

令和元年5月27日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08693

研究課題名(和文) タイト結合ストレスでおきる細胞接着の異常が決定する細胞の形と運命

研究課題名(英文) Changes of tight junctions induced by extracellular stimuli determine cell shape and fate.

研究代表者

澤田 典均 (SAWADA, NORIMASA)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30154149

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タイト結合は、外界刺激に対するバリアであり、細胞にとって極性を維持するフェンスとなる細胞接着装置である。近年では、各種疾患においてタイト結合関連タンパクの量的、部分的な発現異常が報告されている。本研究では、主にヒト腫瘍における発現異常に着目し、以下を明らかにした。タイト結合関連タンパクは腫瘍の診断マーカーとなりうるだけでなく、治療の標的分子となる可能性が示唆された。さらに、タイト結合関連タンパクの発現が腫瘍の悪性化に寄与しており、細胞接着の異常が腫瘍発生に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト癌における細胞間接着装置タイト結合の構成分子の役割を検討し、膵癌ではtricellulin、肺癌ではJAM-A、胆管癌ではclaudin-18が、癌の進行に関与していること、子宮頸部腺癌ではclaudin-1が予後不良因子でGRP30を介してエストロゲン依存性に発現していることを明らかにした。これらは、各タイト結合分子が診断マーカー又は治療標的分子となりうることを意味し、急増する種々の癌に対する新しい治療戦略を提案するもので、社会的影響や意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The tight junction (TJ) is an intercellular junction that works as a barrier to external stimulation and as a fence to maintain cell polarity. Recently, aberrant expression of TJ proteins have been reported in various diseases. In this study, we focused mainly on aberrant expression in human tumor and clarified the following. TJ proteins could be diagnostic markers for some tumors including hepatocellular carcinoma, intrahepatic cholangiocarcinoma, lung adenocarcinoma, cervical adenocarcinoma and salivary gland tumors. These findings suggested that TJ proteins are promising targets of cancer therapy. Furthermore, the expression of TJ proteins were involved in the enhancement of the malignancy of carcinoma such as invasion and proliferation. These findings suggested that abnormality of TJ might be involved in tumorigenesis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：タイト結合 JAM-A claudin occludin tricellulin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タイト結合は、上皮細胞間のもっともアピカル側にある細胞間接着装置である。この接着構造が、細胞を相互にシールすることで細胞シートを形成し、体の内外、管腔の内外を境している。同時に、細胞極性の維持に重要な役割を果たす。当初、タイト結合は、単純な静的接着構造と考えられていたが、選択的に細胞間の物質の透過性を制御し再構成される動的な側面も有する。また、アポトーシスや細胞周期の制御に関与し、細胞内外の環境刺激を受容するセンサーやシグナル伝達の足場として機能する。したがって、タイト結合の機能失調は、多彩な細胞機能異常をひき起こし、がんや炎症性疾患などさまざまな疾患の基盤病態である可能性がある。そこで、申請者は、タイト結合が、多様な病態でおきる細胞接着異常を細胞ストレスとして感知し、タイト結合から積極的に細胞内シグナルを発生し、最終的に細胞の形(極性)と運命(増殖・分化・細胞死)を決定するという仮説の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、以下の3点を明らかにすることをめざす。

(1) 細胞環境の異常を感知する内在システムとしてのタイト結合と、タイト結合が関与する多彩なシグナル伝達

(2) タイト結合ストレスで発生するさまざまな細胞機能異常(増殖・分化・細胞死)

(3) レチノイン酸シグナルの異常がひきおこす細胞接着と極性の異常

- ・がんでみられる細胞接着異常

- ・極性の崩壊細胞が示す上皮間葉転換(EMT)中の細胞動態とその動作原理

このように、がんや炎症などのさまざまな疾患でタイト結合の機能異常を解析することで、“タイト結合病”なる新規の疾患概念を提出することをめざす。

3. 研究の方法

(1) ストレスセンサーとしてのタイト結合の機能分析のため、タイト結合関連分子である occludin および tricellulin の機能や病的状態での役割を検討した。

occludin の発現による微絨毛形成の変化を occludin 欠損マウス肝細胞株と野生型マウス肝細胞株を用いて比較検討した。

tricellulin の膵管癌における局在と役割の変化を手術材料の免疫染色と膵癌細胞株を用いて検討した。

(2) 肺腺癌におけるタイト結合関連分子の発現異常と肺癌での役割を検討した。

前癌病変を含めた肺腺癌におけるタイト結合関連分子 claudin の発現を手術材料の免疫染色により検討した。

肺腺癌におけるタイト結合関連分子 JAM-A に関して、手術材料の免疫染色に加え、細胞株を用いて腫瘍形成や発癌への関与、診断マーカーや治療標的としての有用性を評価した。

(3) 肝・胆道系の癌におけるタイト結合関連分子の発現異常と癌での役割を検討した。

肝細胞癌と肝内胆管癌におけるタイト結合関連分子 claudin の発現を手術材料の免疫染色により検討した。

我々は以前、胆管癌の前癌状態から claudin-18 が高発現し、胆管癌のマーカーとなりうることを示した。(Keira, et al., Virchow Arch., 2015)。今回は、胆管癌における claudin-18 の機能を調べるため、ras 変異がないヒト胆管癌細胞株(TKKK)を用いて、claudin-18 の高発現と遊走能、増殖能、造腫瘍能について検討した。

(4) 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連分子の発現異常とその役割を検討した。

子宮頸部腺癌手術材料の免疫染色を行い、浸潤癌、上皮内癌、非腫瘍性頸部腺で、タイト結合関連分子の発現量及び局在の変化を検討した。

子宮頸癌細胞株における claudin-1 の発現調節機構について検討した。

子宮頸癌における複数の受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の発現の意義を評価するために、RTK (EGFR、HER2 および c-Met) の発現プロファイルと臨床病理学的特徴および頸部腺癌患者の予後との相関関係を調べた。

(5) その他の癌におけるタイト結合関連分子の発現異常を検討した。

唾液腺腫瘍におけるタイト結合関連分子 claudin および JAM-A の発現を手術材料の免疫染色により組織型別に検討した。

卵巣癌を治療するための抗癌剤として *Clostridium perfringens* のエンテロトキシン (CPE) の最適条件を決めるため、その標的である claudin-4 の発現調節について検討した。

(6) レチノイン酸代謝酵素チトクローム P450 26A1 の発癌機構の解明のため、P450 26A1 を過剰発現したトランスジェニックマウス作成し、発癌過程への関与に関して検討した。

4. 研究成果

(1) ストレスセンサーとしてのタイト結合の機能分析

occludin は微絨毛関連分子である ezrin のリン酸化を制御することにより微絨毛形成を誘導した。これは細胞膜上に存在しない occludin の C 末側細胞内ドメインのみでも誘導された。このことから、occludin にはシグナル伝達の場合として細胞質内で機能している可能性が考えられた。

手術材料の免疫染色で、tricellulin は低分化膵管癌において核へと局在が変化した。その局在は予後と相関していた。膵癌細胞株において、tricellulin の核局在により MAPK および PKC 経路を介して増殖能および浸潤能が促進された。この増殖能および浸潤能の促進が低分化膵癌の予後の悪化に関与している可能性があると考えられた。

(2) 肺腺癌におけるタイト結合関連分子の発現異常と肺癌での役割

肺腺癌において、claudin-4 および claudin-7 の発現増加が見られ、診断マーカーとなりうると考えられた。claudin-4 は前癌病変と考えられている異型腺腫様過形成からその発現が増加しており、発癌の初期段階から関与している可能性が考えられた。

免疫染色上、JAM A は非腫瘍と比較し、肺異型腺腫様過形成および肺腺癌において段階的に発現が増加していた。肺腺癌細胞株において、JAM-A の発現抑制により、アポトーシス感受性の増加、コロニー形成能および造腫瘍能の低下が見られた。反対に、肺腺癌細胞の JAM-A の発現増加により腫瘍形成が促進された。抗 JAM-A 抗体は効率的に肺腺癌細胞の細胞増殖を低下させ、アポトーシスを引き起こした。以上から、JAM-A は肺腫瘍の有用な診断マーカーになりうること、JAM-A 阻害による新規癌治療の可能性が示唆された。

(3) 肝・胆道系の癌におけるタイト結合関連分子の発現異常と癌での役割

Claudin-4 および claudin-7 は肝細胞癌では発現が見られないのに対し、肝内胆管癌では発現が見られることから、両者を鑑別するマーカーになりうると思われた。

claudin-18 の発現抑制により、増殖能や浸潤能、in vivo での造腫瘍能が減少した。claudin-18 の第 1 細胞外ループに対する特異抗体を作用させると、細胞増殖は有意に低下した。TKKK 細胞シートを用いて、wound healing の過程を観察すると、wound edge に claudin-18 が高発現しており、スクラッチ後 60 分で、ERK1/2 および AKT、pan-PKC のリン酸化が認められた。EGF-R を活性化すると、EGF の濃度依存性に claudin-18 の発現が有意に上昇し、EGFR 活性化阻害剤と

ERK1/2 活性化阻害剤で、claudin-18 の発現上昇が抑制された。以上から、胆管癌における claudin-18 の発癌への関与は EGFR/ERK シグナル伝達の調節を介しており、claudin-18 は治療標的になりうると考えられた。

(4) 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連分子の発現異常とその役割

非腫瘍性頸部腺と比較して、浸潤癌および上皮内癌において claudin-1 および JAM-A の発現レベルが増加し、その局在は細胞膜全体に広がっていた。これらの結果から、claudin-1 および JAM-A は子宮頸部腺癌の潜在的なバイオマーカーであると考えられた。

子宮頸部腺癌細胞株において、claudin-1 の発現はエストロゲンに依存して増加が見られた。調べた子宮頸部腺癌細胞株はすべて、エストロゲンレセプター (ER) は発現しないが、膜結合型エストロゲン受容体である GPR30 を発現していた。手術材料を用いた免疫染色でも claudin-1 と GPR30 の間に正の相関が見られ、両者の発現は予後不良因子であった。このことから、エストロゲン/ GPR30 シグナル伝達および claudin-1 は子宮頸部腺癌治療に有効な可能性があると考えられた。

上皮内腺癌と浸潤性腺癌の 41/53 例 (77.4%) で細胞膜上に単一 RTK (EGFR, HER2 または c-Met) の高発現を示した。浸潤性腺癌の 20/43 例 (46%) で二重または三重 RTK が陽性であった。EGFR 陽性および EGFR および HER2 二重陽性は、リンパ節転移と有意に相関していた。HER2 陽性は腫瘍の大きさと有意に相関していた ($P = 0.029$)。無再発生存期間 (RFS) は、EGFR と HER2 が二重陽性だった患者で有意に短かった。これらから、EGFR および HER2 の共発現が子宮頸部腺癌の予後因子であり、治療標的となりうると考えられた。

(5) その他の癌におけるタイト結合関連分子の発現異常

claudin-1、-4、-7、JAM-A の免疫染色パネルにより、唾液腺腫瘍の組織型を分類可能であり、鑑別診断マーカーになりうると思われた。

卵巣癌細胞株において、CPE に対する毒性は腫瘍の表面に発現している claudin-4 の発現量に依存していた。このことから CPE の到達しやすさがその細胞毒性に重要であると考えられた。

(6) レチノイン酸代謝酵素チトクローム P450 26A1 の発癌機構の解明

P450 26A1 を過剰発現したトランスジェニックマウスは生後 15 カ月まで正常に成長したため、化学発癌モデルによる検討を行った。7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) による皮膚発癌モデルでは、投与後 7 週間以内に乳頭腫が形成され、その後扁平上皮癌が形成された。以上から、CYP26A1 発現は DMBA による皮膚発癌を促進すると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- [1] Murata M, Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Kawada Y, Yamamoto A, Ono Y, Hiratsuka Y, Kojima T, Sawada N. Occludin induces microvillus formation via phosphorylation of ezrin in a mouse hepatic cell line. *Exp Cell Res*. 366:172-180, 2018.
- [2] Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Murata M, Sawada N. Retinoic acid-metabolizing enzyme cytochrome P450 26A1 promotes skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Oncol Lett*. 15:9987-9993, 2018.
- [3] Aoyama T, Takasawa A, Murata M, Osanai M, Takano K, Hasagawa T, Sawada N. Immunoreactivity patterns of tight junction proteins are useful for differential diagnosis of human salivary gland tumors. *Med Mol Morphol*. Epub ahead of print,

2018.

- [4] Tanaka S, Aoyama T, Ogawa M, Takasawa A, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N. Cytotoxicity of Clostridium perfringens enterotoxin depends on the conditions of claudin-4 in ovarian carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 371:278-286, 2018.
- [5] Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N. Estrogen/GPR30 Signaling Contributes to the Malignant Potentials of ER-Negative Cervical Adenocarcinoma via Regulation of Claudin-1 Expression. *Neoplasia.* 20:1083-1093, 2018.
- [6] Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch.* 2017, 469:55-67. Review.
- [7] Takasawa K, Takasawa A, Osanai M, Aoyama T, Ono Y, Kono T, Hirohashi Y, Murata M, Sawada N. Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer. *Cancer Lett.* 32:290-307, 2017.
- [8] Magara K, Takasawa A, Osanai M, Ota M, Tagami Y, Ono Y, Takasawa K, Murata M, Hirohashi Y, Miyajima M, Yamada G, Hasegawa T, Sawada N. Elevated expression of JAM-A promotes neoplastic properties of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci.* 108:2306-2314, 2017.
- [9] Ueda A, Takasawa A, Akimoto T, Takasawa K, Aoyama T, Ino Y, Nojima M, Ono Y, Murata M, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. Prognostic significance of the co-expression of EGFR and HER2 in adenocarcinoma of the uterine cervix. *PLoS One.* 2017 Aug 31;12(8):e0184123. doi: 10.1371/journal.pone.0184123. eCollection 2017.
- [10] Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins, claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. *Histol Histopathol.* 31:921-931, 2016
- [11] Yamada G, Murata M, Takasawa A, Nojima M, Mori Y, Sawada N, Takahashi H. Increased expressions of claudin 4 and 7 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Med Mol Morphol.* 49:163-169, 2016.
- [12] Ono Y, Hiratsuka Y, Murata M, Takasawa A, Fukuda R, Nojima M, Tanaka S, Osanai M, Hirata K, Sawada N. Claudins-4 and -7 might be valuable markers to distinguish hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma. *Virchows Arch.* 469:417-426, 2016.
- [13] 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.* 6:33582, 2016.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名： 村田 雅樹
ローマ字氏名： MURATA, MASAKI
所属研究機関名： 札幌医科大学
部局名： 医学部 病理学第二講座
職名： 講師
研究者番号（8桁）： 10404592

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 高澤 久美
ローマ字氏名： TAKASAWA, KUMI

(2) 研究協力者

研究協力者氏名： 秋元 太志
ローマ字氏名： AKIMOTO TAISHI

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。