

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08350

研究課題名(和文)新規3細胞間タイト結合分子LSRの癌の診断・治療への応用

研究課題名(英文)A novel tricellular tight junction molecule LSR in diagnosis and therapy for cancer

研究代表者

小島 隆 (Takashi, Kojima)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30260764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、子宮内膜癌および膵臓癌の悪性化における新規3細胞間タイト結合分子LSRの役割および調節メカニズムを、癌細胞株および正常ヒト上皮細胞を用いて解明した。癌細胞株においては、LSRの発現低下によりTEAD1/AREGを介して、癌細胞の遊走、浸潤を亢進していた。このメカニズムとしては、1)Hippo pathwayを介した経路、2)タイト結合分子claudin-1を介してMMP1を増加させる経路があることを見出した。正常上皮細胞においても、siRNAによるLSRの発現低下によりclaudin-1が誘導された。このことは、LSRは複雑なメカニズムで癌細胞の悪性化に関与していることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, to apply a novel tricellular tight junction molecule LSR to diagnosis and therapy for cancer, we investigated the roles and the regulated mechanisms of LSR during malignancy of endometrial cancer and pancreatic cancer by using cancer cell lines and normal human epithelial cells. Knockdown of LSR by the siRNA in cancer cell lines promoted the migration and the invasion of cancer cells via transcriptional factor TEAD1/growth factor AREG. The mechanisms in migration and invasion of cancer cells by loss of LSR, are 1) the Hippo pathway (YAP/AMOT/merin) and 2) the pathway of the increase of MMP1 via induction of tight junction molecule claudin-1. In normal human epithelial cells, knockdown of LSR induced claudin-1 expression. Taken together, loss of LSR may contribute to the malignancy of cancer via the complex mechanisms.

研究分野：細胞生物学、病理学

キーワード：子宮内膜癌 膵臓癌 LSR 悪性化 Hippo pathway TEAD1/AREG claudin-1

#### 1. 研究開始当初の背景

肥満は高脂血症、高血圧、動脈硬化等の生活習慣病の発症と深く関連し、心筋梗塞や脳梗塞といった致命的疾患の発症要因となることは知られているが、最近、悪性腫瘍の発症の危険因子となることも分かってきた。難治性癌である膵癌および子宮内膜癌も、食生活の欧米化(肥満の増加)などの要因で罹患率が著しく増加している。LSR (lipolysis-stimulated lipoprotein receptor)は、最近上皮細胞の3細胞間に局在する膜蛋白として再発見され、tricellulinの局在を含めた3細胞間を調節している上流の重要な分子として考えられている。一部の癌においては、2細胞間タイト結合分子であるclaudin-1が高発現し、癌細胞からのMMP産生を増加させ、癌細胞の浸潤の著しい亢進が報告されている。さらに最近LSRは、tricellulinの局在を調節するだけでなく、apoptosis stimulating proteins of p53 (ASPP) familyであるASPP2と相互作用をもち、そのASPP2は極性分子であるPAR3との結合もみられている。

#### 2. 研究の目的

本研究は、新規3細胞間タイト結合分子 LSRを癌の診断・治療へ応用するために、子宮内膜癌および膵管癌の悪性化における LSR の役割およびメカニズムの解析を目的とした。

#### 3. 研究の方法

1) ヒト剖検材料を用いて前癌組織 (PanIn、子宮内膜症) および癌組織 (膵癌および子宮内膜癌) におけるLSR、ASPP2、claudin-1の発現および局在の変化を悪性度EMT (epithelial-mesenchymal transition) マーカー (Snail, Slug, ZEB) と比較検討する。

2) LSRを高発現している癌細胞株 (子宮内膜癌細胞株 Sawano、膵癌細胞株 HPAC) を用いて、LSRの癌細胞の浸潤および遊走における役割およびそのメカニズムを解明する。

a) Hippo pathway (YAP/AMOT/merin) を介した経路

b) タイト結合分子claudin-1を介してMMP 1を増加させる経路

3) LSRを高発現している癌細胞株を用いて、LSRを介した肥満との関係を見る。leptin、adiponectin、metformin処置によるLSRの発現調節機構をシグナル伝達経路 (JAK/Stat, AMPK/LKB1/mTOR, PI3K/MAPK/NF-kB) に焦点を当て解析する。さらにmetformin処置による癌細胞の遊走および浸潤の効果を見る。

4) LSRに細胞外から特異的結合するリガンドAngubindin-1を作製処置しLSRの機能特にバリア機能を阻害した時の癌細胞の遊走・浸潤の変化を解析する。

5) LSRと同様に3細胞間に局在がみられLSRの発現を調節可能なApoptosis-stimulating p53 protein 2 (ASPP2)をsiRNAを用いて発現低下させた時の癌細胞の遊走・浸潤の変化を解析する。

6) 正常培養ヒト上皮細胞(子宮内膜上皮細胞、膵管上皮細胞)を用いて、siRNAによりLSRの発現を低下させ、他のタイト結合分子の変化をみる。さらに肥満との関係を見る。

#### 4. 研究成果

1) 免疫染色により前癌組織 (PanIn、子宮内膜症) および癌組織 (膵癌および子宮内膜癌) から LSR の局在変化がみられ、悪性度とともにその発現は低下していた。ASPP2 においても同様な変化がみられた。claudin-1 においては、LSR の発現が低下している子宮内膜癌の浸潤部において一部 claudin-1 の発現亢進がみられた。

2) 癌細胞株 (子宮内膜癌細胞株 Sawano、膵癌細胞株 HPAC) において、siRNAによるLSRの発現低下が、転写因子TEAD1/増殖因子AREGを介して癌細胞の遊走、浸潤を亢進していた。

3) LSRの発現低下による癌細胞の浸潤および遊走の亢進メカニズムとしてa) Hippo pathway (YAP/AMOT/merin)を介した経路、b) タイト結合分子claudin-1誘導を介してMMP 1を増加させる経路が認められた。

4) 子宮内膜癌細胞株に leptin、adiponectin、metformin 処置した結果、leptin 処置で LSR の発現低下、adiponectin および metformin 処置で LSR の発現亢進がみられた。これらの発現変化は、JAK2/SAT をはじめとした様々なシグナル伝達経路で調節されていた。さらに metformin 前処置は、siRNA および Leptin 処置による LSR の低下を阻害し、癌細胞の遊走および浸潤の亢進も阻害した。

5) 子宮内膜癌細胞株を用いてASPP2をsiRNAにより発現低下させた結果、LSRの発現低下とともに癌細胞の遊走・浸潤の亢進がみられた。

6) 正常培養ヒト上皮細胞(子宮内膜上皮細胞、膵管上皮細胞)を用いて、siRNAによりLSRの発現を低下させた結果、claudin-1の発現誘導がみられた。さらに正常子宮内膜上皮細胞に leptin、adiponectin、metformin処置した結果、子宮内膜癌細胞株同様に leptin処置で LSR の発現低下、adiponectin および metformin 処置で LSR の発現亢進がみられた。

以上のことは、新規3細胞間タイト結合分子 LSR の低下は複雑なメカニズムで癌細胞の悪性化に密接に関与していることが考えられ

た。新規3細胞間タイト結合分子 LSR の発現変化は、一部癌の補助診断に有用であり、分子標的治療のターゲットになる可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 23 件)

Kojima T, Kohno T, Kubo T, Kaneko Y, Kakuki T, Kakiuchi A, Kurose M, Takano KI, Ogasawara N, Obata K, Nomura K, Miyata R, Konno T, Ichimiya S, Himi T. Regulation of claudin-4 via p63 in human epithelial cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2017 1405(1):25-31. 査読有 DOI: 10.1111/nyas.13456.

Shimada H, Abe S, Kohno T, Satohisa S, Konno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Arimoto C, Kakuki T, Kaneko Y, Takano K, Saito T, Kojima T. Loss of tricellular tight junction protein LSR promotes cell invasion and migration via upregulation of TEAD1/AREG in human endometrial cancer. *Sci Rep*. 2017 7: 37049. 査読有 DOI:10.1038/srep37049.

Kaneko Y, Kohno T, Kakuki T, Takano KI, Ogasawara N, Miyata R, Kikuchi S, Konno T, Ohkuni T, Yajima R, Kakiuchi A, Yokota SI, Himi T, Kojima T. The role of transcriptional factor p63 in regulation of epithelial barrier and ciliogenesis of human nasal epithelial cells. *Sci Rep*. 2017 7:10935. 査読有 DOI: 10.1038/s41598-017-11481-w.

Takano K, Kakuki T, Kaneko Y, Kohno T, Kikuchi S, Himi T, Kojima T. Histone deacetylase inhibition prevents cell death induced by loss of tricellular tight junction proteins in temperature-sensitive mouse cochlear cells. *PLoS One*. 2017 12:e0182291. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0182291.

Kohno T, Kikuchi S, Ninomiya T, Kojima T. The bicellular tensile force sorts the localization of LSRs in bicellular and tricellular junctions. *Ann N Y Acad Sci*. 2017 1397:185-194. 査読有 DOI: 10.1111/nyas.13362.

Shimada H, Satohisa S, Kohno T, Konno T, Takano K, Takahashi S, Hatakeyama T, Arimoto C, Saito T, Kojima T. Downregulation of LSR promotes cell invasion via claudin-1-mediated MMPs in human endometrial cancer. *Oncology Letters* 2017 14:6776-6782. 査読有 DOI: 10.3892/ol.2017.7038.

Takano K, Kakuki T, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kondo A, Kurose M, Kakiuchi A, Kaneko Y, Kohno T, Himi T, Kojima T. The behavior and role of lipolysis-stimulated lipoprotein receptor, a component of tricellular tight junctions, in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Research* 2016 36:5895-5904. 査読有 DOI: 10.21873/anticancer.11176

Kakuki T, Kaneko Y, Takano K, Ninomiya T, Kohno T, Kojima T, Himi T. Behavior of Primary Cilia and Tricellular Tight Junction Proteins during Differentiation in Temperature-Sensitive Mouse Cochlear Precursor Hair Cells. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016 77:27-32. 査読有 DOI: 10.1159/000441867.

Kurose M, Kakuki T, Takano K, Kondo A, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kaneko Y, Konno T, Kohno T, Kojima T, Himi T. Junctional Adhesion Molecule-A in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016 77:92-97. 査読有 DOI: 10.1159/000441881.

Yamamoto K, Yamamoto S, Ogasawara N, Takano K, Shiraishi T, Sato T, Miyata R, Kakuki T, Kamekura R, Kojima T, Tsutsumi H, Himi T, Yokota S. Clarithromycin prevents human respiratory syncytial virus-induced airway epithelial responses by modulating activation of interferon regulatory factor-3. *Pharmacol Res*. 2016 111:804-814. 査読有 DOI: 10.1016/j.phrs.2016.07.033.

Hashimoto S, Yamamoto S, Ogasawara N, Sato T, Yamamoto K, Katoh H, Kubota T, Shiraishi T, Kojima T, Himi T, Tsutsumi H, Yokota S. Mumps Virus Induces Protein-Kinase-R-Dependent Stress Granules, Partly Suppressing Type III Interferon Production. *PLoS One*. 2016 Aug 25;11(8):e0161793. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0161793.

Takasawa A, Murata M, Takasawa K, Ono Y, Osanai M, Tanaka S, Nojima M, Kono T, Hirata K, Kojima T, Sawada N. Nuclear localization of tricellulin promotes the oncogenic property of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2016 Sep 19;6:33582. 査読有 DOI: 10.1038/srep33582.

Sakuma Y, Nishikiori H, Hirai S, Yamaguchi M, Yamada G, Watanabe A, Hasegawa T, Kojima T, Niki T, Takahashi H. Prolyl isomerase Pin1 promotes survival in EGFR-mutant lung adenocarcinoma cells with an epithelial-mesenchymal transition phenotype. *Lab Invest*. 2016 96:391-398. 査読有 DOI: 10.1038/labinvest.2015.155.

Shimada H, Satohisa S, Kohno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Konno T, Tsujiwaki M, Saito T, Kojima T. The roles of tricellular tight junction protein lipolysis-stimulated lipoprotein receptor in malignancy of human endometrial cancer cells. *Oncotarget* 2016 7:27735-27752. 査読有 DOI: 10.18632/oncotarget.8408.

Kakuki T, Kurose M, Takano K, Kondoh A, Obata K, Nomura K, Miyata R, Kaneko Y, Konno T, Takahashi S, Hatakeyama T, Kohno T, Himi T, Kojima T. Dysregulation of junctional adhesion molecule-A via p63/GATA-3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2016 7:33887-33900. 査読有 DOI: 10.18632/oncotarget.8432.

Abe A, Takano K, Kojima T, Nomura K, Kakuki T, Kaneko Y, Yamamoto M, Takahashi H, Himi T. Interferon-gamma increased epithelial barrier function via upregulating claudin-7 expression in human submandibular gland duct epithelium. *J Mol Histol* 2016 47(3):353-363. 査読有 DOI: 10.1007/s10735-016-9667-2.

Kojima T, Kondoh M, Keira T, Takano KI, Kakuki T, Kaneko Y, Miyata R, Nomura K, Obata K, Kohno T, Konno T, Sawada N, Himi T. Claudin-binder C-CPE mutants enhance permeability of insulin across human nasal epithelial cells. *Drug Deliv.* 2016 23(8):2703-2710. 査読有 DOI: 10.3109/10717544.2015.1050530

Kono T, Kondoh M, Kyuno D, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Kohno T, Konno T, Furuhashi T, Sawada N, Hirata K, Kojima T. Claudin-4 binder C-CPE 194 enhances effects of anticancer agents on pancreatic cancer cell lines via a MAPK pathway. 2015 3(6):e00196. 査読有 DOI: 10.1002/prp2.196.

Miyata R, Kakuki T, Nomura K, Ohkuni T, Ogasawara N, Takano K, Konno T, Kohno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. Poly(I:C) induced microRNA-146a regulates epithelial barrier and secretion of proinflammatory cytokines in human nasal epithelial cells. *Eur J Pharmacol.* 2015 761:375-382. 査読有 DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.04.031.

Kohno T, Ninomiya T, Kikuchi S, Konno T, Kojima T. Staurosporine induces formation of two types of extra-long cell protrusions: actin-based filaments and microtubule-based shafts. *Mol Pharmacol.* 2015 87:815-824. 査読有 DOI: 10.1124/mol.114.096982.

④ Miyata R, Nomura K, Kakuki T, Takano K, Kohno T, Konno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. Irsogladine maleate regulates gap junctional intercellular

communication-dependent epithelial barrier in human nasal epithelial cells. *J Membr Biol.* 2015 248:327-336. 査読有 DOI: 10.1007/s00232-015-9774-0.

② Konno T, Ninomiya T, Kohno T, Kikuchi S, Sawada N, Kojima T. c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 enhances barrier function and elongation of human pancreatic cancer cell line HPAC in a Ca-switch model. *Histochem Cell Biol.* 2015 143:471-479. 査読有 DOI: 10.1007/s00418-014-1300-4.

③ Tsujiwaki M, Murata M, Takasawa A, Hiratsuka Y, Fukuda R, Sugimoto K, Ono Y, Nojima M, Tanaka S, Hirata K, Kojima T, Sawada N. Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. *Med Mol Morphol.* 2015 48:33-43. 査読有 DOI: 10.1007/s00795-014-0074-z.

〔学会発表〕(計 17 件)

金子躍人、角木拓也、高野賢一、小笠原徳子、横田伸一、氷見徹夫、幸野貴之、小島隆 ヒト鼻粘膜上皮バリアにおける転写制御因子 p63 の役割 第 106 回日本病理学会 2017 年 4 月 27-29 日「京王プラザホテル(東京都新宿区)」

金野匠、及能大輔、河野剛、有元千紘、畠山翔翼、高橋駿太、幸野貴之、小島隆 肺癌の悪性化における 3 細胞間タイト結合分子 LSR の役割 第 106 回日本病理学会 2017 年 4 月 27-29 日「京王プラザホテル(東京都新宿区)」

阿部秀悦、嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、齋藤豪、幸野貴之、小島隆 3 細胞間タイト結合蛋白 LSR は YAP/AMOT/merlin を介して子宮内膜癌の悪性化へ関与する 第 69 回日本細胞生物学会 2017 年 6 月 13-15 日「仙台国際センター・会議棟(宮城県仙台市)」

金野匠、幸野貴之、及能大輔、嶋田浩志、郷久晴朗、角木拓也、金子躍人、高野賢一、齋藤豪、小島隆 がん細胞の上皮バリアおよび悪性化における糖代謝の役割 第 69 回日本細胞生物学会 2017 年 6 月 13-15 日「仙台国際センター・会議棟(宮城県仙台市)」

垣内晃人、角木拓也、黒瀬誠、高野賢一、近藤敦、小幡和史、野村一顕、宮田亮、金子躍人、幸野貴之、氷見徹夫、小島隆 頭頸部扁平上皮癌におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の p63 依存性タイト結合分子を介した抗腫瘍効果 第 69 回日本細胞生物学会 2017 年 6 月 13-15 日「仙台国際センター・会議棟(宮城県仙台市)」

郷久晴朗、嶋田浩志、阿部秀悦、玉手雅人、岩崎雅宏、寺田倫子、鈴木美和、寺本瑞絵、田中綾一、小島隆、齋藤豪 3 細胞間タイト結合分子 LSR は AMOT により活性化された Hippo pathway を介して子宮内膜癌の悪性化に関与する 第 59 回日本婦人科腫瘍学会学

術講演会 2017 年 7 月 27-29 日「ホテル日航  
熊本・くまもと県民交流館パレア(熊本県熊  
本市)」

嶋田浩志、金野匠、郷久晴朗、阿部秀悦、  
幸野貴之、齋藤豪、小島隆 子宮内膜癌  
(endometrioid)におけるタイト結合分子  
claudin-2 の役割 第 49 回日本臨床分子形態  
学学会 2017 年 9 月 15,16 日「じゅうろく  
プラザ(岐阜県岐阜市)」

保坂雪野、幸野貴之、金子躍人、垣内晃  
人、矢島諒人、金野匠、菊池真、高野賢一、  
氷見徹夫、小島隆 マウス内耳有毛前駆細胞  
における Rho/ROCK 阻害剤 Y27632 による  
primary cilia の変化 第 49 回日本臨床分子  
形態学学会 2017 年 9 月 15,16 日「じゅうろ  
くプラザ(岐阜県岐阜市)」

金野匠、幸野貴之、菊池真、嶋田浩志、  
郷久晴朗、齋藤豪、小島隆 細胞分裂にお  
ける 3 細胞間タイト結合分子の局在変化と役  
割 第 49 回日本臨床分子形態学学会 2017 年  
9 月 15,16 日「じゅうろくプラザ(岐阜県岐阜  
市)」

小島隆、金子躍人、金野匠、角木拓也、  
高野賢一、菊池真、矢島諒人、大國毅、  
氷見徹夫、幸野貴之 ヒト鼻粘膜上皮バリア  
における p63 の役割 2017 年生命科学系学会  
合同年次大会 2017 年 12 月 6-9 日「神戸ポ  
ートアイランド(兵庫県神戸市)」

垣内晃人、角木拓也、黒瀬誠、高野賢一、  
近藤敦、小幡和史、野村一顕、宮田遼、金子  
躍人、氷見徹夫、小島隆 ヒストン脱アセチ  
ル化酵素(HDAC)阻害による頭頸部扁平上皮  
癌タイト結合分子の変化と抗腫瘍効果 2017  
年生命科学系学会合同年次大会 2017 年 12 月  
6-9 日「神戸ポートアイランド(兵庫県神戸  
市)」

金野匠、幸野貴之、菊池真、嶋田浩志、  
郷久晴朗、齋藤豪、小島隆 細胞質分裂にお  
ける 3 細胞間タイト結合分子の局在と役割  
2017 年生命科学系学会合同年次大会 2017 年  
12 月 6-9 日「神戸ポートアイランド(兵庫県  
神戸市)」

小島隆、嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、  
齋藤豪、幸野貴之 子宮内膜癌の悪性化にお  
ける ASP2 の役割 第 114 回北海道癌談話  
会 2016 年 9 月 3 日「札幌医科大学記念ホ  
ール(北海道札幌市)」

嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、有元千尋、  
高橋俊太、畠山翔翼、幸野貴之、齋藤豪、小  
島隆 LSR/YAP/AMOT/merlin による子宮内  
膜癌の悪性化への関与 第 48 回日本分子形  
態学学会 2016 年 9 月 23,24 日「くまもと  
県民交流館パレア(熊本県熊本市)」

Yakuto Kaneko, Takuya Kakuki, Makoto  
Kurose, Ken-ichi Takano, Takayuki Kohno,  
Tetsuo Himi, Takashi Kojima Dysregulation  
of junctional adhesion molecule-A via  
p63/GATA-3 in head and neck squamous cell  
carcinoma Tight junctions and their  
proteins Sep 8-10 2016, Berlin, Germany

Takashi Kojima, Yakuto Kaneko, Takuya  
Kakuki, Terufumi Kubo, Ken-ichi Takano,  
Tetsuo Himi, Takayuki Kohno Claudin-4  
expression via p63 in human normal  
epithelial cells and diseases Tight  
junctions and their proteins Sep 8-10  
2016, Berlin, Germany

嶋田浩志、郷久晴朗、金野匠、高橋俊太、  
畠山翔翼、齋藤豪、幸野貴之、小島隆 ヒト  
子宮内膜癌細胞の悪性化における  
lipolysis-stimulated lipoprotein  
receptor の役割 第 67 回日本細胞生物学会  
2015 年 6 月 30 日 7 月 2 日「タワーホール  
船堀(東京都江戸川区)」

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小島 隆 (KOJIMA TAKASHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30260764

### (2) 研究分担者

幸野貴之 (KOHONO TAKAYUKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号: 10374563

### (3) 連携研究者

近藤昌夫 (KONDOH MASAO)  
大阪大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 50309697

### (4) 連携研究者

澤田典均 (SAWADA NORIMASA)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 30154149