

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460421

研究課題名(和文) 子宮頸部腺癌のタイト結合に着目した発癌機構解析及び臨床応用を目的とする橋渡し研究

研究課題名(英文) Evaluation of potential clinical application of tight junction proteins in cervical adenocarcinoma

研究代表者

高澤 啓 (Takasawa, Akira)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00593021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸部腺癌手術材料でタイト結合関連タンパク質の発現解析を行ったところ、claudin-1, JAM-Aが腺癌組織で高発現していた。その局在は非腫瘍部ではタイト結合領域に見られ、癌細胞では細胞膜全周性に変化していた。発現強度と局在変化を合わせて解析することで、高い判別能が得られた。CRISPR-Cas9システムを用いてclaudin-1欠損株を作成し解析したところclaudin-1の発現が癌悪性化に関与していることが明らかとなった。更にその発現はERK1/2経路を介して調節されていた。以上の結果から、頸部腺癌におけるclaudin-1は診断マーカー、治療標的となりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：We exam the expression of tight junction proteins in uterine cervical adenocarcinoma specimens. We found that expression of Claudin-1 and JAM-A was significantly higher in cervical adenocarcinoma than in non-neoplastic glands. In adenocarcinoma, localization of Claudin-1 and JAM-A was extended throughout the whole cell membranes, whereas they were predominantly expressed at the most apical cell-cell junction in non-neoplastic glands. Immunoreactivities and localization of Claudin-1 and JAM-A successfully distinguished neoplasms from non-neoplastic cervical glands with high specificity and high sensitivity. In cervical adenocarcinoma cell lines, gene knockout of Claudin-1 suppressed tumorigenicity, invasive capacity and tumor-initiation of cancer cells. Expression of Claudin-1 was mediated by ERK signaling. Targeting of Claudin-1 may be effective for cervical adenocarcinoma diagnosis and therapy.

研究分野：医歯薬学

キーワード：子宮頸部 子宮頸部腺癌 タイト結合 治療・診断マーカー

1. 研究開始当初の背景

近年、子宮頸部(以下、頸部)腺癌の患者数は増加し、患者数は子宮頸癌の 25%を占めている。頸部扁平上皮癌と比較して頸部腺癌の予後は悪い。その原因として、細胞異型の乏しさ、早期からの浸潤・転移などが考えられる。予後改善のため、早期診断・治療のための分子マーカーや治療標的として設定可能な分子群の同定が求められる。また、子宮頸癌では HPV 感染が発癌に関与するが、頸部腺癌での発癌機序の詳細は不明である。本研究では、申請者が継続して研究に取り組んでいるタイト結合に焦点を絞り、頸部腺上皮から腺癌への発癌機序の解明を目指す。また、頸部腺癌の診断・治療に寄与する特異的な診断マーカーを確立し分子標的治療へ応用することを目指し、臨床・基礎両方向への橋渡し研究を行う。

タイト結合は、上皮細胞間隙の最表側に位置する細胞接装置であり、claudin family、occludin を含む MARVEL family、JAM family 等の分子複合体である。近年、種々の悪性腫瘍で claudin family を始めとしたタイト結合関連タンパク質(TJPs)が高発現していること、癌の悪性化に関与していることが明らかとなった。これらの TJPs は膜貫通型タンパク質であり、分子標的治療のターゲットとなりうる。

申請者は以前より各種癌における TJPs の発現と調節機構の解明に取り組んでいる。最近では膵癌(業績 6, 7, 9)、胆道癌(論文投稿中)、前立腺癌(業績 11)、婦人科癌の卵巣癌(業績 12)と子宮体癌(業績 3)における TJPs の発現解析、異常発現する TJPs を標的とした新規治療法の基礎的検討を行っている。子宮体癌での検討では、ヒト正常子宮内膜腺上皮の初代培養系を確立し、正常上皮細胞と癌細胞での発現調節機構の比較、治療条件の検討を行っている。しかし、頸部腺癌での TJPs の発現解析は未だ行われていない。癌研究では、

発癌機序の解明、癌腫の形質解析や新規分子療法を含む治療の検討のため、生体の状態を反映した正常上皮細胞と癌細胞株とを比較することは非常に重要である。しかし、ヒト正常頸部腺上皮を用いた癌細胞との比較検討は皆無である。

申請者は予備検討にて、頸部腺癌手術材料で claudin-4 を含む複数の claudin family、JAM-A などの TJPs が、癌選択的に高発現している事、タイト結合の存在する最頂部から膜全周性に発現領域が変化している事を複数症例で確認していた。

2. 研究の目的

以上の背景より、本研究では子宮頸部腺癌で未だ解明されていない発癌による TJPs の発現変化と発現調節機構を明らかにし、発現変化のみられた TJPs を新規診断・治療マーカーとするための基盤研究を行うこととした。

3. 研究の方法

これまでの背景と申請者らの研究成果を踏まえ、本研究では以下の方法で研究を進めた。

- タイト結合に関連した頸部腺癌の新規診断マーカー検索。
 - 手術材料での TJPs の免疫染色により、診断マーカー候補タンパク質を検索する。
 - 生検材料の免疫染色で、a)の候補タンパク質の診断マーカーとしての妥当性を評価する。
- TJPs の頸部腺癌における発現調節機構及び頸部腺上皮の発癌過程での役割・発現変化の解明。
 - 正常頸部腺上皮細胞と各種頸部腺癌細胞株における TJPs の発現調節機構を解析する。
 - 特異的に発現増加していた TJPs の発現欠損株を作成し、癌の増殖、浸潤、造腫瘍能などに TJPs が及ぼす影響を

確認する。

4. 研究成果

1. 手術材料を用いた免疫組織化学的検討
約 50 症例の手術材料を用いて TJPs のうち Claudin-1, -4, -7, JAM-A の抗体による免疫組織学的検討を行い、染色強度や局在の評価を行った。統計学的解析を行ったところ、Claudin-1 と JAM-A が腺癌組織において非腫瘍組織と比較して判別能高く高発現していることが明らかとなった。少数の症例では非腫瘍組織の一部で claudin-1 と JAM-A の発現が見られたが、その発現は細胞接着間最頂部であるタイト結合領域に局在していた。一方、癌組織では claudin-1、JAM-A の何れの発現も細胞膜全体に見られており、発現強度と発現局在を合わせて検討することで、より精度の高い判別能が得られることが確認された。これらの結果をまとめ、論文として報告した(業績 6)。

2. Claudin-1 の子宮頸部腺癌細胞株に及ぼす影響の解析

頸部腺癌細胞株 2 株を用い、CRISPR-Cas9 システムを用いて claudin-1 欠損株を樹立した。解析にて、claudin-1 の欠損により増殖能、浸潤能、造腫瘍能は著明に抑制された。

3. Claudin-1 の発現調節機構の解析

頸部腺癌細胞株 5 株を用い、種々の刺激に対する claudin-1 を中心とした TJPs の発現変化を確認した。ある種の刺激に対して複数の細胞株で claudin-1 を中心に発現の増加が確認された。発現の増加には ERK1/2 の活性化経路が関与していた。研究成果 2 と 3 をまとめ、現在論文投稿中である。

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 11 件)

1. Sugimoto K, Takasawa A, Ichimiya S, Murata M, Kimura H, Gille JP J, Kuroda N, Shimizu H, Hasegawa T, Sawada N, Furuya M, Nagashima Y. Multifocal and microscopic chromophobe renal cell carcinomatous lesions associated with “capsulomas” without FCLN gene abnormality. *Pathol Int.* 63, 501-515, 2016. (査読あり)
2. 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. *Medical Molecular Morphology.* 48, 33-34, 2015. (査読あり)
3. 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.* 466, 265-277, 2015. (査読あり)
4. Fukuda A, Tagami Y, Takasawa A, Sugita S, Kuramoto R, Imai S, Hasegawa T, Iizuka K. Nasopharyngeal hyalinizing clear cell carcinoma with EWSR1 rearrangements diagnosed by fluorescence in situ hybridization. *Auris Nasus Larynx.* 42, 412-415,

2015. (査読あり)
5. Sasaki T, Kanaseki T, Shionoya Y, Tokita S, Miyamoto S, Saka E, Kochin V, Takasawa A, Hirohashi Y, Tamura Y, Miyazaki A, Torigoe T, Hiratsuka H, Sato N. Microenvironmental stresses induce HLA-E/Qa-1 surface expression and thereby reduce CD8(+) T-cell recognition of stressed cells. *Eur J Immunol.* 46(4), 929-40, 2016. (査読あり)
 6. Akimoto T, Takasawa A, Murata M, Kojima Y, Takasawa K, Nojima M, Aoyama T, Hiratsuka Y, Ono Y, Tanaka S, Osanai M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N. Analysis of the expression and localization of tight junction transmembrane proteins, claudin-1, -4, -7, occludin and JAM-A, in human cervical adenocarcinoma. *Histol Histopathol.* 31(8), 921-931, 2016. (査読あり)
 7. Yamada G, Murata M, Takasawa A, Nojima M, Mori Y, Sawada N, Takahashi H. Increased expressions of claudin 4 and 7 in atypical adenomatous hyperplasia and adenocarcinoma of the lung. *Med Mol Morphol.* 49(3):163-169, 2016. (査読あり)
 8. Ono Y, Hiratsuka Y, Murata M, Takasawa A, Fukuda R, Nojima M, Tanaka S, Osanai M, Hirata K, Sawada N. Claudins-4 and -7 might be valuable markers to distinguish hepatocellular carcinoma from cholangiocarcinoma. *Virchows Arch.* 469(4):417-426, 2016. (査読あり)
 9. Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2016, [Epub ahead of print] (査読あり)
 10. Takasawa A, Murata M, Takasawa K, Ono Y, Osanai M, Tanaka S, Nojima M, Kono T, Hirata K, Kojima T, Sawada N. Nuclear localization of tricellulin promotes the oncogenic property of pancreatic cancer. *Sci Rep.* 19;6:33582, 2016. (査読あり)
 11. Takasawa K, Takasawa A, Osanai M, Aoyama T, Ono Y, Kono T, Hirohashi Y, Murata M, Sawada N. Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer. *Cancer Lett.* in press. (査読あり)
- [学会発表] (計 2 件)
1. 高澤啓 他: 胆道癌細胞株における claudin-18 の発現と調節機構および機能解析. 第 103 回日本病理学会総会 2014 年 4 月 24-26 日 広島国際会議場 (広島県広島市)
 2. 高澤啓 他: 子宮頸部腺癌におけるタイト結合関連たんぱく質の免疫組織化学的検討. 第 105 回日本病理学会総会 2016 年 5 月 12-14 日 仙台国際センター (宮城県仙台市)
6. 研究組織
- (1)研究代表者
高澤 啓 (AKIRA TAKASAWA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号:00593021
- (2)研究分担者
村田 雅樹 (MASAKI MURATA)
札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号:10404592

(3)連携研究者

澤田 典均(NORIMASA SAWADA)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号:30154149

田中 敏(SATOSHI TANAKA)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号:30374250