

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08766

研究課題名(和文)異なるクローディン分子種を発現するがん細胞集団の相互作用とその意義

研究課題名(英文)Cell competition between tumour cells expressing different claudins

研究代表者

富川 直樹 (Ichikawa-Tomikawa, Naoki)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：80468587

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞では細胞間接着分子クローディン(CLDN)など様々な分子が発現異常し、診断や治療標的として利用されている。我々はCLDNから核内受容体にいたる新規シグナル伝達経路を発見し、これが乳がんや婦人科がんの悪性形質を制御することを明らかにした。一方で培養がん細胞株やヒトがん組織においては、あるCLDNが異なるCLDNの発現を制御していることを見出した。特にCLDN4とCLDN6は排他的に分布し、それぞれの陽性細胞は極性や増殖性など細胞の形質が細胞間接着以外においても異なることがわかった。以上よりCLDN発現パターンは腫瘍細胞の形質を反映する優れたマーカーである可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

CLDN分子の相互発現制御を解明することにより、異種CLDNどうしのタンパクレベルでの発現制御機構といった新たな生命現象を提唱できる可能性がある。また本機構によってがん組織に発生するCldn分子の多彩な発現様式が腫瘍内不均一性を示し、がんの分化度や悪性度に関連することが明らかになれば、診断並びに予後不良の新たな指標となることが見込まれる。さらなる異なるCLDN分子を発現誘導することにより、がんの悪性化に繋がるCLDN発現を抑制するという、新規分子標的療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Various molecules, including cell adhesion molecule claudins (CLDN), are aberrantly expressed in cancer cells. We have discovered a novel signaling pathway from CLDN to novel serine phosphorylation of nuclear receptors that regulates tumour malignancy in breast and endometrial cancers. On the other hand, we found that one CLDN molecule regulates the expression of another CLDN molecule in cultured cancer cell lines and human cancer tissues. In particular, CLDN4 and CLDN6 were exclusively distributed, and CLDN4-positive or CLDN6-positive cells have different features not only in intercellular adhesion, but also in cell polarity or proliferation. These results indicate that the CLDN expression pattern may be a useful cancer biomarker for personalized treatment.

研究分野：実験病理学

キーワード：細胞間接着 がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織は多様性のある複数のがん細胞集団で構成され、この腫瘍内不均一性はがんの増殖・浸潤・転移等の悪性形質や治療耐性の獲得を促進する。しかし異なる性質を有するがん細胞集団の相互作用及びその機序や、腫瘍内不均一性がどのようにしてがんの進行や予後に影響を及ぼすかについては未だ不明な点が多い。

細胞間接着装置タイト結合の膜貫通分子であるクローディン(CLDN)は、27種類のサブファミリーから構成され、発生過程や組織特異的な発現パターンを示す。また、CLDNは正常細胞間をシールし、傍細胞チャネル・バリアとして機能する他、細胞内シグナルを活性化することも分かっている(Ichikawa-Tomikawa et al., *J Biomed Biotech*, 2011)。一方がん組織ではCLDNの発現異常(低下または亢進)が認められることが多数報告されているものの、その意義や分子機構の詳細は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究ではがん組織におけるCLDNの異常な発現亢進あるいは発現低下、特にその不均一性がどのようにしてがんの悪性形質制御に関わるかについて検討した。

3. 研究の方法

胎児性癌細胞株、乳癌細胞株、および子宮内膜癌細胞株を用いて、分子細胞生物学的手法によりCLDN4とCLDN6のシグナル機能を解析した。また外科手術材料を用いて乳がんと子宮内膜癌におけるCLDN4とCLDN6の発現を解析した。ラットリンパ節法によりCLDN6に特異的なモノクローナル抗体を開発した。

4. 研究成果

CLDN6はSrcファミリーキナーゼ(SFK)/PI3K/AKT経路を介してレチノイン酸受容体 γ (RAR γ)をセリンリン酸化した(図1左; Sugimoto et al., *PNAS*, 2019)。さらにCLDN6は同様の経路でエストロゲン受容体 α (ER α)もセリンリン酸化し、これが子宮体がんの悪性形質を増強することが解った(図1中央; Kojima et al., *under review*, preprint article is available on bioRxiv)。また乳がんではCLDN4が同様に肝X受容体 β (LXR β)を活性化し、がんの進展に寄与することが示唆された(図1右; Murakami et al., *in preparation*)。また我々が検証した限り、これら全ての系においてCLDN4とCLDN6は排他的に分布し、一方の過剰発現はもう一方の発現を低下させた(図1)。このCLDN-核内受容体経路とCLDN同士の細胞競合による細胞制御機構は、他の器官や病態にも関与する可能性が考えられ、様々な疾患に対する治療標的として期待される。

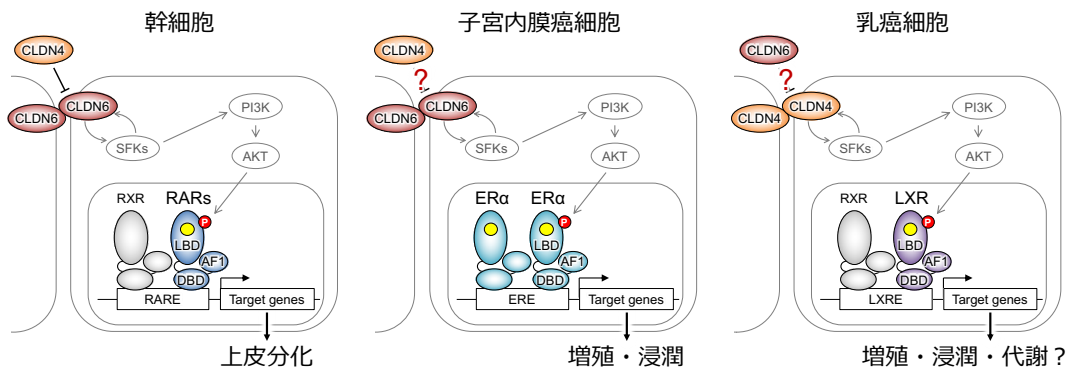
CLDN4とCLDN6の機能解析を実施するにあたり、これらの分布や発現量を正確に評価することが必要である。ところがCLDN4とCLDN6は進化的に近縁であり(図2A)、既存のCLDN6抗体がCLDN4と交差することが判った(図2C, D)。そこでラットリンパ節法によりCLDN4と交差しない特異度の高いモノクローナル抗体を樹立し、特許出願した。今後は本抗体を用いて細胞競合機構の詳細を明らかにして論文発表する予定である。

引用文献

1. Ichikawa-Tomikawa N et al. Possible involvement of tight junctions, extracellular matrix and nuclear receptors in epithelial differentiation. *J Biomed Biotechnol*. 2011
2. Sugimoto K et al. Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019

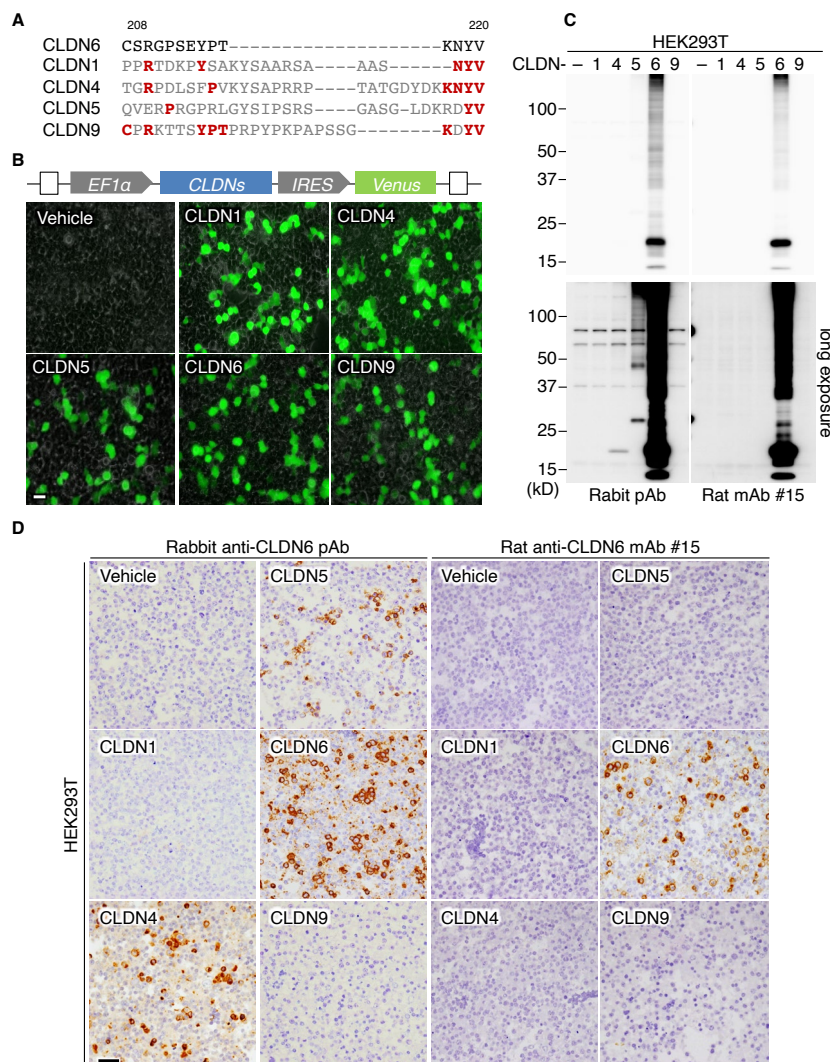
3. Kojima M et al. Aberrant claudin-6-adhesion signal promotes endometrial cancer progression via estrogen receptor α . *bioRxiv*. 2020

図1. CLDNを起点とした新規シグナル経路と細胞制御



CLDN, クローディン; SFK, Srcファミリーキナーゼ; PI3K, PI3キナーゼ; AKT, プロテインキナーゼB; RXR, レチノイドX受容体; RAR, レチノイン酸受容体; ER α , エストロゲン受容体 α ; LXR, 肝X受容体

図2. 抗CLDN6モノクローナル抗体の樹立



A. CLDN4, 6およびそれと近縁なCLDNファミリー分子のC末端アラインメント.

B. HEK293T細胞に各CLDNを強制発現させた結果を示す.

C. Bの細胞抽出物を用いたウエスタンブロット. 抗CLDN6ウサギポリクローナル抗体(市販)ではCLDN4とCLDN5に弱い交差反応が見られるが、ラットモノクローナル抗体では認めない.

D. Bのホルマリン固定パラフィン包埋セルブロックを用いたDAB方による免疫染色像を示す. 抗CLDN6ウサギポリクローナル抗体(市販)ではCLDN4とCLDN5に弱い交差反応が見られるが、ラットモノクローナル抗体では認めない. スケールバーは100 μ m.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Sugimoto Kotaro, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Endo Chihiro, Tanaka Satoshi, Sawada Norimasa, Watabe Tetsuya, Higashi Tomohito, Chiba Hideki	4. 巻 116
2. 論文標題 Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 24600 ~ 24609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913346116	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 -
1. 著者名 Sugino Takashi, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Tanaka Mizuko, Shishito Namiko, Miura Tomiko, Abe Masato, Muramatsu Koji, Oishi Takuma, Kakuda Yuko, Kawata Takuya, Akiyama Yasuto	4. 巻 36
2. 論文標題 Identification of S100A14 as a metastasis-promoting molecule in a murine organotropic metastasis model	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical & Experimental Metastasis	6. 最初と最後の頁 411 ~ 422
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10585-019-09979-w	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 -
1. 著者名 Imura Tetsuya, Kobayashi Yasuyuki, Suzutani Ken, Ichikawa Tomikawa Naoki, Chiba Hideki	4. 巻 29
2. 論文標題 Differential expression of a stress regulated gene Nr4a2 characterizes early and late born hippocampal granule cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Hippocampus	6. 最初と最後の頁 539 ~ 549
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hipo.23045	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 -
1. 著者名 Okai Ken, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Saito Akira C., Watabe Tetsuya, Sugimoto Kotaro, Fujita Daiki, Ono Chikako, Fukuhara Takasuke, Matsuura Yoshiharu, Ohira Hiromasa, Chiba Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel occludin-targeting monoclonal antibody prevents hepatitis C virus infection in vitro	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 16588 ~ 16598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24742	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 -

1. 著者名 Nishiura Keisuke, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Sugimoto Kotaro, Kunii Yasuto, Kashiwagi Korehito, Tanaka Mizuko, Yokoyama Yuichi, Hino Mizuki, Sugino Takashi, Yabe Hirooki, Takahashi Hitoshi, Kakita Akiyoshi, Imura Tetsuya, Chiba Hideki	4. 巻 8
2. 論文標題 PKA activation and endothelial claudin-5 breakdown in the schizophrenic prefrontal cortex	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 93382 ~ 93391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.21850	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 -

1. 著者名 Korehito Kashiwagi, Mai Yanagida, Daiki Matsui, Mizuko Tanaka, Kotaro Sugimoto, Honglei Chen, Naoki Ichikawa-Tomikawa, Shigeru Marubashi, Hiroyuki Suzuki, Hideki Chiba	4. 巻 33
2. 論文標題 Expression of liver X receptors in normal and refractory carcinoma tissues of the human lung and pancreas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 497-505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-11-949	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 該当する

1. 著者名 Fukuda Natsuki, Noi Kentaro, Weng Lidong, Kobashigawa Yoshihiro, Miyazaki Hiromi, Wakeyama Yukari, Takaki Michiyo, Nakahara Yusuke, Tatsuno Yuka, Uchida-Kamekura Makiyo, Suwa Yoshiaki, Sato Takashi, Ichikawa-Tomikawa Naoki, 他	4. 巻 22
2. 論文標題 Production of Single-Chain Fv Antibodies Specific for GA-Pyridine, an Advanced Glycation End-Product (AGE), with Reduced Inter-Domain Motion	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1695 ~ 1695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules22101695	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----