口腔原発扁平上皮癌における E-カドヘリン発現と浸潤様式との関連

榊 敏男・和唐雅博*・田中昭男*・梶 隆一
植野 茂・覚道健治・虫本浩三・白数力也

Relationship between the expression of E-cadherin and the mode of invasion in human primary oral cancer

Toshio SAKAKI・Masahiro WATO*・Akio TANAKA*
Ryuichi KAJI・Shigeru UENO・Kenji KAKUDO
Kozo MUSHIMOTO・Rikiya SHIRASU

Abstract: We carried out immunohistochemical investigations on the relationship between the expression of E-cadherin and the clinical stage and mode of invasion of human primary oral cancers (squamous cell carcinomas).

We found that cancers having a grade 4 mode of invasion displayed a reduced type of E-cadherin expression by the classification of Shiozaki et al.

This suggests that decreased expression of E-cadherin is closely related to the high invasiveness of cancer cells.

Key words: E-cadherin (E-カドヘリン), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌), immunohistochemistry (免疫組織化学), invasiveness (浸潤能)

緒 言

カドヘリンは、カルシウムに依存した細胞間接着に関与する膜貫通性の糖蛋白である¹⁾。この接着分子には、E (上皮) 型、P (胎盤) 型、N (神経) 型、V (血管) 型などのホモフィリックな結合特異性をもつサブクラスがあり^{2,3)}、各分子は胚発生や器官形成の各段階で時間的・空間的に厳密に規制されダイナミックに発現することが知られている^{4,5)}。上皮細胞間の接着には E-カドヘリンが選択的に作用して組織の構築に関与する。

一般に正常組織では、細胞同士の強固な接着によって組織の構築と機能が維持されている。それに対して、癌

組織においては浸潤・転移という異常な細胞の行動がみられ、これらの最初のステップは癌細胞の集団からの脱離によって始まる。

そこで、本研究では臨床的進行度の異なる10症例の口腔原発扁平上皮癌の一次症例を対象に細胞間の接着に関与する E-カドヘリンの発現性を免疫組織化学的に観察し、癌の臨床的進行度および病理組織学的浸潤様式と E-カドヘリン発現様式との関連について検討を加えた。

材料および方法

1990年3月から1992年10月までの2年7か月間に大阪大学附属病院第1口腔外科を受診した10例の口腔原発扁平上皮癌患者の一次症例から得た生検組織を対象とした。各癌の臨床的進行度は、UICC 提案(1987年度)の病期分類⁶⁾に従って区分し、組織学的分類には WHO の分類⁷⁾を用いた。また、癌の浸潤様式は Yamamoto ら⁸⁾の分類に、E-カドヘリンの発現様式(強度と均一性)は Shiozaki ら⁹⁾の分類にそれぞれ従って区分した。

免疫組織化学的観察においては、採取した生検組織の一部をただちに OCT compound (Miles Scientific, IL, USA) に包埋後、-80℃で凍結して未固定の6μm凍結切片とした。切片は冷アセトンで4℃、5分間固定

大阪歯科大学口腔外科学第1講座

(主任: 白数力也教授)

* 大阪歯科大学口腔病理学講座

(主任: 田中昭男教授)

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University (Chief: Prof. Rikiya Shirasu)

* Department of Oral Pathology, Osaka Dental University (Chief: Prof. Akio Tanaka)

受付日: 平成5年2月9日

表 E-カドヘリンの発現様式と口腔原発癌の臨床的進行度および浸潤様式

症例	性別	年齢	部位	TNM 分類	病期分類	浸潤様式	E-カドヘリン発現様式
1	F	63	歯肉	T3N0M0	Ⅲ	2	Pr
2	F	59	歯肉	T1N0M0	I	3	Pr
3	M	49	舌	T4N2M0	Ⅳ	4D	Re
4	F	84	舌	T3N1M0	Ⅲ	4C	Re
5	M	71	歯肉	T2N0M0	Ⅱ	2	Pr
6	F	48	舌	T2N0M0	Ⅱ	4C	Re
7	M	66	歯肉	T4N2M0	Ⅳ	3	Pr
8	M	66	歯肉	T4N2M0	Ⅳ	4C	Re
9	F	45	舌	T2N0M0	Ⅱ	2	Pr
10	F	42	舌	T1N0M0	I	3	Re

Pr: Preserved type Re: Reduced type

写真1 健康歯肉における E-カドヘリンの発現 (×33).

写真2 E-カドヘリンの発現は、角質層の細胞膜には認められない (×132).

後、0.3% H_2O_2 含有メタノールに $-20^{\circ}C$ で30分間浸漬し、非特異反応を抑えるために正常ヤギ血清 (Vector Lab. Inc., Burlingame, CA, USA) と室温で10分間反応させた。その後、切片は一次抗体の抗ヒト E-カドヘリンマウスモノクローナル抗体 (HECD-1, マウス IgG: 京都大学 竹市雅俊教授供与) と室温で1時間反応させたのち、Labelled streptavidin biotin (LSAB) 法で免疫染色を行った。すなわち、まず二次抗体のビオチン化マウス IgG ヤギ血清 (ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, USA) と、ついでペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ICN Biomedicals Inc.) とそれぞれ室温で10分間反応させた。反応終了後、切片は H_2O_2 添加の 3,3'-ジアミノベンチジンで発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。なお、各反応後の洗浄には 1mM $CaCl_2$ を含む PBS を用いた。対照組織には、歯科矯正処置 (便宜抜歯) 時に得た臨床的に健全な歯肉粘膜組織および巨舌症患者の手術時に得た臨床的に健全な舌粘膜組織を用いた。なお、免疫反応の対照に

は、マウス正常血清を一次抗体として用い、他の反応は前記のとおりに行った。また、生検組織の一部をホルマリン固定後、通法に従いパラフィン切片とし、H-E 染色して病理組織学的に観察した。

結 果

対照組織の E-カドヘリンに対する反応は、有棘細胞層と基底細胞層 (基底膜と接する部位を除く) の細胞膜に強く発現した (写真1)。しかし、角質層の細胞膜および基底細胞層の基底膜に接する部位の細胞膜には発現しなかった (写真2, 3)。

今回用いた10症例の口腔原発扁平上皮癌の組織型は、すべて高分化型 (Grade I) で、病期分類ではⅠ期が2例、Ⅱ期が3例、Ⅲ期が2例、Ⅳ期が3例であった。また、浸潤様式では2型が3例、3型が3例、4C型が3例、4D型が1例であった (表)。

これらのすべての癌では、E-カドヘリンは癌細胞内の

写真 3 E-カドヘリンの発現は、基底細胞の基底膜に接する部位の細胞膜には認められない (×132).

写真 5 癌組織における E-カドヘリンの発現。健康歯肉に比べて発現は減弱し、不均一に発現している (reduced type) (×66).

写真 4 癌組織における E-カドヘリンの発現。癌細胞の細胞膜に強く均一に発現している (preserved type) (×66).

写真 6 癌組織における E-カドヘリンの発現。癌細胞全体で発現が減弱している (reduced type) (×66).

細胞膜に発現した (写真 4)。しかし、その発現は癌細胞の外側に向かうにしたがって減弱し、基底膜に接する癌細胞の細胞膜、および間質と癌真珠には発現しなかった。また、E-カドヘリンの発現様式は多彩で、対照組織と同様に細胞膜に均一に強く発現しているもの (写真 4)、対照組織に比べて発現が減弱し、不均一に発現しているもの (写真 5)、癌細胞全体で発現が減弱しているもの (写真 6) などがみられた。しかし、E-カドヘリンの発現をまったく欠失している症例は認められなかった。

口腔原発扁平上皮癌の臨床的進行度と E-カドヘリン発現様式との関連を検討したところ、病期分類が I 期であっても E-カドヘリン発現が弱く不均一なパターンを示すもの (減弱型, reduced type⁹⁾) や、IV 期であっても E-カドヘリンが強く均一に発現しているもの (非減弱型, preserved type⁹⁾) もあり、一定の傾向はみられなかった (表)。一方、癌の浸潤様式と E-カドヘリン発現様式との関連を検討すると、著明な浸潤を示す 4 型の症

例では全例カドヘリンの発現は減弱型であった。

なお、一次抗体としてマウス正常血清を使用した対照では、全例反応は陰性であった。

考 察

最近、細胞—細胞間あるいは細胞—細胞外マトリックス間の接着分子と癌の浸潤・転移との関連が分子生物学的な研究から注目されている。今回、わたくしたちは口腔原発扁平上皮癌における細胞間接着分子 E-カドヘリンの発現性を免疫組織化学的に観察し、臨床病理学的所見と対比して検討を加えた。

一般に、重層扁平上皮における上皮細胞は生理的な状態においてもつぎつぎに老化して脱落していくが、細胞の脱落に伴って基底膜近くの細胞が増殖して細胞の補充が行われる。E-カドヘリンの発現をみても、臨床的に健全な歯肉と舌の角質層では発現が欠失し、角質層の細胞は細胞間接着能を失って生理的に剝がれやすい状態にあ

ることを示していた。一方、基底細胞層でも基底膜と接する部位の細胞膜ではE-カドヘリンを発現しなかったが、このようなヘミデスモソームを介する基質-細胞間の接着には、基底膜に存在するインテグリン $\alpha 6 \beta 4^{10)}$ などの分子が機能していると考えられている。Eidelmanら¹¹⁾は基底層細胞の基底膜に接する部位にはE-カドヘリンの局在は認められないことをヒト皮膚で示しており、わたくしたちも、ヒト歯肉の電顕的観察で同様の所見を確認している¹²⁾。

一方、今回検索した口腔原発扁平上皮癌では、E-カドヘリンはいずれの症例にも発現したが、その発現様式は多彩であった。これらの症例はすべて高分化型であったため組織分化度とE-カドヘリン発現との関連は検討できなかったが、一般的には高分化型では強く発現し、低分化型では減弱する傾向があるとされている^{9,13-17)}。また、未分化癌のリンパ節転移巣ではE-カドヘリンがほとんど発現しないことから、E-カドヘリンの発現減弱は癌細胞の脱分化と転移に関連している可能性が高いと指摘されている¹⁴⁾。

本研究では、口腔原発扁平上皮癌の病期分類とカドヘリン発現様式との間にはあきらかな相関がみられなかったが、浸潤様式が4型を示す癌では、E-カドヘリンの発現があきらかに減弱し、かつ不均一な発現を呈する傾向がみられた。E-カドヘリンと浸潤様式の関連を追究した宋ら¹⁸⁾も、特に浸潤様式4D型ではE-カドヘリンの発現が減弱していることを指摘している。また最近、E-カドヘリンのcDNAをヒトあるいはマウスの癌細胞に導入してカドヘリンを強制発現させると浸潤能が阻止され、抗E-カドヘリン抗体で処理すると再び浸潤能を獲得することがあきらかにされ¹⁹⁻²¹⁾、E-カドヘリンは癌細胞の浸潤を阻害する分子として機能することが示されている。また、E-カドヘリンの発現は、ヒト癌ヌードマウス移植系の増殖期に対応して減弱することも提示されている²²⁾。

一般に癌細胞の浸潤には、細胞-細胞間の関連のほか細胞-基質間との関連も重要であり、近年、細胞外マトリックスとの接着についても追究が進められつつある。細胞外マトリックスの構成成分であるラミニン²³⁾、フィブロネクチン²⁴⁾、IV型コラーゲン²⁵⁾、ビトロネクチン²⁶⁾などの接着分子とこれらの分子に対するレセプターが同定され、レセプターは細胞と細胞外マトリックスの接着に関与するだけでなく、細胞生理機能にも関与するインテグリンファミリー^{27,28)}として取り扱われている。癌細胞がこれらの接着分子と接着すると蛋白分解酵素の活性が上昇し癌の浸潤を容易にすることが報告²⁹⁾されている。また、これらの接着分子レセプターのモノクローナル抗体を利用し、癌の転移・浸潤を抑制する試み³⁰⁻³⁴⁾も進められている。したがって、癌組織における転移・浸潤についての解明には、カドヘリン発現の動態ととも

にインテグリンファミリーについても検討を加えることが必要であろう。

癌組織におけるE-カドヘリンの発現様式についてはShiozakiら⁹⁾による食道癌の研究がある。彼らは正常組織と対比して癌組織における発現様式をpreserved type(非減弱型)とreduced type(減弱型)に大別し、後者をさらに不均一に発現するもの、減弱するが均一に発現するもの、欠失するものの3つに分けている。この分類によれば、15例の食道扁平上皮癌のうち非減弱型は4例にすぎず、残りの症例の大部分は減弱かつ不均一に発現するものであったという。また、血行性転移を伴った乳癌の原発巣についても、すべてが減弱型の発現様式を示したと報告している³⁵⁾。これらのことから、本研究の浸潤様式4型でみられたE-カドヘリンの発現減弱は、細胞間接着能の低下を示し、癌細胞が容易に浸潤あるいは転移しやすい状態にあることを示唆するものである。

しかし、E-カドヘリンを強く発現しているにもかかわらず、細胞間接着が弱く、強い浸潤能をうかがわせる胃癌の症例がShimoyamaら¹⁶⁾によって報告された。この所見は、E-カドヘリンが局在していても接着機能が発揮され得ないこともある可能性を示唆するものである。カドヘリン分子の構造をみると、その細胞内ドメインは α -カテニンと複合体を形成して細胞骨格系と結合している³⁶⁾。そしてカドヘリンのもつ接着分子としての機能は、この細胞質ドメインから制御を受けていることが最近指摘されている^{37,38)}。したがって、本研究においてみられたようなE-カドヘリンを強く発現している口腔原発癌においても、細胞質ドメインからの制御機構に何らかの異常を生じ、細胞接着機能が低下あるいは欠失している可能性が推察される。これらのことから、E-カドヘリンの発現性と α -カテニンの発現性の関連についてさらに検討を要するものと考ええる。

結 語

異なった臨床的進行度の口腔原発扁平上皮癌を対象に細胞間接着分子E-カドヘリンの発現様式を検討した。その結果、E-カドヘリンの発現は、4型の浸潤様式を示す症例では減弱する傾向を示した。この所見は、E-カドヘリン発現の減弱が癌の高浸潤能と密接に関連していることを示唆している。

本研究に際し、抗ヒトE-カドヘリンモノクローナル抗体(HECD-1)を恵与くださり、かつ有益なご助言を賜りました京都大学 竹市雅俊教授に深く感謝いたします。また適切なご助言とご援助を賜りました姫路工業大学 阿形清和助教授に感謝いたします。

本論文の一部は第46回日本口腔科学会総会(1992年4月18日、名古屋)および第34回歯科基礎医学学会総会

(1992年10月15日, 岡山) において発表した.

引用文献

- 1) Yoshida, C. and Takeichi, M.: Tetracar-cinoma cell adhesion: Identification of a cell-surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28: 217-224 1982.
- 2) Takeichi, M.: Cadherins: A molecular family essential for selective cell-cell adhesion and animal morphogenesis. *Trends Genet* 3: 213-217 1987.
- 3) Takeichi, M.: The cadherins: Cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development* 102: 639-655 1988.
- 4) Nose, A. and Takeichi, M.: A novel cadherin cell adhesion molecule: Its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol* 103: 2649-2658 1986.
- 5) Hatta, K., Takagi, S., et al.: Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. *Dev Biol* 120: 215-227 1987.
- 6) Hermanek, P. and Sobin, L.H.: TNM classification of malignant tumors. 4th. ed. Berlin: Springer-Verlag 1987, p 13-18.
- 7) Wahi, P.N., Cohen, B., et al.: International histological classification of tumours. No. 4. Histological typing of oral and oropharyngeal tumours. World Health Organization, Geneva, 1971, p 17-18.
- 8) Yamamoto, E., Kohama, G., et al.: Mode of invasion, Bleomycin sensitivity and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 51: 2175-2180 1983.
- 9) Shiozaki, H., Tahara, H., et al.: Expression of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. *Am J Pathol* 139: 17-23 1991.
- 10) Owaribe, K., Nishizawa, Y., et al.: Isolation and characterization of hemidesmosomes from bovine corneal epithelial cells. *Exp Cell Res* 192: 622-630 1991.
- 11) Eidelman, S., Demsky, C.H., et al.: Expression of the cell-cell adhesion glycoprotein cell-CAM 120/80 in normal human tissues and tumors. *Am J Pathol* 135: 101-110 1989.
- 12) Sakaki, T., Wato, M., et al.: Localization of E-cadherin adhesion molecules in human gingiva and gingival carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 43: 99-106 1993.
- 13) Takeichi, M.: Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science* 251: 1451-1455 1991.
- 14) Schipper, J.H., Frixen, U.H., et al.: E-cadherin expression in squamous cell carcinoma of head and neck: Inverse correlation with tumor dedifferentiation and lymph node metastasis. *Cancer Res* 51: 6328-6337 1991.
- 15) Shimoyama, Y. and Hirohashi, S.: Cadherin intercellular adhesion molecule in hepatocellular carcinomas: Loss of E-cadherin expression in an undifferentiated carcinoma. *Cancer Lett* 57: 131-135 1991.
- 16) Shimoyama, Y. and Hirohashi, S.: Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res* 51: 2185-2192 1991.
- 17) Behrens, J., Weidner, K.M., et al.: The role of E-cadherin and scatter factor in tumor invasion and cell motility. *Experientia* 59: 109-126 1991.
- 18) 宋 時澤, 森 士朗, 他: 扁平上皮癌のリンパ節転移に関与する因子としての接着分子・浸潤様式の比較検討(抄). 第11回日本口腔腫瘍学会抄録集 83: 1993.
- 19) Frixen, U.H., Behrens, J., et al.: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol* 113: 173-185 1991.
- 20) Vleminckx, K., Vakaet, L. Jr., et al.: Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66: 107-119 1991.
- 21) Mareel, M.M., Behrens, J., et al.: Down-regulation of E-cadherin expression in madin darby canine kidney (MDCK) cells inside tumors of nude mice. *Int J Cancer* 47: 922-928 1991.
- 22) Sakaki, T.: Tumor cell kinetics and expression of type IV collagen and E-cadherin in a human gingival carcinoma xenograft line in nude mice. *J Osaka Dent Univ* 26: 79-90 1992.
- 23) Liotta, L.A., Horan Hand, P., et al.: Monoclonal antibodies to the human laminin receptor recognize structurally distinct sites. *Exp Cell Res* 156: 117-126 1985.
- 24) Pytela, R., Pierschbacher, M.D., et al.: Identification and isolation of a 140 kd cell surface glycoprotein with properties expected of a fibronectin receptor. *Cell* 40: 191-198 1985.
- 25) Kurkinen, M., Taylor, A., et al.: Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J Biol Chem* 259: 5915-5922 1984.
- 26) Pytela, R., Pierschbacher, M.D., et al.: A 125/115-kDa cell surface receptor specific for vitronectin interacts with the arginin-glycine-

- aspartic acid adhesion sequence derived from fibronectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 5766-5770 1985.
- 27) Tamkun, J.W., DeSiemone, D.W., et al.: Structure of integrin, a glycoprotein involved in the transmembrane linkage between fibronectin and actin. *Cell* 46: 271-282 1986.
 - 28) Hynes, R.O.: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell* 48: 549-554 1987.
 - 29) Matrisian, L.M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trend Genet* 6: 121-125 1990.
 - 30) Shearman, P.J., Gallatin, W.M., et al.: Detection of a cell-surface antigen correlated with organ-specific metastasis. *Nature* 286: 267-269 1980.
 - 31) Vollmers, H.P. and Birchmeier, W.: Monoclonal antibodies that prevent adhesion of B16 melanoma cells and reduce metastases in mice: Crossreaction with human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 6863-6867 1983.
 - 32) Vollmers, H.P. and Birchmeier, W.: Monoclonal antibodies inhibit the adhesion of mouse B16 melanoma cells *in vitro* and block lung metastasis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3729-3733 1983.
 - 33) Vollmers, H.P., Imhof, B.A., et al.: Monoclonal antibodies NORM-1 and NORM-2 induce more normal behavior of tumor cells *in vitro* and reduce tumor growth *in vivo*. *Cell* 40: 547-557 1985.
 - 34) Steinmann, C., Fenner, M., et al.: Invasive behavior of mouse sarcoma cells is inhibited by blocking a 37,000-dalton plasma membrane glycoprotein with Fab fragments. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 3747-3750 1984.
 - 35) 塩崎 均, 宮田幹世, 他: 癌転移とカドヘリン. *実験医学* 10: 1452-1456 1992.
 - 36) Ozawa, M., Baribault, H., et al.: The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent protein structurally related in different species. *EMBO J* 8: 1711-1717 1989.
 - 37) Nagafuchi, A., Takeichi, M., et al.: The 102 kd cadherin-associated protein: Similarity to vinculin and posttranscriptional regulation of expression. *Cell* 65: 849-857 1991.
 - 38) Ozawa, M., Ringwald, M., et al.: Uvomorulin-catenin complex formation is regulated by a specific domain in the cytoplasmic region of the cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4246-4250 1990.