様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　６　月　　５　日現在

機関番号：　３２６５０
研究種目：　若手研究(B)
研究期間：　2015～2016
課題番号：　１５Ｋ２０５６０

研究課題名（和文）分子生物学的検索を応用した液状化検体細胞診による口腔がん早期発見の診断精度向上

研究課題名（英文）Improvement of diagnostic accuracy of early detection of oral cancer by liquefied specimen cytology applying molecular biological search

研究代表者

野口　沙希（Noguchi, Sunk）

東京歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：３０６１５４０６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,500,000円

研究成果の概要（和文）：　本研究は、口腔擦過細胞診に癌化関連タンパクの発現検索を合わせることで、細胞診における診断精度の向上を目的としたものである。癌化関連タンパクが癌を中心として、どのように発現しているか、マイクロダイセクションおよびPCR法を用いて検索し、マッピングを行った。その結果、これらの癌化関連タンパクは、腫瘍を中心として勾配的に発現していることが明らかになった。さらに、液状化検体細胞診の免疫組織学的な裏付けを目的として、早期舌癌の切除検体を用い、癌化関連タンパクの発現増減を検証した。以上の結果より、免疫組織学的染色を併用することで、液状化検体細胞診の精度向上および、口腔癌の早期診断の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study, we aimed to improve the diagnostic accuracy in cytodiagnosis by combining retrieval of carcinogenesis-associated protein expression in oral cytology. We examined that how dose carcinogenesis-associated proteins expression, used laser capture microdissection and PCR methods. And we tried mapping of carcinogenesis-associated proteins on cancer specimens. As a result, we certified that the expression of these carcinogenesis-associated proteins gradient increases mainly in tumors. Based on this fact, we inspected expression of these carcinogenesis-associated proteins on early tongue cancer. Aim to confirmation of Liquid-based Oral Cytology.As a result, it is suggested that accuracy of Liquid-based Oral Cytodiagnosis will improve by using the immunohistological staining, and possibility of early detect of the oral cancer.

研究分野：　口腔癌

キーワード：　口腔癌　細胞診　免疫染色

１．研究開始当初の背景

口腔扁平上皮癌は直視直達が可能な部位に発現することから、擦過細胞診が応用可能な病変である。また、口腔擦過細胞診は操作が簡便で、侵襲が小さいという利点を持つ。これらの点から、口腔擦過細胞診は、口腔扁平上皮癌のスクリーニング検査の一つといえる。

（１）擦過細胞診の診断精度については、診断の鍵となる異型の強い深層の細胞が採取されない場合、低下するとの報告がある。これは、表層置換型の癌化能を持たない口腔扁平上皮癌が持つ特徴の一つであり、早期癌においては、異型の弱い表層の細胞が中心となる病変も存在する。そのため、早期の口腔扁平上皮癌を対象とした細胞診の診断精度の向上が必要といえる。

（２）一方、癌周囲の上皮性異形成部は最も癌化能が高い病態であり、癌化能を持った上皮性異形成は、限りなく早期の扁平上皮癌に近い病態といえる。そこで、この部位での表層と深層の細胞の関係を検討することが，早期の扁平上皮癌に対する細胞診の診断能力を高めるものと考えた。

（３）癌化能を持った上皮性異形成の診断に関しては、ヒト組織を用いた検討が、多く行なわれている。我々はCK13とCK17が、上皮性異形成部で癌と健常組織の中間的な性格を持つことを明らかにしている。しかし、上皮性異形成部でのCK13とCK17の、表層と深層といった、細胞診で採取される層別の評価は行なわれていない。

２．研究の目的

口腔擦過細胞診の診断精度の向上を目的としてCK13, CK17, Ki-67およびp53の発現を、舌扁平上皮癌とその周囲の上皮性異形成で検討し、細胞診との整合性を検討した。

３．研究の方法

（１）対象：本研究は東京歯科大学市川総合病院歯科・口腔外科において、舌扁平上皮癌と臨床的に診断され、外科的切除を行った12症例を対象とした。症例は男性7名、女性5名、平均年齢61.50歳とした。(Table.1)
本研究は、東京歯科大学倫理委員会において承認されており(受付番号254)、説明と書面による患者の同意を得ている。

No.	Age	Gender	Stage
1	69	M	T2N0M0
2	70	W	T2N0M0
3	61	M	T2N0M0
4	71	M	T2N0M0
5	69	M	T2N0M0
6	75	W	T2N0M0
7	48	W	T2N0M0
8	63	W	T1N0M0
9	40	M	T3N1M0
10	68	M	T2N1M0
11	62	M	T3N1M0
12	39	W	T4aN0M0

M: men, W: women

Table.1

（２）標本作製、サンプルの設定：サンプル採取にあたり、HE染色を行った標本において、口腔病理専門医による病変の診断を行った。各採取領域設定は以下の通りとした（Fig.1）
UN：正常部の傍基底細胞層より上層
LN：正常部の傍基底細胞層と基底細胞層
UD：上皮異形成部の傍基底細胞層より上層
LD：上皮異形成部の傍基底細胞層および基底細胞層
C：腫瘍（癌）部の全層

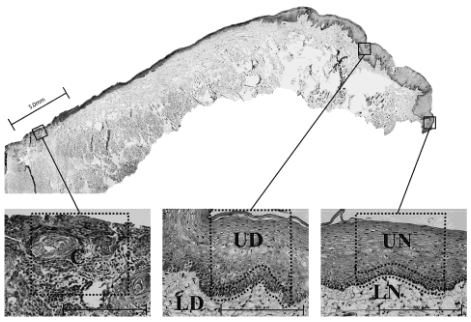

Fig.1：サンプルにおける取領域設定

（３）mRNA発現の評価：①12症例より厚さ8μmの凍結切片を切り出し、ダイセクション用のフィルムコーティングされたスライドグラスにそれぞれ貼付け、100%メタノールで3分間固定。②50%エタノールでコンパウンドを除去後、クレシルバイオレットを用いて染色。③50%エタノールで余剰染色液を洗浄後、100%エタノールで脱水し自然乾燥。前出の通り設定したUN, LN, UD, LD, C各部位のサンプルをレーザーマイクロダイセクションにて採取した。

Total RNAはRNeasy® Micro Kit (QIAGEN)を使用して抽出した。High capacity cyclic DNA Master Mix (Applied Biosystems)を用いてサーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) にセットし、25.0℃,5min,42.0℃,30min, 85℃, 5min, 4.0℃のプログラムでRNAをcDNAに逆転写した。得られたcDNAをTaqManプローブ法により、mRNA expression Assay(Table.1)、Gene Expression Master Mix (それぞれApplied Biosystems)を用いてPCR反応液を調整後、リアルタイムRT-PCR(7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems)で測定を行った。

この研究において、mRNA expression AssayはTable1.に挙げた通り、CK13, CK17, Ki-67, p53の4つのターゲット遺伝子、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを使用し(いずれもApplied Biosystemsの試薬を使用)、PCR反応プログラムはstandard 7500 (stage1: 50.0℃, 2minの1サイクル, stage2: 95.0℃,10minの1サイクル, stage3: 95.0℃, 0.15min, 60.0℃, 1minの50サイクル)で行った。各遺伝子の発現量はGAPDHの発現量を基準として各遺伝子間の比較を行った。

（４）免疫組織化学的評価：各検体より厚さ6μmの凍結切片を切り出し、シランコーティングされたスライドグラスにそれぞれ貼付。染色工程は室温内、インキュベーションチャンバー(KMB)内で反応操作を行った。切り出された各切片を10%パラホルムアルデヒドで30分以上浸漬固定した後､PBSで洗浄し､2段階ポリマー法（EnvisionTM + ポリクローナル HRP (DAB), DAKO)を使用して染色を行い、対比染色にマイヤーヘマトキシリンを使用した。

（５）統計学的解析：統計学的解析はSteel-Dwass法を使用した。統計解析ソフトウェアにはR2.15.0(R Foundation)を使用し、p<0.05を有意差ありとした。

（６）擦過細胞診との整合性：mRNAおよび免疫組織学的タンパク発現と、擦過細胞診との整合性を検討し、評価とした。

４．研究成果

（１）mRNA発現：CK13の発現；UN; 126.51±92.17, LN; 66.23±15.93, UD; 27.55±66.94, LD; 7.51±10.87, C; 0.33±1.55の順に高く、各群間においてはUN-LD, UN-C, LN-C, UD-C間で有意差(p<0.001)を、UN-LN, UD-LD, LD-C間で有意差(p<0.01)を認めた。CK17の発現;UD; 7.61±8.67, C; 6.83±3.40, LD; 1.90±1.49,UN; 1.01;±0.98, LN; 0.18±0.24,の順に高く、各群間において、LN-UD, LN-C間で有意差(p<0.01)を、UN-UD, LN-LD間で有意差(p<0.05)を認めた。Ki-67の発現;LD; 0.04±0.02, C; 0.02±0.01, LN; 0.01±0.01, UD; 0.004±0.002, UN; 0.0043768±0.0018,の順に高く、各群間ではUN-LD, UD-LD間で有意差(p<0.001)を、UN-LN, UN-C, UD-C, LN-UD, LN-LD, UD-C間で有意差(p<0.05)を認めた。p53の発現；LN; 0.070±0.01326, LD; 0.069±0.022, C; 0.035±0.027, UN; 0.026±0.012, UD; 0.01631±0.009,の順に高く、各群間ではLN-UD間で有意差(p<0.01)を認めた。(Fig.2)

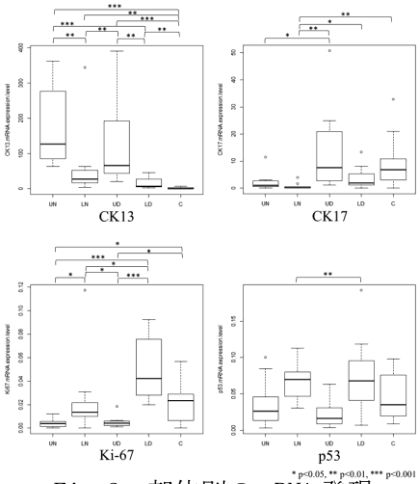

Fig.2：部位別のmRNA発現

（２）免疫組織化学的発現結果：CK13；UNで多くの陽性細胞を認め、UD、LN、LD、Cの順に減少した。CK17；UDおよびCで多くの陽性細胞を認め､LN､LD､LNの順に減少した｡Ki-67はLN､LDで陽性細胞を認めた。p53；LN、LD、Cで陽性細胞を認めた。(Fig.3)

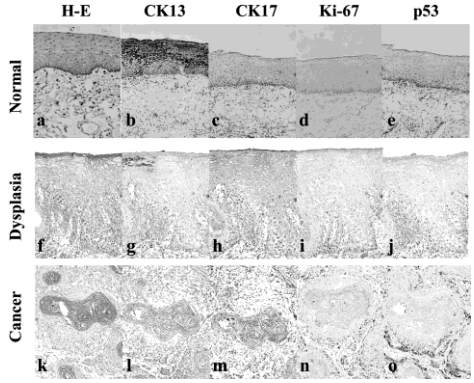

Fig.3：免疫組織化学的タンパク発現結果

（３）Labeling index：CK13は、UN; 82.07±6.47%, UD; 28.23±6.62%, C; 4.89±3.27%, LN; 0±0.21%, LD; 0±0%であり、UN-LN, UN-UD, UN-LD, UN-C, LN-UD, UD-LD, UD-C, LD-C間で有意差(p<0.001)を、LN-C間で有意差(p<0.01)を認めた。CK17は、UD; 52.15±12.62%, C; 47.94±6.24%, UN; 1.46±1.81%, LD; 0±9.09%, LN; 0±0%, UN-UD, UN-C, LN-UD, LN-C間で有意差(p<0.001)を、UD-LD, LD-C間で有意差(p<0.01)を認めた。Ki-67ではLN; 41.66%±11.84%, C; 25.8±9.02%, LD; 31.21±2.99%, UN; 0.61±1.93%, UD; 0±0.68%の順に高く、UN-LN, UN-LD, UN-C, LN-UD, UD-LD, UD-C間で有意差(p<0.001)を認めた。p53においてはC; 63.90±4.08%, LD; 13.31±15.62%, LN; 2.02±4.26%, UD; 0±0% , UN; 0±0%の順に高く、UN-LD, UN-C, LN-C, UD-LD, UD-C, LD-C 間で有意差(p<0.001)を、UN-LN, LN-UD間で有意差(p<0.05)を認めた。(Fig.4)

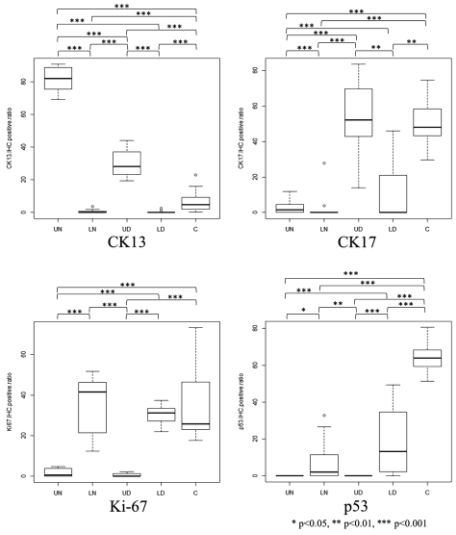

Fig.4：部位別のLabeling index

（４）タンパク発現と細胞診断

Cにおいては、深層ならびに中層の異型細胞を認めSCC,O-HSIL(細胞診ガイドライン

Ver,5 2015 年版日本臨床細胞学会)の診断を得た。UD および UN においては O-LSIL、UNNILM の診断を得た。

以上のことから、液状化検体細胞診に、免疫組織学的染色を併用することで、液状化検体細胞診の精度向上が期待でき、口腔癌の早期診断が可能であることが示唆された。

<引用論文>

Noguchi S, Sato K, Yamamoto G, Tonogi M, Tanaka Y, Tachikawa T, Yamane G 、 Expression of cytokeratin 13 and 17 in tongue squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia. Asian J Oral Maxillofac Surg 23:2011,53-58.

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計１件）

Akiko Matsuhira、Sunaki Noguchi、Kazumichi Sato、Yoichi Tanaka、Gou Yamamoto、Kenji Mishima、Akira Katakura
Cytokeratin 13, Cytokeratin 17, Ki-67 and p53 Expression in Upper Layers of Epithelial Dysplasia Surrounding Tongue Squamous Cell Carcinoma、Bull of Tokyo Dent College、査読有、56(4)、2015、223-231

〔学会発表〕（計１件）

①池田雄介、野村武史、高野伸夫、田中陽一、橋本和彦、野口沙希
蛍光光学機器を用いた腫瘍切除マージンの比較検討－第 2 報-
第 61 回日本口腔外科学会総会・学術大会（千葉市）2016 年 11 月 25 日

６．研究組織

⑴研究代表者

野口　沙希（NOGUCHI, Sunaki）
東京歯科大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：30615406