

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792194

研究課題名(和文) 口腔扁平上皮癌における Claudin 機能発現が浸潤・転移に及ぼす影響

研究課題名(英文) Suppressive effect of invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by Claudin expression

研究代表者

吉澤 邦夫 (Yoshizawa, Kunio)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：60452108

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織化学染色において口腔扁平上皮癌における Claudin-7 陽性発現は、67 症例中 35 症例であり、52.2% であった。臨床病理学的因子との関連では、腫瘍の大きさ、リンパ節転移と浸潤様式に逆相関を示した。また、さらに浸潤様式山本・小浜分類別に口腔扁平上皮癌細胞株を用いて、タンパク発現と mRNA 発現を Western blotting 法と RT-PCR 法にて検索すると、浸潤様式が最も高く浸潤・転移能が最も強い I4D 型では、他の浸潤様式に比べて Claudin-7 発現は減弱していることが判明した。これらのことから Claudin-7 は浸潤・転移に密接に関連し、発現現弱は予後不良因子であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Using immunohistochemical techniques to examine the expression levels of claudin-7 in 67 cases of OSCC, claudin-7 expression was detected in 35 (52.2%) of the 67 cases. Moreover, six cell lines with various invasive properties were investigated in vitro to compare mRNA and protein levels of claudin-7 using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and the western blotting method. Decreased claudin-7 expression correlated significantly with T-category ( $p < 0.05$ ), lymph node metastasis ( $p < 0.01$ ), and mode of invasion ( $p < 0.001$ ). Patients with positive claudin-7 expression had a significantly better prognosis ( $p < 0.05$ ). Claudin-7 protein and mRNA levels were lower in the HOC313 and TSU cells, which have higher invasive potentials compared with other cell lines. These results suggest that loss of claudin-7 expression is associated closely with invasion and lymph metastasis and is an unfavorable prognostic factor in patients with OSCC.

研究分野：口腔腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：臨床腫瘍学 Claudin Tight Junction 口腔扁平上皮癌 浸潤 転移 山本・小浜分類 免疫組織化学的染色

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性口腔扁平上皮癌は、高度ながん浸潤・転移を来し、外科療法・放射線療法・化学療法を主体とした集学的治療を行ったとしても救命できない場合が多い。この難治性因子は様々な遺伝子の発現変化により引き起こされると報告されており、がんの悪性化においても浸潤、転移および薬剤耐性は個々に進行する面もあるが、一連の現象として遂行されている。その点からも色々な観点からがん細胞生成・進展のメカニズムを解明し、治療応用できるようにする必要がある。本研究は口腔扁平上皮癌の悪性化の指標として有効で、国内で普遍的に広く用いられているがん浸潤様式山本・小浜分類を用いて、臨床医療にフィードバックしやすいように、病理組織切片および口腔癌由来細胞株の浸潤の程度を差別化し、Claudin の細胞浸潤・転移および抗がん剤感受性に関わるメカニズムを解明することである。

(2) これまで筆者らは、浸潤度が高くなるにつれて、抗がん剤の細胞内輸送が排出する方向に移行していること(Yoshizawa et al., *Oncology Reports* 18, 2007)、浸潤性が高いと、uPA, uPAR の細胞外マトリックス分解酵素が強く発現し、一方でその抑制化に働く Maspin が減弱していることを報告してきた (Yoshizawa et al., *J Oral Pathol Med* 39, 2009. *Oncology Reports* 26, 2011)。その中でも、共通して、がん細胞が悪性化の最も強い要素である浸潤・転移能を強く持つ過程において、上皮間葉移行との関連が認められており、その上皮間葉移行のがん細胞性質が山本・小浜分類の Grade 4 D に相当し、細胞接着因子が減弱することが分かった(Taki et al., *Cancer Sci* 94, 2003)。これらのことより、がん細胞の高度浸潤性は、上皮間葉移行と密接に関与しており、とくに細胞間接着因子との関連性が強いことが判明してきている。がんの悪性化や抗がん剤耐性機構は様々な要素が複雑に相互作用して形成されていくものであり、臨床応用するためには統合的にがん化メカニズムを把握する必要があるため、細胞間接着因子についても今までの研究のアプローチを進展させながら、浸潤や抗がん剤耐性化への関連性を解明していく所存である。

(3) 今回は、細胞間接着因子 Claudin に着目した。Claudin は、24 種類のサブタイプからなるファミリーを形成し、正常細胞では細胞膜の極性を保ち、物質透過性を調節する作用を

持つことが知られている。各種臓器のがん化において Claudin のさまざまな発現変化が認められるが、口腔扁平上皮癌ではその関連性がよく分かっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 口腔扁平上皮癌においてがん化の様態をよく示すがん浸潤様式山本・小浜分類を用いて、Claudin 機能発現がどのようにがん細胞浸潤に関わるかを調べ、そのメカニズムを解明することでがん浸潤・転移の抑制化を検討した。

(2) 近年、徐々になんのがんの浸潤・転移のメカニズムが明らかになってきている。その中でも、研究代表者らはとくに Claudin を用いて臨床病態学的所見による治療法の選別を検討しており、がん浸潤様式山本・小浜分類に基づいたがん悪性化の系統的研究を進める。Claudin は 24 種類もあり、臓器特異性にその機能発現が全く異なることが報告されているが (Tsukita S et al, *Oncogene* 27, Review 6930-6938, 2008)、頭頸部癌ではとくに Claudin1, 4, 7 との関わりが強いことが報告されている。研究費用やエフォートを考慮して Claudin サブファミリーすべてを実験に供することは現実的に不可能であり、今回はおもに Claudin-7 にターゲットを絞って、浸潤様式 3 型、4C 型、4D 型由来細胞株の Claudin7 発現を検討した。

(3) 臓器特異性に Claudin のサブファミリーそれぞれに機能発現が大きく異なる点に関しては、臨床応用するうえで好都合である。近年、頭頸部の超選択的動注化学療法も飛躍的に進んでいる中、特定臓器に Claudin ターゲット薬を高濃度にすることが可能であり、さらに特定臓器に選択的に作用する性格を持つ Claudin にターゲットを絞り、その臓器特異性をきわめて高くすることが可能となるため、結果として全身に強く影響するような副作用が抑えられる。このことは新しい治療アプローチとしても非常に有効と考える。以上より、口腔癌においても浸潤・転移の分子機構が明らかにされてきており、更なる制御機構の解明につながるものとして遺伝子レベルで siRNA 処理や発現ベクターを用いることの重要性が増してきている。本研究は、Claudin を調節作動させる目的でベクター導入を利用し、口腔癌浸潤・感受性因子に対する治療薬開発を考える上で必要不可欠なものになると考えられる。最近の報告では、鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子機能工学の「21世紀COEプログラム」の研究成果では病気の治療に役立つ遺伝子を細胞内に運ぶ「ヒト人工染色体ベクター」の開発に成功

したとも報告しており、同ベクターにより様々な遺伝子を挿入して細胞内に安全に運び入れ、新たな染色体をつくることが可能になると考えられる。  
つまり、治療用の遺伝子を入れた細胞を培養し、自らに移植することで病気を治療できると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) これまでのがん浸潤様式(山本・小浜分類)に基づいた系統的研究の中でその由来が明確な口腔扁平上皮癌細胞株 8 種を実験に供した。山本・小浜分類浸潤様式 3 型として 3 種 (HSC-2, HSC-4 および OSC-20 細胞) を、4C 型として 3 種 (OBC-01, OSC-19 および OTC-04) を、4D 型として徳島大学口腔顎顔面外科学の長山勝教授から供与を受けた 2 種 (HOC313 および TSU) を用いた。これらの細胞株はすでに当科で培養し、様々な実験系で用いており、*in vitro* およびマウスを用いた *in vivo* の実験系でもその浸潤・転移能の再現性が高く、今回の研究に用いるべき適当な細胞株である。

#### (2) RT-PCR 法およびリアルタイム PCR :

Claudin-7 発現は RT-PCR 法およびリアルタイム PCR 法にて検討した。各種 mRNA の検出に使用するプライマーの配列についてはこれまで他のグループから報告されたものとし、予め PCR の条件を検討する時間は短縮でき、目的の達成により早く近づけるものと考えられた。尚、RNA の抽出は時間の節約から RNeasy kit<sup>®</sup> (QIAGEN) を購入し、各細胞から行った。

#### (3) Western blotting 法 :

前述のターゲットとする Claudin-7 タンパク質発現は Western blotting 法にて検討した。尚、タンパク質の抽出は研究時間の節約から M-Per<sup>®</sup> (PIERCE) を用いて行った。

#### (4) 免疫組織化学的染色法 :

*in vivo* における Claudin 発現の局在性を検討した。検出に使用した抗体は Western blotting 法にて使用した抗体と同一にした。材料としては金沢大学附属病院歯科口腔外科を受診した口腔扁平上皮癌一次症例患者 67 症例より得られた病理組織切片を対象とした。

### 4. 研究成果

(1) 免疫染色結果では、67症例中、35症例 (52.2%) に陽性所見が認められた。また、臨床病理学的因子との関連を検索したところ、減弱した Claudin-7 は、T 分類 ( $P < 0.05$ )、リンパ節転移 ( $P < 0.01$ ) と浸潤様式 ( $P < 0.001$ ) と正の相関を示し、全 5 年生存率においても Claudin-7 陰性症例では陽性症例に比べて予後不良であった。

#### (2) Western blotting 法

浸潤様式 4C 型由来細胞株の OTC-04 および 4D 型由来細胞株の HOC313, TSU において他の浸潤様式由来細胞株に比べて Claudin-7 の発現低下を認めた。

#### (3) RT-PCR 法

図 1 のように浸潤様式 4D 型由来細胞株 HOC313, TSU では他の浸潤様式由来細胞株に比べて Claudin-7 の発現低下を認めた。

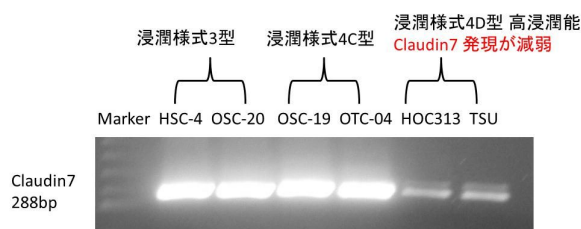


図 1

#### (4) 結果のまとめ

Western blotting 法、RT-PCR 法の結果からは、ともに浸潤様式 4D 型由来細胞株では Claudin-7 の発現低下を認めた。また、免疫組織化学的染色法による結果では、浸潤様式が高くなるにつれて、明らかに Claudin-7 発現が低下し ( $P < 0.001$ )、浸潤能の亢進によりリンパ節転移や生命予後不良にも関連したと考えられた。

上記から Claudin-7 の発現低下時は、浸潤能が高くリンパ節転移を来しやすく予後不良であることが考えられ、予後予測因子として利用できる可能性が示唆された。今後はさらに、そのメカニズムを解明することでがん浸潤・転移の抑制化を検討したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Yoshizawa K, Nozaki S, Kato A, Hirai M, Yanase M, Yoshimoto T, Kimura I, Sugiura S, Okamune A, Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Ueki K, Kawashiri S.: Loss of claudin-7 is a negative factor for invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology Reports* 29, 445-450, 2013. 査読有り

Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H, Nagano O.: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 73, 1855-1866, 2013. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

加藤広禄、木村依世、柳瀬瑞希、杉浦史郎、岡宗絢子、北原寛子、野口夏代、吉澤邦夫、中村博幸、川尻秀一  
口腔扁平上皮癌の浸潤先進部における Caveolin-1 発現に関する免疫組織化学的検討  
第 58 回 日本口腔外科学会  
2013 年 10 月 11 日~ 2013 年 10 月 13 日  
福岡国際会議場 (福岡)

吉澤邦夫、北原寛子、野口夏代、加藤広禄、中村博幸、川尻秀一  
口腔扁平上皮がん浸潤様式 4D 型におけるがん悪性化に関わる各遺伝子発現についての検討  
第 37 回 日本頭頸部癌学会  
2013 年 06 月 13 日~ 2013 年 06 月 14 日 京王プラザホテル (東京)

加藤広禄、野口夏代、吉澤邦夫、北原寛子、岡宗絢子、杉浦史郎、木村依世、八木瑞希、加藤阿希、平井真理子、川尻秀一  
AMPK 活性化薬剤による口腔扁平上皮癌の細胞増殖抑制効果の検討  
第 57 回 日本口腔外科学会  
2012 年 10 月 19 日~ 2012 年 10 月 21 日  
パシフィコ横浜 (横浜)

Yoshizawa K, Sugiura S, Okamune A, Kitahara H, Noguchi N, Kato K, Kawashiri

S.

Claudin-7 expression as a prognostic factor correlates with mode of invasion in oral squamous cell carcinoma.

17th World congress on advances in oncology and 15th International symposium on molecular medicine.

2012 年 10 月 11 日~ 2012 年 10 月 13 日

Creta Maris (Creta), Greece

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

吉澤 邦夫 (Yoshizawa Kunio)

金沢大学・大学病院・講師

研究者番号：60452108