

細胞間タイト結合の役割と がん細胞における異常の分子機構の解明

静岡県立大学 薬学部 准教授 五十里 彰

医療技術の進歩や優れた新薬の開発により、人間の寿命は延長してきた。しかし、がんによる死亡者数が増加傾向にあり、新しい予防法と治療法の確立が期待される。肺がんによる死亡者数は、全がん死の約 20% を占め、がん死亡原因の第一位である。新しい抗がん剤の開発のため、がん細胞の浸潤や転移のメカニズムが解明されてきているが、未だ不明な点が多い。細胞間接着装置は細胞増殖の調節に関与しており、その異常が正常細胞のがん化に関与すると考えられる。近年、細胞間接着装置の分子実体としてクローディンが同定された。クローディンは24種類のサブタイプからなるファミリーを形成し、各組織におけるサブタイプの発現パターンは異なる。サブタイプの組み合わせの違いにより、細胞間接着装置の機能が変化すると考えられる。近年、乳がんや膀胱がんなどでクローディンの発現量が変化することが報告され、クローディンが新しい腫瘍マーカーとして利用され、さらに創薬のターゲットになると期待されている。しかし、クローディンの発現パターンはがんの種類によって異なることから、各臓器におけるクローディンの発現変化を網羅的に解明する必要がある。

本研究では、肺がん組織におけるクローディンの発現変化、クローディン発現の細胞増殖と浸潤に対する影響を検討する。さらに、クローディン発現の抗がん剤感受性に対する影響を調べる。クローディンの発現調節機構と病態生理的役割を解明することにより、がんに対する新しい予防薬・治療薬の開発につながると期待される。以下に本事業で得られた成果の概要を記す。

1 肺がん患者におけるクローディンの発現変化

肺がんは、組織学的に腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、小細胞がんの4種類に大きく分けられる。これらの病変部位と正常部位から抽出されたRNAを用いて、リアルタイムPCR法によりクローディンの発現量を調べた。正常部位では、クローディン-1、-3、-4、-5、-7、-9、-12、-18の発現が確認された。腺がんにおいて、クローディン-2の発現が有意に増加していることを発見した（図1）。一方、扁平上皮がん、大細胞がん、小細胞がんでは、あまり変化していなかった。クローディン-2は正常組織に発現しないため、腺がんの有用なマーカーになるとともに、新しい治療ターゲットになる可能性がある。そこで、クローディン-2発現が細胞運動性に及ぼす影響とクローディン-2の発現調節機構を検討することにした。

2 腺がん細胞におけるクローディン-2の発現解析

ヒト腺がん由来のA549培養細胞を用いて、クローディン-2の発現を確認したところ、遺伝子と蛋白質の発現が確認された。培養条件を検討したところ、培養後48～72時間後にクローディン-2の発現量が最大となり、96時間後には低下した。一方、

クローディン-1の発現量はほとんど変化せず、オクルディン（クローディンとともにタイトジャンクションに発現する膜貫通型蛋白質）とE-カドヘリン（アドヘレンスジャンクションに発現する膜貫通型蛋白質）の発現量は時間依存的に増加した。72時間後には、細胞がコンフルエントの状態になったので、クローディン-2の発現は細胞増殖に関係があると推察された。

3 クローディン-2の機能解析

細胞運動性に対するクローディン-2の影響を検討するため、クローディン-2ノックダウン細胞を作成した。クローディン-2に相補的な21塩基の配列を含む shRNA ベクターを細胞に導入した。このベクターは、ドキシサイクリンの有無でクローディン-2のノックダウンをコントロールすることができる。今回作成した細胞では、約40%までクローディン-2の発現量が低下した（図2）。クローディン-2の発現低下により、クローディン-1、オクルディン、E-カドヘリンの発現量は変化しなかった。細胞増殖に対するクローディン-2の影響を調べたところ、クローディン-2発現の低下により、細胞増殖が低下した。さらに、細胞の移動性と浸潤性も低下した。細胞の移動性は、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）と呼ばれる酵素によって調節される。MMP は数十種類のメンバーからなるファミリーを形成し、その中でも特にMMP-2とMMP-9 ががん組織で高発現している。また、MMP-2とMMP-9の機能は、TIMP-1と呼ばれる蛋白質によって抑制される。そこで、これらの発現量をリアルタイムPCR法で調べたところ、クローディン-2のノックダウンによりMMP-9の発現量と酵素活性が有意に低下することを発見した（図3）。

4 MMP-9の発現調節機構の解析

クローディン-2のノックダウンにより、MMP-9の発現量が低下したため、そのメカニズムを解析した。MMP-9の発現量は、c-Fos、c-Jun、NF- κ B、Sp1といった転写因子によって調節されることが報告されている。そこで、これら転写因子の細胞内分布を調べた。c-Fos、c-Jun、NF- κ Bの細胞内分は、クローディン-2のノックダウンによって変化しなかった。一方、核内におけるSp1の発現量が、クローディン-2のノックダウンによって有意に低下した。このことから、クローディン-2はSp1を核内へ移行させ、MMP-9の発現を増加させると示唆された。次に、A549細胞において、Sp1がMMP-9の発現調節に関与することを調べた。Sp1 siRNAを細胞に導入してSp1をノックダウンしたところ、MMP-9の転写活性、発現量、酵素活性が低下した。さらに、細胞の移動性も抑制された。これらの結果から、クローディン-2はSp1の核内分布を調節し、Sp1がMMP-9の発現を増加させることにより、細胞の移動性が亢進すると示唆された。以上の研究成果は、Life Sciences（文献1）に掲載された。

5 クローディン-2の発現と抗がん剤感受性の関係

肺がんの治療に使用されるエトポシド、イリノテカン、シスプラチン、ゲフィチニブについて、クローディン-2の発現と抗がん剤感受性の関係を調べた。ミトコンドリア活性の指標となるWST-1を用いて、細胞障害性を算出した。抗がん剤は濃度

依存的に細胞障害性を増大した。クローディン-2のノックダウンにより、抗がん剤に対する感受性が増加する傾向がみられたが、まだ例数が少ないため、今後より詳細に検討する必要がある。

6 クローディン-2の発現調節機構の解析

肺腺がん細胞におけるクローディン-2の発現増加が、細胞の移動性を亢進する結果が得られたので、クローディン-2の発現調節機構を検討した。細胞内シグナル伝達因子として知られているMEK、JNK、p38、PKA、PKCの各種阻害剤を用いて、クローディン-2の発現に対する影響を調べたところ、MEK阻害剤のU0126でクローディン-2の発現が低下した。他の阻害剤ではクローディン-2の発現がほとんど変化しなかった。細胞成長因子が受容体に結合することによって、MEKは活性化される。そこで、上皮成長因子（EGF）中和抗体とEGF受容体阻害剤の効果を調べたところ、どちらもクローディン-2の発現を低下させた。さらに、MEKの下流に存在するc-Fosに対するsiRNAを導入したところ、クローディン-2の発現が低下した。以上のことから、A549細胞においてEGFが分泌され、EGF受容体 MEK c-Fosといったシグナル伝達経路の活性化を介して、クローディン-2の発現が増加することが明らかになった。現在、クローディン-2のプロモーター領域を用いて、c-Fosの作用部位に関する解析を続けている。

7 正常組織でのクローディン-2の発現

がん組織と正常組織におけるクローディン-2の発現調節機構と機能を比較するため、内在的にクローディン-2を発現する腎尿細管細胞を用いて実験を行った。イヌ腎尿細管由来のMDCK細胞には、クローディン-1、-2、-3、-4、-5、-7が発現しており、A549の発現パターンと類似している。EGFを処理したところ、MEKの活性化を介してクローディン-2の発現量が低下した（文献2）。A549細胞では、MEKの活性化によりクローディン-2の発現量が増加したことから、臓器によってクローディン-2の発現調節機構は異なることが明らかになった。

8 正常組織でのクローディン-2の役割

肺がん細胞と腎尿細管細胞で、クローディン-2の発現調節機構が異なることが明らかになったため、クローディン-2の細胞運動性に対する影響を調べた。MDCK細胞にクローディン-2 shRNAベクターを導入し、ドキシサイクリンの有無でクローディン-2のノックダウンをコントロールした。クローディン-2の発現低下により、クローディン-1、オクルディン、E-カドヘリンなどの発現量は変化しなかった。クローディン-2の発現低下により、細胞増殖は変化しなかったが、移動性が増加した。さらに、MMP-9の発現量と活性も増加した（文献3）。以上のことから、細胞移動性に対するクローディン-2の効果も、臓器によって異なることが明らかになった。

まとめ

本研究において、我々は肺腺がんにおいてクローディン-2の発現が増加し、細胞の

浸潤性と移動性が亢進することを発見した。さらに、EGF受容体、MEK、c-Fos経路の活性化を介してクローディン-2の発現が増加することを突き止めた。クローディン-2が細胞の浸潤性と移動性の調節に関与することから、クローディン-2とその発現調節因子をターゲットにした薬剤は新しい作用機序の抗がん剤になる可能性がある。また、クローディン-2の発現が低下した細胞は、抗がん剤に対する感受性が増加したことから、クローディン-2に作用する薬剤は、既存薬との併用にも効果があると考えられる。内在的にクローディン-2を発現する尿細管細胞では、肺腺がん細胞と異なり、EGF受容体の活性化によりクローディン-2の発現が低下した。さらに、MMP-9の発現量と細胞の移動性が亢進した。クローディン-2の発現臓器の違いにより、その発現調節機構と細胞運動性に対する効果は異なることが明らかになった。本研究成果は、肺がんだけでなく、他のがんや病態におけるクローディンの役割の解明と治療薬の開発につながると期待される。

文献

1. Ikari, A., Sato, T., Takiguchi, A., Atomi, K., Yamazaki, Y. & Sugatani, J. Claudin-2 knockdown decreases matrix metalloproteinase-9 activity and cell migration via suppression of nuclear Sp1 in A549 cells. *Life Sciences* 88, 628-633, 2011年
2. Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K. & Sugatani, J. Epidermal growth factor increases clathrin-dependent endocytosis and degradation of claudin-2 protein in MDCK II cells. *Journal of Cellular Physiology*, in press, 2011年
3. Ikari, A., Takiguchi, A., Atomi, K., Sato, T. & Sugatani, J. Decrease in claudin-2 expression enhances cell migration in renal epithelial Madin-Darby canine kidney cells. *Journal of Cellular Physiology*, 226, 1471-1478, 2011年

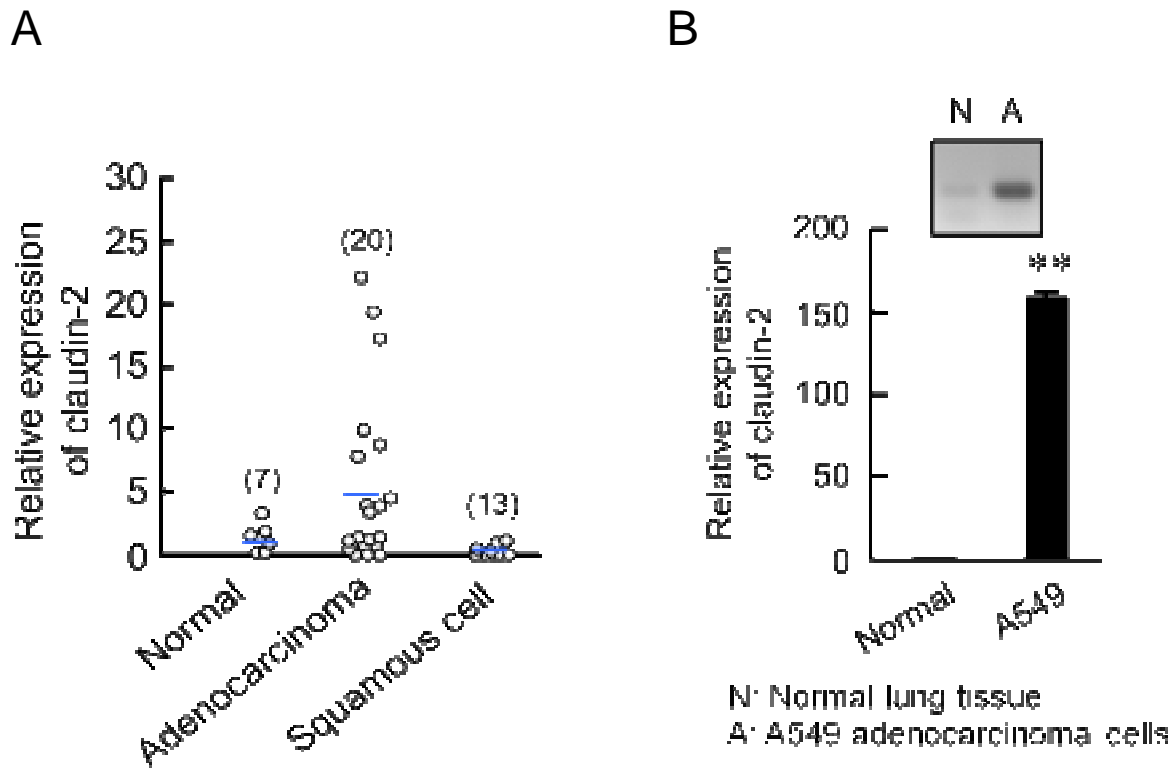


図1 肺腺がんにおけるクローディン-2発現の増加

(A) ヒト肺正常組織、腺がん組織、扁平上皮組織におけるクローディン-2の発現量を、RT-PCR法で調べた。腺がん細胞でクローディン-2発現が増加した。括弧内の数値は例数を示す。(B) 正常組織とA549肺腺がん培養細胞を用いて、クローディン-2の発現量を調べた。A549細胞でクローディン-2発現が有意に増加した。上図はアガロースゲルに電気泳動後のバンドを示す。

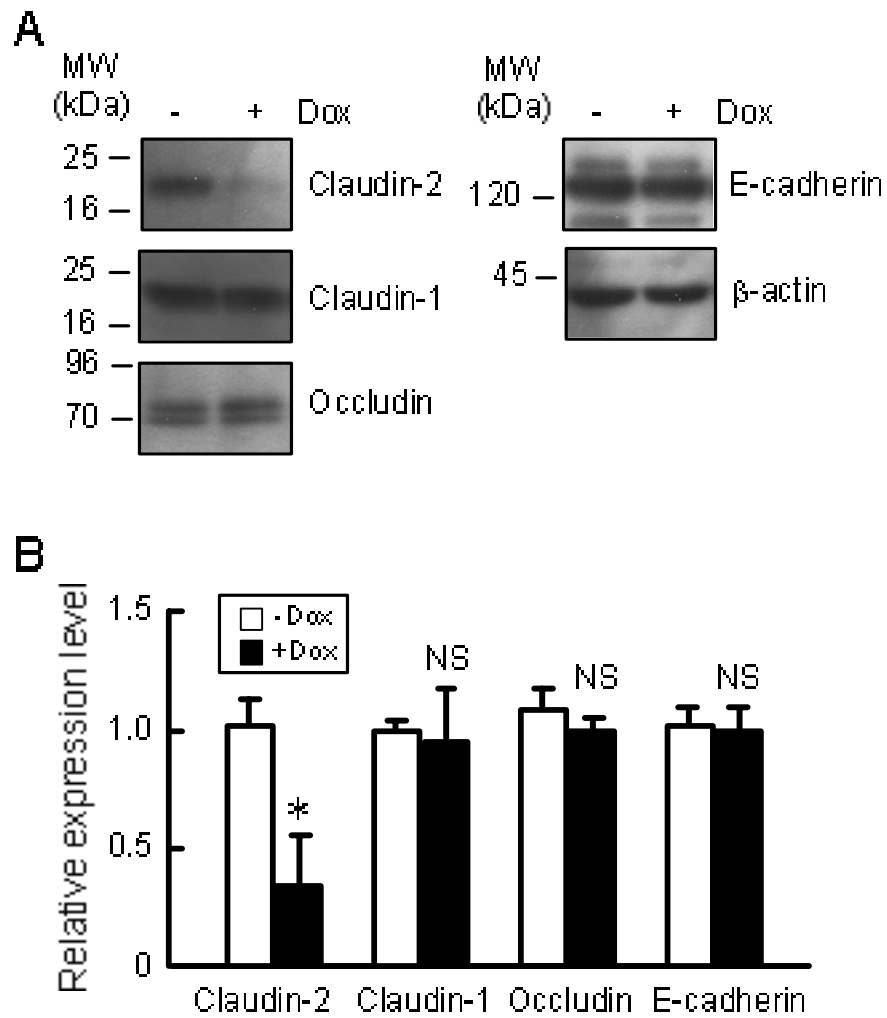


図2 クローディン-2のノックダウンの効果

(A) ウエスタンプロットの結果を示す。ドキシサイクリンの添加により、クローディン-2の発現量が低下した。一方、クローディン-1、オクルディン、E-カドヘリン、β-アクチンの発現量は変化しなかった。(B) ウエスタンプロットで得られたバンド強度を数値化し、発現量を比較した。ドキシサイクリンの添加により、クローディン-2の発現量が有意に低下した。

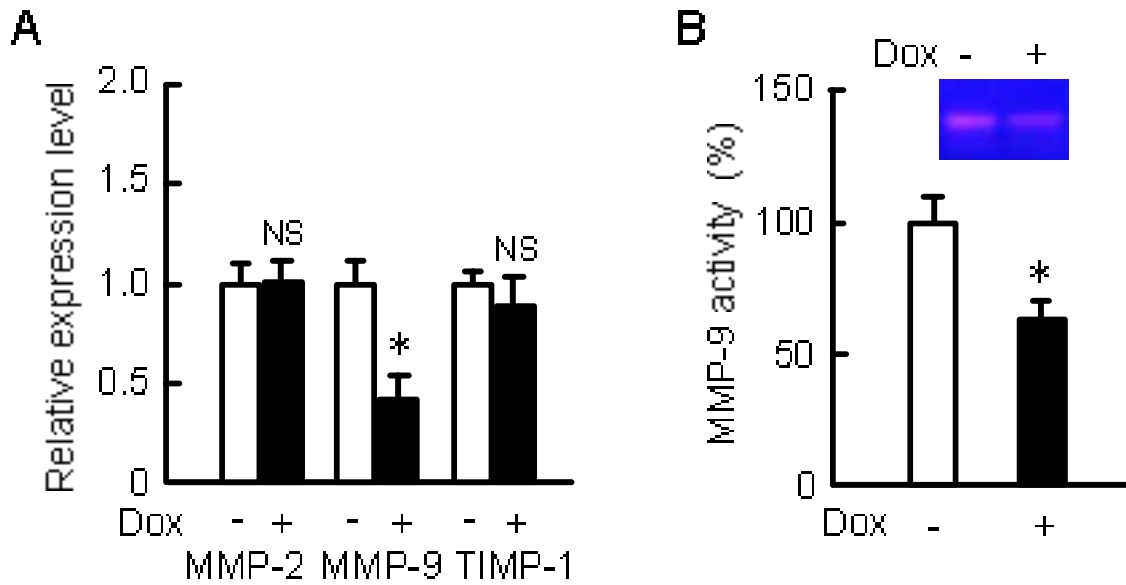


図3 クローディン-2ノックダウンによる MMP-9の発現量と活性の低下

(A) RT-PCR法で、MMP-2、MMP-9、TIMP-1の発現量を調べた。ドキシサイクリンの添加により、MMP-9の発現量が低下したが、MMP-2とTIMP-1は変化しなかった。(B) ゼラチンザイモグラフィー法で、MMP-9の活性を調べた。上図は電気泳動後のゲルの写真を示す。MMP-9のバンド強度を数値化し、発現量を比較した。