紅板症におけるサイトケラチン 19 遺伝子の発現性について

大西 祐一・森田 章介・福武 洋二・中嶋 正博
角熊 雅彦・郷 真奈武・濱本 和彦・岡野 博郎

A study of cytokeratin 19 gene expression in erythroplakia

Yuichi OHNISHI・Shosuke MORITA・Yoji FUKUTAKE・Masahiro NAKAJIMA
Masayuki TSUNOKUMA・Manabu GO・Kazuhiko HAMAMOTO・Hakuro OKANO

Abstract: The expression of the cytokeratin (CK) 19 gene was investigated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern blotting in two cases of erythroplakia, arising in the floor of the mouth of a 61-year-old man and the tongue of a 54-year-old man. Normal gingival tissue and squamous cell carcinomas were used as control. The results were as follows:

1. Expression of CK19 mRNA on RT-PCR analysis. CK19 mRNA was moderately expressed in erythroplakia, slightly expressed in normal gingiva, and strongly expressed in squamous cell carcinomas.
2. Expression of CK19 mRNA on Northern blotting analysis. CK19 mRNA was moderately expressed in erythroplakia and strongly expressed in squamous cell carcinomas. CK19 mRNA was slightly expressed in normal gingiva.

These results indicate that epithelial dysplasia and carcinoma are abnormal processes of epithelial cell differentiation.

Key words: cytokeratin (サイトケラチン) 19, oral precancerous lesion (口腔前癌病変), erythroplakia (紅板症), oral squamous cell carcinoma (口腔扁平上皮癌)

緒 言 で報告する.

対象症例と研究方法

1. 対象症例

大阪歯科大学第2口腔外科にて手術を行った口底および舌粘膜の紅板症2例を対象とした。

対象症例1は61歳男性で、左側口底粘膜に22×15 mmの長方形の比較的均一な発赤した病変が認められ、その周囲に不規則な形態の薄い白斑や濃い白斑が散在性に見られた(写真1)。切除標本の組織学的所見としては発赤病変部上皮の錯角化層は非薄で、上皮脚は比較的短くその先端は鈍で、ときに蕾状に増殖していた。基底細胞は数層にわたっており、核の大小不同や過染色性が認められた(写真2)。棘細胞層は多角形や紡錘形細胞からなり、核の過染色性やときに分裂像もみられ、上皮下には中等度の慢性炎症性細胞浸潤が

紅板症は白板症とともに口腔粘膜の前癌病変にあげられているが、白板症と異なり比較的な疾患で高い癌化率が報告されている。サイトケラチン 19 (以下 CK19 と略す) 蛋白は健康上皮では基底細胞に認められるが、異型上皮や扁平上皮癌ではその発現性に变化がみられるといわれている。そこで今回、紅板症における CK19 遺伝子の探索を reversetranscription-polymerase chain reaction (以下 RT-PCR 法と略す) および Northern blotting 法を用いて行ったの

大阪歯科大学口腔外科学第二講座

(主任: 岡野博郎教授)

Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Osaka Dental University (Chief: Prof. Hakuro Okano)

受付日: 平成7年12月20日

写真1 症例1 初診時の口腔内写真
口底に辺縁不規則な赤色病変がみられ(☆), 周囲には白斑が認められた(矢印).

写真3 症例2 手術時の口腔内写真
境界明瞭な均一に発赤した病変が認められた(矢印: 生検部位, 点線: 切除範囲).

写真2 同切除標本の病理組織写真(H-E染色, ×40)
上皮層の厚い所や薄い所がみられ, 基底細胞は数層にわたり, 核の過染色性や大小不同もみられた.

写真4 同切除標本の病理組織写真(H-E染色, ×40)
錯角化層は菲薄で, 上皮脚は不規則に伸展し, 基底細胞や棘細胞に高度の異型性が認められた.

認められた.

対象症例2は44歳男性で, 約10年前に右側舌縁部の扁平上皮癌 T2N0M0 (早期浸潤癌) で舌部分切除術を受け, 以後再発なく経過していたが, 同部の遠心に約25×15mmの比較的境界明瞭な均一に発赤した病変が発現した(写真3). 切除標本の組織学的所見としては表層の錯角化層は菲薄で, 上皮脚は不規則に伸展した部や比較的平坦な部からなり, 基底細胞層はしばしば数層にわたり, 棘細胞の空胞化や融解がみられ, 細胞や核の大小不同, 核の過染色性が認められ, 分裂像も散在していた(写真4).

なお対照として健常歯肉5例と扁平上皮癌7例(1: 舌癌; 55歳男性 T4N1M0 高分化型, 2: 舌癌; 54歳男性 T3N0M0 中等度分化型, 3: 舌癌; 70歳男性 T3N1M0 高分化型, 4: 舌癌; 65歳男性 T3N0M0 高分化型, 5: 下顎歯肉癌; 72歳女性 T4N1M0 中等度分化型, 6: 下顎歯肉癌; 75歳男性 T2N0M0 高分化型, 7: 頬粘膜癌; 82歳女性 T2N0M0

高分化型)を用いた. 健常歯肉は下顎埋伏智歯抜歯の際に, 臨床的に同部の炎症を認めない歯肉を切除したものを用いた.

2. 研究方法

紅板症は切除標本のうち明らかに赤色病変を認める部分を, また扁平上皮癌は生検標本で腫瘍の部分を取り出して用いた. そして各標本の大きさを約5×3mmで, 厚さ1.0~1.5mmとして実験に供した.

1) RNAの抽出とRT-PCR法による分析

標本をホモジナイザーにて粉碎し, 酸性フェノール法¹⁾により total RNA を抽出した. 次いで各 RNA 1 μg を用い, これに oligo (dT) をプライマーとして, Molony murine leukemia virus 由来の逆転写酵素で 37℃, 1時間の逆転写反応を行い cDNA を作製した. この cDNA の 1/20 量について, ヒト CK19 cDNA の塩基配列²⁾を元に合成したプライマーを用いて PCR を行った. PCR に用いたプライマーは DNA シンセサイザー (Model 381 A, Applied Bio-

写真5 健常歯肉、紅板症および扁平上皮癌における RT-PCR 法

system) により、 β シアノエチル法で合成した。精製は HPLC 逆相カラム [655 A-12 Liquid Chromatograph (日立)] を用いて行った。なお合成したオリゴヌクレオチドの塩基配列は以下の通りである。

ヒト CK19 遺伝子 5' プライマー； 5'-CATGACT TCCTACAGCTATCGCCAG-3'

ヒト CK19 遺伝子 3' プライマー； 5'-CTCAGAG GACCTTGGAGGCAGACAA-3'

作製した cDNA の 1/20 量に対し、10 倍濃度の PCR buffer (50mM KCl, 10mM Tris pH8.4), 2.5 mM $MgCl_2$ 各プライマー 100pmol, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 200mM, Taq polymerase (宝酒造) 0.5 unit を加え、滅菌蒸留水で 50 μ l になるように調整した後、thermo cycler (Thechne PHC-2) により以下に示す温度の周期変化を与えた。

前反応 94℃ 5 分, 94℃ 0.5 分, 60℃ 1 分, 72℃ 3.5 分, 後反応 72℃ 10 分間の条件で行い、増幅回数を 40 回に設定した。

増幅された PCR 産物の 1/20 量を 1% アガロースゲルで電気泳動し、CK19cDNA 全長をプローブとしてサザンブロット解析を行った³⁾。泳動後、アガロースゲルを 1.5M NaCl を含む 0.5M NaOH 溶液 (アルカリ溶液) で 1 時間処理し、次に 3M NaCl を含む 1M トリス-塩酸緩衝液 (中和溶液; pH 8.0) で 1 時間処理後、ゲルをニトロセルロースフィルター (Nitroplus 2000; Micron Separations Inc., Westborough, Mass., USA) に転写後、80℃で 2 時間乾燥させた。ハイブリダイゼーションは Sambrook ら⁴⁾の方法に従った。ハイブリダイゼーション後、フィルターは 6~0.1 $\times$ SSC (0.15M 塩化ナトリウムと 0.015M クエン酸ナトリウムの水溶液を 1 $\times$ 溶液とする) 溶液で数回洗浄した。各バンドの放射性活性はフジバイオイメージアナライザーを用いて測定した。

2) Northern blotting 法による分析

回収した total RNA 10 μ g を 0.6M ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルにて 20V, 15 時間泳動し

た。泳動後ゲルを 20 $\times$ SSC を用いてニトロセルロースフィルターに転写後、80℃で 2 時間乾燥させた。フィルターをハイブリダイゼーション溶液 (6 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 10mM EDTA, 5 $\times$ Denharts, 100 μ g/ml 熱変性サケ精子 DNA) 中にて 42℃ 2 時間プレハイブリダイズし、その後同液にて 42℃ 18 時間、マルチプライムラベルキット (宝酒造) にて 32 P でラベルした CK19cDNA とハイブリダイズさせた。その後、フィルターを 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を添加した 2 $\times$ SSC にて 55℃で 20 分洗浄した後、順次 0.1 $\times$ SDS を添加した 1 $\times$ SSC と 0.1 $\times$ SSC にて 20 分ずつ洗浄し、乾燥させた。そして放射性活性をフジバイオイメージアナライザーにて測定した。

結 果

1) CK19mRNA の RT-PCR 法による発現

紅板症において CK19mRNA は明らかな発現が認められた (写真 5)。また、健常歯肉では 5 例ともわずかな発現が認められ、扁平上皮癌では全例強い発現が認められた。

2) CK19mRNA の Northern blotting 法による発現

紅板症において CK19mRNA は明らかな発現が認められた (写真 6)。また、健常歯肉ではわずかな発現しか認められなかったが、扁平上皮癌では強い発現が認められた。

考 察

紅板症は鮮紅色、ビロード状を呈し境界明瞭で、多くは表面平滑であるが、小顆粒状を示すこともある紅板症性病変である。Shear⁵⁾は臨床的に本症を 1) 均一な紅板症 (homogeneous erythroplakia), 2) 散在性の白斑を伴う紅板症 (erythroplakia interspersed with patches of leukoplakia), 3) 顆粒状

写真 6 健常歯肉、紅板症および扁平上皮癌における Northern blotting 法

あるいは小斑状の紅板症 (granular or speckled erythroplakia) の 3 つの型に分けており対象症例 1 は 2) の型に、症例 2 は 1) の型に分類されるものであった。本症は紅板症の臨床診断で切除しても、病理組織学的にはすでに上皮内癌や早期浸潤癌の組織像を示すことがある。Shafer and Waldron⁶⁾ は紅板症と臨床的に診断された 58 名から採取した生検標本 65 例を検索し、51% は浸潤癌、40% は上皮内癌または高度の上皮異形成、そして残りの 9% が軽度または中等度の上皮異形成であったと報告している。また天竺ら⁷⁾ も紅板症 8 例中 4 例が上皮内癌、3 例が異型上皮であったと述べている。これらのことから治療法は健常組織を含めて病変を切除するのが原則である。

CK19 の発現性について

健常上皮から異型上皮への移行、さらに癌化する際に、上皮細胞には形態的变化のみならず生化学的变化も生じていると考えられる。その一つとして、粘膜上皮細胞の主な構成蛋白である CK が知られている⁸⁻¹²⁾。細胞骨格は細胞内に存在する線維性の変形しうる複雑な網目構造で、細胞の構造や形態の維持、運動性および細胞分裂に際し重要な役割を演じている¹³⁾。この細胞骨格は微小管、マイクロフィラメント、そしてこれら両者の中間の太さの中間径フィラメントからなり、CK はこの中間径フィラメントに属している。CK には 21 種類の分子種があり、13 種類のタイプ I (CK 9~CK 21) と 8 種類のタイプ II (CK 1~CK 8) に分類される。タイプ I は酸性で分子量が小さく (等電点 4.9~6.1, 分子量 40~63KDa)、タイプ II は中性から弱塩基性で分子量がやや大きい。(等電点 6.1~7.8, 分子量 53~67KDa)。フィラメントの形成は細胞内でタイプ I とタイプ II がヘテロテトラマーを作ることによって成立している¹⁴⁾。

健常な粘膜上皮では、基底細胞が増殖しつつ棘細胞に分化し、さらに棘細胞が表層の細胞へと分化していく。この健常な分化の過程で CK19 蛋白はモノクローナル抗体を用いた報告¹⁵⁾ では、基底細胞のみに発現が認められる。しかし、異型上皮や扁平上皮癌では CK 蛋白の発現性にも変化が生じてくる。すなわち、異型上皮においては基底細胞だけでなく、棘細胞層にも CK19 蛋白が認められ、扁平上皮癌では腫瘍細胞は均一に CK19 蛋白陽性であったと報告¹⁵⁾ されている。

そこで紅板症における CK19 遺伝子の発現性を探索するために RT-PCR 法および Northern blotting 法を用いて CK19 mRNA の発現を調べたところ、いずれにおいても明らかな発現が認められた。また対照として用いた健常歯肉ではわずしか発現が認められず、扁平上皮癌では強い発現が認められた。これはモノクローナル抗体を用いた報告とはほぼ同じ結果であり、分子生物学的手法によりこれを証明したことになった。以上のことを考慮し異型上皮における CK19 発現様式の変化を考察すると、形態的異常を基底細胞の分化の遅れや障害と考えることができる。そして癌における著明な CK19 の発現様式は、異型上皮にみられた CK19 の発現様式と似ており、異型上皮からほとんど分化することなく癌化したことを示唆するのではないかと考えられる。

結 語

1. 紅板症 2 例における CK19 遺伝子の探索を行った。
2. CK19mRNA の RT-PCR 法による発現

紅板症において CK19mRNA は明らかな発現が認められた。健常歯肉ではわずかな発現が認められ、扁平上皮癌では強い発現が認められた。

3. CK19mRNA の Northern blotting 法による発現
紅板症において CK19mRNA は明らかな発現が認められた。健常歯肉ではわずかな発現しか認められなかったが、扁平上皮癌では強い発現が認められた。

2 および 3 の結果から上皮異形成の増大や癌化にともない CK19 遺伝子が強く発現すると考えられた。

引用文献

- 1) Chomczynski, P. and Sacchi N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159 1987.
- 2) Bader, B.L., Magin, T.M., et al.: Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin no. 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. *EMBO J.* 5: 1865-1875 1986.
- 3) Southern, E.M.: Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517 1975.
- 4) Sambrook, J., Fritsch, E.F., et al.: Hybridization of radiolabeled probes to nucleic acids immobilized on nitrocellulose filters or nylon membranes. *Molecular Cloning* 9: 52-55 1989.
- 5) Shear, M.: Erythroplakia of the mouth. *Int Dent J* 22: 460-473 1972.
- 6) Shafer, W.G. and Waldron, C.A.: Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer* 36: 1021-1027 1975.
- 7) 天竺光雄, 増尾勝巳, 他 口腔粘膜紅色肥厚症の臨床病理学的研究. *日口外誌* 25: 514-522 1979.
- 8) Moll, R., Franke, W.W., et al.: The catalog of human cytokeratins: Patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31: 11-24 1982.
- 9) Stoler, A., Kopan, R., et al.: Use of mono specific antisera and cRNA probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal differentiation. *J Cell Biol* 107: 427-446 1988.
- 10) Banks-Schlegel, S.P., Harris, C.C., et al.: Aberrant expression of keratin protein and cross-linked envelopes in human esophageal carcinoma. *Cancer Research* 44: 1153-1157 1984.
- 11) Grace, M.P., Kim, K.H., et al.: Keratin expression in normal esophageal epithelium and squamous cell carcinomas of the esophagus. *Cancer Research* 45: 841-846 1985.
- 12) Bobrow, L.G., Makin, C.A., et al.: Expression of low molecular weight cytokeratin proteins in cervical neoplasia. *J Pathol* 148: 135-140 1986.
- 13) 片方陽太郎: ケラチン蛋白質の生化学——構造, 機能, そして遺伝子まで——. *蛋白質 核酸 酵素* 38: 35-46 1993.
- 14) Lazarides, E.: Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space. *Nature* 283: 249-256 1980.
- 15) Van der Velden, L.A. and Schaafsma, H.E.: Cytokeratin expression in normal and (pre) malignant head and neck epithelia: an overview. *Head and neck* 15: 133-146 1993.