

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18224

研究課題名（和文）接着分子CLDN12は子宮頸癌と子宮体癌の診断マーカー・新規治療標的となりうるか

研究課題名（英文）Is CLDN12 a novel biomarker or a novel target for cervical cancer and endometrial cancer?

研究代表者

遠藤 雄大（Endo, Yuta）

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00868896

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）：クローディンは密着分子の一つであり、組織特異的な組み合わせで発現し、様々な腫瘍で異所性発現することから有用ながん診断マーカーとされる。しかしクローディンはファミリー内の相同性が強く、他のクローディンと交叉しない、特異性の高い抗体を樹立することが比較的困難である。今回、クローディン12に対する特異抗体を樹立し、子宮頸癌組織138例の免疫染色、半定量的評価を行い、クローディン12発現と臨床病理学的パラメータとの関連を評価した。その結果、クローディン12低発現は子宮頸癌の予後不良因子であることが明らかとなった。クローディン12低発現は子宮頸癌の予後不良を予測するバイオマーカーである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローディン12低発現が子宮頸癌の予後不良因子であることを明らかにした。新規の抗クローディン12モノクローナル抗体は、多様ながん種や他の疾患におけるクローディン12発現の生物学的関連性を評価するために有用であると考えられる。近年、他のクローディンファミリーのがん診断マーカーとしての有用性も示されており、抗体カクテルや抗体パネルによる層別化や新規の治療標的への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：Within the claudin (CLDN) family, CLDN12 mRNA expression is altered in various types of cancer, but its clinicopathological relevance has yet to be established due to the absence of specific antibodies (Abs) with broad applications. We generated a monoclonal Ab (mAb) against human/mouse CLDN12 and verified its specificity. By performing immunohistochemical staining and semiquantification, we evaluated the relationship between CLDN12 expression and clinicopathological parameters in cervical cancer tissues. The disease-specific survival (DSS) and recurrence-free survival rates were significantly decreased compared with those in the high CLDN12 expression group. We also demonstrated, via univariable and multivariable analyses, that the low CLDN12 expression represents a significant prognostic factor for the DSS of cervical cancer patients. It can be concluded that a reduced CLDN12 expression predicts a poor outcome for cervical cancer.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：子宮頸癌 子宮体癌 細胞接着 クローディン がん診断マーカー

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 (CLDN) は密着結合の主要な構成要素であり、26 種類以上からなるファミリー分子である。CLDN は組織特異的な組み合わせで発現するが、腫瘍化により、発現パターンの変化が見られることからがん診断マーカーとしての有用性が示されている。CLDN ファミリーは腫瘍性病変に特異的で、かつ低分化癌でも発現が保たれる場合が多く、理想的ながん診断マーカーと言える。

申請者は The Cancer Genome Atlas データベースで、細胞間接着分子クローディン-12 (CLDN12) mRNA の高発現が子宮頸癌の予後不良因子である可能性が指摘されていることに着目した。本研究では、子宮頸癌の手術検体を用いて CLDN12 発現の臨床病理学的意義を明らかにし、新規診断マーカー及び新規治療標的としての有用性を検証する。

さらに、The Cancer Genome Atlas データベースにおいて CLDN16 は卵巣癌で高発現を示すことが示されている一方で、卵巣癌と CLDN16 発現に関連についての報告はほとんど見られない。ヒト CLDN16 に対するモノクローナル抗体を樹立し、卵巣癌の手術検体を用いて CLDN16 発現の臨床病理学的意義、新規診断マーカー、および新規治療標的としての有用性を検証する。

2. 研究の目的

細胞間接着分子クローディン (CLDNs) の発現パターンは、腫瘍の診断マーカー及び予後マーカーとして有用である。申請者所属研究室では CLDN6 高発現が子宮体癌の予後不良因子であることを明らかにした。申請者は最近公開された The Cancer Genome Atlas データベースにおいて、細胞間接着分子クローディン-12 (CLDN12) mRNA の高発現が子宮頸癌の予後不良因子である可能性が指摘されていることに着目し、ヒト CLDN12 に対するモノクローナル抗体を開発した。本研究では、子宮頸癌の手術検体を用いて CLDN12 発現の臨床病理学的意義を明らかにする。

また、The Cancer Genome Atlas データベースにおいて CLDN16 は卵巣癌で高発現を示すことが示されている一方で、卵巣癌と CLDN16 発現に関連についての報告はほとんど見られない。ヒト CLDN16 に対するモノクローナル抗体を樹立し、卵巣癌の手術検体を用いて CLDN16 発現の臨床病理学的意義を明らかにする。さらに卵巣癌細胞株を用いて CLDN 16 による腫瘍細胞制御機構を解明して、新規診断マーカー及び新規治療標的としての有用性を検証する。

3. 研究の方法

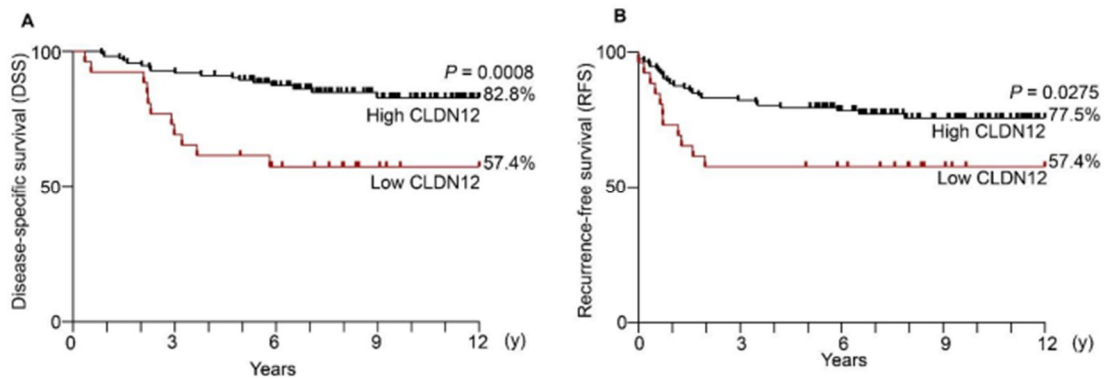
ラットリンパ節法を用いて、CLDN12 に対するモノクローナル抗体を作製した。Western-blot 及び免疫染色により、確立したモノクローナル抗体が CLDN12 を選択的に認識することを明らかにし、免疫染色用に染色条件の最適化を行った。手術を行った子宮頸癌症例のホルマリン固定パラフィン包埋切片を CLDN12 の免疫染色を行い、半定量的評価を行った。CLDN12 発現と臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。また、CLDN16 についても同様にモノクローナル抗体を作製し、同様に半定量的評価を行い、CLDN16 発現と臨床病理学的因子、予後との関連を検討した。卵巣癌細胞株を用いて CLDN 16 による腫瘍細胞制御機構を解明して、新規診断マーカー及び新規治療標的としての有用性を検証する。

4. 研究成果

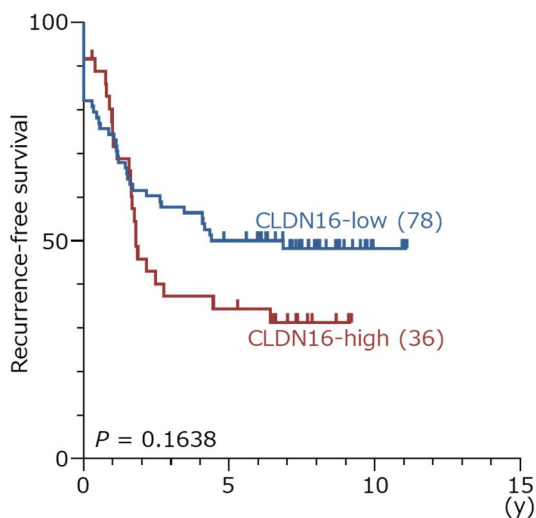
Western-blot 及び免疫染色により、確立したモノクローナル抗体が CLDN12 タンパクを選択的に認識することが明らかになった。子宮頸癌手術症例 138 例中 112 例 (81.2%) が CLDN12 高発現、26 例 (18.8%) が CLDN12 低発現を示した。CLDN12 高発現群、CLDN12 低発現群における 5 年疾患特異的生存率はそれぞれ 82.8%、57.4%、また、5 年無再発生存率はそれぞれ 77.5%、57.4% であり、いずれも CLDN12 低発現は CLDN12 高発現に比べ有意に低下していた。また、単変量解析および多変量解析により、CLDN12 低発現は子宮頸癌患者の疾患特異的生存の有意な予後因子であることが示された (それぞれ HR 3.412, $p = 0.002$, HR 2.615, $p = 0.029$)。CLDN12 低発現は子宮頸癌の予後不良因子であることが明らかとなった。

また、CLDN16 についてもモノクローナル抗体が CLDN16 を選択的に認識することを確認した。本抗体はヒト CLDN16 の第一細胞外ループに相当する 55-69 番目のアミノ酸を抗原として作製した。卵巣癌手術症例 114 症例中 CLDN16 高発現は 36 例 (31.6%)、CLDN16 低発現は 78 例 (68.4%) であった。CLDN16 発現は病期、組織型、T 分類、腹膜播種、再発に相関することが明らかとなった。CLDN16 高発現では無再発生存率が低下している傾向が見られた ($p=0.1638$)。さらに卵巣癌細胞株 AMOC2 を用いて CLDN16 安定過剰発現する AMOC2 : CLDN16 を作成した。Ki-67 抗体を用

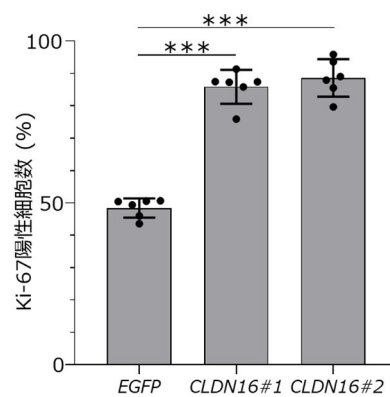
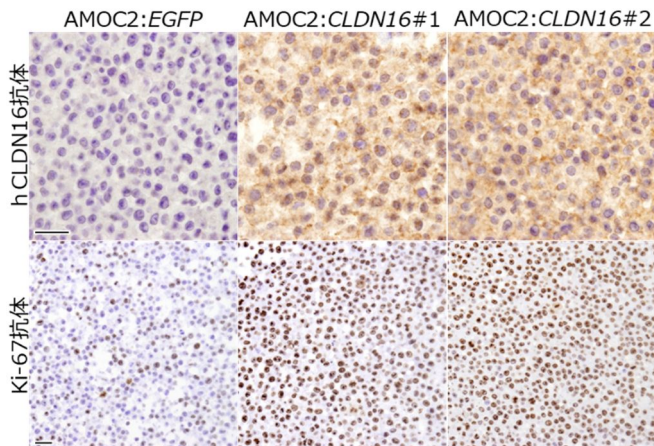
いた免疫染色で増殖能を評価したところ、Ki-67 陽性細胞率は CLDN16 過剰発現により有意に亢進した。また、トランスウェルアッセイにより、CLDN16 は AMOC2 の遊走能、浸潤能を更新することが明らかとなった。さらに、本抗体は細胞外ドメインを抗原としており、卵巣がん細胞株に生きた状態で hCLDN16 抗体を処理すると、CLDN16 シグナルが細胞境界と細胞質内の両方に見られることが明らかとなった。これは CLDN16 抗体が生きた細胞の未固定 CLDN16 蛋白にも結合し、さらに結合した抗体がインターナライズされることが示され、抗体療法に応用できることが期待できる。



CLDN12 低発現は子宮頸癌の疾患特異的生存率、無再発生存率を低下させる。



CLDN16 高発現は卵巣癌の無再発生存率を低下させる傾向がある。



CLDN16 の過剰発現は細胞増殖能を亢進させる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Rahman Abidur, Kobayashi Makoto, Sugimoto Kotaro, Endo Yuta, Kojima Manabu, Furukawa Shigenori, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Hashimoto Yuko, Fujimori Keiya, Chiba Hideki	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3774 ~ 3774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073774	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 Kojima Manabu, Sugimoto Kotaro, Kobayashi Makoto, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Fujimori Keiya, Chiba Hideki	4. 巻 19
2. 論文標題 Aberrant Claudin-6?Adhesion Signaling Promotes Endometrial Cancer Progression via Estrogen Receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1208 ~ 1220
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0835	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 Rahman Abidur, Kobayashi Makoto, Sugimoto Kotaro, Endo Yuta, Kojima Manabu, Furukawa Shigenori, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Hashimoto Yuko, Fujimori Keiya, Chiba Hideki	4. 巻 22
2. 論文標題 Reduced Claudin-12 Expression Predicts Poor Prognosis in Cervical Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3774 ~ 3774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073774	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 該当する
1. 著者名 Kojima Manabu, Sugimoto Kotaro, Tanaka Mizuko, Endo Yuta, Kato Hitomi, Honda Tsuyoshi, Furukawa Shigenori, Nishiyama Hiroshi, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Fujimori Keiya, Chiba Hideki	4. 巻 12
2. 論文標題 Prognostic Significance of Aberrant Claudin-6 Expression in Endometrial Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2748 ~ 2748
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers12102748	査読の有無 無
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 Kojima Manabu, Sugimoto Kotaro, Kobayashi Makoto, Ichikawa-Tomikawa Naoki, Kashiwagi Korehito, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Fujimori Keiya, Chiba Hideki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Aberrant Claudin-6?Adhesion Signaling Promotes Endometrial Cancer Progression via Estrogen Receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0835	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 遠藤雄大、杉本幸太郎、小林信、藤森敬也、千葉英樹
2. 発表標題 Claudin-9は子宮内膜癌の予後不良因子である
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 遠藤 雄大, 杉本 幸太郎, Abidur Rahman, 小林 信, 千葉 英樹
2. 発表標題 Claudin-9は子宮体がんの新規予後マーカーである
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会総会
4. 発表年 2021年～2022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)		

6. 研究組織（つづき）

	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	杉本 幸太郎 (Sugimoto Kotaro)		
研究協力者	小林 信 (Kobayashi Makoto)		
研究協力者	藤森 敬也 (Fujimori Keiya)		
研究協力者	渡邊 尚文 (Watanabe Takafumi)		
研究協力者	添田 周 (Soeda Shu)		
研究協力者	古川 茂宜 (Furukawa Shigenori)		
研究協力者	小島 学 (Kojima Manabu)		

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
---------	---------