

学位論文

Doctor's Thesis

論文名： 唾液腺腺様嚢胞癌における組織型と

基底膜IV型コラーゲン α 鎖分子の発現について

Differential expression of basement membrane type IV collagen

α 1, α 2, α 5 and α 6 chains among the histological subtypes of adenoid cystic carcinoma

著者名

三隅 修治

Shuji Misumi

指導教官

熊本大学大学院医学研究科 博士課程歯科口腔外科学 担当教授

篠原 正徳

審査委員名

- | | | |
|---|----------------|----------|
| 1 | 機能病理学分野担当教授 | 伊藤 隆明 教授 |
| 2 | 細胞病理学分野担当教授 | 竹屋 元裕 教授 |
| 3 | 形態構築学分野担当教授 | 児玉 公道 教授 |
| 4 | 頭頸部感覚病態学分野担当教授 | 湯本 英二 教授 |

目次

要旨	1
Summary	3
発表論文	4
謝辞	5
略号	6
第一章 研究の背景と目的	7
1. 細胞外マトリックスとコラーゲンについて	7
2. 基底膜について	10
3. 癌浸潤と基底膜について	17
4. 腺様嚢胞癌について	20
5. 目的	21
第二章 対象と実験方法	22
1. 対象	22
2. 実験方法	23
i) 組織検体の処理、ホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本の作成	23
ii) 免疫組織化学	23
a) 一次抗体	23

b) 免疫染色の手技	24
c) 免疫染色結果の判定	28
d) Ki-67 の計測法および統計学的処理	28
第三章 結果	29
1. 免疫組織学的検討	29
i) 正常唾液腺導管における免疫染色の結果	29
ii) 腺様嚢胞癌における免疫染色の結果	31
a) 腺管状構造における免疫染色	32
b) 篩状構造における免疫染色	35
c) 充実性構造における免疫染色	37
2. 統計学的検討	38
第四章 考察	40
1. 免疫染色の条件	40
2. 腺様嚢胞癌の免疫染色結果について	41
3. 癌の浸潤と α (IV)鎖の動態について	42
4. 正常唾液腺の発生過程からみた腺様嚢胞癌の組織亜型について	43
参考文献	44

要旨

【目的】

基底膜は上皮と間質の間に存在する膜様構造物で、基底膜の消失が癌の浸潤と密接に関連している事は広く知られている。IV型コラーゲンは基底膜の主要構成成分であり、その α (IV)鎖分子は6種類同定されている。 α 1(IV)鎖、 α 2(IV)鎖は全ての組織の基底膜に認められるのに対し、 α 3(IV)鎖、 α 4(IV)鎖、 α 5(IV)鎖、 α 6(IV)鎖は組織特異的発現を示す。悪性腫瘍における間質浸潤の有無は予後因子の一つであり、その評価は臨床的にも、病理診断学的にも重要である。腺様嚢胞癌におけるIV型コラーゲンの α 鎖の発現に関してはいくつかの報告があるが、サブタイプである α 1(IV)～ α 6(IV)鎖の発現に関する詳細な報告はなく、IV型コラーゲンの消失過程に関しても明らかになっていない。本研究において、正常唾液腺組織における α (IV)鎖分子の特異的発現を基礎的基盤とし、腺様嚢胞癌の組織亜型に伴う α (IV)鎖分子の動態を評価し、サイトケラチン(CK14、CK19)の発現およびKi-67との関連を検討した。

【方法】

腺様嚢胞癌20例の手術材料のパラフィン切片を用い、抗ヒトIV型コラーゲン α 1(IV)～ α 6(IV)鎖分子特異抗体およびCK14、CK19、Ki-67にて免疫染色を行った。

【結果】

正常唾液腺導管においては α 1/ α 2/ α 5/ α 6(IV)鎖は導管基底膜に一致して連続的な発

現を示し、 $\alpha 3/\alpha 4$ (IV)鎖の発現は認められなかった。腺様嚢胞癌の典型的な組織亜型である管状および篩状型の腺様嚢胞癌においては、 $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖に連続陽性の管状構造部位はCK14、CK19、 α -SMAにより明瞭な二相構造を示した。 $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖に不連続陽性あるいは陰性の腫瘍胞巣では、CK14、CK19による二相構造は不明瞭であった。悪性度の高い腺様嚢胞癌の一亜型である充実性型では $\alpha 1/\alpha 2$ (IV)鎖のみ不連続陽性であり、 $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖は完全に陰性を示し、またCK14、CK19による二相性の構造は不明瞭であった。腫瘍胞巣の基底膜の $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖の動態、各組織亜型と腫瘍細胞のKi-67抗体を用いた核分裂能の評価に関する統計学的処理については篩状型腫瘍胞巣基底膜での、 $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖の発現と腫瘍細胞の増殖活性に有意な相関性が認められた。

【結論】

腺様嚢胞癌周囲基底膜におけるIV型コラーゲン $\alpha 5/\alpha 6$ (IV)鎖の発現は、腫瘍細胞の増殖、分化、組織構築と密接に関連している事が示唆された。

Summary

Six distinct α (IV) chains in the basement membrane (BM) of adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary gland were immunohistochemically examined by anti- α (IV) chain specific antibodies, and their expressions were compared to the histologic subtypes and the expressions of CK19, CK14, α -SMA and Ki-67.

In the BM of normal salivary ducts, α 1(IV), α 2(IV), α 5(IV) and α 6(IV) chains were continuously stained, but α 3(IV) and α 4(IV) chains were negative. In the tubular and cribriform subtypes of ACC, tubules with continuous staining of α 5(IV) and α 6(IV) chains showed the biphasic staining pattern among the expressions of CK19, CK14 and α -SMA. However, in cancer cell nests with discontinuous or negative staining of α 5(IV) and α 6(IV) chains the biphasic pattern was ambiguous. In the solid subtype, the staining of α (IV) and α 2(IV) chains was discontinuous, the staining of α 5(IV) and α 6(IV) chains was perfectly negative, and the biphasic staining pattern was unclear. The mitotic activity of cancer cells analyzed by the Ki-67 L.I. was significantly related to the expression of α 5(IV) and α 6(IV) chains in the cribriform subtype.

These results suggest that BM instability with the differential expression of α (IV) chains in ACC closely relates to cell proliferation, cell differentiation and their histologic structure.

発表論文リスト

主論文 1冊

著者名

Shuji Misumi, Ken-ichi Iyama, Yumi Honda, Takao Kitano, Yoshikazu Sado,

Yoshifumi Ninomiya, Masanori Shinohara

論文題

Differential expression of basement membrane type IV collagen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ and $\alpha 6$

chains among the histologic subtypes of adenoid cystic carcinoma

(唾液腺腺様嚢胞癌における組織亜型と基底膜IV型コラーゲン α 鎖分子の発現について)

雑誌名

Virchows Archiv

巻、頁、年

445, 54-62, 2004

謝辞

本研究は、熊本大学医学部歯科口腔外科学講座 篠原正徳 教授の下において行いました。

多面にわたりご指導を頂き深く感謝いたします。

特に医学熊本大学部附属病院病理部助教授、猪山賢一博士には、コラーゲンおよび基底膜についての基礎的な知識は勿論、研究者としての姿勢に及ぶまで多くのことを御指導いただきました。また、同助手、本田由美子博士と元同助手 霧田潤二博士には、病理学の基礎から実際の外科病理診断にいたるまで、熱心にご指導頂きました。猪山博士、霧田博士、本田博士より御指導いただいた、学問に対する考え方、研究者としての姿勢を学ぶ事が出来た大学院生としての 4 年間は私の人生の中でも非常に貴重な時間であったと考えております。ここに深く感謝いたしますとともに、お礼申し上げます。

また本研究を行うにあたり、IV型コラーゲンに関する共同実験者であり、 α 鎖特異抗体を供与していただいた、岡山大学医学部分子医科学講座、二宮善文教授、重井医学研究所免疫部門 佐渡義一博士、および統計学的手法に貴重なご指導をいただいた 熊本大学大学院医学研究科公衆衛生・医療科学分野 北野隆雄博士に深謝申し上げます。

略号

ABC: avidin-biotin complex

ACC: adenoid cystic carcinoma

BM: basement membrane

CK: cytokeratin

HE: hematoxylin - eosin

L. I. : labeling index

PBS: phosphate buffered saline

α -SMA: α -smooth muscle actin

第一章 研究の背景と目的

1. 細胞外マトリックスとコラーゲンについて

細胞外マトリックス (Extracellular matrix, ECM) とは、組織中の個々の細胞と細胞、あるいは細胞集団と細胞集団の間隙を満たしている高分子集合体のことである。細胞外マトリックスを構成する主な分子には、線維性タンパク質 (コラーゲン、エラスチン)、複合糖質 (プロテオグリカン)、細胞接着性タンパク質 (ラミニン、フィブロネクチン) などがある。

コラーゲンは細胞間の最も普遍的なタンパク質で、体内の総タンパク質の約 1/3 を占める。コラーゲン分子は、長さ約 300nm、幅 1.5nm、分子量約 30 万の巨大分子である。最も重要な機能は組織の構築を保持する作用で、張力に対する強い抵抗性はコラーゲン分子間の架橋、プロテオグリカンや糖蛋白との結合、線維間の摩擦力などに基づく。コラーゲンは電顕的に 67nm の周期で規則正しく配列する横紋が特徴であるが、その横紋はコラーゲン分子 300nm が 1/4 ずつずれて同一方向に並ぶことによって出現する。コラーゲン分子は分子量約 97000 の α 鎖と呼ばれる 3 本のポリペプチド鎖で構成される。 α 鎖はアミノ酸 1 個あたり 0.29nm 進行し、1 残基で約 110° 回転するという左巻きの小さならせんを作る。さらに 3 本の α 鎖が 10nm のピッチで右巻きの大きならせんを作り、3 重らせん triple helix を形成する。また、3 重らせん領域のアミノ基末端とカルボキシル基末端には、3 重らせんを作らない球状のペプチドが付着したプロペプチドが存在する。3 重らせん領域の長さはコ

ラーゲン分子の型によって様々であるが、アミノ酸組成はグリシンが全体の約 1/3 を占め (Gly-X-Y) n の繰り返しで構成される。X にはプロリン、Y にはヒドロキシプロリンが位置する事が多く、IV型コラーゲンでは、アミノ酸残基の 30%がグリシン、23%がプロリンとヒドロキシプロリンで占められる。このような配列や、グリシン、プロリン、ヒドロキシプロリンの含有が多い事もコラーゲンの特徴である。ヒドロキシプロリンはほぼコラーゲンに特有のアミノ酸で、ヒドロキシプロリン量からコラーゲン量を概算する事ができる。これらアミノ酸組成の特徴のため、コラーゲンは球状タンパク質とは異なる性質を示す。球状タンパク質は通常、酸性溶液に不溶で、アルカリ溶液には可溶である。また熱変性にて不溶化する。しかしコラーゲンは、一般に酸性溶液によく溶け、塩基性溶液に溶けにくい。さらに熱変性しゼラチンになると水に非常によく溶ける。

コラーゲン α 鎖はアミノ酸組成の違いにより、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖などと呼ばれる。2本の $\alpha 1$ 鎖と1本の $\alpha 2$ 鎖で構成されるコラーゲン分子は $[\alpha 1]_2 \cdot \alpha 2$ と表記される。現在のところコラーゲンは、24種類（I型～XXIV型）が同定されている（表1）。

表 1 I型~XXIV型コラーゲンの特徴

	型	α 鎖	組織局在など
線維性 コラーゲン	I	$\alpha 1(I), \alpha 2(I)$	ほとんど全ての組織に存在。特に骨、腱、真皮、 軟骨
	II	$\alpha 1(II)$	
	III	$\alpha 1(III)$	真皮、動脈壁、胎盤に多い。
	V	$\alpha 1(V), \alpha 2(V),$ $\alpha 3(V), \alpha 4(V)$	I型と共存。角膜に多い。 $\alpha 4(V)$ はシュワン細胞。
	XI	$\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$	軟骨
FACIT コラーゲン	IX	$\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$	軟骨コラーゲン線維表面
	XII	$\alpha 1(XII)$	コラーゲン線維表面
	XIV	$\alpha 1(XIV)$	コラーゲン線維表面
	XVI	$\alpha 1(XVI)$	
	XIX	$\alpha 1(XIX)$	脳、基底膜にもみられる。
	XX	$\alpha 1(XX)$	角膜上皮、胎児皮膚、胸骨、軟骨
	XXI	$\alpha 4(XXI)$	心、腎臓、骨格筋、胎盤
基底膜 コラーゲン	IV	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV), \alpha 3(IV)$ $\alpha 4(IV), \alpha 5(IV), \alpha 6(IV)$	各組織の基底膜
短鎖 コラーゲン	VIII	$\alpha 1(VIII), \alpha 2(VIII)$	デスメ膜、血管内皮細胞
	X	$\alpha 1(X)$	肥大軟骨
Multiplexins	XV	$\alpha 1(XV)$	線維芽細胞、血管内皮細胞
	XVIII	$\alpha 1(XVIII)$	線維芽細胞、血管内皮細胞、肝に多い。
MACIT コラーゲン	XIII	$\alpha 1(XIII)$	線維芽細胞
	XVII	$\alpha 1(XVII)$	皮膚、角膜上皮、粘膜上皮などのヘミデスモソーム
その他	VI	$\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$	ほとんどの線維
	VII	$\alpha 1(VII)$	表皮と真皮間のアンカリング線維の主成分
New collagen	XXII	$\alpha 1(XXII)$	FACIT-like
	XXIII	$\alpha 1(XXIII)$	MACIT-like
	XXIV	$\alpha 1(XXIV)$	Fibrillar-like

FACITコラーゲン Fibril associated collagens with interrupted triple helices

Multiplexins Protein with multiple triplehelix domains and interruptions

MACITコラーゲン Membrane associated collagens with interrupted triple helices

2. 基底膜について

基底膜は、上皮と間質の間に存在する膜様構造物で、コラーゲンと糖タンパクからなる特殊な細胞間物質であるとともに、胎生期に最も早く出現する原始的な細胞間物質である。細胞は他の細胞間物質に対する境界層としてまず基底膜を形成し、自己の内部環境を確保し、その基底で境された細胞間隙に基質やコラーゲンが沈着する。発生初期のコラーゲンは外胚葉や内胚葉の細胞から分泌され、その後に遊走してくる間葉細胞の足場を与え、間葉細胞から産生される膠原線維の構築を規定する。

基底膜は電顕的に、細胞側から透明層 lamina lucida、緻密層 lamina densa、網状層 lamina reticularis の3層に分けられる。透明層は細胞の細胞膜直下にある幅 20nm の薄層でラミニンは主にここに存在し、IV型コラーゲンと細胞との接着の橋渡しをしている。緻密層は電子密度の高い連続性の層で 20-500nm の厚みがあり、一般に間葉性細胞では薄く、上皮性細胞では厚い。さらに肺胞や糸球体では、内皮細胞と上皮細胞の基底膜が融合して厚い緻密層を作り、網状層は欠如している。電顕的には緻密層を基底膜と呼ぶことが多い。網状層は緻密層と間質結合組織を連結する層で、細い膠原線維（細網線維）、microfibril および基質が含まれ、次第に間質結合組織に移行する。基底膜の網状層が結合組織性であるため、基底膜は光顕的には結合組織細胞から産生される細胞間物質の凝集物と考えられた。歴史的背景がある。

基底膜を構成するコラーゲンは、IV型コラーゲンであるが、ラミニン、エンタクチン、プロテオグリカンなど、他の基底膜構成成分の足場となり、基底膜の骨格として働く。そ

の特徴としてアミノ酸組成が、3-ヒドロキシプロリンとヒドロキシリシンが豊富で、ヒドロキシリシン残基の 50-100%に糖が付着している事、線維を形成せず、シート状の構造をとる事が挙げられる。1971 (Kefalides, 1971)によって1次構造の異なるコラーゲンとしてIV型コラーゲンの存在が同定され、さらに α 鎖組成が、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖が2本、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が1本で、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ よりなることが明らかとなった。(Brazel et. al, 1987; Brazel et. al, 1988; Timpl, 1989)。近年、新たに、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 \sim $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖コラーゲンの subtype が同定され(Wieslander et. al, 1985; Soininen et. al, 1988; Butkowski et. al, 1990; Zhou et. al, 1992; Leinonen et. al, 1994; Mariyama et. al, 1994; Oohashi et. al, 1994)、計6種類の $\alpha(\text{IV})$ 鎖があることが明らかとなっている。遺伝子解析の結果、これら $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 \sim $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の遺伝子は $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖各々二つずつが、head-to-headの形で隣り合わせに対をなしており、それぞれ、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A1とCOL4A2)が第13染色体q34の部位に(Soininen et. al, 1988)、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A3とCOL4A4)が第2染色体のq36の部位に(Mariyama et. al, 1994; Leinonen et. al, 1994)、また $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の遺伝子(COL4A5とCOL4A6)が、X染色体q22の部位に(Oohashi et al, 1994; Zhou et al, 1993)存在している(図1)。

さらにそれら α 鎖の組み合わせには、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 、 $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$ 、 $[\alpha 5(\text{IV})]_2\alpha 6(\text{IV})$ の3種類が知られている(Sado et al, 1998; Borza et al, 2001)(図2)。 $[\alpha$

$1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 分子は全ての基底膜に存在するが、 $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)$ 、および $[\alpha 5(IV)]_2\alpha 6(IV)$ の分子は、存在部位が限局している。 $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)$ 分子は肺の肺胞上皮細胞および腎臓の糸球体基底膜では連続性分布を示すものの、尿細管上皮基底膜では一部に不連続性に認められる (Hostikka et al, 1990; Hudson et al, 1993)。 $[\alpha 5(IV)]_2\alpha 6(IV)$ 分子は、乳腺の乳管および小葉基底膜、皮膚の表皮基底膜、平滑筋細胞の基底膜、前立腺基底膜、大腸上皮基底膜、気管支上皮基底膜等に認められる (Ninomiya et al, 1995)。

IV型コラーゲンは、 α 鎖の3重らせん領域のアミノ基末端とカルボキシル基末端に球状のプロペプチドが付着しており、それぞれ7S領域、NC1 (non-collagenous) 領域といわれ、アミノ基末端にある7S領域4分子が会合し、さらにカルボキシル基末端にあるNC1領域2分子が結合することによりシート状のネットワークを形成している (図3)。

基底膜に含まれる糖タンパク質には、ラミニン laminin、エンタクチン entactin、フィブロネクチン fibronectin などが含まれる。ラミニンは基底膜透明層に分布し、培養された内皮細胞や上皮細胞から分泌される。ラミニンはIV型コラーゲン、プロテオグリカン、細胞表面との結合部位を持ち、これらと強く結合することによって基底膜と細胞の接着に役立っていると考えられている。エンタクチンは、硫酸化糖蛋白質で上皮細胞と間葉細胞で合成され、ラミニンとともに諸臓器の基底膜に証明されるが、免疫電顕的には糸球体の上皮細胞または内皮細胞の細胞膜と基底膜の境界に強く検出され、基底膜自体との反応は乏しく、ラミニンと同じく細胞と基底膜の接着物質として働いているものと推測される。

フィブロネクチンは線維芽細胞、内皮細胞、上皮細胞で合成、分泌される細胞の接着や細胞の形態保持に関係する糖蛋白であり、フィブリノーゲン、フィブリン、コラーゲン、ゼラチン、グリコサミノグリカン、プロテオグリカン、アクチンとの結合部位があるが、IV型コラーゲンには付着しない。

グリコサミノグリカンは胎生期に多く発現するといわれ、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸などが含まれる。

基底膜の代謝は、IV型コラーゲン以外の構成成分の代謝は 23-65 日と比較的早いですが、IV型コラーゲンの代謝は数ヶ月から数年と言われている。

基底膜は上皮・内皮・神経細胞をその間質から分ける薄い境界膜であることから、細胞や種々の分子に対するバリアーやフィルターとして、また組織内の構造支持体として機能している。しかし、最近の研究によると、基底膜はそのような物理的な働きのみならず、細胞との相互作用を通じて細胞の接着や伸長、移動、分化、増殖、蛋白合成や分泌などのコントロールに活発な役割を果たしていることがわかってきた。緻密層の構造濾過装置に加え、外透明層における荷電的バリアー作用などによる濾過作用、組織の形態発生、発育、再生、形態支持作用などを有している。

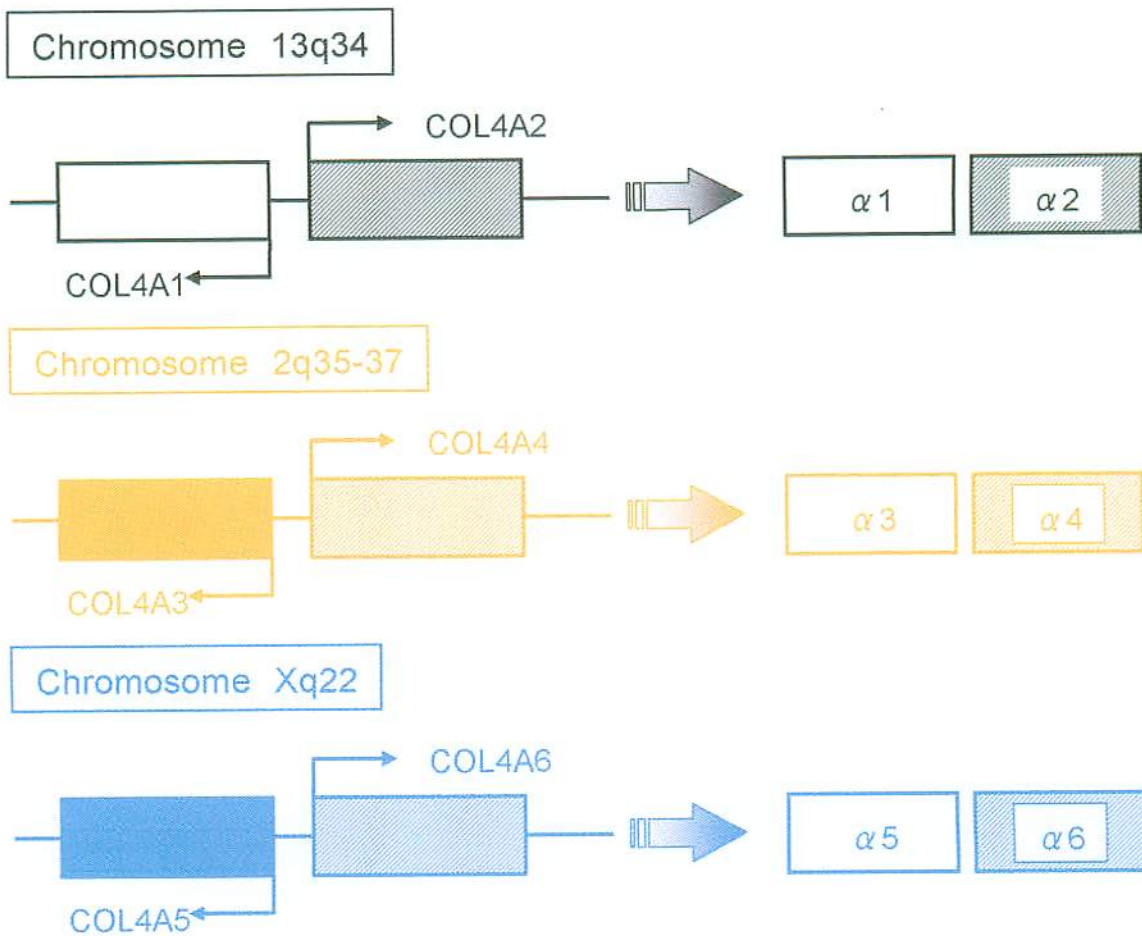


図1 IV型コラーゲン α 鎖遺伝子の位置 (Sado et al, 1998 より一部改変)

$\alpha 1$ (IV)鎖 $\sim\alpha 6$ (IV)鎖の6種類のコラーゲン遺伝子は、 $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖、 $\alpha 3$ (IV)鎖と $\alpha 4$ (IV)鎖、 $\alpha 5$ (IV)鎖と $\alpha 6$ (IV)鎖各々二つずつが、head-to-headの形で隣り合わせに対をなしており、それぞれ、 $\alpha 1$ (IV)鎖と $\alpha 2$ (IV)鎖の遺伝子 (COL4A1 と COL4A2) が第13染色体 q34 の部位に、 $\alpha 3$ (IV)鎖と $\alpha 4$ (IV)鎖の遺伝子 (COL4A3 と COL4A4) が第2染色体の q36 の部位に、また $\alpha 5$ (IV)鎖と $\alpha 6$ (IV)鎖の遺伝子 (COL4A5 と COL4A6) が、X染色体 q22 の部位に存在している。

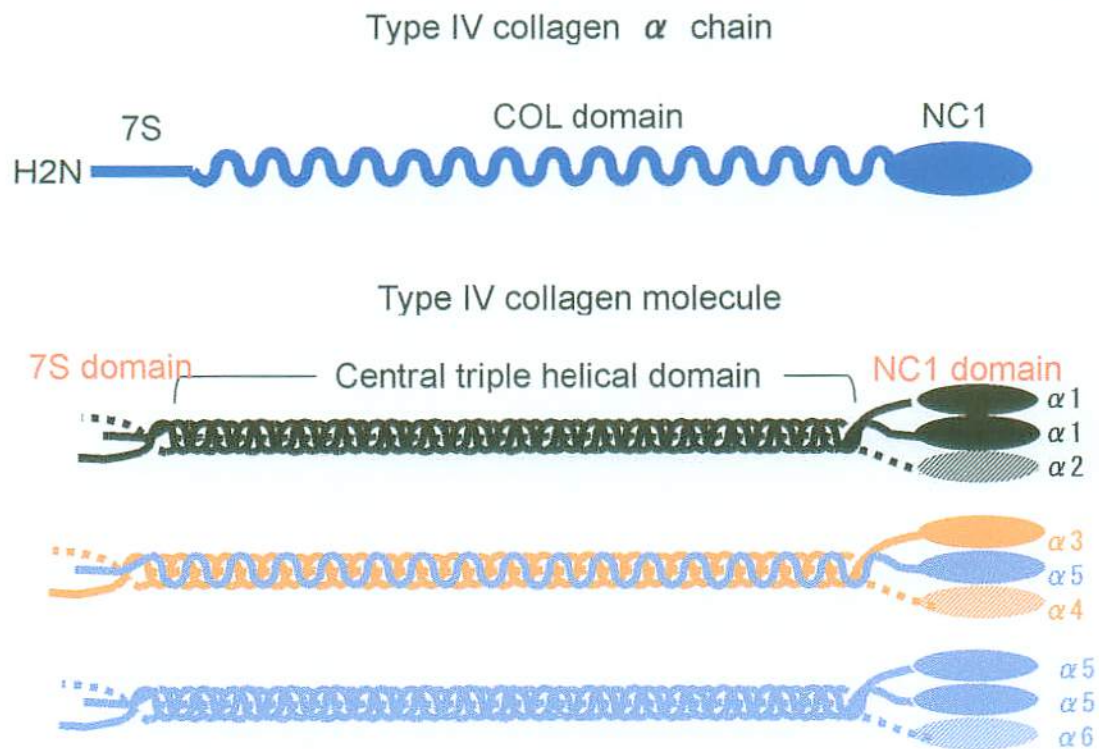


図2 IV型コラーゲンの高次構造1 (Sado et al, 1998 より一部改変)

IV型コラーゲン分子は、3本の α 鎖から構成されている。 α 鎖は中央に3重らせん構造を有し、3重らせん領域のアミノ基末端とカルボキシル基末端に球状のプロペプチドが付着しており、それぞれ7S領域、NC1(non-collagenous)領域といわれる。 α (IV)には $\alpha 1$ (IV)から $\alpha 6$ (IV)まで6種類存在する事が知られており、 α 鎖の組み合わせには、 $[\alpha 1(IV)]_2\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 3(IV)\alpha 4(IV)\alpha 5(IV)$ 、 $[\alpha 5(IV)]_2\alpha 6(IV)$ の3種類が知られている。

Supramolecular assembly

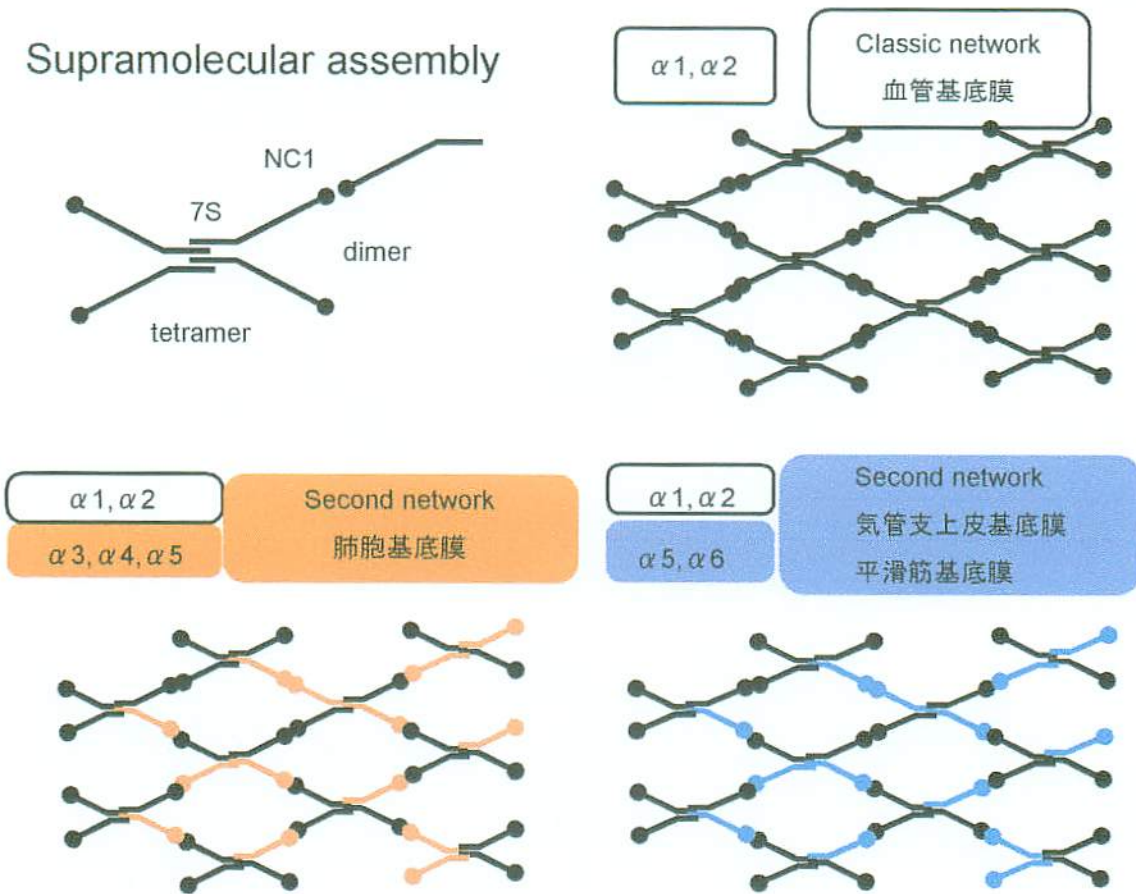


図3 IV型コラーゲンの高次構造2 (Sado et al, 1998 より一部改変)

IV型コラーゲン分子は、7S領域4分子が会合し、さらにNC1領域2分子が結合する事によりシート状のネットワークを形成している。 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ からなる分子は全ての基底膜に存在するが、 $\alpha 3(\text{IV})\alpha 4(\text{IV})\alpha 5(\text{IV})$ 、 $[\alpha 5(\text{IV})]_2\alpha 6(\text{IV})$ からなる分子は、特定の組織に限定して存在する。

3 癌浸潤と基底膜について

基底膜成分の消失が癌の浸潤と密接に関連している事は広く知られている。癌組織において、基底膜の連続性が保たれ、癌細胞が基底膜の上に存在して間質と境界されている状態は非浸潤癌、上皮内癌と定義され、一方、癌の進行に伴って基底膜の連続性が失われ、癌細胞が間質に直接接するようになると浸潤癌と定義される(図 4)。1983 年 Barsky らは (Barsky et al. 1983)、ラミニンおよびIV型コラーゲンに対する抗体を用いて、乳腺、皮膚、膵臓、前立腺の invasive carcinoma, carcinoma in situ (CIS), carcinoma 様良性腫瘍にて基底膜の変化を免疫組織学的に検討した。その結果、ラミニンとIV型コラーゲンは同様の動態を示し、良性病変および CIS 病変においては、基底膜の連続性が正常と同様、完全に保たれていること、微小浸潤の先端にて基底膜の断片化が見られること、高分化な癌でも浸潤部では基底膜は消失傾向にあり、浸潤部位においても基底膜の連続性の消失が認められ、転移巣の所見と同様であることを示したのである。

コラーゲンの分解には、コラゲナーゼが関与している。コラゲナーゼはコラーゲン分子の特異的加水分解酵素で、コラーゲンのらせん部分を切断する。コラゲナーゼは分子量 33,000 から 35,000 で上皮性および間葉性細胞から分泌され、N 末端から 3/4 の断片と 1/4 の断片を生じる。肥満細胞、マクロファージ、リンパ球とコラゲナーゼ産生細胞との相互作用が組織コラゲナーゼ活性の調節に重要と考えられている。1985 年頃から、ECM を破壊する MMP (Matrix metalloproteinase) の構造と性質が明らかにされてきた。MMP には現在 20 種類の存在が確認されている。全て亜鉛イオンを活性部位に持ち、共通の基本構造を持つ

同一遺伝子ファミリーに属する。Barsky はさらに、浸潤部での基底膜の変化がIV型コラーゲンの分泌の障害によるものか、あるいは分解酵素によるものかIV型コラゲナーゼによる染色を用いて検討し、その結果、IV型コラゲナーゼは癌細胞の 10~75%に陽性所見がみられたが、周囲の正常組織や CIS では陰性であり、さらにIV型コラーゲンが消失している浸潤性乳癌全症例で、細胞質内にコラゲナーゼの強い陽性所見を認めた。以上より彼らは基底膜の消失は分解酵素によるものであろうと結論している。その後 Liotta らは(Liotta et al, 1983)、癌の浸潤・転移機構のメカニズムにおいて、three step hypothesis すなわち癌細胞の基底膜への接着(attachment)、癌細胞による基底膜の分解(proteolysis)、癌細胞の移動(migration)の3段階が、癌の浸潤過程における本質であると提唱した。癌細胞が間質へ浸潤し、さらに遠隔転移を成立させるためには、少なくとも原発部位の基底膜と血管基底膜の破壊かつ転移巣の血管の基底膜の破壊が必要となる。以後、癌の浸潤過程に関して、様々な検討が行われているが、IV型コラーゲン $\alpha 1 \sim \alpha 6$ 鎖の消失過程に関する詳細な報告はなく、特に癌の初期浸潤の機序に関しては不明な点が多い。

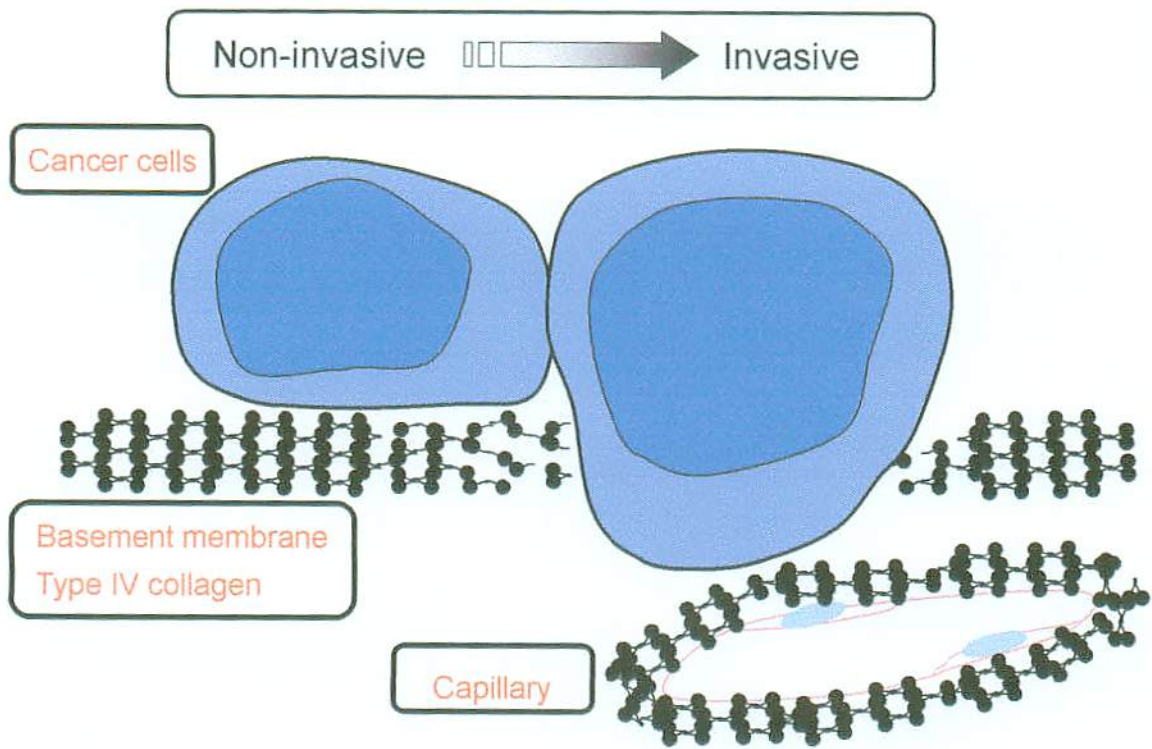


図4 癌の浸潤と基底膜（模式図）

癌組織において、基底膜の連続性が保たれ、癌細胞が基底膜の上に存在し間質と境界されている状態は非浸潤癌、上皮内癌とされ、癌の進行に伴って基底膜の連続性が失われ、癌細胞が間質に直接接するようになると浸潤癌とされる。

4. 腺様嚢胞癌について

腺様嚢胞癌は唾液腺原発の悪性腫瘍のうちで最も発生頻度の高いもので、極めて緩徐な発育と著明な浸潤増殖を示す。この浸潤増殖性は神経、血管、結合組織などの周囲の軟部組織に対して著しい。一方本腫瘍の骨破壊性に関しては扁平上皮癌と比較して軽度である。組織学的に本腫瘍は上皮細胞が多数の小腔を含む篩状の胞巣形成 (Cribriform subtype) を示すことを特徴とするが、管状型 (Tubular subtype) あるいは充実型 (Solid subtype) の胞巣を形成する部分も見られる。腫瘍胞巣の偽嚢胞腔内は、粘液性あるいはヒアルリン様の物質を含み、この粘液性物質はコンドロイチン硫酸とヒアルロン酸を大量に含む。この粘液様物質に加えて、偽嚢胞腔内には線維性物質や基底膜様構造が認められる。

本症の経過は長いものが多いが、予後は極めて不良である。術後の局所再発ならびに遠隔転移はしばしば認められる。

5. 目的

最近、乳癌 (Nakano S et al, 1999)、皮膚の基底細胞 (Tanaka K et al, 1997)、前立腺癌 (Dehan P et al, 1997)、腎細胞癌 (Lohi J et al, 1997)、早期大腸癌 (Hiki Y et al, 2002) 等の癌におけるIV型コラーゲン α 鎖分子のネットワークの動態が解明されてきた。

しかし、これまでに唾液腺の腺様嚢胞癌における抗IV型コラーゲン抗体を用いたIV型コラーゲンの発現についての報告は認められるものの、抗 $\alpha 1(IV) \sim \alpha 6(IV)$ 鎖特異抗体を用いた免疫組織学的検討はない。

本研究では、形態学的評価がより詳細に行えるホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、まず $\alpha 1(IV)$ 鎖 $\sim \alpha 6(IV)$ 鎖全ての正常唾液腺組織および唾液腺を含む口蓋鼻腔領域の腺様嚢胞癌における発現を免疫組織学的手法で検討した。

次いで、腺様嚢胞癌におけるCK14、CK19、 α -SMAの局在と発現により腫瘍細胞の分化度の評価を、Ki-67による腫瘍細胞の増殖活性を明らかにするとともに、そのそれぞれの組織亜型との関連について検討を行った(Ellis GL et al, 1996)。

第2章 対象と実験方法対象

1. 対象

1990年10月から2002年9月までに熊本大学医学部附属病院を受診し、外科的に切除された腺様嚢胞癌20例(表2)を対象とした。また、病巣より十分に距離を置いて、病理組織学的に異常の認められなかった唾液腺組織10例を正常対照とした。

表2 本研究に使用した腺様嚢胞癌の臨床および組織学的特徴

Case No.	Age	Gender	Site	Histologic subtype		
				Tubular	Cribriform	Solid
1	63	Female	Gum	○(9)	×	×
2	70	Male	Parotid gland	○(4)	○(13)	×
3	35	Female	Abdominal muscle (metastasis)	○(5)	○(22)	×
4	56	Male	Lymph node (metastasis)	○(1, 8)	○(10, 24)	×
5	70	Female	Palatine gland	○(2, 7)	○(12, 25)	×
6	73	Male	Paranasal cavity	○(3, 6)	○(11, 16)	×
7	71	Male	Gum	×	○(17)	×
8	64	Female	Palatine gland	×	○(19)	×
9	53	Female	Oral mucosa	×	○(23)	×
10	77	Female	External auditory duct	×	○(26)	×
11	43	Female	Nasal cavity	×	○(28)	×
12	42	Male	Palatine gland	×	○(30)	×
13	57	Male	Submandibular gland	×	○(14, 21)	×
14	66	Male	Paranasal cavity	×	○(15, 31)	×
15	60	Female	Submandibular gland	×	○(18, 29)	×
16	47	Female	Oral mucosa	×	○(20)	○(33)
17	51	Female	Palatine gland	×	○(27)	○(32)
18	52	Male	Lung (metastasis)	×	×	○(34)
19	62	Male	Lymph node (metastasis)	×	×	○(35)
20	46	Female	Brain (metastasis)	×	×	○(36)

注) カッコ内の数字は表4におけるSample No.を示す

2. 実験方法

i) 組織検体の処理、ホルマリン固定パラフィン包埋薄切標本の作成

切除した組織は、10%中性緩衝ホルマリン液 (pH7.0) に入れて固定した。その後パラフィン包埋し 4 μ mの連続薄切切片を作製した。尚、免疫染色操作過程で薄切切片がスライドガラスから剥離するのを防止するため、シランコートスライド (MATSUNAMI GLASS) を使用した。

ii) 免疫組織化学

a) 一次抗体

IV型コラーゲン抗体はヒトIV型コラーゲン α 鎖のNC1 domain(H11, H21, H31, H43, H63)あるいはhelical domain (H53)のアミノ酸配列をもとに作成した合成ペプチドを抗原に、共同研究者である佐渡らが開発したラットリンパ節法により作成した抗ヒトラットモノクローナル抗体を使用した(Sado et al, 1995)。 α 鎖特異性、抗体のクローン名、エピトープ、免疫染色に使用した適性希釈倍率を表3に示す。

表 3 本研究に使用した抗ヒトモノクローナル抗体

Specificity	Clone	Epitope	Dilution
α 1(IV)NC1	H11	KKPTPSTL	1:300
α 2(IV)NC1	H21	DTLKAGLIR	1:150
α 3(IV)NC1	H31	IPSTVKA	1:200
α 4(IV)NC1	H43	PAPDTLKE	1:7
α 5(IV)helix	H53	IDVEF	1:200
α 6(IV)NC1	H63	GELP	1:50
GK14	LL002		1:200
GK19	RCK108		1:100
α -SMA	1A4		1:250
Ki-67	MIB-1		1:50

b) 免疫染色の手技

抗IV型コラーゲン α 鎖抗体の免疫染色操作

免疫組織化学的な染色には avidin-biotin complex (ABC) 法を用いた。

パラフィン切片は十分な脱パラフィン後、オートクレーブを用いた加熱処理およびヒアルロニダーゼ処理による抗原賦活化をおこなった。その後 1.0% H_2O_2 加メタノールにて 60 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。非特異反応のブロッキングは PBS (phosphate-buffered saline) 洗浄後、5%ウサギ正常血清を室温で 30 分反応させて行った。その後、一次抗体反応を 4°Cで一晩行った。PBS にて洗浄後、ビオチン標識抗ラット IgG を反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。非特異反応のブロッキングは PBS (phosphate-buffered saline) 洗浄後、5%ウサギ正常血清を室温で 30 分反応させて行った。その後、一次抗体反応を 4°Cで一晩行った。PBS にて洗浄後、ビオチン標識抗ラット IgG を反応させ、再度 PBS にて洗浄し、avidin-biotin complex と反応させた。 H_2O_2 加 0.05% 3, 3' -diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) にて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行った後封入し、標本を作製した。

CK19, CK14, α -SMA, Ki-67 抗体の免疫染色操作

基本的にはマウスモノクローナル抗体に準じた ABC 法で行った。

以下に各染色ステップの概略を示す。

IV型コラーゲン α 鎖染色

1.	孵卵器 (60°C)	60分
2.	キシレン	30分+15分+15分
3.	100%エタノール	5分+5分
4.	PBS	5分×3
5.	熱処理 (132°C, 2kg/cm ² =3気圧, クエン酸バッファ : pH3.6)	5分
6.	自然冷却	約2時間
7.	PBS	5分×3
8.	1000U/1000 μ lヒアルロニダーゼ (37°C恒温槽中)	20分
9.	PBS	5分×3
10.	1%H ₂ O ₂ 加100%メタノール	60分
11.	PBS	5分×3
12.	5%ウサギ血清	30分
13.	一次抗体 (希釈倍率・表3に記載)	Over night
14.	PBS	5分×3
15.	二次抗体	60分
16.	PBS	5分×3
17.	ABC	60分
18.	PBS	5分×3
19.	0.05%DAB溶液	7分
20.	D.W.	5分中3回
21.	Hematoxylin	2分
22.	D.W.	5分中3回
23.	PBS	5分×3
24.	D.W.	5分中3回
25.	100%エタノール	5分×2
26.	キシレン	5分×2
27.	封入	

CK19、CK14、 α -SMA、Ki-67 染色

1.	孵卵器 (60°C)	60 分
2.	キシレン	30 分+15 分+15 分
3.	100%エタノール	5 分+5 分
4.	PBS	5 分×3
5.	熱処理 (132°C, 2kg/cm ² =3 気圧, クエン酸バッファー : pH6.0)	5 分
6.	自然冷却	約 2 時間
7.	PBS	5 分×3
8.	1%H ₂ O ₂ 加 100%メタノール	60 分
9.	PBS	5 分×3
10.	5%ウマ血清	30 分
11.	一次抗体 (希釈倍率・表 3 に記載)	Over night
12.	PBS	5 分×3
13.	二次抗体	60 分
14.	PBS	5 分×3
15.	ABC	60 分
16.	PBS	5 分×3
17.	0.05%DAB 溶液	7 分
18.	D.W.	5 分中 3 回
19.	Hematoxylin	2 分
20.	D.W.	5 分中 3 回
21.	PBS	5 分×3
22.	D.W.	5 分中 3 回
23.	100%エタノール	5 分×2
24.	キシレン	5 分+×2
25.	封入	

c) 免疫染色結果の判定

α (IV) 鎖分子の発現は以下のように評価した。

＋；連続的に陽性であったもの

－；発現の全く認められなかったもの

±；不連続に陽性であったもの

CK19 の発現は以下のように評価した

P (Positive)；腫瘍性導管上皮細胞に陽性であったもの。

N (Negative)；陰性であったもの

CK14 および α -SMA の発現の性状を以下のように評価した

L (Lining)；腫瘍胞巣周囲に陽性であったもの

D (Disarray)；不規則な発現、あるいは陰性の所見を示したもの

d) Ki-67 の計測法および統計学的処理

それぞれの組織亜型で、5 箇所典型的な所見を示す部位より、200 個以上の腫瘍細胞を選

別し、そのなかの Ki-67 の陽性細胞数の百分率を Ki-67 L. I. とした。

統計学的解析には、分散分析法 (Two-way analysis of variance (ANOVA)) にて比較した。

第三章 結果

1. 免疫組織学的検討

i) 正常唾液腺導管における免疫染色の結果

正常唾液腺において、介在部導管、線条部導管、大導管の基底膜は $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続的に陽性であった。

腺房周囲基底膜においては $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖は連続的に陽性であり、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖は不連続に陽性であった。

一方 $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性の所見であった。

導管上皮細胞と導管基底細胞の細胞質はCK19に陽性であり、CK14は腺房および介在部の筋上皮細胞に陽性であった。 α -SMAもまた腺房および介在部の筋上皮細胞に陽性であった。

α -SMA陽性細胞は腺房および介在部導管の筋上皮細胞に認められた。(図5)

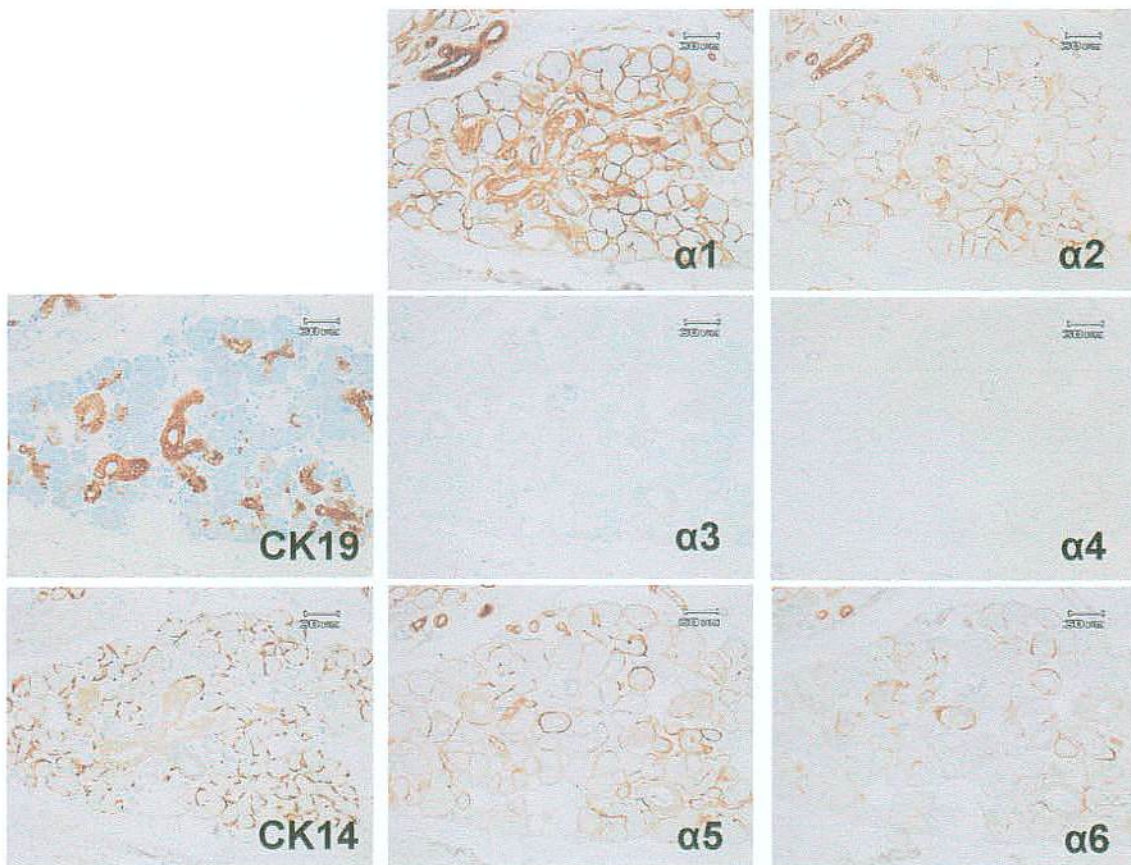


図5 正常唾液腺導管における免疫染色

正常唾液腺組織において、大導管、線条部導管、介在部導管で $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV), $\alpha 5$ (IV), $\alpha 6$ (IV)鎖の発現がみられ、 $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV)鎖の発現は認められなかった。腺房においては、 $\alpha 1$ (IV), $\alpha 2$ (IV)鎖が連続陽性、 $\alpha 3$ (IV), $\alpha 4$ (IV)鎖は陰性、 $\alpha 5$ (IV), $\alpha 6$ (IV)鎖は一部断裂の不連続陽性を示した。CK19は導管上皮に、CK14は腺房の筋上皮細胞、および導管の基底細胞に陽性であった。

ii) 腺様嚢胞癌における免疫染色の結果

各抗体における免疫染色の結果を表 4 に示す。

尚、全ての腺様嚢胞癌の症例において $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

表 4 腺様嚢胞癌における免疫染色の結果と Ki-67 L.I.

Sample No.	Histologic subtype	$\alpha 1(IV)$ and $\alpha 2(IV)$	$\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$	CK19	CK14	α -SMA	Ki-67 L.I.
1	Tubular	+	+	P	L	L	1.80
2	Tubular	+	+	P	L	L	2.43
3	Tubular	+	+	P	L	L	2.94
4	Tubular	+	+	P	L	D	1.67
5	Tubular	+	±	P	L	L	4.24
6	Tubular	+	±	P	L	L	4.80
7	Tubular	+	±	P	L	D	6.21
8	Tubular	±	-	P	L	L	6.66
9	Tubular	±	-	N	D	L	6.01
10	Cribriform	+	+	P	L	L	3.41
11	Cribriform	+	+	P	L	L	6.40
12	Cribriform	+	+	P	L	D	7.11
13	Cribriform	+	+	P	D	L	3.39
14	Cribriform	+	+	P	D	D	3.62
15	Cribriform	+	+	N	D	D	2.98
16	Cribriform	+	±	P	L	L	11.23
17	Cribriform	+	±	P	D	L	11.98
18	Cribriform	+	±	P	D	L	7.56
19	Cribriform	+	±	P	D	D	7.76
20	Cribriform	+	±	N	D	D	7.40
21	Cribriform	+	±	N	D	D	8.85
22	Cribriform	+	-	P	L	L	12.54
23	Cribriform	+	-	P	D	L	12.27
24	Cribriform	+	-	P	D	D	14.32
25	Cribriform	+	-	P	D	D	15.88
26	Cribriform	+	-	N	L	L	6.03
27	Cribriform	+	-	N	D	L	7.03
28	Cribriform	+	-	N	D	L	6.16
29	Cribriform	±	-	N	D	L	7.56
30	Cribriform	±	-	N	D	D	12.04
31	Cribriform	±	-	N	D	D	14.33
32	Solid	±	-	N	D	D	16.35
33	Solid	±	-	N	D	D	14.98
34	Solid	±	-	N	D	D	21.37
35	Solid	-	-	N	D	D	15.67
36	Solid	-	-	N	D	D	27.71

注) 全ての腺様嚢胞癌の症例において $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

P: Positive, N: Negative, L: Lining, D: Disarray

a) 管状構造における免疫染色

腺様嚢胞癌 20 症例中 6 例に管状構造の組織亜型が認められた (表 2 Case No. 1-6)。

腺様嚢胞癌腺管状構造は腫瘍周囲の基底膜における IV 型コラーゲンの発現によって、

$\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す発現様式、および $\alpha 1(IV)$ 、

$\alpha 2(IV)$ 鎖に連続～一部不連続陽性を示し、かつ $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を

示す発現様式で二分した。

$\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す検体は 4 例得られ (表 4 Sample

No. 1-4)、このグループでは、CK19 が腫瘍性導管上皮細胞に限局して発現しており、CK14

はその周囲の腫瘍性筋上皮細胞に陽性であった。

CK19 および CK14 によって示される二相性の組織構築は明瞭に認められた。

α -SMA は管状構造の外周の腫瘍細胞に散見された。

一方、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に連続～一部不連続陽性を示し、かつ $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不

連続陽性～陰性を示した検体は 5 例得られ (表 4 Sample No. 5-9)、このグループでは、CK19

は陰性であり、CK14 は管状構造の内側に強く発現し、また外側にも弱い発現が認められた。

CK19 および CK14 によって示される二相性の組織構築は認められなかった。

α -SMA は管状構造の外周の腫瘍細胞に認められた。(図 7)

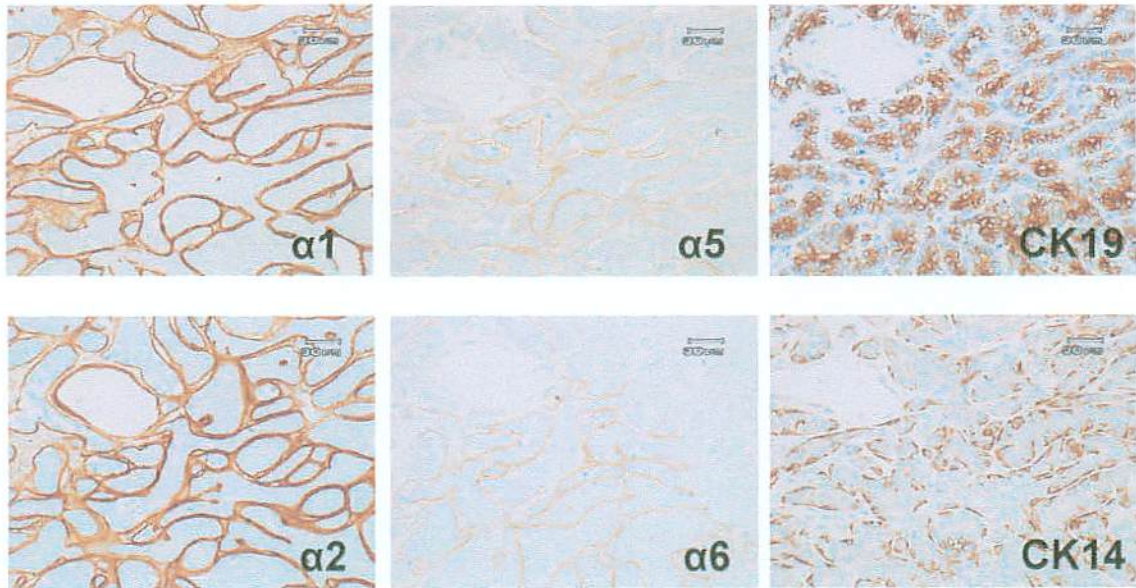


図6 腺様嚢胞癌管状構造 ($\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示すグループ) における免疫染色

$\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す Tubular subtype において、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ も連続陽性を示し、CK19は管状構造の内側の細胞(腫瘍性導管上皮細胞)に陽性であり、CK14は管状構造の外側の細胞(腫瘍性筋上皮細胞)に陽性であり、CK14、CK19による明瞭な二相性の構造がみとめられた。 $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

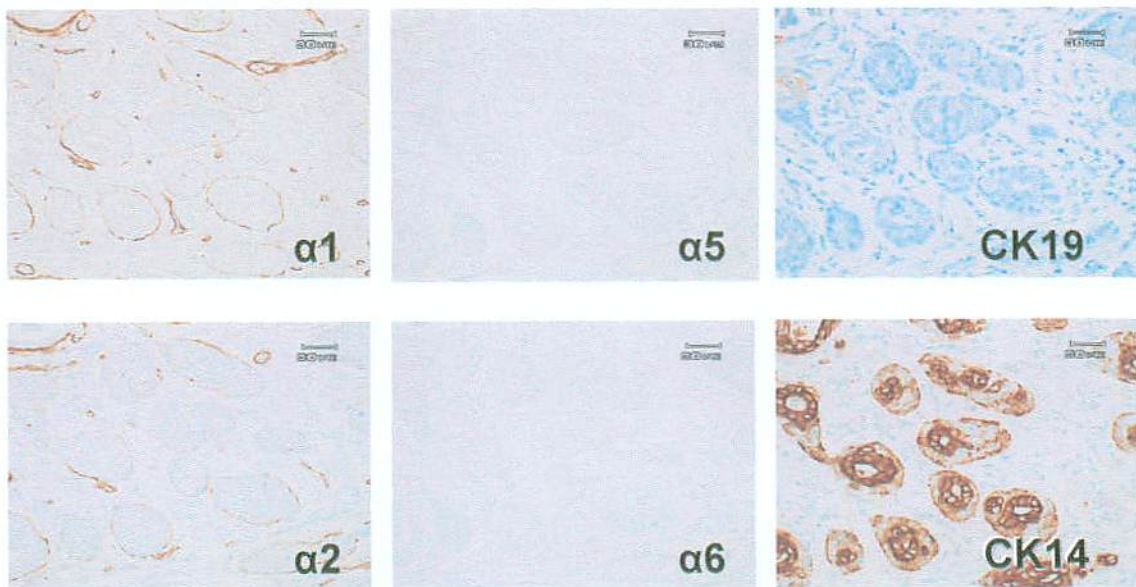


図7 腺様嚢胞癌管状構造 ($\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示したグループ) における免疫染色

$\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に不連続な陽性を示す Tubular subtype において、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖は陰性の所見を示した。CK19は完全に陰性であり、CK14は管状構造の内側の細胞(腫瘍性導管上皮細胞)に強陽性であり、外側の細胞(腫瘍性筋上皮細胞)に不規則な陽性を示し、CK14、CK19による二相性の構造は不明瞭であった。 $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

b) 篩状構造における免疫染色

20 症例中 16 例に篩状構造の組織亜型が認められた (表 2 Case No. 2-17)。

腺様嚢胞癌腺篩状構造は、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す発現様式、および $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に連続～一部不連続陽性を示し、かつ $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示す発現様式で二分した。

$\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す検体は 6 例得られ (表 4 Sample No. 10-15)、このグループでは、CK19 は真の管腔における腫瘍性導管上皮細胞に限局して発現しており、CK14 陽性細胞はその他の腫瘍細胞のほとんどで陽性で、偽嚢胞腔内面もまた CK14 陽性細胞によって取り囲まれていた。(図 8)

一方、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に連続～一部不連続陽性を示し、かつ $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示した検体は 16 例得られ (表 4 Sample No. 16-31)、このグループでは、CK19 は消失する傾向にあり、CK14 は腫瘍胞巢中に不規則に発現していた。 α -SMA は消失するか、腫瘍胞巢中に不規則な発現を認めた。(図 9)

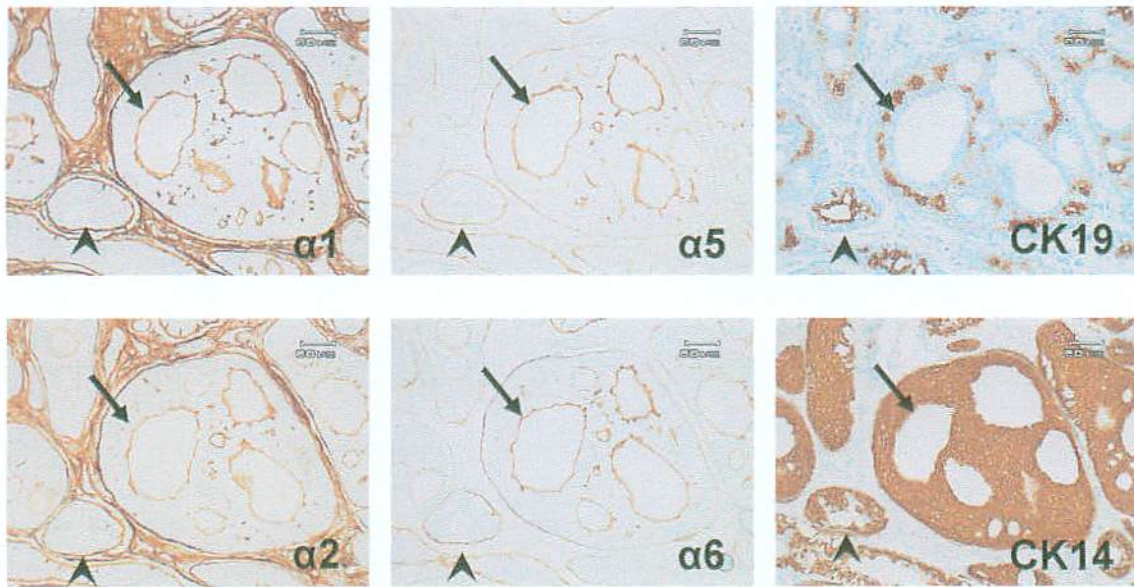


図8 腺様嚢胞癌篩状構造 ($\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示すグループ) における免疫染色

$\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す Cribriform subtype は、同時に $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖も連続陽性を示した。

真の管腔の内側の細胞は CK19 陽性であり、CK19 陽性細胞が管状構造の外側に認められた。

この部位では、真の管腔の内面には $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の発現が認められなかった。(矢頭)

偽嚢胞腔内面には $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の発現が認められた。(矢印)

$\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

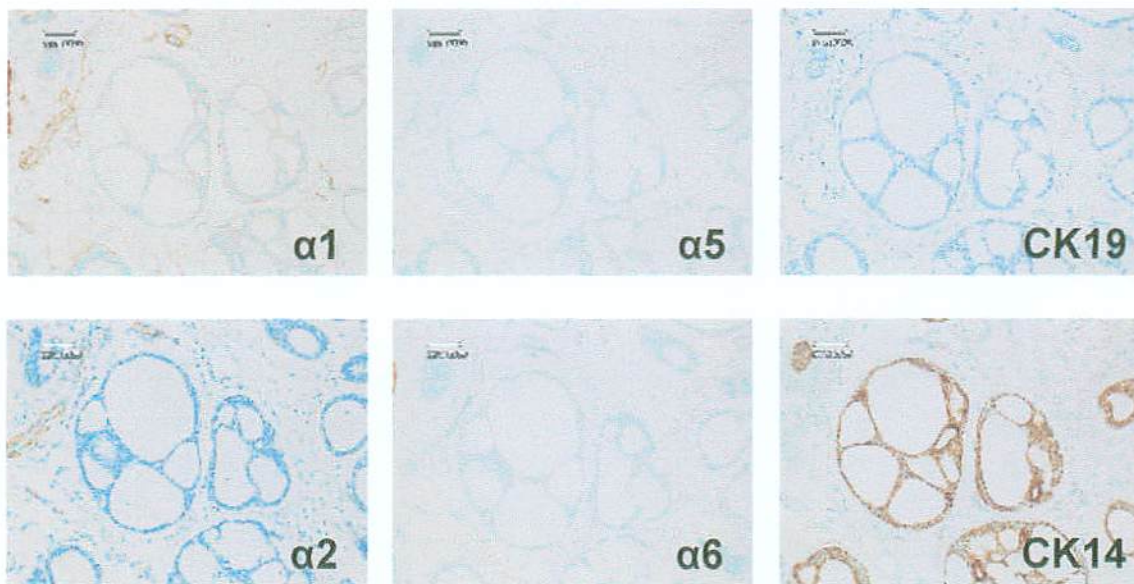


図9 腺様嚢胞癌篩状構造 ($\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示したグループ) における免疫染色

$\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に不連続な陽性を示す Cribriform subtype において、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖もは陰性の所見を示した。CK19 は完全に陰性であり、CK14 瀰漫性に陽性であり、CK14、CK19 による二相性の構造は不明瞭であった。 $\alpha 3(IV)$ 、 $\alpha 4(IV)$ 鎖は陰性であった。

d) 充実性構造における免疫染色

充実性構造は 20 症例中 5 例に篩状構造の組織亜型が認められた (表 2 Case No. 16-20、表 4 Sample No. 32-36)。

全ての充実性構造を示した検体において、 $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 2$ (IV) 鎖は消失傾向を示し、 $\alpha 5$ (IV)、 $\alpha 6$ (IV) 鎖については完全に陰性であった。

CK19 は全ての検体で陰性であり、CK14 陽性細胞は腫瘍胞巣内に散在し、CK14、CK19 による二相性の構造は不明瞭であった。 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV) 鎖は陰性であった。(図 10)

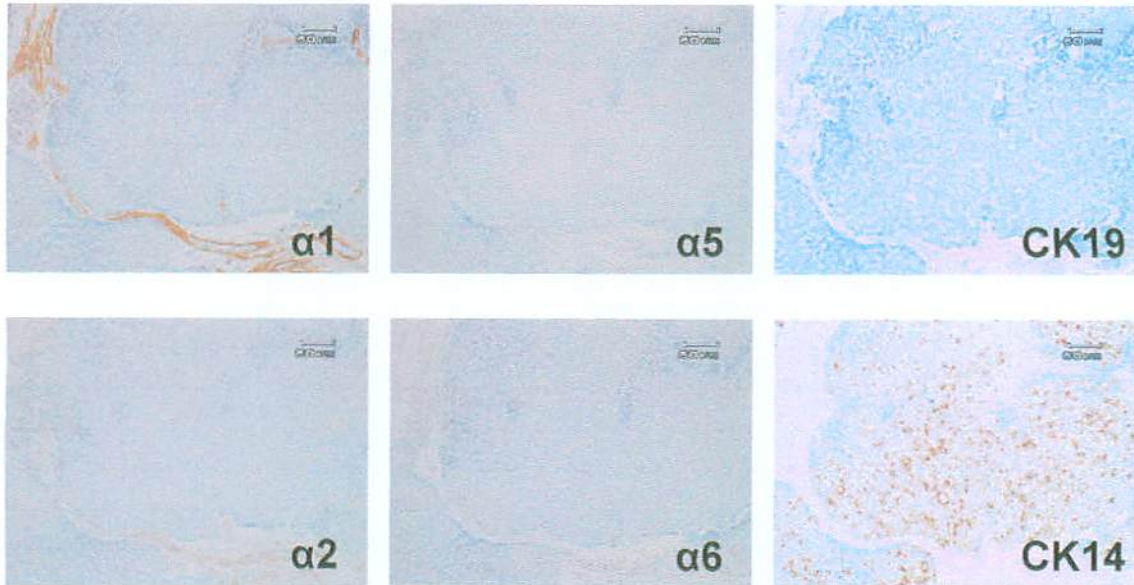


図 10 腺様嚢胞充実性構造における免疫染色

充実性構造において、 $\alpha 1$ (IV)、 $\alpha 2$ (IV) 鎖の消失傾向を示し、 $\alpha 5$ (IV)、 $\alpha 6$ (IV) 鎖は完全に陰性であった。CK19 は陰性であり、CK14 陽性細胞は腫瘍胞巣内に散在し、CK14、CK19 による二相性の構造は不明瞭であった。 $\alpha 3$ (IV)、 $\alpha 4$ (IV) 鎖は陰性であった。

2. 統計学的検討

腺様嚢胞癌の管状構造において、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す発現様式では、Ki-67L.I.は $2.21 \pm 0.59\%$ (平均 \pm 標準誤差)であり、一方 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖に連続～一部不連続陽性を示し、かつ $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示す発現様式では、 $5.58 \pm 1.02\%$ であった。

同様に篩状構造において、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す発現様式ではKi-67L.I.は $4.49 \pm 1.78\%$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続陽性～陰性を示す発現様式では、Ki-67L.I.は $10.18 \pm 3.24\%$ であった。充実性構造では、Ki-67L.I.は $19.22 \pm 5.37\%$ であった。

篩状構造における $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示すグループと不連続陽性～陰性を示すグループにおいて、Ki-67による増殖活性に有意な差がみとめられた。(図11)

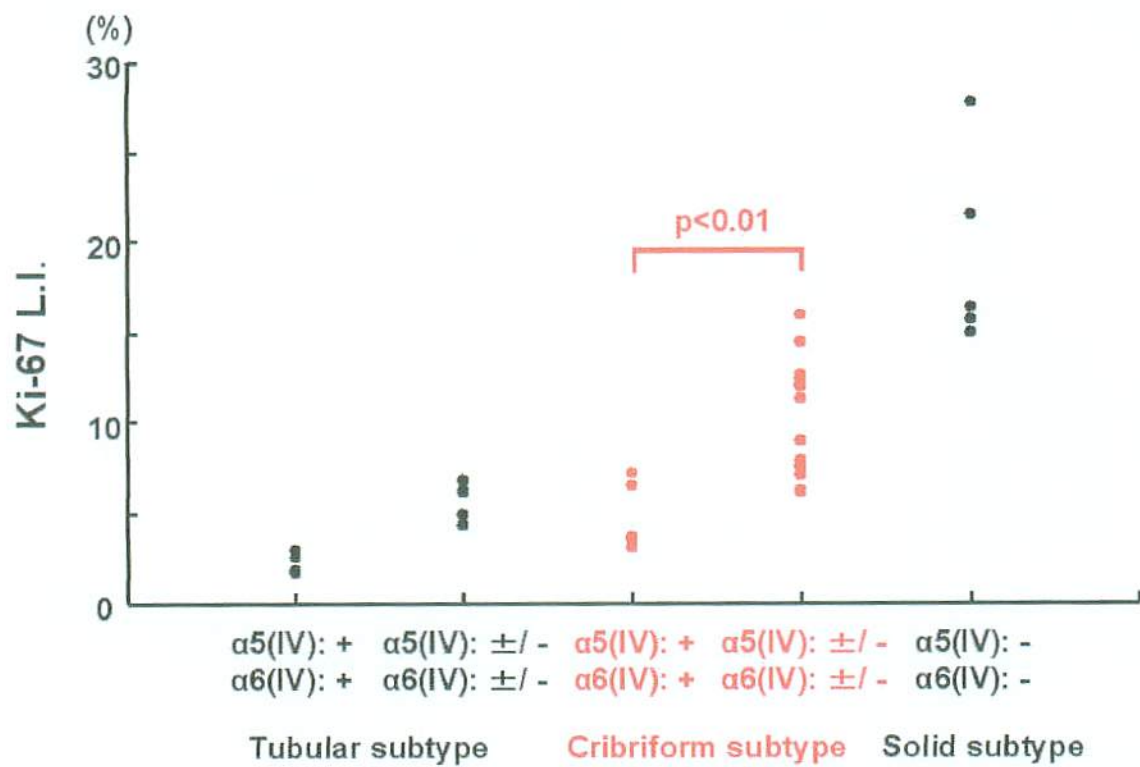


図 1 1 IV型コラーゲン $\alpha 5(IV)$, $\alpha 6(IV)$ 鎖による ACC の組織亜型と Ki-67 L. I. との関係
 Ki67-L. I. は組織亜型別では充実性構造、篩状構造、管状構造の順に高い傾向があり、
 同一の組織亜型内においては、 $\alpha 5(IV)$, $\alpha 6(IV)$ 鎖陰性のグループは、陽性のグループよりも、Ki-67L. I.
 が高い傾向が認められた。
 特に篩状構造では優位差が認められた。

第四章 考察

1. 免疫染色条件

凍結切片およびホルマリン固定パラフィン切片を用いたIV型コラーゲン α 鎖の免疫染色法は、既到大腸粘膜において確立されていたが、唾液腺組織での免疫染色法は確立されていなかった。元来、唾液腺腺様嚢胞癌は比較的稀な腫瘍であるので、実験を始めるにあたって、既存の症例を実験材料として使用するために、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫染色法を確立する必要がある。

陽性コントロールの材料として正常唾液腺組織を用いた。

抗原の賦活化のための処理として、オートクレーブ法による熱処理およびヒアルロニダーゼによる賦活化を行った。オートクレーブ法の際のクエン酸バッファのpHは3.6が最も抗原性の賦活化に適していた。ただしこの至適pHは、非常に厳密に遵守する必要があり、僅かなpHの誤差で抗原性を引き出せなかった。

ヒアルロニダーゼ処理の際の至適条件は、37°Cの恒温槽中でヒアルロニダーゼ1000単位/1000 μ lを20分作用させた。ヒアルロニダーゼ濃度は500単位では十分な効果を認めず、2000単位ではバックグラウンドが強くなってしまった。作用時間では長時間作用させると、バックグラウンドが強くなり、20分の結果が最も良好であった。

2. 腺様嚢胞癌の免疫染色の結果について

多くの管状構造と一部の篩状構造の腺様嚢胞癌において、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示したグループは CK19、CK14 による明瞭な二相性の構造を示した。

篩状構造の腺様嚢胞癌のうち $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に不連続な陽性を示したグループでは腫瘍性導管上皮細胞は腺管の極性を保つ点では低分化な傾向を示し、二相性の構造は不明瞭であった。

腺様嚢胞癌の充実性構造では、腫瘍胞巣周囲の顕著な $\alpha(IV)$ 鎖の消失を伴い、腫瘍胞巣は主に CK14 陽性の未成熟な腫瘍性導管上皮細胞、あるいは腫瘍性筋上皮細胞から構成されていた。

篩状構造において、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示すグループの Ki-67 L.I.は有意差をもって $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖陰性のグループより低値を示した。この結果により基底膜のリモデリングが分裂活性の増加と関連している事が示唆された。

しかし、管状構造における、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示すグループと $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖陰性のグループ間の Ki-67 L.I.の比較において有意差は認められなかった。

この二者の間に有意差を認めなかった原因として、篩状構造に比べ、症例数が少なかった。

たためと考えている。

全ての充実性構造において $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続性に陽性を示すものはなかったため、 $\alpha(IV)$ 鎖間における Ki-67 L.I.の比較検討は出来なかったが、Ki-67 L.I.が管状構造や篩状構造よりも明らかに高値を示し、この結果は過去の文献と一致している (Nordgard S et al, 1997)。

3.癌の浸潤と $\alpha(IV)$ 鎖の動態について

我々の過去の研究において (Hiki Y et al, 2002, Nakano k et al, 2001, Nakano S et al, 1999, Tanaka K et al, 1997)、 $\alpha(IV)$ 鎖分子の様々な消失様式は癌細胞の増殖・浸潤に密接に関連している事を示した。正常乳管上皮は $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖からなり、唾液腺導管と似た構造をしている。乳癌の浸潤の進行に際して $\alpha(IV)$ 鎖が、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の連続的な発現から $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖のみの発現へとリモデリングするのも同様の結果となった (Nakano S et al, 1999)。

今回の研究では、腺様嚢胞癌の充実性構造は $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 鎖の消失傾向、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の完全な消失を示した。これらの所見は乳癌と同様に、進行した浸潤癌の所見と似ている。このことは充実性構造の予後が不良である事と関連しているのかもしれない (Hamper K Y et al, 1990, Nascimento AG et al, 1986)。

一方、 $\alpha 1(IV)$ 、 $\alpha 2(IV)$ 、 $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖に連続陽性を示す多くの管状構造と一部の篩状構造の腺様嚢胞癌は、より高分化な表現型であると考えられる。HE 染色において、好酸性の基底膜様物質はこのタイプの腺様嚢胞癌に豊富に認められる。これらの組織亜型

では、浸潤の際に基底膜物質の活発な産生を伴っているかもしれない。

4.正常唾液腺の発生過程からみた腺様嚢胞癌の組織型について

正常唾液腺の発生の際に、導管上皮細胞系統と筋上皮細胞系統の2系統の系列が考えられている。文献によると (Martins MD et al, 2002, Ogawa Y et al, 2000)、導管上皮細胞の成熟とともに、まず CK14 陽性細胞が出現し、ついで CK14 と CK19 を同時に発現した細胞が出現する。一方筋上皮細胞系統では α -SMA の発現が CK14 の発現に先行することが報告されている。それ故、我々は真の管腔を囲んでいる CK19 のみを発現している腫瘍性導管上皮は高分化型の上皮系統の表現型と考え、充実性の腫瘍性の胞巣を形成している CK14 陽性の細胞は未分化な表現型と考える。同様に、 α -SMA のみ発現している腫瘍性の筋上皮細胞は未分化な表現型であり、 α -SMA と CK14 を同時に発現している腫瘍性筋上皮はより高分化な表現型であると考え。これらことから、この3種の抗体を用いることにより、腫瘍性導管上皮細胞と腫瘍性筋上皮細胞を区別することが可能であり、また CK14 と CK19 の染色により二相性の構造を明らかにすることで分化度の指標とすることが可能であると考え。

以上より、腺様嚢胞癌におけるIV型コラーゲン α 1(IV)、 α 2(IV)、 α 5(IV)、 α 6(IV)鎖による基底膜の不規則性は細胞増殖、細胞分化、組織構築に密接に関連している事が示唆された。

参考文献

Araujo VC, Loducca SVL, Sousa SOM, Williams DM, Araujo NS (2001) The cribriform features of adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma: cytokeratin and integrin expression. *Ann Diagn Pathol* 5:330-334

Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA. (1983) Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest.*: 49:140-147

Borza DB, Bonder O, Ninomiya Y, Sado Y, Naito I, Todd P, Hudson BG: (2001) The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in smooth muscle basement membrane. *J Biol Chem.*: 28532-28540

Brazel D, Oberbaumer I, Dieringer H, Babel W, Glanville RW, Deutzmann R, Kuhn K (1987) Completion of the amino acid sequence of $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non triplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur J Biochem*; 168:529-536

Brazel D, Pollner R, Oberbaumer I, Kuhn K (1988) Human basement membrane collagen (type IV). The amino acid sequence of the $\alpha 2(IV)$ chain and its comparison with the $\alpha 1(IV)$ chain reveals deletions in the $\alpha 1(IV)$ chains. *Eur J Biochem* 172:35-42

Butkowski RJ, Shen GQ, Wieslander J, et al. (1990) Characterization of type IV collagen NC1 monomers and Goodpasture antigen in human renal basement membranes. *J Lab. Clin Med*; 115:365-373.

Brazel D, Oberbaumer I, Dieringer H, Babel W, Glanville RW, Deutzmann R, Kuhn K (1987) Completion of amino acid sequence of the $\alpha 1$ chain of human basement membrane collagen (type IV) reveals 21 non triplet interruptions located within the collagenous domain. *Eur J Biochem* 168:529-536

Darling MR, Schneider JW, Phillips VM (2002) Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: a review and comparison of immunohistochemical markers. *Oral Oncol* 38:641-645

Dehan P, Waltregny D, Beschin A, Noel A, Castronovo V, Tryggvason K, De Leval J, Foidart JM (1997) Loss of type IV collagen $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in human invasive prostate carcinomas. *Am J Pathol* 151:1097-1104

Ellis GL, Auclair PL (1996) Adenoid cystic carcinoma. In: Ellis GL, Auclair PL (eds) *Atlas of tumor pathology: Tumors of the salivary glands*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington DC, pp 203-216

Hamper K, Lazar F, Dietel M, Caselitz J, Berger J, Arps H, Falkmer U, Auer G, Seifert G (1990) Prognostic factors for adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a retrospective evaluation of 96 cases. *J Oral Pathol Med* 19:101—107

Hiki Y, Iyama K, Tsuruta J, Egami H, Kamio T, Suko S, Naito I, Sado Y, Ninomiya Y, Ogawa M (2002) Differential distribution of basement membrane type IV collagen $\alpha(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$ and $\alpha 6(IV)$ chains in colorectal epithelial tumors. *Path Int* 52:224-233

Hostikka SL, Eddy RL, Byers MG, Höyhtya M, Shows TB, Tryggvason K (1990) Identification of a distinct type IV collagen α chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA.*: 87:1606-1610

Hudson BG, Reeders ST, Triggvason K (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem.*: 268:26033-26036

Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Lang S, Blasenbren-Vogt S, Löhrens U (2002) A morphogenetic concept of salivary duct regeneration and metaplasia. *Virchows Arch* 440:519-526

Ihrler S, Zietz C, Sendelhofert A, Riederer A, Löhrens U (1999) Lymphoepithelial duct lesions in Sjögren-type sialadenitis. *Virchows Arch* 434:315-323

Leinonen A, Mariyama M, Mochizuki T, et al. (1994) Complete primary structure of the human type IV collagen $\alpha 4(\text{IV})$ chain. Comparison with structure and expression of the other $\alpha(\text{IV})$ chains. *J Biol. Chem.*; 269:26172-26177

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. (1983) Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest.*: 49:636-649

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. (1991) Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cancer Res* 51 (18 Suppl):5054s-5059s

Lohi J, Korhonen M, Leivo I, Kangas L, Tani T, Kalluri R, Miner JH, Lehto VP, Virtanen I (1997) Expression of type IV collagen $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ polypeptides in normal and developing human kidney and in renal cell carcinomas and oncocytomas. *Int J Cancer* 72:43-49

Mariyama M, Leinonen A, Mochizuki T, et al. (1994) Complete primary structure of the human $\alpha 3(\text{IV})$ collagen chain. Coexpression of the $\alpha 3(\text{IV})$ and $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chains in human tissues. *J Biol Chem.*; 269:23013-23017

Martins MD, Araujo VC, Raitz R, Araujo NS (2002) Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands. *Eur J Oral Sci* 110:316-321

Nagatsuka H, Siar CH, Nakano K, Tsujigiwa H, Gunduz M, Choufuku H, Lee Y-J, Naito I, Sado Y, Nagai N (2002) Differential expression of collagen IV α 1 to α 6 chains in basement membranes of benign and malignant odontogenic tumors. *Virchows Arch* 441:392-399

Nakano K, Iyama I, Mori T, Yoshioka M, Hiraoka T, Sado Y, Ninomiya Y (2001) Loss of alveolar basement membrane type IV collagen α 3, α 4, and α 5 chains in bronchioloalveolar carcinoma of the lung. *J Pathol* 194:420-427

Nakano K, Siar CH, Nagai N, Naito I, Sado Y, Nagatsuka H, Hoh C, Kurada K, Tsujigiwa H, Gunduz M (2002) Distribution of basement membrane type IV collagen α chains in ameloblastoma: an immunofluorescence study. *J Oral Pathol Med* 31:494-499

Nakano S, Iyama K, Ogawa M, Yoshioka H, Sado Y, Oohashi T, Ninomiya Y (1999) Differential tissular expression and localization of type IV collagen α 1(IV), α 2(IV), α 5(IV), and α 6(IV) chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors. *Lab Invest* 79:281-292

Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR (1986) Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer* 57: 312-319

Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama K, Naito I, Kishiro Y, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Sado Y (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies.: *J Cell Biol.*: 130:1219-1229

Nordgard S, Franzen G, Boysen M, Halvorsen TB (1997) Ki-67 as a prognostic marker in adenoid cystic carcinoma assessed with the monoclonal antibody MIB1 in paraffin sections. *Laryngoscope* 107: 531-536

Ogawa Y, Toyosawa S, Ishida T, Ijuhin N (2000) Keratin 14 immunoreactive cells in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of salivary glands. *Virchows Arch* 437:58-68

Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, et al. (1994) Identification of a new collagen IV chain, $\alpha 6(\text{IV})$, by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J Biol Chem.*; 269:7520-7526

Raitz R, Martins MD, Araujo VC (2003) A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med* 32:290-296

Sado Y, Kagawa M, Kishiro Y, Sugihara K, Naito I, Seyer JM, Sugimoto M, Oohashi T, Ninomiya Y (1995) Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different α chains of human type IV collagen. *Histochem Cell Biol* 104:267-275

Sado Y, Kagawa M, Naito I, Ueki Y, Seki T, Momota R, Oohashi T, Ninomiya Y: (1998) Organization and expression of basement membrane collagen IV genes and their roles in human disorders. *J Biochem.*; 123:767-776

Seki T, Naito I, Oohashi T, Sado Y, Ninomiya Y (1998) Differential expression of type IV collagen isoforms, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ chains, in basement membranes surrounding smooth muscle cells. *Histochem Cell Biol* 110:359-366

Soininen R, Huotari M, Hostikka SL, et al. (1988) The structural genes for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of human type IV collagen are divergently encoded on opposite DNA strands and have an overlapping promoter region. *J Biol Chem* 263:17217-17220.

Tanaka K, Iyama K, Kitaoka M, Ninomiya Y, Oohashi T, Sado Y, Ono T (1997) Differential expression of $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the basement membrane of basal cell carcinoma. *Histochem J* 29:563-570

Timpl R(1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. Eur J Biochem 180:487-502

Wieslander J, Langeveld J, Butkowski R, Jodlowski M, Noelken M, Hudson BG (1985) Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. J Biol Chem 260: 8564-8570

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, et al. (1993) Deletion of the paired $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. Science; 261:1167-1169