

平成 21 年 1 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：平成 20 年度～平成 21 年度

課題番号：20791372

研究課題名 (和文)

口腔粘膜癌におけるケラチン発現プロファイルを制御する分子機構

研究課題名 (英文)

The molecular mechanism controlling expression profile of keratin molecules in oral mucosal malignancies

研究代表者：小林 孝憲

研究者番号：00464016

## 研究成果の概要 (和文)：

口腔粘膜の異型上皮・上皮内癌を病理組織学的に区別するのは困難である。そこで口腔粘膜上皮細胞の分化レベルと増殖中心を確定すれば、それからの変位状況を判定して、適確な診断が可能であるという仮説をたてた。これを証明するために、ケラチン K 分子種ならびに Ki-67 抗原の発現状況を免疫組織学的に検討したところ、K19 および K13 がそれぞれ基底細胞、棘細胞マーカーとして有用で、口腔粘膜上皮の増殖中心が傍基底細胞層に存在することが判明した。異型上皮では Ki-67 陽性(+)細胞が基底第一層へ降下かつ重層化し、CK19+の消失と CK13+の表層限局化が生じて二層性異型上皮の基本構成が確定された。上皮内癌は、基底細胞型・疣贅型・萎縮型・乳頭型の三型に分類でき、上皮内癌とは角化と基底細胞への二方向性分化が開始した状態と解釈された。棘細胞型では、Ki-67+細胞が基底第一層に配置する<増殖帯の辺縁化>現象と、K19-K13 が消失して相反的に CK17+が出現する<細胞骨格のスイッチング>現象は悪性転化の特徴的指標とみなされた。

上記診断基準にしたがって、過去 31 年間の口腔癌 88 症例 172 病変について術後再発の経緯を詳細に検索し、再発の有無と切除断端の露出病変との関連を調査した。再発例の切除断端にはいずれかの上皮内癌が 6 割に残存していることが判明し、上記の診断基準が有効であることが確定された。ついで、過正角化型異型上皮をとまなうものが多発例で 5 割以上、再発例で約 3 割に達したので、同異型上皮を免疫組織化学的に検索した結果、過正角化型異型上皮は悪性とは判定できないものの、悪性転化の背景病変としては重要で、同異型上皮の有無が予後判定因子として有効であることが示唆された。

## 研究成果の概要 (英文)：

It is still difficult to distinguish epithelial dysplasia and carcinoma in situ (CIS) of oral mucosa histopathologically. To make reproducible diagnoses for CIS, combined immunohistochemistry directed at the positioning of squamous cell proliferation (Ki-67) and differentiation (keratin (K) 13 and K19) was used, both of which support histological evaluations by providing biological evidence. Normal/hyperplastic epithelia was defined by K19+ cells only in the first basal layer, K13+ cells in the third basal and upper layers, and sporadic Ki-67+ cells in the second basal layer. These profiles indicated that a proliferating center of the oral epithelium is located in the parabasal cell layer, and K19 and K13 can be regarded as markers for basal and prickle cells, respectively. Epithelial dysplasia was characterized by irregular stratification of Ki-67+ cells and the absence of K19/K13 in proliferating cells. Irregular emerging of K19+ and K13+ cells in proliferating foci with unique stratification of atypical Ki-67+ cells indicated CIS. When the definition was applied, surgical margins in 172 recurrent cases were shown to contain CIS and squamous cell carcinoma, indicating that the new diagnostic criteria for CIS reflected clinical behaviors of the cases. The results indicate that oral CIS contain more histological variations, especially those with definite keratinization, than what had been previously defined. Moreover, the mucosal lesions with the orthohyperkeratotic dysplasia (OKD) reached about 30 % in recurrence, and more than 50% in multiple cases, respectively. This result indicated that OKD was significant for a background lesion of the malignant transformation, and the presence of the OKD was effective as a prognostication factor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：実験腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌のなかで広範囲に多発・再発する表在性粘膜癌症例の増加傾向が注目されている。これらの症例は、高齢女性に多く、飲酒・喫煙歴が少ないなど、古典的浸潤癌とは臨床的特徴も異なる。病理組織学的には、微小浸潤癌をともなう場合もあるが基本的には周囲を異型上皮で取り囲まれた上皮内癌主体の表在性癌複合病変である。この表在性口腔粘膜癌の病理組織学的診断には、過形成上皮・異型上皮・上皮内癌・微小浸潤癌のいわゆる悪性境界病変の各病態を精確に鑑別する必要がある。しかし、現実にはヘマトキシリン・エオジン染色のみでの判定は主観的にならざるをえず、病理診断医ごとの診断結果にはばらつきが生じて外科的対応に反映するため、医療施設間の治療成績にも差異が生じる。そこで、異型上皮なり上皮内癌がどの病理診断医によっても安定した診断結果がえられるように、診断基準に共通の科学的根拠が求められている。申請者はこれまでに、高精度で客観的な病理組織診断を実践することを目標に、その基準となるべき組織所見判定の生物学的根拠として、扁平上皮機能性分子の免疫組織化学等の補助手段が機能するかどうかを検討してきた。すなわち、細胞分化マーカーおよび細胞増殖マーカーを用いた免疫組織化学による検索結果から、異型上皮と上皮内癌・浸潤癌の判別が可能であること、さらに上皮内癌を基底細胞型・棘細胞型・疣贅型の三型に判別認識することによって上皮内癌そのものの診断精度が向上することをみだした(業績12・業績14)。その経過で、異型上皮から上皮内癌へ悪性転化する際に、ケラチン13(CK13)陽性が消失し、相反的にケラチン17(CK17)が出現することを発見した(図1)。この現象の認知は境界病変の判定と病変範囲決定に非常に有用であり、日常的にも病理検査業務に大いに活用されている。

しかし、<CK13消失・CK17出現現象>を制御している分子機構は、遺伝子の転写から蛋白質の生合成・修飾機構までほとんど不明である。そこで申請者は口腔粘膜上皮内癌におけるCK13消失・CK17出現現象に着目し、これを上皮内癌の病理診断の国際的基準のひとつとするために、すなわち科学的根拠に基づいた診断基準を確立するために、本研究課題を計画した。申請者の仮説は、「口腔粘膜上皮の癌化過程でCK13およびCK17の遺伝子転写から蛋白質生合成・修飾までのプロセスを障害される機構があり、ケラチン分子発現プロファイルの解析により癌化メカニズムが解明できるのではないか」というものである。

2. 研究の目的

口腔癌の病理診断を客観的な科学的根拠に基づいたものにするため、まず上皮内癌におけるケラチン分子発現プロファイルを制御している分子機構を理解することを目標とし、口腔粘膜上皮細胞分化過程におけるケラチン分子の遺伝子転写から蛋白質生合成・修飾過程までを解析する。最終的には、ケラチン分子プロファイルを決定する転写機構をふまえ、免疫組織化学的検索から得られた上皮内癌に特徴的なケラチン分子発現パターンを利用して、日常の病理検査業務に応用還元することをめざす。

3. 研究の方法

まず組織学的に口腔粘膜異型上皮・上皮内癌・浸潤癌の領域を検討し、各病変のCK13およびCK17分子の分布状況を免疫組織学的に検索する。また、in situ ハイブリダイゼーション法ではCK13 mRNA・CK17 mRNA発現状況を各病変間で比較し、免疫組織化学の結果とあわせて悪性境界病変のケラチン分子プロファイルを確定する。これらにくわえて、口腔粘膜癌由来細胞株を樹立し、培養細胞

胞からケラチン分子蛋白質・RNA および DNA を抽出する。ケラチン分子蛋白質については免疫沈降により蛋白分解ないしリン酸化状況を検索し、RNA についてはリアルタイム RT-PCR をおこなってケラチン分子および上皮細胞分化関連因子について遺伝子発現レベルを検索する。同時に、CK13・CK17 遺伝子の転写因子についても発現をスクリーニングする。さらにレーザーマイクロダイセクション(LMD)法をもちいて上皮内癌領域の上皮組織を採取し、培養細胞と同様に、蛋白質・遺伝子について解析する。また培養細胞および LMD の両者からえた DNA に関して、メチル化特異的 PCR (MSP)法によりケラチン分子遺伝子のプロモータ領域におけるメチル化の解析をおこなう。最終的には、ケラチン分子プロファイルを決する転写機構をふまえ、癌化過程に特徴的なケラチン分子発現パターンを利用し、日常の病理検査業務に応用する。

#### 4. 研究成果

口腔粘膜扁平上皮癌・上皮内癌のヒト外科材料の HE 染色切片にて病理組織学的に検討し、正常上皮・異型上皮・上皮内癌・浸潤癌を区別し、さらに異型上皮を二層性異型上皮・過正角化型異型上皮・その他の異型上皮に、上皮内癌を基底細胞型・疣贅型・長脚棘細胞型・箱型棘細胞型・萎縮型・乳頭型に分類した。正常口腔粘膜上皮のケラチンプロファイルと増殖中心を確定するために、細胞分化マーカーとしてケラチン分子種ならびに増殖細胞マーカーとして Ki-67 抗原の発現状況を免疫組織学的に検討した。その結果、CK19 および CK13 がそれぞれ基底細胞、棘細胞マーカーとして有用であること、ならびに口腔粘膜上皮の増殖中心が傍基底細胞層に存在することが判明した。正常上皮での発現様式をもとに境界病変を客観的に判定すると、異型上皮では Ki-67 陽性(+)細胞が基底第一層へ降下かつ重層化し、CK19+ の消失と CK13+ の表層限局化が生じて細胞増殖を特徴とする二層性異型上皮の基本構成が確定された。浸潤癌と上皮内癌の基底細胞型・疣贅型・萎縮型・乳頭型で CK19+ と CK13+ の特徴的組み合わせが出現しており、角化と基底細胞への二方向性分化、すなわち増殖細胞に扁平上皮分化が開始した状態と解釈された。棘細胞型では、Ki-67+ 細胞が基底第一層に配置する増殖帯の辺縁化現象と、CK19+/CK13+ が消失して相反的に CK17+ が出現する細胞骨格のスイッチング現象が特徴的で、悪性転化の指標とみなされた。

上記診断基準にしたがって、過去 31 年間の口腔癌 88 症例 172 病変について術後再発の経緯を詳細に検索し、再発の有無と切除

断端の露出病変との関連を調査した。再発例の切除断端にはいずれかの上皮内癌が 6 割に残存していることが判明し、上記の診断基準が有効であることが確定された。ついで、過正角化型異型上皮をとともうものが多発例で 5 割以上、再発例で約 3 割に達したので、同異型上皮を免疫組織化学的に検索した結果、過正角化型異型上皮は悪性とは判定できないものの、悪性転化の背景病変としては重要で、同異型上皮の有無が予後判定因子として有効であることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Kobayashi T, Maruyama S, Cheng J, Ida-Yonemochi H, Yagi M, Takagi R, Saku T. Histopathological varieties of oral carcinoma in situ: Diagnosis aided by immunohistochemistry dealing with the second basal cell layer as the proliferating center of oral mucosal epithelia. *Pathology International* (査読有), 60:156-166, 2010
- ② Abe M, Maruyama S, Yamazaki M, Kobayashi T, Al-Eryani K, Shahidul AM, Tsuneki M, Syafriadi M, Saku T, Cheng J. The absence of significant mutational events of the p53 gene in the only two salivary gland tumors possessing radiation-related development risks, Mucoepidermoid carcinoma and Warthin tumor. *Oral Medicine & Pathology* (査読有), 13:151-158, 2009
- ③ Al-Eryani K, Sawair FA, Maruyama S, Watanabe M, Kawahara R, Yokobayashi T, Kobayashi T, Kundu S, Syafriadi M, Cheng J, Saku T. Nerve sheath myxoma of the tongue: report of a case and review of the literature. *Oral Medicine & Pathology* (査読有), 13:105-110, 2009
- ④ Hirano C, Nagata M, Noman AA, Kitamura N, Ohnishi M, Ohyama T, Kobayashi T, Suzuki K, Yoshizawa M, Izumi N, Fujita H, Takagi R. Tetraspanin gene expression levels as potential biomarkers for malignancy of gingival squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer* (査読有), 124(12):2911-2916, 2009
- ⑤ Tilakaratne WM, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, Swelam W, Yamazaki M, Mikami T, Alvarado CG, Shahidul AM, Maruyama S, Cheng J, Saku T. Matrix

meralloproteinase 7 and perlecan in oral epithelial dysplasia and carcinoma *in situ*: an aid for histopathologic recognition of their cell proliferation centers. Journal of Oral pathology & Medicine (査読有), 38:348-355, 2009

- ⑥ 小山 貴寛、飯田明彦、児玉泰光、小林孝憲、福田純一、高木律男. 顎骨骨折患者の長期臨床統計—過去 32 年間について—. 新潟歯学会雑誌 (査読有), 39:49-54, 2009
- ⑦ Kurokawa A, Nagata M, Kitamura N, Noman AA, Ohnishi M, Ohyama T, Kobayashi T, Shingaki S, Takagi R. Diagnostic value of ITGA3, ITGB4 and ITGB5 expression levels for the clinical outcome of tongue squamous cell carcinoma. Cancer. (査読有), 112:282-285, 2008
- ⑧ Tsuneki M, Cheng J, Yamazaki M, Maruyama S, Kobayashi T, Ida-Yonemochi H, Suzuki M, Saku T. Lateral periodontal cyst: a clinicopathological study of 23 cases and an immunohistochemical analysis of its characteristic epithelial plaque in the lining. Oral Medicine & Pathology (査読有), 12(3):89-96, 2008

[学会発表] (計 5 件)

- ① 小林孝憲: 下顎腫瘍. 第 20 回日本臨床口腔病理学会、2009 年 7 月 29 日-31 日、札幌市
- ② 小林 孝憲: 口唇腫瘍. 第 68 回日本病理学会東北支部学術集会、2009 年 2 月 14-15 日、仙台市
- ③ 小林 孝憲: 正角化型異型上皮: 新しい診断概念の確立とその意義. 第 19 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会、2008 年 8 月 20 日-22 日、東京
- ④ Kobayashi T: Central carcinoma associated with odontogenic cysts. The 14th International Congress of Oral Pathology and Medicine、2008 年 6 月 21 日-26 日、San Francisco
- ⑤ 小林 孝憲: 口腔粘膜扁平上皮癌・上皮内癌の再発に関する臨床病理学的検討. 第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15 日-17 日、金沢市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 孝憲 (Takanori Kobayashi)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号: 00464016

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし