

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18741

研究課題名（和文）口腔粘膜上皮の異型形質獲得過程における上皮-間質クロストーク

研究課題名（英文）Epithelial-stromal crosstalk during acquisition of atypical phenotypes in oral mucosal epithelium

研究代表者

辺見 卓男（Henmi, Takuo）

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：20814883

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）：口腔粘膜が癌化する過程では、異型上皮の出現に伴って間質にも形質・構造の変化が生じる。本研究では、異型上皮と間質細胞間の相互作用（上皮-間質クロストーク）の実態を明らかにする目的で、初期の粘膜表在性病変を対象として上皮異型形質と間質要素の関連性を検証した。舌表在性病変の組織解析により、異型上皮における癌抑制遺伝子p53分子の発現様式が異なること、また、健常上皮から異型上皮へ移行する領域において粘膜在位の抗原提示細胞の分布局在が変化することを明らかにできた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌の罹患者数は、特に高齢化が加速する本邦においては増加傾向にあり、早期転移での死亡率が高い現状からも早期発見につながる診断指標の検索が急務である。本研究の成果は、癌抑制遺伝子p53発現を病変領域全体の発現様式から捉えることにより癌形質を区別しうること、また、初期の表在性病変において周囲の間質環境に微小変化をきたしていることを示した。これらの知見は、早期病変の診断指標となるとともに、治療戦略を講じるうえで重要と考えている。

研究成果の概要（英文）： In the process of malignant transformation of the oral mucosa, morphological/structural changes occur in the stroma along with the emergence of atypical epithelium. To clarify the interaction between atypical epithelium and stromal cells (epithelial-stromal crosstalk), this study investigated the relationship between atypical epithelium and stromal elements in early mucosal lesions. Immunohistochemical analysis revealed that the expression pattern of p53 tumor suppressor gene is varied in atypical epithelium, and that the distribution of antigen-presenting cells changes in the transitional region from healthy epithelium to atypical epithelium.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔癌 扁平上皮癌 癌微小環境 早期悪性病変 異型上皮 間質応答

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜の扁平上皮癌(口腔癌)は、早期にリンパ節転移をきたし生命を脅かす。口腔は直視・直達でき、歯科医師が視診や触診により異常に気付くことが多いため、早期発見が期待される。しかしながら、口腔癌を早期に発見、治療できたにも関わらず再発をみる症例や、別の部位に新たな病変が多発する例がある。これらの事象は「Field 発癌」の概念として説明されており、不連続の刺激を受けている粘膜上皮では、遺伝子変異が誘発・蓄積されて広範囲で癌に移行しうる素地(前癌病変)が形成されていると考えられている。ただし、口腔癌でもっとも怖いのは、早期にリンパ節転移をきたす点であり、粘膜局所の小さな病変であっても生命を脅かす危険性を伴っている。

ごく初期の悪性病変について、病理組織学的な観点では、上皮の組織形態に基づく悪性度の判定が難しいことが問題となっている。この理由として、口腔粘膜の癌は重層扁平上皮としての分化・階層構造を保ったまま進行する例が多いこと、また、刺激因子の曝露機会が多い口腔粘膜では可逆的な異型変化(反応性異型)をきたしていることが挙げられる。この「腫瘍性異型」と「反応性異型」の鑑別は病理診断分野で未解決の命題であるが、予後推定の精度、すなわち治療戦略の選択に直結するため、患者の負担を軽減するためにも異型上皮成立機序の解明は喫緊の課題である。

このように、普遍性・再現性のある異型判定基準が模索されるなか、近年では、異型上皮自体ではなく、上皮以外の周囲の結合組織の変化に関心が集まっている。初期の消化器粘膜病変では、上皮下を走る微細な血管網が蛇行するなどの形態変化をきたすため、この変化を検出する内視鏡技術が早期発見に応用されている。その他、不断に刺激を蒙る口腔粘膜では、炎症性細胞の集簇、種々のサイトカイン・増殖因子の介在により、血管・リンパ管自体も反応性変化をきたしていることが推察される。一般に、癌組織における実質(癌細胞)と間質(非腫瘍性の支持組織)の関係において、癌細胞から発せられるシグナルにより間質組織が癌の進展に有利な「癌微小環境」を構築することが判明している。これらの状況を踏まえると、粘膜癌化プロセスの初期において、異型上皮と間質を構成する細胞間でどのような分子クロストークが行われているのか、という点を追究することがリンパ節転移に至る前の早期診断を実現するうえで重要と考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、粘膜癌化プロセスの初期における上皮の異型変化が上皮下の間質細胞に影響を与えると想定し、舌表在性病変における異型上皮-間質要素間相互作用(上皮-間質クロストーク)の実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

解析対象として、舌表在性病変の外科切除検体 30 例(病理診断として上皮性異形成、上皮内癌を含む)を日本歯科大学倫理委員会承認のもとで同大学附属病院にて採取した。検体組織は、病変全域を系統的に病理組織診断するため 3 mm 幅で割断し、全割断試料からパラフィン包埋連続薄切標本を作製、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行った。また、隣接する切片に対して、上皮形質マーカー/Cytokeratin 13 (CK13)、増殖活性マーカー/Ki-67、癌抑制遺伝子/p53、樹状細胞マーカー/HLA-DR、Langerhans 細胞マーカー/Langerin、リンパ管内皮マーカー/Podoplanin、HEV 様脈管マーカー/(シアリルルイス糖鎖抗原 MECA-79)の特異抗体を用いて免疫組織化学的検索(免疫染色)を行った。染色条件のポジティブおよびネガティブコントロールにはヒト正常組織および口腔腫瘍病変を載せた組織アレイブロックを使用した。組織観察では、病変切除に際して設定された安全域の上皮組織を健常相当上皮とした。

研究代表者は、先行研究において診断マーカーの発現・局在パターンの統合解析システムを確立しており、この手法を応用して、検体全域でのマーカー分子の発現分布パターンを記録、各マーカー発現情報を解析に供した。免疫染色における陽性反応の局在に基づいて定性評価(スコア判定)を行い、異型度区分も設定した。染色態度が明瞭な場合は陽性判定が容易であるが、検出対象分子によっては陽性反応の強弱差が激しく、客観的な判定が必要となる場合がある。この対応として、研究代表者らの研究グループが確立した染色画像からの色調抽出と組織要素の分画(ラベリング処理)により定量判定する方法を本研究でも適用した。組織構造解析では、上皮層構造に基づく標本分類と免疫担当細胞の分布パターン比較のため、染色画像を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、画像演算処理システム(RATOC 社; TRI-SRF、NIH; ImageJ/FIJI を使用)で組織変化の形態計測を行った。

4. 研究成果

(1) 舌表在性病変における異型上皮形質

全摘切除された舌の組織診標本（病理診断の確定した口腔上皮性異形成および上皮内癌の上皮領域）について、H-E 染色所見として組織形態学的に判別可能な異型変化を記録後、連続する切片の免疫組織化学データと照合した。この作業は、本研究課題の申請に向けた予備検討から継続しており、病変組織の上皮層領域を 500 μm 幅に区画して健常相当～高度異型の 4 段階で判定する確立済みの手法を使用した。先行研究で明らかにしてきた上皮細胞骨格 CK13 と増殖活性マーカー Ki-67 の発現局在を基盤として、今回 p53 陽性所見の追加により形態変化として現れない初期の異型形質変化の可能性について検討した。

免疫組織化学的な異型判定結果（CK13 発現消失と Ki-67 発現亢進）を H-E 染色で認知できる異型細胞局在と重ねると、高異型度の細胞集団を中心として周辺に低異型度の細胞集団が広がる単中心性病変、健常相当上皮から異型上皮への急な形質移行を伴った側方伸展様式を示す病変、検体全域が軽度異型を示すなかで高異型度細胞集団がパッチ状に点在する多中心性病変、に大別できた。この異型細胞局在のパターンの多様性からも、CK13 や Ki-67 の所見だけでは捉えきれない不顕性の形質変化が示唆される。癌細胞表現型の基盤を制御する癌抑制遺伝子 p53 を検出した結果、p53 陽性核が上皮層下層に少数点在する部位を健常相当、上皮層下層で連続して局在する部位を陽性領域と定義すると、検体のほとんどが p53 陽性領域を含んでいることがわかった。加えて、局所的に p53 陽性核が上皮層内で多層化した部位がみられ、その多くは H-E 染色で高度異型を示す領域の周辺部に散在するほか、形態学的に健常相当の上皮領域でもみられることがわかった。この所見からは、パッチ状の異型細胞集団が増殖・癒合して側方拡大していくフィールド形成の様子が示唆された。また、検体中央部に異形成上皮をみる単中心性病変では、異型領域外周の健常相当領域が広範囲に p53 発現陽性となっており、中央の異型領域ではほぼ p53 陰性となっていた。この傾向はすべての異型区画における p53 陽性領域割合を算出した結果でも確かめられ、高度異型を示す上皮領域は概ね p53 陰性を示すことが明らかとなった。p53 発現パターン解析の興味深い結果として、増殖活性の高い Ki-67 陽性領域との相関は低い一方で、p53 陽性細胞が連続する領域と CK13 発現低下領域との相関が高いことが判明した。p53 発現パターンは複雑多様であるものの、異型細胞プロファイルとして有用であることが示された。

(2) 舌表在性病変における間質細胞の分布局在

口腔粘膜上皮の異型形質獲得プロセスに影響を及ぼしうる間質要素として、上皮層・結合組織層に存在する樹状細胞や Langerhans 細胞に着目した。抗原提示作用をもつこれらの細胞は、上皮細胞に異型形質をもたらす種々の刺激を受容しており、上皮間質環境の変容に關与している可能性が高い。舌表在性病変の免疫組織化学で HLA-DR 陽性抗原提示細胞を検索したところ、HLA-DR 陽性を示す大型の細胞が上皮層内および上皮下結合組織に点在している所見が得られた。特に健常相当上皮と比べて、上皮性異形成病変では HLA-DR 陽性細胞数が多い傾向を示した。さらに、上皮層内に限局する Langerhans 細胞を特異的マーカー Langerin に対する抗体を用いて検索したところ、健常上皮領域と異型上皮領域における Langerhans 細胞の分布・局在は同等であった。しかしながら、連続薄切切片の免疫染色から組織立体構築を行って組織空間での分布の様子を観察した結果、健常異型上皮の境界領域で Langerin 発現陽性細胞の密度が高まっていることが判明した。これらの観察結果から、異型変化の進む粘膜組織では、粘膜在住の間質細胞局在がバランスを崩した間質素地となっていると考えられた。

次に、血管間質に着目して脈管内皮の検索を行った。消化器粘膜の初期病変では、上皮下の微小血管網に形状変化が生じており、この変化には異型上皮由来のシグナルが関与すると考えられてきた。近年では、口腔癌の間質組織変化として、本来リンパ節に存在する高内皮細静脈（HEV）と類似した形質を示す脈管の出現が報告され注目を集めている。そこで、HEV 様の脈管表現型について、シアリルルイス糖鎖抗原の特異抗体 MECA-79 により舌表在性病変における陽性細胞の局在を確かめたところ、主に潰瘍等の炎症部位近傍に出現が認められ、異型上皮局在との相関は低いことが明らかとなった。観察対象とした舌表在性病変は、形態変化も乏しいごく初期の病変であったことから、明確な間質細胞表現型の変化に至っていない可能性が示唆された。

(3) 口腔粘膜組織 *in vitro* モデルの解析

実験遂行に十分な研究期間が確保できなかった都合により、動物モデルを用いた実験計画を見直し、研究代表者の出身研究室と連携してオルガノイド系を用いた上皮-間質間相互作用の解析を試行した。口腔粘膜組織由来の線維芽細胞株、血管内皮細胞株、リンパ管内皮細胞株を用いて口腔粘膜の間質環境を模したオルガノイドゲルを作製し、異型上皮との相互作用について形態観察・免疫組織化学での検証を目指した。間質オルガノイドは、1 型コラーゲンを含むハイドロゲル中で培養 4 日頃から脈管網を形成し、培養 7 日頃まで脈管のリモデリングが観察でき

た。この間質オルガノイドに異型上皮の代替として種々の口腔癌細胞株から作製したスフェロイドを接触させて培養を行った。結果として、いずれの条件においても間質オルガノイド側の顕著な形態学的変化は観察できなかった。なお、この実験条件では癌細胞の組織浸潤は生じないが、オルガノイド境界面での基質接着やスフェロイド自体の分化成熟に違いが認められており、用いる細胞の形質によって間質環境との相互作用に違いが生じる可能性は残されている。本実験条件下で実証するには至っていないが、分子発現レベルでの差異が生じていると考えている。

(4) 総括

病理診断の分野で未だ確立されていない早期悪性病変の普遍性・再現性のある判定基準の策定を目指して、ヒト舌表在性病変のマーカー分子発現の整理を中心に組織所見の検索を行った。本研究課題の申請当時は、粘膜上皮の癌化を早期に検知するため、分子発現レベルでの微小な形質変化を捕捉・記録できる動物モデルの作出を予定していた。パンデミックによる資材の入手困難も重なって当初計画していた動物実験モデルでの検証には至らなかったが、異型上皮の形質変化の多様性、間質の抗原提示細胞や脈管内皮形質に生じる微小な変化を捉えることができた。p53発現と周囲の組織応答について直接的な関連性を突き止めることが今後の課題であるが、本研究の成果を総括して、健常上皮から異型上皮への形質変化に対して、比較的限局した範囲で周辺細胞が応答して間質環境を構築していると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Henmi Takuo, Machida Tomomasa, Takeda Munenori, Kitazume Eri, Inomata Toru, Ishigaki Yoshiki, Shoji Hirobumi, Soeno Yuuichi, Izumo Toshiyuki, Yagishita Hisao	4. 巻 32
2. 論文標題 Clinicopathological study of pT1/T2 tongue squamous cell carcinoma: Correlation between its invasive pattern and prognosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Japanese Society of Oral Oncology	6. 最初と最後の頁 63 ~ 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5843/jsot.32.63	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 猪俣徹, 田中淳平, 里見貴史, 辺見卓男, 出雲俊之, 柳下寿郎
2. 発表標題 高齢口腔癌患者に対する手術適応についての検討
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辺見卓男, 田中淳平, 猪俣徹, 澁井武夫, 出雲俊之, 柳下寿郎
2. 発表標題 顎骨中心性癌の病理診断
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 猪俣徹, 田中淳平, 里見貴史, 辺見卓男, 出雲俊之, 柳下寿郎
2. 発表標題 Stage ・ 口腔扁平上皮癌症例における予防的頸部郭清術の選択基準は？
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳下寿郎, 辺見卓男, 猪俣徹, 田中淳平, 出雲俊之
2. 発表標題 その口腔上皮性異形成は本当に癌化する?
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳下寿郎, 辺見卓男, 出雲俊之
2. 発表標題 口腔上皮性異形成
3. 学会等名 第40回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関