

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 Babkair Hamzah Ali O
学位 博士（歯学）
学位記番号 新大院博(歯)第364号
学位授与の日付 平成28年9月20日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Aberrant Expression of the Tight Junction Molecules Claudin-1 and Zonula Occludens-1 Mediates Cell Growth and Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma (口腔扁平上皮癌におけるタイト結合分子 Claudin-1 および Zonula Occludens-1 の異常発現はがん細胞の増殖と浸潤を亢進させる)

論文審査委員 主査 教授 小林 正治
副査 准教授 程 瑠
副査 教授 佐伯万騎男

博士論文の要旨

【緒言】細胞-細胞間ならびに細胞-細胞外基質間の細胞接着の異常は、腫瘍の発生・進展過程において高頻度に認められ、がん細胞における細胞-細胞間接着の低下は原発部位から周囲への浸潤を促進し、さらには遠隔転移をもたらす。申請者が所属する研究室ではこれまでに、口腔粘膜の上皮異形成・上皮内癌において、接着結合分子 E-cadherin の発現がエピジェネティックに抑制され、同時に β -catenin の細胞膜から核への移行が生じることで、細胞増殖に寄与していることを報告した。この先行研究より、細胞接着の変化が口腔扁平上皮癌の進展に密接にかかわる可能性が考えられたので、次段階として、申請者は口腔粘膜増殖性病変での tight junction (密着結合、以下タイト結合) 分子の発現動態の変化と機能の究明に着手した。本研究では、タイト結合分子の中で、すでに種々の組織・細胞での発現が知られている claudin-1 (CLDN-1)と、その裏打ち蛋白質である zonula occludens-1 (ZO-1)に注目し、それらの口腔粘膜病変における発現状況と機能を解析した。

【材料と方法】実験①：口腔粘膜上皮内癌または扁平上皮癌の診断で外科的切除が施行された72症例を対象とした。それらの外科材料から正常粘膜上皮、上皮異形成、上皮内癌、扁平上皮癌の各段階を同時に含むパラフィン包埋薄切標本を用いて、正常部位と各病巣ごとに CLDN-1 および ZO-1 の発現様式を免疫組織化学的に検討した。なお、各病変段階の客観的評価として、keratin 17 と Ki-67 の免疫染色を併用した。実験②：ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞系 ZK-1、ZK-2、MK-1 を用い、両分子の局在を形態学的に観察し、遺伝子発現レベルを解析するとともに、small interfering RNA (siRNA)導入実験によって各分子の機能を検討した。

【結果と考察】 実験①：正常粘膜上皮(19部位)は CLDN-1 非陽性であり、ZO-1 陽性は5部位

(26%)で上皮細胞境界に認められた。二層性を呈する中等度相当の上皮異形成(50 病巣)では、12 病巣(24%)の上皮下半層の細胞質に CLDN-1 弱陽性がみられ、ZO-1 陽性は上皮下半層の細胞境界(48 病巣 ; 96%)および核(33 病巣 ; 66%)に認められた。一方、上皮内癌(53 病巣)では、下半層の Ki-67 陽性細胞域に一致して、細胞境界に CLDN-1 陽性(51 病巣 ; 96%)、一方、ZO-1 は細胞境界(52 病巣 ; 98%)および核(37 病巣 ; 70%)に陽性で、両分子の陽性率が上昇した。浸潤癌(34 病巣)では、全病巣で細胞境界に CLDN-1 および ZO-1 が陽性、ZO-1 の核陽性も 28 病巣(82%)で認められた。両分子の陽性域は Ki-67 陽性細胞の分布に合致していた。以上の結果より、正常口腔粘膜では発現しない CLDN-1 と ZO-1 両分子が異型上皮で発現し、悪性化進行に伴ってその発現がともに亢進することが明らかとなった。

実験②：三種の口腔扁平上皮癌細胞系いずれも CLDN-1 と ZO-1 を発現していたが、発現部位は相違していた。蛍光抗体法では、CLDN-1 がほぼ細胞境界部に局在するのに対して、ZO-1 は細胞境界部に加えて核にも局在していた。そこで、siRNA 法により CLDN-1 発現を抑制すると、細胞結合が低下して、胞巣状配列が失われ、ZO-1 発現も低下した。一方、ZO-1 発現抑制は細胞形態および CLDN-1 発現に明らかな影響を及ぼさなかったものの、細胞増殖能および浸潤能が有意に低下した。その分子機序としては、核に局在する ZO-1 が転写因子として機能し、細胞周期の回転が促進されると同時に、タイト結合分子による各種 MMP の活性化が考えられた。

【結論】 以上の結果より、タイト結合分子 CLDN-1 と ZO-1 はがん細胞における細胞-細胞間接着に寄与するのみならず、細胞増殖と浸潤に重要な役割を果たす可能性が示された。加えて、CLDN-1 の細胞膜陽性と ZO-1 の核陽性を免疫組織化学的に認識することが口腔粘膜境界病変の病理診断の補助的指標となることが証明された。また、本研究の成果によって、口腔がん細胞で高発現するタイト結合分子を標的とした新規制癌治療の開発にも展望が開けた。

審査結果の要旨

細胞と細胞、細胞と細胞外基質が接着する様式は臓器・組織ごとに異なり、それぞれに特異的な接着装置が形成されている。腫瘍の発生・進展過程においては、その接着分子の発現の変化等による細胞接合の異常が高頻度に出現することが知られる。とくに、がん細胞間接着の低下は原発部位から周囲への浸潤を促進して遠隔転移にいたるとも信じられている。申請者が所属する研究室ではこれまでに、口腔粘膜の上皮異形成・上皮内癌などの前がん病変で、接着結合分子のひとつ E-cadherin の発現抑制と同時に β -catenin の細胞膜から核への移行が生じて、細胞増殖が亢進する機序を明らかにした。この先行研究によって、細胞接着の変化が口腔粘膜のがん化過程に密接にかかわる可能性が考えられていたため、申請者は口腔粘膜増殖性病変におけるタイト結合分子の発現動態の究明に着手したという。本研究では、タイト結合分子の中でも、すでに多くの組織・細胞での発現が検討されてきた claudin-1 (CLDN-1)とその裏打ち蛋白質である zonula occludens-1 (ZO-1)に注目し、それらの口腔粘膜病変における発現状況と機能を解析している。

実験①では、口腔粘膜上皮内癌または扁平上皮癌の診断で外科的切除が施行された 72 症例を

対象としている。正常粘膜上皮、上皮異形成、上皮内癌、扁平上皮癌の各病変は keratin 17 と Ki-67 の免疫染色を併用した客観的指標を評価して判定し、上記の正常上皮と三病変を同時に含む外科切除標本のパラフィン連続切片を用いて、正常部位と各病巣について CLDN-1 および ZO-1 の発現様式を免疫組織化学的に検討したという。実験②として、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞系 ZK-1、ZK-2、MK-1 を用いて両分子の蛋白質レベルと遺伝子レベルでの発現状況を解析し、合わせて、RNAi 法によって各分子の機能も検討している。

その結果、正常粘膜上皮の 19 部位では CLDN-1 の陽性はなかったが、ZO-1 は 5 部位(26%)で上皮細胞境界に陽性所見があったという。二層性を呈する中等度上皮異形成では、50 病巢中 12 病巢(24%)の上皮下半層の細胞質に CLDN-1 陽性で、ZO-1 細胞境界 (48 病巢 ; 96%)および核(33 病巢 ; 66%)に陽性で、上皮内癌では、CLDN-1 陽性 (51 病巢 ; 96%)で、ZO-1 陽性は細胞境界(52 病巢 ; 98%)および核(37 病巢 ; 70%)で、両分子の陽性率が上昇したとしている。さらに、浸潤癌 (34 病巢)では、全病巢で細胞境界に CLDN-1 および ZO-1 が陽性、ZO-1 の核陽性も 28 病巢(82%)で認められ、両分子の陽性域は Ki-67 陽性細胞の分布に合致していたという。以上の結果より、正常口腔粘膜では発現しない CLDN-1 と ZO-1 両分子が異型上皮で発現し、悪性化進行に伴ってその発現がともに亢進することが明らかとなったとしている。

実験②では、三種の口腔扁平上皮癌細胞系いずれも CLDN-1 と ZO-1 を発現していたが、発現部位は相違していたという結果を得ている。蛍光抗体法で、CLDN-1 がほぼ細胞境界部に局在するのを確認したが、ZO-1 は細胞境界部に加えて核にも局在していたという。そこで、siRNA 法により CLDN-1 発現を抑制すると、細胞結合が低下して、胞巣状配列が失われ、ZO-1 発現も低下したという。一方、ZO-1 発現抑制は細胞形態および CLDN-1 発現に明らかな影響を及ぼさなかったものの、細胞増殖能および浸潤能が有意に低下したという。その分子機序として、核に局在する ZO-1 が転写因子として機能し、細胞周期の回転が促進されると同時に、タイト結合分子による各種 MMP の活性化を考えている。

以上の結果より、タイト結合分子 CLDN-1 と ZO-1 が口腔扁平上皮細胞における細胞-細胞間接着に寄与するのみならず、細胞増殖と浸潤に重要な役割を果たす可能性が示されたとしている。それに加えて、CLDN-1 の細胞膜陽性と ZO-1 の核陽性を免疫組織化学的に認識することが口腔粘膜境界病変の病理診断の補助的指標となることも証明したことになる。また、本研究の成果によって、口腔がん細胞で高発現するタイト結合分子を標的とした新規制癌治療の開発にも展望が開いたことになろう。