

141. 新規のエストロゲン受容体活性化機構とがんの細胞制御

杉本 幸太郎

福島県立医科大学 医学部 基礎病理学講座

Key words : 婦人科がん, エストロゲン受容体, クローディン, シグナル伝達

緒言

個体の発生、恒常性維持、および病的状態に対する応答には、細胞が置かれた外的環境を感知しそれに応じて遺伝子の転写を調節することが必要である。これは主に細胞膜に存在する様々な分子（受容体など）に端を発するシグナル伝達が、最終的に転写因子の状態を変化させることによって達成される。シグナルの起点としてホルモンやサイトカインなどの液性因子、細胞間接着、および細胞基質間接着があり、そのうち液性因子によるシグナル伝達は比較的良好に解明されているが、細胞間接着や細胞基質間接着による転写調節機構の解明は相対的に立ち遅れている [1]。以前我々は細胞間接着分子クローディン-6 (CLDN6) が幹細胞の上皮分化トリガーとして機能することを報告した [2]。CLDN6 による幹細胞の上皮分化誘導過程で誘導される分子群は転写因子レチノイン酸受容体 (RARs) による上皮分化誘導で発現する分子群と類似しており、CLDN6 シグナルが RARs に帰結あるいはレチノイン酸シグナルとクロストークする可能性が考えられた。また同時に CLDN6 が子宮体がんの悪性形質を増強すること、およびその作用がエストロゲン受容体 (ER α) 依存性であることを発見した。以上より CLDN6 シグナルが ER α の活性化を介して子宮体がんの進展に寄与する可能性も示唆されていた。

本研究において私は CLDN6 が Src ファミリーキナーゼと共役して PI3K と AKT を順次活性化し、AKT が RAR γ のセリン残基をリン酸化して標的遺伝子発現制御に至る新規シグナル伝達経路を解明した。また本シグナル経路の標的セリン残基は 48 種類の核内受容体スーパーファミリーのうち 14 種類で保存されており、乳がん細胞株 MCF-7 細胞においては同シグナルが ER α のセリンリン酸化に帰結することも示された [3]。さらに子宮体がんではこのシグナル経路が悪性形質増強に寄与していること (Sugimoto et al., *submitted*)、および乳がんでは CLDN4 が別の核内受容体である肝 X 受容体 (LXR β) の活性化を介して腫瘍悪性形質を制御する可能性も示された (Sugimoto et al., *in preparation*)。

方法および結果

1. CLDN6 は対合依存的に SFK/PI3K/AKT を活性化する

私は以前 CLDN6 がマウス F9 幹細胞およびマウス ES 細胞の上皮分化トリガーとしてはたらくことを報告した [1]。その際に誘導される遺伝子群や上皮の形態がレチノイン酸による RAR γ 依存性の分化誘導と酷似していた [4] ことから、CLDN6 による分化誘導はレチノイン酸シグナルとクロストーク、あるいは RAR γ に帰結するのではないかと考えた。

CLDN6 による上皮分化シグナルを明らかにするため、まず CLDN6 の様々なドメインを欠損させた変異体および細胞内ドメインのチロシン残基をアラニンに置換した変異体を作製して F9 幹細胞に導入して検討した。その結果上皮分化には CLDN6 の対合に必要な第二細胞外ループ、および C 末端にある第 196 番と第 200 番のチロシン残基が必須であることが解った。続いて免疫沈降法や各種阻害剤を用いた実験により、CLDN6 は第 196 番および第 200 番チロシン残基依存性に Src ファミリーキナーゼ (SFK) と共役することが明らかとなった。また既に報告されている E-カドヘリンによる SFK 活性化と同様に PI3K と AKT を順次リン酸化することも解った。

2. AKTによるRAR γ の第379セリンをリン酸化はりガンドに対する感受性を変化させる

次にAKTがRAR γ を活性化するかどうか検討した。GPS3.0ソフトウェア[5]で予測したところRAR γ にはAKTによってリン酸化されるセリン残基の候補が10箇所が存在した。それぞれについてセリンをアラニンに置換したリン酸化不応体を作製し、以前樹立した上皮分化能を欠くノックアウト細胞F9: *Rxar*^{-/-}: *Rarg*^{-/-}[6]に対してCLDN6と共にレスキュー導入したところ、第360番セリンと第379番セリンのアラニン置換体のみが上皮分化を誘導できず、これら2つのセリン残基が上皮分化に必要であることが示唆された。続いてこれらのセリン残基をグルタミン酸残基に置換した常時リン酸化体を作製して同様にレスキュー導入すると、第379番のグルタミン酸置換体のみが上皮分化誘導を惹起した。またPhos-tag SDS PAGEによるウエスタンブロットでCLDN6はRAR γ の第379番セリン残基をリン酸化することが示された。さらに脂溶性リガンド除去培地ではこの上皮分化誘導能が失われた一方で、これに全トランスレチノイン酸(ATRA)を加えると、通常F9の上皮分化誘導には200~1,000 nMのATRAが必要であるが、RAR γ の第379番セリンがリン酸化されている場合には1 nMでも顕著な上皮化を認めた。以上より同セリンリン酸化はRAR γ のATRAに対する感受性を亢進させることで下流遺伝子群の発現を変化させ、F9幹細胞を上皮分化させていることが明らかとなった。

3. CLDN6シグナルはER α も標的とする

第379番セリンを含むAKT依存性リン酸化コンセンサス配列はRAR γ のみならず、ヒトで48種類ある核内受容体スーパーファミリーのうち14種類で保存されていた(図1左)。またマウスからゼブラフィッシュに至るまで脊椎動物のRARファミリー(典型的にはRAR α 、RAR β 、RAR γ の3種)でも保存されており、さらに無脊椎動物のホモログやアナログにも分布していた。よってこのシグナル経路はRAR γ による上皮分化のみならず、他の核内受容体の活性化を介して多様な生命現象を制御する可能性が示唆された。そこで次にヒト乳がん細胞株MCF-7細胞を用いて同経路がER α のセリンリン酸化を惹起するかどうか検証した。マウスRAR γ の第379番セリンに相当するヒトER α のアミノ酸は第518番セリンである。RAR γ の場合と同様にアラニン置換体やグルタミン酸置換体を作製して検証したところ、MCF-7においてもCLDN6シグナルはSFKと共役してAKT依存性にER α 第518番セリンをリン酸化し、ER標的遺伝子の転写を活性化することが解った。よって少なくとも2つの動物種と核内受容体においてCLDN6-核内受容体経路が存在することが確認された(図1右)。

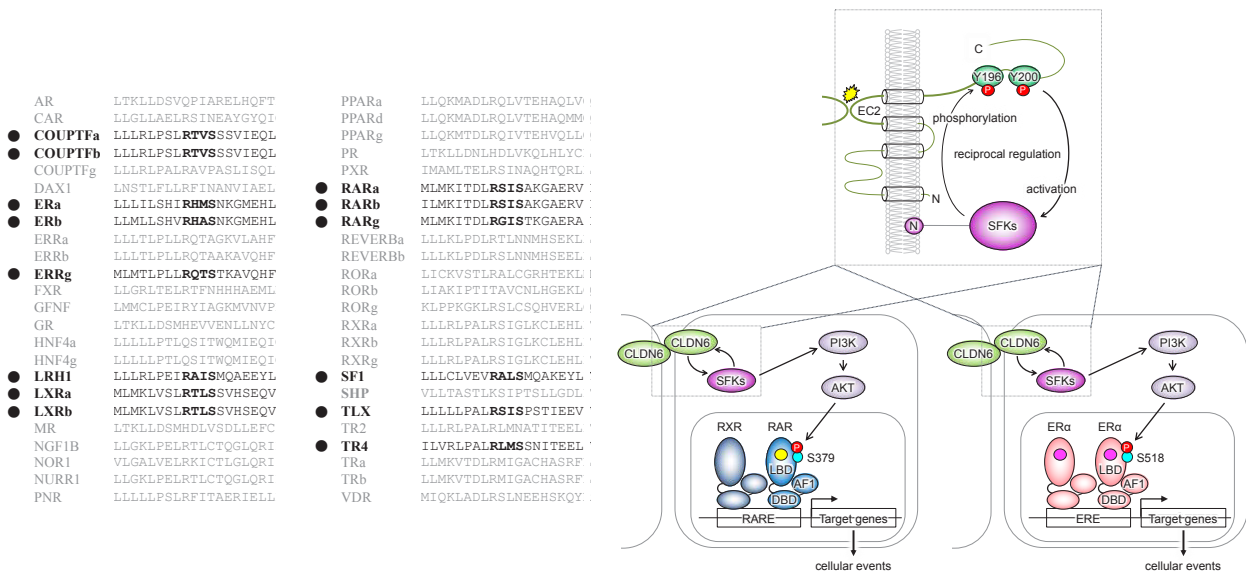


図1. CLDN6シグナルは核内受容体のセリンリン酸化に帰結する

- 左) 48種類ある核内受容体スーパーファミリーのうち14種類で、CLDN6シグナルの標的となりうるAKT依存性セリンリン酸化コンセンサス配列残基が保存されている。
- 右) CLDN6はEC2による対合に依存してSFKと共役し、PI3K/AKTを順にリン酸化して、マウス幹細胞ではRAR γ を、ヒト乳がん細胞ではER α をセリンリン酸化する。セリンリン酸化によってRAR γ やER α はりガンドに対する感受性が上昇し、標的遺伝子の転写を活性化する。

4. CLDN6-ER α 経路は子宮体がんの悪性形質を増強する

次に私は CLDN6-核内受容体経路による細胞制御が他の生命現象においてもみられるか検証しようと試みた。The Cancer Genome Atlas データベース (<https://portal.gdc.cancer.gov>) によると、mRNA レベルでの CLDN6 高発現は子宮体がんの予後不良因子であることが示唆された。そこでホルマリン固定パラフィン包埋手術標本を免疫組織化学法により染色可能な CLDN6 モノクローナル抗体を開発し、子宮体がん手術症例約 160 例について CLDN6 と生命予後や各種臨床病理学的因子との関連性を統計解析したところ、CLDN6 高発現群の 5 年生存率は 30.0%と、低発現群 89.5%と比較して明らかに低く、また多変量解析でも CLDN6 高発現の相対危険度は 3.5 (95%信頼区間 2.42~9.43 ; $p=0.014$) と予後不良因子であることが示された。

続いて培養細胞を用いて子宮体がんにおける CLDN6 の分子機能を解析した。子宮体がん細胞株 ECC-1 および HEC-1A において、CLDN6 過剰発現は細胞増殖能と遊走能を増強させ、ER α コンセンサス標的遺伝子群の発現を亢進させた (図 2 左)。また TALEN を用いたゲノム編集により ER α ノックアウト細胞を樹立して検討したところ、CLDN6 過剰発現による悪性形質増強作用は ER α ノックアウト細胞では観察されなかった。また第 518 番セリンのアラニン置換体はレスキュー効果を示さなかった (図 2 右)。以上より子宮体がん細胞株においても CLDN6 シグナルは MCF-7 と同様に ER α の第 518 番セリンリン酸化に帰結し、このシグナル経路が子宮体がんでは悪性形質増強に作用していることが解明された (Sugimoto et al., *submitted*)。

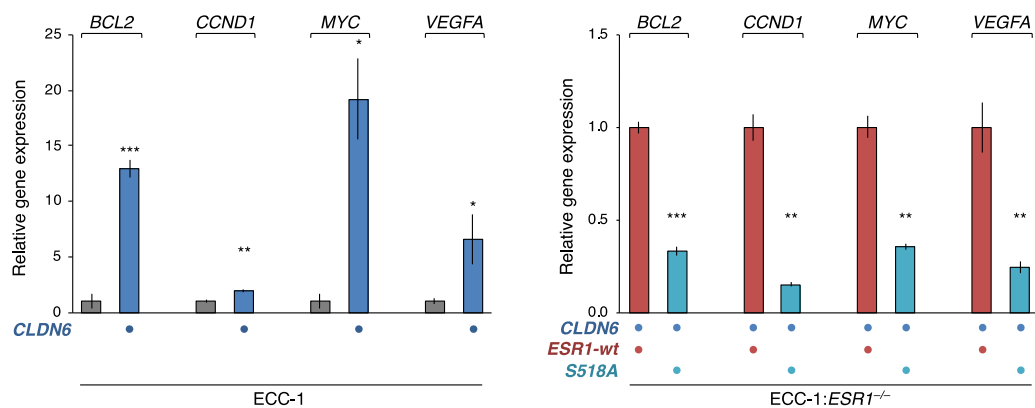


図 2. CLDN6 シグナルは ER α の第 518 セリンリン酸化を介して ER α 下流標的がん関連遺伝子の発現を亢進させる qRT-PCR の結果を示す

左) ECC-1 細胞に CLDN6 を過剰発現させると、ER α 下流コンセンサスがん関連遺伝子である BCL2、CCND1、MYC、VEGFA の発現が亢進する。

右) CLDN6 によるこれら遺伝子の発現亢進は、第 518 番セリンのアラニン置換体では消失する。

N=3~4。* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 、*** $P<0.001$ 。エラーバーは標準偏差を示す。

5. CLDN4-LXR β 経路は乳がんの悪性形質を増強する可能性がある

子宮体がんのみならず乳がんにおいても ER α が腫瘍の進展に関与する。そこで CLDN6-ER α シグナルが乳がんの悪性形質制御に関わるかどうか検討した。子宮体がんの場合と同様に、乳がん手術検体約 200 例における CLDN6 発現を免疫組織化学で評価したところ、CLDN6 陽性症例は 1 症例のみであった。なお乳がんの 25% で CLDN6 が発現するという先行研究 [7] があるが、我々が検証した結果 CLDN6 抗体は CLDN4 と交差反応を示すことが確認された。そこで乳がんの約 40% で発現し、CLDN6 と進化的に近縁で SFK との共役に必要な細胞内ドメインのチロシン残基が保存されている CLDN4 に着目した。乳がん細胞株のうち高分化でホルモン受容体陽性の MCF-7 と T47D は CLDN4 陽性であり、低分化でトリプルネガティブ乳がんの形質を有する MDA-MB-231 は CLDN4 陰性であった。そこで前二者の CLDN4 陽性細胞株では CRISPR 法による CLDN4 ノックアウトを、後者では CLDN4 過剰発現株をそれぞれ樹立して悪性形質を解析した。その結果 CLDN4 は細胞増殖、遊走、および浸潤をそれぞれ正に制御

することが解った。続いてこれらの細胞株におけるトランスクリプトームを RNA シークエンスで比較した。その結果 ER α 下流遺伝子群は変化に乏しく、その一方で別の核内受容体である LXR β の下流遺伝子群で発現亢進が認められた。よって乳がんでは CLDN4-LXR β 経路が悪性形質を制御している可能性が示された (Sugimoto et al., *in preparation*)。

考 察

本研究によって CLDN による細胞間接着シグナルが SFK/PI3K/AKT を介して核内受容体の新規セリンリン酸化に至る新たなシグナル伝達経路が解明された。このシグナル経路は、第一に CLDN6-RAR γ 経路が幹細胞の上皮分化を、第二に CLDN6-ER α 経路が子宮体がんの悪性形質増強を、第三に CLDN4-LXR β 経路が乳がんの進展をそれぞれ制御することが示された。本研究で明らかとなった AKT 標的となるセリン残基はヒトで 14 種類の核内受容体に保存されていることに加え、様々な動物種ホモログやアナログにも広く分布していることから、本シグナル経路が発生、恒常性維持、炎症、および腫瘍の進展など様々な生命現象に関与している可能性が考えられると共に、疾患の創薬標的としての有用性も期待される。

共同研究者・謝辞

本研究は福島県立医科大学医学部基礎病理学講座千葉英樹教授の指導の下に、同講座の富川直樹講師、同講座の柏木惟人助教（現獨協医科大学病理学講座）、同学産婦人科学講座の小島学助教、同学乳腺外科学講座の村上祐子助教らと共に実施した。

文 献

- 1) Cavallaro U, Dejana E. Adhesion molecule signalling: not always a sticky business. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Mar;12 (3) :189–197. PMID: 21346732
- 2) Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Satohisa S, Akashi Y, Kanai R, Saito T, Sawada N, Chiba H. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells. *PLoS ONE.* 2013;8 (10) :e75106. PMID: 23792957
- 3) Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, Endo C, Tanaka S, Sawada N, Watabe T, Higashi T, Chiba H. Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2019 Dec 3;116 (49) :24600–24609. PMID: 31306646
- 4) Kubota H, Chiba H, Takakuwa Y, Osanai M, Tobioka H, Kohama G, Mori M, Sawada N. Retinoid X receptor alpha and retinoic acid receptor gamma mediate expression of genes encoding tight-junction proteins and barrier function in F9 cells during visceral endodermal differentiation. *Exp Cell Res.* 2001 Feb 1;263 (1) :163–172. PMID: 11161715
- 5) Xue Y, Zhou F, Zhu M, Ahmed K, Chen G, Yao X. GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jul 1;33 (Web Server) :W184–W187.
- 6) Chiba H, Clifford J, Metzger D, Chambon P. Specific and redundant functions of retinoid X Receptor/Retinoic acid receptor heterodimers in differentiation, proliferation, and apoptosis of F9 embryonal carcinoma cells. *J Cell Biol.* 1997 Nov 3;139 (3) :735–747. PMID: 92141719
- 7) Xu X, Jin H, Liu Y, Liu L, Wu Q, Guo Y, Yu L, Liu Z, Zhang T, Zhang X, Dong X, Quan C. The expression patterns and correlations of claudin-6, methy-CpG binding protein 2, DNA methyltransferase 1, histone deacetylase 1, acetyl-histone H3 and acetyl-histone H4 and their clinicopathological significance in breast invasive ductal carcinomas. *Diagn Pathol.* 2012;7 (1) :33. PMID: 22349567