

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462857

研究課題名(和文)細胞性免疫反応を用いた口腔粘膜上皮性異形成からの発癌過程の解明

研究課題名(英文)Analysis of immune responses in oral epithelial dysplasia

研究代表者

近津 大地(Chikazu, Daichi)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：30343122

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：舌の上皮性異形成の症例を用いて検討を行った。症例を高度異形成・軽度異形成の二群に分類し、細胞傷害性T細胞などの免疫担当細胞の免疫染色を行った。上皮内および上皮下結合組織へのリンパ球浸潤数と臨床経過との関連について検討した。また、異形成病変と良性炎症性病変の比較目的に、口腔扁平苔癬症例でも検討を行った。

軽度異形成では、高度異形成よりも、上皮内へのリンパ球浸潤(CD8, CD4陽性細胞)が多い傾向がみられた。経過観察中に、軽度異形成から高度異形成へ変化した症例においても、上皮内へのリンパ球浸潤数が減少する傾向がみられた。口腔扁平苔癬との比較では、上皮内へのリンパ球浸潤数に有意差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study among patients with epithelial dysplasia of the tongue. The subjects were divided into two groups: high grade group and low grade group, with both undergoing immunostaining of any immunocompetent cells, such as cytotoxic T cells. We examined the relationship between the number of lymphocytes infiltrating the intraepithelial and subepithelial connective tissues and the clinical course. The study also included subjects with oral lichen planus (OLP) in order to compare dysplasia lesions and benign inflammatory lesions.

The number of lymphocytes intraepithelially infiltrating (CD8, CD4 cells) tended to be larger in the patients with low grade compared to those with high grade. Among those who were found to have changed from low grade to high grade at the follow-up, there was a decreasing tendency in the number of lymphocytes intraepithelially infiltrating. There was no significant difference from OLP in terms of the number of lymphocytes intraepithelially infiltrating.

研究分野：口腔外科

キーワード：上皮性異形成 口腔扁平苔癬

1. 研究開始当初の背景

白板症や紅板症は口腔内扁平上皮癌の前駆病変とされる。発癌に際して、これらの病変では上皮異形成から上皮内癌、浸潤性の扁平上皮癌に進行することが明らかにされている。しかし、上皮性異形成を判断する WHO の基準は、13 項目の因子を挙げ、それらの変化が著明で項目数が多いほど異形成の程度は高度となるとしており、客観的な診断基準が明確になってはいない。そのため、前癌病変の診断について、意見が割れており治療方針の策定に苦慮することが多い。そして、実際の臨床診療のなかでも、同程度の上皮性異形成であっても、経過観察中に癌化する症例、上皮性異形成が継続する症例などさまざまな経過がみられ、上皮性異形成からの発癌過程に何らかの細胞性免疫反応があるのではないかと考えられる。進行した扁平上皮癌や他の癌腫において、細胞性免疫反応の多寡が生命予後や再発率と関連していることがすでに示されており(1-4)、腫瘍細胞が発現する腫瘍精巢抗原(5,6)を標的とする臨床試験や治験も進行中である。口腔の扁平上皮癌においても間質反応(リンパ球浸潤の程度)は、症例により様々で、再発・予後との関連が示唆されている。しかしながら、異形成病変から上皮内癌に移行する、発癌早期の過程での細胞性免疫反応は十分に解析されているとはいえない。また、診断基準は主として形態学的な変化に基づいており、診断者の経験に頼るところが多い。そのため、科学的に客観的な診断基準の確立が求められている。

[参考文献]

- 1) R. D. Schreiber, L. J. Old, M. J. Smyth: Cancer immunoeediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25; 331: 1565-1570.
- 2) K. Schumacher, W. Haensch, C. Roefzaad, P. M. Schlag: Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*. 2001 May 15; 61: 3932-3936.
- 3) Y. Naito, K. Saito, K. Shiiba, A. Ohuchi, K. Saigenji, H. Nagura, H. Ohtani: CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998 Aug 15; 58: 3491-3494.
- 4) E. Sato, S. H. Olson, J. Ahn, B. Bundy, H. Nishikawa, F. Qian, A. A. Jungbluth, D. Frosina, S. Gnjatic, C. Ambrosone, J. Kepner, T. Odunsi, G. Ritter, S. Lele, Y. T. Chen, H. Ohtani, L. J. Old, K. Odunsi: Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Dec 20; 102: 18538-18543.
- 5) M. J. Scanlan, A. O. Gure, A. A. Jungbluth, L. J. Old, Y. T. Chen: Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev*. 2002 Oct; 188: 22-32.
- 6) O. L. Caballero, Y. T. Chen: Cancer/testis (CT) antigens: potential targets for immunotherapy. *Cancer Sci*. 2009 Nov; 100: 2014-2021.

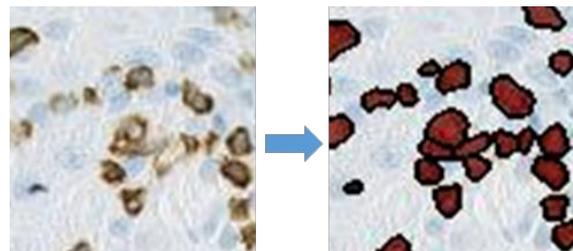
2. 研究の目的

口腔粘膜の上皮性異形成病変における免疫反応を解析し、局所の細胞性免疫反応の相違を明らかにし、細胞性免疫反応の相違から、診断や経過予測について、免疫組織化学的に解析することを目的として研究を行う。

3. 研究の方法

2005 年以降に東京医科大学病院歯科口腔外科・矯正歯科にて臨床的に採取され、上皮性異形成・扁平上皮癌・扁平苔癬の診断を得た生検および切除検体を研究対象とする。保存されている口腔粘膜の上皮性異形成・扁平上皮癌・扁平苔癬のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を用いて、細胞傷害性 T 細胞・制御性 T 細胞などの免疫担当細胞の染色を行い、上皮内および上皮下結合組織、腫瘍胞巣へのリンパ球浸潤数と臨床経過(経過観察中の癌化や上皮性異形成病変の状態など)との関連について検討する。まず、異形成病変と良性炎症性病変との比較目的に、扁平苔癬症例で検討を行う。次に上皮異形成の低異型度・高異型度、扁平上皮癌の順に検討を行う。

上皮内および上皮下結合組織・腫瘍胞巣へのリンパ球浸潤数を計測する方法は、染色標本を高速・高解像度バーチャルスライドスキャナ(NanoZoomer: 浜松 ホトニクス社製)を用いて、高解像度画像を取得。その画像をデジタル病理イメージング解析システム(Tissue Studio Ver.3.5: Definiens 社製)を用いて、リンパ球浸潤数を計測する。リンパ球浸潤数と臨床経過との関連について検討する。



(Tissue Studio Ver.3.5 を用いて、陽性細胞数を計測)

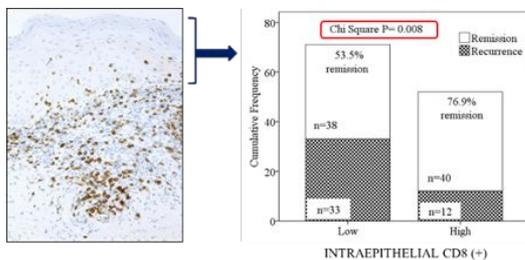
4. 研究成果

平成 28 年度に当院医学倫理委員会の承認を得て研究を行った(承認 NO. 3350, 3434)。東京医科大学病院歯科口腔外科・矯正歯科にて臨床的に採取され、上皮性異形成・扁平上皮癌・扁平苔癬の診断のついた症例を収集した。本研究では、上皮内・上皮下におけるリンパ球浸潤を評価するものであることから、歯肉炎や歯周炎などの炎症を合併している可能性が高いと考えられる歯肉の症例は除外とした。

まず、腫瘍性病変を炎症性疾患と区別するために、炎症性疾患である口腔扁平苔癬について、リンパ球浸潤数と臨床経過の検討を行った。対象は、診断後に最低 3 か月以上経過

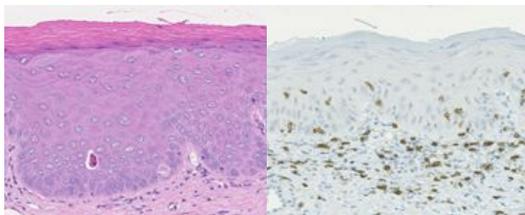
観察を行った症例で、経過観察中に悪性化した症例は除外とした。臨床経過は、初回治療によって症状が改善した症例を軽快群、治療軽快後も症状を繰り返す症例を遷延群と分類した。結果は、上皮内へのCD8陽性リンパ球が多い群で、有意に軽快している結果となった。また、上皮内へのCD8陽性リンパ球が高度かつCD4陽性リンパ球が高度の場合、上皮内へのCD8陽性リンパ球が高度かつT-bet / Foxp3比が高い症例で、有意に軽快していた。それらの結果から、扁平苔癬において、上皮内へのCD8陽性リンパ球の浸潤は、臨床経過を予測する因子であることが考えられた(Ai Enomoto, Eiichi Sato, Takashi Yasuda, Tatsuya Isomura, Toshitaka Nagao, Daichi Chikazu. Intraepithelial CD8+ lymphocytes as a predictive diagnostic biomarker for the remission of oral lichen planus. Hum Pathol. 2018 Apr;74:43-53.)

< 口腔扁平苔癬 CD8 >

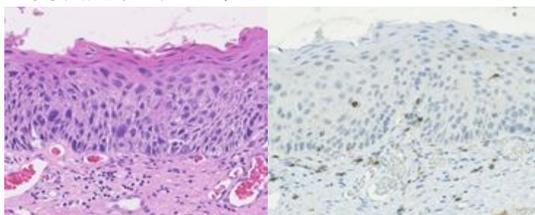


次に、舌粘膜における異形成（軽度異形成および高度異形成）について検討を行った。軽度異形成では、高度異形成よりも、上皮内へのリンパ球浸潤（CD8, CD4陽性細胞）が多い傾向がみられた。また、経過観察中に、軽度異形成から高度異形成へ変化した症例においても、上皮内へのリンパ球浸潤数が減少する傾向がみられた。口腔扁平苔癬との比較では、上皮内へのリンパ球浸潤数に有意差はみられなかった。

< 軽度異形成 HE、CD8 >



< 高度異形成 HE、CD8 >



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 19件)

1. Ai Enomoto, Eiichi Sato, Takashi Yasuda, Tatsuya Isomura, Toshitaka Nagao, Daichi Chikazu. Intraepithelial CD8+ lymphocytes as a predictive diagnostic biomarker for the remission of oral lichen planus. Hum Pathol. 2018 Apr;74:43-53. (査読有)
2. Naoki Ikehata, Masakatsu Takanashi, Takafumi Satomi, Masato Watanabe, On Hasegawa, Michihide Kono, Ai Enomoto, Daichi Chikazu, Masahiko Kuroda. Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Jan 15;495(3):2227-2234. (査読有)
3. Shigeki Miyamoto, Takashi Ogawa, Daichi Chikazu. Sialadenoma papilliferum in the buccal mucosa detected on 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. Br J Oral Maxillofac Surg. 2017 Sep;55(7):727-729. (査読有)
4. Harutsugi Abukawa, Takashi Ogawa, Michihide Kono, Toshiyuki Koizumi, Yoko Kawase-Koga, Daichi Chikazu. Intravenous dexamethasone administration before orthognathic surgery reduces the postoperative edema of the masseter muscle: a randomized controlled trial. J Oral Maxillofac Surg. 2017 Jun;75(6):1257-1262. (査読有)
5. Harutsugi Abukawa, Michihide Kono, Hayato Hamada, Ayako Okamoto, Takafumi Satomi, Daichi Chikazu. Indications of potassium titanyl phosphate laser therapy for slow-flow vascular malformations in oral region. J Craniofac Surg. 2017 May;28(3):771-774. (査読有)
6. Michihide Kono, Takafumi Satami, Harutsugi Abukawa, On Hasegawa, Masato Watanabe, Daichi Chikazu. Evaluation of OK-432 Injection Therapy as Possible Primary Treatment of Intraoral Ranula. J Oral Maxillofac Surg. 2017 Feb;75(2):336-342. (査読有)
7. Takafumi Satami, Michihide Kohno, On Hasegawa, Ai Enomoto, Harutsugi Abukawa, Daichi Chikazu, Maki Yoshida, Jun Matsubayashi, Toshitaka Nagao. Adenosquamous carcinoma of the tongue:

- clinicopathologic study and review of the literature. *Odontology*. 2017 Jan;105(1):127-135. (査読有)
8. Ayako Okamoto, Hideo Miyachi, Katsutoshi Tanaka, Daichi Chikazu, Hitoshi Miyaoka. Relationship between xerostomia and psychotropic drugs in patients with schizophrenia: evaluation using an oral moisture meter. *J Clin Pharm Ther*. 2016 Dec;41(6):684-688. (査読有)
 9. Takuya Murata, Harutsugi Abukawa, Takafumi Satomi, Daichi Chikazu. Nerve sharing between the lingual and mental nerve to restore lower lip sensation after segmental resection of the mandible. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Sep;74(9):1897.e1-5. (査読有)
 10. Masato Watanabe, Masanori Tada, Takafumi Satami, Daichi Chikazu, Masashi Mizumoto, Hideyuki Sakurai. Metastatic rectal adenocarcinoma in the mandibular gingiva: a case report. *World J Surg Oncol*. 2016 Jul;14(1):199-203. (査読有)
 11. 立花絵理子, 山口洋平, 立花哲也, 山科光正, 近津大地: 下顎歯肉に転移した肺原発多形癌の1例. *日本口腔外科学会雑誌* 2015; 61(9): 458-462. (査読有)
 12. 浜田勇人, 古賀陽子, 虻川東嗣, 河野通秀, 藤川 考, 近津大地: ナンセンス変異による PTCH1 遺伝子を伴った母斑基底細胞症候群の1例. *日本口腔外科学会雑誌* 2015; 61(2): 36-40. (査読有)
 13. Harutsugi Abukawa, Takafumi Satomi, Tetsuzou Tauchi, Jun Matsubayashi, Hiroshi Kusama, Toshitaka Nagao, Yusuke Asada, Michihide Kono, Masato Watanabe, Daichi Chikazu: Management of comorbid advanced stage gingival squamous cell carcinoma and classical Hodgkin lymphoma by a combination of surgery and split ABVD chemotherapy. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology* 2015; 27(2): 245-249. (査読有)
 14. Shigeki Miyamoto, Daichi Chikazu, Takashi Yasuda, Ai Enomoto, T Oh-i, Y Hirako, A Tsuchisaka, A Yasukochi, R Sogame, K Teye, H Koga, N Ishii, H Qian, X Li, T Hashimoto: A case of oral mucous membrane pemphigoid with IgG antibodies to integrin $\alpha 6 \beta 4$. *Br J Dermatol* 2014; 171(6): 1555-1557. (査読有)
 15. Hayato Hamada, Akira Matsuo, Toshiyuki Koizumi, Takafumi Satomi, Daichi Chikazu: A simple evaluation method for early detection of bisphosphonate-related osteonecrosis of the mandible using computed tomography. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42(6): 924-929. (査読有)
 16. Harutsugi Abukawa, Takafumi Satomi, Tetsuzou Tauchi, Jun Matsubayashi, Hiroshi Kusama, Toshitaka Nagao, Yusuke Asada, Michihide Kohno, Masato Watanabe, Daichi Chikazu: Management of comorbid advanced stage gingival squamous cell carcinoma and classical Hodgkin lymphoma by a combination of surgery and split ABVD chemotherapy. *J Oral Maxillofac Surg Med Pathol* 2014: available online 21 April 2014. (査読有)
 17. Takafumi Satomi, Michihide Kohno, Ai Enomoto, Harutsugu Abukawa, Ko Fujikawa, Toshiyuki Koizumi, Daichi Chikazu, Jun Matsubayashi, Toshitaka Nagao: Solitary myofibroma of the mandible: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. *Med Mol Morphol* 2014; 47(3): 176-183. (査読有)
 18. Takafumi Satomi, On Hasegawa, Harutsugu Abukawa, Michihide Kohno, Ai Enomoto, Daichi Chikazu, Jun Matsubayashi, Toshitaka Nagao: Exceptionally large solitary fibrous tumor arising from the cheek: an immunohistochemical and ultrastructural study with a review of the literature. *Med Mol Morphol* 2014; 47(2): 108-116. (査読有)
 19. Akira Matsuo, Hayato Hamada, Hiroshi Kaise, Daichi Chikazu, Kimito Yamada, Norio Kohno: Characteristics of the early stages of intravenous bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw in patients with breast cancer. *Acta Odontologica Scandinavica*, Early Online 2014: 1-8. (査読有)
- [学会発表](計 6件)
1. 池畑直樹、里見貴史、渡辺正人、長谷川温、河野通秀、榎本 愛、近津大地: 口腔内細菌による TLR2 の活性化は口腔癌細胞の増殖及び抗癌剤抵抗性の獲得を誘導する; 第 62 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2017 年 10 月 20-22 日、国立京都国際会館、京都
 2. 池畑直樹、高梨正勝、里見貴史、渡辺正人、長谷川温、河野通秀、榎本 愛、黒田雅彦、近津大地: TLR2 は口腔扁平上皮癌において miR-146a を誘導することで CARD10 遺伝子を制御する; 第 41 回日本頭頸部癌学会、2017 年 6 月 8-9 日、ウェスティン都ホテル京都、京都
 3. 長谷川温、里見貴史、渡辺正人、河野通

秀、池畑直樹、近津大地：18F-FDG- PET/CT 検査と生物学的特性の相関における口腔扁平上皮癌の悪性度と予後を検討する；第 41 回日本頭頸部癌学会、2017 年 6 月 8-9 日、ウェスティン都ホテル京都、京都

4. 千喜良仁、木本 明、榎本 愛、河野通秀、長谷川温、渡辺正人、古賀陽子、里見貴史、近津大地：頬粘膜に発生したメトトレキサート関連リンパ増殖性疾患の 1 例；第 203 回（公社）日本口腔外科学会関東支部学術集会、2017 年 5 月 27 日、東京歯科大学水道橋校舎新館・血脇記念ホール、東京
5. 池畑直樹、高梨正勝、上田しのぶ、里見貴史、渡辺正人、長谷川温、河野通秀、榎本 愛、黒田雅彦、近津大地：Activation of TLR2 regulates CARD10 gene expression by miR-146a-5p in oral squamous carcinoma；第 106 回日本病理学会総会、2017 年 4 月 27-29 日、京王プラザホテル、東京
6. 榎本愛、佐藤永一、長尾俊孝、近津大地：Intraepithelial CD8 lymphocyte infiltration as a predictive biomarker of oral lichen planus. 第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月 12-14 日、仙台国際センター、宮城

〔図書〕(計 4 件)

1. 近津大地：口腔の先天異常と口唇裂・口蓋裂 「今日の治療指針 2017 年度版-私はこう治療している」 医学書院、東京、1519-1520、2017.
2. 近津大地：顎骨骨折 「口の中がわかるビジュアル 歯科口腔科学読本」 監修 全国医学部附属病院歯科口腔外科科長会議、クインテッセンス出版株式会社、東京、112-115、2017.
3. 近津大地：顎関節脱臼 「言語聴覚士のための基礎知識 臨床歯科医学・口腔外科学 第 2 版」 編集 夏目長門、株式会社医学書院、東京、169-172、2016
4. 近津大地：口唇裂・口蓋裂に対する上顎骨延長術 「イラストでみる口腔外科手術」第 4 巻、編集、野間弘康、栗田賢一、木村博人、瀬戸皖一、福田仁一、山根源之、朝波惣一郎。東京、クインテッセンス出版、2015、pp 256-261

〔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

近津 大地 (Chikazu Daichi)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：30343122

(2)研究分担者

里見 貴史 (Satomi Takafumi)
東京医科大学・医学部・臨床准教授
研究者番号：70276921

(3)研究分担者

長尾 俊孝 (Nagao Toshitaka)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：90276709

(4)研究協力者

榎本 愛 (Enomoto Ai)