

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20445

研究課題名（和文）モデル動物を用いた口腔粘膜上皮異形成の診断基準を規定する新規マーカーの開発

研究課題名（英文）Development of a new maker for oral epithelial dysplasia by using animal model

研究代表者

中尾 寿奈（Nakao, Juna）

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：30734173

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：口腔扁平上皮癌の前駆病変である上皮性異形成の分子生物学的特徴の検索をラットモデルを用いて行った。次世代シーケンス解析を行ったところ、上皮性異形成、扁平上皮癌において、炎症性カルシウム結合タンパク質であるS100A8、S100A9の発現上昇が明らかとなった。また免疫組織学的検討により正常上皮細胞と比較したところ、異型上皮細胞ではS100A、S100A9の発現の局在に変化を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮性異形成は口腔がんの前駆病変であり、早期発見、治療することでがんの発生を抑えることができる。本研究では病変におけるS100A8、S100A9に発現上昇を明らかにした。上皮性異形成の特徴を形態学的のみならず、分子生物学的に見出すことは、早期発見、診断の新しいマーカー、新規治療薬の開発につながると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Oral epithelial dysplasia is a precursor lesion of oral squamous cell carcinoma. It shows architectural and cellular atypia. However, histopathological diagnosis criteria has a little variation. We investigated a new biomarkers for oral epithelial dysplasia by using rat model and RNA-sequencing. Interestingly, the expression of S100A8 and S100A9 in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma were higher than normal tongue. We focused on S100A8 and S100A9 in oral epithelial cells.

研究分野：口腔病理

キーワード：口腔癌 上皮性異形成 前癌病変 白板症 免疫組織化学染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔内は他の臓器とは異なり自分自身で日常的に覗き触れることが可能であるため、異変に気づきやすい領域にも関わらず、最近の統計では口腔領域に発生した悪性新生物(咽頭や唾液腺を除く)の死亡者数は増加傾向にある。また口腔がんの治療は機能的影響に加え、直視可能であるからこそ審美的にも影響を与えることが多く、QOLの低下は免れない。口腔がんでも最も頻度の高い組織型である扁平上皮癌は、前駆病変として口腔上皮性異形成を生じる。よって口腔癌の発生を抑えるために、この前駆病変の早期発見、確実な診断と治療が望まれる。

しかしながら、口腔上皮性異形成の病理診断基準は未だ世界的基準がひとつに統一されておらず、現在においても病理医や各施設により診断基準にばらつきがある。そのため外科医も取り扱いに苦慮する疾患である。口腔上皮性異形成には明確で客観的診断基準が早急に必要とされる。

### 2. 研究の目的

正常粘膜上皮から上皮性異形成、上皮性異形成から扁平上皮癌という発がん過程には様々な遺伝子の関与の報告があるが、詳細なメカニズムは不明である。本研究では組織学的診断基準にばらつきのある上皮性異形成における特徴的な遺伝子の発現を見出し、病理組織学的診断基準や予後の指標となる新たなマーカーの開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ラット病変モデル

6週齢の雄性 DA ラットに発がん物質 4NQO を連続経口投与し、上皮性異形成、扁平上皮癌(SCC)病変を発生させた。ラットの舌病変の観察は肉眼所見に加え、ブラシによる擦過細胞診を用いた。これにより簡便に経時的に細胞変化が観察できた。また細胞診の標本作製には液状化検体細胞診(LBC)を用いたことで、固定後のサンプルの保存が可能であった。屠殺後、舌組織ホルマリン固定パラフィン切片を用い、病理組織学的評価を行った。

#### (2) 遺伝子発現の網羅的検索

ラット舌組織ホルマリン固定パラフィン切片から抽出した RNA を用い、次世代シーケンサー解析(RNA-Seq 解析)を行った。扁平上皮癌症例の浸潤部、非浸潤部、4NQO 非経口投与群(コントロール)で比較した。

#### (3) 免疫組織学的検索

ラット舌組織において、RNA-Seq 解析によって病変群で高発現がみられた遺伝子のタンパクの局在を観察するために免疫組織化学染色を行った。

また病理組織学的に診断されたヒト舌扁平上皮癌症例ならびに切除範囲に含まれる正常粘膜組織において、RNA-Seq 解析によって病変群で高発現がみられた遺伝子のタンパクの局在を観察するために免疫組織化学染色を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ラット舌癌病変モデル病理組織学的検索

4NQO 投与ラットの舌背に異型を呈す上皮細胞の浸潤性増殖を認めた。腫瘍胞巣は角化傾向を示し、扁平上皮癌の発生を確認した。浸潤部周囲の粘膜上皮は明らかな異型を呈す上皮細胞と角化亢進を認め、上皮性異形成に相当した。

#### (2) 網羅的遺伝子発現解析

コントロール群と比較し、扁平上皮癌発生症例の浸潤部、非浸潤部ではともに S100A8 と S100A9 の発現上昇を認めた。また扁平上皮癌症例の浸潤部、非浸潤部の組織で比較すると浸潤部でより発現の上昇がみられた。(Fig.1) S100A8、S100A9 はカルシウム結合性タンパクで、炎症性病変で上昇することが知られている。発現経路として IL17 シグナル伝達経路が関与することが知られている。しかしながら、病変群では IL17 受容体の発現を認めたにもかかわらず、リガンドとなる IL17 の発現はみられなかった。このことより、腫瘍性病変における S100A8、S100A9 の産生は炎症時とは異なる経路行われていることが示唆された。

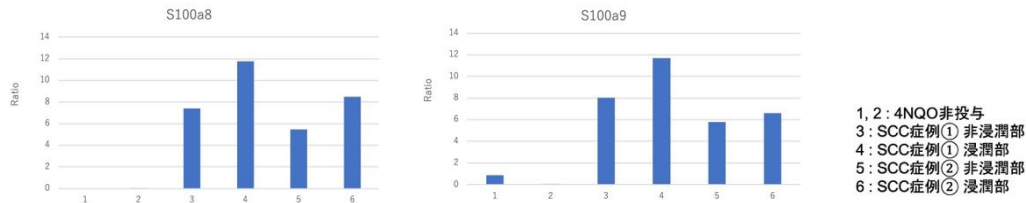


Fig.1 S100A8, S100A9 の発現

### (3) S100A8、S100A9 の免疫組織化学的検索

ラット扁平上皮癌症例において、S100A8、S100A9 とともに、浸潤する異型上皮細胞に陽性を示した。腫瘍胞巣辺縁の細胞は細胞質、核ともに陰性を示した (Fig. 2)。間質には S100A8、S100A9 陽性の炎症細胞の浸潤を認めた。

ヒト扁平上皮癌症例において、S100A8、S100A9 とともに、浸潤する異型上皮細胞に陽性を示した。腫瘍胞巣辺縁の細胞は細胞質、核ともに陰性を示した (Fig. 3)。また正常粘膜上皮細胞と比較すると、上皮性異形成、扁平上皮癌で細胞質に陽性を示す異型上皮細胞は核に発現の減弱傾向を認めた。間質には S100A8、S100A9 陽性の炎症細胞の浸潤を認めた。

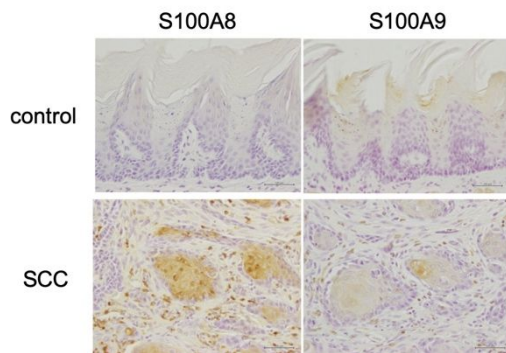


Fig.2 S100A8 および S100A9 免疫染色結果 (ラット)

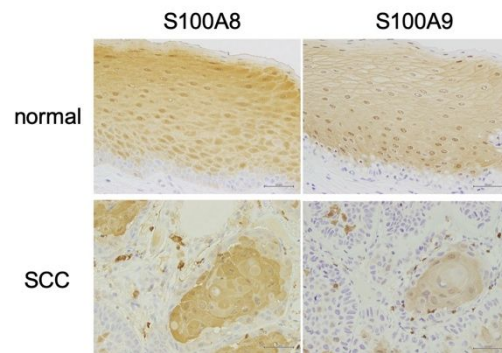


Fig.3 S100A8 および S100A9 免疫染色結果 (ヒト)

この結果より、ラット舌癌病変モデルを用いた網羅的遺伝子発現解析結果より候補遺伝子として挙げられた S100A8、S100A9 は、異型上皮細胞の細胞質に陽性、核における発現の減弱傾向を示し、上皮細胞の腫瘍性変化に関連していることが示唆された。また正常粘膜上皮の基底細胞層、扁平上皮癌の腫瘍胞巣の辺縁に陰性を示すことから上皮細胞の分化との関連が示唆され、S100A8、S100A9 が扁平上皮癌、上皮性異形成における新たなバイオマーカーとなりうる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金子裕康、江原道子、中尾寿奈、永山元彦、住友伸一郎、松原誠、田沼順一
2. 発表標題 液状化検体細胞診を用いたラット舌がん病変を規定する遺伝子の検索
3. 学会等名 第58回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroyasu Kaneko, Juna Nakao, Michiko Ehara, Motohiko Nagayama, Shinichiro Sumitomo, Jun-ichi Tanuma
2. 発表標題 Fundamental studies of cytology by using a model animal
3. 学会等名 The 19th International Congress of Cytology
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考