

学位論文

口腔扁平苔癬の異常角化に関する周辺帯形成
関連タンパク質の異所性局在

嶋田 勝光

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

(主指導教員：長谷川 博雅 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Aberrant localization of cornified cell envelop proteins
related to abnormal keratinization in oral lichen
planus

Katsumitsu Shimada

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral
Medicine

(Chief Academic Advisor : Professor Hiromasa Hasegawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. in Dentistry

口腔扁平苔癬の異常角化に關与する周辺帯形成 關連タンパク質の異所性局在

論文要旨

【緒言】口腔扁平苔癬（Oral lichen planus; OLP）は T リンパ球による上皮結合組織境界部（境界部）の傷害性病変である。病理組織学的には帯状リンパ球浸潤と基底層の液状変性に加え、しばしば角化亢進がみられる。しかし、角化異常に關する研究は乏しく、その發生機序は未だ不明である。角化には、周辺帯（Cornified cell envelope; CE）關連タンパク質が重要な役割を担っている。そこで我々は、OLP の角化異常の機序を明らかにするため、CE 關連タンパク質の局在を免疫組織学的に檢索し、上皮の傷害性変化や増殖性変化との關連を統計学的に解析した。

【実験材料及び方法】両側頬粘膜の網状白斑型 OLP の 20 例を実験材料とし、病理学的に著変のない頬粘膜 5 例を対照群とした。対照群の上皮厚径を基準に、OLP 群の上皮を菲薄部と肥厚部に分類した。上皮の各層の厚径を計測し、基底層の細胞傷害の程度を G0 から G3 に分類して検討した。境界部の変化を確認するために Collagen IV（COL4）、Keratin 19（K19）、Desmoglein 1（DSG1）、Ki-67 に対する一次抗体を用い、角化異常の検討のために CE 關連タンパク質である Involucrin（IVL）、Transglutaminase 1（TGM1）、Transglutaminase 3（TGM3）に対する一次抗体を用いて免疫染色を行った。COL4、K19、DSG1、Ki-67 は陽性率（陽性細胞数/一定領域の総細胞数）を、CE 關連タンパク質は陰性率（下層部の陰性細胞層の厚径/上皮全層の厚径）を算出して解析した。

【結果】OLP 群の上皮では菲薄部と肥厚部が混在し、肥厚部より菲薄部で傷害の程度が有意に高かった。K19 と COL4 陽性率は、対照群に比べ OLP 群で有意に低下したが、肥厚部と菲薄部の差はなかった。一方、DSG1 陽性率は、対照群と OLP 群間に有意差はないが、OLP 群の肥厚部の DSG1 陽性率は菲薄部よりも有意に高かった。Ki-67 陽性率は対照群と OLP 群間、肥厚部と菲薄部間でも有意差はなかった。

IVLは対照群の有棘層下部から細胞質に陽性だが、OLP群では最下層から細胞膜に陽性であった。TGM1は対照群とOLP群の有棘層中央部から細胞膜に陽性だが、OLP群では下層部の細胞質にも陽性を示し、陰性率は対照群よりOLP群で有意に低かった。TGM3は対照群の有棘層下部から核と細胞質に陽性で、OLP群では有棘層中央部から細胞膜にも陽性を示した。陰性率は、対照群よりOLP群で高い傾向だった。TGM1とTGM3の陰性率は弱い負の相関関係を示し、OLP群の肥厚部のDSG1陽性率とTGM3陰性率の間で強い負の相関がみられた。

【考察】OLP群ではK19とCOL4発現が減少し、境界部で傷害性変化が生じていることを確認できた。K19の減少は、上皮厚径、COL4およびKi-67と関連性はなく、対照群とOLP群間のみで有意差があり、基底細胞の形質の変化と考えられる。また対照群とOLP群ではKi-67とDSG1陽性率に差はなく、上皮性異形成症といえる明らかな所見はなかった。なお、OLP群の肥厚部でDSG1が有意に高値であった結果は、棘細胞症に伴う基底細胞の形質変化と考えられる。以上のように、実験に用いた試料は、研究対象として適切と考えられる。

OLP群ではIVLの細胞膜移行像とともにTGM1が下層部の細胞質から広く発現していた。表皮と同様に、OLPでも基底細胞の細胞質内TGM1がIVLの膜移行を促して、IVLの表皮型の細胞内局在を示していると考えられる。興味深いことに、TGM3は本来細胞質に局在するが、OLPでは細胞膜に発現していた。このような報告はこれまでなく、TGM3の異常な膜発現もIVLの膜移行に関与する可能性がある。OLPではTGM1とTGM3は相補的な関係で分布していた。この関係は表皮のTGM1とTGM3の分布に類似している。また、OLPの上皮肥厚部でDSG1とTGM3の発現に強い相関があり、肥厚部の角化亢進にTGM3が関与する可能性がある。IVLの膜移行は周辺帯形成に必須である。正常粘膜と異なり、TGM1とTGM3の表皮型の上皮内発現が、IVLの細胞膜移行に関与すると考えられる。以上のように、TGM1やTGM3の異所性の局在が、OLPの角化亢進に重要な役割を担っている可能性が示された。

緒 言

口腔扁平苔癬（Oral lichen planus; OLP）は遅延型アレルギーによる慢性炎症性疾患で、Tリンパ球による上皮結合組織境界部（境界部）の傷害性病変である¹⁾。OLPの免疫応答の引き金となるタンパク質の候補として口腔粘膜基底層の自己ペプチド²⁾や熱ショックタンパク質³⁾などが挙げられているが、遺伝子異常、ストレス、薬剤、歯科用材料、咬み煙草、C型肝炎ウイルスなどでも発生するといわれ、心因性、物理的、化学的あるいは生物学的因子が複雑に関与する¹⁾。このように背景が多様なOLPは、肉眼所見と病理組織学的所見で特徴付けられる臨床病理学的な疾患である⁴⁾。

OLPの抗原は依然不明であるが、未知の抗原によってCD8陽性T細胞が活性化されて上皮下にリンパ球が帯状に浸潤する。その結果、FasリガンドやTumor Necrosis Factor α (TNF α)などによって生じる基底層のアポトーシスなど、境界部の傷害性変化がこの病変の特徴である⁵⁾。その結果、上皮には液状変性などの診断価値のあるOLPの病理組織学的変化がみられる。また、OLPでは上皮細胞の変性に加えて基底膜の断裂が生じるが、病理組織学的には基底膜の構成タンパク質の部分的な消失がみられる⁶⁾。中でも基底膜の主成分であるCollagen IV (COL4)は炎症性変化によって産生されるMatrix metalloproteinase 9 (MMP9)で破壊される⁷⁾⁻⁹⁾。

傷害性変化に伴い、口腔粘膜上皮には様々な異常が観察される。口腔の非角化重層扁平上皮の基底細胞はKeratin19 (K19)を発現するが、基底細胞のK19は過形成病変で消失し、上皮性異形成症では異所性発現を認めるなど、病理学的変化に伴って発現が異なる^{10),11)}。OLPでも上皮の基底層に相当する最下層でK19が陰性となり、基底細胞に形質変化が生じている。同時に、非角化重層扁平上皮で発現するKeratin13 (K13)の消失や角化細胞で発現するKeratin10 (K10)が陽性を示すなど、角質層の肥厚に加えて有棘層にも異常が生じている¹²⁾。OLPでは角化重層扁平上皮に発現するKeratin1 (K1)とK10のmRNA発現量が上昇し、炎症性変化に伴って遺伝子発現の異常が生じ

ていることが示されている¹³⁾。

OLP の上皮は前述のような角化異常を示すと同時に、棘細胞症が観察される¹⁴⁾。棘細胞症を伴う重層扁平上皮でも、表層へ向って分化するが、この表層への分化にはデスモゾームが関与している。デスモゾームは、Desmoglein や Desmocollin など構成されるタンパク質複合体である¹⁵⁾。Desmoglein 1 (DSG1) は基底層より上層細胞で細胞の増殖を抑制し、分化の促進に関与する¹⁶⁾。

表皮の正常な角質層形成にはケラチンや周辺帯 (Cornified cell envelope; CE) が関与する。細胞質内では不溶性の角化型の K1 と K10 線維が凝集して密な束状を形成する¹⁷⁾。また、表皮の正常な角質層形成では、CE の組み立てが行われる¹⁸⁾。CE は角化の最終段階で細胞膜を置換するように形成される物理的、化学的に強靱な構造物で、表皮角質層におけるバリア機能を有する¹⁸⁾。CE 関連タンパク質は CE 構成タンパク質と架橋酵素タンパク質で、CE の形成に関わる重要な分子である。CE は細胞膜の内側で架橋されたタンパク分子からなる部分と層板顆粒由来のセラミドが細胞膜を置換した脂質エンベロープ部分から構成される。CE 形成の初期に Involucrin (IVL) と Transglutaminase1 (TGM1) が発現して細胞膜上で結合する。次いで細胞膜のリン脂質はセラミドにより置換され、これと IVL が TGM1 により架橋される。最終的に Transglutaminase3 (TGM3) によって架橋された Loricrin (LOR) と Small proline-rich protein (SPR) 分子の複合体が、細胞膜上で TGM1 により架橋され、強靱な CE が形成される¹⁸⁾ (図 1)。口腔の非角化重層扁平上皮では IVL が細胞質内に局在するが、OLP の口腔粘膜上皮では IVL が細胞膜に局在を示すことが報告されている²⁰⁾。しかし、OLP の角化異常機序の詳細は不明である。

そこで、リンパ球浸潤による境界部の傷害性変化と増殖性変化を確認するために COL4、K19、Ki-67、DSG1 の発現を検討し、OLP の角化異常の機序の一端を明らかにするために CE 関連タンパク質である IVL、TGM1、TGM3 の発現を免疫組織学的に解析し、各分子の発現

を統計学的に比較検討した。

実験材料及び方法

1) 症例選択

1997年～2013年の間に松本歯科大学病院で診断された OLP130 例を抽出した。なお、OLP の診断は Proposal for a set of modified WHO diagnostic criteria of oral lichen planus and oral lichenoid lesions を参考とし⁴⁾、臨床所見と病理学的所見の両者を満たす症例を OLP とした。これらの中から両側頬粘膜に発生した網状白斑型の症例で、薬物アレルギー、金属アレルギーおよび C 型肝炎ウイルス感染症の既往歴を欠く 20 例を抽出した。対照群は頬粘膜に発症した線維腫、血管腫および扁平上皮癌の断端の標本で、明らかな炎症性変化、角化亢進および異型細胞を欠く重層扁平上皮 5 例を用いた。

症例の平均年齢は対照群で 49.8 歳、OLP 群で 60.7 歳、男女比は対照群で 1:1.5、OLP 群で 1:5.7 である。対照群と OLP 群はいずれも頬粘膜上皮を用いたが、年齢、性別がバイアス因子となる可能性を排除出来なかった。

2) 形態学的解析

すべての検体は 10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、通法通り厚さ 3 μ m のパラフィン切片を作成した。HE 染色後、対照群の正常粘膜と OLP 群の病変部粘膜を対物レンズ 20 倍で 1360 \times 1024pixel の画像(幅径 433 μ m) を撮影し、Windows 版画像解析・計測ソフトウェア Win Roof (Mitani corporation、福井、日本)を用いて形態計測を行った。まず、対照群で 1 例あたり 5 か所の上皮厚径を計測し、平均厚径を算出した。OLP 群の上皮では、病変内の最も薄い上皮と最も厚い上皮の厚径を計測し、平均厚径より薄い部位を菲薄部、厚い部位を肥厚部と分類した。さらに各症例の角化様式を確認し、非角化と錯角化および正角化に分類した。更に OLP 群では、菲薄部と肥厚部で角質層と有棘層の厚径を計 40 カ所で計測した。

基底層の傷害の程度を半定量化する為、HE 染色標本上で細胞傷害程度を Grade0 (G0) : 傷害がない、Grade1 (G1) : 基底細胞間が離解した軽度の変性、Grade2 (G2) : 基底細胞に単独の空胞化を伴う中等度の変性、Grade3 (G3) : 境界部が網状を呈する重度の変性の 4 段階に分類した。この分類に基づき、菲薄部 20 ヲ所と肥厚部 20 ヲ所の計 40 ヲ所の傷害の程度を評価した。また、OLP の上皮では傷害により基底層が消失している可能性があるため、対照群の基底層に相当する層を最下層と表記する。

3) 免疫組織化学的解析

免疫染色に用いた一次抗体は COL4(DAKO、Glostrup、Denmark)、K19 (Leica Biosystems、Newcastle、UK)、DSG1 (PROGEN、Heidelberg、Germany)、Ki-67 (Leica Biosystems、Newcastle、UK)、IVL (Leica Novocastra、Newcastle、UK)、TGM1 (Avnova、Taipei、Taiwan)、TGM3 (Sigma-Aldrich、St. Louis、USA) である (表 1)。抗原の賦活には ProtaneseK (DAKO、Glostrup、Denmark) による酵素法と 0.01M クエン酸緩衝液 (pH6.0) を使用した高压蒸気法 (121°C 15 分間) を用いた。TGM3 は常温 60 分、その他の一次抗体は 4°C 24 時間反応させた。二次抗体として Nichrei MAX-PO Multi (Nichrei、Tokyo、Japan) を常温 30 分間反応させた。3-3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAKO、Glostrup、Denmark) で発色後、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。前処置以降の工程は自動免疫染色機 HISTOSTAINER (Nichrei、Tokyo、Japan) を用いた。陰性コントロールとして一次抗体の代わりに Phosphate Buffered Saline (PBS) を用いた。また一次抗体として IVL と TGM3 を用い、二次抗体に anti-mouse F(ab') FITC (Alexa Fluor[®] 488F (ab')₂ fragment of goat anti-mouse IgG(H+L)) (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA) と anti-rabbit Cy5 F(ab') (Alexa Fluor[®] 647F (ab')₂ fragment of goat anti-rabbit IgG (H+L)) (Thermo Fisher Scientific、Waltham、USA) を用い、間接法にて

蛍光二重染色を行った。蛍光像は、オールインワン蛍光顕微鏡 BZ-X710 (KEYENCE、大阪、日本) を用いて観察した。

4) 免疫染色結果の評価

(1) 境界部の評価：COL4、K19、DSG1、Ki-67 の局在

1360×1024 pixels (幅 433.0μm) の範囲を対象とし、OLP 群では菲薄部と肥厚部の計 40 ヲ所を評価した。COL4 に関しては、COL4 陽性領域に配列する最下層の細胞を対象とし、最下層の総細胞数に対する陽性領域の細胞数の割合を COL4 陽性率とした。K19 陽性率と DSG1 陽性率は、最下層の総細胞数に対する K19 ないし DSG1 陽性細胞数の割合とした。Ki-67 陽性率は最下層から 3 層の範囲に存在する総細胞数に対する Ki-67 陽性細胞数の割合とした。

(2) CE 関連タンパク質 IVL、TGM1、TGM3 の評価

上述の方法と同様に 1360×1024 pixels (幅 433.0μm) の範囲を対象に、OLP 群では菲薄部と肥厚部の計 40 ヲ所の陰性率を評価した。陰性率は、上皮全層の厚径 (C) に対する下層部の陰性領域の厚径 (A) の割合で、この値を陰性率 (Negative Ratio; $NR=A/C$) とした。また、細胞膜の染色結果のみに注目し、上皮全層の厚径 (C) に対する下層部の細胞膜の陰性領域の厚径 (B) の割合を算出し、細胞膜陰性率 (Membranous Negative Ratio; $MNR=B/C$) とした (図 2)。

5) 統計解析法

対照群と OLP 群の陽性症例数は Fisher の正確確率検定を行った。各群の陽性率、陰性率と細胞膜陰性率については、Shapiro-Wilk 法で正規性を検定後、Ki-67 陽性率と TGM3 細胞膜陰性率はパラメトリック法で、他の陽性率、陰性率と細胞膜陰性率は以下に示すノンパラメトリック法で解析した。対照群と OLP 群間の独立 2 群間の比較は Mann-Whitney U 検定を、菲薄部と肥厚部の対応ある 2 群間の比較は Wilcoxon 符号付順位和検定を、OLP 群の各免疫染色結果の関連性は Spearman の順位相関係数を用いて解析した。また対照群 (G0) と

OLP 群 (G1~G3) との比較は Steel 法を、対照群、菲薄部、肥厚部の多群間比較は Steel-Dwass 法を用いた。なお、全ての統計解析は「R」(The Foundation for Statistical Computing, version 2.13.0) を用いて行い²¹⁾、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。また、 $-0.2 \leq \rho \leq 0.2$ を相関なし、 $-0.4 \leq \rho < -0.2$ 、 $0.2 < \rho \leq 0.4$ を弱い相関、 $-0.7 \leq \rho < -0.4$ 、 $0.4 < \rho \leq 0.7$ を中等度の相関、 $-1.0 \leq \rho < -0.7$ 、 $0.7 < \rho \leq 1.0$ を強い相関とした。

6) 倫理

本研究は松本歯科大学研究等倫理審査委員会の承認 (第 209 号) を得て、ヘルシンキ宣言 (2013 年) に則って実施した。

結 果

1) 上皮の厚径

対照群の上皮厚径の平均値は $262.2\mu\text{m}$ 、OLP 群の平均値は $268.7\mu\text{m}$ だった。OLP 群で、同一症例内に菲薄部と肥厚部がみられた症例は 11/20 例 (55.0%) で、菲薄部と肥厚部における対応のある 2 群間比較は、これら 11 例を用いた。なお、菲薄部のみが認められた症例は 6/20 例 (30.0%)、肥厚部のみが認められた症例は 3/20 例 (15.0%) であった。

2) 角化様式と角質層と有棘層の厚径

対照群全例 (5/5 例) が非角化ないし軽微な錯角化を示した。OLP 群では過正角化症例は 3/20 例 (15.0%)、過正角化と過錯角化の混在する症例は 4/20 症例 (20.0%)、過錯角化症例は 13/20 例 (65.0%) であった。

角質層の厚径は、対照群では $15.4\mu\text{m}$ 、OLP 群では $45.3\mu\text{m}$ 、OLP 群の肥厚部では $46.6\mu\text{m}$ 、菲薄部では $37.6\mu\text{m}$ であった。OLP 群は対照群と比べ有意に ($p < 0.001$) 肥厚していた。OLP 群の肥厚部は対照群よりも有意に ($p < 0.001$) 厚かった。OLP 群の菲薄部は対照群より

も厚い傾向を示したが有意差はなかった。OLP 群の肥厚部は菲薄部より厚い傾向を示したが有意差はなかった。

一方、有棘層の厚径は、対照群では 129.5 μm 、OLP 群では 175.7 μm 、肥厚部では 316.7 μm 、菲薄部では 127.0 μm であった。OLP 群は対照群と比べてやや厚い傾向はあるが有意差はなかった。OLP 群の肥厚部は対照群と比べ厚い傾向を示したが有意差はなかった。OLP 群の菲薄部は対照群比べ薄い傾向を示したが有意差はなかった。しかし、OLP 群の肥厚部は菲薄部と比べて有意に ($p < 0.001$) 厚かった。

3) 境界部の細胞傷害

基底層における細胞傷害の程度は、対照群の全例 (5/5 例) が G0 であった。これに対し OLP 群では G0 はなく (0/20 例)、種々の傷害が観察できた。OLP 群の病変全体で G1 のみが認められた症例は 3/20 例 (15.0%)、G1 と G2 が認められた症例は 4/20 例 (20.0%)、G1 と G3 が認められた症例は 3/20 例 (15.0%)、G2 のみが認められた症例は 6/20 例 (30.0%)、G2 と G3 が認められた症例は 3/20 例 (15.0%)、G3 のみが認められた症例は 1/20 例 (5.0%) であった。

OLP 群の傷害の程度の中央値は G2 で、対照群の傷害の程度の中央値である G0 よりも有意に ($p < 0.001$) 高かった。また、OLP 群の菲薄部と肥厚部の傷害の程度の中央値は、それぞれ G3 と G2 で、菲薄部が有意に ($p < 0.05$) 高かった。

4) 境界部のタンパク質の分布

COL4 は対照群の基底層下部の基底膜相当部に陽性であったが (図 3 a1)、OLP 群では基底膜相当部で断裂し (図 3 a2)、一部では肥厚も認められた。COL4 陽性率は対照群の 100.0%に対し、OLP 群では 77.7%と有意に ($p < 0.001$) 減少していた。しかし、菲薄部と肥厚部の間に有意差はなかった (表 2)。

K19 は対照群の基底層の細胞質に陽性であったが (図 3 b1)、OLP 群では最下層で一部陰性を示した (図 3 b2)。K19 陽性率は、対照群

80.9%に対し OLP 群で 10.2%と、OLP 群が有意に ($p < 0.001$) 低値を示した。しかし、菲薄部と肥厚部の間に有意差はなかった (表 2)。K19 陽性率を傷害の有無で比べると、G0 である対照群の陽性率に比べ、OLP 群の G1 ($p < 0.001$)、G2 と G3 ($p < 0.01$) の陽性率が有意に低下した (図 4)。

DSG1 は対照群の傍基底細胞層から上方の細胞膜に陽性で基底層の細胞膜に陰性を示した (図 3 c1)。OLP 群では傍基底細胞層から上方の細胞膜に陽性で、さらに一部の最下層細胞の細胞膜に陽性を示した (図 3 c2)。DSG1 陽性率は、対照群 7.3%、OLP 群 9.1%で、OLP 群が高い傾向を示したが、有意差はなかった。しかし、DSG1 陽性率は肥厚部で 41.7%、菲薄部で 0.0%であり、肥厚部の陽性率が有意に大きい値を示した (表 2)。

Ki-67 は対照群の傍基底細胞層の核に陽性で (図 3 d1)、OLP 群の最下層から第 3 層目の範囲に散在性に陽性を示した (図 3 d2)。Ki-67 陽性率は、対照群で 42.5%、OLP 群 38.5%で、OLP 群が低い傾向を示したが有意差はなく、菲薄部と肥厚部の間にも有意差はなかった (表 2)。

5) CE 関連タンパク質の分布

IVL は、対照群の全例 (5/5 例) で有棘層下部から上方の細胞質に陽性で、細胞膜に陽性反応を認めなかった (図 5 a1)。一方、OLP 群では細胞質にのみ陽性像をみた例は 20.0% (4/20 例) で、80.0% (16/20 例) の症例は最下層から上方の細胞膜にも陽性を示した (図 5 a2)。このように対照群と比較して、OLP 群の細胞質陽性例は有意に減少し、反対に細胞膜陽性例は有意に増加した (表 3)。IVL 陰性率は、対照群 15.1%に対し OLP 群 10.7%で、対照群よりも OLP 群で低い傾向を示したが有意差はなく (表 4)、対照群 (G0) といずれの傷害の程度 (G1 ~ G3) との間にも有意差はなかった。また、IVL 細胞膜陰性率については、細胞膜に陰性だった対照群 (100.0%) に対し OLP 群が 23.6%と有意に減少した (表 4)。

TGM1 は、対照群の全例（5/5 例）で有棘層中央部から上方の細胞膜に陽性で、OLP 群でも全例（20/20 例）で有棘層中央部から上方の細胞膜に陽性だった（図 5 b1）。ところが、対照群で認めなかった細胞質陽性像が OLP 群の 70.0%（14/20 例）で最下層から有棘層中央部にみられ（図 5 b2）、対照群と比較して細胞質陽性例が有意に増加した（表 3）。TGM1 陰性率は、対照群の 30.1%に対し OLP 群で 0.0%と有意に OLP 群で低かった（表 4）。さらに、TGM1 が細胞質に陰性例と陽性例の間で比較すると、細胞質陽性例の TGM1 陰性率（17.7%）は陰性例（0.0%）と比較して有意に（ $p < 0.01$ ）低かった（図 6）。TGM1 細胞膜陰性率は、対照群 30.1%に対し OLP 群 18.5%と OLP 群で減少傾向を示したが有意差はなかった（表 4）。

TGM3 は、対照群の全例（5/5 例）で有棘層下部から上方の核および細胞質に陽性を示したが、細胞膜陽性所見はなかった（図 5 c1）。OLP 群では、有棘層中央部から上方の核、細胞質および細胞膜に陽性所見を認めた。しかし、核および細胞質のみに陽性所見を示した例はわずか 15.0%（3/20 例）で、85.0%（17/20 例）は細胞膜にも陽性を示し（図 5 c2）、細胞膜陽性例が有意に増加した（表 3）。また、TGM3 陰性率は、対照群 18.1%に対し OLP 群 28.1%と OLP 群が高い傾向を示したものの有意な差はなかった。しかし、TGM3 細胞膜陰性率は対照群（100.0%）に対し OLP 群（50.3%）で有意に減少した（表 4）。CE 関連タンパク質の細胞内局在、陰性率および細胞膜陰性率については、菲薄部と肥厚部の間に有意な差を認めなかった。

IVL と TGM3 の共発現を二重蛍光免疫染色で確認した。いずれのタンパク質も、対照群では核周囲の細胞質に陽性であるのに対し、OLP 群では細胞膜に陽性を示し、共発現していた。なお、TGM3 は対照群細胞の核および核周囲の細胞質に陽性で、OLP 群の細胞では、核、核周囲の細胞質および細胞膜に陽性を示した（図 7）。

6) 各種陽性率、陰性率間の相関関係

OLP 群の TGM1 陰性率と TGM3 陰性率は弱い負の相関関係を示し

た ($p < 0.05$ 、 $\rho = -0.38$ 、図 8a)。DSG1 陽性率と TGM3 陰性率は中等度の負の相関関係を示した ($p < 0.01$ 、 $\rho = -0.47$ 、図 8b)。特に OLP 群の肥厚部では、DSG1 陽性率と TGM3 陰性率は強い負の相関を認め ($p < 0.05$ 、 $\rho = -0.71$)、菲薄部で相関はなかった ($p > 0.05$ 、 $\rho = -0.10$)。また、他の陽性率、陰性率や細胞膜陰性率などの間に相関はみられなかった。

考 察

皮膚扁平苔癬では表皮直下のリンパ球による基底細胞層の傷害とそれに伴うターンオーバー時間の延長が生じると考えられている²²⁾。その結果、個々の表皮細胞は終末分化に至るまでの分化に要する時間が長くなり、細胞容積が増す。そして、ケラトヒアリン顆粒や脱核などの表層の分化に関連する構造を有する角質層と顆粒層は厚くなる²³⁾。今回実験に用いた 20 例は、臨床病理学的に網状白斑型を呈する OLP の典型例である。OLP 群では頬粘膜と比較して種々の程度の傷害があり、有棘細胞層の厚径はやや厚い傾向があり、角質層の厚径は有意に厚い。OLP 群の肥厚部では細胞傷害の程度は G2 と比較的弱く、有意な有棘細胞層の増加と角質層の増加が認められる。菲薄部では細胞傷害の程度は比較的 G3 と大きく、有意な棘細胞層の減少と角質層の軽度増加傾向を示す。これらより形態学的には、肥厚部と比べて菲薄部では基底細胞の傷害に伴って各層の厚径が全体的に減少していることがわかる。

そこで、免疫組織学的にも境界部の変化の確認を行った。OLP 群では対照群と比較して COL4 陽性率が減少していた。これは、COL4 の裏打ちを欠く細胞が基底層に配列していることを意味し、リンパ球浸潤による基底膜の部分的な消失が起こっていることを示している。また、菲薄部では肥厚部と比べて COL4 陽性率が減少する傾向を示していた。これは、細胞傷害の強い菲薄部では肥厚部と比べて基底膜の破壊も強いことを表している。

OLP 群では対照群と比較して、細胞の傷害の程度に関わらず K19

陽性細胞が減少していた。非角化重層扁平上皮の基底細胞マーカーのひとつである K19²⁴⁾の消失には様々な原因が考えられる。まず、基底細胞が T リンパ球の細胞傷害による変性やアポトーシスで消失し、傍基底細胞や有棘細胞が結合組織に面して露出することで生じる可能性がある。また、細胞傷害による基底細胞の形質変化²⁵⁾も指摘されている。そして、OLP では基底膜などの細胞外基質の損傷に伴う上皮の形質変化²⁶⁾も考えられる。さらに、K19 の発現は過形成上皮でも変化することが知られており¹¹⁾、K19 陽性率は細胞傷害だけでなく、細胞増殖によっても影響を受けうる。

細胞傷害の程度の弱い肥厚部では、K19 陽性細胞がほとんど消失する傾向が認められた。反対に傷害の強い菲薄部では K19 陽性細胞が残存する傾向がみられた。これは肥厚部での K19 消失は、細胞傷害による消失よりも、形質変化が要因となる可能性を示唆している。また、K19 陽性率は COL4 や Ki-67 の陽性率と相関がなかったことから、細胞外基質の損傷に伴う形質変化や、細胞増殖に伴う形質変化は否定的である。

OLP では傷害性変化に加え、再生変化による増殖亢進も起こる。事実、対照群では傍基底細胞に散在性に Ki-67 陽性細胞がみられるのに対し、OLP 群では下層 3 層部分に Ki-67 陽性細胞が出現し、不規則な細胞増殖が起こっていることがわかる。また、肥厚部では菲薄部と比べて Ki-67 陽性率が減少する傾向を示す。この結果は扁平苔癬で、基底細胞層の傷害に伴うターンオーバー時間の延長が生じることで細胞層が重積し、上皮厚径が肥厚する²²⁾ことと一致する。

DSG はデスモゾームの主要な構成タンパク質で¹⁵⁾、皮膚重層扁平上皮の基底細胞では DSG2 と DSG3 が細胞増殖を促進し、分化を抑制するのに対し、基底層より上層細胞では DSG1 が細胞の増殖を抑制し、分化を促進することに関与する¹⁶⁾。細胞傷害の程度の弱い肥厚部では、菲薄部と比べて DSG1 陽性率が有意に増加していた。これは、肥厚部では基底細胞の破壊が弱く、COL4 の残存も認められたことから、基底細胞の消失で最下層に DSG1 陽性細胞が露出した可能性は低い。む

しる肥厚部では基底層の段階で DSG1 が発現し、形質変化していると思われる。また、この形質変化は上皮の増殖異常よりも、分化異常を引き起こすと考えられる。

以上のように、本研究で用いた OLP 群の形態学および免疫組織学的特徴は皮膚扁平苔癬の特徴と一致する結果が得られた。

OLP において IVL が細胞膜に局在することが報告されている²⁰⁾。また、ヒト表皮角化細胞では CE の組み立て開始段階において TGM1 が細胞膜で IVL を架橋する²⁷⁾。つまり、IVL の細胞膜移行によって CE が形成される。対照群の頬粘膜で、非角化重層扁平上皮であることと IVL が細胞質に局限して膜移行がないことは一致している。一方、OLP 群の 80.0% で IVL の膜移行像がみられたことは、頬粘膜上皮に角化が起こっている客観的証拠である。リンパ球浸潤と上皮の傷害の程度が最も強い場合に、IVL の陰性領域が最小化するという報告がある²⁰⁾。傷害の程度が強くなると上皮の変性やアポトーシスが生じ、上皮は菲薄化する。すなわち下層の陰性領域の細胞が削り取られ、その結果 IVL の陰性領域が減少する可能性がある。また、Epidermal growth factor receptor (EGFR) 等の炎症性因子は IVL を誘導するので²⁸⁾、OLP の重症化に伴って IVL が下層から発現する可能性がある。以上のように、OLP では IVL が表皮と同様の局在（以下、表皮型という）の細胞内局在に変わる異常が再確認できた。

TGM、特に TGM1 と TGM3 は表皮の角化における IVL や LOR の架橋を担う重要な酵素である²⁹⁾。表皮基底細胞の細胞質に存在する TGM1 は²⁹⁾、プロテアーゼであるカルパインにより分断される³¹⁾。次に TGM1 は細胞質で再構築が行われ、複合体を形成し活性が亢進する³²⁾。さらに TGM1 は細胞膜結合時に高い活性を有する³³⁾⁻³⁵⁾。本研究の対照群の頬粘膜上皮では、TGM1 が細胞膜にのみ陽性であるが、OLP 群の 70.0% が細胞質内にも陽性を示し、局在の変化を認めた。OLP 群の TGM1 の細胞膜陰性率すなわち細胞膜の発現部位には差がないことから、活性の高い細胞膜結合型 TGM1 の局在には明らかな異常はない。しかし、TGM1 陰性率は OLP 群で減少し、TGM1 細胞質陰性群より

も TGM1 細胞質陽性群で有意に減少した。この結果から、細胞質内に局在する TGM1 は下層から発現していたことが解る。表皮と同様に、活性を有する基底細胞の細胞質内 TGM1 が IVL の膜移行を促し、その結果 IVL が表皮型の細胞内局在を示していると考えられる。

これに対し、頬粘膜上皮の TGM3 は、有棘層下部の核と細胞質に陽性で、TGM1 よりも下層から発現していた。また、CE 形成では TGM3 が LOR 内架橋や LOR と SPR を架橋するが^{27), 36)}、細胞膜に存在する CE への架橋には関与しない。ところが、興味深いことに OLP 群の 85.0%で、本来細胞質に局在する TGM3 が細胞膜に移行している所見を認めた。このような細胞膜移行像を示す報告は表皮や口腔粘膜いづれでもない。TGM3 はヒト表皮角化細胞においても細胞膜移行はみられず、細胞質と核に陽性を示し、細胞質内で CE 関連タンパク質の架橋を担うことが知られている³⁶⁾。TGM3 の細胞膜陽性所見の生物学的意味は、CE と関連し病態形成に重要である。実際には TGM3 は、細胞膜に結合していない可能性もある。しかし、TGM3 と IVL との蛍光二重染色から、明らかな細胞膜での共発現が認められ、TGM3 が IVL の細胞膜移行に関与している可能性が高い。OLP における TGM3 の機能は不明で、今後この点を詳細に検討する必要がある。また、COL4、K19 および Ki-67 陽性率と TGM3 陰性率あるいは細胞膜陰性率と相関はなかったが、DSG1 陽性率と TGM3 陰性率との間にのみ中等度の相関を示したことは興味深い。特に、OLP 群の肥厚部では DSG1 と TGM3 の間に強い相関関係がみられたことから、肥厚部では DSG1 陽性細胞が多く、TGM3 陰性率が低いという関係があった。すなわち、肥厚部では TGM3 が下層部から発現することが示唆された。上述したように、肥厚部では角質層の厚径が対照群に比べて厚く、より角化亢進が著明であることを考えると、TGM3 の発現も角化亢進に関与している可能性がある。

OLP 群では TGM1 陰性率と TGM3 陰性率との間に弱い負の相関関係があった。すなわち、下層で TGM1 が陽性の症例では TGM3 は陰性を示す傾向や、その逆を示す可能性がある。この現象は、上皮の下

部から TGM1 と TGM3 が相補的に発現して CE 形成を行っていることを示唆している。実際には、陰性率の中央値は TGM1 が 0.0% に対して TGM3 が 28.1% なので、TGM1 は最下層から発現し、下層部では TGM3 陰性の傾向がある。この分布様式は、TGM1 が上層部の膜に陽性で TGM3 が下層部の細胞質に陽性である正常頬粘膜上皮の分布様式と異なり、TGM1 が基底層の細胞質に、TGM3 が上層部の細胞質にみられる表皮の角化重層扁平上皮の分布様式^{31),37)}に類似している。このように、OLP では正常粘膜と異なり TGM1 と TGM3 の分布が表皮型の上皮内局在に変化することで角化重層扁平上皮の性格を示し、角化の亢進を起こしていることが示唆された。

結 論

OLP 群の最下層では、細胞傷害に伴う COL4 と K19 の消失と肥厚に伴う DSG1 の陽性化などがみられ、本研究で用いた試料は実験群として適切と考えられる。これらの OLP の上皮では IVL の膜移行像がみられ、弱い活性を持つ細胞質 TGM1 が下層から発現することを示した。さらに、TGM3 は DSG1 陽性を示す肥厚部の下層から発現し、異常な TGM3 の細胞膜発現があることを初めて示した。OLP では TGM1 と TGM3 は相補的に発現する傾向を示し、これらの分布様式が表皮に類似することを明らかにした。以上のように、頬粘膜上皮における異常な TGM の分布が、IVL の膜移行を促し、その結果、角化亢進をもたらす可能性が示された。

今後は、SPR の免疫組織学的検索を追加して CE 形質の機序を詳細に検索するとともに、TGM1、TGM3 などの CE 関連タンパク質の mRNA の発現や定量解析を行い、今回の結果を確認する予定である。また、TGM3 の細胞膜における機能や液性因子による TGM1 などの発現の変化を *in vitro* で明らかにしたい。

文 献

1. Ismail SB, Kumar SK and Zain RB (2007) Oral lichen planus

and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci* 49:89-106 .

2. Sugerman PB, Satterwhite K and Bigby M (2000) Autocytotoxic T-cell clones in lichen planus. *Br J Dermatol* 142:449-56.
3. Sugerman PB, Savage NW, Xu LJ, Walsh LJ and Seymour GJ (1995) Heat shock protein expression in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 24:1-8.
4. Rad M, Hashemipour MA, Mojtahedi A, Zarei MR, Chamani G, Kakoei S and Izadi N (2009) Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:796-800
5. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ and Bigby M (2002) The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:350-65.
6. Hirota J, Yoneda K and Osaki T (1989) Destruction of basement membrane and cell infiltrates in oral lichen planus. *Pathol Res Pract* 185(2):218-24.
7. Jungell P (1990) Immunoelectron microscopic study of the basement membrane in oral lichen planus. *J Cutan Pathol* 17:72-6.
8. Gunduz K, Demireli P, Inanir I and Nese N (2006) Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, and MMP-9) and fibronectin in lichen planus. *J Cutan Pathol* 33:545-50.
9. Paulusová V, Laco J, Drížhal I and Slezák R (2012) Expression of matrix metalloproteinase 9 in patients with oral lichen planus. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 55:23-6.
10. Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma JI and Semba I (2006) Immunohistological evaluation of Ki-67, p63,

- CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med* 35:369-75.
11. Lindberg K and Rheinwald JG (1989) Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. *Am J Pathol*. Jan 134:89-98.
 12. Jacques CM, Pereira AL, Maia V, Cuzzi T and Ramos-e-Silva M (2009) Expression of cytokeratins 10, 13, 14 and 19 in oral lichen planus. *J Oral Sci* 51:355-65.
 13. Bloor BK, Seddon SV and Morgan PR (2000) Gene expression of differentiation-specific keratins (K4, K13, K1 and K10) in oral non-dysplastic keratoses and lichen planus. *J Oral Pathol Med* 29:376-84.
 14. el-Labban N, Lucas RB and Kramer IR (1971) The mitotic values for the epithelium in oral keratoses and lichen planus. *Br J Cancer* 25:411-6.
 15. Green KJ and Simpson CL (2007) Desmosomes: new perspectives on a classic. *J Invest Dermatol* 127:2499-515.
 16. Getsios S, Simpson CL, Kojima S, Harmon R, Sheu LJ, Dusek RL, Cornwell M and Green KJ (2009) Desmoglein 1-dependent suppression of EGFR signaling promotes epidermal differentiation and morphogenesis. *J Cell Biol* 29:1243-58.
 17. Dale BA, Resing KA and Lonsdale-Eccles (1985) Filaggrin: a keratin filament associated protein. *J Ann N Y Acad Sci* 455:330-42.
 18. Eckert RL, Sturniolo MT, Broome AM, Ruse M and Rorke EA (2005) Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124:481-92.
 19. Candi E, Schmidt R and Melino G (2005) The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:328-40.

20. McCullough MJ and Radden BG (1992) Involucrin expression in some oral lichenoid lesions. *J Oral Pathol Med* 21:367-9.
21. Kanda Y (2013) Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone Marrow Transplant* 48:452-8.
22. Marks R, Black M and Jones EW (1973) Epidermal cell kinetics in lichen planus. *Br J Dermatol.* 88:37-45.
23. Pinkus H (1973) Lichenoid tissue reactions. A speculative review of the clinical spectrum of epidermal basal cell damage with special reference to erythema dyschromicum perstans. *Arch Dermatol.* 107:840-6.
24. Michel M, Török N, Godbout MJ, Lussier M, Gaudreau P, Royal A and Germain L (1996) Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109:1017-28.
25. Bloor BK, Malik FK, Odell EW and Morgan PR (1999) Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 88:187-95.
26. Liao SC, Hsieh PC, Huang JS, Hsu CW and Yuan K (2012) Aberrant keratinization of reticular oral lichen planus is related to elastolysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 113:808-16.
27. Steinert PM and Marekov LN (1999) Initiation of assembly of the cell envelope barrier structure of stratified squamous epithelia. *Mol Biol Cell* 10:4247-61.
28. Efimova T and Eckert RL (2000) Regulation of human involucrin promoter activity by novel protein kinase C isoforms. *J Biol Chem* 275:1601-7.

29. Candi E, Tarcsa E, Idler WW, Kartasova T, Marekov LN and Steinert PM (1999) Transglutaminase cross-linking properties of the small proline-rich 1 family of cornified cell envelope proteins. Integration with loricrin. *J Biol Chem* 274:7226-37.
30. Kim SY, Chung SI, Yoneda K and Steinert PM (1995) Expression of transglutaminase 1 in human epidermis. *J Invest Dermatol* 104:211-7.
31. Hitomi K, Yamagiwa Y, Ikura K, Yamanishi K and Maki M (2000) Characterization of human recombinant transglutaminase 1 purified from baculovirus-infected insect cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 64:2128-37.
32. Kim SY, Chung SI and Steinert PM (1995) Highly active soluble processed forms of the transglutaminase 1 enzyme in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 270:18026-35.
33. Phillips MA, Qin Q, Mehrpouyan M and Rice RH (1993) Keratinocyte transglutaminase membrane anchorage: analysis of site-directed mutants. *Biochemistry* 32:11057-63.
34. Rice RH, Rong XH and Chakravarty R (1990) Proteolytic release of keratinocyte transglutaminase. *Biochem J* 270:351-7.
35. Steinert PM, Kim SY, Chung SI and Marekov LN (1996) The transglutaminase 1 enzyme is variably acylated by myristate and palmitate during differentiation in epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 271:26242-50.
36. Lee CH, Marekov LN, Kim S, Brahim JS, Park MH and Steinert PM (2000) Small proline-rich protein 1 is the major component of the cell envelope of normal human oral keratinocytes. *FEBS Lett* 478:268-72.
37. Hitomi K, Presland RB, Nakayama T, Fleckman P, Dale BA and Maki M (2003) Analysis of epidermal-type transglutaminase (transglutaminase 3) in human stratified epithelia and cultured

keratinocytes using monoclonal antibodies. J Dermatol Sci
32:95-103.

表1 境界部とCE関連タンパク質の抗体

Antibody	Clone	Company	Dilution	Pretreatment
COL4	CIV22	Dako	1:50	ProK [#]
K19	b170	Leica	1:100	ProK [#]
DSG1	Dsg1-P23	PROGEN	Ready to use	HRM [§]
Ki-67	MM1	Leica	1:100	HRM [§]
IVL	SY5	Novocastra	1:100	ProK [#]
TGM1	—	Abnova	1:160	ProK [#]
TGM3	—	SIGMA	1:200	HRM [§]

[§] Heat antigen Retrieval Method [#] ProtenaseK

表2 境界部の変化に關与する抗体の陽性率

	対照群	OLP群	統計解析
COL4	100	77.8	***
K19	83.1	0	***
DSG1	7.3	9.1	
Ki-67	42.5 [§]	38.5 [§]	
	肥厚部	菲薄部	統計解析
COL4	87.1	72.9	
K19	0	5.3	
DSG1	41.7	0	*
Ki-67	40.6 [§]	45.4 [§]	

値は中央値(%)で、「§」は平均値を示す。

* p < 0.05, *** p < 0.001

表3 CE関連タンパク質の細胞内局在

	Localization	対照群		OLP群		統計解析
IVL	Cytoplasmic	5/5	(100.0)	4/20	(20.0)	***
	Membranous	0/5	(0.0)	16/20	(80.0)	**
TGM1	Cytoplasmic	0/5	(0.0)	14/20	(70.0)	**
	Membranous	5/5	(100.0)	20/20	(100.0)	
TGM3	Cytoplasmic	5/5	(100.0)	3/20	(15.0)	***
	Membranous	0/5	(0.0)	17/20	(85.0)	**

Cytoplasmic; cytoplasmic localization

Membranous; membranous localization

括弧内の値は%(陽性症例数/全症例数)である。

p<0.01, *p<0.001

表4 CE関連タンパク質の抗体の陰性率と膜陰性率

	Analyses	対照群	OLP群	統計解析
IVL	NR	15.1 (7.4 - 27.2)	10.7 (0.0 - 90.1)	
	M-NR	100.0 (100.0 - 100.0)	23.6 (2.5 - 100.0)	*
TGM1	NR	30.1 (25.6 - 34.4)	0.0 (0.0 - 41.1)	**
	M-NR	30.1 (25.6 - 34.4)	18.5 (0.0 - 41.1)	
TGM3	NR	18.1 (8.7 - 33.3)	28.1 (0.0 - 77.8)	
	M-NR	100.0 [§] (100.0 - 100.0)	50.3 [§] (10.2 - 100.0)	**

NR; Negative rate, M-NR; Membraneous negative rate

値は%(中央値)で、「§」は平均値を示す。

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

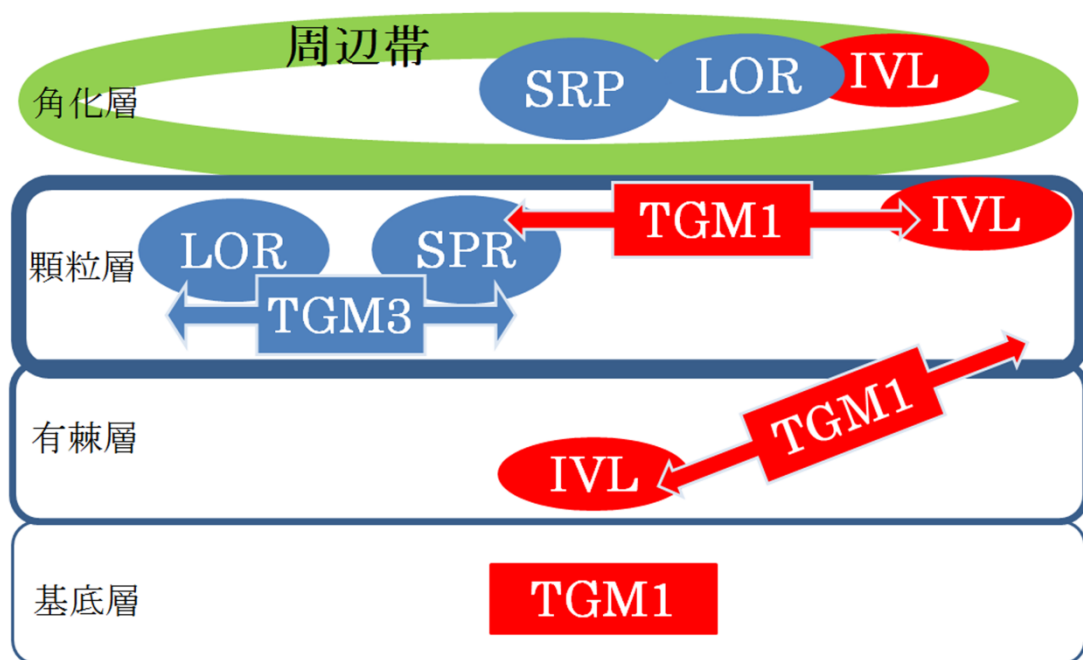


図1 表皮におけるCE関連タンパク質の局在と機能

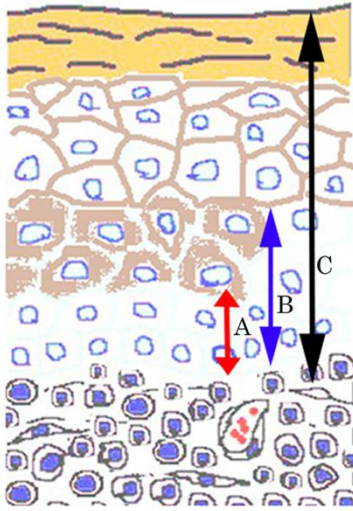


図2 IVL,TGM1,TGM3の
陰性率と膜陰性率の評価法

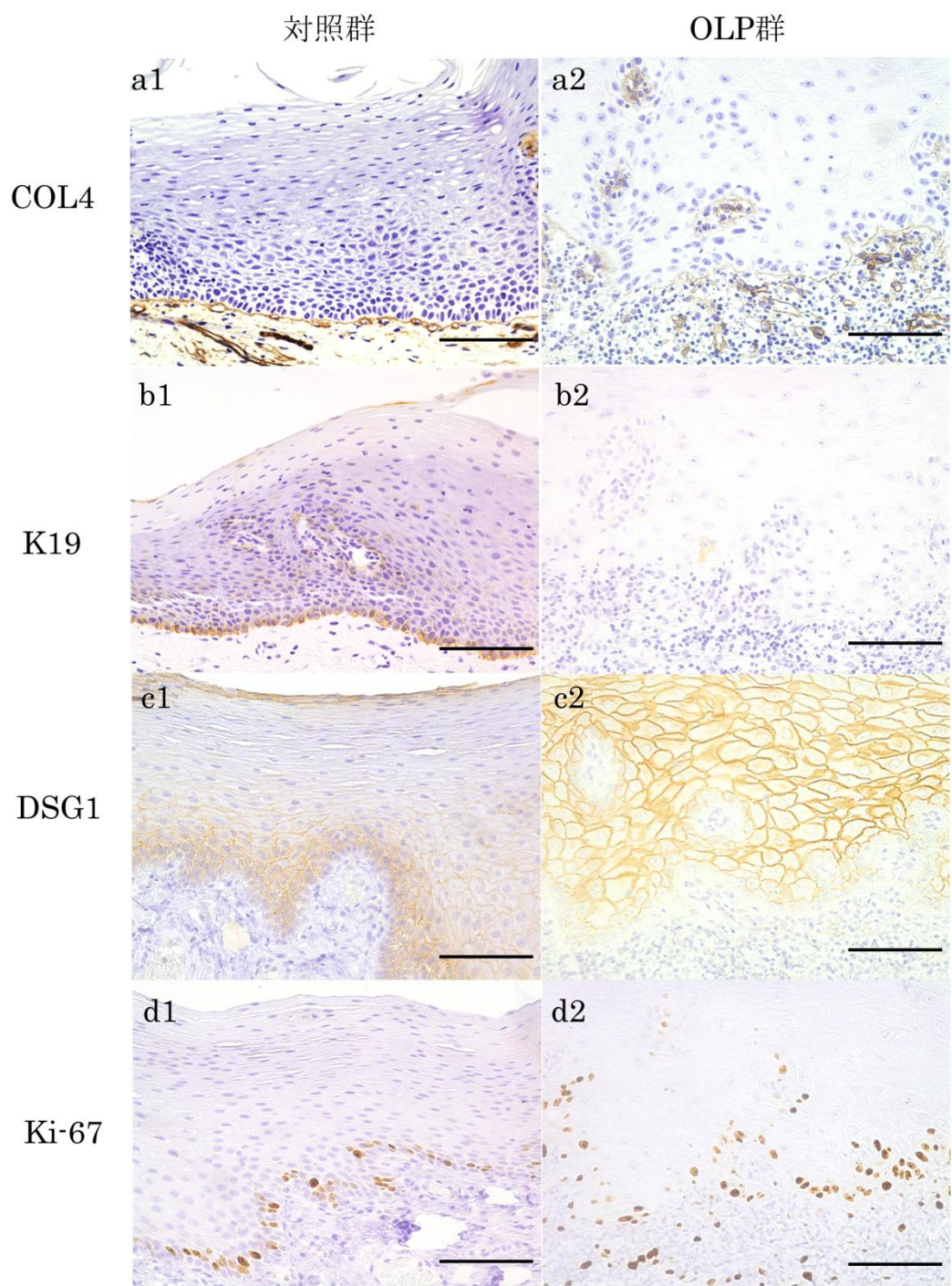


図3 境界部の病理組織学的変化

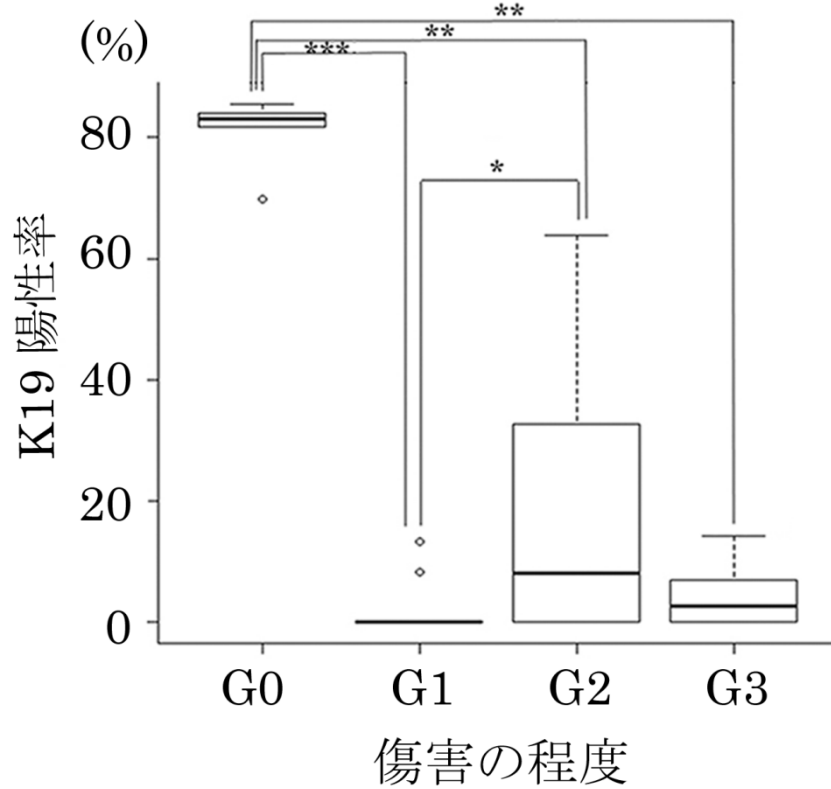


図4 K19の局在と傷害の程度の統計解析

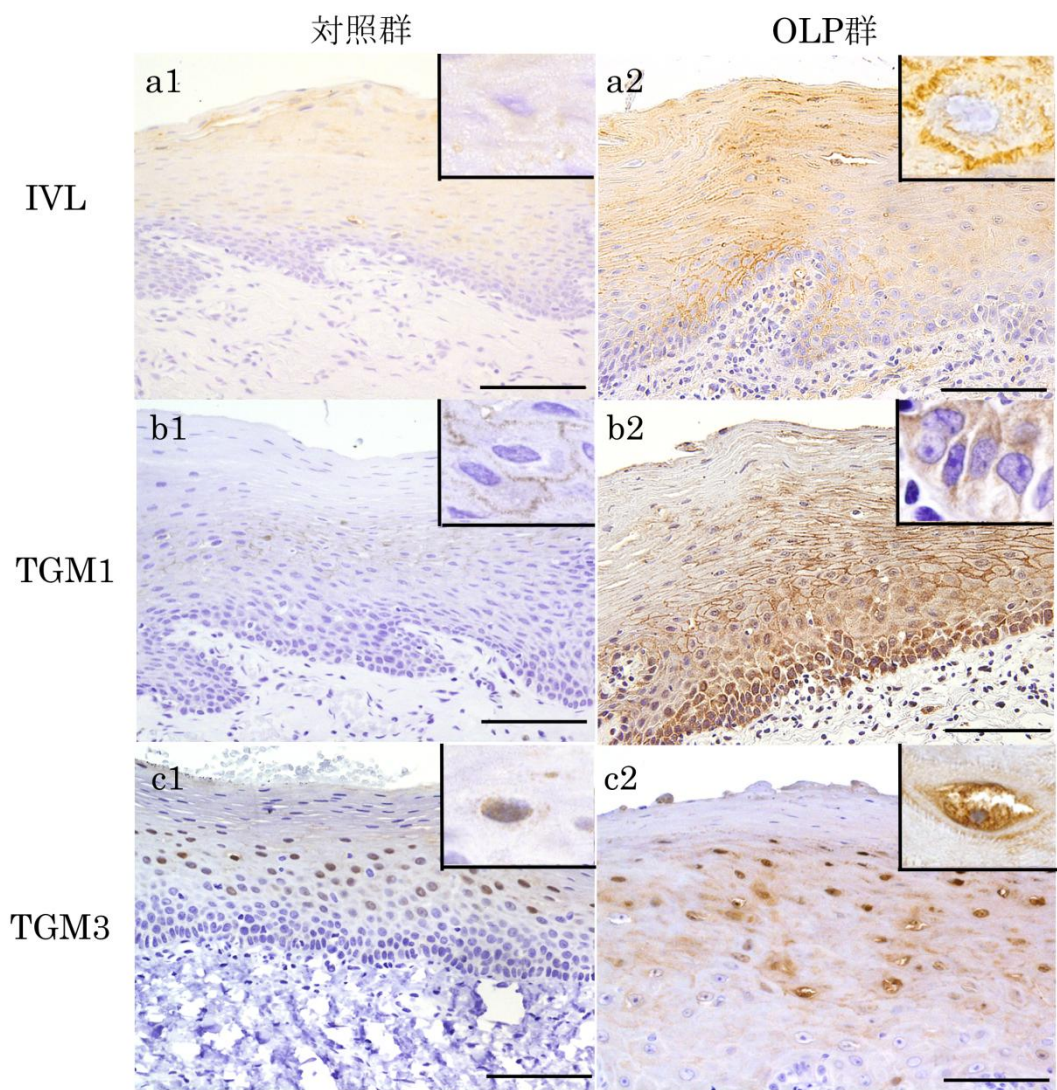


図5 CE関連タンパク質の細胞内局在と上皮内局在

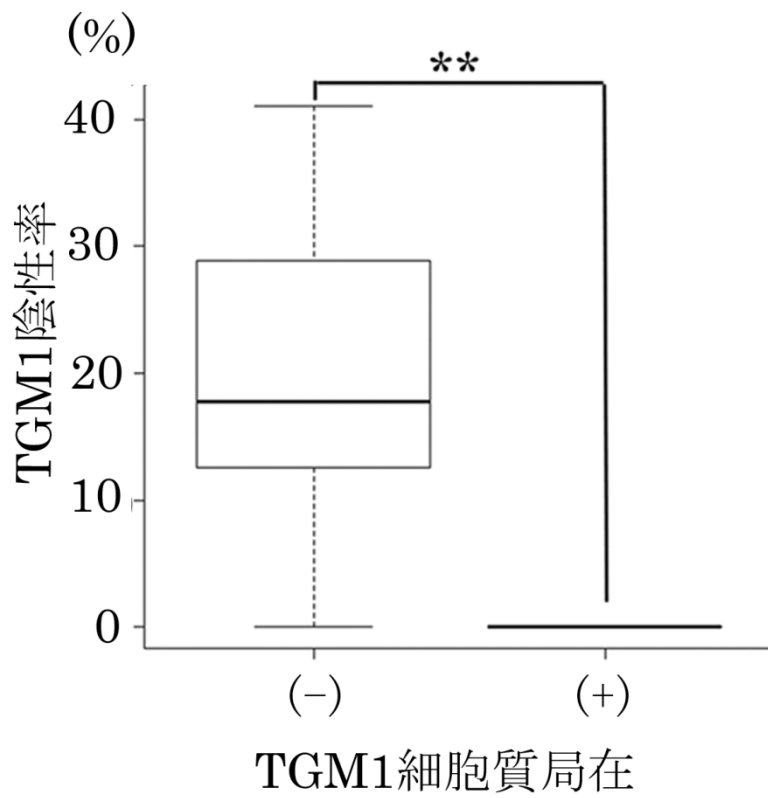


図6 TGM1陰性率と
TGM1細胞質局在の統計解析

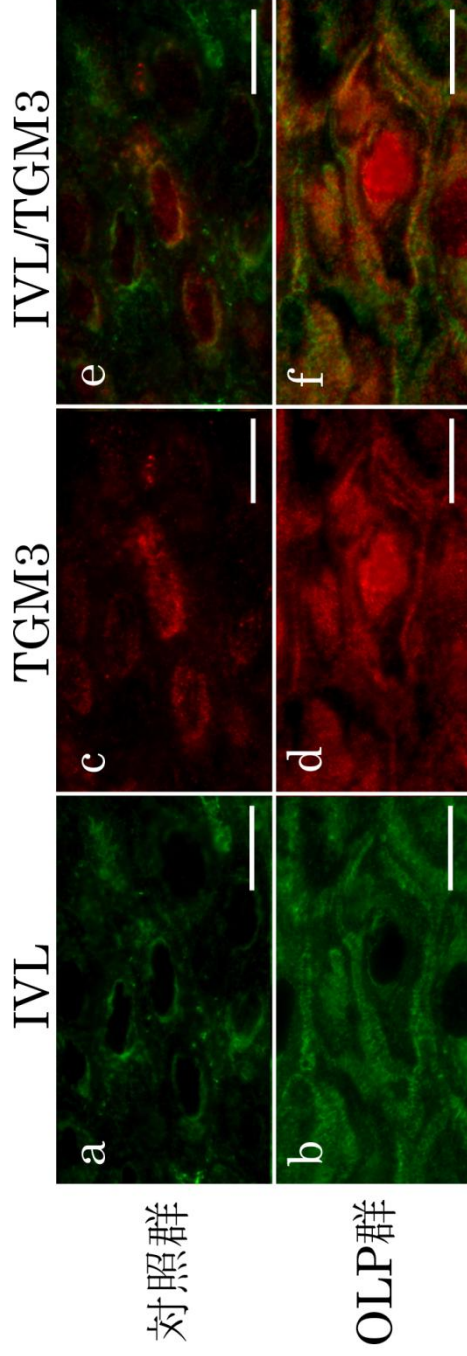
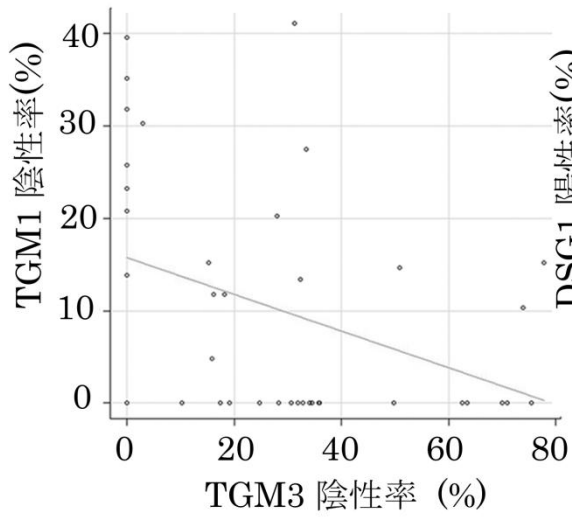


図7 CE関連タンパク質の細胞内局在

a TGM1 と TGM3



b DSG1 と TGM3

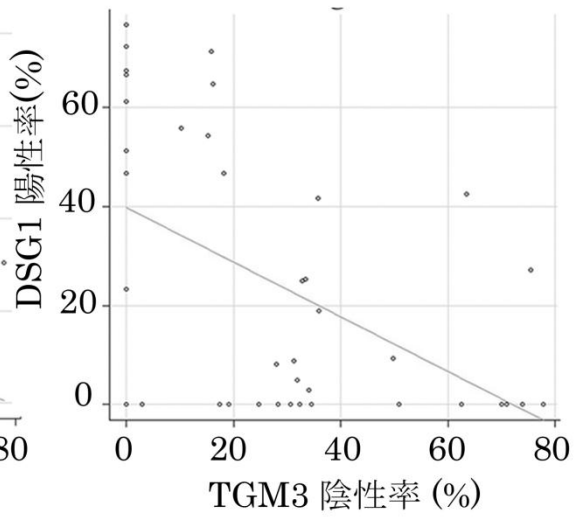


図8 TGM1 と TGM3、DSG1 と TGM3 の関連

付図説明文

- 図 1 CE 形成の初期に IVL と TGM1 が発現して細胞膜上で結合する。最終的に TGM3 によって架橋された LOR と SPR 分子の複合体が、細胞膜上で TGM1 により架橋され、強靱な CE が形成される (TGM1; トランスグルタミナーゼ 1、トランスグルタミナーゼ 3; TGM3、IVL; インボルクリン、LOR; ロリクリン、SPR; スモールプロリンリッチプロテイン)。
- 図 2 陰性率 (Negative Ratio; NR) は、上皮全層の厚径 (C) に対する下層部の陰性部分の厚径 (A) の割合 ($NR=A/C$) で、細胞膜陰性率 (Membranous Negative Ratio; MNR) は上皮全層の厚径 (C) に対する下層部の細胞膜の陰性部分の厚径 (B) の割合 ($MNR=B/C$) である。
- 図 3 COL4 は対照群では連続性に陽性で (a1)、OLP 群では種々の程度で断裂がある (b2)。K19 は対照群では基底層に陽性で (b1)、OLP 群では部分的に陰性である (b2)。DSG1 は対照群では基底細胞層で陰性で (c1)、OLP 群の肥厚部の基底細胞が陽性を示す (c2)。Ki-67 は対照群の傍基底細胞層に陽性で (d1)、OLP 群の下 3 層で散在性に陽性である (d2) (スケールバー; 100.0 μ m)。
- 図 4 K19 の陽性率は対照群 (G0) よりも OLP 群 (G1、G2、G3) で有意に低い。
- 図 5 IVL は、対照群の有棘層下部から上方の細胞質に陽性で (a1)、OLP 群では最下層から上方の細胞膜に陽性である (a2)。TGM1 は、対照群の有棘層中央部から上方の細胞膜に陽性で (b1)、OLP 群では有棘層中央部から上方の細胞膜と下層の細胞質に陽性である (b2)。TGM3 は、対照群の有棘層下部から上方の核および細胞質に陽性 (c1)、OLP 群では有棘層中央部から上方の核、細胞質および細胞膜に陽性である (c2) (スケールバー; 100.0 μ m)。
- 図 6 OLP 群内で TGM1 の細胞質に陰性例 (-) と陽性例 (+) 間で比較すると、TGM1 陰性率は有意に細胞質陽性例で低い。
- 図 7 IVL は対照群の細胞質に (a)、OLP 群の細胞膜に陽性を示す (b)

で、TGM3 は対照群の核と細胞質に (c)、OLP 群の核、核周囲の細胞質および細胞膜に陽性を示す (d)。オーバーレイ画像では、IVL と TGM3 の共発現が確認できる (e、f) (スケールバー; 12.5 μm)。

図 8 TGM1 と TGM3 の陰性率は弱い負の相関関係 ($r = -0.38$) を示し (a)、OLP 群の DSG1 陽性率と TGM3 陰性率は中等度の負の相関 ($r = -0.47$) を示す (b)。