

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：33602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20571

研究課題名(和文)顎骨部病変の形質発現と形態変化に関わる分子病理

研究課題名(英文)Molecular pathology involved in phenotypic expression and morphological changes in jaw lesions

研究代表者

落合 隆永(Ochiai, Takanaga)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20410417

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯原性病変は様々な形態変化を伴う形質変化を示す。歯原性病変での上皮組織の形態変化と角化制御機構を検討した。エナメル上皮腫の扁平上皮化生部ではinvolucrin (IVL)をtransglutaminase1 (TGM1)が架橋し、歯原性角化嚢胞ではIVLをTGM3とTGM5が架橋し、石灰化歯原性嚢胞はIVLをTGM1とTGM3が架橋した。口腔粘膜ではIVLとSPRをTGM1とTGM3が架橋し、正常上皮におけるTGM酵素活性も細胞膜への発現が観察された。歯原性病変は病変の分化の違いにより角化制御機構も異なるり、エナメル上皮腫では特異な角化制御機構の可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Odontogenic lesions appear some kinds of abnormal morphologic changes such as squamous metaplasia and abnormal keratinization. Cornified envelope (CE) is an important structure for keratinization. Ameloblastoma expressed involucrin (IVL), small proline rich protein (SPR) and transglutaminase1 (TG1). In odontogenic keratocyst, TG3 and TG5 crosslinked by IVL. TG1 and TG3 were associated with IVL in calcifying odontogenic cyst. These results suggested the possibility of keratinization mechanism of each odontogenic lesions.

研究分野：口腔病理学

キーワード：分子病理学 形質変化

1. 研究開始当初の背景

顎骨に発生する病変の多くは歯に関連する歯原性疾患である。歯原性疾患は腫瘍性の歯原性腫瘍や嚢胞の歯原性嚢胞がある。歯原性病変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。歯原性病変での上皮組織の変化には、扁平上皮化生、顆粒細胞の出現、石灰化物の出現および腺腔形成等さまざまな変化がしばしば観察される。これらの変化には様々な制御機構や遺伝子異常が存在するが、歯原性腫瘍や唾液腺腫瘍の一部では既に遺伝子異常が報告されているが、多くの疾患で全容は明らかでない。そして、細胞の形質変化に伴う形態変化に対する報告は少ない。これらの制御機構を明らかとすることで、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制御機構解明は病変の発生や治療および病理診断に有用な情報をもたらす。

2. 研究の目的

歯原性腫瘍や歯原性嚢胞の上皮組織は、生理的な歯の発生では観察されない組織変化を呈することが多々みられる。これらの変化は化生であると考えられていたが、組織変化を説明するには不十分であり、詳細な検討も少ない。歯原性上皮での様々な形態変化の多様性は類をみないものであり、これは歯の発生期での歯原性上皮組織と歯原性外胚様性間葉組織が相互に作用するために既知の細胞分化調節因子とは異なる細胞分化や形態形成因子が機能している可能性が考えられる。そこで、本研究では様々な形態変化を呈する歯原性上皮の分化制御機構を解明し、歯に関連する疾患の生物学的な性格を検索する。本研究では、正常の口腔粘膜と歯原性腫瘍および歯原性嚢胞で角化を特徴とする疾患を選択し、角化関連因子を検討した。

3. 研究の方法

(1) 正常組織における角化関連因子の検索
口腔粘膜の非角化重層扁平上皮と角化重層扁平上皮を用いて involucrin(IVL)と Transglutaminase(TGM) ファミリーおよび Small proline-rich protein(SPR) ファミリーの局在を免疫組織化学的に行った。

(2) 角化関連因子のタンパク発現と酵素活性部位の検討

口腔粘膜上皮を用いて凍結標本を作成し、TGM1 と TGM3 のタンパク発現を蛍光免疫組織化学的に局在の検討をした。酵素活性は酵素

組織学的方法を用いて蛍光標識合成ペプチドを用いて酵素活性部位の局在を検討した。また、タンパク質局在と酵素活性部位を免疫組織化学的手法と酵素組織学的手法の二重染色にて同一標本で分布を角化重層扁平上皮と非角化重層扁平上皮のそれぞれで比較検討した。

(3) 歯原性疾患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と皮膚を用いた。通法に従いホルマリン固定パラフィン包埋標本を作製し、involucrin(IVL) と Transglutaminase(TGM) 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) 正常組織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1)。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。

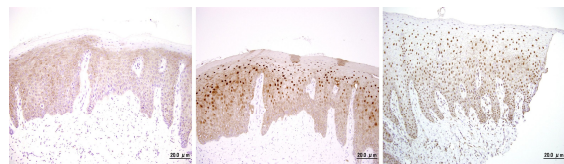


図1：正常口腔粘膜における角化関連因子の発現 TGM1 (左) TGM3 (中央) TGM5 (右)

(2) 角化関連因子のタンパク発現と酵素活性部位の検討

非角化重層扁平上皮にける TGM1 のタンパク質は有棘層の細胞膜に局在し、酵素活性も有棘層の細胞膜にみられた。TGM3 は表層の細胞膜にタンパク質が局在し、酵素活性も表層細胞の細胞膜に発現した。角化重層扁平上皮では TGM1 のタンパク質は有棘細胞から表層細胞の細胞膜に発現し酵素活性も有棘層から表層にかけての細胞膜に発現した。TGM3 のタンパク質は有棘層から表層にかけての細胞質と細胞膜に局在し、酵素活性も同部位の細胞膜へ発現した。タンパク質発現と酵素活性の二重染色において、非角化重層扁平上皮と

角化重層扁平上皮はタンパク質発現と酵素活性は一致した(図2)。非角化重層扁平上皮では有棘層で TGM1 の活性が上昇し、表層では TGM3 の活性が認められることが明らかとなった。角化重層扁平上皮では TGM1 と TGM3 が有棘層から表層まで広く分布し CE の形成に関与することが明らかとなった。口腔粘膜の CE 形成は TGM1 と TGM3 が共に IVL や SPR を架橋することが錯角化の形成機序に重要であると考えられる。

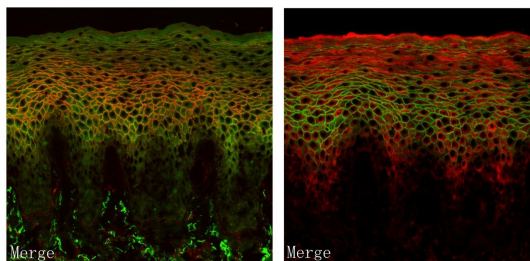


図2：角化重層扁平上皮における TGM1 (左) と TGM3 (右) のタンパク質局在と酵素活性

(3) エナメル上皮における角化制御機構

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3)。SPR1b と SPR2 および SPR3 は有棘細胞様細胞に局在し、SPR1a は角化細胞に陽性であった。口腔の正常角化重層扁平上皮における角化機序は IVL や LOR および SPRs を TGM1 と 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。エナメル上皮腫での角化機構は、IVL と SPR ファミリーを TGM1 が架橋することで周辺帯形成に関与することが明らかとなった。

エナメル上皮腫では口腔粘膜や皮膚の周辺帯形成機構とは異なる機序によって角化が制御されている可能性が示唆された。

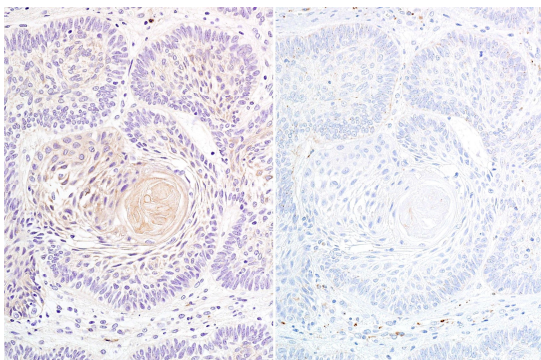


図3：エナメル上皮腫における角化関連因子の発現。TGM1 (左)、TGM3 (右)

(4) 歯原性角化嚢胞における角化制御機構

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。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。

歯原性角化嚢胞は、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、角化に関与する可能性が示唆された(図4)。

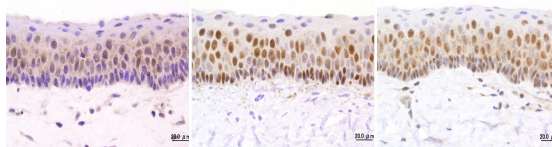


図4：歯原性角化嚢胞における TGM の発現。TGM1 (左)、TGM3 (中央)、TGM5 (右)

(5) 石灰化歯原性嚢胞における角化制御機構

石灰化歯原性嚢胞は、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5)。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 と SPR を TGM1、TGM3 および TGM5 が架橋することで幽霊細胞を形成に関与する可能性が示唆された。

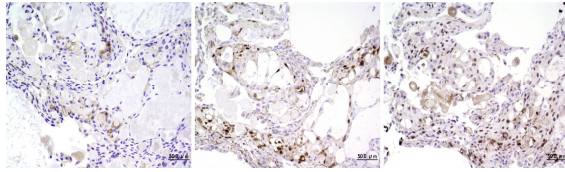


図5：石灰化歯原性嚢胞における角化関連酵素の局在 TGM1(左)、TGM3(中央)、TGM5(右)

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 1 件)

長谷川博雅、嶋田勝光、落合隆永 . 口腔扁平苔癬の鑑別診断 . 診断病理 : (34), 1-14, 2017. 査読有

[学会発表](計 12 件)

落合隆永 . 歯原性腫瘍における形質変化の制御因子 . 第 59 回歯科基礎医学会 . 2017 年 . 松本歯科大学 (長野県塩尻市)

落合隆永、嶋田勝光、中野敬介、長谷川博雅 . 歯原性角化嚢胞における角化関連因子の局在 . 2017 年 . 第 60 回口腔科学会中部地方部会 . 愛知学院大学 (愛知県名古屋市)

嶋田勝光、落合隆永、長谷川博雅 . Transglutaminase の口腔粘膜上皮における局在 . 2017 年 . 第 60 回口腔科学会中部地方部会 . 愛知学院大学 (愛知県名古屋市)

嶋田勝光、落合隆永、長谷川博雅 . 口腔粘膜上皮における Small proline rich proteins の局在 . 2017 年 . 第 10 回日本口腔検査学会 . 日本歯科大学生命歯学部 (新潟県新潟市)

嶋田勝光、落合隆永、長谷川博雅 . 口腔粘膜上皮の周辺帯関連タンパク質の局在 -Transglutaminase と Small proline-rich proteins- 第 85 回松本歯科大学学会 . 2017 年松本歯科大学 (長野県塩尻市)

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)

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)

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)

Ochiai 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)

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

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)

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)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 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 0 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

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