原 著

口腔扁平苔癬の細胞増殖とアポトーシスに関する 病理組織学的検討

新 谷 悟 富 沢 洪 基 三 原 真 理 子
中 原 裕 二 寺 門 永 顕 吉 浜 泰 斗
竹 下 信 義 上 山 吉 哉 松 村 智 弘

抄録: 口腔扁平苔癬 (OLP) は、上皮基底細胞の障害による慢性炎症性疾患である。OLP の上皮基底細胞の障害は、キラー T 細胞による炎症性細胞浸潤の直接的な細胞障害性によると考えられているが、アポトーシスの関与も示唆されている。しかしながら、アポトーシスと OLP の関連についての報告はほとんどない。今回、我々は、OLP 粘膜上皮の細胞増殖能およびアポトーシスについて検討した。OLP 51 症例と健常口腔粘膜 12 例に対し、PCNA およびアポトーシス関連蛋白である Fas ならびに Bcl-2 の免疫組織化学的検討を行った。また、アポトーシスによる DNA 断片化の検索は TUNEL 法により行った。

Bcl-2 蛋白に関しては、上皮に発現を認めなかった。Fas 蛋白に関しては、正常粘膜で発現を認めず、OLP 上皮で、有棘細胞層から顆粒層に発現を認めた。TUNEL 陽性細胞は、正常上皮の基底細胞層ではその発現を認めなかったが、OLP 上皮では、基底細胞層に散在性に陽性細胞を認めた。このことから、OLP 粘膜上皮での上皮融解にアポトーシスの誘導が関与していることが示唆された。

キーワード: 口腔扁平苔癬, アポトーシス, 細胞増殖, Fas, Bcl-2

緒 言

口腔扁平苔癬 (OLP) は、基底膜直下の粘膜固有層の帯状の炎症性細胞浸潤、上皮層の過角化または過錯角化、上皮突起の延長、基底膜の破壊と基底細胞層の融解を特徴とする疾患である。現在まで、OLP の病因についてはほとんどわかっていないが、基底膜下の炎症性細胞浸潤が特徴的であり、この浸潤細胞が T 細胞であることから、細胞性免疫の異常が何らかの関与をしているであろうとされている^{1,2)}。OLP の病態で特徴的なのは、上皮融解と角化亢進による上皮肥厚が隣接して同一病変内に存在することである。

このうち上皮融解に関しては、粘膜下浸潤 T 細胞中の CD4+ 細胞 (Helper/inducer T cell) と CD8+ 細胞 (Killer/suppressor T cell) の比において CD8+ 細胞が組織障害の程度の強い部分で多くなることが報告されており^{3,4)}、T 細胞のキラー活性が上皮細胞の細胞障害をもたらしていると考えられる。しかし一方で、皮膚の扁平苔癬や多形性紅斑などの皮膚病変の細胞融解が生じている上皮角化細胞において、Fas の発現が増強しているとの報告

は⁵⁾、Fas を介したアポトーシスの誘導が、OLP の上皮融解に関与している可能性を示唆させる。

OLP の上皮におけるアポトーシスに関しての報告は少なく⁶⁾、その意義は明らかではない。一方、上皮肥厚部において、細胞増殖活性が上昇していることが報告されており⁷⁾、上皮融解と角化亢進という一見、正反対の変化が同一病変にごく近接して存在する本病変の理解には、細胞増殖と細胞死の両面からの検討が必要と考える。そこで今回我々は、OLP 粘膜上皮の細胞増殖能およびアポトーシスについて検討し、併せてアポトーシス関連蛋白である Fas ならびに Bcl-2 の発現に関して若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

1. 対象

対象は、病理組織学的に OLP と診断された 51 症例 (男性 19 例, 女性 32 例) の生検材料と健常口腔上皮 12 例である。なお、健常口腔粘膜上皮は、口腔粘膜疾患を有しない患者に本研究の目的と内容を説明し、同意を得て採取を行った。OLP の診断は WHO の診断基準⁸⁾に基づき 1) 粘膜固有層上部に局限した帯状のリンパ球浸潤像, 2) 基底細胞の水腫様変性, 3) 上皮細胞の錯角化あるいは正角

Fig. 1 Immunostaining for Bcl-2 in OLP epithelium. OLP epithelia were negative. The positive findings were observed in the lymphocytes and macrophages of the submucosa. ($\times 100$)

Fig. 2 Immunostaining for Fas in OLP epithelium. Fas-positive cells were observed in the granular and prickle cell layers. ($\times 100$)

Fig. 3 TUNEL findings in normal mucosa and OLP epithelium.

A: A few apoptotic cells were observed in the parakeratosis cell layer in normal mucosa. ($\times 200$)

B: Apoptotic cells were also observed scatterly in the basal cell layer of OLP epithelium. ($\times 200$)

C: Higher magnification of B. Apoptotic cells in the basal cell layer of OLP epithelium. ($\times 400$)

化を有する正常な上皮成熟を必須所見とした。

2. 検索方法

各検体は、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋した後、厚さ $3\mu\text{m}$ の連続切片を作成し、通常のヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色ならびに、免疫組織化学染色、Gavrielli ら⁹⁾ の方法に従い、TUNEL 染色を行った。免疫組織化学染色は、ENVISION システム (Dako 社製) に

より行った。すなわち、通常通り脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻止を行い、一次抗体として抗 PCNA 抗体 (Novocastra Lab. Newcastle, UK.), 抗 bcl-2 抗体 (Dako 社製), 抗 Fas 抗体 (Dako 社製) を 200 倍希釈にて、 4°C で 16 時間反応させた。次に Envision ポリマー試薬を室温で 30 分間反応させ DAB (3-3'-diaminobenzidine $\cdot$ 4HCl) にて発色させ、メチルグリーンにて対比染色後、

脱水、透徹、封入し検鏡した。TUNEL 染色には、Apop Tag Kit (Oncor 社) を用い、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) 反応 (37℃, 60 分) 後、DAB による呈色反応を行った。

光学顕微鏡 200 倍視野で、アポトーシス関連抗原の発現を観察するとともに、3 視野以上の部位において、一定の測定幅を設定し基底細胞から、角化層における 2000 個以上の上皮細胞における TUNEL 陽性細胞ならびに PCNA 陽性細胞の割合 (%) を算定し、TUNEL 標識率 (T.I.) ならびに PCNA 標識率 (P.I.) とした。標識率の差の検定には、Mann-Whitney U 検定を行い、5 % 以下の危険率で有意差有りとした。

結 果

健常口腔粘膜上皮において、Bcl-2 蛋白は、上皮細胞で

Fig. 4 Immunostaining for PCNA in OLP epithelium.

PCNA-positive cells were observed in the basal cell layer in OLP epithelium. ($\times 200$)

は陰性であった。OLP 上皮でも、粘膜固有層のリンパ球やマクロファージの多くに、陽性細胞を認めたが、上皮細胞には陽性所見を認めなかった (Fig. 1)。Fas 抗原に関しては、健常上皮では、基底細胞層で弱陽性所見を認めたのみであったが、OLP 粘膜上皮では、有棘細胞層から角化細胞層の付近において発現を認めた (Fig. 2)。

アポトーシス陽性細胞の局在に関して、健常上皮では、TUNEL 陽性細胞が、錯角化細胞層に局限した形で認められ、基底細胞層や有棘細胞層では局在を認めなかったが、OLP 粘膜上皮では、上皮萎縮部分、上皮肥厚部分の両方で、基底細胞層の付近に TUNEL 陽性細胞を認めた (Fig. 3 A, B, C)。

PCNA 陽性細胞は、健常上皮、OLP 粘膜上皮ともに、基底細胞層 1-2 層にはほぼ局限して散在性に認められたが、上皮肥厚部分では、陽性細胞数も増加し、その局在が、基底細胞層上層にも認められた (Fig. 4)。

上皮の増殖能を示すと考えられる P.I. に関しては、健常上皮において、P.I. が $11.5 \pm 3.4\%$ であったのに比し、OLP では P.I. が $14.7 \pm 5.3\%$ で、やや OLP 上皮における標識率が高値を示したが、有意差は認めなかった (Fig. 5)。TUNEL 陽性細胞に関しては、健常口腔粘膜で T.I. が $0.11 \pm 0.06\%$ であったのに対し、OLP 上皮では T.I. が $0.23 \pm 0.06\%$ ($p < 0.05$) と、やや高値を示した (Fig. 6)。

考 察

OLP とアポトーシスに関しては、DNA 損傷を受けた細胞をアポトーシスに誘導する P53 蛋白の発現が、OLP の上皮細胞において亢進しているとの報告¹⁰⁾ や、皮膚の扁平苔癬や多形性紅斑などの細胞融解が盛んに起こっている

Fig. 5 PCNA Labeling Indices in Normal Oral Epithelium and Oral Lichen Planus.

Fig. 6 TUNEL Indices in Normal Oral Epithelium and Oral Lichen Planus.

部分に近接した上皮細胞でアポトーシス関連細胞膜抗原である Fas 蛋白の発現が増強しているとの報告から¹¹⁾, その関連が強く示唆されている。OLP の粘膜上皮でのアポトーシスの発現に関する報告は少なく⁶⁾, OLP 上皮の病的変化におけるアポトーシスの意義に関しては, 不明な点が多い。正常口腔粘膜上皮においては, アポトーシス細胞の発現は, 角化層に局限して発現することが報告されており¹¹⁾, 基底細胞層において分裂した細胞が, 分化しながら最終的には口腔内へ剥離をしていく過程での最終分化段階で, アポトーシスを生じていると考えられる。本検討でも, 健常口腔粘膜上皮において, TUNEL 陽性細胞は, 角化層に局限して発現を認められ, 井川ら¹¹⁾の報告と同様の所見を示したが, OLP 粘膜上皮では, 角化層での発現とともに, 基底細胞層にも散在性に陽性細胞を認めた。このことは, OLP 粘膜上皮の基底細胞層において, 正常粘膜には見られないアポトーシスが生じていることを示しており, OLP の上皮融解にアポトーシスが関与していることを示す所見と考えられた。Dekker ら⁶⁾の報告においても, 我々の報告と同様に, 健常上皮では, TUNEL 陽性細胞を認めなかったが, OLP 粘膜上皮において, TUNEL 細胞を認め, アポトーシスの上皮融解への関与が疑われるとしており, 上皮融解のすべてがアポトーシスを介しての細胞死とはいえないものの重要な因子の一つであると思われた。

OLP 粘膜上皮の細胞増殖に関しては, OLP の悪性化との関連において, いくつかの報告があり, 粘膜肥厚例や細胞異型の認められたもので, 細胞増殖能が高いようである⁷⁾。OLP の病因の主体は, 基底細胞層における上皮融

解であり, 上皮の角化異常は細胞傷害に対する生体の修復反応として二次的に生じたものと解釈すると¹⁾, 粘膜肥厚部における細胞増殖亢進が, 直接, 悪性化と関連するとは考えにくい。本研究においても, 基底細胞層の TUNEL 陽性細胞の発現は, 角化亢進を伴う上皮肥厚部においても認められ, 生体の修復反応としての二次的細胞増殖と思われる。山本ら⁷⁾も, OLP の細胞増殖能と悪性化に直接的な関連はなく, PCNA 陽性細胞率の上昇を即座に悪性化の指標とみなすことはできないと報告している。OLP からの癌化は 1 % 程度であり, 前癌病変としての位置づけも疑問視されていることから^{12, 13)}, OLP の細胞増殖の増加を悪性化との関連とにおいて論じるには無理があるように思われる。しかしながら, 白板症などの前癌状態では, 細胞増殖の増加とともにアポトーシス細胞の増加を認めるが, 上皮内癌では細胞増殖の増加に対して, アポトーシス細胞が減少するとの報告がなされており¹⁴⁾, アポトーシスと増殖細胞の両面より詳細に評価することで悪性化の指標となり得る可能性については否定できない。

アポトーシス関連抗原である Bcl-2 蛋白に関しては, いくつかの腫瘍組織において, その発現がアポトーシスの抑制に関連していることが示されている^{15, 16)}。すなわち, Bax 蛋白が, ホモ二量体を構成,あるいは Bcl-2 とヘテロ二量体を構成することで, アポトーシスは, 亢進し, Bcl-2 がホモ二量体を構成することで, アポトーシスの誘導を抑制していると考えられているが^{17, 18)}, 今回の検討では健常上皮, OLP 粘膜上皮とも, 上皮細胞においてはその発現を認めなかった。この結果より, OLP においては腫瘍性病変とは異なり, 角化亢進部においても, Bcl-2

蛋白を介したアポトーシスの抑制は生じていないことが示唆された。

Fas 蛋白に関しては、この蛋白が、アポトーシスを媒介する細胞表面蛋白質で TNF/NGF レセプターファミリーの一員であることが知られており、その構造から、未知のサイトカインのレセプターであると考えられている¹⁹⁾。今回の検討で、健常上皮に比して、OLP 粘膜上皮においてはその発現がやや増加している所見を認めた。OLP 粘膜上皮では、熱ショック蛋白が異常に発現し、細胞傷害性 T 細胞による傷害を受けること²⁰⁾、また細胞傷害性 T 細胞あるいは関連免疫細胞の Fas リガンドとの結合がアポトーシスの誘導に重要な役割を果たしていることが明らかにされており^{5,21)}、このような観点からの更なる検討が必要と考えられた。

結 論

OLP 粘膜上皮の細胞増殖能およびアポトーシスについて OLP51 症例と健常口腔粘膜 12 例を対象に検討した。PCNA、Fas ならびに Bcl-2 の免疫組織化学染色と TUNEL 染色による DNA 断片化の検索の結果、Bcl-2 蛋白は、上皮に発現を認めず、Fas 蛋白は、OLP 上皮の有棘細胞層から顆粒層に発現を認めた。TUNEL 陽性細胞は、正常上皮では角化層にのみ認められたのに対し、OLP 上皮では基底細胞層に散在性に陽性細胞を認め、OLP 粘膜上皮での上皮融解にアポトーシスの誘導が関与していることが示唆された。

引用文献

- 1) 藤林孝司：歯科臨床に生かす免疫の意味論—口腔扁平苔癬の免疫—クインテッセンス 15(3)：524-528, 1996.
- 2) 伊藤大典, 南雲正男：口腔扁平苔癬—基礎的研究の進歩. 日口粘膜誌 1：1-16, 1995.
- 3) Matthews JB, Scully CM and Potts AJ: Oral lichen planus: an immuno-peroxidase study using monoclonal antibodies to lymphocyte subsets. Br J Dermatol 3: 587-594, 1984.
- 4) Ishii T: Immunohistochemical demonstration of T cell subsets and accessory cells in oral lichen planus. J Oral Pathol 17: 367-373, 1988.
- 5) Sayama K, Yonehara S, Watanabe Y, et al.: Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and introduction of apoptosis in cultured keratinocytes. J Invest Dermatol 103: 330-334, 1994.
- 6) Dekker NP, Lozada NF, Lauganaur LA, et al.: Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. J Oral Pathol Med 26: 170-175, 1997.
- 7) 山本一彦, 米田和典, 山本哲也, 他：口腔扁平苔癬罹患粘膜上皮の細胞増殖と分化—PCNA とレクチン結合性に関する

組織化学的検討—。日口外誌 41: 976-983, 1995.

- 8) WHO Collaborating centre for oral precancerous lesions. Definition of leukoplakia and related lesions; An aid to studies on oral precancer. Oral Surg 46: 518-539, 1978.
- 9) Gavrielle Y and Sherman Y: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. J Cell Biol 119: 493-501, 1992.
- 10) Girod SC, Kramer C, Knurfermann R, et al.: p53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. J Cell Biol 56: 444-448, 1994.
- 11) 井川淳一, 内田 稔, 筒井健機：ヒト歯肉上皮およびヒト歯肉由来培養ケラチノサイトの細胞死における核の形態学的変化. 日口外誌 43: 383-393, 1997.
- 12) Allen CM: Is lichen planus really premalignant? Oral surg Oral Med Oral Path 85: 347, 1998.
- 13) Silverman Jr. S, Gorky M, Lozada-Nur F, et al.: A prospective follow-up of 570 patients with oral lichen planus; persistence, remission, and malignant association. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 60: 30-34, 1985.
- 14) Birchall MA, Winterford CM, Allan DJ and Harmon BV: Apoptosis in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of the oropharynx and oral cavity; a preliminary study. Oral Oncol, Eur J cancer 31 B: 380-383, 1995.
- 15) Sierra A, Castellsague X, Tortola S, et al.: Apoptosis loss and bcl-2 expression: Key determinants of lymph node metastasis in T1 Breast Cancer. Clin Cancer Res 2: 1887-1894, 1996.
- 16) Gregory YL, Gregory VS, Karpeh MS: Immunohistochemical evaluation of bcl-2 protein expression in gastric adenocarcinomas. Cancer 77: 2209-2213, 1995.
- 17) Yin C, Kundson CM, Korsmeyer SJ and Van Dyke T.: Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis. Nature 385: 1637-1640, 1995.
- 18) Zha H, Amie-Spmpe C, Sato T and Reed JC: Proapoptotic protein bax heterodimerizes with bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. J Biol Chem 271: 7440-7444, 1996.
- 19) Itoh N, Yonehara S, Ishii A, et al.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. Cell 66: 233-243, 1991.
- 20) Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ and Seymour CJ.: Heat shock protein expression in oral lichen planus. J Oral Pathol Med 24: 1-8, 1995.
- 21) 東祐太郎, 木崎治俊：免疫系のアポトーシスの分子機構. 日本臨床 53: 753-760, 1995.

別冊請求先：新谷 悟 〒700-8525 岡山市鹿田町 2-5-1
岡山大学歯学部口腔外科学第二講座

A Histological Study of Cell Proliferation and Apoptosis in Oral Lichen Planus

Satoru SHINTANI, Kohki TOMIZAWA, Mariko MIHARA,
Yuuji NAKAHARA, Nagaaki TERAOKA, Yasuto YOSHIHAMA,
Nobuyoshi TAKESHITA, Yoshiya UYEYAMA and
Tomohiro MATSUMURA

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, Okayama University, Dental School
(Chief: Prof. Tomohiro MATSUMURA)*

J. Jpn. Oral Muco. Membr., 5 : 54~59, 1999

Abstract : Oral Lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory mucocutaneous disease in which basal epithelial cells are damaged. It is generally known that the epithelial damage of OLP occurs due to direct infiltration of killer T-lymphocytes. However, there is a hypothesis that loss of basal cells in OLP is due to apoptosis. There are few reports about the relationship between apoptosis and OLP. The purpose of this study was to investigate the distribution of cell proliferation and apoptosis on the epithelium of OLP. Fifty-one OLP and 12 normal mucosa were evaluated for proliferation cell nuclear antigen (PCNA), apoptosis-related proteins, Fas and Bcl-2, immunohistochemically. Further, sections were evaluated with a TUNEL assay that identify apoptotic DNA fragments. Epithelial cells in normal oral mucosa and OLP mucosa were negative for bcl-2. Fas expressed in the granular and prickle cell layers in OLP epithelium. The positive signs of TUNEL assay appeared to be scatter in the basal cells of OLP mucosa, whereas there were no signs in the same area of normal epithelium. These results suggested that the basal cell destruction with apoptosis occurred in OLP.

Key words : Oral lichen planus, Apoptosis, Cell proliferation, Fas, Bcl-2

Reprint requests to Satoru SHINTANI, Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, Okayama University Dental School, 2-5-1 Sikata, Okayama, 700-8525 Japan.

[Received September 11, 1999 : Accepted November 12, 1999]