



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	エナメル上皮腫のbuddingにおける侵襲性増殖メカニズムの解析
Author(s)	篠原, 早紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13874号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13874
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/93152
Type	doctoral thesis
File Information	Saki_Shinohara.pdf



博 士 論 文

エナメル上皮腫の budding における
侵襲性増殖メカニズムの解析

令和2年3月申請

北海道大学
大学院歯学研究科口腔医学専攻

篠 原 早 紀

目次

要旨	3
緒言	5
材料と方法	9
結果	19
考察	31
結論	35
謝辞	35
参考文献	36

要旨

エナメル上皮腫は、顎骨内に生じる歯源性腫瘍である。良性腫瘍でありながら、侵襲性に増殖することが特徴的であり、再発の一因となっている。エナメル上皮腫の亜型の一つに嚢胞型エナメル上皮腫があり、さらに内腔型と壁在型に分けられる。壁在型は嚢胞壁から腫瘍が周囲の間質に進展する構造が特徴的であり、この構造を budding という。壁在型は摘出術のみでは腫瘍の残存の可能性がある、内腔型に比べて再発率が高いことから、budding は侵襲性増殖や再発に関係しているのではないかと考えられる。しかし、budding 形成メカニズムについてはまだ解明されていない。そこで我々はエナメル上皮腫の budding 形成分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞増殖や運動能に関与する Δ Np63 と RNA 結合タンパクである HuR に着目し本研究を行った。HuR は mRNA の AU-rich element (ARE) に結合し、ARE-mRNA を安定化する機能がある。一方、 Δ Np63 は ARE-mRNA として知られている。

免疫組織染色によりヒトエナメル上皮腫の budding 領域において、 Δ Np63 および HuR の発現領域が一致していた。さらにヒトエナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 細胞を用いた *in vitro* 解析により、HuR タンパクは Δ Np63 mRNA に結合し、その mRNA の安定化を介して Δ Np63 発現亢進に関与していることが見出さ

れた。CMLD-2 により HuR と ARE-mRNA との結合を阻害すると、AM-1 細胞の増殖能や、運動能、3 次元マトリックス内の浸潤能が低下した。

Δ Np63 をノックアウトした AM-1 細胞では上皮系マーカーの一つ、細胞間接着分子 E-cadherin の発現亢進が認められ、ヒトエナメル上皮腫 budding 領域では免疫組織染色により E-cadherin 発現が認められなかった。これらのことから、 Δ Np63 の上皮間葉転換（EMT）への関与が疑われたが、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin の発現は budding 領域には認められず、 β -catenin の核内移行を示す所見は認められなかった。これらの結果から、エナメル上皮腫の budding 領域では細胞間接着が低下しており上皮の性質が一部失われているものの、完全な上皮間葉転換（EMT）が起きているわけではないことが示唆された。

本研究により、エナメル上皮腫の budding 形成には、HuR による Δ Np63 の mRNA の安定化とタンパクの発現亢進による細胞間接着の低下が関与していることが示唆された。さらに研究を進め budding 形成メカニズムを明らかにすることができれば、エナメル上皮腫の侵襲性増殖や再発に対する新たな治療法の開発にも寄与することが期待される。

緒言

エナメル上皮腫は、主に顎骨内に生じる良性の歯原性腫瘍である。好発年齢は 20～30 歳代と比較的若く、下顎臼歯部～上行部にかけて好発する¹⁾。本腫瘍は良性腫瘍にもかかわらず、侵襲性に増殖することや、再発をきたすことが特徴的²⁾であるが、侵襲性増殖や再発の詳細なメカニズムは未だ不明である。エナメル上皮腫は若年者に好発するが、根治的な治療のためには顎骨切除が一般的であるため、術後の患者の Quality Of Life (QOL)に長期間大きな影響を及ぼす。

WHO (2017) の分類では、エナメル上皮腫の亜型は単嚢胞型エナメル上皮腫、骨外性／周辺型エナメル上皮腫、転移性エナメル上皮腫に分類される³⁾。エナメル上皮腫の亜型の一つである単嚢胞型エナメル上皮腫は、嚢胞壁面の腫瘍の増殖の有無によって内腔型 (luminal variant : luminal, intraluminal) と、壁在型 (mural variant) とに分かれる (図 1)⁴⁾。内腔型では嚢胞腔を裏装する腫瘍細胞の増殖がみられないか、または嚢胞腔内へ増殖しており、摘出のみでも再発は少ない。しかし、嚢胞腔を裏装する腫瘍細胞が周囲の間質組織に進展するように増殖している壁在型は、摘出のみでは腫瘍が残存する可能性があり、内腔型に比べて再発しやすい傾向にある⁵⁾。壁在型のように、腫瘍が

周囲の間質組織に向かって突起状に増殖している構造を病理組織学的に budding と呼ぶ⁶⁾。 Budding の有無により治療法が異なり，エナメル上皮腫の診療ガイドライン（2015 年版）では，再発しやすい壁在型では摘出術に加えて，周囲骨の搔爬や削除，また，化学的焼灼法や凍結外科などの併用が推奨されている。

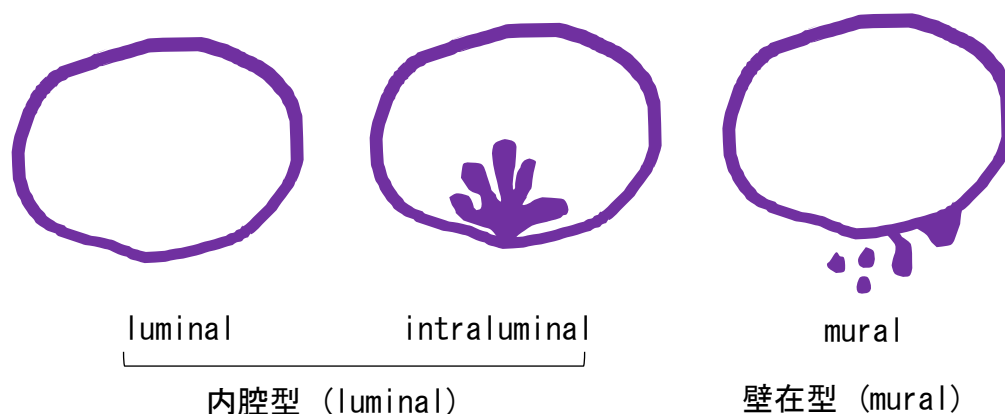


図1 単嚢胞型エナメル上皮腫の variant

単嚢胞型エナメル上皮腫は，壁面への腫瘍の増殖の有無により，内腔型と壁在型に分けられる．（Barnes L, IARC, 2005，エナメル上皮腫診療ガイドライン（2015 年版）より改変）

したがって，エナメル上皮腫の侵襲性増殖や再発機序を理解する上で budding は重要な組織構造である．我々は budding の組織学的特徴から本領域においては細胞の増殖能や運動能が亢進しているのではないかと推測した．これまで，歯源性腫瘍の中でも侵襲的な増殖様式を示すものにおいてはΔNp63 の発現が高

い傾向にあるという報告がいくつかある⁷⁾⁸⁾。そこで、本研究においてはエナメル上皮腫における Δ Np63 について着目することとした。

Δ Np63 は p63 のアイソフォームの一つである。p63 は p53 ファミリーに属する転写因子の一つで、TAp63 と Δ Np63 に大別される⁹⁾。 Δ Np63 は N 末端の一部が欠損したものである。TAp63 と Δ Np63 には多くの機能があり、TAp63 は p53 の機能に類似した機能を持ち¹⁰⁾、アポトーシスの誘導や細胞周期の制御などの機能があることが知られている¹¹⁾一方、 Δ Np63 は TAp63 や p53 のドミナントネガティブ的な作用を持ち、細胞増殖⁷⁾や運動能促進に関わり、TAp63 と Δ Np63 では異なる機能を持つことが報告されている¹¹⁾。

Δ Np63 mRNA に結合する RNA 結合タンパクには HuR¹²⁾や RBM38¹¹⁾が報告されている。HuR は mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する AU-rich element (ARE) と結合し、ARE-mRNA を核外へ輸送し安定化させる機能がある (図 2)。HuR は通常核に存在しているが、ストレスなどの刺激により ARE-mRNA を核外へ輸送し一時的に安定化する。また、HuR が細胞質にも恒常的に局在している細胞では、ARE-mRNA の核外への輸送が行われ、これが ARE-mRNA の安定化につながる。つまり HuR による ARE-mRNA の安定化には、HuR の細胞質の局在が重要となる。

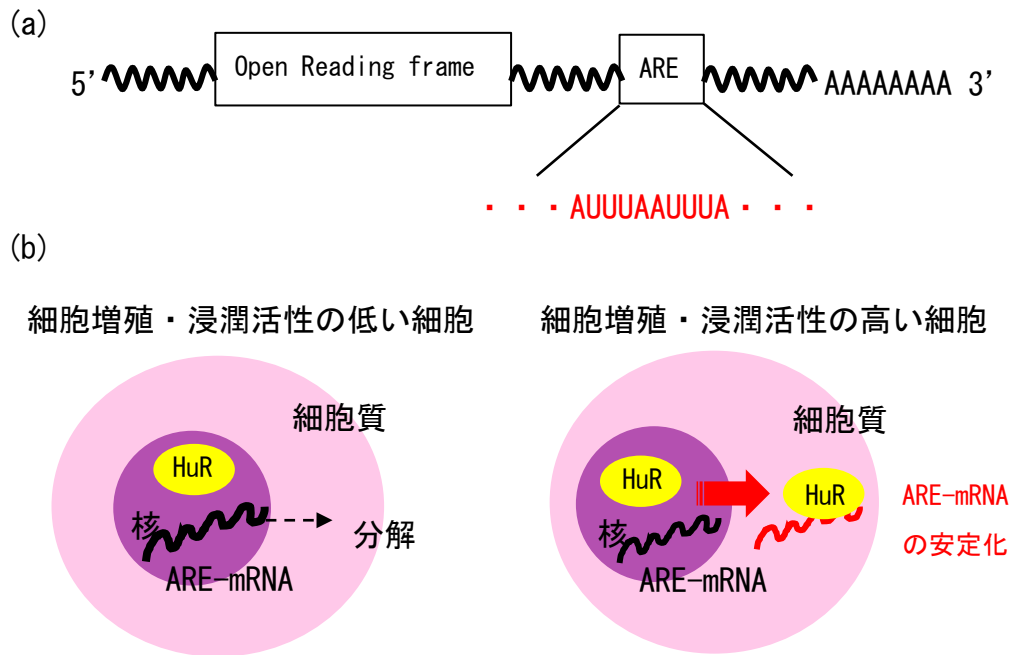


図2 ARE-mRNA の構造と ARE-mRNA の挙動
(a) ARE-mRNA の構造, (b) ARE-mRNA の挙動

これまで、我々を含む多くの研究室が、様々ながん細胞で HuR が核外輸送されることにより ARE-mRNA が安定化され、その安定化が細胞の癌化に寄与することを報告してきた¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾。しかし、エナメル上皮腫における HuR の機能についてはこれまで報告されていない。そこで、今回エナメル上皮腫の侵襲性増殖や再発に関係する budding 形成における Δ Np63 mRNA と RNA 結合タンパク HuR との関係について検討した。

材料と方法

1) 対象組織

免疫組織染色に用いた組織標本は、手術摘出組織の研究への利用への同意を含む手術説明承諾書を事前に取得した患者の手術標本を用いた。具体的には、2008年から2016年に北海道大学病院歯科口腔外科を受診し、病理組織学的にエナメル上皮腫と診断され摘出手術を施行された症例のうち、病理組織学的に budding 構造が認められた 20 例を用いた。

2) 細胞培養

ヒトエナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 細胞²¹⁾を、human recombinant Epidermal Growth Factor 1-531-53 (EGF 1-53) とウシ脳下垂体抽出物 (BPE) を添加した Keratinocyte-SFM (gibco, USA) 中で、37°C, 5%CO₂ 大気下にて培養した。AM-1 細胞は、岩手医科大学原田英光教授より供与いただいた。

3) 免疫組織染色

免疫組織染色は通法に従い、ホルマリン固定パラフィン包埋組織から切片を薄切し、脱パラフィン後、TE バッファー (Tris/EDTA 溶液 : pH9.0) を用いて加熱処理し抗原の賦活化を行った。3%H₂O₂ を 5 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活性化し、一次抗体として抗 p40 抗体 (BC 28, Lot. #H1804, ニチレイバイオサイエンス, Japan) を未希釈で用いた。抗 HuR 抗体 (3A2,

sc5261, Lot. #12816, Santa Cruz Biotechnology, USA) は 5000 倍, 抗 E-cadherin 抗体 (M106, Lot. #019FDF, Takara, Japan) は 500 倍, 抗 N-cadherin 抗体 (13A9, Lot. #C0217, Cell Signaling Technology, USA) は 50 倍, 抗 Vimentin 抗体 (3B4, Lot. #20043919, Dako, USA) は 200 倍, 抗 β -catenin 抗体 (9562S, Lot. #9, Cell Signaling Technology, USA) は 400 倍に希釈して用いた. 次にペルオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体と, 抗 β -catenin 抗体に対してのみペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体を二次抗体とし室温で反応させ, 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) にて発色させた後, マイヤーヘマトキシリンにて核染色を行った.

4) RNA Immunoprecipitation (RIP) assay

RiboCluster Profiler RIP-Assay kit (MBL, Japan) を用いて, RIP assay を行った. AM-1 細胞と抗 HuR 抗体を用いて行い, 結合阻害実験では, HuR と ARE との結合阻害剤である CMLD-2 (Calbiochem, Germany) ²²⁾を用い, CMLD-2 (20 μ M) 及び DMSO で 24 時間処理した AM-1 細胞を使用した.

まず, protein G Sepharose Fast Flow (Sigma Aldrich, USA) を 25 μ l と等量の PBS を混合し, 4°C, 2000g で 1 分間遠心分離した後, 上清を捨て, protein G の洗浄を 3 回行った. これに 1ml の Wash Buffer (Wash Buffer, 1.5mM DTT)を加えた後, 15 μ g の抗 HuR 抗体 (RN004P, MBL, Japan) と

抗 IgG 抗体をそれぞれ加え、4°C で 30 分以上インキュベーションし、Protein G と抗体を反応させた。次に preclear 用に別の Protein G を先ほどと同様に PBS で洗浄後、Wash Buffer, Lysis Buffer (Lysis Buffer, 1.5mM DTT, 50U/mL RNase OUT <Invitrogen, USA>, protease inhibitor) で洗浄した。

15cm dish 上の AM-1 細胞を PBS で洗浄後、5ml の PBS を入れ、セルスクレイパーで細胞を回収した。PBS で細胞を洗浄後、500 μ l の Lysis Buffer を加え攪拌し、4°C で 10 分間インキュベーションした。その後、4°C, 12000g, 5 分間遠心分離し、細胞溶解液を回収し preclear 用の Protein G を tube に加えて、4°C で 1 時間反応させた。Preclear 後、4°C, 2000g, 1 分間遠心分離し、上清を input 用に 10 μ l 回収した。抗体と反応させた Protein G を Lysis Buffer で洗浄した後、preclear 後の上清を加え、4°C, 3 時間インキュベーションした。インキュベーション後、Wash Buffer で数回洗浄し、上清を捨てた。

Preclear 後の溶液と抗体と反応させた溶液からそれぞれ RNA を抽出した。RNA 抽出には Kit に含まれる試薬をプロトコル通りに用いた。400 μ l の Master mix (10 μ l Solution I, 390 μ l Solution II) をそれぞれの tube に加え、攪拌した。これに 250 μ l の Solution III を入れて攪拌し、4°C, 2000g, 2 分間遠心分離した。上清に 2 μ l の Solution IV を加え、600 μ l のイソプロパノールを加えて攪拌し、-20°C で 20 分間インキュベーションした。その後、4°C,

12000g, 10 分間遠心分離し, 上清を捨て, 得られたペレットを 70%エタノールで洗浄した. 再度 70%エタノールを加え, 4°C, 12000g, 3 分間遠心分離し, 沈殿したペレットを 20 μ l の RNase free water で溶解した. その後吸光度計で Total RNA 量を測定し, cDNA を合成した.

cDNA 合成には, RivaTra Ace qPCR RT Master Mix (TOYOBO, Japan) を用いた. 測定した RNA 濃度をもとに RNA 量が 500ng/6 μ l になるように RNase free water を用いて調整した. これに 2 μ l の gDNA Remover 添加の 4 $\times$ DN Master Mix を加え, 37°C で 5 分間インキュベーションし, ゲノム DNA 除去反応を行った. 次に 2 μ l の 5 $\times$ RT Master Mix II を加えて計 10 μ l とし, 37°C で 15 分間, 50°C で 5 分間インキュベーションし逆転写反応を行った. その後, 98°C で 5 分間インキュベーションし酵素失活反応を行った. これを RT-PCR における Δ Np63 mRNA 発現量の解析に用いた.

5) RT-PCR

Power Cyber Green Master Mix (Takara, Japan) を用いて RT-PCR を行った. RNase free water 1.8 μ l にサンプル cDNA 溶液を 1 μ l, Master Mix を 5 μ l, Plus solution 1 μ l, 5pmol の Forward および Reverse プライマーをそれぞれ 0.6 μ l 加え, 全量を 10 μ l とした. 反応条件は, 熱変性は 1 サイクル目を 95°C で 1 分間, 2 サイクル目以降は 95°C で 15 秒間行い, アニーリングは

55℃で15秒間、伸長反応は72℃で30秒間行い、全39サイクル行った。また、スタンダードカーブを作成し、解析に用いた。使用したプライマー配列はΔNp63 (Fw : 5' -TACCTGGAAAACAATGCC-3' , 5' -ACTGCTGGAAGGACACG-3') で、内部標準として GAPDH (Fw : 5' -ATCCTGGGCTACACTGAGCA-3' , Rv : 5' -TGCTGTAGCCAAATTCGTTG-3') を用いた。

6) CMLD-2 によるΔNp63 mRNA の半減期への影響の解析

35mm dish に AM-1 細胞を 1.0×10^5 cells 播種し、24 時間培養後に Actinomycin D ($5 \mu\text{g/ml}$) (富士フイルム和光純薬, Japan) を添加した。その2時間後に、CMLD-2 ($10 \mu\text{M}$) を添加し、30 分毎に RNA を回収した。コントロール群には DMSO を同量用いた。

RNA の抽出は Acid Guanidium-Phenol-Chloroform 法を用いた。Dish 中の細胞に TRI Reagent (Sigma Aldrich, USA) を $500 \mu\text{l}$ 加え、セルスクレイパーで破碎し回収した。これに $100 \mu\text{l}$ のクロロホルムを入れて攪拌し、4℃で15分間静置した後、4℃、12000rpm で15分間遠心分離した。水層を採取し、 $250 \mu\text{l}$ のイソプロパノールを加え、攪拌後、4℃で10分間静置した後、4℃、12000rpm で10分間遠心分離した。上清を除去した後に得られた RNA ペレットを70%エタノールで洗浄し、4℃、7500rpm で5分間遠心分離し、再沈殿させたペレットを $20 \mu\text{l}$ の RNase free water で溶解した。その後、分光光度計

(Nano Drop 1000, Thermo Scientific, USA)で Total RNA の濃度を測定した.

測定した RNA 濃度をもとに, cDNA を合成し, RT-PCR での Δ Np63 mRNA 発現量の解析に用いた.

7) ウェスタンブロッティング

6 well plate に 1.0×10^5 cells/well の AM-1 細胞を播種し, 24 時間後に培地を交換し, CMLD-2 を最終濃度 $5 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $20 \mu\text{M}$ になるようにそれぞれ添加した. コントロールには DMSO を同量添加した. 試薬添加 24 時間後に細胞を PBS で洗浄後, NP-40 Lysis Buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris HCl, 50mM NaF, 5mM B-Gly, 1mM Na₃V04, 10% Glycerol, protease inhibitor)を $100 \mu\text{l}$ 加え, セルスクレイパーを用いて細胞を破碎した. その後 4°C , 15000rpm で 10 分間遠心分離し, タンパクを含む上清を $90 \mu\text{l}$ 程度回収した. 回収した溶液に含まれるタンパク量を Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio rad, USA) を用いて測定した. 測定にはライフサイエンス紫外可視分光解析システム DU 730 UV/Vis Spectrometer (Beckman Coulter, USA) を使用した. 測定結果をもとに $20 \mu\text{g}$ のタンパクを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動 (80V , 30 分間, 180V , 30 分間) を行った. 分離したタンパクをニトロセルロースメンブレンに転写 (100V , 60 分間) し, 非特異的結合を阻害するため, 5% スキムミルク/TBST (1M Tris-HCl, 0.3M NaCl,

0.05% Tween 20) にて室温で1時間反応させた。TBST で15分間洗浄後、一次抗体として抗 Δ Np63 抗体 (619001, Lot. #B202130, Biolegend, USA) を5000倍希釈で用いて4°C, オーバーナイトでインキュベーションした。二次抗体としてHRP 標識抗ウサギ IgG 抗体を室温で1時間反応させた。バンドの検出には Super signal West Femto Maximum Sensitivity Substance (Thermo Fisher Scientific, USA) を用いた。ローディングコントロールとして、一次抗体に抗 β -actin 抗体 (C4, sc47778, lot. #H10216, Santa Cruz Biotechnology, USA) , 二次抗体に HRP 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

8) MTS assay

96 well plate に AM-1 細胞を 3.0×10^3 cells/well 播種し、24時間後に CMLD-2 (20 μ M) を添加した Keratinocyte-SFM 培地に交換した。72時間培養後、CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega, USA) を 20 μ l/well 加えて 37°C で1時間インキュベートした。その後、GloMax - multi detection system (Promega, USA) を用い、490nm の波長で吸光度を測定した。コントロールには同量の DMSO を加えた Keratinocyte-SFM 培地を用いた。

9) Wound healing assay

6 well plate に AM-1 細胞を 1.0×10^5 cells/well 播種し，細胞を dish の 8 割程度まで増殖させた後，Keratinocyte-SFM 培地を交換し，CMLD-2 を最終濃度 $20 \mu\text{M}$ になるように添加した．このとき Keratinocyte-SFM 培地には EGF 1-53 と BPE は添加していないものを使用した．コントロールとして DMSO を同量添加した．試薬添加 24 時間後に P200 マイクロピペットチップでスクラッチを行い，24 時間後に顕微鏡下で観察及び撮影を行った．撮影した写真を Image J ソフトウェア (National Institutes of Health) で解析し，スクラッチ直後の wound area の面積を 100% とし，24 時間後の面積を算出した．

10) 三次元培養

三次元培養には DL-CGH culture (Double Layer - Collagen Gel Hemisphere Culture) 法²³⁾を用いた．コラーゲンゲル溶液の作成には Cellmatrix (新田ゼラチン株式会社，japan) を用い，Type I コラーゲン溶液，10 倍濃度の Ham' F-12 培地，コラーゲンゲル再構成用緩衝溶液を 8:1:1 の割合で混合し調整した．1 層目のゲル溶液には AM-1 細胞を 3.0×10^6 cells/ml になるように調整した．6 well plate に AM-1 細胞含有コラーゲンゲル溶液を $5 \mu\text{l}$ 滴下し， 37°C で 30 分間加温後，細胞が含まれないコラーゲンゲル溶液を 1 層目のゲルの上から $30 \mu\text{l}$ 滴下し， 37°C で 30 分間加温した．2 層の半球状のコラーゲンゲルを作成後，Keratinocyte-FSM 培地を用い培養を行った．培養 1 週間で 1 層目のゲルか

ら 2 層目ゲルに細胞の浸潤がみられたため、CMLD-2 を最終濃度 $10\ \mu\text{M}$ になるように添加し、培養を継続し観察した。コントロールには DMSO を等量添加した。

1 1) CRISPR/Cas9 system による ΔNp63 ノックアウト AM-1 細胞の作成

35mm dish に 1.0×10^5 cells の AM-1 細胞を播種し、24 時間インキュベーション後、Pooled All-in-one lentivirus for Delta Np63 (titer $\times 10^8$ IU/ml) (abm Inc, Canada) を 5 μl 添加した。感染した細胞はピューロマイシンに耐性であるため、48 時間後、 $2.5\ \mu\text{g/ml}$ のピューロマイシンを加え、セクションを行った。ピューロマイシン耐性の AM-1 細胞のうち、免疫蛍光細胞染色で ΔNp63 が発現していない細胞を ΔNp63 ノックアウト AM-1 細胞、 ΔNp63 が発現している細胞をコントロール AM-1 細胞とした。

1 2) 免疫蛍光細胞染色

Pooled All-in-one lentivirus for Delta Np63 を感染させ、ピューロマイシンでセクションを行った AM-1 細胞を 35mm dish に置いたカバーガラス上に播き、免疫染色を行った。細胞を PBS で洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで 15 分間固定し、0.1% tritonX-100 により細胞膜の透過処理を行った後、1% BSA, 0.1% tween20 含有 PBS でブロッキングを行った。一次抗体には抗 p40 抗体 (BC 28, Lot. #H1804, ニチレイ, Japan) を未希釈、抗 HuR 抗体 (N-16, sc5483,

Santa Cruz Biotechnology, USA) を 500 倍希釈で混合または, 抗 p40 抗体 (BC 28, Lot. #H1804, ニチレイ, Japan) を未希釈, 抗 E-cadherin 抗体 (H-108, sc7870, #F151, Santa Cruz Biotechnology, USA) を 500 倍希釈で混合して用い, 4°C でオーバーナイトインキュベーションした. 二次抗体として抗マウス IgG 抗体 568, 抗ヤギ IgG 抗体 488, 抗ウサギ IgG 抗体 488 を用いた. 核染色および封入材には VECTASHIELD Mounting Medium with DAPI (VECTOR LABORATORIES, USA) を用いた.

1 3) 統計解析

得られたデータは Micro Soft Office Excel 2019 の T.TEST を用い, 有意差を解析した.

結果

1) budding における Δ Np63 と HuR の発現

HE 染色組織像ではエナメル上皮腫の腫瘍胞巣から周囲の間質に突起状に進展する複数の budding を認めた (図 3) . エナメル上皮腫の Δ Np63 の発現について検討を行ったところ, budding 領域の腫瘍細胞の核に Δ Np63 が強く発現が認められた (図 4 a, c) . また, HuR も budding 領域の腫瘍細胞で強く発現が認められ (図 4 b) , その発現領域は Δ Np63 と一致した. さらに, 強拡大像で, budding 領域の腫瘍細胞において, HuR は核だけではなく細胞質にも発現が認められた (図 4 d) . Δ Np63 と HuR の発現領域が一致したことから, 両者には何らかの関係性があることが示唆された.

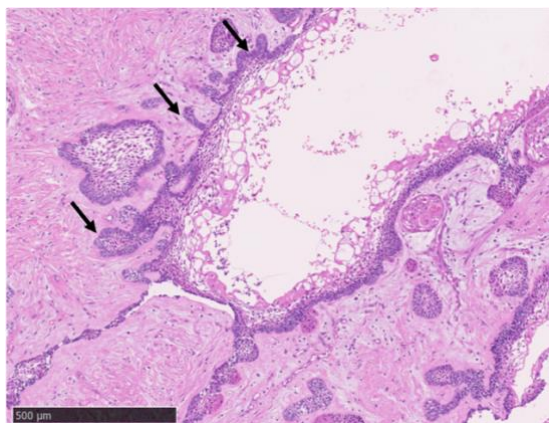


図 3 エナメル上皮腫 病理組織像 (H-E 染色)
腫瘍が周囲の間質に進展する budding (矢印) . スケールバー : 500 μ m

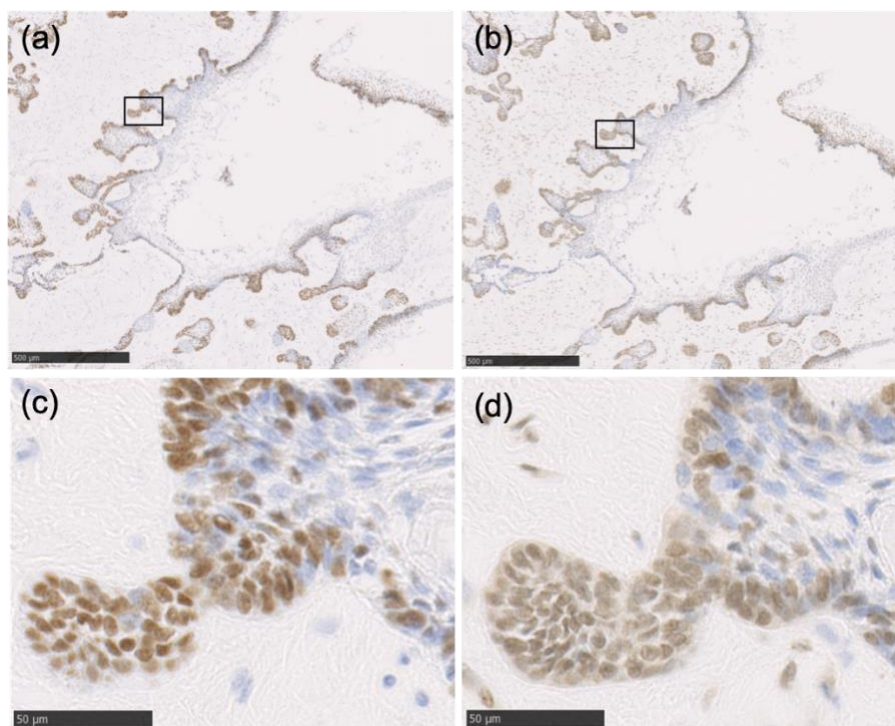


図4 エナメル上皮腫 病理組織像（免疫組織染色）

(a), (c): Δ Np63 (b), (d): HuR. (c), (d)はそれぞれ(a), (b)の黒枠部の強拡大.
スケールバー, a, b : 500 μ m, c, d : 50 μ m

2) HuR タンパクは Δ Np63 mRNA と結合する

RIP assay を行い, RNA 結合タンパクである HuR と ARE を持つ Δ Np63 mRNA との結合を解析した. その結果, control IgG に結合した RNA に比べ, 抗 HuR 抗体に結合した RNA には Δ Np63 mRNA レベルが有意に高く ($P=0.0036$), HuR タンパクは Δ Np63 mRNA と結合していることが示唆された (図 5). HuR は mRNA の ARE に結合することが知られているため, HuR と ARE との結合を阻害する化合物である CMLD-2 (20 μ M) を用いて同様に RIP-assay を行った. CMLD-2 で処理

したものでは, control に比べて抗 HuR 抗体に結合した RNA における Δ Np63 mRNA レベルは有意に低かった ($P=0.0042$) (図 6). このことから, HuR タンパクと Δ Np63 mRNA の結合が CMLD-2 により阻害されていると考えられ, HuR タンパクは Δ Np63 mRNA の ARE と結合していることが示唆された.

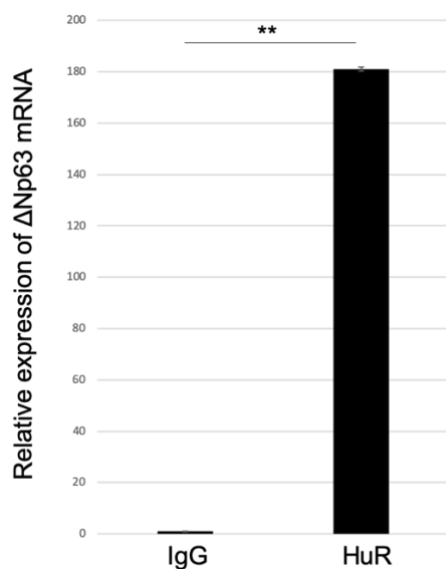


図 5 HuR タンパクと Δ Np63 mRNA との結合

抗 HuR 抗体を用いて RIP assay を行い, 抗体に結合した Δ Np63 mRNA 発現量を qPCR にて測定した.

(** $P<0.01$)

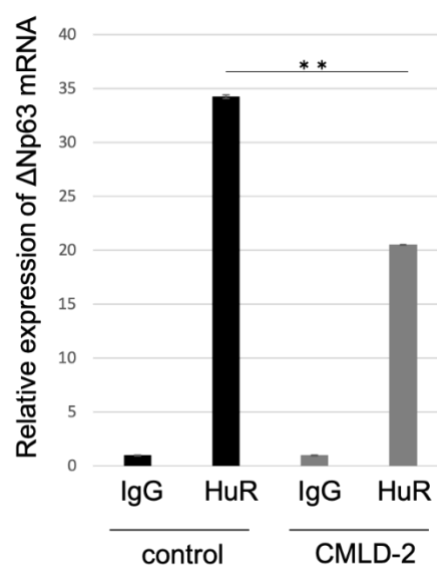


図 6 CMLD-2 による HuR タンパクと Δ Np63 mRNA との結合阻害

CMLD-2 ($20 \mu\text{M}$) で 24 時間処理した後, RIP-assay を行い, 抗体に結合した Δ Np63 mRNA 発現量を qPCR にて測定した.

(** $P<0.01$)

3) CMLD-2 による Δ Np63 mRNA の半減期の短縮

HuR は ARE に結合することで ARE-mRNA を安定化する働きがある．RIP-assay により HuR タンパクは Δ Np63 mRNA の ARE と結合していることが示唆された．そこで，CMLD-2 により両者の結合を阻害することで， Δ Np63 mRNA の半減期が変化するかどうかを調べた．その結果，control では Δ Np63 mRNA の半減期が 2.1 時間であったのに対し，CMLD-2 処理では半減期が 1.4 時間となり， Δ Np63 mRNA の半減期が短縮された（図 7）．このことより，HuR が Δ Np63 mRNA の安定化に関与すると考えられた．

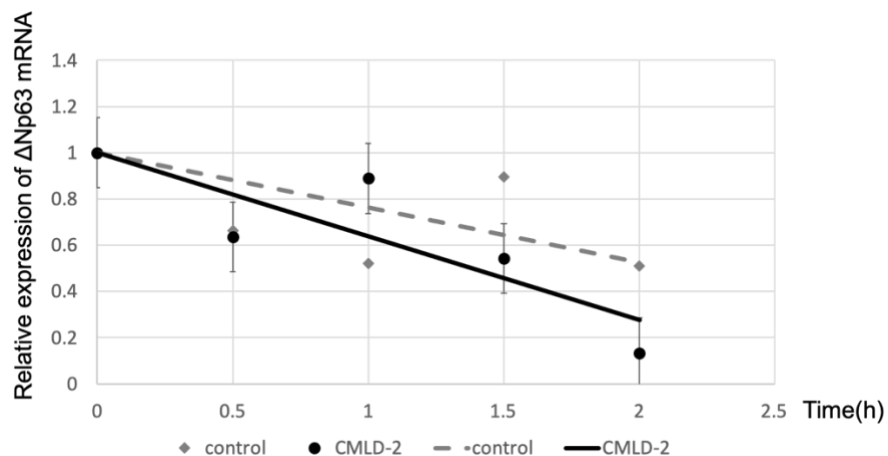


図 7 CMLD-2 による Δ Np63 mRNA 半減期の短縮

Actinomycin D($5 \mu\text{g/ml}$) 添加 2 時間後に，CMLD-2($10 \mu\text{M}$) を添加し，30 分毎に RNA を回収した．RT-PCR を行い Δ Np63 mRNA の半減期を解析した．

4) CMLD-2 による Δ Np63 タンパク発現の減少

CMLD-2 で処理した AM-1 細胞の Δ Np63 のタンパク発現量をウエスタンブロッティングで解析した. CMLD-2 の濃度が $10\ \mu\text{M}$ までは Δ Np63 タンパクの発現量にあまり変化がみられなかったが, CMLD-2 $20\ \mu\text{M}$ では Δ Np63 タンパクの発現量の減少がみられた (図 8). この結果は, Δ Np63 mRNA の半減期が短くなることにより, 翻訳されるタンパク量も減少したことを示唆している.

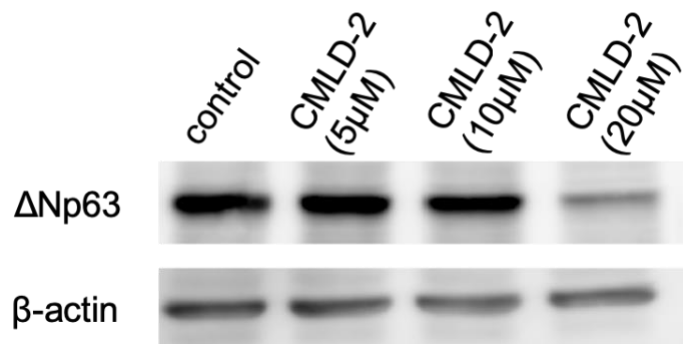


図 8 CMLD-2 による Δ Np63 発現の減少

CMLD-2 で 24 時間処理した後, ウエスタンブロッティングを行い Δ Np63 の発現を解析した.

5) CMLD-2 による細胞増殖能の阻害

MTS assay によって CMLD-2 を用いた HuR の ARE-mRNA への結合阻害による細胞増殖能の変化を評価した. CMLD-2 を用いると, control に比べ AM-1 細胞の

増殖が有意に抑制されており ($P=0.0013$) (図 9), HuR と ARE-mRNA との結合が
阻害されることによって細胞増殖能が低下したと考えられた.

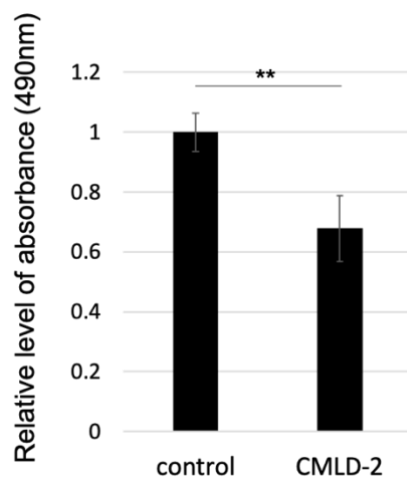


図 9 CMLD-2 による細胞増殖能の阻害

CMLD-2 ($10\mu\text{M}$) で 72 時間処理した後, MTS assay を用いて細胞増殖能を評価した.

(** $P<0.01$)

6) CMLD-2 による運動能の阻害

AM-1 細胞を CMLD-2 で処理すると, control では 24 時間後に細胞遊走による wound area が 54%減少したのに対し, CMLD-2 処理群では 10%しか減少しておらず ($P=0.0007$) (図 10), CMLD-2 により AM-1 細胞の運動能が阻害されていることが示唆された.

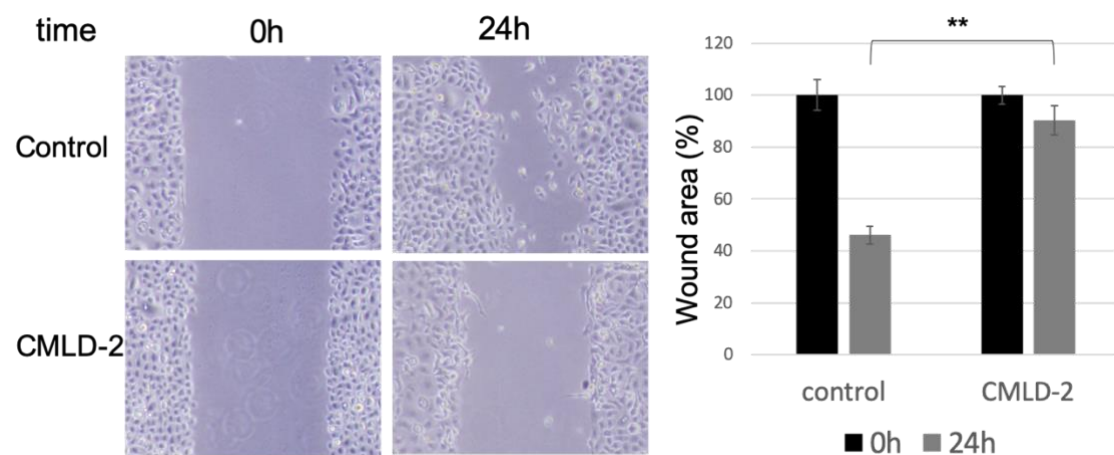


図 10 CMLD-2 による運動能の阻害

CMLD-2 (20 μ M) で 24 時間処理した後，P200 チップでスクラッチを行い，24 時間後に観察をし，wound area を解析して運動能を評価した. (**P<0.01)

7) CMLD-2 による三次元培養における浸潤能の阻害

HuR と ARE-mRNA との結合阻害による AM-1 細胞のコラーゲンゲル内における浸潤能の変化を解析した. CMLD-2 処理群では，control 群に比べて 2 層目の細胞の浸潤がほぼ停止した (図 11)，このことから，HuR と ARE-mRNA の結合が阻害されることにより，AM-1 細胞の三次元マトリックス内における浸潤能が阻害されることが示唆された.

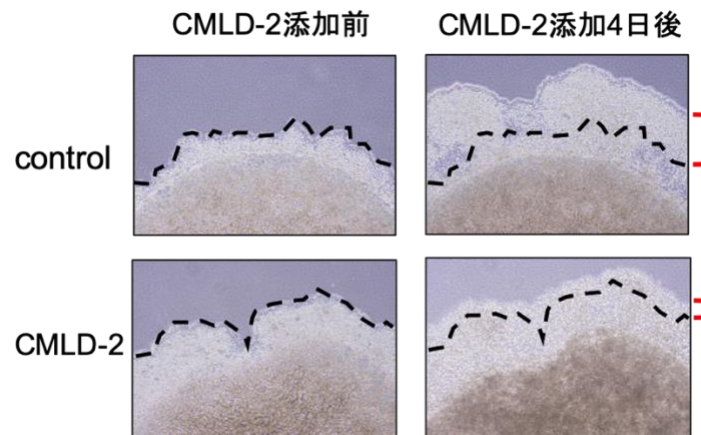


図 11 CMLD-2 による三次元培養における細胞の浸潤能の阻害

DL-CGH culture で AM-1 細胞の三次元培養を行い，1 層目のゲル内の細胞が 2 層目のゲルに浸潤した後，培地に CMLD-2 を加え，培養を続けて観察を行った。

8) Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞における HuR の発現

CMLD-2 は HuR と ARE との結合を阻害する化合物であり， Δ Np63 mRNA 以外の ARE-mRNA を阻害している可能性がある．そこで， Δ Np63 だけを消失させ， Δ Np63 と HuR のより直接的な関係を明らかにするために，CRISPR/Cas9 system を用いて， Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞を作成した． Δ Np63 をノックアウトの標的とした sgRNA を組み込んだレンチウイルスを感染させた AM-1 細胞を免疫細胞蛍光染色すると， Δ Np63 の発現が認められない AM-1 細胞を確認した（図 12）．この結果より，CRISPR/Cas9 system で Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞が作成されたことが確認された．なお，同様にして HuR の発現を調べたところ，HuR は Δ Np63 の発現に関わらず，核と細胞質に発現していた（図 12）．以上の

結果は、 Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞では、 Δ Np63 のみが消失しており、HuR の制御を受ける他の ARE-mRNA には影響を及ぼさない細胞が構築できたことを示している。

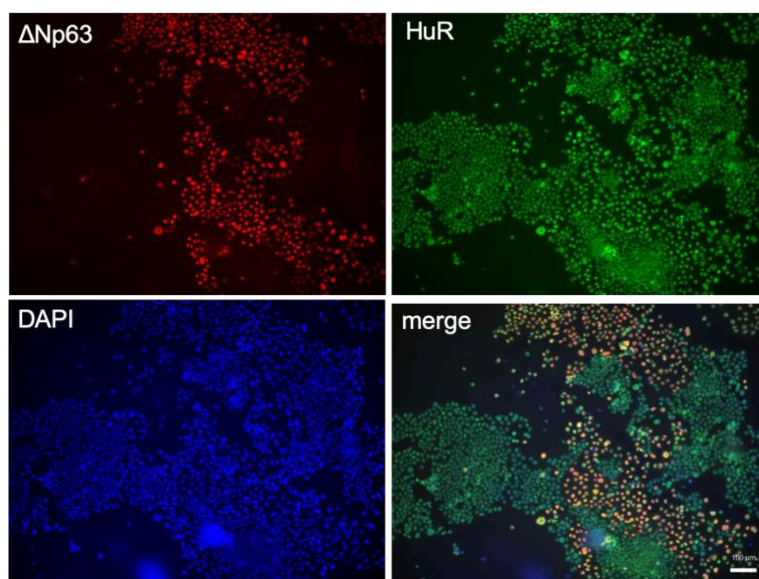


図 12 Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞の免疫細胞染色 ($\times 10$)

Δ Np63 を標的とした sgRNA を組み込んだレンチウイルスを感染させ、 Δ Np63 および HuR で免疫細胞染色を行った。スケールバー：100 μ m

9) Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞における E-cadherin の発現

ここまで、budding 領域における HuR と Δ Np63 は細胞の増殖能や運動能、侵襲能に関わることを示唆する結果が得られたが、我々はこの他に細胞間接着の変化が関与しているのではないかという仮説を立てた (図 13)。

そこで、細胞間接着因子である E-cadherin に着目し、 Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞での E-cadherin の発現を検討した。免疫細胞蛍光染色の結果、 Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞では、 Δ Np63 が発現しているコントロール AM-1 細胞に比べて細胞辺縁に E-cadherin が強く発現していた（図 12）。また、 Δ Np63 ノックアウト AM-1 細胞では、細胞が密集し、細胞の大きさがコントロール AM-1 細胞よりもやや小さかった（図 14）。これらの結果より Δ Np63 は E-cadherin の発現低下を介して上皮細胞間接着を抑制していることが示唆された。

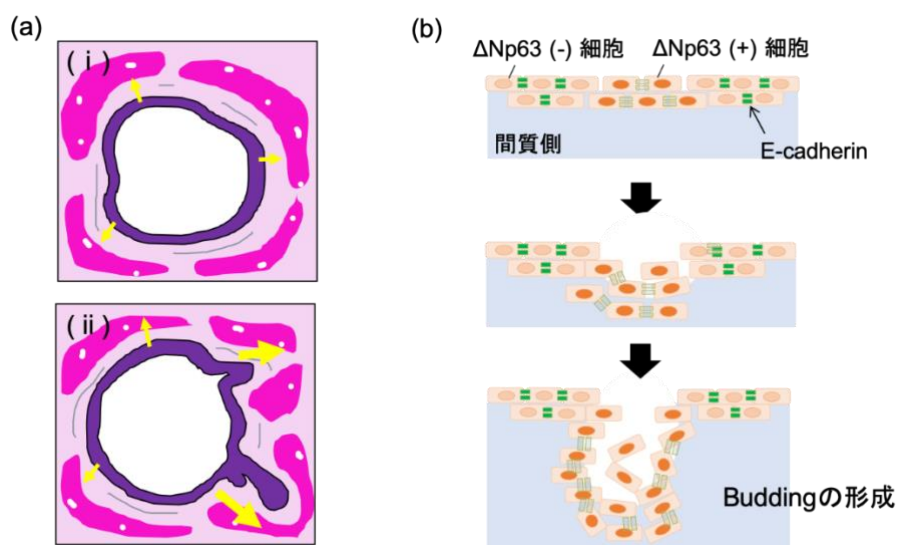


図 13 budding 形成の仮説

嚢胞性の病変では、病変の増大の際に周囲に均等に増大するが (a, i), budding が存在するような病変では特定の部位で病変が増殖している (a, ii)。そこで、エナメル上皮腫の嚢胞壁の細胞の一部に Δ Np63 を発現する細胞が出現すると、細胞間接着が低下し、腫瘍の増殖に伴い、周囲の間質に細胞が侵襲しやすくなり、budding のような構造を形成するのではないかと仮説を立てた (b)。

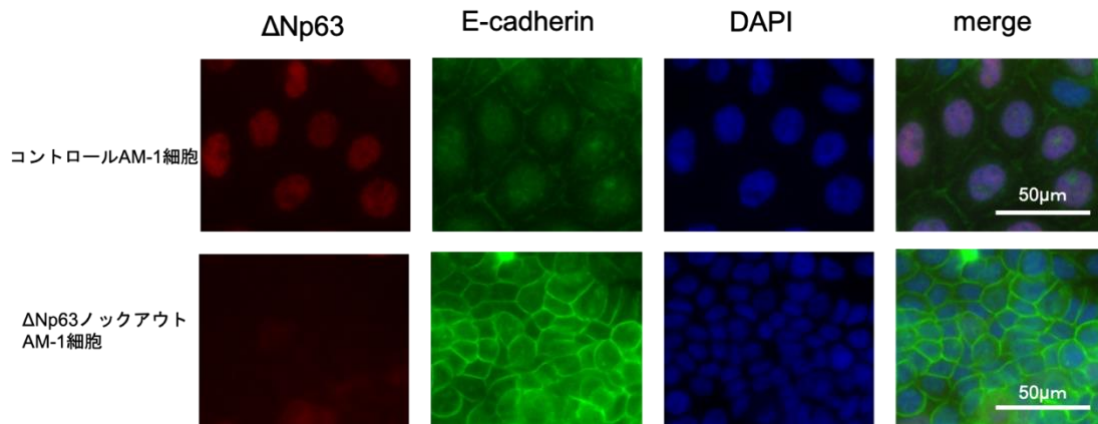


図 14 ΔNp63 ノックアウト AM-1 細胞の免疫細胞染色 (×40)

ΔNp63 をターゲットとした sgRNA を組み込んだレンチウイルスを感染させ、ΔNp63 および E-cadherin で免疫細胞染色を行った。スケールバー：50 μ m

1 0) エナメル上皮腫での E-cadherin の発現および間葉系マーカーの発現.

ΔNp63 ノックアウト AM-1 細胞において、E-cadherin が強く発現していたことから、ΔNp63 が発現する budding 領域の細胞では E-cadherin の発現が低下している可能性が考えられたため、ヒトエナメル上皮腫の組織標本を用いて E-cadherin の免疫組織染色を行った。免疫組織染色の結果、エナメル上皮腫の budding 領域の細胞には細胞間接着分子 E-cadherin の発現が認められなかった (図 15 a, b) . E-cadherin は上皮系マーカーでもあり、E-cadherin の消失は上皮間葉転換 (EMT) の指標となる。そのため、budding 領域における EMT の可能性を考え、間葉系マーカーである N-cadherin, Vimentin, β -catenin の発現を解析するためにそれぞれに対する抗体により免疫組織染色を行った。

budding 領域の細胞では N-cadherin および Vimentin の発現は認めなかった
(図 15 e, f) . また, β -catenin に関しては, budding 領域の細胞質における発現はあったものの, 核における発現は認められず, EMT の指標となる核内移行は起こしていないと考えられた. (図 15 c, d) . これらの結果より, budding 領域の細胞では上皮の細胞間接着が低下していることが示唆されたが, 完全な EMT を起こしている状態ではないと考えられた.

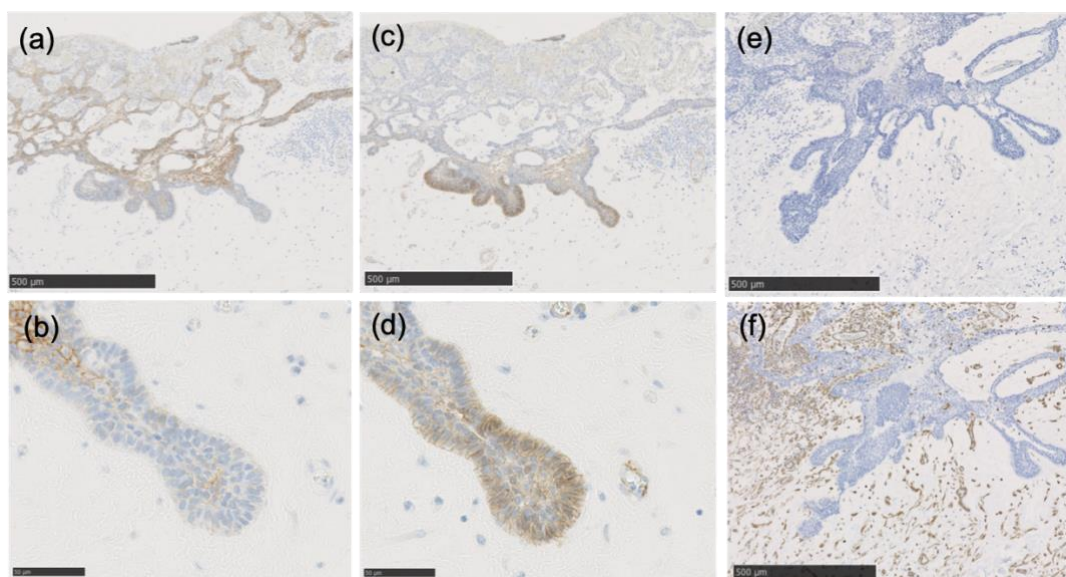


図 15 エナメル上皮腫 病理組織像 (免疫組織染色)

(a), (b): E-cadherin , (c), (d): β -catenin, (e): N-cadherin, (f): Vimentin
スケールバー, a, c, e, f : 500 μ m, b, d : 50 μ m

考察

これまで、エナメル上皮腫に関して様々な研究が行われているが、budding に着目した研究はほとんどなかった。今回、我々はエナメル上皮腫の budding 領域で HuR と Δ Np63 が強く発現していることを見出した。HuR は RNA 結合タンパクの一つである。HuR は mRNA の AU-rich element (ARE) に結合し mRNA を安定化する働きがある。ARE は mRNA の 3' 末端非翻訳領域に存在するアデニルとウラシルに富んだ領域のことである²⁴⁾²⁵⁾。ARE を持つ mRNA は通常すみやかに分解してしまうが、HuR のような RNA 結合タンパクと結合することで安定化される²⁶⁾。bcl-2 や c-fos, c-myc など、ARE-mRNA を持つ遺伝子は多く知られている²⁷⁾が、 Δ Np63 もその一つである²⁸⁾。

HuR は増殖・浸潤活性の低い細胞では核にのみ存在する。しかし、増殖・浸潤活性が高い細胞では HuR は核だけではなく、細胞質にも存在する。HuR が細胞質にも存在することで、ARE と結合し ARE-mRNA の安定化につながり、タンパクが翻訳される。例えば、悪性腫瘍では HuR が核だけでなく細胞質にも存在し、これが細胞の悪性化に関与するという報告がある¹⁵⁾。我々の研究室では、これまでに HuR の局在変化が細胞のがん化に関与すること¹⁴⁾を明らかにした。近年、HuR はがんだけでなく、炎症やウイルス感染細胞など、様々な疾患に関わる細胞で核外輸送されることが見いだされている²⁹⁾。これまで、良性腫瘍と

HuR との関与を証明した報告はほとんどなく、本研究で明らかになったエナメル上皮腫と HuR の関連は新たな発見である。

Δ Np63 mRNA は ARE を持ち、MCF10A 細胞では HuR と Δ Np63 mRNA が結合していることが報告されている¹²⁾。今回、エナメル上皮腫の budding 領域の細胞で HuR と Δ Np63 の発現領域が一致していたことから、AM-1 細胞を用いて両者の関係性を調べると AM-1 細胞でも HuR と Δ Np63 mRNA は結合していることが確認された。さらに、HuR と ARE との結合を阻害する化合物である CMLD-2 により、両者の結合は阻害され、 Δ Np63 mRNA の半減期は短縮し、 Δ Np63 タンパクは減少した。このことから HuR が Δ Np63 mRNA に結合し、mRNA を安定化することでタンパクを発現していることが示唆された。

Budding 領域の細胞では細胞増殖能や運動能、侵襲能が亢進していると考えられる。我々の実験では、CMLD-2 により HuR と ARE-mRNA との結合を阻害することで、細胞増殖能、運動能、侵襲能が阻害された。しかし、CMLD-2 は HuR と Δ Np63 mRNA との結合を阻害する化合物であるため、他の ARE-mRNA も阻害されている可能性がある。

また、細胞増殖能や運動能が亢進しているだけでは budding のような周囲の間質に入り込むような構造は取りにくい。嚢胞様病変の場合、通常は嚢胞腔内の内圧の上昇に伴い、病変が周囲の間質組織を圧排するように比較的均一に増

大すると考えられる (図 13 a, i). しかし, 今回の研究で認められたような budding 構造が存在するエナメル上皮腫においては腫瘍の嚢胞様構造が一部くずれていると考えられる (図 13 a, ii). この背景には, budding 周辺の部位で一時的または恒常的に腫瘍細胞間の接着が低下しており, 他の嚢胞壁様の部位の腫瘍細胞と細胞間接着力が異なるからではないかと推測した. つまり腫瘍細胞間の接着力が低下すると, 同じ力が加わったときにその部位では嚢胞様構造がくずれ, 同部で腫瘍が周囲の間質に侵入しやすくなるのではないかと考えられた. さらに細胞の増殖能や運動能の亢進が budding 形成の一因にもなっているのではないかと推測された (図 13 b). 実際に上皮の細胞間接着分子である E-cadherin の発現を調べると, Δ Np63 をノックアウトすると, AM-1 細胞の細胞膜の E-cadherin 発現が亢進した. さらに, ヒトエナメル上皮腫の budding 領域では E-cadherin の発現が認められなかった. これらのことから, budding 領域の細胞では細胞間接着が低下しており, Δ Np63 が細胞間接着にも影響を与えている可能性が示唆された. E-cadherin は上皮系マーカーであり, budding 領域での発現低下が認められたことから, budding 領域において細胞が上皮間葉転換 (EMT) を起こしている可能性が考えられた. これまでにエナメル上皮腫の EMT に関する報告はいくつかあり, Kurioka らは, slug や TGF- β などの EMT 転写因子がエナメル上皮腫の局所浸潤に関与している可能性を報告している

30). しかし、本研究においてはヒトエナメル上皮腫の budding 領域において間葉系マーカーである N-cadherin と Vimentin の発現は認められなかった。β-catenin は E-cadherin の裏打ちタンパクとして知られており、その局在変化は EMT にも関わる³¹⁾。β-catenin が細胞質に異常蓄積し、核内移行すると転写因子として働くようになり、E-cadherin の発現抑制や snail や slug などの EMT 関連遺伝子の発現に関与する³²⁾。本研究では、エナメル上皮腫の budding 領域において β-catenin の発現は細胞膜または細胞質のみで認められ、核内移行は認められなかった。以上の結果より、budding 領域では EMT が起きているというよりは、上皮間接着の低下という上皮の性質を一部失っている状態と考えられた。

以上より、エナメル上皮腫の侵襲性増殖や再発に関わる budding には HuR や ΔNp63, E-cadherin が関与していることが示唆された。今後も、さらなる検討が必要であるが、本研究結果がエナメル上皮腫の増殖メカニズムを研究する上で重要な足がかりとなると考えられる。エナメル上皮腫の budding における侵襲性増殖メカニズムを解明することで、エナメル上皮腫の再発の防止や、新しい治療法や予後予測因子などの開発、ひいては患者の QOL の向上にもつながることが期待される。

結論

本研究により，エナメル上皮腫の侵襲性増殖や再発に関わるであろう budding 領域では，HuR による Δ Np63 mRNA の安定化を介した Δ Np63 の発現亢進によって腫瘍細胞の細胞間接着が低下していることが示唆され，これら分子が budding 形成に関与している可能性が示唆された。

謝辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学講座血管生物分子病理学教室 樋田京子教授，東野史裕准教授，松田彩特任助教，間石奈湖助教，北海道口腔病理診断所 所長 北村哲也先生（前・血管生物分子病理学教室特任講師）ならびに血管生物分子病理学教室 教室員各位，口腔病態学講座口腔顎顔面外科教室 鄭漢忠教授，大廣洋一准教授ならびに教室員各位に厚く御礼申し上げます。また，AM-1 細胞を提供いただいた岩手医科大学，原田英光教授に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 下野正基, 高田隆, 田沼順一, 豊澤悟 (編), 新口腔病理学 第2版, 医歯薬出版株式会社 : 197-200, 2018
- 2) Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP, Ameloblastoma, American Journal of Clinical Oncology 30 : 645-648, 2007.
- 3) El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ , WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th edition, IARC Press Lyon : p203-260, 2017.
- 4) Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, Pathology and Genetics, Head and Neck Tumours, World Health Organization Classification of Tumours 3rd edition, IARC Press Lyon : 283-327, 2005.
- 5) Li TJ, Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients, Am J Surg Pathol 24 :1385-1392, 2000.
- 6) Sternberg SS, Mills SE, Carter D, Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology 5th edition, Lippincott Williams & Wilkins : 773-823, 2012.
- 7) Kumamoto H, Ohki K, Ohya K, Expression of p63 and p73 in ameloblastomas, J Oral Pathol Med 34 : 220-226, 2005.
- 8) Foschini MP, Cocchi R, Marucchi G, Penneshi MG, Magrini E, Ligorio C, Lombardini F, Toshi AL, Marchetti C, High DerlaN p63 isoform expression favours recurrences in odontogenic keratocyst-

- odontogenic keratocystic tumor, *Int J Oral Maxillofac Surg* 35 : 673–675, 2006.
- 9) Yang A, McKeon F, P63 and P73: P53 mimics, menaces and more, *Nat Rev Mol Cell Biol* : 1, 199–207, 2000
 - 10) Nakamuta N, Kobayashi S, Developmental expression of p63 in the mouse testis, *J Vet Med Sci* 66 : 681–687, 2004.
 - 11) Yan W, Zhang Y, Chen X, TAp63 γ and Δ Np63 γ are regulated by RBM38 via mRNA stability and have an opposing function in growth suppression, *Oncotarget* 13 : 78327–78339, 2017.
 - 12) Yan W, Zhang Y, Zhang J, Cho SJ, Chen X, HuR is necessary for mammary epithelial cell proliferation and polarity at least in part via Δ Np63, *PLoS One* 7 : e45336, 2012.
 - 13) Hasegawa T, Kakuguchi W, Kuroshima T, Kitamura T, Tanaka S, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F, HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells, *Br J Cancer* 16 : 1943–1948, 2009.
 - 14) Kuroshima T, Aoyagi M, Yasuda M, Kitamura T, Jehung JP, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F, Viral-mediated stabilization of AU-rich element containing mRNA contributes to cell transformation, 30 : 2912–2920, 2011.
 - 15) Lopez SI, Lal A, Gorospe M, HuR: Post-Transcriptional Paths to Malignancy, *RNA Biology* 2 : 11–13, 2005.
 - 16) Wang J, Guo Y, Chu. H, Guan. Y, Bi J, Wang, B, Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment

- responses and prognosis, *Int J Mol Sci*, 14 : 10015–10041, 2013.
- 17) Hinman MN, Lou H, Diverse molecular functions of Hu proteins, *Cell Mol Life Sci*, 65 : 3168–3181, 2008.
- 18) Kakuguchi W, Kitamura T, Kuroshima T, Ishikawa M, Kitagawa Y, Totsuka Y, Shindoh M, Higashino F, HuR knockdown changes the oncogenic potential of oral cancer cells, *Mol Cancer Res*, 8, 520–528, 2010.
- 19) Habiba U, Kitamura T, Yanagawa-Matsuda A, Hida K, Higashino F, Ohiro Y, Totsuka Y, Shindoh M, Cytoplasmic expression of HuR may be a valuable diagnostic tool for determining the potential for malignant transformation of oral verrucous borderline lesions, *Oncol Rep*, 31 : 1547–1554, 2014.
- 20) Lopez SI, Fan J, Yang X, Zonderman AB, Potapova O, Pizer ES, Gorospe M, Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis, *Oncogene*, 22 : 7146–7154, 2003.
- 21) Harada H, Mitsuyasu T, Nakamuta N, Higuchi Y, Toyoshima K, Taniguchi A, Yasumoto S, Establishment of ameloblastoma cell line, AM-1, *J Oral Pathol Med*, 27 : 207–212, 1998.
- 22) Wu X, Lan L, Wilson DM, Marquez RT, Tsao WC, Gao P, Roy A, Turner BA, McDonald P, Tunge JA, Rogers SA, Dixon DA, Aube J, Xu L, Identification and Validation of Novel Small Molecule Disruptors of HuR-mRNA Interaction, *ACS Chem Biol* 19 : 1476–1484, 2015.
- 23) Takata M, Maniwa Y DT, Tanaka Y, Okada K, Nishio W, Ohbayashi C, Yoshimura M, Hayashi Y, Okita Y, Double – layered collagen gel hemisphere for cell invasion assay: successful visualization and

- quantification of cell invasion activity, *Cell Commun Adhes* 14 : 157-167, 2009.
- 24)Chen CY, Shyu AB, AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation, *Trends Biochem Sci*, 20 : 465-470, 1995.
- 25)DeMaria CT, Brewer G, AUF1 binding affinity to A+U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation, *J Biol Chem*, 271 : 12179-12184, 1996.
- 26)Brennan CM, Steitz JA, HuR and mRNA stability, *Cell Mol Life Sci*, 58, 266-277, 2001.
- 27)Khabar KS, Hallmarks of cancer and AU - rich elements, Wiley Interdiscip Rev RNA 8 : e1368, 2017.
- 28)Zhang J, Jun Cho S, Chen X, RNPC1, an RNA-binding protein and a target of the p53 family, regulates p63 expression through mRNA stability, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 : 9614-9619, 2010.
- 29)Srikantan S, Gorospe M, HuR function in disease, *Front Biosci*, 17 : 189-205, 2015.
- 30)Kurioka K, Wato M, Iseki T, Tanaka A, Morita S, Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF- β , and E-cadherin in ameloblastoma, *Medical Molecular Morphology* 50 : 68-75, 2017.
- 31)Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T, E-cadherin, β -catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer, *Cancer and Metastasis Reviews* 28 : 151-166, 2009.

- 32) Stacy AJ, Craig MP, Sakaram S, Kadakia M, Δ Np63 α and microRNAs: leveraging the epithelial-mesenchymal transition, Oncotarget 10 : 2114–2129, 2017.