

下顎に発生したエナメル上皮腫の1症例 -Runx 2 の免疫組織化学的検討-

杉野 紀幸^{1,2}, 村木 英司³, 清水 貴子^{3,4}, 塩島 勝^{1,2}, 川上 敏行^{3,4}

¹松本歯科大学 大学院 硬組織疾患画像解析学

²松本歯科大学 歯科放射線学講座

³松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患病態解析学

⁴松本歯科大学 大学院 硬組織疾患病態解析学

A case of ameloblastoma of the mandible with immunohistochemical examination of Runx 2

NORIYUKI SUGINO^{1,2}, EIJI MURAKI³, TAKAKO SHIMIZU^{3,4},
MASARU SHIOJIMA^{1,2} and TOSHIYUKI KAWAKAMI^{3,4}

¹*Image Analysis for Hard Tissue, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine*

²*Department of Oral Radiology, Matsumoto Dental University School of Dentistry*

³*Hard Tissue Pathology, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine*

⁴*Hard Tissue Pathology, Matsumoto Dental University Institute for Oral Science*

Summary

A case of ameloblastoma in a 67-year-old male Malay patient was described with immunohistochemical examination of Runx2. After histopathological examination and diagnosis, the immunohistochemical expression of transcription factor Runx2 was examined. Histopathologically, the tumor consisted predominantly of proliferating follicular nests of odontogenic epithelial cells randomly disposed in the fibrous tissue. Some of these ameloblastoma cell nests showed features of central cystic degeneration, squamous metaplasia, and keratinizing pearl formation. Immunohistochemically, positive reactions of Runx2 was observed in some ameloblastoma cells, the peripheral layer cells and some inner cells of the nests. Furthermore, Runx2 positive products were observed in most of cells showing squamous metaplasia in ameloblastoma nests.

緒言

エナメル上皮腫は歯原性上皮に由来する良性腫瘍として分類され、口腔に発生する歯原性腫瘍の

中では最も頻度が高い。病理組織学的には、腫瘍実質が歯胚の上皮成分に類似した構造を示す。また、良性腫瘍として分類されているが、局所の再発と侵襲性性格のあることについては周知の事実

である。エナメル上皮腫には種々の亜型があり、それは単嚢胞性あるいは多嚢胞性、骨外性あるいは周辺性に細分類されている¹⁾。また、実質細胞の変化により、棘細胞腫型、顆粒細胞腫型など種々の亜型がある。

歯の発生は複雑な生物学的過程によって行われている。すなわち、発生過程における体表外胚葉由来の上皮と神経堤に由来する神経外胚葉性間葉の複雑な相互作用によって行われている。これらの発生過程の制御には数多くの転写因子が関与している²⁾ことが報告されている。これらに由来する歯原性新生物、とくに今回検討したエナメル上皮腫の発育においてもこれらの相互作用が複雑にしかも直接反映していると考えられる。さて、Runx 2は一般に骨芽細胞の分化に必須の転写因子として知られている³⁾が歯胚の発生にも関与していることが最近明らかになってきている^{4,5,6)}。そこで、本腫瘍の亜型はそれぞれ各種転写因子の複雑な発現により起こることが推察される。したがって、発生、とくに形態形成に関与する転写因子の発現状況を追究することは、これら亜型の発現様式を明らかにすることに繋がると考えられる。Heikinheimoら²⁾の研究では、歯胚の発生段階とエナメル上皮腫の比較における各種転写因子の発現がマイクロアレイにより網羅的に追究され、その中でRunx 2の間葉における発現が報告されている。また、D'Souzaら⁵⁾の研究により、エナメル器においてある時期に発現することが明らかにされているが、その意味づけは明らかになっていない。

今回、我々はマレー人男性の下顎に発生したエナメル上皮腫の1症例を病理組織学的に詳細に検討する機会があり、併せてRunx 2について免疫組織化学的検討を行ったところ若干の興味ある所見が得られたのでその概要を報告する。

症 例

患者：67歳 マレー人男性

主訴：下顎左側小白歯部歯肉腫脹

既往歴：エリスロマイシンに対するアレルギー、胃炎

現病歴：下顎左側小白歯部の歯肉腫脹と疼痛があり、これは来院の2ヶ月前から気づいていたと言う。処方された抗生物質と鎮痛剤の服用によって

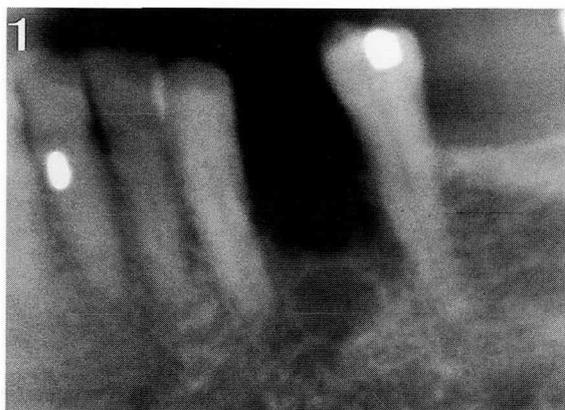


図1：エックス線写真。下顎左側第一小白歯部領域に境界明瞭な円形の透過性病変がある。

も腫脹と疼痛は軽減しなかったため、マラヤ大学歯学部病院口腔外科に来院した。

現症：

全身所見：特記事項なし

局所所見：下顎右側第一小白歯部から下顎左側第一小白歯部にかけて頬側歯肉が腫脹しており、強い疼痛があった。さらに、同部被覆粘膜には発赤と知覚麻痺があった。下顎左側犬歯部から第一小白歯部領域にはわずかな舌側の腫脹も認められた。なお、これらの2歯は動揺していた。同部位の試験穿刺によって80 mlの黄色い液体が吸引された。タンパク質内容分析と細菌検査を行った結果、タンパク質内容は4 g/100 ml以上で、細菌検査では特異的細菌は検出されなかった。

エックス線所見：下顎左側犬歯から第二小白歯間、すなわち下顎左側第一小白歯部領域に比較的境界明瞭な円形の透過性病変が認められた(図1)。

臨床診断：エナメル上皮腫／残存嚢胞

処置および経過：局所麻酔下にて腫瘍(嚢胞)摘出術を施行した。腫瘍は大きなものと数個の小片として摘出された。大きな腫瘍は多房性の塊状物で、複数の娘嚢胞を持っていた。これらに対しての病理組織学的検査によりエナメル上皮腫と診断された。術後の局所治癒は良好であったが、エナメル上皮腫の診断がなされたため長期間に亘る経過観察を計画した。しかし、患者が来院しなくなったためその後の経過は不明である。

検 索 方 法

摘出材料は、通法により10%中性緩衝ホルマリ

ン溶液によって固定し、パラフィンに包埋した。ミクロトームにより4 μm厚の連続切片とし、hematoxylin-eosin (HE) 染色を施した。

免疫組織化学的 (IHC) には残りの連続切片を用いた。1次抗体として抗ヒト Runx 2 抗体 (PEBP2α (M-70), 1:100, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA) を用い、冷蔵庫内にて over night 反応させ、DAKO の EnVision™ + Kit (Dako, Glostrup, Denmark) によって検討した。なお、可視化は DAB により15分間行い、核染色には hematoxylin を用いた。ネガティブコントロールとしては1次抗体の代わりに PBS を使用した。

結 果

病理組織学的に、検索材料は線維性組織から成り、その内部に歯原性上皮の島状の増殖がみられた (図2)。これら胞巣の最外層の細胞は hematoxylin に濃染した核をもつ円柱形ないし高円柱形で柵状に並んでいた。これに対して、胞巣内部の細胞は星芒状を示していた。腫瘍細胞の細胞質は一般に空胞性変化があった。また、ある胞巣ではその中心部に嚢胞性変化が観察された。一部では、歯原性上皮の索状増殖があり、同部で基底細胞の柵状配列から成っていた。さらに、多くの胞巣では角質球の形成を伴う扁平上皮化生を示していた (図3)。以上の所見より、本症例はエナメル上皮腫と診断された。

免疫組織化学的検討により、線維性組織よりなる間質内に増殖しているごく一部のエナメル上皮腫の胞巣を構成する基底細胞と内部の実質細胞に Runx 2 に弱い陽性を示す反応産物が検出された (図4, 5)。これらの陽性反応は細胞質内に細顆粒状にみられた。これに対しエナメル上皮腫の胞巣内における扁平上皮化生を示す部の細胞の細胞質並びに一部の核には極めて強い陽性所見が得られた (図6, 7)。

考 察

考察に当り、まず今回検索したエナメル上皮腫の症例はマレーシアのクアラルンプールにあるマラヤ大学歯学部病院の口腔外科で扱われたものであることを確認しておきたい。腫瘍の臨床診断や病理組織学的診断と口腔外科において行われた処

置などは本邦におけるものと基本的に変わらないのであるが、術前・術後の患者対応などで本邦と比べて生活・社会的環境が大変大きく異なっていることが伺われた。その意味でこの症例を検討する機会が得られたことは貴重な経験であった。

さて、エナメル上皮腫は歯原性上皮に起因する最も一般的な歯原性腫瘍の一つである。また、これは緒言にも記した通り、臨床的には良性に分類されているが、局所的に侵襲性があり再発の危険性も高い。一般に外科的処置により予後は良いが、再発が最初の処置から10年以上経ってからも起こることがあるので、長期経過観察が重要である³⁾。今回の症例では、下顎小白歯部における術前の臨床症状とエックス線的に境界明瞭な小円形の透過像から明らかな様に、エナメル上皮腫の臨床診断を下したものの残存嚢胞の疑いも消えなかった。また腫瘍が小さく、下顎小白歯部領域は外科的にアプローチし易く、再発した場合でも臨床検査・エックス線検査により発見できるため、この病変には保存的外科療法が選択された。しかし、術後の病理組織学的検査よりエナメル上皮腫の診断が下されたため、当該口腔外科ではこの患者のために長期経過観察を行うつもりだったが、結果として患者はその後来院しなくなってしまった。マレーシアの社会的背景がそうさせてしまったものと考えられるが、残念である。

病理組織学的には、多房性エナメル上皮腫のほとんどは線維性の間質組織内における増殖した歯原性上皮島の胞巣から成る。また、扁平上皮化生とそれに伴う角質球形成、実質細胞の退行性変化とそれによる実質嚢胞の形成などが起こる。これらの病理組織学的特徴は今回の症例におけるものに合致しており、その意味で典型的の症例であろう。

次いで、今回の免疫組織化学的検討を行った背景を述べる。我々は細胞分化を司る転写因子の一つである Notch に着目して、これが上顎骨に発生した骨肉腫の細胞分化に関与している⁷⁾ことを報告した。また、本邦における骨肉腫10症例についても同様の検討を行い、Notch ばかりではなく Delta と Runx 2 の発現と細胞分化の様相についても報告した⁸⁾。一般に形態形成は複雑な生物学的な過程であり、これは腫瘍の発育と増殖にも直接反映していると考えられている。エナメル上皮

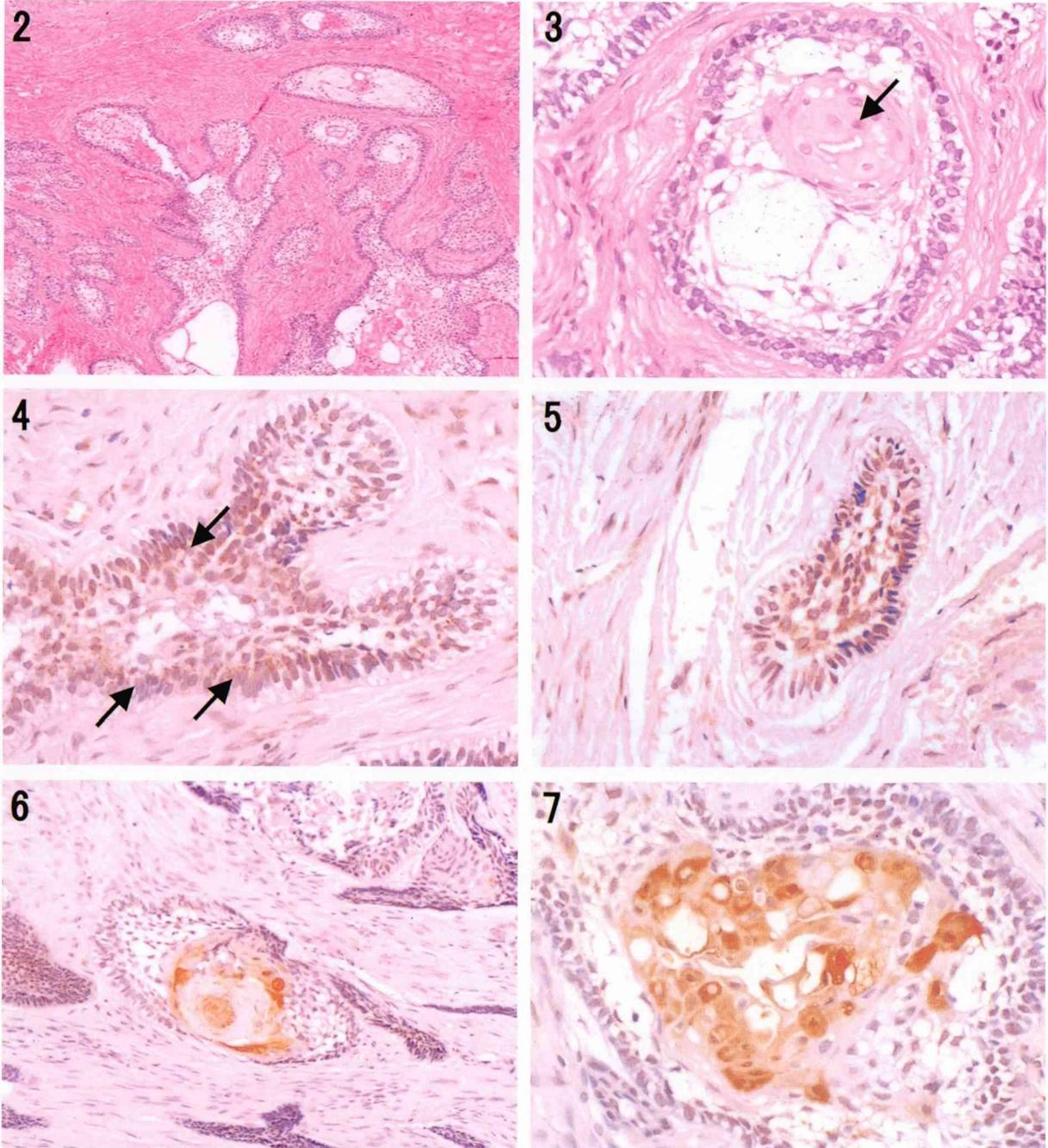


図2：線維性組織内部に歯原性上皮が島状に増殖している (HE, ×40).

図3：胞巣の内部に扁平上皮化生がみられる (HE, ×100).

図4：線維性間質内に増殖した胞巣を構成する基底細胞と内部の実質細胞が弱い陽性反応を示す (IHC: Runx 2, ×200).

図5：胞巣を構成する特に内部の実質細胞の細胞質に弱陽性反応がみられる (IHC: Runx 2, ×200).

図6：胞巣内の扁平上皮化生を起こした細胞の細胞質が強い陽性反応を示す (IHC: Runx 2, ×50).

図7：胞巣中心部の扁平上皮化生を起こした細胞に強い陽性反応がある (IHC: Runx 2, ×100).

腫の増殖に関して、いくつかの形態形成に関与する転写因子は、歯胚との比較において、エナメル上皮腫においても発現している^{4,9)}ことが確認されている。Heikinheimo ら²⁾は、エナメル上皮腫とヒト胎児の歯胚における遺伝子発現の解析に cDNA のマイクロアレイを用い、その結果を報告

している。すなわち、その解析には tumor-necrosis-factor-receptor-1 (TNFRSF-1), sonic hedgehog (SHH), Cadherins 12 and 13 (CDH 12 and 13), transforming growth-factor- β 1 (TGF- β 1) 等が過剰発現していることを報告している。Kumamoto ら⁹⁾は、ヒト歯胚と比較して

エナメル上皮腫における SHH のシグナリングの過剰発現について追究している。その結果から、SHH のシグナリングはエナメル上皮腫の成長において、上皮-間葉相互作用と細胞増殖という役割を果たしているという。歯胚の発育と Runx 2 の関係については、歯胚の発育時における各種転写因子の発現についての検索の中で、Åberg ら⁶⁾ は間葉細胞に発現した Runx 2 が FGF シグナリングを調節していることを報告した。また、発生中の歯胚におけるある特定の時期のエナメル器の細胞に発現することが D'Souza ら⁵⁾ によって報告されている。そこで今回、マレー人男性の症例を検討するに当り、Runx 2 の発現を IHC により追究したものである。

本症例に対する Runx 2 の検討結果を論じる前に、今回用いた Runx 2 抗体について考察を加えたい。今回と同様の抗体を用いて別に行った研究により、これは骨細胞および骨芽細胞に局限して反応することはすでに確認している⁸⁾。したがって、今回得られた陽性反応の局在は、若干の非特異反応である可能性を考慮する必要があるが、大概は真の分布を示すと考えられる。

今回の Runx 2 の免疫組織化学的検討結果は、極めて興味深いものであった。すなわち、増殖した胞巣の一部にはあるが、胞巣の基底細胞と内部の細胞が陽性反応を示した。これは、D'Souza ら⁵⁾ の報告にあるようにエナメル器を作る上皮にもある時期、特定の細胞に Runx 2 が発現することが分かっているため、これを反映したものと考えられる。しかし、発現の時期や細胞の場所などに特別な規則性はみられなかった。このことは、これが腫瘍であり弱いながらも過剰発現していたことと思われた。なお、胞巣中心部の扁平上皮化生を起こした部に強い陽性所見が認められた。一般にこれらの部には非特異的吸着による反応が起こることが知られていることから、これも非特異的なものである可能性も否定できない。しかし、明らかな角質変性物の部には反応が弱くみられた事実があった。したがって、これから他の症例にもみられるのかを含めて検討しなければならないが、腫瘍細胞が扁平上皮化生を起こす際に Runx 2 が過剰に発現した可能性を示すものとも考えられる。

謝 辞

今回の症例はマラヤ大学歯学部病院口腔外科において取り扱われたもので、同大学口腔病理学教授の Siar CH 博士のご厚意により病理組織学的並びに免疫組織化学的検討を行うことができた。同博士に厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Phillipson HP and Coleman H (2005) Ameloblastomas. In: Banes L, Eveson JW, Reichart P and Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 296-300, IARC Press, Lyon.
- 2) Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I and Knuutila S (2002) Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. *J Dent Res* **81** : 525-30.
- 3) Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao Y-H, Inada M, Sato M, Okamoto R, Tomimaga K, Kitamura Y, Yoshiki S and Kishimoto T (1997) Targeted disruption of Cbfa 1 results in complete lack of bone formation owing to the maturation arrest of osteoblasts. *Cell* **89** : 755-64.
- 4) Wang WP, Åberg T, James MJ, Levanon D, Groner Y and Thesleff I (2005) Runx 2 (Cbfa) Inhibits Shh Signaling in the Lower but not Upper Molars of Mouse Embryos and Prevents the Budding of Putative Successional Teeth. *J Dent Res* **84**(2) : 138-43.
- 5) D'Souza RN, Åberg T, Gaikwad J, Cavender A, Owen M, Karsenty G and Thesleff I (1999) Cbfa 1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development* **126** : 2911-20.
- 6) Åberg T, Wang XP, Kim JH, Yamashita T, Bei M, Rice R, Ryoo HM and Thesleff I (2004) Runx 2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. *Dev Biol* **270**(1) : 76-93.
- 7) Kawakami T, Siar CH, Ng KH, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Hasegawa H, Tsujigiwa H, Nagatsuka H and Nagai N (2004) Expression of Notch in a case of osteosarcoma of the maxilla. *Eur J Med Res* **9** : 533-5.

- 8) Kawakami T, Shimizu T, Kimura A, Hasegawa H, Siar CH, Ng KH, Nagatsuka H, Nagai N and Kanda H (2005) Immunohistochemical examination of cytological differentiation in osteosarcomas. *Eur J Med Res* **10** : 475-9.
- 9) Kumamoto H, Ohki K and Ooya K (2004) Expression of sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* **33** : 185-90.