

【198】

氏名	富澤 洪基
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1865号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	口腔前癌病変および扁平上皮癌におけるApoptosisと関連抗原に関する検討
論文審査委員	教授 永井教之 教授 松村智弘 教授 菅原利夫

学位論文内容の要旨

〔緒言〕

ApoptosisはNecrosisとは異なり制御された細胞死であり、細胞の分化、個体の恒常性の維持や様々な病変との関与が示されている。また近年、発癌過程には癌細胞の増殖能の調節機構の異常が関与しているがそれだけではなくApoptosisが重要な因子となっていることが示唆されつつある。一方、Apoptosisの誘導因子の一つであるP53蛋白は、その異常が口腔癌を含めヒト癌の約半数で生じており、発癌段階においてもApoptosis誘導に重要な関与をしていると考えられる。そこで本研究ではヒト臨床検体(口腔前癌病変および扁平上皮癌)とハムスターを用いた実験的舌癌発癌モデルにおけるApoptosisをTUNEL(TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling)法にて検索し、さらにP53蛋白の発現との関連および細胞増殖能を検討した。またApoptosisの別誘導経路であるFas-FasLigand system、前癌病変との比較として前癌状態とされる口腔扁平苔癬についても一部検討を加えた。

〔材料ならびに方法〕

1. 実験対象：岡山大学歯学部附属病院第二口腔外科を受診し、病理組織学的に口腔上皮異形成(Dysplasia, 33例)、扁平上皮癌(SCC, 41例)、扁平苔癬(OLP, 56例)、と診断された症例の生検材料と健常口腔粘膜上皮(Normal, 10例)を対象とした。
実験動物は5週齢の雄ゴールデンハムスターを使用し、藤田らの方法に従い9,10-dimethyl-1,2-benz anthrasen (DMBA)0.5%アセトン溶液を舌に一週間3回長期塗布を行い発癌させた。実験期間中15週目で屠殺した群20例、30週で屠殺した群20例とした。また、対照群としてアセトン液のみ塗布し、15週、30週に摘出した各5例を用い、正常上皮として放置飼育群10例を設け材料に供した。
各材料は、10%ホルマリン固定・パラフィン包埋した後、薄切切片を作成した。
3. 検索方法：通常H-E染色に加え、Apoptosisの検索としてApoptag Kit(ONCOR社)によるTUNEL法染色を用い、TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase)反応(37℃、60分)後、DABによる呈色反応を行った。免疫組織化学染色は、ENVISION System (DAKO社)を使用し一次抗体として抗P53抗体(DAKO社)、抗PCNA抗体(NOVOCASTRA社)、抗Fas抗体(DAKO社)、抗Fas Ligand抗体(Nitirei社)を300倍希

希釈、16時間以上反応を行った。次にEnvisionポリマー試薬を室温で反応させDABにて呈色した。光学顕微鏡視野で各抗原の発現を観察するとともに、上皮細胞におけるTUNEL陽性細胞ならびにPCNA陽性細胞の割合(%)を算定し、TUNEL陽性細胞標識率(TUNEL Index, T.I.)、ならびにPCNA標識率(PCNA Labeling Index, P.I.)とした。これらのデータをもとに臨床的、組織学的因子と、T.I., P.I.、また、それぞれ各抗原との関係をStudent's t検定及び χ^2 検定を用い、統計学的な検討を行った。

[結果及び考察]

1. ヒトにおいてはP.I.はNormal、Dysplasia、SCCと徐々に増加し、SCCで最も高値を認めたのに対し、T.I.はDysplasia(Mild)でやや高値を示し、SCCで大きく低下した。P53蛋白はDysplasiaで発現を示し、SCCで最も多く発現する傾向を認めた。P53蛋白の発現例ではDysplasia、SCCともにT.I.が低下し、P.I.が増加する傾向を認めたため、P53蛋白の過剰発現症例では、細胞増殖能およびApoptosisの制御にP53蛋白の異常が関与している可能性が示唆された。
2. ヒトSCCにおける臨床的な検討においては、T.I.は、高・中分化型のものでやや高く、P.I.は逆に、低分化型ならびに頸部転移陽性例において高値を認めた。T.I./P.I. ratioでは、転移陽性例、浸潤傾向の強いもので有意に低値を示したためSCCにおいて高PCNA Labeling Index及び低TUNEL Indexの症例では、高悪性度を反映する事が示唆された。
3. Fas蛋白はヒトNormalにおいて発現を多く認めDysplasiaにおいてやや低下し、SCCにおいてはもっとも陽性症例数が低下していた。また、Fas Ligand蛋白は逆にNormalで最も低くDysplasia, SCCの順に発現レベルは上昇をしたため、SCCにおいて、FasはDown Regulation、Fas LigandはUp Regulationの機構が働いている事が示唆された。
4. ヒトOLPにおいてはTUNEL陽性細胞が基底細胞層からも出現を認めたが、病理的な基底層融解に由来するものと考えられた。T.I., P.I.はNormalに比べ、明らかな差は認めなかったため細胞増殖能、Apoptosis誘導には大きな変化はないものと思われた。
5. ハムスター発癌モデルは、15週屠殺群は全例Dysplasia、30週屠殺群は全例SCCであり、その増殖能、Apoptosis所見は臨床検体とほぼ同様な結果を認めた。すなわち、P.I.はNormal、Dysplasia、SCCと徐々に増加し、T.I.はSCCで大きく低下した。P53蛋白の発現例では陰性例に比しDysplasia、SCCともにT.I.が低下し、P.I.が増加する傾向を認めた。これにより、ヒト発癌過程でもApoptosis、細胞増殖能の動態は同様であった可能性が示唆された。

[結論]

1. 上皮異形成および扁平上皮癌ではP53蛋白、Fas, Fas Ligandを介するApoptosisの経路が関与していることが示唆された。
2. ヒト扁平苔癬では臨床動態と同様、細胞増殖能、Apoptosisの観点から悪性化する確率は低いと考えられた。
3. 発癌過程においては、細胞増殖能は段階的に亢進し、Apoptosisは上皮異形成では誘導され扁平上皮癌では回避される制御が働いていることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は発癌過程におけるApoptosisと細胞増殖という相反する現象を、ヒト臨床材料（口腔前癌病変および扁平上皮癌）とハムスターの実験的舌癌発癌モデルを用いてTUNEL(TdT-mediated dUTP biotin nick end labeling)法にて検索し、発癌過程の細胞動態を検討したものである。また、これらへ関連深いP53蛋白、および、Apoptosisの別誘導経路であるFas-Fas Ligand systemについても検討を加えている。その結果、

1. 上皮異形成および扁平上皮癌ではP53蛋白、Fas、Fas Ligandを介するApoptosisの誘導が関与していることが示唆された。
2. ヒト扁平苔癬では臨床動態と同様、細胞増殖能、Apoptosisの観点から悪性化する確率は低いと考えられた。
3. 発癌過程においては、細胞増殖能は段階的に亢進し、Apoptosisは上皮異形成では誘導され扁平上皮癌では回避される制御が働いていることが示唆された。

以上の内容は、発癌過程における細胞動態の一端を明らかにするものであり、今後、口腔癌の臨床的病態、さらに治療法の研究を行うに当たり重要な知見であると評価できる。

よって、本申請論文は学位論文の価値に足るものと認める。