

口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣における細胞増殖活性と細胞間接着分子の発現に関する病理学的研究

古屋 出

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座

(主任 : 佐藤 方信 教授)

(受付 : 2005年12月16日)

(受理 : 2006年1月4日)

Abstract : The expression of intercellular adhesion molecules and the cell proliferative activity were analyzed in metastatic focus of lymph node and compared with those in primary oral squamous cell carcinomas in the present study. Immunohistochemistry was performed for E-cadherin, α -catenin and β -catenin in the primary lesions of 11 oral squamous cell carcinomas, and 36 tissues of 18 metastatic foci. The PCNA (proliferative cell nuclear antigen) labeling index was calculated as the percent of immunostain-positive cells to anti-PCNA antibody. Immunostaining of adhesion molecules was categorized as one of three types : preserved, reduced, and lost compared with that in normal oral epithelium.

These three adhesion molecules were clearly expressed in the cell-cell contact sites of normal oral epithelium. In the expression of E-cadherin, 8 primary tumors showed reduced type (72.7%), which was the highest ratio. In contrast, in metastatic foci, 25 tumors showed lost-type as the highest (69.4%). Furthermore, in metastatic focus, the expression of E-cadherin was significantly (ANOVA, $p < 0.05$) decreased, and that of β -catenin was also decreased as the tumor expanded in the lymph node. However, the expression of α -catenin did not change with tumor progression.

Although the PCNA labeling index in metastatic foci was significantly lower than that in primary tumors (Student *t*-test, $p < 0.01$), it increased as the tumor advanced in the lymph node. In metastatic foci, as the expression of E-cadherin reduced, the PCNA labeling index was increased conversely.

In conclusion, in metastatic oral squamous cell carcinoma of the lymph node, reduction of E-cadherin was involved in the growth and migration of oral squamous cell carcinoma.

Key Words : oral squamous cell carcinoma, metastatic focus, intercellular adhesion molecules, cell proliferative activity

緒 言

わが国の口腔癌による死亡者数は人口動態統

計によると1971年には783例¹⁾であったが, 1980年に1,191例²⁾, 1990年に1,515例³⁾, 2003年には3,165例⁴⁾となり, 増加の一途をたどっている。

Pathological study of cell proliferative activity and expression of intercellular adhesion molecules in metastatic focus of oral squamous cell carcinoma in lymph node

Izuru FURUYA

Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Iwate Medical University
19-1, Uchimaru, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

近年、各種治療法の進歩により口腔癌の治療成績は向上してきているが、頸部リンパ節への転移例では口腔癌の制御が困難となっていることが少なくない。わが国の舌癌剖検症例の死因についての集計によれば、肺の感染症が死因の大半を占めているが、頸部リンパ節転移巣から頸部の血管へ浸潤することによる出血死も少なくないと報告されている⁵⁾。このことから転移巣における癌細胞の動態を様々な観点から解明することは重要である。

癌の転移に関与する因子は多種多様であり、1986年に Liotta⁶⁾ は「癌細胞の基底膜浸潤の3段階説」を提唱した。その後、研究はさらに進み、現在、転移の過程は1. 原発巣からの遊離、2. 脈管侵入、3. 脈管内移動、4. 所属リンパ節脈管内定着、5. 脈管外浸潤、6. 転移組織での増殖と一般的に考えられている⁷⁾。

転移の最初の過程である「原発巣からの遊離」に関与する重要な因子の一つに、細胞間接着分子がある。なかでも E-cadherin の発現異常についてはこれまで多くの報告がなされており、癌組織で E-cadherin の発現減弱が高頻度にみられている⁸⁻¹⁵⁾。しかし、これらの報告は原発巣における検索結果であり、転移巣における細胞間接着分子の発現に関する報告は未だみられない。また近年、臨床において原発巣が制御された後に転移を生じる、いわゆる後発転移症例が多くみられる。そのために転移巣における癌細胞の動態を検索することは、転移巣に特異的に効果を示す治療法の確立のためにも意義のあることと思われる。

E-cadherin はカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、裏打ち蛋白である catenin を介して actin と結合し細胞間接着を形成する。したがって、E-cadherin の発現を検索するにあたっては catenin との関連の有無も考慮する必要がある。

本研究では口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣における E-cadherin の発現と、 α -catenin および β -catenin の発現について免疫組織化学的に検討した。さらに細胞増殖活性を

増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, 以下 PCNA) の発現について検索し、細胞間接着分子との関連を検討した。

材料および方法

1. 材料

材料は過去3年間に岩手医科大学附属病院中央臨床検査部臨床病理部門に同歯科医療センター第二口腔外科より提出され、口腔病理学講座で口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移と組織診断された18症例から得た組織学的に変性、壊死傾向のみられない36個のリンパ節である。また、原発巣についての検索はこれらの症例のうち組織学的に観察可能であった11例について行った。なお、これらの検体のうち原発巣とリンパ節が同じ症例で検索できたのは5例であり、これらの症例から得られたリンパ節はあわせて9個である。また、原発巣に隣接する正常粘膜上皮を対照標本とした。

なお、本研究は岩手医科大学歯学部倫理委員会の承認のもとに行った。

2. 検索方法

20%リン酸緩衝ホルマリンに固定されたリンパ節を最大断面で切出し、通法に従いパラフィン包埋した。原発巣と対照標本も同様に固定し、パラフィンに包埋した。各パラフィンブロックより4 μ mの薄切切片を作製し、これをシランコートされたスライドガラスに貼付し、病理組織学的検索および免疫組織化学的検索に用いた。

1) 病理組織学的検索

薄切切片を通法に従い脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE 染色) を行い、組織学的に検索した。リンパ節転移巣は以下のような、腫瘍進展度 (本間, 1982) により分類し、評価した¹⁶⁾。

- Stage I 転移腫瘍が輸入リンパ管や辺縁洞にのみ限局して認められるもの。
- Stage II 転移腫瘍が辺縁洞から傍皮質、中間洞に浸潤、増殖しているもの。
- Stage III リンパ節組織の大半が消失し、腫瘍

Table 1. Antibodies used in the study

Antibody	Source	Clone	Immunized animal	Type of antibody	Optimum dilution
PCNA	Santa Cruz (CA, USA)	PC10	mouse	monoclonal	1:100
E-cadherin	Santa Cruz (CA, USA)	G10	mouse	monoclonal	1:100
α -catenin	Santa Cruz (CA, USA)	C19	goat	polyclonal	1:100
β -catenin	Transduction Laboratories (CA, USA)	clone14	mouse	monoclonal	1:100

に置換されているもの。

StageIV リンパ節外に腫瘍が浸潤, 増殖しているもの。

2) 免疫組織化学的検索

リンパ節転移巣および原発巣における腫瘍細胞の細胞増殖活性を PCNA の発現で, 細胞間接着分子の発現を E-cadherin, α -catenin, β -catenin について, 以下の方法で検索した。

(1)免疫組織化学的染色法

薄切片を Hemo-clear で脱パラフィンし, アルコール系列で脱水した後, 0.01M クエン酸緩衝溶液 (pH6.0) に浸漬し, マイクロウェーブ処理 (500W, 5分間) を3回行い, 抗原性を賦活させた。ついで, リン酸緩衝食塩水 (PBS) に Tween20 (0.05%, Sigma, USA) を加えた溶液 (PBST) で洗浄し, 0.3%過酸化水素加メタノールに室温で20分間浸漬し, 内因性ペルオキシダーゼ活性を除去した。

PBST で洗浄後, α -catenin については10% 正常ロバ血清 (The Binding Site Birmingham, UK) で非特異的反応を阻止した。次いで一次抗体を PCNA については37°C で1時間, E-cadherin, α -catenin, β -catenin についてはそれぞれ4°Cで12時間, 反応させた (Table 1)。

一次抗体の反応終了後, PBST で洗浄し, PCNA, E-cadherin, β -catenin については

En Vision 試薬 (DAKO, USA) を室温で30分間作用させた。 α -catenin については二次抗体としてロバ抗ヤギ IgG 抗体 (Santa Cruz, USA) を室温で45分間作用させ, PBST で洗浄した。その後, avidin biotin peroxidase complex (ABC) 試薬を室温で20分間反応させた。

En Vision 試薬あるいは ABC 試薬それぞれの反応終了後, PBST で洗浄し, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) (WAKO, Japan) にて発色を行い, マイヤーのヘマトキシリンで核染色をし, 脱水, 透徹, 封入した。

(2)染色標本の評価

PCNA 染色標本については, 辻ら¹⁷⁾の方法に従い, 染色性の程度によらず核全体が均一に染まっているものを陽性細胞とした。標本の5箇所視野を無作為に選択し, 200倍で顕微鏡写真を撮影した。この写真上で各視野の腫瘍細胞500個を観察し, その中の陽性細胞の割合を求め, 5視野の平均をその標本の陽性細胞率とした。

E-cadherin, α -catenin, β -catenin の発現の評価は細胞膜での発現を Shiozaki ら¹⁸⁾の方法に準じ, 正常組織と同程度に発現しているものを発現保持例 (+), 組織全体に均一に染まっているが, 正常組織より発現程度が減弱しているもの, あるいは不均一な染色所見がみられる

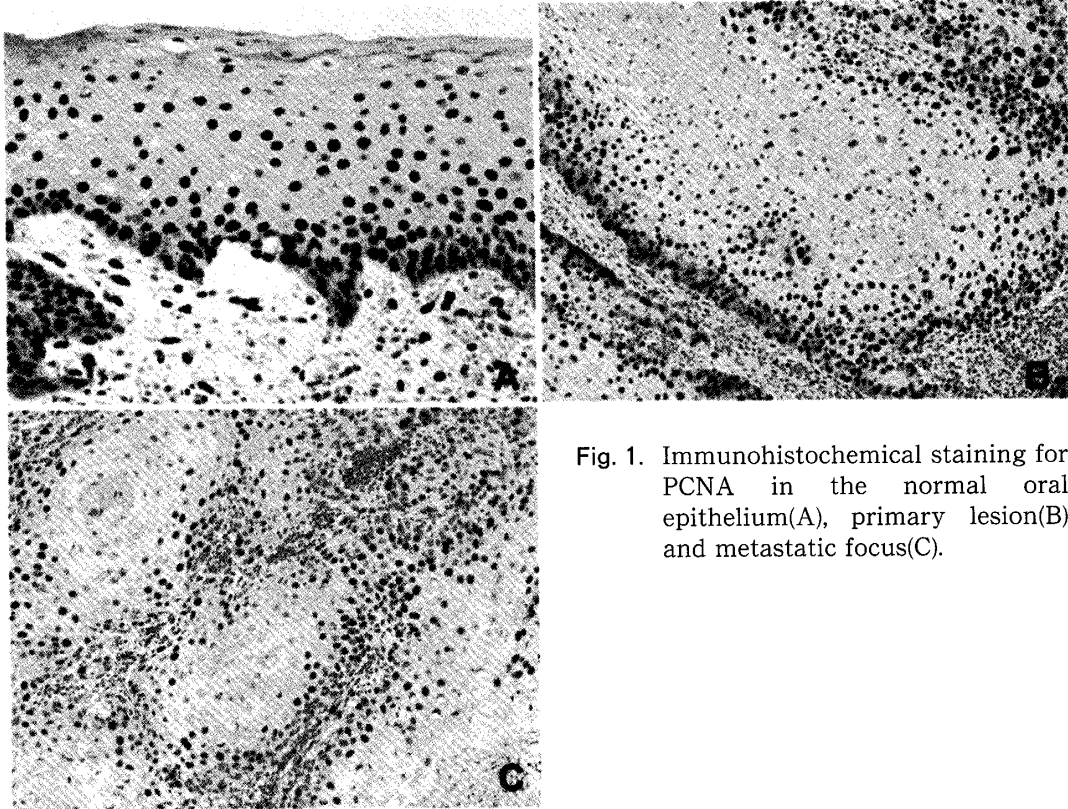


Fig. 1. Immunohistochemical staining for PCNA in the normal oral epithelium(A), primary lesion(B) and metastatic focus(C).

ものを発現減弱例(±), 発現が全くみられないものを発現消失例(-)とした。なお, β -catenin については細胞膜に陰性であっても細胞質に陽性所見がみられることがあるため, このような例については別に PCNA 陽性率を算出し, 検討を加えた。

3. 統計学的解析

原発巣と転移巣の PCNA 陽性率および転移巣の PCNA 陽性率と転移巣において細胞質に β -catenin の陽性所見がみられた例の PCNA 陽性率については student *t*-test にて統計学的に解析した。また, リンパ節転移巣における腫瘍進展度と PCNA 陽性率との関連およびリンパ節転移巣における細胞間接着分子の発現と細胞増殖活性の関連は一元配置分散分析にて統計学的に解析した。

結 果

1. 病理組織所見

リンパ節転移巣の腫瘍進展度別の内訳は, Stage I が 2 個 (5.6%), Stage II が 5 個 (13.9%), Stage III が 23 個 (63.9%), Stage IV が

6 個 (16.7%) であり, Stage III が最も多かった (Table 4)。

2. 免疫組織化学的所見

1) PCNA の発現とリンパ節転移巣の腫瘍進展度

PCNA 陽性細胞は正常口腔粘膜上皮では基底層から有棘層にかけてみられた (Fig. 1-A)。一方, 腫瘍では原発巣と転移巣のいずれにおいても, 分化型の扁平上皮癌では陽性細胞は胞巣辺縁部に多く, 中心部に向かうにつれ減少していた (Fig. 1-B, -C)。なお, 中分化型ならびに未分化型扁平上皮癌では陽性細胞は胞巣全体にわたって不規則に分布していた。また, PCNA の染色性は腫瘍細胞により濃淡の差がみられた。

PCNA 陽性率は原発巣では平均 $87.2 \pm 2.9\%$, 転移巣では平均 $64.5 \pm 12.5\%$ であり, 原発巣に比較して転移巣では有意に低かった (Table 2)。

リンパ節転移巣における PCNA 陽性率を腫瘍進展度別にみると, Stage I, Stage II, Stage III, Stage IV で, それぞれ $54.8 \pm 18.8\%$,

Table 2. PCNA labeling index in the primary lesion and metastatic focus of lymph node

Location(n)	PCNA labeling index(%)(mean ± SD)
Primary lesion (11)	87.2 ± 2.9
Metastatic focus of lymph node (36)	64.5 ± 12.5
metastatic focus of lymph node defected for β -catenin in cytoplasm of tumor cells (6)	80.9 ± 5.6

** p<0.01 (student t-test)

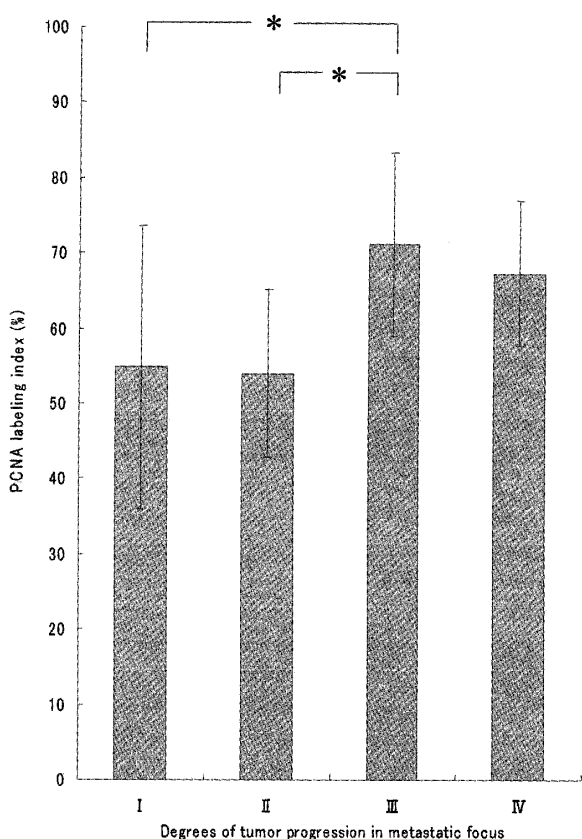


Fig. 2. Relationship between the degree of tumor progression and PCNA labeling index in metastatic focus of lymph node. *p<0.05

54.0±11.2%, 71.2±12.2%, 67.3±9.7%であり、腫瘍進展度が増すと PCNA 陽性率は高くなる傾向にあった。これは統計学的にも Stage I と Stage III および Stage II と Stage III の間に有意の差が認められた (Fig. 2)。

2) E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現

正常口腔粘膜上皮における E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現は基底層から

有棘層の細胞膜にみられた (Fig. 3-A, 4-A, 5-A)。リンパ節転移巣でもこれらの細胞間接着分子は癌細胞の細胞膜に発現し、小さな腫瘍胞巣が散在性にみられるものでも明瞭に発現していた。一方、大きな胞巣を形成していても発現が減弱あるいは消失しているものもあり、これらの発現は腫瘍胞巣の大きさと必ずしも一致しなかった (Fig. 3, 4, 5)。原発巣では E-cadherin, α -catenin および β -catenin のすべてについて、発現減弱例 (±) が最も多く、発現率はそれぞれ72.7%, 63.6%, 54.5%であった (Table 3)。一方、リンパ節転移巣の α -catenin, β -catenin 発現については発現減弱例 (±) が最も多く、発現率はそれぞれ77.8%, 66.7%であった。これに対し、E-cadherin については発現消失例 (-) が最も多くなっており、69.4%を占めていた。また、リンパ節転移巣における β -catenin の細胞質内のみでの発現は36個のリンパ節のうち6個 (16.7%) でみられた (Table 2)。しかし、これら細胞質にのみ β -catenin の発現をみた例では細胞膜における E-cadherin の発現はみられなかった (Fig. 6)。

3) リンパ節転移巣の PCNA 陽性率と E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現

E-cadherin, α -catenin および β -catenin のいずれについてもそれらの発現程度が低下すると PCNA 陽性率は高くなり、発現消失例 (-) の PCNA 陽性率はそれぞれ68.5%, 78.8%, 66.5%であった (Fig. 7)。統計学的には、E-cadherin 発現消失例 (-) の PCNA 陽性率

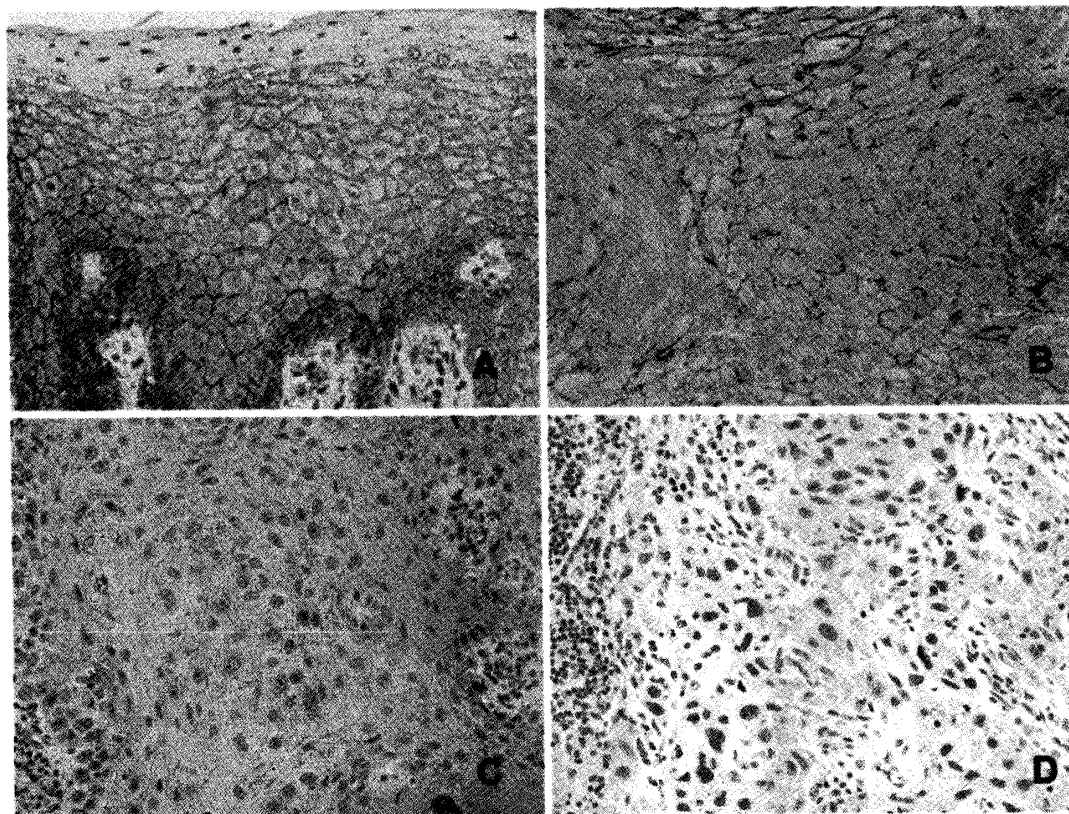


Fig. 3. Immunohistochemical staining for E-cadherin in the normal oral epithelium(A) and metastatic focus (B, C, D). B, Preserved expression type; C, Reduced expression type; D, Lost expression type.

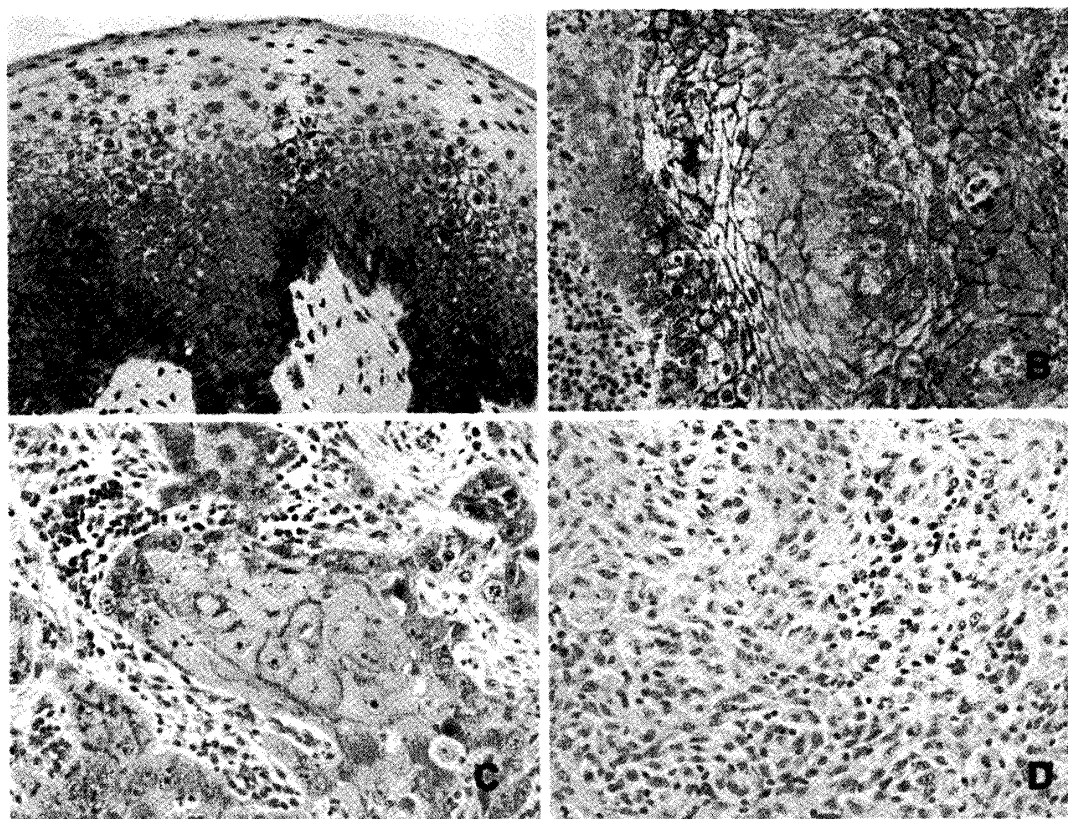


Fig. 4. Immunohistochemical staining for α -catenin in the normal oral epithelium(A) and metastatic focus (B, C, D). B, Preserved expression type; C, Reduced expression type; D, Lost expression type.

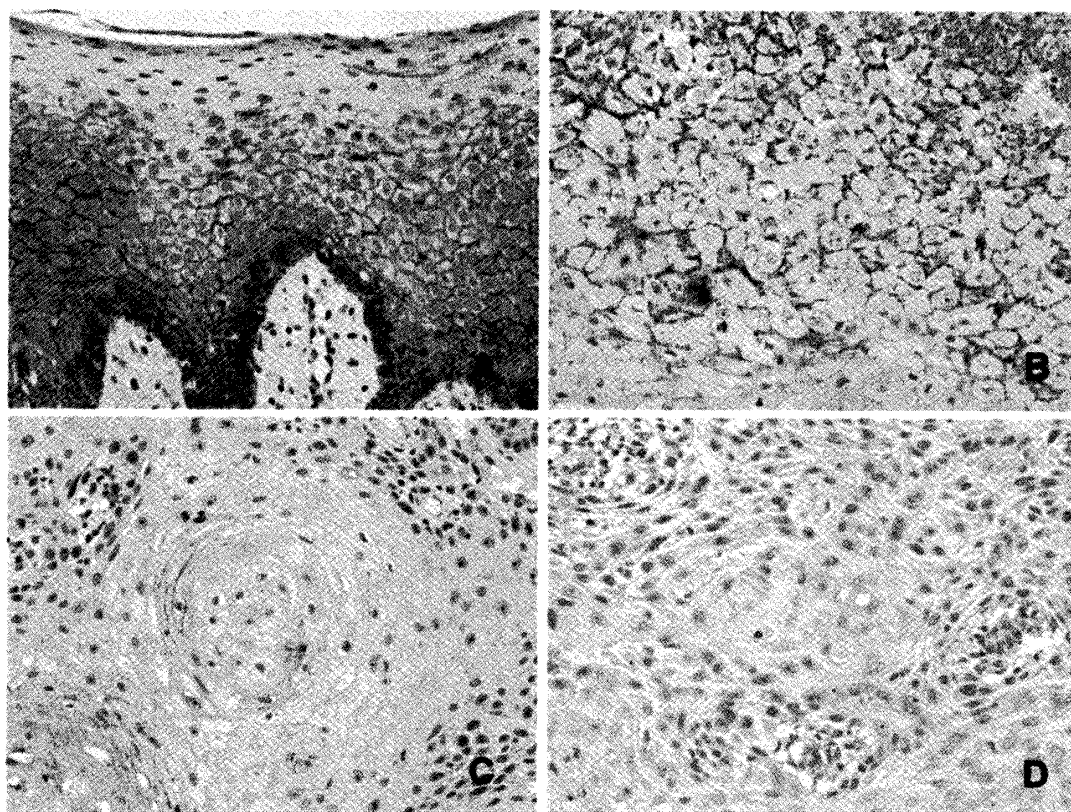


Fig. 5. Immunohistochemical staining for β -catenin in the normal oral epithelium(A) and metastatic focus (B, C, D). B, Preserved expression type; C, Reduced expression type; D, Lost expression type.

Table 3. Expression rate(%) of E-cadherin, α -catenin and β -catenin in primary lesion and metastatic focus of lymph node

Location(n)	E-cadherin			α -catenin			β -catenin		
	+	\pm	-	+	\pm	-	+	\pm	-
Primary lesion(11)	0(0)	72.7(8)	27.3(3)	0(0)	63.6(7)	36.4(4)	9.1(1)	54.5(6)	36.4(4)
Metastatic focus of lymph node(36)	2.7(1)	27.8(10)	69.4(25)	5.6(2)	77.8(28)	16.7(6)	13.9(5)	66.7(24)	19.4(7)

+, preserved expression type ; \pm , reduced expression type ; -, lost expression type

Table 4. Expression rate (%) of E-cadherin, α -catenin, and β -catenin in metastatic focus of lymph node

Degree of tumor progression (n)	E-cadherin			α -catenin			β -catenin		
	+	\pm	-	+	\pm	-	+	\pm	-
I (2)	0(0)	50.0(1)	50.0(1)	0(0)	100.0(2)	0(0)	50.0(1)	50.0(1)	0(0)
II (5)	20.0(1)	20.0(1)	60.0(3)	20.0(1)	60.0(3)	20.0(1)	40.0(2)	40.0(2)	20.0(1)
III (23)	0(0)	30.4(7)	69.6(16)	4.3(1)	73.9(17)	21.7(5)	8.7(2)	73.9(17)	17.4(4)
IV (6)	0(0)	16.7(1)	83.5(5)	0(0)	100.0(6)	0(0)	0(0)	66.7(4)	33.3(2)
Total(36)	2.7(1)	27.8(10)	69.4(25)	5.6(2)	77.8(28)	16.7(6)	13.9(5)	66.7(24)	19.4(7)

+, preserved expression type ; \pm , reduced expression type ; -, lost expression type

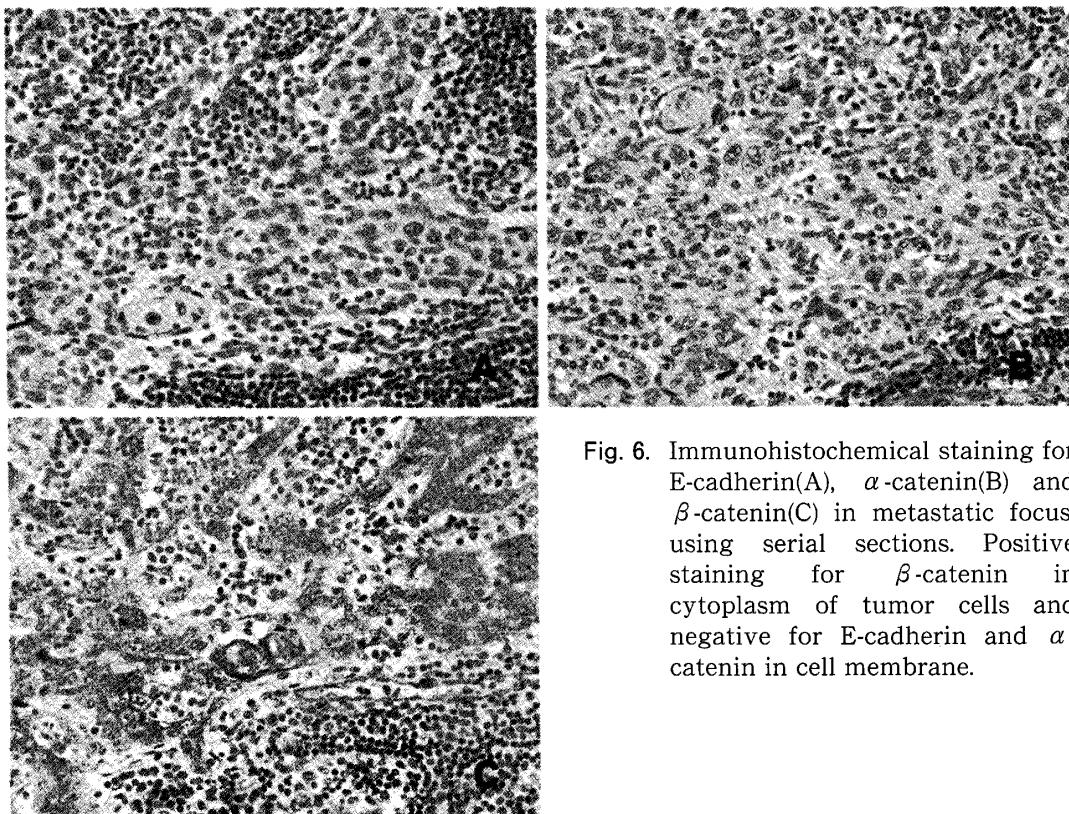


Fig. 6. Immunohistochemical staining for E-cadherin(A), α -catenin(B) and β -catenin(C) in metastatic focus, using serial sections. Positive staining for β -catenin in cytoplasm of tumor cells and negative for E-cadherin and α -catenin in cell membrane.

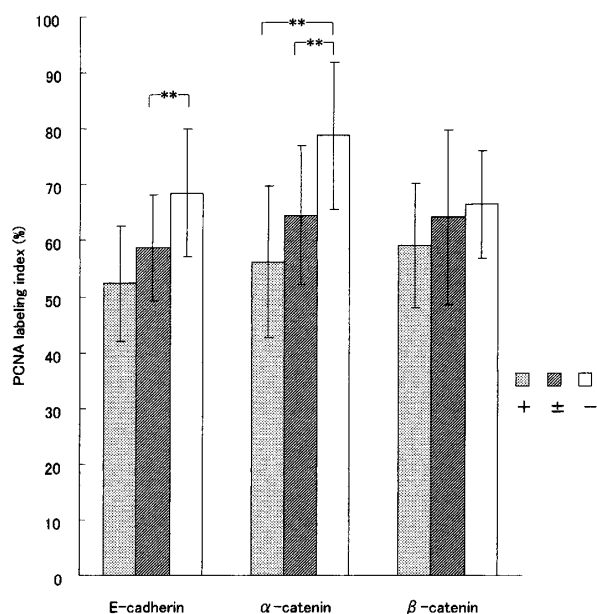


Fig. 7. Relationship between the expression pattern of cell adhesion molecules and PCNA labeling index in metastatic focus of lymph node.

** $p < 0.01$

は発現減弱例(±)に比較して有意に高かった。また、 α -catenin 発現消失例(-)の PCNA 陽性率は、発現減弱例(±)および発現保持例

(+)に比較して有意に高かった。なお、リンパ節転移巣において細胞質にのみ β -catenin の発現がみられた例での PCNA 陽性率は $80.9 \pm 5.6\%$ であり、リンパ節転移巣全体の平均 $64.5 \pm 12.5\%$ よりも有意に高かった (Table 2)。

4) リンパ節転移巣の腫瘍進展度と E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現率

リンパ節転移巣における E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現率を腫瘍進展度別にみると、E-cadherin は腫瘍進展度が増すと、発現消失例(-)の割合が高くなっていた (Table 4)。 α -catenin は腫瘍進展度にかかわらず発現減弱例(±)の割合が最も高く、腫瘍進展度との間に明らかな関連性はみられなかった。一方、 β -catenin は腫瘍進展度が増すと発現保持例(+)の割合が低くなり、発現消失例(-)の割合が高くなる傾向が窺えた。

考 察

口腔扁平上皮癌の悪性度や所属リンパ節転移

を予測することは臨床的にも重要なことであり、これまで形態学的な観点や、免疫組織化学的に基底膜の様相、腫瘍細胞の増殖能および細胞間接着分子などについて数多くの研究がある。しかし、それらは原発巣組織についての検索であり、転移巣における癌細胞の増殖能や細胞間接着分子の発現に関する報告は未だみられない。

本研究では口腔癌の頸部リンパ節転移巣の細胞間接着分子の発現を免疫組織化学的に追究して、原発巣におけるこれらの所見と対比し、細胞増殖活性との関連についても検討を加えた。

1. 細胞増殖活性 (PCNA の発現) について

これまで、癌細胞の増殖活性の組織学的検索には PCNA, Ki-67, AgNORs などが用いられてきた。なかでも、PCNA は細胞回転の G1 後期から S 期にかけて核内に蓄積される核蛋白質で癌腫の悪性度を反映するとされ、多くの研究で用いられ、悪性度の指標としての有用性が報告されている¹⁹⁻²⁴⁾。

現在までに報告されている口腔癌に関する PCNA 陽性率は報告者により様々である¹⁶⁻¹⁹⁾。その理由として、PCNA の発現は使用検体の固定条件 (固定液の種類, 固定時間) に左右されやすいこと、陽性細胞の判定法が統一されていないことなどが考えられている^{23, 24)}。固定条件については、本研究で用いた材料は全て 20% 中性リン酸緩衝ホルマリンで固定され、外科的切除終了時から包埋開始までを固定時間とすると 2~3 日間であり、条件はほぼ一定であった。

PCNA の染色性については 24 時間の固定では軽度の染色性低下²⁰⁾、10%ホルマリンでの 48 時間以上の固定での染色性の低下²¹⁾が報告されている。一方、ホルマリン固定パラフィン切片における PCNA の証明には加熱処理が効果的であるとされている²⁵⁾。本研究でもマイクロウェーブ処理を行ったところ、良好な染色結果が得られたが、その染色性に若干の濃淡がみられた。これまでも PCNA の染色性は細胞により濃淡が異なるとされている^{17, 26)}。辻ら¹⁷⁾は口腔扁平上皮癌についてこれを検索し、濃く染まっ

た細胞のみ計数した場合の PCNA 陽性率は 11.2% であり、濃く染まった細胞と淡く染まった細胞の両者を計数した場合の PCNA 陽性率は 22.8% であったとしている。そこで、本研究では陽性細胞の判定にあたり、染色性の濃淡にかかわらず、核全体に均一な染色所見が見られた細胞をすべて陽性細胞とした。

本研究において口腔扁平上皮癌の PCNA 陽性率は原発巣に比べ転移巣で低くなっていたことから、癌細胞の増殖は転移巣でやや緩慢であると考えられた。しかし、転移巣でも腫瘍進展度が増すにつれて細胞増殖活性は高くなる傾向がみられたことから、さらなる増殖進展と遠隔転移能の存在が示唆された。

2. 細胞間接着分子の発現と腫瘍の進展度

E-cadherin は細胞間接着帯に存在し、裏打ちタンパクである α および β -catenin を介して細胞骨格の actin 線維と相互作用し、細胞間接着の機能を果たす^{27, 28)}。これまで口腔癌の原発巣について、これらの分子の発現様相を検索し、これらの発現低下が癌の浸潤や悪性度と関連していることが報告されている⁹⁻¹³⁾。本研究において口腔扁平上皮癌のリンパ節転移巣における E-cadherin, α -catenin および β -catenin の発現を検索したところ、転移巣では α -catenin および β -catenin の発現消失例 (-) の割合は低かったが、E-cadherin は発現消失例 (-) の割合が高くなっていた。さらに E-cadherin 発現は腫瘍の進展度が増すとともに発現消失例 (-) の割合が高くなっていた。これらのことから、リンパ節転移巣における腫瘍の進展に E-cadherin の発現消失がとくに関連していることが示された。また、同時に β -catenin 発現も腫瘍の進展とともに発現保持例 (+) の割合が低くなり、発現消失例 (-) ないし発現減弱例 (\pm) の割合が高くなる傾向がみられ、 β -catenin の発現消失ないし減弱も進展に参与していることが示唆された。

これまで細胞間接着分子の発現に関する研究は種々の悪性腫瘍で行われている²⁹⁻³³⁾。すなわち、大腸癌については腫瘍の浸潤や転移と

E-cadherin の発現減弱とは有意な相関はなく、 α -catenin 発現減弱とは有意に相関するとする報告²⁹⁾、乳癌では E-cadherin 発現減弱または消失はリンパ節転移、遠隔転移と有意に相関するという報告がある³⁰⁾。また、肝癌では、正常組織と比較して癌組織では E-cadherin は発現が減弱しており、 α -catenin および β -catenin は過剰発現していたと報告されている³¹⁾。しかし、肝癌での同様の検索で、E-cadherin、 α -catenin および β -catenin のいずれも過剰発現していたと報告しているものもある³²⁾。

本研究の原発巣における結果は、Rakha ら³⁰⁾、Endo ら³¹⁾、Williams ら³³⁾の結果と同様であった。一方、Gofuku ら²⁹⁾、Ihara ら³²⁾の結果とは異なっていた。Gofuku ら²⁹⁾の E-cadherin、 α -catenin の染色結果の評価法は本研究のものと異なり、次のように行っている。すなわち、これらの細胞間接着分子の発現が細胞膜に均一にみられる細胞を陽性細胞とし、さらにこの陽性細胞の割合が90%以上であったものを発現保持例(+)とし、90%より低いものを発現減弱例(-)としている。このように Gofuku ら²⁹⁾は cut-off 値を90%と高い値に設定しており、このため本研究と異なる結果となっていると思われる。また、Ihara ら³²⁾は検索した腫瘍組織を組織構造により thin trabecular type, thick trabecular type および pseudoglandular type に分類し、thin trabecular type および pseudoglandular type では E-cadherin、 α -catenin および β -catenin が過剰発現していたが、thick trabecular type では発現が減弱していたとしている。本研究では大きな胞巣を形成しているものでも E-cadherin、 α -catenin および β -catenin の発現が減弱または消失しているものもあった。一方で、胞巣が散在性にみられるものでも発現が保持されているものもあり、組織構造との関連は認められなかった。

また、口腔領域では、Kiyuna ら⁹⁾が舌癌について検索し、原発巣における E-cadherin、 α -catenin および β -catenin の発現減弱は後発転

移と有意に関連していたとしている。平塚ら¹⁰⁾は口腔扁平上皮癌の転移症例と非転移症例の原発巣を比較検討し、転移例では有意に E-cadherin の発現は減弱していたとし、森川¹¹⁾や石岡¹³⁾も同様の報告をしている。一方、榊ら¹²⁾は口腔扁平上皮癌の転移例と非転移例の原発巣を検索し、E-cadherin を発現しているにもかかわらず、 α -catenin の発現が減弱しているものもあり、 α -catenin の発現異常は E-cadherin よりも細胞接着能の低下をより反映するものと考察している。

一方、口腔癌の転移巣における細胞間接着分子の発現についての報告は未だみられない。本研究では口腔扁平上皮癌の原発巣とリンパ節転移巣における細胞間接着分子の発現について検索した。その結果、原発巣では E-cadherin、 α -catenin および β -catenin のいずれも発現減弱例(±)が多く、リンパ節転移巣では α -catenin、 β -catenin は発現減弱例(±)が多かったが、E-cadherin については発現消失例(-)が多かった。本研究で得られた原発巣での結果は平塚ら¹⁰⁾や森川ら¹¹⁾の成績と一致していた。一方、榊ら¹²⁾の結果とは異なっていた。これは、榊ら¹²⁾は腫瘍の浸潤先端部に限定して検索していること、また細胞間接着分子の発現の評価法が本研究と異なるためと思われる。

3. 細胞間接着分子の発現と細胞増殖活性

リンパ節転移巣における細胞間接着分子発現の様相と細胞増殖活性の関連は、E-cadherin、 α -catenin および β -catenin のいずれについても発現程度が低下するとともに PCNA 陽性率は高くなり、発現消失例(-)でこれが最も高かった。

近年、 β -catenin は細胞質や核にも発現し、この場合の β -catenin は細胞間接着分子としてではなく、転写促進因子としての機能をもつことが報告されている³⁴⁻³⁹⁾。すなわち、細胞質に β -catenin が蓄積していると転写が促進され、癌細胞の増殖が増強される。

Zhang ら³⁵⁾は食道癌の原発巣における E-cadherin、 β -catenin の発現を検索し、細胞

質における β -catenin の蓄積は E-cadherin の発現減弱と有意に関連していると報告している。口腔扁平上皮癌については榊ら³⁹⁾が原発巣における β -catenin の発現を検索し、 β -catenin の発現とリンパ節転移例との関連では、細胞膜にのみ発現している症例よりも細胞質内や核に発現している症例で転移の頻度が高いと報告している。本研究において検索した36個のリンパ節のうち6個(16.7%)の転移巣の細胞質に β -catenin の発現がみられ、これらの癌細胞の PCNA 陽性率は $80.9 \pm 5.6\%$ で、転移巣全体の平均よりも有意に高くなっていた。このことから口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣においても細胞質に発現している β -catenin は転写促進因子として機能していることが推察され、さらなる増殖進展能を発現していることが示唆された。また、細胞質に β -catenin が発現していた例では E-cadherin の発現はみられなかった。このことは、 β -catenin の裏打ち対象である E-cadherin が消失することにより β -catenin は細胞間接着分子としての機能を果たせず、細胞質に蓄積するものと考えられた。本研究で検索した細胞間接着分子は cadherin-catenin complex として一つの機能的単位と考えられている。口腔扁平上皮癌においても catenin は cadherin が発現していなければ細胞間接着分子として機能できなくなり、細胞質、核へと移行するものと考えられた。

結 論

口腔扁平上皮癌の原発巣および頸部リンパ節転移巣における細胞間接着分子の発現を E-cadherin とその裏打ちタンパクである α -catenin および β -catenin について、また細胞増殖活性を PCNA について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 原発巣では E-cadherin, α -catenin および β -catenin のいずれについても発現減弱例(±)が多かった。
2. リンパ節転移巣では原発巣に比較して、PCNA 陽性率は有意に低かったが、腫瘍の進展度が増すほど PCNA 陽性率が高かった。
3. リンパ節転移巣では E-cadherin, α -catenin および β -catenin のいずれについても発現が低下するとともに、PCNA 陽性率は高くなっていた。また、E-cadherin については発現消失例(-)が多かった。
4. リンパ節転移巣では腫瘍の進展度が増すほど、E-cadherin の発現消失例(-)の割合が高くなった。 α -catenin についてはほとんどが発現減弱例(±)であり、腫瘍の進展との明確な関連性は認めなかった。 β -catenin については腫瘍の進展度が増すと、発現保持例(+)の割合が低くなり、発現消失例(-)の割合が高くなる傾向にあった。
5. リンパ節転移巣の細胞質に β -catenin が発現している例がみられたが、これらの例では PCNA 陽性率が転移巣全体の PCNA 陽性率よりも有意に高かった。また、その同一標本で E-cadherin は細胞膜に発現していなかった。
6. これらのことから口腔扁平上皮癌の頸部リンパ節転移巣のさらなる進展、増殖に E-cadherin の発現消失が関与していることが明らかとなった。また、 β -catenin の発現減弱も転移巣の進展、増殖に関与していることが示唆された。

謝辞：稿を終えるにあたり、本研究について終始ご懇篤な指導と校閲を頂きました口腔病理学講座佐藤方信教授に深甚なる謝意を表しますとともに、本研究の推進にあたり様々な面にてご指導とご協力頂きました口腔病理学講座の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

また、ご懇切なる校閲をいただきました口腔解剖学第二講座名和橙黄雄教授、口腔外科学第二講座杉山芳樹教授に深謝いたします。

本研究の要旨は第16回日本口腔病理学会学術大会(2005年8月25日、盛岡市)にて発表した。

文 献

- 1) 厚生省大臣官房統計情報部 編集：昭和46年人口動態統計 下巻, 財団法人厚生統計協会, 東京, 74-77ページ, 1973.
- 2) 厚生省大臣官房統計情報部 編集：昭和55年人口動態統計 下巻, 財団法人厚生統計協会, 東京, 94ページ, 1982.
- 3) 厚生省大臣官房統計情報部 編集：平成2年人口動態統計 下巻, 財団法人厚生統計協会, 東京, 94ページ, 1992.
- 4) 厚生省大臣官房統計情報部 編集：平成15年人口動態統計 下巻, 財団法人厚生統計協会, 東京, 136ページ, 2005.
- 5) 佐藤方信, 及川優子, 古屋 出：わが国における舌癌剖検症例の統計的検討 (第VI報), 岩手医大歯誌, 30 : 53-64, 2005.
- 6) Liotta, L. A. : Tumor invasion and metastases—Role of extracellular matrix. *Cancer Res.* 46 : 1-7, 1986.
- 7) Hart, I.R., Goode, N.T. and Wilson, R.E. : Molecular aspects of metastatic cascade. *Biochem. Biophys. Acta.* 989, 65-84, 1989.
- 8) Schipper, J. H., Fixen, U. H., Behrens, J., Unger, A., Jahnke, K., and Birchmeier, W. : E-cadherin expression in squamous cell carcinomas of head and neck : Inverse correlation with tumor differentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res.* 51 : 6328-6337, 1991.
- 9) Kiyuna, J., Hiratsuka, H., Nakamori, K. and Sunakawa, H. : Distribution of reduced expression of E-cadherin and catenins in squamous cell carcinoma of the tongue with special reference to its clinical significance. *Ryukyū Med. J.* 21 : 19-27, 2002.
- 10) 平塚博義, 小田島哲世, 片岡親男, 関口 隆, 谷口康子, 井手 隆, 小浜源郁：口腔扁平上皮癌のE型カドヘリン発現様式に関する免疫組織学的検討, 日口外誌, 42 : 985-991, 1995.
- 11) 森川秀広：口腔扁平上皮癌における α カテニンおよびE-カドヘリンの発現と所属リンパ節転移および生存率との関連, 日口外誌, 43 : 447-464, 1996.
- 12) 榊 敏男, 和唐雅博, 田村 功, 虫本浩三, 白数力也, 田中昭男, 榊 鉄也：口腔原発扁平上皮癌におけるE型カドヘリンと α -カテニンの発現, 日口外誌, 44 : 1-10, 1997.
- 13) 石岡康希：口腔扁平上皮癌の臨床病態に関する癌関連因子の研究, 広歯誌, 34 : 23-32, 2002.
- 14) 田村茂行, 塩崎 均：接着因子と転移, *Surg. Frontier*, 53 : 115-122, 1999
- 15) 松浦成昭, 前田 純, 田 海, 新谷 康：癌転移の分子機構, 外科治療, 92, 1065-1072, 2005
- 16) 本間義郎：口腔癌の頸部リンパ節に関する研究, 日口外誌, 28 : 1667-1684, 1982.
- 17) 辻 龍雄, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金川昭啓, 井上 敬, 早津良和, 篠崎文彦：増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点, 日口外誌, 38 : 1055-1058, 1992.
- 18) 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.
- 19) 田中一成, 岩本 敬, 高橋 学：抗PCNA抗体を用いた重層扁平上皮の腫瘍性病変における増殖細胞核の組織学的検討—ホルマリン固定パラフィン切片への応用—, 癌の臨床, 37 : 1487-1491, 1991.
- 20) 前田寛治, 辻 龍雄, 木村由香, 早津良和, 佐々木功典, 篠崎文彦：口腔扁平上皮癌におけるモノクローナル抗PCNA抗体による細胞動態の解析とその意義について, 日口外誌, 37 : 1961-1965, 1991.
- 21) 佐藤 明, 斎藤 徹, 野谷健一, 福田 博, 進藤正信, 雨宮 璋：抗PCNA抗体を用いた舌扁平上皮癌の免疫組織学的検討, 日口外誌, 39 : 1269-1275, 1993.
- 22) 米本嘉憲, 西嶋克己, 村田 勝, 永井教之：口腔扁平上皮癌におけるp53癌抑制遺伝子産物と増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織化学的検討, 日口外誌, 41 : 746-750, 1995.
- 23) 鈴木幸一, 加藤良平, 川生 明：抗PCNAモノクローナル抗体による増殖細胞の同定, ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫組織化学的検討, 医学のあゆみ, 157 : 655-656, 1991.
- 24) 松野吉宏, 向井 清：増殖細胞核抗原 (PCNA), 病理と臨床, 9 : 879-883, 1991.
- 25) 名倉 宏, 長村義之, 堤 寛 編集：渡辺・中根酵素抗体法, 改訂四版, 学際企画, 東京, 177ページ, 2002.
- 26) Hall, P. A., Levison, D. A., Woods, A. L., Yu, C. C.-W., Kellock, D. B., Watkin, J. A., Barnes, D. M., Gillett, C. E., Camplejohn, R., Dover, R., Wasseem, N. H. and Lane, D. P. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections : An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 162 : 285-294, 1990.
- 27) Takeichi, M. : Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Sci.* 251 : 1451-1455, 1991
- 28) 塩崎 均, 土岐祐一郎, 井上雅智：がん転移とカドヘリン・カテニン系の異常, 北島政樹 編集：がんの浸潤転移 基礎研究の臨床応用, 医学書院, 東京, 225-232ページ, 1998
- 29) Gofuku, J., Shiozaki, H., Tsujinaka, T., Inoue, M., Tamura, S., Doki, Y., Matsui, S., Tsukita, S., Kikkawa, N., Monden, M. : Expression of E-cadherin and α -catenin in patients with colorectal carcinoma. *Am. J. Pathol.* 111 : 29-37, 1999
- 30) Rakha, E. A., Rehim, D. Abd. El., Pinder, S. E., Lewis, S. A. : E-cadherin expression in invasive

- non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathol.* 46 : 685-693, 2005
- 31) Endo, K. Ueda, T. Ueyama, J. Ohta, T. and Terada, T. : Immunoreactive E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin proteins in hepatocellular carcinoma : Relationships with tumor grade, clinicopathologic parameters, and patients' survival. *Human Pathol.* 31 : 558-565, 2000
- 32) Ihara, A., Koizumi, H., Hashizume, R. and Uchikoshi, T. : Expression of epithelial cadherin and α - and β -catenins in nontumoral livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatol.* 23 : 1441-1447, 1996
- 33) Williams, H. K., Sanders, D. S.A., Jankowski, J. A.Z., Landini, G. and Brown, A.M.S. : Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 27 : 308-317, 1998
- 34) 坂本亨宇, 安井 弥, 野村慎太郎 編 : 病理診断における分子生物学, 病理と臨床, 第22巻, 臨時増刊号, 文光堂, 東京, 143ページ, 2004.
- 35) Zhang, G., Zhou, X., Xue, L., Quan, L., Wang, Y., Zhou, C., Lu, N., Wang, Q., Zhu, H. and Xu, N. : Accumulation of cytoplasmic β -catenin correlates with reduced expression of E-cadherin, but not with phosphorylated Ark in esophageal squamous cell carcinoma : Immunohistochemical study. *Pathol. Int.* 55 : 310-317, 2005.
- 36) Kitagawa, S., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K. and Nakayama, K. : An F-box protein, FWD1, mediates ubiquitin-dependent proteolysis of β -catenin. *The EMBO J.* 18 : 2401-2410, 1999.
- 37) Polakis, P. : The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 : 15-21, 1999.
- 38) Kikuchi, A. : Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci.* 94 : 225-229, 2003.
- 39) 榊 敏男, 田村 功, 田村 浩伸, 和唐雅博, 田中昭男, 覚道健治 : 口腔扁平上皮癌における β カテニンおよびリン酸化 β カテニンの発現とリンパ節転移および予後との関連, 頭頸部腫瘍, 29 : 623-631, 2003.