

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09445

研究課題名(和文) TCF-4/CLAUDIN-2/HES1軸による肝癌幹細胞様形質制御

研究課題名(英文) Regulation of Features of Liver Cancer Stem-like Cells through the TCF-4/CLAUDIN-2/HES1 Axis

研究代表者

古賀 浩徳 (Koga, Hironori)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90268855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt-Notchシグナルcrosstalkを解析した。SxxSSモチーフ欠失型TCF-4 isoform Jによって、CLAUDIN-2 (CLDN2)の発現亢進が見られた。SxxSSモチーフを有するK型mutantsを過剰発現させた肝癌細胞株を作成し、接着およびsphere条件下でのCLDN2およびHES1の発現レベルを検討した結果、TCF-4Jのsphereでは特異的に見られたCLDN2・HES1の発現増強は、TCF-4K-mutant 273Aで再現された。従って、HES1発現制御はTCF-4のSxxSSモチーフ欠損あるいはSer273リン酸化によって制御されている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、独自のTCF-4 isoformを用いWnt-Notch crosstalkの解明にアプローチする点が最大の特色であった。Cancer sphereに濃縮されるCLAUDIN-2はleaky tight junctionを形成し、かつNotchシグナル活性化を促進しHES1発現を増強することで癌幹細胞のstemness維持に寄与していると考えている。意義としては、Wnt/TCF-4下流分子CLAUDIN-2からのNotchシグナルリレーが明らかになり、CSCに対する新規治療標的を探索できる可能性を増やすことができる点だと考えている。

研究成果の概要(英文)：We investigated the Wnt-Notch crosstalk in liver cancer cells. Loss of SxxSS motif in TCF-4 led to upregulation of CLAUDIN-2 (CLDN2) mRNA. This finding coupled with upregulation of HES1 was also reproduced at protein levels in both sphere-forming J cells, that do not have SxxSS, and K-mutant cells, having engineered SxxSA motif. These findings suggested HES1 expression was regulated by the critical transcription factor TCF-4 isoforms in liver cancer cells.

研究分野：消化器病学

キーワード：T-cell factor-4 Wnt Claudin-2 Hes1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

GWAS 研究の成果から、Wnt シグナルの擾乱がヒト肝発癌および癌進展に極めて大きなインパクトを与えていることが示された (Fujimoto et al., Nat Genet 2012; Guichard et al., Nat Genet 2012). したがって、肝発癌予防や癌治療戦略を考える上で Wnt シグナル研究の持つ意味は以前にも増して大きい。

幹細胞学における Wnt シグナルの知見は CSC の挙動解析に大きく寄与している。肝癌においては EpCAM など Wnt/ $\beta$ -catenin /TCF-4 制御下分子が CSC (様細胞) マーカーとして同定されている (Yamashita et al., Gastroenterology 2009). しかしながら、通常の網羅的遺伝子解析や  $\beta$ -catenin に特化した Wnt シグナルの異常解析だけでは、CSC における複雑な Wnt シグナルの全容を本質的に理解することは困難である。 $\beta$ -catenin 非依存的 Wnt シグナル伝達系 (Toyama, Lee, Koga et al., Mol Cancer Res 2010) や epigenomic なシグナル調節機構、シグナル crosstalk などを加味した解析が必要である。

肝癌 CSC の細胞生物学的本質に Wnt シグナル側から迫るために、我々はその伝達系の中核転写因子 TCF-4 に着目し、その isoform をヒト肝癌細胞株から単離・同定した。その結果、新規 12 クローンを含む 14 クローンの TCF-4 isoforms を単離した (Tsedensodnom, Koga et al., Exp Cell Res 2011; GenBank 登録済み)。TCF-4 にはその転写活性と密接に関連する特徴的な構造が存在するが、過去の研究により、第 9 エクソンに内在する「SxxSS」モチーフが TCF-4 の転写活性を鋭く制御することが明らかになっている (Pukrop et al., JBC 2001, Hecht et al., JBC 2003). 我々はこのモチーフの有無によって比較可能な 3 つの isoform ペアの中で、J と K とに焦点を当てた構造機能相関を追求している。そしてこれまでに、「SxxSS」が肝癌細胞の 1) 造腫瘍性、2) 低酸素耐性 (以上, Koga et al., PLoS ONE 2012) という CSC (様細胞) の基本特性や、3) Wnt5a/b 発現を介した EMT 誘導 (米国癌学会 2015, 欧州消化器病学会 2015 等で発表) に関わることを見出ししてきた。

ところで近年、発生や種々の疾患における Wnt-Notch シグナル crosstalk への関心が高まっている。肝癌 CSC においても、Notch シグナルが CD90 陽性 CSC の stemness を促進しているとの報告もあり (Luo et al., Oncotarget 2016), 肝癌 CSC の挙動を理解する上で、この“crosstalk”研究の持つ重要性は今後さらに高まると考えられる。こうした背景の中、新規の TCF-4 isoform クローンを持つ我々は、Wnt シグナルの側から “Wnt-Notch crosstalk” を詳細に解析できる利点を有している。

本研究遂行の前に、予備的に進めてきた実験の結果を以下に示す。まず第一に、我々はこれまでの検討で、「SxxSS」モチーフを欠いた TCF-4J のほうが「SxxSS」を有した TCF-4K に比し有意に造腫瘍性が高く、*in vitro* でも cancer sphere を形成しやすいことを明らかにしてきたが、さらに今回、sphere の遺伝子・蛋白発現解析で、偶然 TCF-4J 過剰発現肝癌細胞 (J 細胞) において HES1 が著明に発現していることを見出した。

HES1 は、細胞の未分化性維持や、自らの発現振動 (oscillation) を介した神経幹細胞の多様な分化方向の決定に極めて重要な役割を果たしている (Kageyama et al., Development 2007). しかしながら肝癌とりわけ肝癌 CSC における HES1 の機能はほとんどわかっていない。ただ、Notch シグナルの高度な活性化が肝細胞を起源とした胆管細胞癌の発生を促すことが明確に示されていることから (Sekiya, Suzuki, JCI 2012), 肝癌発生や CSC 生存の分子機構に Notch シグナル分子 HES1 が深く関与していると考えられることは自然である。

次に Wnt シグナル側から “crosstalk” を見たとき、興味深い所見に気づいた。すでに網羅的遺伝子解析で「SxxSS」モチーフを欠いた TCF-4J による CLAUDIN-2 の発現増強を報告していたが (Tomimaru, Koga et al., Cancer Lett 2013), CLAUDIN-2 も HES1 同様、cancer sphere 形成下で著明に発現が亢進していたのである。CLAUDIN-2 は “leaky” な tight junction を構成する膜貫通蛋白であり、乳癌や肺癌、大腸癌などで高発現し、転移と相関することが報告されている (Tabariès et al., Mol Cell Biol 2012; Ikari et al., Biochim Biophys Acta 2012). Cancer sphere の維持・成長には、「細胞間接着の担保」と「細胞と細胞周囲環境との間でのスムーズな物質交換」が必要である。その点、この “leaky” な tight junction 構成蛋白の発現は極めて合理的だと推察する。これらの結果から、Wnt 下流分子 CLAUDIN-2 と Notch シグナル分子 HES1 との間に密な関連を想定した。実際、CLAUDIN-2 のノックダウンにより、HES1 の発現低下が見られたことから、この関連の可能性は高まった。しかも HES1 発現低下は Cleaved-NOTCH1 の発現低下を伴っていたことから、以下の仮説を考えた。①CLAUDIN-2 どちらのホモフィリックな結合により NOTCH リガンド-受容体結合が促進された結果、Notch シグナルが活性化し HES1 発現が増強した。②CLAUDIN-2 と NOTCH リガンドあるいは受容体と直接的に結合し、リガンド-受容体を膜に安定化させた。①は、造血幹細胞成熟過程における Notch シグナルの活性化が Jam1a-Jam2a という細胞接着分子によって制御されているという報告と矛盾しない (Kobayashi et al., Nature 2014). ②については、現在、免疫沈降にて CLAUDIN-2 と JAGGED1 の会合を観察し得ており、その所見を確定する必要があると考えている。

別の興味深い所見として、混合型肝癌細胞株である KMCH-1 および KMCH-2 が接着培養条件下でも顕著な CLAUDIN-2 発現を認め、比較的高い HES1 の発現も見られたことを挙げたい。これらは、CSC 様細胞が濃縮される sphere 形成下で発現すべき分子を恒常的に発現している点で興味深い。また、TCF-4 を遺伝子操作した特殊な系だけでなく、既存の細胞株やヒト

組織においても TCF-4/CLAUDIN-2/HES1 軸が機能している可能性を示唆している点で貴重な所見だと考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では「Wnt-Notch シグナル crosstalk と癌幹細胞 (CSC) stemness との関係」に着目し、Notch シグナル effector 分子 HES1 の発現が TCF-4 isoform 依存性に制御されている可能性を検討したい。具体的には、「SxxSS」欠失型 TCF-4 isoform で発現が著明に亢進する CLAUDIN-2 (tight junction 構成分子) が、いかに cancer sphere 形成に関わり、どのような機序で HES1 発現増強に関わっているかを明らかにし、TCF-4/CLAUDIN-2/HES1 軸が CSC 根絶に向けた治療標的となりうるかについて検討したい。

## 3. 研究の方法

「Wnt-Notch シグナル crosstalk と癌幹細胞 (CSC) stemness との関係」を、TCF-4 isoform とその下流分子 CLAUDIN-2, および Notch シグナル分子 HES1 との関連性から明らかにするため以下の検討をおこなう。①「SxxSS」モチーフを有する TCF-4K の変異型を用いて、CLAUDIN-2/HES1 発現が「SxxSS」依存性か否かを検証する。②J 細胞や混合型肝癌細胞株で発現が増強している CLAUDIN-2 がどのような機序で HES1 の発現を制御しているか、shRNA (CRISPR) による CLAUDIN-2 ノックダウン (ノックアウト) 細胞や CLAUDIN-2 過剰発現細胞で検討する。網羅的解析も加える③作成した CLAUDIN-2 ノックダウン (ノックアウト) 細胞や過剰発現細胞を用いて免疫不全マウスで造腫瘍能を検討する。④混合型肝癌や胆管細胞癌、肝細胞癌を含むヒト肝癌組織を用いて、CLAUDIN-2 と HES1 発現の関連性を検討する。

## 4. 研究成果

Wnt-Notch シグナル crosstalk を解析した。SxxSS モチーフ欠失型 TCF-4 isoform J によって、CLAUDIN-2 (CLDN2) の発現亢進が見られた。SxxSS モチーフを有する K 型 mutants を過剰発現させた肝癌細胞株を作成し、接着および sphere 条件下での CLDN2 および HES1 の発現レベルを検討した結果、TCF-4J の sphere ではほぼ特異的に見られた CLDN2・HES1 の発現増強は、TCF-4K-mutant 273A で再現された。従って、HES1 発現制御は TCF-4 の SxxSS モチーフ欠損あるいは Ser273 リン酸化によって制御されている可能性がある。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1 . 発表者名 Hironori Koga, Hideki Iwamoto, Takahiko Sakaue, Takuji Torimura
2 . 発表標題 Two-faced effects of Claudin-2 on Wnt signaling in liver cancer cells
3 . 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Hironori Koga, Fumitaka Wada, Mitsuhiko Abe, Hideki Iwamoto, Toru Nakamura, Takahiko Sakaue, Atsutaka Masuda, Toshimitsu Tanaka, Hirohisa Yano and Takuji Torimura
2 . 発表標題 The Wnt target CLAUDIN-2 regulates tumorigenesis and stemness in human liver cancer cells
3 . 学会等名 The 109th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research (AACR) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hironori Koga, Fumitaka Wada, Takahiko Sakaue, Hideki Iwamoto, Mitsuhiko Abe, Takuji Torimura
2 . 発表標題 Claudin-2 activates LKB1-AMPK signals, thereby inducing cell cycle arrest and autophagy in liver cancer cells
3 . 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4 . 発表年 2018年

1 . 発表者名 Hironori Koga, Yasuko Imamura, Fumitaka Wada, Mitsuhiko Abe, Hideki Iwamoto, Toru Nakamura, Takahiko Sakaue, Atsutaka Masuda, Toshimitsu Tanaka, Hirohisa Yano, Takuji Torimura
2 . 発表標題 Claudin-2 Activates LKB1-AMPK Signals, Thereby Inducing Cell-Cycle Arrest and Autophagy in Liver Cancer Cells
3 . 学会等名 The 69th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) (国際学会)
4 . 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironori Koga, Toru Nakamura, Fumitaka Wada, Hideki Iwamoto, Atsutaka Masuda, Takahiko Sakaue, Toshimitsu Tanaka, Mitsuhiko Abe, Jun Akiba, Hirohisa Yano, Takuji Torimura
2. 発表標題 HES1 critically regulates sphere-forming ability and tumorigenesis in WNT signal-engineered liver cancer cells
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hironori Koga, Yasuko Imamura, Fumitaka Wada, Yu Ikezono, Mitsuhiko Abe, Hideki Iwamoto, Toru Nakamura, Takahiko Sakaue, Atsutaka Masuda, Toshimitsu Tanaka, Hirohisa Yano, Takuji Torimura
2. 発表標題 The Wnt Target Gene CLAUDIN-2 Regulates Tumorigenesis of Combined Hepatocellular-Cholangiocarcinoma Cells
3. 学会等名 The Liver Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>先端癌治療研究センター肝癌部門  <a href="http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/">http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/</a>  すこやかな『次代』と『人』を創る研究拠点大学へ：先端がん治療・研究による挑戦  <a href="https://www.kurume-u.ac.jp/site/branding/">https://www.kurume-u.ac.jp/site/branding/</a>  久留米大学先端癌治療研究センター肝癌部門  <a href="http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/">http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/</a>  「すこやかな『次代』と『人』を創る研究拠点大学へ～先端がん治療・研究による挑戦～」  <a href="https://www.kurume-u.ac.jp/site/branding/">https://www.kurume-u.ac.jp/site/branding/</a></p>
---

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