

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月30日現在

機関番号：17701
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592337
 研究課題名（和文）：口腔粘膜前癌病変の初期遺伝子変異の解明
 研究課題名（英文）：Analysis for genetic alteration of oral precancerous lesions
 研究代表者：仙波 伊知郎（SEMBA ICHIRO）
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：60145505

研究成果の概要（和文）：

広域発癌の動物モデルとしての口腔扁平上皮の多段階発癌のモデルが確立できたといえ、肉眼変化と組織変化との対応が可能であり、時期と部位差も検討できた。

広域発癌における前癌病変は、隆起性の限局病変に対して、びまん性の背景病変として認められる。発がん剤の連続投与では経時的に増強し、浸潤癌の発生まで多段階の過程を経る。一方、発がん剤の投与を中断すると、上皮異形成は減弱するが、現局性隆起病変は発生し、浸潤癌も発生した。

さらに、前癌病変におけるDNA二重鎖切断修復に関与する因子の高発現を見いだし、前癌病変段階では、浸潤癌とは異なる発癌過程に重要な因子であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we successfully established field-cancerization animal model of tongue carcinoma. The model provides well compatibility of macroscopic and microscopic findings and analysis for chronological and site specific changes of the precancerous lesion. In this model, the precancerous lesion shows diffuse epithelial dysplasia and the grade of histological atypia was increased during the carcinogen administration period, although interruption of the administration of the carcinogen brought decrease the atypia but further advanced lesions such as focal protrude lesion and invasive carcinoma.

There is high level expression of genes related with double strands DNA damage repair in the precancerous lesions, and it suggests that different properties from in the invasive carcinoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔癌前癌病変、4NQO誘発ラット舌癌モデル、遺伝子変異、遺伝子発現異常
 RT-PCR、免疫組織化学、病理組織形態、DNA損傷修復

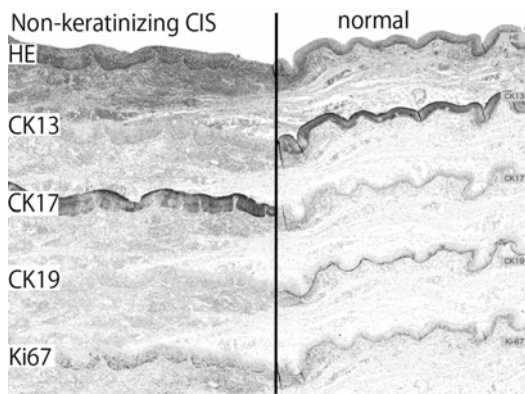
1. 研究開始当初の背景

これまで癌組織における遺伝子変異の検索は組織型との相関とともに数多くなされてきているが、前癌病変や形態学的変化が明らかでない初期における遺伝子変異は、未だ不明な点が多い。病理組織診断における前癌病変の形態学的診断基準の策定や分子マーカーとなる遺伝子変異を明らかにすることは、手術断端の評価にも有用であり、予後因子としても重要である。しかし、このような初期変化をヒトで解析することは極めて困難であり、特に形態変化が明らかでない段階の遺伝子変異は実験モデルでの解析が欠かすことが出来ない。一方、実験モデルにおける候補因子をヒトでも解析する必要がある。

ヒトにおける口腔粘膜扁平上皮癌の前癌病変および境界病変の病理組織診断は、主に細胞異型度を中心に診断されているが、度重なるWHO指針改訂に伴い指標項目が増やされ、必ずしも口腔扁平上皮の組織構築と組織分化の特徴に基づいて検討されてきたとはいえない。また、口腔粘膜の部位特異性に考慮したものではない。

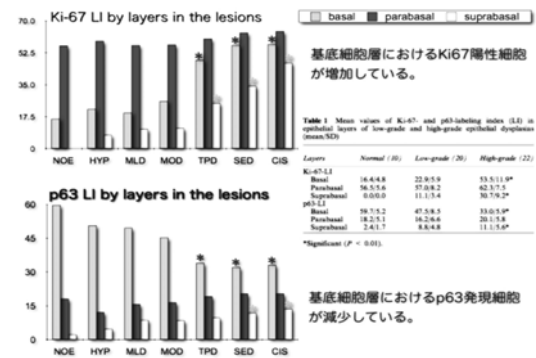
このような現状に対応するため日本口腔病理学会 (JAOP) において口腔前癌病変の病理組織診断基準の策定を試み、更に、口腔腫瘍学会では、口腔癌取扱い規約を策定し、病理組織診断基準を再評価中であるが (JSOP, CIS catalog, 2006)、この中でサイトケラチン

(CK10/13 や CK17) の発現パターンや Ki-67 陽性細胞の分布などにより、病変の境界を見いだすことが出来るようになってきた。



また、ヒト前癌病変における増殖細胞と扁平上皮幹細胞の動態と形態学的な異型度との関連について免疫組織化学および組織計測によって、扁平上皮における前癌病変の進展により、幹細胞機能の異常と増殖細胞分布が扁平上皮の層序の変化と共に見られることを明らかにした (J Oral Pathol Med, 35:369-375, 2006)。

一方、これまでに本研究分野では継続して口腔癌発がんモデル系統ラットを用いたゲノ



ムレベルの発がん感受性の解析を行っており、特に発がん好発系統 (DA) と嫌発系統 (WF) を見だし、系統差に基づく QTL 解析により、発がん感受性に関連する候補 QTLs を同定し (Int J Cancer, 102(6):638-42, 2002)、発がん剤である 4NQO の代謝に密接に関連する NQO1 と発がんの関連を明らかにした (Cancer Letters, 231:185-91, 2005)。

さらに、前癌病変における発がんに関連する転写因子の発現について、特に JunB と c-fos の過剰発現を見出した (Pathol Int, 54(1):35-40, 2004)。しかし、これまでの検討は、浸潤がんが発生する時期における癌周辺異型上皮を主に前癌病変として扱っているが、発がん剤暴露初期における上皮の変化を捉えることが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は口腔粘膜扁平上皮癌の前癌病変におけるエピジェネティック変異を含む遺伝子変異の初期変化を明らかにし、前癌病変の早期診断や早期治療に資することである。

特に発がん剤暴露初期における粘膜上皮の変化を捉えるモデルの確立が重要である。

3. 研究の方法

(1) 動物: 5 週令の近交系 Dark-Agouti ラット (雄性、日本 SLC) を 66 匹用いた。

(2) 発癌実験: 10 mg/L の 4NQO を連続経口投与し、4, 6, 8, 10, および 12 週の連続投与実験群と水投与の対照群を作成した。6 週から 12 週の実験群では、4NQO 投与後に水を継続して投与し、4NQO 負荷を除去した中断群も作成した。

投与実験中、毎週、舌粘膜の肉眼変化を撮影、観察し、解剖した。これらの動物実験は鹿児島大学動物実験委員会の承認に基づいて実施した。

舌粘膜は実体顕微鏡下で剖出し、核酸の抽出には舌粘膜上皮のみを切除した。組織標本は

4 °C、PBS 緩衝 (pH 7.4) 4% パラフォルムアルデヒドで固定後、通報に従ってパラフィン包埋し、HE 染色と各免疫染色を行った。

(3) 免疫染色 : GST-p (MBL)、CK13 (Progen)、CK14 (Novocastra)、Rad51、p53 (SANTA CRUZ)、Ki-67 (Dako) を用いた。GST-p 以外は抗原賦活化のため熱処理を行った (1 mM、pH 8 の EDTA 中で 130°C、3 分間加圧加熱)。

(4) 核酸抽出 : 実体顕微鏡下で舌粘膜を剥離し、局所病変は High Pure RNA Tissue Kit (Roche)、背景病変は ISOGEN (Nippon Gene) を用いて RNA と DNA を抽出した。

(5) リアルタイム PCR : Takara TP-900 (TaKaRa Bio) を用いて、Taqman Gene expression Assay (ABI) により発癌過程の初期に重要と考えられる癌抑制遺伝子や DNA 損傷修復に関連する遺伝子 *Tp53*、*Rad51*、*Rad23b*、*Tdp1* の発現量を測定した。測定法は比較 Δ Ct 法を用いた。また、cDNA アレイ (Qiagen) による発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 舌粘膜の部位差

粘膜病変が生じる舌背部の粘膜上皮は、糸状乳頭構造を持つ。この糸状乳頭構造の密度、大きさ、組織構築によって、前方部、中央部、後方部に分けることができる。前方部では幅が狭く丈の低い乳頭が高密度に配列し、中央部では前方部に比較して幅の広い大型の乳頭が、比較的粗に配列している。中央部と後方部の境界に当たる隆起部では乳頭の組織構造の前後方向が逆転している。後方部では比較的角化が乏しく、幅の狭い乳頭が高密度に配列している。

(2) 舌粘膜の初期変化

4NQO 投与 2 週までに、一過性の体重減少が見られた。同時に、舌尖部の粘膜に水泡形成やびらんが認められた。これらの病変部位は水摂取時に見られるリップングにより給水管が接触する部位であり、4NQO の直接作用による一過性の炎症性変化で疼痛による摂食障害により一時的な体重減少が生じたと考えられた。

これらの炎症性変化は 2 週以降にびらん面の上皮化と共に終息し、以後は明らかな炎症性細胞浸潤は認められなかった。また、舌尖部以外の部位では、2 週までに変化は認められなかった。

① 前癌病変 : びまん性背景病変

4 週以降、びまん性背景病変が前方部から後

方部までに見られ、経時的にその変化が増加した。肉眼的にも乳頭の平坦化や薄い白斑として認められた (図 1)。



図 1 : 肉眼所見

組織学的には乳頭の平坦化、角化の低下と亢進の混在、乳頭幅の拡大、乳頭構造の癒合、上皮脚の滴状化など、主に乳頭の組織構造の乱れが生じていた。細胞異型は基底細胞と傍基底細胞の増加に伴い、核細胞質比の増加、細胞核の多形性、有棘細胞の核小体の明瞭化などが認められた (図 2)。

このびまん性背景病変は、上皮異形成から上皮内癌までの様々な段階の前癌病変であり、投与期間に従って経時的に、その異型度が高まっていた。

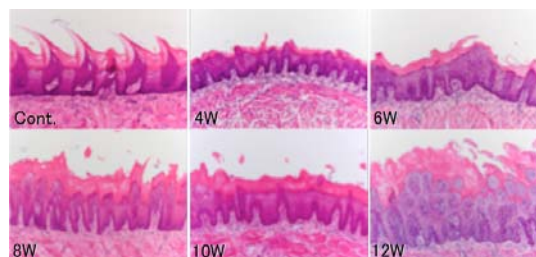


図 2 : びまん性背景病変の組織所見 (HE 染色)

② 前癌病変 : 局所性隆起病変

投与 6 週以降には、びまん性の背景病変に加えて、局所性の隆起病変が、中央部から後方部に発生した。組織学的には、細胞異型に乏しく過角化や上皮肥厚に留まるものから、細胞異型を伴う上皮異形成まで、様々な組織型が認められた。また、10 週以降では、肉眼的に隆起性病変として認められ、組織学的には浸潤性増殖を示す浸潤性の扁平上皮癌が認められた (図 3)。

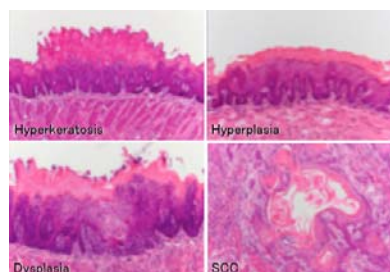


図 3 : 局所性隆起病変の組織像 (HE 染色)

また、投与中断群では、4NQO 投与 6 週後中断群では背景病変とともに隆起性病変が認められ、中断後 10 週では浸潤癌も発生した。

(3) 免疫染色所見

① GST-p は 6 週以降、背景病変の中に微小な領域に陽性となり、経時的に陽性領域の頻度と範囲が増加していた (図 4)。隆起性病変では過角化、上皮肥厚などの初期病変で陽性であった (図 5)。

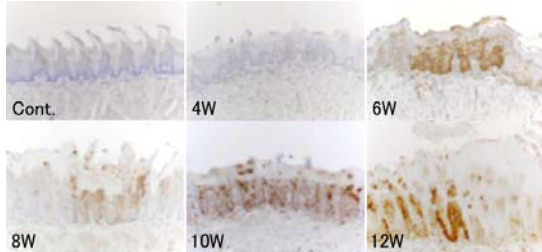


図 5 : 背景病変の GST-p 所見



図 6 : 隆起病変の GST-p 所見

② サイトケラチン (CK13 と CK14) の発現は細胞分化の指標として有用であり、基底細胞に陽性である CK14 は背景病変では経時的に傍基底細胞から有棘細胞までに陽性範囲が拡大し、細胞異型の程度と相関した (図 7)。

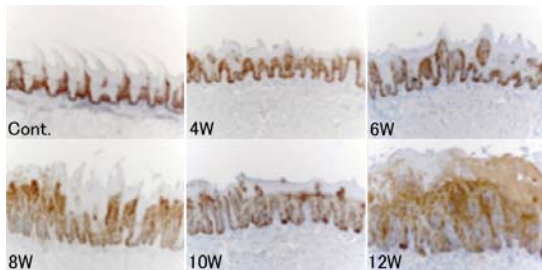


図 7 : 背景病変の CK14 所見

CK13 は有棘細胞から角化細胞に陽性であり、背景病変では細胞異型の程度とともに消失する傾向を示した (図 8)。

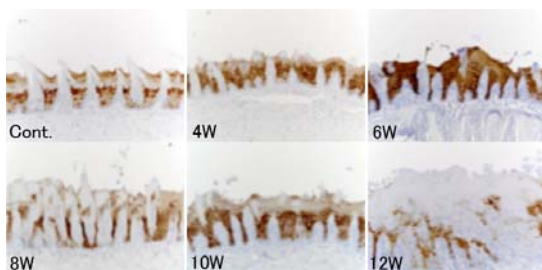


図 8 : 背景病変の CK13 所見

③ Tp-53 は背景病変では、散在性に少数の基底細胞に陽性であったが、局所性隆起病変では上皮異形成では、局所的ではあるが基底細胞以外の範囲にも広く認められた (図 9)。

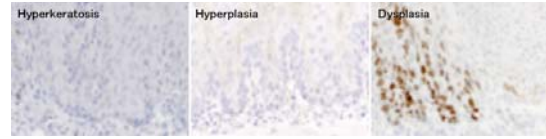


図 9 : 隆起病変の Tp-53 の所見

④ Rad51 は背景病変では、散在性に基底細胞に陽性であったが、局所性病変では基底細胞に限局しているが、陽性範囲が拡大していた (図 10)。

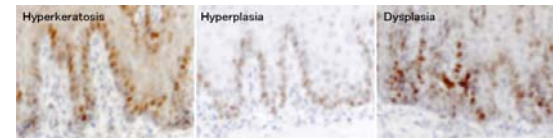


図 10 : 隆起病変の Rad51 の所見

(4) 遺伝子発現

① 背景病変における遺伝子発現

4NQO 連続投与群では、6 週以降、経時的にいずれの遺伝子発現も対照群に比べ発現亢進が見られ、特に *Tp-53* と *Tdp1* は経時的に発現が亢進していた (図 11)。

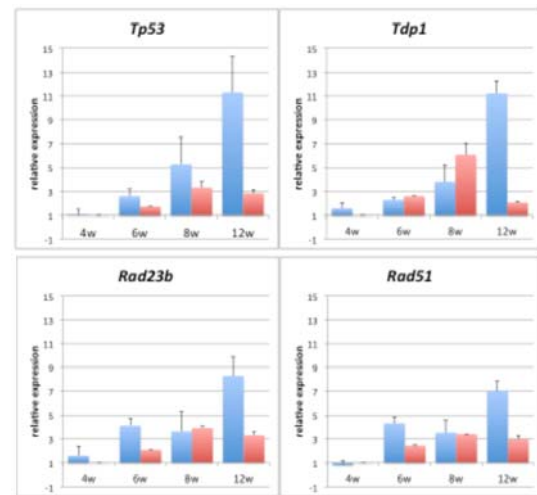


図 11 : 背景病変での遺伝子発現

(青 : 連続投与群、赤 : 投与中断群)

また、最も初期の背景病変が生じる 6 週における cDNA アレイによる発現解析では、DNA 修復関連遺伝子では、*Rad51* の発現亢進が認められた (図 12)。

② 隆起病変での遺伝子発現

隆起病変では、*Rad23* 以外の遺伝子発現が亢進していた。*Tp-53* は、浸潤癌では高値を示したが、隆起性病変での発現亢進は著しくはない。*Tdp1* と *Rad51* は初期の隆起病変である過角化病変から発現が亢進していた (図 13)。

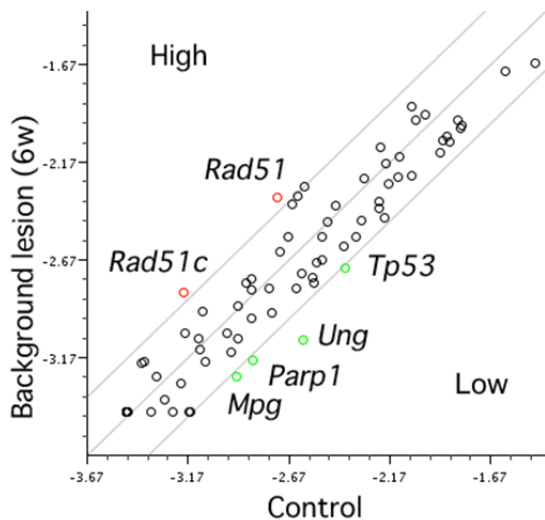


図 12 : 6 週の背景病変での cDNA アレイ解析

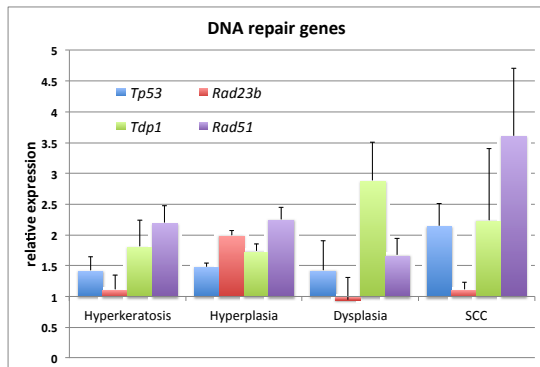


図 13 : 隆起病変での遺伝子発現

(5) 考察

① 病変発生の部位差

4NQO 誘発舌癌モデルでは、糸状乳頭が見られる舌背粘膜に病変が生じる。舌背粘膜の糸状乳頭構造は、前方部、中央部、後方部ではその大きさや密度などが異なっている。この組織合像の部位差が病変発生の部位差の基盤になっていると考えられる。最も糸状乳頭の密度が高く、角化が比較的乏しい後方部で、より高度な上皮異形成や浸潤癌の発生頻度が高い。これまでに、このような舌背粘膜上皮の組織構築の部位差について検討された報告はなく、今後、病変発生の部位差のモデルとして有用であると考えられる。

② 前癌病変の組織型

前癌病変を腫瘍性変化の初期段階と考えると、このモデルでは、前癌病変の全ての段階の病変を見いだすことが出来る。

最も初期に見られる舌尖部の炎症性変化は、その後に同部には浸潤癌に至る前癌病変の発生はほとんど見られないことから、この炎症性変化は発癌の必須条件ではなく、前癌病変とは考えられない。

このモデルでは、び慢性背景病変として、主に糸状乳頭の構造異型が初期から認められ、経時的にその異型度が高度化する。しかし、GST-p の発現は、初期では極限局した領域の基底細胞に認められるが、組織学的異型とは特に相関は認められない。この GST-p の発現は 4NQO 誘発発癌の最も初期の変化と考えられる。

び慢性背景病変の発生は、ヒトの口腔粘膜癌でも見られる領域発癌の有用なモデルと考えられる。経時的にその異型度は高度化するが、初期には主に構造異型が顕著で、細胞異型は乏しい。このような変化はヒトでは白板症として臨床的に捉えられ、前癌病変と反応性病変との鑑別は困難である。構造異型を反映してサイトケラチンの発現パターンの変化が認められる。特に基底細胞の発現する CK14 の発現パターンの変化は、経時的異型度の変化と相関しており、基底細胞様細胞が上皮層内に拡大する上皮異形成のマーカーとなると考えられる。一方、CK13 は異型度の高度化とともに発現が減弱するが、これは有棘細胞への分化が生じず、分化異常を反映していると考えられる。

局所性隆起性病変は、び慢性背景病変の形成後に、中央部から後方部に発生する。組織変化は過角化、上皮肥厚、上皮異形成など、多彩であるが、背景病変とは異なり、限局している。背景病変が構造異型を主体としているが、隆起性病変では増殖性変化がさらに生じていると考えられる。しかし、初期には細胞異型が乏しい。また、上皮異形成と考えられる隆起性病変は、上皮内癌と考えられる。この様に、これらの局所性隆起性病変は、び慢性背景病変とともに前癌病変から上皮内癌までの病変を含み、浸潤癌に進展すると考えられた。

この様に、この動物モデルでは、ヒトとは異なる舌背部粘膜に病変が生じるが、その組織型はヒト病変と類似し、また、経時的に多様な段階の病変が認められ、最終的には浸潤性の扁平上皮癌が生じる。

③ 遺伝子発現

前癌病変における遺伝子の変異と発現の異常を解明するためには、網羅的な全ゲノムの解析とその経時的な変異を明らかにする必要があるが、扁平上皮癌では基底細胞から角化細胞まで多様な分化段階の細胞を対象とするため、未だ困難である。

一方、このモデルでは、前癌病変から段階的に上皮内癌から浸潤癌に至る癌の進展が明らかになり、構造異型として認められる分化異常の段階を経て、上皮内病変から浸潤癌へ至る多段階、かつ発癌領域の形成が扁平上皮癌の発癌機構には重要である。

この事は、発癌初期の段階での多様な遺伝子変異の機構としての染色体不安定性、すなわち DNA 損傷修復機構の異常が重要であることを示唆している。今回の解析では、この DNA 損傷修

復機構に関連する遺伝子の発現について解析した。

前癌病変の初期段階であるび慢性背景病変では、DAN 一本鎖損傷修復に関連する *Tdp1* と癌抑制遺伝子である *Tp-53* は、経時的に発現が増加していた。初期段階では、4NQO による活性酸素などによる酸化的 DNA 損傷が前癌病変の形成に直接大きな役割を果たし、また、生体の適応としての遺伝子発現の亢進が生じると考えられる。

4NQO 投与中断群では、これらの遺伝子発現の亢進は低下するものの、対照群に比べ、発現は持続的に亢進している。また、中断群でも浸潤癌が生じることから、初期に形成される前癌病変には可逆的に排除される変異細胞と浸潤癌にまで進展する変異細胞が複合している事が考えられる。

び慢性背景病変の初期段階である 6 週では特に *Rad51* の発現亢進が認められた。*Rad51* は *BRCA1* 等と染色体相同修復機構に重要な役割を果たすとともに、DNA 二重鎖損傷修復にも重要であると考えられている様に、前癌病変の初期段階で、既に DAN 二重鎖損傷が生じ、染色体の不安定性が増していることが考えられる。中断群でも組織異型が生じ、浸潤癌が生じるのはこの初期段階の変異が持続するためと考えられる。

局所性隆起病変では、DNA 損傷修復関連遺伝子では *Rad51* とともに *Tdp1* の発現亢進が認められた。連続投与している 4NQO による新規の DAN 一本鎖損傷が加味されていると考えられる。浸潤癌では、さらに *Tp-53* の発現が亢進しているが、*Rad51* の発現も亢進している。これは背景病変の初期段階とは異なった傾向と云える。

確立した浸潤癌では、細胞増殖の亢進とともに細胞死も亢進し、特に口腔粘膜扁平上皮癌では高分化、すなわち角化傾向が強く、細胞死の頻度も高まっていると考えられ、*Tp-53* の高発現は細胞死の頻度の上昇に対応していると考えられる。一方、前癌病変では *Tp-53* の発現亢進は僅かであり、細胞増殖が亢進している浸潤癌とは異なり、構造異型に反映される分化異常が細胞増殖異常より重要な段階であり、*Tp-53* の変異や発現は低いものと考えられる。

④ 今後の展望

今回の解析で、口腔粘膜扁平上皮癌の前癌病変の動物モデルを確立するとともに、前癌病変初期段階での DNA 損傷修復機構に関連する遺伝子の発現亢進が明らかになった。

前癌病変の初期段階では、浸潤癌とは異なる病態があり、癌の最も大きな特徴である細胞増殖と浸潤増殖より、細胞分化と構造異型が重要であり、変異細胞はその環境の中で淘

汰されている。この前癌病変の中で、浸潤癌へと進展する変異細胞が生じ、また、維持されており、前癌病変は癌細胞を涵養する微小環境と云える。口腔粘膜上皮では微小環境として一定の広がり領域が必要とされると考えられる。それは、比較的更新速度が速い重層扁平上皮の特性に依存している。

前癌病変では基底細胞様細胞の増加と有棘細胞への分化抑制が生じており、その機構を明らかにする事が今後重要である。また、今回明らかになった DNA 損傷修復機構が持続的に亢進する環境は、変異細胞が細胞増殖の亢進を伴わない段階でも淘汰されることなく存続する事に寄与していると考えられるが、上皮内での微小環境と DNA 損傷修復機構の関係を明らかにする事が必要である。

今後、この前癌病変モデルを用いて *Rad51* を中心とした DNA 損傷修復機構と扁平上皮癌の分化抑制機構の関係を解明する予定である。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 親里嘉貴、平野真人、嶋香織、仙波伊知郎
4NQO 誘発ラット舌前癌病変モデル確立と前癌病変における DNA 損傷修復機構の解析。
第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 26 日、京王プラザホテル (東京都)
- ② Y. Oyazato, M. Hirano, K. Shima, I. Semba
Pathological analysis of precancerous lesion in 4NQO-induced rat tongue carcinogenesis experimental model.
第 22 回日本臨床口腔病理学会学術大会・総会、および第 5 回アジア口腔病理学会総会、2011 年 8 月 24 日、九州大学百年講堂 (福岡市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仙波 伊知郎 (SEMBA ICHIRO)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：60145505

(2) 研究分担者 (H21 まで)

平山 喜一 (HIRAYAMA YOSHIKAZU)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：50343364

(3) 研究協力者

親里 嘉貴 (OYAZATO YOSHITAKA)
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・RA