

氏 名 (本籍)                   くま                   もと                   ひろ                   ゆき  
熊                   本                   裕                   行

学 位 の 種 類                   博                   士                   ( 医                   学 )

学 位 記 番 号                   医                   第                   3 0 7 2                   号

学 位 授 与 年 月 日                   平 成 10 年 9 月 9 日

学 位 授 与 の 条 件                   学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴                   平 成 元 年 3 月 25 日  
鹿 児 島 大 学 歯 学 部 歯 学 科 卒 業

学 位 論 文 題 目                   Detection of apoptosis-related factors and  
apoptotic cells in ameloblastomas : analysis by  
immunohistochemistry and an in situ DNA  
nick end-labelling method.

(エナメル上皮腫におけるアポトーシス関連因子  
およびアポトーシス細胞の検討：免疫組織化学お  
よび in situ DNA nick end-labelling 法による  
解析)

(主 査)

論 文 審 査 委 員                   教 授 堀 井                   明                   教 授 名 倉                   宏

教 授 福 本                   学

# 論 文 内 容 要 旨

歯原性上皮は本来歯の発生に関わる組織であるが、腫瘍や嚢胞への変化は稀ではない。エナメル上皮腫および悪性エナメル上皮腫は歯原性上皮に由来する腫瘍の代表的なものであるが、その腫瘍化や分化に関するメカニズムは明らかでない。一方、アポトーシスは細胞の生理的な死としてとらえられ、個体発生や恒常性維持に関わるだけでなく腫瘍や感染症などの病態においても重要な働きを示すことが知られている。本研究では、歯原性腫瘍の発生や分化におけるアポトーシスの役割を明らかにするため、免疫組織化学およびin DNA nick end-labelling 法によりアポトーシス関連因子およびアポトーシス細胞を検索した。また細胞増殖マーカーの検索も同時に行い比較検討した。

対象としては、東北大学歯学部附属病院口腔外科および関連病院で処置されたエナメル上皮腫29例（濾胞型12例、叢状型9例、顆粒細胞型8例）および悪性エナメル上皮腫2例について検索した。対照としては、歯科矯正目的で摘出された歯冠形成初期の歯胚14例（エナメル器14例、歯堤8例を含む）を用いた。

アポトーシス抑制遺伝子産物である bcl-2 蛋白の発現は、歯胚上皮および腫瘍細胞において細胞質に認められ、いずれも基底膜側の細胞で著明だった。歯胚上皮と悪性エナメル上皮腫は全例陽性だったが、エナメル上皮腫は26例（濾胞型10例、叢状型9例、顆粒細胞型7例）が陽性だった。これらの結果は、統計学的有意差に達しなかった。

アポトーシス誘導の機能を有する p53 蛋白の発現は、歯胚上皮ではみられず、エナメル上皮腫14例（濾胞型6例、叢状型6例、顆粒細胞型2例）と悪性エナメル上皮腫1例の核にみられた。陽性核は主として基底膜に接する細胞にみられた。エナメル上皮腫における p53 蛋白の発現は、歯胚上皮に比べて有意に高かった。陽性症例における平均 p53 陽性細胞率は、エナメル上皮腫7.7%（濾胞型7.2%、叢状型8.4%、顆粒細胞型7.3%）、悪性エナメル上皮腫36.2%で、統計学的有意差には達しなかった。

ある種のアポトーシス細胞に認められる Le<sup>x</sup> 抗原の発現は、歯胚のエナメル器14例、歯堤6例、エナメル上皮腫21例（濾胞型10例、叢状型5例、顆粒細胞型6例）、悪性エナメル上皮腫1例に認められた。エナメル器では星状網と中間層の細胞膜、歯堤では胞巣内側の細胞膜、エナメル上皮腫および悪性エナメル上皮腫では胞巣中央部の多角形細胞の細胞膜に陽性を示し、顆粒細胞型腫瘍細胞は陰性だった。エナメル上皮腫における Le<sup>x</sup> 抗原の発現は、エナメル器より有意に低かった。

細胞増殖マーカーである Ki-67 抗原の発現は、歯胚上皮および腫瘍細胞の核に認められ、特に

基底膜に接する細胞で著明だった。平均 Ki-67 陽性細胞率は、エナメル器 3.7%，歯堤 0.7%，エナメル上皮腫 11.1%，悪性エナメル上皮腫 37.9% で、腫瘍は歯胚上皮より有意に高かった。またエナメル上皮腫での平均 Ki-67 陽性細胞率は、濾胞型 11.1%，叢状型 14.0%，顆粒細胞型 7.9% で、顆粒細胞型は叢状型より有意に低かった。

アポトーシス細胞を証明する in situ DNA nick end-labelling (mTUNEL) 法により、アポトーシス小体が歯胚上皮および腫瘍細胞の核上に褐色の点として検出された。アポトーシス小体は、基底膜より少し離れた細胞に多くみられた。平均 mTUNEL 法陽性細胞率は、エナメル器 0.4%，歯堤 0.7%，エナメル上皮腫 2.2%，悪性エナメル上皮腫 0.9% で、エナメル上皮腫は歯胚上皮より有意に高かった。またエナメル上皮腫での平均 mTUNEL 法陽性細胞率は、濾胞型 1.9%，叢状型 1.7%，顆粒細胞型 3.2% で、顆粒細胞型は叢状型より有意に高かった。

以上のアポトーシス関連因子の相関については、bcl-2 蛋白および p53 蛋白の陽性症例における Ki-67 抗原の発現は陰性例より有意に高かったが、アポトーシス細胞に関しては統計学的有意差に達しなかった。Le<sup>y</sup> 抗原の発現と Ki-67 抗原・アポトーシス細胞については、いずれも有意でなかった。

以上のように、歯原性上皮およびその由来腫瘍において様々なアポトーシス関連因子が検出され、これらの組織・疾患においてアポトーシスが関与することが証明された。また腫瘍細胞は正常細胞に比べ、相反する要因である細胞増殖とアポトーシスの両者が亢進していることが認められ、同じ腫瘍でも組織型により態度が異なることがわかった。これらの結果より、歯原性腫瘍の発生や分化にアポトーシスが密接に関与することが示唆された。さらに増殖因子やサイトカインなどアポトーシス制御に関わる因子を検索することにより、歯原性上皮とその関連疾患の動態や病態発生のメカニズム解明が期待できる。

## 審査結果の要旨

アポトーシスは生理的な細胞死の1形態で、発生過程での形態形成や成熟個体での恒常性維持に関与するとともに、腫瘍などの病態においても重要な機能を示すことが知られている。歯の形成後は消失すべき組織が増殖を示す歯原性腫瘍において、アポトーシスの関与の解明が期待されている。

本研究では、歯原性腫瘍の中で最も発症頻度が高く、臨床的・病理組織学的に問題となるエナメル上皮腫を主に、稀少な悪性エナメル上皮腫および正常の歯胚上皮を対象とし、免疫組織化学および *in situ* DNA nick end-labelling 法によりアポトーシス関連因子およびアポトーシス細胞を検索し、以下の結果を得た。

アポトーシス抑制遺伝子産物 bcl-2 蛋白は、歯胚上皮および腫瘍においてほぼ全例に陽性を示し、これらの組織・病変におけるアポトーシスの抑制が示された。アポトーシス誘導の機能を有する p53 蛋白は、正常に制御されている細胞では検出されず、変異 p53 蛋白は、異常集積として認識される。歯原性上皮については、歯胚上皮ではみられず、腫瘍の約半数に陽性を示し、また悪性エナメル上皮腫では著明に陽性細胞率が高かった。これらは、歯原性上皮の腫瘍化や悪性化に p53 蛋白が関連することを示唆した。ある種のアポトーシス細胞で認められる Le<sup>y</sup> 抗原の発現は、歯胚上皮に比べ腫瘍で低下を示したが、この結果は *in situ* DNA nick end-labelling 法で検出されるアポトーシスの結果とは一致せず、歯原性上皮においてはアポトーシスとは異なる細胞分化を表現していると考えられた。*in situ* DNA nick end-labelling 法によるアポトーシス細胞数は、歯胚上皮に比べて腫瘍で多く、また分化傾向の異なる亜型で有意の相違がみられるなど、歯原性上皮の腫瘍化や細胞分化にアポトーシスが関わることを示唆された。

本研究では、エナメル上皮腫およびその起源組織におけるアポトーシス関連因子およびアポトーシス細胞の発現を明らかにするものであり、これらの組織・病変にアポトーシスが関与することを証明している。以上の結果は、歯原性腫瘍の発生や分化にアポトーシスが重要な役割を果たすことを示唆し、更に歯原性疾患の発症や病態の機序解明の基盤になることが期待される。よって、学位論文に値するものと評価する。