

## 論 文 要 旨

**Analysis of the Wnt signaling pathway in ameloblastoma local invasiveness using novel established ameloblastoma- and normal oral epithelium-derived cell lines.**

新規エナメル上皮腫および正常口腔粘膜細胞株の樹立と  
エナメル上皮腫の局所浸潤における Wnt シグナル経路の解析

岐 部 俊 郎

**【序論および目的】**

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若年者の顎骨に好発する歯原性腫瘍の一つである。エナメル上皮腫は良性腫瘍に分類されているにもかかわらず高度の骨浸潤能があり、高い再発率を有する。治療法としては広範囲な外科的切除もしくは保存療法が選択されるが、それぞれ患者の QOL (quality of life) の低下や局所再発などの問題点も多い。これまでにエナメル上皮腫では高度に顎骨に浸潤するのは皮膚の基底細胞に似た形態の腫瘍細胞であることやエナメル上皮腫の組織型と浸潤様式との関連が報告されているが、エナメル上皮腫研究のための細胞株がわずかしかないために、エナメル上皮腫の浸潤の分子生物学的メカニズムはいまだ不明の点が多い。

そこで、我々は新たに HPV や SV40 を用いない手法でエナメル上皮腫と正常口腔粘膜上皮細胞の不死化株を作成し、エナメル上皮腫について細胞生物学的実験系の確立を行った。さらに、エナメル上皮腫は歯原性上皮の増殖を起原とされていることから、歯の発生にかかわる Wnt シグナルがエナメル上皮腫の性状においてどのような役割を持つかどうか調べた。Wnt は分子量約 4 万の分泌蛋白質ファミリーで、ある種のがんでは細胞の増殖や、細胞遊走能、マトリクスメタロプロテアーゼ (MMP) の分泌亢進による組織浸潤能に関わっていることが報告されている。しかし、エナメル上皮腫においてはこれらの機能はいまだ不明のままである。

本研究では、上記の新たに作成した細胞株を用いて、エナメル上皮腫における Wnt シグナルの役割を調べ、Wnt シグナルが浸潤などに関与しているかを検討した。

**【材料および方法】****1. エナメル上皮腫症例及び、正常口腔粘膜上皮由来の不死化細胞株の樹立**

鹿児島大学病院口腔顎顔面外科にて採取したヒトエナメル上皮腫症例、および正常口腔粘膜上皮の新鮮摘出材料をコラゲナーゼで処理して、分散させ初代培養をおこなった。初代培養細胞に hTERT、hCDK4、cyclinD<sub>1</sub>、ドミナントネガティブ型 p53 などを種々の組み合わせレンチウイルスベクターを用いて、細胞に遺伝子導入し不死化を行い、新規エナメル上皮細胞株 (AM-3) と口腔粘膜上皮細胞株 (MOE1) を樹立した。上記細胞株を既存のエナメル上皮腫細胞株 AM-1 や口腔がん細胞株などと、形態、増殖速度、遺伝子発現、上皮マーカーの発現、足場依存性の増殖を確認し、樹立した細胞株が

それぞれエナメル上皮腫由来、正常口腔粘膜上皮由来であることを確認した。

## 2. AM-1、AM-3、及び MOE1 細胞を用いた Wnt シグナル経路関連分子の発現

新たに樹立した上記細胞株及び、既存のエナメル上皮腫細胞株 (AM-1) から RNA を抽出して、Wnt シグナル経路関連遺伝子の発現を real-time-RT-PCR で解析を行った。

## 3. MMP-2、MMP-9 の発現と口腔がん細胞との比較

HSC-2、HSC-4、Ca-9、KON の 4 種類の口腔がん細胞株と、AM-1、AM-3、MOE 1 細胞から RNA を抽出して、Wnt-5a、Fz-2、MMP-2、MMP-9 の発現を real-time-RT-PCR で解析を行った。

## 4. MMP-2、MMP-9 の酵素活性の解析

AM-1、AM-3 細胞における MMP-2、MMP-9 の酵素活性を解析するために、AM-1、AM-3 の培養上清を濃縮して、ゼラチンザイモグラフィを行った。

## 5. Wnt-3a 蛋白質刺激時の MMP-2、MMP-9 の酵素活性の解析

Wnt-3a 蛋白質を用いて AM-1、AM-3 細胞を刺激したにおける MMP-2、MMP-9 の酵素活性を解析するために、ゼラチンザイモグラフィを行った。

### 【結果】

#### 1. 正常口腔粘膜上皮由来細胞の不死化とその特性の解析

- 1.1. HPV を用いない新たな方法を用いて正常口腔粘膜上皮細胞株 (MOE) を樹立した。樹立した細胞の形態は不死化前と大きな変化はなく上皮マーカーを発現しており、EMT や足場非依存性の増殖などのがん化の特徴は認められなかった。
- 1.2. MOE 細胞は細菌刺激や LPS 刺激反応性にサイトカインや MMP-2、MMP-9 の発現の上昇が認められた。

#### 2. エナメル上皮腫由来細胞の不死化とその特性及び Wnt シグナル経路の解析

- 2.1. MOE 細胞を作製した方法を用いて、新規エナメル上皮腫由来細胞株 (AM-3) の樹立に成功した。樹立した細胞の形態は不死化前と大きな変化はなく上皮マーカーを発現しており、EMT や足場非依存性の増殖などのがん化の特徴は認められなかった。
- 2.2. エナメル上皮腫では Wnt-5a、Frizzled (Fz) -2、Fz-6、MMP-2、MMP-9 などのいくつかの Wnt 関連遺伝子が正常口腔粘膜上皮と比べて発現が亢進していた。
- 2.3. 口腔扁平上皮癌細胞株との比較では、エナメル上皮腫由来細胞の MMP-9 発現の亢進が見られた。
- 2.4. エナメル上皮腫由来細胞では Wnt-3a 蛋白質刺激により、細胞質  $\beta$  カテニンの蓄積が認められた。
- 2.5. エナメル上皮腫由来細胞における MMP-9 の活性及び発現は Wnt-3a 蛋白質依存性に亢進した。

### 【結論及び考察】

本研究では、HPV を用いない手法でエナメル上皮腫 (AM-3) と正常口腔粘膜上皮由来細胞株 (MOE) の樹立を行い、エナメル上皮腫における再現性のある細胞生物学的実験系を確立した。MOE1 細胞株はエナメル上皮腫などの歯原性腫瘍だけではなく、口腔がんを含む他の口腔疾患の研究においても有用な細胞株であると思われる。

エナメル上皮腫由来細胞ではいくつかの Wnt と Wnt レセプターの発現の亢進が認められた。また、Wnt-3a 蛋白刺激によって細胞内  $\beta$  カテニンの蓄積、MMP-9 の活性及び発現は Wnt-3a 蛋白依存性に亢進することが認められた。この結果から、エナメル上皮腫において Wnt シグナルの活性化が MMP-9 の発現や活性上昇を引き起こし、局所浸潤を引き起こしている可能性があることが示唆された。