

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861920

研究課題名(和文) 口腔粘膜上皮内癌における粘膜固有層の癌間質としての機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of lamina propriae as a cancer stroma in the oral mucosal carcinoma in situ.

研究代表者

船山 昭典 (FUNAYAMA, Akinori)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：80529686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜上皮内癌における粘膜固有層について、比較対象を正常上皮・異型上皮の粘膜固有層および浸潤癌症例の癌間質をもちいて、リンパ管および血管の分布様式、粘膜固有層の線維化、種々の細胞外基質分子の発現・消失を解析し、腫瘍間質誘導状況を検証した。上皮内癌のリンパ管の特徴は管腔が閉塞し管壁が不規則であった。これは、浸潤癌辺縁の間質に分布するリンパ管と類似していた。また、上皮内癌では、粘膜固有層の線維化を認め、弾性繊維の断裂や凝集、および筋線維の断裂を認めた。

研究成果の概要(英文)：To evaluate the possibility of tumor stroma in lamina propriae of carcinoma in situ (CIS), the distribution of lymphatics and blood vessels, oral submucous fibrosis, the expression of extracellular matrix were investigated in CIS, normal epithelium, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma (SCC). Lymphatics in CIS were characterized by their closed lumen, irregular shapes. The distribution mode of closed and irregular shaped lymphatics in the peripheral invasive front of SCC resembled those of CIS. In CIS, the elastic fiber were irregularly formed and aggregated, and muscle fiber were denatured sporadically with slightly immunopositive stain due to the submucous fibrosis.

研究分野：口腔癌

キーワード：口腔粘膜上皮内癌 血管 リンパ管 粘膜固有層 線維化

### 1. 研究開始当初の背景

近年、口腔を含む消化管の癌の発生には浸潤癌周囲の粘膜は全くの正常である 'de novo' 発生と、周囲に異型上皮または上皮内癌を伴う 'sequence' 発生の2つの様式が存在し、口腔癌では、後者の発生が優勢である。この sequence 癌の問題点は、深部浸潤は軽度にもかかわらず広範囲でかつ高頻度に多発・再発することであり、これらの特徴から表在性癌と言われている。口腔癌治療成績の向上には再発の抑制が不可欠である。再発症例の切除断端を詳細に検討したところ、異型上皮と上皮内癌の明確な判定基準が一定していないこと、また従来からのヘマトキシリン・エオジン染色のみでは困難であることが判明した。そこで、上皮内癌の手術での 'とりのこし' を防ぐため上皮内癌の診断精度向上を目的に研究をおこなってきた。すなわち、粘膜上皮の解析として、上皮内癌細胞における podoplanin 発現の多層化、および上皮内癌細胞でのケラチン 13 消失とケラチン 17 出現の対応を免疫組織化学的に見いだした。さらに、粘膜固有層での解析で上皮内に巻き込まれる異常血管 '上皮内血管' の認識によって '上皮内血管' が近年、消化管粘膜における悪性腫瘍の診断に使用されている狭帯域フィルター内視鏡 (NBI) が映し出す brown lesion に対応することを証明した。以上の結果の積み重ねによって、われわれの口腔外科臨床における上皮内癌の診断精度は飛躍的に向上してきた。そもそも podoplanin は近年発見された、リンパ管マーカーとして有用な糖タンパク質であり、その安定した免疫組織染色性は申請者らをはじめ多数の研究でリンパ管の認識に有用であった。口腔粘膜病変における podoplanin 発現検討過程で、申請者は上皮内癌下層の粘膜固有層に分布するリンパ管が浸潤癌の間質内リンパ管に類似する事実を発見した。浸潤癌におけるリンパ管の新生、さらにはリンパ管と頸部リンパ節転移の関連や生存率に関する報告は多数見られるが、上皮内癌および異型上皮のリンパ管に関する報告は皆無である。さらに、これまでの予備実験で、正常上皮ではヘマトキシリン・エオジン染色で、粘膜固有層とその下層に位置する舌腱膜は明瞭に区別可能であるが、上皮内癌では、粘膜固有層の線維化が確認され、舌腱膜との区別が困難な症例もあることが分かっている。上皮内癌および、異型上皮下層の粘膜固有層についての細胞外基質についての検討はなされていない。上皮内癌とはいまだ浸潤していない扁平上皮癌と定義されており、上皮内癌細胞はすでに、浸潤癌細胞と同様に、様々な増殖因子を放出し、癌細胞自身の増殖や浸潤性の獲得、周囲粘膜固有層の間質への転換が始まっていることが十分に想定される。即ち、上皮内癌の上皮層下の結合組織では、正常の粘膜固有層とは性格が異なる結合組織からなるという仮説のもとに、リンパ管配置と細胞外基質分

子の配置様式を指標に上皮内癌を取り囲む環境を評価して、上皮内癌における腫瘍間質の誘導を客観的に検証することを計画した。

### 2. 研究の目的

口腔粘膜上皮内癌における粘膜固有層はずでの癌間質としての特性を獲得しているという可能性を証明するために、その比較対象を正常上皮・異型上皮の粘膜固有層および浸潤癌症例の癌間質をもちいて、リンパ管および、血管の分布様式、粘膜固有層の線維化、種々の細胞外基質分子の発現・消失を解析し、腫瘍間質誘導状況を検証する。

第一にヒト舌外科材料を病理組織学的に正常上皮・異型上皮・上皮内癌・浸潤癌を区別し、免疫組織化学的手法をもちいて粘膜固有層および癌間質に分布する血管およびリンパ管の配置、具体的には、その個数および管腔の短径を計測し、各病変レベルで比較検討しその特徴を見だしその微小循環動態を把握する。

第二に血管新生因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) -A/B およびそのレセプターである、VEGFR1,2、リンパ管新生因子の VEGF-C/D とそのレセプター、VEGFR3 を免疫組織学的に解析し、血管・リンパ管新生を細胞増殖因子レベルで解析する。

第三に、粘膜固有層および癌間質の膠原線維、弾性線維をマッソントリクローム (MT) 染色およびアルデヒドフクシン (AF) 染色を実施し、その染色性を対比することで各病変レベルの粘膜固有層の線維化を評価する。

第四に粘膜固有層の線維化および癌化に伴い生じる血液循環障害 (低酸素状態) の程度を評価するために、低酸素誘導因子 (hypoxia-Inducible Factor: HIF-1) の免疫組織化学を実施し、線維化にともなう変化を遺伝子レベルで評価する。

第五に、細胞外基質である、collagen type I, collagen type III, elastin, laminin, tenascin, fibronectin, perlecan の免疫組織化学をおこない、その出現 / 消失状況を明らかにする。以上より、各病変で粘膜固有層および癌間質を構成する構造要素と調整因子の動態を理解し、上皮内癌を栄養する上皮層下結合組織に癌間質としての生物学的な性格付けが可能かどうかを検討したうえで、それら生物学的な意義に基づいて上皮内癌の客観的診断基準の樹立をめざす。

### 3. 研究の方法

(1) sequence 発生癌の病理組織学的検討  
当院歯科病理検査ファイルより抽出したヒト舌外科材料パラフィン連続切片を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色切片にて病理組織学的に検討した。すなわち、正常上皮・異型上皮・上皮内癌・浸潤癌を区別し各病変範囲を決定し、以降の研究の基本データを構築した。

(2) 血管およびリンパ管の量的および質的解析

(1)で作製した連続切片を用い、CD31 および抗ポドプラニン抗体により免疫組織学的に血管とリンパ管を同定した。血管およびリンパ管の個数をカウントし、その粘膜固有層の面積で除してそれぞれの平均個数を病変ごとに算出した。また、血管およびリンパ管の平均短径を解析し、各病変間で多重比較検定をおこなった。さらには、血管およびリンパ管を短径別に3群に分類し(短径  $7\mu\text{m}$ 、 $7 <$  短径  $20$ 、短径 $>20\mu\text{m}$ )正常上皮と比較した。

(3) 血管新生因子およびそのレセプターの免疫組織学的検索

1)および2)の結果をもとに、2)で得られた血管およびリンパ管配置様式の病変レベルでの違いを、血管新生因子(VEGF-A,B,C,D)、およびそのレセプター(VEGFR1,2,3)に対する免疫組織化学を施行し、その発現を検討した。

(4) 各病変における粘膜固有層の線維化の評価

マッソントリクローム染色およびアフデヒドフクシン染色を実施し、粘膜固有層と癌間質の膠原線維および弾性線維を明瞭に認識し、その染色性を対比させ各病変レベルの粘膜固有層の線維化を評価する。なお、正常状態で確認できる筋層直上に広がる、舌腱膜を基準とする。また、上皮下から筋層までの距離を計測しその厚さを比較検討する。

(5) 細胞外基質の免疫組織学的検索

細胞外基質である、collagen type I, collagen type III, elastin, actin, laminin, tenascin, fibronectin, perlcans,  $\alpha$ -SMA の免疫組織化学を行い、その発現/消失を調査することで、4)、5)で調査した、粘膜固有層の線維化による、細胞外基質のタンパクレベルでの影響を調査し、癌間質のそれと比較した。

#### 4. 研究成果

(1) 上皮内癌下層に位置する異常結合組織層と浸潤癌間質との類似性および、異型上皮または性状上皮のそれとの相違点を脈管配置・細胞外基質の発現/消失を免疫組織学的に証明し上皮内癌に誘導される間質の存在を証明することを最終目標として研究を開始した。sequence 発生癌の病理組織学的検討として、当院歯科病理検査ファイルより抽出したヒト舌外科材料パラフィン連続切片を製作し、ヘマトキシリン・エオジン染色切片にて病理組織学的に検討し、正常上皮・異型上皮・上皮内癌・初期浸潤癌を区別し各病変範囲を決定し研究の基本データを構築した。血管および、リンパ管の量的および質的解析を目的に CD31 および抗ポドプラニン抗体により免疫組織学的に容易に血管とリン

パ管を区別可能であった。その結果、正常上皮ではスムーズな管壁を有したリンパ管が、粘膜固有層および下層に均一に分布しており、固有層乳頭部にはリンパ管はほとんど分布していないことが分かった。異型上皮では、正常上皮と類似したスムーズな管壁を有したリンパ管が均一に分布していた。一方、上皮内癌では、リンパ管は固有層乳頭部にも存在し管腔が閉塞して管壁が不規則なリンパ管を多数認めた。これは、浸潤癌の間質に分布するリンパ管と類似していた。平均リンパ管短径は正常上皮で  $13.3\mu\text{m}$ 、異型上皮で  $16.2\mu\text{m}$ 、上皮内癌で  $8.8\mu\text{m}$ 、浸潤癌で  $7.5\mu\text{m}$  で上皮内癌と浸潤癌では類似していた。平均リンパ管数は、正常上皮で  $22.5(\text{個}/\text{mm}^2)$ 、異型上皮で  $17.5(\text{個}/\text{mm}^2)$ 、上皮内癌で  $24.2(\text{個}/\text{mm}^2)$ 、浸潤癌で  $20.8(\text{個}/\text{mm}^2)$ であった。短径別リンパ管数を以下に示す。上皮内癌では、短径  $7\mu\text{m}$  以下の毛細リンパ管が増加して、浸潤癌辺縁部と同様な分布を示した(図1)。

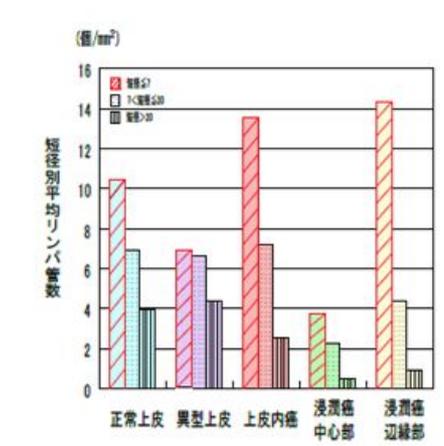


図1：病変別リンパ管数

(2) 異型上皮および上皮内癌の粘膜固有層の線維化について検索した。粘膜固有層の検索には、マッソントリクローム染色(MT染色)、アルデヒドフクシン染色(AF染色)の特殊染色を施行した。上皮内癌において、粘膜固有層の線維化の亢進を認める症例が存在し、弾性繊維の、構造的な架橋構造の乱れ、断裂、および局所的な凝集を認めた。また、線維化層(異常な粘膜固有層)のなかに孤立した筋繊維を認め、これは上皮内癌に特徴的であった(図2、3)。

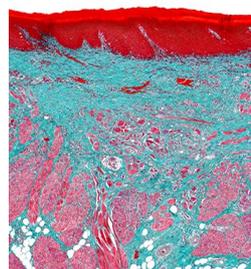


図2：MT染色

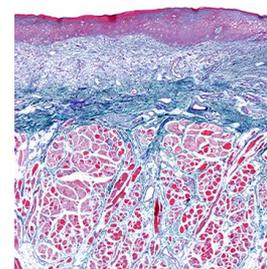


図3：AF染色

(3) 粘膜固有層の線維化による、細胞外基質のタンパクレベルでの影響を調査し、癌間質のそれと比較することにより、上皮内癌の粘膜固有層の癌間質としての可能性を明らかにする目的で細胞外基質である、collagen type I, collagen type III, elastin, actin, laminin, tenascin, fibronectin, perlecan, α-SMA の免疫組織化学を行い、その発現/消失を調査した。

その結果、正常上皮異型上皮では、elastin の均一な網目状の発現が認められたのに対し、上皮内癌で線維化の亢進した粘膜固有層では、elastin の均一で網目状の分布は消失し、不規則な凝集塊を形成していた(図4)。

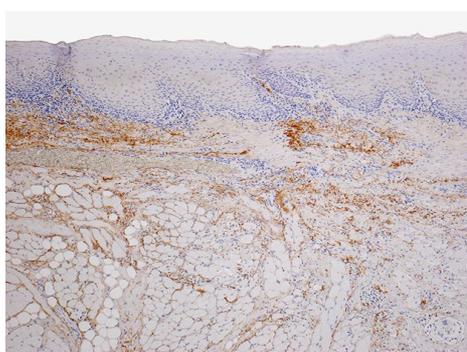


図4 : elastin 免疫染色

-SMA による、粘膜固有層下の筋線維は、線維化が進行している上皮内癌において、筋線維の断裂が見られ、脂肪変性している所見が得られた。これは、異型上皮においても、粘膜固有層の線維化が亢進している症例で認められた(図5)。

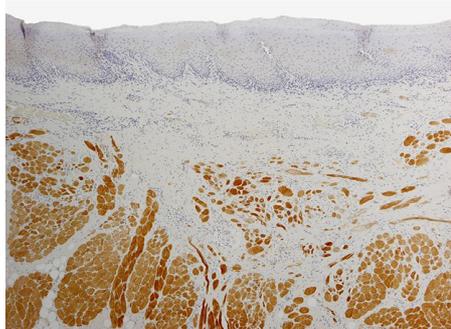


図5 : actin 免疫染色

また、collagen type I, collagen type III, actin, laminin, tenascin, fibronectin に関しては、粘膜固有層において、上皮内癌および、正常上皮、軽度異型上皮、中等度異型上皮との間で明確な発現の差異は認めなかった。

perlecan においては、正常上皮および、異型上皮では、粘膜固有層に発現を認めたのに対し、上皮内癌では、粘膜固有層には認めず、上皮層内にその発現を認めた。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Funayama A. et al. Clinicopathological analyses on predictive factors for loco-regional recurrences in patients with oral squamous cell carcinoma. American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 96th Annual Meeting, Scientific Sessions & Exhibition in conjunction with the Japanese Society 2004 年 9 月 8-13, Hawaii

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

船山 昭典 (FUNAYAMA Akinori)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号：80529686

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：