

ふ り が な 氏 名	みや ゆきこ 宮 由紀子
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 875 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 6 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学 位 論 文 題 目	Gene analysis of ameloblastoma-derived cells treated with retinoic acid (エナメル上皮腫由来細胞のレチノイン酸作用時における遺 伝子解析)
学 位 論 文 掲 載 誌	Journal of Osaka Dental University 第 54 巻 第 1 号 令和 2 年 4 月
論 文 調 査 委 員	主 査 中嶋 正博 教授 副 査 田村 功 教授 副 査 井関 富雄 教授

### 論文内容要旨

エナメル上皮腫は顎骨に発生する最も頻度の高い歯原性良性腫瘍の一つであるが、局所浸潤性に発育するため再発を認めることがある。現在まで数多くの検討が行われてきたがエナメル上皮腫の動的な特徴については未だ解明されていない。一方、白血病治療薬として用いられる脂溶性ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸（RA）は一部の腫瘍に対して抗腫瘍効果を持つことが明らかとなっている。過去に RA が①エナメル上皮腫由来細胞に対して増殖抑制的に働くこと②分化誘導的に働くことを報告したが、その細胞内の情報伝達や調節機構は不明のままである。そこで、エナメル上皮腫の情報伝達などを解明するためにエナメル上皮腫腫瘍細胞を培養し、RA 作用時の遺伝子発現量の差異についてマイクロアレイを用いた網羅的な解析を行い検討した。

研究材料は本学附属病院口腔外科でエナメル上皮腫と診断され手術を行った患者の摘出組織を用い、培養開始 14 日目でクローニングを行い、エナメル上皮腫由来細胞として実験に使用した。その後 RA を最終濃度  $10^{-6} \sim 10^{-7} \text{M}$  になるように添加反応させ 6 時間培養した群を RA 群、無添加群の同条件の群を対照群とし、培養終了後 RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析は 21,939 の遺伝子解析結果から統計学的処理を行い、カットオフを中央値  $> 2,000$  として全体から 6,854 の遺伝子を選択し評価した。

RA 添加により最も発現量が促進された遺伝子は EDF1 で対照群 1,812 の強度に対し RA 群 5,992 と 3.31 倍であり、最も抑制された遺伝子は TM4SF10 で対照群 1,834 の強度に対し RA 群 555 と 0.30 倍であった。その他、CytochromeP450, family26, subfamilyA, polypeptide1 (CYP26A) が対照群 641 の強度に対し実験群 1,957 と 3.05 倍の増加を認めた。それに対し、MMP3 が対照群 14,040 から RA 群

5,315 (0.37 倍), FGF2 が対照群 16,602 から RA 群 8,112 (0.48 倍) とそれぞれ発現量の低下を認めた。CYP26A の発現量の上昇は、添加された RA の代謝のために CYP26A の合成が急務で行われた結果と推測された。また、今回得られた 26 の遺伝子について The Database for Annotation Visualization and Integrated Discovery (DAVID) によるアノテーションを行った。結果、PIP3 経路を活性化することで細胞周期や細胞死などの経路へ繋がる経路と RAP1 経路を活性化する経路を確認した。エナメル上皮腫には FGF2 が存在し増殖促進に関与しており、また、MMPs 産生を促進することより周囲組織再生と組織浸潤性発育に関与している可能性があり、FGF2 による PIP3 経路の活性化は MMP1 の制御に関与していると報告されていることより、上記の二経路は RA の及ぼす影響で重要な経路であると推測された。一方、MMPs は創傷治癒、骨の改造現象および悪性腫瘍の転移や浸潤性発育に深く関与しているが、対照群に比して実験群の MMP1, 2, 3, 9, 10 および 12 の遺伝子発現量は抑制されていた。MMPs 遺伝子群の発現の低下のみでエナメル上皮腫の浸潤能の低下に結論付けることはできないが、発現量が抑制されたことより浸潤能の低下が示唆された。

細胞の増殖や分化の調節には遺伝子発現だけではなくタンパク質の合成、分解、複合体の形成およびリン酸化などの総合的な調節機構が存在する。今回の実験結果よりエナメル上皮腫由来細胞の RA 作用時における増殖抑制や分化促進には、上記遺伝子発現量の変化が部分的に関与していると示唆された。

## 論文審査結果要旨

本論文はエナメル上皮腫の分化および増殖に関連する遺伝子を解明するために行った研究である。

これまでに脂溶性ビタミン A の代謝産物であるレチノイン酸 (RA) は白血病の治療薬として用いられているが、一部の腫瘍に対しても抗腫瘍効果を持つことが言われている。過去に RA がエナメル上皮腫由来細胞に対して増殖抑制的に働くことと分化誘導的に働くことを報告した。今回は細胞内の情報伝達や調節機構を解明するためにエナメル上皮腫腫瘍細胞を培養し、RA 作用時の遺伝子発現量の差異についてマイクロアレイを用いて解析を行い検索した。

全体から 6,854 の遺伝子を選択し評価した。RA 添加により最も発現量が促進された遺伝子は EDF1 で対照群 1,812 の強度に対し RA 群 5,992 と 3.31 倍であり、最も抑制された遺伝子は TM4SF10 で対照群 1,834 の強度に対し RA 群 555 と 0.30 倍であった。

その他、CYP26A が 3.05 倍の増加を認めた。それに対し、MMP3 が 0.37 倍、FGF2 が 0.48 倍と発現量の低下を認めた。CYP26A の発現量の上昇は、添加された RA の代謝のために CYP26A の合成が急務で行われた結果と推測された。

そして、今回得られた 26 の遺伝子について DAVID によるアノテーションを行い、PIP3 経路を活性化することで細胞周期や細胞死などの経路へ繋がる経路と RAP1 経路を活性化する経路を確認した。この二経路は RA の及ぼす影響で重要な経路であると推測された。

また、MMPs は対照群に比して実験群の MMP1, 2, 3, 9, 10 および 12 の遺伝子発現量が抑制されていたことより浸潤能の低下が示唆された。

以上のことから、エナメル上皮腫に RA を添加することにより遺伝子上でも増殖抑制や分化促進が行われていることを示唆された点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。