

免疫組織化学的にみた扁平上皮癌の分化

並 河 勇 人¹⁾ 永 山 元 彦¹⁾ 大 友 克 之²⁾
竹 内 宏¹⁾

1)朝日大学歯学部口腔病理学講座 (主任:竹内 宏教授)

2)朝日大学歯学部外科学講座

抄録 口腔領域の悪性腫瘍で最も発症頻度の高い扁平上皮癌は、角化性扁平上皮癌や非角化性扁平上皮癌に大別されるほか、数種に細分されている。このような組織型は腫瘍細胞の分化の状態と深く関連していることが考えられる。そこで今回、正常口腔粘膜上皮、白板症上皮を対照として、扁平上皮癌の各種について細胞増殖抗原と分化抗原の発現の有無と程度を検討した。その結果、今回検索に供した細胞抗原のほとんどはいずれの組織にも発現される点で共通し、その発現細胞種が異なることが明らかになった。但し、細胞接着性タンパクのE-cadherin, α -および β -cateninは扁平上皮癌にはほとんど発現せず、同タンパクのCD44ファミリーも他の組織に比べて著しい減少傾向を示した。しかし、CD44v6は扁平上皮癌で増加傾向を示し、角化性扁平上皮癌では、over expressionの特徴があった。

以上から、上皮細胞に特異的な発現物質は、扁平上皮癌でreduced, 逆のincreased expression, 時にover expressionし、その結果として異なった分化形態が現れることが強く示唆された。

キーワード:細胞分化, 細胞抗原, 扁平上皮癌

緒 言

悪性腫瘍の中には前癌病変からも腫瘍化するものがある。口腔に発症する上皮性悪性腫瘍(扁平上皮癌, SCC)もその1つで、その前癌病変は白板症, 紅板症, 粘膜下線維症などである。この中で最も発症頻度の高い白板症は、WHOでは均質型と非均質型に大別し、後者の増殖性疣贅型が癌化のリスクが高いとし¹⁾、同じ白板症でも性格がかなり異なることを示している。一方、口腔の扁平上皮癌は、組織像から角化性扁平上皮癌と非角化性扁平上皮癌に大別され、これに加えて基底細胞癌, 基底細胞様扁平上皮癌, 紡錘形細胞扁平上皮癌, 腺様扁平上皮癌, 未分化癌などの亜型がある。

このような白板症の発症と癌化, および扁平上皮癌の中にみられる組織多様性は、口腔粘膜上皮が正常の分化能を消失しつつ腫瘍細胞化すると同時に、その腫瘍細胞がさらに異なる分化を示す結果と考えられる。しかし、これら各疾患における細胞分化の違いについてはよく知られていない。

そこで今回、正常口腔粘膜上皮と白板症および扁平上皮癌の三者における分化の違いを、顕微鏡的および電顕的観察による形態的分野, ならびに免疫組織化学的検索による細胞抗原発現性の面から検討を試みた。

材料と方法

1. 供試材料

1) 正常口腔粘膜

対照として、病理組織学的検索によって非腫瘍性であり、炎症反応等による破壊性変化が軽微で、可及的に正常に近い被蓋上皮(重層扁平上皮)を有する疾患の切除材料20例を供した。

2) 白板症

正常粘膜上皮とSCCの中間的な存在として、20例の白板症を選び、病理組織学的に錯角化あるいは真性角化を有し、上皮層に異型細胞のない群(第1群)と、明らかに異型細胞を認め、前癌病変の可能性の高い群(第2群)の2型に分類し比較検討した。

なお、第1群および第2群に相当する例はそれぞれ10例ずつであった。

3) SCC

生検標本あるいは手術材料から20例のSCCを抽出し、

本論文の要旨は第140回岐阜歯科学会例会(平成13年10月20日, 岐阜)において発表した。
(平成15年1月14日 受理)

病理組織学的に非角化性SCC(第1群)と角化性SCC(第2群)に分類し検索を行った。第1群および第2群とみなすべき例はそれぞれ3例および17例であった。

なお、いずれの供試材料も本学口腔外科来院患者から得た。

2. 標本作製と観察方法

1) 光顕的および電顕的観察

光顕的観察には、各供試材料を10%中性ホルマリンで一晩固定後、通法に従ってパラフィンに包埋し、約6μmの連続切片とした。

また電顕的観察には、各供試材料から5例ずつを抽出し、いわゆる戻し電顕標本を作製した。なお、観察には透過型電子顕微鏡(JEM-1200EX, 日本電子, 東京)を用いた。

2) 免疫組織化学的観察

免疫組織化学的観察に供した一次抗体は表1に示す

ように計10種類で、各抗体は1.0%ウシ血清アルブミンを含む10mMリン酸緩衝液(PBS, pH7.4)で至適濃度に希釈した(表1)。

脱パラフィンした切片を0.3% H_2O_2 を含むメタノールと1.0%ウシ血清アルブミンで内因性ペルオキシダーゼ活性阻止ならびにブロッキングした後、希釈した一次抗体を切片に滴下し、室温で2時間反応させ、ストレプトアビジン・ビオチンペルオキシダーゼ法(LSAB2 kit, Dako, 京都)でペルオキシダーゼを標識し、ジアミノベンチジン過酸化水素水で3分間発色させ、ヘマトキシリンにて細胞核対比染色を行った。

なお、各抗体を用いた発現性の判定は、それぞれの染色強度と陽性細胞数を併せて、(-)~(+++)の評価法を採用した。(-)は非発現、(±)は痕跡程度の発現、(+)は少数細胞の明確な発現、(++)は多数の細胞の発現とし、(+++)は極めて多くの細胞の発現とした。

表1. 検索に用いた1次抗体の種類, タイプ, 希釈倍率および試薬メーカー

Antibody	Type	Dilution	Source
Anti-cytokeratin AE1/AE3	mouse monoclonal	50 folds	Dako, CA, USA
Anti-epithelial membrane antigen (EMA)	mouse monoclonal	100 folds	Dako A/S, Glostrup, Denmark
Anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	mouse monoclonal	200 folds	Santa Cruz Biochemistry, CA, USA
Anti-epidermal growth factor receptor (EGFR)	rabbit polyclonal	100 folds	Santa Cruz Biochemistry, CA, USA
Anti-epithelial cadherin (E-cd)	mouse monoclonal	100 folds	Takara, Otsu, Japan
Anti-alpha catenin (α -ct)	mouse monoclonal	100 folds	Takara, Otsu, Japan
Anti-beta catenin (β -ct)	rabbit polyclonal	100 folds	Takara, Otsu, Japan
Anti-CD44 standard (CD44st)	mouse monoclonal	400 folds	Takara, Otsu, Japan
Anti-CD44 variant3 (CD44v3)	mouse monoclonal	5000 folds	R&D systems, MN, USA
Anti-CD44 variant6 (CD44v6)	mouse monoclonal	1000 folds	R&D systems, MN, USA

結 果

1. 光顕的所見

1) 正常口腔粘膜上皮

対照とした正常口腔粘膜上皮は、基本的に基底層、有棘層、中間層および表層の4層より成るものを選んだ。しかし少数例に中間層と表層にわずかな角化をきたしたものもあった。

2) 白板症

白板症第1群では基底層と有棘層は正常口腔粘膜上皮とほぼ一致した構造を示したが、表層において過真性角化あるいは過錯角化を示す点で異なり、過真性角化を伴う例では顆粒層が発達していた。第2群は基底層と有棘層にhyperchromatism, 核分裂像, 細胞および核の大小不同を主とする異型細胞を混じ、この群には異型性が強く、上皮異形成症と診断すべき症例5例を認めた。

3) SCC

第1群の非角化性SCCと診断した3例は、いずれも腫瘍胞巢中に角質形成細胞がほとんどなく(図1 A),

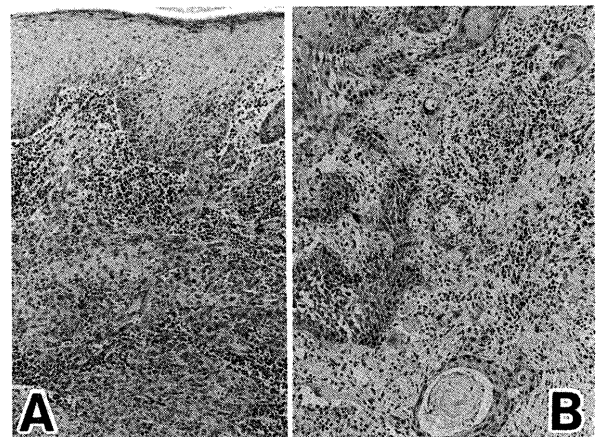


図1. 扁平上皮癌(SCC)の光顕像(Original mag. ×25)
 A: 第1群; 充実性の増殖中に角化細胞をほとんど認めない。
 B: 第2群; 索状および島状の胞巢の多くに角化細胞を認める。

これに対して第2群の角化性SCCは胞巢の随所に角化

細胞を認め、症例によっては胞巣のほぼ全体が角質形成細胞によって占められていた(図1B)。これらSCCの中で、基底膜を破って浸潤増殖を開始し始め、いわゆる初期癌とみなすべき増殖性を示した例は、第1群では1例、第2群では3例で、浸潤増殖が粘膜固有層あるいはそれ以上に達した、いわゆる進行癌の状態の症例は、第1群では2例、第2群では14例であった。そしてその14例中3例にはリンパ節転移を伴っていた。なお、各胞巣は基底細胞や有棘細胞様の細胞が配列するものが多く、この点において正常口腔粘膜上皮と若干の組織類似性を示していた。

2. 電顕的所見

電顕的観察においては、細胞構造は多様であり、却って差異を対比することが困難であった。しかし唯一、tonofilamentとdesmosome complexの形成の様相が分化を知る有力な手懸りとなり得た。そこで、本検索ではこの2つの構造を指標として正常口腔粘膜上皮、白板症およびSCCの対比を試みた。

1) 正常口腔粘膜上皮

基底細胞では細胞質が狭小でありながらミトコンドリアが他層の細胞よりも多く、これに対してdesmosome complexとtonofilamentはわずかであった。しかし、中にはtonofilamentがすでに束状を呈する細胞も散見された。

有棘細胞では全般的にtonofilamentの形成を明確に捉えられたが、その量は基底層側と中間層側とではかなり異なっていた。すなわち、基底層側よりも中間層側で多く、束状をなし、一部にケラトヒアリン顆粒を容れていた。なお、両者ともdesmosome complexは豊富であった。

中間層では細胞は次第に細胞質が扁平化するとともに濃縮核が増え、tonofilamentの形成が著しくなり、さらに表層では核消失をきたした細胞が大部分を占め、極めて発達したtonofilamentを認めた。これに対してdesmosome complexは両層の細胞とも、他部の細胞よりも疎らであった。

2) 白板症

第1群の基底細胞および有棘細胞は正常口腔粘膜のそれとほとんど変わりのない構造を示した。但し、顆粒層を有する白板症では、その顆粒細胞は極めて多数のケラトヒアリン顆粒およびtonofilamentを容れ、また、真性角化を伴う例では、tonofilamentは電子密度の高い束状を呈し、中にケラトヒアリン顆粒の形成を認めた(図2A)。なお、第2群における異型細胞の多くはtonofilament, desmosome complexともわずかであった(図2B)。

3) SCC

第1群ではtonofilament, desmosome complexとも正常上皮や白板症と比べると著しく少なく、とくにtonofilamentの形成性を失った細胞が主体を占めた

(図2C)。これに対して第2群ではdesmosome complexは少ない点で第1群と同様であったが、tonofilamentは強い異型性を示す細胞を除いてすべての細胞にみられ、束状を呈するものが多く、とくにsingle cell keratinizationを起こした細胞では核の周縁をとりまくような配列を示した(図2D)。

3. 免疫組織化学的所見

1) 正常口腔粘膜上皮、白板症およびSCCの各マーカーの免疫組織化学的所見

(1) cytokeratin AE1/AE3の発現性

正常口腔粘膜上皮では上皮全層の細胞の細胞質内に発現を認めたが、基底層の細胞における本物質の発現は微弱であった(図3A)。

白板症第1群では正常口腔粘膜上皮とほぼ同様の所見であった。これに対し第2群では異型細胞に弱い発現、あるいはこれを欠く細胞が多くみられた(図3B)。

SCC第1群では実質細胞における発現は痕跡程度で、一視野中にわずか数個の細胞のみが陽性を示した。これに対して第2群ではほぼすべての腫瘍細胞に強い発現を認めた(図3C)。しかし、異型性の強い細胞では痕跡程度のものもあった。

(2) Epithelial membrane antigen(EMA)の発現性

正常口腔粘膜上皮では主として中間層の細胞に、続いて表層に発現する傾向を示し、有棘層や基底層の細胞では少ないかあるいはほとんど発現を認めなかった。なお中間層の発現は細胞膜、表層のそれは細胞質内であった(図4A)。

白板症第1群では過角化層に発現はなく、他層は正常口腔粘膜上皮とほぼ同様の発現性を示した。しかし、第2群では発現細胞は上皮の広い層に拡がるとともに、ほとんどは細胞質内に発現する傾向を示した(図4B)。また少数例において、発現が基底層の細胞に限局するものがあった。

SCCでは第1群、第2群とも白板症よりもさらに多くの細胞に強い染色を示して発現され、白板症第2群と同様に細胞質内で発現する傾向があった(図4C)。

(3) proliferating cell nuclear antigen(PCNA)の発現性

PCNAはすべての正常口腔粘膜上皮の基底層と有棘層の基底層側に発現を認め、これより表層では発現細胞は全くなかった。

白板症では第1群、第2群ともPCNAの発現細胞数は正常口腔粘膜上皮よりも増加し、とくに第2群では有棘層の細胞の中にも発現をみるものがあった。

SCCでは第1群、第2群とも強い染色性を示してさらに多数の細胞に発現を認め、とくに第1群のように角化傾向の低いSCCの腫瘍細胞には数多い傾向を示した。第2群では、角化細胞には発現はなく、その周囲の角化の程度の低い細胞のみに発現を認めた。

(4) epidermal growth factor receptor(EGFR)の発現性

正常口腔粘膜上皮では20例中9例の基底層の細胞の

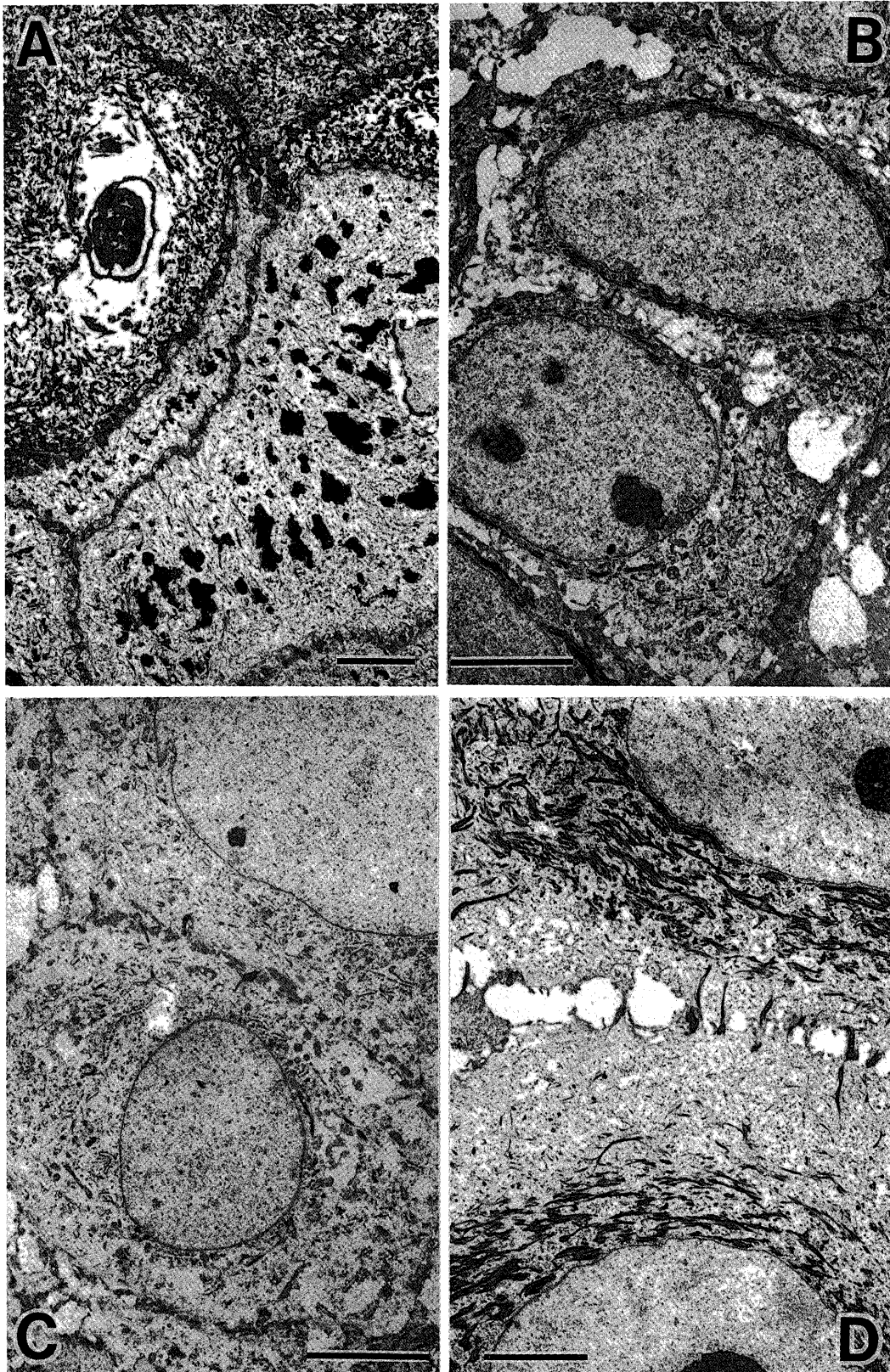


図2. 白板症とSCCの電顕像(Bar = 4 μ m)

- A : 白板症表層部 ; 束状のtonofilamentや多数のケラトヒアリン顆粒を認める.
- B : 白板症異型細胞部 ; tonofilamentは核周囲にわずかに認めるのみで, desmosome complexもわずかである.
- C : SCC第1群 ; tonofilamentの形成をほとんど欠き, desmosome complexもわずかである.
- D : SCC第2群 ; 核周囲に束状のtonofilamentを多数認めたものの, desmosome complexは疎らで少ない.



図3. cytokeratin AE1/AE3の免疫組織化学的所見
 A: 正常口腔粘膜上皮; 基底層を除いた全層に強い発現を認める. (Original mag. $\times 25$)
 B: 白板症第2群; 異型細胞の多くは発現性低下を示す. (Original mag. $\times 50$)
 C: SCC第2群; 実質細胞のすべてに強い発現を認める. (Original mag. $\times 25$)

みに痕跡程度の発現性を示した.

白板症第1群では真性角化および錯角化に拘わらず、正常口腔粘膜上皮と同様に基底層の細胞に局限性で痕跡程度の発現を認めた. これに対して第2群では異型細胞数に対応して発現細胞数が増加し、その発現細胞は正常口腔粘膜上皮の有棘層や中間層の細胞に相当する層に現れる特徴があった. なお、発現が細胞膜上にみられる点でも正常口腔粘膜上皮と異なっていた(図5A).

SCCでは全般的に発現細胞の増加傾向を示した. しかし、その中で、発現細胞の少ない症例と、極めて多数の細胞に強い発現をみる症例を認めた. そして細胞個々にみると、白板症とは異なって細胞質内に発現されるものが多い傾向にあった(図5B). なお、連続切片上でPCNAとEGFRの発現部を詳細に検討してみると、両物質が同時に発現した細胞は正常口腔粘膜上皮や白板症第1群にみられ、他では一致する細胞は極めて少なかった.

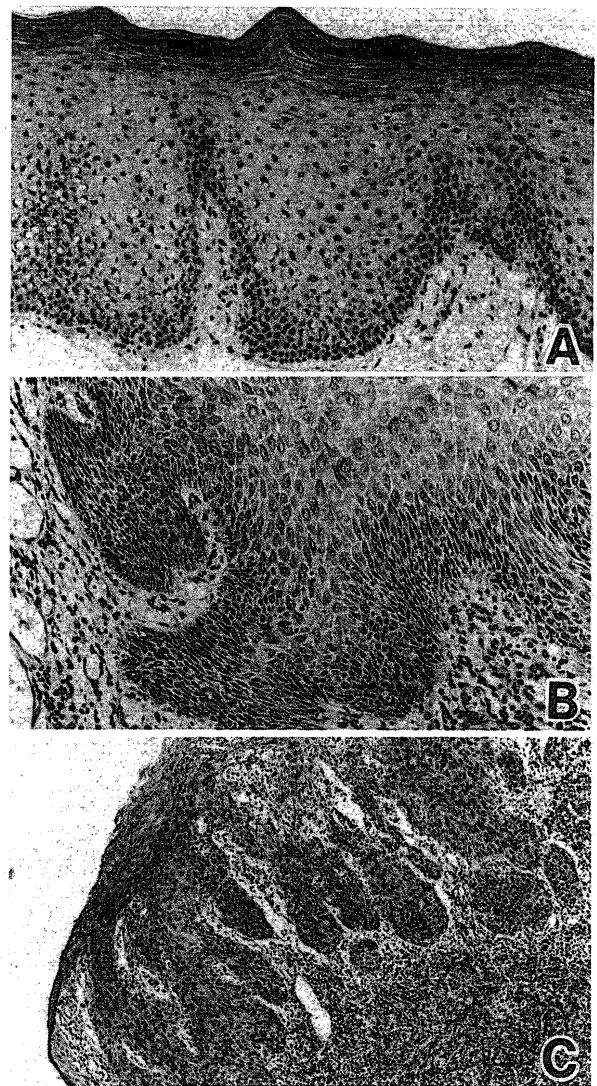


図4. EMAの免疫組織化学的所見
 A: 正常口腔粘膜上皮; 表層と中間層の一部に発現を認める. (Original mag. $\times 50$)
 B: 白板症第2群; 有棘層細胞の細胞質内に発現を認める. (Original mag. $\times 50$)
 C: SCC第1群; 多数の実質細胞に発現を認める. (Original mag. $\times 25$)

(5) 同種細胞接着性タンパクの発現性

正常口腔粘膜上皮では、epithelial cadherin (E-cd) は20例の供試例のうち15例に認められたが、発現は主に有棘層の細胞および一部の中間層の細胞に限られ、基底層と表層では全く発現されなかった. なお、各細胞における発現部位は原形質突起部に一致していた. これに対して α -catenin (α -ct) および β -catenin (β -ct) は20例すべてに認められ、基底層と有棘層の発現は弱く非発現細胞も混在し、中間層の細胞、あるいは有棘層と中間層との移行部の細胞に発現を認めた. これらはE-cdとは異なり細胞質内に発現を認めた.

白板症では、E-cdの発現細胞は第1群、第2群とも正常口腔粘膜上皮に比べると、ほぼ同様かやや減少した. とくに第2群の異型細胞の多い例において減少傾向が目立った. なお、発現は正常口腔粘膜上皮と同様

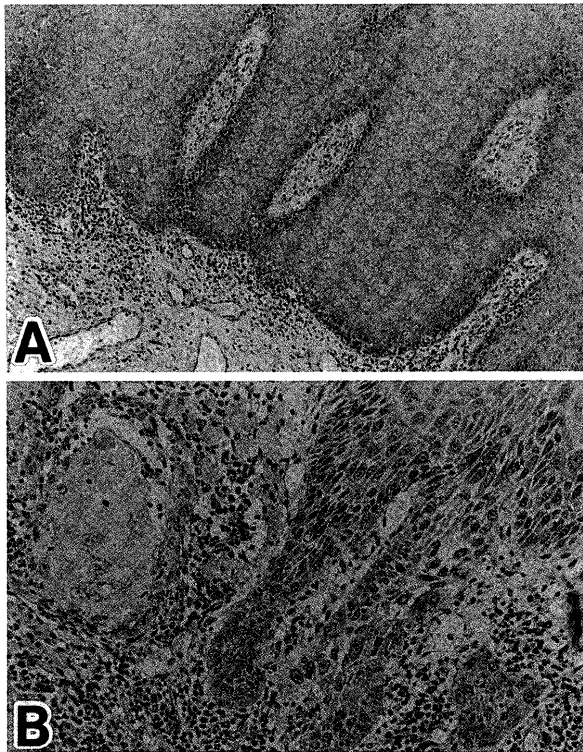


図5. EGFRの免疫組織化学的所見

- A: 白板症第2群; 基底層から有棘層細胞にまで幅広い発現性を認める。(Original mag. $\times 25$)
 B: SCC第2群; 多くの実質細胞の細胞質内に明確な発現を認める。(Original mag. $\times 50$)

に有棘層に限局した。α-ctの発現細胞数はE-cdのそれよりわずかながら多かったが、発現細胞の部位はE-cdとほぼ同様で、基底層の発現は極めて少なかった。しかし、β-ctの発現細胞はE-cdやα-ctよりも若干多く、第1群では基底層にもその発現をみるものがあったが、第2群では基底層の発現は散在性であった。

SCCではさらに減少傾向が強く、E-cd、α-ctおよびβ-ctともほとんどすべての実質細胞において検出できなく、少数例において痕跡程度の発現を示したが、むしろ非発現とみなすべきであった。

(6) CD44の発現性

正常口腔粘膜上皮においては、CD44st、CD44v3およびCD44v6とも基底層に強い染色性を示し、有棘層の一部に弱い染色性を示す発現を認めた(図6 A~C)。

白板症第1群では正常口腔粘膜上皮とほぼ同じく基底層と有棘層の細胞に発現され、中には増加傾向を示す例もあったが、錯角化層や真性角化層では発現はみられなかった。第2群もこれと似た所見であったが異型細胞での発現性は低かった(図6 D~F)。

SCCでは一般に減少傾向を示したが、逆に増加を示す例もあって一定しなかった。しかし、CD44v6については、第1群および第2群とも発現細胞が例外的に多い症例もみられ、特に、第2群の5例はとりわけこの傾向が強く、明らかにover expressionとみなし得る所見を示した(図6 G~I)。

以上のSCCの免疫組織化学的検索において、初期癌、進行癌、転移癌の三者で各マーカーの発現性の明確な差異は見出すことはできなかった。

2) マーカー毎にみた正常口腔粘膜上皮、白板症およびSCCの比較

以上の各マーカーの発現性を正常口腔粘膜上皮を対照として詳しく比較検討すると、図7に示すような傾向を示した。この点を今少し詳しくみると以下の如くであった。

(1) cytokeratin AE1/AE3

正常口腔粘膜上皮の(±)~(++)の発現性に対して、白板症の異常角化層およびSCC第2群で(+++)の発現性を示した。しかし、白板症第2群とSCC中に存在する異型細胞およびSCC第1群の腫瘍細胞は痕跡程度(±)の発現であった。

(2) EMA

正常口腔粘膜上皮では痕跡程度から(+)程度で、白板症では第1群は正常口腔粘膜上皮とほぼ同レベルであり、第2群ではやや増加傾向を示した。これに対し、SCCでは第1群、第2群とも(+)や(++)程度の発現で明らかな増加傾向を示した。

(3) PCNA

正常口腔粘膜上皮に対して、白板症第1群よりも第2群、白板症よりもSCCの順に増加傾向を明確に示した。なお、SCC第1群は第2群よりも発現細胞数がやや多かったが、これは第2群の角化細胞のほとんどがPCNA陰性を示したことによる。

(4) EGFR

正常口腔粘膜上皮と白板症第1群では発現がないか痕跡程度の発現であったのに対し、白板症第2群とSCC第1群でやや増加し、SCC第2群では(++)程度の発現例もあった。

(5) E-cd

正常口腔粘膜上皮は痕跡程度から(++)程度の発現であったのに対し、白板症では(-)や(±)の発現しかなく、SCCでは発現を認めなかった。

(6) α-ctおよびβ-ct

両タンパクの発現性はほとんど一致していた。すなわち、正常口腔粘膜上皮では(±)~(++)程度のやや強い発現であったのに対し、白板症第1群で減少し、第2群で非発現か痕跡程度を示し、SCCではE-cdと同様に発現細胞をみることはできなかった。

(7) CD44

CD44ファミリーは正常口腔粘膜上皮の(+)程度の明確な発現性に対して、白板症第1群で同等かやや減少傾向を示し、第2群ではさらに明確な減少を示した。SCCでは全般的に減少傾向を示しつつも(-)~(+++)まで著しいばらつきがみられ、その中で、SCC第2群の5例にCD44v6の(+++)程度のover expressionとみなすべき症例があった。

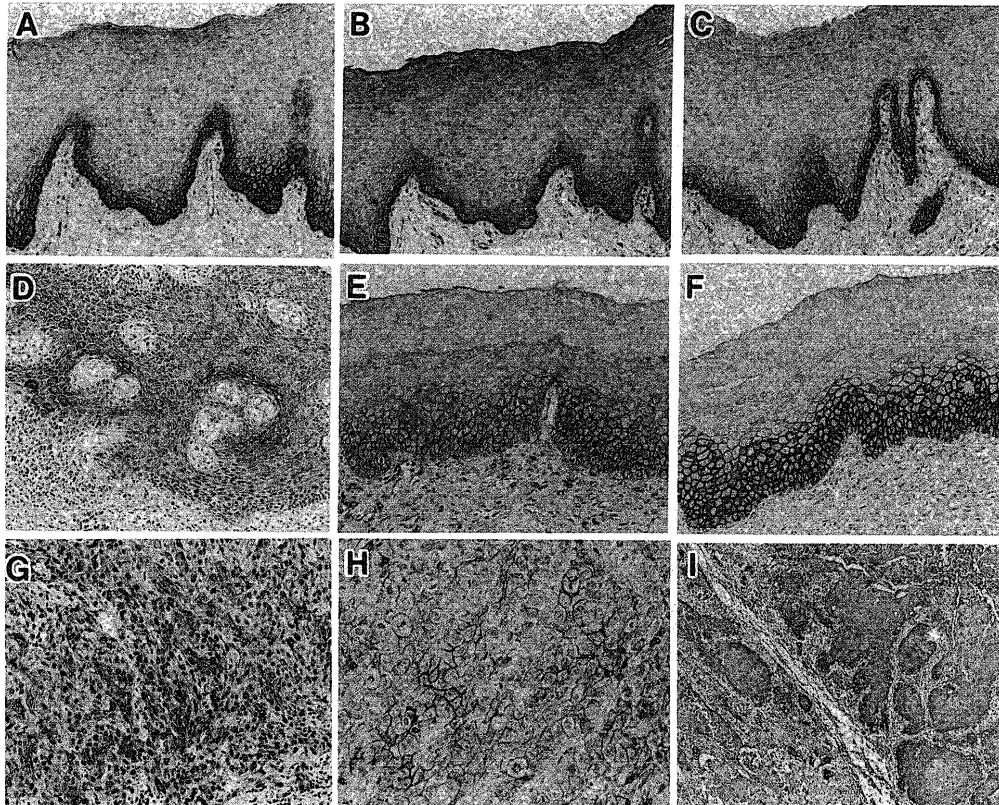


図6. CD44st, CD44v3およびCD44v6の免疫組織化学的所見(Original mag. ×)

- A : 正常口腔粘膜上皮, CD44st ; 基底層とその近傍の細胞に明確な発現を認める. (Original mag. × 25)
- B : 正常口腔粘膜上皮, CD44v3 ; CD44stと同様の発現を認める. (Original mag. × 25)
- C : 正常口腔粘膜上皮, CD44v6 ; CD44stと同様の発現を認める. (Original mag. × 25)
- D : 白板症第2群, CD44st ; 異型細胞に発現低下を認める. (Original mag. × 25)
- E : 白板症第1群, CD44v3 ; 正常口腔粘膜上皮に比べて基底層細胞でやや発現低下を認める. (Original mag. × 25)
- F : 白板症第1群, CD44v6 ; 正常口腔粘膜上皮に比べて基底層細胞でやや発現低下を認める. (Original mag. × 25)
- G : SCC第1群, CD44st ; 胞巣中のいくつかの細胞に発現を認める. (Original mag. × 25)
- H : SCC第1群, CD44v3 ; 胞巣中の一部の細胞に発現を認める. (Original mag. × 50)
- I : SCC第2群, CD44v6 ; 胞巣中のほとんどすべてに強い発現を認め、いわゆるover expressionとみなすべき例. (Original mag. × 10)

	白板症		SCC	
	第1群	第2群	第1群	第2群
Cytokeratin AE1/AE3	↑	↑	↓	↑
EMA	○ ↓	↑	↑	↑
PCNA	↑	↑	↑	↑
EGFR	○	↑	↑	↑
E-cd	↓	↓	↓	↓
α-ct	↓	○ ↓	↓	↓
β-ct	↓	↓	↓	↓
CD44st	↓	○ ↓	↑	↓
CD44v3	↓	↓	↓	↓
CD44v6	○	↓	↑	↑

○ : 正常口腔粘膜上皮と同レベル、↑ : 発現細胞数増加、↓ : 発現細胞数減少

図7. 正常口腔粘膜上皮の発現性と比較した白板症とSCCの各マーカーの発現傾向

考 察

周知のように、分化とは生体細胞が機能的ならびに形態的に成熟して行く過程をいい、これには個体発生時にみられるmajor differentiationと、再生時等でみられるminor differentiationとがある。一方、腫瘍細胞が獲得する分化はこれらとはかなり趣を異にし、異分化と表現されているが、その中でも正常細胞に近い分化を示すものは高分化、著しくかけ離れているものは低分化と呼んで区別されている。このような異分化はその結果として組織細胞の形態にも表現され、それが良性と悪性の決定要因にもなっている。この観点に立って正常口腔粘膜上皮、白板症上皮およびSCCを形態的に対比した場合、光顕的には三者において互いに組織類似性を示す部分と、明らかに異なる部分とが認められた。これは、これら三者の上皮細胞すべてに共通した分化因子と、それぞれに異なる分化因子を有していることを示している。またtonofilamentやdesmosome complexの形成性の面から電顕レベルで検討すると、これら構造物に限って見た場合、三者間に量的な差異があるものの質的には同じであり、異分化の一つとして細胞産生物の形成量の差異も関係していることが示唆された。このような示唆は免疫組織化学的検索によっても確証に近いものであることが窺えた。すなわち、今回検出したマーカーは上皮細胞特異性を決定するタンパク(cytokeratin)、細胞接着性タンパク(カドヘリンファミリー、CD44ファミリー)、その他の胎児性抗原であると同時に腫瘍関連抗原の三群であるが、これらは白板症やSCCでは正常口腔粘膜上皮と対比して一般的にreducedあるいはincreased expressionという発現性の違いを示した。また、この所見はこれら物質をコードする遺伝子のswitch onあるいはoffの機転が分化の違いを左右する一つの因子であることを示唆している。この点を各マーカーについて考察してみると、cytokeratinは上皮特異性マーカーであり、口腔粘膜上皮、白板症第1群を例外としてSCCのすべての供試例で発現された。抗cytokeratinは分子量の違いから極めて多くが標品化されており、理論的にはこれらを用いて上皮細胞の分化を知る手懸りを得ることが可能のように考えられる。また、実際にSCCとその亜型の鑑別に有用とする報告もある¹⁾が、今回の予備的観察では標品毎の発現性の差を明確に捉えることはできなかった。これは認識する分子量の多様性とこれに基づく交叉反応が最大の原因と考えられた。この点を鑑みて、今回はpan cytokeratinに近い性状の抗cytokeratin AE1/AE3のみを最終的にとりあげた。cytokeratin AE1, AE2およびAE3はそれぞれケラチンタイプ中間径フィラメント(50-67kDa)構成タンパクであり、抗AE1は基底細胞に、抗AE2は基底細胞の上部に位置する細胞に、抗AE3は全体の細胞に反応する²⁾。このようなcytokeratin AE1/

AE3は異型細胞全般およびSCC第1群の非角化性SCC実質細胞に発現低下あるいは消失を認めた。この所見は異型細胞とSCC第1群実質細胞がreduced expressionの状態になる点で他とは異なる分化であることを示している。但し、異型細胞の中で、将来角化性を強く獲得するものと、獲得しないままに経過するもののあることは非角化性SCCと角化性SCCの存在で窺い知れる所である。すなわち、両SCCはcytokeratin発現性でみる限り、全く異なる分化状態にあり、とくに第1群は正常口腔粘膜上皮とは著しくかけ離れた存在として捉えることができる。

EMAは、Cerianiら³⁾によってヒト乳脂球に対する抗体が正常上皮や腫瘍上皮に反応性を示すことが報告されたことに端を発し(HMFG; human milk fat globule)、本糖タンパクの抗原決定因子がガラクトースやN-acetylglucosamineであり⁴⁾、正常上皮や高あるいは中等度の分化を示す腺癌に発現されることが明らかにされてきた⁵⁻⁷⁾。本抗体は単に上皮だけでなく、リンパ球系細胞とくに形質細胞にも反応性を示すが⁸⁾、E29のように、形質細胞には反応しなく上皮のみに特異性を示す標品も開発されている⁹⁾。本検索では正常口腔粘膜上皮でも発現をみたが、それは中間層と表層の限局された細胞のみで、本来、cytokeratinのように定常的に発現されない物質と考えられ、白板症でも第1群がこれと類似した発現性であるのに対して、第2群の異型細胞、さらにSCCに多くの発現細胞が現われるという事実は、EMAが上皮細胞の分化異常に際して、明らかにswitch onの状態になることを示している。また、SCC第1群において、SCC第2群より明らかに発現細胞が多いという結果は、cytokeratinと同様にEMA発現性という点でも両腫瘍が若干異なる分化状態にあることを示している。

PCNAは細胞分裂サイクルにおいて分裂期にある細胞が特異的に発現するマーカーであって、口腔癌も含めて腫瘍細胞の発現性についてもすでに数多くの報告がみられる¹⁰⁻¹⁴⁾。このようなPCNA発現細胞は白板症で増加傾向を示し、SCCではさらに多くの発現細胞を認めた。正常口腔粘膜上皮の発現細胞は基底層付近に限局し、生理的再生を行いつつあることを示している。これに対して白板症やSCCでは正常口腔粘膜上皮とは違って発現細胞がかなり随所に拡がり、本質的に異なる増殖性、すなわち腫瘍性増殖あるいはそれに近い増殖性を有していることが強く示唆される。

EGFRはc-erbB-1遺伝子産物であり、c-erbB-2タンパクとともにレセプターのチロシンキナーゼのタイプ1ファミリーで、EGFと結合することによって本レセプターが持つチロシンキナーゼが活性化され、細胞内情報伝達経路を刺激する¹⁵⁾。すなわち、本物質の発現性

は細胞増殖性と密接に関係するものであるが、正常上皮や癌腫において発現と非発現の両方を示すと同時に、癌腫ではc-erbB-2タンパクとともに時にover expressionをも起こすことが確認されている¹⁶⁻¹⁸⁾。しかし、この両タンパクの間には交叉反応がなく、また、EGFR発現細胞は高いレベルのTGF- α を協調的に発現することが報告されている¹⁹⁾。さらに、これらのover expressionは肺癌、子宮癌、膀胱癌において再発や死亡に代表される予後不良を計る一つの指標とされている^{16,20)}。Sakuraiら²¹⁾はc-erbB-3タンパク発現と前癌病変の悪性転化との関係を正常口腔粘膜上皮、verrucous hyperplasiaおよびverrucous carcinomaを材料として検索し、正常口腔粘膜上皮表層に弱い発現を、verrucous hyperplasiaでは症例の39%に、verrucous carcinomaでは84%にその発現を認めている。今回の検索でもPCNAの発現性と相関して白板症第2群やSCCで増加傾向を示した。これは本物質もまた腫瘍細胞とくに悪性傾向の強い細胞に発現されることを示している。また、SCC第2群で若干のover expressionを示し、本物質の発現性からもSCC第1群と第2群は分化の方向が異なることが窺われた。

細胞接着性タンパクの一つであるカルシウム依存性細胞接着分子のカドヘリンスーパーファミリーは、細胞外ドメインで互いの同種細胞が接着し、細胞内ドメインは α -および β -cateninから成るカテニンと接着する。さらにカテニンは中間径フィラメントと結合することによって細胞接着が強固なものになっている²²⁾。このようなカドヘリンは個体発生時にはmorphogenとしても機能し、その発現は整然と統御され、定常的である^{23,24)}。とりわけE-cdはすべての上皮細胞において常に発現される^{25,26)}。一方、E-cdは悪性腫瘍で発現の減少あるいは消退することがよく知られている^{27,28)}。今回の正常口腔粘膜上皮の検索では、カドヘリンおよびカテニンの一連の接着性タンパクは有棘層から中間層の細胞に発現された。この所見は、同種細胞接着性タンパクは、成体においてはかなり分化した細胞に発現されることを示している。この観点に立つてみると、白板症における有棘層の発現細胞の減少は、正常口腔粘膜上皮とは形態的に類似性が高いように見えるもの。実際には正常のそれより分化程度が低いことを示唆している。さらにSCCでは著しいreduced expressionを示した。因みに、Shiozakiら²⁹⁾の食道、胃および肺の

結

今回の検索では正常口腔粘膜上皮と比べて白板症やSCCは若干の組織類似性を有しつつも、異なる形状を示し、その違いを発現物質の面からみると、全般的には質的差異よりもむしろ量的差異として捉えることができた。すなわち白板症の中でも第1群と第2群でその差がかなり明確であり、第1群は概して正常口腔粘

癌腫のE-cdについての免疫組織化学的検索では、それぞれ73%、25%および45%の発現が報告されているが、この報告は今回のほとんど発現されないという今回の検索結果と著しく異なっている。なお、転移の第1段階は腫瘍細胞の剥離であり、カドヘリンが発現されない癌腫では転移の可能性が極めて高くなるといわれている²⁷⁾。これに基づくとSCCは転移し易い癌ということになる。

CD44も膜貫通性接着分子ファミリーで、同時にリンパ球の形成誘導レセプターでもあり、上皮細胞にも発現され、細胞接着に関与していることが明らかにされ³⁰⁻³²⁾、これをコードするCD44遺伝子は11p13染色体上に位置し、少なくとも20個のエクソンを含んでおり、その中の12エクソンは変異的なスプライシングによって多様なバリエーションを作り出すことが知られている^{33,34)}。この多様性はまた、胎生発生期の細胞分化、リンパ球分化、他の血液細胞の分化³⁵⁾はもとより腫瘍細胞の発現として実際上捉えられている³⁶⁻⁴⁰⁾。とくにCD44v5およびCD44v6は癌腫においてよく発現され、時にover expressionが生じ、これが転移と関係しているという見解もある^{37,38,41,42)}。今回用いた抗CD44stは数多くのバリエーションを包含したpanCD44の性格を有している。これに対して、CD44v3とCD44v6は通常、リンパ球、赤血球および血小板に特異的に発現される。これらのいずれの抗体も正常口腔粘膜上皮の基底層から有棘層に陽性反応を示したのに対し、白板症では第1群、第2群とも若干の減少傾向を示し、SCCではCD44v3は両SCCとも明確な減少傾向を示した。しかしCD44stとCD44v6では一定の傾向が得られなかった。とくにCD44v6に対してはover expressionが明らかな症例もあった。この所見は、正常口腔粘膜上皮と比べて白板症およびSCCはCD44stとCD44v3のreduced expressionが生じ、SCCではさらにCD44v6のreduced expressionとover expressionという全く相反する反応が生じ得ることを示し、例えば、SCC第2群の中においてすら分化性の異なるものがあることが示唆された。

なお、リンパ節転移を認めた3例の角化性SCCは他の角化性SCCと比べて特異的な所見はなく、例えばOliveiraら⁴³⁾のSCCにおけるCD44発現の免疫組織化学的検索でCD44v5やCD44v6の発現がSCCの転移に関連するという報告とは相反するものであった。

論

膜上皮に近く、一方、第2群はSCCに近似する発現性を示すものが多い傾向を示した。また、SCCであっても第1群と第2群とで明らかに異なる発現性を示すものがあり、角化性と非角化性では、同じSCCであっても、明らかに分化の方向性が異なることが示唆された。ひいては形態的には一見、過形成や形質的付加として捉え

られる分化の違いの要因の一つとして、種々の物質をリンクするそれぞれの遺伝子のswitch onやswitch offへの変動が深く関係していることが窺えた。

なお、このような遺伝子のswitch on, offをひき起こす機転としては、これらに関与する統御因子が極めて複雑な機構の中でいずれかが統御を失って生じると考えられたが、この点に関しては今後、一連の遺伝子解

析およびこれに関連する解析等を行うことによって手懸りを得るべく準備中である。

稿を終えるにあたり、終始ご懇意なるご指導ならびにご教示を賜りました朝日大学歯学部口腔病理学講座竹内 宏教授にこの場をお借りして感謝いたします。

文 献

- 1) Takata, T., Ito, H., Ogawa, I., Miyauchi, M., Ijuhin, N. and Nikai, H. : Spindle cell squamous carcinoma of the oral region. An immunohistochemical and ultrastructural study on the histogenesis and differential diagnosis with a clinicopathological analysis of six cases. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, **419** : 177~182, 1991.
- 2) Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G. and Sun, T. T. : Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J. Cell. Biol.*, **95** : 580~588, 1982.
- 3) Ceriani, R. L., Thompson, K., Peterson, J. A. and Abraham, S. : Surface differentiation antigens of human mammary epithelial cells carried on the human milk fat globule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **74** : 582~586, 1977.
- 4) Ormerod, M. G., Steele, K., Westwood, J. H. and Mazzini, M. N. : Epithelial membrane antigen : partial purification, assay and properties. *Br. J. Cancer*, **48** : 533~541, 1983.
- 5) Heyderman, E., Steele, K. and Ormerod, M. G. : A new antigen on the epithelial membrane : its immunoperoxidase localization in normal and neoplastic tissue. *J. Clin. Pathol.*, **32** : 35~39, 1979.
- 6) Sloane, J. P. and Ormerod, M. G., Carter, R. L., Gusterson, B. A. and Foster, C. S. : An immunocytochemical study of the distribution of epithelial membrane antigen in normal and disordered squamous epithelium. *Diagn. Histopathol.*, **5** : 11~17, 1982.
- 7) Sloane, J. P., Hughes, F. and Ormerod, M. G. : An assessment of the value of epithelial membrane antigen and other epithelial markers in solving diagnostic problems in tumor histopathology. *Histochem. J.*, **15** : 645~654, 1983.
- 8) Delsol, G., Gatter, K. C., Stein, H., Erber, W. N., Pulford, K. A., Zinne, K., and Mason, D. Y. : Human lymphoid cells express epithelial membrane antigen. Implications for diagnosis of human neoplasms. *Lancet*, **17** : 1124~1129, 1984.
- 9) Cordell, J., Richardson, T. C., Pulford, K. A., Ghosh, A. K., Gatter, K. C., Heyderman, E. and Mason, D. Y. : Production of monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in diagnostic immunocytochemistry. *Br. J. Cancer*, **52** : 347~354, 1985.
- 10) Costa, Ade L., de Araujo, N. S., Pinto, Ddos S. and de Araujo, V. C. : PCNA/AgNOR and Ki-67/AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, **28** : 438~441, 1999.
- 11) Tralongo, V., Rodolico, V., Luciani, A., Marra, G. and Daniele, E. : Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res.*, **19** : 3503~3510, 1999.
- 12) Sittel, C., Ruiz, S., Volling, P., Kvasnicka, H. M., Jungehulsing, M. and Eckel, H. E. : Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.*, **35** : 583~589, 1999.
- 13) Karki, A., Mantyla, E., Hirsimaki, Y., Karlsson, S., Toikkanen, S. and Hirsimaki, P. : Comparison of the effects of tamoxifen and toremifene on rat hepatocarcinogenesis. *Arch. Toxicol.*, **74** : 249~256, 2000.
- 14) Coletta, R. D., Cotrim, P., Vargas, P. A., Villalba, H., Pires, F. R., de Moraes, M. and de Almedia, O. P. : Basaloid equamous carcinoma of the oral cavity: report of 2 cases and study of AgNOR, PCNA, p53 and MMP expression. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.*, **91** : 563~569, 2001.
- 15) Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. : The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science*, **241** : 42~52, 1988.
- 16) Gullick, W. J. : Prevalence of overexpression of the EGF receptor in human tumours. *Br. Med. Bull.*, **47** : 87~98, 1991.
- 17) Di Fiore, P. P., Pierce, J. H., Kraus, M. H., Segatto, O., King, C. R. and Aaronson, S. A. : erbB-2 is a potent oncogene when overexpressed in NIH / 3T3 cells. *Science*, **237** : 178~182, 1987.
- 18) Suda, Y., Aizawa, S., Furuta, Y., Yagi, T., Ikawa, Y., Saitoh, K., Yamada, Y., Toyoshima, K., Yamamoto, T. : Induction of a variety of tumors by c-erbB-2 and clonal nature of lymphomas even with the mutated gene (Val659-Glu659). *EMBO J.*, **9** : 181~190, 1990.
- 19) Gullick, W. J., Hughes, C. M., Mellon, K., Neal, D. E. and Lemoine, N. R. : Immunohistochemical detection of the epidermal growth factor receptor in paraffin-embedded human tissues. *J. Pathol.*, **164** : 285~289, 1991.
- 20) Gullick, D. E. and Venter, D. J. : The Molecular Biology of Cancer. (The c-erbB-2 gene and its expression in human tumours.) (Sikora, K. Waxman, K.),

- Blackwell Scientific Publications (Oxford), 38~53, 1989.
- 21) Sakurai, K., Urade, M., Takahashi, Y., Kishimoto, H., Noguchi, K., Yasoshima, H. and Kubota, A. : Increased expression of c-erbB-3 of protein and proliferating cell nuclear antigen during development of verrucous carcinoma of the oral mucosa. *Cancer*, **89** : 2597~2605, 2000.
 - 22) Takeichi, M. : Cadherins: A molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu. Rev. Biochem.*, **59** : 237~252, 1990.
 - 23) Duband, J. L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M. and Thiery, J. P. : Adhesion molecules during somitogenesis in the Avian Embryo. *J. Cell Biol.*, **104** : 1361~1374, 1987.
 - 24) Takeichi, M. : The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*, **102** : 639~655, 1988.
 - 25) Shirayoshi, Y., Okada, T. S. and Takeichi, M. : The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell*, **35** : 631~638, 1983.
 - 26) Yoshida-Noro, C., Suzuki, N. and Takeichi, M. : Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with monoclonal antibody. *Dev. Biol.*, **101** : 19~27, 1984.
 - 27) Fidler, I. J. : Origin and biology of cancer metastasis. *Cytometry*, **10** : 673~680, 1989.
 - 28) Shimoyama, Y., Hirohashi, S., Hirano, S., Noguchi, M., Shimosato, Y., Takeichi, M. and Abe, O. : Cadherin cell-adhesion molecules in human epithelial tissues and carcinomas. *Cancer Res.*, **49** : 2128~2133, 1989.
 - 29) Shiozaki, H., Tahara, H., Oka, H., Miyata, M., Kobayashi, K., Tamura, S., Iihara, K., Doki, Y., Hirano, S., Takeichi, M. and Mori, T. : Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am. J. Pathol.*, **139** : 17~23, 1991.
 - 30) Haynes, B. F., Liao, H. X. and Patton, K. L. : The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells*, **3** : 347~350, 1991.
 - 31) Stamenkovic, I., Aruffo, A., Amiot, M. and Seed, B. : The hematopoietic and epithelial forms of CD44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J.*, **10** : 343~348, 1991.
 - 32) Jackson, D. G., Buckley, J. and Bell, J. I. : Multiple variants of the human lymphocyte homing receptor CD44 generated by insertions at a single site in the extracellular domain. *J. Biol. Chem.*, **267** : 4732~4739, 1992.
 - 33) Sreaton, G. R., Bell, M. V., Jackson, D. G., Cornelis, F. B., Gerth, U. and Bell, J. I. : Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD 44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89** : 12160~12164, 1992.
 - 34) Sreaton, G. R., Bell, M. V., Bell, J. I. and Jackson, D. G. : The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human and rat. *J. Biol. Chem.*, **268** : 12235~12238, 1993.
 - 35) Günther, U. : CD44 : a multitude of isoforms with diverse functions. *Cur. Top. Microbiol. Immunol.*, **184** : 47~63, 1993.
 - 36) Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zoller, M., Haussman, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H. and Herrlich, P. : A new variant of glycoprotein CD 44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, **65** : 13~24, 1991.
 - 37) Wielenga, V. J., Heider, K. H., Offerhaus, G. J., Adolf, G. R., van-den-Berg, F. M., Ponta, H., Herrlich, P. and Pals, S. T. : Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.*, **53** : 4754~4756, 1993.
 - 38) Kaufmann, M., Heider, K. H., Sinn, H. P., Von Minckwitz, G., Ponta, H. and Herrlich, P. : CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet*, **345** : 615~619, 1995.
 - 39) Piffko, J., Bankfalvi, A., Klauke, K., Dreier, R., Joos, U., Bocker, W. and Schmid, K. W. : Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44-v6 and v-5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Med.*, **25** : 502~506, 1996.
 - 40) Bahar, R., Kunishi, M., Kayada, Y. and Yoshida, K. : CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **26** : 443~446, 1997.
 - 41) Heider, K. H., Dämmrich, J., Skroch-Angel, P., Müller-Hermelink, H. K., Vollmers, H. P., Herrlich, P. and Ponta, H. : Differential expression of CD44 splice variants in intestinal-and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.*, **53** : 4197~4203, 1993.
 - 42) Ue, T., Yokozaki, H., Kagai, K., Higashikawa, K., Yasui, W., Sugiyama, M., Tahara, E. and Ishikawa, T. : Reduced expression of the CD44 variant exons in oral squamous cell carcinoma and its relationship to metastasis. *J. Oral Pathol. Med.*, **27** : 197~201, 1998.
 - 43) Oliveira, D. T., Sheriff, M. and Odell, E. W. : Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, **27** : 303~307, 1998.

Immunohistochemical Evaluation of Differentiation of Oral Squamous Cell Carcinomas

HAYATO NAMIKAWA¹⁾, MOTOHIKO NAGAYAMA¹⁾, KATSUYUKI OHTOMO²⁾
and HIROSHI TAKEUCHI¹⁾

¹⁾ Department of Oral Pathology, Asahi University School of Dentistry
(Chief : Prof. Hiroshi Takeuchi)

²⁾ Department of Surgery, Asahi University School of Dentistry
1851 Hozumi-cho, Motosu-gun, Gifu pref., 501-0296, Japan

Key words : Cellular differentiation, Cellular antigen, Squamous cell carcinoma

Abstract Oral squamous cell carcinomas (SCC) can be histologically classified as keratinized, non-keratinized, basal cell, basaloid, spindle cell and undifferentiated type. These variants of oral SCC are considered to arise due to different in degrees of tumor cell differentiation.

The present study was performed to determine the difference between keratinized and non-keratinized oral SCC by immunohistopathological methods using normal oral mucosa and leukoplakia as control materials. Although almost cellular antigens (cytokeratin AE1 / AE3, epithelial membrane antigen(EMA), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), epidermal growth factor receptor (EGFR), CD44 families excepting for E-cadherin, α - and β -catenin) were immunoreactive to all epithelium supplied to the present investigation, the intensity of immunoreactivity and the value of immunopositive cells for specific antibodies to the cellular antigens exhibited a tendency to decrease as the lesions were more malignant. E-cadherin, α - and β -catenin were detected in the tissue of oral SCC. The difference in immunoreactivity between keratinized and non-keratinized oral SCC could not be distinguished, however, CD44v6, a kind of CD family, was characterized by the specific finding that the antigen is over expressed in some cases of keratinized type oral SCC.

These results obtained from the present study suggest that the difference in the degree of expression of epithelium specific cellular antigens, such as reduced, increased and/or over expressions depends much on the cellular differentiation of variants of oral SCC.