

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592601

研究課題名(和文) 頭頸部扁平上皮癌における細胞接着阻害分子ポドカリキシンの発現、および機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of Expression and Function of Podocalyxin in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

研究代表者

村上 大造 (Murakami, Daizo)

熊本大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70398212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭頸部扁平上皮癌において、ポドカリキシンの発現について臨床検体を用いて検索し、局所浸潤傾向、所属リンパ節、遠隔転移ならびに生存率との関連について解析することを第一の目的としていた。外科的切除を行った頭頸部扁平上皮癌組織でのウエスタンブロット法、および免疫染色を用いた解析ではこれらの組織での発現は確認されず、頭頸部扁平上皮癌での発現は否定的であった。しかしながら、術前生検では扁平上皮癌であったが、術後検体で粘表皮癌の診断となった組織の一部に発現を認め、腺癌系の組織での発現の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：A primary aim of this study is to analyze an expression of podocalyxin in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tissue and a relation between progression of HNSCC and podocalyxin. In examination with western blot and immunostaining method, we could not find the expression of podocalyxin in all HNSCC tissue. However, podocalyxin was expressed in high grade malignant mucoepidermoid carcinoma tissue which was diagnosed as SCC preoperatively. This result indicates the possibility of the expression of podocalyxin in adenocarcinoma.

研究分野：頭頸部癌

キーワード：頭頸部癌 ポドカリキシン

1. 研究開始当初の背景

上皮細胞はアドヘレンスジャンクション、タイトジャンクション、デスモゾームなどの細胞間接着機能により、バリアー機能を獲得するとともに、正常な極性や機能を維持している。この細胞間接着機能の低下は上皮構造の極性の乱れを経て、癌化の initiation と関連するほか、その後の間質への浸潤や遠隔転移の促進にも大きく関わることになる。したがって、E-カドヘリンなど細胞間接着を担う遺伝子は癌抑制遺伝子として多くの解析がなされてきた。

ポドカリキシンはシアロムチンファミリーに分類される細胞膜蛋白で、おもに腎臓の糸球体上皮細胞において発現が認められる。足突起など糸球体上皮細胞の独特な形態形成に寄与し、これにより上皮細胞間に間隙（濾過間隙）を形成し、糸球体濾過という腎臓特有の機能の維持に貢献している。この蛋白の細胞外ドメインはシアル酸、硫酸残基に富み、細胞接着阻害分子として機能し、本来緊密な接着構造を維持している上皮細胞において、あえてその接着を解除する機能を担うユニークな分子である¹⁾。近年、ポドカリキシンは糸球体上皮細胞以外に前立腺癌、乳癌、大腸癌などの癌組織での高発現が報告されている²⁻⁴⁾。さらに、この発現は疾患の予後不良因子になる可能性が示唆されている。発癌や浸潤・転移の過程におけるポドカリキシンの果たす役割についてはいまだ不明な点が多いが、上記の細胞接着阻害機能が関与していると推察されている。すなわち、細胞間接着能の低下により、原発巣での浸潤性が増すとともに、原発巣からの遊走能が亢進することにより、リンパ・血行性転移を促進すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、国内外においていまだ解析が

なされていない頭頸部扁平上皮癌(HNSCCC)において、ポドカリキシンの発現について臨床検体を用いて検索し、局所浸潤傾向、所属リンパ節や遠隔転移、生存率との関連について解析し、頭頸部癌における予後不良因子となりうる蛋白であるかについて検討することを第一の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 対象

術前に扁平上皮癌と診断された頭頸部癌患者の外科的切除後の検体 16 サンプルで診断、治療に影響しない一部を凍結保存したもの。ただし、うち 1 サンプルは術後病理診断で高悪性度粘表皮癌の診断へ変更となった。

(2) 方法

1) の頭頸部癌の凍結保存組織を Lysis buffer (QIAGEN; Qproteome Protein Prep Kit) を用いて溶解後に、BCA 法で蛋白量を測定後 Laemlli sample buffer により SDS 化した。蛋白量 10 μ g を SDS-PAGE で電気泳動 (BIORAD; precast gel 4-15%)、PVDF 膜 (BIORAD) へ転写した。抗ポドカリキシン抗体 (SantaCruz 3D3、B-11) を用いてウエスタンブロット法でポドカリキシンの発現を確認した。

また、(1) と同様の組織を用いて、クリオスタットにて 8 μ m の薄切切片を準備し、1 次抗体に抗ポドカリキシン抗体 (SantaCruz K-19)、2 次抗体に抗 goat Alexa594 (Thermo Scientific A11058) を用いて免疫染色を行い、ポドカリキシンの発現の有無を確認した。また、核染色にはヘキスト染色を用いた。

4. 研究成果

(1) 結果

ウエスタンブロット法による解析
ウエスタンブロット法での解析ではすべての検体でポドカリキシンの発現は確認できなかった。しかしながら、ポジティブコントロールである腎臓組織でも発現はほとんど

なく、高分子量 (>150kDa) のため、メンブレンへの転写効率が悪いことや本解析法では使用した抗体の感度が悪いことなどが原因である可能性も考えられた。そのため、発現を別の方法で解析するために、次項の免疫染色を追加した。

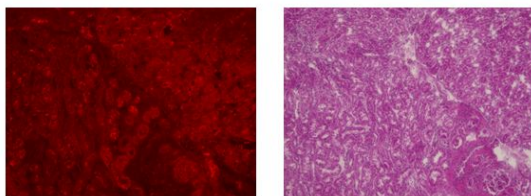
免疫染色

A.

免疫染色でも HNSCC 組織ではポドカリキシンの発現は確認されなかった。

下記にポジティブコントロール (マウス腎臓) および代表的な組織像を示す。

a. マウス腎臓 (ポジティブコントロール)



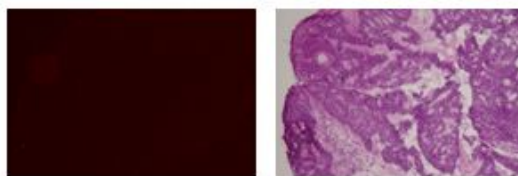
ポドカリキシン

HE

糸球体を中心にポドカリキシンの発現を認めた

b. HNSCC

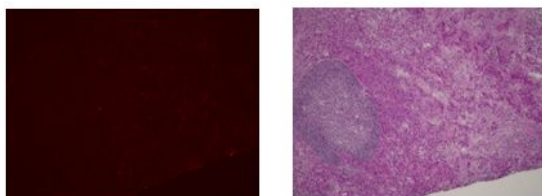
検体 1 (舌癌 T4aN2cM0)



ポドカリキシン

HE

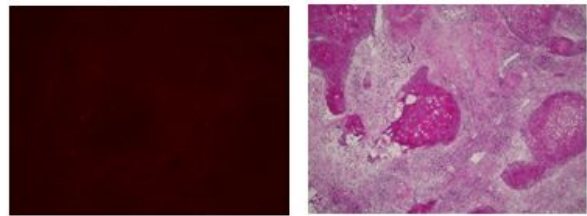
検体 2 (下咽頭癌 T3N2bM0)



ポドカリキシン

HE

検体 3 (舌癌 T4aN2bM0)

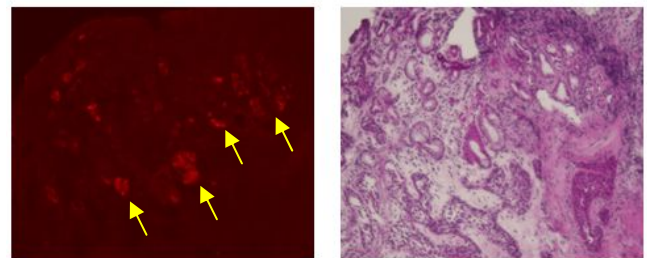


ポドカリキシン

HE

B.

術前生検で扁平上皮癌の診断で、術後の永久病理診断で高悪性度粘表皮癌の診断となった喉頭癌 (T3N0M0) において、



ポドカリキシン

HE

上記のとおり、ポドカリキシン陽性例が 1 例のみ観察された。

(2) 考察

本研究では、頭頸部癌扁平上皮癌症例でのポドカリキシンの発現は確認されず、この組織型において、ポドカリキシンが Cancer progression に関わっているという仮説は否定的となった。

しかしながら、術前生検で扁平上皮癌で永久病理結果で粘表皮癌に診断変更となった症例のみにポドカリキシンの発現を認めた。ポドカリキシンは胃癌、大腸癌、乳癌、前立腺癌などの腺系癌で高発現している報告が多く、頭頸部癌においても腺癌系の症例では、ポドカリキシンが発現している可能性、さらに、発現が確認された組織が高悪性であった点より癌の進展に寄与している可能性は否定できない。

今後、唾液腺癌で高悪性度の唾液腺導管癌や粘表皮癌などについて、ポドカリキシンの発現を解析していく方針である。

- 1) Nielsen JS, et al The role of podocalyxin in health and disease. J Am Soc Nephrol. 20(8):1669-76. 2009
- 2) Hsu YH, et al Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGEF7. Am J Pathol. 176(6):3050-61. 2010
- 3) Sizemore S, et al Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin. Cancer Res. 67(13):6183-91.2007
- 4) Larsson A, et al Overexpression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal cancer.Br J Cancer. 105(5):666-72. 2011

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 0 件)

〔 学会発表 〕 (計 0 件)

〔 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 〕
なし

6 . 研究組織
(1) 研究代表者
村上 大造 (Daizo Murakami)
熊本大学 医学部附属病院
研究者番号 : 70398212

(2) 研究分担者
()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
養田涼生 (Ryosei Minoda)
熊本大学 大学院生命科学研究所
研究者番号 : 30284772