

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390089

研究課題名(和文)タイト結合の機能病理学 - ヒト正常上皮を中心に

研究課題名(英文) Patho-physiology of the tight junction-mainly focusing on human normal epithelial cells.

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) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：タイト結合は、体の内外を境し、外界刺激に対するバリアで、細胞にとっては極性を維持する細胞接着装置である。本研究ではヒト正常上皮細胞を用いて、以下を明らかにした。タイト結合機能の可逆的な変化は、あたらしい薬物投与方法の開発につながることを示唆された。タイト結合タンパクががん治療の標的分子となる可能性が示唆された。タイト結合タンパクの免疫組織染色は、病理発生学や病理診断学に有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The tight junction, intercellular junction, works as barriers between outside and inside of the body, meaning one of drug delivery paths. In polarized cells, the junction performs to maintain cellular polarity. In this project showed the following points. Elastase of *Pseudomonas aeruginosa* causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. Tight junction protein claudin-4 is receptor of *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE). C-CPE recombinant peptides lacking cytotoxic activity also decreased the barrier function. These reversible changes of barrier function are highly applicable for developing new drug delivery techniques. Claudin-4 was up-regulated in human prostate cancer. Cytotoxic effect of CPE depended on the expression level of claudin-4 protein. In normal human prostate epithelial cells, however, the cytotoxic effect was barely detected. These findings suggest that CLDN-4 is a promising target of cancer therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：タイト結合 膀胱癌 肝線維症 緑膿菌

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトの身体は、上皮細胞によっておおわれ、外界から隔絶されている。このような生体バリアの本体は、細胞と細胞の間隙をシールするタイト結合である。従ってタイト結合の機能失調は、浮腫、黄疸、下痢といったヒトの病態と深く関わっている。更に、粘膜上皮細胞のタイト結合が物理的に外来抗原の透過を防いでいることから、最近では、自然免疫系の重要な要素として考えられている。また、タイト結合分子は、C型肝炎ウイルスやアデノウイルスなどのレセプターとしても注目されている。タイト結合は、細胞間での物質の透過を制御するバリア機能だけでなく、細胞膜の頂領域と基底側領域の境界を形成し、細胞膜上の蛋白質や脂質の拡散を防ぎ細胞極性を維持するフェンス機能を有している。

我々は、タイト結合の形成機構と機能調節について研究を進めてきた。その結果、タイト結合形成には HNF-4a が重要な役割を果たすこと、神経栄養因子 GDNF が糖尿病網膜症の治療へ応用可能なこと、小腸からのカルシウム吸収に claudin(CLDN)2 と-12 が重要であることなどを明らかにしてきた。一方、がん細胞は脱分化に伴って細胞極性を失う。これは、タイト結合の形成不全によるフェンス機能の低下によること、タイト結合分子発現がエピジェネティックに抑制されていることを明らかにした。Occludin については、occludin ノックアウトマウスから樹立した肝細胞株を用いて、occludin がアポトーシスに関与することを報告した。

我々は更に、ヒト病態を理解するため、サイトカインとタイト結合調節機構を調べてきたが、いくつかのサイトカインの作用が、ヒト細胞と他の動物細胞とでは反応が異なることが明らかになった。そのためヒト病態の理解には、ヒト正常上皮細胞を用いることが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト正常上皮細胞やヒトがん細胞を用いて以下の点を解明する。

(1) ヒト正常上皮細胞におけるタイト結合分子の発現制御

(2) ヒトがん細胞とタイト結合分子の発現制御

(3) 治療標的分子としての Claudin4(CLDN4)の可能性

(4) ヒト組織診断におけるタイト結合分子の免疫組織学的応用

## 3. 研究の方法

培養細胞：摘出された組織より分離培養を行った正常子宮内膜上皮細胞、

手術で摘出したヒト組織から分離培養し、hTERT 遺伝子導入により延命化したヒト正常膀胱上皮細胞と hTERT 遺伝子導入により延命化したヒト鼻粘膜上皮細胞、

ヒト前立腺癌細胞株、ヒト肺癌細胞株

ヒト組織：肝内胆管癌・肝外胆管癌・乳頭癌 66 例、その背景組織 63 例、併存する上皮内病変(BiIN 1-3) 25 例、生検材料 58 例

解析方法：RT-PCR、western blot、共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡、免疫組織化学、各種シグナル伝達経路阻害剤、RNAi 法による発現ノックダウン、経上皮細胞電気抵抗測定

## 4. 研究成果

(1) ヒト正常上皮細胞におけるタイト結合分子の発現制御

ヒト鼻粘膜上皮細胞に緑膿菌エラスターゼを作用させると、タイト結合分子 claudin(CLDN)1、-4、occludin、tricellulin が、30分、1時間で発現低下し、4時間までに回復した。同様に上皮バリア機能は一過性に低下した。エラスターゼ処置により PAR-1 に変化がなく、PAR-2 でタイト結合分子と同様の変化を示した。緑膿菌エラスターゼは、PKC、MAPK、PI3K、JNK や NF B を介し、タイト結合タンパクのリン酸化およびタイト結合分子の発現低下をもたらすこと、PAR-2

はタイト結合の発現調節に関与し、その低下はタイト結合蛋白の発現低下をもたらすことがあきらかになった。緑膿菌などによりタイト結合機能が一時的に低下した時に細菌やカビが体内に侵入し、さらなる感染がおこると考えられる。また、薬物投与法の応用も期待できる。

イルソグラジンマレイン酸 (IM) は、細胞間ギャップ結合コミュニケーション (GJIC) を活性化する。鼻粘膜上皮における IM による GJIC 活性化とタイト結合バリア機能への影響を検討した。IM は、GJIC 機能の活性化により、ヒト鼻粘膜上皮細胞のタイト結合タンパクを転写レベルで増加させ、上皮バリア機能を亢進することができた。IM は TLR 3 刺激による一部のタイト結合蛋白の低下を抑制した。

ヒト正常子宮内膜上皮細胞では CLDN1、-3、-4、-7、occludin の発現が確認され、プロゲステロンに反応して CLDN3、-4 の増加を認めた。この変化は、月経周期における変化と同様であった。内膜癌細胞株は、エストロゲンに反応し、CLDN3、-4 の増加が認められた。これらの変化には、MAPK 経路が関与しており、内膜癌細胞ではさらにヘッジホッグ経路も関与していた。CLDN4 は、ウェルシュ菌毒素 (CPE) のレセプターであるが、正常ヒト子宮内膜上皮細胞にはまったく殺細胞性を示さず、子宮内膜癌細胞にのみ殺細胞性が認められた。

## (2) ヒトがん細胞とタイト結合分子の発現制御

TGF- $\alpha$  および低酸素で誘導した EMT に対する PKC 阻害剤の効果、CLDN1 の変化を指標に解析した。PKC は膵癌で高発現しており、PKC 阻害剤は EMT 誘導転写因子を抑制し、EMT による CLDN1 などのタイト結合分子の発現や、タイト結合機能の変化を抑制する効果があることが判明した。一方、正常細胞では PKC 阻害剤はタイト結合分子の発現

を誘導したことから、細胞の分化を誘導する可能性が示唆された。PKC はタイト結合分子の発現調節に強く関与し、膵癌細胞と正常膵管上皮細胞は異なるメカニズムで制御されていることが考えられた。

ヒト膵癌では、分化度が低下するに従い、tricellulin が核に染色される細胞の割合が増加した。Kaplan-Meier 生存曲線では、tricellulin 核陽性群で、陰性群と比較して 5 年生存率が有意に短かった。更に低分化膵癌細胞株 (Panc-1) で tricellulin の核への局在を細胞分画法、免疫電顕法を用いて確認した。Tricellulin の発現抑制、強制発現により、Panc-1 では細胞増殖能・浸潤能が変化した。以上から、tricellulin は膵癌において分化度低下に伴い核局在が増加し、核局在が増殖能・浸潤能に関与している可能性が示された。

## (3) 治療標的分子としての CLDN4 の可能性

食中毒の起因菌の一つであるウエルシュ菌の産生する毒素 (CPE) の C 末ペプチド断片 (C-CPE) は、CLDN4 と強い結合性をもち、細胞を傷害することなくそのバリア機能を阻害することが知られている。C-CPE によるヒト鼻粘膜上皮バリア機能の低下は CLDN の発現および局在の変化を伴わず、主に MAPK 経路を介して調節されていることが分かった。本研究のシグナル伝達経路を介した C-CPE のバリア機能への影響を示した結果は、鼻粘膜の CLDN4 をターゲットとした drug delivery system の構築の基礎研究として非常に有用であると考えられた。

ヒト前立腺癌では、CLDN4 を高発現している。そこで CPE の細胞毒性を検討した。ヒト正常前立腺上皮は、CLDN4 を発現しているが CPE 感受性をほとんど示さなかった。一方前立腺癌細胞は、CLDN4 発現の強さに伴って CPE 感受性が上昇した。このことは CPE を用いて CLDN4 を標的と

した前立腺癌治療の可能性が示された。

(4) ヒト組織診断におけるタイト結合分子の免疫組織学的応用

ヒト肝硬変では、再生結節辺縁に CLDN7 陽性肝細胞が認められた。肝細胞の CLDN7 の発現は新犬山分類に基づいた線維化のスコアが上がるほど増加した。肝細胞における CLDN7 の役割を検討するために、マウス肝細胞由来細胞株に CLDN7 を強制発現させた。CLDN -7 の発現は、肝細胞や胆管上皮細胞のいずれのマーカーにも影響を与えなかったが、CLDN1、occludin の誘導によって肝細胞における単層上皮としてのタイト結合を強めていると考えられた。

胆道生検での悪性診断の精度向上のため、悪性診断の特異マーカーの CLDN8、maspin、p53 の免疫組織化学の発現様式を解析した。CLDN 18、maspin、p53 はそれぞれ胆管・乳頭部癌における優れた診断マーカーであった。さらに3抗体をパネル化し、積算値を用いたことでより良い判別能が得られた。二値化処理を行っても良好な結果が得られた。生検診断を含めた日常診療へ応用が可能と考えられた。

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 22 件)

1. Keira Y, Takasawa A, Murata M, Nojima M, Takasawa K, Ogino J, Higashiura Y, Sasaki A, Kimura Y, Mizuguchi T, Tanaka S, Hirata K, Sawada N, Hasegawa T. An immunohistochemical marker panel including claudin-18, maspin, and p53 improves diagnostic accuracy of bile duct neoplasms in surgical and presurgical biopsy specimens. *Virchows Arch*, 査読有, 466(3): 265-277, 2015. doi: 10.1007/s00428-014-1705-4.
2. Nomura K, Obata K, Keira T, Miyata R, Hirakawa S, Takano K, Kohno T, Sawada N, Himi T. *Pseudomonas aeruginosa* elastase causes transient disruption of tight junctions and downregulation of PAR-2 in human nasal epithelial cells. *Respir Res*, 査読有, 15(1): 21, 2014. doi: 10.1186/1465-9921-15-21.
3. Tsujiwaki M, Murata M, Takasawa A, Hiratsuka Y, Fukuda R, Sugimoto K, Ono Y, Nojima M, Tanaka S, Hirata K, Kojima T, Sawada N. Aberrant expression of claudin-4 and -7 in hepatocytes in the cirrhotic human liver. *Med Mol Morphol*, 査読有, 48(1):33-43, 2014. doi: 10.1007/s00795-014-0074-z.
4. Kyuno D, Yamaguchi H, Ito T, Kono T, Kimura Y, Imamura M, Konno T, Hirata K, Sawada N, Kojima T. Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer. *World Journal of Gastroenterology*, 査読有, 20(31): 10813-10824, 2014. doi: 10.3748/wjg.v20.i31.10813.
5. Kubo T, Sugimoto K, Kojima T, Sawada N, Sato N, Ichimiya S. Tight junction protein claudin-4 is modulated via Np63 in human keratinocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications (BBRC)*, 査読有, 455(3-4): 205-11. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.148.
6. Miyata R, Nomura K, Kakuki T, Takano K, Kohno T, Konno T, Sawada N, Himi T, Kojima T. Isogladine maleate regulates gap junctional intercellular communication-dependent epithelial barrier in human nasal epithelial cells. *J Membr Biol*, 査読有, 248(2): 327-336, 2014 doi: 10.1007/s00232-015-9774-0.
7. Konno T, Ninomiya T, Kohno T, Kikuchi S, Sawada N, Kojima T. c-Jun N-terminal kinase inhibitor SP600125 enhances barrier function and elongation of human pancreatic cancer cell line HPAC in a Ca-switch model. *Histochem Cell Biol*, 査読有, 143(5): 471-479, 2014. doi: 10.1007/s00418-014-1300-4.
8. Takasawa A, Kojima T, Ninomiya T, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S,

- Sawada N. Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res*, 査読有, 351(1): 73-84, 2013. doi: 10.1007/s00441-012-1512-7.
9. Sawada N. Tight junction-related human diseases. *Pathol Int*, 査読有, 63(1): 1-12, 2013. doi: 10.1111/pin.12021.
  10. Kyuno D, Kojima T, Yamaguchi H, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Protein kinase C $\alpha$  inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Carcinogenesis*, 査読有, 34(6): 1232-1243, 2013. doi: 10.1093/carcin/bgt.057.
  11. Obata K, Kojima T, Masaki T, Okabayashi T, Yokota S, Hirakawa S, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Curcumin prevents replication of respiratory syncytial virus and the epithelial responses to it in human nasal epithelial cells. *PLoS One*, 査読有, 8(9): e70225, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070225. eCollection 2013.
  12. Hirakawa S, Kojima T, Obata K, Okabayashi T, Yokota SI, Nomura K, Obonai T, Fuchimoto J, Himi T, Tsutsumi H, Sawada N. Marked induction of matrix metalloproteinase-10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *J Med Virol*, 査読有, 85(12): 2141-2150, 2013. doi: 10.1002/jmv.23718.
  13. Someya M, Kojima T, Ogawa M, Ninomiya T, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Regulation of tight junction by sex hormones in normal human endometrial epithelial cells and uterus cancer cell line Sawano. *Cell Tissue Res*, 査読有, 354(2): 481-494, 2013. doi: 10.1007/s00441-013-1676-9.
  14. Kojima T, Ninomiya T, Konno T, Kohno T, Taniguchi M, . Expression of tricellulin in epithelial cells and non-epithelial cells. *Histol Histopathol*, 査読有, 28(11): 1383-1392, 2013.
  15. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Satohisa S, Akashi Y, Kanai R, Saito T, Sawada N, Chiba H. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells. *PLoS One*, 査読有, 8(10):e75106, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0075106, eCollection 2013.
  16. Kamekura R, Kojima T, Takano K, Go M, Sawada N, Himi T. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy*, 査読有, 42(2): 218-228, 2012. doi:10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x.
  17. Maeda T, Murata M, Chiba H, Takasawa A, Tanaka S, Kojima T, Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using *Clostridium perfringens* enterotoxin for prostate cancer. *Prostate*, 査読有, 72(4): 351-360, 2012. doi: 10.1002/pros.21436.
  18. Nomura K, Kojima T, Fuchimoto J, Obata K, Keira T, Himi T, Sawada N. Regulation of interleukin-33 and thymic stromal lymphopoietin in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines. *Laryngoscope*, 査読有, 122(6): 1185-1192, 2012. doi: 10.1002/lary.23261.
  19. Ogawa M, Kojima T, Someya M, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Epidermal growth factor modulates claudins and tight junctional functions in ovarian cancer cell lines. *Histochem Cell Biol*, 査読有, 138(2): 323-3, 38, 2012. doi: 10.1007/s00418-012-0956-x.
  20. Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci*, 査読有, 1257(1):85-92, 2012. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06579.x.
  21. Kojima T, Kyuno D, Sawada N. Targeting claudin-4 in human pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets*, 査読有, 16(9):

881-887, 2012.

doi:10.1517/14728222.2012.708340.

22. Fuchimoto J, Kojima T, Kobayashi N, Ohkuni T, Ogasawara N, Masaki T, Obata K, Nomura K, Kondoh A, Shigyo T, Himi T, Sawada N. Hop water extract inhibits double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from human nasal epithelial cells. Am J Rhinol Allergy, 査読有, 26(6):433-438, 2012. doi: 10.2500/ajra.2012.26.3814.

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 澤田 典均

モーニングレクチャー「タイト結合とがん」第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日、ロイトン札幌、さっぽろ芸文館、札幌市教育文化会館(札幌) 他 3 題、日本癌学会発表。

2. 澤田 典均

宿題報告「生体バリアを担うタイト結合の機能病理学」第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 26 日、京王プラザホテル(東京) 他 19 題、日本病理学会発表。

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

小島 隆 (KOJIMA, TAKASHI)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：30260764

田中 敏 (TANAKA, SATOSHI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：30374250

村田 雅樹 (MURATA, MASAKI)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：10404592

高澤 啓 (TAKASAWA, AKIRA)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00593021

郷 充 (GO, MITSURU)  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号：80448604

今村 将史 (IMAMURA, MASAFUMI)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00404608