

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15958

研究課題名(和文)タイト結合分子クローディンにより増強される小細胞肺癌の悪性形質とその分子機構

研究課題名(英文)The mechanism of malignant phenotype in small cell lung cancer enhanced by claudins

研究代表者

柏木 維人(Kashiwagi, Korehito)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：50722451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々ヒトの体の中の組織は無数の細胞からできており、隣り合う細胞同士は細胞間接着装置によって接着している。細胞間接着装置のひとつであるタイト結合の主要な構成分子であるクローディンは正常組織には勿論のことがん組織にも発現しているが、その発現パターンは正常とがんとでは異なる。今回、予備実験の結果から27種類あるクローディンの中でもクローディン4に着目し、クローディン4が小細胞肺癌の悪性形質を制御する可能性を検討した。その結果、クローディン4の発現が小細胞肺癌細胞の増殖抑制および転移を促進する上皮間葉転換に関連する分子の発現抑制に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、タイト結合分子のひとつであるクローディン4が小細胞肺癌の悪性形質を抑制する性質を持つ可能性が示唆された。これまでにクローディンは様々ながんにおいてその存在意義を明らかにする研究が行われていたが、小細胞肺癌においては殆ど行われていなかった。したがって、本研究は小細胞肺癌とクローディンに関する先駆的研究であり、その意義は大きいものと考えられる。本研究を踏み台とし小細胞肺癌におけるクローディンの存在意義がさらに明確になれば、クローディンの診断マーカーとしての利用や、クローディンを狙った分子標的治療法の開発などにつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our body is composed of various cells, and cells attach one another by cell adhesion systems including tight junction. Claudins are major molecules comprising tight junction and express in normal and cancer tissues. The function of claudins in various cancers has been investigated; however, the investigation in small cell lung cancer (SCLC) has hardly been done. The mechanism of a malignant phenotype regulation by claudin 4 in SCLC was investigated. The result showed that claudin 4 inhibited cell proliferation and the expression of genes relating to epithelial-mesenchymal transition.

研究分野：実験病理学

キーワード：肺がん 細胞間接着 がんの増殖 がんの転移

### 1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌(以下 SCLC)は肺癌の約 20%を占め、高い再発率と低い生存率を特徴とする難治性がんである。SCLC の発生母地と考えられている神経内分泌細胞や II 型肺癌上皮細胞など、多くのがんの発生母地となる上皮細胞では、タイト結合・アドヘレンス結合・デスモソームからなる細胞間接着装置が良く発達している。その装置を構成する細胞間接着分子は細胞同士の接着に関与するだけでなく、近傍のシグナル伝達分子と相互作用することで細胞内シグナル伝達を活性化し、細胞の分化や増殖を制御することが知られている。4 回膜貫通型タンパク質であるクローディン(以下 CLDN)は、タイト結合の主要な構成分子であり、27 種類のサブタイプからなる CLDN ファミリーを形成している。CLDN は正常組織だけでなくがん組織にも発現し、その発現パターンは正常とは異なるパターンを示すことが知られ、また CLDN の発現自体が増殖・浸潤・転移といった腫瘍の悪性形質に影響を与えることが近年数多く報告されている。

我々は本研究の開始以前に、CLDN ファミリーのひとつである CLDN6 が Src ファミリーキナーゼ(SFK)と共役することに端を発したシグナルが PI3K/Akt/mTOR 経路を介して核内受容体とクロストークし、マウス幹細胞の上皮分化を誘導するという知見を得ていた(引用文献)。一方で、CLDN6 と SFK の共役に重要な CLDN6 の C 末端に存在する 2 つのチロシン残基が CLDN4 にも保存されており、また予備実験において SCLC 患者から得た検体には CLDN6 の発現はみられないが CLDN4 の発現は複数の検体においてみられることを確認していた。これらの背景などから、「CLDN4 と SFK の相互作用に端を発したシグナルが PI3K 等のプロテインキナーゼを介して核内受容体(転写因子)とクロストークすることにより、SCLC の悪性形質を増強しているのではないか」という仮説を立てた。さらに、SCLC と CLDN に関する研究はほとんど行われておらず、その意義、新規性が高いと考え、本研究を行うに至った。

### 2. 研究の目的

CLDN4 シグナルが SCLC の増殖、浸潤、転移及び遊走といった悪性形質制御にどのように関与しているのか、またそれに関わるメカニズムを分子生物学的研究手法を用いて明らかにする。本研究により CLDN4 による SCLC の悪性形質制御機構が解明されれば、将来的には CLDN4 が SCLC の分子標的治療や診断マーカーの標的・対象分子としての応用につながることを期待される。

### 3. 研究の方法

まず TKB15、H1688 といった複数の SCLC 細胞株からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法によって CLDN4 の発現状態を検討した。さらにそれらの細胞株の中から、CLDN4 の発現のない細胞株にはウイルスベクターを用いて CLDN4 を導入し、一方で CLDN4 の発現のある細胞株は CRISPR/Cas9 を用いて CLDN4 のノックアウトを行い、CLDN4 の細胞増殖や浸潤・遊走などの悪性形質への関与を検討した。

### 4. 研究成果

(1) SCLC 細胞株を計 6 株用意し、それらの細胞株における CLDN4 タンパクの発現状態をウェスタンブロット法により検討した(図 1)。その結果、H1688 は CLDN4 を強発現し、TKB16、TKB17 および Lu135 においては弱から中程度の発現がみられた。一方で、TKB15 および Lu139 においては CLDN4 発現がみられなかった。従って、SCLC 細胞株では細胞株によって CLDN4 の発現状態に大きな差異がみられることが明らかとなった。尚、CLDN4 の mRNA 発現は各 SCLC 細胞で普遍的にみられ、タンパクレベルとの相関はみられなかった(データ不掲載)。

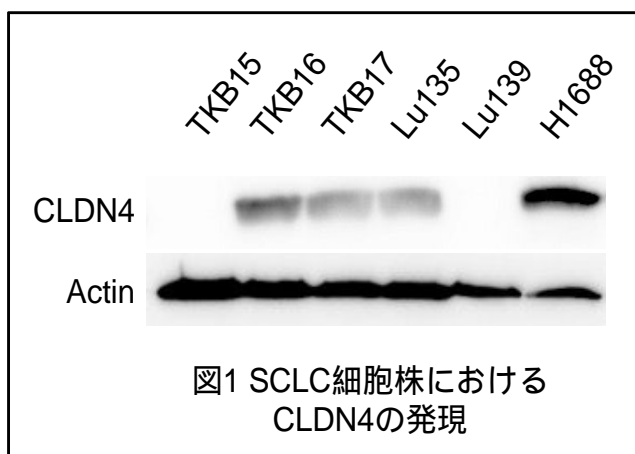


図1 SCLC細胞株における CLDN4の発現

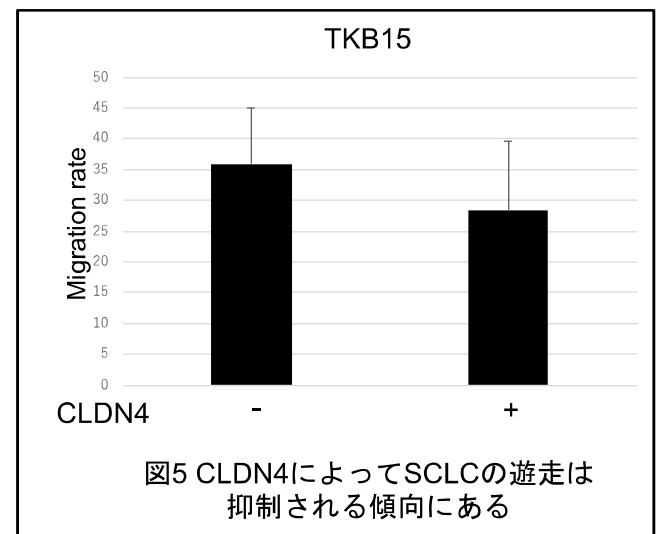
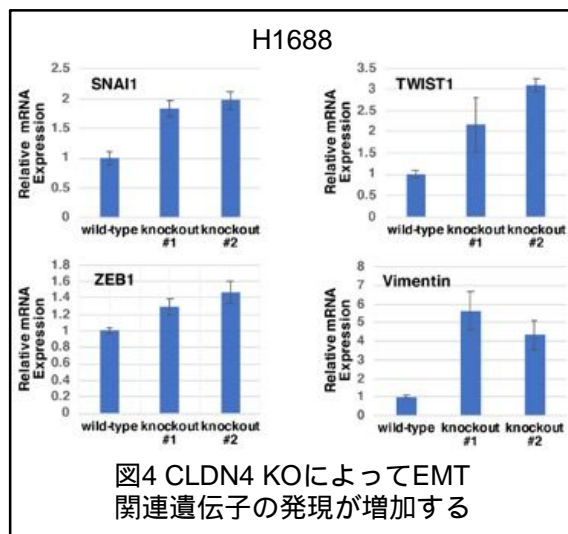
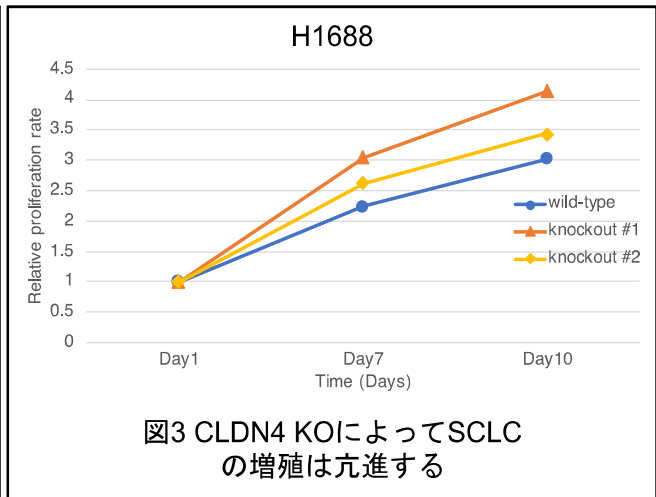
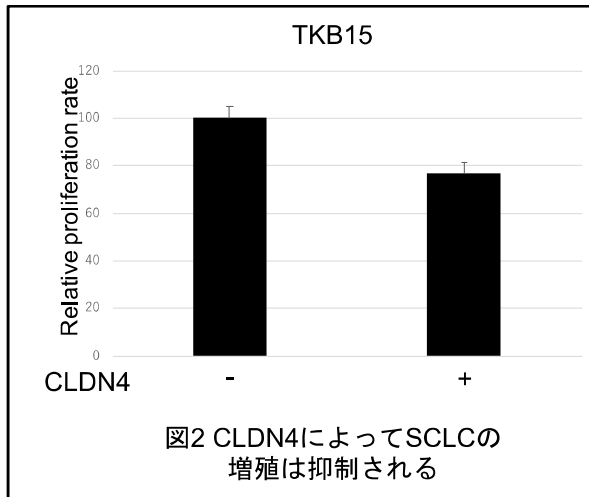
(2) (1)にて CLDN4 の発現がみられなかった TKB15 にはレンチウイルスベクターを用いて CLDN4 を導入し、一方で CLDN4 が強発現していた H1688 は CRISPR/Cas9 によるゲノム編集法を応用したレンチウイルスベクターを用いて CLDN4 のノックアウト(KO)を行った。尚、TKB15 の CLDN4 導入細胞株はテトラサイクリン系薬剤を加えると発現が誘導される Tet-On システムを用いた。各種ウイルスを感染後、2 週間程度のピューロマイシンによる薬剤選択を行い、さらにシングルセル分注機を用いて細胞のクローン化を行った後に各種検

討に用いた。

- (3) (2)にて作成した CLDN4 導入細胞株と KO 細胞株を用いて、細胞増殖アッセイを行い CLDN4 の SCLC 細胞株の増殖に与える影響を検討した (図 2, 3)。その結果、TKB15 においては CLDN4 の発現誘導により細胞増殖は抑制され、一方で H1688 においては CLDN4 KO によって細胞増殖の亢進がみられた。したがって、SCLC 細胞株において CLDN4 は細胞増殖抑制機能を持つことが明らかとなった。
- (4) CLDN4 の転移、浸潤及び遊走への関与を検討すべく、上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子の発現状態を H1688 CLDN4 KO 細胞株を用いて検討した (図 4)。その結果、CLDN4 KO によりわずかながら EMT 関連遺伝子の発現が増加した。この結果から、CLDN4 は SCLC の転移、浸潤及び遊走に対して抑制的に働く可能性が示唆されたため、CLDN4 導入及び KO 細胞株を用いて創傷治癒アッセイを行った (図 5)。その結果、CLDN4 の発現により SCLC 細胞株の遊走が抑制される傾向にあることは示されたが、CLDN4 発現有無両群間の差が有意であるかについては本研究期間中には示すことができなかった。従って、今後さらなる検討を行いたいと考えている。尚、SCLC 細胞株の多くは浮遊系が主体であり通常培養状態では培養皿底面への接着が弱いため、培養皿底面を各種コート剤によりコートし接着性を高めた状態で検討を行った。
- (5) CLDN4 の悪性形質制御機構だけでなく、SCLC において CLDN4 の発現はどのようなメカニズムで制御されているのかを明らかにしたいと考え、SCLC において CLDN4 の発現を制御する可能性のあるいくつかの候補分子 (主に転写因子) をこれまでの論文報告等からピックアップすることができた。しかしながら、研究期間内には検討実施まで至らなかった。今後はさらなる検討を行いたい、CLDN4 による SCLC の悪性形質制御機構の全容を明らかにしていきたいと考えている。

#### 引用文献

Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, Endo C, Tanaka S, Sawada N, Watabe T, Higashi T, Chiba H. Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. 116(49):24600-24609.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------