

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591464

研究課題名（和文）TNF- α とClaudin-1を分子標的とした新規胃癌腹膜播種性転移治療法の開発研究課題名（英文）Claudin 1 mediates TNF α -induced gene expression and cell migration in human gastric cancer cells.

研究代表者

内藤 和世 (NAITO KAZUYO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：90164102

研究成果の概要（和文）：近年、TNF- α が癌組織自体により生産され、内因性の腫瘍プロモーターとして機能することが解明されつつある。本研究では、“Claudin-1 は TNF- α による胃癌腹膜転移進展シグナルにおけるメディエーターとして機能する”という実験仮説の検証を行った。胃癌細胞株（MKN28、MKN45）を TNF- α 処理したところ、Claudin-1 の発現レベルが上昇した。Claudin-1 siRNA を導入した MKN28 において、TNF- α 処理後の Claudin-1 発現増強効果が抑制された。TNF- α 処理、Claudin-1 siRNA 導入の有無別に、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を試みたところ、TNF- α により発現変化した遺伝子のうち約 70%が、Claudin-1 のノックダウンにより抑制された。また、microRNA マイクロアレイを行ったところ、TNF- α により発現変化した microRNA のうち約 87%が、Claudin-1 のノックダウンにより抑制された。また、Claudin-1 siRNA 導入細胞における、細胞増殖抑制効果、アポトーシス増強効果、細胞遊走・浸潤能抑制効果を見出した。DNA マイクロアレイの結果を Pathway 解析したところ、MMP7、TGFB1、TNFSF10 を含む Cellular movement network が Claudin-1 に関連したトップネットワークとして抽出された。これらの結果より、Claudin-1 が単なる密着結合蛋白としてではなく、TNF- α による腫瘍活性化シグナルを伝達するメディエーターとして機能することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：TNF α has been known to be produced in cancer cells as an endogenous tumor promoter, and involved in epithelial-mesenchymal transition. However, Claudin-1 is well known as one of tight junction proteins, recent studies also showed that the expression of Claudin-1 increased during tumor progression in cancer cells. In this study, we investigated the association between TNF α and Claudin-1 during tumor progression in human gastric cancer cells. Claudin-1 was significantly increased upon TNF α treatment in gastric cancer cells, and down-regulation of Claudin-1 using siRNA inhibited 70% of TNF α -induced gene expression and 87% of microRNA expression. Further, knocking-down of Claudin-1 decreased cell proliferation, migration and invasion, and increased apoptosis. Pathway analysis showed that cellular movement, including MMP7, TGFB1 and TNFSF10, was the top-ranked signal network. In conclusion, Claudin-1 behaves as a crucial signal mediator in TNF α -induced gene expression and cell migration in gastric cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：胃癌、TNF- α 、Claudin-1

1. 研究開始当初の背景

近年、TNF- α が癌組織自体により生産され、内因性の腫瘍プロモーターとして機能することが解明されつつある。我々はこれまで、肺癌細胞株において、Claudin-1が単なる密着結合蛋白としてではなく、TNF- α による腫瘍活性化シグナルを伝達するメディエーターとして機能することを解明してきた。

2. 研究の目的

本研究では、“Claudin-1はTNF- α による胃癌腹膜転移進展シグナルにおけるメディエーターとして機能する”という実験仮説の検証を行う。その結果から、新たな腹膜播種形成メカニズムを解明し、斬新な治療概念を構築することを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

1. ヒト胃癌細胞株における TNF- α による Claudin-1 発現制御機構の有無の検討

ヒト胃癌細胞株 (MKN-28, -45) を TNF- α で処理し、Claudin-1 の mRNA・蛋白発現変化を定量的 RT-PCR、ウェスタンブロット法で解析する。また、TNF- α 処理の有無別、Claudin-1 siRNA 導入の有無別に Claudin-1 の mRNA・蛋白発現変化を解析する。

2. ヒト胃癌細胞株における TNF- α ・Claudin-1 経路関連遺伝子制御機構の解明

TNF- α ・Claudin-1 経路により制御される遺伝子を解明するため、TNF- α 処理、Claudin-1 siRNA 導入の有無別に MKN28 をサンプリングし、DNA マイクロアレイ、microRNA マイクロアレイによる網羅的解析を試みる。

3. Claudin-1 を介するヒト胃癌細胞増殖・アポトーシス・遊走・浸潤能制御機構の解明

Claudin-1 siRNA の導入により胃癌細胞の Claudin-1 発現レベルをコントロールし、細胞増殖 (direct count)・アポトーシス (PI-AnnexinV 2重染色)・細胞遊走・浸潤能 (Boyden chamber) に対する効果を検討する。さらに、DNA マイクロアレイの結果を Ingenuity Pathway Analysis で解析し、関連ネットワークに抽出された遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR で解析することにより、具体的な細胞遊走・浸潤制御機構を解明する。

4. 研究成果

胃癌細胞株 (MKN28, MKN45) において、培養時間・細胞密度の増加に伴い、Claudin-1 の蛋白・遺伝子発現レベルが増強されることをウェスタンブロット法・定量的 RT-PCR 法で

確認した。これらの細胞を TNF- α 処理したところ、Claudin-1 の蛋白・遺伝子発現レベルの増強が確認され、ヒト胃癌細胞株において TNF- α による Claudin-1 発現制御機構が存在することが明らかとなった (図 1)。また、MKN28 に Claudin-1 siRNA を導入し、蛋白・遺伝子発現抑制効果を確認した。さらに、Claudin-1 siRNA を導入した MKN28 において、TNF- α 処理後の Claudin-1 発現増強効果が抑制されていることを確認した (図 2)。

TNF- α 処理の有無別、Claudin-1 siRNA 導入の有無別に MKN28 をサンプリングし、DNA マイクロアレイによる網羅的解析を試みたところ、TNF- α 処理により mRNA 発現レベルが 2 倍以上に変化した遺伝子は、control/Claudin-1 siRNA 導入細胞で 932/789 種であった (図 3)。両者を詳細に解析すると、TNF- α により発現変化した遺伝子のうち約 70%が、Claudin-1 のノックダウンにより抑制されることが明らかとなった。また、同条件で microRNA マイクロアレイを行ったところ、TNF- α 処理により microRNA 発現レベルが 2 倍以上に変化した遺伝子は、control/Claudin-1 siRNA 導入細胞で 378/191 種であった (図 4)。

両者を詳細に解析すると、TNF- α により発現変化した microRNA のうち約 87%が、Claudin-1 のノックダウンにより抑制されることが明らかとなった。これら、DNA マイクロアレイ・microRNA マイクロアレイの結果より、TNF- α シグナル伝達におけるメディエーターとしての Claudin-1 の重要性示すと同時に、TNF- α ・Claudin-1 経路により、多くの mRNA 発現、microRNA 発現が制御されていることが解明された。また、研究を進める中で、Claudin-1 siRNA 導入細胞における、細胞増殖抑制効果 (図 5)、アポトーシス増強効果 (図 6)、細胞遊走・浸潤能抑制効果 (図 7) を見出した。DNA マイクロアレイの結果を Ingenuity Pathway Analysis にて解析したところ、MMP7、TGFB1、TNFSF10 を含む Cellular movement network が Claudin-1 に関連したトップネットワークの一つとして抽出された (図 8)。

これらの研究成果は既に学会で発表し、英文論文としてまとめている。また同時に、他の癌細胞株を用いた基礎的解析を行い、Claudin-1 が単なる密着結合蛋白としてではなく、TNF- α による腫瘍活性化シグナルを伝達するメディエーターとして機能することを明らかにした (PLoS ONE. 2012)。

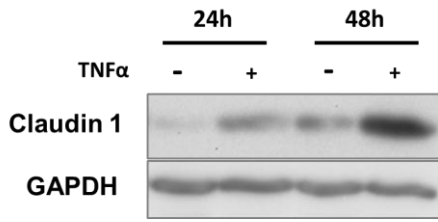


図 1 MKN28 における TNF α 処理による Claudin-1 発現の増強

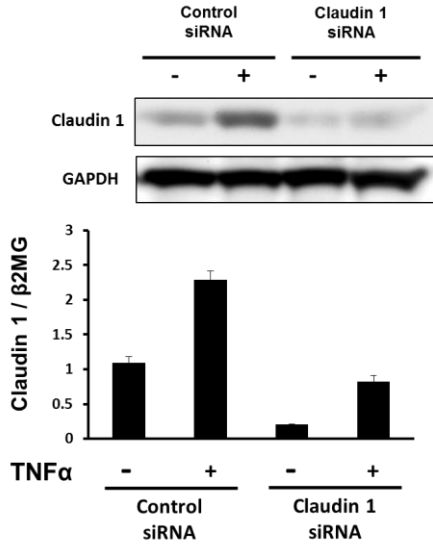


図 2 TNF α /Claudin-1 siRNA 処理による Claudin 1 の発現変化

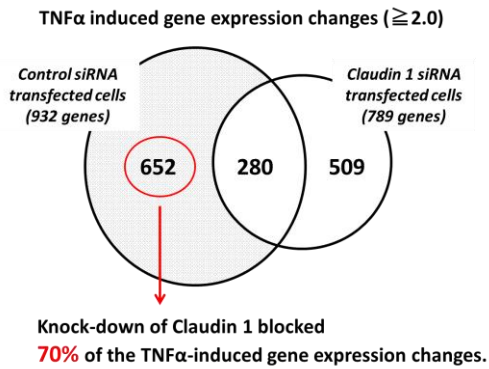


図 3 DNA マイクロアレイ結果

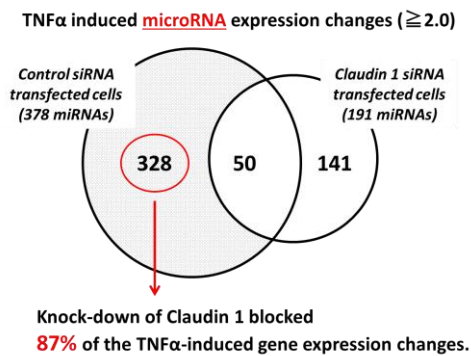


図 4 microRNA マイクロアレイ結果

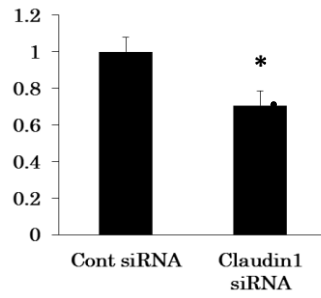


図 5 細胞増殖解析

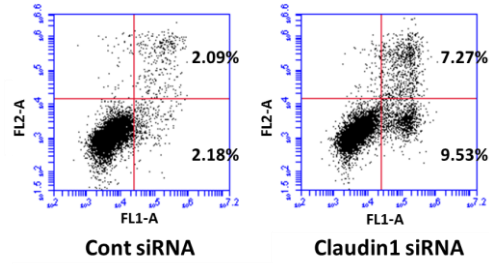


図 6 アポトーシス解析

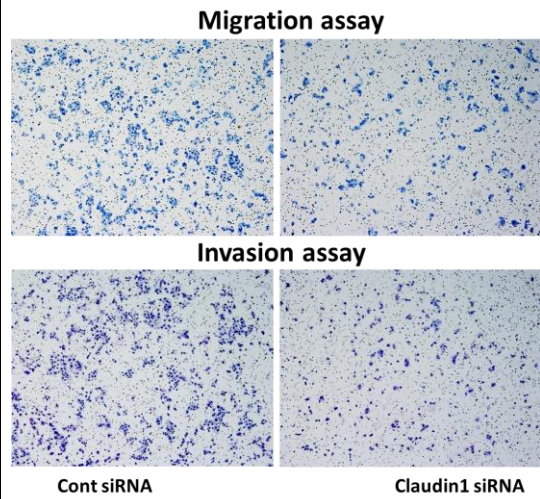


図 7 細胞遊走・浸潤能解析

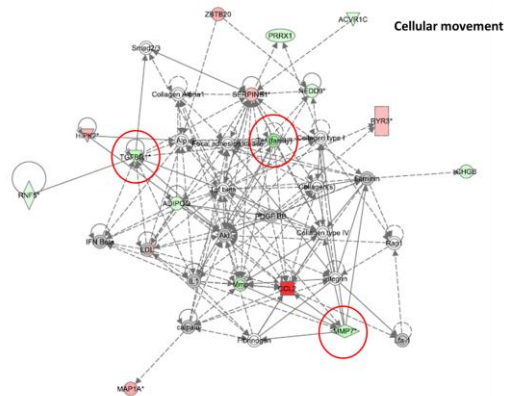


図 8 Claudin-1 関連ネットワーク

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- 1) Shiozaki A, Bai XH, Liu M, et al. Claudin 1 mediates TNF α -induced gene expression and cell migration in human lung carcinoma cells. PLoS One. 2012;7:e38049. 査読有, 10.1371/journal.pone.0038049.
 - 2) Shiozaki A, Keshavjee S, Liu M, et al. XB130 mediates cancer cell proliferation and survival through multiple signaling events downstream of Akt. PLoS One. 2012;7:e43646. 査読有, 10.1371/journal.pone.0043646.
 - 3) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. XB130 as an Independent Prognostic Factor in Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma. Ann Surg Oncol. 2012, 印刷中, 査読有, 10.1245/s10434-012-2474-4.
 - 4) Shiozaki A, Iitaka D, Otsuji E, et al. xCT, component of cysteine/glutamate transporter, as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. J Gastroenterol. 2013, 印刷中, 査読有.
 - 5) Takeshita H, Shiozaki A, Liu M, et al. XB130, a new adaptor protein, regulates expression of tumor suppressive microRNAs in cancer cells. PLoS One. 2013;8:e59057. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0059057.
 - 6) Shimizu H, Shiozaki A, Otsuji E, et al. The expression and role of Aquaporin 5 in esophageal squamous cell carcinoma. J Gastroenterol. 2013, 印刷中, 査読有. 10.1007/s00535-013-0827-9.
 - 7) Iitaka D, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Blockade of chloride ion transport enhances the cytotoxic effect of hypotonic solution in gastric cancer cells. J Surg Res. 2012;176:524-34. 査読有, 10.1016/j.jss.2011.10.039.
 - 8) Nako Y, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Enhancement of the cytotoxic effects of hypotonic solution using a chloride channel blocker in pancreatic cancer cells. Pancreatology. 2012;12(5):440-8. 査読有, 10.1016/j.pan.2012.08.003.
 - 9) Nakashima S, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Anti-Phosphohistone H3 as an independent prognostic factor in human esophageal squamous cell carcinoma. Anticancer Res. 2013;33:461-7. 査読有.
 - 10) Shiozaki A, Otsuji E, Marunaka Y. Intracellular chloride regulates the G(1)/S cell cycle progression in gastric cancer cells. World J Gastrointest Oncol. 2011;3:119-22. 査読有 doi: 10.4251/wjgo.v3.i8.119.
- [学会発表] (計 10 件)
- 1) Shimizu H, Shiozaki A, Naito K, Otsuji E, et al. The role of Claudin-1 as a mediator of TNF-alpha associated with cell migration. 日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日, 札幌.
 - 2) 清水浩紀、塩崎敦、内藤和世、大辻英吾ら. The role of Claudin-1 expression as a mediator of TNF-alpha associated with tumor progression. 日本外科学会定期学術集会, 2012年4月12-14日, 千葉.
 - 3) Shiozaki A, Iitaka D, Otsuji E, et al. Roles of chloride ion transporter in hypotonic shock on gastric cancer cells. 38th Biennial World Congress of the International College of Surgeons, 2012年11月7-10日, Brisbane.
 - 4) Shiozaki A, Kosuga T, Otsuji E, et al. Roles of XB130, a novel adaptor protein, in esophageal squamous cell carcinoma. 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2012年10月15-17日, Venice.
 - 5) Shiozaki A, Iitaka D, Otsuji E, et al. Roles of xCT, cysteine/glutamate transporter, in esophageal squamous cell carcinoma. 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2012年10月15-17日, Venice.
 - 6) Shiozaki A, Iitaka D, Otsuji E, et al. Clinical significance of Ki-67 labeling index in patients with esophageal squamous cell carcinoma. 13th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2012年10月15-17日, Venice.
 - 7) Nakou Y, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Enhancement of cytotoxic effect of hypotonic solution using chloride channel blocker in pancreatic cancer cells. 日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21日, 札幌.
 - 8) Shiozaki A, Ichikawa D, Otsuji E, et al. Roles of XB130, a novel regulator of PI3K /Akt pathway, in cancer cell

- proliferation and survival. 日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21, 札幌.
- 9) 竹本健一、塩崎敦、大辻英吾ら. 消化器癌細胞におけるクロライド輸送体制御を利用した低浸透圧細胞破壊効果の増強. 日本外科学会, 2013年4月11-13, 福岡.
- 10) Nakashima S, Shiozaki A, Otsuji E, et al. Expression and prognostic association of XB130/p21 in esophageal squamous cell carcinoma patients. 日本癌学会学術総会, 2012年9月19-21, 札幌.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 和世 (NAITO KAZUYO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：90164102

(2) 研究分担者

大辻 英吾 (OTSUJI EIGO)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：20244600

塩崎 敦 (SHIOZAKI ATSUSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：40568086

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：