

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791512
 研究課題名 (和文) 複合粘膜培養法を応用した口腔粘膜前癌病変の診断および口腔癌の早期浸潤モデルの開発
 研究課題名 (英文) A new in vivo model of cancer invasion using AlloDerm®, a human cadaveric dermal equivalent
 研究代表者
 南川 勉 (MINAMIKAWA TSUTOMU)
 神戸大学医学部附属病院・助教
 研究者番号：10397804

研究成果の概要：口腔癌の治療成績は向上してきたが、進展例では良好な予後を得られるとは限らず、重大な審美障害や機能障害を後遺し、社会復帰が困難になる場合も少なくない。口腔癌には大きく分けて水平的に広がる癌と垂直的に増殖をきたす癌がみられるが、その細胞学的な性質の相違を明らかにするべく、粘膜の上皮成分のみ分離した環境で口腔癌細胞の培養を行い、細胞学的解析につながる初期癌浸潤モデルの開発を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	0	1,600,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

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：口腔扁平上皮癌、基底膜、口腔癌モデル、無細胞真皮

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の治療成績は近年めざましく向上したが、進展例では必ずしも良好な結果が得られるとは限らず、たとえ癌を制御できたとしても重大な審美障害や機能障害を後遺し、社会復帰が困難となる場合も少なくない。癌を前癌病変あるいは早期癌の段階で発見し早期治療ができれば、良好な予後と機能温存とが両立できるが、実際には自覚症状に乏しいこれらの段階で病院を訪れる患者はそれほど多くない。

口腔内には口内炎の他、扁平苔癬、白板症、紅板症など、びらんや白斑を示すさまざまな

粘膜病変が発生する。これらの多くは歯や義歯による機械的刺激、飲食物や喫煙などによる化学的刺激などによる反応性の病変、あるいはアレルギー性炎の一種であるが、白板症の一部や紅板症は前癌病変ととらえられている。口腔扁平上皮癌では癌周囲粘膜にさまざまな程度の上皮異型を伴うことが多く、先行する前癌病変から上皮内癌を経て発生する、いわゆる sequence 癌が多数を占めると考えられるが、一方で上皮異型や上皮内進展像を伴わずに最初から垂直的増殖をきたす non-sequence 癌もみられる。しかし、sequence 癌と non-sequence 癌の細胞学的性

質や初期浸潤像の相違については明らかにされていない。

最近ルゴールやトリジンブルー溶液による生体染色法を口腔癌あるいは前癌病変の補助診断に応用しようとする試みが口腔外科領域でもなされるようになった。当科の検討でも、ルゴール不染域を示す粘膜は中等度以上の上皮異型を有し高率に p53 蛋白の異常や細胞増殖能の亢進を認めることから、前癌病変の可能性が高いことを報告した(2006年口腔腫瘍学会総会、2006年日本口腔外科学会総会、日本口腔外科学会雑誌投稿中)。しかし、ルゴール染色は上皮顆粒層のグリコーゲンの代謝異常を指標としているため、必ずしも癌化と関連しないこともある。良性の粘膜病変と前癌病変の鑑別は上皮異型の有無などにより判断されるが、炎症を伴った粘膜では診断に苦慮することも少なくない。炎症の影響を排除して上皮細胞そのものを鑑別に観察する方法があれば、炎症性の上皮細胞と前癌性の上皮細胞とを正確に鑑別することができるものと考えられる。

申請者らの施設ではこれまで自己正常口腔粘膜を AlloDerm (ヒト無細胞性新鮮屍体真皮) とともに複合培養し、得られた培養粘膜シートをさまざまな手術により欠損した口腔粘膜に移植するという臨床研究を施行してきた(平成 14~16 年度高度先進医療開発経費 B 研究「培養複合口腔粘膜を用いた口腔機能の再建」)。これまで約 30 名の口腔粘膜白板症や初期癌などを有する患者に実施してきたが、培養の手技は確立し、培養粘膜作成にはほぼ 100% の成功率が得られるようになった(2005 年口腔粘膜学会、2005 年口腔外科学会、2005 年形成外科学会で報告)。白板症や前癌病変の複合粘膜培養については数例の予備実験を行ったが、正常粘膜と同様、AlloDerm 上で培養することは可能で、培養した複合粘膜を病理組織学的に確認すると重層扁平上皮の組織構築が再現されることを確認している。しかしこれら良性あるいは前癌病変を複合粘膜培養し観察したとする報告はみられない。

一方、口腔癌の生物学的な特性を考えると、癌細胞が上皮基底膜を破り粘膜下へ進展すると局所浸潤やリンパ節転移、遠隔転移を引き起こすことから、基底膜への浸潤が悪性化の初期像として最も重要な所見である。しかし、従来の癌の動物実験の多くは、ヒトの癌細胞を直接皮下組織に移植するモデルを用いており、基底膜破壊・浸潤というステップを除外したものとなっている。in vivo 浸潤モデルの報告も散見されるが、癌細胞の運動能を検討したり、コラーゲンゲルなどの基底膜を有しない基質への進展を検討するものが多い。口腔扁平上皮癌由来細胞(HSC-3)を AlloDerm 由来の基底膜への浸潤も観察さ

れることを確認した。さらにこの培養複合粘膜を動物に移植することにより、動物における癌の初期浸潤モデルが作製できるものと期待されている。

今回申請する研究は、これら当教室で行ってきたさまざまな研究の成果を踏まえ、1) 前癌病変や白板症、扁平苔癬などの粘膜病変上皮を AlloDerm 上で複合粘膜培養し、得られた培養粘膜を観察すること、2) 口腔癌患者から得られたさまざまな口腔癌組織(sequence 癌および non-sequence 癌)、および口腔癌由来細胞株を AlloDerm 上で複合粘膜培養し、初期浸潤像を観察すること、3) 得られた口腔癌由来培養複合粘膜をヌードマウスに移植することにより、in vivo における初期浸潤モデルを開発することを目的としている。

2. 研究の目的

今回の研究は扁平苔癬などの炎症性疾患、白板症・紅板症などの口腔癌の前癌病変、口腔扁平上皮癌周囲に広がる上皮性異型、口腔扁平上皮癌由来細胞株(HSC-2、3、4)、手術時得られたさまざまな口腔扁平上皮癌組織などから採取された上皮細胞をヒト無細胞性新鮮屍体真皮(AlloDerm)上に播種、一定期間培養を行い、再構築された重層扁平上皮を形態学的に観察するものである。研究機関内に以下の点を明らかにする予定である。

(1) 扁平苔癬に代表される炎症性角化症、慢性刺激によると考えられる過角化症、前癌病変と考えられる上皮異型などから得られた複合培養粘膜はどのような形態を示し、どのような相違があるのか組織学的に検索し、採取元の病変の組織所見と比較する。

(2) 良性病変、前癌病変、癌から得られた培養複合粘膜について、免疫染色により p53 蛋白、PCNA、Ki-67 の局在を調べ、各上皮の p53 遺伝子の変異や細胞増殖能などについて比較検討する。

(3) 口腔癌から得られた複合培養粘膜について、基底膜浸潤や MMP の局在・発現量などについて調べ、樹立細胞、sequence 癌、non-sequence 癌の間の差異について検討する。

(4) 口腔癌から得られた複合培養粘膜をヌードマウス皮下に翻転移植し、in vivo における初期浸潤像について、樹立細胞、sequence 癌、non-sequence 癌の間の差異について検討する。

皮膚の培養方法としては、3T3 細胞を支持細胞層として用いる方法、真皮に相当する部分にコラーゲンをを用い、表皮角化細胞を培養する方法、コラーゲン等の高分子材料によるスポンジ中に細胞を播種する方法などがある。口腔粘膜培養は 1980 年代より上田らにより、上記の培養方法を応用して様々な検討

がなされている。当科で行っている AlloDerm (ヒト無細胞性新鮮屍体真皮) 上での粘膜培養法は、1999年 Izumi らによって確立された方法で、不死化細胞である 3T3 細胞やウシの血清を用いないため、安全な方法と考えられ、臨床応用がすでに開始されている。さらに AlloDerm は細胞成分は存在しないが、基底膜などの構造は保たれていることが確認されており、その上で癌細胞を培養すると基底膜への浸潤像が見られることを確認している。

癌細胞を培養しさまざまな研究に用いることは古くから行われてきたが、前癌病変や口腔粘膜病変を構成する細胞を培養する試みはこれまでほとんど報告がなかった。一方、上に述べたように正常粘膜細胞をヒト無細胞性新鮮屍体真皮上で一定期間複合培養して増殖させ、採取元患者の手術時に欠損した粘膜部に再移植する試みが、最近いくつかの施設でなされるようになってきた。この方法を応用するとさまざまな口腔粘膜疾患や口腔前癌病変を培養することができるだけでなく、得られた複合培養粘膜は十分な強度を有することから、動物へ移植することも容易であり、*in vivo* での観察も可能となる。

今回申請する研究は、AlloDerm を用いた複合粘膜培養法を粘膜欠損の再建法としてではなく、(1) 口腔粘膜病変、特に前癌病変の診断に応用すること、(2) 口腔癌樹立細胞、sequence 癌、non-sequence 癌の基底膜浸潤像を *in vitro* および *in vivo* で観察することに利用するものである。本研究はほかに関連する研究のない、まったく独創的なものである。

複合粘膜培養法は、粘膜の上皮成分のみを分離し同種真皮上であり、実際の口腔内では無視できない様々な機械的、化学的刺激や粘膜下組織からの影響を完全に排除できるため、粘膜上皮自体の性質を再現することができる。そのため反応性の粘膜と前癌病変との違いが *in vitro* で明らかになり、口腔粘膜病変の診断を下す上で有用な診断法の一つとなることが期待される。さらに、同様の方法により口腔癌を複合粘膜培養し、さらに得られた複合培養粘膜を動物に移植することにより、これまでにはなかった新しい *in vitro* および *in vivo* 初期浸潤モデルの開発ができるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 良性、前癌性口腔粘膜病変の採取

口腔粘膜の白板症、紅板症、扁平苔癬、あるいは原因不明の白色またはびらん性病変を有し、切除が予定されている患者を対象とする。本研究の主旨や目的、方法等について十分なインフォームドコンセントを行い、文書による了解が得られた後に、対象症例に登録する。周囲粘膜に上皮内癌や前癌病変が広

く分布するタイプの口腔癌 (sequence 癌)、および上皮内進展がわずかで垂直的浸潤のみみられるタイプの口腔癌 (non-sequence 癌) に分類しておく。

切除に先立ち、10%ルゴール溶液による生体染色法を実施し、ルゴール不染域を認める場合は不染域を含むように切開線を設定する。摘出材料から、粘膜培養用として約 5×5mm 大の組織を採取する。残りはホルマリン固定を行い、組織切片を作成する。

対照として、反対側の同部位より 5×5mm 大の口腔粘膜を採取し、病変部と同様、一部を粘膜培養に、一部を組織切片にする。

(2) 複合粘膜培養

上記で採取した組織片を over night で 0.05%トリプシン溶液に浸漬することで、口腔粘膜の上皮細胞層は剥離し、基底膜並びに基底膜上の未分化な細胞層が露出される。上皮細胞層が剥離した状態の組織片を同濃度のトリプシン・インヒビター溶液中に浸すことでトリプシンの作用を止め、この後トリプシン・インヒビター溶液中で露出した基底膜上の細胞層をメスなどにより機械的に擦過することにより細胞を採取する。

採取回収した細胞を BCDB-153 培地に播き、ディッシュを 2 日間静置し細胞の生着をはかる。細胞が生着したことを確認した後、培養液交換ならびに必要なに応じて継代を行い細胞数を増加させる。このようにした細胞は、このまま培養しても粘膜上皮は単層構造を示すのみで重層にはならないことから、次に AlloDerm (ヒト無細胞性新鮮屍体真皮) 上に新たに播種し、培養複合口腔粘膜の作製に入る。ここまでは培養液中のカルシウム濃度を低く (0.06mM) することで細胞の分化を抑えているが、AlloDerm 上に播種する時点からは高カルシウム濃度 (1.2mM) へ上昇させる。

播種後に 4 日間培養を行うことで AlloDerm 上には培養上皮細胞により連続した単層上皮の形成を認める。4 日後にこの培養粘膜は粘膜表面を空気にさらすことができる別のフラスコ (Air-liquid interface) に移動して培養を続けることにより、単層であった上皮が徐々に重層化をはじめ、約 10 日後には口腔粘膜に類似した角化様式を呈することが分かっている。14 日後に培養粘膜を AlloDerm ごと取り出し、一部をホルマリン固定し、組織切片を作成。残りを後述のマウス移植実験に用いる。

(3) 組織学的、免疫組織学的検索

上記で得られた培養複合粘膜について HE 染色および p53、PCNA、Ki-67、MMP の免疫染色を行い、組織学的観察や p53 遺伝子変異の有無、細胞増殖能、基底膜浸潤の検討を行い、採取元の組織と比較する。

(4) マウスにおける早期浸潤モデル

上記で得られた培養複合粘膜を、ヌードマ

ウス皮下に翻転移植し、1週、2週、3週、4週後にマウスを安楽死させ、移植部を採取、癌細胞の浸潤像について組織学的に検索し、in vivo 早期浸潤モデルになり得るかどうかが検討を行う。

4. 研究成果

(1) AlloDerm 上での HSC-3 細胞と正常上皮細胞の病理学的特徴

AlloDerm は細胞質の構成要素は全くなく、組織学的には大きさのさまざまな緻密なコラーゲンの束から成り立っており、細胞外基質の構造上の完全な状態は損なわれていないことが分かっている。また、細胞培養を行わず AlloDerm のみを免疫染色した場合、ラミニンとタイプ 4 コラーゲンが AlloDerm の最表面に連続的に存在していることが示された。

この AlloDerm 上にヒト由来の正常上皮細胞と舌扁平上皮癌由来の細胞株 HSC-3 細胞を播種して 11 日目、18 日目、25 日目に組織を取り出し、ホルマリン固定後 H-E 染色と免疫染色にて病理組織学的に検討した。

播種から 11 日目、H-E 染色像で正常細胞播種群は角化細胞の薄い層になっていた。HSC-3 腫瘍細胞は真皮にはまったく浸潤しておらず、AlloDerm の表面で連続的な単層の細胞層を形成したのみであった。このとき免疫染色を行うと、ラミニンとタイプ 4 コラーゲンは HSC-3 細胞と AlloDerm の間に存在していた。

18 日目には正常細胞では上皮層は重層化しはじめ、最表層は平坦になり、エオジン好性の錯角化のような外観を呈した。一方、腫瘍細胞の播種したものでは AlloDerm の表面が不規則になり、AlloDerm 上の大部分の腫瘍細胞は立方形化あるいは扁平化しており、全体としては層をなしていたが、錯角化や真皮への浸潤は見られなかった。

25 日目、正常上皮細胞の組織学的な特徴は、18 日目のものと似ており、成熟した層構造の扁平細胞上皮を示した。腫瘍細胞の播種したものでは、一部の腫瘍細胞は重層化しており、AlloDerm の真皮の中へと深く移動、浸潤している部分が見られた。免疫染色ではラミニンとタイプ 4 コラーゲンの染色は減弱しており、腫瘍細胞が真皮へと浸潤しているところでは局所的にその染色は欠損していた。

また、選択的シクロオキシゲナーゼ

(COX-2) 阻害剤が腫瘍増殖を抑制するという報告があるが、上記の観察方法と同様の方法で、AlloDerm 上で COX-2 阻害剤である NS-398 を含んだ培地を用いて HSC-3 腫瘍細胞を培養した。実験期間中、上記に記したような浸潤像を示すことはなかった。

(2) In vivo でのヌードマウスにおける HSC-3 の転移活動能

In vivo での HSC-3 の転移をみるために、ヌードマウスに (1) で培養した同様の HSC-3 細胞を移植した。

HSC-3 移植後 8 週間においては、肉眼で見える変化としては局所リンパ節あるいは肺では認められなかった。ヒトベータグロビン遺伝子を用いた PCR 分析では、リンパ節転移がマウスの 10 匹中 4 匹 (40%) に認められ、肺転移は PCR 分析によって 10 匹中 3 匹 (30%) のマウスに認められた。これらの結果は以前報告されたものと類似していた。

(3) 他の腫瘍細胞を用いた検討

現在の早期浸潤モデルの作製を継続しており、他の口腔癌由来細胞でも同様の結果が得られてきている。今後はさらに多種の腫瘍細胞に加え、インフォームドコンセントが得られた臨床材料を用いて行う予定である。また免疫染色についても、他の抗体も用いて、その詳細を解明していくこととしている。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南川 勉 (MINAMIKAWA TSUTOMU)

神戸大学医学部附属病院・助教

研究者番号：10397804

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者