ハムスター口腔癌形成過程における免疫組織化学的研究

第1報 頬嚢粘膜癌におけるケラチンの局在について

賀来 亨・中出 修・江戸 稔・館山美樹

奥山富三

Immunohistochemical study on carcinogenesis of the oral mucosa
of the hamster

I. Localization of keratin in carcinomas of cheek pouch mucosa

Tohru KAKU・Osamu NAKADE・Minoru EDO・Miki TATEYAMA

Tomizo OKUYAMA

Abstract: The distribution of intracellular keratin was studied in dysplasia and squamous cell carcinomas of the cheek pouch mucosa of the hamster induced by the application of a 0.5% DMBA mineral oil. The hamster cheek pouches were excised, and placed in a cold aqueous solution of 1% acetic acid for 1 hour while stirring. The pouches were rinsed and placed in a shallow pan of distilled water. The epithelium was then gently freed from the underlying connective tissue with the use of wooden chopsticks. With this technique the epithelium was easily separated from the connective tissue. anti-keratin antibody was induced in rabbits against total keratin extracts from the squamous epithelium of the cheek pouch mucosa. The serum was tested by the indirect immunoperoxidase method (PAP method). Chilled acetone-fixed, paraffin-embedded tissues were employed.

Anti-keratin antibody against total keratin was directed toward cytoplasmic antigen of keratinocytes of spinous and granular layers of the hamster cheek pouch epithelium. No labeling could be detected in the basal cell layer. In the dysplastic lesions and squamous cell carcinomas the expression of keratin antigens was markedly diminished or not detected.

The present study suggests that the difference of the staining intensities of keratin among the normal epithelium, dysplasia and squamous cell carcinoma is a valuable indicator of the malignant transformation in the cheek pouch mucosa.

Key words: immunohistochemistry, carcinogenesis, keratin

結 言

細胞は、細胞質内に細胞の形態の保持に役割を演じている、細胞骨格とよばれている構造と関係する線維性蛋白を含んでいる¹⁾。現在では、大別して3種のものが線維

性蛋白として知られている。すなわち、microfilaments, microtubules, intermediate filaments である¹⁾。中間径フィラメント intermediate filaments は現在生化学的、免疫学的に異なる5種のものが知られている¹⁾。この1つであるケラチンは重層扁平上皮の分化した細胞成分と考えられていたが、広い生物学的分布をしていることが認められている²⁻⁶⁾。ケラチンは重層扁平上皮のみならず、他の上皮細胞にも含まれ、数多くの分子量の異なる subtype が知られている。上皮細胞の種類、部位によって、その含有する subtype が異なることが明らかにされている⁷⁻¹³⁾。

これまで、ハムスター口腔癌形成過程におけるケラチ

東日本学園大学歯学部口腔病理学講座

(主任：奥山富三教授)

Department of Oral Pathology, School of Dentistry,
Higashi-Nippon-Gakuen University (Chief: Prof.
Tomizo Okuyama)

受付日：昭和60年8月22日

ンの免疫組織化学的検索を行った報告はない。今回、われわれはハムスター正常頬嚢粘膜上皮よりケラチンを抽出し、それに対する抗体を用い、ハムスター頬嚢粘膜癌におけるケラチンの免疫組織化学的検索を行った。

材料ならびに方法

1. 実験動物および処置

実験動物は雄ゴールデン・ハムスターを、発癌剤は0.5% 7,12-dimethylbenzanthracene (DMBA) ミネラルオイル溶液とし、週2回頬嚢粘膜に塗布し、頬嚢粘膜癌を形成した。

2. ケラチンの抽出

ハムスター正常頬嚢粘膜を取り出し、4°Cの1%酢酸溶液中で1時間攪拌したのち、粘膜を蒸留水の入ったシャーレにうつし、粘膜上皮のみを剝離した¹⁴⁾

Sun and Green¹⁵⁾の方法により、剝離した上皮からケラチンを抽出した。概略を述べると、剝離した上皮を0.02 M Tris-HCl 緩衝液, pH 7.4 中でホモジナイズし、12,000回転で、20分遠沈、沈殿物を同様の緩衝液でホモジナイズし、これを2回くり返し、最後の沈殿物を0.02 M Tris-HCl-8 M Urea でホモジナイズし、12,000回転、20分遠沈、これを2回くり返し、最後の沈殿物を0.02 M Tris-HCl-8 M Urea-0.01 M dithiothreitol でホモジナイズし、ソニケーターで30分処理後、12,000回転で20分遠沈し、この上清を試料とした。この試料をSDS polyacrylamide gel 電気泳動法¹⁶⁾によりケラチンの分子量を決定した。

3. 抗ハムスター・ケラチン抗体の作製

正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン 100 µg を Freund's complete adjuvant とともに家兎に免疫し、抗体を作製した。Ouchterlony's double-diffusion method¹⁷⁾を用い、ケラチン抗体の産生を確認した。

4. 組織学的、免疫組織化学的検索

頬嚢組織を冷アセトンで固定し、軟パラフィン包埋し、5 µm に薄切し、脱パラフィンを行い、アルコールを通し、水洗し、組織学的検索のためにヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製した。免疫組織学的検索は Sternberger ら¹⁸⁾の PAP 法に準じて行った。その概略を述べると、非特異的 background staining を減弱させる目的で、正常ブタ血清を用いて、抗ハムスター・ケラチン血清 (1:200)、抗ウサギ免疫グロブリン・ブタ血清 (1:20) を反応させ、peroxidase antiperoxidase complex (1:50) との反応を行い、Graham and Karnovsky¹⁹⁾の方法に準じて、3,3'-diaminobenzidine (DAB, Sigma) にて茶かっ色に反応させ、Bioleit 封入を行い鏡検した。核染色はヘマトキシリンを用いた。

写真1 ケラチンの SDS polyacrylamide gel 電気泳動

- 1: 分子量マーカー蛋白質,
Carbonic anhydrase, 30 Kd;
Ovalbumin, 43 Kd; Albumin,
67 Kd; Phosphorylase b, 94 Kd.
- 2: ハムスター頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン。

結 果

1. SDS polyacrylamide gel 電気泳動パターンについて

正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチンは heterogeneity が認められ、分子量は47,000~76,000の蛋白で、9本のバンドが観察された(写真1)。

2. 抗体産生

Ouchterlony 法¹⁷⁾により、ハムスター正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチンと、それを免疫源として家兎に免疫し得られた抗体との間に明瞭な沈降線が認められた(写真2)。

3. ケラチンの局在について

非癌部の異型性のない頬嚢粘膜上皮(写真3A, 4A, 5A)におけるケラチンの局在を検索すると、基底細胞層以外の上皮にケラチンの局在が認められた(写真3B, 4B, 5B)。異型性の認められる上皮(写真3A)ではケラチンの染色性の低下(写真3B)が認められ、扁平上皮癌組織(写真4A, 5A)では癌胞巢の中心である癌真珠につよい染色性が認められ、他部位ではほとんど染色性は認められなかった(写真4B, 5B)。

写真 2 Ouchterlony 法によるケラチンの抗原抗体反応

NAG: ハムスター頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン

NAB: NAG に対する抗体

考 察

ハムスター正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチンは47,000~76,000の分子量の範囲にある、9本のバンドの認められる heterogeneity のある蛋白で(写真1)、種および組織部位によって、ケラチン蛋白のパターンが若干相違するようである。ハムスター頬嚢粘膜上皮のケラチン抗原に対するケラチン抗体を用いて、頬嚢粘膜上皮を PAP 法¹⁹⁾により染色すると、基底細胞層以外の上皮部分に染色性が認められ、異型性の認められる上皮(写真3A)には、染色性の低下および染色の消失が認められた(写真3B)。扁平上皮癌(写真4A, 5A)の癌真珠につよい染色性が認められた(写真4B, 5B)。

動物^{11-13, 20-23)} およびヒト²⁴⁻³²⁾ 表皮および口腔、食道粘膜上皮の前癌病変、癌病変のケラチン蛋白に関する生化学的、免疫組織化学的研究がなされている。

Odajima ら¹³⁾ はハムスター口蓋粘膜上皮と DMBA 塗布により形成された口蓋扁平上皮癌のケラチン蛋白の生化学的分析を行い、口蓋扁平上皮癌では66,000, 70,000の高分子量のケラチン蛋白の欠如が認められ、癌組織では40,000, 43,000の低い分子量をもつケラチン蛋白の出現を報告している。Nelson and Slaga²²⁾ はマウス皮膚に形成された乳頭腫、扁平上皮癌より抽出したケラチン蛋白を生化学的に分析し、乳頭腫では60,000~62,000の高分子量のケラチン蛋白が認められ、乳頭腫のある症例では62,000のケラチン蛋白の消失が、扁平上皮癌では、60,000, 62,000のケラチン蛋白の減少が認められた。これは基底細胞も同様で、癌組織では基底細胞類

似のパターンをとり、ケラチン蛋白パターンの変化はマウス表皮の悪性転化の生化学的マーカーとして役立つと報告している²²⁾。

ヒト表皮および口腔、食道粘膜上皮のケラチン蛋白に関する報告がなされている。Grace ら³²⁾ は食道粘膜上皮と食道扁平上皮癌のケラチンの分析を行い、扁平上皮癌では正常粘膜上皮と比較すると、50,000, 46,000の低分子量のケラチン蛋白の出現が認められ、正常食道粘膜上皮との違いを報告している。Löning ら²⁵⁾ は heterogeneity のあるケラチン蛋白の抗体を作製し、正常表皮、口腔粘膜上皮、前癌、癌病変について、免疫組織化学的検索を行い、分子量62,000, 67,000のケラチン蛋白は有棘、顆粒、角化層に染色性が認められ、基底層には認められず、扁平上皮癌では癌病巣の中心に染色が認められ、辺縁では染色性は認められなかった。Viac ら²⁴⁾ もほぼ同様の結果を報告しており、基底細胞癌、扁平上皮癌では67,000, 62,000のケラチン蛋白の染色性の著しい低下が認められた。われわれの結果も正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン蛋白に対する抗体を使用した免疫組織化学的検索では癌巣中心の癌真珠につよい染色性が認められ、辺縁には染色性が認められず、Löning²⁵⁾、Viac ら²⁴⁾ の染色性パターンに一致する所見である。Banks-Schlegel³³⁾ は家兎の胎生期表皮のケラチン蛋白の生化学的、免疫組織化学的検索を行い、発生段階が進むに従い、胎生18日では分子量40,000~59,000、胎生20日では分子量65,000のケラチン蛋白が出現し、胎生29日では角化層が厚くなり、61,000, 64,000, 54,000の分子量のケラチン蛋白が出現し、胎生早期の基底層に出現した分子量40,000のケラチン蛋白は成熟した家兎の基底層、有棘層には認められなかった。新生仔期では分子量46,000, 50,000のケラチン蛋白の出現をみる他は胎生29日と同じであったと報告している。分子量40,000のケラチン蛋白は胎生期中の表皮に出現し、成熟した表皮の基底層には認められず³³⁾、ヒトの扁平上皮癌で高分子量のケラチン蛋白消失が起こり、低分子領域のケラチンの出現をみることは扁平上皮癌組織ではケラチン蛋白は胎生期の性格をもつことを示唆する所見であり、また heterogeneity のあるケラチン蛋白の変化は重層扁平上皮の前癌、癌病変の悪性転化のマーカーとなりうると思われる。

われわれの結果も正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン抗原に対する抗体を用いた検索結果では異型上皮(写真3A)、扁平上皮癌組織(写真4A, 5A)でケラチン蛋白の著明な染色性の低下が認められ(写真3B, 4B, 5B)、今後、ハムスター頬嚢扁平上皮癌より、ケラチンを抽出し、その抗体を作製し、ハムスター口腔発癌過程におけるケラチンの局在を検索する予定である。

結 語

実験的ハムスター頬嚢癌形成過程に出現した異常上皮および扁平上皮癌のケラチンの免疫組織化学的検索を行った結果、正常頬嚢粘膜上皮では基底層以外の上皮部分にケラチンのつよい染色性が認められ、異型上皮、扁平上皮癌組織では著しい染色性の低下が認められた。正常頬嚢粘膜上皮より抽出したケラチン蛋白の局在を検索することにより、口腔粘膜上皮の悪性転化の1つのマーカーとなりうるものと思われる。

本論文の要旨の一部は第74回日本病理学会において発表した。なお本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。

引用文献

- 1) Rungger-Brändle, E. and Gabbiani, G.: The role of cytoskeletal and cytocontractile elements in pathological processes. *Am J Pathol* 110: 361-392 1983.
- 2) Sun, T.-T., Shih, C., et al.: Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 2813-2817 1979.
- 3) Schlegel, R., Banks-Schlegel, S., et al.: Immunoperoxidase localization of keratin in human neoplasms, A preliminary survey. *Am J Pathol* 101: 45-50 1980.
- 4) Schlegel, R., Banks-Schlegel, S., et al.: Immunohistochemical localization of keratin in normal human tissues. *Lab Invest* 42: 91-96 1980.
- 5) Altmannsberger, M., Osborn, M., et al.: The distribution of keratin type intermediate filaments in human breast cancer: an immunohistological study. *Virchows Arch (Cell Pathol)* 37: 277-284 1981.
- 6) Altmannsberger, M., Weber, K., et al.: Antibodies to intermediate filaments as diagnostic tools: human gastrointestinal carcinomas express prekeratin. *Lab Invest* 46: 502-526 1982.
- 7) Fuchs, E. and Green, H.: The expression of keratin genes in epidermis and cultured epidermal cells. *Cell* 15: 887-897 1978.
- 8) Fuchs, E. and Green, H.: Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell* 19: 1033-1042 1980.
- 9) Doran, T.I., Vidrich, A., et al.: Intrinsic and extrinsic regulation of differentiation of

skin, corneal and esophageal epithelial cells. *Cell* 22: 17-25 1980.

- 10) Baden, H.P., Kubilus, J., et al.: Modification of polypeptide composition in keratinocyte fibrous protein. *J Invest Dermatol* 75: 383-387 1980.
- 11) Winter, H. and Schweizer, J.: Carcinoma-specific keratin polypeptide patterns in keratinizing epithelial of rodents: independence of species and tissue specific variation. *Carcinogenesis* 2: 613-621 1981.
- 12) Dale, B.A., Lonsdale-Eccles, J.D., et al.: Twodimensional analysis of proteins of rat oral epithelial and epidermis. *Archs Oral Biol* 27: 529-533 1982.
- 13) Odajima, T., Aoyagi, T., et al.: Electrophoretic study of keratin polypeptides in chemically-induced oral carcinomas in the hamster. *Archs Oral Biol* 29: 473-475 1984.
- 14) Solt, D.B.: Localization of gamma-glutamyl transpeptidase in hamster buccal pouch epithelium treated with 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene. *JNCI* 67: 193-200 1981.
- 15) Sun, T.T. and Green, H.: Keratin filaments of cultured human epidermal cells: formation of intermolecular disulfide bonds during terminal differentiation. *J Biol Chem* 253: 2053-2060 1978.
- 16) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 1970.
- 17) Ouchterlony, Ö. and Nilsson, L.Å.: Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. In Weir, D.M.: *Handbook of Experimental Immunology* 19. 1-19. 39 Blackwell, Oxford, 1973.
- 18) Sternberger, L.A., Hardy, P.H. Jr., et al.: The unlabelled antibody enzyme method of immunohistochemistry; preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. *J Histochem Cytochem* 18: 315-333 1970.
- 19) Graham, R.C. Jr. and Karnovsky, M.T.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry of a new technique. *J Histochem Cytochem* 14: 291-302 1966.
- 20) Winter, H., Schweizer, J., et al.: Keratin as markers of malignancy in mouse epidermal tumours. *Carcinogenesis* 1: 391-398 1980.
- 21) Hasper, F., Müller, G., et al.: Histological, proliferative, and biochemical alterations in

- dorsal epidermis of the syrian golden hamster induced by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate and the calcium ionophore A 23187. *Cancer Res* 42: 2034-2039 1982.
- 22) Nelson, K.G. and Slaga, T.J.: Keratin modifications in epidermis, papillomas and carcinomas during two-stage carcinogenesis in the SENCER mouse. *Cancer Res* 42: 4176-4181 1982.
- 23) Moll, R., Franke, W.W., et al.: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cell. *Cell* 31: 11-24 1982.
- 24) Viac, J., Staquet, M.J., et al.: Experimental production of antibodies against stratum corneum keratin polypeptides. *Arch Dermatol Res* 267: 179-188 1980.
- 25) Löning, T., Staquet, M.J., et al.: Keratin polypeptides distribution in normal and diseased human epidermis and oral mucosa. Immunohistochemical study on unaltered epithelium and inflammatory, premalignant and malignant lesions. *Virchows Arch A Path Anat and Histol* 388: 273-288 1980.
- 26) Wu, Y.-J. and Rheinwald, J.G.: A new small (40 kd) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinoma. *Cell* 25: 627-635 1981.
- 27) Banks-Schlegel, S.P., Schlegel, R., et al.: Keratin protein domains within the human epidermis. *Exp Cell Res* 136: 465-469 1981.
- 28) Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., et al.: Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95: 580-588 1982.
- 29) 小池正夫, 金城 孝, 他: ヒト歯肉扁平上皮癌由来の培養細胞におけるケラチン polypeptide について. *日口外誌* 28: 992-998 1982.
- 30) Eichner, R., Boniz, P., et al.: Classification of epidermal keratins according to their immunoreactivity, isoelectric point, and mode of expression. *J Cell Biol* 98: 1388-1396 1984.
- 31) Weiss, R.A., Eichner, R., et al.: Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: A 48- and 56- k dalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol* 98: 1397-1406 1984.
- 32) Grace, M.P., Kim, K.H., et al.: Keratin expression in normal esophageal epithelium and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Res* 45: 841-846 1985.
- 33) Banks-Schlegel, S.P.: Keratin alterations during embryonic epidermal differentiation: a presage of adult epidermal maturation. *J Cell Biol* 93: 551-559 1982.

写真 3 基底細胞の下部への増殖の認められる異型上皮

- A. ヘマトキシリン・エオジン染色 (×112)
B. ケラチンの免疫組織化学染色. 異型上皮部分に著しいケラチンの染色性の低下が認められる. ヘマトキシリン核染色 (×112)

写真 4 乳頭状腫瘍形成の認められる扁平上皮癌

- A. ヘマトキシリン・エオジン染色, 多数の癌真珠が認められる. ($\times 45$)
 B. ケラチンの免疫組織化学染色, 癌真珠につよい染色性が認められ, 他部位では著しい染色性の低下が認められる. ヘマトキシリン核染色. ($\times 45$)

写真 5 写真の一部拡大

- A. ヘマトキシリン・エオジン染色. ($\times 112$)
 B. ケラチンの免疫組織化学染色, ヘマトキシリン核染色. ($\times 112$)