

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792186

研究課題名(和文)口腔粘膜癌の微小浸潤の客観的診断法の開発：細胞外基質分子動態のモニタリング

研究課題名(英文)Objective diagnostic procedure of the microinvasion of the oral mucosal malignancies

研究代表者

小林 孝憲 (Kobayashi, Takanori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00464016

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：口腔癌において、初期の微小浸潤を病理組織学的に確定することは困難である。そこで細胞外基質(ECM)の産生・沈着状況に注目し、非浸潤状態である異型上皮・上皮内癌と浸潤癌とのECM発現を比較して、浸潤に特徴的なECM動態を検討した。

その結果、上皮内癌では、HE染色にて基底膜領域の肥厚が高頻度に確認され、免疫組織化学的には基底膜構成ECM分子の過剰沈着が確認された。また異型上皮や上皮内癌では上皮層内にパールカンが異常沈着しているのに対し、浸潤癌ではパールカンの癌間質への分布が強調され、このECM分子沈着領域のスイッチング現象が微小浸潤の指標となることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is difficult to determine the early microinvasion of oral squamous cell carcinoma histopathologically. Therefore we focused the production and deposition of the extracellular matrix (ECM), and investigated whether there was characteristic ECM deposition in the oral invasive cancer.

As a result, the thickening of basement membrane was characteristic in the carcinoma in-situ (CIS), and excessive deposition of basement membrane molecules at the thickening zone were confirmed immunohistochemically. Furthermore, ECM molecules, especially perlecan, were deposited in the epithelial layers of the epithelial dysplasia and CIS, whereas their deposition switched into the cancer stroma at the invasive stage. In conclusion, the switching of area of ECM deposition could be regarded as an indicator of early invasion of oral cancer.

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：口腔癌 初期浸潤 上皮内癌 異型上皮 術中迅速診断 再発

### 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔癌のなかで、広範囲でかつ高頻度に多発・再発する表在性粘膜癌の増加傾向が注目されている。これらは、高齢女性に多く、飲酒・喫煙歴が少ないなど、古典的浸潤癌とは臨床的特徴も異なり、病理組織学的には浸潤は表層に限局性で、周囲を特徴的な異型上皮で取り囲まれた上皮内癌主体の表在性癌複合病変である。この表在性癌の病理組織学的診断には、過形成上皮・異型上皮・上皮内癌・微小浸潤癌のいわゆる悪性境界病変の各病態を精確に鑑別する必要があるが、現実にはヘマトキシリン・エオジン染色のみでの判定は主観的にならざるをえない。そのため、診断結果のばらつきが外科的対応に反映され、切除範囲の決定や治療法選択に影響がでて、医療施設間の治療成績にも差異が生じる。そこで、境界病変について安定した診断となるように、診断基準に共通の科学的根拠が求められている。

これまでの研究過程で、上皮内癌において基底膜部分に細胞外基質が沈着する<基底膜領域の肥厚現象>がみとめられること、微小浸潤癌において細胞外基質沈着が上皮内から周囲の間質細胞中へ切り替わる<細胞外基質沈着領域のスイッチング現象>がみられることが明らかになってきた。これらの現象の認識は上皮内癌および浸潤癌の病理組織学的判定に有用であることはもちろんのこと、癌の浸潤メカニズム解明に寄与することや、日常臨床上の拡大内視鏡による観察結果とあわせて浸潤範囲を決定できるといった発展性が予想されるが、異常沈着した細胞外基質の構成とその臨床的意義についてはほとんど不明である。

そこで申請者は、表在性粘膜癌における基底膜領域の肥厚現象と細胞外基質沈着領域のスイッチング現象に着目し、これらを上皮内癌・初期浸潤癌の病理診断の基準のひとつになるのではないかと仮説をたて、これを検証することを計画した。

### 2. 研究の目的

口腔癌の微小浸潤を科学的根拠にもとづいた診断にするため、上皮内癌から初期浸潤癌への進行過程における細胞外基質分子の産生動態を認識してその科学的意義を理解することを目標とし、口腔癌組織における細胞外基質分子の産生・分泌・沈着の過程を解析する。具体的には、二つの現象、すなわち<上皮内癌における浸潤準備段階としての基底膜領域の肥厚>と<微小浸潤癌における細胞外基質沈着領域のスイッチング現象>に注目して、これらの成因とその臨床的意義について明らかにし、最終的には両者の結果を総合して初期浸潤癌の判定根拠を確定する。

### 3. 研究の方法

ヒト外科材料にて病理組織学的に異型上皮・上皮内癌・微小浸潤癌を区別し、免疫組

織化学的手法をもちいて各病変のヘパラン硫酸プロテオグリカン(パルカン)・IV型コラーゲン・テネイシン・ラミニン分子の沈着状況を検索し、基底膜領域の構成分子および細胞外基質沈着領域を把握する。同時にKGF・VEGF・SHH等の細胞増殖因子やMMP-2、-7、-9等の細胞外基質分解酵素の分布もあわせて調査する。続いて、口腔粘膜癌由来細胞株と口腔粘膜癌由来線維芽細胞株とを共培養し、免疫細胞化学的に浸潤状態における細胞外基質産生状況を検討する。同時に、浸潤前段階の状態として、術中検体から上皮内癌細胞を採取して上皮内癌培養モデルの樹立を開始し、同細胞株における細胞外基質の産生状況把握をめざす。その後、in situ ハイブリダイゼーション法にて、各病変ならびに各培養細胞における細胞外基質 mRNA の発現を検索する。さらに、培養細胞から RNA を回収し、RT-PCR 法を用いて細胞外基質分子の mRNA 発現量を測定して遺伝子発現状況を確認する。最終的には、浸潤前および浸潤過程における細胞外基質分子の産生担当細胞および沈着機構をふまえ、免疫組織化学的検索から得られた浸潤癌に特徴的な細胞外基質分子沈着パターンを、実際の手術症例の再発や予後調査結果と合わせて評価し、臨床診断および日常の病理診断業務、治療方針決定に応用・還元する。

### 4. 研究成果

正常上皮においては基底膜に一致して基底膜構成分子の発現が確認され、上皮層内および粘膜固有層に過剰沈着はなかった。正常上皮での発現様式をもとに悪性境界病変を客観的に判定すると、異型上皮では増殖帯相当部においてパルカンが上皮細胞間に過剰に発現していた。また上皮内癌では、パルカンが上皮層内に過剰沈着するとともに、HE染色切片で確認された<基底膜領域の肥厚>領域に一致して基底膜分子の沈着が確認され、同現象が浸潤準備段階の分子生物学的変化と解釈された。いっぽう浸潤癌では、細胞外基質分子、とくにパルカン沈着が上皮内から周囲の癌間質細胞中に切り替わる<細胞外基質沈着領域のスイッチング現象>が免疫組織化学的に確認された。

上記結果を日常診断業務に反映するとともに臨床的意義を確認するため、2002年 - 2007年の口腔癌一次症例236例について、術後の再発の有無や経緯を検索し、再発と切除断端の露出病変との関連、とくに術中迅速診断の意義について調査した。その結果、再発例が全体の約20%におよび、それらの切除断端には上皮内癌や中等度異型上皮が約7割で露出していること、さらに術中迅速診断においてこれら悪性境界病変を精確に診断することにより再発率が抑制できることが明らかとなった。

## 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 7 件)

1. Nagata M, Noman AA, Suzuki K, Kurita H, Ohnishi M, Ohyama T, Kitamura N, Kobayashi T, Uematsu K, Takahashi K, Kodama N, Kawase T, Hoshina H, Ikeda N, Shingaki S, Takagi R: ITGA3 and ITGB4 expression biomarkers estimate the risks of locoregional and hematogenous dissemination of oral squamous cell carcinoma. BMC Cancer (査読有). 13: 410, 2013.
2. Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, Abe T, Adeola HA, Cheng J, Nishiyama H, Hayashi T, Kobayashi T, Takagi R, Funayama A, Saito C, Saku T: Inflammatory histopathogenesis of nasopalatine duct cyst: a clinicopathological study of 41 cases. Oral disease (査読有). 19: 415-424, 2013.
3. Kobayashi T, Maruyama S, Abe T, Cheng J, Takagi R, Saito C, Saku T: Keratin 10-positive orthokeratotic dysplasia: a new leucoplakia-type precancerous entity of the oral mucosa. Histopathology (査読有). 61: 910-920, 2012.
4. Aida J, Kobayashi T, Saku T, Yamaguchi M, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Maruyama S, Cheng J, Poon SS, Sawabe M, Arai T, Takubo K.: Short telomeres in an oral precancerous lesion: Q-FISH analysis of leukoplakia. J Oral Pathology and Medicine (査読有). 41(5):372-378, 2012.
5. Saito M, Kobayashi T, Takagi R, Saku T: Clinicopathological distinction of two categories of oral squamous cell carcinoma of the tongue: de novo vs. sequential type. Oral Medicine and Pathology (査読有). 81: 81-88, 2012.
6. Arashiyama T, Kodama Y, Kobayashi T, Hoshina H, Takagi R, Hayashi T, Cheng J, Saku T.: Ghost cell odontogenic carcinoma arising in the background of a benign calcifying cystic odontogenic tumor of the mandible: Report of a case and review of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol (査読有). 114(3): 35-40, 2012.
7. 星名秀行, 永田昌毅, 高木律男, 藤田 一, 安島久雄, 児玉泰光, 池田順行, 齋藤正直, 小林孝憲, 嵐山貴徳, 小山貴寛, 小玉直樹, 勝見祐二, 小川 信, 山田一穂, 魚島勝美: 頭頸部癌の切除不能頸部リンパ節転移巣に対する温熱化学放射線療法; 治療成績および予後について. 新潟

歯学会誌(査読有). 42(1):27-36, 2012.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 御代田 駿, 小林孝憲, 宮島 久, 永田昌毅, 星名秀行, 小林正治, 高木律男, 丸山 智, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌とその境界病変における術中迅速病理診断の意義: 局所再発に関する臨床病理学的検討. 平成 25 年度新潟歯学会第二回例会, 新潟市, 2013 年 11 月 9 日.
2. 御代田 駿, 小林孝憲, 宮島 久, 小林正治, 高木律男, 丸山 智, 朔 敬: 口腔粘膜扁平上皮癌および悪性境界病変の再発に関する臨床病理学的検討. 第 23 回日本口腔内科学会・第 26 回口腔診断学会合同学術大会, 東京, 2013 年 9 月 13-14 日.
3. 御代田 駿, 小林孝憲, 宮島 久, 小林正治, 高木律男, 丸山 智, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌とその境界病変における術中迅速病理診断の意義: 再発に関する臨床病理学的検討. 第 73 回新潟癌治療研究会. 新潟市, 2013 年 7 月 27 日.
4. 小林孝憲, 大湊 麗, 児玉泰光, 小山貴寛, 永田昌毅, 飯田明彦, 小野和宏, 高木律男: 粘膜下口蓋裂に関する臨床的検討 - 診断と治療について -. 第 37 回日本口蓋裂学会総会・学術総会, 佐賀市, 2013 年 5 月 30-31 日.
5. 村山正晃, 小林孝憲, 児玉泰光, 池田順行, 永田昌毅, 高木律男: 下歯槽神経障害を伴う放射線性骨髄炎を呈した頭頸部癌の 2 例. 第 17 回口腔顔面神経機能学会, 福岡市, 2013 年 3 月 2 日.
6. 永田昌毅, 栗田 浩, 星名秀行, 大西 眞, 北村信隆, 小林孝憲, 上松晃也, 新垣晋, 齊藤 力, 高木律男: インテグリン遺伝子発現定量による扁平上皮癌のリンパ行性及び血行性転移のリスク診断. 第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会. 横浜市, 2012 年 10 月 19-21 日.
7. 小林孝憲, 安島久雄, 小山貴寛, 齋藤正直, 村山正晃, 高木律男: 上唇と咬筋内に発生した静脈奇形の 1 例. 日本形成外科学会関東支部第 88 回新潟地方会, 新潟市, 2012 年 11 月 30 日.
8. 小林孝憲, 安楽純子, 齊藤直朗, 飯田明彦, 大西眞, 高木律男: 舌癌化学療法中に生じた抗利尿ホルモン不適合症候群 (SIADH) の 1 例. 第 38 回 (社) 日本口腔外科学会北日本地方会, 札幌市, 2012 年 6 月 23-24 日.

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)  
なし

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小林 孝憲 (Takanori Kobayashi)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：00464016

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし