

—総説—

細胞間接着を起点とするがん化機構に関する研究

五十里 彰*

要約：肺がんによる死亡者数は増加傾向にあり、新たな治療標的の同定と治療法の開発が必要である。これまでに著者らは、細胞間接着を構成するクローディン-2が正常肺組織に発現しないが、腺がん組織に高発現することを見出している。肺腺がん細胞におけるクローディン-2の発現をノックダウンすると細胞増殖能が低下したため、クローディン-2による細胞増殖の調節機構を検討した。また、クローディン-2が肺腺がんの治療標的になると考えられたため、クローディン-2発現を抑制する化合物を探索した。その結果、増殖期の細胞においてクローディン-2は核内とタイトジャンクションに分布し、細胞周期調節因子のZO-1 associated nucleic acid binding protein (ZONAB)と結合することを解明した。クローディン-2の発現をノックダウンすると、ZONABの発現量が低下してG1期の細胞の割合が増加した。クローディン-2の核移行機序を検討し、208番目のセリン残基のリン酸化が一部関与することを突き止めた。また、クローディン-2指向性ペプチドがタイトジャンクションから細胞質内へのクローディン-2の移行を介してネクロシスによる細胞死を誘導することを発見した。クローディン-2はクラスリン依存性エンドサイトーシスによって細胞質内へ移行し、リソソームで分解された。フラボノイドのケルセチンはクローディン-2の転写活性を低下させず、miR-16マイクロRNAの発現誘導を介してクローディン-2 mRNA量の安定性を低下させ、その発現量を低下させた。クローディン-2を起点とするがん化機構の解明とその阻害剤の探索は、肺腺がんの新たな治療法の開発につながると期待できる。

索引用語：肺がん、タイトジャンクション、クローディン、核移行、マイクロRNA

Molecular Mechanism Underlying Carcinogenesis Caused by Abnormal Cell-cell Contact

Akira IKARI

Abstract: The mortality associated with lung cancer has been increasing; consequently, novel therapeutic targets need to be identified and novel therapeutic methods need to be developed. We recently reported that claudin-2, a component of the tight junction (TJ), was expressed in human lung adenocarcinoma, whereas it was absent from normal lung tissues. Knockdown of claudin-2 in lung adenocarcinoma cells decreased their proliferation. Therefore, we examined the mechanism underlying the regulation of cell proliferation by claudin-2. Moreover, we sought out compounds that can decrease claudin-2 expression. We found that claudin-2 was distributed both in the nucleus and in the TJ in proliferating cells and was bound with the ZO-1 associated nucleic acid binding (ZONAB) protein, which controls cell-cycle regulator expression. shRNA-mediated knockdown of claudin-2 decreased ZONAB expression and increased the proportion of cells in the G1 phase of the cell cycle. Moreover, we examined the nuclear trafficking of claudin-2 and found that this trafficking was regulated in part by the phosphorylation of claudin-2 at Ser208. The short peptide, DFYSP, whose sequence mimics the second extracellular loop of claudin-2, caused claudin-2 to be trafficked from the TJ to cytosol, increased lysosomal degradation of claudin-2, and induced necrotic cell death. Transport of claudin-2 to the cytosol was mediated via a clathrin-dependent endocytosis pathway. Quercetin, a flavonoid, decreased claudin-2 expression through the induction of miR-16 and a decrease in the stability of claudin-2 mRNA, although it did not inhibit the transcriptional activity of the claudin-2 gene. The clarification of the involvement of claudin-2 in the molecular mechanism underlying carcinogenesis and the identification of claudin-2 inhibitors will lead to the development of novel agents for the treatment of lung adenocarcinoma.

Key phrases: lung cancer, tight junction, claudin, nuclear trafficking, microRNA

1. 緒言

基礎医学の進歩とともに、再生医療、分子標的治療、遺伝子治療などが現実化し、人々の寿命が延長している。しかし、平均寿命の延長に伴い、がんや生活習慣病に罹患する人が増加している。日本では、2人に1人ががんを患い、3人に1人ががんで亡くなる時代になった。正常な細胞の遺伝子に傷がつくことによってがん細胞が発生するため、長生きをするほど細胞ががん化する可能性は高くなる。そのため、がんと長寿は切り離せない関係にある。部位別にがん死亡者数をみると、男性では肺がん、胃がん、大腸がん、女性では大腸がん、肺がん、胃がんが上位を占める。肺がんのリスクとして喫煙が知られており、喫煙者の肺がん発生率は非喫煙者に比べて約4倍高いとの報告がある。喫煙以外にも、アスベストやディーゼル排気ガスなどが肺がんリスクを増大させ、女性ホルモンの関与も報告されている¹⁾。

肺がんは組織学的に非小細胞がん (NSCLC) と小細胞がん (SCLC) の2種類に分類され、非小細胞がんはさらに腺がん、扁平上皮がん、大細胞がんに分類される。肺がんの60%は腺がんが占め、次に扁平上皮がんが多くみられる²⁾。一方、大細胞がんや小細胞がんの発症頻度は比較的低い。小細胞がんは抗がん剤や放射線治療の効果が得られやすいが、非小細胞がんはこれらの治療効果が得られにくく、手術を中心とした治療が行われる。近年、上皮成長因子受容体などに作用する分子標的治療薬が開発され、肺がんの治療効果が向上したが、進行性肺がんでは十分な治療効果が得られないことや、重度の副作用、薬剤耐性などによって治療薬の使用が制限されることがある³⁾。そのため、肺がん組織に特異的に発現する新規標的分子の同定とその標的に作用する治療薬の開発研究が必要である。

上皮細胞は細胞間にタイトジャンクションを形成し、物質の透過性、細胞極性、増殖などを制御する^{4,5)}。タイトジャンクションは4回膜貫通型タンパク質のクローディンやオクルディン、裏打ちタンパク質のZO-1やZO-2、シグナル伝達因子などで構成される⁶⁾。クローディンには27種類のサブタイプが存在し、正常組織におけるサブタイプの発現パターンは異なる。また、がんや炎症により、サブタイプの発現パターンが変化することが明らかになってきた。ヒトがん組織で発現変化が報告されたクローディンをTable 1にまとめる。我々はヒト正常肺組織およびがん組織から調製されたcDNAを用いて、クローディンの網羅的発現解析を行った。その結果、腺がん組織でクローディン-2が高発現すること⁷⁾、クローディン-18の発現が低下していることを見出した⁸⁾。本総説ではがん細胞の増殖に対するクローディン-2とクローディン-18の影響、クローディン-2の発現を抑制する化合物について詳述する。

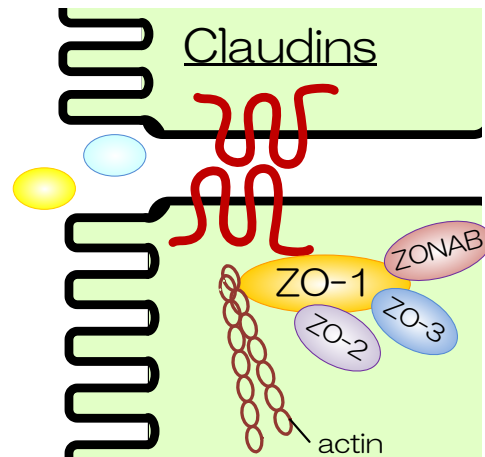


Fig. 1. Structure of tight junction.

2. クローディン-2発現と細胞増殖能の関係

1) 培養時間と細胞間接着分子の発現の関係

ヒト肺腺がん由来のA549細胞におけるクローディン-2の発現と培養日数との関係を調べたところ、細胞増殖能を有する48時間と72時間でクローディン-2の発現量が増加した (Fig. 2)。一方、96時間後のコンフルエントの状態では、クローディン-2の発現量が低下した。他の細胞間接着分子の発現量も調べたところ、クローディン-1はあまり変化せず、E-カドヘリンは時間経過とともに増加した。以上の結果から、細胞増殖能とクローディン-2の発現量に何らかの関係があると示唆されたため、その機序を検討することにした。

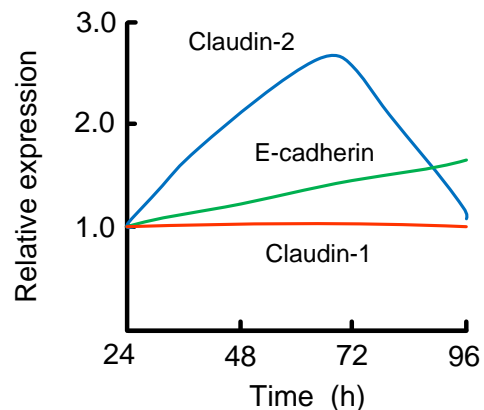


Fig. 2. Relative expression of claudin-1, claudin-2 and E-cadherin in lung adenocarcinoma cells.

2) クローディン-2による細胞増殖の促進機序

クローディン-2の発現をノックダウンするため、claudin-2/pSingle-tTS-shRNAベクターを構築し、A549細胞に安定発現させた。このベクターを導入した細胞では、テ

Table 1. Expression of claudin subtypes in human tumor tissues

Tumor tissues	Up	Down
Colon	1, 2, 3, 12	4, 8
Stomach	1, 3, 7	4, 18, 23
Thyroid gland	1, 7	
Esophagus	1, 2, 3, 4	7
Hepatoblastoma	1, 2	3, 4
Lung	2, 5	18
Breast	16	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7
Prostate	3, 4	2
Ovary	3, 4, 7, 16	
Pancreas	3, 4, 18	

トラサイクリンの添加により、クローディン-2 に対する shRNA が発現誘導され、クローディン-2 発現をノックダウンすることができる (Fig. 3)。クローディン-2 ノックダウン細胞では、発現細胞に比べて細胞増殖能が有意に低下したため、フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析したところ、G1 期の細胞数が増加し、S 期の細胞数が減少した (Table 2)。このことからクローディン-2 は G1 期から S 期への細胞周期の移行を調節すると示唆された。

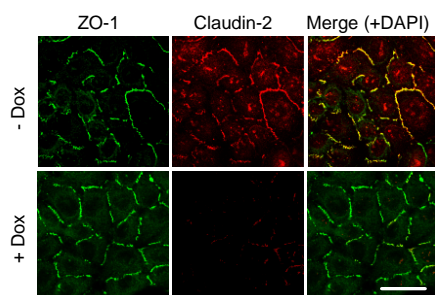


Fig. 3. Cellular localization of claudin-2 in claudin-2 KD/A549 cells. Cells were cultured in the presence (+Dox) and absence (-Dox) of doxycycline, a stable tetracycline analogue. The cells were stained with claudin-2 (red) and ZO-1 (green). The scale bar represents 10 μ m. The results were cited from ref 16.

Table 2. Effect of claudin-2 expression on the percentage of cells in G1, S, G2/M phase of the cell cycle

Claudin-2	Cell population (%)		
	G1	S	G2/M
-	61.5 \pm 0.7	22.1 \pm 0.7	16.0 \pm 0.2
+	69.5 \pm 0.2	14.8 \pm 0.2	15.1 \pm 0.3

細胞周期の進行は 3 つのチェックポイントで監視されており、サイクリンやサイクリン依存性キナーゼの複合体によって調節される。クローディン-2 ノックダウンにより、G1 期から S 期への移行調節に関わるサイクリン D1 とサ

イクリン E1 の発現量が低下した。これらの細胞周期調節因子の発現は、ZO-1 associated nucleic acid binding protein (ZONAB) によって調節されることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。ZONAB の細胞内分布を調べたところ、クローディン-2 と核内に分布していた。一方、クローディン-2 ノックダウン細胞では、核内における ZONAB の発現量が低下した。次に、細胞増殖に対する ZONAB 発現の影響を調べた。ZONAB siRNA を用いてその発現をノックダウンすると、サイクリン D1 とサイクリン E1 の発現低下とともに、G1 期の細胞数が増加した。以上の結果から、クローディン-2 は ZONAB の核内分布を増加させ、細胞増殖を促進させることが示唆された。サイクリン D1 は glycogen synthase kinase-3 β によってリン酸化されて核外へ運ばれる。その後、サイクリン D1 はユビキチンリガーゼによってユビキチン化され、プロテアソームで分解される^{12) 13)}。クローディン-2 は核内で ZONAB やサイクリン D1 と複合体を形成し、サイクリン D1 のリン酸化と核外移行を抑制すると推察される。

3. クローディン-2 の核移行と役割

1) 核局在性クローディン-2 の役割

A549 細胞を用いた一連の解析で、クローディン-2 はタイトジャンクションだけでなく核内にも分布することを発見した。クローディン-2 の配列に、既知の核移行シグナルが存在しないため、核移行シグナル (NLS) または核外移行シグナル (NES) を付加したクローディン-2 を発現させ、細胞増殖に対する影響を検討した。NLS-クローディン-2 発現細胞では、NES-クローディン-2 発現細胞に比べて ZONAB の発現量が増加し、細胞増殖能が亢進した。さらに、G1 期の細胞数が減少し、S 期の細胞数が増加したことから、核内に分布するクローディン-2 は G1 期から S 期への移行を促進させることが示唆された。

2) クローディン-2 のリン酸化と核移行の関係

大腸がん細胞でクローディン-1 は核内に分布することが報告されている¹⁴⁾。肺腺がん細胞でクローディン-1 は核内に分布しなかったため、その局在は組織特異的に調節されると考えられた。核局在性クローディン-1 の役割は解明されていないが、 β -カテニンの局在を調節することにより、細胞浸潤能に影響を及ぼすと考えられている。我々は肺腺がん組織でクローディン-2 が核内に分布することを発見したが、他のがん組織を含めて同様の報告はなく、その調節機構は不明である。カルボキシ側細胞質ドメインを除去したクローディン-2 を A549 細胞に発現させたところ、核内のクローディン-2 分布量が低下したため (Fig. 4)、細胞質ドメインに核移行シグナルが含まれることが示唆された。細胞質ドメインにリン酸化部位が存在するため、核移行に対するリン酸化の影響を検討することにした。

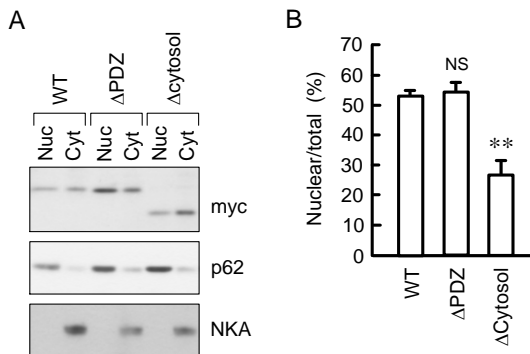


Fig. 4. Decrease in nuclear claudin-2 level by deletion of carboxyl-terminal cytosolic region. (A) Cells were transiently transfected with WT, Δ PDZ, or Δ cytosol claudin-2/pCMV-Tag3. Nuclear (Nuc) and cytoplasmic (Cyt) fractions were immunoblotted with anti-myc, nucleoporin p62, and NKA antibodies. (B) The nuclear levels of claudin-2 were represented relative to the total level. ** $P < 0.01$ significantly different from values of WT. NS, $P > 0.05$. $n = 4$. The results were cited from ref 16.

これまでにアデニル酸シクラーゼ活性化剤のフォルスコリンが、腎尿管細胞でクローディン-2 を脱リン酸化することが報告されている¹⁵⁾。A549 細胞においてもフォルスコリンはクローディン-2 を脱リン酸化した。さらに、フォルスコリンは核内のクローディン-2 分布量を増加させたため、脱リン酸により核移行が促進することが示唆された。そこで、208 番目のセリンをアラニンに置換した脱リン酸化 (S208A) 変異体を A549 細胞に発現させ、細胞内局在を調べた。ウエスタンブロット法および蛍光免疫染色法 (Fig. 5) により、野生型に比べて S208A 変異体の核内分布量が多いことが示された。

以上の結果から、クローディン-2 の核移行の一部は、リン酸化によって制御され、核局在性クローディン-2 が細胞増殖の亢進に関与することが明らかになった¹⁶⁾。

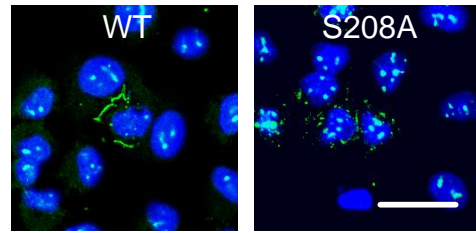


Fig. 5. Nuclear distribution of S208A mutant of claudin-2. Wild-type (WT) or S208A mutant of claudin-2 was transfected in A549 cells. The green and blue color indicate claudin-2 and nuclei, respectively. The scale bar represents 10 μ m. The results were cited from ref 16.

4. クローディン-2 指向性ペプチドによるクローディン-2 の発現低下と細胞障害の増大

1) クローディン-2 指向性ペプチドの選択性

上述のように、我々はヒト肺腺がん組織でクローディン-2 が高発現することを見出し、クローディン-2 のノックダウンによって細胞増殖能が低下することを解明した。近年、乳腺上皮細胞において、クローディン-3 やクローディン-4 の細胞外ループ構造と同一構造の短鎖ペプチド (クローディン-3/4 指向性ペプチド: DFYNP) が、クローディン-3 とクローディン-4 の発現量を低下させ、細胞死を誘導することが報告された¹⁷⁾。一方、クローディン-2 の細胞外ループの構造は一部異なっており、DFYNP が作用しない可能性が高い。そこでクローディン-2 発現細胞を用いてクローディン-2 指向性ペプチド (DFYSP) の効果を検討したところ、クローディン-2 の発現量が低下することを見出した。

クローディン-2 指向性ペプチドの DFYSP は、クローディン-2 の発現量を濃度依存的に低下させた。一方、クローディン-1 の発現量を変化させなかった。A549 細胞にクローディン-3 とクローディン-4 が発現しないため、発現ベクターを用いてこれらのクローディンを過剰発現させ、DFYSP の効果を調べたところ、クローディン-1 と同様にクローディン-3、-4 の発現量は変化しなかった。以上のことから、DFYSP はクローディン-2 に選択的に作用することが明らかになった。真核細胞にはユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー・リソソーム系の 2 つの主要なタンパク質分解経路が存在する。DFYSP によるクローディン-2 発現の低下に、これらの分解機構が関与するか否かを解明するため、リソソーム阻害剤のクロロキン、プロテアソーム阻害剤の MG-132 の効果を検討した。DFYSP とクロロキンの共処理により、クローディン-2 の発現低下が阻害された。一方、MG-132 の共処理では阻害されなかった。以上のことから、DFYSP はリソソームにおけるクローディン-2 の分解を促進することが示唆された。

2) DFYSP の作用機序

蛍光免疫染色法により、クローディン-2の細胞内局在に対するペプチドの効果を調べた。無処理細胞でクローディン-2は、タイトジャンクションと核に分布する。DFYSP 処理により、タイトジャンクションに分布するクローディン-2の蛍光強度が低下したが、核内の蛍光強度はほとんど変化しなかった。また、ランダムペプチド処理により、クローディン-2の細胞内分布は変化しなかった。同様の結果が、核/細胞質画分を用いたウエスタンブロット法でも確認されたため、DFYSP はタイトジャンクションに分布するクローディン-2に選択的に作用すると示唆された。DFYSP とクロロキンの共処理により、細胞質内のクローディン-2の分布量が増加した。クローディン-2の局在を調べたところ、ゴルジマーカと共局在せず、リソソームマーカ LAMP-1 と共局在したため (Fig. 6)、タイトジャンクションのクローディン-2 がタイトジャンクションからリソソームへ移行すると示唆された。クローディン-2は核内にも分布するため、ペプチドが核内へ移行する可能性について検討した。FITC 標識した DFYSP を細胞に処理し、2 時間後に蛍光画像を観察し、核内のペプチド量を測定した。その結果、無処理細胞と比較して、核内の蛍光強度は増加しなかった (Fig. 7)。以上のことから、DFYSP はタイトジャンクションに分布するクローディン-2に結合し、クローディン-2 のエンドサイトーシスおよびリソソームへの移行を促進させると示唆された。

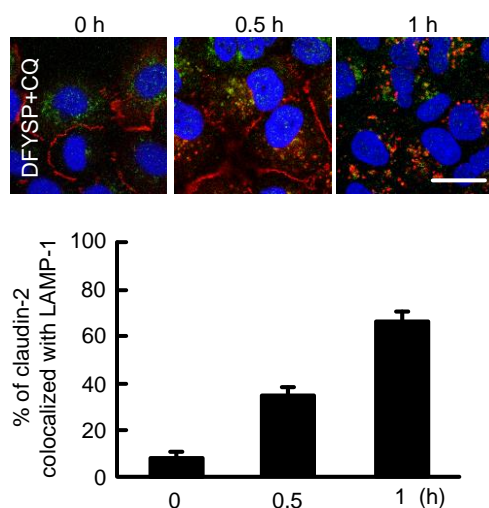


Fig. 6. Accumulation of claudin-2 in the lysosome by DFYSP peptide and chloroquine (CQ). A549 cells were treated with 500 μ M DFYSP peptide plus 100 μ M CQ for the periods indicated. The cells were stained with claudin-2 (red), LAMP-1 (green), and DAPI (blue). The co-localization region between claudin-2 and LAMP-1 was manually marked using ImageJ. The intensity of co-localization region was shown as percentage of total intensity of claudin-2 in the cytoplasmic and junctional regions. The scale bar represents 10 μ m. The results were cited from ref 21.

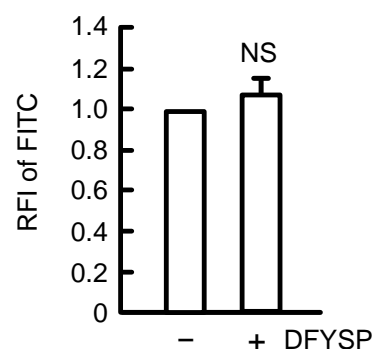


Fig. 7. Distribution of FITC-labeled DFYSP peptide in the nuclei. Claudin-2 KD/A549 cells were cultured in the absence of doxycycline. The cells were incubated with DAPI in the presence and absence of 500 μ M FITC-labeled DFYSP peptide for 120 min. The intensity of FITC-labeled peptide in the nuclei was determined by measuring the mean pixel density using ImageJ software and represented as the fold increase relative to the value in the absence of FITC-labeled peptide. Statistical comparison was made by student *t* test. NS, not significantly different. The results were cited from ref 21.

3) クローディン-2のエンドサイトーシス機構

膜タンパク質のエンドサイトーシスには、クラスリン依存性経路、カベオラ依存性経路、アクチン依存性経路などが関与する。クローディン-2のエンドサイトーシスの機序を解明するため、クラスリン依存性経路阻害剤のモノダンシルカダベリン、カベオラ依存性経路阻害剤のメチル- β -シクロデキストリン、アクチン依存性経路阻害剤のサイトカラシン B の効果を検討した。その結果、DFYSP によるクローディン-2 発現の低下が、モノダンシルカダベリン共処理によって阻害されたが、メチル- β -シクロデキストリンとサイトカラシン B では阻害されなかった。同様に、蛍光免疫染色において、DFYSP とモノダンシルカダベリンを共処理した細胞では、クローディン-2はタイトジャンクションに分布した。このことから、DFYSP が結合したクローディン-2はクラスリン依存性エンドサイトーシスにより、細胞質内へ移行すると示唆された。

4) DFYSP による細胞障害機構

DFYSP 処理により、培養ディッシュから解離する細胞が増加したため、細胞障害に対する影響を検討することにした。クローディン-2を発現する A549 細胞において、DFYSP は濃度依存的に細胞障害を増大した。一方、クローディン-2発現をノックダウンした細胞において、DFYSP による細胞障害は有意に抑制された。ランダムペプチドでは、細胞障害が有意に増加しなかった。細胞障害に対するエンドサイトーシス阻害剤の効果を調べたところ、DFYSP による細胞障害の増大がモノダンシルカダベリンの共処

理で阻害されたが、メチル- β -シクロデキストリンやサイトカラシン B の共処理で阻害されなかった。これらの結果は、ウェスタンブロット法や蛍光免疫染色法における結果と一致する。以上のことから、DFYSP はクローディン-2 を細胞質内へ移行させ、細胞障害を増大させることが示唆された。

DFYSP とクロロキンの共処理により、クローディン-2 がリソソームに分布したため、細胞障害の誘導にリソソームが関与すると考えた。リソソームマーカーの Lyso-ID で細胞を染色したところ、DFYSP を処理した細胞では Lyso-ID の蛍光強度と細胞内に占める割合が増大したため、リソソーム量が増加したと推察された。一方、ランダムペプチド処理でリソソーム量は有意に変化しなかった。リソソームにはヌクレアーゼ、グリコシダーゼ、リパーゼなどの多くの酵素が含まれており、膜の崩壊によってネクロシスやアポトーシスが引き起こされる^{18,19}。DFYSP がリソソーム膜に及ぼす影響を解明するため、カテプシン B の細胞内漏出量を調べたところ、DFYSP はカテプシン B の漏出量を増加させた。カテプシン B の漏出は、モノダンシルカダベリンの共処理で阻害されたが、メチル- β -シクロデキストリンやサイトカラシン B の共処理では阻害されなかった。これらの結果は、細胞障害の結果と一致する。活性酸素種の産生、微小管阻害、DNA 損傷などによりリソソーム膜が崩壊することが報告されている¹⁹。今後、DFYSP によるカテプシン B の漏出機序を解明する必要がある。

細胞死はネクロシスとアポトーシスに大別される。クローディンとともにタイトジャンクションに分布するオクルディンについて、細胞死との関係が報告されている²⁰。オクルディンの細胞外ループ構造と同一構造の短鎖ペプチド (LYHY) は細胞質内のオクルディン量を増加させ、アポトーシスによる細胞死を誘導する。また、アポトーシスに関わるカスパーゼ-3 やカスパーゼ-8 の活性化がおこるため、オクルディンの細胞内移行はアポトーシスを誘導すると示唆される。さらに乳がん細胞において DFYNP はクローディン-3 とクローディン-4 の細胞内移行を促進させ、アポトーシスを誘導する¹⁷。このように短鎖ペプチドがアポトーシスによる細胞死を誘導することが報告されていたため、DFYSP も肺腺がん細胞のアポトーシスを起こすと考えたが、DFYSP による細胞障害はアポトーシス阻害剤の Z-VAD-FMK で抑制されず、部分的にネクロシス阻害剤の necrostatin-1 で抑制された。さらに、アネキシン V 染色法や TUNEL 法でアポトーシスの関与を検討したところ、アポトーシス誘導剤のエトポシドでアポトーシスが見られたが、DFYSP はアポトーシスを誘導しなかった。以上のことから、DFYSP は LYHY や DFYNP と異なり、ネクロシスによる細胞死を誘導することが明らかになった²¹。

5. クローディン-2 発現に対する ケルセチンの効果

1) ケルセチンの抗がん効果

クローディン-2 は細胞増殖の調節に関わるため、その発現を抑制する化合物は肺腺がんの予防や治療に効果があると推察される。これまでクローディン-2 の発現低下作用を有する天然化合物は報告されていない。我々は、がん細胞の増殖抑制効果や細胞死誘導効果を有するケルセチンの効果を検討することにした。ケルセチンはフラボノイドの一種で、リンゴやタマネギに豊富に含まれる。強い抗酸化作用を有しており、がんだけでなく動脈硬化や糖尿病などの生活習慣病の予防にも有用であると期待されている。がん細胞においてケルセチンは、Bcl-2 の低下、シトクロム c の放出、カスパーゼの活性化を介してアポトーシスを誘導することが明らかになっている^{22,23}。しかし、がん細胞の増殖抑制機序は不明なままである。A549 細胞においてケルセチンは、クローディン-1 の発現変化を伴わずにクローディン-2 の発現増加を阻害した。この結果から、ケルセチンはクローディン-2 の発現増加を選択的に阻害することが示唆されたため、その機序を検討することにした。

2) クローディン-2 の転写活性に対するケルセチンの効果

これまでに我々は、クローディン-2 の発現が、mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路や phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/Akt 経路によって調節されることを見出している。MEK/ERK 経路阻害剤の U0126 と PI3K/Akt 経路阻害剤の LY-294002 は、それぞれ ERK と Akt のリン酸化を阻害し、クローディン-2 の発現量を低下させた^{24,25}。一方、ケルセチンは、ERK や Akt のリン酸化量を変化させなかったため、他の機序を介してクローディン-2 の発現を低下させることが示唆された。タンパク質安定性の変化を調べるため、翻訳阻害剤であるシクロヘキシミドの存在下で、ケルセチンの効果を調べた。その結果、クローディン-2 タンパク質の発現量は、ケルセチンの影響を受けずに時間依存的に低下した。また、リアルタイム PCR 法によりクローディン-2 mRNA 量を調べたところ、ケルセチン処理により有意に mRNA 量が低下した。以上のことから、ケルセチンはクローディン-2 タンパク質の安定性を変化させず、mRNA 量を低下させることが明らかになったため、転写活性を調べることにした。クローディン-2 の転写活性は、AP-1、GATA、HNF-1 α 、cdx といった転写調節因子によって調節される²⁶⁻²⁸ (Fig. 8)。ヒトクローディン-2 のプロモーター領域を用いて転写活性を調べたところ、U0126 と LY-294002 は転写活性を低下させたが、ケルセチンは転写活性を増加させた。クローディン-2 のプロモーター領域として約 1,000 bp 上流までを使用したため、他の領域に抑

制因子が結合するという可能性を否定できないが、ケルセチンは別の機序によりクロードイン-2 の発現を低下させると考えた。次に、クロードイン-2 mRNA の安定性に対する効果を検討した。転写阻害剤であるアクチノマイシン D の存在下でクロードイン-2 mRNA 量を調べたところ、ケルセチンにより mRNA 量が有意に低下した。mRNA の安定性はポリ A の負荷によって向上することが報告されている²⁹⁾。ポリアデニル化阻害剤であるコルジセピンの効果を調べたところ、ケルセチンと同様にクロードイン-2 mRNA 量を低下させた。しかし、3'-非翻訳領域 (UTR) を PCR 法で増幅したところ、ケルセチン処理でポリアデニル化の阻害が見られなかったため、ケルセチンは別の機序でクロードイン-2 mRNA 量を低下させることが示唆された。

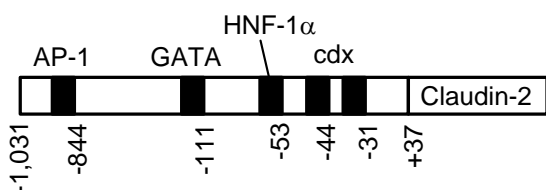


Fig. 8. Schematic drawing of transcriptional binding sites in human claudin-2 promoter.

3) マイクロ RNA (miRNA) によるクロードイン-2 mRNA の安定性の変化

近年、mRNA の安定性が miRNA によって調節されることが報告されている^{30,31)}。Target Scan ツールでクロードイン-2 の 3'-UTR への結合が予測される miRNA を探索したところ、miR-15a、15b、16、195、424、497 が候補として見つかった。リアルタイム PCR 法でこれら miRNA の発現量を解析したところ、ケルセチン処理により miR-16 の発現量が増加した。miR-16 に対する siRNA をケルセチンと共処理したところ、クロードイン-2 mRNA 量の低下が抑制された。以上の結果から、ケルセチンは miR-16 の発現増加を介してクロードイン-2 mRNA の安定性を低下させ、クロードイン-2 の発現低下を引き起こすことが示唆された。NSCLC 患者の肺組織において miR-16 の発現量が低下していることが報告されている³²⁾。他のがん組織でもクロードインと miRNA の関係が調べられており、ヒト卵巣がん細胞では miR-155 の過剰発現によってクロードイン-1 の発現が低下し、腫瘍形成が抑制される³³⁾。また、胃がん細胞では miR-1303 の発現低下によってクロードイン-18 の発現が増加し、細胞増殖能や浸潤能が低下する³⁴⁾。NSCLC 細胞に miR-16 を発現させると、細胞増殖能、コロニー形成能、遊走能、浸潤能が低下するため³⁵⁾、miR-16 は肺上皮細胞のがん化に密接に関わると考えられる。肺腺がん組織におけるクロードイン-2 発現の増加機構は不明であるが、miR-16 の発現低下が関与することが示唆される。また、クロードイン-2 の発現低下作用を有する天然化

合物は同定されていなかったため、ケルセチンの作用機序の解明は、今後の創薬研究に対して有用な情報を提供するものと考えられる。

6. 肺がん細胞におけるクロードイン-18 の発現と生理的役割

1) ヒト肺がん組織におけるクロードイン発現の変化

クロードイン-2 が肺腺がん細胞の増殖能の調節に関わっており、ケルセチンがクロードイン-2 の発現を低下させることを解明したが、他のクロードインサブタイプの発現と機能は十分に調べられていない。そこで、ヒト肺腺がん、扁平上皮がん、大細胞がん、小細胞がん組織から調製された cDNA を用いて、リアルタイム PCR 法によりクロードインサブタイプの発現量を調べた。正常肺組織には、これまでの報告のようにクロードイン-1、3、4、5、7、18 が発現していた。サブタイプの発現量の変化に共通性は見られなかったが、すべてのがん組織でクロードイン-18 の発現量が低下していることを見出した。クロードイン-18 には肺に発現するクロードイン-18.1 と胃に発現するクロードイン-18.2 が存在する³⁶⁾。これらの発現はエクソン 1a と 1b の選択的スプライシングによって調節される。クロードイン-18.2 の発現はしばしば胃がんにおいて低下しており、胃がん由来の MKN47 細胞でクロードイン-18.2 の発現をノックダウンすると、細胞増殖能と浸潤能が亢進する³⁷⁾。一方、肺におけるクロードイン-18.1 の発現と機能は十分に検討されていない。

2) 肺がん細胞におけるクロードイン-18 の発現

ヒト正常肺組織と比較して、肺がん組織におけるクロードイン-18 mRNA 量は低かった。さらに、腺がん由来の A549、RERF-LC-MS、PC-3、扁平上皮がん由来 RERF-LC-AI、大細胞がん由来 IA-LM、小細胞がん由来 WA-hT 細胞におけるクロードイン-18 mRNA 量も低かった。ヒトの肺腺がん組織および近傍の正常組織から調製されたサンプルで、クロードイン-18 の発現量を調べたところ、培養細胞と同様にがん組織での発現量が低かった (Fig. 9)。これらのことから、肺がん組織ではクロードイン-18 の発現量が低下していることが明らかになった。

クロードイン-18 の機能を調べるため、A549 細胞を用いて安定発現細胞を構築した。クロードイン-18 の発現により、クロードイン-1、オクルディン、タイトジャンクション裏打ちタンパク質の ZO-1、アドヘレンスジャンクション構成タンパク質の E-カドヘリンの発現量は変化しなかった。クロードイン-18 は ZO-1 とともにタイトジャンクションに分布した。同様に、PC-3 細胞でもクロードイン-18 はタイトジャンクションに分布した (Fig. 10)。これらのことから、正常肺組織でクロードイン-18 はタイトジャン

クションに分布して機能すると示唆された。

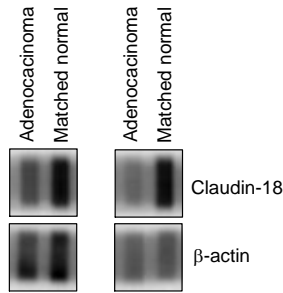


Fig. 9. Low level of claudin-18 protein in human lung adenocarcinoma. The protein levels of claudin-18 and β -actin was examined using Protein Slot Blot Tissue (Proteus Biosciences). Whole protein lysates from lung adenocarcinoma and matched normal tissues from two independent subjects are arrayed on PVDF membrane-coated dipsticks. The PVDF membrane was blotted with anti-claudin-18 and β -actin antibodies. The results were cited from ref 8.

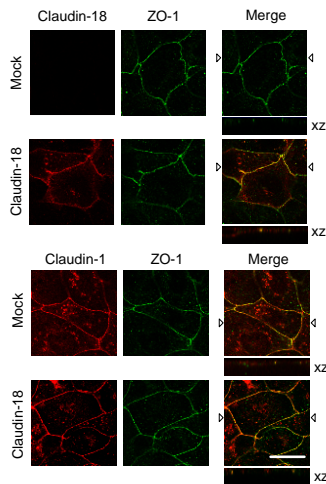


Fig. 10. Effect of claudin-18 expression on the intracellular distribution of claudin-1 in PC-3 cells. Mock or claudin-18 vector was transiently transfected into PC-3 cells. After 48 h of transfection, the cells were stained with anti-claudin-18 (red), claudin-1 (red), or ZO-1 (green) antibodies. Scale bar represents 10 μ m. Lower panels (xz) show the vertical sections indicated by the triangles at the merged images. The results were cited from ref 8.

3) 細胞間透過性に対するクローディン-18の影響

クローディン-18 ノックアウトマウスにおいて、小分子の細胞間透過性が亢進することが報告されている³⁸⁾。一方、過剰発現の効果は調べられていない。A549 細胞にクローディン-18 を発現させたところ、分子量が 4,000 Da のデキストラン透過性が低下したが、10,000 Da のデキストラン透過性は変化しなかった。また、クローディン-18 の発現により上皮膜間電気抵抗値が増加した。以上の結果から、クローディン-18 は小分子とイオンの透過性の制御に関わることが明らかになった。

4) 細胞増殖・浸潤に対するクローディン-18の影響

クローディン-18 の発現・非発現細胞を用いて、経時的に細胞数を測定したところ、クローディン-18 の発現により細胞数の増加が抑制された。クローディン-18 が細胞増殖を抑制または細胞障害を増加させることが考えられたため、WST-1 細胞増殖アッセイと乳酸デヒドロゲナーゼ放出アッセイを行った。クローディン-18 の発現により、細胞増殖は有意に低下したが、細胞障害は変化しなかった (Fig. 11)。クローディン-18 が細胞増殖を抑制することが明らかになったため、細胞周期に対する影響を検討した。フローサイトメーターを用いて細胞周期を解析したところ、クローディン-18 の発現により G1 期の細胞数が増加し、S 期の細胞数が減少したことから、G1 期から S 期への移行が抑制されることが示唆された。また、クローディン-18 は細胞浸潤も抑制した。細胞浸潤能はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) によって調節されることが報告されている³⁹⁾。MMP-2 と MMP-9 の活性を調べたところ、クローディン-18 の発現によりこれらの活性は低下した。以上の結果から、クローディン-18 は細胞増殖と浸潤に対して抑制作用を示すことが明らかになった。

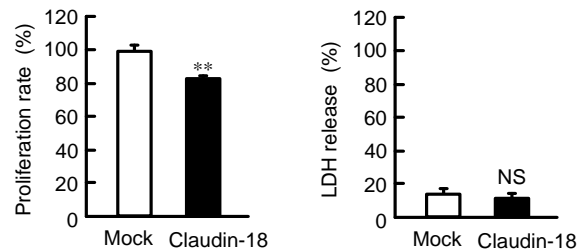


Fig. 11. Effect of claudin-18 expression on cell proliferation and injury. Mock or claudin-18 vector was transiently transfected into A549 cells. Cell proliferation was investigated by WST-1 assay. Proliferation rate was represented relative to value of mock. Cell death was assessed by LDH release assay. LDH release was represented as a percentage of total LDH activity (intracellular plus extracellular activities). ** $P < 0.01$ compared with mock transfected cells. NS, $P > 0.05$. The results were cited from ref 8.

5) 細胞内シグナル伝達因子に対するクローディン-18の影響

細胞増殖や浸潤の調節に、mitogen-activated protein (MAP) キナーゼが関与する。クローディン-18 の発現によってリン酸化 Akt 量が低下した。その分子機序を解明するため、Akt の上流に存在する分子のリン酸化量を調べたところ、上皮成長因子受容体 (EGFR)、PI3K、phosphatase and tensin homolog (PTEN) のリン酸化量は変化しなかったが、リン酸化 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) 量が低下することを発見した。また、Raf、MEK、ERK、Jun

N-terminal kinase、p38 といった他の MAP キナーゼのリン酸化量は変化しなかった。これらのことから、クローディン-18 は PDK1 から Akt へのシグナル伝達を阻害することが示唆された。クローディン-18 非発現細胞で PDK1 は主に核内に分布したが、クローディン-18 発現細胞では、PDK1 とクローディン-18 が結合し、PDK1 は主に細胞間接着部位に分布した。核内に分布する PDK1 は、G1-S 細胞周期移行の抑制因子である p27Kip1 の転写を抑制する⁴⁰⁾。クローディン-18 は PDK1 と結合し、PDK1 の細胞内局在を変化させることによって Akt のリン酸化を阻害するとともに、細胞増殖を阻害することが示唆された⁸⁾。

上述のように、クローディン-18 は PI3K/Akt 経路の阻害により、細胞増殖を抑制することが考えられた (Fig. 12)。この主張を裏付けるため、細胞増殖に対する PI3K 阻害剤の LY-294002 の効果を調べた。LY-294002 はクローディン-18 と同様に細胞増殖を抑制し、細胞周期の解析において、G1 期の細胞を増加させ、S 期の細胞を減少させた。さらに、MMP-2 と MMP-9 の活性を低下させ、細胞浸潤を抑制した。以上のことから、肺がん細胞の増殖・浸潤調節に、クローディン-18 と PI3K/Akt 経路が関与することが明らかになった。肺がん細胞におけるクローディン-18 の発現を回復させる薬剤が新たな抗がん剤になると考えられ、クローディンやその調節機構を標的とした今後の創薬研究の進展が期待される。

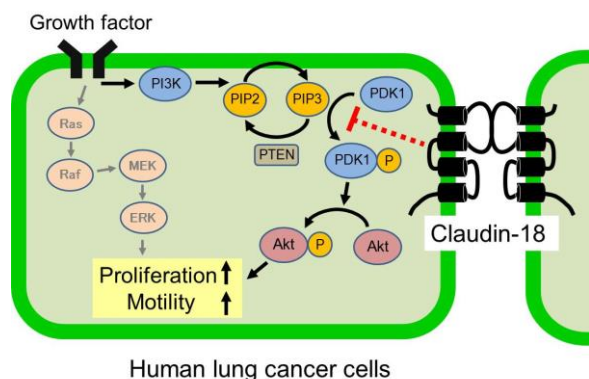


Fig. 12. Scheme of inhibition of cell proliferation by claudin-18 in lung cancer cells.

7. 総括

クローディンサブタイプの異常発現は、各がん組織に特異的であるため、クローディンを標的とした薬剤は臓器選択的に作用すると考えられる。さらに、クローディンの異常発現を改善することにより、細胞の異常増殖を抑制するだけでなく、エンドサイトーシスを惹起することにより、がん細胞死を誘導することが可能になると考える。細胞間接着を起点とするがん化機構と創薬に関する研究はやっ

とスタートラインに立ったところであり、クローディンを標的とした新たな治療薬の開発に期待する。

8. 謝辞

本研究は静岡県立大学薬学部生体情報分子解析学分野および岐阜薬科大学生命薬学大講座生化学研究室の教員と学生の協力のもとに実施された。ご協力いただいた方々に感謝致します。また、本研究は科学研究費補助金基盤研究 C (代表者：五十里彰)、武田科学振興財団 (薬学系研究奨励)、SGH 財団、金原一郎記念医学医療振興財団、中富健康科学振興財団、薬理研究会からの研究助成金により実施された。

9. 引用文献

- 1) Siegfried, J. M., and Stabile, L. P. *Semin. Oncol.* **41**, 5-16 (2014)
- 2) Collins, L. G., Haines, C., Perkel, R., and Enck, R. E. *Am. Fam. Physician* **75**, 56-63 (2007)
- 3) Tan, C. S., Gilligan, D., and Pacey, S. *Lancet Oncol.* **16**, e447-459 (2015)
- 4) Anderson, J. M., Van Itallie, C. M., and Fanning, A. S. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 140-145 (2004)
- 5) Ikari, A., Hirai, N., Shiroma, M., Harada, H., Sakai, H., Hayashi, H., Suzuki, Y., Degawa, M., and Takagi, K. *J. Biol. Chem.* **279**, 54826-54832 (2004)
- 6) Tsukita, S., Furuse, M., and Itoh, M. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 285-293 (2001)
- 7) Ikari, A., Sato, T., Takiguchi, A., Atomi, K., Yamazaki, Y., and Sugatani, J. *Life Sci.* **88**, 628-633 (2011)
- 8) Shimobaba, S., Taga, S., Akizuki, R., Hichino, A., Endo, S., Matsunaga, T., Watanabe, R., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Sugatani, J., and Ikari, A. *Biochim. Biophys. Acta* (2016)
- 9) Yasen, M., Kajino, K., Kano, S., Tobita, H., Yamamoto, J., Uchiumi, T., Kon, S., Maeda, M., Obulhasim, G., Arii, S., and Hino, O. *Clin. Cancer Res.* **11**, 7354-7361 (2005)
- 10) Nakatsura, T., Senju, S., Yamada, K., Jotsuka, T., Ogawa, M., and Nishimura, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **281**, 936-944 (2001)
- 11) Buchert, M., Papin, M., Bonnans, C., Darido, C., Raye, W. S., Garambois, V., Pelegrin, A., Bourgaux, J. F., Pannequin, J., Joubert, D., and Hollande, F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 2628-2633 (2010)
- 12) Guo, Y., Yang, K., Harwalkar, J., Nye, J. M., Mason, D. R., Garrett, M. D., Hitomi, M., and Stacey, D. W. *Oncogene* **24**, 2599-2612 (2005)
- 13) Baldin, V., Lukas, J., Marcote, M. J., Pagano, M., and Draetta, G. *Genes Dev.* **7**, 812-821 (1993)
- 14) Dhawan, P., Singh, A. B., Deane, N. G., No, Y., Shiou, S. R., Schmidt, C., Neff, J., Washington, M. K., and Beauchamp, R. D. *J. Clin. Invest.* **115**, 1765-1776 (2005)

- 15) Van Itallie, C. M., Tietgens, A. J., LoGrande, K., Aponte, A., Gucek, M., and Anderson, J. M. *J. Cell Sci.* **125**, 4902-4912 (2012)
- 16) Ikari, A., Watanabe, R., Sato, T., Taga, S., Shimobaba, S., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Endo, S., Matsunaga, T., and Sugatani, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1843**, 2079-2088 (2014)
- 17) Baumgartner, H. K., Beeman, N., Hodges, R. S., and Neville, M. C. *Chem. Biol. Drug Des.* **77**, 124-136 (2011)
- 18) Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., Elling, F., Leist, M., and Jaattela, M. *J. Cell Biol.* **153**, 999-1010 (2001)
- 19) Boya, P., and Kroemer, G. *Oncogene* **27**, 6434-6451 (2008)
- 20) Beeman, N. E., Baumgartner, H. K., Webb, P. G., Schaack, J. B., and Neville, M. C. *BMC Cell Biol.* **10**, 85 (2009)
- 21) Ikari, A., Taga, S., Watanabe, R., Sato, T., Shimobaba, S., Sonoki, H., Endo, S., Matsunaga, T., Sakai, H., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., and Sugatani, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1848**, 2326-2336 (2015)
- 22) Zhang, J. Y., Yi, T., Liu, J., Zhao, Z. Z., and Chen, H. B. *J. Agric. Food Chem.* **61**, 2188-2195 (2013)
- 23) Yang, J. H., Hsia, T. C., Kuo, H. M., Chao, P. D., Chou, C. C., Wei, Y. H., and Chung, J. G. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 296-304 (2006)
- 24) Ikari, A., Sato, T., Watanabe, R., Yamazaki, Y., and Sugatani, J. *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 1110-1118 (2012)
- 25) Sonoki, H., Sato, T., Endo, S., Matsunaga, T., Yamaguchi, M., Yamazaki, Y., Sugatani, J., and Ikari, A. *Nutrients* **7**, 4578-4592 (2015)
- 26) Garcia-Hernandez, V., Flores-Maldonado, C., Rincon-Heredia, R., Verdejo-Torres, O., Bonilla-Delgado, J., Meneses-Morales, I., Gariglio, P., and Contreras, R. G. *J. Cell. Physiol.* **230**, 105-115 (2015)
- 27) Escaffit, F., Boudreau, F., and Beaulieu, J. F. *J. Cell. Physiol.* **203**, 15-26 (2005)
- 28) Sakaguchi, T., Gu, X., Golden, H. M., Suh, E., Rhoads, D. B., and Reinecker, H. C. *J. Biol. Chem.* **277**, 21361-21370 (2002)
- 29) Guhaniyogi, J., and Brewer, G. *Gene* **265**, 11-23 (2001)
- 30) Jansson, M. D., and Lund, A. H. *Mol. Oncol.* **6**, 590-610 (2012)
- 31) Fabian, M. R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351-379 (2010)
- 32) Bandi, N., Zbinden, S., Gugger, M., Arnold, M., Kocher, V., Hasan, L., Kappeler, A., Brunner, T., and Vassella, E. *Cancer Res.* **69**, 5553-5559 (2009)
- 33) Qin, W., Ren, Q., Liu, T., Huang, Y., and Wang, J. *FEBS Lett.* **587**, 1434-1439 (2013)
- 34) Zhang, S. J., Feng, J. F., Wang, L., Guo, W., Du, Y. W., Ming, L., and Zhao, G. Q. *Dig. Dis. Sci.* **59**, 1754-1763 (2014)
- 35) Ke, Y., Zhao, W., Xiong, J., and Cao, R. *FEBS Lett.* **587**, 3153-3157 (2013)
- 36) Tureci, O., Koslowski, M., Helftenbein, G., Castle, J., Rohde, C., Dhaene, K., Seitz, G., and Sahin, U. *Gene* **481**, 83-92 (2011)
- 37) Oshima, T., Shan, J., Okugawa, T., Chen, X., Hori, K., Tomita, T., Fukui, H., Watari, J., and Miwa, H. *PLoS One* **8**, e74757 (2013)
- 38) Li, G., Flodby, P., Luo, J., Kage, H., Sipos, A., Gao, D., Ji, Y., Beard, L. L., Marconett, C. N., DeMaio, L., Kim, Y. H., Kim, K. J., Laird-Offringa, I. A., Minoo, P., Liebler, J. M., Zhou, B., Crandall, E. D., and Borok, Z. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **51**, 210-222 (2014)
- 39) Nagase, H., and Woessner, J. F., Jr. *J. Biol. Chem.* **274**, 21491-21494 (1999)
- 40) Kikani, C. K., Verona, E. V., Ryu, J., Shen, Y., Ye, Q., Zheng, L., Qian, Z., Sakaue, H., Nakamura, K., Du, J., Ji, Q., Ogawa, W., Sun, L. Z., Dong, L. Q., and Liu, F. *Science signaling* **5**, ra80 (2012)