

令和元年5月27日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17111

研究課題名(和文)放射線照射による舌の血管・リンパ管内皮損傷と癌細胞存在下での脈管網の再構築

研究課題名(英文) Reorganization of blood/lymphatic vessel networks by irradiation under the presence/absence of cancer cells in mouse tongue xenograft model

研究代表者

白子 要一 (SHIRAKO, Youichi)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：50756377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔癌への放射線照射で生じる脈管組織の損傷とその修復機序を明らかにする目的で、マウス舌へのヒト癌細胞株移植モデルを用いて、X線照射後の癌実質および間質の血管・リンパ管の構造変化を解析した。担癌舌組織へのX線照射により癌胞巣は壊死に陥り、舌組織では粘膜炎が惹起されたが、脈管構造は比較的安定に保たれており、一部のリンパ管内皮が増殖傾向を示した。X線照射による組織損傷後のリンパ管内皮の修復応答の速さが、残存癌細胞との相互作用を経てリンパ行性転移に繋がる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の放射線治療に関する基礎研究では、癌の再燃に関わる組織修復機構が注目されてきたが、被照射組織において想定される複雑な癌細胞-間質間相互作用を詳細に検証した例は少ない。また、口腔癌の多発する粘膜上皮ではリンパ管も存在するが、固形癌におけるリンパ管新生は血管新生と比較して解析が遅れていた。本研究で確立したOSC19移植によるリンパ管誘導では、移植後2週間程度で癌胞巣内に高密度のリンパ管網を構築でき、腫瘍リンパ管内皮細胞の解析に適した実験モデルとなることを実証した。癌治療における損傷血管・リンパ管の再構築機序に関する研究の推進に寄与できると考えている。

研究成果の概要(英文)：To clarify the vascular tissue damage and its repair mechanism after radiation to oral cancer, we analyzed structural changes of blood and lymphatic vessels after X-ray irradiation in a transplantation model of human oral cancer cells into mouse tongue. X-ray irradiation of tumor-bearing tongue tissue resulted in necrosis of cancerous lesions and caused mucositis in tongue epithelium. While the overall vasculature was kept relatively stable, some lymphatic endothelium exhibited proliferative activity. This observation suggested that the repair speed of lymphatic endothelium after X-ray irradiation may lead to lymphatic metastasis via interaction with residual cancer cells.

研究分野：実験病理学

キーワード：病理学 扁平上皮癌 放射線 リンパ管 創傷治癒 同所移植モデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜に発生した扁平上皮癌(口腔癌)の治療においては、咀嚼・嚥下・構音などの口腔機能の温存および審美的観点から、初回治療では可及的に外科手術を回避し、侵襲の少ない化学療法と放射線療法の併用により根治を目指す機運が高まっている。癌病変を含む粘膜組織への放射線照射の効果に注目すると、活発に増殖する癌細胞を直接的に障害するとともに、癌周囲に発達した栄養血管に循環障害を引き起こして間接的に癌を壊死に陥らせることが期待できる。ただし、低酸素下では放射線の影響が減弱するため、患部組織への酸素供給が維持できるよう実際の臨床治療では複数回の分割照射を行って血管のダメージ軽減と回復を図っている。しかしながら、分割照射の弊害として、生き残った癌細胞も栄養供給を受けることになり再発の助長に繋がる懸念されている。

局所の放射線障害に対する全身的な応答として、即時的なストレス応答や損傷組織への骨髄由来細胞の集積が認められる。損傷部位に再構築される血管では、集積した骨髄由来細胞からの増殖因子刺激によって残存内皮細胞が増殖するとともに、骨髄由来細胞の一部も自ら内皮細胞へ分化することが知られている。これらの事象の実験的裏付けとしては、げっ歯類担癌モデルにおいて高放射線量単回照射による組織障害の解析が進められてきた。ただし、単回照射では放射線の影響が鮮明になると同時に組織障害も甚大となること、また、実験の多くが障害初期の血管応答に注目しており照射後の後期段階については検証が不充分であることが指摘されていた(Kozinら, JNCI, 2012)。癌組織での血管新生は古くから知られているが、癌細胞と周囲間質との相互作用、いわゆる“癌微小環境”の特殊性が次第に明らかとなっており、癌微小環境では健常血管内皮とは形質の異なる腫瘍血管内皮(TEC; Tumor endothelial cell)が出現していることも判明している。一方、リンパ管については解析が遅れていたが、近年になってリンパ管内皮マーカー(Prox1, Lyve1, Podoplaninなど)が充実し、癌組織におけるリンパ管内皮の活性化や構造変化について知見が蓄積してきている(Stackerら, Nat Rev Cancer, 2014)。

研究代表者は、ヌードマウス舌組織への癌細胞移植モデルを用いて、異なる口腔癌細胞株について造腫瘍活性、局所浸潤様式、脈管新生誘導能、リンパ節転移能を比較してきた。申請課題立案時では、連続薄切切片への多重免疫染色とデジタル画像処理による癌組織の立体構築を進めており、サイトケラチン陽性癌胞巣の形状とともに周囲の密なPECAM1陽性血管ネットワークや胞巣を包み込むように走行するLyve1陽性リンパ管を解析してきた。さらに形態計測では、サイトケラチン陽性領域を画像演算処理し、陰性領域(間質)を腫瘍内間質と宿主間質とに分画する手法を考案した。この手法を用いて各種口腔癌細胞株移植群での組織内血管・リンパ管密度を解析したところ、非移植群との比較において、高分化を示す癌細胞株(KOSC2, HSC2)の癌胞巣内外で血管密度が有意に高まっていること、また中分化型で高転移性を示す癌細胞株(OSC19, OSC20)の癌胞巣ではリンパ管密度が有意に高まっていることを明らかにした(Shirakoら, J Oral Pathol Med, 2015)。特にOSC19におけるリンパ管新生誘導は顕著であり、癌胞巣を最表層から深部へと分けけて密度計測すると、深部になるにつれて血管密度が減少するのに対し、リンパ管密度は高まっていることも判明した。これらの成果から、脈管誘導性の癌細胞存在下にて放射線照射実験を行うことにより、照射後の組織修復における血管・リンパ管構築の比較解析が可能になるのではないかと発想した。

2. 研究の目的

本研究では、口腔癌への放射線照射で生じる脈管組織の損傷とその修復機序の解明を目的として、口腔癌細胞株OSC19のヌードマウス舌組織への移植とX線照射を実施し、血管・リンパ管網の経時的な構造変化を中心とした病態解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養およびマウス舌への細胞移植

日本歯科大学動物実験委員会のガイドラインに従ってアイソトープ研究施設内飼育室においてマウス系統の飼育管理、癌細胞移植と試料採取を行った。口腔癌細胞株は、RPMI1640培地+10%ウシ胎仔血清に懸濁し、5%CO₂雰囲気下(37℃)で培養した。マウス舌への癌細胞移植では、8×10⁶細胞/ml PBSに調製した癌細胞浮遊液25μl(2×10⁵細胞)をBALB/c-*nu/nu*ヌードマウス舌側縁部に26Gシリンジで注入、移植後1~4週間、腫瘍塊の増大を視診によりモニタリングした。低酸素領域検出の目的では、屠殺2時間前にピモニダゾール溶液(Hypoxyprobe-1)10mg/ml濃度を60mg/kg body weightで腹腔内投与した。深麻酔下・頸椎脱臼による安楽死後速やかに舌組織および転移巣確認のために頸部リンパ節を摘出、4%ホルムアルデヒド固定した。組織立体構築用のパラフィン包埋試料では、セクショントランスファー装置付き回転式マイクロトームで4μm厚にて約100~200枚の連続薄切標本を作製した。なお、組織の収縮・変形を抑える目的で、採取したマウス舌の周囲をコルク台にピン止めした状態で固定処理した。

(2) マウス舌へのX線照射

対照群および移植群のヌードマウス(7週齢)に対し、ペントバルビタールナトリウム 50 mg/kg の腹腔内投与により麻酔を行った。プラスチック製の保定装置でマウス体躯を固定し、舌体を舌側縁がみえる状態まで露出させて木製の小ピンセットで把持・固定した。鉛製ブロックで体躯を遮蔽し、照射装置内にマウスを保定装置ごと入れ、線源直下に腫瘍を含む舌側縁部を合わせ、直径 5 mm の穴を開けた鉛製ブロックを置いて腫瘍部位のみにX線が到達するよう位置を調整した。実験動物用放射線照射装置(MBR-1520R-3;日立メディコ)を使用し、鉛製ブロック経由でコリメートしたX線を舌右側縁部に照射した。

(3) 免疫組織化学と画像解析

担癌舌組織切片については、ヒト上皮質マーカー(サイトケラチン)、増殖活性マーカー(Ki-67)、マウス血管内皮細胞マーカー(PECAM1)、リンパ管内皮細胞マーカー(Lyve1)の特異抗体を用いて、異なる発色剤(青色のVector blue、茶色のDAB、赤色のAEC)を組み合わせ、ABC法による多重免疫標識を実施した。染色画像は高解像度スライドスキャナ(バーチャルスライド装置NanoZoomer、浜松ホトニクス)でデジタル記録した。画像は対物20倍の解像度を維持してTIFF形式で保存(この画像解像度と空間解像度 $0.46 \mu\text{m}/\text{pixel}$ では細胞核1個を識別して分画可能)した。染色画像毎にImageJ/Fiji(NIH)で画像処理を行い、陽性判定領域の抽出と形態計測を実施した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞移植後の組織変化

先行実験によりリンパ管誘導能の高いことが判明した口腔癌細胞株OSC19を使用し、ヌードマウス舌への移植を行い、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、増殖細胞核を中心とした免疫組織化学・形態解析(2次元組織画像)また、連続薄切・多重免疫染色から組織立体構築を行い、脈管間質の構造変化について3次元構造解析を行った。移植後のOSC19細胞は、中分化型の形質を示す癌胞巣を形成し、周囲間質では血管内皮細胞およびリンパ管内皮細胞の有意な増殖が確認できた。組織立体解析では、OSC19癌胞巣ではリンパ管が顕著に増生しているが、リンパ管密度は腫瘍塊周囲間質では低く、腫瘍内部に進むにしたがって密度が高まっていた。脈管形成誘導に関わるVEGFAおよびVEGFCの発現を検討したところ、腫瘍組織周囲の間質領域で局所的なVEGFA/VEGFC発現をみるにとどまり、OSC19細胞でのVEGFA/VEGFC発現はみられなかった。これらの所見から、舌の既存血管・リンパ管の損傷に対する応答は、マクロファージ等の炎症細胞の活性化に伴うVEGFシグナルによるものと考えられ、OSC19移植によるリンパ管の増生は異なる分子機序が働いている可能性が推察された。

(2) マウス舌組織へのX線照射

OSC19移植による担癌マウスに対し、麻酔下で腫瘍塊を含む舌半側のみに安定してX線照射を行うための操作手順を最適化した。実験手順の概要として、照射に先立ち、プラスチック製の保定装置でマウス体躯を固定し、舌側縁がみえるまで舌体を露出させた状態で木製の小ピンセットで把持・固定を行った。次いで、鉛製ブロックで体躯を遮蔽し、照射装置内にマウスを保定装置ごと入れ、線源直下に腫瘍を含む舌側縁部を合わせる操作を行った。この時、腫瘍部位にのみX線が到達するよう、直径 5 mm の穴を開けた鉛製ブロックを作製した。実験ではこの穴を通して(コリメート)照射を行った。照射条件は、管電圧 150 kV、管電流 20 mA、被射体までの距離 350 mm、アルミニウムフィルター 1 mm、総照射量 2 Gy とした。これらの操作手順により、照射率 0.26 Gy/min で麻酔状態のマウスへ安定照射できること達成できた。

(3) X線照射後の癌組織・間質組織の変化

舌組織の反応

2 Gy 照射から 3 日後の舌粘膜では、上皮基底細胞層にわずかな配列の乱れを生じており、上皮過形成を伴う軽度の粘膜炎となっていたが、炎症性細胞の浸潤は比較的少なかった。一方、4~6 Gy 照射群では、基底層の乱れとともに有棘層と角化層の肥厚が顕著に認められた。特に、基底部の 2~3 層においては核腫大を伴う異型細胞が多数出現しており、6 Gy 照射群では、上皮結合組織における炎症性細胞浸潤も高まっていた。X線量と組織損傷に関しては、20 Gy 以上の単回照射を受けたマウスでは重度の口内炎を発症することが知られている。今回確立した照射手順では、コリメートしたX線を腫瘍部位にフォーカスすることにより、小線量の複数回照射で粘膜局所に損傷を与えることができ、放射線照射による組織応答を検証するうえで有用なモデルであることが実証できた。

OSC19 移植 7~10 日後 (2 mm 超の腫瘍塊) の舌組織に対して、X 線を複数回照射 (2 Gy/day を 1~3 回) したところ、3 回照射群においては大半の癌細胞が死滅して壊死組織となった。炎症反応が惹起された間質では、毛細血管が拡張しており、照射刺激による炎症応答が続いていることが確認できた。一方、リンパ管の拡張は認められず、既存組織のリンパ管は縮小傾向を示したが、癌巣周囲のリンパ管内皮は概ね維持され増殖活性を示す細胞も確認できた。これらの所見から、X 線照射後の組織修復過程において、組織損傷後のリンパ管内皮の修復応答の速さが残存癌細胞との相互作用を介してリンパ行性転移に繋がると推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Migration of lymphatic endothelial cells and lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice, *Int J Dev Biol* (査読有), 2018;62: 293-301, doi: 10.1387/ijdb.170218yt.

〔学会発表〕(計 5 件)

添野雄一, 田谷雄二, 佐藤かおり, 白子要一: 日本歯科大学における研究の現在 生命歯学部病理学講座研究紹介, 日本歯科大学校友会学術フォーラム 2019, 2019.

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Lymphatic vascular development in the craniofacial region of embryonic mice Migration of lymphatic endothelial cells from cardinal veins into mandibular arches, *Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB Program Book, Cell Struct. And Funct., Supple: 150 (No. P3-031)*, 2018.

田谷雄二, 佐藤かおり, 白子要一, 添野雄一: マウス顎顔面領域へのリンパ管内皮細胞の移住とリンパ管形成, 第 60 回歯科基礎医学会学術大会プログラム・抄録集, p.155 (No. 02-22), 2018.

Taya Y, Sasaki Y, Shirako Y, Sato K, Soeno Y: Tongue morphogenesis through epithelial-mesenchymal interaction in mouse embryos, *Mech Develop*, 145 (Suppl): S153 (doi.org/10.1016/j.mod.2017.04.433), 2017.

Taya Y, Sato K, Shirako Y, Soeno Y: Regulatory switches of commitment from myogenic progenitors into myoblasts or satellite cells in the development of mouse tongue, 平成 29 年度日本歯科大学歯学会第 4 回ウィンターミーティング プログラム・抄録集: 12 (No.2-1), 2017.

Shirako Y, Taya Y, Sato K, Soeno Y: Lymphangiogenic dynamics in oral cancer microenvironment, 平成 29 年度日本歯科大学歯学会第 4 回ウィンターミーティング プログラム・抄録集: 13 (No.2-3), 2017.

〔図書〕(計 1 件)

佐藤かおり, 田谷雄二, 白子要一, 添野雄一: ポイントレビュー病理学・口腔病理学, キタメディア, 東京, 2018.

〔その他〕

ホームページ等

[http:// www.ndu.ac.jp/~pathhome/](http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。