

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17981

研究課題名(和文) 卵巣癌におけるクローディン発現の臨床病理学的・生物学的意義

研究課題名(英文) The significance of high claudin expression in ovarian cancer

研究代表者

小島 学 (KOJIMA, MANABU)

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30746970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌におけるクローディン6高発現の臨床病理学的意義については症例を増やして再検討をしたが有意差は得られなかった。一方で同時に行った子宮内膜癌の検討ではクローディン6高発現が5年生存と強い関連性を認めており、クローディン6は子宮内膜癌において強力な予後不良因子であることが示唆された。また分子生物学的検討では、クローディン6過剰発現株は野性株よりも増殖能と遊走能において亢進がみられること、エストロゲン受容体と共役して悪性形質の増強に関わること、エストロゲン受容体の活性化に必要なリン酸化部位がわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

婦人科癌の殺細胞剤の奏効率はタキサン・プラチナ製剤の出現によって飛躍的に向上したが、進行例の再発率は依然として高い。新たに開発された分子標的薬も全生存期間を有意に改善しないばかりか、腸管穿孔や血栓症等の有害事象が問題視されている。このようにいくつかの課題を抱える薬物療法の現状を鑑みると、細胞間接着分子クローディン6は腫瘍のみに発現する際だった特徴もつため、クローディン6を標的とする抗体薬を用いた治療戦略は理想的といえる。今後はクローディン-6抗体薬の作成やクローディン6を検出するコンパニオン診断薬の開発につながる成果を示したい。

研究成果の概要(英文)：Regarding the clinicopathologic significance of high expression of claudin-6 in ovarian cancer, the number of cases was reexamined and no significant difference was obtained. On the other hand, a simultaneous study of endometrial cancer found that high expression of claudin 6 was strongly associated with 5-year survival, suggesting that claudin-6 is a strong poor prognostic factor in endometrial cancer. It was In addition, molecular biology revealed that claudin-6 overexpressing strains showed higher proliferation and migration abilities than wild strains, that they were associated with estrogen receptor to enhance malignant phenotypes, and estrogen receptor the phosphorylation site required for the activation of was identified.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮内膜癌 核内受容体 シグナル伝達 クローディン エストロゲン受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着分子は、細胞同士を繋ぎ止める“糊”として機能するのみならず、シグナル伝達の“ハブ”としても働く。例えば、アドヘレンス結合分子カドヘリンはキナーゼ活性を有しないにも拘らず、隣接する細胞のカドヘリンと会合することによって細胞内シグナルを活性化。しかし、細胞間接着シグナルが寄与する細胞機能やその分子機構の全貌は分かっていない。研究協力者である本学基礎病理学講座・千葉英樹教授らは、タイト結合膜貫通分子であるクローディン(CLDN)ファミリーのうち、CLDN6 が初期胚幹細胞の上皮分化を誘導することを発見した。またこの新規上皮分化誘導シグナルが、1) CLDN6 の対合に関わる第 2 細胞外ドメイン(EC2)とシグナル伝達を担う C 末ドメインを介すること、2) 脊椎動物間で保存された 4 つのチロシン残基のうち 2 つを必要不可欠とすること、3) Src ファミリー・キナーゼ(SFK)のうち Blk 及び Src との相互作用を必須とすること、4) PI3K/Akt/mTOR/S6K 経路を介することを突き止めている。さらに CLDN6 による上皮分化誘導が、核内受容体であるレチノイド受容体及び hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4)の機能と類似していたことを端緒とし、CLDN6 シグナルがこれら核内受容体やエストロゲン受容体(ER)とクロストークすること、ポジティブフィードバックにより CLDN6 発現を亢進することを見出している。一方 CLDN6 は子宮内膜腺癌などいくつかのヒトがん組織で発現しているが、がん細胞における機能や生物学的意義は未解明であった。そこで研究者らは、『過剰な CLDN6 シグナルが ER など転写因子の転写活性を亢進させ、がんの悪性形質を増強する』という仮説を立てた。この着想を踏まえ、まず外科的に摘出されたヒト子宮内膜癌検体 141 例における CLDN6 の発現を免疫組織学的に検討し、スコア化した。その結果、CLDN6 高発現症例の 5 年生存率は 30%で、CLDN6 低発現症例に比べて著しく予後不良であることを見出した。また臨床病理学的因子のうち、臨床病期、組織型、組織グレード、脈管侵襲、リンパ節・遠隔転移、腹膜播種が、CLDN6 発現スコアと有意な正の相関を示した。この結果を受け、子宮内膜癌よりも CLDN6 陽性症例の割合が多いヒト卵巣腺癌(特に漿液性腺癌)においても、CLDN6 過剰発現ががんの悪性形質を増強している可能性を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、『CLDN6 ER シグナルクロストーク』に着目し、卵巣癌の新規悪性形質促進機構を解明することを目的とした。具体的には、まず CLDN6 高・低発現ヒト卵巣癌 150 症例を用いて、CLDN6 高発現と 5 年生存率や各臨床病理学的因子との相関を明らかにし、また、これらの既存パラフィン検体と新規凍結検体を用いて、CLDN6 シグナルとその最下流の ER を中心にクロストーク機構の有無を明らかにすることとした。さらに、CLDN6 及び ER の in vitro/vivo における gain of function や loss of function を検討し、CLDN6 ER シグナルが卵巣癌の悪性形質に及ぼす影響やその分子機構を解明することをめざした。

3. 研究の方法

CLDN6 高・低発現ヒト卵巣癌のパラフィン・凍結切片を用いて、以下の項目を免疫組織学的に検討し、CLDN6 シグナルとその受け手となる ER を中心としたクロストークの有無を評価する。

1) ER 発現スコア 2) ER ・プロゲステロン受容体(PR)発現スコア: ER の転写活性を阻害する代表的転写因子として検討する。 3) ER のリン酸化状態: 上述したように申請者らは、CLDN6 シグナルが初期胚幹細胞の SFK/PI3K/Akt/mTOR/S6K を活性化することを明らかにしている。一方、Akt 及び S6K は ER の Ser167 をリン酸化してリガンド非依存性に ER の転写活性を亢進させること、ER -Ser167 リン酸化は子宮内膜癌の予後不良因子であることが知られている。また最近、mTOR が ER の Ser104/106 をリン酸化して ER 標的遺伝子の転写を活性化することも報告された。これら自他の知見から、卵巣癌組織を抗 CLDN6 抗体と抗 ER -Ser104/106/167 リン酸化抗体(いずれも市販)で二重染色し、CLDN6 発現細胞において ER の Ser104/106/167 がリン酸化されているかを評価する。また、SFK/PI3K/Akt/mTOR/S6K の各リン酸化抗体を用いた多重染色を行い、卵巣癌における CLDN6 過剰シグナルが ER とクロストークし得ることを示す。

CLDN6 または ER を発現しているヒト卵巣癌細胞株については、いくつか知られている。しかしながらヒト卵巣癌細胞株を用いて、CLDN6 と ER の両方の分子を定量的に評価した報告はない。そこでまずウエスタンブロット法によって、一般的に使用されている複数の卵巣癌細胞株(OV90-P7, UCI-101, Hey, A2780, Caov-3, OVCAR-3, PE04, OV2008, SKOV3, C3)について両分子の発現プロファイルを解析する。その結果をもとに、CLDN6 高発現株については CLDN6 のノックアウト株および ER の過剰発現株を、ER 高発現株に対しては ER ノックアウト株と CLDN6 過剰発現株をそれぞれ樹立し、それらの細胞増殖・生存、運動・遊走・浸潤等の悪性形質を親株と比較する。また ER に関しては Ser104/106/167 リン酸化状態による影響も検討するため、それらのセリン残基をアラニン残基(恒常的非リン酸化・非活性化型)およびグルタミン酸残基(恒常的リン酸化・活性化型)に置換した変異体を導入し、同様に検討する。

4. 研究成果

卵巣癌におけるクローディン 6 高発現の臨床病理学的意義については有意差が得られなかった。一方で宮内膜癌の検討ではクローディン 6 高発現が 5 年生存と強い関連性を認めており、また

クローディン 6 高発現は他のどの臨床病理学的因子よりも強く生命予後の悪化に寄与していた。学外の施設の症例も含めて検討したが同様の結果であった。また分子生物学的検討では、クローディン 6 の対合がエストロゲンレセプター とクロストークすることにより子宮内膜癌細胞株の悪性形質を増強していることを複数の細胞株で確認した。またクローディン 6 およびエストロゲンレセプター の存在下で転写が亢進する遺伝子も複数確認した。クローディン 6 からエストロゲンレセプター までのシグナル伝達に関わる分子やエストロゲンレセプター のリン酸化部位については現在同定を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 MANABU KOJIMA
2. 発表標題 THE HIGH EXPRESSION OF CLAUDIN-6 IS A POOR PROGNOSTIC FACTOR IN UTERINE ENDOMETRIAL CARCINOMA
3. 学会等名 17th Biennial Meeting of the International Gynecologic Cancer Society (IGCS 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kojima.M
2. 発表標題 Clinicopathological significance of claudin-6 expression in uterine endometrial cancer
3. 学会等名 第69回日本産科婦人科学会
4. 発表年 2017年

〔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
研究協力者	千葉 英樹 (CHIBA HIDEKI)		
研究協力者	杉本 幸太郎 (SUGIMOTO KOUTAROU)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	田中 瑞子 (TANAKA MIZUKO)		
研究協力者	富川 直樹 (TOMIKAWA NAOKI)		
研究協力者	柏木 維人 (KASHIWAGI KOREHITO)		