

# 学 位 論 文

## 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

信本 忠義

広島大学大学院医歯薬保健学研究科  
博士課程 医歯薬学専攻 歯学専門プログラム

2018 年度

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)

## 謝辞

本研究に際し、御懇篤なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬保健学研究科分子口腔医学・顎顔面外科学 岡本哲治教授に深厚なる謝意を表します。また、本論文作成上、ご指導を賜りました本学歯周病態学 栗原英見教授ならびに先端歯科補綴学 津賀一弘教授に深謝致します。また、本論文のご審査を賜りました口腔健康科学 杉山勝教授、細胞分子薬理学 兼松隆教授に深謝いたします。

尚、本研究を進めるに際し、終始御懇切なる御指導と御配慮を賜りました、広島大学病院 顎・口腔外科 講師 林堂安貴博士に心から感謝の意を表します。さらに、多大なる御支援、御協力を頂きました分子口腔医学・顎顔面外科学 准教授 虎谷茂昭博士をはじめ教室員各位に感謝致します。

## 目次

### 第1章 緒言

### 第2章 材料及び方法

#### 第1節 細胞培養法

- 1) 細胞培養液
- 2) 細胞株と培養方法
- 3) 細胞からの total RNA の抽出

#### 第2節 口腔扁平上皮癌細胞株における claudin1 (CLD1) 発現機構の解析

- 1) CLD1 発現における  $\beta$ -カテニン/TCF 経路の関与の検討
  - (1) Western Blot 法による GSK3 $\beta$  阻害剤 LiCl 処理した口腔扁平上皮癌細胞株の CLD1 蛋白発現の解析
  - (2) Western Blot 法による  $\beta$ -カテニン/TCF 阻害剤 PNU74654 処理した口腔扁平上皮癌細胞株の CLD1 蛋白発現の解析
- 2) 口腔扁平上皮癌細胞における CLD1 の翻訳後修飾について
  - (1) Western Blot 法によるプロテアソーム阻害剤及びリソソーム阻害剤で処理した口腔扁平上皮癌細胞の CLD1 蛋白発現の解析
  - (2) 共免疫沈降法による CLD1 と LNX の複合体形成についての検討
  - (3) Mammalian two-hybrid 法による CLD1 と LNX1p80 の複合体形成についての検討
- 3) Western Blot 法による HDM2 高発現口腔扁平上皮癌細胞の LNX1 蛋白発現の解析
- 4) Ligand of Numb Protein X1 (LNX1) p80 と HDM2 の結合

- (1) 共免疫沈降法による human double minute 2 (HDM2) と LNX1 の複合体形成についての検討
  - (2) Mammalian two-hybrid 法による HDM2 と LNX1p80 の複合体形成についての検討
- 5) Western Blot 法によるプロテアソーム阻害剤及びリソソーム阻害剤で処理した口腔扁平上皮癌細胞の LNX1 蛋白発現の解析

### 第3節 口腔扁平上皮癌細胞株における CLD1 の機能解析

- 1) CLD1 高発現口腔扁平上皮癌細胞株の作製
  - (1) CLD1 発現ベクターの構築
  - (2) 口腔扁平上皮癌細胞株 SCCKN への CLD1 遺伝子導入
- 2) Western Blot 法による CLD1 蛋白発現の検討
- 3) 細胞増殖能の判定
- 4) 細胞運動能の検討
- 5) ザイモグラフィーによるプラスミノゲンアクチベーター活性の判定
- 6) コラーゲンゲル内培養法

### 第4節 口腔扁平上皮癌組織における CLD1 発現と臨床病態因子との相関

- 1) 対象症例
- 2) 免疫組織染色
- 3) 口腔扁平上皮癌患者における CLD1 発現と臨床病態因子との相関の分析

## 第3章 結果

- 1) GSK3 $\beta$  阻害剤 LiCl が口腔扁平上皮癌細胞の CLD1 蛋白発現に与える影響
- 2)  $\beta$ -カテニン/TCF 阻害剤 PNU74654 が口腔扁平上皮癌細胞の CLD1 蛋白発現に与える影響

- 3) プロテアソーム阻害剤またはリソソーム阻害剤で処理した口腔扁平上皮癌細胞の CLD1 蛋白発現の解析
- 4) 共免疫沈降法による CLD1 と LNX1 の複合体形成についての検討
- 5) Mammalian two-hybrid 法による CLD1 と LNX1p80 の結合についての検討
- 6) HDM2 高発現口腔扁平上皮癌細胞の LNX1 蛋白発現の解析
- 7) 共免疫沈降法による HDM2 と LNX1 の複合体形成についての検討
- 8) Mammalian two-hybrid 法による HDM2 と LNX1p80 の結合についての検討
- 9) プロテアソーム阻害剤またはリソソーム阻害剤が口腔扁平上皮癌細胞の LNX1 蛋白発現に与える影響
- 10) CLD1 高発現細胞株の作製
- 11) CLD1 の発現亢進が口腔扁平上皮癌の細胞増殖に与える影響
- 12) CLD1 の発現亢進が口腔扁平上皮癌細胞の遊走能に与える影響
- 13) CLD1 の発現亢進が口腔扁平上皮癌細胞の蛋白分解活性に与える影響
- 14) CLD1 の発現亢進が口腔扁平上皮癌の浸潤増殖に与える影響
- 15) 口腔扁平上皮癌組織における CLD1 発現
- 16) 口腔扁平上皮癌組織における CLD1 発現と臨床病理学的因子との相関

#### 第4章 考察

#### 第5章 総括

#### 参考文献

#### 図表