

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463054

研究課題名(和文)顎骨部腫瘍の形質発現に関わる分子病理

研究課題名(英文)Molecular pathology of phenotypic changes in lesions of jaw bones

研究代表者

長谷川 博雅 (Hasegawa, Hiromasa)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：60164828

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)：歯源性腫瘍は様々な形態変化を伴う形質変化を示す細胞が出現するが知られている。本研究は、これら歯源性病変での神経内分泌細胞への分化制御機構と歯源性上皮の角化機序を検討した。エナメル上皮腫において神経内分泌細胞の特徴であるCD56とSynaptophysin (SYP)の局在と遺伝子発現を認めた。さらに分化制御因子であるNotchがSYP発現部位に一致して局在した。角化関連因子の発現は歯源性疾患により架橋酵素や構成タンパク質が疾患により構成が異なった。歯源性上皮の形質変化の制御機構や歯源性上皮の角化機序の制御機構は、病態の形成や形態的な変化を誘導し、歯源性疾患の鑑別に応用される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Odontogenic lesions sometimes appear many kinds of abnormal morphologic changes. Therefore, we examine the localization of neuroendocrine cell markers and cornified cell envelop (CE) related proteins in odontogenic lesions. CD56 and synaptophysin co-expressed in some parts of columnar cells in ameloblastomas. Furthermore, the mRNA expressed both CD56 and synaptophysin. CE related proteins showed various expression depending on the lesions. Our result suggest that CD56-positive cells partially differentiated into synaptophysin-positive cells in ameloblastomas. CE related proteins play important roles in odontogenic lesions. The examination of neuroendocrine cell markers and CE related protein expression could clarify the differentiation of some odontogenic lesions.

研究分野：口腔病理学

キーワード：分子病理学 臨床腫瘍学 形質発現

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域に発生する腫瘍として、歯原性腫瘍は非常に大きな位置をしめるものである。歯原性腫瘍の発生母組織である歯は組織発学的に体表外胚葉由来の上皮組織、神経外胚葉由来の間葉組織を包含しており、発生由来の異なる組織の相互作用が臓器組織固有の形質や機能の獲得に関与している。その際、組織を構成する細胞の分化や増殖は細胞間のシグナル伝達によって厳密に制御されている。これは正常組織発生のみならず腫瘍組織においても同様であることがわかってきた。また骨髄幹細胞の多分化能が明らかになり、さまざまな臓器において骨髄幹細胞の積極的関与が報告されている。心筋梗塞や脳梗塞等、一部の疾患では実際に骨髄幹細胞を用いた治療の臨床応用研究が既に始まっている。ES 細胞や iPS 細胞と同様に多分化能を有する細胞が末梢血中に存在し様々な臓器に定着して活動していることが明らかとなってきた。口腔外科領域における各種細胞増殖性病変、すなわち歯原性腫瘍、唾液腺腫瘍などの腫瘍細胞の供給に関わる研究領域のほか、顎骨の骨折、抜歯創の治癒、粘膜損傷の治癒など細胞増殖性病変の場においても、その治癒を促進させる為の過程には骨髄幹細胞が関与すると推察される。しかし、顎骨部腫瘍組織において、その構成細胞の由来と腫瘍の形質発現を検討するにあたり、発生由来胚葉や幹細胞との関連を念頭に行われたものは殆ど無く、機能解明を行う生物学的意義は大きい。本申請研究で得られる結果は、顎骨部腫瘍の分子病理学的診断と分子生物学的アプローチによる腫瘍形質のコントロールによる効果的な治療法の開発に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

歯に関連する組織から発生するエナメル上皮腫をはじめとする各種歯原性腫瘍、唾液腺腫瘍やその他の顎骨部腫瘍の起源となる細胞は、従来考えられていた発生母組織や腫瘍の組織分類とは必ずしも一致せず、発生由来となる組織の性格を時として発現することがある。これら一連の腫瘍組織の起源と由来を詳細に検討し、それら顎骨部病変の形質発現における機能解明を行った。

3. 研究の方法

(1) エナメル上皮腫における分化制御因子の検索
 エナメル上皮腫で CD56、Synaptophysin (SYP)、Chromogranin(CHGA) の組織内での局在を免疫組織学的にデキストランポリマー法にて解析した。またこれらの発現をパラフィン包埋標本から mRNA を抽出し遺伝子発現を RT-PCR 法にて検討した。さらにこれらの遺伝子群を制御する機構を検討するために SYP 発現群と非発現群をマイクロアレイにて遺伝子発現を検討した。マイクロアレイの結

果より得られた Notch の発現を免疫組織学的に検討した。

(2) 歯原性の病変における細胞分化の検索
 エナメル上皮腫 12 例, 歯原性角化嚢胞 20 例, 石灰化歯原性嚢胞 5 例を抽出し実験に用いた。対照群は炎症反応や腫瘍性変化のない正常歯肉上皮を用いた。通法に従いホルマリン固定パラフィン包埋標本作製し、involucrin (IVL) と Transglutaminase (TG) ファミリーおよび Small proline-rich protein (SPR) ファミリーの組織内局在を免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

(1) エナメル上皮腫における分化制御因子の検索

エナメル上皮腫の 14 例 (56.0%) で高円柱状の前エナメル芽細胞様細胞に部分的に CD56 陽性を認めたが、SYP と CHGA は陰性であった。叢状型エナメル上皮腫は、CD56 陽性であったが、SYP と CHGA は陰性であった。濾胞型エナメル上皮腫の 2 例で SYP 陽性であり、柵状増殖を示す胞巢の高円柱状細胞に部分的に陽性を示し、CD56 と SYP の局在はほぼ一致していた (図 1) が、CHGA は陰性であった。

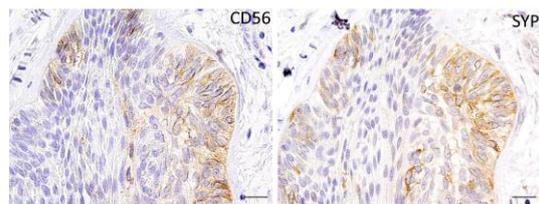


図 1 : CD56 と SYP の組織内局在が一致した。

免疫染色にて CD56 (+) /SYP (+) では CD56 と SYP 遺伝子の増幅が認められた。同様に CD56 (+) /SYP (-) では CD56 の遺伝子が増幅され、CD56 (-) /SYP (-) 例は遺伝子の増幅は確認できなかった (図 2)。

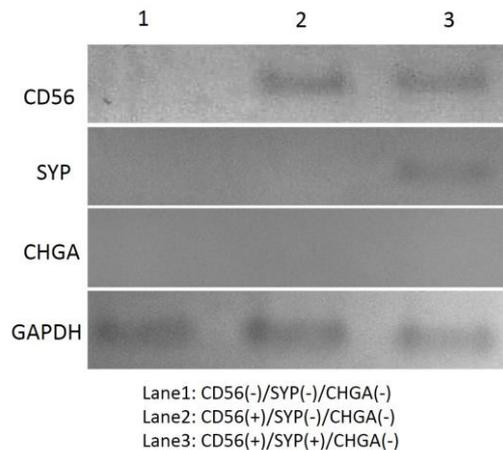


図 2 : CD56 (+) /SYP (+) では遺伝子発現が認められた。

CD56 (+) /SYP (+) と CD56 (-) /SYP (-) のマイクロアレイの結果 CD56 (+) /SYP (+) における Notch4 の高発現が確認できた。免疫

組織学的に Notch4 の局在は CD56 (+) /SYP (+) となった部位と同じ部位に局在をみとめた。

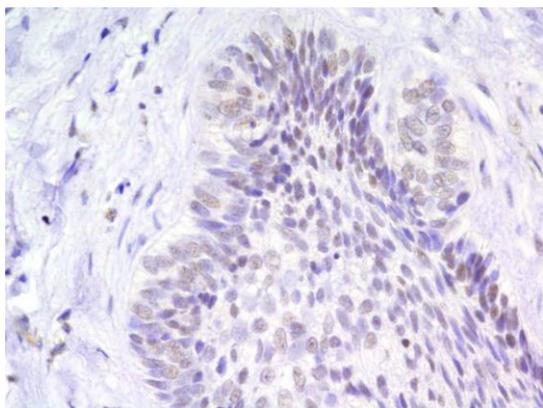


図 3 : CD56 (+) /SYP (+) 陽性部位に一致する Notch4 の局在。

(2) 正常口腔粘膜上皮での角化関連タンパク質の分布

正常角化重層扁平上皮の IVL 発現は、有棘細胞層から角化層直下の細胞質に陽性を認めた。TGM1 は傍基底細胞から角化層直下まで細胞質にびまん性の陽性所見を示した。TGM3 は上皮細胞の細胞質に発現し、有棘細胞層の上層部から角化細胞直下までの細胞膜に局在を認めた。さらに同部での核陽性所見が観察された。TGM5 は、基底細胞から角化層の核に発現を認め、有棘層から角化層直下の細胞膜に局在を認めた (図 4)。

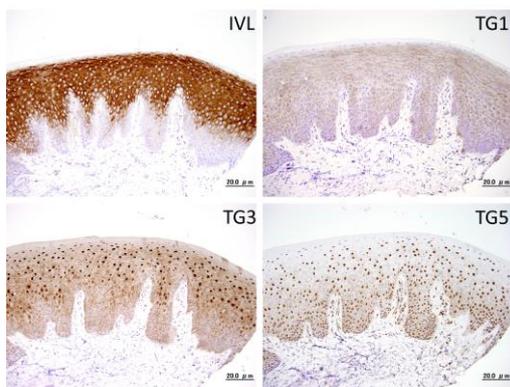


図 4 : 歯肉上皮での IVL と TG ファミリーの局在。

SPR1a は有棘層の核に陽性であった。SPR1b は有棘層の細胞質に局在した。SPR2 は有棘層の核と細胞質に局在をみた。SPR3 は有棘層上層の細胞質に陽性であった (図 5)。

(3) エナメル上皮腫における角化関連タンパク質の分布

IVL は扁平上皮化生部位の有棘細胞様細胞と角化細胞に陽性を示した。TGM1 は有棘細胞様細胞に陽性を認めた。TGM3 の発現は観察されなかった (図 6)。SPR1b と SPR2 および SPR3 は有棘細胞様細胞に局在し、SPR1a は角化細

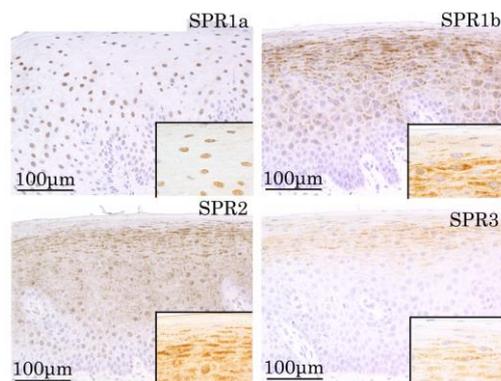


図 5 : 歯肉上皮における SPR ファミリーの局在。

胞に陽性であった (図 7)。重層扁平上皮における角化機序は IVL や LOR および SPRs を TGM1、TGM3 が架橋することで角質層の形成が行われる。これまでの研究で歯原性角化嚢胞では TGM3 が周辺帯形成の架橋酵素となり石灰化歯原性嚢胞では TGM1 と TGM3 が酵素となり IVL や周辺帯関連タンパクを細胞膜で架橋することを明らかとしてきた。平成 28 年度はエナメル上皮腫での角化機構を検討し、IVL と SPR ファミリーを TGM1 が架橋することで周辺帯形成に参与する可能性が示唆された。

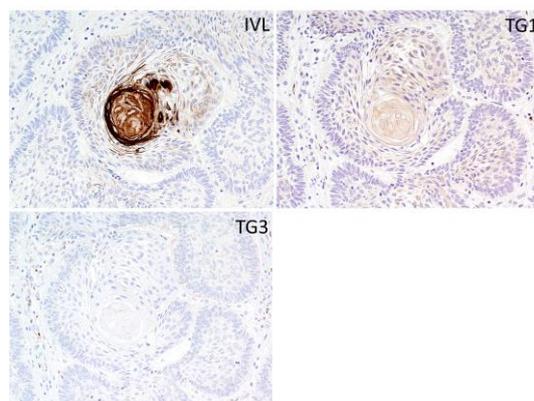


図 6 : エナメル上皮腫における IVL と TG ファミリーの胞巣内での局在。

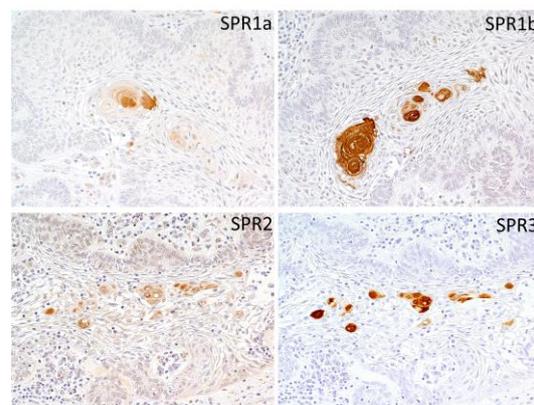


図 7 : エナメル上皮腫での SPR ファミリーの局在。

(4) 歯原性角化嚢胞 (角化嚢胞性歯原性腫瘍) における角化関連タンパク質の分布

歯原性角化嚢胞での IVL は有棘細胞から角化細胞の細胞質に局在し、一部で基底細胞の細胞質に陽性であった。TGM3 は基底細胞から有棘細胞の核と細胞質に発現した。TGM5 は基底細胞の核と細胞質に発現し、有棘細胞では核と細胞膜への局在を認めた。TGM5 の一部の症例で散在性に核に陽性を認めた。TGM1 は有棘細胞の核と細胞質に多くの症例で発現したが、基底細胞から角化細胞に様々な局在を示した (図 8)。

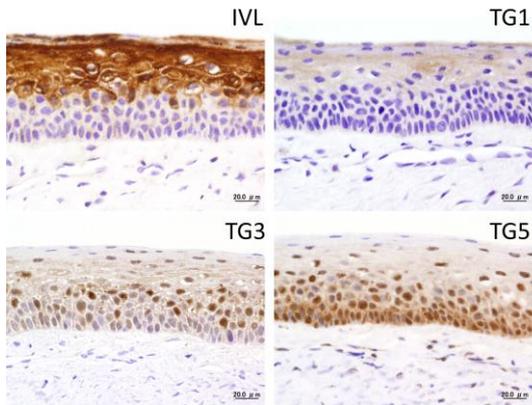


図 8 : 歯原性角化嚢胞における IVL と TG ファミリーの局在。

歯原性角化嚢胞における SPR1a は有棘層と表層の核に陽性であり、僅かに細胞膜への局在があった。SPR1b は有棘層上層と表層の細胞質に局在した。SPR2 と SPR3 は表層の細胞質に陽性であった。歯肉上皮での SPR1a は有棘層の核に陽性であった。SPR1b は有棘層の細胞質に局在した。SPR2 は有棘層の核と細胞質に局在をみた。SPR3 は有棘層上層の細胞質に陽性であった。角化嚢胞性歯原性腫瘍は、TGM3 が基底細胞から有棘細胞で発現した。さらに TGM5 が基底細胞の核と細胞質に発現し有棘細胞では細胞膜への移行が観察された。TGM3 と TGM5 の発現は IVL の局在と関連し、角化に参与する可能性が示唆された (図 9)。

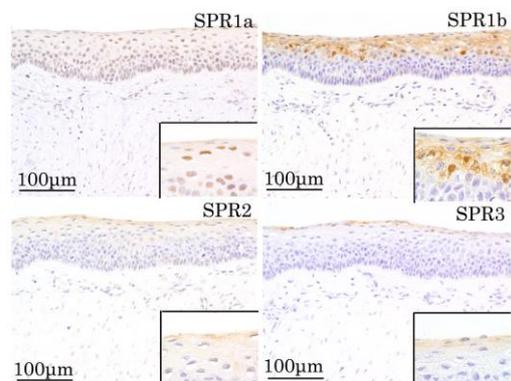


図 9 : 角化嚢胞性歯原性腫瘍での SPR ファミリーの局在

(5) 石灰化歯原性嚢胞 (石灰化嚢胞性歯原性腫瘍) における角化関連タンパク質の分布
石灰化嚢胞性歯原性腫瘍は、幽霊細胞周囲のエナメル髓様細胞と核の残存する幽霊細胞

の細胞質に IVL は局在した。TGM1 は幽霊細胞周囲のエナメル髓様細胞の細胞質に陽性だった。TGM3 は幽霊細胞周囲のエナメル髓様細胞の細胞質と核に陽性だった。TGM5 は高円柱状細胞とエナメル髓様細胞の核に陽性だった (図 10)。

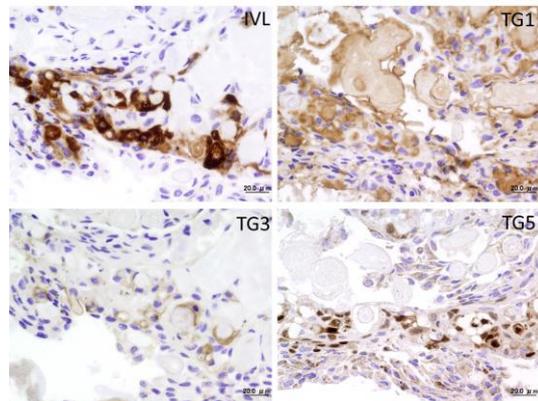


図 10 : 石灰化歯原性嚢胞における IVL と TG ファミリーの局在。

SPR1a と SPR3 は幽霊細胞の細胞膜に局在を認めた。SPR1b は幽霊細胞の細胞質と細胞膜に陽性を認めた。SPR2 は幽霊細胞の細胞質に陽性であった。

石灰化嚢胞性歯原性腫瘍は、エナメル髓様細胞で IVL、TGM1、TGM3 が SPR を架橋することで幽霊細胞を形成に参与する可能性が示唆された (図 11)。

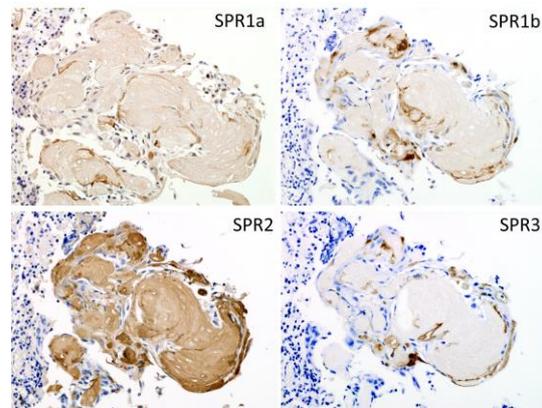


図 11 : 石灰化歯原性嚢胞の幽霊細胞における SPR ファミリーの局在。

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 件)

[学会発表] (計 9 件)

① Ochiai T, Shimada K and Hasagawa H. Cornified cell envelope related proteins in ghost cells. 第 27 回日本臨床口腔病理学会. 2016 年. 広島大学 広仁会館 (広島県広島市)

② 落合隆永、中野敬介、長谷川博雅. 角化嚢

胞性歯原性腫瘍の角化機序. 第 58 回歯科基礎医学会. 2016 年. 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

③落合隆永、嶋田勝光、保坂典子、長谷川博雅. 下顎骨病変. 第 56 回日本骨軟部腫瘍研究会. 2016 年. 樺細工伝承館 (秋田県仙北市)

④Ochiai T, Shimada K and Hasegawa H. Cornified cell envelope related proteins in odontogenic tumors. 13th Biennial congress of the european association of oral medicine. 2016 年. Turin (Italy)

⑤Shimada K, Ochiai T and Hasegawa H. Small prolin-rich proteins in keratocystic odontogenic tumor. 13th Biennial congress of the european association of oral medicine. 2016 年. Turin (Italy)

⑥落合隆永、嶋田勝光、中野敬介、長谷川博雅. 歯原性の幽霊細胞における角化関連因子の免疫組織学的検討. 第 26 回日本臨床口腔病理学会. 2015 年. 北海道大学学術交流会館 (北海道札幌市)

⑦落合隆永、中野敬介、長谷川博雅. Immunohistochemical analysis of cornified cell envelope related proteins in keratocystic odontogenic tumor. 第 57 回歯科基礎医学会. 2015 年. 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

⑧Ochiai T, Nakano K and Hiromasa H. Expression of neuroendocrine cell markers in ameloblastomas. 17th International congress of oral pathology and medicine. 2014 年. Harbiye military museum and cultural center (Istanbul, Turkey)

⑨落合隆永、嶋田勝光、中野敬介、長谷川博雅. CD56 の新たな単嚢胞性エナメル上皮腫マーカーとしての可能性. 第 60 回日本病理学会秋季特別大会. 2014 年. 国立劇場おきなわ (沖縄県浦添市)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :

取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
長谷川 博雅 (HASEGAWA, Hiromasa)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 60164828

(2) 研究分担者
中野 敬介 (NAKANO, Keisuke)
岡山大学・歯学部・准教授
研究者番号 : 10325095

落合隆永 (OCHIAI, Takanaga)
松本歯科大学・歯学部・講師
研究者番号 : 20410417

(3) 連携研究者
辻極 秀次 (TSUJIGIWA, Hidetsugu)
岡山理科大学・理学部・教授
研究者番号 : 70335628

(4) 研究協力者
嶋田 勝光 (SHIMADA, Katsumitsu)