

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590404

研究課題名(和文)新規培養ヒト正常膵管上皮細胞を用いた膵癌タイト結合分子標的治療の基礎的研究

研究課題名(英文)The basic study of molecular targeted therapy via pancreatic duct tight junctions by using a novel culture system of human pancreatic duct epithelial cells

研究代表者

小島 隆(Kojima, Takashi)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30260764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々が確立した新規培養ヒト正常膵管上皮細胞と膵癌細胞株を用いて、膵癌において高発現しているタイト結合蛋白claudin(CL)-4、CL-18およびPKCを標的とした膵癌分子標的治療の基礎的研究を実施した。結果、ヒト正常膵管上皮細胞と膵癌細胞株のCL-4およびCL-18ともにPKC特にPKCシグナル伝達経路により調節されていることが分かった。膵癌分子標的治療の候補であるCL-4を介した細菌毒素CPEは、膵癌細胞株においては用量依存性に細胞毒性効果がみられたが、ヒト正常膵管上皮細胞には毒性を示さなかった。そして、膵癌細胞へのCPEの効果は、PKC阻害剤により調節可能であった。

研究成果の概要(英文)：In the present study, using normal human pancreatic duct epithelial cells and cancer cell lines, we investigated the basic study targeting tight junction molecules claudin-4, -18 and a signal molecule PKC that highly expressed in pancreatic cancer. Claudin-4 and -18 were regulated via a PKC α signal transduction pathway in both human pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. The cytotoxic effects of CPE via claudin-4 are thought to be useful as a novel therapeutic tool for pancreatic cancer. The cytotoxicity was not observed at any concentration of CPE, whereas in pancreatic cancer cells, CPE had a dose-dependent cytotoxic effect. PKC α inhibitors represent potential therapeutic agents against human pancreatic cancer cells by the use of CPE cytotoxicity via claudin-4.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：ヒト正常膵管上皮細胞 膵癌 分子標的治療 PKC claudin

1. 研究開始当初の背景

膵癌は「21世紀に残された難治性癌」と呼ばれ、根治し得る治療法は現時点では手術療法のみである。しかし、膵癌根治手術が成された場合でも、5年生存率は約15%と十分な予後が得られているとは言えず、さらに化学療法、放射線療法の開発も盛んに行われているが、十分な成果はまだ得られていないのが現状である。従って、既存の治療法とは異なる分子標的治療等の新規治療法の開発が求められている。

2. 研究の目的

正常ヒト膵管上皮細胞の培養系を用いて、タイト結合は膜貫通蛋白 claudin (CL)-4 および CL-18 の正常膵管上皮細胞の発現調節機構を PKC のアイソフォームに焦点を当て解析し、膵癌細胞とその発現調節機構を比較検討する。次に、CL-4 を介した CPE による細胞毒性効果について、PKC シグナル特に PKC α を中心に検討する。さらに未だ正常膵管上皮および膵癌細胞での詳細な働きが不明である tricellulin の発現動態についても合わせて解析し、CL-4 および CL-18 と比較することにより、tricellulin の膵癌診断あるいは分子標的の可能性について検討する。

3. 研究の方法

培養ヒト正常膵管上皮細胞系を確立し、膵癌において高発現しているタイト結合蛋白 claudin(CL)-4、CL-18 および PKC シグナル分子の発現調節機構の解明およびそれらの分子を標的とした膵癌分子標的治療の基礎的研究を実施する。

(1) ヒト正常膵管上皮細胞培養系の確立

膵切除標本の非疾患部より採取した少量の膵組織を酵素処理し、膵管上皮細胞を分離した後、レトロウイルスベクターにより hTERT を導入し、継代可能な安定したヒト膵管上皮細胞系を確立する。

(2) ヒト正常膵管上皮細胞における CL-4 および CL-18 の誘導発現調節機構の解析

ヒト正常膵管上皮細胞を各種サイトカイ

ンや増殖因子等で刺激し、CL-4 および CL-18 の発現誘導物質をみつける。タイト結合蛋白の発現変化は、免疫染色、電子顕微鏡(凍結切断レプリカ法)、RT-PCR、real-time PCR、Western blot で解析し、タイト結合のバリア機能変化は電気生理学的手法により解析する。

(3) CL-4 および CL-18 の発現誘導に関する特異的転写因子の同定

hTERT 導入ヒト膵管上皮細胞において、マイクロアレイにより網羅的に解析し、CL-4 および CL-18 の発現誘導に関与するシグナル伝達経路や特異的転写因子の同定を行う。その同定された発現調節因子に対する siRNA による阻害実験を行い、CL-4 および CL-18 の発現誘導との関連を確認する。

(4) PKC シグナル伝達経路を介した正常膵管上皮細胞を用いた CL-4 および CL-18 の発現調節機構の解明

正常膵管上皮細胞において、CL-4 および CL-18 の発現誘導に関与する PKC シグナル伝達経路の同定を行う。その同定された PKC アイソフォームの特異的阻害剤および siRNA による阻害実験を行い、CL-4 および CL-18 の発現誘導との関連性を確認する。

(5) PKC シグナル伝達経路を介した膵癌細胞株を用いた CL-4 および CL-18 の発現調節機構の解析

高分化型膵癌細胞株と低分化型膵癌細胞株において、正常ヒト膵管上皮細胞と同様に CL-4 および CL-18 の発現誘導に関与する PKC シグナル伝達経路の同定を行う。その同定された PKC アイソフォームの特異的阻害剤および siRNA による阻害実験を行い、CL-4 および CL-18 の発現誘導との関連を確認する。

(6) PKC シグナル伝達経路を介した CPE による CL-4 を標的とした in vitro 膵癌治療効果の検討

正常膵管上皮細胞および膵癌細胞株において、CPE の細胞毒性効果を PKC シグナル伝達経路に焦点を当て検討する。

(7) 正常膵管上皮細胞および膵癌細胞株を用いた tricellulin の発現調節および機能についての解明

正常膵管上皮細胞および膵癌細胞株を用いて、tricellulin の役割を解明する。

4 . 研究成果

(1) ヒト正常膵管上皮細胞培養系の確立

現在までに数十例の hTERT 導入ヒト膵管上皮細胞系が確立できた。

(2) ヒト正常膵管上皮細胞における CL-4 および CL-18 の誘導発現調節機構の解析

正常膵管上皮細胞の CL-4 の発現誘導には、血清および PKC activator である TPA 刺激、CL-18 の発現誘導には、TPA 刺激が効果的であった。

(3) ヒト正常膵管上皮細胞における CL-4 および CL-18 の発現誘導に関する特異的転写因子の同定

マイクロアレイにより網羅的に解析した結果、転写因子としては、GATA-3 および ELF3 の発現変化がみられた。そのうち ELF3 については、CL-7 の発現調節に関与していることが分かった。

(4) PKC シグナル伝達経路を介した正常膵管上皮細胞を用いた CL-4 および CL-18 の発現調節機構の解明

PKC アイソフォームの特異的阻害実験の結果、正常膵管上皮細胞の CL-4 および CL-18 の発現誘導には PKC α の関与がみられた。

(5) PKC シグナル伝達経路を介した膵癌細胞株を用いた CL-4 および CL-18 の発現調節機構の解析

PKC アイソフォームの特異的阻害実験の結果、膵癌細胞の CL-4 および CL-18 の発現誘導には、PKC α だけでなく PKC δ , PKC ϵ の作用もみられた。さらに、PKC α は、EMT に関与が知られている CL-1 の発現および機能への影響もみられた。

(6) PKC シグナル伝達経路を介した CPE による CL-4 を標的とした in vitro 膵癌治療効果の検討

正常膵管上皮細胞においては、PKC 活性刺激により CL-4 を高発現しても CPE の細胞毒性効果はみられなかった。膵癌細胞株においては、PKC 活性刺激により CPE の細胞毒性効果の減弱がみられ、PKC α 阻害剤によりその効果は回復した。

(7) 正常膵管上皮細胞および膵癌細胞株を用いた tricellulin の発現調節および機能についての解明

正常膵管上皮細胞および膵癌細胞株の tricellulin は、上皮バリア機能を持ち、主に JNK シグナル経路を介して調節されていた。

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 25 件)

Kojima T, Ninomiya T, Konno T, Kohno T, Taniguchi M, Sawada N. Expression of tricellulin in epithelial cells and non-epithelial cells. *Histol Histopathol.* 2013, 28:1383-1392. 査読有
http://www.hh.um.es/Abstracts/Vol_28/28_1/28_11_1383.htm

Kojima T, Yamaguchi H, Ito T, Kyuno D, Kono T, Konno T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human pancreatic duct epithelial cells. *Tissue Barriers.* 2013, 1:e24894 査読有 doi:10.4161/tisb.24894.

Kyuno D, Kojima T, Yamaguchi H, Ito T, Kimura Y, Imamura M, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Protein kinase C α inhibitor protects against downregulation of claudin-1 during epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2013, 34:1232-43. 査読有 doi: 10.1093/carcin/bgt057.

Takasawa A, Kojima T, Ninomiya T, Tsujiwaki M, Murata M, Tanaka S, Sawada

N. Behavior of tricellulin during destruction and formation of tight junctions under various extracellular calcium conditions. *Cell Tissue Res.* 2013, 351:73-84. 査読有 doi: 10.1007/s00441-012-1512-7.

Kojima T, Go M, Takano K, Kurose M, Ohkuni T, Koizumi J, Kamekura R, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Hirakawa S, Nomura K, Keira T, Miyata R, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Regulation of Tight Junctions in Upper Airway Epithelium. *BioMed Research International.* 2013,2013:947072. 査読有 doi: 10.1155/2013/947072.

Obata K, Kojima T, Masaki T, Okabayashi T, Yokota S, Hirakawa S, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Fuchimoto J, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Curcumin prevents replication of respiratory syncytial virus and the epithelial responses to it in human nasal epithelial cells. *PloS One* 2013, 8:e70225. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0070225.

Hirakawa S, Kojima T, Obata K, Okabayashi T, Yokota SI, Nomura K, Obonai T, Fuchimoto J, Himi T, Tsutsumi H, Sawada N. Marked induction of matrix metalloproteinase-10 by respiratory syncytial virus infection in human nasal epithelial cells. *J Med Virol.* 2013, 85:2141-2150. 査読有 doi: 10.1002/jmv.23718.

Fuchimoto J, Kojima T, Okabayashi T, Masaki T, Ogasawara N, Obata K, Nomura K, Hirakawa S, Kobayashi N, Shigyo T, Yokota SI, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. Humulone suppresses replication

of respiratory syncytial virus and release of IL-8 and RANTES in normal human nasal epithelial cells. *Med Mol Morphol.* 2013, 46:203-209. 査読有 doi: 10.1007/s00795-013-0024-1.

Someya M, Kojima T, Ogawa M, Ninomiya T, Nomura K, Takasawa A, Murata M, Tanaka S, Saito T, Sawada N. Regulation of tight junctions by sex hormones in normal human endometrial epithelial cells and uterus cancer cell line Sawano. *Cell Tissue Res.* 2013,354:481-494. 査読有 doi: 10.1007/s00441-013-1676-9.

Kojima T, Kyuno D, Sawada N. Targeting claudin-4 in human pancreatic cancer. *Expert Opinion on Therapeutic Targets,* 2012, 16:881-887. 査読有 doi: 10.1517/14728222.2012.708340.

Kojima T, Sawada N. Regulation of tight junctions in human normal pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci,* 2012, 1257:85-92. 査読有 doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06579.x.

Fuchimoto J, Kojima T, Kobayashi N, Ohkuni T, Ogasawara N, Masaki T, Obata K, Nomura K, Kondoh A, Shigyo T, Himi T, Sawada N. Hop water extract inhibits double-stranded RNA-induced thymic stromal lymphopoietin release from human nasal epithelial cells. *Am J Rhinol Allergy.* 2012, 26:433-438. 査読有 doi: 10.2500/ajra.2012.26.3814.

Hanai K, Kojima T, Ota M, Onodera J, Sawada N. Effects of atelocollagen formulation containing oligonucleotide on endothelial permeability. *J Drug Deliv.* 2012,

2012:245835. 査読有doi:

10.1155/2012/245835.

Nomura K, [Kojima T](#), Fuchimoto J, Obata K, Keira T, Himi T, Sawada N. Regulation of IL-33 and TSLP in human nasal fibroblasts by proinflammatory cytokines.

Laryngoscope. 2012, 122:1185-1192. 査読有 doi: 10.1002/lary.23261.

Soini Y, [Takasawa A](#), Eskelinen M, Juvonen P, Kaärjä V, Hasegawa T, [Murata M](#), Tanaka S, [Kojima T](#), Sawada N. Expression of claudins 7 and 18 in pancreatic ductal adenocarcinoma: association with features of differentiation. J Clin Pathol. 2012, 65:431-436. 査読有 doi: 10.1136/jclinpath-2011-200400.

Kamekura R, [Kojima T](#), Takano K, Go M, Sawada N, Himi T. The role of IL-33 and its receptor ST2 in human nasal epithelium with allergic rhinitis. Clinical & Experimental Allergy. 2012, 42:218-228. 査読有 doi: 10.1111/j.1365-2222.2011.03867.x.

Maeda T, [Murata M](#), Chiba H, [Takasawa A](#), Tanaka S, [Kojima T](#), Masumori N, Tsukamoto T, Sawada N. Claudin-4-targeted therapy using Clostridium perfringens enterotoxin for prostate cancer. Prostate. 2012, 72:351-360. 査読有 doi: 10.1002/pros.21436.

[Kojima T](#), [Takasawa A](#), Kyuno, Tatsuya Ito T, Yamaguchi H, Hirata K, Tsujiwaki, [Murata M](#), Tanaka S, Sawada N. Downregulation of tight junction-associated MARVEL protein marvelD3 during epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. Exp Cell Res, 2011, 317:2288-2298. 査読有 doi:

10.1016/j.yexcr.2011.06.020.

Masaki T, [Kojima T](#), Okabayashi T, Ogasawara N, Ohkuni T, Obata K, [Takasawa A](#), [Murata M](#), Tanaka S, Hirakawa S, Fuchimoto J, Ninomiya T, Fujii N, Tsutsumi H, Himi T, Sawada N. An NF- κ B signaling pathway via PKC δ regulates replication of respiratory syncytial virus in polarized normal human nasal epithelial cells. Mol Biol Cell 2011, 22: 2144-2156. 査読有 doi: 10.1091/mbc.E10-11-0875.

Yamaguchi H, [Kojima T](#), Ito T, Kyuno D, Kimura Y, Imamura M, Hirata K, Sawada N. Effects of Clostridium perfringens enterotoxin via claudin-4 on normal human pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. Cell Mol Biol Lett 2011, 16:385-397. 査読有 doi: 10.2478/s11658-011-0014-z.

- 21 Ito T, [Kojima T](#), Yamaguchi H, Kyuno D, Kimura Y, Imamura M, [Takasawa A](#), [Murata M](#), Tanaka S, Hirata K, Sawada N. Transcriptional regulation of claudin-18 via specific protein kinase C signaling pathways and modification of DNA-methylation in human pancreatic cancer cells. J Cell Biochem, 2011, 112:1761-1772. 査読有 doi: 10.1002/jcb.23095.
- 22 Kondoh A, Takano K, [Kojima T](#), Ohkuni T, Kamekura R, Ogasawara N, Go M, Sawada N, Himi T. Altered expression of claudin-1, claudin-7, and tricellulin regardless of human papilloma virus infection in human tonsillar squamous cell carcinoma.

- Acta-Otolaryngol, 2011, 131:861-868. 査読有 doi: 10.3109/00016489.2011.562537.
- 23 Ohkuni T, Kojima T, Ogasawara N, Masaki T, Fuchimoto J, Kamekura R, Koizumi JI, Ichimiya S, Murata M, Tanaka S, Himi T, Sawada N. Poly(I:C) reduces expression of JAM-A and induces secretion of IL-8 and TNF- α via distinct NF- κ B pathways in human nasal epithelial cells. Toxicol Appl Pharmacol 2011, 250:29-38. 査読有 doi: 10.1016/j.taap.2010.09.023.
- 24 Kojima T, Sawada N. Expression and function of claudins in hepatocytes. CLAUDINS: METHODS AND PROTOCOLS. Methods Mol Biol, 2011, 762:233-244. 査読有 doi: 10.1007/978-1-61779-185-7_16.
- 25 Ogasawara N, Kojima T, Go M, Takano KI, Kamekura R, Ohkuni T, Koizumi JI, Masaki T, Fuchimoto J, Obata K, Kurose M, Shintani T, Sawada N, Himi T. Epithelial barrier and antigen uptake in lymphoepithelium of human adenoids. Acta Otolaryngol, 2011, 131: 116-123. 査読有 doi: 10.3109/00016489.2010.520022.

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1 小島隆 ヒト腭管上皮細胞株における Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤によるバリア機能および細胞の高さの亢進 第 65 回日本細胞生物学会 2013 年 6 月 19-21 日 名古屋
- 2 及能大輔, 小島隆 PKC 阻害剤は腭癌細胞の EMT におけるタイト結合分子 claudin-1 の低下を抑制する 第 114 回日本外科学会 2013 年 4 月 3-5 日, 京都

- 3 小島隆, 金野匠, 及能大輔, 澤田典均 ヒト腭管上皮細胞株における Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤によるバリア機能および細胞の高さの亢進 2012 年 9 月 28-29 日, 第 44 回日本臨床分子形態学会, 高知
- 4 小島隆, 澤田典均 正常ヒト腭管上皮細胞および腭癌細胞における claudin の発現調節機構の解明 2012 年 9 月 13-14 日, 第 45 回日本臨床分子形態学会, 第 62 回日本顕微鏡学会, 福岡
- 5 Kojima T. Regulation of tight junctions in normal human pancreatic duct epithelial cells and cancer cells. International conference, Berlin 2011 "Barriers and channels formed by tight junction proteins -From mechanisms to disease and back" 2011, September 22-24, Berlin, Germany.
- 6 小島隆. シンポジウム ヒト腭管上皮細胞におけるタイト結合の調節機構 2011 年 5 月 16-18 日, 第 62 回日本顕微鏡学会, 福岡

〔図書〕(計 1 件)

- 1 小島隆, 村田雅樹, 高澤啓, 田中敏, 澤田典均. 細胞間結合装置. 病気の分子形態学. 日本臨床分子形態学会編. 学際企画, 2011, 54-57.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島隆 (KOJIMA TAKASHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 30260764

(2) 連携研究者

村田 雅樹 (MURATA MASAKI)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10404592

高澤 啓 (TAKASAWA AKIRA)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00593021