

Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma

北村, 亮二
九州大学大学院歯学府

<https://doi.org/10.15017/21992>

出版情報 : 九州大学, 2011, 博士 (歯学), 課程博士
バージョン :
権利関係 :

口腔扁平上皮癌の分化における
サイトケラチン 17 の発現に関する検討

Association of cytokeratin 17 expression with differentiation
in oral squamous cell carcinoma

2012 年

九州大学大学院歯学府口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

北村 亮二

指導教官

九州大学大学院歯学研究院口腔顎顔面病態学講座

顎顔面腫瘍制御学分野

中村 誠司 教授

本研究の一部は下記の学術雑誌に投稿中である。

Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma

Ryoji Kitamura, Takeshi Toyoshima, Hideaki Tanaka, Shintaro Kawano,
Kazunari Oobu, Takahiro Kiyosue, Ryota Matsubara, Yuichi Goto, and Seiji Nakamura

Submitted to **Oral Oncology**

略語一覧

cDNA: complementary DNA (相補的 DNA)
CK: cytokeratin (サイトケラチン)
DAB: diaminobenzidine
DEPC: diethyl pyrocarbonate
DMEM: Dulbecco's modified Eagle' medium
FBS: fetal bovine serum (ウシ胎児血清)
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HE: Hematoxylin and Eosin
NOE: normal oral epithelium (正常口腔粘膜上皮)
N.S.: not significant
OSCC: oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)
PBS: phosphate-buffered saline (リン酸緩衝生理食塩水)
PFA: paraformaldehyde
RT PCR: reverse transcriptase polymerase chain reaction
RQ: relative quantification

目次

要旨	4
緒言	7
材料および方法	10
結果	
I .OSCC や白板症、NOE における CK17 の発現	18
II .OSCC の分化による CK17 の発現様式	34
考察	40
謝辞	46
参考文献	47

要旨

口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) は診断の遅れや、放射線療法および化学療法に抵抗性を持つ OSCC 細胞の存在により予後不良となることが多い。よって、OSCC を早期診断し、組織学的特徴を把握するために、より精度の高い診断方法を確立することが重要である。以前よりサイトケラチン (cytokeratin: CK) は固形癌の診断のためにその有用性が検討されているが、特に CK17 は子宮頸部や喉頭の扁平上皮癌において過剰に発現していることが報告されている。そこで本研究は、OSCC において CK17 を含む 7 種類の CK の発現様式を解析した。また、OSCC の分化に着目し、白板症や正常口腔粘膜上皮 (normal oral epithelium: NOE) における発現について検討した。

I. OSCC や白板症、NOE における CK17 の発現

病理組織学的に OSCC と診断された 105 例の生検組織材料を用い、7 種類の抗 CK 抗体 (抗 CK13 抗体、抗 CK14 抗体、抗 CK16 抗体、抗 CK17 抗体、抗 CK18 抗体、抗 CK19 抗体、抗 CK20 抗体) を用いて免疫組織化学的染色を行った。また、臨床的に白板症と診断された 108 例の生検材料を用い、抗 CK17 抗体と抗 CK13 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。対照群として NOE 10 例を用いた。

OSCC における 7 種類の CK の発現頻度は CK13 が 3/105 例 (2.9%)、CK14 が 102/105 例 (97.1%)、CK16 が 60/105 例 (57.1%)、CK17 が 101/105 例 (96.2%)、CK18 が 21/105 例 (20.0%)、CK19 が 39/105 例 (37.1%)、CK20 が 22/105 例 (21.0%) であった。NOE における発現頻度は CK13 が 10/10 例 (100%)、CK14 が 10/10

例 (100%)、CK16 が 4/10 例 (40.0%)、CK17 が 0/10 例 (0%)、CK18 が 2/10 例 (20.0%)、CK19 が 4/10 例 (40.0%)、CK20 が 0/10 例 (0%) であった。CK17 のみ NOE において発現を認めず、OSCC において高発現した ($p < 0.01$)。臨床病理学的所見と比較すると、低分化型よりも高分化型 OSCC において有意に CK17 の発現を認めた ($p < 0.01$)。また、CK17 の発現頻度とその他の臨床病理学的所見との間に関連は認めなかった。白板症全体では 55/108 例 (50.9%) において CK17 の発現を認めた。上皮性過形成を伴う (hyperplasia) 症例では 36/74 例 (48.6%) において発現を認めたのに対し、上皮性異形成を伴う (dysplasia) 症例では 19/34 例 (55.9%) において有意に発現頻度が高かった ($p < 0.01$)。OSCC ではほとんど発現がみられなかった CK13 は、白板症全体では 63/108 例 (58.3%) において発現を認めた。hyperplasia 症例では 52/74 例 (70.3%) において発現を認めたのに対し、dysplasia 症例では 11/34 例 (32.4%) において有意に発現頻度が低かった ($p < 0.01$)。

II. OSCC の分化による CK17 の発現様式

CK17 の発現と OSCC 細胞の分化との関連を検索するため、上皮幹細胞のマーカーであり、低分化 OSCC 細胞との関連が示唆される Δ Np63 を用いて免疫組織化学染色を行った。また、高分化型 OSCC 由来の HSC-2、低分化型 OSCC 由来の HSC-3 および SAS、OSCC 再発症例由来の SQUU-A、同じく再発症例で高転移能を有する SQUU-B といった 5 種類の細胞株における CK17 mRNA 発現量を real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT PCR) 法にて解析し、OSCC 細胞の分化の違いによる CK17 mRNA の発現の差異を検索した。 Δ Np63 の発現頻度は 102/105 例 (97.1%) であり、核に特異的に発現していた。 Δ Np63

は上皮基底層や癌巣の最外層に発現し、癌巣の内側に発現する CK17 とは相対する発現を認めた。ΔNp63 の発現様式と OSCC の臨床病理学的所見との間に有意な発現はみられなかった。HSC-2 における CK17 mRNA 発現量は、HSC-3 および SAS と比較して有意に多かった ($p < 0.01$)。また、SQUU-B より SQUU-A において発現量が有意に多かった ($p < 0.01$)。以上から、CK17 は高分化な OSCC 細胞に発現することが示唆された。

CK17 は正常上皮と比較して異型上皮や OSCC において発現頻度が上昇し、OSCC では臨床病理学的に分化との関連が認められた。さらに、CK17 は高分化 OSCC 細胞株に高発現していた。以上から、CK17 は悪性度の低い高分化型 OSCC のマーカーであると考えられた。

緒言

外科的切除、放射線療法および化学療法を行う三者併用療法を用いることで口腔扁平上皮癌 (oral squamous cell carcinoma: OSCC) の5年生存率は80%を超えるようになった(1-3)。しかし依然として予後不良となる症例は少なくない。その理由として、診断の遅れや放射線療法および化学療法に抵抗性を持つOSCC細胞の存在が挙げられる。OSCCの中でも成長が早く、放射線療法等に抵抗性を示すのが低分化OSCC細胞といわれている。ゆえに、OSCC細胞の特徴を把握するマーカーを確立することが非常に重要である。

サイトケラチン (cytokeratin: CK) は上皮細胞の細胞骨格を成す中間径フィラメントである。20数種類のCKが発見されており、上皮の分化により発現するCKも異なる(4)。重層扁平上皮の角化層ではCK1とCK10(5)、基底細胞層ではCK5とCK14が主に発現している(6)。さらに、正常上皮が癌化する際に重層扁平上皮の階層構造が変化することで、様々な種類のCKが発現し(7)扁平上皮癌の分化と関連するため、その診断因子としての有用性が検討されてきた。特に、CK17は子宮頸部において正常複合上皮の基底層に発現しているため、上皮幹細胞のマーカーといわれている(8)。また、子宮頸癌においても発現を認めており、特に高分化型扁平上皮癌において発現頻度が高い(9)。さらに、肺(7)、喉頭(10)、食道の扁平上皮癌(11、12)において、正常上皮と比較するとCK17が過剰に発現しているという報告もある。Toyoshimaらの報告では、マイクロアレイ解析によりOSCCの原発巣においてCK14 mRNA、CK16 mRNA、CK17 mRNA、CK18 mRNA、CK19 mRNA、CK20 mRNAの発現を検討し、CK17

mRNA が最も過剰発現していた。さらに、OSCC 患者 56 例の原発巣組織における CK17 mRNA の発現について、OSCC の診断因子としての有用性が報告されている CK19 (13) 、および再発との関連が報告されている CK20 (14) との比較を行った。結果は、CK17 mRNA が 53/56 例 (94.6%) において最も過剰発現しており、OSCC の診断因子としての有用性を示した (15) 。さらに、Whipple らはマイクロアレイ解析により、OSCC 原発巣組織における CK17 と CK13 の関与に注目し、CK17 mRNA の高発現と CK13 mRNA の低発現を報告している (16) 。

CK13 は正常組織では眼球角膜の周囲に発現しており、非角化重層上皮の傍基底層において粘膜特異的に発現する (17) 。口腔内では、正常口腔粘膜上皮 (normal oral epithelium: NOE) の傍基底層に発現し、上皮性異形成 (dysplasia) を呈することで減少が認められる (18) 。また、OSCC へ悪性転化することで重層扁平上皮の構造が崩れ、CK13 の発現が消失すると考えられている (19) 。

前述の特徴を示す CK17 と CK13 であるが、前癌病変である白板症において両者の発現を検索することは非常に有用である。なぜなら、dysplasia は上皮性過形成 (hyperplasia) よりも癌化する可能性が高いため (20) 、悪性転化を起こす白板症の予測が可能となるからである。Mikami らは、白板症においては NOE と比較して CK17 の発現頻度が上昇し、CK13 の発現頻度が減少すると報告している (21) 。しかし、OSCC および白板症における CK17 と CK13 の発現様式を臨床病理学的所見と比較検討した報告はない。

また、CK17 は他の CK と同様に分化関連因子と考えられているが、OSCC における発現様式は不明な点が多い。そこで、CK17 以外の分化関連因子として Δ Np63 が低分化 OSCC 細胞のマーカーの候補としてあげられる。 Δ Np63 は重層

扁平上皮の発生過程において基底層に発現し、基底細胞の増殖および重層化を促進する。また、重層化により生じた有棘層や顆粒層の分化した細胞では $\Delta Np63$ の発現が消失することが報告されている (22)。以上から、CK17 と $\Delta Np63$ の発現様式を比較することで OSCC 組織中の分化の局在を把握できると考えられる。

本研究では、OSCC において高頻度に発現する CK を見出すために、まず CK17 と CK13 を含む 7 種類の CK の発現様式を検討した。その結果、CK17 が OSCC に特異的に高発現していることが分かった。そこで OSCC への悪性転化の指標を検討するために、白板症において CK17 と CK13 の発現様式を検索した。また、OSCC の分化と CK17 の発現との関連を検討するために、 $\Delta Np63$ の発現との比較を行い、分化の異なる OSCC 細胞株における CK17 の発現を検索した。

材料および方法

1. 対象患者

対象は、2005年1月から2010年12月に九州大学病院を受診し、病理組織学的にOSCCと診断された105例および病理組織学的所見をふまえて臨床的に白板症と診断された108例である。これらの生検材料を採取し、直ちに4% paraformaldehyde (PFA) に24~48時間浸漬固定後、パラフィン包埋を行った。ミクロトーム (Leica Microsystems, Japan) にて5 μm の切片を作製し、Hematoxylin and Eosin (HE) 染色および免疫組織化学的に用いた。対照群として正常口腔粘膜上皮 (normal oral epithelium: NOE) 10例を用いた。OSCC 105例および白板症 108例の内訳を表1および表2にそれぞれ示す。

表 1 OSCC 105 例の内訳

項目	分類	症例数(%)
性別	男	53 (50.5)
	女	52 (49.5)
年齢	65>	61 (61.0)
	65<	44 (39.0)
分化度	高分化	72 (68.6)
	中分化	31 (29.5)
	低分化	2 (1.9)
T	1	41 (39.0)
	2	47 (44.8)
	3	3 (2.9)
	4	14 (13.3)
N	あり	20 (19.0)
	なし	85 (81.0)
YK 分類	1	9 (8.6)
	2	21 (20.0)
	3	48 (45.7)
	4C	19 (18.1)
	4D	7 (6.7)
ステージ分類	I	42 (40.0)
	II	33 (31.4)
	III	8 (7.6)
	IV	22 (21.0)
部位	舌	63 (60.0)
	歯肉	23 (21.9)
	頬粘膜	8 (7.6)
	口底	7 (6.7)
	口蓋	4 (3.8)

表 2 口腔白板症 108 例の内訳

項目	分類	症例数(%)
性別	男	68 (63.2)
	女	40 (36.8)
年齢	65>	51 (48.1)
	65<	57 (53.8)
dysplasia の程度	hyperplasia	74 (69.8)
	mild dysplasia	20 (18.9)
	moderate dysplasia	8 (7.5)
	severe dysplasia	6 (5.7)
部位	歯肉	45 (42.5)
	舌	44 (41.5)
	口蓋	10 (9.4)
	頬粘膜	7 (6.6)
	口唇	1 (0.9)
	口底	1 (0.9)

2. 生検材料の病理組織学的診断

OSCC は組織学的悪性度分類として、grade 分類 (WHO) (23) と山本・小浜の分類 (YK 分類) (24) を用いた。WHO の grade 分類は腫瘍細胞の分化度に応じて grade 1 (高分化型)、grade 2 (中分化型)、grade 3 (低分化型) に分類した。YK 分類は腫瘍宿主境界部における浸潤様式に応じて grade 1、2、3、4C、4D に分類した。

YK 分類の基準を示す:

grade 1: 腫瘍と宿主の境界線が明瞭である。

grade 2: 境界線にやや乱れがある。

grade 3: 境界線は不明瞭で大小の癌胞巣が散在している。

grade 4C: 境界線は不明瞭で小さな癌胞巣が索状に浸潤している。

grade 4D: 境界線は不明瞭で癌巣を作らず、瀰漫性に浸潤している。

白板症においては WHO の診断基準に従って、dysplasia と hyperplasia に分類した (25)。さらに、dysplasia はその程度が低い順に応じて、軽度異形成 (mild dysplasia)、中等度異形成 (moderate dysplasia)、重度異形成 (severe dysplasia) に分類した。

3. 免疫組織学的解析

作製したパラフィン切片を xylene に 20 分間、さらに、100%、95%、85%、75% ethanol に各 5 分間浸漬させ、脱パラフィン処理および水和処理を行い、Target Retrieval Solution (DTRS; code S1700; Dako, Denmark) を用いて、抗原の賦活化処理 (121°C、5 分) を行った。切片を phosphate-buffered saline (PBS) にて洗浄後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、1.0%過酸化水素水を室温で 30 分反応させた。その後、抗体の非特異的吸着を防ぐために 10%ヤギ正常血清 (ヒストファインブロッキング試薬 II; Nichirei Bioscience, Japan) を室温で 1 時間反応させた。一次抗体は室温で 3 時間反応させた。使用した一次抗体を表 3 に示す。

表 3 免疫組織化学染色に用いた一次抗体

抗体	細胞種	濃度	購入先	動物種
CK13	KS-1A3	1:1000	Novocastra	Mouse
CK14	LL002	1:300	Abcam	Mouse
CK16	LL025	1:100	CHEMICON	Mouse
CK17	E3	1:60	Dako Cytomation	Mouse
CK18	RCK106	1:100	Millipore	Mouse
CK19	RCK108	1:50	Dako Cytomation	Mouse
CK20	Ks20.8	1:25	Dako Cytomation	Mouse
ΔNp63	4A4	1:100	Dako Cytomation	Mouse

二次抗体にはペルオキシダーゼ標識 IgG ポリクローナル抗体 (Nichirei Bioscience) を用い、室温で 1 時間反応させた。PBS で 20 分間洗浄後、3,3'-diaminobenzidine·4HCl (DAB substrate kit; Nichirei Bioscience) にて可視化し、さらに、hematoxylin (Mayer's Hematoxylin Solution; Wako, Japan) を用いて対比染色を行った。その後、75%、85%、95%、100% ethanol に各 5 分間浸漬させ、脱水処理を行い、Mount-Quick (Daido Sangyo, Japan) を用いて封入した。陰性対象として一次抗体の代わりに 10% ヤギ正常血清を用いた。

二重免疫組織化学染色は、抗 CK17 モノクローナル抗体と抗 Δ Np63 モノクローナル抗体を用いて行った。抗体の非特異的吸着を防いだ後、抗 Δ Np63 モノクローナル抗体を室温にて 3 時間反応させた。二次抗体として MACH 2 Double Stain 2 (BIOCARE MEDICAL, USA) を用いて室温にて 30 分間反応させ、Perma Blue (DBS, USA) にて可視化した。さらに、抗 CK17 モノクローナル抗体を室温にて 3 時間反応させ、二次抗体として MACH 2 Double Stain 1 (BIOCARE MEDICAL) を用い室温にて 30 分間反応後、DAB Chromogen Kit (BIOCARE MEDICAL) にて可視化した。10 分間水洗し、その後 VectaMount AQ (Vector Laboratories, USA) にて封入した。陰性対象として、一次抗体の代わりに 10% ヤギ正常血清を用いた。

また、切片より 0.5 mm^2 の範囲を無作為に 3 か所選択して、DAB にて標識された陽性細胞数を計測し、それらを全上皮系細胞数で除したものを陽性率として算出した。評価方法は、発現細胞が 60%以上を強陽性 (+++) とし、59~30% を陽性 (++)、29~5% を弱陽性 (+)、5%未満を陰性 (-) とした。さらに、60%以上のものを高発現、60%未満を低発現とし、臨床所見との関連を統計学的に検討

した。

4. 細胞培養

本研究では、口腔扁平上皮癌細胞株である HSC-2 (高分化型口底癌由来)、HSC-3 (低分化型舌癌由来)、および SAS (低分化型舌癌由来) 細胞、また同一症例由来の SQUU-A (非転移株) および SQUU-B (転移株) 細胞、さらに正常ヒトケラチノサイト由来細胞株である HaCaT 細胞を用いた。培地には、Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) /F-12 (Sigma-Aldrich, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich)、100 units/ml penicillin、および 100 units/ml streptomycin (P/S) を添加したものをを用い、37°C、5%CO₂ 存在下で細胞培養を行った。

5. RNA の抽出および complementary DNA (cDNA) の合成

RNA の抽出は acid guanidium-phenol-chloroform 法を用いた。まず、培養皿中の細胞に TRIzol[®] (Invitrogen, USA) を 1.0 ml を加え、セルスクレーパーにて粉砕した。その後、これらに 0.2 ml の chloroform (Nacalai tesque, Japan) を加えて攪拌し、4°C、14,000 rpm で 15 分間遠心分離を行った後、RNA を含む水層を採取した。これに 1 ml の isopropanol (Nacalai tesque) を加えて攪拌後、4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清の除去後に得られた RNA ペレットを 75% ethanol (Nacalai tesque) にて洗浄した。さらに、4°C、14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、再沈殿させたペレットを乾燥させ、50 µl の 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) 処理水 (Nacalai tesque) に溶解した。その後、吸光度計 (NANO DROP 1000; Thermo

Scientific, USA) にて total RNA の濃度を測定した。

cDNA の合成には、DEPC 処理水に約 2.0 µg の total RNA、25 units/µl の recombinant RNase inhibitor (Nacalai tesque) を 1.0 µl、100 mM Tris-HCl (pH 8.8)、500 mM potassium chloride および 0.8% Nonidet P40 を含む 10×Taq DNA Polymerasa Buffer を 2.0 µl、25 mM magnesium chloride solution (以上、Bio Basic, Canada) 4.0 µl、2.0 mM dNTPmix (Toyobo, Japan) を 2.0 µl、50 µm Random Hexamers を 1.0 µl 加えて合計 20 µl とし、42°C で 15 分間インキュベートした。その後、99°C で 5 分間加温して酵素を失活させ、5°C で 5 分間冷却し、これを mRNA の発現解析に用いた。

6. Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT PCR) 法による mRNA の発現解析

Real-time PCR は Brilliant[®] II SYBR[®] Green QPCR Master Mix (Stratagene, USA) を用いて行った。滅菌水に Master Mix を 10 µl、template DNA を 10 ng、プライマーを 1 µl 加え、全反応量を 20 µl とした。反応条件は、熱変性は 95°C で 1 サイクル目が 5 分、2 サイクル目以降は 10~30 秒間で行い、伸長反応は 72°C、10~30 秒間で行い、伸長反応は 72°C、10~30 秒間とし、全 45 サイクルの増幅を行った。

mRNA の発現を解析する分子は CK17 [Hs KRT17 1 SG QuantiTect Primer Assay (200) (Cat. QT00001680)] である。Relative Quantification (RQ) は STRATAGENE MX3000 (Agilent Technologies, USA) にて測定した。また、mRNA の発現量を定量化するため、housekeepig 遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) を用いて補正し、 $\Delta\Delta Ct$ 法 (26) により相対的発現量を算出した。なお、得られた PCR 産物を 2.0% アガロースゲル (Invitrogen) 上で電気泳動を行い、ethidium bromide 染色液に、紫外線により可視化した。

7. 統計

統計処理には、student の t 検定、Welch の t 検定、Mann-Whitney U 検定もしくは χ^2 検定を用い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結果

I. OSCC や白板症、NOE における CK17 の発現

I-1. OSCC および NOE における 7 種類の CK の発現様式

本研究では、まず OSCC および NOE の生検組織材料における 7 種類の CK の発現を検索するため免疫組織化学的染色を行った (図 1、2)。

CK は細胞質基質に限局して発現しており、OSCC における発現頻度は CK13 が 3/105 例 (2.9%)、CK14 が 102/105 例 (97.1%)、CK16 が 60/105 例 (57.1%)、CK17 が 101/105 例 (96.2%)、CK18 が 21/105 例 (20.0%)、CK19 が 39/105 例 (37.1%)、CK20 が 22/105 例 (21.0%)であった。CK13 は OSCC においてはほとんど発現がみられず、一部の症例において癌真珠の角化部分に発現を認めるのみであった (図 1-1; e)。CK14 は OSCC 組織全体において発現を認めた (図 1-1; f)。CK16 は OSCC 組織中心部に弱く発現を認めた (図 1-1; g)。CK17 は OSCC 組織に強く発現を認めた。特に癌胞巢の最外層から 2、3 層には発現がみられず、内側において強い発現を認めた (図 1-1; h)。CK18 は腺組織に発現を認めたが、OSCC 組織においては弱い発現を認めるのみであった (図 1-2; d)。CK19 は発現を認める OSCC 細胞が組織内に散在していた (図 1-2; e)。CK20 は OSCC 組織全体に弱い発現を認めた (図 1-2; f)。

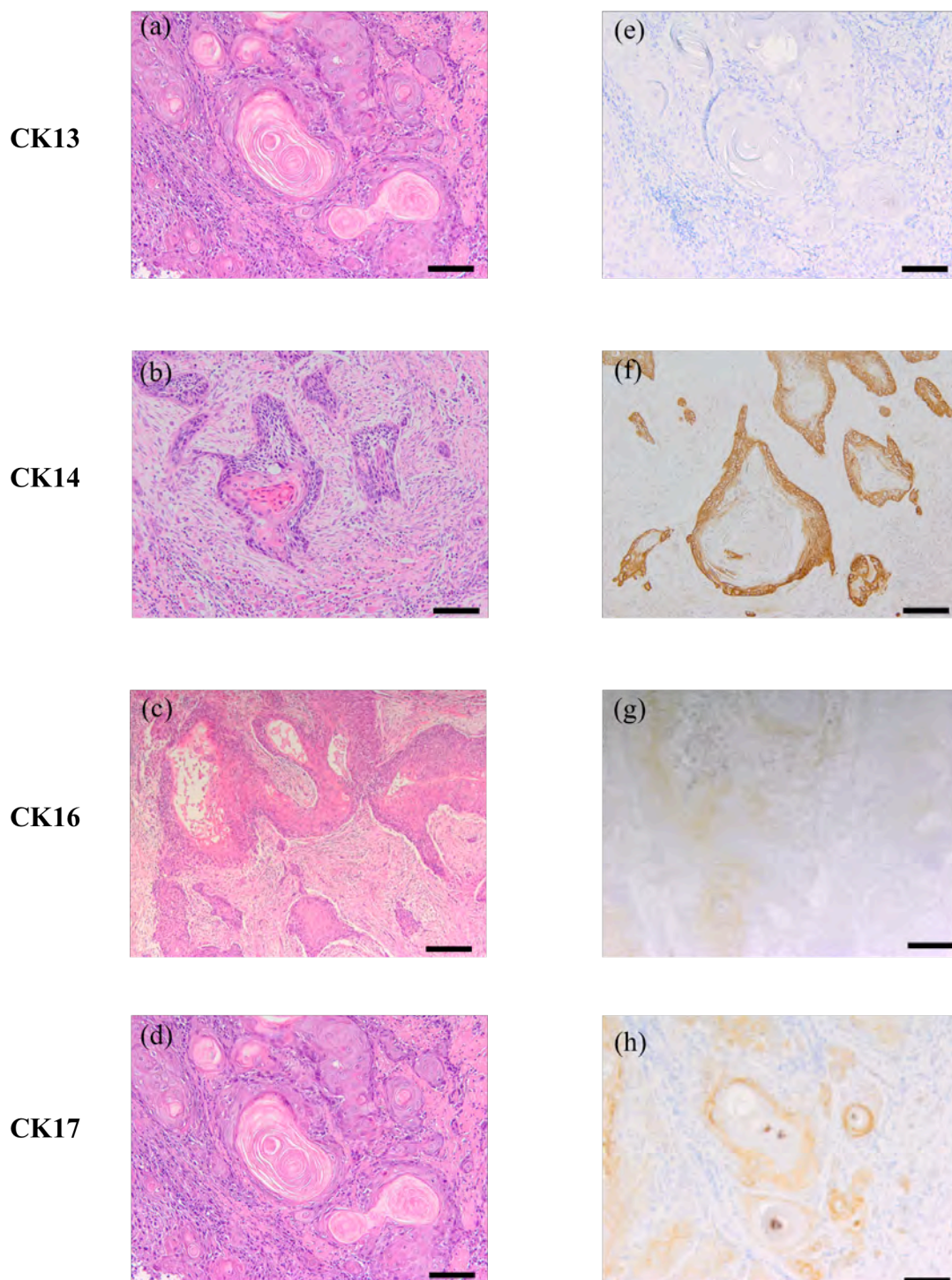


図 1-1 OSCC における 7 種類の CK の発現
 OSCC において CK17 は腫瘍の中心部に発現を認めた (h)。CK13 の発現は
 みられなかった (e)。CK14 は OSCC 組織全体に発現を認めた (f)。CK16
 は OSCC の中心部に弱い発現を認めた (g)。(scale bars: 100 μ m)

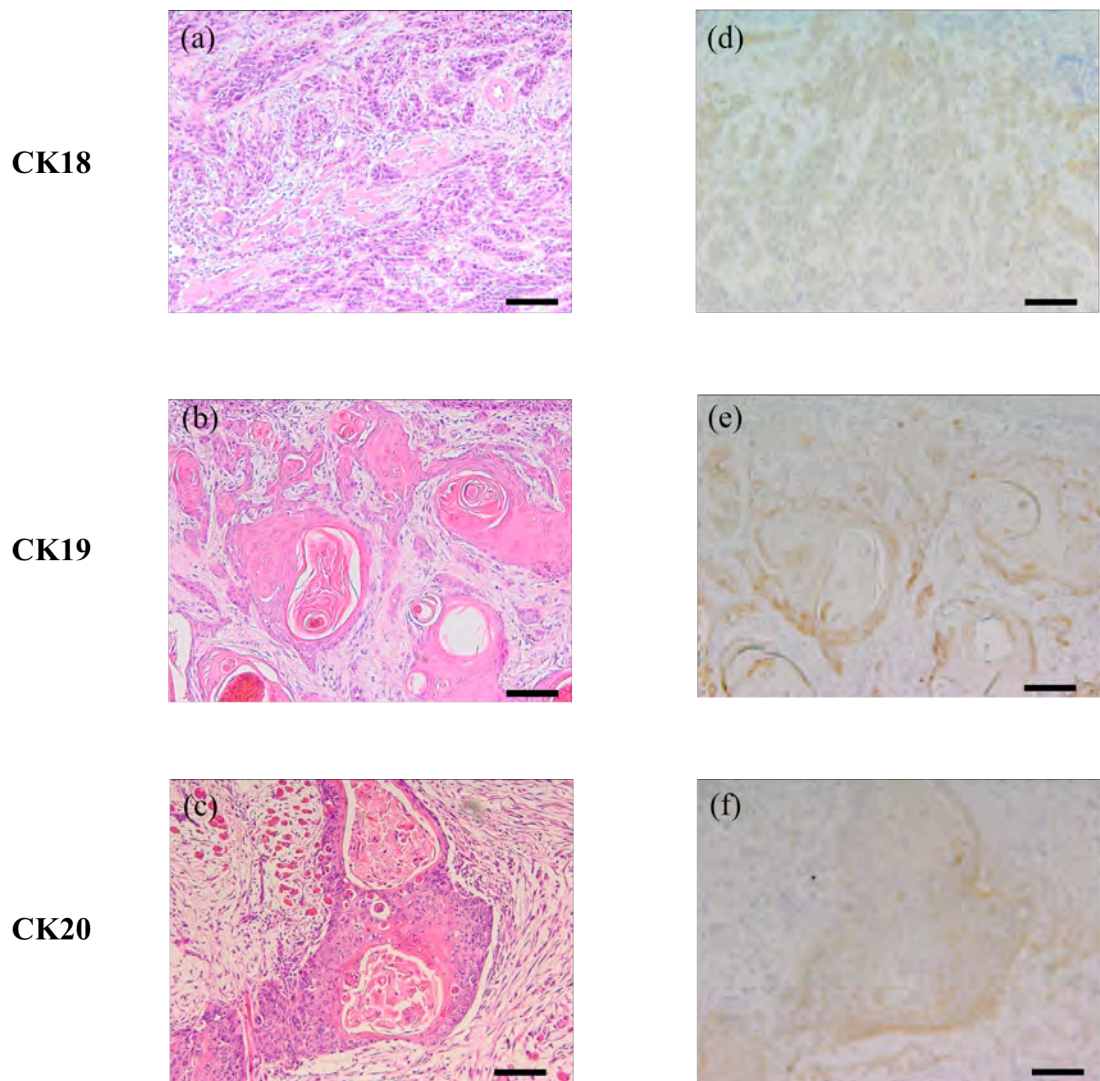


図 1-2 OSCC における 7 種類の CK の発現
 CK18 は腫瘍中心部において弱い発現を認めた (d)。CK19 は OSCC 組織全体に発現を認める細胞が散在していた (e)。CK20 は OSCC 組織の一部に弱い発現を認めた (f)。 (scale bars: 100 μ m)

NOEにおける発現頻度はCK13が10/10例(100%)、CK14が10/10例(100%)、CK16が4/10例(40%)、CK17が0/10例(0%)、CK18が2/10例(20.0%)、CK19が4/10例(40%)、CK20が0/10例(20%)であった。CK13およびCK16は有棘層に発現を認めた。CK14およびCK19は基底層に発現を認めた。CK18は一部の基底層に発現を認めた。CK17およびCK20は発現がみられなかった(図2)。CK17はNOEに比較して、OSCCにおいて有意に発現頻度が高かった(図3; χ^2 検定、 $p<0.01$)。また、CK13はOSCCにおいて発現がみられず、NOEにおいて発現頻度が有意に高かった(図3; χ^2 検定、 $p<0.01$)。他のCKは、NOEとOSCCにおける発現頻度の間に有意な差は認めなかった。以上より、CK17がOSCCにおいて特異的に発現することが分かった。

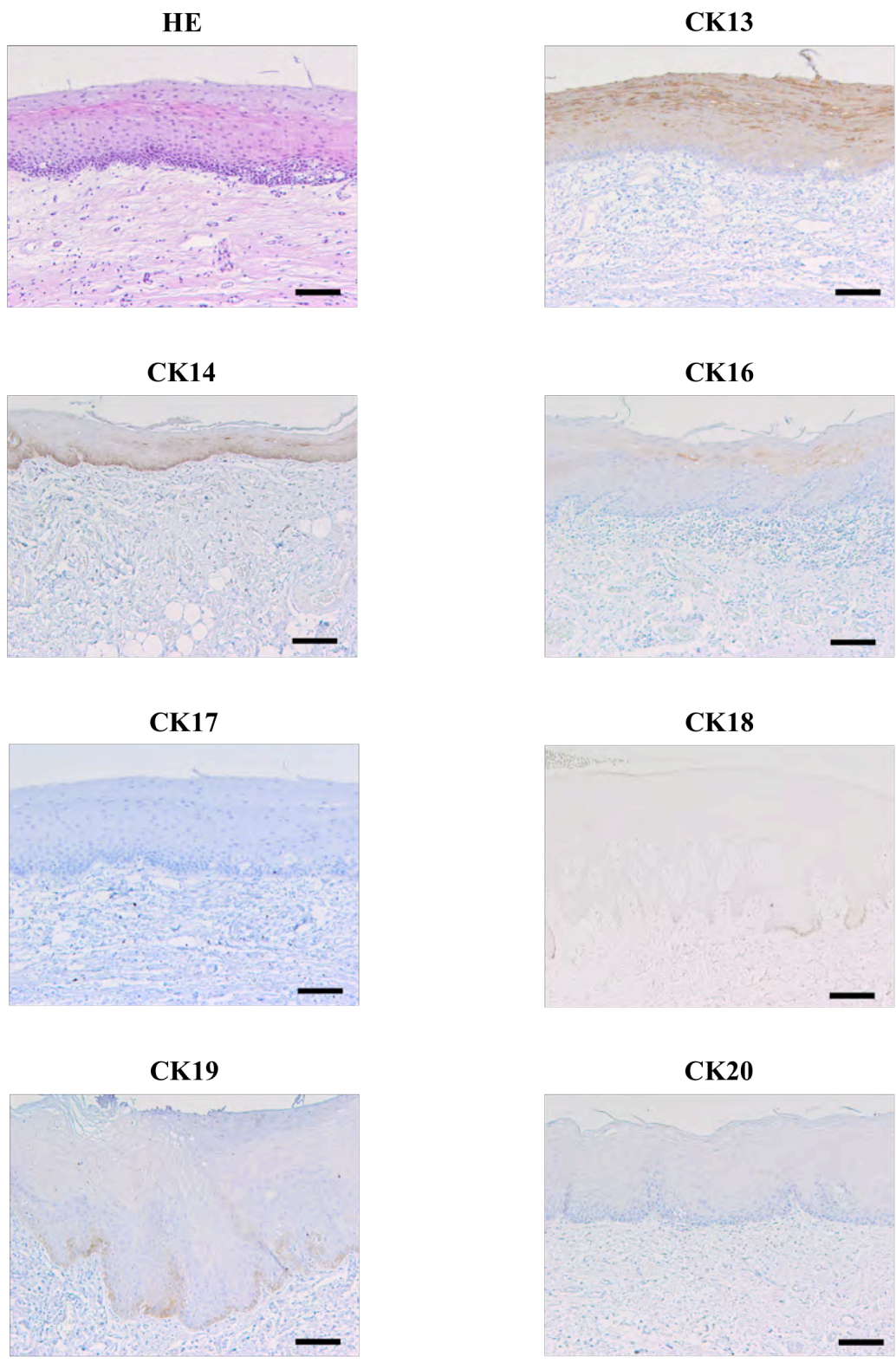


図2 NOEにおける7種類のCKの発現
 NOEにおいてCK17の発現はみられなかった。CK13、CK16は有棘層において発現を認めた。CK14やCK18、CK19は基底層において発現を認めた。CK20の発現はみられなかった。(scale bars: 100 μ m)

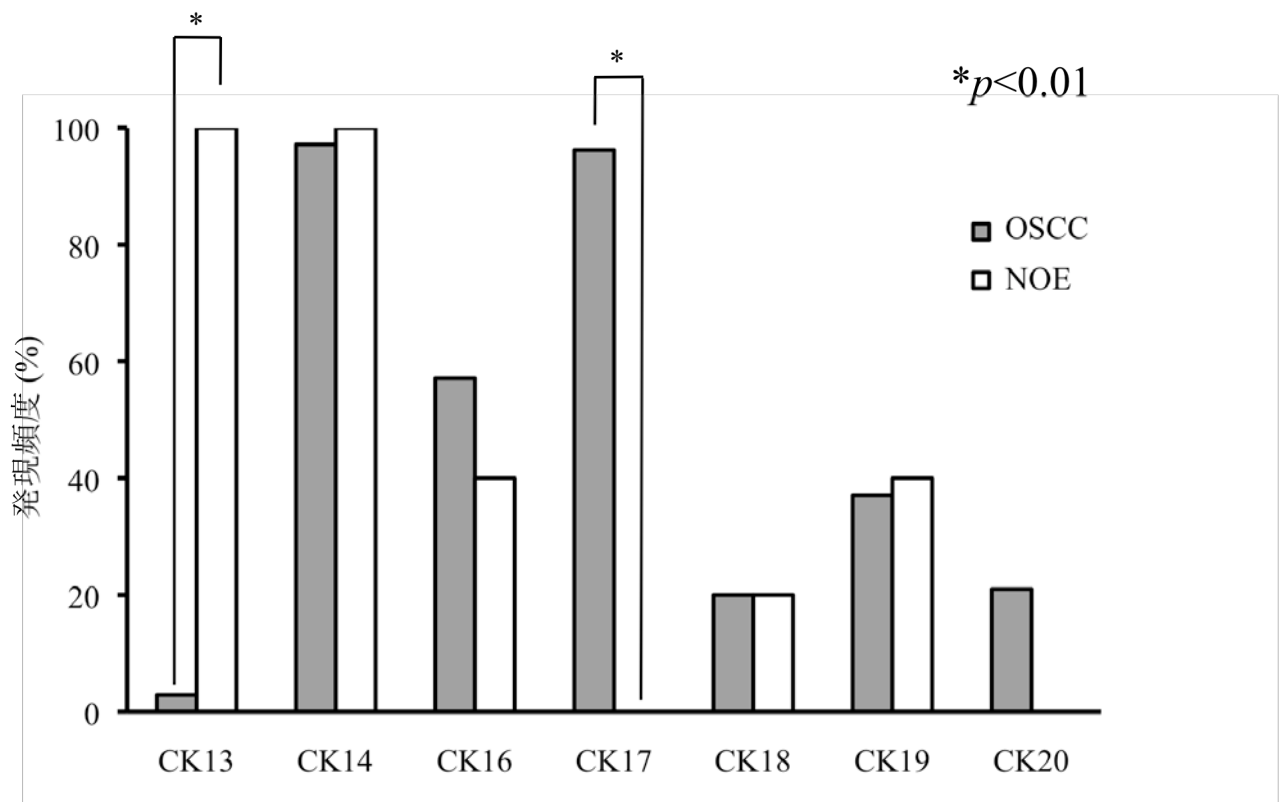


図3 OSCC と NOE における CK の発現頻度の比較

CK17 は NOE と比較して、OSCC において有意に発現頻度が高かった。また、CK13 は OSCC と比較して、NOE において発現頻度が有意に高かった。その他の CK には OSCC と NOE における発現頻度間に有意な差は認めなかった。統計処理には χ^2 検定を用いた。

I -2. OSCC における CK17 の発現様式と臨床病理学的所見との比較

分化度に着目すると、CK17 は高分化型 OSCC において癌巣の内側に発現を認め、最外層には発現がみられなかった (図 4; d)。また、中分化型 OSCC においては全体的に発現を認めたが、高分化型 OSCC と比較すると弱い発現であった (図 4; e)。低分化型 OSCC では一部の OSCC 細胞に発現を認めるのみで、CK17 の発現はほとんどみられなかった (図 4; f)。

さらに、CK17 の高発現症例に着目すると、中分化型 OSCC や低分化型 OSCC において 1/33 例 (3.0%) のみ CK17 の高発現を認めたのに対し、高分化型 OSCC においては 23/73 例 (31.5%) と有意に CK17 の高発現を認めた (表 4; χ^2 検定、 $p < 0.01$)。また、他の臨床病理学的所見との間には有意な発現はみられなかった。図 5 に中分化型 OSCC の代表的症例を示すが、CK17 は NOE において発現がみられず、dysplasia において発現を認めた (図 5; B、d)。また、癌巣では最外層には発現がみられなかったが、内側の OSCC 細胞において発現を認め、(図 5; e)。さらに腫瘍の浸潤先端部に散在する OSCC 細胞には発現がみられなかった (図 5; f)。

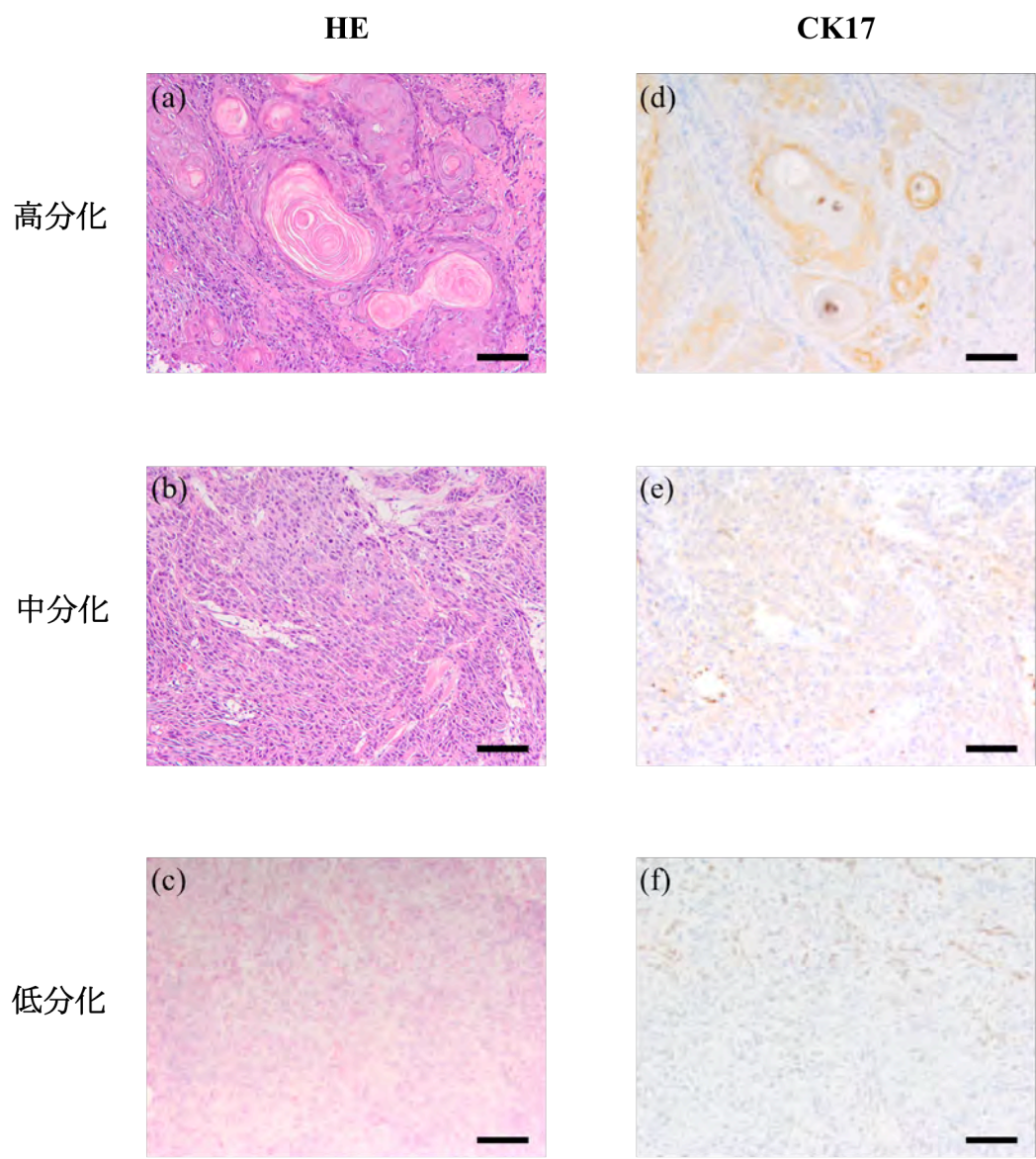


図4 CK17を発現するOSCCの代表的症例
 高分化型OSCCにおいてCK17は癌巣の内側に発現を認めた(d)。中分化型OSCCにおいてCK17は全体的に発現を認めたが、高分化型OSCCと比較すると弱かった(e)。低分化型OSCCでは、CK17は一部のOSCC細胞に発現を認めるのみであった(f)。(scale bars: 100 μ m)

表4 OSCCにおけるCK17の発現と臨床病理組織学的所見との関連

項目	分類	症例数 ^b	OSCCにおけるCK17の発現頻度 ^a				有意差 ^c
			-	+	++	+++	
性別	男	53	2	11	26	13	N.S.
	女	52	2	11	29	11	
年齢	65>	61	1	14	30	16	N.S.
	65<	44	3	8	25	8	
分化度 ^d	高分化	72	4	10	35	23	<i>p</i> <0.01
	中分化	33	0	12	20	1	
	+ 低分化						
T	1	41	4	10	21	6	N.S.
	2	47	0	7	26	14	
	3	3	0	2	1	0	
	4	14	0	3	7	4	
N	あり	20	0	4	10	6	N.S.
	なし	85	4	18	45	18	
腫瘍浸潤様式 ^e	1	9	2	1	5	1	N.S.
	2	21	1	4	11	5	
	3	48	1	7	28	13	
	4C	19	0	6	9	4	
	4D	7	0	4	2	1	
ステージ分類 ^f	I	42	4	10	21	7	N.S.
	II	33	0	4	19	10	
	III	8	0	4	3	1	
	IV	22	0	4	12	6	
部位	舌	63	3	15	31	14	N.S.
	歯肉	23	0	3	11	9	
	頬粘膜	8	0	2	6	0	
	口底	7	1	2	3	1	
	口蓋	4	0	0	4	0	

^aCK17を免疫組織化学的に検索した。発現頻度の評価方法は「材料と方法」に示している。

^b症例数を示す。

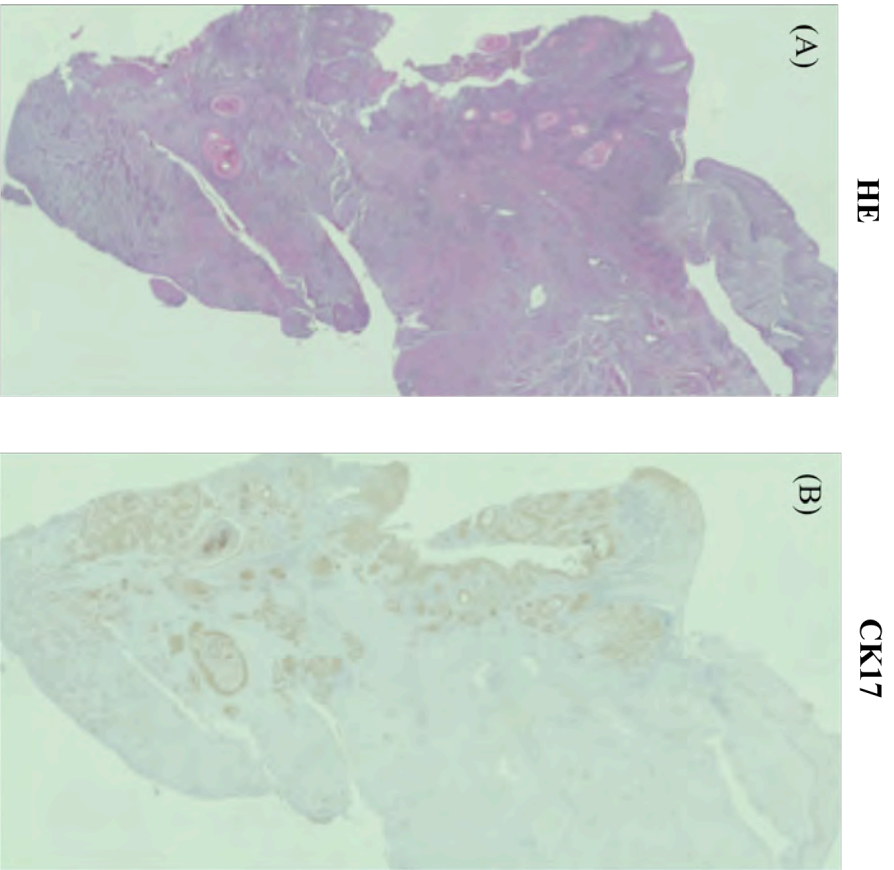
^c χ^2 検定を行った。

^d分化度はWHO分類による。

^e腫瘍浸潤様式は山本・小濱分類による。

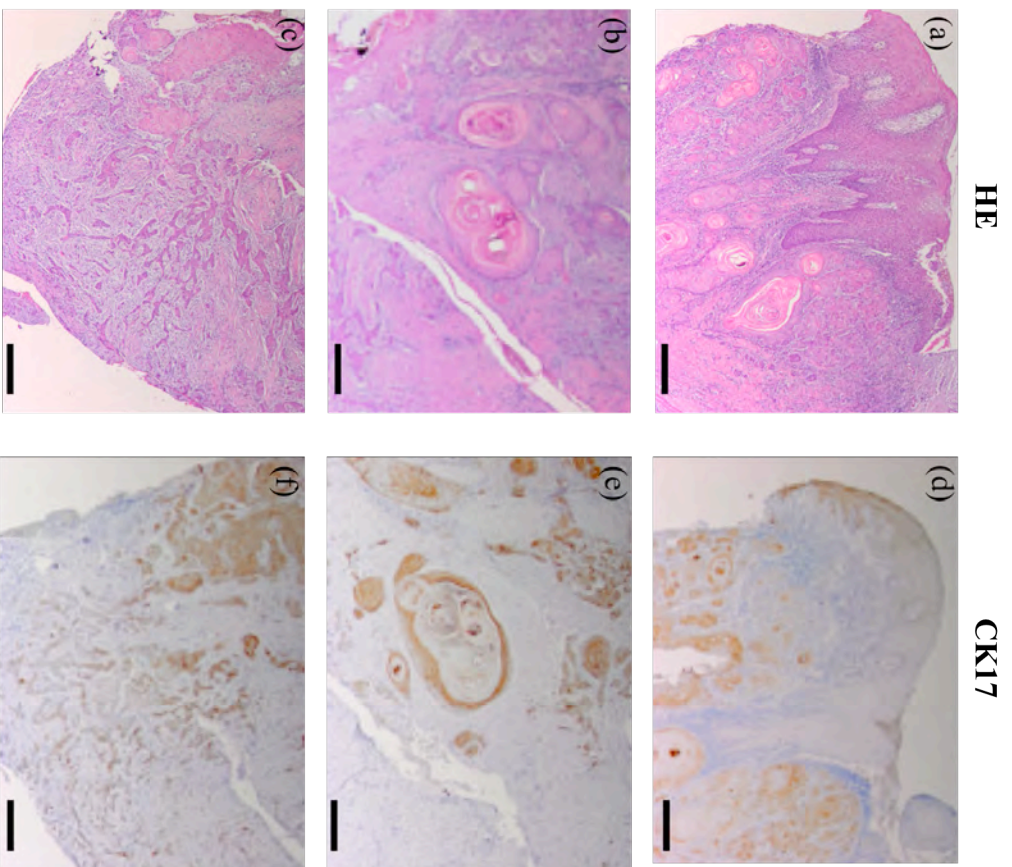
^fステージ分類はWHO分類による。

N.S.: not significant



HE

CK17



HE

CK17

図5 CK17を発現する中分化型OSCCの代表的症例
 生検組織の弱拡大像を示す(A、B)。NOEにおいてCK17の発現はみられず(B)、dysplasiaにおいて発現を認めた(d)。癌
 胞巣においては最外層では発現はみられず、内側においてのみ発現を認めた(e)。癌胞巣を形成しない低分化OSCC細胞
 においてはCK17の発現はみられなかった(f)。(scale bars: 200 μm)

I-3. 白板症における CK17 および CK13 の発現様式の比較

次に、OSCC にて対称的であった CK17 および CK13 の発現を、白板症において免疫組織化学的に検索した (図 6)。

白板症において、CK17 と CK13 はともに上皮の有棘層および顆粒層に発現を認めた。白板症全体における CK17 の発現頻度は 55/108 例 (50.9%)、CK13 の発現頻度は 63/108 例 (58.3%) であった。dysplasia と hyperplasia の境界に注目すると、同一症例の連続切片にて、dysplasia の部分において CK17 の強い発現を認めたが (図 7; a)、その一方で hyperplasia の部分において CK13 の強い発現を認め (図 7; b)、dysplasia の有無により CK17 と CK13 の発現が反転していた (図 7)。

そこで、CK17 の発現頻度を dysplasia の有無で分類すると、hyperplasia 症例において 36/74 例 (48.6%) で発現を認めたのに対して、dysplasia 症例においては 19/34 例 (55.9%) で発現を認めた。さらに、CK17 の高発現症例に着目すると、hyperplasia 症例において 3/74 例 (4.0%) のみ CK17 の高発現を認めたのに対して、dysplasia 症例においては 8/34 例 (23.5%) と有意に CK17 の高発現を認めた (表 5; χ^2 検定、 $p<0.01$)。

また、CK13 の発現頻度を dysplasia の有無で分類すると、hyperplasia 症例において 52/74 例 (70.3%) で発現を認めたのに対して、dysplasia 症例においては 11/34 例 (32.4%) で発現を認めた。また、CK13 の高発現症例に着目すると、hyperplasia 症例において 23/74 例 (31.3%) と有意に CK13 の高発現を認めたのに対して、dysplasia 症例において CK13 の高発現はみられなかった (表 5; χ^2 検定、 $p<0.01$)。

また、CK17 が高発現し CK13 が低発現している 11 症例の中で 8/11 例が

dysplasia 症例であり、CK17 が低発現し CK13 が高発現している 23 症例は全て hyperplasia 症例であった (表 6; χ^2 検定、 $p < 0.01$)。

NOE において CK17 の発現頻度は 0/10 (0%) であり、CK13 の発現頻度は 10/10 (100%) であった。hyperplasia 症例において CK17 の発現頻度は 35/74 (48.6%) であり、CK13 の発現頻度は 52/74 (70.3%) であった。dysplasia 症例において CK17 の発現頻度は 18/34 (54.5%) であり、CK13 の発現頻度は 11/34 (32.4%) であった。OSCC において CK17 の発現頻度は 102/105 (96.2%) であり、CK13 の発現頻度は 3/105 (2.9%) であった。NOE から OSCC へと悪性度の高い組織になるにつれて、CK17 は発現頻度が増加し、CK13 は発現頻度が減少した。(図 8)。

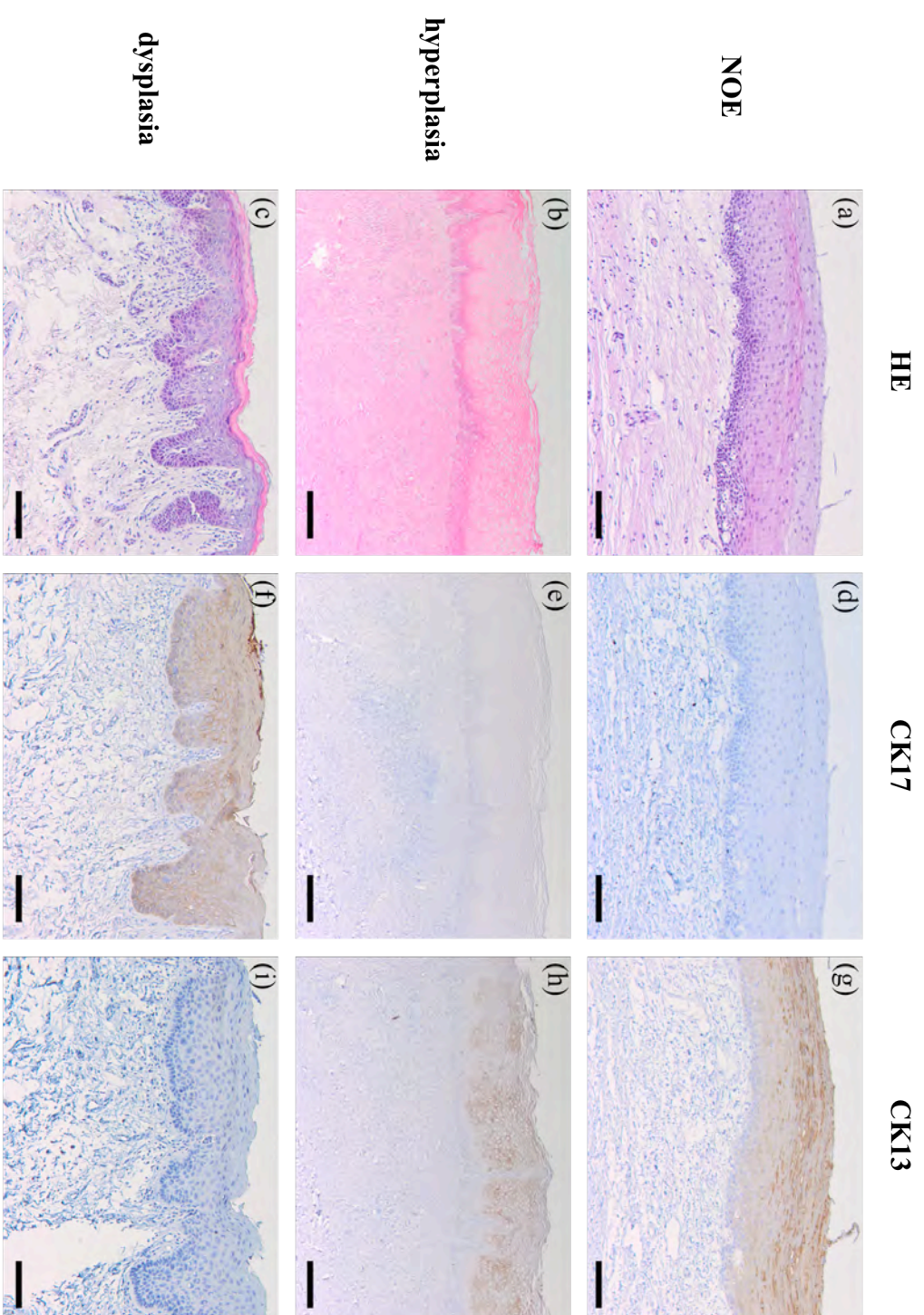


図 6 NOEと白板症における CK17 と CK13 の発現
 CK17 は NOE および hyperplasia 症例において発現がみられなかったが (d, e)、dysplasia 症例において発現を認め
 た (f)。一方、CK13 は NOE および hyperplasia 症例において発現を認めたが (g, h)、dysplasia 症例において発現が
 みられなかった (i)。(scale bars: 100 μm)

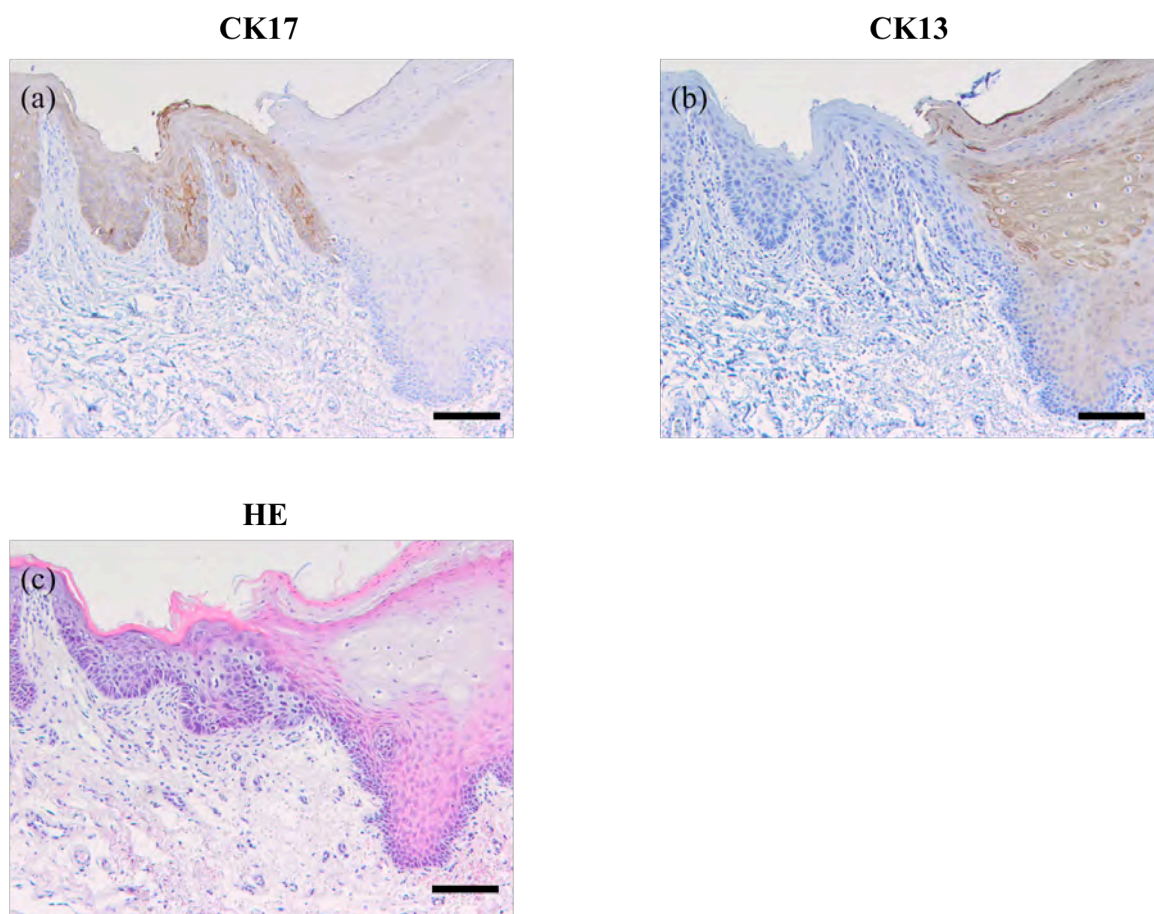


図7 dysplasiaの境界におけるCK17とCK13の発現
CK17はdysplasiaの部分における発現を認め(a)、一方CK13はhyperplasiaの部分
における発現を認めた(b)。CK17とCK13との発現により明らかな境界が確認で
きる。(scale bars: 100 μ m)

表 5 口腔白板症におけるCK17およびCK13の発現と臨床病理組織学的所見との関連

項目	分類	症例数 ^b	CK17の発現頻度 ^a					有意差 ^c	CK13の発現頻度 ^a					有意差 ^c
			-	+	++	+++	-		+	++	+++			
性別	男	68	37	4	17	10	N.S.	30	18	6	14	N.S.		
	女	40	16	3	20	1		15	9	7	9			
年齢	65>	51	24	5	18	4	N.S.	24	10	7	10			
	65<	57	29	2	19	7		21	17	6	13			
dysplasia の程度 ^d	hyperplasia	74	38	7	26	3	$p<0.01$	22	19	10	23			
	mild	20	9	0	7	4		14	6	0	0			
	moderate	8	2	0	3	3		4	2	2	0			
部位	severe	6	4	0	1	1	$p<0.01$	5	0	1	0			
	歯肉	45	28	3	14	0		19	10	6	10			
	舌	44	20	2	12	10		17	12	5	10			
	口蓋	10	1	1	8	0		3	3	2	2			
	頬粘膜	7	4	0	2	1		4	2	0	1			
口唇	1	0	0	1	0	N.S.	1	0	0	0				
口底	1	0	1	0	0		1	0	0	0				

^a CK17を免疫組織化学的に検索した。検索方法は「材料と方法」に示す。

^b 症例数を示す。

^c χ^2 検定を行った。

^d 異型の程度はWHO分類による。

N.S.: not significant

表 6 dysplasia の有無による CK17 および CK13 の発現の相関

	dysplasia ^a	hyperplasia	合計	有意差 ^b
CK17 高発現 ^c / CK13 低発現	8	3	11	
CK17 低発現 / CK13 高発現	0	23	23	$p < 0.01$

^a 異型の程度は WHO 分類による。

^b χ^2 検定を行った。

^c CK17 と CK13 を免疫組織化学的に検索した。発現頻度の評価方法は「材料と方法」に示している。

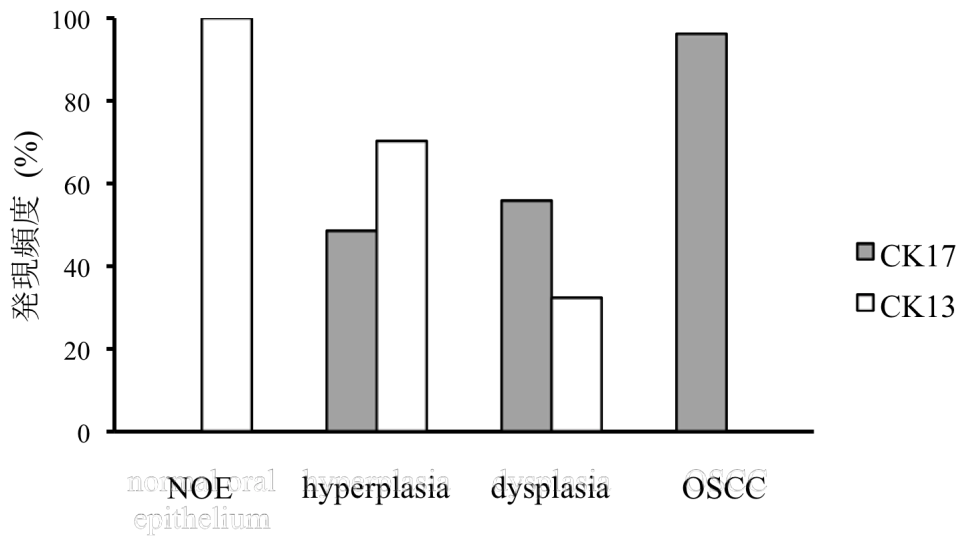


図 8 NOE や白板症、OSCC における CK17 と CK13 の発現頻度
 CK17 は NOE において発現がみられず、悪性度が上がると発現頻度は増加した。
 CK13 の発現頻度は NOE において最も高く、悪性度が上がると発現頻度は減少した。