

〔原 著〕

口腔上皮ならびに口腔扁平上皮癌における
アポトシスに関する病理組織学的研究

—特にLewis Y 糖鎖発現と、DNA nick end labeling法との比較—

安彦 善裕, 斉藤 正人, 大内 知之,
高橋 香苗, 田嶋 久士, 長江 俊一, 賀来 亨

東日本学園大学歯学部口腔病理学講座

(主任: 賀来 亨教授)

Histopathological study on apoptosis in oral epithelia
and oral squamous cell carcinomas.

-Comparison between expression of Lewis Y carbohydrate
and DNA fragmentation by DNA nick end labeling method.-

Yoshihiro ABIKO, Masato SAITOH, Tomoyuki OHUCHI,
Kanae TAKAHASHI, Hisashi TAJIMA, Shun-ichi NAGAE and Tohru KAKU

Department of Oral Pathology, School of Dentistry

HIGASHI-NIPPON-GAKUEN UNIVERSITY

(Chief: Prof. Tohru KAKU)

Abstract

Apoptosis (programmed cell death) detection by DNA fragmentation is well known. Recently, a method to identify the phenomenon in tissue sections was developed as a DNA nick end labeling method. Following this technique, the expression of blood group antigen Lewis Y (Le^Y) was reported to correspond to apoptosis. We examined the localization of Le^Y antigen in squamous cell carcinomas and oral epithelia and compared it with results of the DNA nick end labeling method. In normal oral epithelia, signals by the DNA nick end labeling method agreed with the apoptosis, i.e. in nuclei in the subcornified layer with parakeratosis. The Le^Y localized at the prickle cell layer was not real apoptosis. The positive staining in the salivary gland was not acceptable as apoptosis. In squamous cell carcinomas, suggestive colocalization may

support Le^Y to be an apoptosis related antigen.

Key words : Apoptosis, Oral epithelium, Squamous cell carcinoma

緒 言

細胞死の大半の原因は主に外来性因子によるもので、最近まで細胞死は壊死 (necrosis) という概念で説明されてきた。近年、壊死という受動的な死に対して能動的な死、すなわち細胞の発生、分化の過程において必要不可欠な生理的な細胞の死についての概念が注目されてきている。Wyllieら¹⁾の電子顕微鏡による細胞の形態的観察から、細胞死が従来受動的な細胞死である壊死とは異なっていることが指摘され、この現象はアポトーシス (apoptosis) または、プログラムされた細胞死 (programmed cell death) と呼ばれている。アポトーシスの現象を検索する方法として、DNA電気泳動法による核の断片化を観察する方法、核の断裂いわゆる apoptotic body を電子顕微鏡により形態的に観察する方法が報告されている。²⁾ さらに最近、Gavrieliら³⁾により通常の方法で作成された組織標本、すなわちホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、核の断片化を観察することが可能なDNA nick end labeling法が開発された。また、血液型関連抗原Lewis Y (Le^Y) 抗原が、アポトーシス部に一致するという報告から、アポトーシス関連抗原として注目されてきている⁴⁾。しかし、これらの方法による口腔疾患への応用についての報告は文献を渉猟した範囲ではみあたらない。先頃、われわれは正常口腔上皮ならびに扁平上皮癌にDNA nick end labeling法を応用し、そのアポトーシスについて報告した⁵⁾。

今回、DNA nick end labeling法による結果と更に抗Le^Y抗体を用いた免疫組織化学的な方

法による結果を比較検討し、口腔領域における抗Le^Y抗体とアポトーシスとの関連について考察する。

材料および方法

DNAの断片化の検索およびLe^Y抗原の局在の検索のために、口腔領域の扁平上皮癌と診断された切除組織およびその周囲の非癌部組織、ならびに正常口腔上皮を用いた。組織はいずれも病理組織学的検索のために、通法に従い10%中性緩衝ホルマリン固定、パラフィン包埋されたものである。

DNA nick end labeling法はGavrieliら³⁾の方法に従って行った。概略を述べると、切片を脱パラフィン、脱キシレン、水洗の後、Proteinase Kによる蛋白分解酵素処理を行い、2% H₂O₂による内因性ペルオキシダーゼの除去の後、terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Gibco BRL 社製, USA) とbiotin化標識 - 16 - 2'- deoxyuridine -5'- triphosphate (UTP) (Boehringer Mannheim 社製, Germany) によりDNA断片を標識し、これに対してペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ社製, 東京) を用いて、最後にペルオキシダーゼ発色基質 (協和メデックス社製, 東京) にて検出した。陽性対照として、TdTとUTPの反応の前にDNase I (Amresco 社製, USA) による処理を行った。Le^Yモノクローナル抗体 (BM-1/JIMRO, 日本抗体研究所製) を用い、2次抗体以降histofine streptoavidin-biotin kit (ニチレイ社製, 東京) によって、免疫組織反応を行った。すなわち、2次抗体としてビオチン化標識ウサギ抗マウスIgG+IgA

+IgM抗体, 酵素試薬としてペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用い, 最後にペルオキシダーゼ発色基質(協和メデックス社製, 東京)にて検出した。陰性対照には, 1次抗体のかわりに正常マウス血清を用いた。いずれもヘマトキシリンによる核染色の後, 光顕的に観察撮影した。通常の組織学的検索にはヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

結 果

Le^y抗体を用いた免疫組織化学染色, DNA nick end labeling法のいずれも, 反応の強弱はあるがすべての標本において陽性部が観察された。DNA nick end labeling法のDNaseを用いた陽性コントロールでは, 切片上に存在するすべての核に陽性反応が認められた(写真1)。正常組織のDNA nick end labeling法によるapoptotic cellの検索では, 口腔上皮に多くみられる錯角化重層扁平上皮の角質層に存在する核, ならびに角質層直下部の核の一部に陽性反応が散在性に認められた(写真2)。さらに, 僅かではあるが筋組織の核, 血管内の血球にも陽性反応を示すものがみられた。同部のLe^y抗原の局在は, 重層扁平上皮の基底細胞上層から角質層下部にわたり細胞膜上に観察された(写真3)。また, 既存の唾液腺組織では導管上皮の一部, および漿液性腺房に陽性反応が認められたが, 粘液性腺房には陽性反応はみられなかった(写真4)。扁平上皮癌ではDNA nick end labeling法による陽性部位は正常の重層扁平上皮の陽性に相当する部位, すなわち角質層直下部の核, 癌真珠形成部の周囲に認められたが, 局在は正常の上皮に比較して多い傾向にあった(写真5)。さらに, 癌細胞の浸潤部などの上皮の角化とは無関係の部位や, 癌細胞巢の周辺部の細胞の一部にも陽性反応が認められ, 癌細胞巢周囲の炎症性細胞に多数の陽性所見が観察された(写真6)。同部でのLe^y抗原の局在は, 基

本的には正常の扁平上皮と同様に基底細胞層相当部以外のすべての層の細胞に認められたが, 細胞膜のみならず細胞質内にも局在する傾向にあった。明らかな腫瘍の浸潤部では, 基底細胞類似の細胞にも強い陽性反応が認められた(写真7)。

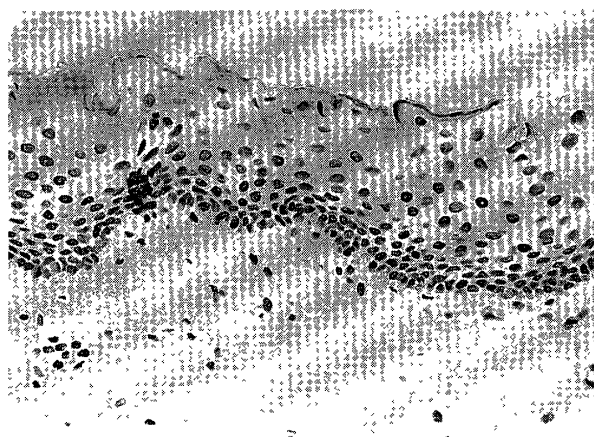


写真1 DNA nick end labeling法の陽性対照。DNaseで処理するとすべての核が陽性反応を示す。

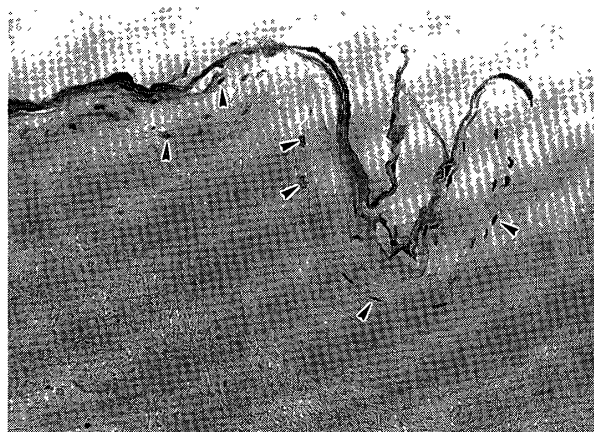


写真2 DNA nick end labeling法。正常口腔上皮では, 錯角化重層扁平上皮の角質層に存在する核, ならびに角質層直下部の核の一部に陽性反応がみられる(矢印)。

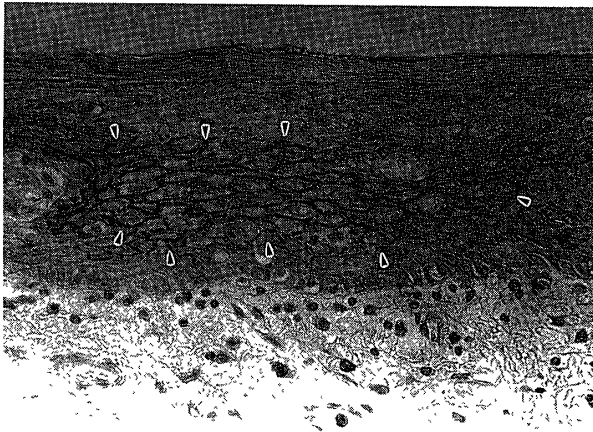


写真3 Le^y抗原の免疫組織化学染色。
正常口腔上皮での局在は、重層扁平上皮の基底細胞上層からの角質層下部にわたる細胞膜上にみられる (矢印)。

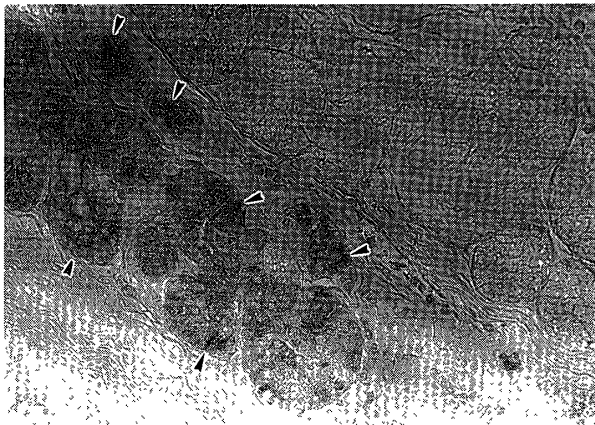


写真4 Le^y抗原の免疫組織化学染色。
既存の唾液腺組織では漿液性腺房に陽性反応がみられ (矢印)、粘液性腺房は陰性である。

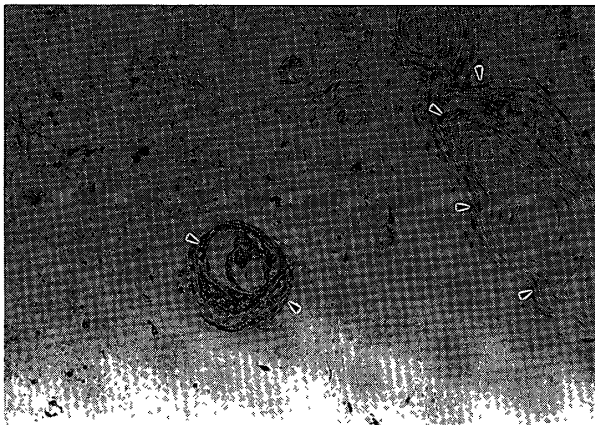


写真5 DNA nick end labeling法。
扁平上皮癌での陽性部位 (矢印) は、角質層直下部の核、癌真珠形成部の周囲に認められたが、局在は正常の上皮に比較して多い傾向にある。



写真6 DNA nick end labeling法。
癌細胞の浸潤先端の一部にも陽性反応がみられる (矢印)。

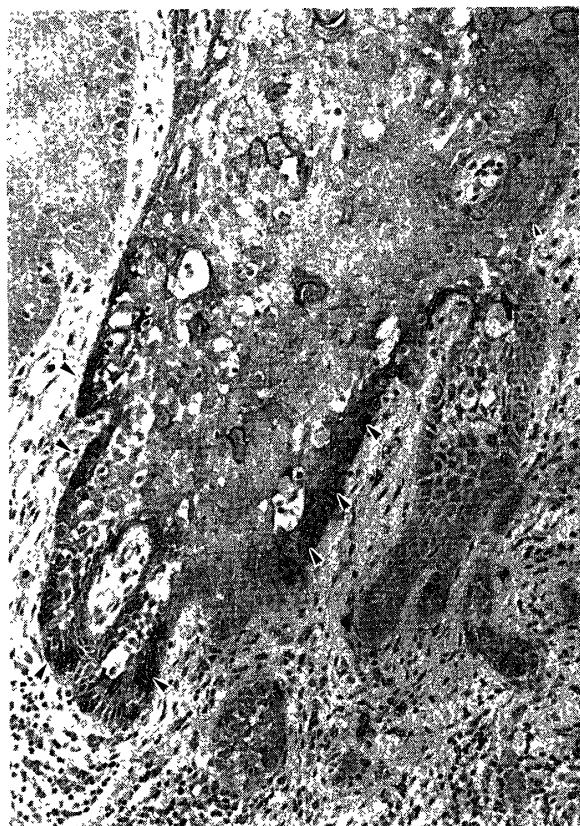


写真7 Le^y抗原の免疫組織化学染色。
腫瘍の浸潤先端部では、基底細胞類似の細胞にも強い陽性反応が認められる(矢印)。

考 察

アポトーシスが壊死とは大きく異なることは、壊死による細胞の変化はまずミトコンドリアなどの細胞小器官の膨張からはじまり、細胞質、細胞膜に変化が起きるのに対し、アポトーシスでは、はじめにDNAの断片化という明らかな変化が起こることである²⁾。Gavrieliら³⁾によって報告されたDNA nick end labeling法はTdT-mediated dUTP-biotin nick end labelingの頭文字をとってTUNEL法とも呼ばれるが、文字通り断片化したDNAの末端を標識する方法である。今回の検索もわれわれの先の報告⁵⁾と同様に、通常ホルマリン固定、パラフィン包埋切片で比較的ばらつきの少ない結果を得ることができた。今後、病理組織学的診断に有用な方法となりうると思われる。

Le^y抗原はLewis式血液型物質の一つであり、糖脂質、糖蛋白質の糖鎖が抗原決定基となっているが、ガラクトースとNアセチルグルコサミンが1～4結合し、これにフコースが付加されることにより形成される⁶⁾。赤血球膜だけでなく上皮細胞などの全身の多くの細胞に存在し、特に抗原の発現と癌化に注目した多数の報告がみられる⁷⁻¹⁰⁾。先頃、Hiraishiら⁴⁾によるこのLe^y抗原の局在がアポトーシス部と一致しているとの報告から、日本抗体研究社がLe^yをアポトーシス関連抗原BM-1/JIMROとして抗Le^y抗体の市販を開始した。われわれは、口腔領域の組織において抗Le^y抗体(BM-1/JIMRO, 日本抗体研究社製, 徳島)を用いDNA nick end labeling法の結果と比較検討した。正常口腔粘膜上皮では、DNA nick end labeling法によるDNAの断片化が錯角化重層扁平上皮の角質層に存在する核ならびに角質層直下部の核に確認され、重層扁平上皮の分化に伴うアポトーシスと一致していた。しかし、Le^y抗原の局在はこれよりも広範囲の細胞層、すなわち口腔粘膜上皮では重層扁平上皮の増殖する細胞である基底細胞層以外の上層の細胞膜に観察された。この局在は細胞の増殖、分化という観点から、増殖する細胞以外の細胞に認められたと言えるが、アポトーシスとするにはあまりにも広範囲であると考えられた。さらに、唾液腺組織では、漿液性腺房には一様に陽性反応がみられたが、粘液性腺房には観察されず、陽性反応とアポトーシスとを関連づけるのは困難で、抗Le^y抗体の認識する糖鎖の差によるものと考えられた。扁平上皮癌では、極性の消失に伴い角化傾向を示す周囲以外にもDNAの断片化が認められ、Le^y抗原の局在も極性の消失に伴い広い範囲に認められたが、細胞レベルで観察すると局在は細胞膜のみならず、細胞質中にも認められた。この点に関して、Dabelsteenら⁸⁾は同様に口腔扁平上皮癌のLe^y抗原の局在について、むしろ細胞膜

よりも細胞質内にみられるものが大部分であるとの報告をしている。このことは、細胞内で産生されたLe^yをはじめとする糖鎖が、癌化に伴い、細胞間接着蛋白と同様に細胞膜へ到達せずに停滞していることによると思われた。また、癌細胞の浸潤先端部では、角化に関係なくDNAの断片化もLe^y抗原の局在も一部で観察された。このことは両者の局在様式に共通性のあることを示唆しており、2重染色や、連続切片などにより細胞レベルで、両者の一致部位の有無をさらに詳細に検索する必要があるものと思われた。しかしながら、正常の組織では上述の如く、Le^y抗原の局在がアポトーシスとは矛盾のある結果も観察され、Le^y抗原をアポトーシス関連抗原と言及することには疑問が残された。

結 論

口腔粘膜上皮および扁平上皮癌を用いDNA nick end labeling法と抗Le^y抗体 (BM-1/JIMRO)を用いた免疫組織化学染色の結果を比較検討し、以下の結論を得た。

1. 正常口腔粘膜上皮におけるDNA nick end labeling法による結果はアポトーシス部に一致していた。
2. 正常口腔粘膜上皮における血液型関連抗原であるLe^y抗原の局在は必ずしもアポトーシス部に一致していなかった。
3. 特に唾液腺組織の同抗原の局在よりアポトーシスとの関連は唾液腺組織では否定的であった。
4. 扁平上皮癌では両者の局在様式に一致する部位がみられ、Le^y抗原とアポトーシスとの関連を示唆するものであったが、さらなる検討が必要と思われた。

謝 辞

本研究において、抗Le^y (BM-1/JIMRO) 抗体を用いた免疫組織化学染色とDNA nick end labeling法

にご協力頂いた当教室の矢上子臨床検査技師に感謝致します。

参考文献

1. Wyllie, A. H. : Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284:555-556, 1980.
2. Ardens, M. J. and Wyllie, A. H. : Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32:223-254, 1991.
3. Gavrieli, Y., Shyman, Y. and Ben-Sasson, S. A. : Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.* 119:493-501, 1992.
4. Hiraishi, K., Suzuki, K., Hakomori, S. and Adachi, M. : Le^y antigen expression is correlated with apoptosis (programmed cell death). *Glycobiology* 3:381-390, 1993.
5. Abiko, Y., Ohuchi, T., Nakahata, H., Sadaoka, T., Kanda, M. and Kaku, T. : In situ labeling of nuclear DNA fragmentation in normal oral epithelia and squamous cell carcinomas. *Jpn. J. Oral Biol.* in press.
6. Sakamoto, J., Watanabe, T., Tokumura, T., Takagi, H., Nakazato, H. and Lloyd, K. O. : Expression of Lewis^a, Lewis^b, Lewis^x, Lewis^y, sialyl-Lewis^a, sialyl-Lewis^x blood group antigen in human gastric carcinoma and in normal gastric tissue. *Cancer Res.* 49:745-752, 1989.
7. Kim, Y.S., Yua, M., Itzkowitz, S.H., Sun, Q., Kaizu, T., Paleker, A., Trump, B.F. and Hakomori, S. : Expression of Le^y and extended Le^y blood group-related antigens in human malignant, premalignant and nonmalignant colonic tissues. *Cancer Res.* 46: 5985-5992, 1986.
8. Dabelsteen, E., Clausen, H., Holmstrup, P. and Reibel, J. : Premalignant and oral lesions are associated with changes in the glycosylation pattern of carbohydrates related to ABH blood group antigens. *APMIS*, 96: 813-819, 1988.
9. Hellström, I., Garrigues, H.J., Garrigues,

U. and Hellström, K.E. : Tumor-reactive,
internalizing, mouse monoclonal antibodies to

Le^x-related cell surface antigens. Cancer
Res. 50:2183-2190,1990.