

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：21601  
研究種目：若手研究  
研究期間：2018～2019  
課題番号：18K16264  
研究課題名(和文) クローディングシグナルによる乳癌の悪性形質増強機構

研究課題名(英文) Functional analysis of CLDN4.

研究代表者

村上 祐子 (Murakami, Yuko)

福島県立医科大学・医学部・助手

研究者番号：40815081

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)：細胞間接着分子クローディング(CLDN)ファミリーは様々な細胞機能を制御するが、なかでもシグナル機能についてはほとんど解明されていない。CLDN6から核内受容体に至るシグナル経路が子宮体がんの悪性形質を増強するという先行研究をもとに、進化的にCLDN6と近縁で乳がんが発現するCLDN4に着目し、その分子機能を明らかにすべく研究を進めた。乳がん細胞株においてCLDN4はSrcファミリーキナーゼ依存的に増殖能、遊走能、および浸潤能を正に制御していた。また下流標的として複数の増殖関連遺伝子やがん代謝関連遺伝子が抽出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では過剰なCLDN4シグナルが乳癌細胞株の増殖能、遊走能および浸潤能を増強することを明らかにした。またこのシグナルはSFK/PI3K/AKT経路を介して、LXR を活性化することで悪性形質を促進する可能性が示された。CLDN4のシグナルによる乳癌悪性形質増強機構の全貌を明らかにすることで、新たなバイオマーカーや治療標的として有用となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The tight-junction molecule claudin family regulates various cellular events. Our previous studies show that a signaling pathway from CLDN6 to nuclear receptors triggers epithelial differentiation and endometrial cancer progression. In this study, we dissected molecular functions of CLDN4, which cytoplasmic domain is highly conserved with CLDN6 and is abundantly expressed in breast cancer tissues. CLDN4 enhanced cell proliferation, migration, and invasion on Src family kinase-dependent manner in multiple breast cancer cell lines. RNAseq result suggests that CLDN4-signal targets diverse genes involved in cancer malignancy.

研究分野：一般外科

キーワード：乳がん クローディング 転写因子

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

クローディン(CLDNs)はタイト結合の主要構成分子であり、20種類以上からなるファミリーを構成して組織、細胞ごとに特有の分布を示す。近年 CLDNs ががんの浸潤や増殖を制御することがわかってきており、特定の CLDNs 発現は腫瘍の悪性形質を決定する上で重要な役割を担っている可能性がある。我々はこれまでに CLDN6 から核内受容体に至る新規のシグナル経路を解明し、それが正常幹細胞の上皮分化トリガーとして機能することを突き止めた。また子宮内膜癌では過剰な CLDN6 シグナルがエストロゲン受容体のセリンリン酸化を介して悪性形質を増強することがわかった。乳癌でしばしば高発現する CLDN4 は CLDN6 と近縁で、シグナル伝達に関わる C 末端細胞内ドメインがよく保存されていることから、乳癌においては過剰な CLDN4 接着シグナルによる悪性形質増強機構が存在すると仮説を立てた。

### 2. 研究の目的

乳癌細胞株および乳癌手術検体を用いて CLDN4 接着シグナルによる悪性形質増強機構を明らかにする。

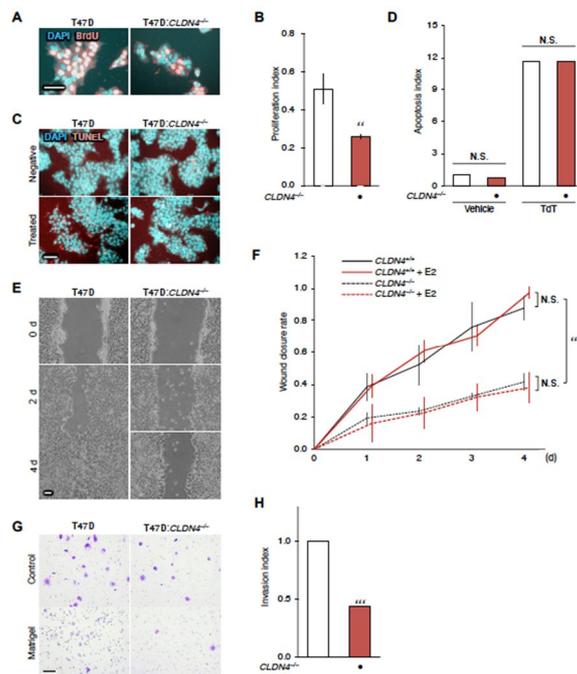
### 3. 研究の方法

CLDN4 陽性乳癌細胞株 T47D と MCF-7 に対し、CRISPR 法で CLDN4 のノックアウト細胞株を樹立し、一方で CLDN4 陰性の MDA-MB-231 については CLDN4 過剰発現を実施し、それぞれ野生型と悪性形質を比較解析した。また CLDN4 の機能ドメインを同定するため、ノックアウト細胞に様々な変異体をレスキュー導入して検討した。CLDN4 シグナルの標的を同定するため、RNA シークエンスで親株とノックアウト株のトランスクリプトームを比較した。

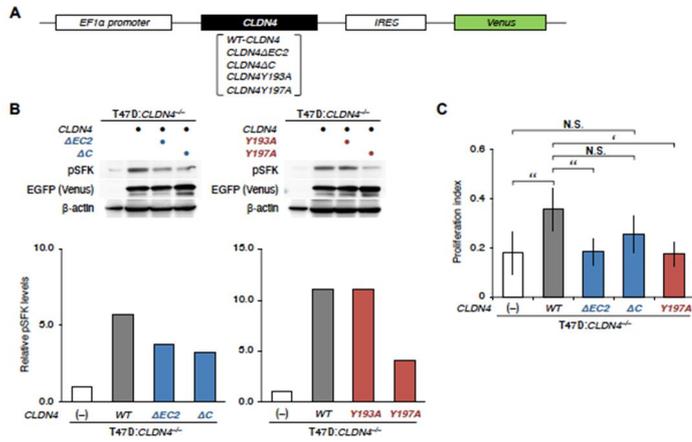
### 4. 研究成果

CLDN4 は増殖能、浸潤能、および遊走能を正に制御していることがわかった。さらに CLDN4 による悪性形質増強には CLDN4 の対合と、C 末端ドメインにある第 197 チロシンが必須であった。CLDN4 シグナルは様々ながん関連遺伝子の発現を制御しており、特に脂質代謝関連遺伝子群が多く抽出されたことから、本シグナルは肝 X 受容体(LXR)に帰結する可能性が考えられた。

手術検体を用いた臨床病理学的検討では、CLDN4 発現単独では乳がん患者の予後や臨床病理学的因子とは相関しなかったが、CLDN4 陽性かつ LXRβ 高発現群では予後不良である可能性が示唆された。

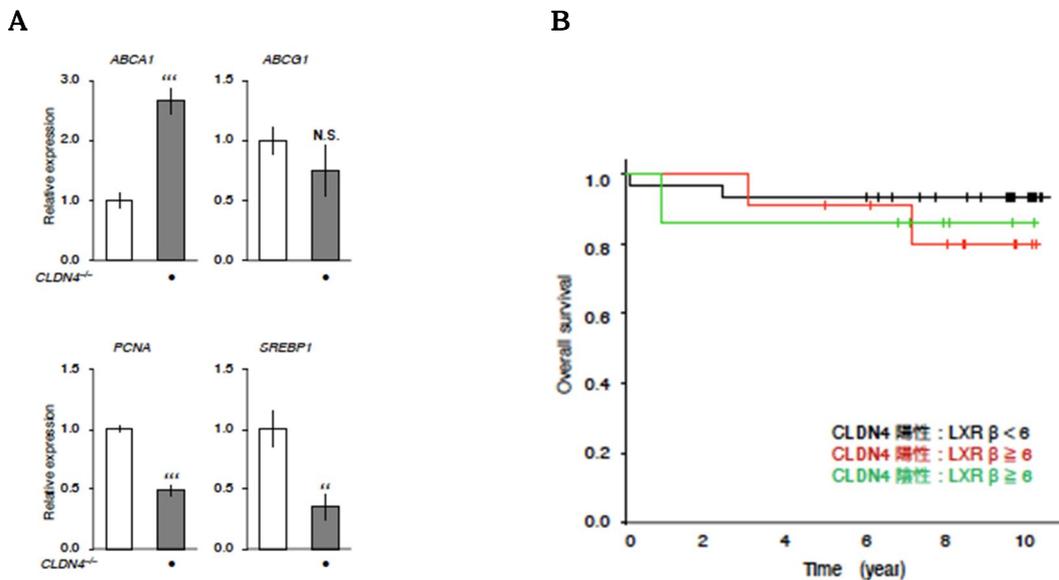


**CLDN4 は乳癌細胞株 T47D の増殖能、遊走能、および浸潤能を亢進する**  
(A, B) BrdU アッセイによる細胞増殖能の評価。エラーバーは標準偏差を示す。N = 4. (C, D) TUNEL アッセイによるアポトーシスの評価。TdT, Terminal Deoxynucleotidyl Transferase; N.S., not significant. (E, F) 創傷治癒アッセイによる遊走能の評価。エラーバーは標準偏差を示す。N = 5. (G, H) マトリゲル浸潤アッセイによる浸潤能の評価。N = 20. Bars, 50  $\mu$ m. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$



### CLDN4 による SFK 活性化と増殖能促進には EC2 と Y197 が必要である

(A) 導入したプラスミドベクターの概略図を示す。(B) T47D:CLDN4<sup>-/-</sup>に CLDN4 の野生型と変異体を一過性にレスキュー導入した細胞抽出物を用いたウエスタンブロット。抗 EGFP 抗体は Venus を標識する。グラフは第 1 レーンを 1 とした pSFK シグナルの相対値を示す。EC2, 第二細胞外ループ欠損体; C, C 末端細胞内ドメイン欠損体; Y193A/Y197A, 第 193/197 番チロシンのアラニン置換体。(C) それぞれのレスキュー細胞における BrdU 取込み率を示す。N.S., not significant; \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$



(A) 代表的な LXR 標的遺伝子について, T47D と T47D:CLDN4<sup>-/-</sup> の mRNA 発現量を RT-qPCR で比較したグラフを示す。エラーバーは標準偏差。N = 3. N.S., Not significant; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ 。

(B) CLDN4 の発現の有無と LXR 低発現・高発現をそれぞれの組み合わせの生存曲線を示す。CLDN4 陽性かつ LXR 高発現群が予後不良の傾向がある。\*,  $p < 0.05$ 。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 村上祐子
2. 発表標題 乳癌におけるクローディン発現の分子生物学的検討
3. 学会等名 第26回日本乳癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上祐子
2. 発表標題 乳癌におけるクローディン4発現の分子生物学的検討
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村上祐子
2. 発表標題 CLDN4の乳癌悪性形質増強機構の解明
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村上祐子
2. 発表標題 乳癌におけるCLDN4発現の分子生物学的検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----