

平成22年 5月22日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592321
 研究課題名 (和文) ヒト舌癌の浸潤・転移能と病理組織診断：細胞異型と癌胞巣構造の3次元組織形態解析
 研究課題名 (英文) Pathohistological diagnosis of infiltration and metastasis of tongue carcinoma: Three-dimensional analysis of tumor cell atypia and alveolar architecture
 研究代表者
 柳下 寿郎 (YAGISHITA HISAO)
 日本歯科大学・生命歯学部・准教授
 研究者番号：50256989

研究成果の概要 (和文)：

本研究課題では、舌癌の浸潤様式と予後判定に役立つ組織診断指標を明らかにする目的で、連続薄切標本に癌形質マーカの免疫標識を施し、舌癌深達領域における実質・間質要素を分画したうえで組織立体構築を行った。舌癌20症例での3次元構造解析の結果から、癌実質と間質との境界面の形状、癌実質の構成細胞総数とKi-67陽性細胞数（および両者の比率による増殖活性）、間質中に分散する癌胞巣の出現頻度が舌癌の予後判定に重要であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

We initiated histology-based 3D reconstruction of oral squamous cell carcinoma (SCC) arising on the lateral border of the tongue in order to collect quantitative information of diagnostic value regarding cancer invasion and prognosis. The basic procedures for 3D reconstruction are: preparation of serial histological sections in combination with immunostaining of cell/tissue constituents of interest, alignment and superposition of digitized images, and computer-assisted color segmentation of labeled targets. Cytoplasm/nucleus segmentation of individual SCC cells lead to quantitative analysis of histological parameters. The results support the wide potential usage and advantage of histology-based 3D reconstruction in cancer biology understanding and pathological diagnosis. Particularly, 3D histomorphometric parameters regarding tumor alveolar structure and spatial distribution of cancer foci in a microenvironment will be of inexpensive value in prediction and diagnosis of tumor aggressiveness and malignancy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学・病態検査学

キーワード：口腔扁平上皮癌、浸潤先端、病理組織学、免疫組織化学、3次元構築

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜は不断に外来性刺激に曝されており、上皮異形成から癌化の道筋を辿る危険性も高い。舌癌は口腔癌のうちで最も発症頻度が高く、視診による診断が可能であるが、臨床症状による悪性度や予後判別は難しく、確定診断に至った時期には所属リンパ節への転移をきたしている症例も少なくない。そのため、舌癌の早期診断と浸潤範囲の病理確定診断が重要となっている。従来の癌病変の分類・診断・予後判定においては、主に2次元組織画像で捉えられる細胞形態・組織構造と免疫・遺伝子マーカーによる表現型・癌形質の同定を基本としている。ただし、癌の実質・間質における組織要素間のネットワーク総体を捉えるうえでは2次元解析には限界があり、癌表現型と生物学的特質とを関連付けるためには3次元定量解析が求められる。研究代表者は本研究課題の申請時において、画像処理システム（RATOC社 TRI-SRF2）の演算処理機能を組み合わせることにより、組織染色画像から一切のマニュアル操作を排除して複数の組織要素をRGB色調により自動抽出できる画像処理アルゴリズムを開発していた。3年間の交付期間においては、バーチャル・スライドの導入による広領域・高分解能による組織立体構築法を確立するとともに、ヒト舌癌摘出試料を対象とした組織立体構築と3次元形態解析を計画した。

2. 研究の目的

舌癌の病理組織診断では、HE染色と免疫染色に基づき癌病変の広がり範囲と切除断端での癌巣の有無、脈管侵襲の有無を判定する。ただし、2次元組織画像の上では癌巣の広がり範囲や連結性を確認することが難しく、単独あるいは少数の癌細胞で構成される癌巣構造を確定診断あるいは定量評価することは容易ではない。本研究では、日常の病理診断基準となる2次元組織情報と舌扁平上

皮癌の立体構造との橋渡しを目指して、病歴および術後経過に関する情報が揃っている舌癌20症例（原発病巣のパラフィン包埋試料）を対象として、舌癌浸潤様式の分類と予後判定に有用な3次元形態パラメータを明らかにする目的で、舌癌浸潤先端部における増殖・浸潤様式について3次元形態計測を遂行した。

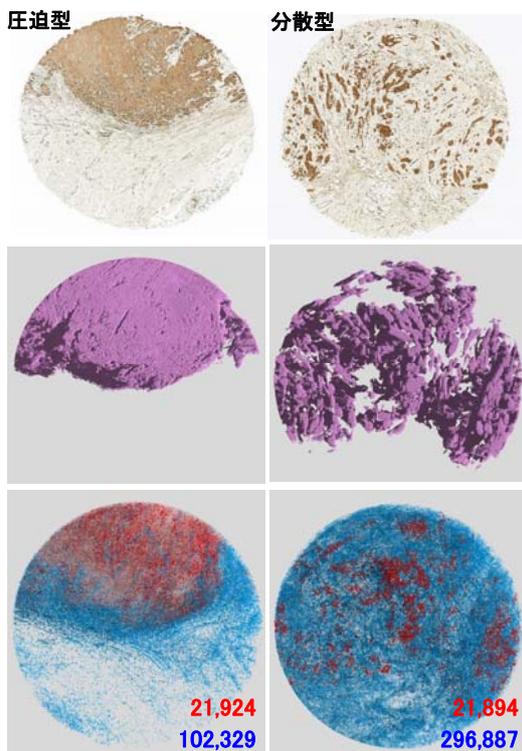
3. 研究の方法

本研究においては、病歴などの情報が揃っている舌癌全摘症例から所属リンパ節への転移を認めていない10症例と所属リンパ節転移をきたした10症例を観察対象とした。各舌癌症例の手術摘出組織試料のパラフィン包埋ブロックより組織アレイ法を用いて最深達部の領域を組織アレイ法で円柱状（3mm直径）に切り出し、舌扁平上皮癌の回転式マイクロトームで連続切片（4μm厚さ、100枚前後）を作製した。癌形質の免疫標識に向けては、上皮マーカーとしてサイトケラチンカクテル（AE1+AE3/34βE12/MNF116）抗体と増殖マーカーとしてKi-67抗体を使用した。サイトケラチン/Ki-67の免疫二重染色（ヘマトキシリン核染）においては、抗体反応はABC法により異なる発色剤（Vector SGとDAB）で識別した。免疫標識画像をバーチャル・スライド装置（浜松ホトニクス NanoZoomer）で対物×20倍の分解能でデジタル記録し、画像処理ソフト（RATOC TRI-SRF2）により実質・間質要素とKi-67陽性核を分画して立体構築した。

4. 研究成果

舌癌最深達部における浸潤様式：舌癌最深達部における浸潤様式として、実質・間質の境界が明瞭で癌巣が大きな集塊を示す症例から、癌巣が板状ないし根棒状の形状を示しながら癌実質が互いに交差しながら増殖する症例、索状の癌実質が互いに連結しながら網目状に増殖し、間質に向けて細い癌巣突起

を伸ばしている症例、小さな島状の癌胞巣が間質内に分散する症例まで、その形態学的な特徴は多彩であった。本研究での実質・間質の境界面の3次元形態学的な特徴に基づき、大きな集塊を形成して間質を圧迫する様に増殖する圧迫型、癌実質内に血管間質が陥凹して太い突起状に伸展している突起型、細い索状の胞巣が網目状に連結している索状型、索状の連結が断たれて間質内に分断された小胞巣が散在している分散型に分類できた。3次元形態計測の結果では、圧迫型の癌胞巣においても細い血管間質が複雑に入り込んでおり、境界面積は他の浸潤様式よりも大きな値を示すことが確かめられた。最深達部の癌胞巣の形状として、実質・間質境界面に注目してみると、癌実質の体積あたりの境界面積比率（比表面積値）は胞巣形状に依存しており、塊状の胞巣形状→索状型→分散型に移行するなかで大きくなる傾向をみとめた。



圧迫型、分散型の立体構築像を例示する。立体観察領域の免疫染色像(上段)、浸潤先端部の癌実質(中断)、Ki-67免疫標識により癌実質での増殖核を赤色、間質領域での増殖核を青色で表示する。実質・間質での増殖核の計測値を示す(下段)。

癌実質・間質での増殖活性：高分解能のバーチャル画像に基づく立体構築空間では、 $10^4/\text{mm}^3$ オーダーの細胞核を分画できる。癌実質における増殖活性の局在については、胞巣全体に分散している場合から間質との境界面に限局して増殖活性を示す場合まで症例間あるいは同一症例においても観察部位によって多様性が顕著であった。間質側でのKi-67陽性核の局在については、癌実質辺縁を囲む領域に限局して高い増殖活性を示す場合と、間質中にび漫性に増殖活性が検出される場合が区別された。癌実質辺縁での増殖活性の一部は脈管内皮細胞、浸潤したリンパ球、および線維芽細胞様の単核細胞集団の増殖を反映していた。

癌胞巣の連結性と間質に分散する孤立胞巣の出現：今回の立体構築には、YK分類で3(境界線は不明瞭で大小の腫瘍胞巣が散在)から4C(索状型：境界線は不明瞭で小さな腫瘍胞巣が索状に浸潤)に分類される舌癌症例を用いたが、病理組織標本上で島状に分散して見える癌胞巣が3次元組織空間では相互に連結した索状構造を示すことを実証できた。さらに、組織立体構築に基づく形態計測では、癌胞巣の3次元的な連続性を指標として、連結を保ちながら増殖する癌胞巣と周囲の間質で囲まれた孤立胞巣を自動判別することができる。立体構築空間から検出された孤立胞巣1352個についての計測結果では、孤立胞巣サイズは単独の癌細胞から最大で2500個の細胞集団まで分散していたが、数のうえでは細胞2個の胞巣が最も多く全体の24%を占めており、単独の癌細胞が間質に遊離している場合も138個、全体の10%に相当しており、細胞10個未満の小胞巣として分散する割合は78%に達していた。また、孤立胞巣の約65%でKi-67陽性の増殖活性が検出された。孤立胞巣の発生時期に関しては、筋層に達していない早期癌の症例でも間質との境

界領域において癌細胞形質転換を生じることと、単独あるいは数個の癌細胞で構成される孤立胞巣が発生することを確かめている。

まとめ

舌癌の浸潤能を診断するうえでは、癌実質・間質の境界面における癌胞巣の連結性と増殖活性の定量化が重要である。高画質バーチャル画像に基づく3次元形態解析では、広範囲の癌実質・間質の境界面における癌胞巣の連結性を検証できるとともに、間質に囲まれた孤立癌胞巣の全個数と形状を定量化できる。これまでの解析結果では、癌微小環境において単独細胞から小細胞集団、多細胞集団としての浸潤様式の多様性を生じていることと、単独細胞としての分離は比較的早期に起こっていることが注目された。今後の展望として、ヒト舌癌症例から集積される3次元形態計測データに基づき、癌細胞レベル・胞巣レベルでの形態指標と臨床情報とを対比することにより、癌の浸潤・転移能の予後判定につながる病理組織診断基準の策定に寄与できると考えている。

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1件)

- ① Shimazu Y, Kudo T, Yagishita H, Aoba, T. Three-dimensional visualization and quantification for the growth and invasion of oral squamous cell carcinoma、Japanese Dental science Review、査読有、46:17-25、2010

[学会発表] (計20件)

- ① 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、腫瘍微小環境の3次元構造解析：多形腺腫の組織多形と脈管間質、第54回日本唾液腺学会、平成21年12月5日、東京都文京区

- ② 島津徳人、工藤朝雄、田谷雄二、佐藤かおり、青葉孝昭、バーチャルスライドシステムの導入による広領域・高解像度の組織立体解析法の確立、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ③ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、癌微小環境は舌癌胞巣の浸潤形態にどのように影響するか？、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ④ 駒田幸穂、工藤朝雄、島津徳人、佐藤かおり、青葉孝昭、口腔粘膜の上皮・血管・リンパ管の部位特異的な構造特性に関する立体構造解析、第51回歯科基礎医学会、平成21年9月10日、新潟県新潟市
- ⑤ 島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における3次元組織形態解析(1)：癌胞巣と細胞異型、第6回日本病理学会カンファレンス、平成21年7月31日、茨城県つくば市
- ⑥ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における3次元組織形態解析(2)：脈管の新生と侵襲、第6回日本病理学会カンファレンス、平成21年7月31日、茨城県つくば市
- ⑦ 島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍の3次元形態解析：腫瘍構成細胞の空間局在と胞巣構造、第98回日本病理学会、平成21年5月3日、京都府京都市
- ⑧ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌にみられる局所浸潤様式の3次元形態解析、第98回日本病理学会、平成21年5月3日、京都府京都市
- ⑨ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における癌胞巣構造と脈管間質の3次元形態解析、

- 第 98 回日本病理学会、平成 21 年 5 月 3 日、京都府京都市
- ⑩ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍の 3 次元構造解析：腫瘍構成細胞の表現型と増殖活性、第 53 回日本唾液腺学会、平成 20 年 12 月 6 日、東京都文京区
- ⑪ 佐藤かおり、島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、歯学部教育へのバーチャル・スライド導入と活用実績、第 21 回日本歯科医学会総会、平成 20 年 11 月 14、15 日、神奈川県横浜市
- ⑫ 島津徳人、工藤朝雄、東理頼亮、柳下寿郎、佐藤かおり、青葉孝昭、3 次元組織立体構築法による口腔病変の構造解析、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 25 日、東京都江東区
- ⑬ 佐藤かおり、島津徳人、工藤朝雄、柳下寿郎、青葉孝昭、病理学教科へのバーチャル・スライド導入と活用実績、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 25 日、東京都江東区
- ⑭ 工藤朝雄、島津徳人、東理頼亮、柳下寿郎、青葉孝昭、口腔腫瘍の 3 次元解析：腫瘍構造と増殖活性、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 23 日、東京都江東区
- ⑮ 水上彩、那須真奈、今井絵里、大徳知世、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭、口腔病変の 3 次元形態観察-病態解明と Web 教材化を目指して-、第 50 回歯科基礎医学会、平成 20 年 9 月 23 日、東京都江東区
- ⑯ 工藤朝雄、島津徳人、柳下寿郎、青葉孝昭、唾液腺腫瘍における細胞表現型と空間局在の解析、第 19 回日本臨床口腔病理学会、平成 20 年 8 月 22 日、東京都、文京区
- ⑰ Kudo T, Shimazu Y, Yagishita H, taya Y, Sato K, Aoba T, Three-dimensional

visualization and morphometry of oral squamous cell carcinoma, 86th IADR, 2008.7.4, Toronto, Canada

- ⑱ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭、口腔粘膜上皮内癌の免疫組織化学と 3 次元形態解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市
- ⑲ 柳下寿郎、工藤朝雄、島津徳人、青葉孝昭、3 次元組織立体構築法による口腔腫瘍構造解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市
- ⑳ 工藤朝雄、柳下寿郎、島津徳人、出雲俊之、青葉孝昭、舌扁平上皮癌における浸潤様式の 3 次元形態解析、第 97 回日本病理学会、平成 20 年 5 月 16 日、石川県金沢市

[図書] (計 1 件)

- ① 島津徳人 編集 (青葉孝昭 監修)、医歯薬出版、口腔病変立体構造アトラス-立体動画で組織構造と病変をみる-、2009、89 頁

[その他]

ホームページ等

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳下 寿郎 (YAGISGITA HISAO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：50256989

(2) 研究分担者

出雲 俊之 (IZUMO TOSHIYUKI)

埼玉県立がんセンター・臨床腫瘍研究所・研究員

研究者番号：80322709

島津 徳人 (SHIMAZU YOSHIHITO)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10297947

佐藤 かおり (SATO KAORI)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：90287772

青葉 孝昭 (AOBA TAKAAKI)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：30028807