

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10100

研究課題名(和文) 発生学的知見と上皮間葉組織病態を応用した新たな歯原性嚢胞の病理診断方法の開発

研究課題名(英文) Development of new pathological diagnosis method of odontogenic cyst using the findings of histogenesis and epithelial-mesenchymal histopathology

研究代表者

前田 初彦 (Maeda, Hatsuhiko)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：30175591

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯原性嚢胞の病理組織学的所見は類似しており、また、二次的に炎症を伴うことが多く日常の病理診断に苦渋することが多い。本研究は、発生学的知見と上皮間葉組織病態を応用して歯原性嚢胞の簡便で信頼性の高い実践的な免疫染色を用いた病理診断方法を開発することを目指した。その結果、CK-13、CK-17、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrinの免疫染色を組み合わせることが、病理診断において歯原性角化嚢胞とその他の歯原性嚢胞を区別できる最適な免疫染色の組み合わせであることが判明した。この病理診断方法は、歯原性嚢胞の治療に大きく寄与する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎骨内嚢胞の治療において、歯原性角化嚢胞は再発率が高いことが問題であり、歯原性角化嚢胞との鑑別を正確におこなうことが重要である。しかし、歯原性嚢胞の裏装上皮は病理組織学所見が類似しており、二次的な炎症を伴った場合の正確な病理診断は極めて難しい。本研究では、歯原性嚢胞の簡便で信頼性の高い実践的な病理診断方法を開発することを目指している。この病理診断方法により、日常の歯原性嚢胞の診断・治療に大きく寄与し、ひいては国民の健康維持および医療費の負担軽減につながる。

研究成果の概要(英文)：Histopathological findings of odontogenic cysts are similar, and routine pathological diagnosis is often difficult because they are often accompanied by secondary inflammation. This study aimed to develop a simple, reliable, and practical immunostaining-based pathological diagnosis method for odontogenic cysts by applying embryological findings and epithelial-mesenchymal histopathology. As a result, we found that a combination of immunostaining for CK-13, CK-17, Ki-67, EGFR, Gli-2, and Loricrin is the optimal combination of immunostaining that can distinguish odontogenic keratocyst from other odontogenic cysts in pathological diagnosis. This pathological diagnosis method will greatly contribute to the treatment of odontogenic cysts.

研究分野：口腔病理学

キーワード：歯原性嚢胞 病理診断 上皮間葉転換 口腔組織発生 組織アレイ サイトケラチン 免疫染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯原性嚢胞は歯胚のエナメル器、歯堤の残存、Malassez の上皮遺残に起因する嚢胞で、口腔領域で発生頻度が高い疾患である。嚢胞の病理組織学的所見は類似しており、また、二次的に炎症を伴うことが多く日常病理診断に苦渋することが多い。これまでに、歯原性嚢胞のサイトケラチン(CK)の発現を解析した報告がある¹⁾が、その発現は複雑であり、どのCKを病理診断に使用するのが最適であるかは、未だ判明していない。これまでの歯原性嚢胞の診断においては、嚢胞裏装上皮のCKの発現やKi-67などを用いて細胞増殖を検討していた。しかし、CKの発現は、CK-1、2、4、5、6、7、10、13、14、17、18、19、20と多岐にわたっており、また、Ki-67の発現も2次的な炎症をとともうと増加する傾向があり、決定的な病理診断に利用できる免疫染色は現在までに無い。

申請者らは、歯原性角化嚢胞(角化嚢胞性歯原性腫瘍)の再発に関する予後を調べた結果、病理診断時の歯原性角化嚢胞におけるKi-67発現の評価が、再発を避けるための予後マーカーとして役立つことを示唆した²⁾。また、歯原性病変にメラノサイトの発現がみられ、特に歯原性角化嚢胞に高率にみられることを明らかにし、また、その発現により歯原性角化嚢胞の発生起源は年齢により異なる可能性を報告した³⁾。さらに、歯原性嚢胞の被覆上皮のCK発現やepidermal growth factor receptor (EGFR)およびglioma associated oncogene homologue-2 (Gli-2)の発現の検索も行い、歯原性角化嚢胞においてCK17、EGFR、Gli-2の発現が高いことを報告した³⁾。そして、嚢胞壁の性状が各嚢胞により異なることが考えられ、歯原性嚢胞での上皮間葉組織病態の上皮間葉転換(EMT)の指標であるE-cadherin、N-cadherinの発現を検討した結果、歯原性角化嚢胞においては、E-cadherinの発現が減少しN-cadherinが増加することを明らかにした(未発表)。このことから歯原性角化嚢胞では、EMTが起きていることが示唆された。また、歯原性嚢胞の上皮間葉転換の解析では、歯原性角化嚢胞の局所浸潤にEMTが関与していることが、Transforming growth factor- (TGF-)およびSlugの陽性所見から報告されている⁴⁾。

顎骨内嚢胞の治療において、歯原性角化嚢胞は再発率が高く、また、局所浸潤が強いことが問題であり、歯原性角化嚢胞とその他の嚢胞との鑑別を正確におこなうことが重要である。しかし、歯原性嚢胞の裏装上皮は病理組織学所見が類似しており、二次的な炎症を伴った場合の正確な病理診断は極めて難しいのが現状である。

2. 研究の目的

歯原性角化嚢胞は再発率が高く、また、局所浸潤が強い。そのため顎骨内嚢胞の治療では、歯原性角化嚢胞とその他の嚢胞との鑑別を正確におこなうことが重要である。しかし、歯原性嚢胞の裏装上皮は病理組織学所見が類似しており、さらに、二次的な炎症を伴った場合の正確な病理診断は極めて難しいのが現状である。申請者らは、病理診断時の歯原性角化嚢胞におけるKi-67発現の評価が再発を避けるための予後マーカーとして役立つことをすでに報告している²⁾。また、歯原性嚢胞の被覆上皮のCK発現やEGFRおよびGli-2の発現の検索を行い、歯原性角化嚢胞においてCK17、EGFR、Gli-2の発現が高いことを報告した³⁾。さらに、歯原性角化嚢胞においては、E-cadherinの発現が減少しN-cadherinが増加することを明らかにし(未発表)、歯原性角化嚢胞では、EMTが起きていることが示唆された。

本研究では、これらの結果を基に歯原性嚢胞のCK発現、EMT、上皮増殖因子、結合組織への浸潤、遺伝子変異を相補的に検索して、歯原性嚢胞の簡便で信頼性の高い実践的な病理診断方法を開発することを目指している。この病理診断方法により、歯原性嚢胞の治療に大きく寄与し、ひいては国民の健康維持および医療費の負担軽減につながる。

3. 研究の方法

本研究では、発生学的知見と上皮間葉組織病態を応用した免疫染色により新たな歯原性嚢胞の病理診断方法の開発を目的としている。

対象とする顎骨内嚢胞は、歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞とした。また、軟組織内の鼻歯槽嚢胞、頬皮嚢胞、頬表皮嚢胞とエナメル上皮腫や扁平上皮癌は、鑑別診断用の比較対照とした。研究には、愛知学院大学歯学部附属病院にて2002~2017年の15年間に手術により採取され、病理診断により上記の対象疾患と診断された各100症例のホルマリン固定パラフィン包埋組織切片を使用して、組織アレイを作成した。1つのアレイには各9症例を載せた。組織アレイ作成は、直径6mmのトレパンで組織を切り取り、通常の包埋皿に資料を接着材にて固定してパラフィン包埋して使用した。また、炎症が著しい症例においても病理診断に使用できるのか明らかにするために、嚢胞上皮内および嚢胞壁に炎症性細胞浸潤を伴う症例を選出した。なお、炎症性の歯原性嚢胞である歯根嚢胞に関しては、より炎症の著しい症例を使用した。

検索対象は、CK発現:CK-4、5、6、10、13、14、17、19、EMT:E-cadherin、N-cadherin、Slug、遺伝子異常:Gli-2、上皮増殖因子:Ki-67、EGFR、mTOR (mammalian target of rapamycin)、Transforming growth factor- (TGF-)、上皮の角化:Loricrin、アポト

ーシス：B-cell lymphoma 2 (BCL-2)、浸潤関連：Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、を用いて、統計学的に優れた病理診断に最適な免疫染色の組み合わせを明らかにした。方法として、日常病理診断に多く用いられている免疫染色を使用し、その検証としてウェスタンブロットィング(WD)および *in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)を用いてタンパク質発現を実証した。各免疫染色の結果を口腔病理専門医 4 名によりスコアリングを行い、この結果を統計学的処理(重回帰分析等)を行い、病理診断に最適な組み合わせを検索した。

4. 研究成果

(1) CK 発現：CK-4、5、6、10、13、14、17、19 の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、歯原性角化嚢胞でその他の嚢胞と比較して、CK-13 および 17、特に CK-17 の陽性率が有意に高かった。この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫や扁平上皮癌に比較的類似していた。また、CK-19 の発現に関しては、含歯性嚢胞および歯根嚢胞に陽性率が高い傾向がみられた。歯原性角化嚢胞では CK-19 の発現は弱い傾向が認められた。その他の CK- 4、5、6、10 の陽性率に関しては優位の差はみられなかった。

(2) EMT：E-cadherin、N-cadherin、Slug の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、歯原性角化嚢胞において N-cadherin の陽性率が高かったが、統計学的な優位の差は認められなかった。また、この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照の扁平上皮癌に比較的類似していた。E-cadherin および Slug の陽性率に関しては優位の差は認められなかった。

(3) 遺伝子異常：Gli-2 の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、歯原性角化嚢胞において Gli-2 の陽性率が有意に高かった。この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫に比較的類似していた。

(4) 上皮増殖因子：Ki-67、EGFR、mTOR (mammalian target of rapamycin)、Transforming growth factor- (TGF-) の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、歯原性角化嚢胞において Ki-67 および EGFR の陽性率が有意に高かった。しかし、mTOR や TGF- の陽性率に関しては優位の差は認められなかった。この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫や扁平上皮癌に類似していた。

(5) 上皮の角化：Loricrin の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、歯原性角化嚢胞において Loricrin の陽性率が有意に高かった。この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫や扁平上皮癌に比較的類似していた。

(6) アポトーシス：B-cell lymphoma 2 (BCL-2) の免疫染色結果：

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、各嚢胞において、陰性の結果であった。

(7) 浸潤関連：Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

歯原性嚢胞の歯根嚢胞、含歯性嚢胞、歯原性角化嚢胞および非歯原性嚢胞の鼻口蓋管嚢胞における上記の免疫染色結果では、一部、歯原性角化嚢胞において陽性であったが、優位の差はみられなかった。鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫や扁平上皮癌においては、MMP-9 の陽性率は高かった。

また、上記の結果の検証として WD、ISH を行い、その結果、各タンパク質の発現を確認した。

上記の(1)から(7)の結果、歯原性角化嚢胞ではその他の嚢胞と比較して、CK-17、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrin の陽性率が有意に高かった。この免疫染色の結果は鑑別診断用の比較対照のエナメル上皮腫や扁平上皮癌に比較的類似していた。

(8) 上記の(1)から(7)の結果をもとに、CK-17、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrin の免疫染色を炎症が著しい症例においても病理診断に使用できるのか明らかにするために、嚢胞上皮内および嚢胞壁に炎症性細胞浸潤を伴う症例を用いて行った。なお、炎症性の歯原性嚢胞である歯根嚢胞に関しては、より炎症の著しい症例を使用した。この結果、歯原性角化嚢胞では、その他の嚢胞と比較して、CK-17、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrin の陽性率が有意に高いことが判明した。また、上記の結果の検証として WD、ISH を行い、その結果、各タンパク質の発現を確認した。

上記(1)から(8)の結果を統計学的処理(重回帰分析等)を行い、最適な免疫染色の組み合わせについて検討した。その結果、歯原性角化嚢胞の鑑別において、CK-17、CK-19、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrin の免疫染色を組み合わせることが最適であることが判明した。

<まとめ>

CK 発現：CK- 4、5、6、10、13、14、17、19、 EMT：E-cadherin、N-cadherin、Slug、
遺伝子異常：Gli-2、 上皮増殖因子：Ki-67、EGFR、mTOR (mammalian target of rapamycin)、
Transforming growth factor- (TGF-)、 上皮の角化：Loricrin、 アポトーシス：B-
cell lymphoma 2 (BCL-2)、 浸潤関連：Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、を用いて、

歯原性嚢胞の統計学的に優れた病理診断に最適な免疫染色の組み合わせを検討した結果、歯原性角化嚢胞の鑑別において、CK-17、Ki-67、EGFR、Gli-2、Loricrin が陽性で、CK-19 が陰性であることが重要であることが判明した。

この病理診断方法は、日常で行われている通常の免疫染色の組み合わせであり、簡単な方法である。この病理診断方法により、歯原性嚢胞の治療に大きく寄与し、ひいては国民の健康維持および医療費の負担軽減につながる。

<引用文献>

- 1) Stoll C, Stollenwerk C, Riediger D, Mittermayer C, Alfer J. Cytokeratin expression patterns for distinction of odontogenic keratocysts from dentigerous and radicular cysts. *J Oral Pathol Med.* 2005 Oct;34(9):558-64. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00352.x. PMID: 16138895.
- 2) Kuroyanagi N, Sakuma H, Miyabe S, Machida J, Kaetsu A, Yokoi M, Maeda H, Warnakulasuriya S, Nagao T, Shimozato K. Prognostic factors for keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation. *J Oral Pathol Med.* 2009 Apr;38(4):386-92. doi: 10.1111/j.1600-0714.2008.00729.x. Epub 2009 Jan 2. PMID: 19141056.
- 3) Isomura M, Sato N, Kawai R, Yoshida W, Sugita Y, Kubo K, Komori A, Yoshiyama M, Doi S and Maeda H, *J Hard Tissue Biol*, 27: 233-236, 2018.
- 4) Zhong WQ, Chen G, Zhang W, Ren JG, Wu ZX, Zhao Y, Liu B, Zhao YF. Epithelial-mesenchymal transition in keratocystic odontogenic tumor: possible role in locally aggressive behavior. *Biomed Res Int.* 2015;2015:168089. doi: 10.1155/2015/168089. Epub 2015 Mar 23. PMID: 25879017.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	吉田 和加 (Yoshida Waka) (10513210)	愛知学院大学・歯学部・講師 (33902)	
研究分担者	杉田 好彦 (Sugita Yoshihiko) (20367618)	愛知学院大学・歯学部・准教授 (33902)	
研究分担者	久保 勝俊 (Kubo Katsutoshi) (60329604)	愛知学院大学・歯学部・准教授 (33902)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	河合 遼子 (Kawai Ryouko)		
研究協力者	磯村 まどか (Isomura Madoka)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------