



Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma

中山, 文仁

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4308

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004308>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	中山 文仁
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 1908 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma(メチル化による Claudin-7 発現低下は大腸癌の進展を促進する)

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	横野 浩一
	教 授	古瀬 幹夫

背景と目的

がん細胞転移機構のうち細胞間接着の消失は第一段階に必要であり、がん細胞の浸潤能・転移能獲得機序を検討する上で、細胞間接着因子の発現制御メカニズムの解明が望まれている。

上皮細胞の接合部複合体は、tight junction・adherens junction・desmosomeにより構成されている。Tight junctionは細胞間を接合する役割を示し、細胞のバリア機能と細胞間輸送に関与している。さらに、tight junctionは上皮細胞の分化・増殖・遊走を制御するシグナル経路に関与している事も示されている。

Claudinはtight junctionを構成する4つの膜貫通領域を持つ膜蛋白質で、24個の遺伝子ファミリーを形成して、それぞれが特有の組織発現パターンを示している。また、一部の悪性腫瘍ではその発現が変化する事が示されており、例えば大腸癌の多くは、claudin-1,-8,-12の発現が上昇、claudin-4の発現が低下している事が明らかとなっている。また、大腸癌の浸潤と転移にclaudin発現の変化が重要な役割を果たしている事が、過去の研究により示唆されている。しかしながら、どのような機序で大腸癌のclaudin発現が変化するのかについては明らかではないが、乳癌ではclaudin-7(CLDN7)発現低下の一因としてプロモータ領域のDNAメチル化に関与している事が示されている。また、食道癌ではclaudin-7の発現が浸潤部で有意に低下しており、リンパ管侵襲とリンパ節転移に関与している事が示されている。

本研究では大腸癌およびリンパ節転移巣においてclaudin-7の発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を評価した。また、大腸癌進展におけるclaudin-7発現の変化を引き起こす機序を明らかにするため、プロモータ領域のDNAメチル化についての検討を行った。

対象と方法

細胞株

本研究では大腸癌細胞6株(DLD-1, SW480, LoVo, TCO, Colo201, Colo320)を使用した。Colo320はDNA methyltransferase inhibitorである5-aza-2'-deoxycytidine (5-aza-dC)およびhistone deacetylase inhibitorであるtrichostatin Aを加えた培地で培養し、脱メチル化・脱アセチル化処理を行った。

細胞株のclaudin-7発現の評価

細胞株はRPMI-1640培地で十分に培養した後、RNA・蛋白を抽出した。

抽出したRNAを用いてRT-PCRを、蛋白を用いてウェスタンブロットを行い、各細胞株のclaudin-7発現を評価した。ウェスタンブロットにはclaudin-7抗体(rabbit polyclonal antibodies against claudin-7, Zymed)を使用した。各細胞株をエタノールで固定し、claudin-7抗体およびanti-rabbit fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated antibodyにより蛍光免疫組織化学を行った。

メチル化特異的 PCR (Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction; MSP)

細胞株およびパラフィン包埋切片から抽出したDNAをバイサルファイト処理し、claudin-7プロモータ領域に対するプライマーを用いてメチル化特異的PCRを行った。ポジティブコントロールとしては、DLD-1より抽出したDNAをSssI methylaseでメチル化したものと、5-aza-dCで脱メチル化したものを使用した。

バイサルファイトシーケンス

メチル化特異的PCRの正当性を確認するために、細胞株から抽出したDNAをバイサルファイト処理し、PCRにて増幅させた後に大腸菌でクローニングを行った。クローニングにより得られたDNAに対し、ABI 310を用いて直接塩基配列決定を行った。

免疫組織化学解析

臨床検体として、当院で内視鏡的・外科的に切除された大腸癌116例(Stage 0 26例、Stage I-IV 90例)、転移を認めたリンパ節42例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本を使用した。標本は厚さ4 μ mに薄切し、claudin-7抗体により免疫組織化学解析を行った。免疫組織化学の評価は、claudin-7発現を認める細胞が30%未満のものをlow、30%以上のものをhighとした。免疫組織化学の結果と臨床病理学的因子との相関についてはカイ二乗検定により評価を行い、P値が0.05以下の場合、統計学的有意差があるものとして判定した。

結果

Claudin-7のmRNAレベルと淡白レベルが相関している事を確認するために、大腸癌細胞株6株でウェスタンブロット解析およびRT-PCRを行った。その結果、いずれの細胞株でもclaudin-7蛋白レベル・mRNAレベルは同様

の発現パターンを示し、蛋白レベルと mRNA レベルには相関していると考えられた。蛍光免疫組織化学を行ったところ、細胞株の膜表面に claudin-7 の発現が局在している事が確認された。Colo320 は蛋白レベル・mRNA レベルとも claudin-7 発現が著明に低下しており、*CLDN7*プロモータ領域がメチル化されている事が MSP により確認された。MSP による評価の有効性を立証するために、DLD-1 および Colo320 から抽出した DNA でパイサルファイトシーケンスを行ったところ、DLD-1 ではほとんど CpG アイランドがメチル化されていなかったのに対し、Colo320 では大半の CpG アイランドがメチル化されていた。さらに、Claudin-7 発現低下と高メチル化との関与を確認するために、5-aza-dC による脱メチル化処理と TSA による脱アセチル化処理を Colo320 に対して行った。脱アセチル化処理では Colo320 の claudin-7 発現は変化しなかったが、脱メチル化処理を行うと Colo320 の claudin-7 発現が回復することが、RT-PCR により確認された。

次に、腺腫成分を含む早期大腸癌(stage 0)における claudin-7 発現を検討したところ、正常大腸粘膜では claudin-7 は全例で細胞膜表面に発現していたのに対し、腺腫部では 4 例(15%)、癌部では 16 例(62%)で claudin-7 発現は低下していた。claudin-7 発現が低下している一部の症例では、*CLDN7*プロモータ領域のメチル化を認めた。

大腸癌進展における claudin-7 発現の役割を検討するために、大腸癌切除標本を用いて claudin-7 発現の検討を行った。90 例の進行大腸癌(stage I-IV)で検討を行ったところ、72 例(80%)で claudin-7 の発現低下が認められた。また、18 例(20%)では、表層部より浸潤部で claudin-7 発現がより低下している傾向が認められた。臨床病理学的因子との関連では、リンパ管侵襲($P=0.027$)、脈管侵襲($P=0.009$)、臨床病期($P=0.033$)との間に相関が認められた。また、claudin-7 発現が低下している例ほど、リンパ節転移や遠隔転移を認める率が高い傾向が認められた。Claudin-7 発現と高メチル化との関連を検討するため、進行大腸癌症例から抽出した DNA を用いて、MSP 解析を行った。その結果、claudin-7 の発現低下が認められた 45 例のうち、9 例(20%)で *CLDN7*プロモータ領域のメチル化が認められたのに対し、claudin-7 の発現低下が認められなかった 14 例ではメチル化は認められなかった。

最後に、42 例のリンパ節転移症例で、原発巣とリンパ節転移とで claudin-7 発現の比較を行った。原発巣で claudin-7 発現が低下していたのは 42 例中 37 例(88%)であったのに対し、リンパ節転移で claudin-7 発現が低下していたのは 21 例(50%)であった。

考察

今回の研究では、adenoma-carcinoma sequence における claudin-7 発現の変化を検討するために、腺腫部を含む早期大腸癌での claudin-7 の発現を検討した。その結果、癌部では腺腫部より有意に claudin-7 発現が低下している傾向が認められた。このことより、大腸癌が悪性形質転換する過程において、claudin-7 の発現低下が重要であると考えられた。また、進行癌における検討では、claudin-7 発現低下とリンパ管侵襲・脈管侵襲・臨床病期との間に相関が見られ、表層部より浸潤部で発現がより低下している傾向にある事が示されたことから、claudin-7 発現低下が大腸癌進展に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、リンパ節転移巣では逆に原発巣よりも claudin-7 発現レベルが高い傾向が認められており、このような変化は、claudin-7 発現が epigenetic な要因により変化しているという仮説を支持するものと考えられる。

メチル化に関する検討では、claudin-7 発現低下を認める大腸癌細胞株を脱メチル化処理する事で、claudin-7 の発現が回復することを示した。大腸癌における claudin-7 の発現低下にプロモータ領域のメチル化が関与していると考えられるが、進行大腸癌の臨床検体を用いた検討では、claudin-7 の発現が低下した症例のうち、メチル化が認められたのは 20%のみであった。本症例では、予測されるプロモータ領域(+851 ~ -330 bp)を MSP により検討を行ったが、MSP によって評価される CpG アイランドは全体のごく一部でしかなく、その周辺の CpG アイランドのメチル化状態を検討する必要があると考えられた。

細胞間接着の減少は、腫瘍細胞が原発巣から離れ、転移が成立するのに重要であると考えられている。Park らは、E-cadherin、 α -catenin、 β -catenin、 γ -catenin、claudin-7 などの細胞間接着分子が、乳癌において原発巣で発現低下し、リンパ節転移で再発現する傾向にあることを示した。これらの細胞間接着に関わる蛋白が再発現する機序は明らかではないが、蛋白再発現によって、循環している腫瘍細胞が転移臓器に定着出来るのではないかと考えられる。さらに Lioni らは、食道癌細胞株 TE-8 で claudin-7 を過剰発現させる事で細胞間の接着が増強し、細胞凝集塊の形成が促進される事を示した。今回の研究では、大腸癌において claudin-7 の発現低下が発癌の過程で起こり、再発現が転移の成立に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1909 号	氏 名	中山 文仁
論 文 題 目 Title of Dissertation	Hypermethylation-modulated downregulation of claudin-7 expression promotes the progression of colorectal carcinoma メチル化による Claudin-7 発現低下は大腸癌の進展を促進する		
審 査 委 員 Examiner	主 査 林 祥 剛 Chief Examiner 副 査 古 瀬 幹 夫 Vice-examiner 副 査 横 野 浩 一 Vice-examiner		
審 査 終 了 日	平成 20 年 2 月 19 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

がん細胞転移機構のうち細胞間接着の消失は第一段階に必要であり、がん細胞の浸潤能・転移能獲得機序を検討する上で、細胞間接着因子の発現制御メカニズムの解明が望まれている。上皮細胞の接合部複合体は、tight junction・adherens junction・desmosomeにより構成されている。Tight junction は細胞間を接合する役割を示し、細胞のバリア機能と細胞間輸送に関与している。さらに、tight junction は上皮細胞の分化・増殖・遊走を制御するシグナル経路に関与している事も示されている。

Claudin は tight junction を構成する4つの膜貫通領域を持つ膜蛋白質で、24個の遺伝子ファミリーを形成して、それぞれが特有の組織発現パターンを示している。また、一部の悪性腫瘍ではその発現が変化する事が示されており、例えば大腸癌の多くは、claudin-1, 8, 12の発現が上昇、claudin-4の発現が低下している事が明らかとなっている。また、大腸癌の浸潤と転移に claudin 発現の変化が重要な役割を果たしている事が、過去の研究により示唆されている。しかしながら、どのような機序で大腸癌の claudin 発現が変化するのかについては明らかではないが、乳癌では claudin-7(CLDN7)発現低下の一因としてプロモータ領域の DNA メチル化が関与している事が示されている。また、食道癌では claudin-7 の発現が浸潤部で有意に低下しており、リンパ管侵襲とリンパ節転移に関与している事が示されている。本研究では大腸癌およびリンパ節転移巣において claudin-7 の発現を評価し、臨床病理学的因子との関連を評価した。また、大腸癌進展における claudin-7 発現の変化を引き起こす機序を明らかにするため、プロモータ領域の DNA メチル化についての検討を行った。本研究では、adenoma-carcinoma sequence における claudin-7 発現の変化を検討するために、腺腫部を含む早期大腸癌での claudin-7 の発現を検討した。その結果、癌部では腺腫部より有意に claudin-7 発現が低下している傾向が認められた。このことより、大腸癌が悪性形質転換する過程において、claudin-7 の発現低下が重要であると考えられた。また、進行癌における検討では、claudin-7 発現低下とリンパ管侵襲・脈管侵襲・臨床病期との間に相関が見られ、表層部より浸潤部で発現がより低下している傾向にある事が示されたことから、claudin-7 発現低下が大腸癌進展に重要な役割を果たす可能性が示唆された。また、リンパ節転移巣では逆に原発巣よりも claudin-7 発現レベルが高い傾向が認められており、このような変化は、claudin-7 発現が epigenetic な要因により変化しているという仮説を支持するものと考えられる。

メチル化に関する検討では、claudin-7 発現低下を認める大腸癌細胞株を脱メチル化処理する事で、claudin-7 の発現が回復することを示した。大腸癌における claudin-7 の発現低下にプロモータ領域のメチル化が関与していると考えられるが、進行大腸癌の臨床検体を用いた検討では、claudin-7 の発現が低下した症例のうち、メチル化が認められたのは20%のみであった。本症例では、予測されるプロモータ領域(851 ～330 bp)を MSP により検討を行ったが、MSP によって評価される CpG アイランドは全体のごく一部でしかなく、その周辺の CpG アイランドのメチル化状態を検討する必要があると考えられた。

細胞間接着の減少は、腫瘍細胞が原発巣から離れ、転移が成立するのに重要であると考えられている。Park らは、E-cadherin、 α -catenin、 β -catenin、 γ -catenin、claudin-7 などの細胞間接着分子が、乳癌において原発巣で発現低下し、リンパ節転移で再発現する傾向にあることを示した。これらの細胞間接着に関わる蛋白が再発現する機序は明らかではないが、蛋白再発現によって、循環している腫瘍細胞が転移臓器に定着出来るのではないかと考えられる。さらに Lioni らは、食道癌細胞株 TE-8 で claudin-7 を過剰発現させる事で細胞間の接着が増強し、細胞凝集塊の形成が促進される事を示した。本研究は、大腸癌の転移における claudin-7 の発現変化との関係を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった claudin-7 発現低下が発癌の過程で起こり、再発現が転移の成立に関与する可能性について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。