

口腔扁平上皮癌における Coxsackie-adenovirus receptor (CAR/ CXADR)
の役割について

柳下 治男

明海大学歯学部病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学分野
(指導: 坂下英明教授)

Role of Coxsackie-adenovirus receptor (CAR/ CXADR) in oral squamous cell
carcinoma

Haruo YAGISHITA

Division of Oral and Maxillofacial Surgery,
Department of Diagnostic and Therapeutic Sciences,
Meikai University School of Dentistry
(Mentor: Prof. Hideaki SAKASHITA)

歯乙 第 592 号 2014 年 3 月 26 日

Abstract: The coxackie- and adenovirus receptor (CAR/ CXADR), a transmembrane glycoprotein, was initially characterised as a viral attachment site on the surface of epithelial cells. Thereafter it was identified as a component of the tight junction complex, and a regulator of tight junction formation. Furthermore, CAR physiologically participates in cell–cell adhesions as a part of the apical junctional complex. Functionally, loss of CAR has been suggested to weaken intercellular adhesion, to increase proliferation, and to promote migration as well as invasion of cancer cells. On the basis of these findings, a tumor-suppressive role of CAR in human cancers has been postulated. Although it has currently been reported that the expression of CAR is observed in various organs, it is unclear whether CAR expresses in oral cancer. This study examined the role of CAR on squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity. It was demonstrated that CAR is constitutively expressed in oral SCC cell lines, HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 and SAS. Then, to analyze the function of CAR, the proliferation activity of SAS cells when knockdown *CAR* gene was examined. CAR knockdown indeed did not be promoted proliferation activity in SAS cells. Although the expression level of CAR was decreased by CAR knockdown, that of NF- κ B p65 was little change. Furthermore, to investigate the function of CAR, the proliferation activity of SAS cells when overexpressed *CAR* gene was examined. SAS cell numbers were markedly reduced by CAR overexpression. Finally, it was suggested that CAR overexpression in SAS cells led to apoptosis via the activation of caspases-9. In addition, the localization of CAR and NF- κ B p65 in 40 cases of oral SCCs with

various stages was examined using an immunohistochemical method. The positive reaction for PAb CAR was weakly observed on the membrane of carcinoma cells in 19 of 40 cases (47.5%) of oral SCC. The immunoreactivity for CAR especially tended to fade away in the invasive front of oral SCC tissues. Meanwhile, NF- κ B p65 immunoreactivity was strongly positive, particularly on the nucleus of cancer cells in the invasive front, in 30 of 40 cases of oral SCC (75%). These findings suggest that CAR plays a significant role on the inhibition of oral cancer proliferation.

Key words: coxackie- and adenovirus receptor (CAR/ CXADR); nuclear factor-kappaB (NF- κ B p65; RelA); human oral squamous cell carcinoma (HOSCC) (ヒト口腔扁平上皮癌)

和文抄録

膜貫通型糖タンパク質である Coxackie- and adenovirus receptor (CAR/ CXADR) は最初、上皮細胞の細胞膜のウイルス吸着部位と見なされた。その後、タイトジャンクション複合体の構成要素であり、タイトジャンクション形成の調節因子として認識されるようになった。さらに CAR は細胞間接着に関与している。機能的に CAR の欠失は細胞間接着が弱まり、細胞増殖を増大させ、癌細胞の浸潤および転移が促進することが示唆されている。これらの所見に基づいて、ヒトの癌における CAR の腫瘍抑制的な働きが想定される。近年、多様な臓器における CAR の発現が観察されているが、口腔癌においては明らかではない。本研究では、口腔扁平上皮癌における CAR の役割について検索した。CAR は口腔扁平上皮癌由来株化細胞、HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS において、構成的に発現していた。CAR の機能を解析するために、CAR 遺伝子をノックダウンした SAS 細胞の増殖活性について検索を行った。CAR のノックダウンは実際に SAS 細胞の増殖活性を促進させなかった。CAR のノックダウンによって CAR タンパク質の発現レベルは減少したけれども、NF- κ B p65 の発現レベルはほとんど変化しなかった。さらに CAR の機能を検索するために、CAR 遺伝子を過剰発現させた時の SAS 細胞の増殖活性を検索した。CAR 遺伝子の過剰発現によって SAS 細胞数は顕著に減少した。最終的に SAS 細胞における CAR 遺伝子の過剰発現は caspase-9 の活性化を介してアポトーシスを誘導する可能性が示唆された。加えて、多様な病期の口腔扁平上皮癌 40 例における CAR および NF- κ B p65 の局在について免疫組織化学的手法を用いて検索した。CAR 陽

性反応は口腔扁平上皮癌 40 例中 19 例 (47.5%) の癌細胞の細胞膜に弱く観察された。CAR の陽性反応は、とりわけ口腔扁平上皮癌の浸潤の最前線において消失する傾向にあった。その一方で、NF- κ B p65 は口腔扁平上皮癌 40 例中 30 例 (75%) の、特に浸潤の最前線の癌細胞の核に強陽性を示した。これらの所見は、CAR が口腔癌増殖の抑制において重要な役割を担っている事を示唆している。

緒 言

Coxsackie- and adenovirus receptor (CAR/ CXADR)は最初、上皮細胞表面のウイルス吸着部位として発見された膜貫通型糖タンパク質である¹⁾。胎生期の心臓および神経系においてはCARの高発現が認められるが、やがて消失する^{2,3)}。成人では主に重層扁平上皮細胞や腸管上皮細胞において発現し、タイトジャンクション複合体の構成因子であることが判明し⁴⁻⁹⁾、現在では細胞間接着分子の1つとしても知られている^{10,11)}。アデノウイルス粒子のヘキソタンパク質がヒト上皮細胞表面のCARに結合すると、接着分子であるインテグリンが細胞内へ多様な情報伝達を行うことで、細胞増殖の調節といった生物学的に重要な役割を演じていることが示唆されている¹²⁾。これまでに固形腫瘍である大腸癌¹³⁾、乳癌¹⁴⁾、胃癌¹⁵⁾、膀胱癌¹⁶⁾および脳腫瘍¹⁷⁾といった多様な悪性腫瘍においてCARの発現および機能が報告されており、さらに最近の*in vitro*の研究結果から、CARの欠失は種々の癌細胞における細胞間接着を減弱させ、その結果細胞増殖を増大させるとともに、癌細胞浸潤や転移を促進させることが報告されている¹⁷⁻²¹⁾。これらの所見はヒト悪性腫瘍においてCARが腫瘍抑制機能を有しているという仮説^{13,15)}を支持している。しかしながら、口腔癌におけるCARの発現および役割については未だ明らかにされていない。

本研究は、口腔扁平上皮癌の浸潤・増殖メカニズムを探る一手段として、口腔扁平上皮癌由来株化細胞におけるCARの発現とその役割について検索するとともに、口腔扁平上皮癌の生検組織材料を用いて、CAR発現に関する免疫組

織化学的検索を行ったので報告する.

ランニングタイトル：口腔癌における CAR の役割について

材料および方法

1. 培養腫瘍細胞および培養方法

ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞 HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS [Japanese Cancer Research Resources Bank (JCRB) からの供与] を実験に供した。これらの細胞は、100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate (Life Technologies, Carlsbad, AC, USA) と 2.0 mg/ml の sodium bicarbonate を含む 10 % 牛胎仔血清 (fetal bovine serum : FBS; Sigma, St. Louis, MO, USA) 添加 RPMI1640 培地 (日水製薬, 東京) 中で、37 °C, 5 % CO₂ インキュベーターにて 25 cm² フラスコに単層状態になるまで培養した。

2. 培養細胞からの RNA 抽出

腫瘍細胞からの total RNA の抽出は acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法²²⁾を用いて行った。培養終了後、培養上清を除き 1 フラスコあたり 3 ml の solution D [4 M guanidinium thiocyanate, 25 mM sodium citrate (pH 7.0), 100 mM 2-mercaptoethanol, 0.5 % sarcosyl] を加え、15 ml のコニカルチューブに回収した。その後、2 M sodium acetate 溶液 300 µl, phenol 3 ml, chloroform/isoamylalcohol (49 vol : 1 vol) 600 µl を加えて振盪後、氷中で 15 分間静置し、4 °C, 1,200 × g, 20 分間遠心して上層を回収した。これに 2 倍量の 100 % エタノールを加え -20 °C で 1 時間静置した後、4 °C, 1,200 × g, 40 分間遠心分離し、沈殿物を 300 µl の diethyl pyrocarbonate (DEPC) 水に溶解した。さらに通法に従い phenol/chloroform 抽出を行い、エタノール沈殿後、70 %

エタノールで洗浄し 30 μ l の滅菌蒸留水に溶解して total RNA を得た。RNA の定量は分光光度計(GeneQuant pro; GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)を用いて OD 260 nm の値を測定し、実験に使用するまで -80°C で保存した。

3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)法

上記の方法で得られた total RNA 100 ng/ μ l を template として、 65°C 、5 分間加熱した後、氷中に 5 分間静置し、これに cDNA 反応溶液として 40 U/ μ l ribonuclease inhibitor (タカラバイオ, 大津, 日本), $1\times$ RNA PCR buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4), gelatin 200 mg/ml], 5 mM MgCl_2 , 1 mM dNTPs (Ultrapure dNTP Set, 2'-deoxynucleotide 5'-triphosphate; GE Healthcare), 2.5 μ M Random 9 mers (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse-transcriptase (RTase; 0.25 U/ μ l; タカラバイオ)をそれぞれ加え滅菌蒸留水で 10 μ l に調整し、 30°C 、10 分、 42°C 、30 分間反応させた。その後 99°C 、5 分間加熱して反応を停止させて氷中で急冷した。得られた cDNA 5 μ l に対して $1\times$ LA PCR Buffer [50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.4)], 2.5 mM MgCl_2 , CAR プライマー 4 pmol, LA Taq DNA polymerase (タカラバイオ) 2.5 units を加え、滅菌蒸留水で 25 μ l になるように調整した後、GeneAmp PCR System 9700 (Life Technologies)で以下に示す条件で PCR を行った。すなわち、 94°C 、5 分間反応させた後、DNA の変性を 95°C 、45 秒、アニーリングを 56°C 、30 秒、プライマーの伸長を 68°C 、45 秒行い、これを 1 サイクルと設定してこのサイクルを 40 回繰り返した。最後に 72°C 、7 分間伸長反応を行い、 4°C で保存した。増幅された PCR 産物は臭化エチジウム (0.5 μ g/ml ; Sigma) を含む 2 %アガロース

ゲル (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 電気泳動により検出した。また RT-PCR に用いたプライマーを別に示す (表 1)。CAR プライマーのデザイン及び精製は Sigma-Aldrich Japan (東京, 日本) に依頼した。なお, internal control として glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) プライマーを用いた。CAR および GAPDH のプロダクトサイズはそれぞれ, 83 bp, 138 bp であった。

4. Real-Time quantitative RT-PCR (定量性 RT-PCR)法

上記の方法で得られた total RNA 100 ng/μl を template として, iScript One-Step RT-PCR キット (Bio-Rad) および定量性 RT-PCR 用各プライマー 4 μmol (表 1) を用いて滅菌蒸留水で 20 μl になるように調整した後, Bio-Rad iCycler システム (Bio-Rad) を用いて以下に示す条件で定量性 RT-PCR を行った。すなわち, CAR mRNA 検出において cDNA 合成として 50 °C, 10 分間反応させた後, 逆転写酵素の不活性化を 95 °C, 5 分間行い, 続いて定量 PCR 反応として DNA 変性 95 °C, 10 秒, アニーリングを 56 °C, 30 秒行い, これを 1 サイクルと設定して 45 サイクル繰り返した。また各試料は duplicate で解析を行った。なお, 結果は Bio-Rad iCycler Software 3.0 と Microsoft Excel 97 を使用して解析し, GAPDH を内部標準遺伝子 (リファレンス遺伝子) としてその発現量を 1 としたときの標的遺伝子の mRNA の相対的発現量を算定した。PCR 産物の特異性は melting curve data によって評価した。なお, CAR の定量性 RT-PCR 用プライマーは RT-PCR と同じものを使用した。

5. Western blot 法

各腫瘍細胞株を培養後, 培養上清を除き 1 フラスコあたり 1 ml の細胞溶解液

[50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.02 % sodium azide, 1 % Triton X-100, 1 µg/ml aprotinin, 100 µg/ml phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)] を加え, 4 °C で 20 分放置した. その後, 4 °C, 18,000 × g, 5 分間遠心分離を行い, 上清を細胞抽出液としてポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: SDS-PAGE) のための試料とした. 各試料のタンパク質濃度を Bio-Rad DC protein assay 試薬 (Bio-Rad) にて測定し, 20 µg ずつ等量の sample buffer [0.5 M Tris HCl (pH 6.8) 0.5 ml, glycerol 0.4 ml, 10 % (w/v) SDS 0.8 ml, 2-mercaptoethanol 0.2 ml, 0.5 % (w/v) bromophenol blue 0.4 ml] に溶解し, 5 分間煮沸した後, 10 % SDS-PAGE に供した. 分子量マーカーは Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad) を使用した. 電気泳動終了後, 試料タンパク質を 25 mM Tris, 200 mM glycine, 20 % methanol, 0.03 % SDS を含む緩衝液中でタンク式ブロッティング装置 (Bio-Rad) を用いて polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜 (Bio-Rad) に電氣的に転写した. PVDF 膜を 0.1 % Tween 20 加 2 % bovine serum albumin (BSA)-phosphate buffered saline (PBS) に浸漬し, 非特異的反応を阻止した. 1 次抗体として 1,000 倍希釈した rabbit polyclonal anti-human CAR antibody (PAb CAR; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) および同希釈の mouse monoclonal anti-human NF-κB p65 antibody (MAb NF-κB p65; Santa Cruz Biotechnology) を室温にて 60 分間反応させ, 0.1 % Tween 20 加 PBS (PBT) にて洗浄後, 2 次抗体として 25,000 倍希釈 horse radish peroxidase (HRP) 標識 goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (GE Healthcare) または HRP 標識 rabbit anti-mouse IgG (H+L) antibody (GE Healthcare) を 60 分間室温にて反

応させ、再び PBT にて洗浄後、ECL plus Western blotting 検出試薬 (GE Healthcare) に 5 分間浸漬の後、Hyperfilm ECL (GE Healthcare) に 2 分間露光させ自動現像した。Internal control として 10,000 倍希釈の mouse monoclonal anti-human β -actin antibody (MAb β -actin; Sigma) を用いた。

6. CAR ノックダウンおよび生細胞数の測定

SAS 細胞において、CAR 遺伝子の腫瘍細胞増殖に対する役割を検索する目的で、CAR に対する siRNA を作製し SAS 細胞に導入し、CAR をノックダウンした際の生細胞数の変化を解析した。96 ウェルのマイクロプレート (Nalge Nunc, Rochester, NY, USA) の各ウェルに SAS 細胞を 1×10^4 個/100 μ l/ウェルずつ播種し、24 時間培養後、CAR siRNA または control siRNA (最終濃度 10 nM) と 50 倍希釈した Lipofectamine (Life Technologies) の混合液 100 μ l を室温にて 20 分間反応させ、各ウェルに添加し 48 時間培養した。その後、各ウェルに 10 μ l の Cell Counting Kit-8 溶液 (同仁化学, 熊本, 日本) を加え、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ インキュベーター中で 4 時間作用させた後、生細胞数の割合を iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) で 450 nm の吸光度にて triplicate で測定した。またヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞 SAS について CAR ノックダウンした時の CAR タンパク質および NF- κ B p65 タンパク質の発現を Western blot 法にて検索した。25 cm² フラスコに SAS 細胞を 1×10^5 個/5 ml ずつ播種し、24 時間培養した後、CAR siRNA または control siRNA (最終濃度 10 nM) と 50 倍希釈した Lipofectamine の混合液 1 ml を室温にて 20 分間反応させ、各フラスコに添加し 48 時間培養した。その後、上記と同様にして細胞抽出液を回収し、10 μ g のタ

ンパク質を SDS-PAGE 後, Western blot 法を行った. Internal control として β -actin を示した. *CAR* siRNA のセンスおよびアンチセンスの塩基配列を別に示す (表 2).

7. *CAR* の過剰発現

CAR 遺伝子を過剰発現させた際の SAS 細胞への影響について検索する目的で, *CAR* 遺伝子のコード領域をクローニングした発現ベクター (Flexi ORF clone; Promega, Madison, WI, USA) を SAS 細胞に遺伝子導入し, 検討した. すなわち, 96 ウェルのマイクロプレートに SAS 細胞を 1 ウェルあたり 1×10^4 個 / 100 μ l ずつ 24 時間培養した後, 0.2 μ g の *CAR* プラスミド DNA を 0.6 μ l の FuGENE HD 形質導入試薬 (Promega) と混合し (*CAR* DNA : FuGENE HD = 1 : 3), 室温で 15 分間反応させた混合液を各ウェルに添加し, 24 時間培養した. その後, 前述と同様の方法で細胞増殖活性を測定した. さらに, *CAR* タンパク質の発現は遺伝子導入した細胞より細胞抽出液を調整し, 10 μ g のタンパク質を SDS-PAGE 後, Western blot 法により解析した. なお, コントロールとして *CAR* 遺伝子のコード領域を含まないコントロールベクターを用いた.

8. アポトーシスの解析

CAR 遺伝子を過剰発現させた際の SAS 細胞のアポトーシス誘導を解析した. 24 ウェルのマイクロプレートに SAS 細胞を 1 ウェルあたり 2×10^5 個 / ml ずつ播種し 24 時間培養した後, 前述と同様の比率で 1 μ g の *CAR* プラスミド DNA を 3 μ l の FuGENE HD 核酸導入試薬と混合し (*CAR* DNA : FuGENE HD = 1 : 3), 室温で 15 分間反応させた混合液を各ウェルに添加し, 24 時間培養した. その後,

Annexin V-FITC kit (MBL, 名古屋, 日本)を用いてアポトーシスの検出を行った。すなわち, 冷PBS(-)にて洗浄した後, trypsin-EDTAにてSAS細胞を剥離し, 遠沈回収し, 再度PBS(-)にて洗浄した後, 85 μ lのBinding Bufferにて懸濁した。この懸濁液にAnnexin V-FITC溶液10 μ lとPI溶液5 μ lを混和し, 室温, 暗所にて15分間染色反応させ, 蛍光顕微鏡OLYMPUS IX70 (オリンパス, 東京, 日本)にて観察を行った。コントロールとしてCAR遺伝子のコード領域を含まないコントロールベクターを用いた。FlowCytometry解析には, FACS Calibur (EPICS ALTRA; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)を用いた。調製したサンプルを流速12 μ l/minにて流し, それに488 nmのアルゴンレーザー光を照射した。この時サンプルが発する散乱光や蛍光のデータをリストモード形式にて保存した。なおアポトーシス細胞の解析は, EXPO ver. 2 software (Beckman Coulter)を用いて行った。

9. Caspase 活性化の検出

前述と同様の方法で CAR 遺伝子の過剰発現を行った後, Caspase-Glo 3/7, -8 および-9 の測定システム (Promega) を用いて Caspase の活性化を測定した。すなわち, 96 ウェルのマイクロプレートに SAS 細胞を 1 ウェルあたり 1×10^4 個 / 100 μ l ずつ播種し 24 時間培養した後, CAR プラスミド DNA を FuGENE HD 核酸導入試薬によって遺伝子導入し, 24 時間作用させた。各ウェルに Caspase-Glo 3/7, -8 および-9 を 50 μ l ずつ室温にて 30 分間作用させ, ルミノメーター (Promega) にて各 Caspase の活性を測定した。なお, コントロールとして CAR 遺伝子のコード領域を含まないコントロールベクターを用いた。

10. 臨床材料および免疫組織化学的検索

口腔扁平上皮癌組織における CAR および NF- κ B p65 の発現を調べる目的で、明海大学付属明海大学病院歯科口腔外科で生検が施行され、本学病理学分野で診断された口腔扁平上皮癌 40 例における生検組織のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた免疫組織化学的検索を施行した。なお、病理組織診断は WHO による分類²³⁾に従って H-E 染色標本の組織学的検索を行い、Union for International Cancer Control (UICC)の頭頸部腫瘍の TNM 分類にしたがって扁平上皮癌の病期分類を行った²⁴⁾。また本研究を行うにあたり、明海大学歯学部倫理委員会の承認を得ている (No. 0801)。

検体は通法に従いマイクロトーム (大和光機, 朝霞, 日本) にてパラフィンブロックから 1~3 μ m 程度の薄切切片を作成し、脱パラフィン後、エタノールで脱水し、その後 0.3% H₂O₂ 加メタノール中で内因性ペルオキシダーゼ活性阻止を行った。PBS で洗浄後、抗原賦活化のため 0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 15 分間マイクロウェーブ処理した。その後検体を室温まで放置させ、PBS にて洗浄後、以下のごとく PAb CAR および MAb NF- κ B p65 を用いた酵素抗体間接法により染色し、光顕的に観察した。非特異的反応阻止のため 2% BSA-PBS を 15 分間室温にて反応させた。1 次抗体として 100 倍希釈抗 PAb CAR および MAb NF- κ B p65 を室温にて 60 分間反応させ、PBS にて洗浄後、2 次抗体として 1,000 倍希釈 biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) antibody (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) または biotinylated horse anti-mouse IgG (H+L) antibody (ニチレイバイオサイエンス) を 30 分間室温にて反応させ、再び PBS

にて洗浄後，streptavidin–peroxidase を 30 分間室温にて反応させた．PBS にて洗浄後，発色は 0.01 % H₂O₂ 加 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液にて行い，Mayer's hematoxylin で対比染色後，脱水，透徹，封入し検鏡した．また陰性コントロールとして PAb CAR および MAb NF- κ B p65 の代わりに PBS を用いた．評価の方法は，グリッドを用いて腫瘍標本を観察し，1,000 個の腫瘍細胞中 5%以上の細胞が染色された症例を陽性と判定した．

11. 統計処理

各腫瘍細胞株間における CAR mRNA 発現の相関関係について，Bonferroni/Dunn 法および SAS 細胞における caspase-9, -3/7 の活性化について，Spearman の順位相関係数を用いた統計学的検討を行った．いずれも危険率 5 %未満をもって有意差ありと判定した．

結 果

1. CAR 発現の解析

ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞における CAR mRNA の発現状況を調べる目的で、非刺激の HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS 細胞それぞれにおける CAR mRNA の発現状況を RT-PCR 法により解析した。その結果、ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞 HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS 細胞すべてにおいて構成的な CAR mRNA の発現を認めた (図 1)。

2. CAR 発現の定量的解析

各細胞間において RT-PCR 法では CAR mRNA の発現量に明確な差異を認めなかったことから、HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS 細胞それぞれにおける CAR mRNA の発現状況を定量性 RT-PCR 法により解析した。その結果、いずれの細胞においても CAR mRNA の発現亢進が認められたが、とりわけ HSC-4 細胞において強く発現亢進が認められ、SAS 細胞においては最も CAR の発現量が少なかった (図 2)。

□. CAR 発現の解析

ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞における CAR タンパク質の発現を検索する目的で、非刺激の HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS 細胞それぞれにおける CAR タンパク質の発現状況を Western blot 法により解析した。その結果、HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS すべての細胞において分子量 46 kDa 付近に CAR タンパク質の発現が認められた (図 3)。

4. CAR ノックダウンによる細胞増殖活性の解析

CAR 遺伝子およびタンパク質の発現解析において、これまでの CAR が腫瘍抑制機能を有しているという報告^{13,15)}から考えて、もし正常な機能を保った状態で CAR の発現が亢進しているならば、腫瘍細胞は増殖が抑制されているはずだが、今回検索したヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞いずれも増殖抑制は起こっていない。このことから今回検索した細胞のいずれにも CAR に何らかの機能不全が起こっている可能性を考え、CAR の最も発現量の少なかった SAS 細胞に着目した。そして CAR 遺伝子が口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響を解析する目的で、CAR 遺伝子に対する siRNA を作製し SAS 細胞の CAR 遺伝子をノックダウンした時の細胞増殖活性を検索した。その結果、コントロールと比べて CAR 遺伝子のノックダウンにより SAS 細胞数において顕著な変化は認められなかった (図 4A)。この時の CAR および NF- κ B p65 タンパク質の発現を Western blot 法にて検索したところ、CAR 遺伝子のノックダウンによってコントロールと比べて CAR タンパク質の発現量は減少を示したが、NF- κ B p65 タンパク質の発現量において大きな違いは認められなかった (図 4B)。この結果から、SAS 細胞において CAR 遺伝子は増殖活性ならびに NF- κ B p65 の発現制御に関与していないことが示唆された。

5. CAR 遺伝子過剰発現による SAS 細胞の変化

CAR 遺伝子の働きを確認する目的で CAR 遺伝子を過剰発現させた際の SAS 細胞の増殖活性を検索した。その結果、CAR 遺伝子の過剰発現によりコントロールと比べて SAS 細胞数の顕著な減少を確認した (図 5A)。また、この時の

CAR タンパク質発現の増強を Western blot 法にて確認した。次に SAS 細胞への CAR 遺伝子の過剰発現によりアポトーシスが誘導された可能性を考え、Annexin V によるアポトーシスの検出を試みた。その結果、蛍光顕微鏡観察において SAS 細胞質に FITC 標識した Annexin V (図 5B-a-2) と、核に PI (図 5B-a-3) の取り込みを確認するとともに、フローサイトメトリーによって、コントロールに比べ Annexin V-FITC のみで染まる細胞集団と、Annexin V-FITC 及び PI で染まる細胞集団の増加が確認された (図 5C)。次に caspase の活性化を解析した。この結果、caspase-8 においては活性低下が認められたが、caspase-9 に明らかな活性化が認められた (図 5D)。このことから、SAS 細胞に CAR 遺伝子導入によって、ミトコンドリア経路を介して caspase の活性化が起こり、アポトーシスが誘導された可能性が示唆された。

6. 免疫組織化学的検索

口腔扁平上皮癌 40 例の生検組織材料における CAR および NF- κ B p65 の陽性率について検索を行った。各患者背景と CAR および NF- κ B p65 発現との関係を示す (表 3)。その結果、CAR 陽性反応は口腔扁平上皮癌 40 例のうち 19 例 (47.5%) の、癌細胞の細胞膜に弱く観察された。CAR の免疫染色所見は、とりわけ口腔扁平上皮癌の浸潤の最前線において消失する傾向にあった (図 6A)。一方、NF- κ B p65 は口腔扁平上皮癌 40 例中 30 例 (75%) の浸潤の最前線において、癌細胞の核に強陽性を示した (図 6B)。なお、CAR の発現と臨床病理学的諸因子との間に特別な相関関係は認められなかったが、分化度が低くなるに従い浸潤の最前線での CAR の発現は消失する傾向が認められた。

考 察

宿主に対してウイルスによる感染が成立するためには、細胞表面にそのウイルスに対応するレセプターの存在が必要であり、いかなる細胞にでもウイルスの感染が成立するわけではない。すなわち、宿主細胞がどのようなレセプターを有しているかにより、ウイルスの宿主への親和性が決まってくる。そのレセプターの一つと考えられている CAR は食道、結腸、肺組織で発現が著明であり、それは腎、心臓、中枢神経にも認められることが報告されている²⁵⁾。そして近年、分子量46 kDaの膜貫通型タンパク質であるCARは多様な機能を持つことが明らかにされてきており、ひとつにはコクサッキーB群ウイルスとアデノウイルスの2つのウイルス共通レセプターとしての機能¹⁾、もうひとつは上皮細胞のタイトジャンクションの構成要素として局在し、巨大分子やイオンの移動に対するバリアの役割を果たす、さらには細胞接着分子としての機能である⁶⁾。また多様な細胞タイプのウイルス感受性におけるCARの強い関与が報告されている²⁶⁻²⁸⁾。実際に、CARにはアデノウイルスに対する結合部位が存在し、ウイルスと宿主の親和性を増強する鍵として、また宿主細胞へのウイルス感染の初期段階において重要な役割を担っている^{29, 30)}。さらに最近では、固形癌において分化度が低くなるにつれ、また浸潤性の増大に伴い、CAR発現の減弱が報告されてきており、大腸癌においては約75%の症例にCAR発現の抑制が認められている³¹⁾。これらの所見に基づいて、癌におけるCARの腫瘍抑制的な役割が提唱されている。その一方で、初期の乳癌において増大したCARの発現が認

められたことから、CARは腺癌の発育を促進するとも推測されている^{32,33)}。また、CARは腺癌細胞がアポトーシスに陥るのを抑制し、腫瘍形成に必要とされるとの報告もなされた³⁴⁾。このように癌浸潤の最前線におけるCARの発現とその役割については未だ不明な点が多い。

本研究においては、検索したヒト口腔扁平上皮癌細胞株すべてに CAR が発現しており、定量性 RT-PCR の結果から、特に HSC-4 細胞においては CAR の発現量の増大が認められたのに対し、SAS 細胞においては最も CAR の発現量が少なかった。これまでの報告¹⁷⁻²¹⁾において、CAR 発現量の減少が癌細胞における細胞間接着を減弱し、その結果細胞増殖を増大させるとともに、癌細胞浸潤や転移を促進することが推測されていることから、もし CAR が正常な機能を保った状態でその発現が亢進しているならば、腫瘍細胞は増殖が抑制されているはずだが、今回検索したヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞いずれも増殖抑制は起こっていない。このことから CAR の発現亢進を認めた細胞のいずれにおいても CAR に何らかの機能不全が起こっている可能性が考えられた。この結果 CAR の最も発現量の少なかった SAS 細胞に着目し、CAR 遺伝子が口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響について解析を行った。まず、CAR 遺伝子をノックダウンした際の細胞増殖活性を検索したところ、SAS 細胞数においてコントロールと比べて顕著な変化は認められなかった。また、多くの腫瘍において腫瘍細胞自身が TNF- α を産生して NF- κ B p65 の活性化を誘導することによって、悪性腫瘍の増殖・進展においても重要な役割を担っていることが知られている³⁵⁾。そこで、CAR 遺伝子をノックダウンした際の NF- κ B p65 の発現量について

解析したが、NF- κ B p65 タンパク質の発現量においても大きな違いは認められなかった。このことから CAR 遺伝子は SAS 細胞における増殖活性ならびに NF- κ B p65 の発現を制御していないことが示唆された。ここで、SAS 細胞上の正常な機能状態にある CAR 遺伝子をノックダウンしたのであれば、これまでの報告¹⁷⁻²¹⁾から NF- κ B p65 の発現量が増大するとともに SAS 細胞の増殖は増強されるはずである。ところが結果はこれに反していた。すなわち、SAS 細胞においても CAR 遺伝子が機能不全に陥っていたことが推測される。さらに SAS 細胞における CAR 遺伝子の働きを確認する目的で CAR 遺伝子を過剰発現させた時の SAS 細胞の増殖活性を検索した。その結果、SAS 細胞数の顕著な減少を確認するとともに caspase-9 の活性化が認められた。このことは SAS 細胞における CAR 遺伝子の過剰発現により CAR の機能が正常化することによって、ミトコンドリア経路を介して caspase の活性化が起こり、アポトーシスに至った可能性を示唆している。今回行った *in vitro* の実験結果から、SAS 細胞だけでなく CAR の発現亢進を認めたヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞すべてにおいて CAR の発現・蓄積は起こっているものの機能していない、すなわち CAR の機能不全の状態にあることが示唆された。また免疫組織化学的検索においても、口腔扁平上皮癌組織における CAR の発現は少なく、癌浸潤の最前線において消失する傾向を認めたことから、CAR の発現および機能は遺伝子変異を含め、何らかの原因で制御されている可能性が示唆された。今後、CAR の遺伝子変異について検索することが重要と考える。

以上のことから、CAR は口腔癌増殖の抑制において重要な役割を担っている

事が示唆された。更に CAR は癌浸潤の最前線において消失するという事実から、口腔癌の患者における予後因子として有用であると共に、ここに発生している情報伝達経路を解析することは口腔癌の増殖、進展メカニズムを解明するために重要であると考えられる。

結 語

口腔癌の増殖と進展における CAR の役割について解析する一手段として、ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞における CAR の発現とその役割について検索するとともに、口腔扁平上皮癌の生検組織材料を用いて CAR 発現に関する免疫組織化学的検索を行い、以下の結果を得た。

1. CAR mRNA の発現状況を定量性 RT-PCR 法により解析したところ、HSC-2, HSC-3, HSC-4 および Ca9-22 および SAS すべての細胞において CAR mRNA の発現亢進が認められたが、とりわけ HSC-4 細胞において強く発現亢進が認められ、SAS 細胞においては最も CAR の発現量が少なかった。
2. Western blot 法により構成的な CAR の発現量を検索したところ、検索した上記の細胞株すべてにおいて分子量 46 kDa 付近に CAR の発現を認めた。
3. CAR 遺伝子が口腔扁平上皮癌細胞に及ぼす影響について解析する目的で、CAR 遺伝子をノックダウンした際の細胞増殖活性を検索したところ、SAS 細胞数においてコントロールと比べて顕著な変化は認められなかった。
4. CAR 遺伝子の働きを確認する目的で CAR 遺伝子を過剰発現させた際の SAS 細胞の動態を検索したところ、caspase-9 の活性化、Annexin V 陽性細胞の増加が認められ、アポトーシスが誘導されたことが推察された。
5. 免疫組織化学的検索により、CAR 陽性所見は口腔扁平上皮癌 40 例中 19 例 (47.5 %) の、重層扁平上皮の細胞膜に弱く観察され、とりわけ口腔扁平上皮癌の浸潤の最前線において消失する傾向にあった。

以上の結果から、CAR は口腔癌増殖の抑制において重要な役割を担っている事が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました坂下英明教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究に協力していただいた本学病態診断治療学講座口腔顎顔面外科学分野の各員に対し厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Bergelson, J.M., Cunningham, J.A., et al: Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275: 1320-1323 1997.
2. Ito, M., Kodama, M., et al: Expression of coxsackie- virus and adenovirus receptor in hearts of rats with experimental autoimmune myocarditis. *Circ Res* 86, 275-280 2000.
3. Hotta, Y., Honda, T., et al: Developmental distribution of coxsackie virus and adenovirus receptor localized in the nervous system. *Brain Res Dev Brain Res* 143, 1-13 2003.
4. Cohen, C.J., Shieh, J.T., et al: The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15191-15196 2001.
5. Sollerbrant, K., Raschperger, E., et al: The Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) forms a complex with the PDZ domain-containing protein ligand-of-numb protein-X (LNX). *J Biol Chem* 278: 7439-7444 2003.
6. Coyne, C.B., Voelker, T., et al: The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. *J Biol Chem* 279: 48079-48084 2004.

7. Excoffon, K.J., Hruska-Hageman, A., et al: A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J Cell Sci* 117: 4401-4409 2004.
8. Mirza, M., Raschperger, E., et al: The cell surface protein coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) directly associates with the ligand-of-Numb Protein-X2 (LNK2). *Exp Cell Res* 309: 110-120 2005.
9. Raschperger, E., Thyberg, J., et al: The coxsackie- and adenovirus receptor (CAR) is an in vivo marker for epithelial tight junctions, with a potential role in regulating permeability and tissue homeostasis. *Exp Cell Res* 312: 1566-1580 2006.
10. Honda, T., Saitoh, H., et al: The coxsackievirus–adenovirus receptor protein as a cell adhesion molecule in the developing mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res* 77, 19-28 2000.
11. Bruning, A. and Runnebaum, I.B.: CAR is a cell–cell adhesion protein in human cancer cells and is expressionally modulated by dexamethasone, TNFalpha, and TGFbeta. *Gene Ther* 10, 198-205 2003.
12. Farmer, C., Morton, P.E., et al: Coxsackie adenovirus receptor (CAR) regulates integrin function through activation of p44/42 MAPK. *Exp Cell Res* 315 2637-2647 2009.
13. Stecker, K., Vieth, M., et al: Impact of the coxsackievirus and adenovirus receptor on the adenoma–carcinoma sequence of colon cancer. *Br J Cancer* 104, 1426-1433 2011.

14. Martin, T.A., Watkins, G., et al: The Coxsackie-adenovirus receptor has elevated expression in human breast cancer. *Clin Exp Med* 5: 122-128 2005.
15. Anders, M., Vieth, M., et al: Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br J Cancer* 100, 352-359 2009.
16. Matsumoto, K., Shariat, S.F., et al: Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. *Urology* 66: 441-446 2005.
17. Huang, K.C., Altinoz, M., et al: Impact of the coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on glioma cell growth and invasion: requirement for the C-terminal domain. *Int J Cancer* 113: 738-745 2005.
18. Okegawa, T., Li, Y., et al: The dual impact of coxsackie and adenovirus receptor expression on human prostate cancer gene therapy. *Cancer Res* 60: 5031-5036 2000.
19. Okegawa, T., Pong, R.C., et al: The mechanism of the growth-inhibitory effect of coxsackie and adenovirus receptor (CAR) on human bladder cancer: a functional analysis of car protein structure. *Cancer Res* 61: 6592-6600 2001.
20. Bruning, A. and Runnebaum, I.B.: The coxsackie adenovirus receptor inhibits cancer cell migration. *Exp Cell Res* 298: 624-631 2004.
21. Wang, B., Chen, G., et al: Inhibitory effect of coxsackie adenovirus receptor on invasion and metastasis phenotype of ovarian cancer cell line SKOV3. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 25: 85-87, 93 2005.
22. Chomczynski, P. and Sacchi, N.: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159 1987.

23. Pindborg, J.J., eds: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd ed, World Health Organization International histological Classification of tumors, Springer–Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997, p. 11.
24. Sobin, L.H., eds. UICC: TNM classification of malignant tumors. 5th Ed, John Wiley and Sons, Inc., New York, 2002, p20.
25. Nagai, M., Yaoita, E., et al: Coxsackievirus and adenoviruses receptor, a tight junction membrane protein, is expressed in glomerular podocytes in the kidney. *Lab Invest* 83: 901-911 2003.
26. Kim, J.S., Lee, S.H., et al: Enhancement of the adenoviral sensitivity on human ovarian cancer cells by transient expression of coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR). *Gynecol Oncol* 85: 260-265 2002.
27. Hemmi, S., Geertsen, R., et al: The presence of human coxsackievirus and adenovirus receptor is associated with efficient adenovirus-mediated transgene expression in human melanoma cell cultures. *Hum Gene Ther* 9: 2363-2373 1998.
28. Li, Y., Pong, R.C., et al: Loss of adenoviral receptor expression in human bladder cancer cells: a potential impact on the efficacy of gene therapy. *Cancer Res* 59: 325-330 1999.
29. Leon, R.P., Hedlund, T., et al: Adenoviral-mediated gene transfer in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13159-13164 1998.
30. Wang, X. and Bergelson, J.M.: Coxsackievirus and adenovirus receptor cytoplasmic and transmembrane domains are not essential for coxsackievirus and adenovirus infection. *J Virol* 73: 2559-25562 1999.
31. Zhang, N.H., Song, L.B., et al: Proteasome inhibitor MG-132 modifies coxsackie and adenovirus receptor expression in colon cancer cell line lovo. *Cell Cycle* 7(7): 925–933 2008.

32. Anders, M., Hansen, R., et al: Disruption of 3D tissue integrity facilitates adenovirus infection by deregulating the coxsackievirus and adenovirus receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(4): 1943-1948 2003.
33. Kuster, K., Grotzinger, C., et al: Sodium butyrate increases expression of the coxsackie and adenovirus receptor in colon cancer cells. *Cancer Invest* 28(3): 268-274 2010.
34. Bruning, A., Stickeler, E., et al: Coxsackie and adenovirus receptor promotes adenocarcinoma cell survival and is expressionally activated after transition from preneoplastic precursor lesions to invasive adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 11(12): 4316-4320 2005.
35. Karin, M.: How NF- κ B is activated: the role of the I κ B kinase (IKK) complex. *Oncogene* 18: 6867-6874 1999.

写真・図の説明

図1 RT-PCR 法

ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞における CAR mRNA の発現. HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS すべてにおいて構成的な CAR mRNA の発現を認めた.

図2 CAR 発現の定量的解析

各ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 (1×10^5 個) を 25 cm^2 のフラスコにて培養し, 単層状態の細胞から total RNA を調整し定量性 RT-PCR 法にて CAR mRNA の発現を検討した. データは GAPDH の発現量を 1 としたときの CAR mRNA の発現量を示している. SAS 細胞における CAR mRNA の発現量は他の 4 種類のそれぞれと比較して有意に抑制されていた ($p < 0.05$, Bonferroni/Dunn 法). また, HSC-4 細胞においては逆に CAR mRNA 発現量の有意な亢進が認められた ($p < 0.002$, Bonferroni/Dunn 法).

図3 Western blot 法

ヒト口腔扁平上皮癌由来株化細胞における CAR の発現. HSC-2, HSC-3, HSC-4, Ca9-22 および SAS すべてにおいて分子量 46 kDa 付近に CAR の発現を認めた.

図4 CAR ノックダウンによる細胞増殖活性の解析

(A) CAR siRNA または control siRNA を, Lipofectamine を用いて SAS 細胞に導入し, 48 時間後, 各ウェルに Cell Counting Kit-8 溶液を加え, 4 時間作用させた後, 生細胞数の割合を吸光度計 (OD 450 nm) にて triplicate で測定

した.

(B)同様の系で 25 cm² フラスコにて CAR siRNA または control siRNA を SAS 細胞に導入し, Western blot 法にて CAR および NF-κB p65 タンパク質の発現を検討した. Internal control としてβ-actin を示す.

図 5 CAR 遺伝子過剰発現による SAS 細胞の変化

(A) 培養後, CAR cDNA プラスミド (0.2 μg) を FuGENE HD 核酸導入試薬を用いて遺伝子導入し, 24 時間後, Cell Counting Kit-8 を用いて生細胞数を測定した. また CAR タンパク質の発現を Western blot 法により解析した.

(B) 上記 CAR cDNA を遺伝子導入 24 時間後, SAS 細胞を Annexin V-FITC kit を用いて染色し, 蛍光顕微鏡観察によりアポトーシス細胞の検出を行った (original magnification × 200). (a-1)位相差顕微鏡写真, (a-2) FITC 標識した Annexin V 陽性所見, (a-3) PI 陽性所見. (b-1)コントロールベクターを遺伝子導入した際の位相差顕微鏡写真, (b-2)コントロールベクターを遺伝子導入した際の Annexin V 染色所見, (b-3)コントロールベクターを遺伝子導入した際の PI 染色所見をそれぞれ示す.

(C) アポトーシス細胞の割合を定量的に測定するため上記 CAR cDNA 遺伝子導入 SAS 細胞を Annexin V-FITC kit を用いて染色し, フローサイトメトリーにて解析した.

(D) Caspase-Glo 3/7, -8 および-9 の測定システムを用いて caspase の活性化を測定した. SAS 細胞に CAR cDNA を遺伝子導入した際の caspase-9 において有意な活性化を示した (p<0.05, Spearman の順位相関係数).

図 6 免疫組織化学的検索

H-E 染色標本弱拡大像（上段左）にて癌浸潤の最前線の部分を確認し，□で囲んだ部分に対する H-E 染色標本強拡大像（上段右），CAR および NF- κ B p65 染色結果を以下に示す．

(A) PAb CAR を用いた免疫組織化学的検索の結果，とりわけ口腔扁平上皮癌の浸潤の最前線において消失する傾向にあった（黒矢印；original magnification, $\times 66$ ）．(B) NF- κ B p65 は口腔扁平上皮癌の浸潤の最前線において，癌細胞の核に強陽性を示した（黒矢印；original magnification, $\times 66$ ）．

表 1 RT-PCR 法および定量性 RT-PCR 法に用いたプライマー塩基配列

CAR primer pairs

Forward primer: 5'-GAAGATGTGCCACCTCCAAAGAG-3'

Reverse primer: 5'-GACATGGACCCAGGGATGAA-3'

GAPDH

Forward: 5'-CAGCCTCAAGATCATCAGCA-3'

Reverse: 5'-ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT-3'

表 2 CAR siRNA 塩基配列

CAR siRNA

sense: GAA GCU ACA UCG GCA GUA Att;

antisense: UUA CUG CCG AUG UAG CUU Ctt

control siRNA

sense: AAG AAG CGU UAC GAU CGC Att;

antisense: UGC GAU CGU AAC GCU UCU Utt

表3 口腔扁平上皮癌患者40例におけるCARとNF-κBタンパク質の発現と臨床病理学的諸因子間の相関関係

NO.	Age	Gender	Location	Differentiation	pTNM	Stage	immunohistochemistry	
							CAR	NF-κB
1	87	M	Oral floor	well	T2N2bM0	IVA	—	+
2	48	F	Gingiva	well	T4N0M0	IVA	—	+
3	56	F	Buccal mucosa	well	T2N0M0	II	—	+
4	75	M	Tongue	well	T4N2cM0	IVA	+	+
5	55	M	Oral floor	well	T2N0M0	II	—	+
6	54	M	Tongue	well	T4N2bM0	IVA	—	+
7	54	M	Oral floor	well	T2N2aM0	IVA	+	+
8	70	M	Tongue	well	T2N0M0	II	—	+
9	67	M	Maxillary gingiva	well	T4N3M0	IVB	+	+
10	92	M	Soft palate	well	T2N0M0	II	+	—
11	66	M	Tongue	well	T2N0M0	II	+	+
12	87	M	Tongue	well	T2N0M0	II	—	—
13	48	F	Tongue	well	T1N0M0	I	+	—
14	85	M	Tongue	well	T2N1M0	III	+	—
15	56	F	Tongue	well	T1N2bM0	IVA	—	+
16	67	M	Mandibular gingiva	well	T1N2bM0	IVA	—	+
17	55	M	Tongue	well	T1N0M0	I	+	+
18	85	M	Buccal mucosa	well	T1N0M0	I	—	—
19	50	M	Mandibular gingiva	well	T3N1M0	III	+	+
20	67	M	Mandibular gingiva	well	T4N0M0	IVA	+	+
21	79	M	Buccal mucosa	well	T2N0M0	II	+	+
22	54	M	Buccal mucosa	well	T1N0M0	I	—	+
23	54	M	Mandibular gingiva	well	T4N1M0	IVA	—	—
24	62	M	Mandibular gingiva	well	T1N0M0	I	—	+
25	60	M	Maxillary gingiva	well	T1N0M0	I	+	—
26	79	M	Mandibular gingiva	moderately	T4N2cM0	IVA	—	+
27	85	F	Tongue	moderately	T2N1M0	III	+	+
28	54	M	Tongue	moderately	T1N0M0	I	+	+
29	54	M	Tongue	moderately	T4N2bM0	IVA	—	+
30	75	M	Mandibular gingiva	moderately	T1N0M0	I	—	—
31	66	F	Mandibular gingiva	moderately	T1N0M0	I	—	—
32	65	M	Mandibular gingiva	moderately	T2N0M0	II	—	—
33	88	M	Mandibular gingiva	moderately	T2N0M0	II	—	+
34	79	M	Mandibular gingiva	moderately	T2N0M0	II	—	+
35	54	M	Buccal mucosa	moderately	T2N0M0	II	+	+
36	64	M	Buccal mucosa	poorly	T2N0M0	II	+	+
37	62	M	Tongue	poorly	T2N1M0	III	+	+
38	60	M	Tongue	poorly	T2N1M0	III	+	+
39	60	M	Tongue	poorly	T1N0M0	I	+	+
40	68	M	Maxillary gingiva	poorly	T3N0M0	III	—	+

CAR expression: 19/40 cases (47.5%), NF-kappaB expression: 30/40 cases (75%)

图 1

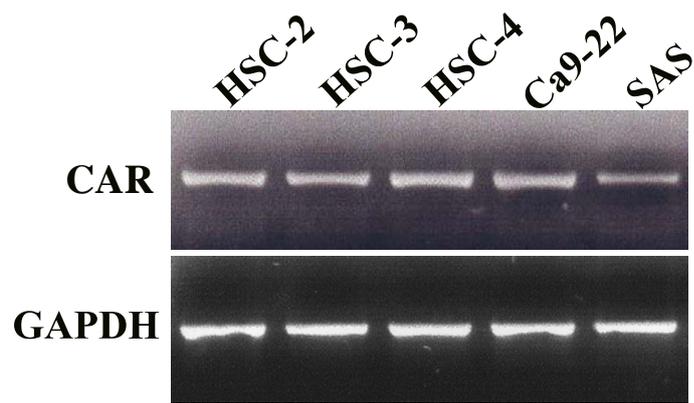


图 2

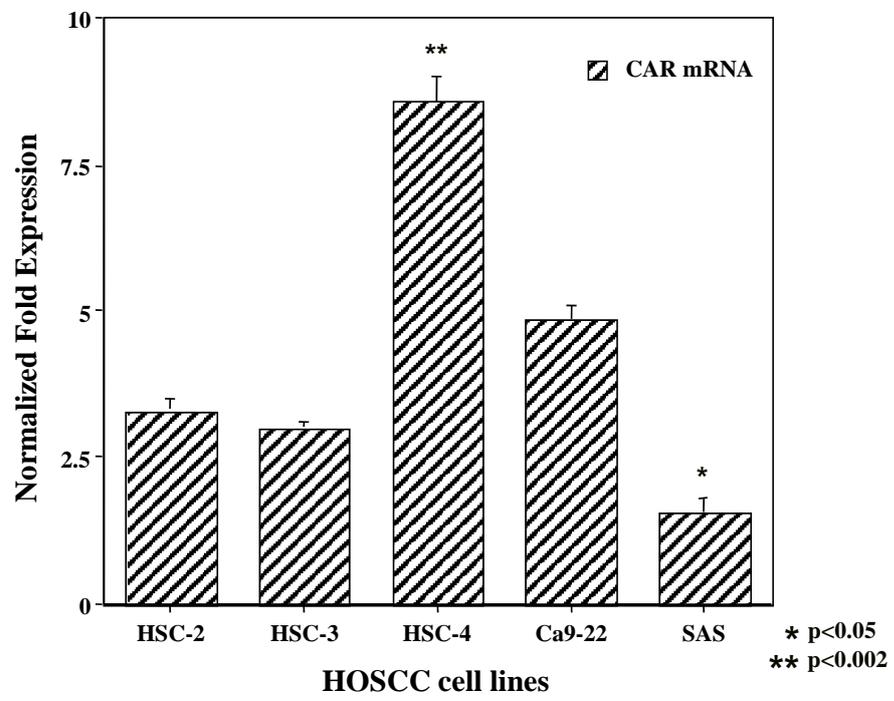
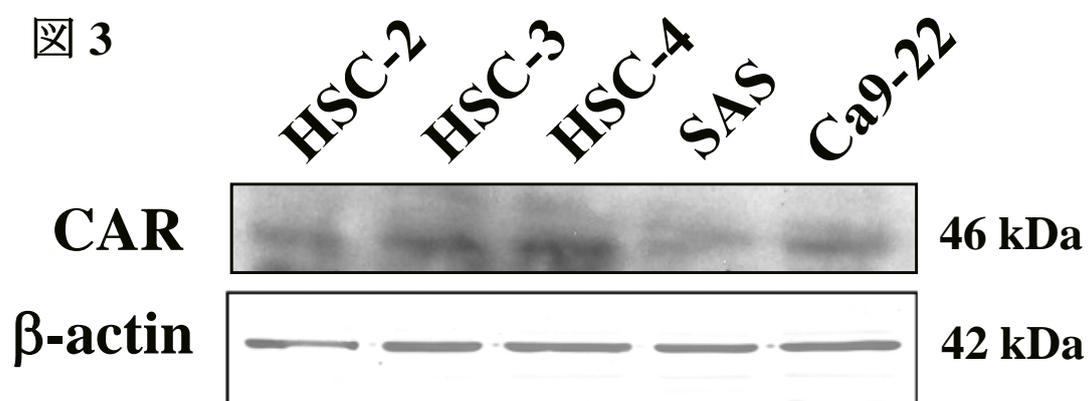
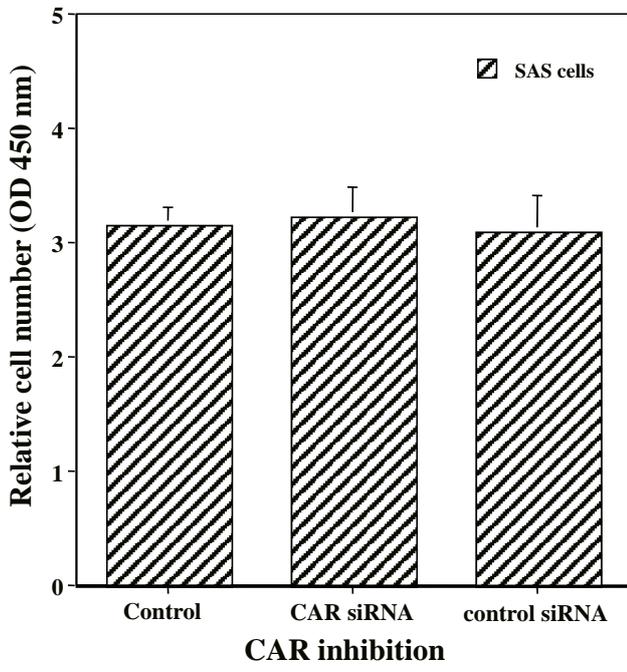


图 3

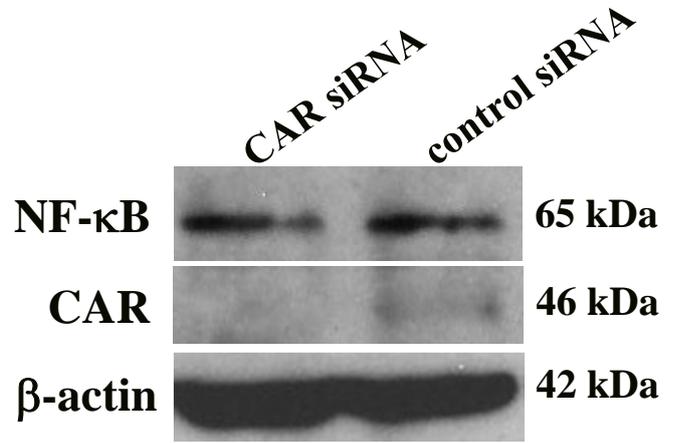


☒ 4

(A)



(B)



☒ 5A

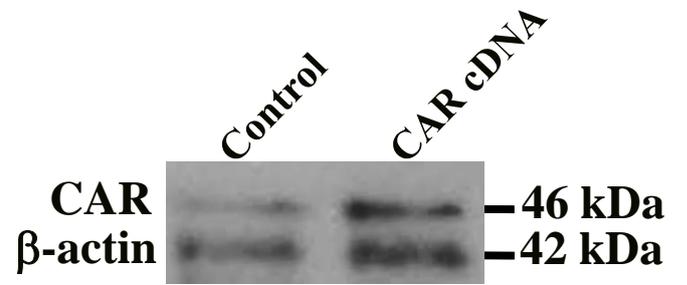
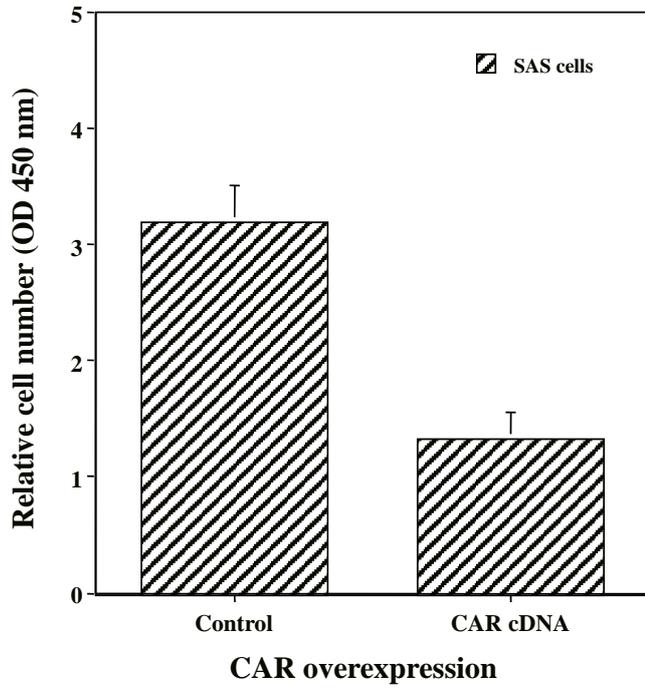


図 5B

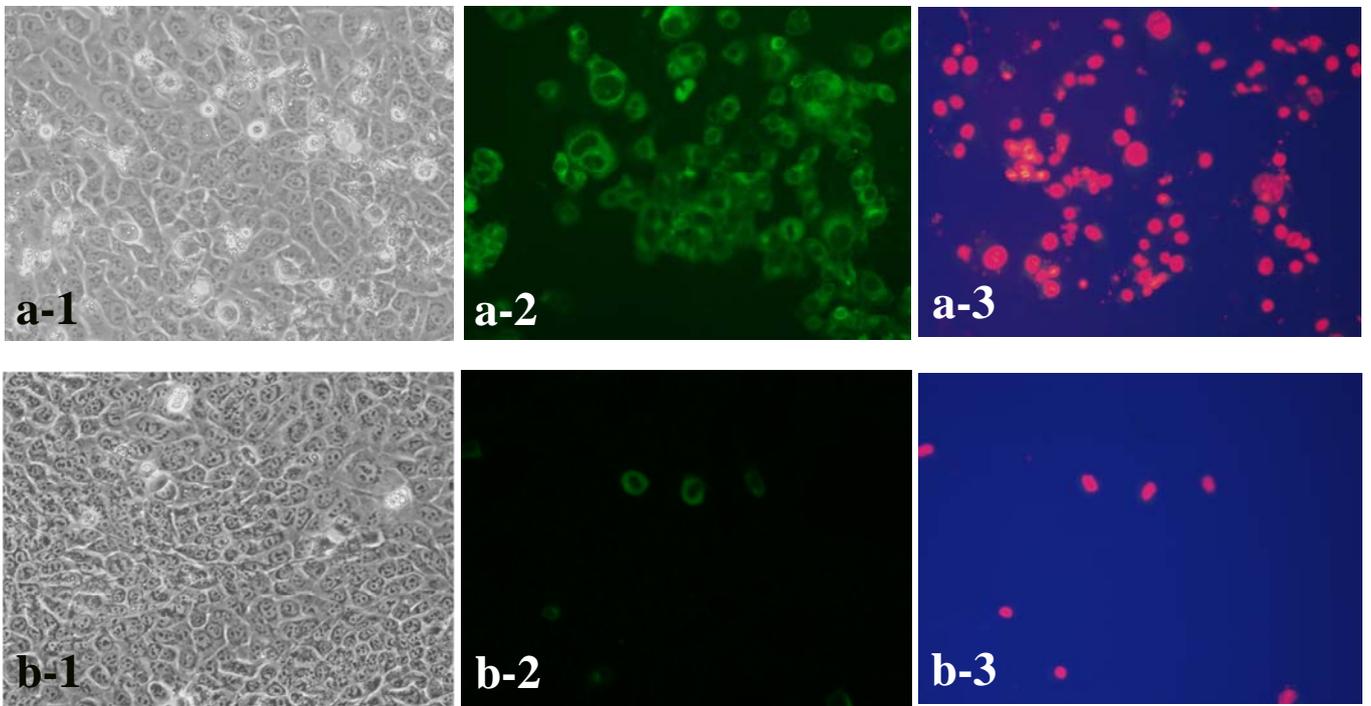
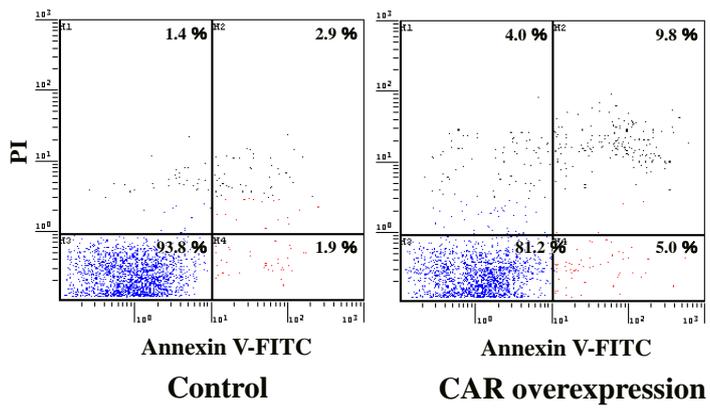


图 5

C



D

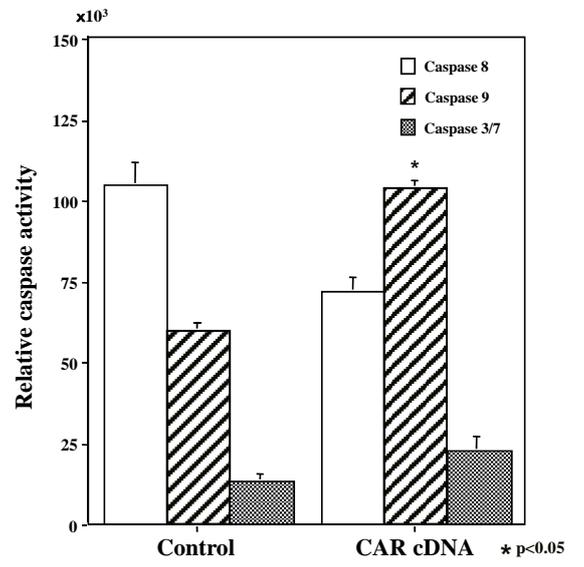


图 6

