

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：26201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08381

研究課題名(和文)細胞接着因子claudinが大腸癌の増殖能、浸潤能に及ぼす影響の臨床病理学的解析

研究課題名(英文)Clinicopathological analysis of tight-junction-associated protein claudin on proliferation and invasion in colorectal carcinoma

研究代表者

平川 栄一郎(Hirakawa, Eiichiro)

香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授

研究者番号：60238342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間タイト結合蛋白であるclaudinの発現と局在について、大腸癌の手術症例及びヒト大腸癌培養細胞を用いて検討した。claudin-1の細胞膜での発現はリンパ管侵襲、深達度と逆相関を示し、claudin-3の核での発現は粘液癌において有意に増加した。また、claudin-1の発現は原発巣由来株Caco-2細胞と比較してリンパ節転移巣由来株SW620細胞において減少すること、claudin-1は細胞増殖や細胞遊走においてアップレギュレーションとして作用することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the expression and localization of tight-junction-associated protein claudins in colorectal adenocarcinoma tissues and cell lines. The membranous expression of claudin-1 was correlated with lymphatic vessel invasion and depth of tumor invasion, whereas the nuclear expression of claudin-3 was significantly increased in mucinous adenocarcinoma. The expression level of the claudin-1 protein was significantly lower in metastatic colon cancer cell line SW620 cells than in primary colon cancer cell line Caco-2 cells. Up-regulation of claudin-1 expression was associated with cell proliferation and cell migration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：claudin 大腸癌 免疫組織化学 増殖・浸潤能

### 1. 研究開始当初の背景

Claudin は少なくとも 24 種類からなる遺伝子ファミリーを形成している主要なタイト結合蛋白質の 1 種であり、細胞極性の維持や組織間のバリア機能に係っている。癌では claudin が発現異常をきたし、癌の進展に関与しているといわれているが、その役割はまだ明らかではない。大腸癌における claudin-1 の発現の低下による再発率の上昇や生存率の低下がみられという報告は、タイト結合蛋白質の低下により細胞同士の接着が崩壊することによって、癌の浸潤や転移が起こるといった考え方を示唆している。一方、多くの研究によって大腸癌における claudin 発現の増加が報告されている。claudin-1,4 の発現低下によるリンパ節転移の増加は Ersoz らにより既に報告されているが、Dhawan らは逆に claudin-1 の発現増加や細胞内の分布異常が腫瘍の発育や予後に相関することを報告している。このように大腸癌における claudin の生物学的役割についてはまだ明らかではない。

### 2. 研究の目的

本研究では、大腸癌手術材料および原発巣由来とリンパ節転移巣由来のヒト大腸癌培養細胞を用いることにより、以下の 3 つの目的により、未だ明確でない claudin の発現と臨床病理学的な因子との相関、生物学的な役割を明らかにする。

(1) 本研究の第一の目的は、100 例以上の大腸癌症例を用いて、claudin の発現を、免疫組織化学的に観察し、claudin の発現変化と臨床病理学的な相関を検証することである。

(2) 次に、大腸癌の claudin 発現の変化とリンパ節転移能、増殖能、浸潤能を観察する為に、原発巣由来ヒト大腸癌培養細胞株とリンパ節転移巣由来細胞株を用いて検証する。それぞれのヒト大腸癌培養細胞の claudin の発現変化と分布を免疫染色および RT-PCR、ウエスタンブロット等を用いて検討し、増殖能、浸潤能との関連について検証を行う。

(3) さらに claudin-1 に対する siRNA を作成し、原発巣由来細胞株とリンパ節転移巣由来細胞株に siRNA のトランスフェクションを行い、claudin-1 のノックダウン大腸癌培養細胞を作製する。このノックダウン細胞の claudin-1 の発現が低下していることを確認した後、その増殖能、浸潤能についてコントロールと比較検討する。

### 3. 研究の方法

(1) 大腸癌症例を用いた claudin-1,4,3,7 及び Ki-67(MIB-1)の免疫組織化学的検討

大腸癌 100 例のパラフィン包埋ブロックから 4 μm の厚さの切片を作製し、脱パラフィン後、オートクレーブによる賦活化を行い、抗 claudin-1,4,3,7 モノクローナル抗体(Abcam, ×200)と抗 Ki-67 モノクローナル抗体(MIB-1.

DAKO, ×200)を用いて 2 時間反応させ、2 次抗体として MAX-PO (Multi, ニチレイ)を反応させた。発色は DAB (ニチレイ)を用いた。claudin-1,4 については膜での発現を scoring 法により定量化し、claudin-3,7 については膜と核での発現について定量化を行った。Ki-67 については labeling index を用いて定量化を行った。それぞれの結果をもとに、claudin-1,4,3,7 と Ki-67 の発現と臨床病理学的因子との相関について、統計学的解析を行った。臨床病理学的因子は大腸癌取扱い規約に従い、年齢、性別、組織学的分化度、リンパ管侵襲、静脈侵襲、リンパ節転移、深達度、進行度 (stage)の項目について分類し、組織学的分化度は分化型腺癌、低分化腺癌、粘液癌に分類した。

(2) 大腸癌培養細胞を用いた免疫細胞化学  
原発巣由来細胞株 Caco-2 細胞とリンパ節転移巣由来の細胞株 SW620 をチャンバースライド(Thermo Fisher Scientific)で培養し、ホルマリン固定後、抗 claudin-1,3,4,7 モノクローナル抗体(Abcam, ×200)を用い 2 時間反応させ、2 次抗体として MAX-PO (Multi, ニチレイ)を反応させた。発色は DAB(ニチレイ)を用いた。

(3) 大腸癌培養細胞における claudin-1,4,3,7 の遺伝子発現と蛋白発現

原発巣由来細胞株 Caco-2 細胞とリンパ節転移巣由来細胞株 SW620 から RNAeasy Plus Mini kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出し、RT-PCR を行い比較検討した。次に SuperScript VIL0 cDNA Synthesis kit (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific)により claudin-1,4,3,7 に対する cDNA を作製した。Quantitative (q)PCR は Power SYBR-Green RNA-to-CT 1-Step kit を用い Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Thermo Fisher Scientific)により検討した。リアルタイム PCR は GAPDH を補正を行い、遺伝子の発現量を比較した。

蛋白の発現はウエスタンブロットにより解析した。Caco-2 細胞(3×10<sup>5</sup>)と SW620 細胞(3×10<sup>5</sup>)をそれぞれ 40 mm ディッシュでコンフルエントになるまで培養し、各細胞から蛋白を抽出し、15%SDS-PAGE の後、PVDF 膜に転写を行い、抗 claudin-1 抗体(Abcam, 1:300)、抗 claudin-4 抗体(Abcam, 1:1000)、抗 claudin-3 抗体(Abcam, 1:300)、抗 claudin-7 抗体(Abcam, 1:1000)を用い、化学発光キット Chemi-Lumi one L (Nacalai Tesque)により検出を行いデンストメーターにより定量化を行った。

(4) siRNA による Claudin-1 発現抑制細胞の作製と増殖能、遊走能、浸潤能の検討

Claudin-1 siRNA (Santa Cruz)および Control siRNA(Santa Cruz)を用いて、プロトコールに従い、Caco-2 細胞及び SW620 細胞にトランスフェクションを行い、claudin-1 発現抑制細胞を作製し、それぞれの細胞から RNA 及び蛋白を抽出し、リアルタイム PCR、

ウエスタンブロットを行った。

次に、増殖能の測定は、それぞれの細胞を96穴ディッシュで48時間培養後、MTT試薬を添加し、12時間後にマイクロプレートリーダーで吸光度を測定した。アポトーシスはヘキスト染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて測定した。

遊走能と浸潤能の測定は、CytoSelect™ 24-Well Wound Healing Assay (Cell Biolabs) 及び CytoSelect™ 24 Well Cell Invasion Assay (Cell Biolabs)によりプロトコールに従って行った。

#### 4. 研究成果

(1) Claudin1,4,3,7 及び Ki-67(MIB-1)の発現と臨床病理学的因子との相関

大腸癌の Claudin1,4,3,7 の免疫組織化学による発現と臨床病理学的因子との相関では、claudin-1 の膜における発現はリンパ管侵襲、深達度、進行度とそれぞれ負の相関を示していた( $p < 0.05$ )。Claudin-4,7 の膜における発現については臨床病理学的因子との相関は認めなかった。Claudin-3 の核における発現は、分化型腺癌と比較して粘液腺癌では、その発現が有意に増加していた( $p < 0.01$ )。Ki-67(MIB-1)の labeling index は進行度 II と比較して進行度 IIIa において有意な増加を認めた( $p < 0.05$ )。大腸癌手術症例 100 例の免疫組織化学による検討では、claudin1,3 及び Ki-67(MIB-1)は進行あるいは悪性度が高い大腸癌の予後因子として応用できるという可能性を示した。

(2) 大腸癌培養細胞を用いた免疫細胞化学

培養細胞の免疫細胞化学では、Claudin-1 は Caco-2 細胞では細胞膜及び細胞質に発現し、SW620 細胞では細胞質に発現していた (Fig.1)。又、claudin-4 は Caco-2 細胞では膜と細胞質に発現し、SW620 細胞では核に発現していた。一方、claudin-3 は Caco-2 細胞、SW620 細胞のいずれにおいても核に発現したが、claudin-7 は Caco-2 細胞では細胞膜に発現し、SW620 細胞では細胞質に発現した。

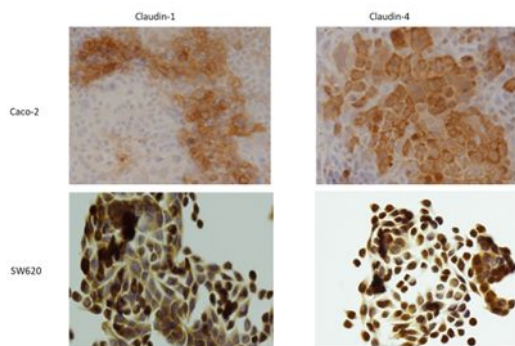


Fig. 1

(3) 大腸癌培養細胞における claudin-1,4,3,7 の遺伝子発現と蛋白発現

RT-PCR では Caco-2 細胞、SW620 細胞のいずれにも claudin-1 と claudin-4 の発現を認めた。リアルタイム PCR とウエスタンブロットによる解析では、Caco-2 細胞と比較して、SW620 細胞では Claudin-1,4,7 の発現が有意に減少した。一方 claudin-3 の発現は Caco-2 細胞と比較して、SW620 細胞において増加した (Fig. 2,3)。

Claudin-1,4 の発現は、原発巣由来株 Caco-2 細胞と比較してリンパ節転移巣由来株 SW620 細胞において減少していたことより、リンパ節転移には claudin-1 の膜での発現低下が関与しており、claudin-4 は膜、細胞質における発現低下と核での発現の軽度増加が癌のリンパ節転移に関与している可能性を示した。claudin-3,7 の核での発現については、claudin-3 の核での発現増加、あるいは claudin-7 の核での発現減少が癌のリンパ節転移に関与する可能性を示した。

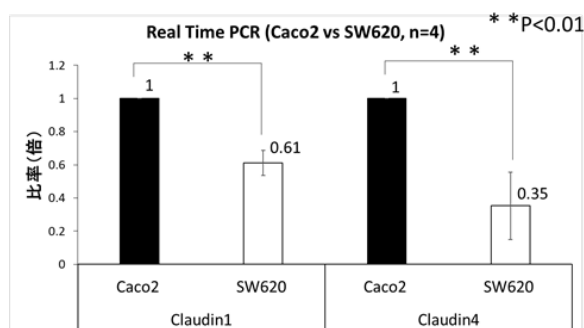


Fig. 2

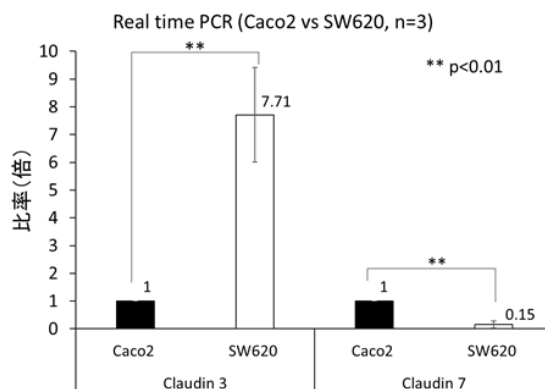


Fig. 3

(4) siRNA による Claudin-1 発現抑制細胞の作製と増殖能、遊走能、浸潤能の検討

大腸癌培養細胞株 (Caco-2, SW620) において Claudin-1 の mRNA 発現量を real-time PCR において比較した結果、ネガティブコントロールと比べ、siRNA を導入したものの mRNA の発現量は有意に減少した。Caco2 細胞は 55% 抑制され、SW620 細胞は 62% 抑制された (Fig. 4)。発現抑制はそれぞれの細胞から蛋白を抽出し行ったウエスタンブロットによっても確認された。

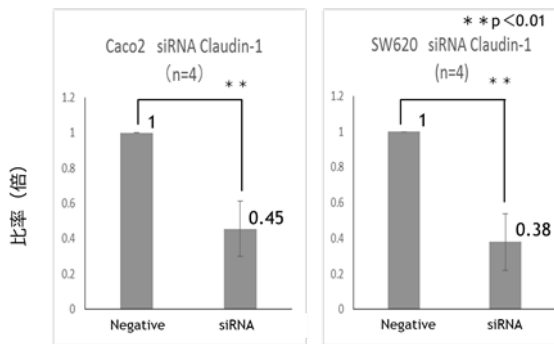


Fig. 4

MTT アッセイによる増殖能の測定では、Caco-2 細胞ではネガティブコントロールと siRNA 導入による claudin-1 発現抑制細胞では、MTT アッセイの結果に有意差は認めなかった。しかし、SW620 細胞では、ネガティブコントロール siRNA を導入したものの生存率を 100% として、siRNA を導入したものは 76.2% であり、有意に生存率の減少を認めた (Fig. 5)。

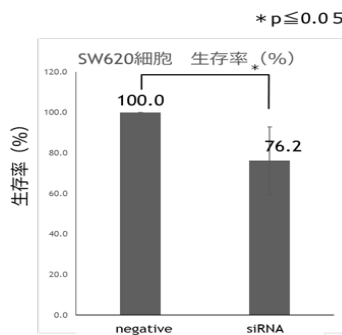


Fig. 5

ヘキスト染色によるアポトーシスの検出では、Caco-2 細胞、SW620 細胞のいずれにもおいても、ネガティブコントロールと siRNA 導入による claudin-1 発現抑制細胞では、アポトーシス数に有意差は認めなかった。

遊走能の測定では、Caco-2 細胞、SW620 細胞のいずれにおいても Claudin-1 発現抑制細胞は、ネガティブコントロールと比較して、それぞれ 61%、51% の遊走能低下を認めた (Fig. 6)。また、SW620 細胞の浸潤能の測定では、Claudin-1 発現抑制細胞は、ネガティブコントロールと比較して 11% の浸潤能低下を認めた。

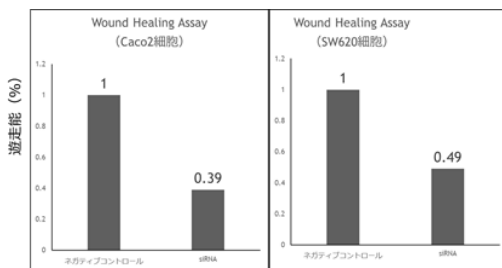


Fig. 6

以上より、claudin-1 の発現は、細胞の増殖に対しアポトーシスとは関係なくアップ

レギュレーションとして働き、又、claudin-1 の発現は、遊走能や浸潤能に関してアップレギュレーションとして働くことが明らかとなった。この結果は、大腸癌 100 例の免疫組織化学染色による claudin-1 の膜での発現低下がそのリンパ管侵襲や深達度、進行度において浸潤性増殖と相関するという結果と相反する結果であった。しかし、培養細胞の免疫細胞化学の結果からリンパ節転移巣細胞株 SW620 細胞では、原発巣細胞株 Caco-2 細胞と比較して、膜での発現低下、細胞質での発現増加を認めている。このことより、Claudin-1 の膜での発現低下と細胞質での発現増加が大腸癌の増殖能、遊走能、浸潤能をアップレギュレーションしていると考えられた。以上の結果は、本研究の目的とした claudin-1 と大腸癌の増殖や浸潤、転移に関する疑問に答えるものとなった。今後 claudin-1 の発現と増殖能、浸潤能について、発現部位との関係解析を進め、claudin-1 及び他の claudin-3,4,7 等についても臨床病理学的な予後因子としての確立や病理組織診断、治療法の進歩に応用できるよう研究を継続していく予定である。

#### 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 2 件)

① Yasunori Tokuhara, Tatsuya Morinishi, Toru Matsunaga, Manabu Sakai, Takayoshi Sakai, Hiroyuki Ohsaki, Kyuichi Kadota, Yoshio Kushida, Reiji Haba, Eiichiro Hirakawa, Nuclear expression of claudin-3 in human colorectal adenocarcinoma cell lines and tissue, oncology letters, 査読有, Vol.15, 2018, pp99-108  
DOI: 10.3892/ol.2017.7281

② 森西起也、徳原康哲、平川栄一郎、大腸癌における Ki-67 の発現と臨床病理学的因子および PPAR- の局在との関連についての検討、香川県立保健医療大学雑誌、査読有、9 巻、2018 年、pp35-39

〔学会発表〕(計 4 件)

① Eiichiro Hirakawa, Yasunori Tokuhara, Tatsuya Morinishi, Hiroyuki Ohsaki, Yoshio Kushida, Reiji Haba, Reduced expression of claudin-1 in colorectal carcinoma is correlated with poor prognosis. The 106<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese society of pathology, 28 April, 2017, Tokyo

② 森西起也、寒原真穂、三宅彩理、徳原康哲、平川栄一郎、大腸癌における Ki-67 の発現と PPAR- の局在発現についての検討、第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会、2017 年

③Yasunori Tokuhara, Tatsuya Morinishi, Toru Matsunaga, Hiroyuki Ohsaki, Yoshio Kushida, Reiji Haba, Eiichiro Hirakawa, Differential expression of claudin-1 between well- to moderately-differentiated and poorly-differentiated gastric adenocarcinoma. The 20<sup>th</sup> world congress on advances in oncology, 8-10 October, 2015, Greece

Eiichiro Hirakawa, Yasunori Tokuhara Tatsuya Morinishi, Hiroyuki Ohsaki, Erica Uemura, Yukari Miki, Toru Matsunaga, Yoshio Kushida, Reiji Haba, Differential expression of claudin-1 is a prognostic factor in gastric cancer. The 20<sup>th</sup> world congress on advances in oncology, 8-10 October, 2015, Greece

〔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：  
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

平川栄一郎 (HIRAKAWA, Eiichiro)  
香川県立保健医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：60238342

### (2) 研究分担者

徳原康哲 (Tokuhara, Yasunori)  
愛媛県立医療技術大学・保健科学部・講師  
研究者番号：60746329

### (3) 連携研究者

羽場礼次 (Haba Reiji)  
香川大学医学部・附属病院・准教授  
研究者番号：90304584