

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592959

研究課題名(和文) 口腔粘膜癌におけるヨード生体染色機序およびグリコーゲン代謝異常の解明

研究課題名(英文) Study on mechanism of vital staining with iodine solution and disorder of glycogen metabolism in oral squamous cell carcinoma

研究代表者

栗田 浩 (KURITA, HIROSHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：10273103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：口腔扁平上皮癌の診断・治療にヨード生体染色は有用である。本研究の結果、ヨード生体染色の反応の場は非角化上皮表層1/2であり、細胞内に存在するグリコーゲン(full- and surround-type)と反応していることが示唆された。また、グリコーゲンの代謝異常を検討したところ、癌組織では正常粘膜に比べて、糖の細胞内への取り込みの増加、および、グリコーゲンの分解促進が進んでいることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Vital staining with iodine solution has been used in diagnosis and treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC). The results of this study suggested that iodine infiltrated and reacted with intra-cell glycogen (full- and surrounded- type) mainly in the upper superficial layer of the non-keratinized epithelium. And it was also suggested that OSCC cells showed significant increase of glucose uptake and accelerated glycogen breakdown.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：ヨード染色 グリコーゲン 口腔扁平上皮癌 生体染色 糖代謝 ルゴール染色 臨床腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜の扁平上皮癌の診断・治療にヨード生体染色は有用である。我々は、ヨード生体染色法に関する研究を行い、以下の研究成果を得てきた。

- (1)ヨード生体染色による口腔癌の診断法の確立。
- (2)ヨード生体染色により上皮表面における口腔癌の範囲が正確に診断できることを証明。

概要：ヨード(ルゴール)染色は、粘膜の悪性病変を検出する方法として有用性が認められている。しかし、外科手術における本法の有用性に関する報告は見られなかった。そこでわれわれはこの染色方法を口腔癌および口腔異型性上皮の診断における有用性を再確認し、本染色により粘膜癌の表面的な拡がり精度5mmの範囲で正確に描き出すことや、切除術に用いることにより口腔癌の再発が少なくなることを報告した。

一般的にヨード生体染色は、ヨードと上皮細胞中のグリコーゲンが反応し、発色することにより病変の染め分けを行っていると考えられている(正常粘膜上皮細胞はグリコーゲンを保有し発色する vs 異型性上皮はグリコーゲンを欠き発色しない)。しかし、実際に(1)ヨードは上皮内に染みこんでいるのか(呈色反応の場合は)?(2)ヨードが染みこんだ場所には何(グリコーゲン)があるのか?など染色機序に関しては十分な検討が行われていない。

悪性化した粘膜上皮細胞においてグリコーゲンが消失することが確認されており、粘膜上皮の癌化に細胞内のグリコーゲン代謝異常が深く関連していることが示唆される。しかし、口腔粘膜の悪性化とグリコーゲンの関係に関する報告はほとんどみられない。口腔粘膜癌の癌化のメカニズムやヨード生体染色の機序を検討するためには、このグリコーゲンの代謝異常に関する検討が必須である。近年、各種抗体の開発によりグリコーゲンの代謝に関連する膜輸送タンパクや酵素の局在が組織化学的な方法で検討出来るようになってきた。

2. 研究の目的

今回の研究では、ヨード生体染色の機序を検討すると共に、それと深く関連するグリコーゲン代謝の異常(糖輸送、グリコーゲンの合成および分解)を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)ヨード生体染色機序の解明

作業仮説：ヨードは上皮内に浸透し上皮内のグリコーゲンと反応する(ヨードの浸透部位とPAS陽性部位が一致する)。異型性上皮ではグリコーゲンが消失し、染色反応が起

らない。

対象：口腔粘膜癌の切除を受ける患者

方法：

1. 歯科用ヨードグリセリン液を用いて生体染色を施行。
2. 切除範囲の設定を行い、病変を切除。
3. 摘出標本において、非染色部と染色部を含むように検体を採取。
4. 組織片の凍結連続切片を作製し、a:非染色、b:H-E、C:PAS染色を行い顕微鏡下で観察。
5. 組織の永久標本を作成し、免疫染色(P53, Ki67)により異型性上皮の範囲を確定。
6. ヨードの分布範囲と、PAS、免疫染色部位との比較を行う。

(2)口腔粘膜異型性上皮、扁平上皮癌におけるグリコーゲン代謝異常の解明

作業仮説：口腔粘膜異型性上皮、扁平上皮癌細胞ではグリコーゲン代謝の異常(糖の取り込み能の低下、グリコーゲン合成能の低下、グリコーゲン分解能の促進)が存在する。

対象：口腔粘膜異型性上皮、口腔粘膜癌の切除標本

方法：

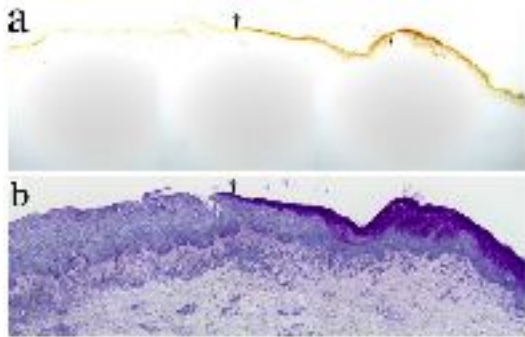
1. 切除標本(パラフィン固定)から半連続切片を作製。
2. グリコーゲントランスポーター(GLUT1およびGLUT3抗体)、グリコーゲン合成に参与する酵素(Glycogen synthase, Phospho-Glycogen Synthase抗体)、グリコーゲン分解に参与する酵素(Glycogen phosphorylase, GPBB抗体)の免疫組織染色。
3. H-E染色、PAS染色。
4. 顕微鏡下で観察。各種染色部位の分布および強度を検討する。

4. 研究成果

ヨード生体染色反応の場

ヨード溶液は染色域の上皮1/2まで浸透していた。同部ではグリコーゲンの存在もPAS染色で確認された。また、癌抑制遺伝子変異(p53)、細胞増殖能(Ki67)との関連について、免疫組織学的に検討した結果、p53に関しては基底層において、また、Ki67に関しては、表層においてヨード不染域で標識率が有意に高かった(26.1% vs. 9.8%、11.7% vs. 4.3%)。

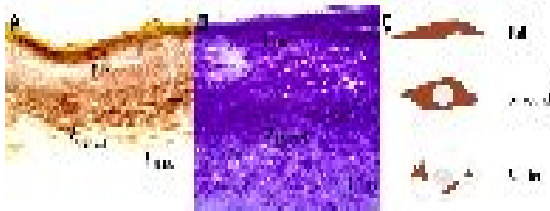
以上の結果から、ヨード呈色反応の場は上皮表層1/2であると考えられた。また、上皮表層において、ヨード不染域と染色域の間でKi67の発現に有意差があり、ヨード染色機序に細胞分裂能が関連している可能性が示唆された。



a:ヨードの染み込み b:PAS 染色

細胞内グリコーゲンの検討

電顕的な観察を行い、上皮細胞内には3つのパターン (full-, surround- and scatter-types) でグリコーゲンが存在していることを明らかにし、そのうち2つのタイプ (full- and surround-type) でヨードとの反応が起こっていると考えられた。



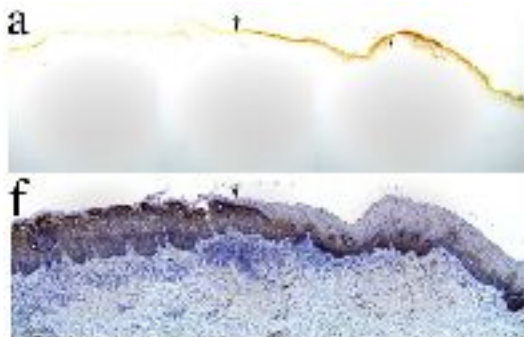
A:ヨードの染み込み B:PAS 染色 C:細胞内グリコーゲンのタイプ

(2) 口腔粘膜異型性上皮、扁平上皮癌におけるグリコーゲン代謝異常の解明

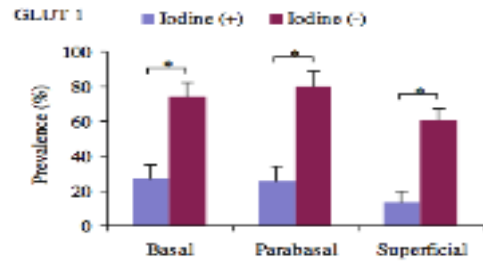
グリコーゲントランスポーター

ヨード染色結果と糖の取り込みに関連するグルコーストランスポーター (GLUT-1) の発現について、免疫組織学的に検討した。その結果、GLUT-1 の標識率は上皮全層においてヨード不染域が染色域よりも有意に高かった (基底層 77.0 vs 22.4%, 傍基底層 84.9 vs 21.8%, 表層 62.0 vs 10%; Wilcoxon 符号付順位検定、 $P < 0.05$)。また、併せて Ki67 の発現状況を調べたところ、表層においてヨード不染域で標識率が有意に高かった (26.1% vs. 9.8%, 11.7% vs. 4.3%)。

以上の結果から、上皮表層において、ヨード不染域と染色域の間で GLUT-1 および Ki67 の発現に有意差があり、口腔粘膜の悪性化にグリコーゲンの取り込みと細胞分裂能が関連している可能性が示唆された。



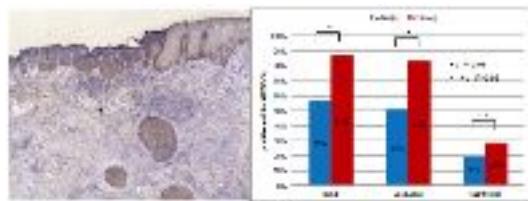
a:ヨードの染み込み f:GLUT-1 染色



グリコーゲンの新生に関連する酵素
グリコーゲンの新生に関連する glycogen synthase (GS) と phospho-glycogen synthase (PGS) 発現について免疫組織学的に検討した。その結果、ヨード不染域で GS および PGS 発現の増加傾向はみられるものの有意差は見られず、口腔粘膜の悪性化において糖の新生に有意な差はないものと思われた。

グリコーゲン分解に関連する酵素

グリコーゲンの分解に関与する酵素である glycogen phosphorylase isoenzyme BB, (GPBB) と Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) 発現について、免疫組織学的に検討した。その結果、不染域と染色域の間で GPBB の発現に有意差があり、ヨード不染の細胞では糖の分解が更新している可能性が示された。



以上の所見から、口腔扁平上皮癌細胞では正常粘膜細胞に比べて、糖の細胞内への取り込みの増加、および、グリコーゲンの分解促進が進んでいることが示唆された。今後は癌化における代謝異常 (グリコーゲンおよび糖代謝) について検討を深める必要がある。

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2件)

Xiao T, Kurita H, Li X, Qi F, Shimane T, Aizawa H, Uehara S. Iodine penetration and glycogen distribution in vital staining of oral mucosa with iodine solution. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 117, 754-759, 2014, 査読あり

doi: 10.1016/j.oooo.2014.02.008.

Xiao T, Kurita H, Shimane T, Nakanishi Y, Koike T. Vital staining with iodine solution in oral cancer: iodine

infiltration, cell proliferation, and glucose transporter 1. Int J Clin Oncol, 18, 792-800, 2013, 査読あり
doi: 10.1007/s10147-012-0450-4.

〔学会発表〕(計5件)

Aizawa H, Xiao T, Kobayashi H, Shimane T, Kurita H, Vital staining with iodine solution and glycogen metabolism in oral squamous cell carcinoma, 21st International conference on oral and maxillofacial surgery, 2013.10.21, Barcelona, Spain

相澤仁志, 肖 鉄鵬, 小林啓一, 小池剛史, 嶋根 哲, 齊 芳芳, 栗田 浩, 口腔扁平上皮癌におけるグリコーゲンに関する検討, 第37回日本頭頸部癌学会, 2013.6.14, 東京

Xiao T, Kurita H, Shimane T, Nakanishi Y, Koike T, Vital staining with iodine solution in OSCC: Iodine infiltration, cell proliferation and GLUT1, 10th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2012.11.18, Bali, Indonesia

肖 鉄鵬, 栗田 浩, 西牧史洋, 嶋根 哲, 飯島 響, 鎌田孝広, 小池剛史, 口腔扁平上皮癌におけるヨード生体染色機序の解明 2. 上皮に染みこむ部位とグリコーゲン分布の関連について, 第30回日本口腔腫瘍学会総会, 2012.1.26, さいたま市

肖 鉄鵬, 栗田 浩, 李 向軍, 嶋根 哲, 飯島 響, 鎌田孝広, 小池剛史, 小林啓一, 口腔扁平上皮癌におけるヨード生体染色機序の解明, 第49回日本癌治療学会総会, 2011.10.27, 名古屋市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗田 浩 (KURITA HIROSHI)

信州大学・医学部・教授

研究者番号: 10273103

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者