

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590691

研究課題名（和文） 胃癌の発生と進展におけるタイト結合蛋白クローデインの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of tight junction protein: claudins on the development and progression of gastric cancer

研究代表者

大島 忠之（OSHIMA TADAYUKI）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：00381814

研究成果の概要（和文）：

本邦では依然として胃癌の罹患率は高く、ピロリ菌感染がその発生にかかわっているが、胃癌発生はピロリ菌感染者の数%のみである。本研究では、胃癌の発生や悪性度にかかわる因子として細胞と細胞の接着をつかさどるタイト結合蛋白に注目した。胃癌では、クローデイン3の発現低下が癌細胞の増殖能と相関し、また胃に比較的特異的に発現しているクローデイン18の胃癌浸潤先進部での発現低下と悪性度が相関していることを初めて明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

The morbidity of gastric cancer is still high in Japan, and it is known that *Helicobacter pylori* infection is involved in the development of gastric cancer. However, the incidence of gastric cancer in *Helicobacter pylori* infected people is a couple of %. We focused on tight junction proteins as the factor related to the development of gastric cancer and the malignancy. Down-regulation of claudin-3 was associated with proliferative potential of gastric cancer cells. Furthermore, down-regulation of claudin-18 at the invasive front of gastric cancer was associated with the proliferative and invasive potential, suggesting that they have pivotal roles in gastric cancer progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

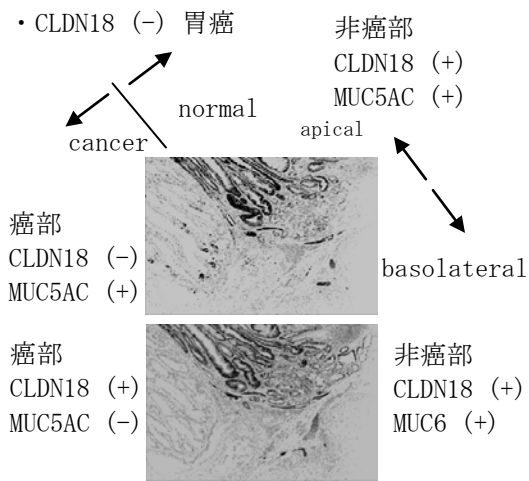
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道，胃，十二指腸）

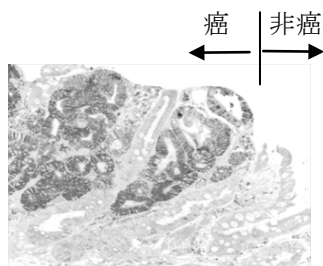
## 1. 研究開始当初の背景

本邦において胃癌は依然として高い罹患率を示し、ピロリ菌の関与は明らかであるものの全ピロリ菌感染者が胃癌を発生するわけではなく、胃癌の発生はピロリ菌感染の数%のみである。ではこの胃癌発生に関与する他因子は何であるのか？われわれは、少なくとも27種

類のファミリーを形成するタイト結合蛋白：クローデイン（CLDN）の中に、CLDN18が胃に比較的特異的に発現し、萎縮腸上皮化生胃粘膜上皮細胞では発現が消失し、劇的に発現変化することを見出し（図1）、胃癌発生と進展におけるタイト結合蛋白の発現制御が重要であると考え、着眼した。



• CLDN18 (+) 胃癌



非癌部 (腸上皮化生)  
CLDN18 (-)

図 1. 胃癌における CLDN18 の発現

## 2. 研究の目的

タイト結合蛋白は細胞間のバリア機能や細胞極性の維持に重要な役割を果たしており、その発現は、癌を含む種々の疾患で特徴的な変化を示す。クローデインは、タイト結合の構成や機能に重要な役割をはたしており、少なくとも 27 のサブタイプからなり、臓器特異的に発現し、組織特異的な生理機能調節に関与していると考えられている。さらにクローデインの発現変化が炎症や腫瘍の増殖を含めた様々な病態にも関与している可能性が示されているが、依然その詳細は明らかでない。

本研究は、胃癌発生に関わる動的に変化する細胞間接装置、特にタイト結合蛋白：クローデインの機能と発現制御を明らかとし、胃癌の発生と進展予測への関与を検討し、その発現制御による診断と治療応用を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 内視鏡的粘膜切除 (EMR), 内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD), 及び外科的手術により切除された胃腫瘍組織でのタイト結合関連蛋白の発現解析

胃腺腫, 高分化型腺癌, 中分化型腺癌を対象とした。サンプルは 10%ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作成し HE 染色を行った。上皮細胞の増殖能を評価するために、Ki67 免疫染色を行い、それぞれの病変でラベリングインデックス (Ki67-LI) を算出した。上皮におけるタイト結合蛋白の局在を評価するために CLDN3, 4, 7, 18 の蛍光免疫染色を行った。染色された細胞の割合によって、クローデインの発現をスコア化して評価した。サンプルの病理組織結果や臨床的背景は隠した状態で、2 人の独立した研究者によりスコアを評価した。腸上皮化生を伴わない胃粘膜と腸上皮化生粘膜、癌病変部に対して評価を行った。粘膜下層まで浸潤した病変については、粘膜下層浸潤先進部におけるそれぞれのタイト結合蛋白の発現と Ki67-LI についても解析を行った。

(2) ノックダウンによる CLDN18 の機能解析  
ノックダウンは siRNA の手法を用いて胃粘膜上皮細胞の CLDN18 の発現を抑制した。ノックダウンの確認は、western blotting あるいは RT-qPCR にて行った。ノックダウンが確認されたところでその細胞の形態変化、増殖能の変化、細胞間透過性の変化、浸潤能の変化を検討し、胃癌細胞における CLDN18 の機能を検討した。

## 4. 研究成果

正常胃粘膜、腸上皮化生粘膜あるいは胃癌細胞には CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN7, CLDN18 が発現し、それぞれの発現は、劇的に変化することが明らかとなった。CLDN3, CLDN4, CLDN7 のタイト結合における発現は腸上皮化生のない胃粘膜と比べて腸上皮化生粘膜と早期胃癌で有意に高いことが明らかとなり、増殖マーカーである Ki67 発現 (Ki67-LI) は CLDN3 と有意に逆相関し、CLDN4, CLDN7 とは相関を認めなかった。さらに胃癌の粘膜病変部と粘膜下層浸潤先進部においてクローデインの発現程度を比較すると粘膜下層浸潤癌での CLDN3 と 7 の発現は、粘膜内病変部と比較して粘膜下層浸潤先進部で有意に低かった。CLDN3 と CLDN4 の発現には有意な正の相関を認めたが、CLDN3 と CLDN7 の発現に有意な相関は認めなかった (Okugawa T, Oshima T, et al. Dig Dis Sci. 2012)。

CLDN18 の胃上皮細胞における発現は、腸上皮化生のない胃粘膜と比べて腸上皮化生粘膜と早期胃癌で有意に低いことが明らかとなり、さらに早期胃癌での CLDN18 の発現は、腸上皮化生のない胃粘膜と比べて有意に低いことが明らかとなった。胃癌の粘膜下層浸潤先進部では、CLDN18 の発現が Ki67-LI と有意に逆相関し、粘膜下層浸潤先進部における CLDN18 の発現低下が、癌の浸潤や転移にかかわってい

る可能性が考えられた (図 2) .

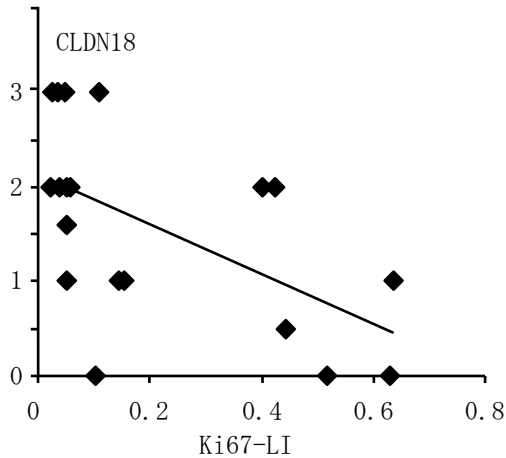


図 2. CLDN18 と Ki67 発現の相関

このことを証明するために CLDN18 を発現する胃癌細胞株に CLDN18 siRNA を処理し、CLDN18 発現を低下させると、癌細胞増殖と浸潤能が有意に増加することが明らかとなり、CLDN18 の発現低下が、胃癌の浸潤や転移にかかわっていることが初めて明らかとなった (図 3) .

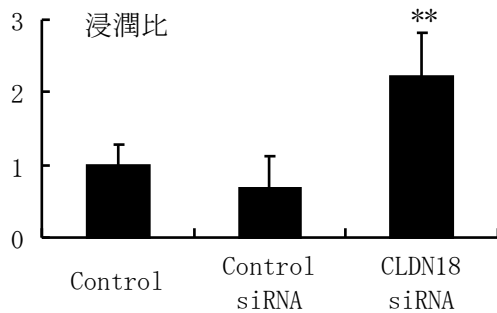


図 3. CLDN18 siRNA の浸潤能に与える影響

## 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 5 件)

- ① Sekikawa A, Fukui H, Zhang X, Maruo T, Tsumura T, Okabe Y, Wakasa T, Osaki Y, Chiba T, Tomita T, Oshima T, Watari J, Miwa H. REG I $\alpha$  is a biomarker for predicting response to chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with unresectable stage IV gastric cancer. Br J Cancer. 査読有, 2013 Feb 5;108(2):395-401. doi: 10.1038/bjc.2012.572.

- ② Okugawa T, Oshima T, Chen X, Hori K, Tomita T, Fukui H, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Down-regulation of claudin-3 is associated with proliferative potential in early gastric cancers. Dig Dis Sci. 査読有, 2012 Jun;57(6):1562-7. doi: 10.1007/s10620-012-2043-5.
- ③ Watari J, Moriichi K, Tanabe H, Kashima S, Nomura Y, Fujiya M, Tomita T, Oshima T, Fukui H, Miwa H, Das KM, Kohgo Y. Biomarkers predicting development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection: An analysis of molecular pathology of Helicobacter pylori eradication. Int J Cancer. 査読有, 2012 May 15;130(10):2349-58. doi: 10.1002/ijc.26275.
- ④ Tomita T, Arai E, Kohno T, Kondo T, Kim Y, Oshima T, Hori K, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Outcomes of Treatment of Argon Plasma Coagulation Therapy in Elderly or High-risk Patients With Early Gastric Cancer: A Comparison of Outcomes Among Experienced and Nonexperienced Endoscopists. J Clin Gastroenterol. 査読有, 2011 Jul;45(6):e54-9. doi: 10.1097/MCG.0b013e3181ef3612.
- ⑤ Sakurai J, Watari J, Oshima T, Miwa H. Multiple gastric polypoid lesions with protein-losing enteropathy. Intern Med. 査読有, 2011;50(14):1497-8. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21757837>

[学会発表] (計 6 件)

- ① Fukui H, Zhang X, Sun C, Yamasaki T, Kondo T, Ikehara H, Tomita T, Oshima T, Watari J, Fujimori T, Miwa H. Groc promotes invasion of gastric cancer cells. Sa1719 (Digestive Disease Week 2013. 5. 18. 2013. Orlando, Florida, USA)
- ② Fukui H, Zhang X, Toyoshima F, Tomita T, Oshima T, Watari J, Imura J, Fujimori T, Matsumoto T, Miwa H. Involvement of IL-22 signaling in gastric cancer cell invasion. Su1840 (Digestive Disease Week 2012. 5. 22. 2012. San Diego, California, USA)
- ③ Okugawa T, Oshima T, Morita T, Sakurai J, Tanaka J, Tomita T, Fukui H, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Down-regulation of submucosal claudin-18 at the invasive

front is associated with proliferative potential of submucosal gastric cancer. Sa1907 (Digestive Disease Week 2011. 5. 7. 2011. Chicago, Illinois, USA)

- ④ Oshima T. Tight Junctions: Implications in Gastrointestinal Diseases. (招聘講演) (The Sino-Japan Symposium about Digestive Diseases in Tianjin. 3. 6. 2011. Tianjin, China)
- ⑤ 胃粘膜内癌におけるクローデインの発現と増殖能は相関する. 奥川卓也, 大島忠之, Chen Xin, 神谷紀子, 豊島史彦, 櫻井淳, 田中淳二, 森田毅, 富田寿彦, 堀和敏, 渡二郎, 松本譽之, 三輪洋人. JDDW2010 (一般ポスター消P-159) (2010. 10. 13. パシフィコ横浜, 神奈川)
- ⑥ Chen X, Oshima T, Sakurai J, Tanaka J, Morita T, Tomita T, Kim Y, Hori K, Watari J, Matsumoto T, Miwa H. Down-regulation of claudin-4 and up-regulation of claudin-18 are associated with proliferative potential of intramucosal gastric cancer. S1961 (Digestive Disease Week 2010. 5. 2. 2010. New Orleans, Louisiana, USA)

[図書] (計 1 件)

- ① 渡二郎, 盛一健太郎, 田邊裕貴, 藤谷幹浩, 富田寿彦, 大島忠之, 福井広一, 堀和敏, 松本譽之, 三輪洋人, 高後裕. 【H. pyloriと胃癌の基礎と臨床】 H. pylori除菌による早期胃癌内視鏡治療後の異時性発癌の抑制効果(解説/特集) 消化器内科 (1884-2895)54 巻 3 号 Page302-308(2012. 03) 科学評論社.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大島 忠之 (OSHIMA TADAYUKI)  
兵庫医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00381814

### (2) 研究分担者

渡二郎 (WATARI JIRO)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10311531  
三輪 洋人 (MIWA HIROT)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80190833