

口腔の白板症と扁平上皮癌における p53 経路中の p14 と mdm2 の発現に関する研究

岡 田 玲 子

Study on expressions of p14 and mdm2 proteins on the ARF-p53 pathway in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas

Reiko Okada

(平成13年1月17日受付)

I. 緒 言

最近の約20年間の癌研究の進歩の中で、多くの癌関連遺伝子が、単離され、また同定されてきた。ヒトの発癌や悪性化に関与する癌遺伝子は、既に極めて多くの種類が、また癌抑制遺伝子も20数種が発見されている。近年、癌化のシグナルは細胞周期と深く関与した RB 経路と p53 経路の 2 つに集約されているが¹⁻⁷⁾ (図 1)、中でも癌抑制遺伝子である p53 は、種々の要因によって活性化されて、細胞周期、アポトーシス、DNA 修復などの諸因子により、正常細胞の悪性化を制御している^{8,9)}。

mdm2 は p53 と結合して、p53 の転写活性を阻害するが^{10,11)}、この mdm2 は p53 の分解を促進することが明らかとなり、正常 p53 の分解によって癌抑制能を低下させることから癌遺伝子として機能していると考えられている¹²⁾。p53 自体は mdm2 の転写を活性化して生じる mdm2 によってその作用が抑制されることから、p53 と mdm2 はフィードバックの機構に関与している¹³⁻¹⁷⁾。すなわち、p53 と mdm2 は機能的抑制の相互関係を形成しているが、mdm2 蛋白の過剰発現は、プロテアソームで p53 を分解する癌遺伝子産物として働き、この mdm2 は発癌過程に重要な役割を演じていることが推定されている。

p14ARF は、mdm2 と結合して p53/mdm2/p14ARF から成る 3 量体を形成するが、p14ARF の発現が上昇することによって mdm2 を不安定化させる^{18,19)}。この結果、タンパク質レベルで p53 を間接的に安定化させ、

かつ蓄積させることによって癌抑制遺伝子として作用することが考えられている^{20,21)} (図 2)。p14ARF は、細胞に腫瘍原性の変異が生じたときに、UV やストレスなどによる p53 の活性化には無関係に、その発現が誘導される。一方、正常型 p53 は p14ARF の転写を制御する。すなわち、通常の細胞では、p53 は mdm2 と結合して、p14ARF を抑制することにより発現量が低く抑えられていると考えられる。

現在、p53 蛋白を中心として、その上流と下流に存在するシグナル分子や修飾分子の存在が解明されつつあるが、この相関的意義に関しては、いまだに不明な点も多く、現在、癌の発生や細胞の悪性化の機構は遺伝子変異やタンパク分解との関係によって解明されねばならぬ時代に入っている。

本研究では、口腔の白板症とその悪性化例、また扁平上皮癌の増殖や浸潤能、またその臨床病態を推定する根拠として、p53 経路に着目し、p53 の上流に位置する遺伝子産物である p14ARF と下流に位置する遺伝子産物の mdm2 を指標とし、これらの発現様相が、癌化や腫瘍細胞の増殖に及ぼす影響を及ぼしているかを検索した。

II. 被験対象と実験方法

1. 被験対象

口腔の扁平上皮癌や、前癌病変である白板症における p53, mdm2 および p14 の発現様相を明らかにし、これらの発現状態と臨床病態の所見との相関性を検討するため、広島大学歯学部附属病院第二口腔外科 (1993 年～2000 年) において、生検または外科手術時に切除された口腔扁平上皮癌 96 例と白板症 56 例を被験対象とした。これら生検または手術時の切除物は、10%中性

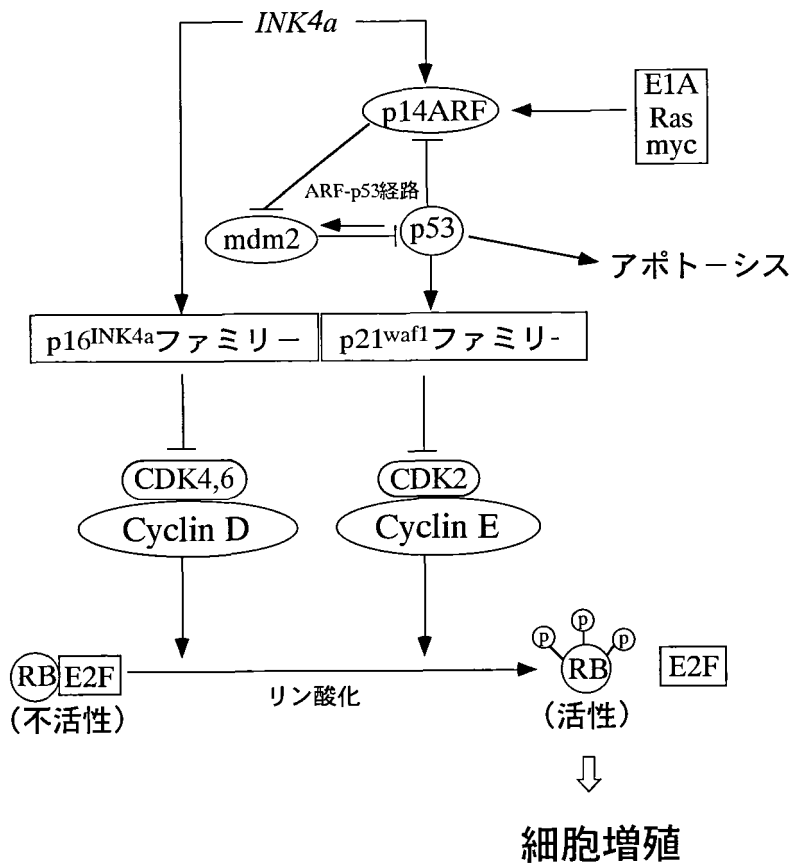


図1 G1/S期におけるRBタンパク質リン酸化とCDK阻害タンパク質、p53との関係

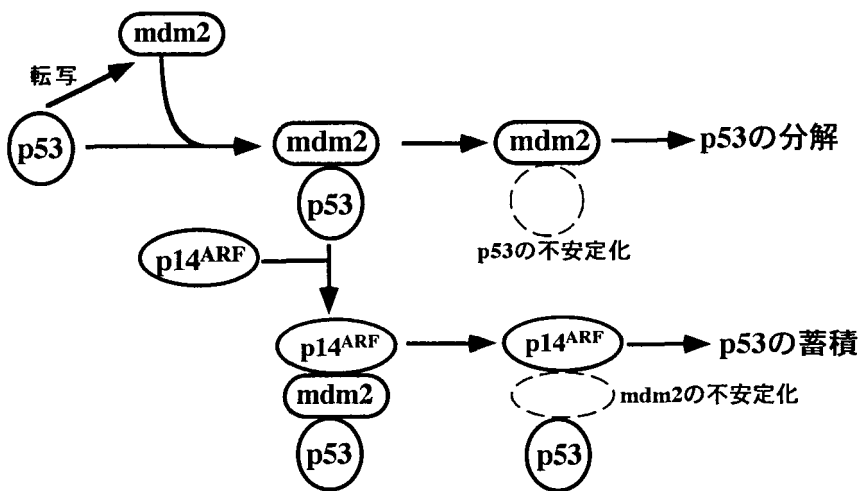


図2 p14ARFによるmdm2の不安定化とp53の安定化

緩衝ホルマリン固定後、通法に従い、パラフィン包埋したものである。

口腔扁平上皮癌の患者の平均年齢は65.8歳であったが、男性58例（平均62.0歳）、女性38例（平均69.6歳）であった。なお、原発部位や治療による影響を可及的に避けるため、96例の扁平上皮癌例は全て原発巣のもので、化学療法や放射線治療を受ける以前の未治療群のものを選定した。部位別では、舌42例、歯肉38例、口底8例、頬粘膜4例、口唇4例であった。UICCの分類法では、T1 28例、T2 33例、T3 13例、T4 22例であった。

白板症の56例は、その予後を検討し、経年後に発癌したことが判明した例を癌化群とし、この群と非癌化群との比較対照としての実験を行った。

なお、対照群の口腔粘膜組織として、埋伏智歯抜去時の歯冠周囲歯肉を26例、口腔扁平苔癬21例を前述のホルマリン固定パラフィン包埋した切片を用いた。

p53, mdm2 および p14 の発現様相を検索するために、ヒト口腔癌由来培養細胞株9株（HSC2, HSC3, HSC4, HSY, Ca9-22, KB, KSA, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1）を用いた。なお、これらの実験に供した細胞株として、腺癌株の HSY²²⁾ は、徳島大学歯学部 佐藤光信教授から分与され、また他の細胞株は Japanese Research Resources Bank (JCRB) より供与されたものであり、また、腺様嚢胞癌由来株 KSA²³⁾ は、当科で樹立したものである。各細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) (Boehringer Mannheim, Germany) を含む Dulbecco 変法 Eagle's MEM (ニッスイ製薬, 東京) を用い、5% CO₂-incubator 内で 37°C の環境で継代培養したものを、実験に供した。

2. 実験方法

1) p53, mdm2, p14 の免疫組織化学的検索法

免疫組織化学的検索は、抗 p53 抗体 (NCL-P53-DO-7, Novocastra Newcastle upon Tyne, UK), 抗 mdm2 抗体 (NCL-MDM2-IF-2, Novocastra Newcastle upon Tyne, UK), 抗 p14 抗体 (p14ARF, SMP14, c-18: sc-8613, Santa Cruz Sio., INC., CA) および Vectastain ABC Kit (Vector, California, USA) により、ABC 法を用いて検索した。抗体の希釈倍率等は、表1に示す条件とした。

免疫組織化学的検索の手順は、表2に示す通りとし、また p53 の染色評価は、癌細胞における陽性細胞を算定し、その判定基準は10%以上の細胞陽性率を示す例を陽性例と判定した。mdm2 と p14 の染色評価は、上皮細胞または癌細胞における陽性細胞および間質細胞の核における陽性例を算定したが、mdm2 と p14 の陽

表1 免疫組織科学的検索法 (ABC 法) に用いた一次抗体

抗体	抗体名 (希釈倍率)
抗ヒト p53 抗体	DO-7, Novocastra (1/200)
抗ヒト mdm2 抗体	IF-2, Novocastra (1/100)
抗ヒト p14 抗体	SMP14, C-18: SC-8613, Santa Cruz (1/100)

p53, mdm2 はモノクローナル抗体

p14 はポリクローナル抗体

表2 免疫組織科学的検索法 (ABC 法) の手順

1. p53 (DO-7, monoclonal)	
1.	脱パラフィン, 水洗
2.	0.3%過酸化水素水を含むメタノール (室温, 30分)
3.	マイクロウェーブ処理 (クエン酸バッファー, 10分, 1回)
4.	10%ウマ正常血清 (室温, 30分)
5.	一次抗体 (1:200 に希釈, 室温, 30分)
6.	マウスビオチン標識抗マウス免疫グロブリン (室温, 30分)
7.	ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (室温, 30分)
8.	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) による発色
9.	ヘマトキシリンによる counter staining
2. mdm2 (IF-2, monoclonal) p14 (SMP14, sc8613, polyclonal)	
1.	脱パラフィン, 水洗
2.	0.3%過酸化水素水を含むメタノール (室温, 30分)
3.	マイクロウェーブ処理 (クエン酸バッファー, 10分, 1回)
4.	10%ウマ正常血清 (室温, 30分)
5.	一次抗体 (1:100 に希釈, 4°C, 一晚)
6.	mdm2 にはマウスビオチン標識抗マウス免疫グロブリン (室温, 30分) p14 にはマウスビオチン標識抗ヤギ免疫グロブリン (室温, 30分)
7.	ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (室温, 30分)
8.	3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) による発色
9.	ヘマトキシリンによる counter staining

性細胞の判定基準は、陽性に染色された例のすべてを陽性例として判定した。白板症組織では、前述の癌化群と、非癌化群の間で比較検討したが、染色陰性例の対照群としては、一次抗体に正常マウスのIgGを用いて染色した。

2) Western blot 法による p53, mdm2, p14 タンパクに関する検索法

ヒト口腔癌由来培養細胞株9株 (HSC2, HSC3, HSC4, HSY, Ca9-22, KB, KSA, Ho-1-N-1, Ho-1-u-1) を被験対象とした。これら株細胞から, lysis buffer [50mM Tris-HCl (pH7.4), 125 mM NaCl, 0.1% Nonident P-40 (NP-40; Sigma Chemical Co.), 5 mM EDTA, 0.1M NaF, 10 μ g/l leupeptin (Sigma Chemical Co.), 0.1 μ g/ml trypsin inhibitor (Sigma Chemical Co.), 50 μ g/ml Phenylmethylfonyl fluoride (和光純薬)] を用いて, タンパクを抽出した²⁴⁾。これらのタンパク濃度は, Bradford protein assay (Bio-rad) により測定した。なお, Western blot 法では, 免疫染色に用いた抗体と同じ抗体を使用した (表3)。各細胞株から抽出した 50 μ g の蛋白は, Laemmli's sample buffer に溶解し, p53 は

表3 Western blot 法に用いた一次抗体

抗体	抗体名 (希釈倍率)
抗ヒト p53 抗体	DO-7, Novocastra (1/500)
抗ヒト mdm2 抗体	IF-2, Novocastra (1/500)
抗ヒト p14 抗体	SMP14, C-18: SC-8613, Santa Cruz (1/500)

p53, mdm2 はモノクローナル抗体
p14 はポリクローナル抗体

10%, mdm2 は8.5%, また p14 は12.5%の sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel によって電気泳動し, ニトロセルロースメンブレン上に転写した。フィルターは, 5%スキムミルクを含む PBS buffer (137 mM NaCl, 8.1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 2.68 mM KCL, 1.47 mM KH_2PO_4) を使用して, 4°C で1時間のインキュベートを行った。2次抗体には, peroxidase-coupled goat anti-mouse antibody (MBL) を用い, 室温で1時間のインキュベートを行った。さらに, ECL Western blotting detection system (Amersham) により, X線フィルム上でオートラジオグラフィを行った。

III. 実験結果

I. 免疫組織化学的検索結果

I-1) 正常および各病変における p53, mdm2, p14 の発現様相

1) 正常歯肉: p53 は, 基底細胞層を中心に免疫活性がみられた (図3-A)。mdm2 と p14 は有棘細胞層を中心に陽性反応が強くみられたが, 上皮下結合組織には mdm2 の免疫活性は認められなかった (図3-B, C)。

2) 口腔扁平苔癬: p53 は, 基底細胞層を中心に陽性所見を呈した (図4-A)。mdm2 は, 上皮細胞の核に陽性を示すと同時に, 上皮下の間質細胞にも活性がみられた (図4-B)。なお, p14 は, 上皮細胞核にのみ, 陽性所見がみられた (図4-C)。

3) 口腔白板症: p53 は, 基底細胞層を中心に陽性所見を呈した (図5-A, 6-A)。しかし, mdm2 と p14 は, 基底細胞層の染色所見に比較すると, 有棘細胞層を中心として陽性所見がより強くみられた (図5, 6-B, C)。また, mdm2 は, 白板症の癌化群における上皮下結合

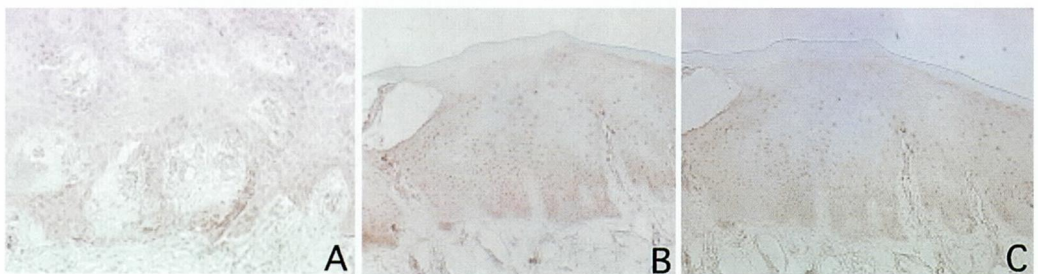


図3 正常歯肉組織における p53, mdm2, p14 の発現

A: p53 (×200)

基底層を中心に陽性反応を示した。

B: mdm2 (×200)

有棘層を中心に陽性を示し, 上皮下結合組織には mdm2 の免疫活性は認められなかった。

C: p14 (×200)

有棘層を中心に陽性を示し, 上皮下結合組織には p14 の免疫活性は認められなかった。

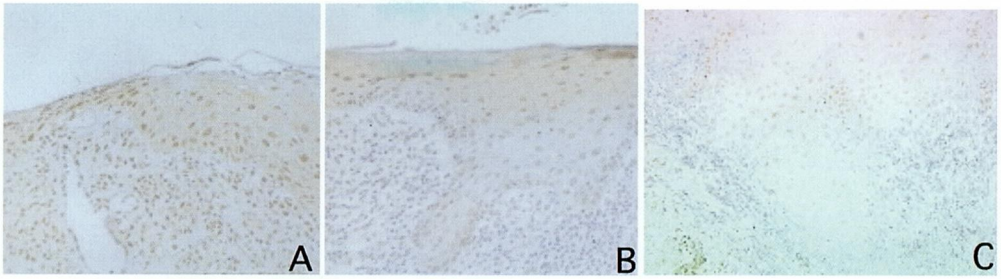


図4 口腔扁平苔癬における p53, mdm2, p14 の発現

A : p53 (×200)

基底層を中心に陽性を示した。

B : mdm2 (×200)

上皮細胞の核に陽性を示し、同時に上皮下の間質細胞にも mdm2 の活性がみられた。

C : p14 (×200)

上皮細胞の核のみに陽性所見を示した。

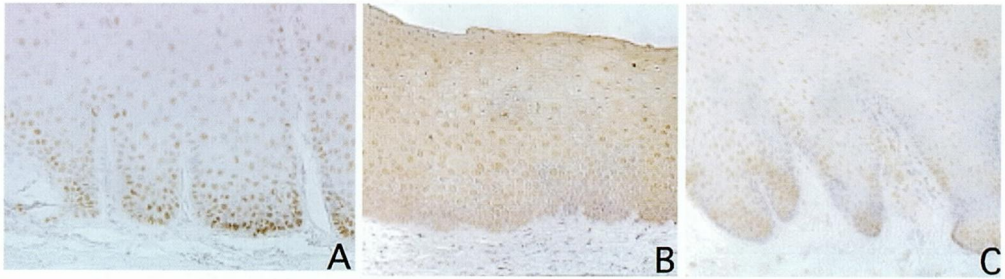


図5 口腔白板症・非癌化群における p53, mdm2, p14 の発現

A : p53 (×200)

基底層を中心に陽性を示した。

B : mdm2 (×200)

有棘層を中心に陽性を示した。

C : p14 (×200)

有棘層を中心に陽性を示した。



図6 口腔白板症・癌化群における p53, mdm2, p14 の発現

A : p53 (×200)

基底層を中心に陽性を示した。

B : mdm2 (×200)

有棘層を中心に陽性を示した。

C : p14 (×200)

有棘層を中心に陽性を示した。

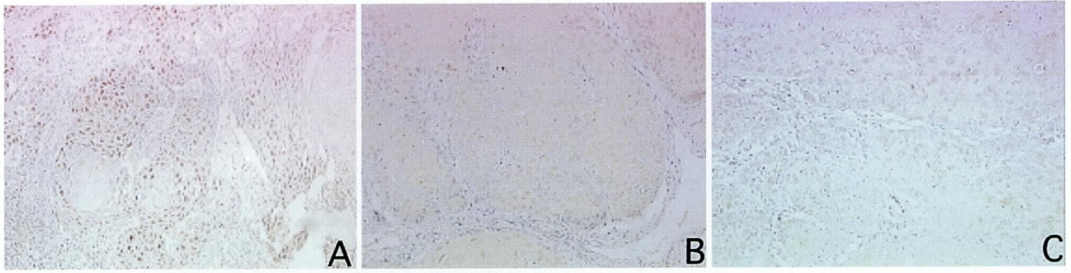


図7 口腔扁平上皮癌における p53, mdm2, p14 の発現

A : p53 (×200)

腫瘍細胞の核に活性を示した。

B : mdm2 (×200)

腫瘍細胞の核に活性が認められ、特に有棘層を中心に陽性を示した。
また、間質細胞にも陽性所見がみられた。

C : p14 (×200)

腫瘍細胞の核に活性が認められ、特に有棘層を中心に陽性を示した。

織と扁平上皮癌の間質細胞には陽性所見を呈した (図 6-B)。

4) 口腔扁平上皮癌 : p53 は、腫瘍細胞の核のみに免疫活性が認められたが (図 7-A), mdm2 と p14 は、腫瘍細胞の核により強い活性がみられた (図 7-B, C)。

I-2) 正常および各病変における p53, mdm2, p14 の発現率

1) 正常歯肉 : 正常歯肉での p53, mdm2, および p14

の発現率は、各々 7.7, 92.3 および 92.3% であった (表 4)。

2) 口腔扁平苔癬 : この病変での p53, mdm2, および p14 は各々 25.0, 81.0 および 33.3% の発現率であった (表 4)。

3) 口腔白板症 : p53, p14 および mdm2 の発現率は、各々 23.2, 44.6 および 56.0% であり、異型度別にこれら各発現様相をみると、p14 のみが細胞異型度に関

表4 正常口腔歯肉組織、口腔扁平苔癬、口腔白板症、口腔扁平上皮癌における p53, mdm2 および p14 の発現

	p53	mdm2		p14		
		上皮層 (部)	間質	上皮層 (部)	間質	
正常口腔歯肉組織	2/26 (7.7)	24/26 (92.3)	2/26 (7.7)	24/26 (92.3)	2/26 (7.7)	
口腔扁平苔癬	5/20 (25.0)	17/21 (81.0)	17/21 (81.0)	7/21 (33.3)	3/21 (14.3)	
口腔白板症	13/56 (23.2)	25/56 (44.6)	20/56 (35.7)	28/50 (56.0)	24/50 (48.0)	
[軽度異型	3/15 (20.0)	9/15 (60.0)	7/15 (46.7)	9/13 (69.2)	7/13 (53.8)	
	7/33 (21.2)	11/33 (25.0)	10/33 (30.3)	16/30 (53.3)	14/30 (46.7)	
	高度異型	3/ 8 (37.5)	5/ 8 (66.7)	3/ 8 (37.5)	3/ 7 (42.8)	3/ 7 (42.8)
[非癌化例	5/31 (16.1)	14/31 (45.2)	8/31 (25.8)	20/28 (71.4)	15/28 (53.6)	
	癌化例	8/25 (32.0)	11/25 (44.0)	12/25 (48.0)	8/22 (36.4)	9/22 (40.9)
口腔扁平上皮癌	42/96 (40.8)	45/96 (46.9)	44/96 (45.8)	22/96 (22.9)	38/96 (39.5)	
[高分化型	27/62 (43.5)	29/62 (46.8)	29/62 (46.8)	17/62 (27.4)	29/62 (46.8)	
	中分化型	14/29 (48.3)	14/29 (48.3)	13/29 (44.8)	5/29 (17.2)	10/29 (34.5)
	低分化型	1/ 5 (20.0)	2/ 5 (40.0)	2/ 5 (40.0)	0/ 5 (0)	0/ 5 (0)
[T 1	13/28 (46.4)	16/28 (57.1)	16/28 (57.1)	6/28 (21.4)	11/28 (57.1)	
	T 2	14/33 (42.4)	16/33 (48.5)	16/33 (48.5)	10/33 (36.4)	14/33 (48.5)
	T 3	2/13 (15.4)	2/13 (15.4)	3/13 (23.1)	2/13 (7.7)	4/13 (30.8)
	T 4	13/22 (56.5)	11/22 (50.0)	9/22 (36.4)	4/22 (18.2)	9/22 (40.9)

p53 の発現は、10%以上の腫瘍細胞の核が陽性を示すものを positive、10%以下を negative とした。
mdm2, p14 の発現は、上皮細胞または癌細胞および間質の核が陽性を示すものを positive とした。

連して発現する傾向がみられた。すなわち、異型度の強い例ほど、その発現率は低下した（表4）。

4) 口腔白板症の非癌化群と癌化群：非癌化群と経年後に癌化した群を大別すると、これらにおける p53 の発現率は、各々16.1%と32.0%であり、癌化群では高い発現率を示した。一方、p14 は、各々71.4%と36.4%の発現率であり、癌化群での発現率は、Shaffe の F 検定によると、1%以下の危険率で、有意に低下していた。mdm2 の発現率は、この両者間では統計的に著明な有意差はなかった（図8）。

5) 口腔扁平上皮癌：p53, p14 および mdm2 の発現率は、各々40.8, 46.9および22.9%であった。分化度別にみると、分化度が低いものほど、p14 の発現率は低値を示した（表4）。分化度別における mdm2 と p14 の同時陽性例は、分化度の低下例ほど減少しており、ま

た低分化癌にはみられなかった。一方、mdm2 陽性と p14 陰性を示す例の発現頻度と組織分化度には強い関連性はなく、また mdm2 陰性例における p14 の発現頻度と組織分化度にも一定の関係はみられなかった（図9）。

6) 各種因子の発現：以上の発現様相を総合して考えると、正常歯肉、白板症の非癌化群と癌化群、および扁平上皮癌になるにつれ、すなわち、異常細胞が増加するにつれて、p53 の発現率は増加した。逆に p14 は、Shaffe の F 検定によると、正常歯肉と癌化例、扁平上皮癌および非癌化例と癌化例、また非癌化例と扁平上皮癌の群間には、5%以下の危険率で、有意に低下していた。mdm2 は、正常歯肉での発現率が最も高く、各病変群間では相関する傾向はなかった（図8）。

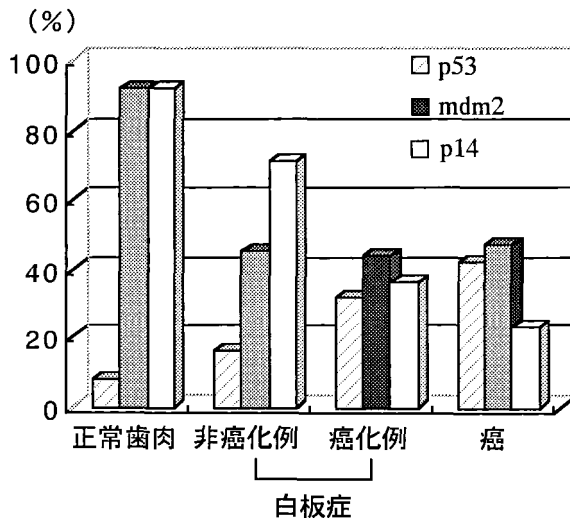


図8 各病態での p53, mdm2, p14 の発現率

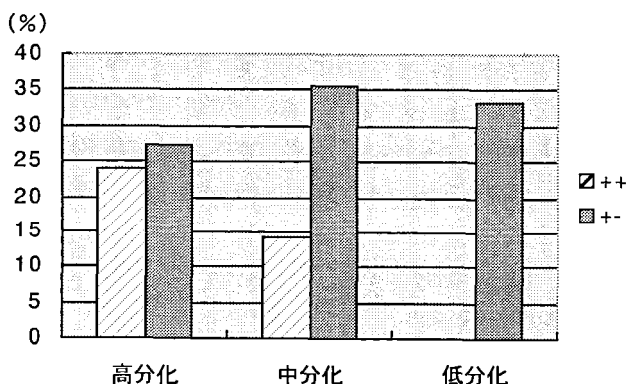


図9 口腔扁平上皮癌における分化度別の mdm2 と p14 の相関性

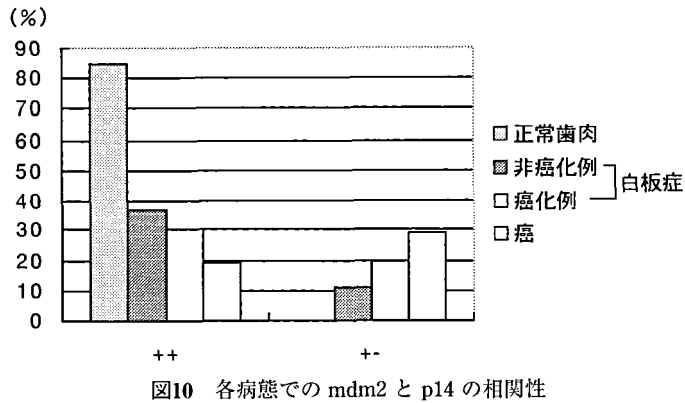


図10 各病態での mdm2 と p14 の相関性

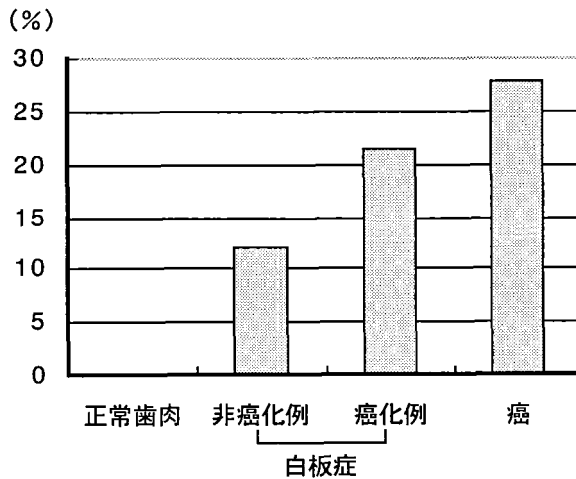


図11 各病態での p53(-), mdm2(+), p14(-) 例の発現率

7) mdm2 と p14 の相関性：mdm2 と p14 が同時に陽性を示した例は、正常歯肉、白板症の非癌化群と癌化群、および扁平上皮癌では、各々約85%、37%と30%および19%であり、病変の悪性化につれてその発現率は低下した。一方、mdm2 が陽性で、p14 が陰性の例は、逆に増加した。mdm2 が陰性例での p14 の発現頻度と各病変間には相関する現象はなかった (図10)。

8) 正常型 p53 の mdm2 と p14 の相関性：p53 に変異のない正常型 p53 を示す例での mdm2 と p14 の相関関係を知るため、p53 陰性例で mdm2 と p14 の関係を検討した。この結果、mdm2 が陽性で p14 陰性の例は、細胞の悪性化につれて、その発現率は増加したが、正常歯肉にはみられなかった (図11)。これ以外の mdm2 と p14 の組み合わせ条件において、各病変間に見られる傾向は現状では明瞭ではなく、また p53 陽性例の同様な検討でも、関連する傾向はなかった。

9) 各病変の間質における mdm2 の発現率：本研究の遂行過程において、病態の変化に応じて間質での免疫活性に変化がみられたことから、上皮-間質性の関係を検索する必要性が生じた。白板症における間質細胞の mdm2 陽性率は、非癌化群と癌化群では、各25.8と48.0%であり、癌化群の方が高値を示した。扁平上皮癌の T 分類で、T1, 2, 3 と 4 では各57.1, 48.5, 23.1と36.4%であり、早期癌例 (52.5%) では進行癌例 (37.1%) に比べ、それらの発現率は高かった。対照の扁平苔癬20例中17例 (85%) は粘膜上皮下の結合織に帯状に浸潤するリンパ球では mdm2 が陽性 (81%) であったが、正常歯肉の間質細胞には mdm2 は7.7%にしか陽性反応を示さなかった (図12)。

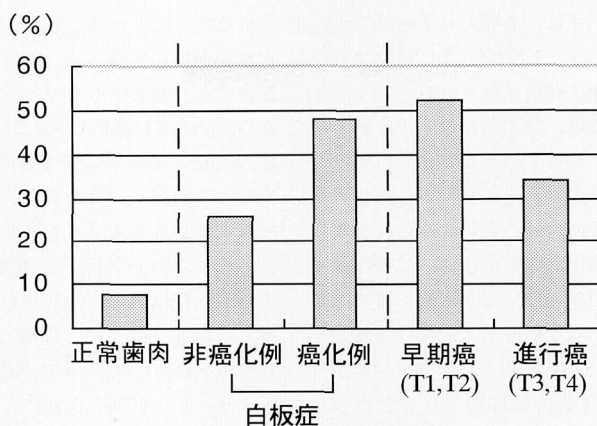


図12 各病態における間質での mdm2 発現様相

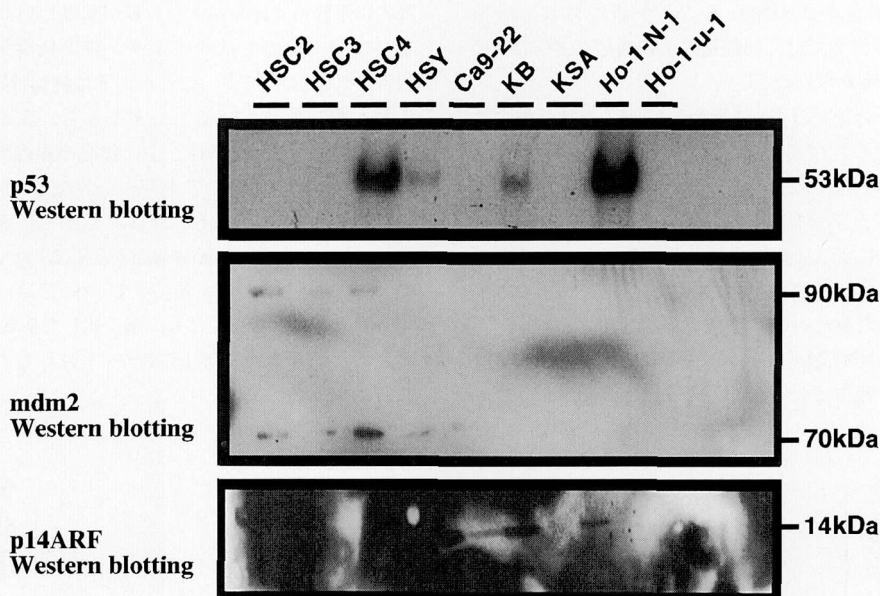


図13 口腔癌由来培養細胞株における p53, mdm2 および p14ARF の発現
p53 蛋白は 53 kDa, mdm2 蛋白は 90 kDa と 70 kDa, p14ARF 蛋白は 14 kDa に発現がみられた。

2. 口腔癌由来培養細胞株における p53, mdm2, p14 タンパクの発現結果

ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞株 (HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, KB, Ho-1-N-1, Ho-1-U-1) 7 株のうち, HSC4, Ca9-22, KB, Ho-1-N-1 の 4 株に p53 蛋白が発現した。mdm2 蛋白は 3 株 (HSC2, HSC3, HSC4) に, また p14 は 3 株 (Ca9-22, KB, Ho-1-N-1) に発現した。しかし, p14 と mdm2 の両方が同時に陽性であった例は, 口腔扁平上皮癌由来培養細胞株にはなかった。また, 対象としたヒト唾液腺腺癌由来培養細胞株 (HSY,

KSA) 2 株のうち, HSY には, mdm2 と p14 が同時発現したが, p53 蛋白はいずれの株にも発現しなかった (図13)。

IV. 考 察

1. 口腔扁平上皮癌における ARF-p53 経路の異常について

1) 免疫組織化学的検索結果に関する考察
癌の発生や細胞の悪性化過程には, 種々な癌関連遺伝子の異常が関与すると推測されている。癌抑制遺伝

子として知られる p53 遺伝子は、各種のヒト癌種で高頻度に変異や欠失をしていることから²⁵⁻²⁸⁾、腫瘍マーカーとして、多くの癌研究に利用されている。

変異型の p53 遺伝子産物は、野生型の遺伝子産物に比べて、半減期は延長しており、その安定化のために悪性腫瘍細胞の核内に異常蓄積することが知られている²⁹⁾。この結果、種々の腫瘍でその発現のみられることが報告されている。癌細胞に高発現している p53 は変異型 p53 であることが判明しているが、大多数の口腔扁平上皮癌においても同様であることが報告されている³⁰⁾。すなわち、細胞に DNA 損傷や他のストレスが関与すると、その分解が選択的に抑制されて変異型 p53 の量が著明に増加し、核内に蓄積することになる。この結果、変異型 p53 は免疫染色法によって検出が可能となる。頭頸部の扁平上皮癌では、50%以上の症例に p53 の異常が認められることが報告されているが³¹⁻³³⁾、本研究では、口腔扁平上皮癌の40.8%の例に p53 の異常がみられた。

ユビキチン経路の E3 酵素として p53 を特異的にユビキチン化し、プロテアソームでの分解を促進する mdm2³⁴⁾ は、多くの癌や肉腫でその異常が検出されているが³⁵⁻⁴⁵⁾、正常型 p53 の分解による癌抑制能を低下させることによって癌遺伝子として作用していると考えられている¹²⁾。頭頸部腫瘍では、この癌遺伝子に関する報告は未だ少ないのが現状である⁴⁶⁻⁵⁰⁾。

また、癌抑制遺伝子である p14 は、頭頸部癌では現在のところ報告はない。

そこで、p53, mdm2 および p14 の各因子の相互的発現様相の関係を調べることは癌発生機序を推定する一助となり、意義あるものと考えた。本実験の検索結果から、p53 は上皮基底層および基底膜側の細胞核に、また mdm2 と p14 は、正常歯肉や口腔の扁平苔癬、白板症では有棘層に、また扁平上皮癌では、上皮の中間層に分布や局在することが認められた。p53 経路で相互的に働くこれら各因子を免疫染色により検討すると、その局在性は異なった様相を呈し、増殖に関与すると考えられる mdm2 は、増殖力がより強い基底細胞層には染色されなかった。p53 経路の下流では、一般に、サイクリン E と CDK2 が複合して RB 蛋白をリン酸化し、また、RB 経路の下流では、サイクリン D と CDK4,6 が複合化して、RB 蛋白をリン酸化することによりこれを不活化して、細胞周期を S 期へ進行させている⁵¹⁻⁵²⁾。既に腺系腫瘍ではサイクリン E が発現しやすいことが、また扁平上皮癌ではサイクリン D の発現することが報告されており⁵³⁻⁵⁴⁾、これら因子は臓器特異性のあることも報告されている⁵⁵⁾。すなわち、正常な口腔扁平上皮では、RB 経路は、主に細胞や組織の増殖に働き、p53 経路は代謝やアポトーシスなどに関与している可能性があると考えられる。しかし、癌の発生や進行に伴って、p53 経路に異常が生じるのか、p53 経路の異常によって癌化するのかについては、現時点では不明である。少なくとも、悪性化した病変では、p53 経路も異常な細胞増殖に関与しているものと推測される。

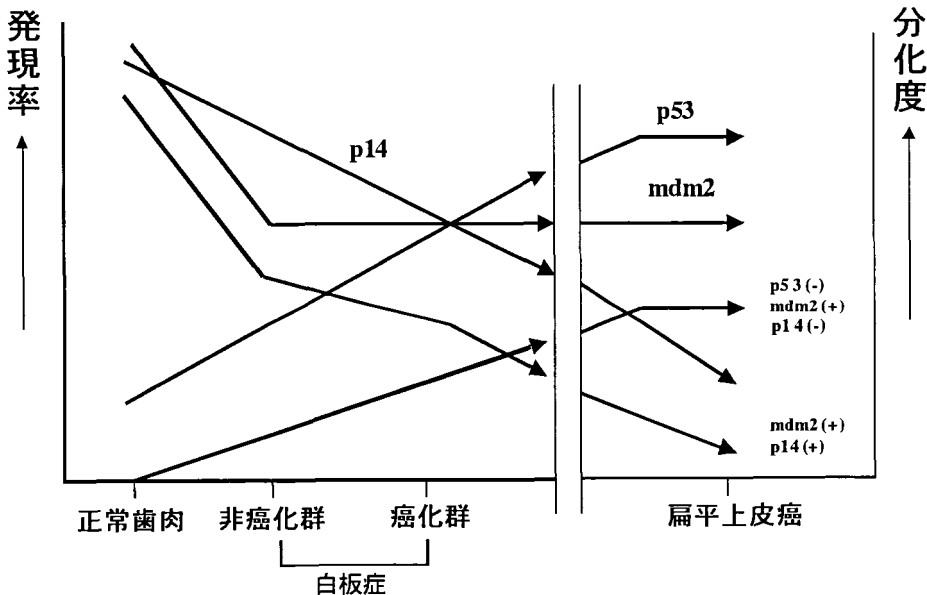


図14 各因子の病態による発現率の推移

正常歯肉組織、口腔扁平苔癬、白板症の非癌化群と癌化群、また口腔扁平上皮癌へと細胞学的悪性化が進行するに伴い、p53の発現率は増加したが、p14は逆に減少した(図14)。本研究において、特にp14の発現が有意に低下した事実は、p14の癌抑制機能の変異または低下が癌化への裏付けを示す結果であり、またp53経路に生じた変異に起因するものと考えられた。一方、正常組織で最も高い発現率を示したmdm2を、正常組織から前癌病変に移行した段階でのものと比較により、その発現率の低下したことは言えるが、各病変や病変間でのmdm2の発現率のみからではそれらの相関性は推定できなかった(図14)。正常歯肉では、mdm2は増生力のより強い基底細胞層には染色反応はみられず、有棘層細胞を主体に強く染色されたことから細胞の増生に関連する結果ではなく、主にアポトーシスなどの代謝や細胞分化に伴う反応に働いている可能性があると推測された。細胞や組織が悪性化することにより、これらの代謝に異常の生じた結果、mdm2の発現が低下したことが推察された。ヒトの発癌では癌抑制遺伝子p53の変異が重要な因子となることは事実と思われるが、癌抑制遺伝子単独の失活によって癌化するかどうかは課題である。癌抑制遺伝子を破壊したマウスの実験結果では、それ自体ではすべての細胞が癌化しないことが判明していることから、癌遺伝子の活性化も同時に必須であるとの見解が有力であると考えている。

骨肉腫では、p53の遺伝子異常が頻発するが、p53の異常がみられない骨肉腫⁴¹⁾では、p53タンパク質の分解促進に関与するmdm2が過剰に発現し、両者間で、逆相関を示した報告もみられる⁴²⁾。しかし、本実験では、口腔扁平上皮癌において、この両者間の発現に相関性は認めなかった。p14はmdm2を抑制し、かつ間接的にp53を安定化させていると考えられる。機能的に正常なp53を発現しているにもかかわらず、ある細胞では異常増殖している原因を調べるために、p53が陰性であった例を対象に、mdm2とp14の相互関係を検索した結果、mdm2の単独発現例は、正常組織や病変の悪性化に伴い、増加した(図14)。

p53変異の発現の有無が予後因子として治療効果の判定に応用できるか、または癌の早期診断のマーカーとなり得るかについては、既に報告されており、またそのp53変異の検出法に関しても報告がある。今回の結果を考え併せると、mdm2はp53やp14との組み合わせによって、前癌病変から癌化に移行したことの示唆指標となり得るものと期待される。

白板症は、前癌病変とされているが、経年後に癌化する例と癌化しない例があり、臨床的にも鑑別ができ

ないのが現状である。本研究から非癌化群と癌化群の比較によってp14に発現差がみられたことは、白板症の予後を推定する上で有用なマーカーになり得ることが期待できる。

本研究では、間質にもmdm2やp14の免疫陽性反応を示した。この結果に関しては、ウエスタンブロット法による結果から、抗体の特異性には問題がなかったと考えている。mdm2もp14も正常組織に存在しているが、癌特異的な物質ではないことから、生理的に要求される事態になると、発現するものと考えられる。各病変と病態の間質におけるmdm2の発現様相を検索すると、正常歯肉ではmdm2が発現しなかったのに対して、白板症の非癌化群では25.8%、癌化群では48.0%の発現率であり、癌化例群が明らかに高値を示した。間質での染色性は一定の傾向を示しており、非特異的免疫反応とは考えられない。癌化例群でのT分類別の発現率は、各々57.1、48.5、23.1と36.4%であった。すなわち、早期癌の方が、進行癌に比べて、mdm2の発現が有意に高い発現率を示した。上皮組織と間葉系組織は互いに応答しあって増生や再生への細胞分化をしていることはよく知られた事象である。正常組織の間質には7.7%しか発現しないmdm2が上皮の悪性化につれて発現する傾向のみられた現象は、間質が上皮の悪性変化に対応して発現した反応結果と考えられる。すなわち、上皮の分化や再生に間質の増生する必要性を考えると、生体の防御反応としての可能性が強く考えられた。

2) Western blot 法に関する考察

口腔扁平上皮癌由来培養細胞株(HSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, KB, Ho-1-N-1, Ho-1-u-1)7株のうち、既にHSC2, HSC3, HSC4, Ca9-22, Ho-1-N-1, Ho-1-u-1にはp53遺伝子の変異が報告されているが、今回の研究結果では、HSC4, KB, Ca9-22, Ho-1-N-1にp53タンパクの発現が認められた。本来、数分以内に発現と減弱の行われるはずのp53が分解されずに、異常蓄積していることが推定され、p53遺伝子に何らかの変異の生じていることが示唆された。一方、p14は癌遺伝子の活性化によって転写が促進され、mdm2の不活化によってp53の安定化が誘導されることが報告されている。しかし、本研究では、口腔扁平上皮癌由来培養細胞株には、mdm2とp14が同時に発現した株はなく、唾液腺癌由来培養細胞株1株のみにこの現象がみられた。一般的に増殖が緩慢といわれる唾液腺腫瘍のみに、*in vitro*であったとしても、mdm2タンパクとp14タンパクが同時に発現した例がみられ、口腔扁平上皮癌にみられなかった結果は、異常増殖の一因として、mdm2とp14の相互関係が消失している可能性が推測

された。

p14 は ras 遺伝子や myc 遺伝子によっても誘導されること、また、ras 遺伝子や myc 遺伝子の変異は癌組織では高頻度に発現する例の多いことが、既に報告されている⁵⁶⁾。しかし、本研究では、口腔扁平上皮癌では p14 の発現が、癌化により減少した。いずれにせよ、p14 の発現にも異常が生じ、悪性化につれて p53-ARF 経路でのこれら三者間の関係において、mdm2 と p14 の相互作用が消失や欠落してゆく可能性が推測された。

上皮細胞の分化発育に対しては、まず間質の増生の必要は、前述のごとく多くの生物学的事象から知られている。この現象は、細胞や組織の悪性化に対する生体防衛機構の一環として、ある時期の間質には腫瘍増殖への自己制御にも参加する可能性も示している。

V. 結 論

I. 口腔の扁平上皮癌96例と白板症56例における癌関連遺伝子 (p53, mdm2, p14) の発現を免疫組織化学的に検索し、p53 経路での異常の有無を検討した。

1. p53, mdm2, p14 の発現率は、白板症で各23.2, 44.6, 56.0%であり、p14 のみが細胞異型度と相関性を示し、異型度の強いほど、その発現率は低下した。非癌化例では、各々71.4, 36.4%であり、癌化例では有意に低下した。

扁平上皮癌では、各40.8, 46.9, 22.9%で、分化度の低いものほどその発現率は低下した。なお、対照の正常歯肉では、各7.7, 92.3, 92.3%であった。

2. mdm2 と p14 の同時陽性例は、正常歯肉、白板症の非癌化群と癌化群および扁平上皮癌で各85, 37, 30と19%であり、異常細胞の増加につれて低下した。扁平上皮癌では、高、中および低分化組織型で各24, 14.3 および0%であり、分化度の低い例ほど同時陽性率は低下した。

3. p53 の発現しない例のうち、mdm2 陽性で、p14 陰性の例は、正常歯肉、白板症の非癌化群と癌化群および扁平上皮癌で各0, 12, 21.4および27.8%と、悪性度に相関して増加した。

4. 間質におけるmdm2 の発現率は、白板症の非癌化群と癌化群では、各25.8と48.0%で、癌化群が高かった。扁平上皮癌のT分類別では、T1, T2, T3 と T4 では 57.1, 48.5, 23.1と36.4%で、進行例に比べ早期例の発現が高かった。対照の正常歯肉と扁平苔癬における間質の mdm2 の発現率は、各7.7%と85%であった。

II. ヒト口腔扁平上皮癌由来培養細胞株における癌関連遺伝子 (p53, mdm2, p14) の発現をWestern blot 法による検索で検討した。ヒト口腔扁平上

皮癌由来培養細胞株の7株中4株に p53 蛋白が、また mdm2 蛋白と p14 蛋白は3株に発現した。しかし、mdm2 蛋白と p14 蛋白が同時に発現した例はなかった。

以上を総括すると、口腔白板症の悪性化や口腔扁平上皮癌の p53 に対して、mdm2 と p14 の発現が低下するため、ARF-p53 経路に生じる異常は腫瘍増殖機構の一因となる可能性が推定された。また、細胞や組織の悪性化に伴い、生体の自己防衛機構の一環として腫瘍の制御に間質の参加する可能性も示された。

VI. 謝 辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導および御校閲を賜りました広島大学顎口腔医療学講座(口腔外科学第二講座)石川武憲教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究と本論文作成に、貴重な御助言、御校閲を賜りました本学基礎口腔医学講座(口腔生化学講座)加藤幸夫教授ならびに本学応用口腔医学講座(口腔外科学第一講座)岡本哲治教授に深謝いたします。

さらに、本研究を遂行する上で御指導賜りました本学歯学部顎口腔医療学講座(口腔外科学第二講座)原田直講師に謹んで御礼を申し上げますと同時に、多大なるご支援を戴きました本学歯学部顎口腔医療学講座(口腔外科学第二講座)杉山勝助教授をはじめとする同講座の諸先生方、また、特に研究遂行に御助力頂きました道面仁子先生、Ujjal Kumar Bhawal 先生、中川裕之先生、石岡康希先生に感謝致します。

VII. 文 献

- Weinberg RA: The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81, 323-30, 1995.
- Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science*. 274, 1672-7, 1996. Review.
- Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 366, 704-7, 1993.
- Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH: p14ARF links the tumor suppressors RB and p53. *Nature*. 395, 124-5, 1998.
- Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 88, 323-31, 1997. Review.
- Williams BO, Remington L, Albert DM, Mukai S, Bronson RT, Jacks T: Cooperative tumorigenic effects of germline mutations in Rb and p53. *Nat Genet*. 7, 480-4, 1994.
- Ookawa K, Tsuchida S, Adachi J, Yokota J: Dif-

- ferentiation induced by RB expression and apoptosis induced by p53 expression in an osteosarcoma cell line. *Oncogene*. **14**, 1389–96, 1997.
- 8) Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. **88**, 323–31, 1997. Review.
 - 9) Ko LJ, Prives C: p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*. **10**, 1054–72, 1996. Review.
 - 10) Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ: The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell*. **69**, 1237–45, 1992.
 - 11) Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B: Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. **358**, 80–3, 1992.
 - 12) Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingram S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B: Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature*. **362**, 857–60, 1993.
 - 13) Chen J, Lin J, Levine AJ: Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol Med*. **1**, 141–52, 1995.
 - 14) Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M: Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*. **387**, 296–9, 1997.
 - 15) Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH: Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. **387**, 299–303, 1997.
 - 16) Thut CJ, Goodrich JA, Tjian R: Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev*. **11**, 1974–86, 1997.
 - 17) Landers JE, Cassel SL, George DL: Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized Wild-Type p53 Protein. *Cancer Res*. **57**, 3562–8, 1997.
 - 18) Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, Quelle DE, Downing JR, Ashmun RA, Grosveld G, Sherr CJ: Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell*. **91**, 649–659, 1997.
 - 19) Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 suppression pathways. *Cell*. **92**, 725–34, 1998.
 - 20) Promerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee HW: Coedon-Cardoc, Depinho Ra. Chin, Jason Potes, Ken chen, Irene Orlw, Han-Woong Lee, Carlos Cordon-Cardo, and Ronald A. Depinho: The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. **92**, 713–723, 1998.
 - 21) Yanping Zhang, Yue Xiong, Wendell G. Yarbrough: ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the p53 tumor suppression pathways. *Cell*. **92**, 725–734, 1998
 - 22) Yanagawa T, Hayashi Y, Nagamine S, Yoshida H, Yura Y, Sato M: Generation of cells with phenotypes of both intercalated duct-type and myoepithelial cells in human parotid gland adenocarcinoma clonal cells grown in athymic nude mice. *Virchows Archiv B Cell Pathol Incl Mol Pathol*. **51**, 187–95, 1986.
 - 23) Ikemoto K, Murakami K, Yasui A, Ishikawa T, Shimamoto T: Biological properties newly-established cell line (KSA) from human adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Tissue Culture in Dentistry*. **26**, 41–3, 1989.
 - 24) Yasui W, Ayhan A, Kitada Y, Nishimura K, Tokozaki H, Ito H, Tahara E: Increased expression of p34cdc2 and its kinase activity in human gastric and colonic carcinomas. *Int J Cancer*. **53**, 36–41, 1993.
 - 25) Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC: p53 mutations in human cancers. *Science*. **253**, 49–53, 1991. Review.
 - 26) Roderigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP, Gannon JV, Greaves R: p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 7555–9, 1990.
 - 27) Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP: Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J*. **9**, 1595–602, 1990.
 - 28) Martin HM, Filipe MI, Morris RW, Lane DP, Silvestre F: p53 expression and prognosis in gastric carcinoma. *Int J Cancer*. **50**, 859–62, 1992.
 - 29) Kawasaki Y, Monden T, Morimoto H, Murotani M, Miyoshi Y, Kobayashi T, Shimano T, Mori T: Immunohistochemical study of p53 expression in microwave-fixed, paraffin-embedded sections of colorectal carcinoma and adenoma. *Am J Clinical Pathol*. **97**, 244–9, 1992.
 - 30) Sakai E, Tsuchida N: Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*. **7**, 923–33, 1992.
 - 31) Kusama K, Okutsu S, Takeda A, Himiya T, Kojima A, Kidokoro Y, Chu L, Iwanari S, Kudo I, Moro I: p53 gene alterations and p53 protein in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J pathol*. **178**, 415–21, 1996.

- 32) Heinzel PA, Balaram P, Bernard HU: Mutations and polymorphisms in the p53, p21 and p16 genes in oral carcinomas of Indian betel quid chewers. *Int J Cancer*. **68**, 420–423, 1996.
- 33) De Araujo VC, Loyola AM, Pinto Junior DD, Borra RC, De Araujo NS: p53 in biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncology*. **33**, 5–9, 1997.
- 34) Momand J, Zambetti GP: Mdm-2: “big brother” of p53. *J Cell Biochem*. **64**, 343–52, 1997.
- 35) Skomedal H, Kristensen GB, Abeler VM, Borresen-Dale AL, Trope C, Holm R: TP53 protein accumulation and gene mutation in relation to overexpression of mdm2 protein in ovarian borderline tumours and stage I carcinomas. *J Pathol*. **181**, 158–65, 1997.
- 36) Dellas A, Schultheiss E, Almendral AC, Gudat F, Oberholzer M, Feichter G, Moch H, Torhorst J: Altered expression of mdm-2 and its association with p53 protein status, tumor-cell-proliferation rate prognosis in cervical neoplasia. *Int J Cancer*. **74**, 421–5, 1997.
- 37) Ihling C, Haendeler J, Mendel G, Hess RD, Fraedrich G, Schaefer HE, Zeiher AM: Co-expression of p53 and mdm2 in human atherosclerosis: implications for the regulation of cellularity of atherosclerotic lesions. *J Pathol*. **185**, 303–12, 1998.
- 38) Leach FS, Tokino T, Meltzer P, Burrell M, Oliner JD, Smith S, Hill DE, Sidransky D, Kinzler KW, Vogelstein B: p53 Mutation and MDM2 amplification in human soft tissue sarcomas. *Cancer Res*. **53**, 2231–4, 1993.
- 39) Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH: MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. *Cancer Res*. **53**, 16–8, 1993.
- 40) Gorgoulis VG, Zoumpourlis V, Rassidakis GZ, Karameris A, Rassidakis AN, Spandidos DA, Kittas C: A molecular and immunohistochemical study of the MDM2 protein isoforms and p53 gene product in bronchogenic carcinoma. *J Pathol*. **18**, 129–37, 1996.
- 41) Lonardo F, Ueda T, Huvos AG, Healey J, Ladanyi M: p53 and MDM2 alterations in osteosarcomas: correlation with clinicopathologic features and proliferative rate. *Cancer*. **79**, 1541–7, 1997.
- 42) Dei Tos AP, Doglioni C, Piccinin S, Meastro R, Mentzel T, Barbareschi M, Boiocchi M, Fletcher CD: Molecular abnormalities of the p53 pathway in dedifferentiated liposarcoma. *J Pathol*. **181**, 8–13, 1997.
- 43) Pilotti S, Della Torre G, Lavarino C, Di Palma S, GSozzi G, Minoletti F, Rao S, Pasquini G, Azzarrelli A, Rilke F, Pierotti MA: Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *J Pathol*. **181**, 14–24, 1997.
- 44) Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J: The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*. **26**, 3453–9, 1998.
- 45) Capoulade C, Bressac-de Paillerets B, Lefrere I, Ronsin M, Feunteun J, Tursz T, Wiels J: Overexpression of MDM2, due to enhanced translation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells: *Oncogene*. **16**, 1603–10, 1998.
- 46) Matsumura T, Yoshihama Y, Kimura T, Shintani S, Alcalde RE: p53 and mdm2 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oncology*. **53**, 308–12, 1996.
- 47) Stoll C, Baretton G, Lohrs U: The influence of p53 and associated factors on the outcome of patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. **433**, 427–33, 1998.
- 48) Girod SC, Cesarz D, Fischer U, Krueger GR: Detection of p53 and MDM2 protein expression in head and neck carcinogenesis. *Anticancer Res*. **15**, 1453–7, 1995.
- 49) Capaccio P, Carboni N, Pignataro L, Scotti A, Ottaviani F, Pruneri G: Cyclin D1, p53, mdm2, and Ki67 protein expression in preneoplastic lesions of the larynx. *J Chemother*. **9**, 113–4, 1997.
- 50) Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Lurninari S, Capaccio P, Neri A, Buffa R: MDM-2 oncoprotein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: association with wild-type p53 accumulation. *Mod Pathol*. **10**, 785–92, 1997.
- 51) Xiong Y, Zhang H, Beach D: D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*. **71**, 505–14, 1992.
- 52) 松七五三 仁: 哺乳動物細胞におけるサイクリンD依存性蛋白リン酸化酵素活性. *医学のあゆみ*. **171**, 302–5, 1994.
- 53) Akama Y, Yasui W, Yokozaki H, Kuniyasu H, Kitahara K, Ishikawa T, Tahara E: Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res*. **86**, 617–21, 1995.
- 54) Yasui W, Akama Y, Kuniyasu H, Yokozaki H, Semba S, Shimamoto F, Tahara E: Expression of cyclin E in human gastric adenomas and adenocarcinomas: correlation with proliferative activity and p53 status. *J Exp Ther Oncol*. **1**, 88–94, 1996.
- 55) 松尾敬士: 唾液腺腫瘍の増殖に対する癌抑制遺伝子と細胞周期調節因子の影響に関する研究: 広島大学歯学雑誌. **31**, 127–31, 1999.
- 56) Zindy F, Eischen CM, Randle DH, Kamijo T,

Cleveland JL, Sherr CJ, Roussel MF: Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-

dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.* **12**, 2424–33, 1998.