

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11609

研究課題名（和文）マウス発癌モデルを用いた口腔癌早期病変の生物学的解析と病態解明

研究課題名（英文）Molecular and pathological understanding of oral early cancer using mouse chemical carcinogenesis model

研究代表者

宇佐美 悠（Usami, Yu）

大阪大学・歯学研究科・講師

研究者番号：80444579

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、化学発癌を用いて、マウスの舌に、必ず浸潤癌に進行する上皮異形成・上皮内癌を作製し、病変と血管の関係について解析した。血管構造の異常は異形成から始まり、細胞分裂を伴う血管増生は進行癌に特徴的であった。また、本モデルを応用することで、早期病変である異形成の細胞を培養することが可能であったことから、将来的には、癌になる前の病変に関して、より詳細な研究や病態把握が可能となる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで進行癌の研究に関しては、様々な方法が存在しており、様々な研究がなされてきた。しかしながら、癌になる前の上皮異形成や、浸潤する前の上皮内癌に関する研究は、切除材料しか存在しないことから、非常に困難であった。

本研究は、古典的な化学発癌モデルを用いることで、前癌病変や上皮内癌の研究が可能になるという可能性を示した意義ある研究である。また本モデルを用いることで、これまで培養が不可能であった超早期病変の細胞が培養可能になることが示された。今後、様々な検索方法や遺伝子組み替え動物を応用することで、より詳細な癌化過程や、新たな治療法の開発に繋がる可能性がある、学術的、社会的意義のある研究である。

研究成果の概要（英文）：In this project, we evaluated the vessel alterations during the tongue cancer development using mouse chemical carcinogenesis model. The first histological abnormality of the blood vessel was revealed in epithelial dysplasia, the early pre-malignant mucosal lesion. Endothelial cell proliferation was evident only in the stroma of the invasive squamous cell carcinomas. Also, we successfully cultured the primary cells from epithelial dysplasia using our current model. Our study showed that the chemical carcinogenesis model can be a good model to evaluate both pathological and molecular abnormalities found in pre-malignant and early malignant lesion of the oral mucosa.

研究分野：口腔病理

キーワード：口腔癌 舌癌 早期癌 化学発癌 癌微小環境 血管新生 異形成

期間における病変の割合を図2に示す。

- 上皮過形成 (hyperplasia): 釘脚の延長、核異型を伴わない上皮の著しい肥厚。
- 上皮異形成 (dysplasia): 極性喪失、核の多形や濃染等の核異形を伴い、釘脚の延長を認める上皮。
- 上皮内癌 (CIS): 著明な核異型、分裂像の増加を伴った異型細胞が上皮の全層に見られる。
- 扁平上皮癌 (SqCC): 間質への浸潤を伴う、著明な核異型、分裂像の増加を伴った異型上皮。

(3) 免疫組織化学的染色、蛍光免疫組織化学

免疫組織化学的染色はLSAB法 (labeled streptavidin biotinylated antibody 法) を用いて行い DAB (3, 3'-diaminobenzidine, DAB, Dako, Glostrup, Denmark) にて発色し検出した。一次抗体として、抗 CD31 抗体 (1:50, Abcam, Cambridge, UK)、抗 α -SMA 抗体 (1:500, Abcam)、抗 VEGF 抗体 (vascular endothelial growth factor, 1:500, Thermo Fisher Scientific, CA, USA)、抗 pimonidazole 抗体 (1:400, Hypoxyprobe Inc., MA, USA)、抗 ERG 抗体 (1:100, Abcam) を使用した。蛍光染色には、Alexa Flour 488-, 647-標識 2 次抗体 (1:200, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) および DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Sigma) を使用した。蛍光免疫染色標本は、共焦点レーザー顕微鏡 (SP8, Leica Biosystems Inc., IL, USA) を用いた観察した。

(4) 血管密度の計測

血管密度は、抗 CD31 抗体を用いて免疫組織化学染色後に、無作為に撮影された画像より、CD31 陽性の血管数および間質の面積を計測し、血管密度を算出した。

(5) 墨汁による血管走行の観察

血管の描出は、1:1 で混合された 10% PFA/PBS・墨汁混合液を深麻酔されたマウス左室より環流することで行った。環流固定後、組織は BABB 法 (Benzyl Alcohol Benzyl Benzoate) により透明化処理後、1mm 厚の組織を切り出し、全焦点顕微鏡 (Nikon instrument, 東京) にて観察した [8]。

(6) EdU による血管内皮細胞増生の解析

内皮細胞の増殖を検討するため、EdU (5-ethynyl-20-deoxyuridine, 体重 (g) あたり 50 μ g, Life Technologies) を腹腔内投与後 2 時間で安楽死させ、通法に従いパラフィン包埋切片を作製した。EdU は Click-iT EdU Imaging Kits (Life Technologies) にて検出し、蛍光免疫組織化学にて検討した。

(7) 遺伝子発現解析

遺伝子発現解析のため、安楽死の後、採取された舌組織を分割後、直ちに凍結し、クライオスタットにて薄切り後、RNAlater (Life Technologies) にて固定を行い、レーザーマイクロダイゼクション法にて病変部分を採取し、mRNA を抽出後、cDNA を得た。各病変より採取された cDNA は、TaqMan Fast advanced mastermix (Thermo Fisher Scientific) および TaqMan Array Mouse Angiogenesis Panel (Thermo Fisher Scientific) により解析した。

(8) Pimonidazole を用いた低酸素領域の同定

低酸素領域に結合する Pimonidazole (Hypoxyprobe, Inc.) を体重 (g) あたり 60 μ g 腹腔内に投与し、1 時間後に安楽死の上、組織を採取した。組織は通法に従いパラフィン包埋の後に、薄切切片を作製し、抗 pimonidazole 抗体を用いて免疫組織学的に Pimonidazole を検出した。

(9) 統計処理

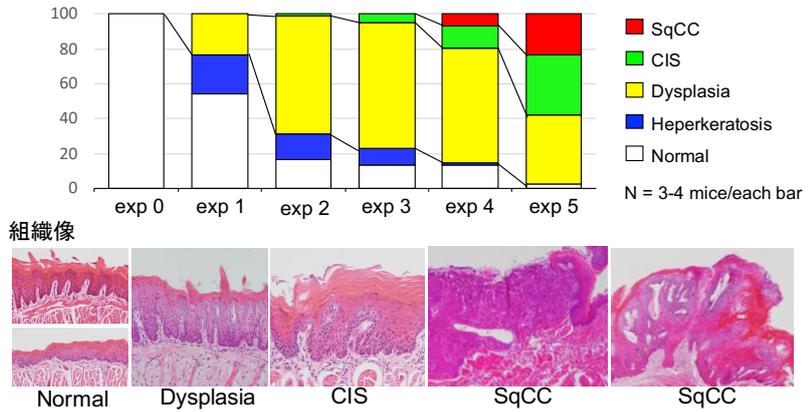
全てのデータは、Graphpad PRISM7 ソフトウェア (GraphPad Software, Inc., CA, USA) を使用して、Kruskal-Wallis one-way analysis of variance および Dunn's multiple comparisons test により解析した。P 値 0.05 以下を有意と解釈した。

4. 研究成果

(1) 4NQO 化学発癌

4NQO 化学発癌により得られた病変を組織学的に解析したところ、4NQO 終了時 (exp 0) の正常上皮 (normal) より、実験の進行 (exp 1, exp 2, ...) とともに hyperplasia、dysplasia、CIS、SqCC が出現することを確認した。実験の進行と出現する各病変の割合および組織像を図 2 に示す。以後、dysplasia を中心として解析する群は exp 2 より、SqCC を中心とした解析を行う群を exp 5 より得る事とした。

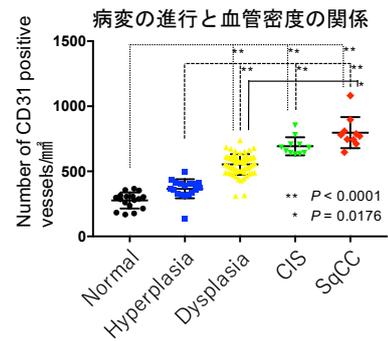
図2. 実験の進行と病変



(2) 病変の組織学的な変化に一致して血管密度は増加する

4NQO 化学発癌の過程において出現する血管が、病態の進行に応じて変化するか否かを検討するため、抗 CD31 抗体を用いて免疫組織化学的に血管を同定し、血管密度を計測した。様々な実験時期 (exp 1...) および、各画像における組織像より解析を行ったところ、dysplasia、CIS、SqCC と段階的に進行する病変に一致して血管密度の増加が認められるものの、各画像を撮影した実験時期と血管密度の増加には明らかな関連は認められなかった。これは、血管の増生が 4NQO による変化ではなく、病態に応じて変化していることを示していると考えられた (図 3)。

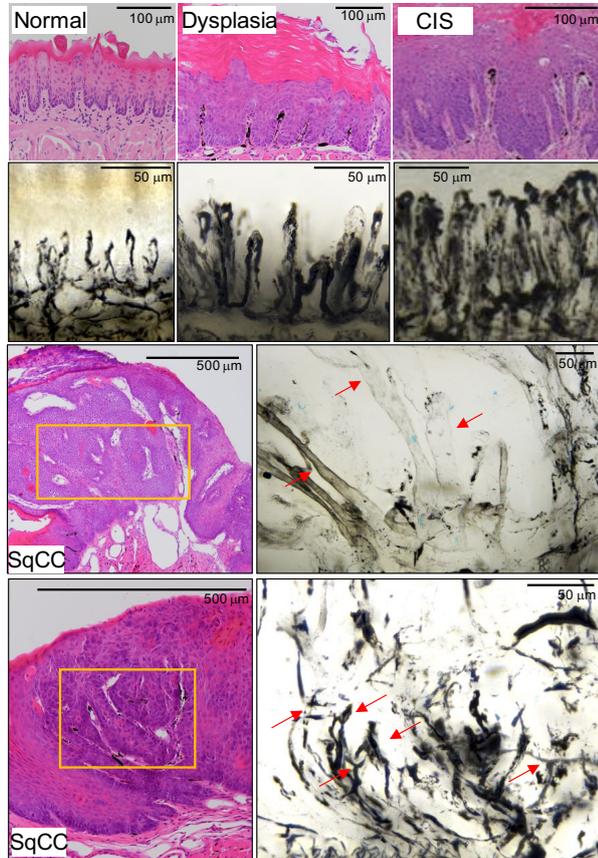
図3. 血管密度



(3) 血管構造の変化は dysplasia の段階より変化する

腫瘍組織においては、蛇行や湾曲、太さの異なる血管の吻合や盲端といった異常な走行を示す血管が見られることが知られている [9]。そこで、血管内に中性緩衝ホルマリン・墨汁混合液を注入し BABB 法にて組織を透明化処理後、1 mm 厚に薄切後、全焦点顕微鏡にて観察を行った。正常粘膜 (normal) では間質乳頭部分でおよそ 20 μm の長さを縦走していた血管が、dysplasia では 50 μm 程度の長さで、コイル状に走行し、SqCC では、著明な蛇行、鋭角の湾曲、盲端といった走行の以上が確認された (図 4)。

図4. 血管の走行



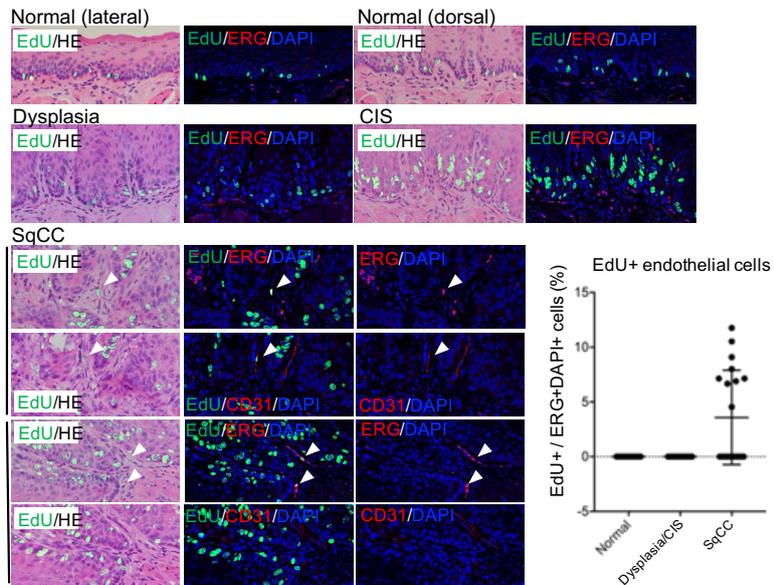
(4) 血管の微小構造は dysplasia の段階より変化する

血管は、内腔面を CD31 陽性の血管内皮細胞に、その外側を α -SMA 陽性の血管周皮細胞に覆われる。これまで SqCC では血管内皮細胞の欠落など異常な微細構造が報告されているが、dysplasia における変化は明らかではない。そこで抗 CD31 抗体、抗 α -SMA 抗体を用いて免疫組織学的に解析したところ、dysplasia の段階において抗 α -SMA 抗体陽性となる血管周皮細胞の欠落が、また SqCC において明らかな血管腔を有さない抗 CD31 抗体陽性細胞が間質に認められることが明らかとなった。

(5) 血管内皮細胞の増殖活性

血管新生において、どのように血管構成細胞の増殖が起きるのか、に関しては依然として不明な点が多い[9]。そこで分裂細胞に取り込まれる EdU による細胞増殖活性の検討を行った。EdU 投与後 2 時間において増殖細胞の核に陽性となる EdU と血管内皮細胞の細胞膜に陽性となる CD31、核に陽性となる ERG が共陽性となる細胞を検討したところ、浸潤に伴う間質の拡大が見られる SqCC においてのみ、内皮細胞増殖が起きていることが明らかとなった (図 5)。

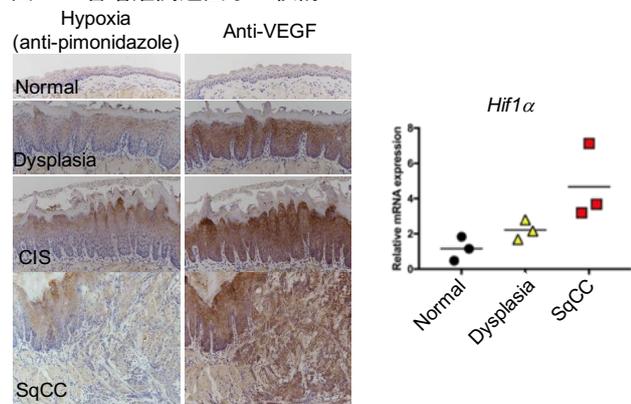
図5. EdUを用いた血管内皮細胞増殖活性の検討



(6) 血管増殖関連遺伝子の網羅的解析

血管増殖のメカニズムを検討するため、病変より採取した mRNA より血管増殖関連遺伝子の発言を網羅的に解析したところ、低酸素の責任遺伝子である HIF1 α (Hypoxia inducible factor) だけでなく、種々の間質細胞に関わる遺伝子の上昇が認められた (データ示さず)。また、低酸素領域を抗 Pimonidazole 抗体で、VEGF (vascular endothelial growth factor) 発現を抗 VEGF 抗体で検討したところ、抗 Pimonidazole 抗体で陽性となる低酸素領域、VEGF 発現ともに dysplasia から発現の上昇が見られたが、SqCC では、VEGF 発現は陽性となるものの、低酸素領域は解消される傾向にあることが明らかとなった (図 6)。低酸素領域は、進行癌において、より顕著になると考えられており、新しい治療標的の一つでもある。本結果は、それに相反するものであり、今後、詳細な見当が必要と思われる。

図6. 血管増殖関連因子の検討

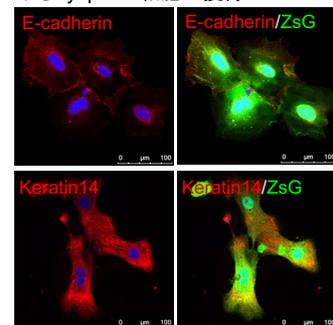


(7) 今後の展望

本研究計画にあった dysplasia 細胞の初代培養に関して、上皮細胞が GFP 陽性となる K14Cre:ZsG マウスを用いて発癌実験を行い、exp 2 の dysplasia 病変より細胞を採取することができた (図 7)。今後、これらの細胞を用いて、exp 5 で得られる SqCC 細胞との異同を低酸素応答の観点から解析する予定である。

本研究の結果より 4NQO 化学発癌モデルを用いることで、これまで困難であった dysplasia や CIS といった、移植モデルでは再現不可能な早期病変の病態を明らかにできる可能性が示唆された。また dysplasia 病変からの初代培養細胞を応用することで、分子生物学的、細胞生物学的解析による dysplasia の病態把握が期待される。

図7. K14Cre;ZsGreen マウスにおける dysplasia 細胞の獲得



引用文献 [1] Reibel J. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:47-62, [2] Zhang L, *et al.* Oral Oncol. 2016;60:125-129, [3] Lakshmi K, *et al.* J Oral Maxillofac Pathol. 2016;20:261-268, [4] Izumo T. Int J Clin Oncol. 2011;16:15-26, [5] Abe M, *et al.* BMC Cancer. 2016;16:350, [6] Joyce JA, Pollard JW. Nat Rev Cancer. (2009), [7] Tang XH, *et al.* Clin Cancer Res. 2004;10:301-313. [8] Becker K, *et al.* Cold Spring Harb Protoc. 2013;8:743-44. [9] Senger DR, Davis GE. Angiogenesis. Cold Spring Harbor Perspect in biol. 2011;3:a005090.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇佐美 悠、白銀 陽一郎、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白銀 陽一郎、宇佐美 悠、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 第30回日本臨床口腔病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白銀 陽一郎、宇佐美 悠、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 第38回日本口腔腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白銀 陽一郎、宇佐美 悠、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、池邊 一典、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白銀 陽一郎、宇佐美 悠、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、池邊 一典、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 大阪大学歯学会第128回例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宇佐美 悠、白銀 陽一郎、廣瀬 勝俊、佐藤 淳、豊澤 悟
2. 発表標題 4NQO発癌モデルを用いた舌癌発生過程における血管の解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	豊澤 悟 (Toyosawa Satoru) (30243249)	大阪大学・歯学研究科・教授 (14401)	
研究 分担者	大家 香織 (Oya Kaori) (00779126)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (14401)	