

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08699

研究課題名（和文）過剰な細胞間接着シグナルによるがんの悪性形質促進機構

研究課題名（英文）Promotion of cancer progression by aberrant cell adhesion signaling

研究代表者

千葉 英樹 (Chiba, Hideki)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00295346

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）：タイト結合分子クローディン-6 (CLDN6)による細胞接着を起点とするシグナルが、レチノイン酸受容体 (RARgamma)とエストロゲン受容体 (ERalpha)のセリンリン酸化に至り転写活性を制御する「細胞接着-核内受容体シグナル伝達経路」を発見した。また子宮体癌では、CLDN6の異所性発現が強力かつ独立した予後不良因子となることを明らかにした。さらに分子生物学的アプローチにより、癌細胞がCLDN6-ERalphaシグナルを乗っ取ることで悪性形質が増強されることを突き止めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

組織構築に必須である細胞接着分子は、細胞内シグナルを活性化することで多様な生理・病理現象を制御するが、その分子機構は不明であった。我々はCLDN6による細胞接着を起点とするシグナルが核内受容体のリン酸化に帰結し転写活性を制御することを見出した。このコンセンサスリン酸化配列はヒト核内受容体48種類中14種類で保存されており、生物学的重要性が強く示唆された。さらに我々は、異常なCLDN6-ERalphaシグナルは子宮体癌の悪性形質を増強することを見出した。今回の研究成果から、「細胞接着シグナルが転写因子の活性を制御することによってがんの進行を促進する」新たな分子機構の存在が明らかになった。

研究成果の概要（英文）： We have identified that the cell adhesion signal initiated by the tight-junction protein claudin-6 (CLDN6) regulates nuclear receptor activity. The CLDN6 signaling targeted the AKT phosphorylation sites in the retinoic acid receptor gamma (RARgamma) and the estrogen receptor alpha (ERalpha) and stimulated their activity.

We also demonstrated that high CLDN6 expression promotes endometrial cancer progression and represents the poor prognostic marker. The second extracellular domain and Y196/200 were required to recruit and activate Src-family kinases (SFks) and to stimulate malignant phenotypes. Importantly, we found that the CLDN6/SFK signaling directs to the ERalpha and ligand-independently activate target genes in endometrial cancer cells, resulting in cancer progression.

研究分野：病理学

キーワード：細胞接着 核内受容体 エストロゲン受容体 シグナル伝達 がん 子宮体癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞間接着分子は細胞同士を繋ぎ止めるのみではなく、シグナル伝達のハブとしても機能する。細胞間接着シグナルは、細胞分化・増殖・生存・遊走・極性など種々の細胞機能を制御することで多彩な生理・病理現象を司ると考えられている。しかしながら、細胞間接着シグナルの実態やその分子メカニズムは長い間不明であった。このような動向のなか我々は「細胞間接着分子クローディン-6 (CLDN6)と核内受容体スーパーファミリーに属するレチノイン酸受容体 (RAR γ)によって惹起される細胞機能が極めて類似している」という自らの研究成果(Chiba et al., *J Cell Biol*, 1997; Chiba et al., *Mol Cell Biol*, 1997; Chiba et al., *Exp Cell Res*, 2003; Chiba et al., *J Cell Biol*, 2006; Chiba et al., *Biochim Biophys Acta*, 2008; Sugimoto et al., *PLoS One* 2013)を端緒とし、「CLDN6による細胞接着シグナルが核内受容体に帰着する新規シグナル伝達経路」が存在すると考えるに至った。

(2) 一方 CLDN6 は多くの胚細胞腫瘍や一部の胃腺がん・肺腺がん・卵巣がん・子宮体がんや異所性発現することが知られているが、その臨床病理学的意義は明らかではない。また卵巣がんや子宮体がんでは、確立した予後予測バイオマーカーや分子治療標的はない。そこで我々は、「過剰な CLDN6 シグナルががんの悪性形質を増強する」という仮説を立て研究を進めた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、CLDN6 シグナルの全貌、すなわち CLDN6 による細胞間接着を起点とするシグナルが核内受容体の活性化に至る「CLDN6-核内受容体シグナル伝達経路」を解明することを目的とした。まず「CLDN6 シグナルに必須のドメインやアミノ酸配列」、「CLDN6 によって活性化される細胞内シグナル」を同定した。次に、CLDN6 による細胞接着シグナルが核内受容体に帰着することを証明した。さらに CLDN6 シグナルの受け手となる核内受容体の特定部位がどのような生物学的意義を有し、48 種類あるヒト核内受容体メンバーでどの程度保存されているかを明らかにした。

(2) 子宮体がんにおける CLDN6 異所性発現の臨床病理学的意義を明らかにすることを目的とした。また分子生物学的アプローチにより、子宮体がんでは「がん細胞が CLDN6 エストゲン受容体 α (ER α)シグナルを乗っ取り、悪性形質が増強される」ことを証明した。

3. 研究の方法

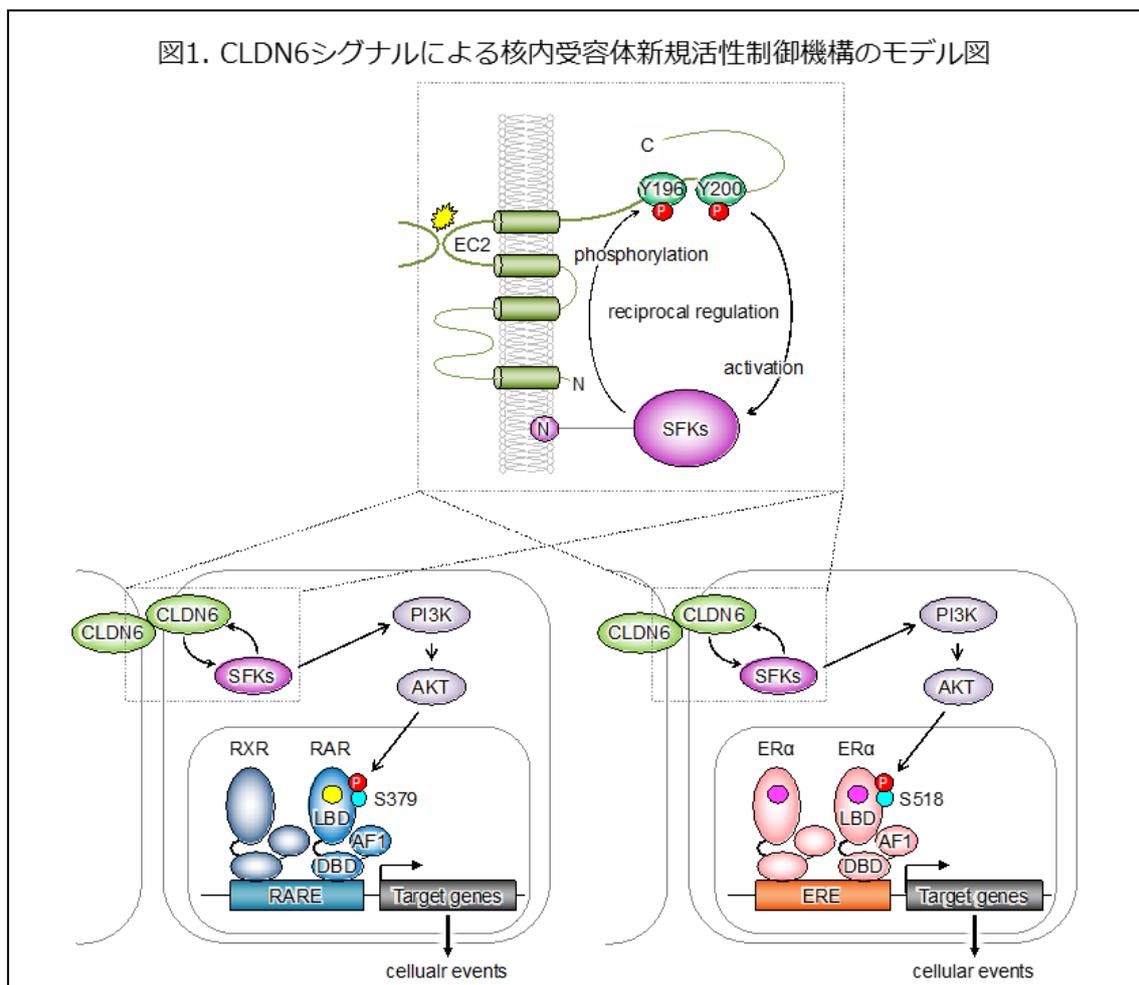
- (1) 「CLDN6-核内受容体シグナル伝達経路の同定」では、以下の項目について検討した。
- ① CLDN6 を導入した F9 幹細胞では上皮分化が誘導される (Sugimoto et al., *PLoS One* 2013)。そこで、CLDN6 の第 1 細胞外ドメイン欠損体 (F9:iCldn6 Δ EC1-Flag)、第 2 細胞外ドメイン欠損体 (F9:iCldn6 Δ EC2-Flag)、全 C 末細胞内ドメイン欠損体 (F9:HA-Cldn6 Δ C)、遠位 1/2C 末細胞内ドメイン欠損体 (F9:HA-Cldn6 Δ C1/2)を発現する F9 細胞株を樹立し、位相差顕微鏡による観察や免疫染色及び Western blotting 解析にて、CLDN6 シグナルに必須のドメインを同定した。また EC2 対合阻害剤である C 末 *Clostridium perfringens* enterotoxin (C-CPE) を用い、CLDN6 シグナルにおける EC2 の重要性を検証した。
 - ② CLDN6 の C 末細胞内ドメインのうち脊椎動物で保存された 4 つのチロシン残基に着目し、アラニン置換体を発現する F9 細胞株 (F9:Cldn6Y196A, F9:Cldn6Y200A, F9:Cldn6Y213A, F9:Cldn6Y218A)を樹立し、①と同様に解析した。
 - ③ CLDN6 のシグナル活性には Y196/200 が必須であることが分かったことから、これらのチロシン残基がリン酸化されるかを検証した。
 - ④ チロシンキナーゼのうち、カドヘリンやインテグリン等の細胞接着分子を活性化することが知られている Src ファミリーキナーゼ (SFKs)に着目した。野生型及び変異 CLDN6 を発現する種々の F9 幹細胞や胚様体を用い、免疫染色や免疫沈降で CLDN6 と活性化 SFKs の相互作用を調べた。また様々な SFK 阻害剤や PI3K 阻害剤及び AKT 阻害剤を用いることで、CLDN6 シグナルにおける SFK/PI3K/AKT の関与を明らかにした。
 - ⑤ CLDN6 シグナルがレチノイド受容体に帰結するか否かを明らかにするために、以前作製した F9:R α RA γ :Rarg $^{-/-}$ 細胞株に CLDN6 を導入し、その性状を解析した。
 - ⑥ HEK293T 細胞に RXR α -RAR γ 及び CLDN6 を導入し、免疫沈降にて AKT と RXR α -RAR α の相互作用を検証した。
 - ⑦ F9:R α RA γ :Rarg $^{-/-}$:Cldn6 細胞株に RXR α -RAR γ , RXR α -RAR γ Δ N, RXR α -RAR γ Δ C を導入するレスキュー実験を行い、上皮分化を評価した。
 - ⑧ マウス RAR γ を GPS3.0 プログラムで検索したところ、5 か所の AKT コンセンサスリン酸化候補部位が検出された。そこでこれらのセリン/スレオニン残基をアラニン残基に置換した変異 RAR γ (S192A, S360A, S379A, T388A, A426/S427A) の発現を誘導できる F9:R α RA γ :Rarg $^{-/-}$:Cldn6 細胞株を樹立し、その性状を解析した。また恒常的リン酸化体 (S360E, S379E)の発現を誘導できる F9:R α RA γ :Rarg $^{-/-}$:Cldn6 細胞株を作製し、同様に性状を解析した。
 - ⑨ クロマチン免疫沈降法にて、CLDN6 シグナルや RAR γ -S379 恒常的リン酸化が核内受容体 コリプレッサー (NCOR)の解離に関わるかを調べた。
 - ⑩ CLDN6 シグナルや RAR γ -S379 恒常的リン酸化がリガンド (全トランスレチノイン酸;

- ATRA)の作用に及ぼす影響を調べた。この際、内因性脂溶性リガンドの影響を排除するために、種々の樹立 F9 細胞株をチャコール処置した FBS を用いて培養した。
- ⑪ RAR γ の AKT コンセンサスリン酸化部位が種を超えて保存されているかを検討した。またこの新規リン酸化部位がヒト核内受容体 48 種類中何種類で保存されているかを調べた。
 - ⑫ ヒト乳癌細胞株 MCF-7 を用いて、CLDN6 シグナルが ER α の S518 に帰結することを検証した。
 - ⑬ PyMOL 解析にて、立体構造における RAR γ -S379 や ER α -S518 の意義を考察した。

- (2) 「CLDN6 高発現による子宮体がんの悪性形質増強機構」では、以下の研究項目を遂行した。
- ① 腸骨リンパ節法を用い、ヒト CLDN6 の C 末ペプチドに対するモノクローナル抗体を作製し、ELISA や Western blotting 及び免疫染色にてその特異性を評価した。
 - ② 子宮体癌 171 例の手術標本を対象に抗ヒト CLDN6 モノクローナル抗体で免疫染色し定量化することで、生存率や各種臨床病的因子との関連を統計学的に調べた。
 - ③ CLDN6 を過剰発現させたヒト子宮体癌細胞株 Ishikawa (Ishikawa:CLDN6) を樹立し、細胞増殖・生存・遊走能について親株と比較した。またマウスへの皮下移植実験によって、腫瘍重量や腫瘍周囲被膜への浸潤能を調べた、子宮体癌における CLDN6 の機能獲得性を評価した。
 - ④ 変異体や EC2 対合阻害剤 C-CPE を用いることで、CLDN6 の EC2 や Y196/200 が子宮体癌における SFK 活性化や腫瘍進展に必須であるかを検討した。また SFK 阻害剤、PI3K 阻害剤や AKT 阻害剤および SGK (serum- and glucocorticoid-regulated kinase) 阻害剤を用いることで、CLDN6 シグナルにおけるこれらのキナーゼの関与を明らかにした。
 - ⑤ Ishikawa:ESR1^{-/-}及び Ishikawa:CLDN6-ESR1^{-/-}細胞株を樹立し、性状を解析した。また ER α 非発現ヒト子宮体癌細胞株である HEC-1A 細胞株に CLDN6 あるいは ER α 及び両方を導入し、細胞増殖・生存・遊走能について親株と比較した。これらの実験により、CLDN6 シグナルが ER α に帰結するかを検討した。
 - ⑥ AKT 及び SGK と ER α との相互作用を免疫沈降法で調べた。また Ishikawa:CLDN6-ESR1^{-/-}細胞株に野生型 ESR1 または ESR1S518A を導入し、その性状を解析した。

4. 研究成果

- (1) 今回同定した「CLDN6-核内受容体シグナル伝達経路」の概略モデル図を図 1 に示した。同様な細胞接着-転写因子連関が多彩な細胞機能を制御していると考えられた。



- ① 上皮分化誘導は F9:*Cldn6*ΔEC1-Flag や F9:*HA-Cldn6*ΔC1/2 で認められたが、F9:*Cldn6*ΔEC2-Flag 及び F9:*HA-Cldn6*ΔC ではみられず、CLDN6 シグナルには EC2 と C 末細胞内ドメインの前半 1/2 が必要であることが示された。また EC2 対合阻害剤である C-CPE を用いた検討により、CLDN6 シグナルにおける EC2 の重要性を確かめられた。
- ② 上皮分化は F9:*Cldn6Y213A* と F9:*Cldn6Y218A* で誘導されたが、F9:*Cldn6Y196A* 及び F9:*Cldn6Y200A* では認められなかった。よって、C 末細胞内ドメインの前半 1/2 に位置する Y196/200 が CLDN6 のシグナル活性に必須であることが明らかになった。
- ③ 免疫沈降法により、CLDN6 は Y196 及び Y200 でチロシンリン酸化されることを明らかにした。また C-CPE を用いた検討により、CLDN6 のチロシンリン酸化には EC2 の対合が必要であることを示した。
- ④ F9 幹細胞や胚様体の上皮分化領域では、CLDN6 と活性化 SFKs が共局在することが分かった。また CLDN6 は EC2 及び Y196/200 依存性に SFKs と相互作用し SFK 活性を亢進させることを見出した。さらに阻害剤を用いた検討により、CLDN6 シグナルは SFK/PI3K/AKT 経路を活性化することを明らかにした。
- ⑤ CLDN6 を導入した F9:*Rxra*^{-/-}:*Rarg*^{-/-}細胞株では SFK の活性化はみられた一方、上皮分化は全く認められなかった。この結果から、CLDN6 シグナルがレチノイド受容体に帰結することが明らかになった。
- ⑥ 免疫沈降にて HEK293T 細胞における AKT と RXRα-RARα の相互作用を証明した。
- ⑦ RXRα-RARγ または RXRα-RARγΔN を導入した F9:*Rxra*^{-/-}:*Rarg*^{-/-}:*Cldn6* 細胞株では上皮分化が認められたが、RXRα-RARγΔC 導入細胞では上皮分化がレスキューされなかった。よって CLDN6 シグナルは RARγ の Hinge 領域、LBD (Ligand binding domain)/AF1 (Activation function 2) または F 領域のいずれかにリンクすることが示された。
- ⑧ ⑦ で同定された RARγ 領域には、5 か所の AKT コンセンサスリン酸化候補部位が検出された。アラニン及びグルタミン酸置換体の性状を解析した結果、CLDN6 シグナルは RARγ の S379 を標的とすることを突き止めた。
- ⑨ 標的遺伝子 (*Rarb*, *Hnf4a*, *Cldn6*) のレチノイン酸応答配列への NCoR 結合は CLDN6 または RARγ-S379E 導入群では減弱した。一方 RARγ-S379 非リン酸化体 (S379A) 導入群では、NCoR 結合が増加した。以上の結果から、CLDN6 シグナルや RARγ-S379 恒常的リン酸化はコリプレッサーを解離し、RARγ の活性を亢進すると考えられた。
- ⑩ CLDN6 シグナルや RARγ-S379 恒常的リン酸化は生理的濃度 (1 nM) の ATRA の作用を相乗的に高め、上皮分化を誘導することが明らかになった。
- ⑪ RARγ の AKT 依存性の新規リン酸化部位は種を超えて保存されているのみならず、ヒト核内受容体 48 種類中 14 種類で保存されており、その生物学的重要性が示唆された。
- ⑫ CLDN6 シグナルが ERα の S518 に帰結しその活性を制御することを明らかにした。
- ⑬ RARγ-S379 や ERα-S518 は各々立体構造上 L268 及び L384 と接しており、リン酸化により反発力が弱まると D269 及び E385 によるリガンド保持力が高まると考えられた。

(2) 「CLDN6 高発現による子宮体がんの悪性形質増強機構」では、以下の研究成果を得た。

- ① ELISA による一次スクリーニングにて、384 種のハイブリドーマから 24 クローンを選択した。Western blot による二次スクリーニングでは、20/24 クローンはヒト CLDN6 と反応した。ヒト CLDN1/4/5/6/9 (抗原ペプチドに相当するアミノ酸配列が比較的保存されている) を過剰発現した HEK293T 細胞をホルマリン固定・パラフィン包埋したセルブロックを免疫染色した結果、CLDN6 を特異的に認識するモノクローナル抗体 (クローン#15) の開発に成功した。
- ② 子宮体癌症例のうち CLDN6 高発現群は約 6% を占めた。また CLDN6 高発現症例においても CLDN6 陽性・陰性細胞が混在し、CLDN6 発現に不均一性が認められた。CLDN6 高発現群の 5 年生存率は約 30% であり、低発現群の 90% に比べ著しく低かった (図 2)。また臨床病理学的因子のうち臨床病期、組織グレード、脈管侵襲、リンパ節転移、遠隔転移が CLDN6 高発現と有意な相関を示した。さらに多変量解析の結果、CLDN6 高発現が独立した予後不良因子 (Hazard ratio=3.50, p=0.014) であることを明らかにした。
- ③ Ishikawa:*CLDN6* では CLDN6 が細胞間接着領域に認められ、細胞増殖能や遊走能が親株に比べ顕著に亢進していた。また Ishikawa:*CLDN6* 移植腫瘍では親株に比べて腫瘍重量が有意に増加しており (図 3)、腫瘍周囲被膜への浸潤が明らかであった。
- ④ Ishikawa:*CLDN6* では活性化 SFK が CLDN6 と共局在していた (図 4A)。また SFK 活性化や CLDN6/SFK 相互作用及び CLDN6 チロシンリン酸化は親株に比べ Ishikawa:*CLDN6* で顕著に検出された一方、Ishikawa:*CLDN6Y196A* や Ishikawa:*CLDN6Y196A* 及び EC2 対合阻害剤 C-CPE で処理した Ishikawa:*CLDN6* 細胞では減少していた (図 4BC)。さらに細胞株の悪性形質を比較することにより、CLDN6 シグナルは EC2 及び Y196/200 依存性に SFKs を活性化させ、子宮体癌の進展を促進することが明らかになった。また CLDN6/SFK シグナルは PI3K を介して AKT 及び SGK を活性化することを見出した。
- ⑤ Ishikawa:*ESR1*^{-/-} 及び Ishikawa:*CLDN6:ESR1*^{-/-} 細胞株の性状を比較した結果、CLDN6 シグナルは ERα に帰結することが明らかになった。この結論は、ERα 非発現ヒト子宮体癌細胞株である HEC-1A 細胞株に CLDN6 あるいは ERα 及び両方を導入し性状解析した結果からも支持

された。

⑥ AKT及びSGKがER α と相互作用することを免疫沈降法で証明した。またCLDN6シグナルがER α のS518に帰結することで標的遺伝子の発現を亢進させ、子宮体癌の悪性形質を促進することを突き止めた(図5)。

これらの結果から、細胞接着シグナルが転写因子活性を制御することによりがんの進展を促進する可能性が示された。

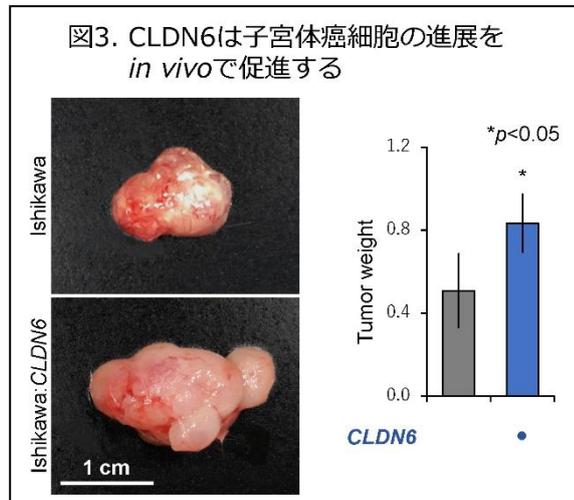
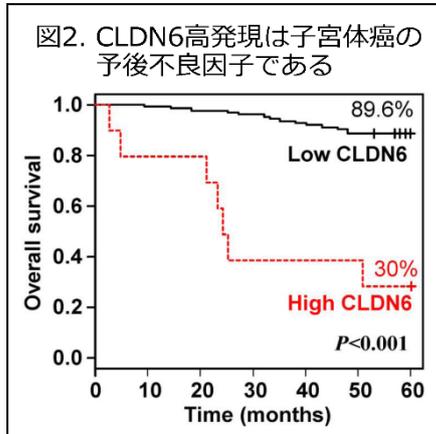


図4. 子宮体癌細胞ではCLDN6シグナルがEC2及びY196/200依存性にSFKをリクルートし活性化する

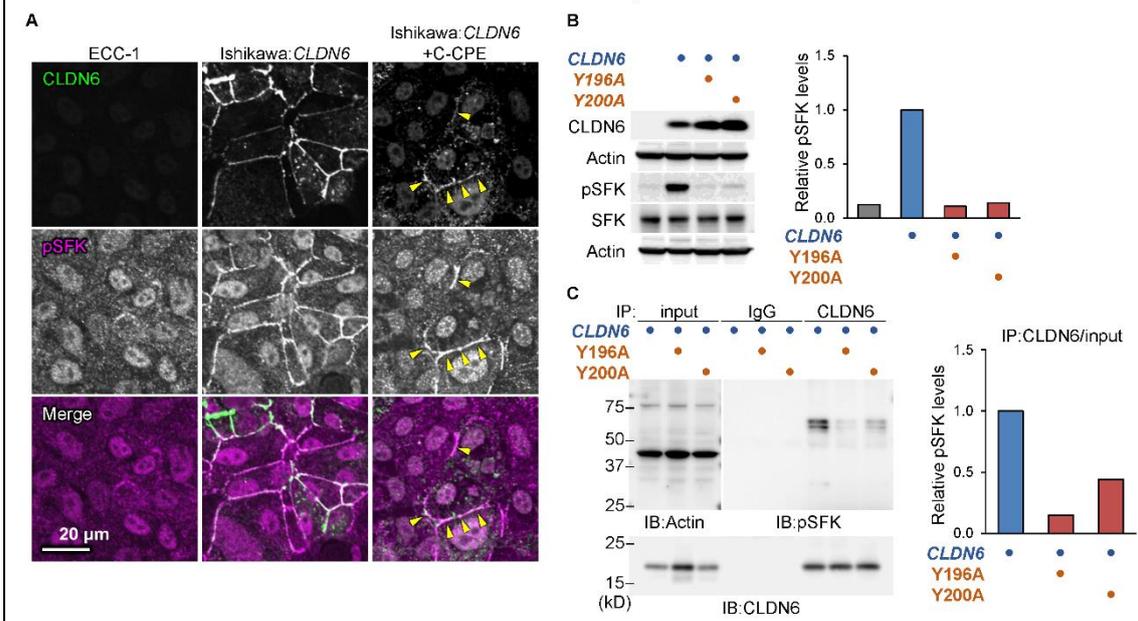
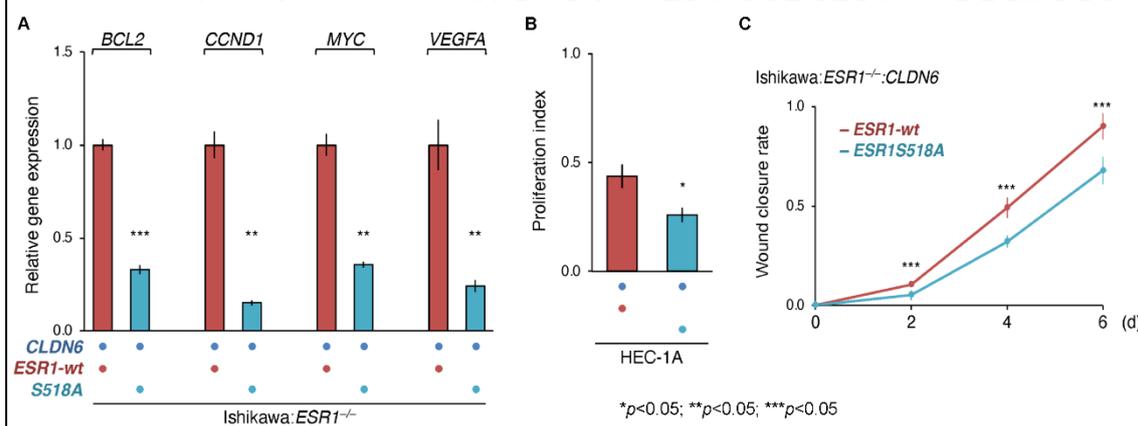


図5. CLDN6シグナルはER α -S518に帰結することで標的遺伝子発現を亢進し子宮体癌を増悪させる



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugimoto Kotaro, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Endo Chihiro, Tanaka Satoshi, Sawada Norimasa, Watabe Tetsuya, Higashi Tomohito, Chiba Hideki	4. 巻 116
2. 論文標題 Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24600 ~ 24609
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1913346116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小島学、杉本幸太郎、田中瑞子、柏木維人、齋藤明、富川直樹、千葉英樹
2. 発表標題 タイト結合分子クローニン-6の発現は子宮内膜癌の予後不良因子である
3. 学会等名 第106回日本病理学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 杉本幸太郎、小島学、田中瑞子、柏木維人、富川直樹、千葉英樹
2. 発表標題 タイト結合分子クローニン-6接着シグナルは子宮内膜癌の悪性形質を増強する
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kotaro Sugimoto, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Korehito Kashiwagi, Tomohito Higashi, Hideki Chiba
2. 発表標題 Mutual activation of Claudin-6 and Src family kinases triggers epithelial differentiation via RAR phosphorylation
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 5st and JSCB 70th（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 杉本幸太郎, 富川直樹, 柏木惟人, 小島学, 村上祐子, 田中瑞子, 東智仁, 千葉英樹
2. 発表標題 細胞接着シグナルによる正常細胞機能とがん悪性形質の新規制御機構
3. 学会等名 第107回日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 千葉英樹
2. 発表標題 ラットモノクローナル抗体の樹立と有用性 - 子宮体癌予後予測と悪性中皮腫の新規マーカーを例に -
3. 学会等名 新技術説明会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 子宮体癌患者の予後予測バイオマーカー
2. 発表標題 子宮体癌患者の予後予測バイオマーカー
3. 学会等名 ファーマラボEXPO
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本幸太郎, 東淳子, 東智仁, 千葉英樹
2. 発表標題 タイト結合分子クローディングに対するモノクローナル抗体の樹立とその応用
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 千葉英樹
2. 発表標題 ラットモノクローナル抗体の樹立と有用性
3. 学会等名 第5回DSANJ Bio Conference'20 Open
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 子宮体癌患者の予後予測バイオマーカー	発明者 千葉英樹, 杉本幸太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/12503	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

公立大学法人 福島県立医科大学基礎病理学講座 https://www.fmu.ac.jp/home/p2/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	杉本 幸太郎 (Sugimoto Kotaro) (40791009)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	柏木 維人 (Kashiwagi Korehito) (50722451)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	齋藤 明 (Saito Akira) (70791010)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	