様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　７ 年　 ６ 月 １５ 日現在

機関番号：２１６０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2022～2024
課題番号：２２Ｋ０９４５３

研究課題名（和文）新規抗CLDN10モノクローナル抗体を活用した腎癌悪性形質制御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism Underlying Malignant Phenotype Regulation in Renal Cell Carcinoma Using a Novel Anti-CLDN10 Monoclonal Antibody

研究代表者
小名木　彰史（Onagi, Akifumi）

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：７０８９４３８５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,100,000円

研究成果の概要（和文）：淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）は代表的な腎がんであり、進行例では治療選択肢が限られています。本研究では、ccRCCにおけるCLDN10という細胞接着分子の機能を明らかにするため、新規モノクローナル抗体を作製し、臨床検体に対する免疫染色および細胞実験を行いました。その結果、CLDN10の高発現は進行性腫瘍と関連し、腫瘍細胞内でアミノ酸輸送体LAT1と共局在し、細胞増殖に関わるmTORシグナルを活性化して悪性形質を促進することが明らかとなりました。これらの知見は、CLDN10がccRCCにおける新たな予後マーカーおよび分子標的治療の候補となり得る可能性を示唆しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義
腎がんの悪性度や進行に関わる新たな因子として、CLDN10というタンパク質の働きを明らかにしました。本成果は、がんの進行を抑える新しい治療法の開発や、予後予測に役立つ指標の確立につながる可能性があります。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the role of CLDN10 in clear cell renal cell carcinoma (ccRCC), we developed a novel monoclonal antibody specific to CLDN10. Immunohistochemical analysis of clinical samples and in vitro experiments revealed that CLDN10 promotes malignant phenotypes by enhancing mTOR signaling through interaction with the amino acid transporter LAT1. CLDN10 may serve as a potential therapeutic target in ccRCC.

研究分野：泌尿器悪性腫瘍

キーワード：CLDN10

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

１．研究開始当初の背景

腎癌は世界的に罹患率が増加傾向にあり、手術不能な進行例や転移・再発例においては、分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が登場したものの、依然として予後は不良である。したがって、再発リスクの高い症例を予測する新たな分子マーカーの開発や、それに基づいた新規治療法の創出が喫緊の課題とされている。

細胞間接着分子クローディン（CLDN）ファミリーは、細胞接着のみならずシグナル伝達の場としても機能し、癌の進展に深く関与する。癌組織における CLDN の発現異常は、診断マーカーや治療標的としての可能性が示されてきた。腎癌においては、The Cancer Genome Atlas（TCGA）データベースの解析から、CLDN10 遺伝子の mRNA 発現低下が予後不良と関連することが示唆されていた。

しかし、これらの知見は mRNA レベルの解析に限定されていた。その最大の理由は、CLDN ファミリー分子間で相同性が高いことに起因し、CLDN10 を特異的に認識して病理組織標本を染色できる質の高い抗体が存在しなかったことにある。このため、腎癌における CLDN10 タンパク質の真の発現動態や臨床的意義、さらには癌細胞における分子機能については、ほとんど解明されておらず、多くの点が未解明のままであった。

２．研究の目的

本研究は、淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）における CLDN10 の役割を、タンパク質レベルで解明することを目的とした。この目的を達成するため、まず CLDN10 を特異的に認識するモノクローナル抗体を独自に開発し、これを用いて以下の点を明らかにすることを目指した。

(1) ccRCC の臨床検体における CLDN10 タンパク質の発現を検証し、予後予測マーカーとしての有用性を臨床病理学的に検討すること。

(2) ccRCC 細胞株における CLDN10 の機能を解析し、癌の悪性形質（増殖、遊走等）をどのように制御しているかを明らかにすること。

(3) CLDN10 による悪性形質制御の分子メカニズムを解明し、新規治療標的としての可能性を検証すること。

３．研究の方法

(1) CLDN10 特異的モノクローナル抗体の開発および性能評価

ラットリンパ節法により、高感度かつ高特異性を有する CLDN10 特異的モノクローナル抗体を作製した。その特異性は、各種 CLDN ファミリー分子を強制発現させた細胞を用いて、ウェスタンブロットおよび免疫組織化学により検証した。

(2) 臨床検体を用いた病理学的・予後解析

淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）患者 165 例の手術摘出標本を対象に、上記抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。CLDN10 タンパク質の発現スコアを算出し、各種臨床病理学的因子および癌特異的生存率との関連性を統計学的に解析した。

(3) 腎癌細胞株を用いた CLDN10 の機能解析

ccRCC 細胞株（786-0、ACHN、OS-RC-2 等）に CLDN10 を導入し過剰発現株を樹立した。これらの株を用い、CLDN10 の発現が細胞増殖、遊走、浸潤に与える影響を評価した。

(4) 分子メカニズムの探索および機能的検証

① 網羅的解析：RNA シーケンスにより、CLDN10 の発現に伴い変動する遺伝子群および関連シグナル経路を同定した。また、免疫沈降–質量分析（IP-MS）により、CLDN10 と複合体を形成する相互作用分子を網羅的に探索した。

② シグナル伝達経路の検証：相互作用分子として同定された LAT1 との結合を共免疫沈降法により確認した。さらに、siRNA ノックダウンや特異的阻害剤を用いて、CLDN10-LAT1 シグナルが mTOR 経路の活性化および腫瘍の悪性形質に寄与することを機能的に明らかにした。

４．研究成果

(1) 高特異性 CLDN10 モノクローナル抗体の確立

本研究により、CLDN10 に対して高い特異性を有し、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）切片の免疫染色にも適用可能な高品質モノクローナル抗体を確立した。これにより、従来困難であった CLDN10 タンパク質の正確な組織レベルでの解析が可能となった。

(2) CLDN10 高発現は腎癌の独立した予後不良因子であることを証明

165 例の淡明細胞型腎細胞癌（ccRCC）症例を対象に、開発した抗体を用いた免疫組織化学的解析を行った。その結果、CLDN10 タンパク質の高発現は、腫瘍の高悪性度・高進行度・静脈浸潤と有意に関連していた。また、多変量解析により、CLDN10 高発現は他の因子とは独立して生命予後と強く相関する、独立した予後不良因子であることを明らかにした。

(3) 腎癌細胞における CLDN10 の悪性形質促進機能の解明

ccRCC 細胞株を用いた機能解析により、CLDN10 の過剰発現が細胞の増殖能および遊走能を有

意に亢進させることを確認した。これにより、CLDN10 が腫瘍の悪性形質に寄与する因子であることが示唆された。

(4) 新規シグナル経路「CLDN10-LAT1-mTOR」の同定

分子メカニズムの解析において、CLDN10 がアミノ酸トランスポーターLAT1 と細胞膜上で物理的に結合し、アミノ酸取り込みを促進することにより、mTOR 経路を活性化させることを見出した。この CLDN10-LAT1-mTOR 経路は、腎癌の新規悪性化経路として位置づけられ、今後の分子標的治療開発における有望な標的となり得る。

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　1件）

１．著者名 Onagi A, Sugimoto K, Kobayashi M, Sato Y, Kobayashi Y, Yaginuma K, Meguro S, Hoshi S, Hata J, Hashimoto Y, Kojima Y, Chiba H	４．巻 22
２．論文標題 Extrajunctional CLDN10 cooperates with LAT1 and accelerates clear cell renal cell carcinoma progression	５．発行年 2024年
３．雑誌名 Cell Communication and Signaling	６．最初と最後の頁 588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12964-024-01964-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 小名木彰史、杉本幸太郎、小林信、小島祥敬、千葉英樹
２．発表標題 腎細胞癌におけるClaudin-10の分子病理学的解析
３．学会等名 第111回日本病理学会総会
４．発表年 2023年

１．発表者名 小名木彰史、杉本幸太郎、小林信、小島祥敬、千葉英樹
２．発表標題 腎細胞癌におけるClaudin-10の臨床病理学的・分子病理学的解析
３．学会等名 第111回日本病理学会総会
４．発表年 2022年

１．発表者名 小名木彰史、杉本幸太郎、小林信、小島祥敬、千葉英樹
２．発表標題 腎細胞癌におけるClaudin-10の分子病理学的解析
３．学会等名 第112回日本病理学会総会
４．発表年 2023年

１．発表者名
Syunta Makabe, Kei Yaginuma, Satoru Meguro, Ryo Tanji, Ruriko Takinami, Seiji Hoshi, Tomoyuki Koguchi, Junya Hata, Yuichi Sato, Hidenori Akaihata, Soichiro Ogawa, Yoshiyuki Kojima

２．発表標題
CLDN10-LAT1 signaling accelerates clear cell renal cell carcinoma progression

３．学会等名
第112回日本泌尿器科学会総会

４．発表年
2025年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

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・講師 (21601)	
研究分担者	星　誠二 (Hoshi Seiji) (70813137)	福島県立医科大学・医学部・助教 (21601)	
研究分担者	胡口　智之 (Koguchi Tomoyuki) (40791950)	福島県立医科大学・医学部・病院助手 (21601)	
研究分担者	片岡　政雄 (Kataoka Masao) (90554204)	福島県立医科大学・医学部・病院助手 (21601)	
研究分担者	小島　祥敬 (Kojima Yoshiyuki) (60305539)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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