

## 【12】

氏 名	志 村 美智子 しむら みちこ
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第777号
学位授与の日付	令和3年3月3日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (口腔外科学)
学位論文題目	Whole exome sequencing of SMO, BRAF, PTCH1 and GNAS in odontogenic diseases (歯原性疾患におけるSMO、BRAF、PTCH1、GNASの全エクソン解析)
論文審査委員	(主査) 教授 石 田 和 之 (副査) 教授 楫 靖 教授 白 瀧 博 通

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

歯原性疾患（腫瘍、嚢胞、異形成症）は、臨床経過、画像所見、病理組織所見をもとに診断がなされているものの必ずしも確定診断が得られるわけではない。さらに、歯原性腫瘍は歯の形成に関与する細胞に由来する腫瘍であるが、多彩な組織像を呈するため診断に難渋する症例も少なくない。現在、種々の歯原性疾患に対して、責任遺伝子や遺伝子変異が報告されるようになってきた。しかし、系統的な解析、診断への応用の報告は極めて少ない。現在、歯原性疾患に対する遺伝子診断は、すでに報告されている遺伝子のある特定の部位を解析していることがほとんどである。

#### 【目 的】

本研究の目的は、歯原性疾患（腫瘍、嚢胞、異形成症）と診断された病変に対して、SMO、BRAF、PTCH1、GNASの全エクソンを自家製（in-house panel）Next Generation Sequencer（NGS）パネルで解析し、臨床経過、レントゲン所見、病理組織所見と合わせることで、各歯原性疾患において存在する遺伝子変異を同定すると同時に、病理組織学的診断の妥当性、遺伝子診断の有用性について検証することである。

#### 【対象と方法】

本研究は後ろ向き研究であり、研究の施行においては獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て（生命倫理申請番号：R-35-23J）、患者からインフォームド・コンセントを取得し行った。2014年1月～2018年12月に獨協医科大学病院口腔外科で診断・治療を行った歯原性疾患18症例（2017年WHO病

病理組織診断：エナメル上皮腫6例、歯原性角化嚢胞7例、セメント質骨性異形成症2例、腺腫様歯原性腫瘍1例、歯牙腫1例、含歯性嚢胞1例）を研究に使用し、in-house panelを用いたNGS解析を試みた。標的遺伝子はSMO、BRAF、PTCH1、GNASであり、全エクソンの遺伝子配列を解析した。

## 【結 果】

病理組織学的にエナメル上皮腫と診断されていた症例では下顎に発生した2例の同じ部位にBRAFのミスセンス変異（T440P）が認められ、この変異は肺癌で報告されている活性化変異であった。下顎に発生し咀嚼筋隙に浸潤を示した周辺性エナメル上皮腫はPTCH1にミスセンス変異（V582G）を認めた。病理組織学的に歯原性角化嚢胞と診断されていた7症例中4例にPTCH1のミスセンス変異が認められ、その中で右下顎臼歯部に発生した巨大な病変の症例はBRAFにも2か所のミスセンス変異（K51N、Y647D）が認められた。また、右下顎臼歯部に発生した症例はBRAFにミスセンス変異（T263P）が認められた。左上顎臼歯部に発症し、病変内に歯冠を含む智歯を上方に押しやり上顎洞内を占拠するような巨大な病変の症例に、SMOのミスセンス変異（N396T）が認められた。病理組織学的に歯牙腫と診断された症例で、SMOのミスセンス変異（Y394S）、BRAFのミスセンス変異（T263P）、PTCH1のミスセンス変異（T456P、D461N）が認められた。また、家族性と考えられるセメント質骨性異形成症では検索した遺伝子に変異を認められなかったが、硬組織病変の周辺に肉芽組織様の軟組織病変を伴っていた症例では、SMO（Y394S）、PTCH1（F725V）のミスセンス変異が認められた。上顎に発生した腺腫様歯原性腫瘍と診断された症例は、SMO（Y394S、Y399S）にミスセンス変異が認められた。下顎智歯の歯冠を含む含歯性嚢胞と診断した症例に変異は検出されなかった。なお、今回検索した18症例中7症例にGNAS（V860G）の変異が検出され、ミスセンスバリエーション（SNP）と考えられた。

## 【考 察】

今回、NGS解析で変異が示唆された遺伝子部位の結果をもとに歯原性疾患の診断を再考の余地があると考えられる。すなわち、臨床診断、病理組織診断、レントゲン診断ではエナメル上皮腫と診断できない症例（歯原性角化嚢胞などと診断されている症例）でも、上顎でSMOの変異がある症例はエナメル上皮腫やその類縁腫瘍の可能性があり、下顎ではBRAFの変異がある症例では、やはりエナメル上皮腫等の可能性を考慮しなければならない。今回の結果では、歯原性角化嚢胞と診断した7症例のうち4症例にPTCH1の変異が検出された。さらに、下顎1症例はBRAFの変異があり、上顎の1症例はSMOの変異が検出され、エナメル上皮腫等との鑑別が必要になるが、病理組織学的にはエナメル上皮腫やその類縁疾患と診断できる部位は存在しなかった。また、レントゲン像、臨床所見でエナメル上皮腫を強く疑っていたが、病理組織学的には確定できず歯原性角化嚢胞と診断せざるを得なかった。この症例の変異解析ではPTCH1の変異のみ検出されたので、歯原性角化嚢胞の診断が妥当だったのかもしれない。象牙質様の巨大な硬組織を有しており、病理組織学的に診断に苦慮した症例では、その部分が歯牙腫様であったことから、臨床的には歯牙腫と診断した。この症例は、硬組織を取り囲む軟組織にBRAF、SMO、PTCH1すべての変異が認められたことから、エナメル上皮腫類縁腫瘍の可能性も考えられる。しかしながら、病理組織学的には歯原性上皮と考えられる組織は同定でき

ず、歯原性間葉での変異を検出している可能性もある。セメント質骨性異形成症と診断した症例では、硬組織周囲の扁平上皮様の組織を含む軟組織にSMOとPTCH1の変異が検出されたため、腫瘍性疾患を考慮しなければならない。上顎洞を占拠する腺腫様歯原性腫瘍の典型的な組織像を示していた症例では、SMOの変異が認められた。腺腫様歯原性腫瘍はRASの変異、beta-cateninがあることは報告されているが、SMOの変異の報告はこれまでにはない。

#### 【結 論】

今回、NGS解析で検出された変異については特異度の検証が必要であるが、これらの結果から、全エクソンのNGS解析が歯原性疾患の鑑別診断（腫瘍の抽出）に有用であると考えられた。また、現在は歯原性角化嚢胞と呼ばれている疾患の中で、かつて角化嚢胞性歯原性腫瘍とされていた腫瘍性疾患の存在を再検討する必要と思われる。今後、歯原性腫瘍の診断には、臨床診断、レントゲン診断、病理組織診断と遺伝子変異解析の融合が必要と思われる。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

#### 【論文概要】

歯原性疾患（腫瘍、嚢胞、異形成症）は、臨床、画像、病理組織所見をもとに診断がなされているが、必ずしも確定診断が得られるわけではない。上顎骨に発生したエナメル上皮腫はSMO遺伝子に高頻度に活性化変異が見られ、下顎骨に発生したエナメル上皮腫ではBRAF遺伝子の活性化変異が見られることが報告されている。また、基底細胞母斑症候群の責任遺伝子であるPTCH1遺伝子は、孤発性の腫瘍性格を持った歯原性角化嚢胞（KCOTと呼ばれていた病変）にも変異が存在することが報告されている。このように、種々の歯原性疾患に対して、遺伝子変異が報告されるようになってきたが、系統的な解析、診断への応用は報告されていない。

申請者は本研究において、歯原性疾患における、SMO、BRAF、PTCH1、GNASの全エクソン解析を行うことで、当該遺伝子の遺伝子変異が歯原性疾患の系統的な解析、診断に応用出来るかを試みている。その結果、歯原性角化嚢胞と診断された症例の多くはPTCH1遺伝子の変異を認め、上顎に発症した症例はSMOの変異が、下顎に発症した症例はBRAFの変異が認められた。下顎のエナメル上皮腫と診断された症例では2例でBRAFの変異を認めており、1例はPTCH1の変異を認めた。臨床病理組織学的に診断が困難な歯牙腫様の症例ではBRAF、SMO、PTCH1すべての変異を検出した。また、セメント質骨性異形成症でSMOとPTCH1の変異を、腺様エナメル上皮腫ではSMOの変異を検出した。これらの結果から、歯原性疾患の確定診断にはNext Generation Sequencer（NGS）による全エクソン解析が有用であると結論付けている。

#### 【研究方法の妥当性】

申請論文の研究は、後ろ向き研究であり、研究の施行においては獨協医科大学生命倫理委員会の承認を得て、患者からインフォームド・コンセントを取得して行われた。2014年1月～2018年12月に獨協医科大学病院口腔外科で診断・治療を行った歯原性疾患18症例（2017年WHO病理組織診断：エナメル上皮腫6例、歯原性角化嚢胞7例、セメント質骨性異形成症2例、腺腫様歯原性腫瘍1例、歯牙

腫1例、含菌性嚢胞1例)を研究に使用し、DNA抽出後にin-house panelを用いたNGS解析を行っている。対象設定、DNA抽出、NGS解析の方法および評価方法はいずれも妥当である。

#### **【研究結果の新奇性・独創性】**

歯原性疾患に対する遺伝子診断は、すでに報告されている遺伝子のある特定の部位を解析していることがほとんどである。本研究は、臨床・画像・病理組織学的に診断された歯原性疾患に対して、SMO、BRAF、PTCH1、GNASの全エクソン解析を行い、多くの遺伝子変異を検出し、歯原性疾患の鑑別診断、特に腫瘍の抽出に有用である可能性を示したことにおいて、新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

#### **【結論の妥当性】**

歯原性疾患に関する現在の診断体系では、適切な対照群の設定の下、確立された実験手法を用いて、歯原性疾患におけるSMO、BRAF、PTCH1、GNASの全エクソン解析が歯原性疾患の鑑別診断(腫瘍の抽出)に有用であることを明らかにしている。NGSの特性をよく理解した上で、特異度の高いデータを抽出し正しく解釈されており、それらの結果から導かれる結論は、論理的に矛盾するものではなく、関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

#### **【当該分野における位置付け】**

歯原性疾患(腫瘍、嚢胞、異形成症)は、臨床・画像・病理組織所見をもとに診断がなされているが、必ずしも確定診断が得られるわけではない。さらに、歯原性腫瘍は歯の形成に関与する細胞に由来する腫瘍であるが、多彩な組織像を呈するため診断に難渋する症例も少なくない。申請論文では、歯原性疾患(腫瘍、嚢胞、異形成症)にみられる遺伝子変異の鑑別診断における有用性を検討しており、大変意義深い研究と評価できる。

#### **【申請者の研究能力】**

申請者は、歯原性疾患における全エクソン解析に関する知識を得たうえで、作業仮説を立て、研究計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。さらに、研究結果の臨床への応用、今後の研究の展開等についても考察しており、研究の継続性という点で優れていると考えられる。研究結果は当該領域の国際誌へ掲載されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

#### **【学位授与の可否】**

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって博士(医学)の学位授与に相応しいと判定した。

#### **(主論文公表誌)**

In Vivo

(34 : 3233-3240, 2020)