

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791628

研究課題名（和文） 上中咽頭癌の EMT における EBV と HPV によるタイト結合の変化

研究課題名（英文） Altered expression of tight junctions in nasopharyngeal and oropharyngeal carcinoma of EMT in EBV or HPV infection

研究代表者

高野 賢一（KENICHI TAKANO）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：70404689

研究成果の概要（和文）：

中咽頭癌では Claudin-1 の強い発現は認められたのに対し、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、EMT と claudin-1 の関連が示唆された。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 oropharyngeal squamous cell carcinoma, the expression of claudin-7 and tricellulin was weak or absent, whereas claudin-1 was observed strong expression. We observed that claudin-1 was stronger expression at the invasive front, this suggests the interaction between expression of tight junctions and EMT. 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
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医師薬学

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：咽頭癌、EMT、タイト結合

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡の約 90%は腫瘍細胞の局所浸潤と遠隔転移によるものであり、癌制圧には浸潤・転移の抑制が不可欠である。癌細胞は多段階のステップを踏んで浸潤転移することが知られているが、その最初のステップは、癌細胞が原発巣の母集団から離れ、周囲組織

へ浸潤することから始まる。近年、この癌浸潤過程に、EMT と呼ばれる可逆的な細胞の形質変化が関与することが明らかになってきた。

EMT の誘導と維持には、細胞表面に存在するタイト結合や E-cadherin などの接着分子と腫瘍細胞周辺の微小環境の相互作用が重

要な役割を果たす。もともと上皮細胞は、タイト結合を手掛かりとして apico-basal 極性を形成する。この apico-basal 極性を徐々に失うことで、移動細胞としての極性を持つようになる。こうした EMT 獲得に際し、タイト結合の本体である Claudin の発現変化が知られる。Claudin の発現低下は、細胞極性を失わせ、かつ細胞間接着を“ゆるく”し、腫瘍の細胞運動性を高め浸潤能を増長させる。研究代表者らも、Claudin-1 の発現低下による EMT プロセスの一部を報告している。EMT が起こるプロセスは、MAPK や STAT3 などの複数の情報伝達系を介することがわかっているが、咽頭癌におけるその機構はいまだ不明な点が多い。EMT を制御することが可能であれば、腫瘍細胞の浸潤や転移を制御することができ、あらたな癌治療戦略に結びつく可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 咽頭癌組織におけるタイト結合—特に Claudin-1, -7, tricellulin の発現変化を分子レベル、タンパクレベルで明らかにする。

上咽頭癌は EB ウイルス(EBV)、中咽頭癌はヒトパピローマウイルス(HPV) 関連腫瘍であることは周知の事実である。咽頭癌において、Claudin の発現低下を認めることは先に触れたが、まずこうした Claudin の発現低下とウイルス感染の有無との相関、臨床背景との相関などを詳細に検討する。特に、周囲組織への浸潤をきたしている腫瘍については、EMT を獲得していると思われるその浸潤面の詳細な検討を行う。

(2) 咽頭癌細胞におけるウイルス感染による EMT への関与の解明

EBV の癌関連タンパク Latent membrane protein 1 (LMP1) が EMT を誘導することがわかっている(Horikawa T et al, Cancer Res 2007)。また、HPV が EMT に関与している可能性も報告されている。しかし、ウイルス感染によるタイト結合の変化を含めた EMT の詳細は全く不明である。そこで免疫組織学的、in situ hybridization, 血清学的検討、さらには培養細胞系を用いてウイルス感染あるなしによる違いを検討する。このことから、EMT に関する新たな概念構築に結びつく可能性が高い。最終的には咽頭癌細胞におけるウイルス感染の EMT への関与を明らかにし、EMT を制御できる物質を特定することで、進行癌を含めた癌の浸潤転移の抑制に結び付けたい。

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

免疫染色において、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ディン claudin-1 の発現も低下する傾向にあった。

EMT がより誘導されていると考えられる癌の浸潤面においては、claudin-1 の発現が低下しており、EMT との関連が示唆された。

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

現低下が報告されて以来、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いる。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であるが、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 10 件)

① Himi T, Takano K, Yamamoto M, Naishiro Y, Takahashi H. A novel concept of Mikulicz's disease as IgG4-related disease. *Auris Nasus Larynx*. 2011(in press) 【査読有】

② Kondoh A, Takano K, Kojima T, Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, Himi T. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma.

Acta Otolaryngol. 2011(in press) 【査読有】

③ Takano K, Kondoh A, Matsumiya H, Himi T. A well-differentiated liposarcoma of the hypopharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 144: 479-80, 2011. 【査読有】

④ Ogasawara N, Kojima T, Go M, Takano K, Kamekura R, Ohkuni T, Koizumi J, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Kurose M, Shintani T, Sawada N, Himi T. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. *Acta Otolaryngol*. 131:116-23, 2011. 【査読有】

⑤ Kamekura R, Kojima T, Takahashi A, Koizumi J, Ogasawara N, Go M, Takano K, Murata M, Tanaka S, Ichimiya S, Himi T, Sawada N. Thymic stromal lymphopoietin induces tight junction protein claudin-7 via NF-kappaB in dendritic cells. *Histochem Cell Biol*. 133:339-48, 2010. 【査読有】

⑥ Takano K, Yamamoto M, Takahashi H, Shinomura Y, Imai K, Himi T. Clinicopathologic similarities between Mikulicz disease and Küttner tumor. *Am J Otolaryngol*. 31:429-34, 2010 【査読有】

⑦ Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Ninomiya T, Kikuchi S, Go M, Takano K, Himi T, Sawada N. Expression and localization of tricellulin in human nasal epithelial cells in vivo and in vitro. *Med Mol Morphol*. 42:204-11, 2009. 【査読有】

⑧ Takano K, Yamamoto M, Kondo A, Himi T. A case of reversible hyposmia associated with Mikulicz's disease. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 141:430-1, 2009. 【査読有】

⑨ Himi T, Takano K, 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】

⑩ Takano 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】

[学会発表] (計 6 件)

① 第 23 回日本口腔・咽頭科学会総会ならびに学術講演会 (平成 22 年 9 月 16-17 日 東京都) 高野賢一, 山本元久, 苗代康可, 氷見徹

去. ミクリツ病における顎下腺の組織学的検討

② The 7th International Symposium on Tonsils and Mucosal Barriers of the Upper Airways. (2010.7.7-9, Asahikawa, Japan) Ken-ichi Takano, Takashi Kojima, Noriko Ogasawara, Mitsuru Go, Shin Kikuchi, Takafumi Ninomiya, Makoto Kurose, Jun-ichi Koizumi, Ryuta Kamekura, Norimasa Sawada, Tetsuo Himi. M-Like Cells of Human Adenoids in Vivo and in Vitro.

③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 福井市) 高野賢一, 亀倉隆太, 近藤 敦, 氷見徹夫. ミクリツ病における顎下腺の病理組織学的検討

④第 22 回日本口腔・咽頭科学会(平成 21 年 9 月 10-11 日, 和歌山) 高野賢一, 氷見徹夫: ミクリツ病における病理組織学的検討

⑤第 4 回日本小児耳鼻咽喉科科学会(平成 21 年 6 月 27-28 日, 名古屋) 高野賢一, 吉岡 巖, 佐藤 純, 氷見徹夫: 急性散在性脳脊髄炎症例における ABR の検討

⑥第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会(平成 21 年 2 月 12-14 日, 千葉) 高野賢一, 山本元久, 氷見徹夫: ミクリツ病における嗅覚障害の検討.

[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

高野 賢一 (KENICHI TAKANO)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 70404689

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

氷見 徹夫 (TESTUO 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