

機関番号： 11301  
 研究種目： 基盤研究（C）  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20592194  
 研究課題名（和文） 歯原性上皮の腫瘍化における歯の発生プログラム制御機構の異常に関する研究  
 研究課題名（英文） Alterations of tooth development regulation associated with oncogenesis of odontogenic epithelium  
 研究代表者  
 熊本 裕行（KUMAMOTO HIROYUKI）  
 東北大学・大学院歯学研究科・教授  
 研究者番号：70215028

## 研究成果の概要（和文）：

歯原性上皮の腫瘍化や細胞分化における歯の発生プログラム制御因子の影響について検索した。Notch とそのリガンドの発現は、歯胚・エナメル上皮腫ともに、主として基底膜より離れた上皮性細胞にみられた。幹細胞関連分子 CD133 の発現は、悪性エナメル上皮性腫瘍で歯胚・エナメル上皮腫より有意に高かった。ABCG2 は歯胚上皮に反応がみられず、エナメル上皮腫・悪性エナメル上皮性腫瘍ではいくつかの症例において腫瘍細胞に陽性を示した。オートファジー関連分子 ATG5 のエナメル上皮腫・転移性エナメル上皮腫での発現は、歯胚より低下を示した。Beclin1・ATG5 とともに、エナメル上皮腫において顆粒を持つ腫瘍細胞で発現が著明だった。

## 研究成果の概要（英文）：

Regulators of tooth development were examined in oncogenesis and differentiation of odontogenic epithelium. Tooth germs and ameloblastomas expressed Notch receptors and their ligands chiefly in epithelial cells detached from the basement membrane. A stem cell-related molecule CD133 expression in malignant ameloblastic tumors was significantly higher in tooth germs and ameloblastomas. ABCG2 did not react with tooth germ epithelium, while some cases of ameloblastomas and malignant ameloblastic tumors showed positive reaction in neoplastic cells. An autophagy-related molecule ATG5 expression in ameloblastomas and metastasizing ameloblastomas was slightly lower than in tooth germs. Granular neoplastic cells in ameloblastomas showed evident Beclin1 and ATG5 expression.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード： 実験腫瘍学・歯原性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

| 近年の分子生物学的技術の発展により、歯

の発生の分子メカニズムが解明されつつあり、その制御因子の異常が歯の先天異常や歯の異常を伴う全身性疾患と関連することが知られている(Kurisu et al 1997, Tucker et al 1999, Thesleff 2000)。また、歯の発生制御因子の異常は歯原性腫瘍の発症要因となりうるとの報告も散見されるが、PTC 遺伝子異常(Hahn et al 1996, Levanat et al 1996)、 $\beta$ カテニン遺伝子変異(Sekine et al 2003)、アメロブラスチン遺伝子変異(Toyosawa et al 2000, Fukumoto et al 2004)の検索がなされているのみで、十分な解析がなされているとはいえない。研究代表者は、代表的な上皮性歯原性腫瘍であるエナメル上皮腫を免疫原として歯原性上皮に特異性を示すモノクローナル抗体を作製して歯原性組織の発生・分化およびその病的変化に関する病因について考察し(1996)、特徴的な腫瘍化を示す歯原性上皮に応用した(1997, 1998, 1999, 2000)。また、歯原性上皮由来の腫瘍にはエナメル上皮腫をはじめ腺様歯原性腫瘍・歯原性石灰化上皮腫・転移性エナメル上皮腫・エナメル上皮癌・歯原性淡明細胞癌など多数の疾患があり、臨床的にも病理組織学的にも独特の特徴を有している(Reichart et al 2004, Hall et al 2007)ことについては、歯胚および上皮性歯原性腫瘍における増殖活性関連因子や細胞周期関連因子、アポトーシス関連因子の検索より、これらの因子およびそのシグナル伝達機構の異常が歯原性上皮の腫瘍化や細胞分化に関与することを報告した(1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007)。更に、歯原性腫瘍の多くは局所浸潤の傾向を示し再発しやすいことや稀に転移をきたすことが知られており(Sciubba et al 2001, Barnes et al 2005)、基質分解酵素、接着分子、血管新生因子、骨吸収性サイトカインの検索より、これらが特徴的な病態に関連することを報告した(1999, 2001, 2002, 2003, 2004, 2006, 2007)。歯の発生プログラムに関わる制御因子に関しては、現在までに、エナメル上皮腫における発生シグナル伝達分子のSHH、 $\beta$ カテニン/APC、およびBMPの発現に関する報告(2004, 2005, 2006)、角化嚢胞性歯原性腫瘍および基底細胞母斑症候群におけるPTC遺伝子異常に関する報告(2004)、*ptc*ノックアウトマウスにおける顎骨病変に関する報告(2003)を行っている。

## 2. 研究の目的

歯原性上皮の腫瘍化に伴う歯の発生プログラム制御機構の異常について解明するため、これらに関連する様々な制御因子の変容について検索する。このために、歯の発生プログラムの制御因子である細胞分化決定因

子(Notch1-4, Delta1, Jagged1)、オートファジー関連分子(Beclin1, ATG5)の解析が必要である(Kurisu et al 1997, Tucker et al 1999, Thesleff 2000)。また、組織発生ないし腫瘍発生の母細胞ともなりうることを予測されている幹細胞についても、幹細胞分子マーカー(CD133, ABCG2, Bmi-1)を用いて調査する(Pardal et al 2003, Jordan et al 2006)。以上の解析により、歯原性腫瘍の発症・細胞分化・進展における歯の発生プログラム制御機構の異常について包括的な検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞分化決定因子の検索

① RT-PCR法：凍結組織よりRNA抽出キット(Qiagen)を用いてRNAを抽出し、逆転写反応キット(Qiagen)でcDNAを合成する。歯の発生過程における歯原性細胞の分化決定因子であるNotch1-4およびその受容体Delta1, Jagged1に対するプライマーを作製しPCR増幅する。アガロースゲル上で電気泳動しこれらの因子の発現について調査する。

② In situ hybridization法：1-1)で検索した分子に対するプライマーを作製し、PCRで増幅させる。PCR産物をジゴキシゲニン標識キット(Roche Diagnostic)を用いて転写し、ジゴキシゲニン標識cRNAプローブを作製する。3 $\mu$ mの連続切片を作製し、酵素処理およびアセチル化の後、cRNAプローブと反応させる。各濃度SSCでの洗浄後、ジゴキシゲニン標識核酸検出キット(Roche Diagnostic)により、ハイブリダイゼーションシグナルをNBT/BCIPで発色させ、陽性細胞の局在および程度について観察する(Divjak et al 2002, Tanizaki et al 2006)。

### (2) 歯原性組織内の幹細胞の検索

① RT-PCR法：正常組織や腫瘍組織における幹細胞に関連する分子CD133, ABCG2, Bmi-1に対するプライマーを作製しRT-PCR法でこれらの因子の発現について調査する。

② 免疫組織化学：2-1)で検索した幹細胞関連分子に対する抗体(Miltenyi, Upstate, R&D)を用いて免疫染色を行い、陽性細胞の局在および程度を観察する。

### (3) オートファジー関連因子の検索

① RT-PCR法：オートファジー関連分子であるBeclin1およびATG5に対するプライマーを作製しRT-PCR法でこれらの分子の発現について調査する。

② ウェスタンブロット法：凍結組織のホモジネートより、蛋白質抽出試薬(Sigma)を用いて蛋白質試料を調整する。ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動し、PVDFメンブレンに転写する。これに3-1)で検索したシグナル

分子とその関連受容体に対する抗体(R&D)を作用させ、免疫反応検出キット(Invitrogen)によりこれらの分子の発現を調査する。

③ 免疫組織化学：3-1)2)で検索した分子に対する抗体(Santa Cruz)を用いて免疫染色を行い、陽性細胞の局在および程度を観察する。

#### 4. 研究成果

歯原性上皮の腫瘍化や細胞分化における歯の発生プログラム制御因子の影響を解明するため、細胞の運命決定因子である Notch とそのリガンド、幹細胞関連分子、オートファジー関連分子について検索した。

(1) Notch とそのリガンドの検討：RT-PCR 法および in situ hybridization 法により、歯胚・エナメル上皮腫ともに発現がみられた。歯胚・エナメル上皮腫ともに発現は、主として基底膜より離れた上皮性細胞にみられた。

(2) 幹細胞関連分子の検討：RT-PCR 法および免疫組織化学により、歯胚・エナメル上皮腫・悪性エナメル上皮性腫瘍において、CD133, Bmi-1, ABCG2 の発現がみられた。CD133 の発現は、悪性エナメル上皮性腫瘍で歯胚・エナメル上皮腫より有意に高かった。また、ABCG2 は歯胚上皮に反応がみられず、エナメル上皮腫・悪性エナメル上皮性腫瘍ではいくつかの症例において腫瘍細胞に陽性を示した。

(3) オートファジー関連分子の検討：RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫組織化学により、歯胚・エナメル上皮腫・悪性エナメル上皮性腫瘍において、Beclin1 および ATG5 の発現がみられた。ATG5 のエナメル上皮腫・転移性エナメル上皮腫での発現は、歯胚より低下を示した。Beclin1・ATG5 ともに、エナメル上皮腫において顆粒を持つ腫瘍細胞で発現が著明だった。

#### 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 9 件)

1. Kumamoto H, Oikawa M: Detection of Beclin1 and ATG5 in ameloblastic tumors. Oral Med Pathol 14(4):153-159, 2010(査読有)
2. Kumamoto H, Ohki K: Detection of CD133, Bmi-1, and ABCG2 in ameloblastic tumors. J Oral Pathol Med 39(1):87-93, 2010(査読有)
3. Kumamoto H: Molecular alterations in

the development and progression of odontogenic tumors. Oral Med Pathol 14(4):121-130, 2010(査読有)

4. Takata Y, Koeda S, Inahara H, Kumamoto H, Kawamura H: Tophaceous pseudogout (tumoral calcium pyrophosphate dihydrate crystal deposition disease) of the temporomandibular joint: a case report. Asian J Oral Maxillofac Surg 22(2):108-111, 2010(査読有)

5. Oizumi T, Funayama H, Yamaguchi K, Yokoyama M, Takahashi H, Yamamoto M, Kuroishi T, Kumamoto H, Sasaki K, Kawamura H, Sugawara S, Endo Y: Inhibition of necrotic actions of nitrogen-containing bisphosphonates (NBPs) and their elimination from bone by etidronate (a non-NBP): a proposal for possible utilization of etidronate as a substitution drug for NBPs. J Oral Maxillofac Surg 68(5):1043-1054, 2010(査読有)

6. Ohtaki Y, Yamaguchi K, Yu Z, Kumamoto H, Shimauchi H, Iwakura Y, Sugawara S, Endo Y: Hepatic platelet accumulation in fas-mediated hepatitis in mice. International Immunopharmacology 9(9):1071-1078, 2009(査読有)

7. Kumamoto H, Ohki K: Detection of Notch signaling molecules in ameloblastomas. J Oral Pathol Med 37(4):228-234, 2008(査読有)

8. Kumamoto H, Ooya K: Immunohistochemical detection of BH3-only proteins in ameloblastic tumors. Oral Dis 14(6):550-555, 2008(査読有)

9. 熊本裕行: 歯原性腫瘍の分子病理学. 東北歯誌 27(2):44-56, 2008(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 小野寺健、熊本裕行: 歯原性嚢胞性病変におけるサイトケラン7, 20 およびカルチンの発現に関する免疫組織化学的検討. 第 99 回日本病理学会総会 2010. 4. 28. 東京
2. 熊本裕行: 淡明細胞を伴った下顎骨腫瘍. 第 99 回日本病理学会総会 病理診断講習会 2010. 4. 29. 東京
3. 熊本裕行: 顎口腔病変の病理診断と研究. 平成 22 年度第 1 回歯朋星陵会学術講演会 2010. 6. 24. 仙台
4. 熊本裕行: 歯原性腫瘍の病理診断と分子病理学的解析. 日本大学松戸歯学部大学院セミナー 2010. 11. 11. 松戸
5. 熊本裕行: 歯原性腫瘍の病理. 第 55 回東北大学歯学会 2009. 6. 26. 仙台
6. 熊本裕行: エナメル上皮腫における Notch シグナル伝達分子の発現に関する検討. 第 97

回日本病理学会総会 2008. 5. 16. 金沢

〔図書〕(計 2 件)

1. 入野田昌史、宮下仁、篠原文明、菅原由美子、小関健由、清水良央、三木康宏、熊本裕行：口腔がん・口腔粘膜病変－診査と連携のてびき。宮城県歯科医師会／東北大学大学院歯学研究科 1-10:2010
2. 熊本裕行：歯原性腫瘍・口腔癌。笹野公伸、真鍋俊明編：病理画像ケーススタディ。南山堂 34-35:2008

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

熊本 裕行 (KUMAMOTO HIROYUKI)  
東北大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70215028

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし