

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861768

研究課題名(和文) 口腔上皮内癌における細胞競合現象の認識とその病理学的意義の解明

研究課題名(英文) Cell competition in lateral invasion fronts of oral carcinoma in-situ

研究代表者

阿部 達也 (Abe, Tatsuya)

新潟大学・医歯学総合病院・レジデント

研究者番号：70634856

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)：口腔上皮内癌CISおよび口腔扁平上皮癌SCCの病理診断では、癌組織は非癌組織との間に明瞭な界面を形成することがしばしば観察される。この界面部において細胞競合という現象が生じるという仮説を立て、検証することとした。明瞭な界面を形成するCISを含む病理組織標本の検討では、癌組織にアポトーシス小体(60%)、好酸性硝子体(36%)が高頻度だった。選択的に癌組織・非癌組織を採取し、LC/MS/MSで蛋白質の網羅的解析を行うと、癌細胞でインターフェロン応答性蛋白質の発現が明らかになった。癌細胞が非癌細胞に対して敗者となっている可能性とともに、その分子基盤にはサイトカインの関連が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histopathologically, oral carcinoma in-situ (CIS) foci are frequently confronted with non/less malignant lesions including epithelial dysplasia when they invade laterally within the epithelial compartment. In those interfaces, cell competition-like phenomena must occur between CIS cells and less malignant cells. Thus, I have investigated such lateral invasion fronts of oral CIS against normal/dysplastic epithelia in the tissue section level. There were apoptotic bodies (60%) and eosinophilic hyaline bodies (36%) in SCC/CIS sides of the interfaces. In addition, LC/MS/MS proteomics analysis detected interferon-induced proteins in those interface-adjacent carcinoma cells. These findings suggested carcinoma cells might be losers in cell competition with less malignance cells as winners, and that these cell competitive conditions are induced by cytokines shed from both side cells.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔上皮内癌 口腔扁平上皮癌 細胞競合 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

口腔粘膜上皮内癌の病理診断はヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) のみで行うには限界があり、免疫組織化学的染色や遺伝子学的解析の補助が必要であるとの認識は口腔病理医のなかに定着しつつあるのは、各種新技法の適用により従前は HE 標本上で見過ごされていた病理組織学的所見が認知されるようになってきたからである。それらの所見を HE 標本に反映させて探索し直せば、HE でも検出可能な微細な細胞・組織の変化が認知されことも判明した。このようなフィードバック作業を積み重ね、研究代表者の所属する研究室では、口腔上皮内癌の病理診断の科学的根拠を確立してきた (*Pathol Int* 2010; *Oral Oncol* 2011; *J Oral Pathol Med* 2011; *Histopathol* 2011; *Mod Pathol* 2012, *Virchows Arch* 2012 など)。

以上の成果のなかで研究代表者がもっとも注目した上皮内癌の病理組織学的特徴は、上皮内癌胞巣が正常・異型上皮部によって分断される多中心性の発生状況であった。この事実は 1950 年代に米国の Slaughter らが field cancerization (フィールド発がん) の概念を、口腔上皮内癌を材料にして初めて提唱したこと (*Cancer* 1953) に照合され、同時に近年の細胞生物学で最も注目される研究領域になってきた cell competition (細胞競合) (Johnston, *Science* 2009) の概念にも重なった。そこで細胞競合の視点から上皮内癌を捉え直す必要があることを認識するようになった。すなわち、試験管内実験で明らかになってきた細胞競合関連分子を組織レベルで癌部-非癌部境界において可視化できるのではないかと考えたのである。細胞競合における勝者 (winner) と敗者 (loser) は、相互の接触において一方から分泌される分子の他方での受容により各々の細胞内で発現する分子の増強と減弱が生じ勝者が敗者を細胞死に向かわせる (Moreno, *Nature Rev*

Cancer 2008)。ただし、これまでに細胞競合という現象は試験管内で明らかにされてきたものの、実際にヒトの疾患のどこでこの現象が出現して特定の病態を惹起するのかは不明であった。そこで、本研究は、病理組織学標本を主な材料として、「口腔粘膜の上皮内癌 (上皮層内に限局して下方浸潤のない癌細胞集団) が周囲の非癌細胞集団と側方浸潤界面を形成したときに細胞競合という現象が生じる」という仮説を立てて、これを証明しようとしたのであった。

2. 研究の目的

細胞競合という近年注目されてきた細胞生物学の研究主題を、口腔癌と非癌部との境界面に当てはめて、ヒト疾患を対象として細胞競合現象の出現状況を詳細に検証したい。その研究結果をもとに口腔癌-非癌境界を可視化して悪性判定を客観化する方法を開発して病理診断に活用するとともに、細胞競合現象を応用して癌細胞抑制という治療技術として臨床現場にトランスレーショナルな展開となりうる基礎研究を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞競合関連分子の口腔粘膜上皮内癌組織における発現動態

口腔粘膜上皮内癌症例の抽出：口腔粘膜上皮内癌を材料に、病変境界での細胞競合現象を検討する材料として二群各 100 界面、対照として浸潤癌 100 界面を選定した。すなわち、グループ 1：最適な癌-非癌部 (正常または異型上皮) の境界が垂直面あるいは斜面で明瞭に出現し HE 染色により選別可能な上皮内癌組織標本、グループ 2：HE 染色での界面認知は困難であるがケラチン 13、ケラチン 19、ケラチン 17 の免疫組織化学を用いれば癌-非癌部界面を領域として明示できた上皮内癌組織標本、グループ 3：対照群として正常口腔粘膜上皮に隣接し筋層浸潤の明らかな扁

平上皮癌組織標本。

臨床病理学的因子の検討： 項で抽出した上皮内症例グループ1・2の二群について、性別・部位・腫瘍長径・粘膜上皮層の厚さ・局所再発・浸潤癌への移行の有無など臨床病理学的事項を整理し、界面形成パターンとの関連をスクリーニングした。

これまでの細胞競合研究はショウジョウバエを中心とした下等動物についてもっぱら行われてきて、勝者細胞および敗者細胞で発現する因子が複数確認されてきた。その哺乳類細胞ホモログ分子を列記すると、勝者細胞では Myc (Moreno, *Carcinogenesis* 2010)、敗者細胞では Ras, Src (Fujita, *Nature Cell Biol* 2009) 等の過剰発現などである。そこで、これらの分子について、 項で調整した標本の病変境界部における発現プロフィールを免疫組織化学的方法により検討した。

(2) 癌-非癌部界面でのタンパク質の網羅的解析: レーザーマイクロダイセクション Laser capture microdissection (LCM) 法を用い、組織切片上から 界面に面する癌組織、 界面に面する非癌組織、 界面に近接しない癌組織、 界面に近接しない非癌組織をそれぞれ採取し、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析 (LC/MS/MS) を用いた網羅的解析を行い、タンパク質の比較検討を行い、細胞競合現象に関連した変化を探索した。

4. 研究成果

(1) 口腔粘膜の上皮内癌(CIS)および扁平上皮癌(SCC)を含む外科切除材料 100 界面以上を用いて、癌-非癌部における明瞭な上皮内病変境界を詳細に検討した。この際、癌-非癌部の境界の確認には、免疫組織化学を併用し、ケラチン17陽性癌領域-ケラチン13陽性非癌領域界面を指標とした。

その結果、癌-非癌部界面部において、癌細胞に高頻度にアポトーシス小体 (60%) および好酸性の硝子体形成 (36%) が認められ、免疫組織化学ではともに caspase-3 陽性を示し、界面部での癌細胞において、アポトーシス性細胞死の機序が亢進していることが示唆された。しかし、癌-非癌境界部において、既知の細胞競合関連因子の強調は免疫組織化学では認識されなかった。その他の特徴的な形態変化として、細胞の紡錘形化(64%)および細胞間隙の拡大(71%)が高頻度に観察され、癌-非癌界面で癌細胞と非癌細胞の相互作用によって細胞形態が変化させられていることが示唆された。

(2) これらの外科切除標本については、癌-非癌部の蛋白質発現動態を網羅的に検索することを目的に、特に明瞭な界面を形成する標本を選定し、癌-非癌部組織試料にケラチン13 およびケラチン17 免疫組織化学を併用して、癌-非癌部境界を客観的に視覚化したうえで、LCM法により選択的に癌、非癌部を採取した。この際、ケラチン13 免疫組織化学施行切片からはケラチン13 非陽性癌領域を、ケラチン17 免疫組織化学施行切片からケラチン17 非陽性非癌組織を採取することで、抗体結合による蛋白質混入を最小限に抑えるようにした。これらの採取組織は、試験管内で trypsin 消化し、C18 stage tip®を用いてペプチドを精製した。これらのサンプルを LC/MS/MS によって解析した。これらの方法によって少数例の解析から得られた結果では、癌-非癌部界面に面した癌組織において、interferon-induced protein 53 および interferon-induced protein p78 が同定された。したがって、現在のところ、癌-非癌界面に面した癌組織で interferon 応答反応が生じていることが示唆された。

(3) 上記の癌-非癌境界に形成される硝子体

は、口腔扁平苔癬の粘膜上皮に生じるシバット小体と形態的な共通点が多く、扁平苔癬のシバット小体についても検討を行った。シバット小体は、上皮肉芽組織の血管破綻像と関連しており、ケラチン 17 陽性、カスパーゼ 3 およびヘモグロビン共陽性が明らかになったことから、上皮細胞の赤血球貪食に関連した細胞死であることが示唆された。

(4) 癌-非癌境界に形成される硝子体のほとんどは、細胞核が消失した上皮細胞残渣で、皮膚表皮にみられる正角化性変化に対応する変化である可能性が示唆された。そこで、口腔扁平上皮癌細胞について正角化関連分子について検討すると、癌組織では正角化に関連したケラチン 10・フィラグリン・カスパーゼ 14 の免疫組織化学陽性が、角化癌真珠を中心に認められ、口腔扁平上皮癌においても皮膚型の正角化が亢進している事実が確認できた。

(5) 今後の展望

本研究により、癌-非癌組織境界では、細胞死の亢進とともに、特徴的な硝子体形成や細胞形態の変化が伴うことが明らかになった。さらに、意外にも、癌細胞と非癌細胞の間では、癌細胞のほうがむしろ細胞競合における敗者となっている可能性が示唆された。ただし、これらの細胞死とアポトーシス性細胞死との差異についての検討は今後の課題である。細胞競合による細胞死がどのような分子基盤によるものか、さらに詳細な検討が必要と考えられる。そのなかでも、本課題実施期間内に、LC/MS/MS 法による網羅的解析で癌細胞のサイトカイン応答の変化を示唆する興味深い所見が得られ、細胞競合現象の具体的証左とみなされたことは大きな成果であった。それらのサイトカインの質的解析をすすめ、今後も、癌細胞-非癌細胞間の細胞競合の詳細な分子機構を解明して

いくことにたゆまず努める所存である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

(雑誌論文)(計 5 件)

1. Abé T, Maruyama S, Babkair H, Yamazaki M, Cheng J, Saku T: Simultaneous immunolocalization of desmoglein 3 and IgG4 in oral pemphigus vulgaris: IgG4 predominant autoantibodies in its pathogenesis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, online published November 17, 2014. doi: 10.1111/jop.12290. (査読有)
2. Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Essa A, Babkair H, Cheng J, Saku T: MFG-E8 expression for progression of oral squamous cell carcinoma and for self-clearance of apoptotic cells. *Laboratory Investigation*, 94 (11): 1260–1272, 2014 November; online published September 24, 2014. DOI: 10.1038/labinvest.2014.108. (査読有)
3. Miyota S, Kobayashi T, Abé T, Miyajima H, Nagata M, Hoshina H, Kobayashi T, Takagi R, Saku T: Intraoperative assessment of surgical margins of oral squamous cell carcinoma using frozen sections: a practical clinicopathological management for recurrences. *Biomed Research International*, Volume 2014, Article ID823968, 9 pages; accepted June 3, 2014. DOI: 10.1155/2014/823968. (査読有)
4. Essa AAM, Yamazaki M, Maruyama S, Abé T, Babkair H, Cheng J, Saku T: Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: reciprocal roles of neutrophils and macrophages. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 43 (10): 778-784, 2014 November; online published June 14, 2014; accepted March 27, 2014. DOI: 10.1111/jop.12197(査読有)
5. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Essa A,

Babkair H, Mikami T, Shingaki S, Kobayashi T, Hayashi T, Cheng J, Saku T: Intramuscular keratocyst as a soft tissue counterpart of keratocystic odontogenic tumor: differential diagnosis by immunohistochemistry. *Human Pathology*, 45 (1): 110-118, 2014. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 阿部達也, 丸山 智, 山崎 学, Babkair Hamzah, 程 瑠, 朔 敬: 口腔天疱瘡はデスモグレイン 3 と IgG4 の点状共局在様式から病理組織診断でも確定できる. 第 25 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2014 年 8 月 27-29 日, メディアシップ日報ホール (新潟県・新潟市).
2. Abé T, Maruyama S, Yamazaki M, Babkair H, Cheng J, Saku T: Orthokeratinization-related factors in the oral dysplasia squamous cell carcinoma sequences. 17th International Congress on Oral Pathology and Medicine, May 25-30, 2014, Istanbul (Turkey).
3. 阿部達也, 丸山 智, Essa Ahmed, Babkair Hamzah, 山崎 学, 程 瑠, 朔 敬: 扁平上皮癌シーケンスにおける正角化関連分子の発現動態. 第 103 回日本病理学会総会, 2014 年 4 月 24-26 日, 広島国際会議場・ANA クラウンプラザホテル広島 (広島県, 広島市).
4. 阿部達也, 丸山 智, Essa Ahmed, Babkair Hamzah, 程 瑠, 朔 敬: 口腔扁平苔癬のいわゆるシバット小体における細胞死関連因子の検討. 第 24 回日本臨床口腔病理学会総会・学術大会, 2013 年 8 月 28-30 日, 日本大学理工学部 1 号館 CST ホール (東京都).

5. 阿部達也, 丸山 智, Essa Ahmed, Babkair Hamzah, 山崎 学, 程 瑠, 朔 敬: 口腔扁平上皮癌の側方進展界面における細胞死. 第 102 回日本病理学会総会, 2013 年 6 月 6-8 日, ロイトン札幌・さっぽろ芸文館 (北海道, 札幌市).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

阿部 達也 (ABE TATSUYA)
新潟大学・医歯学総合病院・レジデント
研究者番号 : 70634856

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし