いて NFAT5 のノックダウン実験を行った。その結果、ノックダウン細胞において浸透圧上昇に伴う EGFR の細胞膜移行は抑制され、さらに糖鎖修飾を担う N 型糖鎖修飾関連遺伝子 DPAGT1 の発現低下が認められた。

以上の結果から、HSC-3 において、浸透圧上昇刺激により転写因子である NFAT5 を介した DPAGT1 の発現上昇が惹起され、それに引き続く EGFR への糖鎖付加および小胞体から細胞膜への移行が促進され、細胞増殖が亢進されることが示唆された。