

平成 30 年 4 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11066

研究課題名(和文) 歯原性上皮の腫瘍化に関わる幹細胞性維持と骨内微小環境との相互作用の解析

研究課題名(英文) Association of stemness preservation with 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・教授

研究者番号：70215028

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯原性上皮の骨内微小環境下での腫瘍化や分化・進展に関わる低酸素状態、細胞増殖、発生の制御分子を検索し、幹細胞性維持への影響について検討した。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、CD34陽性血管はこれらと正の相関を示した。細胞内増殖シグナル伝達を担うMAPK、Akt、STAT3経路は歯嚢よりエナメル上皮腫で活性化しており、BRAF変異はエナメル上皮腫でのみ検出された。細胞の発生・分化に関連する遺伝子EWSR1の転座は、明細胞性歯原性癌で検出され、他の淡明細胞性腫瘍ではみられなかった。

研究成果の概要(英文)：Regulator molecules associated with hypoxic condition, cell development, proliferation, and differentiation were examined to clarify the effect of stemness preservation in oncogenesis of odontogenic epithelium under the intraosseous microenvironment. Hypoxia-related molecules, HIF-1 and CA IX, were greater in ameloblastoma than in tooth germ, and solid ameloblastoma showed high reactivity as compared with unicystic ameloblastoma. Measurement of CD34-positive microvessels were correlated positively with HIF-1 and CA IX. Cell proliferation signaling pathways, MAPK, Akt, and STAT3, were activated in ameloblastoma rather than tooth germ, and BRAF mutations were detected only in ameloblastoma but not in tooth germ. Translocation of cell development-related gene EWSR1 was confirmed in clear cell odontogenic carcinoma but not in other clear cell tumors by FISH method.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯原性腫瘍 腫瘍発生 骨内進展

1. 研究開始当初の背景

幹細胞は自己複製能と様々な分化細胞への移行能を有する未分化細胞で、多くの組織の構築・機能維持に関わっている。腫瘍組織中にも幹細胞の機能を有する細胞“腫瘍幹細胞”が見出されており、腫瘍発生に大きな役割を有することが知られている。また、これらの細胞は“ニッチ”とよばれる極めて特殊な微小環境下で制御・維持されているとの報告がなされている (Reya et al 2001, Fuchs et al 2004)。しかしながら、歯原性組織や歯原性腫瘍における幹細胞の存在やニッチに関する報告は少なく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, 2013) が、腫瘍進展と骨吸収に関わるシステインプロテアーゼや骨内の低酸素状態の把握、血管新生の調節を担う Ephrin-Eph 受容体系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歯原性腫瘍中の幹細胞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 (Hall et al 2007, Van Dam et al 2010, Takata et al 2017) 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, 2013, 2014)。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 (Robinson et al 2012, Takata et al 2017)、接着分子、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の進展に関連することを報告した (1999, 2001, 2004, 2005)。幹細胞関連因子については、現在までにエナメル上皮腫および悪性エナメル上皮性腫瘍における CD133, Bmi-1, ABCG2 について検索を行い、これらが腫瘍発生や細胞分化、悪性能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關与することを報告している (2003, 2006, 2007)。血管新生因子については、血管増殖因子 VEGF や血管分化因子アンジオポエチンについて検討を行い、それらが間質の血管誘導と關与し、上皮性歯原性腫瘍の腫瘍化や悪性能に寄与することを報告している (2002, 2006)。

2. 研究の目的

歯原性上皮の骨内微小環境下での腫瘍化における幹細胞性維持のメカニズムを解明するため、これに影響を及ぼすと考えられる様々な制御因子の変容について検索する。このために、骨内微小環境下での歯原性上皮の制御因子である低酸素状態関連分子 (HIF-1, CA IX)、細胞内増殖シグナル伝達分子 (MAPK, Akt, STAT3 経路) 細胞の発生・分化関連遺伝子 (EWSR1) の解析が必要である (Jubb et al 2004, Bilodeau et al 2013, Kurppa et al 2014)。これらの解析により、歯原性腫瘍の骨内微小環境下での発症・細胞分化・進展における歯原性上皮の幹細胞性維持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) 低酸素状態関連分子の検索：エナメル上皮腫 67 例 (初発 48 例、再発 19 例；充実性 37 例、単嚢胞性 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。

(2) 細胞内増殖シグナル伝達分子の検索：エナメル上皮腫 47 例 (充実性 36 例 (濾胞型 19 例、叢状型 17 例)、単嚢胞性 11 例) と対照の歯嚢 10 例に対し、BRAF, V600E 変異 BRAF, pERK, pAkt, pmTOR, pSTAT3 を免疫組織化学で、また BRAF V600E の遺伝子変異を DNA シークエンス法で検討した。

(3) 細胞の発生・分化関連遺伝子の検索：明細胞性歯原性癌 (CCOC) 2 例およびこの腫瘍との鑑別がしばしば問題となる淡明細胞を含む、淡明細胞型石灰化上皮腫 (CC-CEOT) 2 例、淡明細胞型編表皮癌 (CC-MEC) 2 例について、FISH 法および RT-PCR 法により EWSR1 遺伝子転座を調べた。

4. 研究成果

歯原性上皮の骨内微小環境下での腫瘍化や細胞分化における歯原性上皮の幹細胞性維持のメカニズムを解明するため、低酸素状態関連分子、細胞内増殖シグナル伝達分子、細胞の発生・分化関連遺伝子について検索した。

(1) 低酸素状態関連分子の検討：HIF-1, CA IX は、歯原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 は、間質の新生血管内皮細胞に陽性を示し、観察単位面積当たりの血管密度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。また、HIF-1, CA IX の発現と CD34 陽性血管は正の相関を示した。

(2) 細胞内増殖シグナル伝達分子の検討：免疫組織化学的に、BRAF、pERK、pAkt、pmTOR、pSTAT3 は歯嚢の歯堤上皮、エナメル上皮腫の腫瘍細胞の細胞質に発現を示し、一部では核での発現もみられた。エナメル上皮腫でのこれらの分子の発現は歯嚢より有意に高かった。V600E 変異 BRAF は、エナメル上皮腫でのみ発現が認められ、充実性エナメル上皮腫における V600E 変異 BRAF の発現は単嚢胞性エナメル上皮腫に比べ有意に高く観察された。BRAF V600E 遺伝子変異はエナメル上皮腫で検索できた 24 例中 18 例 (75%) で認められ、これらの変異症例はすべて免疫組織化学的に V600E 変異 BRAF 陽性を示した。

(3) 細胞の発生・分化関連遺伝子の検討：FISH 法では、CCOC 例において 10-20%程度の腫瘍細胞に EWSR1 遺伝子の分離シグナルが検出されたが、CC-CEOT および CC-MEC では確認されなかった。現在、これらのパラフィン包埋組織より mRNA を抽出し cDNA に逆転写したサンプルより、EWSR1-ATF1 融合遺伝子の検出を行っている。

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 18 件)

1. Immunohistochemical assessment of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) and carbonic anhydrase IX (CA IX) in ameloblastomas(Arima Y Oikawa M Shimizu Y Echigo S Takahashi T Kumamoto H)J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 30: in press, 2018. (査読有) DOI: 10.1016/j.ajoms.2017.10.002.
2. Peripheral clear cell variant of calcifying epithelial odontogenic tumor devoid of calcification(Kurihara A Mori S Oikawa M Kumamoto H Takahashi T)J Oral Sci 15: in press, 2018. (査読有) DOI: in press.
3. Expression of immunoregulatory molecules PD-L1 and PD-1 in oral cancer and precancerous lesions: a cohort study of Japanese patients(Kouketsu A Sato I Oikawa M Shimizu Y Saito H

- Takahashi T Kumamoto H)J Craniomaxillofac Surg 45: in press, 2018. (査読有) DOI: 10.1016/j.jcms.2017.04.013.
4. 下顎に発生した周辺性象牙質形成性幻影細胞腫の 1 例(神田直典 及川麻理子 廣谷拓章 川井忠 熊本裕行 高橋哲)日口外誌 63(5): 251-256, 2017. (査読有) DOI: なし.
5. 口腔癌(口腔扁平上皮癌)とその前駆病変の組織診断と分子病理(熊本裕行)東北歯誌 35(2)・36(1): 1-9, 2017. (査読有) DOI: なし.
6. Diagnostic performance of MR imaging of three major salivary glands for Sjogren's syndrome(Kojima I Sakamoto M Iikubo M Kumamoto H Muroi A Sugawara Y Satoh-Kuriwada S Sasano T)Oral Dis 23(1): 84-90, 2017. (査読有) DOI: 10.1111/odi.12577.
7. Underlying mechanisms and therapeutic strategies for bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ)(Endo Y Kumamoto H Nakamura M Sugawara S Takano-Yamamoto T Sasaki K Takahashi T)Biol Pharm Bull 40(6): 739-750, 2017. (査読有) DOI: 10.1248/bpb.b16-01020.
8. Experimental comparison between tractional and compressive stress on temporomandibular joint(Nogami S Yamauchi K Shimizu Y Hirayama B Kumasaka A Iikubo M Kumamoto H Takahashi T)Oral Dis 23(5): 644-652, 2017. (査読有) DOI: 10.1111/odi.12650.
9. Induction of the histamine-forming enzyme histidine decarboxylase in skeletal muscles by prolonged muscular work: histological demonstration and mediation by cytokines(Ayada K Tsuchiya M Yoneda H Yakaguchi K Kumamoto H Sasaki K Tadano T Watanabe M Endo Y)Biol Pharm Bull 40(8): 1326-1330, 2017. (査読有) DOI: 10.1248/bpb.b17-00112.
10. Roles of aryl hydrocarbon receptor in aromatases-dependent cell proliferation in human osteoblasts(Miki Y Hata S Ono K Suzuki T Ito K Kumamoto H Sasano H)Int J Mol Sci 18(10): E2159, 2017. (査読有) DOI: 10.3390/ijms18102159.
11. 歯原性腫瘍の病理診断(熊本裕行)東北歯誌 34(2)・35(1): 1-12, 2016.(査読有) DOI: なし.
12. Radicular cyst associated with anomalous tooth, suspicious of dens invaginatus: report of two cases(Kataoka Y Yamauchi K Saito M Nogami S Yamaguchi Y Saito H Kumamoto H Takahashi T) J Oral Maxillofac Surg Med

Pathol 28(4): 375-379, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.ajoms.2016.03.006.

13. Immunohistochemical and genetic evaluations of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma(Abe S Oikawa M Miki Y Shimizu Y Suzuki T Takahashi T Kumamoto H) J Oral Maxillofac Surg Med Pathol 28(2): 174-181, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.ajoms.2015.08.002.

14. Detection of human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: a cohort study of Japanese patients(Kouketsu A Sato I Abe S Oikawa M Shimizu Y Takahashi T Kumamoto H) J Oral Pathol Med 45(8): 565-572, 2016. (査読有) DOI: 10.1111/jop.12416.

15. Quantitative analysis of nuclear shape in oral squamous cell carcinoma is useful for predicting the chemotherapeutic response(Ogura M Yamamoto Y Miyashita H Kumamoto H Fukumoto M) Med Mol Morphol 49(2): 76-82, 2016. (査読有) DOI: 10.1007/s00795-015-0121-4.

16. Timed-release system for periosteal expansion osteogenesis using NiTi mesh and absorbable material in the rabbit calvaria(Yamauchi K Nogami S Martinez-de la Cruz G Hirayama B Shimizu Y Kumamoto H Lethaus B Kessler P Takahashi T) J Craniomaxillofac Surg 44(9): 1366-1372, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.jcms.2016.06.015.

17. *In vivo* corrosion behaviour of magnesium alloy in association with surrounding tissue response in rats(Miura C Shimizu Y Imai Y Mukai T Yamamoto A Sano Y Ikee N Isozaki S Takahashi T Oikawa M Kumamoto H Tachi M) Biomedical Materials 11(2): 025001, 2016. (査読有) DOI: 10.1088/1748-6041/11/2/025001.

18. Steoid and xenobiotic receptor-mediated effects of bisphenol A on human osteoblasts(Miki Y Hata S Nagasaki S Suzuki T Ito K Kumamoto H Sasano H) Life Sci 155: 29-35, 2016. (査読有) DOI: 10.1016/j.lfs.2016.05.013.

[学会発表](計 24 件)

1. 診断に苦慮した下顎前歯部石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の 1 例(瀧藤哲 樋口景介 相場信彦 熊本裕行 高橋哲) 第 43 回日本口腔外科学会北日本支部学術集会 2017.5.26. 函館.

2. 口腔癌および前癌病変における Eph/Ephrin 系の分子発現に関する免疫組織化学的検討(齊藤博紀 及川麻理子 瀧藤衆

清水良央 高橋哲 熊本裕行) 第 62 回日本口腔外科学会総会 2017.10.20. 京都.

3. 口腔扁平上皮癌および前癌病変における制御性 T 細胞および M2 腫瘍随伴マクロファージの関与に関する臨床病理学的研究(瀧藤衆 及川麻理子 清水良央 高橋哲 熊本裕行) 第 35 回日本口腔腫瘍学会総会 2017.1.26. 福岡.

4. アジアにおける歯原性腫瘍の実態に関する大規模共同調査研究(高田隆 仙波伊知郎 前田初彦 武田泰典 熊本裕行 久山佳代 豊澤悟 長塚仁 宮内睦美 小川郁子) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.13. 仙台.

5. エナメル上皮腫における細胞内増殖シグナル伝達分子の検討(及川麻理子 佐藤郁郎 瀧藤衆 清水良央 熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.13. 仙台.

6. エナメル上皮腫における低酸素分子 HIF-1 α , CA IX に関する免疫組織化学的検討(有馬良季 及川麻理子 清水良央 越後成志 高橋哲 熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.13. 仙台.

7. 形態異常歯から生じた歯根嚢胞の 2 例(齊藤博紀 片岡良浩 山口佳宏 山内健介 齊藤政二 熊本裕行 高橋哲) 第 42 回日本口腔外科学会北日本支部学術集会 2016.6.18. 山形.

8. 口腔扁平上皮癌とその前駆病変の病理診断(熊本裕行) 第 5 回宮城県口腔外科学会総会・講演会 2016.9.3. 仙台.

9. 口腔癌・前癌病変の分子病理とその臨床応用(熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.14. 仙台.

10. 口腔癌および前癌病変における Eph/Ephrin 系の分子発現に関する免疫組織化学的検討(齊藤博紀 及川麻理子 瀧藤衆 清水良央 高橋哲 熊本裕行) 第 61 回日本口腔外科学会総会 2016.11.25. 千葉.

11. 口腔癌および前癌病変における PD-L1/PD-1 発現に関する臨床病理学的研究(瀧藤衆 佐藤郁郎 及川麻理子 清水良央 高橋哲 熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.12. 仙台.

12. 樹脂包埋標本の多段階研磨・染色法(及川美穂 清水良央 佐野有哉 及川麻理子 熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.14. 仙台.

13. 骨組織誘導再生法における血管改造(加賀龍太郎 清水良央 及川麻理子 佐野有哉 及川美穂 熊本裕行) 第 105 回日本病理学会総会 2016.5.14. 仙台.

14. 新規 BP 製剤(MPMBP) の局所投与によるラット大腿骨の骨欠損治療に対する効果(齋藤悠 刀根武士 小田島健二 清水良央 篠田壽 高橋哲 熊本裕行) 第 61 回日本口腔外科学会総会 2016.11.25. 千葉.

15. Histopathological and histomorphometrical characteristics of *in vivo* behavior of concentrated growth factor

in rabbits(Tone T Shimizu Y Saito H Sato T Ito H Oikawa M Takahashi T Kumamoto H) The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science 2016.1.18. Sendai.

16. 歯原性腫瘍の病理診断(熊本裕行)第26回日本臨床口腔病理学会総会 2015.7.29. 札幌.

17. アジアにおける歯原性腫瘍の実態に関する大規模共同調査研究(高田隆 仙波伊知郎 前田初彦 武田泰典 熊本裕行 久山佳代 豊澤悟 長塚仁 宮内睦美 小川郁子)第26回日本臨床口腔病理学会総会 2015.7.30. 札幌.

18. 小児の上顎に生じたエナメル上皮癌の1例(岡田みわ 井筒崇司 枝松満 及川麻理子 熊本裕行 濱本宜興)第60回日本口腔外科学会総会 2015.10.17. 名古屋.

19. Odontogenic tumors(Kumamoto H) Workshop Nasional I Ikatan Spesialis Pathologi Mulut Dan Maksilfasial Indonesia (ISPaMMI) 2015.11.21. Surabaya (Indonesia).

20. 口腔癌におけるPD-L1発現に関する臨床病理学的研究(瀧本 及川麻理子 清水良央 齋藤博紀 高橋哲 熊本裕行)第60回日本口腔外科学会総会 2015.10.17. 名古屋.

21. 骨欠損部におけるセラミック系骨補填材移植による血流回復と血管再生効果(清水良央 佐野有哉 加賀龍太郎 及川麻理子 及川美穂 熊本裕行)第104回日本病理学会総会 2015.4.30. 名古屋.

22. ラット大腿骨骨欠損部における新規BP製剤(MPMBP)の局所投与による治癒効果に関する研究(齋藤悠 清水良央 刀根武士 小田島健二 篠田壽 高橋哲 熊本裕行)第69回日本口腔科学会学術集会 2015.5.13. 大阪.

23. 完全自己血液由来フィブリンゲル(CGF)の生体内分解挙動と組織反応(刀根武士 清水良央 齋藤悠 及川麻理子 伊藤秀寿 高橋哲 熊本裕行)第69回日本口腔科学会学術集会 2015.5.13. 大阪.

24. ウサギCGFにおける生体内作用の病理組織学および組織形態学的検討(刀根武士 清水良央 伊藤秀寿 齋藤悠 佐藤工 及川麻理子 高橋哲 熊本裕行)第19回日本顎顔面インプラント学会総会学術集会 2015.11.28. 横須賀.

〔図書〕(計4件)

1. 明細胞性歯原性癌・骨外型/周辺型エナメル上皮腫・扁平歯原性腫瘍(熊本裕行): 口腔病理アトラス 第3版(高木實 監 高田隆・豊澤悟 編)文光堂 212, 220, 221: 2018.

2. 歯原性嚢胞(熊本裕行): 新口腔病理学 第2版(下野正基 高田隆 田沼順一 豊澤悟 編)医歯薬出版 182-188: 2018.

3. 硬組織非脱灰研磨標本の作製法(清水良央

及川美穂 佐野有哉 及川麻理子 高橋正敏 高田雄京 熊本裕行): 組織細胞化学 2016(日本組織細胞化学会編)中西印刷 131-144: 2016.

4. 石灰化上皮性歯原性腫瘍(熊本裕行): 腫瘍病理鑑別診断アトラス 頭頸部腫瘍 II(森永正二郎 高田隆 長尾俊孝編)文光堂 123-127: 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

清水 良央(SHIMIZU YOSHINAKA)
東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 30302152

及川 麻理子(OIKAWA MARIKO)

東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 00712902

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし