

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460285

研究課題名(和文)タイト結合膜蛋白クローディン7の扁平上皮癌に対する抑制効果の三次元培養での検証

研究課題名(英文)Examination of the effect of claudin-7 on squamous cell carcinoma using three dimensional culture

研究代表者

稲井 哲一郎 (inai, Tetsuichiro)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00264044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Lioniら(2007)の報告を三次元培養系で検証する目的であったが、報告に誤りがあり研究をケラチノサイトの三次元培養系の確立に変更した。ヒト初代培養ケラチノサイトをカルシウム、アスコルビン酸、KGF添加培地で気液界面培養により角化重層扁平上皮を再構築できた。さらに、マウスケラチノサイト細胞株であるCOCA細胞、K38細胞を使って、それぞれ角化および非角化重層扁平上皮を再構築できた。また、タイト結合形成の指標となる細胞間電気抵抗値がそれぞれ463、63  $\cdot$  cm<sup>2</sup>であった。今回確立したマウス三次元培養系は、角化および非角化重層扁平上皮におけるタイト結合の形成や機能を調べる上で有用である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to examine the report (Lioni et al, 2007) using three dimensional (3D) culture, but we found E-cadherin expression in esophageal cancer cell line, TE-8. Thus, we changed the study theme to establishment of 3D keratinocyte culture system. We formed keratinized stratified squamous epithelium using human primary keratinocytes directly seeded on the membrane of culture inserts under airlifted conditions in EpiLife medium supplemented with calcium, ascorbic acid and KGF. Under similar conditions, mouse keratinocyte cell lines, COCA and K38, formed keratinized and non-keratinized stratified squamous epithelium, respectively. These multilayers formed functional tight junctions as revealed by transepithelial electrical resistance. The 3D culture system we have established is useful to study tight junction formation and function.

研究分野：組織学

キーワード：タイト結合 クローディン 重層扁平上皮 三次元培養

## 1. 研究開始当初の背景

重層扁平上皮は皮膚、口腔上皮、食道上皮などでみられる。これまでに細胞の癌化でタイト結合膜蛋白 claudin (cldn)の発現異常が起こるといふ多くの報告がなされている。また、cldn の発現の亢進や減少が癌の悪性度や予後と関連があるといふ報告も多い。食道癌では cldn-3, cldn-4 の発現が亢進 (Montgomery et al, 2006)し、cldn-7 の発現が低下 (Usami et al, 2006)するといわれている。cldn-4 の発現が低い食道癌ほど予後が悪い (Lee et al, 2012)。口腔癌では cldn-7 の発現が多いと予後が良い (Yoshizawa et al, 2013)。ヒト食道の重層扁平上皮癌由来の細胞株 TE-1 細胞は cldn-7 を発現するが cldn-1, cldn-4 は発現しない。TE-8 細胞は cldn-1, cldn-4, cldn-7 のすべてを発現しない。TE-11 細胞は cldn-1, cldn-4, cldn-7 のすべてを発現する。TE-1 細胞と TE-11 細胞は E-cadherin (E-cad)を発現するが、TE-8 細胞は E-cad を発現しない。興味深いことに、TE-8 細胞に cldn-7 を発現すると E-cad を発現するようになり、細胞の浸潤性が低下した (Lioni et al, 2007)。しかし、TE-8 細胞に E-cad を発現しても cldn-7 は発現しなかった。一方、TE-1 細胞で cldn-7 の発現をノックダウンすると、E-cad の発現が減少し、細胞の浸潤性が亢進した。以上の結果から、食道の重層扁平上皮癌細胞株である TE-8 細胞は、cldn-7 を発現することで E-cad が発現して細胞接着が回復し、続いてタイト結合を形成して極性を回復したのと考えられる。こうして、癌としての性質、特に浸潤性が抑制されて正常な細胞に近づいたと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト食道の重層扁平上皮癌由来の細胞株 TE-8 細胞および食道と同じ重層扁平上皮である皮膚や口腔由来の癌細胞において、cldn-7 が普遍的に癌抑制的に

働くかどうかを三次元培養系にて調べることを目的とする。

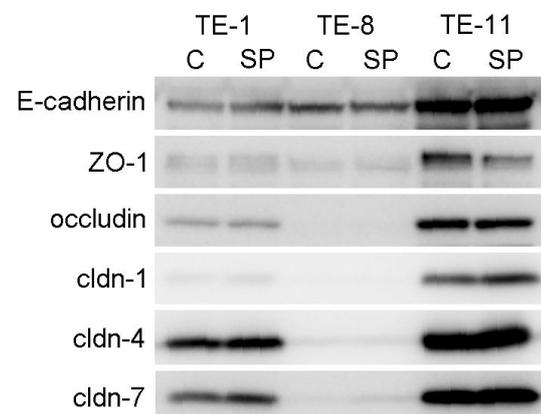
## 3. 研究の方法

ヒト食道の重層扁平上皮癌由来の細胞株 TE-8 細胞において、N 末端に EGFP を付与した cldn-7 (EGFP-cldn-7)を pTet-One vector を用いてドキシサイクリン制御下に発現誘導し、これを三次元培養して、形成される重層構造が正常の重層扁平上皮に近づくかどうかをケラチンなどの分化マーカー (K5, K14, K4, K13, K1, K10)にて調べることを目的とする。さらに、皮膚や口腔由来の癌細胞を用いて同様に調べる。

## 4. 研究成果

はじめに、TE 細胞での E-cadherin, タイト結合蛋白 (cldn-1, -4, -7, ZO-1, occludin)の発現をウェスタンブロッティングで調べた。カルシウム (C), カルシウム + SP600125 (SP)添加培地で二次元培養した細胞を使った。カルシウムはケラチノサイトの分化誘導、SP600125 はタイト結合形成誘導に働くといわれている。図 1 に示す通り、Lioni ら (2007)の報告とは異なり、cldn-7 を外因性に TE-8 細胞に発現する前に、すでに TE-8 細胞は E-cadherin を発現していた。

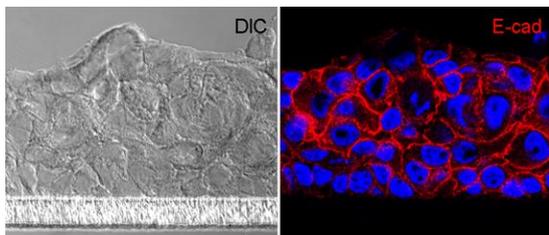
図 1



また、三次元培養でも E-cadherin が細胞

間に局在した(図2)。

図2

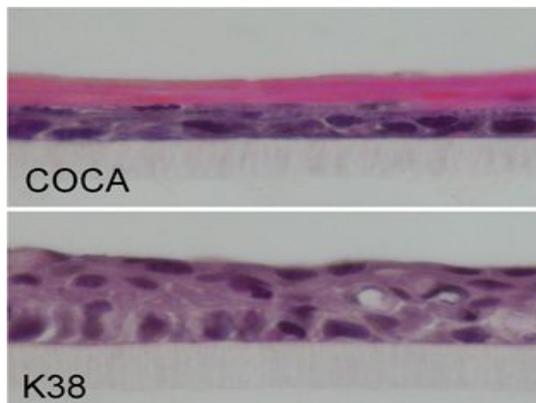


研究の前提となる、claudin-7によるE-cadherinの発現誘導ができないため、研究を「ケラチノサイトの三次元培養系の確立」に方向転換した。

培地成分が公開されているEpiLife培地に、カルシウム、アスコルビン酸、keratinocyte growth factor (KGF)という3種の因子を種々の組み合わせで添加し、それぞれの因子の作用を検討した。細胞はセルカルチャーインサートのポリカーボネート膜に直接播種し、コンフルエントになったのを確認後、インサート内外の液面を下げて細胞を気液界面培養で3週間まで培養した。その結果、重層上皮の再構築のためにはカルシウムが必須因子であることがわかった。気液界面培養開始2週間で形態的に角化重層扁平上皮に類似した重層構造が形成された。ケラチン(K)1, 5, 10, 14、インボルクリン、インテグリンβ4といった分化マーカーは、それぞれ生体の重層扁平上皮に対応する層に局在が見られた。培養開始3週間では、3種の因子すべてを添加しないとインテグリンβ4の局在または発現自体が維持できないことがわかった。以上の結果から、重層扁平上皮の再構築のためには、3種の因子すべてを添加することが必要であることがわかった(Seo et al, 2016)。

さらに、マウスのケラチノサイト細胞株であるCOCA細胞(CnT-PR培地で培養)とK38細胞(FAD培地で培養)を使って、同様の方法でそれぞれ角化および非角化重層扁平上皮を再構築できた(図3)。

図3



また、COCA細胞およびK38細胞を使って3週間後に再構築された重層構造において、タイト結合形成の指標となる細胞間電気抵抗値がそれぞれ $463\Omega \cdot \text{cm}^2$ 、 $63\Omega \cdot \text{cm}^2$ であった。

今回確立したマウス三次元培養系は、角化および非角化重層扁平上皮におけるタイト結合の形成や機能を調べる上で有用な実験系である。

#### 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. Hatakeyama Y, Matsuda Y, Hatakeyama J, Oka K, Anan H, Tsuruga E, Inai T, Ishikawa H, Sawa Y. The effect of growth differentiation factor-5, 6, 7 in chondrogenic cell differentiation of ATDC-5. American Journal of BioScience. 2014; 2:188-192.
2. Hatakeyama Y, Hatakeyama J, Oka K, Tsuruga E, Inai T, Anan H, Sawa Y. Immunohistochemical Study of Amelogenin and Lysosome- Associate Membrane Proteins (LAMPs) in Cartilage. Int. J. Morphol.. 2014; 32: 618-626
3. Yamaguchi A, Kaneko T, Inai T, Iida H.

Molecular Cloning and Subcellular Localization of Tektin2-Binding Protein 1 (Ccdc 172) in Rat Spermatozoa J Histochem Cytochem 62(4):286-297, 2014. doi: 10.1369/0022155413520607.

4. Kitagawa N, Inai Y, Higuchi Y, Iida H, Inai T. Inhibition of JNK in HaCaT cells induced tight junction formation with decreased expression of cytokeratin 5, cytokeratin 17 and desmoglein 3. Histochem Cell Biol. 142(4):389-99, 2014 doi: 10.1007/s00418-014-1219-9.

5. Inada A, Inada O, Fujii NL, Fujishima K, Inai T, Fujii H, Sueishi K, Kurachi K.  $\beta$ -Cell Induction In Vivo in Severely Diabetic Male Mice by Changing the Circulating Levels and Pattern of the Ratios of Estradiol to Androgens. Endocrinology. 155(10):3829-42, 2014. doi: 10.1210/en.2014-1254.

6. Minakami M, Kitagawa N, Iida H, Anan H, Inai T. p38 Mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase regulate the accumulation of a tight junction protein, ZO-1, in cell-cell contacts in HaCaT cells. Tissue Cell. 47:1-9, 2015. doi: 10.1016/j.tice.2014.10.001.

7. Yamamoto T, Takahara K, Inai T, Node K, Teramoto N. Molecular analysis of ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel subunits expressed in mouse portal vein. Vascul Pharmacol. 75:29-39, 2015. doi:10.1016/j.vph.2015.06.018.

8. Shiomi R, Shigetomi K, Inai T, Sakai M, Ikenouchi J. CaMKII regulates the strength of the epithelial barrier. Sci Rep. 5:13262, 2015.

doi: 10.1038/srep13262.

9. Seo A, Kitagawa N, Matsuura T, Sato H, Inai T. Formation of keratinocyte multilayers on filters under airlifted or submerged culture conditions in medium containing calcium, ascorbic acid, and keratinocyte growth factor. Histochem Cell Biol. 146(5): 585-597, 2016. DOI:10.1007/s00418-016-1472-1

10. Tsukamoto M, Hiyama E, Hirofumi K, Gotoh T, Inai T, Iida H. Translocation of Tektin3 to the equatorial segment of heads in bull spermatozoa exposed to dibutyryl cAMP and calyculin A. Mol Reprod Dev. 84(1):30-43, 2017. doi: 10.1002/mrd.22763.

〔学会発表〕(計 19件)

1 . 北河憲雄、稲井哲一朗  
HaCaT 細胞のタイト結合形成誘導による基底細胞マーカー発現の変化  
第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会  
2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日  
福岡国際会議場

2 . 水上正彦、北河憲雄、阿南壽、稲井哲一朗  
HaCaT 細胞におけるタイト結合形成と Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)  
第 56 回 歯科基礎医学会学術大会・総会  
2014 年 9 月 25 日～9 月 27 日  
福岡国際会議場

3 . 北河憲雄、稲井哲一朗  
The effect of Nisin on keratinocyte cytoskeleton and intercellular junction.  
第 120 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2015 年 3 月 21 日～23 日  
神戸国際会議場・展示場

4 . 瀬尾皓, 松浦尚志, 江田 和夫, 稲井哲一  
朗, 佐藤博信

完全合成培地によるケラチノサイトの培養  
系の確立

平成 27 年度日本補綴歯科学会九州支部学  
術大会

2015 年 8 月 23 日

九州歯科大学

5 . T. Matsuura, A. Seo, Y. Arima, E.

Mizumachi, Y. Shinozaki, T. Inai, H. Sato

A 3D keratinocyte culture model creating  
keratinized epithelial equivalents.

International College of Prosthodontists 2015

September 17-20, 2015

COEX Convention & Exhibition Center/Seoul,  
Korea

6 . 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博信, 稲井哲一  
朗

ケラチノサイトの 3 次元培養系にかかわる  
因子の解析

第 42 回福岡歯科大学学会総会

2015 年 12 月 13 日

福岡歯科大学

7 . 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博信, 稲井哲一  
朗

ケラチノサイトの 3 次元培養系における角  
化, 重層化の解析

第 15 回日本再生医療学会総会

2016 年 3 月 17 日 ~ 3 月 19 日

大阪国際会議場

8 . 北河憲雄, 稲井哲一  
朗

血管内皮タイト結合に対する終末糖化産物  
の作用

第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会

2016 年 3 月 28 日 ~ 30 日

ビッグパレットふくしま

9 . 北河憲雄, 大谷崇仁, 稲井哲一  
朗

ケラチノサイトの細胞骨格に対する食品添  
加物 Nisin の作用

第 70 回栄養・食糧学会総会

2016 年 5 月 13 日 ~ 5 月 15 日

武庫川女子大学 中央キャンパス

10 . 北河憲雄, 大谷崇仁, 稲井哲一  
朗

Analysis of cytoskeleton in normal cells  
surrounding cancer cells.

第 58 回歯科基礎医学会学術大会

2016 年 8 月 24 日 ~ 8 月 26 日

札幌コンベンションセンター

11 . 北河憲雄, 大谷崇仁, 稲井哲一  
朗

JNK 阻害によるケラチノサイトの分化誘  
導

第 23 回日本歯科医学会総会

2016 年 10 月 21 日 ~ 10 月 23 日

福岡国際会議場

12 . 稲井哲一  
朗, 北河憲雄

タイト結合膜蛋白 claudin-10b と  
claudin-15 の機能解析

第 23 回日本歯科医学会総会

2016 年 10 月 21 日 ~ 10 月 23 日

福岡国際会議場

13 . 水上正彦, 北河憲雄, 阿南壽, 稲井  
哲一  
朗

HaCaT 細胞における Mitogen-Activated  
Protein Kinase ( MAPK ) のタイト結合形成  
への影響

第 23 回日本歯科医学会総会

2016 年 10 月 21 日 ~ 10 月 23 日

福岡国際会議場

14. 中山英明, 二階堂美咲, 北河憲雄,  
大谷崇仁, 阿南 壽, 稲井哲一朗  
マウス大腸癌由来 CMT93- 細胞における  
タイト結合蛋白 claudin の発現調節につい  
て  
第 43 回福岡歯科大学学会総会  
2016 年 12 月 18 日  
福岡歯科大学

15. 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博信, 稲井  
哲一朗  
ケラチノサイトの 3 次元培養系における角  
化, 重層化の解析  
第 15 回日本再生医療学会総会  
2016 年 3 月 17 日~3 月 19 日  
大阪国際会議場

16. 瀬尾皓, 宮園祥爾, 松浦尚志, 佐藤  
博信, 稲井哲一朗  
ケラチノサイトの 3 次元培養におけるカル  
シウム、アスコルビン酸、KGF の作用  
日本バイオマテリアル学会シンポジウム  
2016  
2016 年 11 月 21 日~11 月 22 日  
福岡国際会議場

17. 宮園祥爾, 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博  
信, 稲井哲一朗  
気液界面培養、液浸培養におけるタイトジ  
ヤンクシオンタンパク質の局在  
第 43 回福岡歯科大学学会総会  
2016 年 12 月 18 日  
福岡歯科大学

18. 北河憲雄, 大谷崇仁, 稲井哲一朗  
上皮単独による癌細胞排除機構の研究  
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2017 年 3 月 28 日~30 日  
長崎大学坂本キャンパス

19. 宮園祥爾, 瀬尾皓, 松浦尚志, 佐藤博  
信, 稲井哲一朗  
気液界面培養におけるタイト結合蛋白質の  
局在の変化  
第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会  
2017 年 3 月 28 日~30 日  
長崎大学坂本キャンパス

〔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  
稲井 哲一朗 (INAI, Tetsuichiro)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号: 00264044

(2)研究分担者  
北河 憲雄(KITAGAWA, Norio)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  
研究者番号: 40628517

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし