

口腔粘膜細胞診で判定する上皮細胞の
形態学的特徴を裏付ける細胞骨格分子

ささじま かずまさ
篠島 一将

本論文の要旨は、第235回朝日大学歯学研究所発表会（2020年6月23日，瑞穂）において発表した。本論文の一部は、第29回日本臨床口腔病理学会総会・共催学術集会（2018年8月26日，東京），第58回日本臨床細胞学会秋季大会（2019年11月17日，岡山），第61回日本臨床細胞学会春季大会（2020年6月20日－7月19日，横浜）において発表した。

緒 言

口腔粘膜は、物理的刺激や化学的刺激等の外因性の環境因子と遺伝子や内分泌、免疫系の異常を含む内因性素因等の刺激が及ぶために白色病変、赤色病変あるいは隆起性病変等のさまざまな臨床像を示す。これらの病変の中には、初期の口腔癌や口腔潜在的悪性疾患等の腫瘍性変化を有する疾患が含まれる¹⁾。それら病変を組織レベルで確定するには、組織診が必要であるが、生体や病変に侵襲を及ぼす欠点を伴う。一方、細胞レベルの検査には口腔粘膜細胞診があり、粘膜上皮の病変に対してはブラシ等による擦過を行い、粘膜下の病変に対しては穿刺吸引によって細胞を採取し、判定が可能となる。すなわち口腔粘膜細胞診は、生体に対して非侵襲性に実施できるという利点があり、通常 Papanicolaou 染色（PAP 染色）による細胞や核の形態的变化を細胞異型として捉えることができる²⁻⁴⁾。しかし、その判定には熟練した専門的知識を必要とされ、またこれを裏付ける客観的要素の確立にはまだ乏しく、判定基準の統一が求められている⁵⁾。口腔癌をはじめとする悪性腫瘍の特徴は、自律的な細胞の増殖と周囲組織への浸潤性増殖であり、特に癌細胞の浸潤獲得には、上皮間葉転換と呼ばれる形態ならびに機能変化が起

こる^{6, 7)}。これにより，細胞骨格の再構成や細胞間接着装置が変化し，浸潤突起と呼ばれる突起構造を伸ばして細胞外マトリックスに侵入し，その中を移動して浸潤・転移することが知られている（図1）^{8, 9)}。

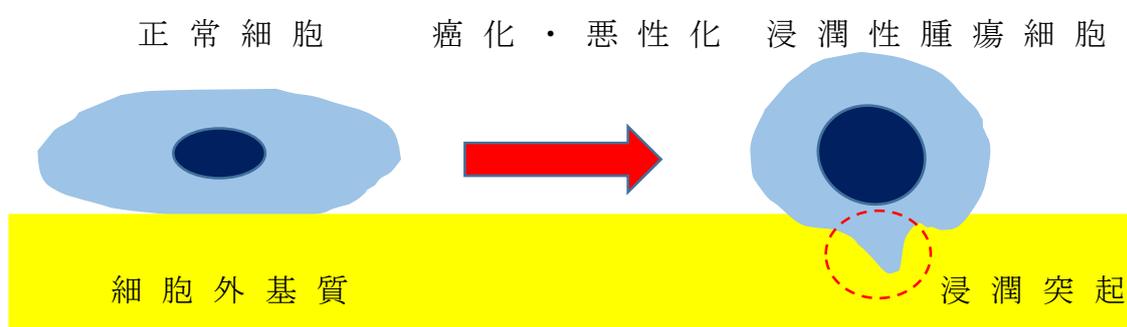


図1 浸潤性口腔癌細胞の模式図

分子生物学的にはこれらの細胞形態の変化を細胞骨格成分に裏付けて観察することが可能で，上皮細胞の主要な細胞骨格の Cytokeratin (CK) は中間径フィラメントとして細胞形態維持に必須分子で^{10, 11)}，腫瘍細胞において過剰発現するといわれている¹²⁻¹⁴⁾。他にも F-actin が挙げられ，細胞骨格の構成や重合と脱重合を繰り返して細胞運動をコントロールし，細胞膜表面側に存在する Cortactin と結合して，浸潤突起の形成に関与することが知られている¹⁵⁻¹⁷⁾。そこで，上皮細胞の腫瘍化と細胞骨格の動態が大きく関わりを持つこと

から，口腔粘膜細胞診検体の P A P 染色で見られる形態的変化の細胞異型を細胞骨格関連分子の変化で裏付けるために，腫瘍性変化に伴う C K の局在変化，F-actin の微細構造と N/C 比の変化，F-actin と Cortactin の相互作用による細胞の浸潤能の変化，腫瘍性変化の組織における Cortactin の発現強度について検討した．

材料および方法

1. 患者標本

本研究は、朝日大学病院医学倫理審査委員会によって承認されている（承認番号：2019-11-07）。標本は、様々な口腔粘膜疾患の口腔細胞診実施時にブラシで採取し、細胞保存液（PreservCyt[®] Solution, Hologic, Marlborough, MA, USA）に入れた液状化検体細胞診（Liquid based cytology, LBC）標本を10例用いた。また、扁平上皮癌切除標本からブラシで擦過したLBC標本も10例用いた。さらに、F-actin観察のために、直接10%ホルマリンで固定しLBC法検体としたFormalin Liquid based cytology（FLBC）標本も20例用いた。また組織標本は、扁平上皮癌と診断された症例及び組織診で健全な粘膜組織と確認できた症例を20例用いた。

2. CK免疫蛍光染色

LBC検体で、Negative for Intraepithelial Lesion or Malignancy（NILM）、Oral Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion（OLSIL）、Oral High-grade Squamous Intraepithelial Lesion（OHSIL）、Squamous Cell Carcinoma（SCC）と判定された各5症例の診断後のLBC法検体残液を95%エタノー

ルで固定し, Anti-Cytokeratin (AE1/AE3, Dako, Santa Clara, CA, USA) を ready to use で 1 次抗体に, BIOTINYLATED ANTI-MOUSE IgG (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA) を 15 μ g/ml で 2 次抗体とし, 蛍光標識アビジン (FLUORESCCEIN AVIDIN DCS, VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA) を 20 μ g/ml で用いて蛍光免疫染色を行った. 対比核染色は, DAPI (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA) を用いた. 観察は共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (ZEISS, Oberkochen, Germany) で細胞像を観察撮影し, 3 次元解析ソフトウェア ZEN2012 (ZEISS, Oberkochen, Germany) を用いて画像構築を行った後, 同標本からカバーガラスを剥がして同一の細胞に PAP 染色を施し, 光学顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo) で観察撮影した.

3. F-actin 蛍光染色と N/C 比

NILM あるいは SCC と判定された各 10 症例の FLBC 法検体に対して, Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) による F-actin 染色と DAPI (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA) による核蛍光染色を行った. 各 30 個の正常細胞と腫瘍細胞について ZEN2012 (ZEISS, Oberkochen, Germany) で画像構築を行い,

3次元解析画像から細胞の水平断より N/C 比を計測した。統計学的有意差検定は Welch's t-test を行い、危険率 $P < 0.01$ 未満を有意差ありとした。

4. F-actin 蛍光染色と Cortactin 免疫蛍光染色

NILM または SCC と判定された各 5 症例の FLBC 法検体を Alexa Fluor 488 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて F-actin に対する蛍光染色と Anti-Cortactin (Abcam, Cambridge, UK) を $0.95 \mu\text{g/mL}$ で 2 時間反応させ蛍光標識は Goat anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor Plus 594 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。さらに DAPI (VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA, USA) による対比核染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM710 (ZEISS, Oberkochen, Germany) で観察撮影し、三次元的解析ソフトウェア ZEN2012 (ZEISS, Oberkochen, Germany) を用いて画像構築を行った後、同標本からカバーガラスを剥がして同一の細胞に PAP 染色を施し、光学顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo) で観察撮影に供した。

5. Cortactin 免疫組織染色

組織診で SCC と診断された生検標本 10 例と健

常粘膜組織 10 例のパラフィン切片をキシレンで脱パラフィンし，3% H₂O₂ メタノール液で内因性ペルオキシターゼを除去した後，10 mM Tris-EDTA Buffer (pH9.0) に浸漬し，圧力鍋を用いて熱抗原賦活処理を行った．続いて 9.5 µg/mL に調整した Anti-Cortactin (Abcam, Cambridge, UK) を室温で 2 時間反応させ，Envision Dual Link System-HRP (Dako, Santa Clara, CA, USA) および Liquid DAB+Substrate Chromogen System (Dako, Santa Clara, CA, USA) で標識された HRP の基質発色を行い，ヘマトキシリンで対比染色して，光学顕微鏡 BX53 (Olympus, Tokyo) で観察撮影を行った．

結 果

1. 腫瘍性変化に伴う CK の局在変化

PAP 染色で NILM と判定された表層角化細胞は細胞集塊における核間距離や N/C 比が等しく，細胞質輝度上昇や核濃染等もみられなかった．一方 OLSIL や OHSIL では細胞質輝度上昇や核濃染がみられ，OHSIL では核腫大を伴っていた．SCC では，細胞質輝度上昇を伴う表層角化細胞や中層から深層型のライトグリーン好染性細胞が観察され，N/C 比上昇もみられた．

これら細胞の CK 蛍光免疫染色の 3 次元構築画像では，NILM と判定された細胞の細胞質内全域にほぼ一定の方向に配列した線維状の構造がみられた．OLSIL の CK 免疫染色では，細胞質の外周部で蛍光強度の上昇を示し，核の周囲では蛍光強度の低下を示す細胞を認めた．OHSIL において細胞質の外周部の蛍光強度は正常に比べて強いが，核周囲の細胞質のみならず外周部にも部分的に蛍光強度が低下した領域がみられた．SCC ではさらに CK 蛍光強度が上昇した部分から低下した部分までが複雑に分布する様相がみられた．また深層異型細胞では，核腫大，核濃染に対応した DAPI 蛍光の上昇がみられた（図 2）．

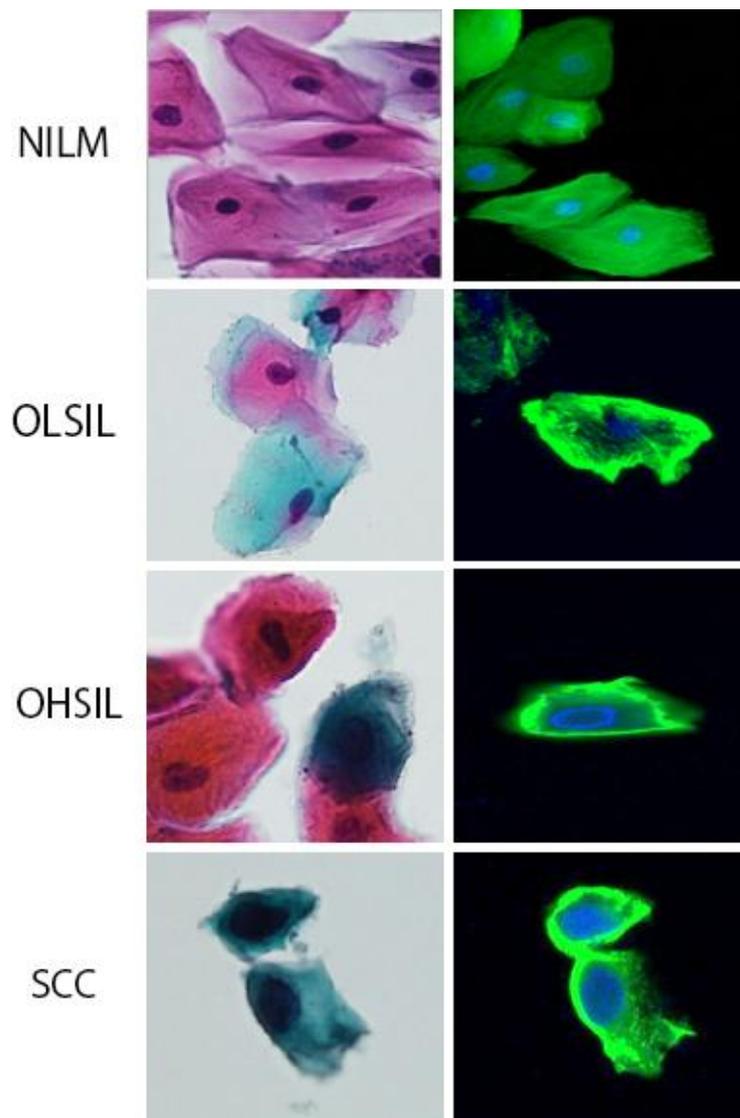


図 2 口腔粘膜細胞診における細胞の PAP 染色像
 (左) と CK 免疫蛍光染色像 (右)
 すべて original mag. ×40

2. F-actin 微細構造と N/C 比の変化

口腔粘膜上皮細胞の F-actin 微細構造は, NILM
 では微絨毛様構造やハニカム様構造としてみられ,
 SCC では細胞外へ突出する細くて長い糸状仮足や

細胞外へ突出する結節状変化がみられた（図 3）。
なお，共焦点レーザー顕微鏡による Z 軸方向 3 次元
的立体構築解析画像から算出した N/C 比は，
NILM と比較して，SCC で有意な上昇を示した（図
4）。

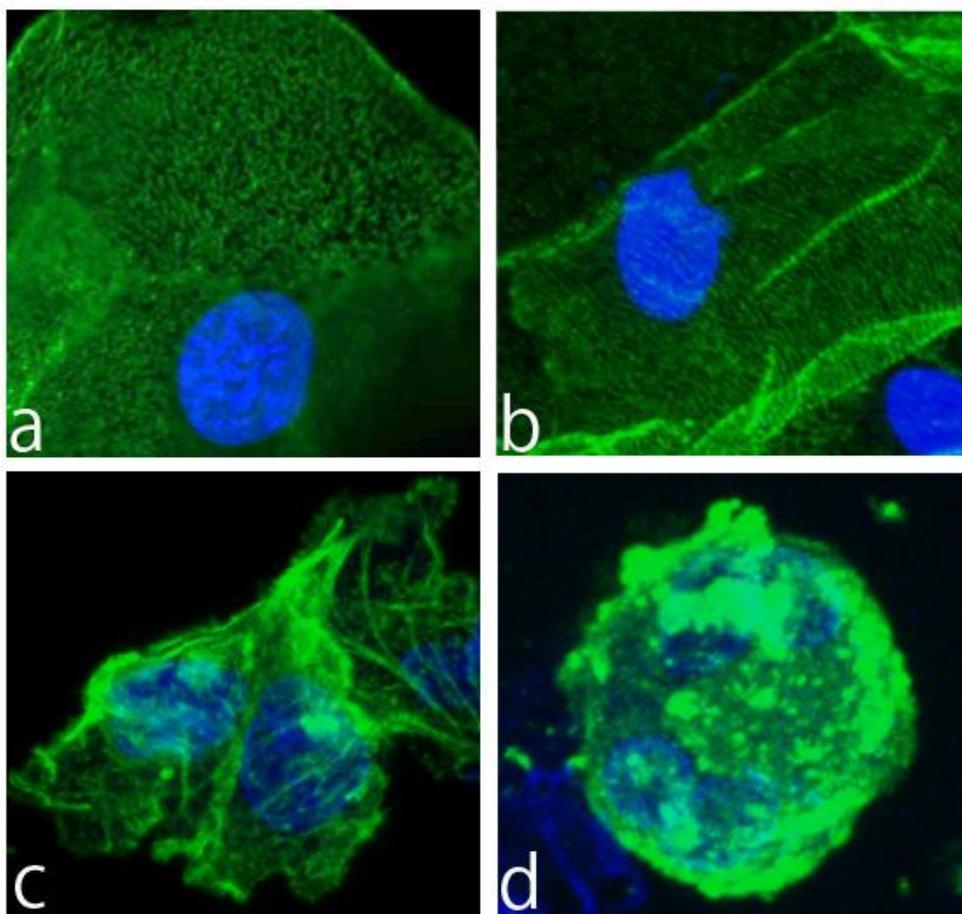
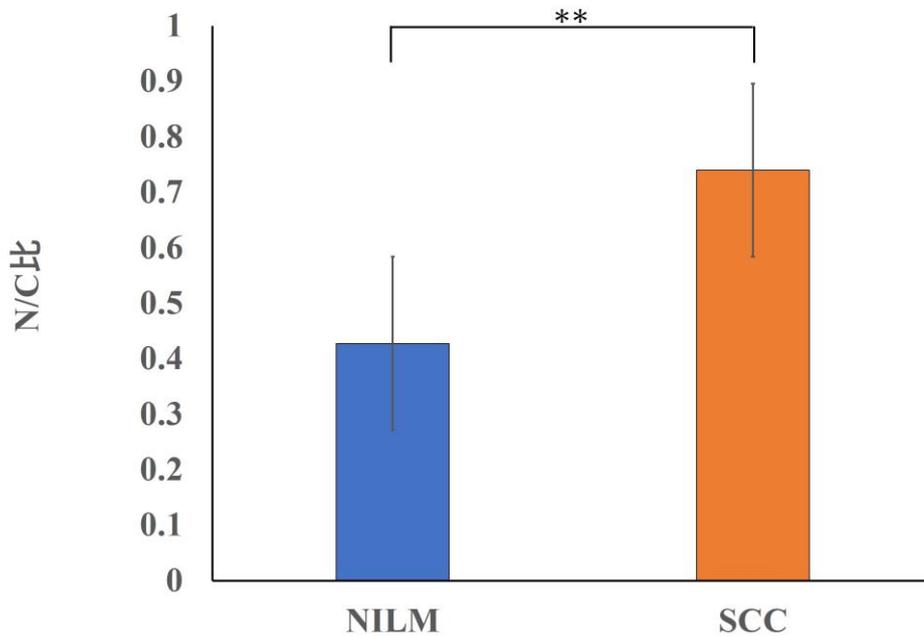


図 3 F-actin 蛍光染色

(a) 短い微絨毛様構造 (NILM, 口蓋粘膜上皮細胞),
(b) ハニカム構造 (NILM, 頬粘膜上皮細胞), (c) F-
actin が凝集した細長い糸状仮足 (SCC, 舌縁部粘膜上
皮細胞), (d) 細胞外へ突出する結節状変化 (SCC, 歯
肉粘膜上皮細胞), original mag. $\times 120$ (a, c), $\times 100$
(b, d)



** $p < 0.01$, N=60

図 4 N/C 比の棒グラフ

縦軸は N/C 比，横軸は病態を示し，バーは標準誤差を示す。

3. F-actin と Cortactin の相互作用による細胞の浸潤能の変化

Cortactin は腫瘍性変化で発現を認め，F-actin と Cortactin の共発現がみられた浸潤突起は，SCC の深層異型細胞にみられたが，輝度が上昇した表層角化細胞や表層異型細胞にはみられなかった（図 5）。

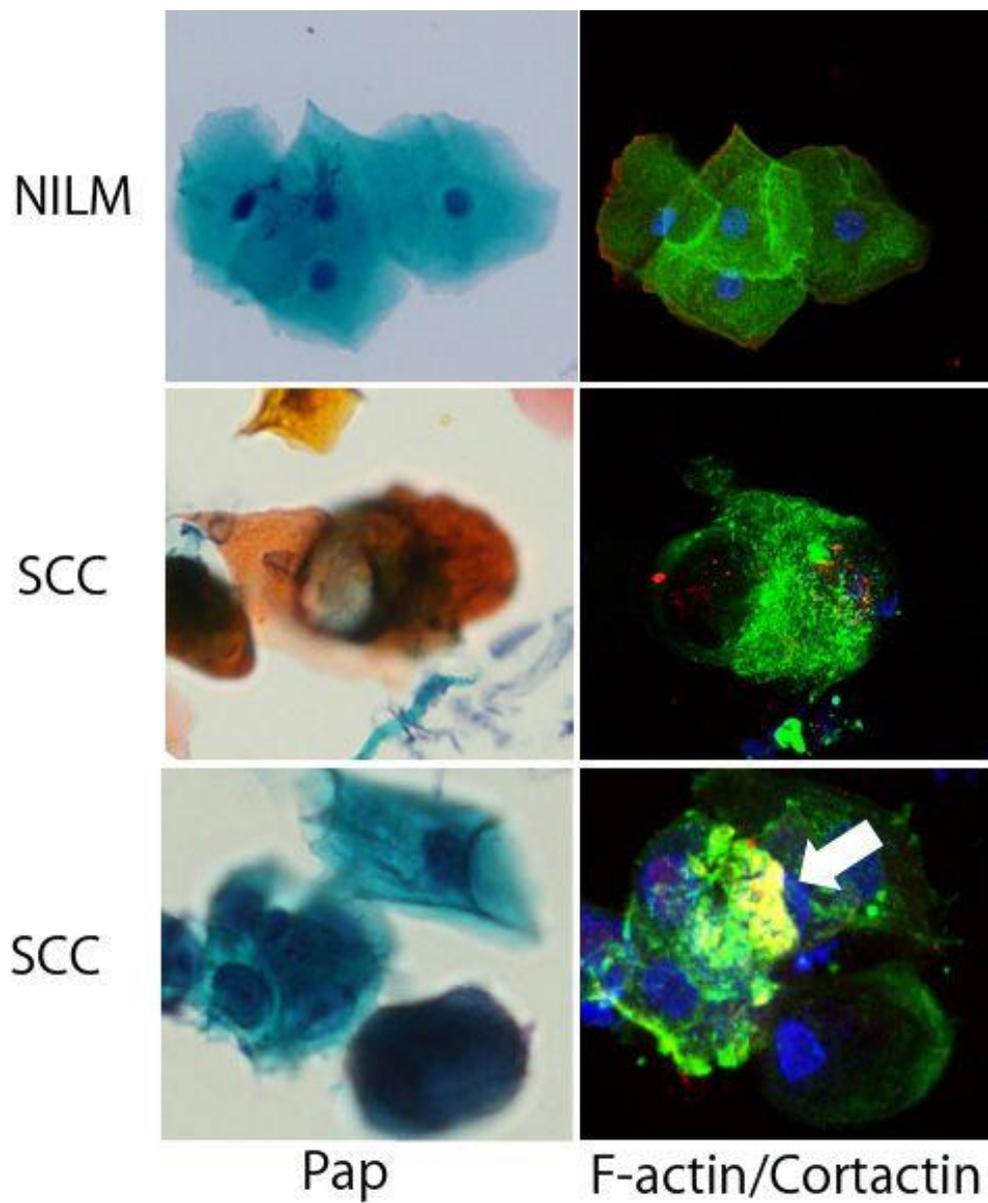


図 5 Pap 染色像と Cortactin/F-actin の蛍光染色像
 NILM（頬粘膜）や SCC（舌縁部粘膜）の表層角化細胞
 では見られなかった浸潤突起が SCC（歯肉粘膜）の深
 層細胞では F-actin と Cortactin の共発現として見られ
 る（白矢印） すべて original mag. ×40

4. 腫瘍性変化の組織における Cortactin の発現強度

正常な頬粘膜標本では，粘膜上皮の有棘層から基底層に Cortactin の弱陽性像がみられ，舌縁部 SCC の生検標本では，正常粘膜上皮と上皮性異形成の境界移行像がみられ，異形上皮の中間層から基底層にかけて Cortactin の陽性像がみられた． SCC10 症例中 7 例では深部および癌胞巣先端部の腫瘍細胞に Cortactin の強発現がみられた（図 6）．

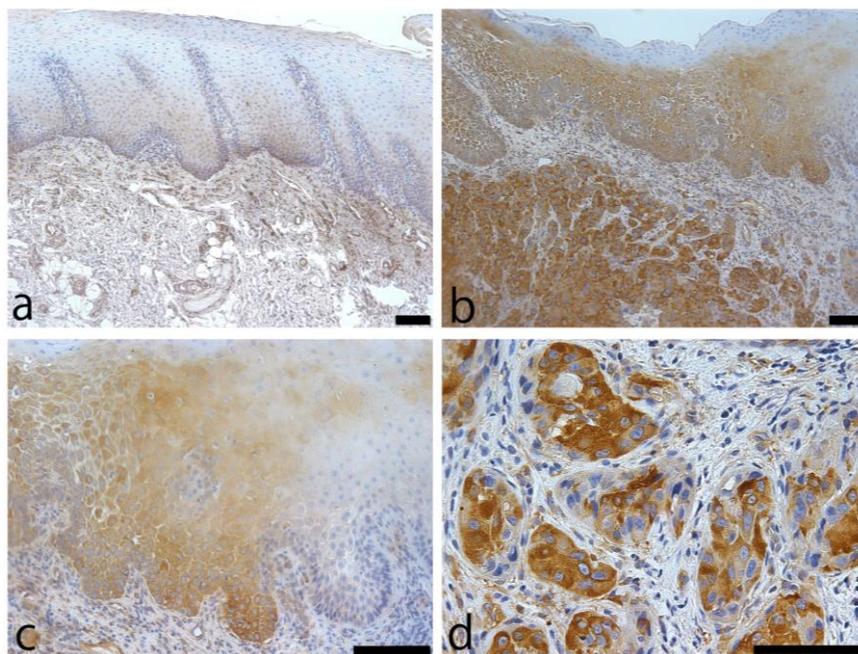


図 6 Cortactin 発現強度の違い

(a) 頬粘膜上皮組織（正常），(b) 舌縁部 SCC 生検組織（正常粘膜上皮から上皮性異形成部との境界，ならびに腫瘍胞巣部を示す．），(c) 上皮性異形成部の一部中拡大像．(d) 胞巣部の一部強拡大像．スケールバー = 100 μ m

考 察

細胞診で行われる P A P 染色では，色素分子の大きさと細胞質の構築密度が大きく関与しており，細胞の分化度によって個々の細胞を染め分けることができる．最も分子量の小さなオレンジ G は構築密度の高い表層の角化細胞へ浸透し，最も分子量の大きなライトグリーンが密度構築の低い深層の基底細胞や中層細胞へ浸透する．分子量が中間のエオジン Y はオレンジ G とライトグリーンの間の様相を取り，表層細胞へ浸透する^{18, 19)}．したがって，オレンジ G やライトグリーン好染の口腔粘膜の上皮細胞は，炎症による影響の場合を除き，腫瘍性変化が進むにつれて次第に細胞が肥厚し，体積の増加が生じている．これは，以前から顕微鏡観察時の焦点合わせステージ上下量で経験的に捉えていたものの，これら P A P 染色の変化を分子レベルで捉えた報告はない．

本研究では，共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞の蛍光標識された細胞骨格関連分子を画像解析で 3 次元構築後，同一の細胞を P A P 染色して細胞骨格分子の動態との裏付けを行った．先行研究として細胞骨格の C K (A E 1 / A E 3) に注目し，免疫蛍光染色と P A P 染色の形態的観察の比較を行い，免疫蛍光染色を行った結果，すべての症例で上皮細

胞に陽性を示し，CK陽性細胞とDAPI核染色による蛍光強度は，腫瘍性変化に伴って上昇した．これらはその後に行った同標本のPAP染色における細胞質オレンジG染色性の上昇やヘマトキシリン好性核腫大および核濃染にそれぞれ対応した変化を示した．口腔擦過細胞診検体を用いたリアルタイムPCRにおいて，正常口腔粘膜上皮細胞と比較し扁平上皮癌細胞におけるCK17の過剰発現が認められた報告²⁰⁾から，PAP染色でみられる細胞質や核の染色性強度とCKの蛍光強度の上昇が，細胞内部に存在する抗原量（分子量）の腫瘍性変化を反映している可能性が示唆された．

次に，F-actinは細胞骨格の中で最も細胞運動に挙動を示し，腫瘍の浸潤・転移に関与するとされているため^{21, 22)}，本分子に注目した．培養扁平上皮癌細胞を用いた抗癌剤の有用性を示す報告では，効果の判定にF-actinの仮足状変化や細胞骨格の変化を評価していることから^{23, 24)}，F-Actinの動態を細胞診標本で捉えようと試みたが，F-Actinは通常のアルコールを主成分としたLBC保存液では構造が破壊され，発現をとらえることができなかったため，細胞の保存や固定を10%ホルマリンに変更したFLBC法でF-actin蛍光染色を行った．NILMと判定された細胞に比べSCCと判定された細胞でアクチンの凝集や糸状仮足等の細胞運動を

示唆する細胞を観察することができ、腫瘍性形態変化を捉えることができたと考えられる。

F-actin の微細構造は、Matravers and Tyldesley²⁵⁾ が示した SEM 像の所見と一致しており、細胞表面の形状を細胞質内の F-actin が構築していることが示唆された。この結果から、F-actin 蛍光染色は PAP 染色の判定を形態学的な観点で裏付けていることが示唆された。

細胞運動の中でも、浸潤転移に関与するといわれている Cortactin は「Cortical actin cytoskeleton (表層アクチン骨格)」に由来しているように、細胞運動の際に形成される葉状仮足や浸潤突起等に発現し、F-actin の重合を促進するといわれている²⁶⁾。そこで F-actin と Cortactin の蛍光免疫染色を行い、両者の共発現から、PAP 染色との比較を行った。SCC と判定された細胞でライトグリーン好性の深層細胞にのみ F-actin と Cortactin の共発現がみられ、腫瘍の浸潤や転移にライトグリーン好性の深層細胞が関与していることが示唆された。さらに組織標本においても、腫瘍性変化に伴い Cortactin の発現強度が上昇し、SCC と診断された症例の 7 割では、上皮性異形成を示す異形上皮で陽性像がみられ、浸潤先端胞巣部では強陽性による強発現がみられたことから、Cortactin は腫瘍細胞の動態を時空間的に捉えていると考えた。また、

腫瘍細胞における Cortactin の F-actin との共発現や組織における浸潤部での強発現は定量化することも可能である。最近、盛んに研究が進んでいるデジタルパソロジーの目的の 1 つにバーチャルスライドを用いた WSI (Whole slide imaging) による診断応用があり、乳がんにおける核分裂像の検出という課題に、AI アルゴリズムと病理医の一致率が高かったと報告されている^{26, 27)}。腫瘍細胞における Cortactin や F-actin 発現細胞の検索をこれら AI で応用して行うことができれば浸潤や転移等の評価をより客観的に定量できる形にすることも可能となり、細胞診判定の向上や組織との正診率向上に寄与することも可能であると考えた。

結 論

口腔粘膜細胞診で判定する上皮細胞の形態学的特徴を細胞骨格分子で検討した。その結果は以下のとおりである。すなわち、

1. LBC法を用いた口腔粘膜細胞診から、PAP染色の形態的所見を細胞骨格関連分子や核の分子学的検索から客観的所見を加えることができた。
2. 細胞診の分子学的手法の介入は、客観的所見の裏付けのみならず病理組織診断所見との正診率を向上させることができた。
3. 本研究結果は、次世代に向けた口腔粘膜細胞診のAI化導入に貢献できる基礎データとして提供可能である。
4. 細胞診レベルでの判定において本研究による根拠のある客観的指標の確立は、腫瘍性変化を段階的に捉えることができ口腔癌の早期発見・早期治療の可能性を広げることができる。

引用文献

- 1) Reibel J, Gale N, Hille J, Hunt J.L, Lingen M, Muller S, Sloan P, Tiakaratne W.M, Westra W.H, Williams M.D, Vigneawaran N, Fatani H.A, Odell E.W and Zain R.B; El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T and Slootweg PJ, eds. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017: 112.
- 2) 内藤善哉, 田中陽一, 石橋浩晃, 伊藤由美, 江原道子, 小川郁子, 金田悦子, 岸野万伸, 久山佳代, 才藤純一, 佐藤由紀子, 田沼順一, 永山元彦, 橋本和彦, 秀島克巳, 松本敬, 松本直行, 矢田直美; 佐々木 寛, 土屋眞一編. 細胞診ガイドライン5 消化器. 1版. 東京: 金原出版; 2015: 20-22.
- 3) 小島勝己, 杉島節夫, 川嶋活彦, 大久保文彦; 西 国広編. ~基礎から学ぶ~細胞診のすすめ方. 4版. 東京: 近代出版; 2001: 180-183.
- 4) 田中陽一; 羽田礼次, 内藤善哉編. 細胞診の基本から実践へ病理と臨床. 1版. 東京: 文光堂; 2013: 297-300.
- 5) 田中 昇. 細胞診スクリーニング自動化の歴史と現在. 2001; 40: 172-175.

- 6) Jayanthi P, Varun BR and Selvaraj J. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma: An insight into molecular mechanisms and clinical implications. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2020; 24: 189.
- 7) Krisanaprakornkit S and Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol*. 2012: 681469.
- 8) 齋藤康二, 太田安隆. がん細胞の浸潤における運動様式の転換制御. *生化学*, 2017; 89: 90-93.
- 9) Bai Y, Sha J and Kanno T. The role of carcinogenesis-related biomarkers in the wnt pathway and their effects on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in oral squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020; 12: 555.
- 10) Abraham L. Kierszenbaum and Laura L. Tres; 内山安男編. 組織細胞生物学 (原書). 3版. 東京: 南江堂; 2015: 33.
- 11) Anand B, Abhiraj R, Swati P and Manju P. Study of cytokeratin AE1/AE3 reactivity in squamous cell carcinoma in aspiration cytology. *Indian J Pathol Oncol*. 2016; 3: 14-18.

- 12) Moll R, Krepler R and Franke WW. Complex cyokeratin polypeptide patterns observed in certain humancarcinomas. *Differentiation*. 1983; 23: 256-269.
- 13) Lane EB and Alexander CM. Use of keratin antibodies in tumor diagnosis. *Semin Cancer Biol*. 1990; 1: 165-179.
- 14) Chu PG and Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002; 40: 403-439.
- 15) 小田俊郎. アクチン研究の展望. 生物物理. 2010; 50: 216-217.
- 16) Bradley A, Lilly J, Robert E and Alan S. Dissecting the functional domain requirements of cortactin in invadopodia formation. *Eur. J. Cell Biol*. 2007; 86: 189-206.
- 17) 山口英樹. がん細胞による浸潤突起形成の分子機構. 生化学. 2012; 84: 35-38.
- 18) 内藤善哉, 田中陽一, 石橋浩晃, 伊藤由美, 江原道子, 小川郁子, 金田悦子, 岸野万伸, 久山佳代, 才藤純一, 佐藤由紀子, 田沼順一, 永山元彦, 橋本和彦, 秀島克巳, 松本敬, 松本直行, 矢田直美; 佐々木 寛, 土屋眞一編. 細胞診ガイドライン5 消化器. 1版. 東京: 金原出版株式会社; 2015: 15.

- 19) 畠山重春, 和泉智子, 安里嗣則; 水口國雄
編. 最新染色法のすべて. 1版. 東京: 医歯薬
出版; 2011: 237.
- 20) 末次志郎. 細胞膜形態形成に関わるタンパク
質と細胞骨格制御の研究. 生化学. 2014; 86:
637-649.
- 21) 原田昌彦, 山崎祥他, 尾間由佳子. アクチン
ファミリー分子によるクロマチン・細胞核機
能制御. 生化学. 2015; 87: 629-632.
- 22) Matravers J and Tyldesley WR. Scanning
electron microscopy of oral epithelial cells.
Part I. Normal and malignant tissue. *Br J Oral
Maxillofac Surg.* 1978; 15: 193-202.
- 23) Pineiro NM, Carneiro ACDM, Crema VO. Rho
GTPases are involved on regulation of
cytodifferentiation of SCC-4 oral squamous cell
carcinoma cell line: A preliminary study. *Asian
Pac. Cancer Prev.* 2020; 21: 3-6.
- 24) Moreira C, Rodrigues L, Pinheiro NM, Tavares-
Murta BM and Crema VO. HA-1077 inhibits cell
migration/invasion of oral squamous cell
carcinoma. *Anti-cancer Drugs.* 2015; 26: 923-
930.
- 25) Ito A, Kudo N and Yoshida M. Regulation of

cancer cell migration by cortactin acetylation and drug discovery research. *MEDCHEM NEWS*. 2017; 27: 190-194.

26) Yamada S, Yanamoto S, Kawasaki G, Mizuno A and Nemoto TK. Overexpression of cortactin increases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2010; 16: 523-531.

27) Klaus P, Eric D, David N, Amandine C, Jean-Pierre V, Thierry M, Sabine R and Catherine A. Circulating epithelial cells in patients with benign colon diseases. *Clin. Chem*. 2012; 58: 936-940.