

氏名	山 近 英 樹		
授与した学位	博	士	
専攻分野の名称	歯	学	
学位授与番号	博 甲 第 1225 号		
学位授与の日付	平成 6 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	細胞外マトリックス, テネイン, フィブロネクチン, IV型コラーゲンの歯胚および歯原性腫瘍における免疫組織化学的局在について		
論文審査委員	教授 永井 教之	教授 西嶋 克巳	教授 松村 智弘

### 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【緒言】

細胞外マトリックスはコラーゲンファミリー, 糖タンパクであるフィブロネクチン, テネイン, ラミニン, その他プロテオグリカンなどに分けられ, 細胞の分化または形質転化の課程で, 重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また正常組織の細胞分化, 増殖, 上皮-間質相互作用に関与するのみでなく, 腫瘍細胞の浸潤, 増殖にも重要な役割を果たしていることが報告されている。これらの細胞外マトリックスのうち, テネインは発生初期の歯, 唾液腺などの上皮原基を含む間質に出現し, 発育課程で一旦消失し, 癌間質などで再び現れることが知られている。また, フィブロネクチンは細胞の癌化との関係が注目されている細胞外マトリックスで, いままでに細胞接着, 細胞伸展, 細胞移動などの機能が報告され分化, 形態形成に重要な役割を果たすことが言われている。さらにテネインがフィブロネクチンの持つ細胞接着機能を阻害するとの報告もある。

従来, 歯胚および歯原性腫瘍における細胞外マトリックスに関する研究の多くは, 基底膜成分の分布に関するものであり, 歯胚および歯原性腫瘍におけるテネインの局在は未だ十分に解明されていない。さらにテネインの持つフィブロネクチンとの相互作用や基底膜との関連について不明な点も多い。そこで本研究では, 歯胚および歯原性腫瘍におけるテネインの局在を解明し, さらにテネインとフィブロネクチンおよび基底膜の主要成分であるIV型コラーゲンの関連を探る目的で, これら細胞外マトリックスの局在につい

て免疫組織化学的に検索した。

## 【材料と方法】

### 1. 材料

本研究に使用した組織は、岡山大学歯学部附属病院において手術または生検材料として切除されたエナメル上皮腫20例（濾胞型10例，叢状型10例），エナメル上皮線維腫1例，エナメル上皮癌2例である。また，胎生18日から生後7日のウイスター系ラット歯胚10例，および岡山大学医学部附属病院より提供を受けた，胎生16～20週齢の自然流産児の歯胚3例である。

### 2. 免疫組織化学的染色方法

組織は10%中性緩衝ホルマリンで浸漬固定後，上昇アルコール系列で脱水，パラフィン包埋した。厚さ約3  $\mu$ mのパラフィン切片を作製し脱パラフィン後，0.3%過酸化水素メタノールに30分間浸漬し，内因性ペルオキシダーゼ阻止を行った。その後，モノクローナル抗体（抗ヒトテネイシン抗体，抗IV型コラーゲン抗体）ではABC法，ポリクローナル抗体（抗フィブロネクチン抗体，抗ラットテネイシン抗体）ではPAP法により免疫組織化学的染色を行った。一次抗体は，抗ヒトテネイシン抗体（Biohit社製），抗ラットテネイシン抗体（理化研，坂倉より供与）200倍希釈，抗IV型コラーゲン抗体（Shiseido社製）50倍希釈，抗フィブロネクチン抗体（Lipshaw社製）500倍希釈を4℃で16時間反応させた。DABによる呈色反応後，Mayerのヘマトキシリンで後染色を行い光顕的観察を行った。

## 【結果】

エナメル上皮腫：エナメル上皮腫の間質をH.E.所見により 1)密な結合組織，2)疎な結合組織，3)硝子化部，4)嚢胞形成部に分類した。1)密な結合組織からなる間質ではテネイシンは胞巣基底膜部に不規則な線状の陽性像を示した。フィブロネクチンでは間質に均一な弱陽性所見を認めた。2)疎な結合組織からなる粘液様の間質では，テネイシンは上皮基底膜から間質に延びる叢状の陽性所見を示した。またフィブロネクチンは，間質に陰性または弱陽性所見を示した。3)硝子化した間質ではテネイシンは陽性，陰性が混在し特に一定の傾向を示さなかった。フィブロネクチンは間質に陽性像を示すことが多かったが，一部には陰性像が混在していた。4)嚢胞形成をみる間質ではテネイシン，フィブロネクチンともに陰性であった。

エナメル上皮線維腫：テネイシンは線維腫部分に均一な陽性所見を認めた。しかし線維腫部の一部ではテネイシン陰性部も認められた。フィブロネクチンは同部では均一な弱陽性ないし陰性であった。

エナメル上皮癌：テネイシン，フィブロネクチンともに間質に強陽性を示した。さらに癌胞巣の一部では胞巣上皮内にテネイシンの顆粒状の陽性所見を認めた。IV型コラーゲンは胞巣基底膜部で欠如，あるいは不規則な陽性像を示した。

ヒト歯胚：歯堤の成長端において、テネインは歯堤周囲の粘膜下結合組織に陽性を示したが歯嚢側では陰性であった。さらにテネインは内エナメル上皮直下の歯乳頭間質に帯状の局在を示した。フィブロネクチンは歯乳頭、歯嚢結合組織ともに均一な弱陽性像を示した。

ラット歯胚：テネインは胎生18日の歯蕾上皮を取り囲む間葉系組織、さらに上皮内にも陽性像を認めた。生後1日の歯胚では歯乳頭、象牙芽細胞層直下に強い陽性像を示した。生後3、7日では歯乳頭中央部に向かいテネイン陽性領域がさらに増加した。また歯嚢、歯根膜はテネイン陰性であった。

#### 【まとめおよび考察】

テネインは歯胚分化の各段階に特徴ある局在を示し、特に上皮の急激な増殖初期の胎児期間質に陽性を示すことが示唆された。エナメル上皮腫およびエナメル上皮線維腫などの良性歯原性腫瘍においては、テネインが歯胚類似の局在を示す部位を認めるものの、間質結合組織の構造により局在が左右されることが示唆された。エナメル上皮癌では、テネイン、フィブロネクチンともに腫瘍胞巣基底膜部に強陽性を示したことから、癌組織においては両者は拮抗的でないと考えられた。また癌胞巣におけるテネイン陽性像から、癌細胞によるテネイン産生が考えられた。さらにⅣ型コラーゲンの染色結果からみた、歯原性腫瘍の基底膜は、歯原性上皮細胞の悪性化に伴って消失、断裂しており、同部にテネイン強陽性所見が認められたことから、両者は何らかの関連を有している可能性が示唆された。従ってテネイン、フィブロネクチン、Ⅳ型コラーゲンは歯胚、歯原性腫瘍において、形成形態、腫瘍の増殖および浸潤と関連して局在する可能性が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は歯原性腫瘍の生物学的性状を検討する目的で、胎児期間質あるいは癌間質に強く発現する細胞外マトリックス・テネインと、ほとんどすべての種類の細胞に対して接着・伸展活性を示すフィブロネクチンおよび基底膜の主要な構成成分であるⅣ型コラーゲンの局在を、歯胚および歯原性腫瘍について免疫組織化学的に検索し比較検討したものである。

テネインは歯胚分化の各段階に特徴ある局在を示し、特に上皮の急激な増殖初期の胎児期間質に陽性を示すことが示された。エナメル上皮質およびエナメル上皮線維腫では、テネインが歯胚類似の局在を示す部位を認めたものの、間質結合組織の構造により局在が異なっていた。エナメル上皮癌では、テネイン、フィブロネクチンともに腫瘍胞巣基底膜部および間質に強陽性を示した。また癌細胞によるテネイン産生が考えられた。Ⅳ型コラーゲンの染色結果から見た歯原性腫瘍の基底膜は癌化に伴って消失、断裂している場合もあり、癌間質における間質の胎児化にテネイン発現が関与している可能性が示唆

された。

これらの知見は歯原性腫瘍における形態形成，腫瘍の増殖および浸潤などの生物学的性状を明らかにしたことから価値ある研究業績である。よって申請者は博士（歯学）の学位を得る資格があると認める。