Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-04

Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus

宇佐美，悠

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2007-03-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲3794
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003794

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【 96 】

氏　　名・（本　籍）	宇佐美　悠	（　兵庫県　）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）	
学　位　記　番　号	博い第1794号	
学位授与の　要　件	学位規則第５条第１項該当	
学位授与の　日　付	平成19年3月25日	

【 学位論文題目 】

Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus
（食道扁平上皮癌におけるclaudin-7発現の低下は浸潤と転移に関与する）

審　査　委　員

主 査　教　授　東　　健
教　授　古瀬　幹夫
教　授　丹生　健一

1. 背景

E-cadherin をはじめとする細胞間接着分子は細胞極性や組織環境の構築と維持に重要な役割を果たし、様々な悪性腫瘍においてその異常が知られている。癌細胞は原発腫瘍巣から間質への浸潤を通して転移すると考えられているが、その段階的な腫瘍の発育・進展において原発腫瘍巣からの離脱は重要なステップであり、種々の細胞間接着分子の関与が報告されている。

単層上皮において tight junction は細胞の管腔側に位置し細胞、組織間の barrier 機能や細胞極性の維持にかかわっている。Tight junction は膜タンパクと裏打ちタンパクから構成される接着装置で、claudin、occuludin などが膜タンパクとして、ZO-1、-2、-3 が裏打ちタンパクとして知られている。Claudin は 4 つの transmembrane component と 2 つの細胞外ドメインから構成され、それらを通じて相対する claudin と細胞間において接着する。また細胞質に存在するカルボキシル基末端において ZO-1 と結合しアクチン等の細胞骨格に連続する。Claudin-1 や claudin-7 は 24 種類ある claudin multigene family の中の 2 つであり、両者の発現は肺、乳腺、腎臓、子宮頸部重層扁平上皮、食道扁平上皮で知られている。Claudin-7 の発現低下は乳癌、頭頸部扁平上皮癌で認められており、一方、子宮頸部上皮内病変や浸潤癌においては、発現亢進が報告されている。一方、claudin-1 の発現亢進は大腸癌や食道癌で報告されている。しかしながら食道扁平上皮癌においての詳細な claudin-1 および-7 発現の検討と悪性形質とのかかわりについては報告がない。

本研究ではヒト正常食道扁平上皮における claudin-1,-7 および ZO-1 のそれぞれの発現と食道扁平上皮癌における claudin-1,-7 の発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。

2. 材料と方法

2.1 組織検体

2004 年から 2005 年に神戸大学医学部附属病院で行われた病理解剖検体 4 例における正常食道粘膜を Western blot 法に使用した。また陽性コントロールとしてマウス腎皮質を使用した。

1997 年から 2004 年に神戸大学医学部附属病院において外科的に切除された術前化学、放射線療法歴を有さない 62 例のホルマリン固定パラフィン包埋された食道扁平上皮癌に関して免疫組織化学的手法を用いて検討した。臨床病理学的分類は食道癌取り扱い規約および WHO ガイドラインに従い行った。さらに 17 例に関しては隣接する正常食道扁平上皮に対する評価も行った。

2.2 Westrn Blot 法

正常食道粘膜からタンパクを抽出し、通例に従い SDS-PAGE を用いて分離、

転写し、抗 claudin-1 ウサギモノクローナル抗体、抗 claudin-7 ウサギポリクローナル抗体、抗 ZO-1 ウサギポリクローナル抗体、抗 β-actin マウスモノクローナル抗体を一次抗体として用い、検討した。

2.3 免疫組織化学

正常食道扁平上皮における claudin-1、claudin-7、ZO-1 発現と局在と、食道扁平上皮癌における claudin-1、claudin-7 発現の変化を免疫組織化学的に解析した。正常食道においては上皮を基底細胞層、棘細胞層、下方表層上皮、表層上皮の 4 層に便宜的に分類し発現の有無を評価した。食道扁平上皮癌および転移性リンパ節においては claudin-1 および-7 の発現を陰性、細胞膜における点状発現、細胞膜における線状発現の 3 段階に分類し評価した。

2.4 統計学的解析

統計学的解析は χ^2 検定を用いて行った。原発巣と転移性リンパ節における発現の差はウィルコクソン検定を用い解析した。

3. 結果

3.1 正常扁平上皮における claudin-1、claudin-7、ZO-1 発現

正常食道重層扁平上皮に対し免疫組織化学を行ったところ claudin-1 および claudin-7 は細胞間に連続する線状に分布し、棘細胞層においては蜂巣状に発現が見られた。基底細胞層においてはいずれの発現も確認されなかった。ZO-1 は細胞間直下の細胞質への発現が認められた。Claudin とは対照的に ZO-1 の発現は棘細胞層のみならず基底細胞層、下方表層上皮おいても発現が認められた。Western blot 法を用いた解析によって claudin-1、claudin-7、ZO-1 それぞれ分子量 22、23、225 kDa の位置に発現が確認された。

食道扁平上皮癌における claudin-1 および claudin-7 の発現と臨床病理学的因子との関連を評価するため 60 例の浸潤性扁平上皮癌および 2 例の上皮内癌におけるそれぞれの発現を免疫組織化学にて検討した。上皮内癌においては両者の発現低下は認めなかった。正常扁平上皮においては棘細胞層に限局していた claudin-1 および-7 は、上皮内癌では異型上皮全層に発現していた。低分化型扁平上皮癌において claudin の発現は低下している傾向にあり、中分化、あるいは高分化型扁平上皮癌においては特に角化部を中心に強い発現が認められた。興味深いことに、claudin-1 が同一検体において比較的均一な発現を示すのに対し、claudin-7 発現は不均一であり、癌表層で発現が保たれているものの深部で著明に減少している症例が 9 例認められた。

3.2 腫瘍深部における claudin-1 および claudin-7 の低下と臨床病理学的因子の関連

次に浸潤部における claudin の発現低下に着目し、腫瘍最浸潤部(invasive front)での解析を行った。Claudin-1 および claudin-7 発現の低下はそれぞれ 46 例(74%)、44 例(71%)であった。Invasive front における claudin-7 発現の低下は進達度(P = 0.004)、ステージ(P = 0.038)、リンパ管侵襲(P = 0.001)、およびリンパ節転移(P = 0.014)と有意な相関を認めた。組織型においては統計学的な有意差は得られなかったが低分化型扁平上皮癌において claudin-7 が低下する傾向が見られた(P = 0.076)。Invasive front における claudin-1 発現の低下は組織型と有意な差を認めた(P = 0.029)のみであり他の臨床病理学的因子との相関は見られなかった。

3.3 原発巣と転移性リンパ節における claudin-1 および-7 発現の検討

62 例の食道扁平上皮癌の内、28 例においてリンパ節転移が認められた。検体として得られた 27 例における原発巣と転移性リンパ節での claudin-1、-7 発現の検討を行った。原発巣に比べ claudin-1 の低下が見られた症例は 27 例中 7 例、claudin-7 発現の低下は 10 例であった。原発巣と転移性リンパ節における claudin 発現を比較したところ、転移性リンパ節において claudin-7 発現が低下していた(P = 0.007)。一方、claudin-1 発現の低下に関して有意な差は見られなかった(P = 0.118)。

4. 総括

本研究では、まず正常食道扁平上皮における claudin-1 および-7 の有棘層における局在を明らかにした。皮膚重層扁平上皮においては claudin-1、-3、-4、-6、-8、-11、-12、および-17 の発現が知られており。Furuse らは claudin-1、-4 が基底細胞層と顆粒層に発現していることを明らかにしており、claudin-1 欠損マウスは生後 1 日にして脱水により死亡するということを報告している。これらの結果は哺乳類上皮において tight junction がバリア機能に必須であることを示唆する。食道扁平上皮での ZO-1、claudin-1、-7 発現は過去の論文で述べられており、今回得られた結果と一致している。

悪性腫瘍において原発巣から癌細胞が離脱することは転移形成において必須の現象であり、細胞接着の低下、あるいは消失がその原因として想定されている。本研究では食道扁平上皮癌の invasive front において claudin-7 が低下していることが明らかとなった。cDNA マイクロアレイ法において頭頸部扁平上皮癌を正常扁平上皮と比較したところ claudin-7 発現の低下が見られたことが報告されている。乳癌では claudin-7 発現の低下と組織学的悪性度との関連が報告されている。Invasive front における claudin-7 発現の低下は深達度、病期、リンパ管侵襲、リンパ節転移と統計学的に有意に相関することが今回明らかとなり、これらの結果から claudin-7 の発現が浸潤能や転移能に関与する可能性が示唆された。

Kominsky らは乳癌細胞株における claudin-7 発現低下のメカニズムとしてプロモーター領域のメチル化を報告している。今回の研究でわれわれの明らかにした腫瘍深部、リンパ節における claudin-7 発現の低下の原因として浸潤に伴う claudin-7 のプロモーター領域のメチル化が関与している可能性がある。

本研究では食道扁平上皮癌浸潤部および転移性リンパ節において claudin-7 発現が低下し、腫瘍の浸潤能や転移能に関連すると思われる臨床病理学的因子との関係を明らかにした。腫瘍浸潤部での claudin-7 発現を検討することで転移のマーカーとしての応用が期待されるとともに、その発現調節機構の解明は癌の浸潤・転移メカニズムの解明に寄与する可能性が示唆された。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨

受付番号	甲　第１７９９号	氏　名	宇佐美　悠
論文題目 Title of Dissertation	Reduced expression of claudin-7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus 食道扁平上皮癌におけるclaudin-7発現の低下は浸潤と転移に関与する		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner　東　健 副　査 Vice-examiner　古瀬幹夫 副　査 Vice-examiner　丹生健一		
審査終了日	平成１９年１月１７日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

Tight junction は claudin, occuludin といった膜タンパクと ZO-1 などの裏打ちタンパクから構成される接着装置で、単層上皮において細胞の管腔側に位置し細胞、組織間の barrier 機能や細胞極性の維持にかかわっている。Claudin-1 や claudin-7 は 24 種類ある claudin multigene family の中の 2 つであり、様々な臓器においてその発現が明らかになりつつある。また乳癌、頭頸部扁平上皮癌 claudin 発現の低下が報告されており、子宮頸部上皮内病変や浸潤癌においては、発現亢進が明らかにされている。しかしながら食道扁平上皮癌においての詳細な claudin-1 および-7 発現の検討と悪性形質とのかかわりについては報告がない。

本申請者はヒト正常食道扁平上皮における claudin-1,-7 および ZO-1 のそれぞれの発現と食道扁平上皮癌における claudin-1,-7 の発現と臨床病理学的因子との関連を検討している。正常食道扁平上皮および癌組織での発現検討には、外科的に切除され、ホルマリン固定パラフィン包埋された食道扁平上皮癌を用い、免疫組織化学的手法による解析を行っている。また Western blotting 法を用いて正常上皮における発現を検討するため病理解剖検体を使用している。

正常食道重層扁平上皮に対し免疫組織化学を行ったところ claudin-1 および claudin-7 は細胞間に連続する線状に分布し、棘細胞層においては蜂巣状に発現が見られ、ZO-1 は細胞間直下の細胞質への発現が認められた。Western blot でも claudin-1、claudin-7、ZO-1 の発現が確認された。申請者は本研究において食道扁平上皮における claudin 発現が正常扁平上皮細胞の全周に発現していることを明らかにした。

一方、食道扁平上皮癌における claudin-1 および claudin-7 の発現と臨床病理学的因子との関連を評価するため 60 例の浸潤性扁平上皮癌お

よび2例の上皮内癌におけるそれぞれの発現を免疫組織化学にて検討したところ、上皮内癌においては両者の発現低下は認めなかったが、正常扁平上皮において棘細胞層に限局していたclaudin-1および-7は、上皮内癌では異型上皮全層に発現していた。また、低分化型扁平上皮癌においてclaudinの発現は低下している傾向にあり、中分化、あるいは高分化型扁平上皮癌においては特に角化部を中心に強い発現が認められた。Claudin-1が同一検体において比較的均一な発現を示すのに対し、claudin-7発現は不均一であり、癌表層で発現が保たれているものの深部で著明に減少している症例が9例認められた。

申請者は次に浸潤部におけるclaudinの発現低下に着目し、腫瘍最浸潤部(invasive front)での解析を行ったところ、Claudin-1およびclaudin-7発現の低下はそれぞれ74%、71%にで認められた。Invasive frontにおけるclaudin-7発現の低下は進達度、ステージ、リンパ管侵襲、およびリンパ節転移と有意な相関を認めた。また、Invasive frontにおけるclaudin-1発現の低下は組織型と有意な差を認めたが他の臨床病理学的因子との相関は見られなかった。27例における原発巣と転移性リンパ節でのclaudin-1、-7発現の検討を行ったところ、原発巣に比べclaudin-1の低下が見られた症例は27例中7例、claudin-7発現の低下は10例であった。原発巣と転移性リンパ節におけるclaudin発現を比較したところ、転移性リンパ節においてclaudin-7発現が有意に低下していた。一方、claudin-1発現の低下に関して有意な差は見られなかった。

Invasive frontにおけるclaudin-7発現の低下は深達度、病期、リンパ管侵襲、リンパ節転移と統計学的に有意に相関することが本研究により明らかとなり、これらの結果からclaudin-7の発現が浸潤能や転移能に関与する可能性が示唆された。

腫瘍浸潤部でのclaudin-7発現を検討することで転移のマーカーとしての応用が期待されるとともに、その発現調節機構の解明は癌の浸潤・転移メカニズムの解明に寄与する可能性が示唆された。

本研究は、食道扁平上皮癌におけるclaudin-1、claudin-7発現について、その臨床病理学的意義を研究したものであるが、claudin-7発現の低下が食道癌の浸潤と転移に関与することについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があるものと認める。