

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791348
 研究課題名(和文) 抗ハードケラチン抗体作製と幻影細胞の発現メカニズム解析およびその意義
 研究課題名(英文) Development of anti-hard keratin antibody and expression mechanism analysis of shadow cell
 研究代表者
 田中 章夫 (TANAKA AKIO)
 明海大学・歯学部・助教
 研究者番号：30406392

研究成果の概要(和文)：本研究では、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫、石灰化上皮腫、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫でみられる幻影細胞および陰影細胞出現と Wnt シグナル伝達経路の関与について免疫組織化学的に検索した。その結果、幻影細胞および陰影細胞は hair proteins に対する抗体に強い陽性反応を示した。また近接した上皮細胞に β -catenin の核および細胞質での発現増加、および Lef-1 の核への局在を認めたことから、これらの細胞の出現に Wnt シグナル伝達経路の関与が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the involvement of Wnt signaling transduction pathway in the presence of ghost cells and shadow cells in the calcifying cystic odontogenic tumor, odontoma, pilomatixoma and adamantinomatous craniopharyngioma was examined by an immunohistochemical method. Ghost cells and shadow cells showed strong reactivity for antibodies against hair protein. In the epithelial components around these cells, the increased expression of β -catenin was found in the nucleus and cytoplasm, and the positive reaction for Lef-1 was seen in the nucleus. These findings suggest that the presence of ghost cell and shadow cell in the hard keratin expressing tumors are involved in Wnt signaling transduction pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	420,000	2,520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫、石灰化上皮腫、頭蓋咽頭腫、幻影細胞、陰影細胞、hard keratin、Wnt シグナル伝達経路

1. 研究開始当初の背景

(1) 毛母細胞に由来する石灰化上皮腫は、そ

の實質が好塩基性細胞、移行細胞および陰影細胞から成り、毛への分化を模倣しているも

のと考えられている。陰影細胞と同様の細胞が出現する腫瘍としては他に、下垂体に生じるエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫や、歯原性腫瘍の石灰化嚢胞性歯原性腫瘍がある。この石灰化嚢胞性歯原性腫瘍でみられる同様の細胞は幻影細胞と呼ばれ、陰影細胞のアナログといわれている。

(2) 電子顕微鏡による解析では、幻影細胞に多量のトノフィラメントの局在を認めるものの、角化でみられるケラトヒアリン顆粒がみられないことから、上皮で通常生じる角化とは異なることが考えられている。また、免疫組織化学的検索にて keratins の発現が認められないことから、分子量の異なる keratins の存在もしくは keratins の欠失が示唆されていた。しかしながら近年の研究において、石灰化上皮腫の移行細胞に、hard keratins の遺伝子発現が *in situ* hybridization によって確認され、また、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫では、陰影細胞にヒト hair proteins に対するポリクローナル抗体が反応することが報告されている。

(3) 我々はこれまでにヒト hair proteins に対するウサギポリクローナル抗体 (PA-HP1、PA-HP2)、およびマウスモノクローナル抗体 (MA-HP1) を独自に作製し、石灰化上皮腫の移行細胞および陰影細胞、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫の陰影細胞、さらには石灰化歯原性嚢胞の幻影細胞に hard keratins の発現を確認した。そしてこれらの 3 種類の病変が hard keratins 発現腫瘍であり、毛髪への分化を特徴とするという考え方を示してきた。

(4) 代表的な歯原性腫瘍で、組織奇形あるいは過誤腫とされている歯牙腫にも、幻影細胞が出現することは古くから知られている。しかし、その出現頻度に関する報告はわずかであり、検索結果も一定ではない。

(5) 幻影細胞や陰影細胞の由来については、腫瘍を構成する上皮細胞が考えられているが、その詳細は明らかではなく、発生メカニズムも不明である。近年、石灰化上皮腫やエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫、および石灰化嚢胞性歯原性腫瘍では、 β -catenin の遺伝子変異や発現の亢進がみられることから、腫瘍発生の病因として、Wnt- β -catenin-Tcf/Lef シグナル伝達系の関与が強く示唆されている。また、Wnt シグナル伝達系は毛髪の分化を誘導する重要な役割を果たすことが知られており、 β -catenin と Lef-1 が核内に移行し複合体を形成することで hair keratins の発現を誘導する。しかしながら、これらの腫瘍において、hard keratins の発現を示す陰影細胞ならびに幻影細胞の出現と、Wnt シグナル伝達系の関与についての詳細は不明である。

2. 研究の目的

(1) ヒト hair proteins は、中間径フィラメ

ントである hard keratins とマトリックスポタンから成り、その内、hard keratins は 40-50kd の type I acidic と 55-65kd の type II neutral / basic の 2 つのファミリーで構成されている。我々の作製した MA-HP1 は、type II neutral/basic hard α -keratins にのみ特異的に反応するため、type I acidic hard α -keratins に対する特異的反応性については検索していない。そのため、type I acidic hard α -keratins を特異的に認識するモノクローナル抗体を新たに作製し、hard keratins 発現腫瘍における反応性の確認を行なう必要がある。

(2) 歯原性腫瘍の一つで、組織奇形あるいは過誤腫とされている歯牙腫にも幻影細胞が出現することは古くから知られているが、その出現頻度についての詳細は不明である。もし、歯牙腫における幻影細胞の発現が恒常的なものであるならば、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、石灰化上皮腫およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫などと同じ範疇の腫瘍状病変 (hard keratin 発現腫瘍) として取り扱われるべきものと思われる。そのため、まず作成した各種抗体を用いて歯牙腫における幻影細胞の発現状況の確認を行う。

(3) これら hard keratins 発現腫瘍において、陰影細胞および幻影細胞の出現のあり方に差異があることから、これらの細胞の出現メカニズムと Wnt- β -catenin-Tcf/Lef シグナル伝達系との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 検索対象は、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍 17 例、歯牙腫 69 例、石灰化上皮腫 16 例およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫 15 例で、各試料は 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィン包埋を行い、薄切切片を作製して、H-E 染色により病理組織学的検索を行った。なお、本研究にあたっては、明海大学歯学部倫理委員会の承認を得た (承認番号 A0313 号)。

(2) type I acidic hard α -keratins に対するモノクローナル抗体の作製：ヒト毛髪から採取した免疫原を Balb/c マウスへ注入し、その後脾細胞を採取して骨髓腫細胞

(P3-X63-Ag8-U1) とポリエチレングリコールを用い細胞融合させ、選択 (HAT) 培地でハイブリドーマのみを生き残らせて増殖させる。細胞増殖を確認の後、免疫原を固相したマイクロプレートを用い、ELISA によりスクリーニングを行う。反応性の高いウエルのハイブリドーマを限界希釈法によりクローニングを行い、その培養上清を抗体として使用した。培養上清中の抗体の反応性については、Western blotting 法で検索した。

(3) 免疫組織化学的検索：免疫組織化学的検索は streptavidin peroxidase biotin complex method により行った。すなわち通法

に従い、切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ活性阻止のために0.3% H_2O_2 加メタノールにて室温で20分間処理を行った。流水およびリン酸緩衝液(PBS)で洗浄後、非特異的反応の阻止のため2%bovine serum albumin(ICN Biomedicals Inc, Auroa, OH, USA)を用いて室温で15分間処理を行った。1次抗体としてはanti-human hair protein rabbit polyclonal antibody 1(PA-HP1, 10 μ g/ml), anti-human hair protein rabbit polyclonal antibody 2(PA-HP2, 10 μ g/ml), anti-human hair protein monoclonal antibody 1(MA-HP1, supernatantの50倍希釈液), anti- β -catenin antibody(BD Biosciences, San Jose, CA USA: 200倍希釈), および anti-Lef-1 antibody(Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz, CA, USA: 20倍希釈)を用い、室温で60分間反応させた。PBSにて洗浄後、2次抗体として biotinylated anti-mouse IgG(H+L) horse antibody または biotinylated anti-rabbit IgG(H+L) goat antibody(いずれも Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA: 200倍希釈液)を用い、室温で30分間作用させた。再びPBSにて洗浄後、streptavidin-peroxidase(GIBCO-BRI, Grand Island, NY, USA: 200倍希釈液)を用い、室温で30分間作用させた。PBSにて洗浄後、発色は0.01% H_2O_2 加3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorid(Sigma-Aldrich Inc, Saint Louis, MO, USA)溶液で行い、Mayerのヘマトキシリンで核染色を行い、通法にて封入し、検鏡した。陰性対照標本は1次抗体の代わりにPBSを反応させ、同様に染色し、非特異的な呈色反応のないことを確認した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的検索の結果、hair proteinsに対する抗体の反応は、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍および歯牙腫の幻影細胞、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫の陰影細胞、石灰化上皮腫の移行細胞並びに陰影細胞の細胞質に強い陽性所見を示した。各種hair proteinsに対する抗体の反応性はいずれも同じであった。石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫では、幻影細胞または陰影細胞は、上皮組織内に散在性あるいは集族性に存在し、ときに高度な集積を認めた。移行細胞を有する石灰化上皮腫を除いて、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫における幻影細胞や陰影細胞の出現様式は突然であり、移行形態を有しない点で同じであった。ヒト正常毛幹の皮質細胞でみられるメラニン沈着を、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍や歯牙腫の上皮細胞の一部に認めることがあり、幻影細胞の出現は陰影細胞と同様に、毛髪への分化を

模倣したものと考えられた。

(2) 歯牙腫における幻影細胞の出現頻度は69例中46例(66.7%)と高いことがわかった。通常、幻影細胞は未熟なエナメル質の近傍に発現を認めた。結合組織内および硬組織間隙では、幻影細胞は周囲に歯原性上皮または石灰化を伴い出現していた。これらの幻影細胞の多くは散在性あるいは集族性に存在し、ときに高度な集積を認めた。幻影細胞の由来については、歯原性上皮が角化を伴うmetaplasiaに陥り形成されると考えられているが、本研究ではハードケラチンの発現は幻影細胞の細胞質のみに認め、近傍の歯原性上皮にはハードケラチンの発現がみられなかった。歯牙様硬組織の形成が少量である未熟な歯牙腫では、エナメル器に類似した歯原性上皮を豊富に認めた。しかし、幻影細胞の発現は少量で、石灰化像もほとんどみられなかった。一方、硬組織形成および石灰化が著しい歯牙腫では歯原性上皮に乏しく、幻影細胞を中心とした同心円状の石灰化を示すLiesegang環様の構造物や塊状の石灰化像を多量に認めた。歯牙様構造物の間隙には、不規則な石灰化像が広範囲に拡がり、内部に幻影細胞が混在する像もみられた。これらの所見から、歯牙腫の成熟に伴い歯原性上皮は減少し、増加した幻影細胞は徐々に石灰化を伴ってLiesegang環様構造物を形成し、増大融合して大きな石灰化巣の一部を形成することが考えられた。組織型では集合性歯牙腫52例中41例、複雑性歯牙腫17例中5例に幻影細胞の発現を認めた。集合性歯牙腫に発現頻度が高い傾向を認めることから、比較的高度な分化を示す歯牙腫の形成過程で、幻影細胞の発現頻度が増加することが考えられた。

(2) β -cateninに対する免疫染色では、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫で、幻影細胞または陰影細胞の周囲にみられる一部の上皮細胞の核や細胞質に強い反応をみ、細胞膜にもその陽性所見を認めた。石灰化上皮腫では、好塩基性細胞および下層の移行細胞の核と細胞質に β -cateninに対する反応を認めた。また、一部の幻影細胞および陰影細胞も β -cateninに対する反応を弱いながらも認めた。この核および細胞質における β -cateninの異常集積には、cadherin、APCおよび β -cateninの変異が関与していることが推察された。

(3) Lef-1に対する免疫染色では、石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫およびエナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫で不均一ではあるものの、幻影細胞および陰影細胞の周囲にみられる一部の上皮細胞の核や細胞質に強い陽性所見を認めた。また、幻影細胞や陰影細胞にもLef-1に対する反応を弱いながらも認めた。石灰化上皮腫では、好塩基性細胞および下層の移行

細胞の核や細胞質に Lef-1 に対する反応を認め、陰影細胞および上層の移行細胞にも Lef-1 の弱い反応を認めた。

(4) これらの hard keratin 腫瘍では、腫瘍細胞の細胞質において β -catenin の集積が増加し、核内へ移行することによって Lef-1 と結合し、hair protein のプロモーター領域の転写活性が生じて hard keratin の産生が増加した結果、幻影細胞または陰影細胞が形成されることが考えられた。

(5) 歯、脳下垂体および毛髪はその発生過程の初期に、それぞれの関連する上皮（歯は口腔粘膜上皮、脳下垂体前葉はラトケ嚢、毛髪は皮膚上皮）が間質に陥入して、当該の間葉との相互作用により形成を開始するという共通性がある。これらの異なる組織に由来する石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、歯牙腫、エナメル上皮腫型頭蓋咽頭腫および毛母腫には、幻影細胞および陰影細胞の出現という類似した組織学的特徴がみられ、その腫瘍発生のメカニズムにも共通性があり、さらなる遺伝子レベルでの検索の必要性が考えられた。

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 6 件）

① Akio TANAKA, Motoyoshi OKAMOTO, Dai YOSHIZAWA, Shigeru ITO, Patricia GONZÁLEZ ALVA, Fumio IDE, Kaoru KUSAMA, Presence of Ghost Cells and the Wnt Signaling Pathway in Odontomas, J Oral Pathol Med, 査読有、36 巻、2007、400-404

② 岡本基良、田中 真、ゴンザレス アルバ、パトリシア、井出文雄、坂下英明、田中章夫、Hard keratin 発現腫瘍における幻影細胞および陰影細胞の出現と Wnt シグナル伝達経路について、明海大学歯学雑誌、査読有、37 巻 2008、1-7

〔学会発表〕（計 3 件）

① 田中章夫、Hard keratin 発現腫瘍における Wnt signaling pathway について、第 96 回日本病理学会総会、2007 年 3 月 13 日-15 日、大阪

〔図書〕（計 2 件）

① 内山健志、他、学建書院、コンサイス口腔外科学、2007、214-271

② 内山健志、他、学建書院、サクシント口腔外科学、2009、214-270

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 章夫 (TANAKA AKIO)
明海大学・歯学部・助教

研究者番号：30406392

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
草間 薫 (KUSAMA KAORU)
研究者番号：20130479