原 著

口腔白板症における WHO の上皮性異形成診断基準と TGF- α および p53 蛋白の発現との関連

中 村 雅 子 油 井 久 美 恵 山 口 真 吾
岩 瀬 正 泰 角 田 左 武 郎 南 雲 正 男

抄録 : 上皮性異形成を有する口腔白板症で認められる上皮の変化と TGF- α および p53 蛋白の発現との関連を検討した。このため、上皮性異形成を示す口腔白板症 48 例について連続切片を作成し、TGF- α および p53 蛋白の発現について免疫染色を施行した。そして、WHO の上皮性異形成診断基準と TGF- α および p53 蛋白の発現との関連を検討した。

その結果、TGF- α および p53 蛋白の発現は、上皮性異形成の診断基準項目が多い症例ほど強くなっており、TGF- α 高発現症例に診断基準項目 3, 4, 5, 6, 7 が、また p53 高発現症例で項目 3, 4, 6, 7 が低発現症例と比較して多くみられた。これらの項目はいずれも細胞分裂あるいは増殖と関連すると考えられることから、TGF- α および p53 蛋白が上皮細胞の増殖に何らかの役割を演じている可能性が示唆された。

キーワード : 口腔白板症, 上皮性異形成, TGF- α , p53 蛋白

緒 言

上皮組織が悪性化する過程において、上皮細胞の増殖制御機構に何らかの変化が生じていると推測されるが、いまだ不明な点が多い。口腔白板症は重要な前癌病変の 1 つで種々の検索がなされているが、この点について検討した報告は少ないようである。

一方近年、ケラチノサイトが産生する TGF- α が、EGF レセプターを介してオートクリンにトランスフォームした細胞の自律的増殖能の獲得に関与していることが示唆されている¹⁾。また、癌抑制遺伝子である p53 遺伝子は、p21 を介して細胞周期の制御を行っており、変異によってこの制御機構が破綻し、細胞増殖の抑制が行われなくなると考えられている^{2,3)}。そこで著者らは、上皮性異形成を有する口腔白板症で認められる上皮組織の変化と TGF- α および p53 遺伝子産物である p53 蛋白の発現との関連を検討し、若干の知見が得られたので報告する。

材料と方法

1. 対象症例

対象としたのは、1989 年 4 月より 1997 年 3 月までの 8 年間に昭和大学歯科病院第 2 口腔外科を受診し、臨床および病理学的に口腔白板症と診断され、WHO の上皮性異形

成診断基準項目⁴⁾が認められた男性 33 例、女性 15 例の計 48 症例である。発生部位は、舌 26 例、頬粘膜 12 例、歯肉 9 例、口蓋が 1 例であった。年齢分布としては、60 歳代が 20 例と全体の 41.7 % を占めており、平均年齢は 60.3 歳であった (Table 1)。なお、対照として口腔白板症症例の平均年齢とほぼ同年齢者から同意を得て採取した正常上皮、および上皮性異形成のみられなかった口腔白板症症例それぞれ 7 例についても同様の検索を加えた。標本は、10 % 中性緩衝ホルマリン液にて固定後、パラフィン包埋して切片を作成し、免疫組織化学的染色を施行した。

2. 免疫組織化学的染色

ポリ-L-リジンにてコーティングしたスライドガラス上に連続切片 (3~4 μ m) をのせ、脱パラフィン後にストレ

Table 1 Clinical Features of the Subjects

	tongue	gingiva	cheek	palate
Case number	26	9	12	1
Age	Sex			
	Male	Female	Total	
20~	0	2	2	
30~	3	3	6	
40~	1	0	1	
50~	5	2	7	
60~	16	4	20	
70~	8	4	12	
Total	33	15	48	

プトアビジン・ビオチン標識ペルオキシダーゼ (LSAB) 法にて免疫染色を施行した。なお、p53 蛋白については、染色操作の前にマイクロウェーブによる抗原の賦活化を行った。一次抗体として、TGF- α (AB-2/Oncogene 社) および p53 蛋白 (DO-7/Dako 社) マウスモノクロナル抗体を、それぞれ至適濃度に希釈して用いた。

3. 免疫染色の評価

陽性細胞数の算定は、200 倍の光顕下で行った。標本中の上皮細胞と染色陽性細胞数を、それぞれの典型的な組織像を呈する 5 視野について最低でも 1000 個以上カウントした。この際、明瞭に核のみられない上皮細胞は除外し、これらの結果から陽性率 (陽性細胞の比率) を算定した。

4. 統計的評価

Mann-Whitney U test を用い、それぞれのグループ間の有意差を検定した。

結 果

1. WHO の上皮性異形成診断基準項目の出現頻度

今回対象症例とした口腔白板症 48 症例で、WHO の基準 12 項目 (Table 2) のうち 1 項目のみが該当した症例は 4 例、2 項目が 14 例、3 項目が 7 例、4 項目が 10 例、5 項目以上が該当した症例は 13 例であった。WHO の基準 12 項目のうち、該当項目数の多少に関係なく、全体の 64.6 % の症例に項目 2 の「一層以上の基底細胞様外観を有する細胞の存在」が、また全体の 58.3 % の症例に項目 8 の「細胞の多形性」が認められた。さらに、項目 1 の「基底細胞層の極性の消失」が 47.9 % に、項目 11 の「細胞間接着の減退」が 43.8 % にみられた (Fig. 1)。

2. 免疫組織化学的染色所見

TGF- α および p53 蛋白の発現状況および局在については既報⁵⁻⁷⁾と同様であった。すなわち、TGF- α は正常粘膜上皮においてほとんど染色されなかったが、口腔白板症では基底細胞直上の細胞を中心に細胞質がび漫性に染色されていた。一方、p53 蛋白については、正常粘膜上皮および口腔白板症ともに陽性細胞がみられ、細胞の核が染色されており、いずれも基底細胞を中心に分布していた。なお、口腔白板症における TGF- α および p53 蛋白は、上皮性異形成の基準項目数が多い症例ほどより上皮上層の細胞に発現が認められる傾向がみられた。

Table 2 EPITHELIAL DYSPLASIA (WHO, 1978)

1. Loss of polarity of the basal cells.
2. The presence of more than one layer of cells having a basaloid appearance.
3. An increased nuclear-cytoplasmic ratio.
4. Drop-shaped rete processes.
5. Irregular epithelial stratification.
6. Increased number of mitotic figures.
(A few abnormal mitoses may be present.)
7. The presence of mitotic figures in the superficial half of the epithelium.
8. Cellular pleomorphism.
9. Nuclear hyperchromatism.
10. Enlarged nucleoli.
11. Reduction of cellular cohesion.
12. Keratinization of single cells or cell groups in the spinous cell layer.

Fig. 1 Positive case rate for WHO's items in oral leukoplakias with epithelial dysplasia

Fig. 2 Expression of TGF- α and p53 protein in oral leukoplakias

■: normal epithelium, ▨: without epithelial dysplasia, ▩: one item, |||: two items, ||||: three items, |||||: four items, □: over five items. Data are expressed as Mean $\pm$ S.E.

*Significantly different ($p < 0.01$) versus leukoplakia without epithelial dysplasia.

3. 上皮性異形成の程度と TGF- α 、p53 蛋白の陽性率との関係

WHO の上皮性異形成の診断基準項目数と TGF- α 、p53 蛋白の陽性率との関係を検討した。その結果、TGF- α 陽性率は、正常粘膜上皮において 0.6%，上皮性異形成みられない口腔白板症症例で 6.4%，1 項目が該当する症例で 7.4%，2 項目で 13.6%，3 項目で 18.5%，4 項目で 18.9%，そして 5 項目以上該当する症例で 24.5%であった。また、p53 蛋白陽性率は、正常粘膜上皮においては 1.1%，上皮性異形成みられないものでは 2.1%，以下 1 項目該当する症例で 13.6%，2 項目で 11.5%，3 項目で 12.8%，4 項目で 14.4%，5 項目以上該当する症例で 25.1%であった。陽性率は、上皮性異形成のない白板症と比較すると、TGF- α では 3 項目以上該当する症例で、p53 蛋白では 1 項目以上該当する白板症症例で有意に高値を示していた (Fig. 2)。

4. WHO 基準項目と TGF- α および p53 蛋白陽性例の比率

まず、TGF- α および p53 蛋白それぞれについて、口腔白板症症例の陽性率に順位を付けたところ、中位にあたる症例の陽性率が TGF- α 、p53 蛋白ともほぼ 15%であったことから、陽性率 15%未満を低発現症例群、15%以上の症例を高発現症例群と定義した。そして、診断基準の項目ごとに該当した症例のそれぞれ 2 群の症例に対する比率を求めた。なお、TGF- α の高発現症例は 23 例、低発現症例群は 25 例で、p53 蛋白の高発現症例は 26 例、低発現症例は 22 例であった。

その結果、TGF- α においては、項目 3 の「核・細胞質比の増大」、項目 4 の「滴状型の上皮脚」、項目 5 の「上皮の不規則な重層」、項目 6 の「有糸分裂像の増数」、および項目 7 の「上皮層の上半部における有糸分裂像の存在」で低発現症例と比較して高発現症例群において該当症例がより高率に認められた (Fig. 3)。

p53 蛋白においては、項目 3、4、6、および 7 で低発現症例群と比較して高発現症例群により高率に該当症例が認められた (Fig. 4)。

考 察

口腔白板症は、口腔粘膜疾患のうち頻度が高い疾患である。口腔白板症は前癌病変として知られ、悪性化の頻度は 5~10%であると報告されており⁸⁻¹⁰⁾、悪性化は上皮性異形成が高度なものほど起きやすいといわれている¹¹⁾。従って、口腔白板症における悪性化潜在能を判断する指標の 1 つとして、上皮性異形成を検討することは重要である。

一方、粘膜上皮が悪性化する過程において、種々の遺伝子変異が生じることが認められている¹²⁾。変異が報告されている p53 は、その変異が口腔癌発生過程の比較的早期に生じると考えられており^{13,14)}、さらにアポトーシスなどから逃れた変異細胞は、TGF- α 等の成長因子の過剰発現により、オートクリンに自律的増殖能を獲得するとの説が支持されている¹⁾。そこで TGF- α および p53 蛋白の発現と上皮性異形成との関連を検討した。

まず、病理組織学的に上皮性異形成の判定として最も多く用いられている WHO の上皮性異形成の診断基準の各項

Fig. 3 Positive case rate for WHO's items in high and low expression cases of TGF- α
 ■ : less than 15 % positivity, □ : more than 15 % positivity

Fig. 4 Positive case rate for WHO's items in high and low expression cases of p53 protein
 ■ : less than 15 % positivity, □ : more than 15 % positivity

目の出現頻度を検討した。WHOの基準に関しては1997年に改訂され、1項目追加となつて13項目として新しい基準¹⁵⁾となっているが、これまでの報告と比較するために、今回は1978年に出された基準を用いた。その結果、48例中31例(64.6%)に、項目2の「一層以上の基底細胞様外観を有する細胞の存在」が、また、28例(58.3%)に項目8の「細胞の多形性」が認められ、上皮性異形成を伴う白板症組織に高頻度にみられるとされる項目2が今回の症例においても多くみられた。

次に、WHOの基準項目数とTGF- α およびp53蛋白の陽性率との関係を検討したところ、上皮性異形成の基準項

目が多くみられる症例ほどTGF- α およびp53蛋白の陽性率が高くなっており、上皮性異形成を示さない症例と比較してTGF- α では基準項目の3項目以上を示す症例で、p53蛋白では1項目以上該当する症例で有意に陽性率が高くなっていた。この結果は、著者ら⁵⁻⁷⁾がすでに報告した結果とほぼ同じであった。すなわち、既報では同じWHOの診断基準を用いてBanoczyらに従って軽度、中等度、高度に分類したが、TGF- α 、p53蛋白はともに上皮性異形成が高くなるほど(すなわち基準項目の項目数が多いほど)陽性率は高くなっていた。なお、p53蛋白の発現については、TGF- α より少ない項目数で有意に陽性率が高く、

上皮性異形成が時間の経過とともに高度になるという報告¹⁶⁾が正しければ、p53 遺伝子の変異はやはり比較的早い段階で起きていることになる。

以上のことから、TGF- α および p53 蛋白が上皮性異形成と関連していることが示唆されたが、それぞれが上皮性異形成のどの項目と関連しているかは明らかではない。そこで、各項目ごとにその項目が認められる症例の比率を算定して、TGF- α 、p53 蛋白と各項目との関連性を検討した。この際、TGF- α 、p53 蛋白ともそれぞれの陽性率が分散していたため、中位の陽性率であった 15 % 以上を高発現症例、15 % 未満を低発現症例と定義して関連性を検討した。その結果、TGF- α を高発現していた症例においては、項目 3 の「核・細胞質比の増大」、項目 4 の「滴状型の上皮脚」、項目 5 の「上皮の不規則な重層」、項目 6 の「有糸分裂像の増数」、項目 7 の「上皮層の上半部における有糸分裂像の存在」が低発現症例と比較して多く認められた。一方、p53 蛋白高発現症例では、項目 3、4、6、および 7 が低発現症例と比較して多くみられた。これらの項目は、先に述べた上皮性異形成のある口腔白板症で高頻度にみられる項目でないことから、その特異性が示唆される。従って、TGF- α 、p53 蛋白のいずれもが、細胞の分裂あるいは増殖と関係する項目と関連していることが推測される。

嶋田ら¹⁷⁾は、癌化症例には項目 3、4、5、8、9 が多かったと報告しており、桐田ら¹⁸⁾は、上皮性異形成が強くなるほど変化が著しい項目として項目 1、2、3、4、6、12 の 6 項目を挙げている。また山本ら¹⁹⁾は、種々の文献的考察をもとに項目 1、2、4、5 などの基底細胞層および上皮の下層における変化が重要で、さらに項目 6、8、12 などの個々の細胞の異常が加わった病変にはより悪性化潜在能が高くなるとした見解を示している。今回の検討で TGF- α および p53 蛋白高発現を示す症例では、上皮性異形成診断基準項目 3、4、5、6 などがみられるものが多かった。これらの項目はいずれも前述のようにこれまで癌化と関連しているとされる項目に含まれており、これら上皮の変化が TGF- α 、p53 蛋白と関連して生じていること、さらに癌化の過程に TGF- α 、p53 蛋白が関与していることが推測される。

結 語

上皮性異形成の認められた口腔白板症 48 症例を対象に、WHO の診断基準項目を用いて上皮性異形成と TGF- α および p53 蛋白の発現との関連を検討し、以下の結果を得た。

1. 上皮性異形成のみられた口腔白板症では、項目 2 の「一層以上の基底細胞様外観を有する細胞の存在」が全体

の 64.6 % に、および項目 8 の「細胞の多形性」が全体の 58.3 % にみられた。

2. WHO の上皮性異形成の診断基準 12 項目のうち、TGF- α 高発現を示した症例に低発現症例と比較して多く認められる項目は、項目 3 の「核・細胞質比の増大」、項目 4 の「滴状型の上皮脚」、項目 5 の「上皮の不規則な重層」、項目 6 の「有糸分裂像の増数」、および項目 7 の「上皮層の上半部における有糸分裂像の存在」であった。

3. p53 蛋白高発現症例では、項目 3、4、6、および 7 が低発現症例と比較して多く認められた。

以上の結果から、TGF- α および p53 蛋白の発現が口腔白板症において上皮細胞の分裂・増殖と関連していることが示唆された。

文 献

- 1) Sporn MB and Todaro GJ: Autocrine secretion and malignant transformation. *New Engl J Med* 303 : 878-880, 1980.
- 2) EL-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al: WAF1/Cipl is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54 : 1169-1174, 1990.
- 3) Miller J and Cook A: p53 transformed cells. *EMBO J* 9 : 2885-2889, 1990.
- 4) WHO collaboration centre for oral precancerous lesions: Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg* 46 : 518-539, 1978.
- 5) Nakamura M: Changes in the expression of transforming growth factor α and Lewis^x antigen with the malignant transformation of oral leukoplakia into squamous cell carcinoma. *J Showa Univ Dent Soc* 15 : 303-310, 1995.
- 6) Nakamura M, Kanemoto K, Yui K, et al: Immunohistochemical study on oral leukoplakia: Correlation of epithelial dysplasia with Le^x antigen and p53 protein. *Dentistry in Japan* 34 : 65-68, 1998.
- 7) 中村雅子, 油井久美恵, 伊東大典, 他: 白板症の免疫組織化学的検討—上皮異形成と TGF- α 発現との関連—. *日口粘膜炎* 2 : 49-53, 1996.
- 8) Bánóczy J and Sugar L: Longitudinal studies on oral leukoplakias. *J Oral Pathol* 1 : 265-272, 1972.
- 9) Pindborg JJ, Renstrup G, Joist O, et al: Studies in oral leukoplakia: A preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *JADA* 76 : 767-771, 1968.
- 10) Silverman S, Gorsky M and Lozada F: Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 53 : 563-568, 1984.
- 11) Bánóczy J, and Csiba A: Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg* 42 : 766-774, 1976.
- 12) Schmandt R and Mills GB: Genomic components of carcinogenesis. *Clin Chem* 39 : 2375-2385, 1993.
- 13) Nishioka H, Hiasa Y, Hayashi I, et al: Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein

- in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinico-pathological findings. *Oncology* 50 : 426-429, 1993.
- 14) Boyle JO, Hakim J, Koch W, et al: The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer. *Cancer Res* 53 : 4477-4480, 1993.
- 15) Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, et al: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Second edition, Springer, Geneva, 1997, pp. 25-26.
- 16) 黒川英雄, 山崎健太郎, 山下善弘, 他: 口腔白板症の臨床病理学的検討. *口科誌* 47 : 61-67, 1998.
- 17) 嶋田 誠, 篠原正徳, 原田 猛, 他: 口腔前癌病変, 前癌状態の悪性化能に関する組織学的検討. *日口外誌* 40 : 107-112, 1994.
- 18) 桐田忠昭, 堀内啓介, 露木基勝, 他: 口腔白板症の臨床病理学的検討—特に悪性化潜在能について—. *日口外誌* 41 : 26-35, 1995.
- 19) 山本一彦, 桐田忠昭, 杉村正仁: 口腔白板症—特に悪性化潜在能についての最新の研究—. *日口粘膜誌* 2 : 1-21, 1996.

別刷請求先: 中村雅子 〒145-8515 東京都大田区北千束 2-1-1
昭和大学歯科病院・第2口腔外科

Correlation of WHO's Criteria for Epithelial Dysplasia with TGF- α and p53 Protein in Oral Leukoplakia

Masako NAKAMURA, Kumie YUI, Shingo YAMAGUCHI,
Masayasu IWASE, Saburo KAKUTA and Masao NAGUMO

*Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Showa University
(Chief : Prof. Masao NAGUMO)*

J. Jpn. Oral Muco. Membr. 4 : 115~121, 1998

Abstract : The correlation of epithelial dysplasia with the expression of TGF- α and p53 protein was studied in oral leukoplakia with epithelial dysplasia. For this purpose, TGF- α and p53 protein were examined immunohistochemically in 48 cases of oral leukoplakia. Then the correlation of WHO's items for epithelial dysplasia with the expression of TGF- α and p53 protein was evaluated.

The results revealed that the expression of TGF- α and p53 protein became strong with increasing number of WHO's items. In the case with high positivity of TGF- α and p53 protein, the WHO's items 3, 4, 5, 6 and 7 and the WHO's items 3, 4, 6 and 7 were observed more frequency than in the cases with low positivity of TGF- α and p53 protein, respectively. These results suggest that of TGF- α and p53 protein may play a role in proliferation of epithelial cells, because these items are thought to be related to cell division or proliferation.

Key words : oral leukoplakia, epithelial dysplasia, TGF- α , p53 protein

Reprint requests to Masako NAKAMURA, The Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Showa University, 2-1-1, Kitasezoku Ota-ku Tokyo 145-8515, Japan.

[Received October 5, 1998 : Accepted November 10, 1998]