

氏名	藤井 英貴
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 2 8 7 3 号
学位授与の日付	平成 1 7 年 3 月 2 5 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)
学位論文題名	ヒト歯胚と歯原性腫瘍基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の局在に関する免疫組織化学的研究
論文審査委員	教授 山本 敏男 教授 佐々木 朗 教授 永井 教之

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

WHO の組織学的分類では、歯原性腫瘍の歯原性上皮と歯原性間葉組織の有無と硬組織形成の有無により分類されている。歯原性腫瘍の多くは良性であり、悪性型の歯原性癌や歯原性肉腫はまれである。

歯原性腫瘍の生物学的性質は組織形態分化と関連していると考えられることから、腫瘍の発生および増殖に関する分子メカニズムは歯胚分化と比較しながら理解することが必要である。

歯原性腫瘍の細胞分化・機能分化の生物学的検索では、エナメル上皮腫のサイトケラチン（細胞骨格）、アメロジェニンの遺伝子発現、間葉系組織（間質）の歯原性への分化、BMP ファミリーの発現等から、腫瘍の機能分化に上皮—間葉相互作用が存在し、基底膜が重要な役割を果たすことが示唆されてきた。

そこで今回基底膜の主要な構成成分である IV 型コラーゲンの $\alpha 1$  鎖～ $\alpha 6$  鎖に対するモノクローナル抗体を用いて、良性および悪性歯原性腫瘍を免疫組織化学的に検討し、ヒト歯胚との類似性を検討した。

### 【材料および方法】

エナメル上皮腫 8 例、腺様歯原性腫瘍 2 例、歯牙腫 4 例、エナメル上皮線維腫 3 例、エナメル上皮線維肉腫 1 例、悪性エナメル上皮腫 2 例、原発性骨内癌 1 例の手術生検材料とヒト歯胚を用いた。組織は中性緩衝ホルマリンにて固定後、パラフィン包埋し厚さ  $4\mu\text{m}$  の切片を作製し、H-E 染色と免疫染色を行った。

WHO の歯原性腫瘍組織分類に従い、腫瘍の組織学的診断を行った。

ヒト IV 型コラーゲン $\alpha 1$  鎖、 $\alpha 2$  鎖、 $\alpha 3$  鎖、 $\alpha 4$  鎖、 $\alpha 5$  鎖、 $\alpha 6$  鎖それぞれを認識するラットモノクローナル抗体 H11,H22,H31,H43,H53,H63 を用いた。抗体の特異性は ELISA 法、イムノブロットング法により確認されている。

免疫組織化学的染色は脱パラフィン後、10mM クエン酸緩衝液を用いオートクレーブ(121°C,5 分)により前処理した。

0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  添加メタノールに 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼをブロック後、0.05M Tris buffer saline (TBS) で 5 分 3 回洗浄した。1 次抗体を 4°C で overnight させ反応させた。それぞれの 1 次抗体は $\alpha 1$  鎖と $\alpha 2$  鎖は 400 倍、 $\alpha 3$  鎖は 100 倍、 $\alpha 4$  鎖は 10 倍、 $\alpha 5$  鎖は 100 倍、 $\alpha 6$  鎖は 20 倍に希釈した。免疫反応は ABC キット(Vector Lab)を用いた。発色は 0.01% $\text{H}_2\text{O}_2$  添加 0.05% 3,3'-ジアミノベンチジンテトラヒドロクロライド [0.05M Tris-HCl buffer (pH 7.6)] で行った。対比染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いた。陰性対照はラット正常血清または 2 次抗体のみで行い、全てのコントロールは陰性であった。

## 【結果と考察】

ヒト歯胚ではすべての歯原性上皮基底膜部位に一致して $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が認められ、 $\alpha 4$ 鎖は内エナメル上皮のみに認められた。歯胚および歯原性腫瘍では全ての検体で $\alpha 3$ 鎖は認められなかった。

エナメル上皮（腫濾泡型、叢状型）：胞巣周囲の基底膜部位に $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が断続的に線状の陽性所見を示した。

線維形成性エナメル上皮腫：腫瘍胞巣辺縁では $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が連続的な線状の強陽性所見を示した。いずれのタイプのエナメル上皮腫でも $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖は $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖よりも明瞭な陽性所見を示す傾向がみられた。 $\alpha 4$ 鎖は認められなかった。

エナメル上皮線維腫：上皮胞巣の周囲基底膜に $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が歯乳頭様の間質と腫瘍上皮胞巣を分けるように連続的な線状の陽性所見を示した。

腺様歯原性腫瘍：上皮胞巣内の腺管様構造では $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が幅の広い線状の陽性所見が観察された。上皮胞巣周囲の立方細胞が索状に増殖している部位、および石灰化物周囲の扁平上皮様細胞の基底膜では $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が陽性を示し、 $\alpha 4$ 鎖は陰性であった。

歯牙腫：歯牙様硬組織周囲の上皮基底膜で $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖の明瞭な陽性所見が認められた。

悪性エナメル上皮腫：胞巣周囲で $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が不連続、線状の陽性所見が観察され、部位により $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が幅の広い線状、顆粒状物質として認められた。 $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖および $\alpha 4$ 鎖は陰性であった。

原発性骨内癌：上皮胞巣周囲では $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖は不連続、線状の弱陽性反応を示した。 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖は $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖と比較し明瞭な陽性を示す傾向がみられ、顆粒状反応物として認められた。 $\alpha 4$ 鎖は陰性であった。

エナメル上皮線維肉腫：上皮胞巣の周囲基底膜は $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖が弱陽性を示した。 $\alpha 4$ 鎖は胞巣の周囲に限局的な陽性反応を示した。

歯原性外胚葉性間葉を伴う腫瘍においてエナメル上皮腫には認められない $\alpha 4$ 鎖が観察され、ヒト歯胚の内エナメル上皮基底膜における $\alpha$ 鎖の局在と高い類似性を示した。以上のことから、 $\alpha 4$ 鎖が歯原性腫瘍の間葉組織とりわけ歯乳頭への分化、誘導に関与していると考えられる。

悪性歯原性腫瘍において $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖よりも $\alpha 5$ 鎖と $\alpha 6$ 鎖のみの過剰産生が生じていると考えられる。

## 【結論】

良性の歯原性腫瘍における基底膜の $\alpha$ 鎖の局在は分化程度に一致して、ヒト歯胚の $\alpha$ 鎖の局在様式に類似していた。悪性の歯原性腫瘍は $\alpha$ 鎖の不規則な局在を示した。歯原性腫瘍基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の局在は良性では歯胚への分化と相関し、悪性ではその局在において特異性を示すことから、良性歯原性腫瘍またその他の悪性腫瘍との鑑別解析に有用であると考えられる。

## 論文審査結果の要旨

歯原性腫瘍の生物学的特徴は歯胚の形態分化と関連していると考えられることから、歯原性腫瘍をヒト歯胚の分化と比較しながら理解することが必要である。歯の発生は基底膜を介して、歯原性上皮と歯原性間葉組織の相互作用により形態形成と細胞分化が制御されていると考えられている。従って、歯原性腫瘍にも実質と間質の相互作用の存在が示唆される。基底膜はIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどから構成されている。その中でも主要な構成成分で骨格構造を構築しているのはIV型コラーゲンである。IV型コラーゲンは $\alpha$ 鎖からなるトリプルヘリックス構造をとっており、近年 $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 鎖の6種類の分子種が同定されている。

本研究は、ヒト歯胚および歯原性腫瘍の基底膜におけるIV型コラーゲンの各種 $\alpha$ 鎖の局在について、免疫組織化学的に検討したものである。

その結果、ヒト歯胚（鐘状期）では $\alpha$ 鎖の局在は部位特異性を示し、内エナメル上皮では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 鎖の陽性所見を認めている。良性歯原性腫瘍はヒト歯胚の $\alpha$ 鎖の局在に類似していた。しかし良性歯原性腫瘍のうち、エナメル上皮腫（濾胞型・叢状型）と線維形成性エナメル上皮腫においては、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 鎖の局在を示し、歯胚の内エナメル上皮にみられる $\alpha 4$ 鎖の局在は示さなかった。しかし、エナメル上皮線維腫、腺様歯原性腫瘍の腺管様部位、歯牙腫では $\alpha 4$ 鎖の局在を示した。これらの腫瘍は歯原性外胚葉性間葉を伴う腫瘍であり、ヒト歯胚の内エナメル上皮基底膜のIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の構成と同様な局在を示し、これらの腫瘍に上皮—間葉の相互作用が存在することを明らかにしている。

一方、悪性エナメル上皮腫では $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖は陰性、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 鎖は陽性を示し、原発性骨内癌とエナメル上皮線維肉腫では、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖の弱陽性と共に $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 鎖の断続的な陽性を示したことから、悪性歯原性腫瘍では $\alpha$ 鎖は不完全で特異的な局在を示すことを明らかにしている。

以上のことから、歯原性腫瘍の基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の局在は、良性歯原性腫瘍では歯胚との分化と関連していることを明らかにした。一方、悪性歯原性腫瘍では主として $\alpha 5$ 、 $\alpha 6$ 鎖が局在し、この $\alpha$ 鎖の局在様式は、良性歯原性腫瘍と悪性歯原性腫瘍との鑑別解析に有用であると考えている。

これらの知見は、歯原性腫瘍の分化および浸潤、増殖のメカニズム解明の一端を担う、基礎研究として価値のある研究業績である。よって本申請論文は博士（歯学）の学位論文の価値に足るものと認めた。