口腔扁平上皮癌における Fas 抗原の検出

村木 祐孝・吉岡 千尋・立石 晃
福田 仁一・羽地 達次*

Detection of Fas antigen in oral squamous cell carcinoma

Yukoh MURAKI・Chihiro YOSHIOKA・Akira TATEISHI
Jin-ichi FUKUDA・Tatsuji HANEJI*

Abstract: Fas antigen is a cell surface glycoprotein that mediates apoptosis from the cell surface into the cytoplasm. A monospecific and high titer polyclonal antibody, designated as Fas D, raised against a synthetic polypeptide selected from a part of the human Fas antigen (aa 104-114) was used to detect the Fas antigen in human oral squamous cell carcinoma (SCC). Biopsy specimens of oral SCCs obtained from 38 patients were prepared, and paraffin sections were stained with the FasD antibody using an indirect immunohistochemical method.

Expression of Fas antigen was observed in 68% of the SCC cases examined. The mean age of the Fas-positive group (65.8 years old) was significantly higher than that of the Fas-negative group (55.8 years old). The specimens were also divided into well, moderately, and poorly differentiated grades according to histopathological criteria. Although the number of specimens examined was limited (24 cases) in the present study, 92% of the well differentiated SCCs stained for Fas antigen. In moderately differentiated SCCs, only 37% of the SCCs (4 out of 11) showed Fas-positive staining. No Fas-positive cells were detected in poorly differentiated SCCs although only three specimens were examined. It was found that the production of Fas antigen was related to the degree of tumor differentiation. No relationship was noted between Fas antigen expression and tumor location, T categories of the TNM classification of the UICC (1987), and cervical lymph node metastasis.

Furthermore, the clinical and pathological effects of chemotherapy in each case were evaluated with respect to the correlation with Fas antigen expression. There was a significant positive correlation between Fas antigen expression and the clinicopathological course after chemotherapy.

Key words: Fas antigen (Fas 抗原), immunohistochemical study (免疫組織化学的研究), squamous cell carcinoma (扁平上皮癌), chemotherapy (化学療法)

九州歯科大学口腔外科学第一講座
(主任: 福田仁一教授)

*九州歯科大学口腔解剖学第一講座
(主任: 小林 繁教授)

First Department of Oral and Maxillofacial surgery, Kyushu Dental College (Chief: Prof. Jin-ichi Fukuda)

*First Department of Oral Anatomy, Kyushu Dental College (Chief: Prof. Shigeru Kobayashi)

受付日: 平成9年1月20日

緒 言

アポトーシスは癌細胞の増殖特性と同様に、癌の進行において重要な意味をもつと考えられている¹⁾。Fas 抗原はこのアポトーシスのシグナルを細胞外より細胞内に伝達する細胞表面糖蛋白質であり、TNF/NGF レセプターファミリーに属する²⁾。われわれはこれまでに合成 Fas ペプチド (aa104-114) を家兎に免疫して作成した抗 Fas 抗体 (FasD)³⁾ を用いた免

疫 blotting 法ならびに免疫組織化学的染色法による細胞内 Fas 抗原の検出を正常口腔粘膜上皮, ならびに各種口腔粘膜疾患について行い報告してきた^{4, 5)}。

今回, われわれは当科で扱った口腔扁平上皮癌患者の生検時標本 38 例を対象に, Fas 抗原の発現を免疫組織化学的染色法にて検索し, 臨床ならびに病理組織学的所見との関連性について検討を行った。さらに, これら口腔扁平上皮癌一次症例で, 術前に化学療法のみを行い, 外科的手術療法を施行した 25 例を対象に, 化学療法施行前における Fas 抗原の発現と, 化学療法による臨床ならびに病理組織学的治療効果との関連性について検討を行ったので報告する。

対象および方法

1. 対象

対象は 1991 年 4 月から 1995 年 3 月までの 4 年間に九州歯科大学附属病院第一口腔外科にて治療を行った口腔扁平上皮癌一次症例のうち, 検索可能であった 38 例とした。対象症例の性別は男性 24 例, 女性 14 例 (男女比 1.7 : 1), 年齢は 36 歳から 90 歳までの平均 60.8 歳であった。部位別では歯肉 16 例, 舌 10 例, 口底 7 例, 頬粘膜 3 例, 口蓋 2 例であった。

またこれら口腔扁平上皮癌一次症例で, 術前に化学療法のみを行い, 外科的手術療法を施行した 25 例の手術時切除標本を病理組織学的検索に供した。

2. 方法

今回の研究では, ヒト Fas 抗原の細胞外ドメインに相当する 11 アミノ酸配列 (104-114, TRTQNTKGRCK) のポリペプチドを合成後, 家兎に免疫して作製した抗 Fas ポリクロナール抗体 (FasD)³⁾ を用いた。

生検時ならびに手術時標本として採取した材料は, 10%ホルマリン固定の後, 2~3 μ m のパラフィン切片とした。免疫反応は間接酵素抗体法 (LSAB 法) を用い, 通法にしたがってキシレンにて脱パラフィン, エタノール脱水を行い, 0.3% H_2O_2 メタノール溶液にて 10 分間処理して内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止した後, 0.1% トリプシンにて前処理, 4% BSA にてブロッキングし, 一次抗体として FasD を TBS (Tris-buffered saline) にて 200 倍希釈としたものを用いた。その後, 二次抗体, ペルオキシダーゼ標識 L-ストレプトアビジンを反応させ, AEC- H_2O_2 にて発色, ヘマトキシリンにて核染色を施した。ネガティブコントロールには同希釈の正常家兎血清を用いた。

Fas 抗原の検出は癌細胞集団の中で異なる数視野 (200 倍視野) において, 全く染色されていないものを陰性とし, それ以外はすべて Fas 抗原陽性とした。

臨床病理学的因子の分類は「頭頸部癌取り扱い規約 (改訂第二版)」に従った。化学療法による臨床の治療効果判定に関しては日本癌治療学会の「固形癌化学療

図1 Fas 抗原の発現と患者年齢

法直接効果判定基準」に基づいて行い, 著効を CR, 有効を PR, 不変を NC, 進行を PD とした扱った。また病理組織学的治療効果判定は大星下里分類を用いて行った。

統計学的処理は, Fas 抗原の発現と患者年齢に関しては Student's t-test を用いた。Fas 抗原の発現と T 分類, 腫瘍組織の分化度, 化学療法による抗腫瘍効果に関しては χ^2 検定を用い, 統計学的結果は危険率 5% 以下を有意とした。

結 果

1. 生検時標本における Fas 抗原の発現に関して

Fas 抗原の発現と患者年齢との関係を図 1 に示した。Fas 抗原陽性群と陰性群とでは, 陽性群の平均年齢 65.8 歳が陰性群の 55.8 歳に対して有意に高い年齢値を示した。

T 分類別における Fas 抗原の発現に関しては, 特に T2 症例において 13 例中 11 例 (85%), T3 症例において 7 例中 7 例 (100%) と高い割合で Fas 抗原の発現が認められた。また T1 症例では 6 例中 2 例 (33%) と Fas 抗原の発現が認められにくい傾向にあった (表 1)。

表 2 に頸部リンパ節転移との関係を示した。手術時摘出標本においてリンパ節転移の認められた症例は 19 症例であり, その中で Fas 抗原陽性症例は 14 例 (74%) であった。また, 転移の認められなかった症例は同じく 19 例であり, Fas 抗原陽性症例は 12 例 (60

表1 Fas 抗原の発現と T 分類 (UICC, 1987)

T 分類	Fas 抗原の発現	
	－	＋ (%)
T 1 (n = 6)	4	2 (33)
T 2 (n = 13)	2	11 (85)
T 3 (n = 7)	0	7 (100)
T 4 (n = 12)	6	6 (50)
Total (n = 38)	12	26 (68)

Fas 抗原の発現：陰性 (－), 陽性 (＋)

表2 Fas 抗原の発現とリンパ節転移

リンパ節転移	Fas 抗原の発現	
	－	＋ (%)
pN (＋) (n = 19)	5	14 (74)
pN (－) (n = 19)	7	12 (60)
Total (n = 38)	12	26 (68)

Fas 抗原の発現：陰性 (－), 陽性 (＋) N. S.

表3 Fas 抗原の発現と腫瘍組織の分化度

腫瘍組織の分化度	Fas 抗原の発現	
	－	＋ (%)
Well (n = 24)	2	22 (92)
Moderate (n = 11)	7	4 (36)
poor (n = 3)	3	0 (0)
Total (n = 38)	12	26 (68)

Fas 抗原の発現：陰性 (－), 陽性 (＋) $P(\chi^2) = 0.011$

%)であった。Fas 抗原の発現とリンパ節転移との間に統計学的有意差は認められなかった。

腫瘍組織の分化度別 Fas 抗原の発現に関しては、高分化型において 24 例中 22 例 (92%) と非常に高い割合で Fas 抗原の発現を認め、中等度分化型では 11 例中 4 例 (37%) と Fas 抗原の発現が認められる割合は低い傾向を示した。また低分化型の症例は 3 例と例数は少ないものの 3 例すべてにおいて Fas 抗原の発現は認められなかった。高分化型と分化度の低いタイプ (中等度＋低分化型) との間には $P(\chi^2) = 0.011$ が得られ、Fas 抗原の発現に関して有意差を認めた (表 3)。

免疫組織化学的染色所見では、高分化型扁平上皮癌において癌巣を形成する腫瘍細胞の細胞膜および細胞質の一部に顆粒状に染色される強い Fas 抗原陽性所見が認められた (写真 1)。中等度分化型では癌巣を形成する腫瘍細胞のごく一部の細胞に陽性所見を認め

表4 Fas 抗原の発現と化学療法による臨床的抗腫瘍効果

臨床的抗腫瘍効果	Fas 抗原の発現	
	－	＋ (%)
CR (n = 0)	0	0 (0)
PR (n = 10)	2	8 (80)
NC (n = 10)	6	4 (40)
PD (n = 5)	3	2 (40)
Total (n = 25)	11	14 (56)

Fas 抗原の発現：陰性 (－), 陽性 (＋) $P(\chi^2) = 0.048$
著効：CR, 有効：PR, 不変：NC, 進行：PD

表5 Fas 抗原の発現と化学療法による病理組織学的抗腫瘍効果

病理組織学的抗腫瘍効果	Fas 抗原の発現	
	－	＋ (%)
GradeⅣ (n = 0)	0	0 (0)
GradeⅢ (n = 4)	1	3 (75)
GradeⅡb (n = 8)	1	7 (88)
GradeⅡa (n = 5)	3	2 (40)
GradeⅠ (n = 8)	6	2 (25)
Total (n = 25)	11	14 (56)

Fas 抗原の発現：陰性 (－), 陽性 (＋) $P(\chi^2) = 0.008$

るのみであり染色性は弱かった (写真 2)。また低分化型においては Fas 抗原の発現は全く認められなかった (写真 3)。

2. 生検時 Fas 抗原の発現と化学療法に対する治療効果

化学療法に対しての臨床的治療効果と、生検時 Fas 抗原の発現の有無との関連を表 4 に示した。臨床的に化学療法による効果が明らかに認められた PR 症例では 10 例中 8 例 (80%) において生検時に Fas 抗原の発現が認められていた。また症例数は少ないものの、化学療法後も病変の進行が認められた PD 群では 5 例中 2 例 (40%) において Fas 抗原の発現が認められているのみであった。Fas 抗原の発現と化学療法による臨床的治療効果に関して、PR 以上の群と NC 以下の群との間には $P(\chi^2) = 0.048$ が得られ、統計学的に有意差が認められた。

化学療法に対しての病理組織学的治療効果と、生検時 Fas 抗原の発現の有無との関連を表 5 に示した。病理組織学的に化学療法の効果が強く認められた GradeⅢ群においては 4 例中 3 例 (75%), GradeⅡb 群においては 8 例中 7 例 (88%) と多くの症例におい

写真1-A, B 高分化型扁平上皮癌における Fas 抗原の検出所見

A. 腫瘍胞巣内の一部の腫瘍細胞において、細胞膜ならびに細胞質内に顆粒状の Fas 抗原陽性所見を認める。(×200)

B. Negative control (×100)

写真2 中等度分化型扁平上皮癌における Fas 抗原の検出所見

一部の腫瘍細胞に微弱な Fas 抗原陽性所見を認める。(×150)

写真3 低分化型扁平上皮癌における Fas 抗原の検出所見

Fas 抗原の発現は全く認められない。(×200)

て生検時に Fas 抗原の発現が認められていた。なお効果の認められなかった Grade I 群では 8 例中 2 例 (25%) において Fas 抗原の発現が認められているのみであった。Grade II b 以上の症例群と Grade II a 以下の症例群との間では $P(\chi^2) = 0.008$ が得られ、Fas 抗原の発現と化学療法による病理組織学的治療効果との間に統計学的有意差が認められた。

考 察

Fas 抗原の正常皮膚における存在は基底層を中心に表皮細胞、ランゲルハンス細胞、メラノサイトにおいて認められており⁶⁾、ある種の皮膚病変では Fas 抗原の発現が高まっているとの報告もある⁷⁾。さらに正常皮膚の培養細胞に対して抗 Fas 抗体を添加することにより、培養皮膚細胞にアポトーシスを惹起することも報告されている⁸⁾。口腔粘膜上皮における Fas 抗原の存在に関しては、これまで特異性の高い抗体が開発されていなかったこともあり、明らかにされ

ていないのが現状であった。FasD³⁾を用いたわれわれのこれまでの研究では、ヒトの正常歯肉において分子量 35kDa を有する Fas 抗原の発現が上皮細胞層の有棘層から顆粒層直下の細胞層にかけて認められた⁴⁾。さらに口腔粘膜に発現する各種疾患においてそれぞれ異なった染色性を示すことが明らかとなった⁵⁾。

Fas 抗原はアポトーシスのシグナルを細胞外より細胞内へと伝達する細胞表層糖蛋白質であることが知られている。アポトーシスが起きていることを証明する手法としては、従来、細胞の形態学的変化 (染色体の核膜周辺部への凝集と核の断片化) を電子顕微鏡的あるいは生化学的に証明する方法が用いられており、近年では Gavrieli らが開発した TUNEL 法 (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling 法) により、比較的簡単に組織パラフィン切片上で DNA の断片化が検出可能となった⁹⁾。一方、Fas 抗原は細胞がアポトーシスに陥る前段階において検出され、たとえ

ば正常口腔粘膜上皮においては脱核前の有棘層から顆粒層付近にかけての細胞層に出現が認められる⁴⁾。このことは Fas 抗原が口腔粘膜上皮における角化のプロセスに何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆している。アポトーシスは正常な皮膚や粘膜における角化の過程ばかりではなく未処置の悪性新生物内においてもみられ^{10~12)}、癌の進行において重要な意味をもつと考えられている¹⁾。特にある種の扁平上皮癌においては、分裂が盛んな腫瘍組織であってもアポトーシスによる腫瘍細胞の死によって増殖能が低い状態に抑えられていることも報告されている¹³⁾。

1. Fas 抗原の発現と臨床・病理組織学的所見との関連性について

今回の研究では Fas 抗原陽性群の方が陰性群に比して有意に高い年齢値を示していた。一般的に高齢者における扁平上皮癌の発育は緩慢であり、分化度も高いことが知られている。このような癌における腫瘍細胞の分化やアポトーシスの誘導には Fas 抗原を介した何らかのシステムが関与しているのかも知れない。

T 分類と Fas 抗原の発現との間には明らかな関連性は認められなかったが、T1 症例においては発現し難い傾向にあった。われわれは口腔白板症における dysplasia 症例において、Fas 抗原が正常粘膜上皮に比べて発現し難くなっている（6 例中 1 例、17%）ことをすでに報告し⁵⁾、今回の報告例以外でも、上皮内癌や早期浸潤癌において Fas 抗原の発現が認められ難い傾向を示す結果を得ている。これらの結果が示すような、発癌過程や発癌早期における Fas 抗原の消失は、細胞の癌化におけるアポトーシスの関与¹⁴⁾と同様に、発癌のプロセスを解明する上で重要な意味をもつものと思われる。

リンパ節転移に関しては、Fas 抗原の発現との関連性は認められなかった。扁平上皮癌のリンパ節転移については、腫瘍細胞自身の増殖特性だけでなく、腫瘍の組織学的所見などからその転移の可能性を予測する試みがなされている。特に腫瘍の増殖方向および分化度、浸潤様式および基底膜を含めた細胞外マトリックスの破壊等の所見が重要視されている¹⁵⁾。しかし転移の成立には、細胞間接着分子および糖鎖の発現¹⁶⁾など多くの因子が関与している可能性が高く、いまだ統一した見解は得られていない。

今回、FasD を用いた免疫組織化学的染色法によって高分化型扁平上皮癌および一部の中等度分化型扁平上皮癌において Fas 抗原の発現を認めた。しかし他の中等度分化型扁平上皮癌や低分化型の扁平上皮癌では Fas 抗原の発現は認められなかった。24 症例という限られた症例数ではあるが、高分化型扁平上皮癌における Fas 抗原の発現は 92% と非常に高い値を示した。Fas 抗原の発現は、主に癌真珠を形成する腫瘍細胞の細胞質あるいは周囲の細胞膜において顆粒状の陽性所

見として認められた。このような染色パターンはヒト正常歯肉における有棘層ならびに顆粒層直下における Fas 抗原の発現所見⁴⁾と同様の所見であった。中等度分化型の扁平上皮癌においては、11 例中わずか 4 例（36%）において Fas 抗原の発現が認められるのみであった。また低分化型においてはわずか 3 例ではあるが、全例において Fas 抗原の発現は認められなかった。これらの所見は扁平上皮癌における Fas 抗原の発現が腫瘍細胞の分化度によって異なり、口腔扁平上皮癌における癌真珠の形成あるいは個々の細胞の角化において重要な役割を担っている可能性を示唆するものであった。多くの扁平上皮癌は正常上皮組織より発生し、下在組織（固有層）へと増殖ならびに浸潤してゆく。このような所見は高分化型の扁平上皮癌において最も典型的である¹⁷⁾。正常上皮細胞とは異なった形態の細胞より構成される分化度の低いタイプの扁平上皮癌に比べて、比較的細胞形態が正常上皮細胞と類似した高分化型において Fas 抗原の発現が高率に認められたことは、Fas 抗原の発現が口腔粘膜上皮における角化のプロセスに何らかの影響を及ぼしている可能性をさらに裏付けるものと考ええる。

2. Fas 抗原の発現と術前化学療法による治療効果との関連性について

Fas 抗原の発現と術前化学療法後の抗腫瘍効果に関しては、生検時に Fas 抗原の発現が認められた症例の方が発現の認められなかった症例に比して、抗腫瘍効果が認められやすい傾向を示し、臨床ならびに病理組織学的効果判定において有意差が認められた。近年、抗癌剤によってある種の癌細胞にアポトーシスが誘導されるとの報告が相次いでいる^{18~20)}。しかし、このような癌細胞で誘導されるアポトーシスが Fas 抗原や TNF (tumor necrosis factor) といった調節因子を介して起きているのか否かは明らかにされていない。今回のわれわれの検索結果は、Fas 抗原を介したアポトーシスの誘導が、扁平上皮癌に対する化学療法の抗腫瘍効果発現に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆するものであった。この点に関しては、今後、分子生物学的手法を交えてのさらに詳細な検索が必要と考える。

結 語

合成 Fas ペプチド (aa104-114) を家兎に免疫して作成した抗 Fas 抗体 (FasD) を用いた免疫組織化学的染色法にて、口腔扁平上皮癌一次症例 38 例を対象に、Fas 抗原の発現に関する検索を行った。

1. Fas 抗原陽性群と陰性群とでは、陽性群の平均年齢 65.8 歳が陰性群の 55.8 歳に対して有意に高い年齢値を示した。

2. T1 症例では Fas 抗原の発現が認められ難い傾向にあった。

3. Fas 抗原の発現とリンパ節転移との間に統計学的有意差は認められなかった。

4. 腫瘍組織の分化度別に Fas 抗原の発現に関する検討を行った結果、高分化型においては分化度の低いタイプに比して高率に Fas 抗原の発現を認め、両者間には有意差が認められた。

5. 術前化学療法後の臨床的治療効果と、生検時 Fas 抗原の発現の有無との関連性について検討を行った結果、PR 以上の群が NC 以下の群に対して有意に Fas 抗原の発現率が高かった。

6. 術前化学療法後の病理組織学的治療効果と、生検時 Fas 抗原の発現の有無との関連について検討を行った結果、Grade II b 以上の群は Grade II a 以下の群に対して有意に Fas 抗原の発現率が高かった。

稿を終えるにあたり、今回の研究で用いた抗 Fas 抗体 (FasD) を快く御供与下さいました長崎大学薬学部薬理学教室小林信之教授に厚く謝意を表します。

なお本研究の一部は、平成 7 年度文部省科学研究費奨励研究 (A) 課題番号 07771967 による。

引用文献

- 1) 片岡之郎, 鶴尾 隆: 抗癌剤とアポトーシス. 実験医学 13: 92-96 1993.
- 2) Itoh, N., Yonehara, S., et al.: The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 66: 233-243 1991.
- 3) Koji, T., Kobayashi, N., et al.: Immunohistochemical localization of Fas antigen in paraffin sections with rabbit antibodies against human synthetic Fas peptides. *Acta Histochem Cytochem* 27: 459-463 1994.
- 4) Yoshioka, C., Muraki, Y., et al.: Identification of Fas antigen in human gingiva. *J Dent Res* 75: 1353-1357 1996.
- 5) Muraki, Y., Yoshioka, C., et al.: Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia. *J Oral Pathol Med* 26: 57-62 1997.
- 6) Oishi, M., Maeda, K., et al.: Distribution of apoptosis-mediating Fas antigen in human skin and effects of anti-Fas monoclonal antibody on human epidermal keratinocyte and squamous cell carcinoma cell lines. *Arch Dermatol Res* 286: 396-407 1994.
- 7) Sayama, K., Yonehara, S., et al.: Expression of Fas antigen on keratinocytes in vivo and induction of apoptosis in cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 103: 330-

334 1994.

- 8) 水谷 仁, 稲地 真: 皮膚疾患とアポトーシス 実験医学 13: 223-226 1995.
- 9) Gavrieli, Y., Sherman, Y., et al.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501 1992.
- 10) Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., et al.: Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257 1972.
- 11) Kerr, J.F.R. and Searle, J.: A suggested explanation for the paradoxically slow growth rate of basal-cell carcinomas that contain numerous mitotic figures. *J Pathol* 107: 41-44 1972.
- 12) Weedon, D., Searle, J., et al.: Apoptosis: Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol* 1: 133-144 1979.
- 13) Weedon, M.: Apoptosis. *Adv. Dermatol.* 5: 243-256 1990.
- 14) Bursch, W., Paffe, S., et al.: Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci of rats. *Carcinogenesis* 11: 847-853 1990.
- 15) 野口 誠, 小浜源郁, 他: 口腔扁平上皮癌における laminin の局在様式と組織学的悪性度. 癌の臨床 35: 880-885 1989.
- 16) 新田康隆: マウス可移植性腫瘍における肺転移能と接着分子: CD44 の発現との相関. 東北歯誌 12: 1-12 1993.
- 17) Cawson, R.A., Binnie, W.H., et al.: Oral Disease, pp.13.6-13.14 Wolfe, London. 1994.
- 18) Kaufmann, S.H.: Induction of endonucleolytic DNA cleavage in human acute myelogenous leukemia cells by etoposide, camptothecin, and other cytotoxic anticancer drugs: a cautionary note. *Cancer Res* 49: 5870-5878 1989.
- 19) Kamesaki, S., Kamesaki, H., et al.: bcl-2 protein inhibits etoposide-induced apoptosis through its effects on events subsequent to topoisomerase II-induced DNA strand breaks and their repair. *Cancer Res* 53: 4251-4256 1993.
- 20) Fisher, T.C., Milner, A.E., et al.: bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res* 51: 3321-3326 1993.