

平成22年5月31日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791208
 研究課題名（和文）咽頭癌におけるタイト結合タンパク Claudin の浸潤関連因子としての役割
 研究課題名（英文）The role of tight junction proteins in human pharyngeal carcinoma
 研究代表者
 近藤 敦 (ATSUSHI KONDOH)
 札幌医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40457718

研究成果の概要（和文）：中咽頭側壁癌では Claudin-1 の強い発現は認められたものの、Claudin-7 および Tricellulin は発現低下又は発現が認められなかった。転移リンパ節でも原発巣と同様に Claudin-1 の強い発現が認められた一方で、Claudin-7 及び Tricellulin の発現は低下していた。また Claudin-1 の発現は浸潤面でより強い発現を認めた。HPV 感染との関連について In situ hybridization にて調べたところ、Claudin や Tricellulin の発現と HPV 感染については有意な関連は見いだせず、HPV の感染がタイト結合の発現に影響を与えないことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In human tonsillar squamous cell carcinoma, the expression of claudin-7 and tricellulin was weak or absent, whereas claudin-1 was observed strong expression. At the invasive front, claudin-1 was stronger expression. There were not significant relationships between the tight junction expressions and HPV status.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 耳鼻咽喉科学

キーワード：①タイト結合 ②咽頭癌 ③腫瘍浸潤

1. 研究開始当初の背景

がんの浸潤関連因子を変化させる可能性のあるものはいろいろ報告されているが、細胞と細胞を接着させバリア機構として働くタイト結合も浸潤関連因子を変化させることが報告されてきた。特にタイト結合の構成タ

ンパクである Claudin ファミリーの発見以来、このタンパクのがん細胞における発現の変化が浸潤・転移様式と密接に関連していることがわかってきた。タイト結合は従来の概念のように単に静的に細胞の接着を規定しているだけでなく、動的な調節により種々の機

能を発揮することがわかってきた。このような研究から、タイト結合のがん細胞浸潤においての重要性が再認識されたばかりでなく、Claudin タンパクを調節することにより、予後不良であった高悪性度の癌の浸潤を抑制できる可能性があり、がん治療の標的タンパクとしての重要性が増しており、Claudin タンパクは頭頸部癌での新しい治療戦略のターゲットとして重点的に研究を進めるべきタンパクと考えられた。

2. 研究の目的

(1) 咽頭に発生する扁平上皮癌の各 Claudin について発現を分子レベル、タンパクレベルで検討する。

中咽頭癌における生検材料や手術摘出の組織をタイト結合タンパクと浸潤関連因子との関連を検討することで、臨床的病理学的に特徴を捉える。

(2) 浸潤関連因子としての Claudin の発現を調節する因子について検討し、ウイルスとの関連を調べる。

タイト結合はウイルスの受容体としても働く。Adenovirus, Coxsackievirus の受容体はタイト結合 CAR であり Reovirus の受容体は同様にタイト結合 JAM である。このような点からも、ウイルスとタイト結合が密接に関連していることがわかる。中咽頭癌の一部はパピロームウイルス関連腫瘍であることから、ウイルス感染と Claudin 発現の関連を調べる。このことから、新しい腫瘍動態の概念構築に結びつけ、治療への応用の基礎研究とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

札幌医大病院耳鼻咽喉科における 2003～2008 年の 5 年間の中咽頭側壁癌 28 例の手術および生検標本
対照として扁桃肥大症例の摘出扁桃 3 例

(2) 方法

i) 免疫組織染色法

polyclonal anti-claudin-1 (1:100 dilution, Zymed)

polyclonal anti-claudin-7 (1:100 dilution, Zymed)

polyclonal anti-tricellulin (1:100 dilution, Zymed)

ii) 評価 (grading method) : “1+”, 0-25%; “2+”, 26-50%; “3+”, 51-75%; “4+”, 76-100% cells positive. “1+” = low, “2+ 3+ 4+” = high.

iii) Real-time PCR 法

iv) In situ hybridization 法

Wide spectrum HPV biotinylated DNA probe (Dako)

positive control - slides with HPV positive human cervical cancer

negative control - hybridization solution without probe

4. 研究成果

免疫染色の結果、ヒト正常扁桃では Claudin-1, -7 および Tricellulin が上皮全層に発現を認めた。一方、中咽頭側壁癌の典型例では Claudin-1 の強い発現は認められたものの、Claudin-7 および Tricellulin は発現低下又は発現が認められなかった。転移リンパ節でも原発巣と同様に Claudin-1 の強い発現が認められた一方で、Claudin-7 及び Tricellulin の発現は低下していた。

Real-time PCR を用いて検討したところ、mRNA レベルでも、claudin-7 と Tricellulin は Claudin-1 に比べ有意に発現低下していることが認められた。

各症例についてまとめると、Claudin-1 は 23 例 82% で発現が認められたのに対し、Claudin-7 と Tricellulin はそれぞれ 86% および 89% で発現が認められなかった。また Claudin-1 の発現が低下していた症例はすべてステージ IV という結果で、分化度が低下するとクロードイン claudin-1 の発現も低下する傾向にあった。

HPV 感染との関連について In situ hybridization にて調べたところ、HPV 陽性症例は 35.7% で、平均年齢では HPV 陰性群に比べ有意に若年であったが、Claudin や Tricellulin の発現と HPV 感染については有意な関連は見いだせず、HPV の感染がタイト結合の発現に影響を与えないことが示唆された。

頭頸部領域では、2002 年に Claudin-7 の発現低下が報告され、他の癌についてもいくつか同様の報告がなされており、例えば Claudin-7 の低下が E-cadherin の発現異常を引き起こし、癌の浸潤をもたらすと報告されている。また近年、EpCAM (上皮細胞接着装置) と claudin-7 との関連が言われている。EpCAM 蛋白は細胞接着に関与する膜蛋白の一種であり、頭頸部領域も含め多くの癌で EpCAM の発現と臨床予後との関係が報告されており、中咽頭癌における Claudin-7 の発現変化が、増殖や浸潤・転移といった腫瘍動態に影響を与えている可能性が考えられた。

一方、Claudin-1 に関しては、癌細胞や癌組織において発現上昇が認められたとする報告が多くされており、例えば口腔癌においては、Claudin-1 が MMP を介して癌の浸潤能を高めるといわれている。また最近直腸癌において、Claudin-1 が Wnt/beta-catenin 系により調節されることが分かっており、頭頸部癌でも Wnt/beta-catenin 系が癌細胞の増殖・浸潤に重要な役割をもつことが報告され

てる。今回検討した中咽頭癌においても、Wnt/beta-catenin 系の異常シグナルが Claudin-1 の発現増強を及ぼしている可能性も考えられた。

Tricellulin と癌との関連であるが、Tricellulin は近年新たに同定された分子であり、まだ癌における報告はない。今回の検討で、中咽頭側壁癌では Claudin-7 と同様の発現パターンをとっており、癌組織における両者の関連が示唆されたが、今後さらなる検討が必要であると思われる。

HPV 感染とタイト結合の関連だが、タイト結合関連分子はいくつかの病原体の受容体としても機能することはすでによく知られている。HPV とタイト結合が何らかの関連があるかと当初推測していたが、今回の検討では HPV 感染がタイト結合の発現変化には影響をあたえないことが分かった。

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)

①Takano K, Yamamoto M, Kondo A, Himi T: A case of reversible hyposmia associated with Mikulicz's disease. Otolaryngol Head Neck Surg. 141(3): 430-1, 2009 【査読有】

②Himi T, Takano KI, Kondo A, Kamekura R, Obata K, Yamamoto M, Takahashi H : Clinicopathological characteristics of Mikulicz' s disease and Küttner' s tumor Oral Med Pathol 14: 41-7, 2009 【査読有】

[学会発表] (計 6 件)

①第28回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会 (平成22年2月18-20日, 福井)

中咽頭側壁癌におけるタイト結合蛋白の発現変化の検討

近藤 敦, 高野賢一, 大國 毅, 亀倉隆太, 氷見徹夫

②第15回北日本頭頸部癌治療研究会 (平成21年10月24日, 仙台)

近藤 敦, 黒瀬 誠, 氷見徹夫: 当科における中咽頭癌症例の検討

③第22回日本口腔・咽頭科学会 (平成21年9月10-11日, 和歌山)

近藤 敦, 高野賢一, 氷見徹夫: 中咽頭扁平上皮癌におけるタイト結合蛋白の発現変化の検討

④第 33 回日本頭頸部癌学会 (平成 21 年 6 月 10-12 日, 札幌)

近藤 敦, 坪田 大, 氷見徹夫: 当科における中咽頭扁平上皮癌の臨床的検討

⑤第 14 回北日本頭頸部癌治療研究会 (平成 20 年 10 月 4 日 仙台市)

近藤 敦, 坪田 大, 白崎英明, 氷見徹夫: 当科における扁平上皮癌以外の頭頸部悪性腫瘍症例の検討

⑥第 32 回日本頭頸部癌学会 (平成 20 年 6 月 11~13 日 東京都)

近藤 敦, 坪田 大, 平 篤史, 氷見徹夫: 当科における頭頸部腺様嚢胞癌症例の検討

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 敦 (ATSUSHI KONDOH)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：40457718

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

氷見 徹夫 (TETSUO HIMI)
札幌医科大学医学部・教授
研究者番号：70404689

澤田 典均 (NORIMASA SAWADA)
札幌医科大学医学部・教授
研究者番号：30154149

亀倉 隆太 (RYUTA KAMEKURA)
札幌医科大学医学部・研究員
研究者番号：70404697

