

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10346

研究課題名(和文) 舌扁平上皮癌の進展誘導に働く異型間質フィールドの解析

研究課題名(英文) Analysis of atypical stromal environment in premalignant oral mucosal lesions

研究代表者

添野 雄一 (SOENO, Yuuichi)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：70350139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜の癌化過程では、上皮の異型変化に伴って間質環境も形質・構造の変化を生じている。本研究では、異型間質フィールドの実態を明らかにする目的で、口腔粘膜の早期病変を対象として異型指標マーカーや間質要素の関連性を検証した。舌表在性病変の比較解析により、上皮層構造によりCD44やBmi-1発現パターンが異なること、また、粘膜在住のLangerhans細胞や樹状細胞が健常-異型上皮境界で分布変化する様子を明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢化が進む本邦において、口腔癌の罹患者数は増加傾向にあり、治療法が進歩しても依然として術後の局所再発や早期転移により死亡率が高い現状にある。本研究の成果として、これまで癌化機序の主軸とされていた上皮細胞の異型形質に加えて、間質環境の変化が癌化を促進する素地となりうることを示した。これらの知見は、早期病変の診断指標となるとともに、将来の超早期治療を実現する基盤として重要と考えている。

研究成果の概要(英文)：Stromal environment of oral mucosa undergoes phenotypic/structural changes in parallel to atypical changes in the epithelium. To clarify the atypical stromal field this study investigated the relationship between atypical markers and interstitial elements in early oral mucosal lesions. Comparative analysis of tongue lesions revealed that the expression pattern of CD44 and Bmi-1 varied depending on the epithelial layer construction and that the distribution of mucosa-resident Langerhans cells as well as dendritic cells altered at the boundary region between healthy and atypical epithelium.

研究分野：実験病理学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 癌微小環境 早期悪性病変 異型上皮 間質応答

1. 研究開始当初の背景

口腔領域に生じる悪性腫瘍のなかで、口腔粘膜上皮の扁平上皮癌(口腔癌)が最も発症頻度が高い。一般に、口腔粘膜では数十年のオーダーで上皮幹細胞に遺伝子変異が蓄積し、やがて形態変化として認識できる異型上皮細胞が出現、最終的に浸潤性の癌細胞となって周囲組織を侵していく。粘膜上皮に変異を誘発する要因としては、熱い・辛い・硬いなどの飲食物の刺激、喫煙、アルコール摂取、ウイルス感染などが知られている。

口腔を含む上部消化管ではこれらの刺激に頻回に晒されており、癌の素地となる異型上皮が広範囲に生じているとされる(フィールド発癌の概念)。しかし、実際の扁平上皮癌の発生は一樣でなく、好発部位は舌、歯肉、頬部、口底、口蓋の順で解剖学的な差異が生じている。特に、舌側縁部で発症する舌癌は症例全体の6割を占める。さらに、舌癌症例の比較では、長期間異型上皮の状態に留まっているもの(上皮性異形成)、上皮層レベルに留まるもの(上皮内癌)、外向性に発育するもの、内向性に浸潤し早期にリンパ節転移をきたすものなど、症例ごとに発育・浸潤様式は多様性を示す。病理組織学的に類似した形質を示す例でも、間質(非腫瘍性組織)における炎症・免疫応答が異なっていることが多い。病理診断の実情として予後不良例を推測することが難しく、口腔癌の発症機序と病態の解明は急務の課題となっている。

舌側縁部は他部位と比べて機械的刺激(歯・義歯等との直接接触や咬傷)を蒙りやすい。また、上皮幹細胞に異型形質をもたらす種々の刺激は、近傍の間質細胞に対しても形質変化を誘発しうる。これらの点に着目すると、多様な舌癌病態の一端を説明しうる仮説として、“舌粘膜で繰り返される組織損傷・修復応答の結果、異型上皮の発生と同時にもしくは先行して、癌の浸潤・転移を容易にする間質環境が生じている”という可能性が考えられる。

近年の癌研究により、進行癌では癌細胞と周囲の間質要素(血管内皮や線維芽細胞等)との相互作用によって特殊な“癌微小環境”が形成され、病態・予後に影響を及ぼしていることが明らかになってきた。一方、初期の消化器粘膜病変では、上皮下の微小血管網(IPCL)が健常と異なった複雑な形状を呈することが判明し、このIPCLの変化を検出する内視鏡技術が早期発見に応用されている。また、最近の研究で、リンパ節に存在する高内皮細静脈(HEV)に類似した形質を示す脈管が口腔癌の間質に出現することが明らかとなり、転移との関連が示唆されている。

こうした初期病変における血管間質の変化は、異型上皮が発するシグナルに間質が反応した結果と捉えられてきた。しかしながら、刺激応答が介在する組織では間質細胞や集簇した炎症性細胞から種々のサイトカイン・増殖因子が分泌されている。さらに、口腔粘膜上皮層には、皮膚と同様に抗原提示に働くLangerhans細胞、上皮下結合組織には樹状細胞、血管周囲マクロファージといった免疫担当細胞が局在している。

以上の考察から、組織損傷・修復の過程で間質環境のバランスが崩壊し、異型上皮の出現と併行して、IPCL形状の変化、HEV様脈管の出現、リンパ管内皮の性状やリンパ管構造に変化をもたらすのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、健常と異なった形質・構造を成す間質構成全体を「異型間質フィールド」と定義し、舌粘膜病変における異型間質フィールドの実態を明らかにするとともに、この組織環境と上皮形質の関連性について検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究の解析は、舌表在性病変として診断済みの外科切除検体17症例(口腔上皮性異形成7症例、口腔上皮内癌8症例、早期扁平上皮癌2症例)を使用した。組織学的検索にはHematoxylin-Eosin染色、各種表現型解析には免疫染色を行い、染色条件のポジティブおよびネガティブコントロールにはヒト正常組織および舌癌・唾液腺腫瘍病変を載せた組織アレイブロックを使用した。組織観察では、病変切除に際して設定された安全域の上皮組織を健常相当上皮とした。

表現型解析では、パラフィン包埋薄切切片に対し、上皮形質マーカーCytokeratin(CK)13, CK17, E-cadherin, Bmi-1 (F-6; Abcam), CD44v5 (VFF-8; OriGene Technologies), CD44v6 (2F10; Bio-Techne), CD44v7-8 (VFF-17; Thermo Fisher Scientific), CD44v9 (RV3; Cosmo Bio)、樹状細胞マーカーHLA-DR (TAL 1B5; Abcam)、Langerhans細胞マーカーCD207 (rabbit polyclonal; Atlas Antibodies)、HEV様脈管マーカー6-sulfo sialyl Lewis X (MECA-79; BD Biosciences)の特異抗体で標識した。組織構造解析では、上皮層構造に基づく標本分類と免疫担当細胞の分布パターン比較のため、染色画像をバーチャルスライド装置(NanoZoomer; 浜松ホトニクス)でデジタル記録し、画像演算処理システム(RATOC社; TRI-SRF, NIH; ImageJ/FIJI)を使用した。組織変化の形態計測、組織立体構築を行った。

4. 研究成果

(1) 舌表在性病変における CD44 バリエント発現プロファイル

異型上皮が成立する初期段階からの上皮細胞形質の変化を追跡する目的で、舌表在性病変を健常上皮領域、異型上皮領域、過形成上皮領域に分けて上皮形質マーカーの発現解析を行った。

CD44 (cluster of differentiation 44) は、細胞と細胞外マトリックスの接着を担う接着分子の一つで、主にヒアルロン酸の受容体として白血球や線維芽細胞など広範な細胞種に発現し、健常粘膜上皮では細胞間隙に局在している。CD44 遺伝子座から標準型 CD44s が生成されるほか、選択的スプライシングによって複数の変異型バリエント CD44v が発現する。癌と CD44 の関連については、癌細胞で発現減弱することにより周囲の細胞や基質との接着が解除され、癌細胞の運動能・浸潤能の亢進に繋がると解釈されていたが、近年では癌幹細胞で高発現することから癌幹細胞マーカーとして注目されるようになった。

今回の解析では、腫瘍細胞での発現変化に関する報告の多い CD44v5、CD44v6、CD44v7-8、CD44v9 を対象として免疫染色を行い、健常上皮、異型上皮、過形成上皮に相当する視野を観察した。健常上皮における各 CD44 バリエントの発現・局在をみると、基底層・傍基底層および有棘層の上皮細胞間隙に陽性反応がみられ、いずれも基底層側で最も発現強度が強く、有棘層にかけて次第に減弱する傾向にあった。角化層ではいずれのバリエントも陰性であった。CD44v6、CD44v9 の発現強度は、CD44v5、CD44v7-8 と比べると強い傾向があり、分子の発現量の違いと解釈できるが、CD44v7-8 の染色所見では、扁平層部付近で顆粒状の非特異的反応もみられることから抗体の特異性や抗原親和性の違いによる影響も想定された。

異型上皮における CD44 バリエントは、角化層を除く基底層～有棘層の細胞間隙に陽性反応が認められた。基底層での発現は、健常上皮と比較すると強くないが、有棘層では発現が増強している傾向を示した。異型上皮では、構成する細胞の大小不同が目立ち、異型細胞間で発現の強弱もみられた。過形成上皮における各 CD44 バリエントは、基底層から有棘層までの細胞間隙に陽性反応が認められ、基底層から有棘層上層にかけて強い発現を保ったまま減弱しない傾向を示した。

上皮層における各 CD44 バリエントの発現分布は微小な差異に留まることから、3D surface plot 解析 (ImageJ/Fiji) したところ、健常上皮では、基底層で最もシグナル強度が強く、傍基底層では速やかに減弱し、有棘層から表層にかけて減弱が進んでいることが読み取れた。これに対し異型上皮では、基底層でのシグナル強度は健常上皮の基底層よりも弱いことがわかった。さらに異型上皮では、基底層でのシグナル強度が傍基底層にかけてやや亢進し、有棘層中層付近まで高い発現レベルを保っていることがわかった。過形成上皮の解析では、基底層で健常上皮同様の強い発現を呈し、傍基底層でやや減じる傾向を示した。ただし、過形成上皮の有棘層では、中層・表層へ至る過程でもシグナル強度が維持されている点が健常上皮と大きく異なっていた。これらの解析結果は、免疫染色像の観察で得られた組織所見と概ね一致しており、バリエントの種類に関わらず舌粘膜上皮での CD44 発現に共通する傾向と考えられた。

(2) 舌表在性病変における癌幹細胞マーカー Bmi-1 の発現

Bmi-1 (B cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site 1) は、主に核に局在する転写因子であり、組織幹細胞において発生・分化の調節に関与するポリコム複合体の必須構成要素である。先行研究により、癌幹細胞の活性化に伴って Bmi-1 の発現が亢進し、腫瘍の分化・増殖を促進させることが明らかにされた。増殖活性の高い癌病巣に Bmi-1 陽性細胞が多いことや、Bmi-1 タンパク発現を低下させることで化学療法や放射線療法の感受性を高めるという事実から、癌幹細胞の指標とされるようになった。口腔粘膜の解析では、上皮内癌症例や上皮性異形成症例における Bmi-1 発現の亢進が確認されている。

先に実施した CD44v5、CD44v6、CD44v7-8、CD44v9 バリエント免疫染色と連続する切片を用いて Bmi-1 免疫染色を行い、CD44 バリエント解析と同部位を観察・解析に供した。健常上皮では、基底層の一部に強い Bmi-1 陽性核が点在していた。上皮層全体では、やや弱い陽性反応を示す核もみられた。上皮結合組織中の線維芽細胞では比較的強い反応の陽性核が認められた。

異型上皮での Bmi-1 の発現は、基底層に強い陽性反応を示す核が多いほか、傍基底層から有棘層の中層にかけて陽性核が認められた。特に腫大して形状の不整な異型核はほぼ Bmi-1 陽性であった。一方、過形成上皮では、健常上皮と同様に基底層・傍基底層付近で陽性核を認めるが、有棘層における陽性核の出現は稀であった。

尚、切除断端の上皮を健常相当として評価してはいるが、異型変化を生じる前段階での Bmi-1 発現亢進を示唆する所見も得られ、Bmi-1 の発現は、ごく初期の表在性病変における異型変化の判定に有用と考えられた。同時に、炎症の介在によって Bmi-1 発現が変動することも判明し、他部位と比べて歯・義歯等との直接接触などの機械的刺激を蒙りやすい舌側縁部の観察では注意を要することも理解できた。

Bmi-1 と CD44 はいずれも癌幹細胞マーカーとして用いられるが、異型上皮における両者の関連性は明らかでない。そこで、異型上皮で高発現を示す CD44 (v6 と v9) と Bmi-1 の局在を画像

解析したところ、Bmi-1 陽性核は基底層から有棘層にかけて散在しており、CD44v6、CD44v9 の発現領域と概ね重なった。一方、炎症を伴った部位では、Bmi-1 陽性上皮細胞が密に集簇する様子が捉えられた。リンパ球を主とした炎症細胞も Bmi-1 を発現しているが、炎症細胞以外に、炎症部位直上で Bmi-1 陽性の上皮細胞が目立っており、炎症刺激により上皮細胞の Bmi-1 発現が亢進している可能性が考えられた。

(3) 健常～異形成粘膜組織における免疫担当細胞の分布局在

上皮細胞に異型形質をもたらす種々の刺激は、近傍の他の細胞種にも伝達する。口腔粘膜上皮層には、皮膚と同様に抗原提示に働く Langerhans 細胞、上皮下結合組織には樹状細胞といった免疫担当細胞が局在している。この点に着目すると、舌粘膜で繰り返される組織損傷・修復応答によって、粘膜に在住する免疫担当細胞や血管・リンパ管を含む間質環境にも変化が生じている可能性がある。

そこで、口腔粘膜の免疫応答に関して、HLA-DR 陽性を示す抗原提示細胞の局在を検索したところ、HLA-DR 陽性細胞は上皮層内および上皮下結合組織に点在していた。健常粘膜と異形成病変の上皮層に注目して形態計測すると、HLA-DR 陽性細胞数は上皮層の厚さに応じて増加傾向を示すこと、また、同程度の上皮層厚さの場合、異型上皮ほど HLA-DR 陽性細胞が多い傾向にあることを突き止めた。上皮層内に局在する Langerhans 細胞については、特異的マーカーである CD207 の免疫染色によって同等の結果を得ることができた。ただし、その差異は微小であったため、さらに詳細に解析するため、連続薄切切片の CD207 免疫染色と画像処理により組織立体構築を行って観察した結果、上皮組織環境では異型上皮と健常上皮の境界部で CD207 陽性 Langerhans 細胞の密度が高まる傾向にあることを明らかにできた。以上の観察結果から、粘膜上皮の異型変化過程で粘膜在住の間質細胞局在のバランスが崩壊し、異常な間質素地が生じていることが推察された。

(4) 健常～異形成粘膜組織における脈管構造の変化

初期の消化器粘膜病変では、上皮下の微小血管網 (IPCL) が健常と異なった複雑な形状を呈することが知られている。初期病変における血管間質の変化は、異型上皮が発するシグナルに間質が反応した結果と捉えられてきた。特に近年の報告では、リンパ節に存在する高内皮細静脈 (HEV) に類似した形質を示す脈管が口腔癌の間質に出現することが明らかとなり注目されている。そこで、HEV 様の脈管表現型について、6-sulfo sialyl Lewis X 糖鎖抗原の特異抗体 (MECA-79) により陽性局在を確かめたところ、炎症細胞の集簇する部位に HEV 様血管の出現を認めたと、上皮異型度との関連は見出せなかった。組織形態変化の乏しいごく初期の粘膜表在性病変であるため、明確な間質表現型の差異が生じていないものと推察された。

(5) 総括

本研究では、初期の舌表在性病変を対象として、上皮細胞の異型形質獲得に伴う周囲間質環境の変化について解析した。組織マーカー解析の結果、健常上皮 異型上皮の環境変化に対し免疫担当細胞を含む間質要素が応答・変化している異型間質フィールドの証左を得ることができた。病理診断の分野では、早期悪性病変について様々な表現型マーカーの検証が進められてきたが、未だ普遍性・再現性のある判定基準が得られていない実情にある。今回の解析では、当初計画していた粘膜炎の経過と異型間質環境の関連性を検証するには至らなかったが、微弱な形質変化 (CD44、Bmi-1 発現変動) を指標とした上皮環境の選別と比較によって、軽微ではあるが、非上皮成分である抗原提示細胞局在の変化を捉えることができた。今後の展望として、組織損傷・炎症の程度や修復過程に応じた間質環境プロファイルのさらなるパターン分けが必要と考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Henmi Takuo, Machida Tomomasa, Takeda Munenori, Kitazume Eri, Inomata Toru, Ishigaki Yoshiki, Shoji Hirobumi, Soeno Yuuichi, Izumo Toshiyuki, Yagishita Hisao	4. 巻 32
2. 論文標題 Clinicopathological study of pT1/T2 tongue squamous cell carcinoma: Correlation between its invasive pattern and prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society of Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5843/jsot.32.63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wu Y-H, Taya Y, Kuraji R, Ito H, Soeno Y, Numabe Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Dynamic microstructural changes in alveolar bone in ligature induced experimental periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-019-00471-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 猪俣 徹, 田中淳平, 里見貴史, 辺見卓男, 出雲俊之, 柳下寿郎
2. 発表標題 Stage ・ 口腔扁平上皮癌症例における予防的頸部郭清術の選択基準は？
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳下寿郎, 辺見卓男, 猪俣 徹, 田中淳平, 出雲俊之
2. 発表標題 その口腔上皮性異形成は本当に癌化する？
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳下寿郎, 辺見卓男, 出雲俊之
2. 発表標題 口腔上皮性異形成
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 埴 太宥, 田谷雄二, 堀江哲郎, 佐々木康成, 川本沙也華, 工藤朝雄, 佐藤かおり, 添野雄一
2. 発表標題 マウス舌下神経軸索の伸長誘導に関わる遺伝子群の網羅的解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤朝雄, 埴 太宥, 川本沙也華, 佐藤かおり, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 低接着性培養による口腔癌スフェロイド形成と3次元形態・免疫表現型の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y
2. 発表標題 Craniofacial lymphatic vessels are formed by endothelial cells migrated from truncal cardinal veins
3. 学会等名 Society for Developmental Biology 78th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤朝雄, 相原尚之, 大町哲夫, 上家潤一, 添野雄一
2. 発表標題 イヌ・ネコの舌扁平上皮癌における癌周囲粘膜の組織学的解析
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤かおり, 工藤朝雄, 田谷雄二, 添野雄一
2. 発表標題 舌粘膜病変における異型上皮形質の比較病理学的解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 廣原つかさ, 田谷雄二, 佐藤かおり, 島津徳人, 添野雄一
2. 発表標題 舌表在性病変における上皮細胞形質の解析
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本歯科大学病理学講座HP
<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

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	辺見 卓男 (HENMI Takuo) (20814883)	日本歯科大学・生命歯学部・助教 (32667)	
研究分担者	田谷 雄二 (TAYA Yuji) (30197587)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	柳下 寿郎 (YAGISHITA Hisao) (50256989)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	
研究分担者	佐藤 かおり (SATO Kaori) (90287772)	日本歯科大学・生命歯学部・講師 (32667)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関