

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 12月 30日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592033

研究課題名（和文） 石灰化嚢胞性歯原性腫瘍由来CCOT細胞系における幻影細胞化と石灰化の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of ghost cell formation and calcification in calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) cell lines

研究代表者

程 瑤 (CHENG, JUN)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40207460

研究成果の概要（和文）：歯原性腫瘍に特徴的な幻影細胞が最も顕著な石灰化嚢胞性歯原性腫瘍 (calcifying cystic odontogenic tumor, CCOT) の性格は十分に理解されていない。われわれは同腫瘍由来の細胞株樹立に成功したので、これを用いて幻影細胞成立、二次的悪性化機序を試験管内で検討した。その結果、幻影細胞の特徴的細胞像はパールカンなどの細胞外基質分子が細胞外に分泌されずに沈着することが原因であることをつきとめた。幻影細胞の特徴的な細胞質、脱核の機構など長年の懸案が説明でき、CCOT 由来細胞の腫瘍性格を明確にすることで、CCOT の診断から治療までの臨床的対応に科学的根拠をもってあたることができるようになった。

研究成果の概要（英文）：Calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) is histopathologically characterized by the emergence of ghost cells. However, their histopathogenesis has been poorly understood. To understand the cellular mechanism towards ghost cell formation, we have successfully established of cell lines from a CCOT surgical specimen. Using these CCOT cells, we successfully demonstrated that ghost cells were generated due to intracellular deposits of extracellular matrix molecules including perlecan, and that their calcification was started in those matrices and completed by proteolysis of deposited matrices towards their denucleated forms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：口腔病理学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

 キーワード：歯原性腫瘍 石灰化歯原性嚢胞 幻影細胞 石灰化 細胞外基質 細胞培養  
脱核 免疫組織化学 RT-PCR

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

## 1. 研究開始当初の背景

われわれは、顎骨内に発生する良性歯原性腫瘍から二次的に悪性化する病変、とくに、石灰化歯原性嚢胞に焦点を絞って、その悪性化機序を検討してきた。同病変は、従来顎骨内に発生する嚢胞性病変として分類されてきたが、再発頻度の高いこととともに浸潤性に増殖し、二次的に悪性化するなど腫瘍性性格を有することから、2005年版 WHO 分類では *calcifying cystic odontogenic tumour* (CCOT) という名称が採用となり、腫瘍としての位置づけが明確にされた。しかし、同分類で同時に腫瘍として位置づけられた歯原性角化嚢胞 *keratocystic odontogenic tumour* (KCOT) の根拠が基底細胞癌と共通した *Patched 1* 遺伝子変異であったのに比べ、CCOT の腫瘍性性格根拠は生物学的にやや不十分の感が残った。

CCOT の亜型としては、浸潤性で充実性増殖をしめす *dentinogenic ghost cell tumour*、さらにその悪性型 *ghost cell odontogenic carcinoma* が分類されることになった。しかし、後二者は前者から移行的に発生するのか、三者は明確に異なる病変なのでは？等の疑問は残り、旧称<石灰化歯原性嚢胞>の本態が十分に理解されたわけではない。いずれにも共通する特徴的な幻影細胞分化や類象牙質等の特異な細胞外基質 (ECM) の形成、石灰化機序、各病変の鑑別の意義など未詳な問題が多いが、これらの疑問は摘出材料の病理組織学的検索では解決困難であるので、試験管内での腫瘍細胞の多分化方向性の検討が待たれていた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、顎骨内に発生する石灰化歯原性嚢胞または石灰化嚢胞性歯原性腫瘍 (CCOT) と診断された症例の外科摘出材料の組織化学的検討と CCOT 由来株化細胞を用いた試験管内実験の両軸で、CCOT の基本的生物学的特性石灰化を含む基質形成と幻影細胞成立機序に関して分子病理学的に解析し、その二次的に悪性化する分化機構を解明するのが目的であった。

## 3. 研究の方法

(1) 症例収集および免疫組織化学的検索：本学医歯学総合病院の病理診断ファイルから、石灰化歯原性嚢胞または石灰化嚢胞性歯原性腫瘍 CCOT と診断された症例を無作為に収集し、すべての症例に対して、新しい WHO 診断基準にしたがって再度検鏡し、嚢胞部、充実性増殖部、浸潤性部、とくに石灰化と幻影細胞出現部位を含む病変部分に注目して詳細に再検討した。収集した症例のフォルマリン固定パラフィン包埋標本を連続切片作製し、歯原性上皮細胞マーカーとしてのケラチン分子種、パールカンはじめ各種細胞外基質とその関連分解酵素、アルカリフォスファターゼ等の石灰化関連分子等の発現を検討した。

(2) 細胞培養：すでに樹立したヒト CCOT1 - CCOT6 細胞について、免疫細胞化学、ISH 法、RT-PCR 法、染色体標本作製などのために細胞を培養維持したが、石灰化または幻影細胞化する条件の培養期間をまず決定し、その条件下での周密化までの培養期間の適切な時

期を設定して、経時的に固定、回収した。

(3) 免疫細胞化学および遺伝子発現の検索：同時に CCOT 細胞を、 $1.2 \times 10^4$  細胞を 35 mm の培養皿に植え込み、経時的に 4%パラフォルムアルデヒドで固定後、上記 2)項で使用した同様の抗体種を免疫蛍光抗体法と ISH 法にて実施した。さらに、各株細胞から total RNA を回収して RT-PCR 法を用いて、上記各分子の遺伝子発現状況も確定した。

#### 4. 研究成果

(1) 施設内外から収集しえた石灰化菌原性嚢胞または石灰化嚢胞性菌原性腫瘍 CCOT 症例について、詳細な病理組織学的検討をするとともに、免疫組織化学的な手段をもちいて、菌原性上皮細胞マーカーとしてのケラチン分子種 Keratin(K) 5、K13、K14、K17、K18、K19、アメロゲニン、エナメルリン、パールカン、ヘパラーゼをはじめとする各種細胞外基質 (ECM) とその関連分解酵素、アルカリホスファターゼ、骨シアロタンパク質(BSP)等の石灰化関連分子を、ソニックヘッジホッグや Wnt 経路の各分子を含めても検索し、それぞれの発現様式を確認し、幻影細胞と石灰化の生成機序については経時的関連性も確定した。同時に、CCOT 以外のエナメル上皮腫をはじめ菌原性良性腫瘍で、二次的悪性転化をきたした症例も取り上げ、ポドプラニンの菌原性腫瘍における発現様式を加えて、同様の解析をおこなった。ポドプラニン陽性は菌原性腫瘍細胞胞巣の基底細胞層を中心とした細胞増殖巣に近似した発現パターンをしめし、間質 ECM のシグナル伝達を背景に成立した増殖性関与が明らかになった。しかし、幻影細胞におけるポドプラニン発現は確認されず、幻影細胞化過程で消失することから

も、幻影細胞ではすでに ECM シグナルの受容は行われていないことが判明した。その結果をまとめ論文投稿準備中である。

なお、細胞樹立に使用した CCOT 症例については、その概要を症例報告として出版した。

(2) 樹立し株化したヒト CCOT1-6細胞系を、培養皿に植え込み、経時的に固定後、上記 1)項で使用した同様の抗体種を免疫蛍光抗体法にて実施し、同時に、各株細胞から total RNA を回収して RT-PCR 法を用いて、上記各分子の遺伝子発現状況も確定し、培養細胞は COOT 腫瘍性格と一致する結果が得られた。さらに、単層培養下でも幻影細胞の出現が確認されたが、幻影細胞とその周囲細胞ではポドプラニンが出現せず、組織レベルでの結果と一致した。同時に、口腔扁平上皮癌等の通常型口腔癌細胞との相違を RT-PCR 法を用いて、上記各分子の遺伝子発現状況をさらに詳細に検討し、幻影細胞出現時期を確定させ、その特異的な分子発現状況を把握したが、二次的悪性転化の分子機序の解明には至らなかった。

(3) 以上の病理組織学的解析および培養細胞の解析により、CCOT 腫瘍の幻影細胞には ECM 分子が細胞質内蓄積を起こしていることが判明したので、さらに ECM 分子の分泌障害の視点から、その蓄積状況を解析し幻影細胞の性格付けを開始した。幻影細胞の蓄積 ECM 分子遺伝子の発現状況に対応させて、それらの分解レベル・異常構造の有無を検討した。また本来細胞外に分泌されるべき ECM 分子がただちに分解されず細胞質内に維持される仕組みを解明することに務めた。糖鎖修飾と細胞内輸送経路、蓄積機構と分解抵抗性に関しては幻影細胞を分別微小切出して回収した試料でプロテオーム解析に進めていたが、解析実験に十分な収量を得ることに

成功していないので、今後の課題となった。

以上のとおり、本研究の実施によって、CCOT腫瘍細胞における幻影細胞化、石灰化、細胞外基質の分泌障害の分子機構に関する知見を得た。

#### 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 5 件)

- ① Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Essa A, Babkair H, Mikami T, Shingaki S, Kobayashi T, Hayashi T, Cheng J, Saku T. Intramuscular keratocyst as a soft tissue counterpart of keratocystic odontogenic tumor: differential diagnosis by immunohistochemistry. *Human Pathology* 45(1): 110-118, (2014). (DOI: j.humanpath.2013.08.011). 査読有
- ② Arashiyama T, Kodama Y, Kobayashi T, Hoshina H, Takagi R, Hayashi T, Cheng J, Saku T. Ghost cell odontogenic carcinoma arising in the background of a benign calcifying cystic odontogenic tumor of the mandible. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 114 (3): e35-40, (2012). (DOI: 10.1016/j.oooo.2012.01.018). 査読有
- ③ Metwaly H, Maruyama S, Yamazaki M, Tsuneki M, Abe T, Jen KY, Cheng J, Saku T. Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma. *Human Pathology* 43 (11): 1973-1981, (2012). (DOI:

10.1016/j.humanpath.2012.02.006). 査読有

- ④ Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Cheng J, Saku T. Podoplanin expression profiles characteristic of odontogenic tumor-specific tissue architectures. *Pathology – Research and Practice* 208 (3): 140-146, (2012). (DOI: org/10.1016/j.prp.2011.12.016). 査読有
- ⑤ Tsuneki M, Yamazaki M, Cheng J, Maruyama S, Kobayashi T, Saku T. Combined immunohistochemistry for the differential diagnosis of cystic jaw lesions: its practical in surgical pathology. *Histopathology* 57(6): 806-813, (2010) (DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03721.x). 査読有

[学会発表] (計 6 件)

- ① 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, アーメッド エッサ, 新垣 晋, 齊藤 力, 林 孝文, 程 珺, 朔 敬. 側頭筋-咬筋内嚢胞性病変. 第 23 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2012 年 8 月 29-31 日, 東京医科歯科大学 M&D タワー鈴木章夫記念講堂 (東京都文京区)
- ② Cheng J, Wu L, Maruyama S, Yamazaki M, Saku T. A clinicopathological analysis of intraductal papilloma of minor salivary gland origin. Japan-China Dental Conference 2012. April 26-28, 2012. West China College of Stomatology, Sichuan University (Chengdu, China)
- ③ Cheng J, Wu L, Maruyama S, Yamazaki M, Saku T. Intraductal papilloma with peri-luminal extension of the minor salivary gland. 第 22 回日本臨床口腔病理学会総

会・学術大会・第5回アジア口腔病理学会,  
2011年8月23-25日,九州大学医学部百  
年講堂(福岡市東区)

- ④ Tsuneki M, Yamazaki M, Cheng J,  
Maruyama S, Saku T. Combined  
immunohistochemistry for the differential  
diagnosis of cystic jaw lesions: its practical in  
surgical pathology. 15<sup>th</sup> International  
Congress on Oral Pathology and Medicine.  
International Association of Oral Pathologists  
2010 in Seoul. August 16-20, 2010. Seoul  
COEX (Seoul, Korea)
- ⑤ 程 珺, 常木雅之, 丸山 智, 山崎 学,  
金丸祥平, 新垣 晋, 齊藤 力, 西山秀昌,  
林 孝文, 朔 敬. 顎骨腫瘍. 第20回  
日本口腔粘膜病学会・第21回日本臨床口  
腔病理学会総会・学術大会, 2010年7月  
30日-8月1日, 大阪歯科大学楠葉学舎(大  
阪府枚方市)
- ⑥ 長谷川真弓, 程 珺, 丸山 智, 山崎  
学, 齊藤 力, 朔 敬. 角化嚢胞性歯原  
性腫瘍におけるパールカン結合分子. 第  
20回日本口腔粘膜病学会・第21回日本臨  
床口腔病理学会総会・学術大会, 2010年7  
月30日-8月1日, 大阪歯科大学楠葉学舎  
(大阪府枚方市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/patho/publications/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

程 珺 (CHENG, JUN)  
新潟大学・医歯学系・准教授  
研究者番号: 40207460

### (2) 研究分担者

丸山 智 (MARUYAMA, Satoshi)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号: 30397161

山崎 学 (YAMAZAKI, Manabu)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号: 10547516

朔 敬 (SAKU, Takashi)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号: 40145264

阿部 達也 (ABE, Tatsuya)  
新潟大学・医歯学総合病院・レジデント  
研究者番号: 70634856

### (3) 連携研究者

なし