

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：20101
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2019
課題番号：18K15084
研究課題名(和文) クローディン18とがん微小環境制御機構 - 酸性化に果たす役割

研究課題名(英文) Claudin-18 and tumor microenvironment

研究代表者

高澤 久美 (Takasawa, Kumi)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50359709

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本来、胃特異的に発現するタイト結合関連タンパク質のクローディン18.2(以下、CLDN18)が、種々のがんで異常発現し、予後不良に関与することが近年報告されている。本研究では、がん細胞におけるCLDN18発現上昇の意義と役割を、がん細胞をとりまくがん微小環境との関連に着目して検討した。がん微小環境を模した複数培養条件下において、胆管がん細胞におけるCLDN18発現が変動することを確認し、タイト結合関連機能評価を行った。また、CLDN18発現変動が見られた条件下で培養した細胞の網羅的タンパク質発現解析を行い、対照と比較して発現変動が見られた分子群の発現解析及びCLDN18との相互作用を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローディン18に関する研究では、claudiximab(抗クローディン18抗体)の胃がんに対する臨床治験が行われており、未治療群と比べて有意に予後を改善するという良好な結果が報告されている。今後、クローディン18が高発現する他臓器がんへの適応の拡大も期待され、いまだ判然としない claudiximab の抗腫瘍効果発現機序の解明は重要課題となっている。がんにおけるクローディン18発現とがん微小環境の相互作用を理解することは、学術的意義にとどまらず、がんの新規治療戦略構築にも貢献し得る。

研究成果の概要(英文)：In normal tissues, a tight junction protein claudin-18.2 (CLDN18) shows stomach-specific expression pattern. Recent studies have revealed that CLDN18 is aberrantly expressed in tumors derived from various organs and is associated with poor prognosis. In our previous studies, we have reported that CLDN18 is aberrantly expressed in pancreatic and bile duct cancers by using immunohistochemistry on surgical specimens and that CLDN18 contributes to malignant potentials of bile duct cancer cells.

In the present study, we confirmed that expression of CLDN18 was altered under several culture conditions mimic to tumor microenvironment by using Western blotting and immunofluorescence and evaluated tight junctional functions under the conditions. We performed comparative shotgun proteome analysis to identify candidate molecules which is associated with aberrant expression of CLDN18 and evaluated the expression pattern and interaction with CLDN18.

研究分野：細胞生物学

キーワード：クローディン18 タイト結合 がん微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞を含む組織集団は、がん細胞の生存・増殖に有利な環境、「がん微小環境」を形成する。中でも、酸性環境の形成は、上皮内がんの段階から生じており、低酸素化と並び、がん進展に重要な役割を果たしている。酸性環境の形成は、がん細胞周囲の間葉系細胞や、がん細胞自身の代謝変化に由来している。がん細胞では、グルコース代謝が亢進して乳酸が蓄積する。その乳酸がイオン化して水素イオン量が増え、細胞内 pH が低下(酸性化)する。細胞内の酸性化は有害であるため、がん細胞はプロトンポンプなどを利用して、細胞内の水素イオンや乳酸を細胞外に排出する。その結果、がん細胞の周囲は酸性化する。酸性環境は、がん細胞自身の増殖・浸潤・転移を促進すると共に、抗がん免疫応答からの防御シールドとなるため、がん細胞集団の生存・増殖に有利となる。しかし、酸性環境の形成機構、酸性環境からの保護機構には不明な点が多く残っている。

クローディンは、上皮細胞・内皮細胞の細胞間接着装置タイト結合を形成する膜貫通型タンパク質であり、細胞 - 細胞間の分子の透過をコントロールしている。本研究で注目したクローディン 18.2 (CLDN18) は、胃型クローディンと呼ばれ、胃で特異的に発現し、胃酸バリアの形成に重要な役割を果たしている。近年、CLDN18 欠損マウスの作製とその表現型解析で、胃の上皮に発現する CLDN18 の欠損により、胃の pH 上昇(アルカリ化)、プロトンポンプ H⁺/K⁺ ATPase の発現低下が報告された。この事実から、CLDN18 が、胃酸からの胃上皮の保護のみならず、胃酸産生・分泌に重要な役割を果たしていることが示唆された。

申請者は、クローディン 18.2 (CLDN18) が膵がん・胆管がんを高発現するバイオマーカーであること、CLDN18 が ERK の活性化と関連して胆管がん細胞の悪性化に寄与することを明らかにしてきた。また、CLDN18 の細胞外ドメインを認識する抗体が、CLDN18 発現がん細胞の増殖を抑制することを同時に報告した。膵がん・胆管がんは非常に予後不良ながんである。また、肺腺がんでは CLDN18 が高発現する群は予後不良であること、子宮頸部腺がんの中でも、CLDN18 が高発現する胃型腺がんは予後が悪い組織型であることが報告されている。これらの事実は、CLDN18 が高発現するがん腫は総じて悪性度が高いことを示している。しかし、細胞表面に発現する膜貫通型タンパク質である CLDN18 が、具体的にどのような分子メカニズムを介して悪性化に寄与するかは未解明である。

2. 研究の目的

以上の研究背景より、本研究では、胃特異的に発現するクローディン 18.2 (CLDN18) が、他臓器でどのような分子メカニズムでがん細胞の悪性化に関与するかを、酸性がん微小環境の形成および酸性環境からのがん細胞の保護に着目して明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞外環境の変化と CLDN18 発現

- ・細胞外酸性化には、低酸素下での解糖系による乳酸産生の亢進が関与していることから、各種細胞株に、低酸素やそれに関与する刺激を行い、CLDN18 の発現変化を解析する。
- ・プロトン濃度だけでなく、塩酸、乳酸、ピルビン酸など、複数の酸性物質を用いて、異なる酸性環境での CLDN18 発現変化を解析する。

(2) CLDN18 の酸性環境への寄与

- ・CLDN18 の発現抑制で、培養液の酸性化、周囲酸性環境への耐性に変化があるか確認する。

(3) CLDN18 誘導・抑制環境での mRNA、タンパク質の網羅的解析

- ・CLDN18 の発現変化を誘導する条件でのタンパク質の網羅的解析を行う。

・ CLDN18 高発現、低発現で変化するタンパク質の網羅的解析を行う。

4 . 研究成果

(1) 細胞外環境の変化と CLDN18 発現

がん細胞株に対して、低酸素、CoCl₂、TGF 刺激を行ったところ、複数の細胞株で CLDN18 発現が増加した。タイト結合機能の変化は、低下する細胞株も見られたが、上昇する細胞株も見られた。両者の差異については、CLDN18 以外の分子の挙動を含め、検討中である。また、酸性環境下では、複数のタイト結合蛋白質の発現変化が確認された。CLDN18 については、その発現が増加する細胞株が複数見られた。タイト結合が機能を発揮している細胞株の場合、弱酸性環境は一過性にはタイト結合機能を上昇させた。また、CLDN18 を含むタイト結合蛋白質の発現は、酸性物質の違いにより、異なる挙動を示した。これは、酸性環境が単純にプロトン濃度によるものではなく、酸性環境を作り出す物質によっても異なることを示唆する結果である。現在、これらの違いについて、検討を行っている。

(2) CLDN18 の酸性環境への寄与

CLDN18 を高発現する細胞株を用い、一過性に CLDN18 発現を抑制し、各種酸性環境への曝露を行ったが、一過性発現での結果は再現性に乏しかった。shRNA および CRISPR-Cas9 を用いた定常的な発現抑制および発現欠損株での検討が必要と考え、現在、これらの細胞株の樹立を試み、いくつかの安定発現抑制株を得ている。これらを用いて、CLDN18 発現が酸性環境への適合に及ぼす影響を解析している。

(3) CLDN18 誘導・抑制環境でのタンパク質の網羅的解析

(2)で作成した CLDN18 安定発現抑制株とコントロール株を用いた、比較プロテオーム解析を行った。その結果、タイト結合蛋白質のみならず、そのほかの細胞間接着にかかわるタンパク質やシグナル伝達にかかわるタンパク質が複数変化することが確認された。また、複数の酸性環境で培養したがん細胞株と、そのコントロール株を用いた、比較プロテオーム解析を行った。プロテオーム解析から主成分分析を行ったところ、(1)で得られた結果を反映し、異なる酸性環境では、主成分分析はそれぞれ異なる分布を示した。CLDN18 発現により変化したタンパク質群と、酸性環境下で変化したタンパク質群について、両者で共通するタンパク質を複数同定し、ウエスタンブロットでもその発現変化を確認した。以上の結果をまとめたものを投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Murata M, Osanai M, Saito T, Sawada N.	4. 巻 20
2. 論文標題 Estrogen/GPR30 Signaling Contributes to the Malignant Potentials of ER-Negative Cervical Adenocarcinoma via Regulation of Claudin-1 Expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neoplasia	6. 最初と最後の頁 1083-1093
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neo.2018.08.010.	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 Murata M, Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Kawada Y, Yamamoto A, Ono Y, Hiratsuka Y, Kojima T, Sawada N.	4. 巻 366
2. 論文標題 Occludin induces microvillus formation via phosphorylation of ezrin in a mouse hepatic cell line.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 172-180
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2018.03.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Osanai M, Takasawa A, Takasawa K, Murata M, Sawada N.	4. 巻 15
2. 論文標題 Retinoic acid-metabolizing enzyme cytochrome P450 26A1 promotes skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 9987-9993
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2018.8599.	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 Aoyama T, Takasawa A, Takasawa K, Ono Y, Emori M, Murata M, Hayasaka T, Fujitani N, Osanai M, Yamashita T, Hasegawa T, Sawada N.	4. 巻 189
2. 論文標題 Identification of Coiled-Coil Domain-Containing Protein 180 and Leucine-Rich Repeat-Containing Protein 4 as Potential Immunohistochemical Markers for Liposarcoma Based on Proteomic Analysis Using Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Pathol	6. 最初と最後の頁 1015-1028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ajpath.2019.01.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ino Y, Akimoto T, Takasawa A, Takasawa K, Aoyama T, Ueda A, Ota M, Magara K, Tagami Y, Murata M, Hasegawa T, Saito T, Sawada N, Osanai M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Elevated expression of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) is associated with poor prognosis in patients with uterine cervical adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 18157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14670/HH-18-157	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 高澤久美、高澤啓、小山内誠、青山智志、小野祐輔、村田雅樹、澤田典均
2. 発表標題 Overexpression of claudin-18 contributes to malignant potentials of bile duct cancer
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Makoto Osanai
2. 発表標題 Role of claudin-18 on malignant potentials of bile duct cancer.
3. 学会等名 Eleventh AACR-JCA Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Taishi Akimoto, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Tsuyoshi Saito, Makoto Osanai
2. 発表標題 Significance of estrogen/GPR30 signaling and claudin-1 in cervical adenocarcinoma
3. 学会等名 The 38th Sapporo International Cancer Seminar (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kumi Takasawa, Akira Takasawa, Tomoyuki Aoyama, Yusuke Ono, Makoto Osanai.
2. 発表標題 Significance of claudin-18 and EGFR/ERK signaling in bile duct cancer.
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----