

論文内容要旨

口腔扁平上皮癌における Claudin1 の 発現機構ならびに機能解析

主指導教員：岡本 哲治 教授
(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：栗原 英見 教授
(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：津賀 一弘 教授
(医歯薬保健学研究科 先端歯科補綴学)

信本 忠義

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

研究目的

Claudin-1(CLD1)は、タイトジャンクションの主要な構成蛋白で、上皮細胞の細胞間接着を制御していることが知られている。

申請者の所属する研究室の先行研究において、p53のエピキチンリガーゼ(E3)である Human double minute-2 (HDM2)が、 β -カテニン経路を介して口腔扁平上皮癌 (OSCC) 細胞の CLD1 等の EMT 関連分子発現を調節している可能性をみいだした。

本研究では OSCC 細胞の CLD1 の発現機構を明らかにするために、CLD1 発現における β -カテニン経路の関与を検討するとともに、E3 の 1 つである Ligand of numb-protein X1 (LNX1) と CLD1 発現との関連について検索した。さらに OSCC の浸潤・増殖における CLD1 の役割を明らかにするため、遺伝子導入による CLD1 発現亢進が、口腔扁平上皮癌細胞の浸潤・増殖に与える影響について検討した。さらに広島大学病院顎・口腔外科にて加療した OSCC 組織における CLD1 発現を免疫組織学的に検索し、臨床病理学的因子との関連性について解析した。

研究方法

実験には、OSCC 細胞株 SCCKN と、SCCKN に遺伝子導入により作成した HDM2 高発現細胞株 KN-HDM2 を用いた。

GSK3B 阻害剤 LiCl と、 β -カテニンと Tcf の結合阻害剤 PNU74654 が OSCC 細胞の CLD1 蛋白発現に与える影響をウエスタンブロット法で検索した。さらにプロテアソーム阻害剤 MG132 とオートファジー阻害剤クロロキンを、OSCC 細胞の CLD1 及び LNX1 の蛋白発現に与える影響を解析した。

LNX1 と、CLD1 または HDM2 との複合体形成を共免疫沈降法にて検討した。さらに LNX1 と、CLD1 または HDM2 との結合を mammalian two-hybrid 法で解析した。すなわち LNX1 遺伝子を Activation Domain Cloning Vector である pVP16 に組み込み LNX1-pVP16 を作製した。CLD1 遺伝子または HDM2 遺伝子を GAL4 DNA-Binding Domain Cloning Vector である pM に組み込み、それぞれ CLD1-pM または HDM2-pM を作製した。Reporter Vector である pG5SEAP とともに、CLD1-pM 及び LNX1-pVP16 または HDM2-pM 及び LNX1-pVP16 を A431 に導入し、培養上清中のアルカリフォスファターゼを測定した。

SCCKN に、哺乳動物発現ベクター pCI-neo に CLD1 遺伝子を組み込んだ pCI-neo/ CLD1

を導入し、CLD1 高発現細胞株 KN-CLD1 を分離した。

各細胞の細胞運動能は、ケモタキセルを用いた Boyden チャンバー変法により検討した。タンパク分解活性は、カゼインを基質とするザイモグラフィにて解析した。さらに I 型コラーゲンゲルを用いた三次元培養法にて各細胞の増殖様式を検討した。

広島大学病院顎・口腔外科にて外科的治療を行った OSCC 84 例における CLD1 発現を免疫組織学的に検討し、生存率や臨床病理学的因子との関連性を検討した。なお、生存曲線は Kaplan-Meier 法で算出し、CLD1 陽性・陰性群間の有意差検定は logrank 法で行い、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

研究結果

1. LiCl は CLD1 蛋白発現を亢進し、PNU74654 は CLD1 蛋白発現を低下させた。
2. MG132 およびクロロキンは、LNX1 及び CLD1 の蛋白発現を亢進させた。
3. 共免疫沈降法と Two-hybrid 法により、LNX1 は、CLD1 または HDM2 と結合することが明らかになった。
4. KN-CLD1 細胞では、増殖能、細胞遊走能、蛋白分解活性及び浸潤能が亢進していた。
5. OSCC 組織では、CLD1 発現群は、CLD1 非発現群に比べ、生存率が有意に低下していた。

結語

CLD1 は、 β -カテニン経路を介して発現が調節されていた。CLD1 は LNX1 と複合体を形成しユビキチン化され、オートファジーまたはプロテアソームでの分解を受けている可能性が考えられた。さらに LNX1 は HDM2 と結合していることから、HDM2 は LNX1 のユビキチン化やオートファジーまたはプロテアソームでの分解に関与している可能性が示唆された。すなわち、HDM2 発現誘導により LNX1 分解が促進された結果、CLD1 分解が抑制されている可能性が推測された。

CLD1 は OSCC 細胞の増殖能、運動能と蛋白分解活性を促進し、浸潤増殖を亢進させていることが明らかになった。CLD1 は OSCC の予後不良因子であることが示され、CLD1 を標的とした OSCC の診断・治療の有用性が示唆された。