

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593067

研究課題名(和文) 舌扁平上皮癌の予後因子としてのリンパ管新生とリンパ管侵襲の臨床病理診断法の開発

研究課題名(英文) Development of clinicopathological diagnosis of lymphangiogenesis and lymphatic invasion as a prognostic factor in tongue squamous cell carcinoma

研究代表者

島津 徳人 (SHIMAZU, YOSHIHITO)

麻布大学・その他部局等・准教授

研究者番号：10297947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：舌癌のリンパ節転移機序の解明と臨床病理診断における予後判定基準を確立することを目的として、癌浸潤領域を含む連続薄切標本に多重免疫標識を施し、上皮要素、リンパ管内皮・血管内皮、間質要素を分画下力行地区を実施した。立体構築した腫瘍微小環境においては、連結した癌母集団および間質中に分散する大小の癌浸潤胞巣(Collective & Individual migration)の局在と胞巣構成細胞数、癌胞巣周縁と胞巣内部に分布する血管・リンパ管走行と組織内密度、Ki-67陽性核の局在と増殖活性、癌細胞による脈管腔の栓塞箇所を定量解析が可能となり、舌癌の予後判定に有用な組織計測データを得ることができた。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at developing clinicopathological diagnosis of lymphangiogenesis and lymphatic invasion as a prognostic factor in tongue squamous cell carcinoma. During the approved 3-year period, 3D reconstruction was achieved using 100 serial histological sections that were prepared from the invasion front of tongues squamous cell carcinomas. Cancer parenchyma and stroma were characterized by stepwise immunohistochemistry in combination with antibodies (cytokeratin, Ki67, CD31, D2-40, S100A4). 3D inspection in combination of epithelial and mesenchymal markers provided direct evidence for loco-regional invasion patterns, divergent intra- and peritumor microvessel densities, high frequencies of spatial association between carcinoma cells and blood/lymph endothelial cells. The results support the wide potential usage and advantage of histology-based 3D reconstruction in understanding of cancer biology and pathological diagnosis of tumor aggressiveness and malignancy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 病理学 舌癌 リンパ管新生 リンパ管浸潤 転移 病理診断 3次元形態計測

1. 研究開始当初の背景

口腔癌の大部分は口腔粘膜上皮に由来する扁平上皮癌であり、舌側縁が好発部位となり、早期に所属リンパ節に転移しやすく予後も悪い。舌扁平上皮癌の予後判定においては、臨床病理診断に基づく癌病変の広がり範囲と深達度、摘出断端と癌胞巣の浸潤先端との距離が注目されている。舌扁平上皮癌のリンパ行性転移の成り立ちを病理形態学的に明らかにするうえでは、腫瘍微小環境を構成する癌浸潤癌巣と血管・リンパ管走行を高精細に再構成し、癌細胞の脈管内侵襲部位を網羅的に検出するために、高分解能の組織画像を積層した立体観察と3次元形態計測が必要となってくる。研究代表者らはこれまでに、平成20～21年度若手研究B「口腔癌における血管・リンパ管の新生誘導と脈管侵襲の3次元形態解析」と平成22～23年度若手研究B「舌癌の浸潤・転移を制御する癌微小環境の3次元構造解析」の課題が採択されており、組織アレイ法による連続薄切標本の作製と特異抗体による免疫多重染色を習得するとともに、マニュアル操作を排除した組織立体構築システムを確立してきた。本研究では、これまでの立体構築法に高画質デジタル情報を取り入れて、舌扁平上皮癌の浸潤様式とリンパ管内侵襲の成立機序を明らかにすることを到達目標とした。

2. 研究の目的

本申請課題では、舌癌のリンパ管内侵襲の成立機序に関する作業仮説として、癌胞巣内部の狭い間質では腫瘍増殖圧によってリンパ管腔は圧平されており、機能的な循環機能を果たしておらず、癌細胞の侵襲にとっても不適であるが、癌胞巣周辺では新生リンパ管密度が高く、管腔も拡張しやすく、管腔内閉塞も起こりやすいことを想定した。この仮説を検証する目的では、最初に予後経過を含む臨床情報が揃っている舌癌症例を対象とし

て、癌微小環境における実質・間質構造の特質（癌胞巣の連結性と増殖活性、intratumor領域とperitumor領域での脈管密度と空間分布、癌細胞と脈管壁との接触頻度と管腔内閉塞の発生頻度）と癌症例の予後情報（所属リンパ節への一次転移・後発転移、遠隔臓器への転移の有無）とを照合することを設定した。本申請課題の到達目標のひとつとして、舌癌症例での解析例を蓄積するなかで、浸潤様式の分類とそれらの構造特性に適用する画像解析プロトコルを確立し、日常の臨床病理診断にも使える利便性や汎用性を実現することも計画した。

3. 研究の方法

舌扁平上皮癌の最深達部の領域を組織アレイヤーで3mm直径の円筒形に切り出し、自動切片送り機能を有した自動回転式マイクロームを用いて連続薄切標本（4μm厚、約100枚）を作製した。次にリボン状に連続して薄切されてくる連続薄切切片をスライドグラスに方位を揃えて配列（9連続標本×3列）した。この操作により、後述する免疫染色操作とバーチャル画像のデジタル記録を短時間に効率的に遂行できる。舌癌症例では、同じ症例においても実質・間質境界に沿って部位的に浸潤様式の多様性をともなっている。そのため、癌病変全域の浸潤様式の多様性を包括的に評価する目的で、各舌癌症例の最大割断面に相当する連続組織標本に多重免疫標識（CD31 D2-40 サイトケラチン ビメンチンあるいはFSP1）を施した。抗体反応についてはABC法により異なる発色剤（DAB茶色；Vector SG濃青色）で識別した。連続組織薄切標本全域の染色画像の染色像については、バーチャルスライド装置（対物×20）で記録した。立体構築にはRATOC TRI-SRF2ソフトとVG Studio Maxを使用し、癌胞巣の形状、脈管密度、間質構成細胞の空間分布について3次元形態計測を実行した。

4. 研究成果

(1) バーチャルスライドと多段階免疫染色を組み合わせた組織立体構築法

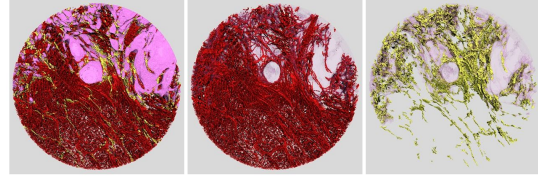
今回用いたバーチャルスライド画像の解像度(9000×7000ピクセル、0.46μm/ピクセル)では、CD抗原のように細胞膜表面上に局在する分子を分画することが可能であり、観察領域を3mm直径とした場合に、立体構築に使用する1枚のバーチャル画像は240MB程度に達するが、組織立体構築システム(TRI SRF2とVG Studio Max)と大容量画像データの演算処理のためのコンピュータ(DOS/V, CPU Xeon/3.0 GHz, 32 GB RAM, Win XP x64)を併用することで、バーチャル画像100枚を積層する立体構築も比較的短時間で処理できた。

(2) 免疫表現型に基づいた細胞の分画と空間局在

周辺舌粘膜から癌浸潤領域の免疫多重標識(サイトケラチン、Ki-67、CD抗原、細胞骨格など)と核染色(ヘマトキシリン染色)のデジタル画像を統合した立体構築プロトコールにおいては、血管内皮、リンパ管内皮、癌細胞をそれぞれ色調分画して3次元表示した。立体構築された癌組織空間(3mm径、4μm×108枚、3mm³の組織空間)においては、全構成細胞に相当する1~2×10⁶/mm³の細胞核を分画することができ、全構成細胞を対象とした増殖活性の局在のほかに、癌細胞の浸潤様式、脈管容積と間質内密度、癌実質と脈管内皮との近接度、脈管内への癌細胞の侵襲の有無について可視化と定量化が可能となった。

今回の立体構築・3次元構造解析では、画像積層処理と観察対象物の形状・色調抽出処理をすべて演算アルゴリズムに基づいて遂行しており、立体構築の精度と再現性の保証とともに、立体構築工程に要する労力・時

間も大幅に短縮することができた。



舌癌の浸潤先端部での組織立体構築
(癌実質 / 血管内皮 / リンパ管内皮)

(3) 舌癌浸潤先端部での微小浸潤胞巣の空間局在

浸潤先端部の立体画像観察では、舌癌浸潤様式として、周囲間質を圧迫するように増生する結節・圧迫型から、間質中に多数の孤立胞巣が分散する分離・分散型まで多彩な特徴を捉えることができた。

実質・間質の境界領域の3次元解析では、腫瘍母集団から分離した個々の癌細胞集団を分画したうえで、分離胞巣を構成する癌細胞数と増殖活性、および母集団の境界面からの最近接距離の計測結果から、実質・間質境界面から100μm範囲の空間内に配置する1,000個超の癌微小浸潤胞巣の解析結果において、単独の癌細胞から数百個の癌細胞集団が混在しており、境界面からの最近接距離に依存した細胞集団サイズの偏りはみられなかった。また、今回の結果から、上皮形質を保った癌細胞の浸潤様式として Individual migration と collective migration が共存しており、母集団から分離後に癌微小細胞集団サイズの増加をとまなうことが示唆された。

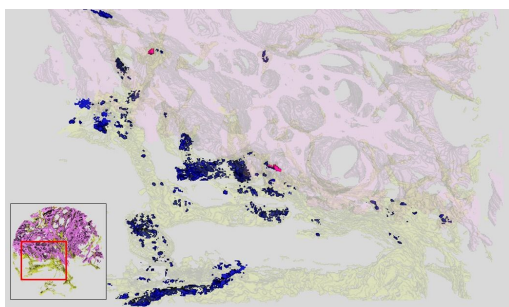
(4) 癌微小環境における血管・リンパ管新生

舌癌の浸潤先端部における血管内皮細胞(CD31)、リンパ管内皮細胞(D2-40)、上皮(サイトケラチン)および増殖活性(Ki67)を解析対象として、これらの免疫標識情報から免疫表現型に基づいて細胞要素を分画した。構築された立体空間内では、血管走行とリンパ管走行を分画したうえで脈管分岐構造を追跡できた。癌微小環境における、脈管

内皮細胞の増殖活性に注目してみると、特に、Intratumor 領域では、脈管新生を反映して血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞ともに増殖活性が亢進しており、Peritumor 領域に分布する新生リンパ管の内皮細胞は高い増殖活性を示すが、管腔構造が不明瞭にとどまるものが多かった。

(5) 癌胞巣によるリンパ管侵襲の多様性

特に、結節・圧迫型の舌癌症例では、実質・間質境界部において微小癌胞巣のリンパ管侵襲を検出することが多く、分離・分散型では癌胞巣内部の間質領域において癌細胞のリンパ管侵襲が目立っていた。構築した分画要素の空間情報から、脈管容積と間質内密度、癌実質と脈管内皮との接触箇所と接触面積を計測するとともに、脈管内への癌細胞の侵襲の有無をモニター上で検出した。癌胞巣のリンパ管侵襲様式としては、上皮形質を維持した癌細胞集団は主に腫瘍実質・間質境界部においてリンパ管壁を穿孔してリンパ管侵襲を起こしていた。拡張したリンパ管腔内では、多数の S100A4 陽性細胞が検出されており、その一部の細胞は C K 陽性癌細胞集団をエスコートしていた。



リンパ管内で CK 陽性癌細胞をエスコートする S100A4 陽性細胞

まとめ

本研究課題では、舌側縁部に好発する扁平上皮癌の浸潤様式とリンパ管内侵襲の成立機序を明らかにすることと、臨床病理診断における予後判定基準を確立することを目的

として、癌微小環境（癌胞巣、血管・リンパ管走行など）を構成する細胞・組織要素をコンピュータ処理により分画したうえで組織空間を再構築した。高精細な組織立体構築に向けて、回転式マイクロトームで連続薄切標本（4 μ m 厚、100 枚）を作製し、複数の特異抗体（サイトケラチン、Ki-67、CD31、D2-40、S100A4、SMA）と発色剤（DAB 茶色；Vector SG 青色；AEC 赤色）の組み合わせによる多重免疫標識を実施した。再構築された組織空間では、免疫標識物質の形状と位置情報に基づき、間質中に分散する微小浸潤癌胞巣、腫瘍細胞と脈管内皮との接触と脈管内侵襲の発生部位などを検出できた。複数要素を統合させた癌病変の 3D 構造を可視化する上では、3D データを高圧縮し、汎用性の高い QuickTime VR 形式ファイルに変換することで、一般的な PC でもインタラクティブに動的観察が可能となっている。我々は既に 3D ポータルサイトを立ち上げており、Web3D データの自由閲覧システムにおいて研究成果を公開している。

我々は、自動演算処理による 3 次元構築と形態解析法の可能性を追求する中で、NIH の Web サイトから無償でダウンロードできる Image-J と市販の立体構築ソフトを併用した演算プロトコールも開発してきた。近年、自動薄切装置、自動免疫装置、バーチャルスライドが導入されるなかで、連続薄切標本を用いた組織立体構築を研究・診断に導入するうえでの障壁は低くなっている。特に Image-J については、演算処理に際してのパネル操作が容易であり、比較的簡単に短時間で高詳細の立体構築を実行することが可能であり、メモリーの効率的使用により 100 枚前後の連続組織画像を用いた簡便な組織立体構築に適している。現在、必要最小限のプラグイン機能を組み合わせた Image-J による組織立体構築プロトコールについても 3D ポータルサイトで公開している。

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)

[雑誌論文](計4件)

Oshiro H, Miura M, Iobe H, Kudo T, Shimazu Y, Aoba T, Okudela K, Nagahama K, Sakamaki K, Yoshida M, Nagao T, Nakaya T, Kurata A, Ohtani O.: Lymphatic stomata in the adult human pulmonary ligament, *Lymphat Res Biol*, 12/2014; DOI:10.1089/lrb.2014 査読有
Maruyama S, Shimazu Y, Kudo T, Sato K, Yamazaki M, Abé T, Babkair H, Cheng J, Aoba T, Saku T.: Three-dimensional visualization of perlecan-rich neoplastic stroma induced concurrently with the invasion of oral squamous cell carcinoma, *J Oral Pathol Med*, 43:627-36, 2014, doi: 10.1111/jop.12184. 査読有
Kurata M, Nose M, Shimazu Y, Aoba T, Kohada Y, Yorioka S, Suehiro S, Fukuoka E, Matsumoto S, Watanabe H, Kumon Y, Okura T, Higaki J, Masumoto J.: Microvasculature of carotid atheromatous plaques: hemorrhagic plaques have dense microvessels with fenestrations to the arterial lumen, *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 23: 1440-1446, 2014, doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.12.003. 査読有
島津 徳人, 工藤 朝雄, 田谷 雄二, 佐藤 かつお, 柳下 寿郎, 出雲 俊之, 青葉 孝昭. 腫瘍微小環境と口腔癌浸潤: 舌癌 YK 分類と三次元癌胞巣構造, *日本口腔腫瘍学会誌* Vol. 24 (2012) No. 3 p. 77-87

[学会発表](計7件)

添野雄一, 白子要一, 島津徳人, 田谷雄二, 佐藤かつお, 青葉孝昭: 扁平上皮癌の同所移植モデルにおける原発 - リンパ節転移環境での脈管間質形成、第 104 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26 日.

辺見卓男, 島津徳人, 工藤朝雄, 柳下寿郎, 佐藤かつお, 青葉孝昭: 舌表在性癌の浸潤前段階にみられる細胞表現型の 3 次元形態解析、第 104 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26 日.

白子要一, 添野雄一, 島津徳人, 田谷雄二, 佐藤かつお, 青葉孝昭: 癌微小環境における脈管新生の 3 次元形態解析: 腫瘍 - 宿主境界での脈管チャネルの空間分布、第 104 回日本病理学会総会、広島、2014 年 4 月 26 日.

Henmi T, Shimazu Y, Soeno Y, Yagishita H, Okabe S, Taya Y, Sato K, Aoba T.: Intraepithelial 3D-architectural analysis of tongue premalignant-cancerous progression, 43rd Annual Meeting & Exhibition of the AADR, Charlotte, North Carolina (USA), 2014 年 3 月 21 日.

辺見卓男, 柳下寿郎, 荘司洋文, 岡部貞夫, 青葉孝昭: 舌異型上皮の悪性度診断: 舌粘膜のヨード染色性と上皮細胞の免疫表現型の照合システム、第 32 回日本口腔腫瘍学会総会・学術大会、札幌、2014 年 1 月 23 日.

島津徳人, 田谷雄二, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 佐藤かつお, 青葉孝昭: 脈管構造の組織立体構築と Virtual Reality 観察、第 55 回歯科基礎医学学会学術大会・総会、岡山、2014 年 9 月 21 日.
島津徳人, 添野雄一, 白子要一, 藤田和也, 田谷雄二, 中右かよ, 佐藤かつお, 青葉孝昭, 癌微小環境の 3 次元形態学: Virtual Reality 観察の導入、第 102 回

日本病理学会総会、札幌、2013年6月6日.

〔図書〕(計1件)

島津徳人(編集)、青葉孝昭(監修):今すぐ始める組織立体構築-ImageJ/Fijiの活用プロトコール、キタメディア、33ページ、2013年.

〔その他〕

ホームページ等

日本歯科大学病理学講座

<http://www.ndu.ac.jp/~pathhome/>

3Dポータルサイト

<http://portal.nvs.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島津徳人 (Yoshihito Shimazu)

麻布大学・その他部局等・准教授

研究者番号: 10297947

(2) 研究分担者

柳下寿郎 (Hisao Yagishita)

日本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 50256989

佐藤かおり (Kaori Sato)

日本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 90287772

田谷雄二 (Yuji Taya)

日本歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号: 30197587

青葉孝昭 (Takaaki Aoba)

日本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 30028807