

# Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias

口腔上皮異形成における Ki-67, p63, CK19 および p53 蛋白発現の免疫組織学的評価

鹿児島大学大学院歯学研究科  
(指導教員 杉原一正 教授)

申請者氏名 竹田智郎

## 緒言

口腔粘膜扁平上皮癌の多くは、上皮異形成を経て生じると考えられている。この上皮異形成は、重層扁平上皮細胞の分化と増殖の異常によって生じると考えられており、WHO では、口腔上皮異形成の組織形態学的指標として、13 項目を列挙している。しかし、上皮異形成の構造パターンには触れられておらず、また、異型性の程度についても曖昧な点が残されており、病理形態学的診断が困難な病変でもある。

そのため、異型性の程度に関連する、より客観的な分子マーカーについての研究がなされてきたが、その中で Ki-67 を指標に用いた細胞増殖活性評価と異形成の程度との関連が示唆され、また、重層扁平上皮の幹細胞マーカーとされる p63 の過剰発現が口腔癌の発生に関連するといわれている。しかし、口腔上皮異形成における p63 の発現と異型性の程度との関係は不明であり、また、重層扁平上皮の組織構造、特に基底細胞層や傍基底細胞層における Ki-67 の発現動態についての詳細な知見は乏しいのが現状である。

今回、口腔上皮異形成における増殖細胞および幹細胞の動態を検索するために、Ki-67 および p63 蛋白の発現を基底細胞層、傍基底細胞層、それ以上の細胞層に分けて計測し、異形成の程度と、これらの分子マーカーの発現動態の関連について免疫組織学的検索を行った。また、中等度上皮異形成の一つのパターンとして最近報告された二相性を呈する上皮異形成についても検討した。さらに、癌化の一つの指標と考えられる変異 p53 の発現や幹細胞のマーカーとして CK19 の発現動態も併せて検索した。

## 方法と材料

対象は 1999 年から 2004 年までの 6 年間に鹿児島大学病院を受診した 72 症例で、WHO の指標に基づく診断基準に従い、口腔上皮異形成の程度を軽度、中等度、高度の各群に分類した。また、悪性対照例として上皮内癌症例、正常対照例として異型性が認められない手術断端部と反応性過形成と考えられた症例を用いた。

免疫組織化学的染色は、通法に従い、前処理として圧力鍋を用いた抗原賦活化処理を行った。Ki-67 および p63 陽性細胞数を基底細胞層、傍基底細胞層、それ以上の細胞層毎に計測し、各細胞層の 500 細胞中の陽性細胞数から labeling index を算出した。各症例の細胞層ごとの labeling index の平均値について、各上皮異形成群間の差を検定するために一元配置分散分析法を用い、危険率 1%未満で有意差を判定した。

## 結果と考察

Ki-67 は正常対照例では、傍基底細胞層に多く発現し、基底細胞層には散在性に発現が見られた。中等度以上の上皮異形成では、基底細胞層での発現が多く見られ、傍基底細胞層以上の細胞層にも発現が多く見られた。p63 は正常対照例では基底細胞層に発現が多く見られたが異型性の程度に従い減少し、傍基底細胞層以上の細胞層での発現が増加していた。

各細胞層での Ki-67 の発現を labeling index で見ると、正常対照群も含め各上皮異形成群間では、傍基底細胞層には有意な差は認められずほぼ一定の値を示し、このことは重層扁平上皮では、増殖細胞が傍基底細胞層に存在することを示唆するものと考えられた。また、基底細胞層および傍基底細胞層以上においては、異型性の程度に比例して発現が増加し、正常対照群と二相性上皮異形成および高度異型上皮群間に有意差が認められた。

p63 の labeling index では、基底細胞層における発現が異型性の程度に従って有意に減少した。この様に、上皮異形成では基底細胞層に位置している幹細胞が、基底細胞層での機能を減弱している事が示唆された。

さらに二相性上皮異形成および高度異型上皮群と軽度および中等度異型上皮群との二群に分け、各細胞層での labeling index を比較したところ、Ki-67 は基底細胞層と傍基底細胞層以上の細胞層で有意差が認められ、また、p63 では基底細胞層において有意差が認められた。

p53 陽性症例は高度上皮異形成の 15.4%および上皮内癌の 70%に限局性発現が見られた。CK19 は正常対照例の基底細胞層にのみ発現が見られ、口腔上皮異形成では発現が著しく減弱していた。

この様に、口腔上皮異形成では異型性の程度に従って、増殖細胞と幹細胞の分布が変位し、特に、基底細胞層と傍基底細胞層以上の細胞層での増殖細胞の増加、および基底細胞層での幹細胞の減少が認められ、前癌病変としての口腔上皮異形成を評価する際には、特に基底細胞層および傍基底細胞層における細胞増殖能と幹細胞の状態を把握することが、重要であると考えられた。

(Journal of Oral Pathology & Medicine 掲載予定)

報告番号	歯研第 134号		氏名 竹田 智郎	
論文審査担当者	主査	杉原 一正		
	副査	和泉 雄一	中村 典史	田畑 純

## Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasia

(口腔上皮異形成における Ki-67, p63, CK19 および p53 蛋白発現の免疫組織学的評価)

口腔上皮異形成は重層扁平上皮細胞の分化と増殖の異常により生じると考えられているが、病理組織学的診断が困難な病変でもある。そのため、より客観的な分子マーカーの研究が行われ、Ki-67 を指標とした細胞増殖活性と異形成との関連や p63 の過剰発現と口腔癌の発生との関連が報告されている。しかし、口腔上皮異形成における p63 の発現と異形成の程度との関連や重層扁平上皮の組織構造における Ki-67 の発現動態についての詳細な報告は少ない。

今回、口腔上皮異形成における増殖細胞および幹細胞の動態を検索するために、Ki-67 および p63 蛋白の発現を基底細胞層、傍基底細胞層、それ以上の細胞層に分けて計測し、異形成の程度とこれらの分子マーカーの発現動態の関連について免疫組織学的検索を行った。また、中等度上皮異形成の一つである二相性上皮異形成についても同様な検索を行うとともに癌化の指標として変異 p53 の発現と幹細胞マーカーとして CK19 の発現動態も併せて検索した。

対象は 1999 年から 2004 年までの 6 年間に鹿児島大学病院口腔外科を受診した 72 症例で WHO の指標に基づく診断基準に従い口腔上皮異形成の程度を軽度、中等度、高度の各群に分類した。免疫組織化学的染色は通法に従って行い、Ki-67 および p63 陽性細胞数を基底細胞層、傍基底細胞層、それ以上の細胞層毎に計測し各細胞層の 500 細胞中の陽性細胞数から labeling index を算出した。

その結果、各細胞層での Ki-67 の labeling index は各上皮異形成群間の比較では、傍基底細胞層には有意な差は認められずほぼ一定の値を示した。このことは重層扁平上皮では増殖細胞が傍基底細胞層に存在することを示唆するものと考えられた。また、基底細胞層および傍基底細胞層以上においては異形成の程度に比例して発現が増加し、正常対照群と二相性上皮異形成および高度上皮異形成群間に有意差が認められた。

p63 の labeling index では、基底細胞層における発現が異形成の程度に従って有意に減少した。このことは上皮異形成では基底細胞層に位置している幹細胞が基底細胞層での機能を減弱していることを示唆している。

さらに、二相性上皮異形成および高度上皮異形成群と軽度および中等度上皮異形成群との二群に分け各細胞層での labeling index を比較したところ、Ki-67 は基底細胞層と傍基底細胞層以上の細胞層で有意差が認められ、p63 では基底細胞層において有意差が認められた。

p53 陽性細胞は高度上皮異形成の 15.4% および上皮内癌の 70% に限局性発現がみられ、CK19 は正常対照群の基底細胞層のみ発現がみられ口腔上皮異形成では発現が著しく減弱していた。

以上、口腔上皮異形成では異形成の程度に従って増殖細胞と幹細胞の分布が変化し、基底細胞層と傍基底細胞層以上の細胞層での増殖細胞の増加、基底細胞層での幹細胞の減少が認められた。このことより、前癌病変としての口腔上皮異形成を評価する際には、特に基底細胞層および傍基底細胞層における細胞増殖能と幹細胞の状態を把握することが重要であると考えられた。

以上のことから本研究は前癌病変としての口腔上皮異形成における基底細胞層および傍基底細胞層における細胞増殖能と幹細胞分布の関係を明らかにし、今後のヒト口腔上皮異形成の診断と治療に指標を与えるものと評価できる。

よって、本審査委員会は本論文が学位論文として十分に価値あるものと判定した。

最終試験の結果の要旨および担当者

様式 8

報 告 番 号	歯 研 第 1 3 4 号	氏 名	竹 田 智 郎	
論文審査担当者	主 査	杉原 一正		
	副 査	和泉 雄一	中村 典史	田畑 純
<p>審査委員会は、平成 18 年 6 月 1 日（木）に、上記学位申請者に面接して、学位論文の内容について説明を求めると共に、これと関連する口腔粘膜の前癌病変、上皮異形成、口腔扁平上皮癌の臨床的ならびに病理組織学的特徴などについても試問を行った結果、いずれも満足すべき回答が得られた。</p> <p>以上のことから、申請者は大学院歯学研究科博士課程修了者としての学力と識見を有するものと認め、博士（歯学）の学位を与えるに十分な資格をもつものと判断した。</p>				