

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03453

研究課題名(和文)タイトジャンクションは、腫瘍形成を如何にオーガナイズするか？

研究課題名(英文)How does tumor formation occur in T-cell junctions?

研究代表者

田村 淳(Tamura, Atsushi)

帝京大学・医学部・准教授

研究者番号：00362525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜貫通タンパク質であるクローディン(Cldn)を中心に構築されるタイトジャンクション(TJ)は、胃の表面の上皮細胞間に存在し、胃酸の粘膜下への漏出を防ぐ重要なバリア構造である。胃では、胃型Cldn18.2がTJの構築に重要で、KOマウスにおけるその欠損は、若齢では胃炎に、加齢にともない胃腫瘍の発生につながる。申請者らは、本マウスの解析により、ヒトの胃がんでも、Cldn18.2の減少と、その結果として生じる幹細胞性の亢進が、胃がん発生の過程として重要である可能性を示唆した。本研究では、類似の所見として、TJ関連COBL変異マウスでのバリア障害と胃炎についても解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃がんの多くは、ヘリコバクターピロリ菌の感染と、ピロリ菌により産生されるCagA因子およびその下流シグナルによる細胞増殖や細胞極性の異常化が重要であると考えられている。クローディン欠損が、ピロリ菌感染胃炎と類似の病態を示すことから、胃がんの発生に、タイトジャンクションを介する過程が非常に重要である可能性が示唆された。今後、胃がんをはじめ、他種のがんにおいても、治療標的としてのCldnの可能性の検討が期待される。

研究成果の概要(英文)：Tight junctions (TJs), built with the cell membrane protein called claudin (Cldn), are crucial barrier structures located between cells on the epithelial sheets of the stomach, preventing the leakage of gastric acid into the submucosa. In the stomach, gastric-type Cldn18.2 is major Cldn for TJ formation, and its deficiency in knockout (KO) mice leads to gastritis in young age and the development of gastric tumors with aging. Our results suggested that the decrease in Cldn18.2 and the consequent increase in stemness may be important in the process of gastric cancer development, based on the analysis of these mice. In this study, we further analyzed the barrier impairment and gastric inflammation in TJ-associated COBL mutant mice as similar findings.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クローディン タイトジャンクション 胃炎 胃がん 幹細胞 invasive gland

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞間接着装置タイトジャンクション (Tight junction: TJ) は、膜貫通タンパク質クローディン(Cldn)分子が、鎖のように連なってできたストランド構造が、上皮細胞の頭頂部周囲を連続して取り囲み、細胞どうしの接着と、細胞間バリア、をつかさどるタンパク質の重合構造である。血管内皮細胞を含む、全身すべての上皮細胞間に存在して、唯一の機械的バリアをつくる構造と言える。バリア機能をつくる細胞間接着構造は TJ のみなので、多くの TJ 研究は、細胞間バリアに焦点を当てて進められている。

こうした中で申請者は、細胞間バリア分子 Cldn の欠損マウスであるにも関わらず、TJ-バリアの異常の視点のみでは理解が困難な現象を、複数観察してきた。その1つが、胃型 Cldn18 欠損マウスに生じる胃腫瘍である。本マウスは、クローディン(Cldn)分子が、組織の形態形成や代謝機能など、多様で重要な生体機能に直接・間接に関わる事実を示す。

本申請では、Cldn 分子異常がもたらす腫瘍に焦点を当て、『タイトジャンクションは、腫瘍形成を如何にオーガナイズするか?』を核心となる問い、として解析を進める。

### 2. 研究の目的

タイトジャンクション (TJ) の最も顕著な機能は、細胞間のバリア機能である。しかし最近の解析は、TJ が、バリア機能にとどまらず、多様な病態を制御する生体機能のオーガナイザーとしても機能することを示すことを示唆する。Cldn は、27 種類のメンバーからなる大きな遺伝子・タンパク質ファミリーを形成する。Cldn はメンバーにより細胞間につくるバリアの特徴が異なる。例えば、Cldn2 や Cldn15 は、細胞間にカチオン選択的なチャネル活性を形成する。一方、Cldn1 や Cldn3 など、多くの Cldn はイオンや水に対する細胞間バリアを形成する。

本研究では、胃における主要な Cldn である胃型 Cldn18.2 を対象とした研究である。胃型 Cldn18.2 は、重合して TJ を構築することで胃酸に対するバリアを形成し、Cldn18.2 が欠失すると、胃酸が粘膜下に漏出し、マウス若齢期に急性胃炎を生じる。胃型 Cldn18.2KO マウスでは、その後、慢性胃炎に移行するが、通常は急性炎症でのみ主に観察される好中球も同時に多く観察される慢性活動性胃炎の病態を示す。興味深いことは、こうした慢性活動性胃炎の病態は、胃がんの素地となる *H. pylori* 感染性胃炎で一般的に観察されることが知られている。ヒトの *H. pylori* 菌感染胃炎と、胃型 Cldn18.2 の病態に関して、何らかの共通機構の存在を示唆する。マウスはその後、胃に腫瘍を生じてくるが、転移や浸潤などの悪性化は観察されない。

本申請研究では、腫瘍形成オーガナイザーとしての TJ 機能について、胃型 Cldn18.2 欠損マウスを標的に生じる胃腫瘍を解析することで、明らかにする。本解析は、発生・構造・機能にも関わる一般的な TJ-Cldn 機能の理解にもつながるものである。

なお、*H. pylori* 感染のないヒトの慢性炎症では腫瘍形成まで進まない。また、がん原因子と考えられている *H. pylori* の毒素 CagA のみではがんの発症率は高くない。また、マウスにおいて胃型 Cldn18.2 の欠損で生じる腫瘍性の病変は、複数あるマウスの胃病態モデルの中でも、非常に進行が早い。こうしたことから、Cldn18.2 の欠損は、何らかの特異的な機序で胃腫瘍・胃がんの病態に寄与する可能性と、*H. pylori* 感染胃がんの病態促進の基盤である可能性を示唆する。実際、ヒトの胃がんや胃炎では Cldn18.2 の発現低下が一般に認められる。一方、抗 Cldn18.2 抗体の抗がん製剤が有効で治験に入っているが作用機序は十分に理解されていない。Cldn18.2 以外の Cldn 欠損マウスでも腫瘍形成の報告が続き、Cldn 異常と腫瘍発生の詳細なメカニズム解析を含む因果関係解析など、詳細な検討が望まれる。こうした複雑な背景が本申請研究のモチベーションになった。大枠の表現型解析の済んだ本マウスを丹念に精査することで、これらの問題を

明らかにし、医学貢献につなげたい。

### 3. 研究の方法

Cldn18には、2種のスプライシング型が知られ、胃のみで主に発現するCldn18.2と、肺のみで主に発現するCldn18.1が存在する。本申請研究では、そのため、胃のみで主に発現するCldn18.2遺伝子欠損マウスを用いた解析を進めた。

胃型Cldn18.2マウスについては、すでにこれまで大枠の解析がすすんでいたため、本解析では、さらに、組織学的解析、遺伝子発現の解析、など細胞生物学的、形態学的、分子生物学的および生理学的な手法を用いて詳細な解析を進めた。

### 4. 研究成果

(1) 申請者らは、本胃型Cldn18.2マウスの胃では、一見基底膜を超えた、がんの浸潤様に見える腺構造が見られることを見出した。本構造は、一般に、invasive glandと呼ばれ、その名の由来の通り、がんの浸潤組織と考えられる場合がある。申請者らは、複数切片の観察から、浸潤を反映するか、あるいは、発生当初より基底膜を超えた粘膜下に腺状構造を持つかを検討した。胃型Cldn18.2KOマウスでは、基底膜を浸潤する像を見出すことができず、発生時から見られる構造と考えられた。

(2) 胃型Cldn18.2KOマウスでは、週齢にともない、壁細胞や主細胞の数が減少するOxyntic atrophic gastritisを示す。特に、60週齢以降では、数個/腺構造以下に低下する。しかし、このような状態でも、H2ブロッカーを用いて、胃酸分泌を停止すると、組織の炎症マーカーの発現が著減した。このことから、数は減少するものの、胃炎発症に対する胃酸の影響は、マウスが高齢になっても継続するものと考えられた。

(3) 高齢になる中で、胃型Cldn18.2KOマウス腫瘍領域における幹細胞性の亢進は特徴的であった。特に、腫瘍特異的なマーカーとして知られるMMP7は、マウスの寿命に近い100週齢で、劇的に発現の上昇が認められる。また、60週齢では、幹細胞マーカーであるASCL2の上昇が認められる。これらの結果は、リンパ球の出現が顕性化する40週齢以降、慢性胃炎として記載される状態が継続しても、病態としては安定化することなく徐々に変化・進行し、ある段階で次の慢性炎症の段階に移行すること、最終的には、悪性化に向かう可能性が示唆された。

上記のことから、(2)(3)の結果から、胃酸が胃炎・胃腫瘍 胃がん進展への重要因子となる可能性が示唆されるが、酸がない状態での、腫瘍や幹細胞化の進展の有無については、今後さらに検討が必要である。

(4) 胃型Cldn18.2マウス胃炎では、遺伝子KOマウスのゲノム構造上、胃型プロモーターが肺型Cldn18.1の第1エクソン発現に影響し、肺型Cldn18.1が代償的に発現している。しかし、肺型Cldn18.1の発現は、胃型Cldn18.2の欠損を代償できず、そのため、胃炎や胃腫瘍の発生が見られる。先行する論文では、肺における肺型Cldn18.1の欠損は、YAPシグナルの核移行・活性化を招き、結果として、肺腫瘍を生じるとの報告がある(Zhou et al., J Clin Invest, 2018)。申請者らのマウスの解析から、胃型Cldn18.2KOマウスにおける胃腫瘍の形成に関しては、YAPシグナルに加えたシグナル機構の存在も示唆される。

(5) TJ関連タンパク質COBLの遺伝子改変マウスの解析を進めた。COBLは、TJ-AJ領域の細胞間接着装置の裏打ちタンパク質で、微小管結合性かつアクチン伸長の核となるタンパク質である。本COBL-KOマウスでは、細胞間の透過性が上昇し、胃型Cldn18.2と同様に、胃炎を呈した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Shogo, Yano Tomoki, Namba Toshinori, Konishi Satoshi, Takagishi Maki, Herawati Elisa, Nishida Tomoki, Imoto Yasuo, Ishihara Shuji, Takahashi Masahide, Furuta Ken'ya, Oiwa Kazuhiro, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 220
2. 論文標題 Planar cell polarity induces local microtubule bundling for coordinated ciliary beating	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202010034
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202010034	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Ozono Yoshiyuki, Tamura Atsushi, Nakayama Shogo, Herawati Elisa, Hanada Yukiko, Ohata Kazuya, Takagishi Maki, Takahashi Masahide, Imai Takao, Ohta Yumi, Oshima Kazuo, Sato Takashi, Inohara Hidenori, Tsukita Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Daple deficiency causes hearing loss in adult mice by inducing defects in cochlear stereocilia and apical microtubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-96232-8	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sato Ko, Matsumoto Ikumi, Suzuki Koya, Tamura Atsushi, Shiraishi A, Kiyonari H, Kasamatsu J, Yamamoto H, Miyasaka T, Tanno D, Miyahara A, Zong T, Kagesawa T, Oniyama A, Kawamura K, Kitai Y, Umeki A, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Tsukita Sachiko, Kawakami Kazuyoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Deficiency of lung-specific claudin-18 leads to aggravated infection with Cryptococcus deneoformans through dysregulation of the microenvironment in lungs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00708-6	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Tsukita Kazuto, Kitamata Manabu, Kashihara Hiroka, Yano Tomoki, Fujiwara Ikuko, Day Timothy F., Katsuno Tatsuya, Kim Jaewon, Takenaga Fumiko, Tanaka Hiroo, Park Sungsu, Miyata Makoto, Watanabe Hitomi, Kondoh Gen, Takahashi Ryosuke, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 9
2. 論文標題 Phase separation of an actin nucleator by junctional microtubules regulates epithelial function	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadf6358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.adf6358	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Sugiyama Shintaro, Sasaki Tsutomu, Tanaka Hiroo, Yan Haomin, Ikegami Takeshi, Kanki Hideaki, Nishiyama Kumiko, Beck Goichi, Gon Yasufumi, Okazaki Shuhei, Todo Kenichi, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko, Mochizuki Hideki	4. 巻 13
2. 論文標題 The tight junction protein occludin modulates blood-brain barrier integrity and neurological function after ischemic stroke in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2892
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-29894-1	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Suzuki Koya, Yamaga Kosuke, Tokumasu Reitaro, Katsuno Tatsuya, Tanaka Hiroo, Chiba Shuhei, Yagi Takeshi, Katayama Ichiro, Tamura Atsushi, Murota Hiroyuki, Tsukita Sachiko	4. 巻 1523
2. 論文標題 Double mutation of <i>claudin 1</i> and <i>claudin 3</i> causes alopecia in infant mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Annals of the New York Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 51 ~ 61
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nyas.14980	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Yano Tomoki, Tsukita Kazuto, Kanoh Hatsuho, Nakayama Shogo, Kashihara Hiroka, Mizuno Tomoaki, Tanaka Hiroo, Matsui Takeshi, Goto Yuhei, Komatsubara Akira, Aoki Kazuhiro, Takahashi Ryosuke, Tamura Atsushi, Tsukita Sachiko	4. 巻 40
2. 論文標題 A microtubule LUZP1 association around tight junction promotes epithelial cell apical constriction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e104712
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2020104712	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 -

1. 著者名 Matsuo Junichi、Douchi Daisuke、Adachi Makoto、Tamura Atsushi、Tsukita Sachiko、Ito Yoshiaki	4. 巻 -
2. 論文標題 Iqgap3-Ras axis drives stem cell proliferation in the stomach corpus during homeostasis and repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gut	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/gutjnl-2020-322779	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 該当する

1. 著者名 Tsukita Kazuto、Yano Tomoki、Tamura Atsushi、Tsukita Sachiko	4. 巻 20
2. 論文標題 Reciprocal Association between the Apical Junctional Complex and AMPK: A Promising Therapeutic Target for Epithelial/Endothelial Barrier Function?	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6012 ~ 6012
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20236012	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Konishi Satoshi、Yano Tomoki、Tanaka Hiroo、Mizuno Tomoaki、Kano Hatsuho、Tsukita Kazuto、Namba Toshinori、Tamura Atsushi、Yonemura Shigenobu、Gotoh Shimpei、Matsumoto Hisako、Hirai Toyohiro、Tsukita Sachiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Vinculin is critical for the robustness of the epithelial cell sheet paracellular barrier for ions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e201900414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.201900414	査読の有無 無
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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 白土玄、小西聡史、矢野智樹、柏原 宏香、中山彰吾、勝野達也、Elisa Herawati、後藤慎平、近藤玄、渡邊仁美、田村淳、月田早智子
2. 発表標題 多繊維協調運動の確立過程のライブイメージングによる解析
3. 学会等名 第74回細胞生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tamura, A. Suzuki, K., Tanaka, H., Yano, T., Hayashi, D., Sentani, K., Oshima, M., Yasui, W., and Tsukit, S.
2. 発表標題 StCldn18 deficiency activates signaling cascade towards gastric tumorigenesis in mice.
3. 学会等名 4th International Tight Junction Conference, Berlin (online conference) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 月田和人、矢野智樹、藤原郁子、Francis Day Timothy、勝野達也、柏原宏香、竹永富妙子、田中啓雄、田村淳、月田早智子
2. 発表標題 TJMAP2は微小管依存的な相分離により細胞接着部位のアクチン重合を制御する
3. 学会等名 第74回細胞生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村淳、鈴木浩也、田中啓雄、矢野智樹、仙谷和弘、大島正伸、安井 弥、月田早智子
2. 発表標題 タイトジャンクションの変化はマウス胃腫瘍形成へのシグナルカスケードを活性化する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会(Web開催)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nakayama, S., Konishi, S., Yano, T., Herawati, E., Kashihara, H., Tamura, A., and Tsukita, S.
2. 発表標題 Role of the arrangement of basal bodies in establishment of the coordinated ciliary beating in multi-ciliated cells.
3. 学会等名 ASCB/EMBO 2019 meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakayama, S., Herawati, E., Takagishi, M., Torisawa, T., Namba, T., Ishihara, S., Yano, T., Tamura, A., Furuta, K., Oiwa, K., Takahashi, M., and Tsukita, S.
2. 発表標題 Planar cell polarity-dependent distribution of apical microtubules in tracheal multiciliated cells.
3. 学会等名 The 20th International Conference on Systems Biology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村淳、田中啓雄、矢野智樹、鈴木浩也、月田早智子
2. 発表標題 タイトジャンクション-クローディンによる細胞間バリア制御と、その異常と病態ークローディン欠損マウス解析の視点からー
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学 先端総合研究機構 <a href="https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/">https://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/tsukita/</a>
--

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------