

機関番号：33602

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592349

研究課題名 (和文) 骨吸収を惹起する増殖性病変における細胞分化の分子調節機構

研究課題名 (英文)

Molecular mechanism of cyto-differentiation of proliferating bone resorbing lesions

研究代表者

川上 敏行 (KAWAKAMI TOSHIYUKI)

松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・教授

研究者番号：80104892

研究成果の概要 (和文)：

顎骨の骨吸収を惹起する増殖性病変の代表的なものとして、種々の歯源性腫瘍型を取り上げ研究してきた。その結果、顎骨の骨吸収を惹起する増殖性病変の代表的なものとしての歯源性腫瘍やその他の腫瘍型においても、その発生母細胞、母組織の発生時における発現状況と若干異なる事がわかり、腫瘍性を獲得した後においても Notch シグナルは細胞分化時、腫瘍組織内においてもその細胞性格の相違する部位に良く発現しており、腫瘍細胞の細胞分化に強く働いている事が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

We examined Notch signaling molecules, Notch1 and Jagged1, in serial large cases of typical solid/multicystic ameloblastoma. In summary, the results showed that these morphogenesis regulation Notch and related factors are closely related to cytological differentiation in neoplastic cells of ameloblastoma. The Notch and Jagged positive-cell ratio was frequently positive, and was nearly the same between the varied histopathological, cytological patterns; however, the less-differentiated cells were slightly fewer in number than that of well-differentiated cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般

1. 研究開始当初の背景

Notch は 細胞膜結合型タンパクであり、その代表的リガンドは、Jagged である。ここでは、Notch シグナルの概略は 細胞膜結合型タンパクであり、そのリガンドである Jagged と結合する事によって、酵素の作用によって細胞内ドメインが切断され、これを Notch - intracellular domain (NICD) と言う。これが核内に移行し、下流遺伝子を働かせる。その代表的な働きとしては、“側方分化”と呼ばれるものがある。すなわち、時間を経て、変化、すなわち分化するのである。この変化、分化を司っているのが“Notch シグナル”と言うのである。以上のように、Notch シグナルは形態形成や細胞の分化を司る代表的な調節因子であり、歯胚の発生にも重要な役割を担っている。そこで、この細胞分を司っている因子 Notch シグナルについて着目した訳である。

そこで今回、組織型をエナメル上皮腫などに絞った上で、多くの症例について検討する事を考えた。“Notch”の発現をその細胞分化の方向から検討しようとした。

2. 研究の目的

今回研究の背景で説明したように幾つかの歯原性腫瘍について Notch の発現状況を研究してきたものであるから、その流れの中においてエナメル上皮腫における Notch シグナルの発現状況を検討する事を決めた。今回の研究に使うエナメル上皮腫の症例について、病理組織学的詳細な検討の後、Notch シグナルについて、Notch1 と Jagged1 を免疫組織化学的手法 (IHC) によってその発現の分布状態を検討した。また、歯原性腫瘍の他の組織型についても検討した。

3. 研究の方法

まず検討材料であるが、なるべく多くの症

例を検討すべく準備した。最終的に免疫組織化学的に検討したのは、40 症例になった。この 40 症例とは、エナメル上皮腫と診断された 50 症例について、WHO2005 年のエナメル上皮腫の分類基準に則り病理組織学的に再検討し、典型的な「Solid/multicystic type」の合計 40 症例である。さらにその他の組織型の歯原性腫瘍多数も供した。

4. 研究成果

症例番号# 22 は、22 歳男性の下顎に発生したエナメル上皮腫である。線維性の成熟した間質組織内に島状にエナメル上皮腫の胞巣が増殖している事がわかる。その最外層の細胞、いわゆる基底細胞は、立方形ないし円柱状を呈しており、整然と配列していた。胞巣の内方に行くにしたがって星状となって疎に配列し、エナメル髓に似た組織構造をしていた。エナメル上皮腫の典型的な特徴的な組織像であることが判った。また、一部エオシンに好染し、いわゆる扁平上皮化生を示している部もあった。従って、このエナメル上皮腫の胞巣においても各種の細胞において細胞分化がなされていることがわかった。すなわち、円柱形の基底細胞から星状のエナメル髓様の細胞、さらに扁平上皮様細胞へ、そして角化まで。何段階かの細胞分化、ないし化生している事である。

症例番号# 20 では、21 歳男性の下顎の症例です。この様に、典型的な島状の胞巣から、索状に伸びあかかも“歯堤”を思わせるような、立方型の細胞の集合構造を示す部も認められた。その先端は歯堤の先のような蕾状になっている部もあった。

症例番号# 22 は、22 歳男性の下顎のもので。このスライドでは、胞巣の内部に空隙の生じている部、すなわち融解壊死による小さな囊胞形成の部、いわゆる実質囊胞の形

成部、またその周囲にはいわゆる扁平上皮化生を示す部等も認められた。以上の所見から、単に上皮性の構成成分からのみ構成されているエナメル上皮腫においても多種多様な組織構造をしている事を再確認した。したがって、これらの細胞の“分化”には“Notchシグナル”が関与している事が伺えた。

免疫組織化学的染色結果では、症例番号5、20歳、男性の下顎のエナメル上皮腫で、Notch1の免疫組織化学的染色結果では、腫瘍細胞の多くにDABによって褐色に発色した細胞がみられ、エナメル上皮腫の構成細胞にはNotch1が発現していることが確認された。その発現状況をみてみると、胞巣の最外層の細胞、いわゆる基底細胞と、その内部の星状のエナメル髓に似た細胞との両者に発現していた。しかし発現状況は若干異なるように思われた。なお、いわゆる固有間質である線維性結合組織内の線維芽細胞等にも若干の発現が認められた。

症例番号5、20歳、男性の下顎のエナメル上皮腫では、濾胞状のエナメル上皮腫の胞巣が幾つもあり、その構成細胞は、基底細胞、内部の細胞ともにNotch陽性を示していた。しかし、その胞巣の一部から歯堤状に突出した小型の立方型の細胞の集団部では、Notchがほぼ陰性であった。

症例番号2は濾胞状のエナメル上皮腫の胞巣であるが、内部には実質嚢胞や扁平上皮化生部がみられます。そしてそれぞれの細胞はNotch陽性を示していることが伺えた。濾胞状胞巣の一部拡大像では、Notchを染色していたが、その陽性の割合にはかなりのバリエーションが確認された。また、濾胞状のエナメル上皮腫の胞巣であるが、内部には実質嚢胞や扁平上皮化生部がみられた。それぞれの細胞はNotch1陽性を示していることが伺えた。

NotchのリガンドであるJagged1の免疫組織化学染色標本では、症例番号5では、20歳、男性の下顎のエナメル上皮種である。Jaggedの発現状況は、Notchのものと同様に感じられた。すなわち胞巣の最外層の細胞、いわゆる基底細胞と内部の星状細胞との間に若干の相違があるようにみられた。基底細胞では、円柱形細胞にはどちらかと言うと発現している細胞が多いように見受けられたが、基底細胞のとくに立方形の細胞については、発現していない細胞が多いように見られた。

また、濾胞状のエナメル上皮腫の胞巣ですが、内部には実質嚢胞や扁平上皮化生部がみられた。そしてそれぞれの細胞はJagged1陽性を示していることが伺えた。

症例番号5、20歳、男性の下顎のエナメル上皮腫である。先のNotchの所見と異なり、濾胞状のエナメル上皮腫の胞巣から歯堤状に突出した小型の立方型の細胞の集団部では、Jaggedが良く染色されており、平均的な所見と異なる部分もあることが判る。

さて、これらの免疫組織化学的染色結果について、少しでも定量化しようと考え、全症例についてのCS-Indexを求めた。このCS-Indexは、対象視野の総細胞数と陽性細胞数を手作業にてカウントし、その割合を求めるのである。この場合の免疫組織化学的な陽性反応について、その強弱は一切考慮せず、どんなに微かにでも陽性反応が認められればその細胞を陽性と判定し、カウントした。なお、全症例について次のスライドで示す分類基準に基づいて対象視野を特定し、カウントした。そして、その平均陽性率によってマイナス(-)から、プラス(+), 2プラス(++), そして3プラス(+++)に分類しました。(-)は、完全に陽性細胞の無い場合、(+)は陽性率25%以下、(++)は25~70%, それ以上は(+++)とした。

その病理組織学的な分類基準は、検討全症例について、病理組織像から5つに区分した。

(1) 立方形の基底細胞, (2) 円柱形の基底細胞, (3) エナメル髓陽細胞, (4) 扁平上皮化生部, そして(5) 間質の線維芽細胞の5種である。

その結果、まずエナメル上皮腫の胞巣の基底細胞について、Notch と Jagged とともに小型立方型の細胞ではその発現が弱く、円柱形の者のほうがその発現が強い事がわかった。これは、その形状から、立方形細胞の方が分化の程度が低い状態のままであることが伺え、Notch, Jagged のシグナルが強く働いていない事を示すと考えている。

それに対し、胞巣内部の細胞は、エナメル髓様、扁平上皮化生の細胞ともにNotchシグナルが働いている事が伺えた。また、間質の線維芽細胞にもその発現が認められた。

以上、Notch シグナルの発現は、エナメル上皮腫の腫瘍細胞の分化と細胞性格の獲得に密接に関与している事が示唆された。なお、今回のまとめについてはエナメル上皮腫を主体に書きしるしたが、その他の組織型についてもほぼ同様であった。

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 14 件)

①Siar CH, Nakano K, Chelvanayagam PI, Ng KH, Nagatsuka H and Kawakami T (2010) An unsuspected ameloblastoma in the subpontic region of the mandible with consideration of pathogenesis from the radiographic course. Eur J Med Res **15**: 153-158, Peerreviewed.

②Siar CH, Nakano K, Ng KH, Tomida M,

Nagatsuka H and Kawakami T (2010) Squamous odontogenic tumor of the mandible: A case report demonstrating immunoexpression of Notch1, 3, 4, Jagged1, 2 and Delta1. Eur J Med Res **15**: 180-184, Peerreviewed.

③Siar CH, Nagatsuka H, Chuah KS, Rivera RS, Nakano K, Ng KH and Kawakami T (2010) Notch4 overexpression in ameloblastoma correlates with the solid/multicystic phenotype. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **110**: 224-233, Peerreviewed.

④Siar CH, Nakano K, Han PP, Nagatsuka H, Ng KH and Kawakami T (2010) Differential expression of Notch receptors and their ligands in desmoplastic ameloblastoma. J Oral Pathol Med **39**: 552-558, Peerreviewed..

⑤Siar CH, Ha KO, Aung LO, Nakano K, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ng KH and Kawakami T (2010) Immunolocalization of Notch signaling protein molecules in a maxillary chondrosarcoma and its recurrent tumor. Eur J Med Res **15**: 456-460, Peerreviewed.

⑥Nakano K, Siar CH, Tomida M, Matsuura S, Tsujigiwa H, Nagatsuka H and Kawakami T (2010) Immunohistochemical observation of Notch signaling in a case of calcifying cystic odontogenic tumor. J Hard Tissue Biol **19**: 147-152, Peerreviewed.

⑦Siar CH, Chuah KS, Nakano K, Rivera RS, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Ng KH and Kawakami T (2010) Immunohistochemical study of Notch signaling proteins in the calcifying epithelial odontogenic tumor (Pindborg tumor). J Hard Tissue Biol **19**: 167-174, Peerreviewed.

⑧ Nagatsuka H, Katase N, Han PP, Tsujigiwa H, Siar CH, Nakajima M, Naomoto Y, Tamamura R, Kawakami T and Gunduz M (2009) Heparanase and its related molecules in odontogenic tumors. *Oral Med Pathol* **13**:81-89, Peerreviewed.

⑨ Siar CH, Oo VPA, Nagatsuka H, Nakano K, Ng KH and Kawakami T (2009) Angiogenic squamous dysplasia-like phenomenon in oral epithelial precursor lesions. *Eur J Med Res* **14**: 315-319, Peerreviewed.

⑩ Chuah KS, Siar CH, Nakano K, Nagatsuka H, Khoo SP, Ng KH and Kawakami T (2009) Wingless-type protein-1 (Wnt-1) expression in primary conventional and unicystic ameloblastomas and their recurrent tumors. *J Hard Tissue Biol* **18**: 63-70, Peerreviewed.

⑪ Nakano K, Chelvanayagam P, Born K, Siar CH, Ng KH, Nagatsuka H and Kawakami T (2008) A study of recurrent giant odontogenic myxoma of the mandible with immunohistochemical examination of Notch. *Oral Med Pathol* **12**: 53-56, Peerreviewed.

⑫ Nakano K, Siar CH, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N and Kawakami T (2008) Notch signaling in benign and malignant ameloblastic neoplasms. *Eur J Med Res* **13**: 476-480, Peerreviewed.

⑬ Sathi GS, Fujii M, Tamamura R, Borkosky SS, Katase N, Kawakami T, Nagatsuka H and Nagai N (2008) Juxta-epithelial hyalinization inhibits tumor growth and invasion in ameloblastoma. *J Hard Tissue Biol* **17**(2): 63-68, Peerreviewed.

⑭ Nakano K, Nagatsuka H, Tsujigiwa H, Gunduz M, Katase N, Siar CH and Kawakami T (2008) Immunohistochemical character-

istics of odontogenic neoplasms and their physiological counterparts. *J Hard Tissue Biol* **17**(3): 79-90, Peerreviewed.

[学会発表] (計 12 件)

- ① Biennial Conference of European Association of Oral Medicine (10th) Incorporating the World Workshop on Oral Medicine, London, september 25, 2010. Immunohistochemical expression of Notch signaling in calcifying cystic odontogenic tumor: Kawakami T, Siar CH, Nakano K, Tomida M, Matsuura S, Tsujigiwa H and Nagatsuka H (*Oral Dis* **16**: 517, 2010)
- ② International Congress of Oral Pathology and Medicine (15th), Seoul, Korea, August 17, 2010. Wnt-antagonist sFRP-2 inhibits bone formation and promotes cell proliferation in ameloblastoma: Nagatsuka H, Ara SGS, Katase N, Siar CH, Kawakami T, Tamamura R, Hirata Y and Tsujigiwa H (Program and Abstract book p88)
- ③ 日本臨床口腔病理学会総会 (第 21 回) 2010 年 7 月 31 日, 大阪. 石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の 1 例—Notch の免疫組織学的検討—: 中野敬介, 辻極秀次, 長塚 仁, 長谷川博雅, 川上敏行 (プログラム・抄録集 p133)
- ④ International Association for Dental Research (88th), Barcelona, Spain, July 15, 2010. Notch expression patterns and ameloblastoma phenotypes: Siar CH, Nakano K, Chuah KS, Nagatsuka H, Ng KH and Kawakami T. (*J Dent Res* **89** (Sp Iss B) Abstract No. 3478, 2010)
- ⑤ 日本病理学会総会 (第 99 回) 2010 年 4 月 28 日, 東京. Squamous odontogenic tumor の 1 症例: Notch とその関連因子の検討: 中

野敬介, 長塚 仁, 川上敏行 (日病会誌 99 : 313, 2010)

⑥2009 FDI Annual World Dental Congress, Singapore, September 4, 2009. Notch receptors and their ligands in ameloblastomas: Siar CH, Kawakami T, Nakano K, Nagatsuka H and Ng KH

⑦日本臨床口腔病理学会総会 (第 20 回) 2009 年 7 月 30 日, 札幌. 口腔粘膜の境界悪性病変におけるデスモゾームタンパク質の異常発現: 相沢聡一, 落合隆永, 中野敬介, 木村晃大, 川上敏行, 長谷川博雅 (プログラム・抄録集 p86 ; Oral Med Pathol 14: 75, 2009)

⑧ Malaysian Dental Association Annual Dental Meeting (66th), Penang, Malaysia, June 10, 2009. Notch signaling molecules in ameloblastoma: Siar CH, Ng KH, Nagatsuka H, Nakano K and Kawakami T

⑨日本病理学会総会 (第 98 回) 2009 年 5 月 3 日, 京都. Ameloblastoma と ameloblastic carcinoma における HSP27 の発現: 中野敬介, 川上敏行 (日病会誌 98: 360, 2009)

⑩日本歯科医学会総会 (第 21 回) 2008 年 11 月 14 日, 横浜. 歯胚およびその新生物における基底膜の構造変化とその意義: 中野敬介, 長塚 仁, 永井教之, 川上敏行 (日歯会誌 61: 111, 2008)

⑪ International congress of oral pathology and medicine (International association of oral pathologists 14th, American academy of oral & maxillofacial pathology 62nd) San Francisco, June 23, 2008. Recurrent giant odontogenic myxoma of the mandible: Kawakami T, Nakano K, Chelvanayagam P, Born K, Siar CH and Ng KH (Program and abstract p23)

⑫日本病理学会総会 (第 97 回) 2008 年 5 月 16 日, 金沢. Ameloblastoma と Ameloblastic

Carcinoma における Notch の発現: 中野敬介, 長塚 仁, 永井教之, 川上敏行 (日病会誌 97: 75, 2008)

[図書] (計 2 件)

① Kawakami T, Nagatsuka H, Nakano K, Shimizu T, Tsujigiwa H, Hasegawa H and Nagai N (2008) Chapter1: Cell differentiation of neoplastic cells originating in the oral and craniofacial regions. in Ivanova LB Ed: Cell differentiation research developments. p1-30, Nova Science Publishers, New York, USA

② Kawakami T and Nagatsuka H (2009) Cell differentiation of neoplastic cells originating in the oral and craniofacial regions, Nova Science Publishers, New York, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 敏行 (KAWAKAMI TOSHIYUKI)

松本歯科大学・大学院歯学独立研究科・教授

研究者番号 : 80104892

(2) 研究分担者

中野 敬介 (Keisuke Nakano)

松本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号 : 10325095

長塚 仁 (Nagatsuka Hitoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 70237535