

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592826

研究課題名(和文) 歯原性上皮の腫瘍化における骨内微小環境と細胞分解系制御の関

研究課題名(英文) Roles of cell degradation system regulation in oncogenesis of odontogenic epithelium within the intraosseous microenvironment

研究代表者

熊本 裕行 (KUMAMOTO, HIROYUKI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70215028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯原性上皮の腫瘍化や分化・進展に関わる細胞増殖・分解の制御分子を検索し、骨内微小環境下での低酸素状態関連分子についても検討した。増殖因子受容体EGFR、HER2-4は歯原性上皮に発現し、EGFRとHER4の発現が顕著だった。これらの分子の遺伝子異常はみられなかった。オートファジー関連分子ATG7、LC3、p62は、主として基底膜近傍の歯原性上皮性細胞に発現した。顆粒細胞型エナメル上皮腫での発現は顕著だった。低酸素状態関連分子HIF-1、CA IXの発現は、歯嚢よりエナメル上皮腫で高く、充実性エナメル上皮腫で単嚢胞性エナメル上皮腫より高い傾向を示した。CD34陽性新生血管については計測中である。

研究成果の概要(英文)：Regulator molecules associated with cell proliferation and degradation as well as hypoxic condition under the intraosseous microenvironment were examined in oncogenesis, cell differentiation, and progression. Growth factor receptors, EGFR and HER2-4, were expressed in odontogenic epithelial cells, and reactivity for EGFR and HER4 was prominent. Gene alterations of these molecules were obscure. Autophagy-related molecules, ATG7, LC3, and p62, were recognized chiefly in odontogenic epithelial cells neighboring the basement membrane. Granula cell ameloblastoma showed high reactivity for these molecules. Hypoxia-related molecules, HIF-1 and CA IX, were found greater in ameloblastoma than in tooth germ, and solid type ameloblastoma showed high reactivity as compared with unicystic type ameloblastoma. Measurement of CD34-positive microvessels is in progress.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯原性腫瘍 骨内微小環境 細胞分解

### 1. 研究開始当初の背景

細胞は、プログラム細胞死の1型で非選択的な構成成分分解を行うオートファジーと、特異的な構成成分を標的とする分解を行うユビキチン-プロテアソーム経路により、分解・成分更新を行っている。近年の研究より、これらの細胞分解系についての分子メカニズムが明らかにされつつあり様々な疾患との関連が示唆されている (Klionsky et al 2000, Weichman et al 2005) が、歯原性腫瘍における研究は限られており十分な解析がなされているとはいえない。一方、歯原性腫瘍の進展の場となる骨内微小環境の動態を示す指標となる骨吸収性サイトカインや骨形成関連因子に関する検索はなされている (Kumamoto 2006, 2010) が、骨内の低酸素状態の把握や腫瘍進展と骨吸収に関わるシステインプロテアーゼに関わる解析は見当たらず、これらを検索することと同時に細胞分解系制御に及ぼす影響についての検討が必要と思われる。

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腫様歯原性腫瘍・石灰化上皮性歯原性腫瘍・転移性エナメル上皮腫・エナメル上皮癌・明細胞性歯原性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 (Barnes et al 2005, Hall et al 2007, Van Dam et al 2010) ことについては、歯胚および上皮性歯原性腫瘍における細胞死関連因子や増殖活性関連因子、歯の発生プログラム制御因子の検索より、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, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2010)。さらに、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)、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)。オートファジー関連因子については、現在までにエナメル上皮腫におけるオートファジー誘導に関わる Beclin1 およびオートファジー実行に関わる ATG5 について検索を行い、これらが腫瘍発生や細胞分化と関わりをもつことの報告を行っている (2010)。また、基質分解酵素については、金属プロテアーゼ MMP-1, 2, 9 とその修飾分子 TIMP-1, 2, RECK, EMMPRIN、セリンプロテアーゼ uPA とその関連分子 uPAR, PAI-1, マスピンについて検討し、これらがエナメル上皮腫の

骨内進展に関与することを報告している (2003, 2006, 2007)。

### 2. 研究の目的

歯原性上皮の腫瘍化における骨微小環境と細胞分解系制御の相関を解明するため、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、骨微小環境下での歯原性上皮の制御因子である増殖因子受容体 HER ファミリー分子 (EGFR, HER2-4)、オートファジー関連分子 (ATG7, LC3, p62)、低酸素状態関連分子 (HIF-1, CA IX) の解析が必要である (Klionsky et al 2000, Yardan et al 2001, Jubb et al 2004)。また、この微小環境下における血管新生動態を CD34 を用いて調査する (Jubb et al 2004)。以上の解析により、歯原性腫瘍の発症・細胞分化・進展における骨内微小環境下での歯原性上皮の細胞分解系制御機構とその異常について包括的な検討を行う。

### 3. 研究の方法

(1) HER ファミリー分子の検索：エナメル上皮腫 65 例 (初発 49 例、再発 20 例；充実型 58 例、単嚢胞型 11 例を含む) と対照の歯嚢 10 例および含歯性嚢胞 11 例を用い、EGFR, HER2, HER3, HER4 の発現・増幅・変異について免疫組織化学および chromogenic in situ hybridization (CISH) 法、DNA ダイレクトシークエンス法により解析した。

(2) オートファジー関連分子の検索：エナメル上皮腫 64 例 (初発 49 例、再発 20 例；充実型 58 例、単嚢胞型 11 例を含む) と対照の歯嚢 9 例を用い、ATG7, LC3, p62 の発現・局在について免疫組織化学により解析した。

(3) 低酸素状態関連分子の検索：エナメル上皮腫 64 例 (初発 49 例、再発 20 例；充実型 58 例、単嚢胞型 11 例を含む) と対照の歯嚢 10 例を用い、HIF-1, CA IX, CD34 の発現・局在について免疫組織化学により解析した。

### 4. 研究成果

歯原性上皮の腫瘍化や細胞分化における骨内微小環境下での歯原性上皮の制御分子の影響を解明するため、増殖因子受容体、オートファジー関連分子、低酸素状態関連分子について検索した。

(1) HER ファミリー分子の検討：EGFR および HER2-4 は、歯原性上皮に免疫組織化学的に発現がみられた。EGFR と HER4 の発現は、HER2 と HER3 より強かった。HER2 の発現は、エナメル上皮腫において歯嚢と含歯性嚢胞より有意に低かった。Her2 と HER4 の発現は、濾胞型エナメル上皮腫において叢状型エナメル上皮腫より有意に高かった。EGFR と HER3 の反応性は、再発例で初発例よりやや強かった。CISH 法で、エナメル上皮腫における

EGFR・HER2の増幅はみられなかったが、いずれも濾胞型で叢状型より有意にシグナル増加が認められた。DNAシーケンス法で、エナメル上皮腫においてEGFRの変異はみられなかった。

(2) オートファジー関連分子の検討: ATG7、LC3、p62は、主として歯原性上皮性細胞に発現がみられた。基底膜近傍の細胞で中央部の細胞より強い発現がみられた。ATG7は、エナメル上皮腫で歯嚢より有意に高く発現した。また、ATG7、LC3、p62の発現は、単嚢胞型エナメル上皮腫で充実型エナメル上皮腫より有意に高かった。顆粒細胞型エナメル上皮腫において、顆粒を有する腫瘍細胞でのこれらのオートファジー関連分子の発現は顕著であった。さらに、LC3とp62の発現は、再発症例において初発症例より有意に低かった。

(3) 低酸素状態関連分子の検討: HIF-1、CA IXは、自然性上皮性細胞および間質間葉系細胞に発現がみられた。これらの発現は、歯嚢よりエナメル上皮腫で高く、充実型エナメル上皮腫で単嚢胞型エナメル上皮腫より高い傾向を示した。CD34は、間質の新生血管内皮細胞に陽性を示し、現在、観察単位面積当たりの血管密度の計測を行っている。また、HIF-1、CA IXの発現とCD34陽性血管の関連について検索中である。

#### 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10件)

1. Okada M, Oikawa M, Miki Y, Shimizu Y, Echigo S, Takahashi T, Kumamoto H. Immunohistochemical assessment of ATG7, LC3, and p62 in ameloblastomas. J Oral Pathol Med 2014; 43(8): 606-612. (査読有)
2. Fukumoto M, Amanuma T, Kuwahara Y, Shimura T, Suzuki M, Mori S, Kumamoto H, Sito Y, Ohkubo Y, Duan Z, Sano K, Oguchi T, Kainuma K, Usami S, Kinoshita K, Lee I, Fukumoto M. Guanine nucleotide-binding protein 1 is one of the key molecules contributing to can cell cell radioresistance. Cancer Sci 2014; 105(10): 1351-1359. (査読有)
3. 栗原淳、宮下仁、柳下陽子、熊本裕行、長坂浩、高橋哲. 下顎頭の高高度骨吸収を伴う巨大な滑膜性軟骨腫症の1例. 日口外誌 2014; 60(2): 50-54. (査読有)
4. Oikawa M, Miki Y, Shimizu Y, Kumamoto H. Assessment of protein expression and gene status of human epidermal growth factor receptor (HER) family molecules in ameloblastomas. J Oral Pathol Med 2013;

42(5): 424-434. (査読有)

5. 川井忠, 廣谷拓章, 君塚哲, 樋口景介, 熊本裕行, 高橋哲, 越後成志. 下顎正中に生じた巨大なエナメル上皮腫の1例. 東北歯誌 2013; 32(1): 17-21. (査読有)
6. 熊本裕行. 歯原性腫瘍の発生進展に関わる分子: 最新の知見と診断への応用. 病理と臨床 2013; 31(5): 541-546. (依頼稿)
7. Yoneda H, Niiijima-Yaoita F, Tsuchiya M, Kumamoto H, Watanabe M, Ohtsu H, Yanai K, Tadano T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Roles played by histamine in strenuous or prolonged masseter muscle activity in mice. Clin Exp Physiol Pharmacol 2013; 40(12): 845-855. (査読有)
8. Miyashita H, Mori S, Fukumoto M, Fukumoto Y, Kumamoto H, Takahashi T. Genetic analysis of the MEN1 and HRPT2 in jaw tumor and parathyroid adenoma associated with familial hyperparathyroidism. Tohoku Univ Dent J 2012; 31(1): 52-58. (査読有)
9. Kobayashi M, Miki Y, Ebina M, Abe K, Mori K, Narumi S, Suzuki T, Sato I, Maemondo M, Endo C, Inoue A, Kumamoto H, Kondo T, Yamada-Okabe H, Nukiwa T, Sasano H. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules as surrogate markers for EGFR inhibitor sensitivity in human lung adenocarcinoma. Br J Cancer 2012; 107(10): 1745-1753. (査読有)
10. Miki Y, Ono K, Hata S, Suzuki T, Kumamoto H, Sasano H. The advantage of co-culture over mono cell culture in simulating *in vivo* environment. J Steroid Biochem Mol Biol 2012; 131(3-5): 68-75. (査読有)

[学会発表](計6件)

1. Kumamoto H. Molecular alterations in odontogenic tumors. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine 2014.5.27.(Istanbul, Turkey)
2. 熊本裕行. 歯原性腫瘍の病理診断. 第25回日本臨床口腔病理学会総会 2014.8.27.(新潟)
3. 影山曜子, 及川麻理子, 清水良央, 熊本裕行. 顎骨嚢胞・腫瘍の臨床病理学的検討 - 特に歯原性病変の特徴について. 第79回日本病理学会東北支部学術集会 2014.7.19.(盛岡)
4. 岡田みわ, 及川麻理子, 三木康宏, 清水良央, 越後成志, 高橋哲, 熊本裕行. エナメル上皮腫におけるATG7、LC3、p62に関する免疫組織化学的検討. 第59回日本口腔外科学会総会 2014.10.17.(千葉)
5. 熊本裕行. 歯原性腫瘍の病理診断. 第24回日本臨床口腔病理学会総会 2013.8.28.(東京)
6. 及川麻理子, 三木康宏, 清水良央, 熊本裕

行. エナメル上皮腫における erbB ファミリー分子に関する検討. 第 101 回日本病理学会総会 2012.4.26. (東京)

〔図書〕(計 1 件)

1. 熊本裕行: 石灰化上皮性歯原性腫瘍. 森永正二郎、高田隆、長尾俊孝編: 頭頸部腫瘍. 文光堂 in press:2015

〔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

三木 康宏 (MIKI YASUHIRO)  
東北大学・災害科学国際研究所・講師  
研究者番号: 50451521

### (3) 連携研究者

なし