

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08164

研究課題名（和文）複数のクローディン分子連携による小細胞肺癌の悪性形質制御機構

研究課題名（英文）The regulatory mechanism of malignant phenotype for small cell lung cancer through the interplay between 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）：本研究ではタイト結合分子クローディンの3,4及び18に着目し研究を行った。その結果、クローディン3は小細胞肺癌細胞株の増殖と遊走を亢進させること、またクローディン18.2は増殖を抑制することが明らかとなった。一方、クローディン4が小細胞肺癌細胞株の増殖及び遊走を抑制することは既に明らかになっていたが、その発現制御機構は不明であった。検討の結果、主に転写因子SP1によって発現制御されていることが明らかとなった。さらに、本研究期間内では、クローディン分子間（例えば3と4）の相互作用と思われる結果を得ることはできなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌の治療法は従来からの抗癌剤による治療が中心で、分子標的治療の開発は他のがん比べて遅れている。勿論のことさらなる研究は必要であるが、クローディン3は小細胞肺癌細胞株の増殖を亢進させることから、クローディン3を発現する小細胞肺癌症例に対してクローディン3抗体を使用するという分子標的治療法開発に繋がる可能性がある。一方、クローディン4は小細胞肺癌細胞株の増殖や遊走を抑制することから、クローディン4の発現を制御する転写因子SP1の活性を薬剤等で上げることにより、小細胞肺癌の悪性形質をある程度抑えられるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the tight junction molecules claudin-3, claudin-4, and claudin-18. Our findings revealed that claudin-3 promotes the proliferation and migration of small-cell lung cancer (SCLC) cell lines. In contrast, claudin-18.2 inhibits cell proliferation. It was already known that claudin-4 suppresses both the proliferation and migration of SCLC cell lines, but its regulatory mechanisms were unclear. Upon investigation, we discovered that claudin-4 expression is primarily regulated by the transcription factor SP1. Furthermore, during the course of this study, we were unable to obtain results suggesting interactions between different claudin molecules (e.g., claudin-3 and claudin-4).

研究分野：実験病理学

キーワード：小細胞肺癌 クローディン タイト結合 がんの増殖 がんの遊走 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞肺癌 (small cell lung cancer, 以下 SCLC) は非常に悪性度の高いがんである。その治療法はシスプラチンやエトポシド等による従来からの抗がん剤治療が主体であり、その奏効率は 60%以上と決して悪い数字ではないが、ほとんどの症例で再発するため 5 年生存率は 10%以下である。そのような現場を打破すべく新たな治療法の開発なども行われているが、免疫チェックポイント阻害薬であるアテゾリズマブが数ヶ月の生存期間延長を示すに留まっている。

我々はタイト結合の主要構成分子であるクローディンに着目し、クローディンによる小細胞肺癌の悪性形質制御機構があると考え検討を行ってきた。先行研究では、クローディン 4 が小細胞肺癌の増殖や遊走を抑制することを報告したが、クローディン 4 がどのようなメカニズムで発現制御されているかは不明であった。また、クローディンは哺乳類では 27 種類が同定されており、小細胞肺癌においてもクローディン 4 以外のクローディンの発現も認められるが、それらの小細胞肺癌の悪性形質への関与は未解明であった。

2. 研究の目的

クローディン 4 以外のクローディンが、小細胞肺癌の悪性形質に関与するのかを明らかにする。また、それらのクローディン間の相互作用を検討する。加えて、未だ不明であった小細胞肺癌におけるクローディン 4 の発現制御メカニズムを解明する。これらの目的を達成することで、小細胞肺癌に対する分子標的治療法開発の基盤となる知見を提供する。

3. 研究の方法

まず、複数種類の小細胞肺癌細胞株から RNA を抽出し、RT-PCR に供しクローディン 1-27 までの遺伝子発現を検討した。さらに、クローディン 3, 4, 18 のタンパク発現はそれぞれの特異的抗体を用いたウェスタンブロット法により確認した。

小細胞肺癌細胞株におけるクローディンや転写因子 SP1 のノックアウトは、レンチウイルスベクターをベースにした CRISPR-Cas9 システムを用いて行った。また、小細胞肺癌へのクローディン導入はレンチウイルスベクターあるいはレトロウイルスベクターを用いた。

小細胞肺癌細胞株の増殖は Cell Counting Kit-8 による細胞増殖アッセイ法により、また遊走能の評価はスクラッチアッセイによって評価した。

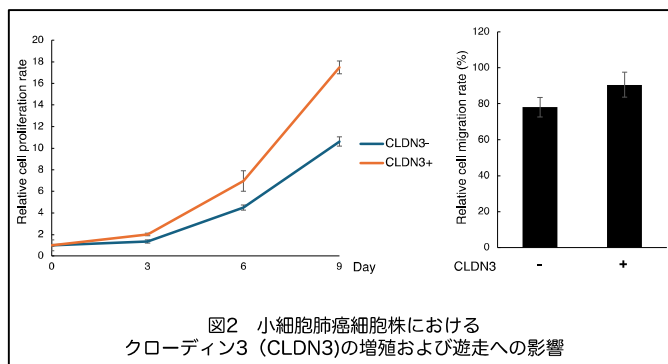
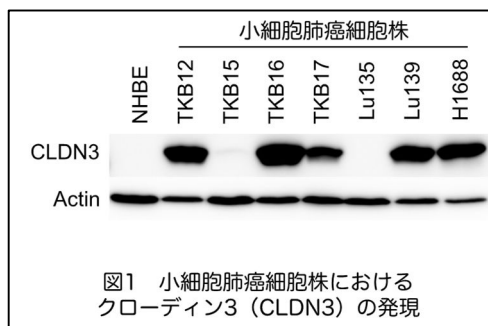
クローディン 4 のプロモーター領域の転写活性はレポーターアッセイ法により計測した。また、プロモーター領域への転写因子 SP1 の結合は ChIP (クロマチン免疫沈降) 法により検討を行った。

4. 研究成果

小細胞肺癌細胞株におけるクローディン 1-27 までの遺伝子発現を検討したところ、複数のクローディンの発現が確認され、クローディン 4 は勿論のこと、クローディン 3 及び 18 にも着目し研究を行った。

(1) 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン 3 の発現とその機能

クローディン 3 は複数の小細胞肺癌細胞株においてタンパクレベルでの発現がみられた (図 1)。次に、その発現は小細胞肺癌細胞株の悪性形質に対してどのような影響をもたらしているのかを検討した。クローディン 3 の発現がみられない TKB15 細胞株にレンチウイルスベクターを用いてクローディン 3 を発現させ、クローディン 3 を導入していないコントロール細胞と増殖および遊走を比較したところ、どちらもクローディン 3 の導入により亢進することが明らかとなった (図 2 左: 増殖, 右: 遊走)。これによりクローディン 3 は小細胞肺癌の悪性形質を増強することが示唆された。なお、浸潤能の評価はポイデンチャンバーを用いた浸潤アッセイを行ったが、どちらも浸潤する細胞はみられなかった。これは小細胞肺癌細胞株の *in vitro* 環境では細胞外マトリックスへの接着が弱く浸潤しにくいという性質に起因するものと考えられた。



(2) 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン 18 の発現とその機能

クローディン 18 は 18.1 と 18.2 という 2 種類のサブタイプがあり、通常それぞれのサブタイプには組織特異性があり、18.1 は肺、18.2 は胃に発現している。小細胞肺癌細胞株においてクローディン 18 遺伝子の発現を確認したところ TKB17 のみ発現が確認され、タンパクレベルでも同様の発現傾向がみられた (図 3 上: 遺伝子, 下: タンパク)。この TKB17 に発現するクローディン 18 は、肺がんであることから当初は 18.1 のサブタイプであるものと考えていたが、その後の解析により 18.2 の異所性発現であることが明らかとなった。このクローディン 18.2 が小細胞肺癌細胞株の悪性形質にどのような影響を及ぼすのかを検討するため、クローディン 18.2 の発現のみられない TKB15 及び Lu135 に対し、Tet-on システムでクローディン 18.2 が発現するシステムをレトウイルスベクターにより導入した (図 4 左)。一方で、クローディン 18.2 の発現がみられる TKB17 に対しては、CRISPR-Cas9 を用いてクローディン 18.2 のノックアウトを行った (図 5 左)。その結果、クローディン 18.2 によって TKB15 及び Lu135 の増殖が抑制され (図 4 右)、一方 TKB17 においてはクローディン 18.2 の欠損によって増殖が亢進することが確認された。(図 5 右)

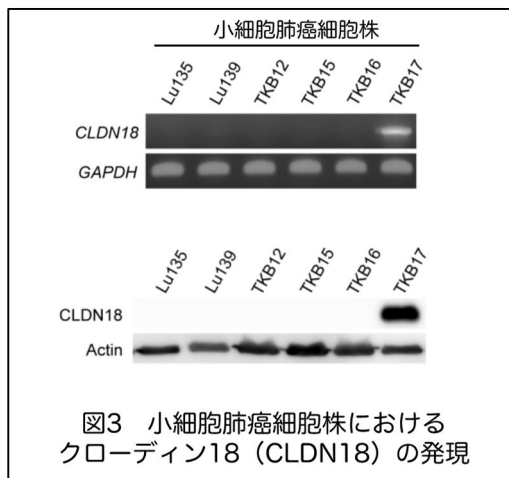


図3 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン18 (CLDN18) の発現

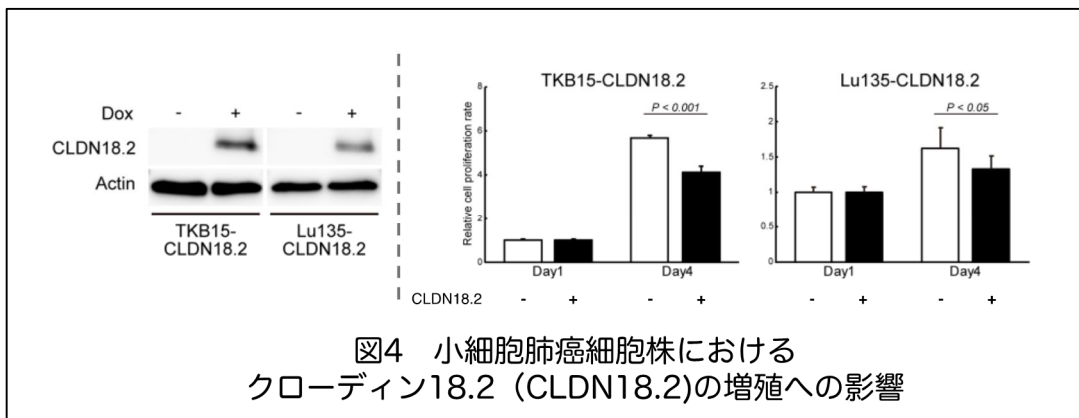


図4 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン18.2 (CLDN18.2)の増殖への影響

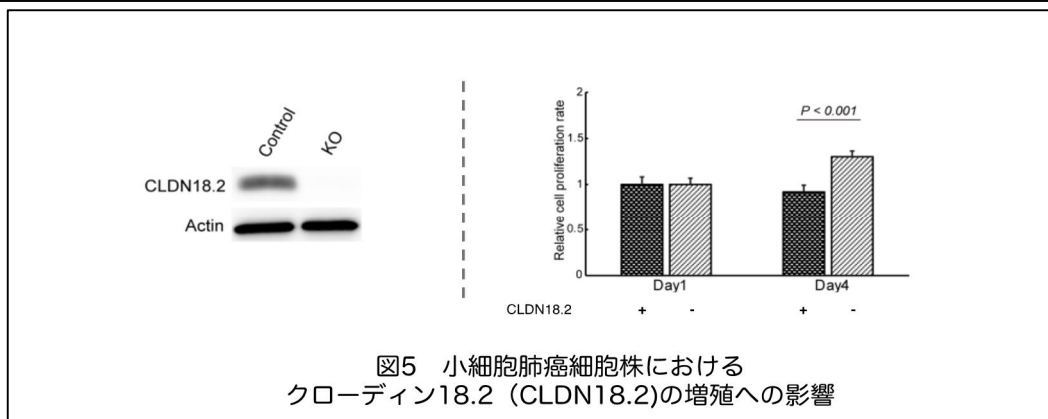


図5 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン18.2 (CLDN18.2)の増殖への影響

(3) 小細胞肺癌細胞株におけるクローディン 4 の発現制御機構

これまで小細胞肺癌細胞株の悪性形質に対してクローディン 4 が抑制的に機能することは分かっていたが、クローディン 4 がどのようなメカニズムで発現制御されているかは不明であった。そこで、クローディン 4 のプロモーター領域を転写因子結合配列データベース JASPAR により解析したところ、転写因子 SP1 の結合可能サイトが数多く存在することが明らかとなった。そこで、SP1 結合可能サイトのクローディン 4 プロモーター活性への影響を測るため、プロモーター領域の様々な鎖長を組み込んだレポーターベクターを作り、レポーターアッセイを行った。その結果、+44 から+55

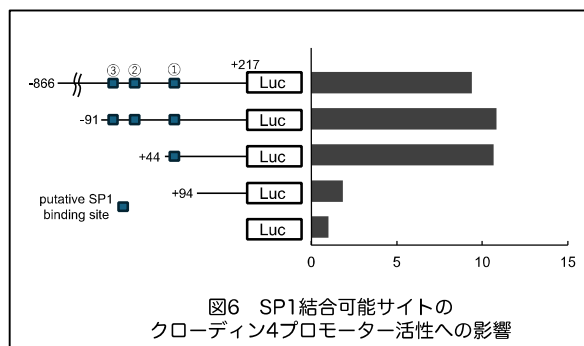


図6 SP1結合可能サイトのクローディン4プロモーター活性への影響

の領域に存在する結合可能サイトの存在がプロモーター活性に大きな影響を与えていることが明らかとなった。また、ChIP 法により小細胞肺癌細胞株において結合可能サイトに SP1 が実際に結合していることも確認された(図7左)。さらには、クロードイン4を発現している小細胞肺癌細胞株 Lu135 において CRISPR-Cas9 による SP1 をノックアウトしたところ、クロードイン4のタンパク発現が顕著に減少した(図7右)。これらのことから、小細胞肺癌細胞株においては転写因子 SP1 が主にクロードイン4の発現を制御していることが示唆された。

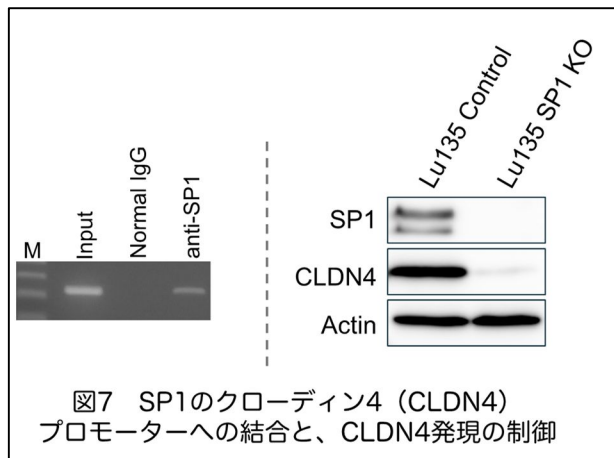


図7 SP1のクロードイン4 (CLDN4) プロモーターへの結合と、CLDN4発現の制御

(4) 各クロードイン間の相互作用

小細胞肺癌細胞株に発現する様々なクロードイン分子間の相互作用を検討するため、対象とするクロードイン発現のみられない細胞株に複数のクロードインを同時に発現させることを試みた。しかし、各クロードイン分子間での発現強度の差が激しく、強度の差をある程度調整方法の検討に時間を要したこともあり、本研究期間内では相互作用の存在を示唆する結果を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 KASHIWAGI KOREHITO, SATO-YAZAWA HANAKO, ISHII JUN, KOHNO KAKERU, TATSUTA ISAAKI, MIYAZAWA TADASUKE, TAKAGI MEGUMI, CHIBA HIDEKI, YAZAWA TAKUYA	4. 巻 42
2. 論文標題 LXR Activation Inhibits the Proliferation of Small-cell Lung Cancer Cells by Depleting Cellular Cholesterol	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 2923 ~ 2930
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancer.15774	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 Korehito Kashiwagi, Tadasuke Miyazawa, Hanako Sato-Yazawa, Jun Ishii, Kakeru Kohno, Koudai Konno, Chie Miyata-Hiramatsu, Tamotsu Kamimura, Shunsuke Miyata, Takuya Yazawa	4. 巻 Advance publication
2. 論文標題 Claudin 18.2 Inhibits the Proliferation of Small-Cell Lung Cancer Cells via G0/G1 Cell-Cycle Arrest	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Dokkyo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.51040/dkmj.2023-021	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Korehito Kashiwagi, Hanako Sato-Yazawa, Jun Ishii, Tadasuke Miyazawa, Tamotsu Kamimura, Shunsuke Miyata, Hideki Chiba, Takuya Yazawa
2. 発表標題 Claudin-4 regulates the malignant characteristics in small-cell lung cancer cell lines
3. 学会等名 第113回 日本病理学会総会
4. 発表年 2024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
研究分担者	矢澤 卓也 (Yazawa Takuya) (50251054)	獨協医科大学・医学部・教授 (32203)	

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 分 担 者	矢澤 華子 (佐藤華子) (Yazawa Hanako) (60438132)	獨協医科大学・医学部・講師 (32203)	
研究 分 担 者	石井 順 (Ishii Jun) (80749599)	獨協医科大学・医学部・助教 (32203)	

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