

ヒト歯肉過形成（いわゆるエプーリス）における増殖因子と そのレセプターの免疫組織化学的局在

川原田 裕 子 佐 藤 勝 竹 内 宏

Immunohistochemical Localization of Some Growth Factors and Their Receptors in the Human Gingival Hyperplasia (so-called epulis)

KAWARADA YUKO, SATO MASARU and TAKEUCHI HIROSHI

歯肉の結節性過形成（エプーリス；GH）の形成機序を明らかにするために、数種の代表的成長因子とその特異的レセプターを免疫組織化学的に検出した。その検出に際して、GHは光顕的に、肉芽組織優位型（granulation dominant type (GDT)）(病巣の60%以上が肉芽組織) (20例)、線維組織優位型（fibrous tissue dominant type; FDT）(60%以上が線維組織) (21例)そしてGDTやFDTに骨やセメント質が存在する骨・セメント形成型（cemento-ossifying type; COT）(21例)の3型に大別した。さらに、これらGHを細分類し、GDTはほとんど肉芽組織のみから成るType I（13例）、肉芽組織中に線維組織が疎らに形成されたType II（7例）に分け、FDTは40%以下の肉芽組織が混じるType III（7例）、肉芽組織がわずかで70-80%が線維組織より成るType IV（6例）、線維組織のみから成るType V（8例）に分けた。COTはType IIからType V中に硬組織を認め、GDTのType Iにはこれを認めなかった。

免疫組織化学的検索の1次抗体は、増殖因子はepidermal growth factor (EGF), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor- α および- β (TGF- α , TGF- β), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), tumor necrosis factor- α および- β (TNF- α , TNF- β), hepatocyte growth factor (HGF)を抗原としたものであり、これらに対するレセプターはEGFR, IL-1 R, TGF- β RI・TGF- β RII, PDGFR-, Bek (FGFR II), TNFR II, HGFRに対する抗体とした。また、これらに加えて、マクロファージ (M) を検出するためにCD68, トロポコラーゲンと線維芽細胞を検出するためにfibroblast 5 B 5 (F5B5)抗体をも採用した。

EGFはEGFRとともにいずれのエプーリスにも上皮以外は陰性、TNF- α , TNF- β とTNFR II, HGFとHGFRはすべての症例においてすべての細胞が陰性であった。IL-1とIL-1 R, PDGFとPDGFR-, b-FGFとBekはほぼすべての病型に頻度高く検出された。また、TGF- β 1はV型を除くすべての病型の多くの細胞に陽性で、そのレセプターのTGF- β RIは陰性が弱陽性を示し、TGF- β RIIはV型を除く各病型の線維芽細胞や血管芽細胞および骨・セメント質形成性エプーリスの間葉細胞に陽性であった。

これらの増殖因子とそのレセプターに対する陽性反応はM, 線維芽細胞, 血管芽細胞, 血管内皮細胞, そしてCOTに特異的な間葉系組織細胞に認められた。

CD68を用いた検索では、Mの浸潤や局在はGHの肉芽組織の増殖の程度に相関し、従って、CD68陽性細胞はType IやType IIに多く、Type Vでは極端に少ないことが判明した。F5B5はType I(6例), Type II(3例), Type III(3例)とCOTのType II(3例), Type IV(4例)にも検出された。

これらの所見から、エプーリスにおける肉芽組織中の細胞の増殖のための主な成長因子とレセプターはIL-1, b-FGF, TGF- β 1とこれらの特異的レセプターであること、その主要な産生細胞はMであり、パラクリン的に線維芽細胞や血管芽細胞が増殖することが示唆された。また、TGF- β 1はIV型の線維芽細胞と線維細胞に最もよく発現したところから、線維芽細胞の増殖とともに線維細胞への成熟と膠原線維の形成に関わっている可能性と骨・セメント質形成性エプーリスの間葉系組織への分化にも関与していることが示唆された。

キーワード：歯肉過形成，成長因子，レセプター，免疫組織化学的局在

Immunohistochemical localization of some typical growth factors and their specific receptors in gingival hyperplasia, so-called epulis (GH), was examined in order to clarify the mechanism of GH formation. Prior to immunohistochemistry, GH was microscopically divided into granulation tissue-dominant types (GDT) consisting of more than 60% granulation tissue of GH (20 cases), fibrous-tissue dominant types, consisting of more than 60% fibrous tissue (FDT) (21 cases) and cemento-ossifying-types, consisting of cemento and/or osseous tissue in GDT or FDT (COT) (22 cases). These three types of GH were further classified into small groups. GDT was classified into Type I, which was simplified by only one component of proliferation of granulation tissue (13 cases) and Type II, which was accompanied by sparsely formed fibrous tissue (7 cases). FDT was classified into Type III, consisting of fibrous tissue with less than 40% granulation tissue (7 cases), Type IV, consisting of more than 70-80% fibrous tissue and sparsely localized granulation tissue (6 cases) and Type V, consisting of only fibrous tissue (8 cases). COT showed the formation of hard tissues in Type II to Type V, but was investigated in Type I of GDT.

Antibodies to some growth factors, epidermal growth factor (EGF), interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor- β (TGF- β), transforming growth factor- α (TGF- α), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and (TNF- β) and hepatocyte growth factor (HGF) and antibodies to their specific receptors, EGFR, IL-1 R, TGF- β R I, TGF- β R II, PDGFR- β , Bek (FGFR II), TNFR II, and HGFR, were used for the present immunohistochemistry. Adding to the above antibodies, antibodies to CD 68 and fibroblast 5B5 (F5B5) were also adopted to identify macrophage (M) and detect tropocollagen and/or fibroblast, respectively.

EGF and EGFR were not recognized in tissue except the epithelium. The expression of TNF- α , TNF- β , TNFR II, HGF and HGFR were negative in all cells in all types of GH. In contrast to negative findings of such growth factors and receptors, IL-1, IL-1 R, PDGF, PDGFR- β , b-FGF, and FGFR II were demonstrated in all types of GH. TGF- β 1 and TGF- β R II were positive in the GH except Type V. The growth factors and receptors were mainly found in the cytoplasm of M, fibroblasts, angioblasts, endothelial cells, and mesenchymal cells which differentiated and proliferated around the cemento-osseous tissue of COT.

The examination using antibody to CD 68 clarified the infiltration and/or localization of M corresponding to the degree of proliferation of granulation tissue of each type of GH. Thus, positive cells were abundant in Type I and Type II, while, they were rare in Type V.

F5B5 was detected in some cases of Type I (6 cases), Type II (3 cases) and Type III (2 cases). F5B5 was also found in the 3 cases each of Type II and Type III, and 4 cases of Type IV of COT.

These findings on microscopy and immunohistochemistry indicate that the main growth factors and receptors leading proliferation of granulation tissue are IL-1, b-FGF, and TGF- β 1, and their specific receptors. It was also identified that the main producer of these growth factors involved in granuloma formation is M, suggesting that the proliferation of fibroblasts and angioblasts is mediated by the paracrine system. The formation of collagen fibers which take a FDT direction was suggested to arise in Type I to Type III of GH with the formation of granulation tissue, and the mature fibers transform GH to epulis fibrosa. TGF- β 1 and TGF- β R II were suggested to participate in the transformation of GH to FDT in view of the function of TGF- β 1.

Key words: gingival hyperplasia, growth factors, receptors, immunohistochemical-localization

緒 言

従来、エプーリスとされてきた歯肉の病変は Shafer¹⁾が a growth on the gingiva とし、Cawson and Eveson²⁾が結節性過形成の一つとして扱っているように、真の腫瘍ではなく過形成である。この代表例は線維性エプーリス(肉芽腫性エプーリスを含む)であり、口腔の種々の結節性過形成の中で発現頻度の高い疾病の一つである。その原因として、生物的原因(細菌感染)や外傷(咬傷, 不適合義歯, 齶窩), 内分泌的原因等が挙げられているが、過形成と線維化の機転の本態は

各種の増殖因子とそのレセプターの発現である。

そこで今回、エプーリス(gingival hyperplasia; GH とする)において、どのような増殖因子とレセプターが関わっているのかを免疫組織化学的手法を中心に検索した。

材料と方法

1. 被験材料

朝日大学歯学部口腔外科にて切除された GH63例を被験材料とし、切除後即座に10%中性ホルマリンにて固定した後(2日間)、通常によってパラフィン包埋

し、5 μm の連続切片を作製した。

2. 病型分類

これら63例の各切片にヘマトキシリン・エオジン染色(HE染色)を施し、肉芽組織と線維成分の占める比率と硬組織形成の有無を指標として、まず病型の詳細な分類を行った。すなわち、肉芽組織の占める割合が60%以上の例を肉芽腫性エプーリス(GH granulation tissue-dominant type; GDTとする)(20例)、線維成分の占める割合が60%以上の例を線維性エプーリス(GH fibrous tissue-dominant type; FDTとする)(21例)、GDTあるいはFDTにかかわらず骨およびセメント質形成を伴う例を骨・セメント質形成性エプーリス(Gingival hyperplasia with cemento-osteoplastica; COTとする)(22例)に大別し、さらに結果の項で述べるように、GDTを2型に、またFDTを3型に分類した。

3. 免疫組織化学的検索

1) 1次抗体

まず、炎症病巣において多くの増殖因子の産生細胞の位置を占めるマクロファージ(以下Mとする)の同定と、肉芽組織の線維組織の成分をなすトロポコラーゲンの線維芽細胞による産生性について検索し、続いて各種増殖因子およびそのレセプターの発現性を免疫組織化学的に検索した。

その免疫組織化学的検索のために以下の1次抗体を採用した。

(1) M とトロポコラーゲンの検出

CD68と fibroblast 5B5 (F5B5) の抗血清を用いた。

(2) 増殖因子とそのレセプターの検出

最も代表的な増殖因子の epidermal growth factor (EGF) interleukin-1 (IL-1), transforming growth factor-α および-β (TGF-α および-β), platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF), tumor necrosis factor-α (TNF-α), hepatocyte growth factor (HGF) と、これらの特異的レセプターの EGF receptor (EGFR), IL-1 receptor (IL-1R), TGF-α receptor (TGF-RI と-RII), PDGF receptor (PDGFR-α), b-FGF receptor (FGFR II, Bek), TNF-α receptor (TNFR II), HGF receptor (HGFR) の抗血清を採用した。

(3) 反応手順

これら増殖因子とそのレセプターの検出のために用いた各1次抗体の至適濃度と、反応のための切片の前処置を表1に示した。

まず、キシレンで脱パラした各切片を下降エタノール系列で水和し、pH7.2リン酸緩衝液(PBS)で3回洗った後、0.3%過酸化水素水を含むメタノールを60分間反応させて内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した。

続いて、1 mM EDTA 含有 Tris buffer (pH9.0; 10 mM) で121℃、2分30秒間抗原賦活を行い、1% (w/v) ウシアルブミン血清を用いて30分間反応させてブロッキングした。そして各1次抗体を3時間反応させた後にPBSで3回洗い、使用した1次抗体に対応するペルオキシダーゼ標識2次抗体と30分間反応させた。再びPBSで3回洗浄後、0.03%過酸化水素水を含むジアミノベンチジンを発色基質として3分間発色させた。なお、核対比染色としてヘマトキシリン染色を施した。

なお、本研究については、本学倫理委員会の承認を得ている(No.17028)。

表1 1次抗体とその至適濃度ならびに切片前処理方法

1次抗体	至適濃度	切片			
		無処理	オートクレーブ	トリプシン	
CD68	5 μg/ml ※	○	○	○	
F5B5	10 μg/ml ※※	○	○	○	
EGF	5 μg/ml ※	○	○		
EGFR			○		
IL-1α			○	○	
IL-1R			○		
TGF-α			○		
TGF-β			○	○	
TGF-βRI			○	○	
TGF-βRII			○	○	
PDGF			○	○	
PDGFR-α			○	○	
b-FGF		10 μg/ml ※※	○	○	○
Bek				○	
HGF	5 μg/ml ※		○		
HGFR			○		

原液に対する希釈倍率 1:100, 1:50

結果

1. HE 所見

1) GDT

病巣の60%以上が肉芽組織のGDTは、さらに、病巣のほぼ全体が肉芽組織より成る例と、やや多くの線維成分が混在する例の2型に分類し、前者をI型GDT(13例)(図1A)、後者をII型(Type II, 7例)とした。

両型とも線維芽細胞と新生血管、そして微細なものから、エオジン好性の太い線維束に至る種々の成熟度が認められた。

2) FDT

狭義のFDTは、肉芽組織が40%以下で他が線維成分より成る例(Type III, 8例)(図1B)、線維成分が約70~80%を占め残りがかなり成熟した肉芽組織の例(Type IV, 6例)、肉芽組織はなく線維成分のみから成る例(Type V, 7例)(図1C)の3型に分類することができた。

Type IIIは線維束間に散在性に肉芽組織が存在し、そこにマクロファージ・リンパ球・形質細胞が浸潤し、Type IVは炎症性細胞の浸潤がわずかで、Type Vは太い膠原束の錯走塊より成り、上皮直下にわずかに

単球等の浸潤を認めた。

なお、TypeⅣの多くは線維が微細であったが、中には微細な線維から太い線維束に移行しつつある例も認められた。

3) COT

COTは、病巣の基本的組織がTypeⅠのものではなく、TypeⅡ(3例)、TypeⅢ(8例)、TypeⅣ(8例)およびTypeⅤ(3例)であった。

この中で骨形成のみの形成例は17例、骨・セメント質形成例は5例で、セメント質単独形成例はなかった。またTypeⅡ、Ⅲ、Ⅳを背景とする症例では、硬組織の周囲に細胞密度の高い線維芽細胞様の間葉系細胞の増殖を伴い(図1D)、この細胞が骨芽細胞やセメント芽細胞に分化し硬組織を形成したものの他に、化生骨あるいは化生セメント質として形成されたものも認

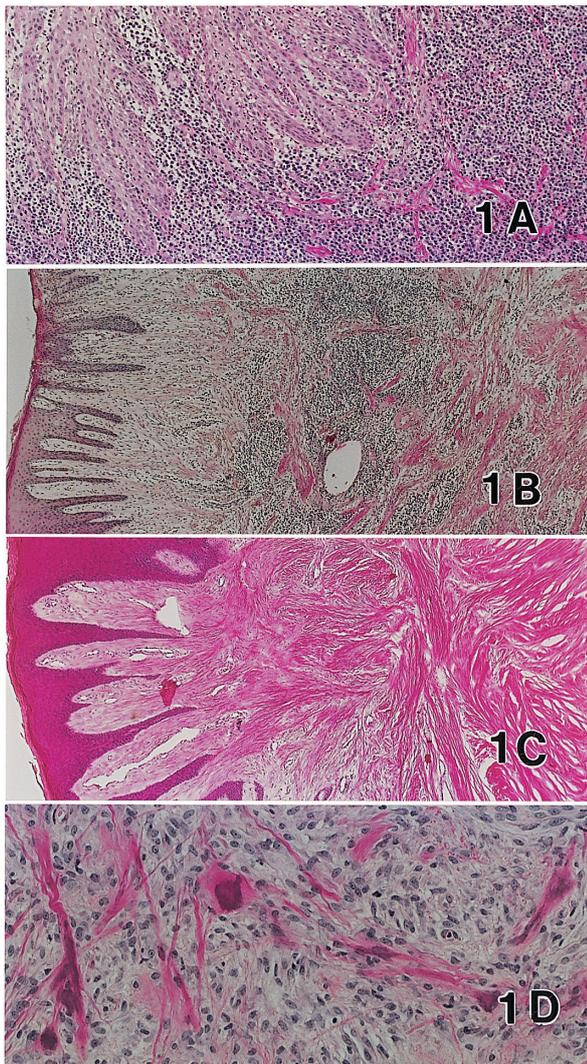


図1 GHの各病型の病理組織所見
A; TypeⅠ(×100), B; TypeⅢ(×40),
C; TypeⅤ(×100), D; GCO(×200)

表2 各エプーリスにおけるCD68およびF5B5陽性細胞

	肉芽腫性エプーリス		線維性エプーリス			骨・セメント質形成性エプーリス				
	I	II	III	IV	V	II	III	IV	V	
CD68	+++	+++	++	+	±	++	+	+	±	
F5B5	±	+	±	±	-	+	+	±	-	

CD68; +++: 多くの発現細胞数 ++: かなり多くの発現細胞数
+: 少ないが明確な発現細胞 ±: わずかな発現細胞 -: 無発現
F5B5; +: 5例以上の症例に発現 ±: 4例以下の症例に発現 -: 無発現

めた。TypeⅤではこの種の細胞の増殖は認められなかった。

2. 免疫組織化学的所見

CD68およびF5B5陽性細胞については表2のような所見を得た。

1) CD68 (M) の検出

CD68陽性細胞は、TypeⅠとTypeⅡ、そしてFDTのTypeⅢでは、全症例にび慢性あるいは集簇性に密度高く認め(図2)、TypeⅣは少なくなり、TypeⅤでは陽性細胞は上皮直下に極くわずかな浸潤を認めたのみであった。

COTのMの浸潤も基本的構造に対応していた。しかし硬組織周囲の間葉系組織には、CD68陽性細胞は極めて少なかった。

2) F5B5 (線維芽細胞・プロトコラーゲン)

プロトコラーゲンに陽性例はTypeⅠで6例、TypeⅡで3例に、TypeⅢで2例にそれぞれ発現を認め、TypeⅣとTypeⅤには陽性細胞あるいは陽性物質を認めなかった。COTではTypeⅡ3例、TypeⅢ3例、TypeⅣ4例に陽性で、TypeⅡ、Ⅲでは多くの間葉系組織にも陽性を示した(図3)。

3) 増殖因子とそのレセプター

今回対象とした増殖因子とそのレセプターの検出結果を要約すると表3の如くであった。また、陽性を示した増殖因子とレセプターのみについて、TypeⅠからTypeⅤまでの病型との関係をまとめてみると図4の如くであった。

(1) EGF (上皮細胞増殖因子) と EGFR

陽性細胞は主として上皮基底層部の上皮細胞に限定的に認められた。

(2) IL-1 と IL-1R

IL-1は肉芽組織の形成を伴う各病型の線維芽細胞、血管内皮細胞・Mに陽性を示し(図5)、TypeⅣでは少数のMと内皮細胞および多くの線維細胞に陽性、TypeⅤでは上皮直下の内皮細胞や線維細胞にわずかに陽性を示した。COTでは、硬組織周囲の間葉系組織にも陽性細胞を多く認めた。

IL-1Rは主として多数のリンパ球・線維芽細胞、線維細胞に陽性を示し、その他に、上皮と血管内皮細胞の一部にも陽性であった。TypeⅣでは膠原線維を

表3 各エプーリスにおける増殖因子とそのレセプターの発現症例数と発現細胞数

増殖因子とレセプター	肉芽腫性エプーリス		線維性エプーリス					骨・セメント質形成性エプーリス				間葉細胞
	I	II	III	IV	V	II	III	IV	V			
EGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EGFR	-	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-α	●	●	●	◎	△	●	●	●	△	△	△	△
IL-αR	++	++	++	+	±	++	++	+	±	±	±	±
TGF-α	△	△	△	○	-	△	△	△	-	△	△	△
TGF-β1	±	±	±	+	-	±	±	±	-	±	±	±
TGF-βRI	◎	◎	◎	◎	-	◎	◎	◎	-	◎	◎	◎
TGF-βRII	+	+	+	++	-	-	-	++	-	+	+	+
PDGF	●	●	◎	◎	△	●	◎	●	△	◎	◎	◎
PDGFR-α	++	++	+	++	±	++	+	++	±	±	±	±
b-FGF	●	●	●	●	△	●	●	●	△	△	△	△
Bek	++	++	+	++	±	++	+	++	±	±	±	±
TNF-α	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	±	±
TNF-β	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TNFR II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HGF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HGFR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

●:90%以上の症例に発現 ◎:70-89%の症例に発現 ○:50-69%の症例に発現 △:49%以下の症例に発現 -:発現症例なし
 ++:多くの細胞に発現 +:やや多くの細胞に発現 ±:わずかな細胞に発現 -:発現細胞なし

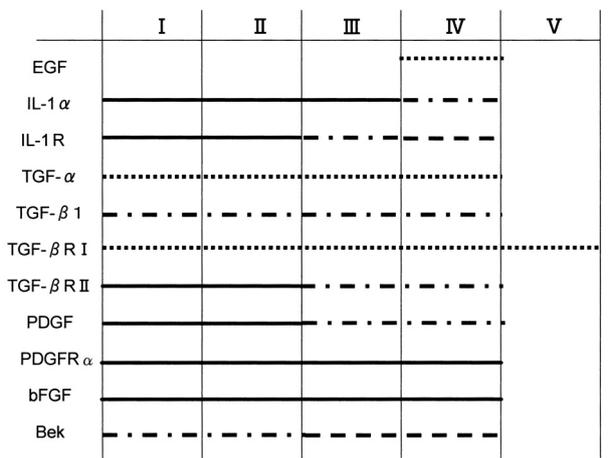


図4 各病型における増殖因子とレセプターの発現の概略

産生しつつある多くの線維細胞にも陽性を示した。しかし Type V のほとんどは陰性であった。COT では、間葉系組織と骨周囲の骨芽細胞にも陽性を示した。

(3) TGF-α, TGF-β1 および TGF-βRI と TGF-βRII

TGF-α は上皮細胞, 線維芽細胞, 線維細胞, 血管内皮細胞および M の極く一部に陽性を示し, とくに

Type III の線維細胞が最も明確に陽性を認めた。COT では多くの線維細胞や一部の硬組織表面の細胞が陽性で, とくに破骨巨細胞が強い染色性を示した。

TGF-β1 は Type V 以外のすべての M と新生血管が陽性であった。骨・セメント質形成性エプーリスでは、硬組織近傍の間葉系組織も強陽性を示した。

TGF-βRI は各病型の少数例の線維芽細胞と血管内皮細胞に弱い染色性を示した。これに対して, TGF-βRII は Type V 以外のすべてのタイプの線維芽細胞や血管内皮細胞に発現を認め (図6), また GDT (Type II) では間葉形組織にも染色性を示した。

(4) PDGF と PDGFR-

PDGF は Type I, II, III の上皮細胞, 線維芽細胞, 線維細胞, 血管内皮細胞および M に検出され, Type IV から Type V に向うにつれて著しく少なくなった。COT では、骨の周囲の骨芽細胞にも陽性を示した (図7A)。本 PDGF も Type I, Type II において過剰発現を示した。

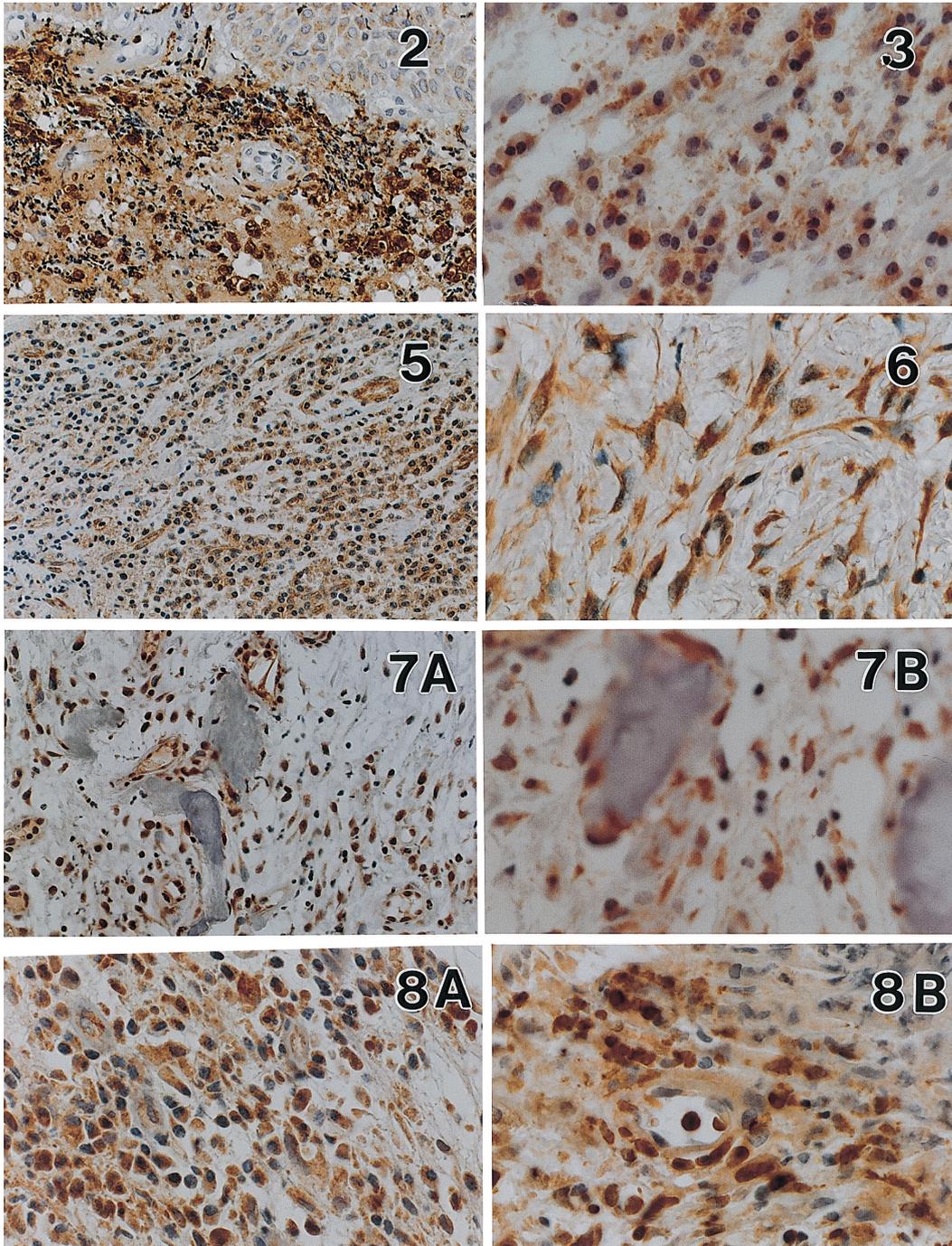
PDGFR- は Type I から Type IV の上皮細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞・M に加えてリンパ球に陽性を示した。従って肉芽腫性エプーリスにおいて陽性細胞が多数検出された。Type IV ではとくに多数の線維芽細胞が強陽性を示し, COT では間葉系組織でも強

染色性を示した(図7B).

(5) b-FGF と Bek

b-FGF は全病型の M と線維芽細胞に陽性であった

が, とくに TypeIVでは多くの線維細胞が陽性を示し, TypeVは少数の M と一部の内皮細胞のみが陽性であった(図8A). COTは, 間葉系組織部が症例によ



- 図2 Type I の CD68陽性細胞 (× 100)
- 図3 Type II の F 5 B 5 陽性細胞 (× 200)
- 図4 各病型における増殖因子とレセプターの発現の概略
- 図5 Type III の IL- 1 の陽性細胞 (× 100)
- 図6 Type II の TGF- R II 陽性細胞 (× 200)
- 図7 COT の PDGF(A ; × 100) と PDGFR- (B ; × 200)
- 図8 Type III の肉芽組織部における b-FGF(A ; × 100) と Bek(B ; × 200)

で陽性と陰性とに分かれたが、骨芽細胞やセメント芽細胞は明確な陽性を示した。

Bek 陽性細胞は Type I から Type IV の線維芽細胞が発現し、上皮直下に多く出現する傾向を示した (図 8 B)。Type IV のそれは上皮下から深部に散在性であった。Type III では骨周囲の骨芽細胞にも強い染色性を示した (図 8 B)。

(6) TNF- と TNF-R

TNF- は極くわずかな症例のわずかな M に、また TNF-R はわずかな症例の線維芽細胞に弱い染色性を示したが、これらは陽性とみなすことはできなかった。

(7) HGF と HGF-R

今回供試したすべての症例で陰性であった。

以上から、GH における増殖因子は、IL-1、TGF-1、PDGF、b-FGF が頻度高く発現され、これらに対するレセプター IL-1 R、TGF- II、PDGFR-、Bek は主に線維芽細胞や血管内皮細胞が発現することが明らかとなった。

考 察

今回の GH63 例の光顕の検索から、病巣の本態をなす肉芽組織あるいは線維組織の占める割合とその成熟度によって、GDT は 2 型 (Type I および Type II) に、また FDT は 3 型 (Type III、Type IV、Type V) に分類し得た。COT は、基本病巣は Type II から Type V のいずれかであったが、Type V 以外には硬組織の周囲に細胞密度の高い間葉系細胞が増生していた。このような GH の各病型について、代表的な細胞増殖因子とそれらのレセプターの発現を検討した。増殖因子は、細胞を G0 期から G1 期に引き込む作用と、細胞の DNA 合成促進作用に大別できる。前者の物質には PDGF があり、G0 期から G1 期に導く competent 因子として作用する。一方、DNA 合成促進因子には EGF、TGF- 等がある。Dixon ら³⁾ は子宮筋腫や子宮筋層 (月経周期の増殖期の細胞) における TGF-、EGF、IGF-1 (insulin-like growth factor-1)、VEGF (vascular endothelial growth factor)、FGF-2、EGFR、IGF- IR および FGFR- I を免疫組織化学的に検出し、血管平滑筋と増殖期の筋細胞がこれらすべての増殖因子とレセプターを発現すること、平滑筋細胞や子宮筋層とともに、血管平滑筋が TGF-、EGF、IGF-1、VEGF、FGF-2、EGFR、IGF- IR および FGFR- I を発現するのに対して、血管内皮細胞は TGF-、EGF、FGF-2、EGFR、および FGFR- I に陽性を示すこと、平滑筋腫中の線維芽細胞は IGF-1、FGF-2、そしてわずかに FGFR- I に陽性を示し、平滑筋腫の細胞外マトリックスには FGF-2 と IGF-1 が局在することを明らかにした。この平滑筋腫増殖期

の子宮筋層の増殖因子とそのレセプターの発現と、今回の GH のそれとを比較すると、GH では EGF が上皮以外にはほとんど染色性を示さなく、逆に Bek が多くの細胞に発現したこと等かなりの違いがある。これは各腫瘍あるいは各腫瘍性病変において増殖因子やそのレセプターの発現に特異性があることを示している。とくに GH では、EGF と EGFR、HGF と HGFR は全く無関係であり、TNF- および TNF-R II も検出症例は少なく、染色性も弱く、これらは GH において関わりは希薄であると見なした。一方、IL-1、TGF-1、PDGF、b-FGF とレセプターの IL-1 R、TGF- R II、FGFR (Bek)、PDGFR- が関わりが深いようであった。その中の IL-1、PDGF、b-FGF は産生細胞の M の活性化や血管芽細胞の増殖が旺盛であることに起因していることが示唆された。これら増殖因子とレセプターは、Type I と Type II、そして一部は Type III で頻度高く、且つ多数の細胞に発現されている。このような発現傾向から、主な増殖因子は肉芽組織の形成、すなわち線維芽細胞や血管芽細胞の増殖と分化に関与しているとみなし得た。IL-1 は主として M によって産生され⁴⁾、IL-1 と IL-1 が前駆体としてコードされ⁵⁾、いずれも type I の IL-1 R と結合し⁶⁾、線維芽細胞や血管芽細胞の増殖にも関与する⁷⁾。とくに、metalloproteinase、collagenase、stromelysin、plasminogen activator のような細胞外マトリックス分解作用をもつ物質の産生を促す。この作用から、炎症反応の一過程で細胞外マトリックスを分解させ、癒着を抑制するとともに、細胞と基質との接着を阻止し、これがシグナルとなって肉芽組織の増殖につながることを示唆される。また炎症歯肉や実験的歯肉炎においても、IL-1 や IL-1 がその疾患の発症と経過に関連すること⁸⁻¹⁰⁾、そして歯肉炎中の線維芽細胞の IL-1 レセプターの発現は健常歯肉の線維芽細胞よりも増量することが明らかにされている¹¹⁾。これらの所見は、歯肉炎がエプーリスに転化する潜在性を秘めていることを示している。なお、IL-1 は、Type I から Type III に至る間によく発現し、これに対して IL-1 R は Type II で一旦発現が停止し、Type IV で再び増加傾向を示した今回の所見は、GDT の肉芽腫の形成だけでなく、線維形成期の初期に再度線維芽細胞の増殖を促している可能性をも示唆するものであった。

TGF- は線維芽細胞の培養上清中から見い出された形質転換因子で、形質転換にはもう一つの TGF-1 が必要である¹²⁾。TGF- は肝細胞、表皮ケラチノサイト、線維芽細胞の増殖を促進させるのに対して、TGF-1 は上皮細胞、血管内皮細胞等多くの細胞の増殖を抑制し、線維芽細胞のみに促進的に作用する¹³⁾。

また、股関節部の関節形成術に際して、成否の鍵となる骨とインプラントとの間の界面の粘膜組織中の内皮細胞、M・線維芽細胞がEGFとTGF- β を発現し¹⁴⁾、口腔領域でも、培養された歯肉上皮シートを用いたVEGF, EGF, TGF- β , TGF- β 1の定量的検索で、VEGFと共にTGF- β が有意に増量する¹⁵⁾。今回の検索では、TGF- β は肉芽腫性および線維性エプーリスの各病型の一部の症例に明確に見出すことができ、とくにType IVの発現が多かったことから、本増殖因子が線維芽細胞の増殖と血管新生の促進作用によって肉芽腫形成に若干の関わりを持ち、さらに線維芽細胞の線維細胞への形質転換にも関わっていることが考えられた。このTGF- β がEGFファミリーであるのに対して、TGF- β 1は40個以上にもなる類似の構造を持つTGF- β ファミリーの一つであり、これらは約200~400アミノ酸から成る前駆体として作られ、C末端の110~140アミノ酸から成る部位が切断され、この部が活性を有し¹⁶⁾、2種類の異なる機能を有している。即ち、TGF- β , nodal, アクチピンは、細胞性シグナル伝達分子のRSmad, Smad2, Smad3を活性化し、他のBMP (bone morphogenetic protein) やMIS (Mullerian inhibiting substance) 等は、Smad1, Smad5, Smad8を活性化する¹⁶⁾。TGF- β 1は血小板、血管内皮細胞、T-cellおよびMによって産生され、線維芽細胞に対してはIL-1とは逆にコラーゲン、フィブロネクチンの合成を促進させ、コラーゲンの分解を抑制させる。Marpoulouら¹⁷⁾はTGF- β 1が歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞の増殖性にどのように影響しているのかをPDGF-RやrhBMP-2とともに検討し、BMP-2がDNA合成に対して抑制的であるのとは逆に、TGF- β 1はPDGFと共に促進的に働くことを見出している。また、先天性歯肉線維腫症やcyclosporinで処理された歯肉線維芽細胞が産生するTGF- β 1がType Iコラーゲンの産生を促進し、metalloproteinase-1や-2の産生を抑えること^{18,19)}、さらに、ヒト歯肉線維芽細胞において、Smad3がTGF- β 1に誘導されたMMP-13発現を増大させること、TGF- β 1誘導性MMP-13の発現がSmad3とalpha p38の2つの異なるシグナル経路によることも明らかにされている²⁰⁾。TGF- β 1のレセプターのTGF-R IとR IIは共に細胞内にセリンスレオニンキナーゼドメインを持つ²¹⁾。そしてTGF- β 1のシグナル伝達にはこの両方が必要で、TGF-R IはTGF-R IIの存在下でのみTGF- β 1を結合する。そしてこのTGF-R Iのキナーゼドメイン中のL45ループがSmadに特異的に結合する²²⁾。GHでは、TGF-R Iはわずかであるがすべての病型に検出され、またTGF-R IIはType V以外の多くの症例の多くの細胞に検出された。この

所見とIL-1とは拮抗的にmetalloproteinaseを抑制することから、TGF- β 1は、GHにおいては線維芽細胞などを基質との細胞接触に導き、その圧認識によって増殖を抑え、ひいてはTGF- β と同様に形質転換因子としてGDTのFDTへの移行とFDTの線維化に関わっていることが示唆された。

PDGFはM・血管内皮細胞、平滑筋細胞等によって発現され、PDGF-AとPDGF-Bの2量体があり、これをコードする遺伝子のエクソン4と5に増殖因子ドメインが存在する^{23,24)}。そのレセプターのPDGFR-はヒトではRとRとがあり、前者はPDGF-A, B, C, Dのすべてを結合し、RはPDGF-B, Dとのみ結合する^{25,26)}。PDGFおよびPDGFR-は多くの臓器組織に発現されるが、同一組織細胞において両者が同時発現することはあまりなく、ひいてはPDGFの増殖作用はパラクリンであり²⁷⁾、特定の細胞増殖を促すことによる創傷治癒や発生過程に重要であるとされている^{28,29)}。口腔領域では、cyclosporine AがヒトMのPDGF-B geneのupregulationを誘導し、これがcyclosporine投与による歯肉増殖症の発症機転になると推測されている³⁰⁾。GHにおいては、PDGFはType V以外の各GHの上皮細胞・線維芽細胞・線維細胞・血管内皮細胞およびMに検出され、PDGFR-もPDGFとほぼ同様の細胞に認めることができた。このような所見は、GHにおける線維芽細胞と血管芽細胞の増殖に最も長期にわたって深く関わり、その増殖様式はパラクリン的な増殖と同時に、Fredrikssonら²⁷⁾の見方とは違ってオートクリンの可能性をも示唆するものであった。

FGFは種々の細胞の増殖因子、分化誘導因子として作用し、ヒトでは22種類にのぼるファミリーを形成しており、その中のFGF-1とFGF-2は線維芽細胞の増殖因子として脳や脳下垂体から抽出された。両FGFは等電点から酸性FGFと塩基性FGF(b-FGF)に分けられたが、他のFGFが5'末端にシグナルペプチドを有し容易に細胞から分泌されるのに対して、共にシグナルペプチドを持たない。そのために分泌機構は不明であるが、小胞体・ゴルジ体経路非依存的分泌機構や細胞の損傷による放出が考えられている^{31,32)}。エプーリスではこのb-FGFが肉芽組織巢のMを中心に線維芽細胞や一部の血管内皮にも検出され、Type IからType IVの長期にわたって発現され、そのレセプターのBekは主として線維芽細胞に発現され、その発現細胞数は少ないもののType IVに至るまで存在していた。これらの所見は、b-FGFもGHにおける線維芽細胞の増殖の要因になっていることを示している。

また、F5B5陽性物質、すなわちFDTの主構成要素

となる膠原線維の前駆物質のトロポコラーゲンも、GDTのType I, Type IIとCOTに産生され、他ではほとんど検出されることはなかったが、これには線維芽細胞あるいは線維細胞のトロポコラーゲンの産生時期と、metalloproteinase等、間質成分の分解とも密接に関係していると考えられる。従って、この現象には線維芽細胞の増殖を促し、同時にmetalloproteinaseの産生を抑制するTGF-1の影響を強く受けていることが考えられた。さらに、TGF-1の作用機序とその発現性あるいは染色性から、COTに特有の間葉細胞の分化にも本因子が関わっていることも併せて示唆された。

なお、IL-1, TGF-1, PDGFおよびb-FGFはType IおよびType IIあるいはType IIIの各GHに最もよく発現されたが、その各増殖因子が相互にどのように関係しているのか、例えば相乗的に作用するのか、拮抗的に作用するのか、あるいはその両者であるのかは今回の検索からは不明であった。

以上のGHにおける細胞増殖因子とそのレセプターの検出結果から以下の結論を得た。

1. 広義の線維性エプーリスは、肉芽腫性エプーリスと狭義の線維性エプーリスに大別され、肉芽腫性エプーリスはさらにほとんどが肉芽組織から成るタイプ(Type I)と、わずかに線維成分の形成されるタイプ(Type II)に、また線維性エプーリスは多くの膠原線維中に若干の肉芽組織を伴うタイプ(Type III)、肉芽組織はなく微細な膠原線維を主とするタイプ(Type IV)、強靱な膠原線維束より成るタイプ(Type V)に分けることができた。
2. CD68陽性MはこのType IからType Vのすべての症例に検出されたが、Type Vのように線維束のみから成る例では少なかった。
3. Fibroblast 5B5陽性細胞あるいは陽性物質(プロトコラーゲン)は、とくにType IとType IIに産生される傾向にあった。
4. 今回、検索した増殖因子8種類の中で、エプーリス病巣中に頻度高く検出された増殖因子はIL-1, TGF-1, PDGFそしてb-FGFで、レセプターはIL-1R, TGF-R II, PDGFR-, Bekであった。これら増殖因子を最もよく発現したのはMであった。
5. このような増殖因子とレセプターの発現性から、線維性エプーリスの初期過程のGDTとFDTのType IIIの時期に肉芽組織や線維の形成に深く関わることが考えられた。
6. TGF-1はType IVの線維芽細胞の線維細胞への分化、そして膠原線維の産生に促進的に作用することが示唆された。

7. またTGF-1はCOTに特有の間葉系組織細胞の分化と増殖にも関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) Shafer WG, Hine MK and Levy BM. Benign and Malignant Tumors of the Oral Cavity. A Textbook of Oral Pathology 4th ed., Philadelphia: W.B. Saunders Co; 1983: 86-229.
- 2) Cawson RA and Eveson JW. Diseases Nerves.: Muscle and Connective tissue., William Heinemann Medical Books, Oral Pathology and Diagnosis, London; 1987: 131-154.
- 3) Dixon D, He H and Haseman K. Immunohistochemical localization of growth factors and their receptors in uterine leiomyomas and matched myometrium. *Environ Health Perspect.* 2000; 108: 795-802.
- 4) Dinarello CA. Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist. *Int Rev Immunol.* 1998; 16: 457-499.
- 5) Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE and Sims JE. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem.* 2000; 275: 1169-1175.
- 6) Mochan E, Uhl J and Newton R. Interleukin-1 stimulation of synovial cell plasminogen activator production. *J Rheumatol.* 1986; 13: 15-19.
- 7) Appleton I, Tomlinson A, Colville-Nash PR and Wilmoughby DA. Temporal and spatial immunolocalization of cytokines in murine chronic granulomatous tissue. Implications for their role in tissue development and repair processes. *Lab Invest.* 1993; 69: 405-414.
- 8) Tsalikis L, Parapanisiou E, Bata-Kyrkou A, Polymenides Z and Konstantinidis A. Crevicular fluid levels of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta during experimental gingivitis in young and old adults. *J Int Acad Periodontol.* 2002; 4: 5-11.
- 9) Rossano F, Rizzo A, Sanges MR, Cipollaro de L'Ero G and Tufano MA. Human monocytes and gingival fibroblasts release tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 alpha and interleukin-6 in response to particulate and soluble fractions of *Prevotella melaninogenica* and *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Clin Lab Res.* 1993; 23: 165-168.
- 10) Abe M, Kawamoto K, Okamoto H and Horiuchi N. Induction of collagenase-2(matrix metalloproteinase-8) gene expression by interleukin-1 beta in human gingival fibroblasts. *J Periodontol Res.* 2001; 36: 153-159.
- 11) Kanda-Nakamura C, Izumi Y and Sueda T. Increased expression of interleukin-1 receptors on fibroblasts derived from inflamed gingiva. *J Periodontol.* 1996; 67: 1267-1273.
- 12) De Larco JE and Todaro GJ. Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978; 75: 4001-4005.

- 13) Glick AB. TGF beta 1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biol Ther.* 2004; 3: 276-283.
- 14) Xu JW, Ma J, Li TF, Waris E, Alberty A, Santavirta S and Kontinen YT. Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in interfacial membranes retrieved at revision total hip arthroplasty. *Ann Rheum Dis.* 2000; 59: 822-827.
- 15) Momose M, Murata M, Kato Y, Okuda K, Yamazaki K, Shinohara C and Yoshie H. Vascular endothelial growth factor and transforming growth factor-alpha and -beta 1 are released from human cultured gingival epithelial sheets. *J Periodontol.* 2002; 73: 748-753.
- 16) Miyazawa K, Shinozaki M, Hara T, Furuya T and Miyazono K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signalling. *Genes Cells.* 2002; 7: 1191-1204.
- 17) Marcopoulou CE, Vavouraki HN, Dereka XE and Vrotsos IA. Proliferative effect of growth factors TGF-beta 1, PDGF-BB and rhBMP-2 on human gingival fibroblasts and periodontal ligament cells. *J Int Acad Periodontol.* 2003; 5: 63-70.
- 18) Cotrim P, de Andrade CR, Martelli-Junior H, Graner E, Sauk JJ and Coletta RD. Expression of matrix metalloproteinases in cyclosporin-treated gingival fibroblasts is regulated by transforming growth factor (TGF)-beta 1 autocrine stimulation. *J Periodontol.* 2002; 73: 1313-1322.
- 19) Martelli-Junior H, Cotrim P, Graner E, Sauk JJ and Coletta RD. Effect of transforming growth factor-beta1, interleukin-6, and interferon-gamma on the expression of type I collagen, heat shock protein 47, matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by fibroblasts from normal gingiva and hereditary gingival fibromatosis. *J Periodontol.* 2003; 74: 296-306.
- 20) Leivonen SK, Chantry A, Hakkinen L, Han J and Kahari VM. Smad 3 mediates transforming growth factor-beta-induced collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) expression in human gingival fibroblasts. Evidence for cross-talk between Smad 3 and p38 signaling pathways. *J Biol Chem.* 2002; 29: 46338-46346.
- 21) Heldin CH, Miyazono K and Ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390: 465-471.
- 22) Shi Y and Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003; 113: 685-700, 2003.
- 23) Waterfield MD, Scrace GT, Whittle N, Stroobant P, Johnsson A, Wasteson A, Westermark B, Heldin CH, Huang JS and Deuel TF. Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28 sis of simian sarcoma virus. *Nature* 1983; 304: 35-39.
- 24) Doolittle RF, Hunkapiller MW, Hood LE, Devare SG, Robbins KC, Aaronson SA and Antoniades HN. Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. *Science* 1983; 221: 275-277.
- 25) Yarden Y, Escobedo JA, Kuang WJ, Yang-Feng TL, Daniel TO, Tremble PM, Chen EY, Ando ME, Harkins RN and Francke U. Structure of the receptor for platelet-derived growth factor helps define a family of closely related growth factor receptors. *Nature* 1986; 323: 226-232.
- 26) Claesson-Welsh L, Eriksson A, Westermark B and Heldin CH. CDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 4917-4921.
- 27) Fredriksson L, Li H and Eriksson U. The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004; 15: 197-204.
- 28) Wilder RL, Lafyatis R, Roberts AB, Case JP, Kumkumian GK, Sano H, Sporn MB and Remmers EF. Transforming growth factor-beta in rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci.* 1990; 593: 197-207.
- 29) Rappolee DA, Brenner CA, Schultz R, Mark D and Werb Z. Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. *Science* 1988; 241: 1823-1825.
- 30) Nares S, Ng MC, Dill RE, Park B, Cutler CW and Iacopino AM. Cyclosporine A upregulates platelet-derived growth factor B chain in hyperplastic human gingiva. *J Periodontol.* 1996; 67: 271-278.
- 31) Coffin JD, Florkiewicz RZ, Neumann J, Mort-Hopkins T, Dorn GW 2nd, Lightfoot P, German R, Howles PN, Kier A and O'Toole BA. Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell.* 1995; 6: 1861-1873.
- 32) Zhou M, Sutliff RL, Paul RJ, Lorenz JN, Hoying JB, Haudenschild CC, Yin M, Coffin JD, Kong L, Kranias EG, Luo W, Boivin GP, Duffy JJ, Pawlowski SA and Doetschman T. Fibroblast growth factor 2 control of vascular tone. *Nat Med.* 1998; 4:201-207.