

平成23年5月2日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592208

研究課題名(和文) 歯原性腫瘍の組織型発現の決定因子に関する分子病理学的研究

研究課題名(英文) Molecular-pathological study on histological expression-mechanism of odontogenic tumors

研究代表者

武田 泰典 (TAKEDA YASUNORI)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：60137536

研究成果の概要(和文)：歯原性腫瘍の病理組織所見の多彩性を決定する要因を *in vivo* ならびに *in vitro* で検索した。その結果、エナメル上皮腫の腫瘍細胞とマクロファージとの間の相互作用の存在、周辺性歯原性上皮性腫瘍の細胞骨格タンパク、癌遺伝子産物、細胞増殖活性等の特異性、再発性エナメル上皮腫の組織学的特徴、エナメル基質産生性上皮性腫瘍における基底膜タンパクの変化、エナメル上皮腫由来細胞からの不死化上皮細胞株樹立の可能性、歯原性上皮細胞間結合におけるレチノイン酸の役割、などを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Tumorigenic factors related to various histopathologic expression of odontogenic tumors were examined by immunohistochemical and molecular biologic methods. The results were as follows: the existence of epithelial-mesenchymal interaction between tumor cells of ameloblastoma and macrophages, cellular and molecular pathologic characteristics of peripheral epithelial odontogenic tumors, histopathologic characteristics of recurrent ameloblastoma, characteristics of basement membrane-related proteins in various stages of enamel matrix-like substance in calcifying epithelial odontogenic tumor, possibility of establishment of human dental epithelial cell lines expressing enamel-related proteins, influence of retinoic acid to tight junctions in odontogenic keratinocytes, etc.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学、病理診断学、分子病理学、歯原性腫瘍、上皮間葉相互作用

1. 研究開始当初の背景

歯原性腫瘍は歯牙萌出領域という限局した部分に生じるが、その組織型は多彩であり、かつ、それぞれに好発部位が存在する。しか

し、組織型や好発部位を規定する因子は全く不明である。また、多くの歯原性腫瘍の組織由来は Malassez の上皮残遺をはじめとする種々の歯原性上皮ならびにそれらに接する

間葉組織に求められてきたが、実際に歯原性腫瘍と正常歯胚あるいは歯牙構成要素との関連を示した研究はなかった。私はこの点について動物材料および人体材料を用いて検討しており、歯原性腫瘍の発生と組織表現型の決定に神経外胚葉系細胞が関与していることや、好発部位を規定していると思われる要因をはじめ、新たな知見を明らかにしてきた。本研究では、それらをさらに発展させることを目的に企画した。なお、国内外の関連する研究の中での当該研究動向や位置づけについてであるが、歯原性腫瘍の病理学的特徴ならびにその組織発生については内外で膨大な研究がなされてきたにも関わらず、神経外胚葉系細胞ならびに神経組織との関連から系統的な研究を行ってきたのは私だけであり、その成果は 20 編ちかくの論文として国際誌に発表し、欧米のテキストや論文にも引用されていた。

2. 研究の目的

種々の形成段階のヒトの歯とその周囲組織、ならびに歯原性混合性腫瘍にはときに神経外胚葉細胞がみられることは従来から一部の研究者によって指摘されてきたが、これは極めて稀な偶発的現象と考えられ、その病理学的意義も考慮されなかった。私は 1985 年から歯胚、歯周組織、種々の歯原性腫瘍と嚢胞における神経外胚葉系細胞の出現状況と分布状況、出現経路等を明らかにし、その生理的および病理学的意義について考察を加え、発表してきた。今回はさらに開発されつつある最新の手法を駆使し、より詳細な検討を試みる。とくにこれまでに歯牙形成完了後の歯原性上皮と末梢神経組織との間の相互作用の存在を提唱してきており、神経線維を伝わって顎骨深部に歯原性上皮が migration する現象が各種腫瘍の好発部位を決定するものと考えに至った。今回、個々の腫瘍細胞はもとより、腫瘍細胞間ならびに腫瘍細胞と非腫瘍細胞との相互作用を中心に検討する。

一方、歯の発生と形成過程における上皮間葉組織間の相互作用の存在は古くから知られているが、実際にこれら両者間に如何なる細胞間伝達経路があるのかは明らかでない。そこで間葉系誘導を伴わないエナメル上皮腫と、活発な上皮間葉相互作用のみられるエナメル上皮線維腫に着目し、分離培養法ならびに組み合わせ培養法にて上皮細胞と間葉細胞との界面を中心に各種リセプターの発

現状況を比較検討する。このような試みは未だなされていない。

本研究は多岐にわたるため、研究に当たって、具体的に以下の三つに大きく分けて行った：

(1) ヒトの検体を用いた免疫組織学的ならびに分子病理学的手法による腫瘍細胞個々の動態、腫瘍細胞間相互作用、ならびに腫瘍細胞と非腫瘍細胞との相互作用について

とくに上皮と単球—マクロファージ系細胞については、部分的にはあるが同様の所見が角化嚢胞性歯原性腫瘍にもみられることがあるが、他の上皮性歯原性腫瘍でマクロファージと腫瘍上皮との関連を検索した報告はない。歯原性腫瘍に関する一連の研究の中で、稀ではあるが単球—マクロファージ系細胞が増殖腫瘍細胞間に、あるいは腫瘍胞巣に接して集簇することがあることを確認している。そこで単球—マクロファージ系細胞と腫瘍細胞との間に相互作用があるか否かを検討する。

これまでに蒐集できた周辺性歯原性腫瘍について、腫瘍と被覆上皮との移行部の細胞骨格の性状、癌遺伝子産物、細胞増殖活性等について検索する。加えて、歯原性腫瘍のほとんどを占める顎骨中心性のものとの比較検討を行う。

再発したエナメル上皮腫例を用い、一次症例と比較して周囲組織への発育状況に差異があるか否かを検討する。

石灰化上皮性歯原性腫瘍の実質細胞から産生されるアミロイド様物はエナメル基質タンパクと考えられているが、エナメル基質は間葉系組織に誘導されるものであり、上皮性腫瘍におけるエナメル基質タンパクの消長に関する知見は乏しい。そこで、石灰化上皮性歯原性腫瘍における基底膜構成タンパクならびに細胞間結合タンパクの発現を検討する。

Chievitz 傍口腔器官は、ときに組織学的に扁平上皮癌との鑑別を要するといわれているが、歯原性腫瘍との鑑別については論じられていないため、具体的な症例を提示しながら、新たな提言を行う。

(2) 得られた結果の臨床的ならびに病理診断学的応用について

上記で得られた結果について臨床的ならびに病理診断学的応用できる可能性について検討する。

加えて、特殊な臨床所見や画像所見を呈する石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、再発性エナメル上皮腫、石灰化上皮性歯原性腫瘍、類臍型エナメル上皮腫などの診断やの治療について報告をする。

(3) ヒト症例から得られた正常組織やならびに腫瘍細胞の *in vitro* における動態について

エナメル上皮腫由来細胞からの不死化上皮細胞株の樹立の試みが諸施設でなされているが、未だ株化は難しいのが現状である。そこで、臨床例を用い、私の主宰する分野で新たな視点からこの点について試みる。

歯肉接合上皮と歯の原基(歯原性腫瘍の原基ともいえる)とは発生学的に同一である。なお、私が主宰する分野では、ヒト接合上皮を気相と液相との界面で培養する方法に成功している。この培養法を用いて種々の条件化における反応を検索する。

なお、以上の研究の全てはヒトの細胞や組織を用いたものであり、それらの使用に当たっては日本病理学会で定められた研究指針を遵守するとともに、岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認を得たうえで遂行する。

3. 研究の方法

(1) エナメル上皮腫の腫瘍細胞とマクロファージとの相互作用について

上皮と単球—マクロファージ系細胞とからなる病変として疣状黄色腫が知られている。部分的にはあるが同様の所見が角化嚢胞性歯原性腫瘍にもみられることがあるが、他の上皮性歯原性腫瘍でマクロファージと腫瘍上皮との関連を検索した報告はない。歯原性腫瘍に関する一連の研究の中で、稀ではあるが単球—マクロファージ系細胞が増殖腫瘍細胞間に、あるいは腫瘍胞巣に接して集簇することがあることを確認している。そこで単球—マクロファージ系細胞と腫瘍細胞との間に相互作用があるか否かを検討する。

基底膜を構成する主要分子の一つであり、腫瘍間質のみならず、上皮細胞にも発現し、腫瘍細胞の実質と間質との表現型に何等かの関与をしていると考えられている *perlecan* に着目した。

以上の2点について、主として通常の手法にしたがった免疫組織化学的に検討する。

(2) 周辺性歯原性腫瘍における被覆上皮基底層の細胞学的性状について

これまでに蒐集できた周辺性歯原性腫瘍

について、腫瘍と被覆上皮との移行部の細胞骨格の性状、癌遺伝子産物、細胞増殖活性等について検索した。加えて、歯原性腫瘍のほとんどを占める顎骨中心性のものとの比較検討を行なった。

今回は周辺性エナメル上皮腫について、被覆上皮基底層と腫瘍との移行部における 34β E12(高分子ケラチン)と CAM5.2(低分子ケラチン)、ならびにアポトーシス抑制活性を持つ癌遺伝子である *bcl-2* の発現に注目し、免疫組織化学的に検索する。加えて、Ki-67(MIB-1)の陽性率を指標とした細胞増殖活性についても検討する。

(3) 再発性歯原性腫瘍の特異な浸潤性について

再発したエナメル上皮腫例を用い、一次症例と比較して周囲組織への発育状況に差異があるか否かを検討する。

(4) エナメル基質産生性上皮性腫瘍における上皮—間葉間の動態について

石灰化上皮性歯原性腫瘍例を用い、実質細胞から産生されるアミロイド様物の消長を知るために基底膜構成タンパクならびに細胞間結合タンパクの発現を免疫組織化学的に検討した。用いた一次抗体は、基底膜構成タンパクの一つの *laminin5* と *type IV collagen*、細胞結合タンパクの一つの *E-cadherin* である。

(5) Chievitz 傍口腔器官(juxtaoral organ of Chievitz)構成細胞と歯原性上皮生腫瘍との類似性について

Chievitz 傍口腔器官そのものをヒトの症例から得ることは非常に困難であるが、これまでに蒐集することのできた症例について詳細な病理組織学的所見を観察する。パラフィン包埋ブロックがあるものについては、新たな薄切片を作製して免疫組織化学的な検討を行なう。

(6) 特殊な臨床所見や画像所見を呈する歯原性腫瘍の臨床動態について

歯原性腫瘍の中で、通常臨床所見や画像所見を呈さなかった症例について、病理組織学的に如何なる所見を反映しているのかについて、定型例との比較検討を行なう。なお、対象となる症例は研究期間内に扱ったものに限定する。

(7) エナメル上皮腫由来細胞からの不死化上皮細胞株の樹立の試みについて

私の主宰する分野で、エナメル上皮腫由来初代培養細胞に TERT 遺伝子を導入して、エナメル上皮腫由来不死化細胞の樹立を試みている。株化できるものについては、その経過中に発現するタンパク（とくに歯原性上皮に特有のもの）を検索する。

(8) レチノイン酸が接合上皮由来株化細胞に及ぼす影響について

歯肉接合上皮と歯の原基(歯原性腫瘍の原基ともいえる)とは発生学的に同一であることから、私が主宰する分野では歯肉接合上皮に注目して *in vitro* で検討を行ってきた。その一つとして、ヒト接合上皮を気相と液相との界面で培養する方法に成功している。そしてこれを用いて種々の条件化における反応を検索中であり、上皮細胞の生存に不可欠な要素であるレチノイン酸が如何に関与しているかを種々の添加濃度で検討する。

4. 研究成果

(1) エナメル上皮腫の腫瘍細胞とマクロファージとの相互作用について

今回免疫組織学的検索に用いた試料では、部分的に実質内の腫瘍細胞間隙とその近傍の間質に perlecan の発現をみたが、この perlecan と単球—マクロファージ系細胞の集簇との関連を示唆する所見は得られなかった。今後、種々のプロテオグリカンについて検討を続ける予定である。なお、エナメル上皮腫で単球—マクロファージ系細胞が増殖腫瘍細胞間に、あるいは腫瘍胞巣に接して集簇している場合、単球—マクロファージ系細胞の表現型は全て泡沫状の成熟した貪食細胞であった。この泡沫状の成熟した貪食細胞がエナメル上皮腫において如何なる分子病理学的な意義を有するか、今後の課題となった。

(2) 周辺性歯原性腫瘍における被覆上皮基底層の細胞学的性状について

周辺性エナメル上皮腫について、被覆上皮基底層と腫瘍との移行部における 34 β E12(高分子ケラチン)と CAM5.2(低分子ケラチン)、ならびにアポトーシス抑制活性を持つ癌遺伝子である bcl-2 の発現に注目して検討した結果、34 β E12 は被覆上皮基底層から腫瘍へと移行的に発現していた。この 34 β E12 は腫瘍実質のかかなりの範囲に、かつ胞巢

構造の辺縁部と中央部とのいずれにも発現しており、腫瘍細胞の細胞骨格タンパクの多くを占めているものと思われた。CAM5.2 は腫瘍のみに発現しており、健常被覆粘膜と腫瘍との移行部を免疫電顕的に検討せねばならないことを痛感した。また、bcl-2 も腫瘍のみに発現していた。bcl-2 のアポトーシス抑制明らかになって以来、多くのファミリー遺伝子が同定されているが、日常の臨床診断業務においてトータルとしての bcl-2 の発現を検索することは、外科的摘出後の腫瘍の残存の有無を判断する一つの指標となるであろうことが示唆された。一方、Ki-67(MIB-1)の陽性率を指標とした細胞増殖活性については、被覆上皮基底層と腫瘍との間には有意な差はみられなかった。Ki-67 は細胞増殖周期の G1、さらに S~M 期の細胞核内に発現し、その陽性率はフローサイトメトリーなどでの相関が良いことから細胞増殖能の指標として広く利用されている。しかし、MIB-1 以外の種々のクローンについても検討することによって、被覆上皮基底層と腫瘍との差異の有無について検討をせねばならないことが課題として残った。

(3) 再発性歯原性腫瘍の特異な浸潤性について

再発したエナメル上皮腫例を一次症例と比較して周囲組織への発育状況に差異があるか否かを検討した結果、少数例ではあるが、切断神経腫内に小胞巣を形成しながら増殖する所見を見出した。このような所見は良性腫瘍といえども、エナメル上皮腫の場合には周囲組織に多少ともびまん性に浸潤することがあり、臨床的に外科的切除にあたっては神経線維束との関連にも注意を要することが示唆された。なお、今回の検索例では浸潤エナメル上皮胞巣と神経内膜、あるいは神経周膜との関連を思わせる免疫組織化学的結果は得られなかった。

(4) エナメル基質産生性上皮性腫瘍における上皮—間葉間の動態

石灰化上皮性歯原性腫瘍では、アミロイド様物の形成が上皮間から間葉におよびはじめると、基底膜構成タンパクの一つである laminin5 が次第に消失し、アミロイド様塊が間葉部分と接する範囲が増すに従って、腫瘍実質基底面に再び laminin5 が発現していた。また、type IV collagen はアミロイド様物と関係なしに、不規則に腫瘍実質内に深く侵入

していた。一方、細胞結合タンパクである E-cadherin は上皮細胞間全てではなく、不規則に上皮細胞間に発現していた。これら基底膜構成タンパクと細胞結合タンパクの発現の意義について考察中である。

(5) Chievitz 傍口腔器官(juxtaoral organ of Chievitz)構成細胞と歯原性上皮生腫瘍との類似性について

Chievitz 傍口腔器官は、ときに組織学的に扁平上皮癌との鑑別を要するといわれているが、今回の検索にてエナメル器に類する組織構築を呈するものがあることを見出した。すなわち、ヒト手術摘出検体を対象に、下顎臼歯部から上行枝部の頰側軟組織を組織学的に詳細に検索すると、症例によっては Chievitz 傍口腔器官が外側と内側の二相性構築を呈し、前者は腫瘍細胞が規則的に配列していたが、後者ではそのような規則性は認められなかった。これまで、手術摘出検体に Chievitz 傍口腔器官が認められた場合には扁平上皮癌の浸潤したものとの鑑別を要することがあることはよく知られていた。しかし、今回の検索ではエナメル上皮腫との鑑別を要することがあることを見出した。研究期間内に免疫組織化学的に細胞骨格の性状を検索するには至らなかった。今後、Chievitz 傍口腔器官とエナメル上皮腫とを細胞学的に比較検討する新たな課題が残され、継続して研究していく。なお、私はこれまでにエナメル上皮腫をはじめとした歯原性上皮性あるいは混合性腫瘍と神経外胚葉性細胞(とくにメラノサイト)との関連を検索してきたが、エナメル器に類する組織構築を呈する Chievitz 傍口腔器官でも上皮巢内に、あるいはそれらに接してメラノサイトを認めるものがあつた。しかし、このような所見は如何なる細胞学的意義があるのかについて言及することは出来なかった。

(6) 特殊な臨床所見や画像所見を呈する歯原性腫瘍の臨床動態について

特殊な臨床所見や画像所見を呈した検討対象症例は石灰化嚢胞性歯原性腫瘍、再発性エナメル上皮腫、石灰化上皮性歯原性腫瘍、類腫型エナメル上皮腫などであつた。これらの症例の診断やの治療について、臨床担当医と検討し、誌上あるいは学会で報告した。

(7) エナメル上皮腫由来細胞からの不死化上皮細胞株の樹立の試みについて

研究期間中に、種々の症例から分離された 3 株(30 代継代)の性状を解析することが出来、現在も継続中である。いずれの細胞株もケラチン 14、ケラチン 18 を発現し、単層上皮の性状を示し、ameloblastin の発現を確認している。エナメル上皮腫の不死化上皮細胞株の樹立によって、ヒトエナメル質の形成メカニズムはもとより、種々の因子を作用させることにより、in vitro ならびに in vivo で腫瘍誘発モデルの作成も可能と考え、さらに発展させる予定である。

(8) レチノイン酸が接合上皮由来株化細胞に及ぼす影響について

今研究期間では、ヒト接合上皮を気相と液相との界面で培養した場合、レチノイン酸は上皮細胞間結合装置のタンパク発現に関与していることを in vitro で明らかにした。現在総説的にまとめている最中である。今後、がん因子の作用についても検討し、歯原性上皮性腫瘍の誘発が可能か否かについても検討していきたい。

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 6 件)

- ① 武田泰典、三上俊成：顎骨腫瘍の病理、頭蓋・顔面骨および胸郭の骨・軟部境界領域病変の画像診断、臨床画像、査読有、Vol. 26、No. 3、2010、pp. 17-30
- ② Hatakeyama, S.、他：Changes in cell characteristics due to retinoic acid; specifically, a decrease in the expression of claudin-1 and increase in claudin-4 within tight junctions in stratified oral keratinocytes. J Periodont Res、査読有、Vol. 45、2011、pp. 207-215
- ③ Hatakeyama, S.、他：Establishment of human dental epithelial cell lines expressing ameloblastin and enamelin by transfection of hTERT and cdk4 cDNAs. J Oral Pathol Med、査読有、Vol. 40、2011、pp. 227-234
- ④ Murai, O.、他：Cathepsin B, D and L regulation in cyclosporin A-mediated gingival hyperplasia of a patient with sarcoidosis、Clin Lab (in press)

- ⑤ 齋藤大嗣、他：複数の過剰埋伏歯を伴った石灰化嚢胞性歯原性腫瘍の一例、岩医大歯誌、査読有、(印刷中)
- ⑥ 川村貴史、他：チタンメッシュトレーとPCBMによる下顎骨再建を施行した類腫型エナメル上皮腫の1例、岩医大歯誌、査読有、(印刷中)

[学会発表] (計11件)

- ① 田村永樹、他：下顎骨骨肉腫に放射線併用動中化学療法を施工した1例、第26回日本口腔腫瘍学会総会、2008年1月23日、大分市
- ② 阿部亮輔、他：当科における歯原性腫瘍198例の統計的検討、第26回日本口腔腫瘍学会総会、2008年1月23日、大分市
- ③ 加藤秀昭、他：過去13年間に当科で経験したエナメル上皮癌の3例、第26回日本口腔腫瘍学会総会、2008年1月23日、大分市
- ④ 千葉卓、他：チタンメッシュトレーとPCBMによる顎骨再建を施行したエナメル上皮腫(desmoplastic type)の1例、第34回日本口腔外科学会北日本地方会、2008年5月16日、新潟市
- ⑤ 小幡和郎、武田泰典：下顎犬歯部に発生した集合性歯牙手の5例、第20回日本小児口腔外科学会総会、2008年9月20日、川越市
- ⑥ 山谷元気、他：炎症性サイトカインによる口腔粘膜上皮細胞の角化機転に関するin vitroでの検討、第18回日本口腔粘膜学会総会、2008年9月19日、東京都
- ⑦ 三上俊成、他：口腔ケラチノサイトにおけるconnexin発現に対するレチノイン酸の影響、第50回歯科基礎医学会学術大会、2008年9月23日、東京
- ⑧ 山谷元気、他：気相培養下での口腔粘膜上皮細胞の角化機転に関する検討、第50回歯科基礎医学会学術大会、2008年9月23日、東京
- ⑨ 畠山節子、他：hTERTおよびcdk4遺伝子導入による不死化歯原性上皮細胞株の樹立、第50回歯科基礎医学会学術大会2008年9月23日、東京
- ⑩ 高橋美香子、他：下顎骨に発生した骨芽細胞腫の1例、第35回日本口腔外科学会北日本地方会、2009年6月26日、旭川市
- ⑪ 小見憲夫、他：ブリッジのポンテイツク

下に骨過形成が認められた一症例、岩手医科大学歯学会第71回例会、2011年2月26日、盛岡市

[図書] (計3件)

- ① 武田泰典：歯原性腫瘍、医歯薬出版、新口腔病理学、2008、pp.210-227
- ② 武田泰典、畠山節子：硬組織の取扱い(脱灰法を中心に)、文光堂、2008、pp.22-28
- ③ 武田泰典：歯原性腫瘍、朝倉書店、口腔科学、(印刷中)

[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

武田 泰典 (TAKEDA YASUNORI)
 岩手医科大学・歯学部・教授
 研究者番号：60137536

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：