

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462852

研究課題名(和文) 口腔前癌病変と扁平上皮癌の細胞解析による早期診断システムの構築

研究課題名(英文) Establishment of early diagnostic system using cytological analysis of oral squamous cell carcinoma and precancerous lesion

研究代表者

岸野 万伸 (KISHINO, Mitsunobu)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60346161

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞診断システムの構築を目的に「細胞診の正診性に関する研究」というタイトルで、他施設との共同研究が行われた。423例の細胞診標本について専門医11名で再検鏡した結果、癌細胞の判定において、感度は71.5%、特異度は87.0%であった。また、他の細胞診専門医らとともに、口腔細胞診の診断基準を示すためにガイドラインを作成した。

免疫染色では、内在性レクチンタンパクであるGalectin-1に着目し、液状細胞診標本を用いて細胞診断における有用性について解析した。腫瘍性病変では高い陽性率を示し(79.0%)、感度、特異度、陽性的中率においても、75.0%、75.0%、91.3%と高い値を示した。

研究成果の概要(英文)：Collaborative research with other institutions entitled 'Study on accurate diagnostic rate in oral cytology' was performed. 423 cases of cytological specimens were used for microscopic re-examination by 11 oral cytologist. The sensitivity for detection of cancer cells was 71.5%, and its specificity was 87.0%. We created diagnostic criteria of the oral cytology with other oral cytologists.

Immunocytochemical staining method was used for detecting Galectin-1 (endogenous lectin protein) in liquid based cytology specimens. The positive ratio of Galectin-1 was higher in neoplastic lesions (79.0%) than in non-neoplastic lesions (22.0%). The sensitivity (75.0%), specificity (75.0%) and positive predictive value (91.3%) of Galectin-1 were also high in cytological specimens.

研究分野：医歯薬学

キーワード：扁平上皮癌 前癌病変 細胞診

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する研究動向及び位置づけ
WHO 死亡統計データベースによれば、日本における口腔癌の死亡率は 1960 年代までは欧米諸国に比較して低かったが、徐々に増加傾向を示し現在ではイギリスやアメリカの死亡率を超え、30 年前と比較して 2 倍以上に増加している。この傾向は若年層を含めどの年齢層においてもみられることから、原因として、国や自治体の口腔癌に対する対策がとられていないこともあるが、早期発見のための診断基準が定まっていなかったことが大きな原因と考えられる。

組織診断においては、前癌病変である白板症や紅板症についての統一的な見解が得られておらず、上皮異形成の程度と腫瘍化(癌化)との関連は明確にはされていない。上皮異形成から浸潤癌に進展する過程で、p16, p21, p53, cyclin D1, Mdm2, EGFR 等様々な癌関連遺伝子の異常が報告されているが、組織形態との相関は明らかではない。これまでは、主に p53 および Rb 経路の異常が報告されている。

近年になって、癌の早期発見を目的として口腔細胞診が行われるようになってきており、診断基準に関する議論が臨床細胞学会でも活発に行われている。しかしまだ明文化されたものはない。

また、口腔癌の発生において、喫煙と飲酒が主なリスクファクターとされているが、喫煙率の低下にもかかわらず、非喫煙群や若年層、女性の口腔癌患者が近年増加傾向にある。この要因としてヒトパピローマウイルス (HPV) の関与が報告されているが、未だ定まった見解はない。

(2) これまでの研究成果

「口腔前癌病変と扁平上皮癌における HPV 感染に関する検討」という内容で、これまで日本口腔科学会学術集会(第 62 回・平成 20 年:優秀ポスター賞受賞)、日本病理学会総会(第 97 回・平成 20 年)、日本臨床口腔病理学会総会(第 19 回・平成 20 年と、第 20 回・平成 21 年:優秀ポスター賞受賞)において発表してきた。本研究の連携研究者である森井氏に協力いただき、子宮頸部病変を HPV 感染陽性の指標として、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、PCR 法による HPV-DNA の検出と、クラボウの協力により HPV typing (GeneSQUARE®) を試みた。その結果、口腔では子宮頸部病変に比較して感染率がかなり低く、HPV 感染が癌化に関与する可能性が低いことが示され、論文発表を行った (Int J Clin Oncol. 2011, 16:646-53)。引き続き、科学研究費補助金(基盤研究(C)、課題番号:22592034、H22-24)にて、細胞診材料を用いて検証した結果、HPV 感染は確認できていない。また、細胞診断に関する検討では、口腔扁平上皮癌の正診率は 90.5%と高い水準がえられ、残りの 9.5%も癌の診断には至らなかったものの異型上皮が認められた。

口腔粘膜細胞診の診断基準の確立に向けて、前向きな成果が上げられたと考える。この結果をもって、日本臨床細胞学会(第 51 回秋期大会・平成 24 年 11 月)のフォーラム「口腔扁平上皮癌の細胞診」にて講演を行った。

(3) 着想に至った経緯

口腔癌において、明らかな浸潤癌の場合は生検によりほぼ 100%診断され、かつ細胞診においても癌あるいは癌疑いとして診断可能である。しかし、浸潤が不明瞭な場合や前癌病変の場合はいずれの方法でも診断精度は低下傾向にある。ゆえに、それらの精度を上げるために診断基準を明確にすることが重要になってくる。生検材料を用いた組織学的検討や免疫染色による種々の蛋白の局在・遺伝子異常の検出も重要であるが、癌検診やスクリーニングのために用いられる細胞診材料を利用することが早期診断に繋がると考えられる。細胞診に関しては、口腔病変は直視できるという理由から普及率はまだまだ低い。口腔細胞診の診断基準の確立と細胞診検査の普及に貢献することは、私たち数少ない細胞診専門歯科医の責務であると考えている。また、細胞診で得られた検体の利用範囲は広く、癌関連蛋白や遺伝子異常の検出に用いることができ、口腔癌の早期発見とそれによる死亡率の低下に少なからず貢献できると考え、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、口腔粘膜擦過細胞診で得られた検体から、細胞形態学的・免疫組織化学的解析および遺伝子変異の検索をすることにより、細胞診断システムを構築することを目的とする。また、それをもとにして、口腔癌の早期発見や口腔癌検診の普及に貢献できるものと期待している。

具体的には、まず、生検材料により上皮異形成あるいは扁平上皮癌と診断された症例を病理診断データベースから抽出し、組織学的な検討と癌関連蛋白に関する免疫組織化学的染色を行い、それぞれの相関を検討し癌の診断に有用な因子を決定する。また、口腔扁平上皮癌において変異が高率に検出される p53 については、組織標本からゲノム DNA を抽出し、PCR-SSCP 法にて変異を検出しシーケンスを行い、免疫染色でえられた結果と比較検討する。細胞診症例については細胞形態学的解析に加え、組織学的検討により有用とされた因子に関する多重免疫染色を行い、組織診断結果と照合し、診断精度の検討と診断システムの構築を行う。また、若年者層(40 歳以下)の発癌については HPV との関与も否定できないので、残りの細胞診検体から DNA を抽出し、PCR 法による HPV-DNA の検出と、Genotyping 法による HPV の型判定を行い、関連の有無を明らかにする。

これまでの口腔癌に関する研究では、主に組織学的および免疫組織化学的解析による上皮異形成や癌化との関連、そして、その際

にみられる遺伝子変異の検索が行われてきており、発癌メカニズムの解明や転移・予後・治療法等との関連が議論されている。本研究は、これまでの知見をもとに、組織および細胞診における診断基準の確立を目的とするものである。特に細胞診断の基準を明文化することが重要であると考え。そして、これにより、口腔癌の予防や口腔癌検診の普及、それに伴う早期発見と死亡率の低下に貢献できるものと期待している。

3. 研究の方法

口腔前癌病変と扁平上皮癌の細胞解析による早期診断システムを構築するために、まず研究計画の初年度から次年度にかけては、組織検体を用いて解析を進めていく。大阪大学歯学部附属病院の病理診断データベースから口腔前癌病変と扁平上皮癌症例を抽出し、癌関連蛋白・増殖マーカーに関する免疫染色所見や遺伝子変異の所見も含めてデータベースの再構築を行う。そこから特に前癌病変や初期癌に発現頻度が高く、浸潤癌にもみられる所見を候補としてあげていく。細胞診に関しては、異常細胞が出現していた症例について細胞の形態学的な解析を行う。組織診も行われている症例については、細胞の解析結果と比較検討し、診断基準を明確にしていく。また、組織学的検討により有用とされた因子に関する多重免疫染色を行い、早期診断システムを構築する。

(1) 病理診断データベースの構築

大阪大学歯学部附属病院の病理診断データベースから口腔前癌病変と扁平上皮癌症例を抽出し、別にデータベースを作る。

組織切片を利用した解析

・癌関連蛋白質

癌の増殖能、細胞周期、アポトーシスに関連する蛋白を免疫組織化学的染色により検出する。具体的には Ki67, p16, p21, p53, cyclin D1, Mdm2, EGFR 等に対する抗体を用いて染色する。症例数は年間 100 例を越え染色標本数は膨大な量になるため、組織マイクロアレイ (TMA) を作製し、極力労力を抑えるようにする。

・p53 遺伝子変異

口腔扁平上皮癌において変異が高率に検出される p53 については、パラフィンブロックから腫瘍組織の回収が可能なものについては、ゲノム DNA を抽出後、PCR-SSCP 法で変異バンドを検出し、exon5-8 を中心にシーケンスをおこなう。

データベースの追加と検討

上記で得られた結果をデータベースに追加して完成させ、そこから特に前癌病変や初期癌に発現頻度が高く、浸潤癌にもみられる異常所見をリストアップする。

(2) 細胞診断基準

組織診断との比較検討

細胞診標本は、検体採取用ブラシで病変部を擦過しスライドグラスに塗抹したあと、ブラ

シを液状細胞診用の固定液に浸漬し、一部は免疫染色用標本を作製し残りの検体から DNA を抽出し保存しておく。

作製した標本をもとに細胞診断を行い、生検ないしは手術材料の病理組織検査も行われている場合にはそれと照合し、細胞診断結果を検証する。

異常細胞の形態学的解析

各症例について、標本中にみられる異常な形態を示す細胞を顕微鏡写真撮影装置 (DS-Ri1) にて取り込み、画像統合ソフトウェア (NIS-Elements) を用いて解析し、形態分類を行う。実際の診断結果と形態解析結果との相関を検討する。

上記の結果をもとに口腔前癌病変と扁平上皮癌に関する細胞診の診断基準を作成する。

免疫染色

病理診断データベースからリストアップされた項目について、細胞診標本の免疫組織化学的染色を行う。p53 遺伝子変異検索の必要性の有無についても検討する。

細胞診断基準の確立

作成した診断基準に、補助診断法としての最良な免疫染色項目を決定し、細胞診断システムを完成させる。

(3) HPV 解析

若年者層における口腔癌の発生に HPV が関与しているとの報告もあるので、40 歳以下の症例については、細胞診の残りの材料から抽出した DNA を用いて HPV の検出を試み、発癌との関連について調べる。比較するものとして、若年者で高率に HPV が検出されており、口腔にも隣接する領域である扁桃から咽頭にかけての癌の組織を用いる。これらの標本提供、指導については連携研究者の森井氏に依頼する。

HPV-DNA PCR

大部分の HPV に共通する L1 region DNA に対する consensus primer (GP5+/GP6+) を用いて PCR を行い、HPV-DNA の検出を試みる。

HPV typing (PapiPlex 法)

16 種類の HPV に対する multiplex primer で PCR を行い、各 HPV に対するプローブとハイブリダイゼーションを行い検出する方法。

4. 研究成果

(1) 病理診断データベース

大阪大学歯学部附属病院のデータベースから歯肉扁平上皮癌症例を抽出し、癌関連蛋白・増殖マーカー等に関する免疫染色所見も含めてデータベースの再構築を行った。癌関連蛋白質については、癌の増殖能、細胞周期、アポトーシス、免疫等に関連する蛋白を免疫組織化学的染色により検出した。具体的には、Ki67, p16, p21, p63, cyclin D1, EGFR, IMP3, E-cadherin, laminin5 2, HLA-1, CD3, CD4, CD8, CD68, Galectin-1,3,7 に対する抗体を用いて染色し、臨床病理学的データとの相関について解析した。その結果については、「口

の難病プロジェクト・2013年度進捗状況報告会および2014年度成果報告会にて発表した。予後との関連については、cyclin-D1とlaminin5 2, Galectin-1が生存率と有意な相関が見られ、転移には腫瘍免疫とGalectin-1の発現が関与していた。

Galectin-1は、非腫瘍性組織ではほとんど発現がみられないことから、細胞診断においても有用な因子の可能性があると考えた。

(2) 細胞診断基準

細胞診断システムの構築を目的に、組織学的診断結果の出ている症例を細胞診データベースから抽出し、「細胞診の正診性に関する研究」というタイトルで、他施設との共同研究を行った。細胞診標本423例について、専門医11名で再検鏡した結果、癌細胞の判定において比較的高い感度と特異度が得られた。また、他の専門医とともに、口腔細胞診の新たな診断基準を作成するとともに、ガイドラインの執筆を行った。細胞診断基準については、1つの目標が達成できたと考える。組織標本の免疫染色に使用した癌関連蛋白質の中から、Galectin-1に着目し、液状細胞診標本を用いて細胞診断における有用性について解析を行った。扁平上皮癌や前癌病変では非腫瘍性病変に比較して有意に高い陽性率が認められ、感度、特異度、陽性的中率においても高いパーセンテージが示された。癌の細胞診断において、診断精度の向上に貢献できる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Noda Y, Kondo-Suzumura Y, Sakai M, Sato S, Kishino M. Galectin-1 is a useful marker for detecting neoplastic squamous cells in oral cytology smears. Human Pathol. 2016 52:101-109. 査読有, DOI: 10.1016/j.humpath.2016.01.014.

〔学会発表〕(計 9件)

岸野万伸、鈴村侑子、野田百合他。口腔粘膜病変の細胞新材料を用いたHPV検出の試み。第24回日本臨床口腔病理学会。2013年8月29日。東京

岸野万伸、太田沙世子。病理細胞診セミナー「口腔癌」。第52回日本臨床細胞学会秋期大会。2013年11月3日。大阪市

岸野万伸。教育講演「口腔癌の細胞像-非腫瘍性病変との鑑別-」。第55回日本臨床細胞学会総会。2014年6月7日。横浜市

野田百合、岸野万伸、佐藤淳他。歯肉扁平上皮癌におけるRCAS1の発現に関する免疫組織化学的検討。第104回日本病理学会総会。2015年5月2日。名古屋市

岸野万伸。スライドセミナー「口腔」。第56回日本臨床細胞学会総会。2015年6月14日。松江市

野田百合、岸野万伸、廣瀬勝俊他。歯肉扁平上皮癌におけるGalectin-1の発現と腫瘍免

疫の関連について。第26回日本臨床口腔病理学会。2015年7月30日。札幌市

野田百合、近堂(鈴村)侑子、東條文昭、岸野万伸。口腔細胞診での腫瘍性病変の鑑別におけるGalectin-1の有用性。第54回日本臨床細胞学会秋期大会。2015年11月22日。名古屋市

東條文昭、近堂(鈴村)侑子、野田百合、岸野万伸。口腔細胞診と生検組織診の比較検討。第54回日本臨床細胞学会秋期大会。2015年11月22日。名古屋市

Noda Y, Kishino M, Sato S, et al. Relationship between galectin-1 expression and tumor immunity at gingival squamous cell carcinoma. International Symposium 2015 Oral and Craniofacial Development and Diseases. 2015/12/11. Suita, Japan

〔図書〕(計 2件)

岸野万伸、佐藤淳。文光堂。病理と臨床臨時増刊号病理診断クイックリファレンス「疣状癌」。2015年。343ページ

岸野万伸。金原出版。細胞診ガイドライン5 消化器。2015年。340ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岸野 万伸 (KISHINO Mitsunobu)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：60346161

(2) 研究分担者

大倉 正也 (OKURA Masaya)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：10281130

鈴村 侑子 (SUZUMURA Yuko)
大阪大学・歯学部附属病院・臨床検査技師
研究者番号：50648748

(3) 連携研究者

森井 英一 (MORII Eiichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：10283772