

## 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 6 月 20 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592049

研究課題名（和文） 良性腫瘍は悪性腫瘍に形質転換するか？唾液腺腫瘍における形態学的・分子病理学的解析

研究課題名（英文） Are benign tumors transformed into malignant tumors? The morphological and molecular pathological analysis in salivary gland tumors.

研究代表者

河野 葉子 (KOHNO YOHIKO)

昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40195681

研究成果の概要（和文）：唾液腺腫瘍のなかで、多形腺腫は最も頻度の高い良性腫瘍で、長期に経過した場合、悪性化することが知られている。同一腫瘍内に良性部位と悪性部位が混在している異型多形腺腫や多形腺腫由来癌を用いて、良性腫瘍が悪性腫瘍に形質転換するメカニズムを検索した。悪性に転化したと思われる異型性を伴った細胞が認められた部位では、p63 や EMA 陽性を示し、筋上皮細胞と導管上皮細胞の両者が形質転換したことが明らかになり、それらの部位では DNA 修復や細胞周期に関与するタンパク質が過剰発現していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： In a tumor of salivary gland, a pleomorphic adenoma is a benign tumor with the highest frequency, and when it passes at a long period of time, carrying out malignant alteration is known. The cause which a benign tumor transforms into a malignant tumor was searched using the atypical pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic-adenoma to which the benign part and the malignant part are intermingled in the same tumor. The part as which the malignant tumor was regarded showed p63 immunohistochemical staining and EMA immunohistochemical staining were positive, what both the myoepithelial cell and the ductal-epithelium cell transformed became clear, and it checked that the protein which participates in DNA repair protein or cell cycle related protein were over expressed by those parts.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	750,000	240,000	990,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,350,000	720,000	3,070,000

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：唾液腺腫瘍、多形腺腫、多形腺腫由来癌、形質転換

## 1. 研究開始当初の背景

唾液腺腫瘍は、全身の腫瘍に占める割合で

は 1% 程度で、頭頸部腫瘍では 5% 以下の発生率である。唾液腺腫瘍には数多くの組織型

が存在し、腫瘍の発生に関していくつかの機序が仮説として提唱されている。唾液腺組織内には種々の細胞がみられ、どの細胞が腫瘍細胞になる可能性を有しているかという説がいくつか提唱されており、導管に存在する基底細胞であるという可能性が示唆される説や、どの細胞も腫瘍化する可能性を有しているという説がある。基底細胞が腫瘍細胞になるという説は、実験的に基底細胞には未分化な性格を有することが証明されており、どの細胞も腫瘍化するという説では、唾液腺に存在するすべての細胞が細胞分裂期に入り、分裂できるということが証明されている。唾液腺腫瘍の多くは導管上皮細胞と筋上皮細胞の二層性を示し、発生母地として介在部導管との関連が示唆されている。腫瘍細胞が二層性を構成する比率は腫瘍によりさまざま、一腫瘍内においても部位により変化がみられることから、一腫瘍でも多彩な像を示す。さらに筋上皮細胞は形態的にも多彩な像を示し、筋上皮細胞と基底細胞は形態的に連続性が認められている。唾液腺腫瘍の発生原因にはさまざまな因子（ウイルス）や環境因子が関与していることも興味深い。筋上皮細胞と基底細胞には形態的連続性がみられ、Actin と cytokeratin14 の発現に移行性がみられており、腫瘍細胞においても同様の連続性が示唆される。

唾液腺腫瘍の組織型の中で、多形腺腫は大唾液腺である耳下腺が最好発部位で、全大唾液腺腫瘍の55%～70%を占める。多形腺腫由来癌の好発年齢は50歳～70歳代で、多形腺腫の存在期間に比例して高くなる。多くの症例に長期間の病歴（平均23.3年）があり、急速に増大してきたために来院することが多い。近年、高齢化社会が進み、高齢者や超高齢者の全人口に対する割合が増加していることを考慮すると、多形腺腫由来癌の発生率も増加する可能性がある。多形腺腫では70%に再構成（染色体の8q12部位、12q13-15部位）が見られ、遺伝子のPLG1とHMGA2が関与していると報告されている。多形腺腫が癌化する過程でCDK4、HMGA2、MDM2を含む12q13-15染色体の遺伝子の過剰発現が関与していると示唆されている。

## 2. 研究の目的

同一腫瘍内で良性部位と悪性部位が確認される多形腺腫由来癌を検体として用いることにより、細胞の形質転換が移行的に行なわれるかどうかの検索（腫瘍での筋上皮細胞や基底細胞の発現差異）が他の腫瘍に比べて容易と考えられる。さらに、良性から悪性に形質転換が起きる場合、細胞周期に変化が起きると推測され、細胞周期の変化の検索や、さらにはDNA修復に関する遺伝子などの相互関係の検索を行なうことが出来る。

現在まで、唾液腺腫瘍の発現起序は諸説挙げられているが、明瞭な結果はいまだ明らかではない。多形腺腫と多形腺腫由来癌に関する論文では、p53の発現やp63、 $\beta$ -cateninの発現での比較を行なっているものが確認されているが、細胞周期やDNA修復などに関する検索を行なっている論文はわずかである。

そこで本研究目的の1つとして細胞周期やDNA修復因子などのさらなるタンパク質発現を検索することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本大学病院の唾液腺腫瘍のうち、2004年～2009年の6年間における良性混合腫瘍（多形腺腫）77症例（現在まで）と悪性混合腫瘍（多形腺腫由来癌）11例（現在まで）を研究試料とする。多形腺腫に発現しているタンパク質などを1つの指標として、多形腺腫由来癌の悪性部位は良性部位からの形質転換で発生したのかどうかを検索・解析する。方法として、筋上皮由来や上皮由来の指標となるマーカー、細胞増殖率の指標となるマーカー、あるいは周囲環境に関するTGF $\alpha$ など、各種の抗体を用いて免疫染色を行い、腫瘍の良性部位と悪性部位での各タンパク質発現の差異を確認する。さらに、その良性部位と悪性部位のDNAを採取し、up regulateあるいはdown regulateしているDNAを検索し、形質転換が起きるメカニズムの解析を進める。

## 4. 研究成果

研究対象として多形腺腫由来癌や異型性を伴う多形腺腫を用い、良性腫瘍部や悪性腫瘍部、移行部で発現しているタンパク質発現の変化を確認し、細胞が良性から悪性に移行するメカニズムの解析を目的とした。

多形腺腫由来癌の癌成分は、大部分が腺管形成や充実性増殖、一部では孤立性に浸潤する上皮成分で、核腫大やクロマチン増加、多形成、核小体が目立つなどの多彩な像を呈していた（図1）。二層性を示す腺管部分でも、内腔側の上皮に異型性を認める部分があり、p63は外側の筋上皮細胞に陽性を示し（図2）、内側の異型を示す細胞ではEMA陽性（図3）、p53陽性、p21陽性が認められた。充実性に増殖する腫瘍細胞の大部分はEMA陽性で、ごく一部にp63陽性がみられた。多形腺腫の硝子変性内に紡錘形の腫瘍様細胞がみられ、一部の細胞にp63陽性を示していた。二層性を示す腺管部分の内腔側の細胞に異型を示し、p53陽性率も高く、充実性に増殖する腫瘍細胞にはEMAやp63の両者の発現を認め、比率としてはEMA発現の方が優位であった（図4、5）。また、異型細胞が著明にみられるところでは、p53の陽性率が高く（図6）、DNA損傷を受けている可能性が示唆された。比率と

しては少ないが、筋上皮細胞に著明な核の大小を示す部分が認められた（図7）。

以下の写真は、異型多形腺腫と多形腺腫由来癌の組織写真で、上皮異型が著明に認められる部位のHE染色、p63染色、EMA染色である。

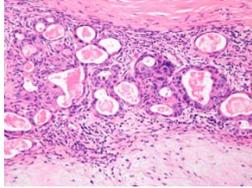


図1. HE染色

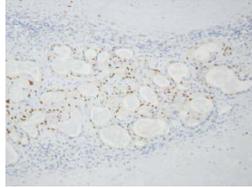


図2. p63染色

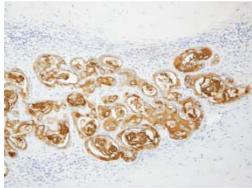


図3. EMA染色

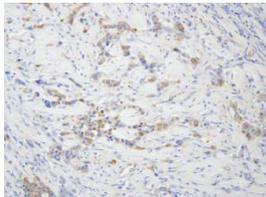


図4. EMA染色

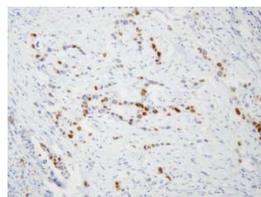


図5. p63染色

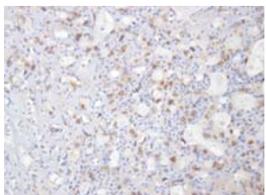


図6. 異型細胞 p53染色

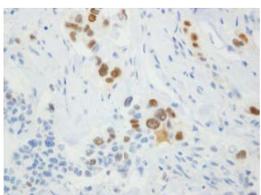


図7. p63染色

Skp2(ユビキチンリガーゼ)は、G0期から増殖サイクルに戻るときに、p27(CDK阻害因子)を分解し、S期でp27の分解を制御していることが知られている。p27などの細胞周期ブレーキを分解することによりG0期から細胞周期への再進入を促し、細胞増殖を開始させることから、異型細胞にSkp2の過剰発現がみられるかどうかの確認を行ったところ、癌細胞や異型細胞に、正常細胞と比較して陽性像が強く認められた。

また、多形腺腫由来癌の経過は長く、多くの症例では多形腺腫が存在した後、急速に増大する傾向がある。筋上皮細胞と基底細胞の形態的連続性が示唆されているが、今回の結果から筋上皮細胞と導管上皮細胞の両者が長期経過中にDNA損傷などをうけて形質転換し、癌化する可能性が示唆された。

以下の写真は唾液腺正常部のskp-2染色（図8）と腫瘍部異型細胞のskp2染色（図9）、HE染色（図10）、p53染色（図11）、skp-2染色（図12）である。

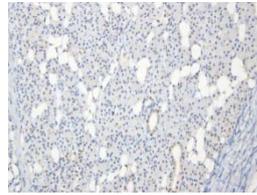


図8. 正常部 skp2染色

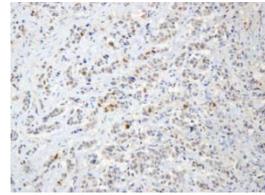


図9. 異型細胞 skp2染色

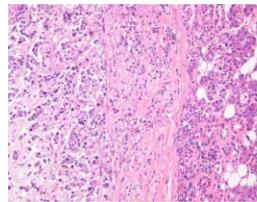


図10. 腫瘍部と正常部(HE)

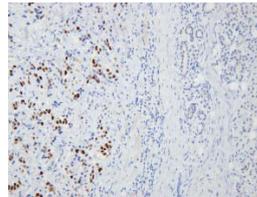


図11. p53染色

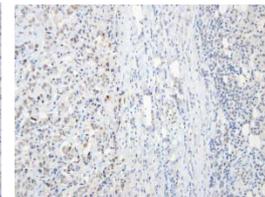


図12. skp2染色

以下の写真は異型細胞が見られる部位の腺管構造や充実性を呈する部分のHE染色（図13）、p21染色（図14）、skp2染色（図15）、MIB-1染色（図16）である。

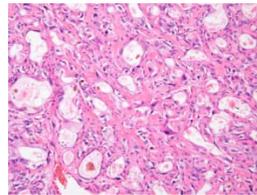


図13. HE

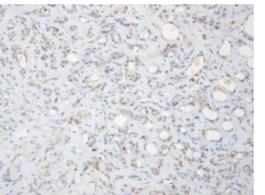


図14. p21染色

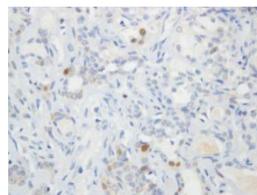


図15. skp2染色

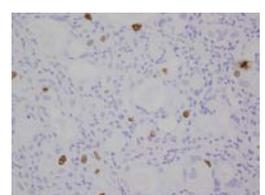


図16. MIB-1染色

## 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4件)

- ① Omatsu M, Kunimura T, Mikogami T, Hamatani S, Shiokawa A, Watanabe H, Kohno Y, Isozaki M, Tateno H, Miyake S, Kitayama T and Morohoshi T. A Rare Case of Peripheral Primitive Neuroectodermal Tumor Arising from the Minor Salivary Gland in a Young Woman. The Showa Univ. J Med Sci Vol. 24 No.4. 319-323, 2012
- ② Kamioka N, Akahane T, Kohno Y, Kuroki T, Iijima M, Honma I, Ohba M. Protein kinase C  $\delta$  and  $\eta$  differently regulate the expression of loricrin and Jun family proteins in human keratinocytes. Biochemical and Biophysical Research Communications. 394 : 106-111, 2010
- ③ 上岡なぎさ、本間生夫、赤羽智子、河野葉子、飯島正文、大場基：ヒト三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立と表皮分化へのCキナーゼの関与。昭和医会誌、70(3号)、253-262、2010
- ④ 花上健一、椎木さやか、武田栄三、山内智博、柴原孝彦、村松敬：下顎に発生した歯原性癌腫の2例。日本口腔外科学会雑誌、56(3号)170-174、2010

〔学会発表〕(計3件)

- ① 診断に苦慮した顎下腺腫瘍の1例  
河野葉子、野呂瀬朋子、瀧本雅文、太田秀一  
第52回日本病理学会関東支部学術集会  
2011年9月3日 埼玉 獨協大学
- ② 顎下腺に発生した唾液腺導管癌の1例  
河野葉子、瀧本雅文、矢持淑子、塩沢英輔、野呂瀬朋子、磯辺友秀、福田ミヨ子、津田祥子、九島巳樹、太田秀一  
第50回日本臨床細胞学会秋期大会  
2011年10月22日、23日 東京
- ③ 唾液腺穿刺吸引細胞診における診断成績の検討  
津田祥子、河野葉子、外池孝彦、福田ミヨ子、太田善樹、前田朱美、吉谷地玲子、九島巳樹  
第53回日本臨床細胞学会総会(春期大会)  
2012年6月1日~3日 千葉 幕張メッセ

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

河野 葉子 (KOHNO YOHKO)  
昭和大学・歯学部・准教授

研究者番号：40195681

### (2) 研究分担者

村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00276982