

氏名	玉 村 亮
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 8 7 2 号
学位授与の日付	平成 17 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	口腔扁平上皮癌の病理発生・病態におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の免疫組織化学的研究
論文審査委員	教授 佐々木 朗 教授 山本 敏男 教授 永井 教之

### 学位論文内容の要旨

#### 【目的】

口腔癌の病理発生や浸潤の過程においては上皮・間質の境界部に存在する基底膜の分解が不可欠である。基底膜は IV 型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどから構成されている。その中でも主要な基底膜の構成成分で骨格構造を成すのは IV 型コラーゲンであり、その消失が癌細胞の浸潤において特に重要であるといわれている。

IV 型コラーゲンは $\alpha$ 鎖から成るトリプルヘリックス構造をとっており、近年、 $\alpha 1 \sim \alpha 6$  鎖の 6 種類の分子種が同定されている。皮膚の上皮基底膜は [ $\alpha 1$ (IV)] $2\alpha 2$ (IV)、[ $\alpha 5$ (IV)] $2\alpha 6$ (IV) の 2 つの組み合わせから構成されているという報告があるが、口腔粘膜上皮の基底膜 IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の構成については知られていない。

これまで口腔扁平上皮癌の病態や病理発生については浸潤様式や組織分化型により解析されているが、IV 型コラーゲン各 $\alpha$ 鎖の動態による解析の報告はない。

本研究では口腔粘膜上皮における基底膜 IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の構成を明らかにすると共に、口腔扁平上皮癌における IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖及び IV 型コラーゲンを特異的に分解する MMP の局在を免疫組織化学的に検索し、病理発生、組織分化型との相関について検討した。

#### 【材料・方法】

岡山大学医学部歯学部附属病院病理部口腔病理診断部門で扱った扁平上皮癌 30 例、初期浸潤癌 10 例、上皮内癌および上皮異形成 10 例を対象とした。また、正常粘膜上皮 5 例を対照として用いた。得られた材料を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液にて固定し、パラフィン包埋後、 $4 \mu\text{m}$  の連続切片を作製したものを病理組織学的および免疫組織化学的に検索を行った。又、一部の材料については 2% グルタールアルデヒド液と 2% パラホルム液による前固定、1% オスミウム液による後固定後、エポン樹脂包埋し電顕観察を行った。

#### 免疫組織化学的検索

$\alpha$ 鎖の検索にはラットリンパ節法により作製された抗ヒト Type IV collagen  $\alpha 1 \sim 6$  各鎖に対するモノクローナル抗体（重井医学研究所より供与）、IV型コラゲナーゼの検索には抗ヒト MMP-2 抗体、抗ヒト MMP-9 抗体（第一ファインケミカル）をそれぞれ一次抗体として用い、ABC 法により染色を行った。

#### 【結果】

##### (1) 正常口腔粘膜

正常口腔粘膜の基底膜では、IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の局在は $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖すべて陽性であった。 $\alpha 3$ 鎖および $\alpha 4$ 鎖の局在は認められなかった。尚、本研究で扱った全ての組織において $\alpha 3$ 鎖、 $\alpha 4$ 鎖は陰性を示した。

##### (2) 扁平上皮癌に至る基底膜 IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の変化

上皮異形成： $\alpha$ 鎖の局在は正常口腔粘膜と同様で $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖すべて陽性であった。MMP の局在は認められなかった。

上皮内癌： $\alpha$  1鎖， $\alpha$  2鎖のみが局在を示し、 $\alpha$  5鎖， $\alpha$  6鎖の局在が認められなかつた。 $\alpha$ 鎖の消失部位に一致して MMP の局在を認めた。

一方、時に $\alpha$ 鎖が正常口腔粘膜と同様の局在を示すものの、連続した太い帯状構造を呈する例を認め、電顕的には基底膜 (lamina densa) の多層構造として認められた。

初期浸潤癌：上皮下との境界部において各 $\alpha$ 鎖は局在が認められず、癌細胞内に MMP の局在を認めた。

### (3) 扁平上皮癌における $\alpha$ 鎖の動態

#### ①高分化型および中分化型扁平上皮癌

病巣中央部：癌胞巣周囲においては、 $\alpha$ 鎖は多くが正常口腔粘膜基底膜と同様の局在を示し、MMP-2、9 ともに発現は弱かつた。また、癌胞巣周囲の基底膜においてこれまでとは異なる $\alpha$ 1鎖， $\alpha$ 2鎖陰性、 $\alpha$ 5鎖， $\alpha$ 6鎖陽性の局在様式が認められた。

浸潤先端部：多くが $\alpha$ 鎖は陰性を示し、癌細胞や周囲の線維芽細胞に MMP-2、9 の著明な発現を認めた。

#### ②低分化型扁平上皮癌

多くの癌胞巣周囲で $\alpha$ 鎖は陰性を示した。また MMP-2、9 の発現は弱く、ほとんど認められなかつた。

また浸潤様式（山本・小浜の分類）と $\alpha$ 1鎖全体の分布からみると、1型から4D型にグレードが上がるに従って $\alpha$ 1鎖の消失が著明であつた。

## 【結論】

①口腔粘膜上皮基底膜における IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の構成は $\alpha$ 1鎖， $\alpha$ 1鎖， $\alpha$ 2鎖と $\alpha$ 5鎖， $\alpha$ 5鎖， $\alpha$ 6鎖の組み合わせであると考えられた。

②口腔扁平上皮癌の病理発生においては、MMP による上皮基底膜 IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の分解が生じていた。癌化に伴い $\alpha$ 5鎖， $\alpha$ 6鎖の分解、次いで $\alpha$ 1鎖， $\alpha$ 2鎖の分解が生じることによって、浸潤が開始されることが示された。

癌化に際し基底膜の過形成も生じており、異型上皮細胞の機能亢進と考えられた。

③口腔扁平上皮癌における IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の動態は組織分化型と密接に関連し、高分化型、中分化型が低分化型より $\alpha$ 鎖の形成能を有していた。

高分化型、中分化型の浸潤先端部では $\alpha$ 鎖の分解が、低分化型では $\alpha$ 鎖の未形成が認められ、癌の浸潤と密接に関係することが示唆された。

$\alpha$ 5鎖， $\alpha$ 6鎖のみからなる胞巣周囲の異常形成基底膜は、悪性腫瘍の特徴の1つと考えられた。

以上のことから、口腔扁平上皮癌では、上皮及び胞巣周囲基底膜において、IV 型コラーゲン $\alpha$ 鎖の形成や分解が生じ、病理発生、組織分化型と密接に関連していることが示された。

## 論文審査結果の要旨

口腔癌の病理発生や浸潤の過程においては、上皮・間質の境界部に存在する基底膜の分解が不可欠である。基底膜はIV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどから構成されている。その中でも主要な基底膜の構成成分で骨格構造を構築しているのはIV型コラーゲンであり、その消失が癌細胞の浸潤において特に重要であるといわれている。

IV型コラーゲンは $\alpha$ 鎖から成るトリプルヘリックス構造をとっており、近年、 $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 鎖の6種類の分子種が同定されている。

本研究は口腔粘膜上皮における基底膜IV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の構成を明らかにすると共に、口腔扁平上皮癌におけるIV型コラーゲン $\alpha$ 鎖及びIV型コラーゲンを特異的に分解するマトリックスメタロプロテナーゼ(MMP)の局在を免疫組織化学的に検索し、病理発生、組織分化型との相関について検討している。

その結果、正常口腔粘膜基底膜においては $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ 鎖陽性であり皮膚同様の構成を示した。

口腔扁平上皮癌の病理発生においては、癌化に伴い、まず $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ 鎖の分解、次いで $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ 鎖の分解が生じることによって、癌細胞の浸潤が開始されることを明らかにしている。癌化に際し基底膜の過形成も生じており、電顕的にlamina densaの層状構造を認めている。これらは異型上皮細胞の機能亢進と考察している。

一方、口腔扁平上皮癌の組織分化型との相関について、IV型コラーゲン $\alpha$ 鎖の動態とMMPの局在を検討している。高分化型と中分化型では、病巣中央部と浸潤先端部では、形成と分解が生じていることを明らかにしている。高分化型、中分化型の浸潤先端部では主として $\alpha$ 鎖の分解が生じ、低分化型では $\alpha$ 鎖が未形成であると考察している。時に癌胞巣周囲でみられる、主として $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ 鎖からなる異常形成の基底膜は、口腔扁平上皮癌の特徴と考えられた。

これらの知見は、口腔扁平上皮癌の病理発生、病態、浸潤のメカニズム解明の一端を担う、基礎研究として価値のある研究業績である。よって本論文は博士（歯学）の学位論文の価値に足るものと認めた。