

博士論文

ヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現に関する検討

属増 晃一

ヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現に関する検討

所属 内科学専攻

指導教員 長瀬 隆英

氏名 属増 晃一

目次

略語表	1
要旨	5
序文	6
方法	
1. CLDN-18.2 の発現頻度と OS への影響についての解析	15
2. 細胞株を用いた CLDN-18.2 の機能解析	19
3. The Cancer Genome Atlas database を用いた <i>in silico</i> 解析	27
結果	
1. CLDN-18.2 の発現頻度と OS への影響についての解析	30
2. 細胞株を用いた CLDN-18.2 の機能解析	40
3. The Cancer Genome Atlas database を用いた <i>in silico</i> 解析	52
考察	58
結語	63
引用文献	64
謝辞	81

略語表

CLDN, Claudin

DEG, Differentially Expressed Genes

FDR, False Discovery Rate

GSEA, Gene Set Enrichment Analysis

OS, Overall Survival

POLR 2 A, RNA polymerase II subunit A

qPCR, quantitative PCR

TCGA, The Cancer Genome Atlas

TSVdb, TCGA Splicing Variants Data Base

要旨

Claudin (CLDN)ファミリーは tight junction の主要な構成タンパクである。正常な肺胞上皮では CLDN-18.1 が発現しているが、一部の肺癌細胞で本来は胃粘膜上皮に発現する CLDN-18.2 が異所性に発現していることが知られている。本研究ではヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の臨床的、分子生物学的な意義を検討した。当院で手術を行なった肺腺癌症例の 6% で CLDN-18.2 の発現を認めた。*in vitro* の検証により、一部の細胞では CLDN-18.2 の発現によって足場非依存性の増殖能や遊走能において優位性を獲得することが示唆された。

序文

1. 肺癌診療の現状

肺癌は臓器別の癌死の原因として世界的に最も頻度が高い[1]。毎年約 200 万人が新規に発症し、約 160 万人が死亡しているとされている[2-5]。病理組織別には腺癌が最も多く、約 4 割前後を占めている[2]。EGFR、ALK、ROS1、BRAF、MET の変異を標的とした分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬の登場により患者の予後は改善傾向ではあるものの、1993 年から 2011 年までに診断された患者を対象とした日本国内の調査では、5 年相対生存率は 34.9 % (男性 29.5 %、女性 46.8 %)に留まっており[6]、肺癌の病態解明、新規の治療標的の探索が引き続き求められている。

2. クローディンファミリー

クローディン (Claudin; CLDN) は tight junction を構成する 4 回膜貫通型の膜タンパクである。1998 年に日本から世界で初めての報告が発表されて以来 [7]、これまでに 27 種類が報告され、このうち 23 種類についてヒトの正常臓器での発現が確認されている。CLDN は上皮や内皮細胞に発現して傍細胞間隙のバリア機能や分子輸送の調整機能を果たし、細胞の極性の維持に関与している

[8-13]。表 1 に示す通り、CLDN の発現は臓器ごとに特異なパターンを有している[14-16]。

表 1. 正常組織における CLDN の発現パターン

CLDN	Tissue Specificity	CLDN	Tissue Specificity
CLDN-1	Liver, Skin	CLDN-15	Intestine
CLDN-2	Brain, Gallbladder, Kidney, Liver, Seminal vesicle	CLDN-16	Kidney
CLDN-3	Intestine, Thyroid gland, Lung	CLDN-17	Esophagus, Salivary gland, Tongue, Vagina
CLDN-4	Thyroid gland, Lung, Kidney	CLDN-18	Lung, Stomach
CLDN-5	Adipose tissue	CLDN-19	Brain, Kidney, Placenta, Retina
CLDN-6	Placenta, Testis	CLDN-20	Low tissue specificity
CLDN-7	Intestine, Lung	CLDN-21	-
CLDN-8	Breast, Kidney	CLDN-22	Salivary gland
CLDN-9	Brain, Pancreas, Pituitary gland, Placenta	CLDN-23	Salivary gland
CLDN-10	Kidney, Lymphoid tissue, Pancreas, Salivary gland	CLDN-24	Kidney, Salivary gland
CLDN-11	Brain, Ovary, Testis	CLDN-25	Pituitary gland, Skin
CLDN-12	Low tissue specificity	CLDN-26	-
CLDN-13	-	CLDN-27	-
CLDN-14	Kidney, Liver		

[14-16]を参考に作成した。

3. CLDN とヒトの疾患

CLDN はヒトのさまざまな疾患との関係が指摘されている[17]。例えば C 型肝炎ウイルス (HCV) は肝細胞に侵入する際に CLDN-1 を co-receptor として利用していることが分かっている [18]。この機序を標的として、CLDN-1 に対するモノクローナル抗体によって HCV の肝細胞への侵入を阻止する研究も行われている [19]。他にも、炎症性腸疾患と CLDN-1、-2、-18 の発現低下との関連 [11]、急性呼吸窮迫症候群と CLDN-18 の発現低下との関係などについても報告されている[20]。

4. CLDN と悪性腫瘍

さまざまなヒトの悪性腫瘍で CLDN の発現パターンが正常組織とは異なっていることが知られている[21]。表 2 にこれまでに報告されている悪性腫瘍と CLDN の発現パターンとの関係の一部を示す。

CLDN の発現パターンの変化が悪性腫瘍の形成、進展に果たす役割は多様であり、かつ難解である。たとえば CLDN-1 はメラノーマや甲状腺濾胞癌、卵巣癌では腫瘍促進的に機能することが知られている[22-24]。一方で、前立腺癌、肺腺癌では腫瘍抑制的に機能することが報告されている[25-27]。さらには、同じ乳癌であっても、エストロゲン受容体陽性の腫瘍では CLDN-1 が tumor

suppressive に、陰性の腫瘍であれば tumor promotive に機能していることが知られており[28]、さまざまな要因により同じタンパクであっても全く逆の機能を果たすことがある。

表 2. 癌における CLDN 発現の変化

	Expression	
	Upregulated	Downregulated
CLDN-1	Brest (triple negative) Thyroid Pancreatic	Brest (HER2 enriched) Hepatocellular Lung
CLDN-3	Ovarian Prostate Pancreatic	Glioblastoma
CLDN-4	Ovarian Prostate Pancreatic	
CLDN-7	Gastric, Liver	Thyroid, Breast, Prostate
CLDN-18.1		Lung
CLDN-18.2	Gastric	

[29-44]を参考に作成した。

5. CLDN-18

CLDN-18 は 3 番染色体の長腕にコードされている 261 のアミノ酸から成る CLDN ファミリーの膜タンパクである[45] (図 1)。CLDN-18 には 2 つの splice variant が知られており、正常組織での発現パターンが異なる。このうち CLDN-18.1 は正常な肺胞上皮細胞で発現している[46, 47]。もう一つの variant である CLDN-18.2 は胃粘膜上皮に発現している[48]。両者は Exon-1 が異なり、Exon-2 から Exon-5 までの配列は同一である。タンパクの構造としては N 末端から Extra cellular loop 1 の大部分までが異なり、Trans membrane 2 以降の構造が同一である。

肺癌では正常な肺胞上皮に発現している CLDN-18.1 の発現が低下することが知られている[49-53]。CLDN-18 をノックアウトしたマウスで肺腺癌が形成されやすいとの報告があり[29, 54]、CLDN-18.1 は肺胞上皮細胞の増殖、癌化の抑制に関与していると考えられている[55, 56]。また、肺癌、膵癌、卵巣癌の一部で、正常組織では発現していない CLDN-18.2 が異所性に発現していることが知られている[57-60]。病理組織の免疫染色で肺腺癌の 3.7 %で CLDN-18.2 が陽性であったとの報告もある[57]。CLDN-18.2 の異所性発現が肺腺癌に及ぼす影響については未解明である。

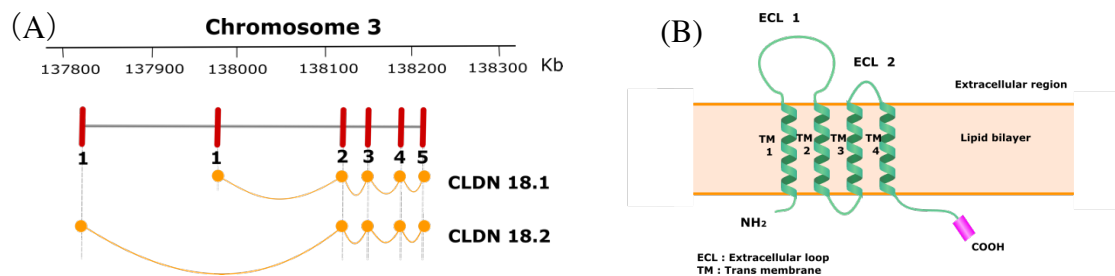


図 1. (A) CLDN-18 の Splice variant

(B) タンパク構造の模式図。

[45]を参考に作成した。

6. CLDN-18 が腫瘍の形成、進展を抑制する機序

CLDN の異常が腫瘍の形成、進展に寄与する経路の一つは、tight junction の機能不全により本来細胞間隙を通過しない物質の侵入を許し、結果的に炎症が惹起されることによると考えられている[15, 61-64]。その一方で、CLDN のノックアウトマウスで炎症所見を伴わない細胞増殖が起きることが知られており、炎症惹起以外の経路による細胞の増殖促進も起きている可能性が示唆されている[65, 66]。

CLDN の異常によるバリア機能不全、傍細胞間隙の物質輸送不全以外の腫瘍形成経路として注目されているのが YAP/TAZ シグナル伝達経路を介した経路である。CLDN-18 は YAP や YAP suppressor large tumor suppressor kinase 1/2 (LATS1/2)と結合して、YAP/TAZ を細胞膜直下に留めると共に YAP の働きを抑制している[29]。CLDN-18 の発現が低下すると、結合が解除された YAP/TAZ は核内に移行し、細胞増殖を促進する。もう一つの重要な経路は IGF-R1 を介した

経路である。CLDN-18 は IGF-R1 を抑制する働きがあり、IGF-R1 を介した AKT の活性化を抑制している。CLDN-18 の消失は IGF-R1 と PDK1 の活性化を起こし、PI3K/AKT 経路を活性化するとともに、YAP の活性を引き起こして YAP による PTEN の抑制が解除されることから、PI3K/AKT 経路のさらなる活性化を引き起こすことになる。図 2 に上記の経路を示す[67]。

また、胃癌においては CLDN-18_ARHGAP 融合遺伝子の存在が指摘されており[68-71]、融合遺伝子の形成という経路も CLDN が悪性腫瘍の形成、進展に關与する経路の一つとして注目を集めている。

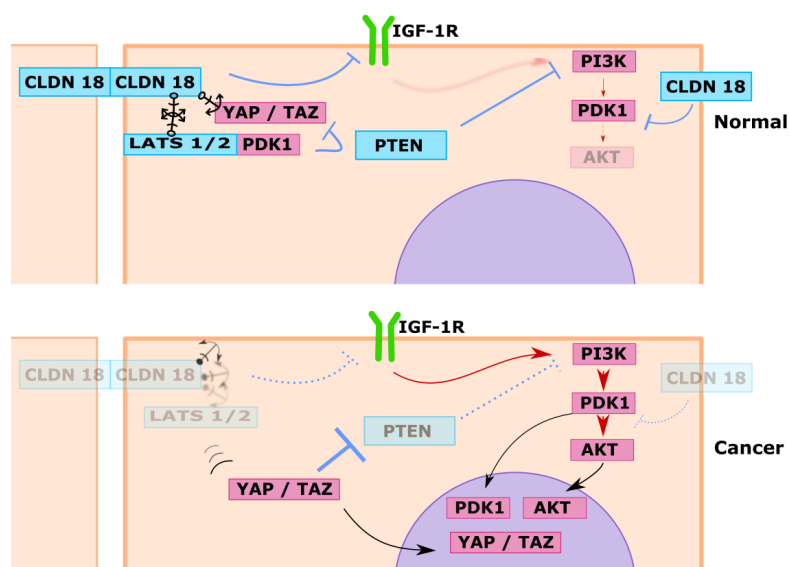


図 2. CLDN-18 と細胞内のシグナル伝達経路 [33]を参考に作成した。

7. 治療標的としての CLDN-18

CLDN に対する特異抗体を用いた癌治療の研究がさまざまな癌腫を対象に行われている[72-76]。大腸癌のモデルマウスを使って CLDN-4 に対するモノクローナル抗体である 4D3 を用いた研究では良好な腫瘍縮小効果を報告している[77]。胃癌の研究では CLDN-18 に対するモノクローナル抗体 (Zolbetuximab (IMAB362))による治療が臨床試験段階にある [68, 69, 78]。現時点では肺癌の治療において CLDN を標的とした治療薬は開発されていない。表 3 にこれまでに報告されている CLDN を標的としたモノクローナル抗体の一部を示す。

表 3. CLDN に対するモノクローナル抗体

Target	Monoclonal Antibody	Study Type	Cancer
CLDN-4	KM3900	<i>in vivo</i>	Pancreatic, Ovarian
CLDN-3, -4	KM3907	<i>in vivo</i>	Pancreatic, Ovarian
CLDN-3, -4	5A5	<i>in vivo</i>	Pancreatic, Ovarian
CLDN-18.2	IMAB362	Clinical Trial	Gastric
CLDN-6	IMAB027	Clinical Trial	Ovarian

[79-83]を参考に作成した。

8. 本研究の目的と概要

上記の背景を踏まえ、本研究ではヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の臨床的、分子生物学的な意義を検討することを目的とした。まず、肺腺癌において CLDN-18.2 が異所性に発現している頻度を The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースや臨床検体を用いて検討した。また、CLDN-18.2 が異所性に発現している症例の臨床的特徴を調べた。次に、CLDN-18.2 を強制発現させた細胞株を作成し、CLDN-18.2 が腫瘍促進的に作用するのか、腫瘍抑制的に機能するのかを検討した。最後に、大規模データベースを利用して CLDN-18.2 を異所性に発現しているヒト肺腺癌の遺伝子発現プロファイルと CLDN-18.2 低発現なヒト肺腺癌のプロファイルと比較し、その特徴を検討した。

方法

1. CLDN-18.2 の発現頻度と Overall Survival (OS)への影響についての解析

1-1. TCGA データベースを用いた発現頻度の解析

TCGA の公開データベースを用いて肺腺癌における CLDN-18.2 の発現頻度、Overall Survival (OS)との関連を解析した。TCGA に登録されている肺腺癌、515 症例の RNA sequence (RNA-seq)のデータを用いた。CLDN-18.2 の isoform ごとのリード数は TCGA Splicing Variants Data base (TSVdb) [84]を用いて取得した。

1-2. 臨床検体を用いた解析

1-2-1. 肺癌組織検体の採取と保管

2007 年 3 月から 2013 年 12 月までに東京大学医学部附属病院呼吸器外科で手術を行い、病理学的に腺癌と診断された 100 症例の切除検体を解析に用いた。研究計画は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会に「ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理申請」を申請し（受付番号：1069）、承認を受けており、全ての対象患者から術前にインフォームドコンセントを書面にて取得した。RNA 抽出は外科的切除検体の一部を切り分け、RNA later (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, USA) で処理して 4 °C で一晩保管し、RNA 抽出までは -20 °C で保存した。

1-2-2. 肺癌組織検体からの RNA 抽出

細切した肺癌組織検体を RNAiso Plus (Takara Bio, Kyoto, Japan) 1 mL と共にセラミックビーズ入りチューブ (CK Mix kit Tube, Bertin Technologies, France) に入れ、細胞破碎装置 Precellys 24 (Bertin) で破碎した。破碎後の細胞懸濁液を遠心して上清を回収した。回収した上清にクロロホルム (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 200 μ L を加えて懸濁、遠心したのち水相を回収し、イソプロパノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) 500 μ L を加え、沈殿した Pellet を 80 %エタノール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で洗浄し回収した。回収した RNA は DEPC 処理水で溶解し、Nano Drop 2000c (Thermo Fisher Scientific) で濃度を確認し、-80 °C で保管した。

1-2-3. cDNA 合成、qPCR による CLDN-18 の発現定量

CLDN-18.1 および-18.2 の発現量を quantitative PCR 法 (qPCR 法) によって定量した。臨床検体から抽出した total RNA 1 μ g を DNase (Thermo Fisher Scientific) で室温 15 分間処理したのち 25 mM EDTA 1 μ L を加え、65 °C 15 分

間の heat activation を行なった。続いて Random Hexamer (Thermo Fisher Scientific)、dNTP (10mM each, Thermo Fisher Scientific)を加えて 65 °Cで 5 分間加温し、氷上で 1 分間 incubate した。上記産物に SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific)を加えて cDNA 合成を行なった。合成した cDNA は標的配列の Forward、Reverse Primer と共に THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (Toyobo, Osaka, Japan)を用いて 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Bio Systems, California, USA)で qPCR を行なった。各 Primer は Primer BLAST (NCBI-NIH, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)を用いて作成し、正常肺組織 (First Choice Human Total RNA Survey Panel, Thermo Fisher Scientific)ないし正常胃組織 (Human Stomach Total RNA, Thermo Fisher Scientific)の total RNA を用いて増幅効率を算出し、最も増幅効率の良い Primer set を採用した。内在性コントロールとしては RNA polymerase II subunit A (POLR2A)を用いた。得られたサンプルの Ct 値と内在性コントロールの Ct 値の差をとって Δ Ct 値として相対定量法により発現量を比較した。使用したプライマーの配列を表 4 に示す。

表 4. qPCR で使用したプライマー配列情報

	Sequence (5' – 3')
CLDN-18.1 Forward	CCAAGTGGTGGCGTTCC
CLDN-18.1 Reverse	GCCTACGATCATCAGGGCTC
CLDN-18.2 Forward	TTGGGGTTCGTGGTTTCACT
CLDN-18.2 Reverse	GCCTACGATCATCAGGGCTC
POLR2A Forward	GAAGGCCAAGCAGGACGTAA
POLR2A Reverse	GCAGAGGAGCCAGTCTTGTC

2. 細胞株を用いた CLDN-18.2 の機能解析

2-1. 細胞株

NIH-3T3、A549、H1975、HCC827 は American Type Culture Collection (Manassas, USA) から、Lenti-X 293T 細胞は Takara Bio USA, Inc (California, USA) から得た。NIH-3T3、Lenti-X 293T は培地として DMEM + 10% FBS (Biowest, Missouri, USA) + Antibiotic-Antimycotic Mix (NACALAI TESQUE, INC. Kyoto, Japan) を用いた。A549、H1975、HCC827 は RPMI 1640 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) + 10% FBS (Biowest) + Antibiotic-Antimycotic Mix (NACALAI TESQUE, INC.) を用いた。いずれの細胞も 37°C、5% CO₂ の培養器で培養を行なった。

2-2. ヒト CLDN-18.2 のクローニング

CLDN-18.2 の cDNA 配列から成るプラスミドベクター、pcDNA3.1+/C-(K)DYK (OHu03374)を GenScript Biotech Corporation 社 (New Jersey, USA)から得た。これを鋳型として、制限酵素 EcoRI の認識配列を付加した CLDN-18.2 の Forward primer (ATATGAATTCATGGCCGTGACTGCCTG)、NotI の認識配列を付加した Reverse primer (ATATGCGGCCGCTTACACATAGTCGGTG)を用いて EcoRI-CLDN18.2-NotI 配列を PCR 増幅した。PCR 産物は 1% Agarose Gel で電気泳動した上で当該 PCR 産物のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Wisconsin, USA)を用いて精製した。

上記 PCR 産物とレンチウイルスベクター (CS II -CMV-MCS-IRESS2-Bsd, Riken BRC, Ibaraki, Japan)を制限酵素 EcoRI と NotI で切断し、1:3 のモル比で T4 ligase (New England Biolabs, Massachusetts, USA)を用いて ligation し、CSII-CMV-CLDN18.2-Bsd ベクターを得た。ベクターの構造模式図を図 3 に示す。

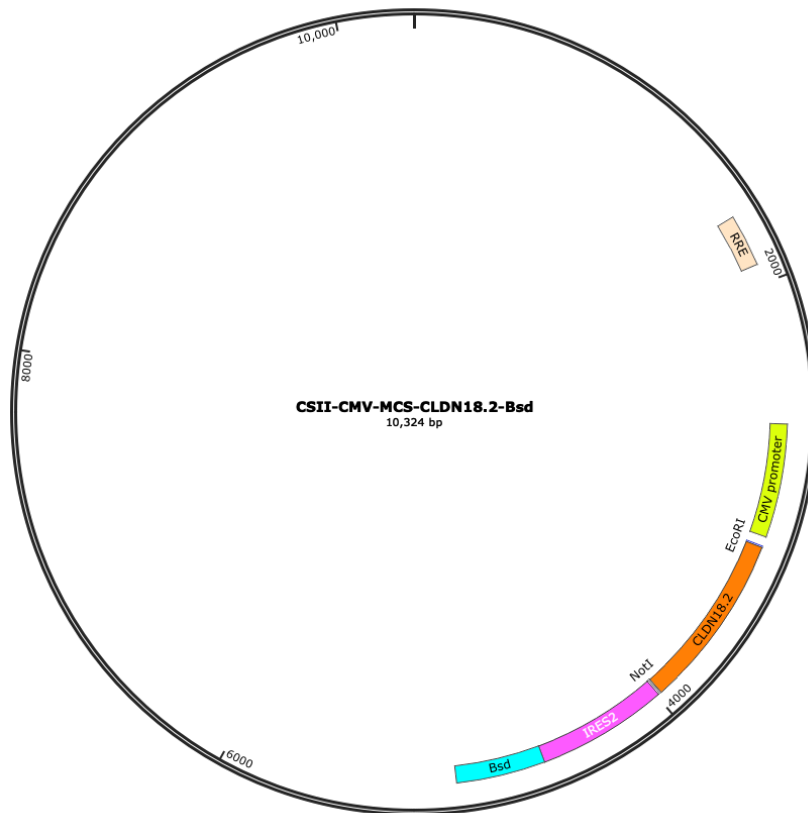


図 3. CSII-CMV-CLDN-18.2-Bsd 構造

2-3. レンチウイルス 感染

pCMV-VSV-G-RSV-Rev および pCAG-HIVgp (Riken BRC)をパッケージングプラスミドとし、作成したレンチウイルスベクターを用いて Lenti-X 293T 細胞にリポフェクションを行なった。リポフェクションには HilyMax (Dojindo, Tokyo, Japan)を使用し、48 時間後に培養上清をフィルター (Millex-HV 0.45 µm, Merck Millipore Ltd, New jersey, USA)を通過させて回収した。回収したウイルス液を NIH-3T3、A549、H1975、HCC827 細胞に Polybrene (NACALAI TESQUE, INC.)と共に感染させた。感染の 48 時間後から Blastcidin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) による薬剤選択を行なった。また、薬剤選択後に細胞の RNA を RNAiso (Takara Bio, Kyoto, Japan)を用いて抽出したのち、前述と同様の手順で cDNA を作成し、リアルタイム PCR で CLDN-18.2 の発現を確認した。

2-4. Focus Formation Assay

CLDN-18.2 強制発現細胞および empty vector を遺伝子導入したコントロールの細胞を 6-well culture plate に 2×10^5 / well で播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ の培養器内で培養した。21 日経過後に Giemsa 染色液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で染色して撮像した。撮像した画像を Image J[85]に取り込み、well 全体の面積に占める Focus の面積を算出した。

2-5. Cell Proliferation Assay

CLDN-18.2 を強制発現させた細胞株、および empty vector を遺伝子導入したコントロールの細胞株をあらかじめ 10 cm dish 内で 80 % confluent 程度になるように培養した。Day1 に各細胞を 6-well plate に 2×10^5 / well で播種した。Day2 – day7 にそれぞれ triplicate で細胞数をカウントした。細胞数のカウントは、Trypsin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で細胞を処理したのち、Trypan blue (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation) で染色し、TC10 Automated Cell Counter Version 1.129 (BIO-RAD, California, USA)を用いて自動測定した。測定値は “Alive count”のみを採用した。なお、day6、day7 測定用の細胞については、day5 に培地交換を行なった。

2-6. Soft Agar Colony Formation Assay

Bacto Agar (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA)を超純水で溶解し、各細胞の培地で希釈した。終濃度を 0.75% Agar とした Bottom Mix を 6-well plate に 2.5 ml / well で添加し、室温で Agar が凝固するまで放置した。各細胞株は Trypsin 処理をしたのち、遠心して pellet down し、培地を用いて pipetting を反復しながら再懸濁し、Cell Strainer 40 μm (CORNING, New York, USA)を通過させて個細胞化させ、 2×10^5 / ml に調整した。これを 0.36% Agar に混和して Top Mix を作成した。凝固した Bottom Mix の上に Top Mix を 1.5 ml ずつ添加 (終細胞数 4.5×10^4 /well)した。Day1- day15 まで隔日でコロニーの数を計測した。計測は BZ-X710 (KEYENCE, Osaka, Japan)の 4 倍対物レンズを用いて 1well あたりランダムに 10 枚の画像を撮影し、長径が 100 μm を超えるコロニー数を計測して合計した。これを triplicate して平均値を求めた。

2-7. Adhesion Assay

あらかじめ 10 cm dish 内で 80% confluent 程度に培養しておいた細胞を trypsin 処理して細胞を計数し、 1×10^6 / well で 6 well Dish に播種した。37 $^{\circ}\text{C}$ の培養器内で 1 時間培養したのち、PBS で 3 回洗浄し、残った細胞を trypsin 処理

後に trypan blue で染色して TC10 Automated Cell Counter Version 1.129 (BIO-RAD, California, USA)で計数した。

2-8. Migration Assay

各細胞はあらかじめ 10 cm dish 内で 80% confluent 程度になるように培養した。24-well plate に Culture Insert 2well (ibidi GmbH, Gräfelfing, Germany)を静置し、 $5 \times 10^5 / \text{ml}$ に調整した細胞懸濁液を $70 \mu\text{L} / \text{well}$ で播種した。37°C、5% CO₂ の培養器内で 24 時間培養したのち、Culture Insert をピンセットで取り除き、各細胞の培地で洗浄して剥離細胞を除去した。BZ-X710 (KEYENCE)で gap を撮像したのち、培養器内で一定時間培養した。培養時間は予備実験の結果から NIH-3T3 は 24 時間、A549 は 9 時間、H1975 と HCC827 は 12 時間とした。一定時間経過後に再度撮影を行い、gap の大きさの変化を Image J を用いて計測した。

2-9. 免疫染色

2-9-1. CLDN-18.2 免疫染色

CLDN-18.2 を強制発現させた NIH-3T3 細胞株を Slide & Chamber 8 well (WATSON, Tokyo, Japan)に $5 \times 10^5 / \text{well}$ で播種し、24 時間 培養した。上清を吸引したのち、methanol を $500 \mu\text{L} / \text{well}$ で添加し、-20°Cで 15 分間 培養した。

Methanol を吸引したのち、PBS で 3 回 洗淨し、2% BSA in PBS を blocking buffer とし、4 °C で 30 分間の blocking を行なった。Blocking 後に PBS で 3 回 洗淨したのち、CLDN-18.2 抗体溶液 (CLDN18 (43-14A) Assay; VENTANA, Roche, Basel, Switzerland) を 150 μ L / well 添加し、室温で 1 時間 培養した。次に、蛍光標識二次抗体 (Anti-mouse IgG #8890, Cell Signaling Technology, Massachusetts, USA) を PBS で 1 : 400 に希釈し、150 μ L / well で添加し、遮光環境下で 1 時間 培養した。PBS で 3 回 洗淨した後に DAPI (Mounting Medium with DAPI, VECTOR Laboratories, California, USA) と共に封入して顕微鏡で観察した。

2-9-2. アクチン染色

細胞を Slide & Chamber 8well (WATSON, Tokyo, Japan) に 5×10^5 / well で播種し、24 時間 培養した。4% paraformaldehyde (NACALAI TESQUE, INC.) で固定し、0.1 % Triton X-100 in PBS で膜透過処理を行なった。Phalloidin (Phalloidin-iFluour 488 Conjugate, Cayman Chemical, Michigan, USA) 150 μ L / well で染色した後、PBS で 3 回 洗淨し、DAPI と共に封入して顕微鏡で観察した。

3. The Cancer Genome Atlas database を用いた in silico 解析

3-1. CLDN-18.2 の異所性発現の機序に関する解析

肺腺癌において CLDN-18.2 が異所性に発現する機序を検討した。TCGA に登録されている肺腺癌症例について、DNA のメチル化に関するデータを TCGA データベースから取得し、CLDN-18.1 および-18.2 のプロモーター領域のメチル化の状態を比較した。

3-2. CLDN-18.2 高発現症例の同定

CLDN-18 の isoform ごとの発現量は TSVdb [84]を利用して RNA-Seq データを元に解析した。上記で同定した CLDN-18.2 高発現症例の症例番号を TCGA データベースで検索し、高発現症例 30 例、CLDN-18.1、-18.2 のいずれのリード数もゼロの症例 30 例について RNA-Seq の全リードデータを TCGA データベースから得た。得られた RNA-Seq データは Bioconductor のパッケージである TCC [86-88]を用いて多次元尺度構成法 (Multi-Dimensional Scaling; MDS)および主成分分析 (Principal Component Analysis; PCA)による解析を行い、CLDN-18.2 の機能を反映すると思われる 2 群に分かれるように症例の取捨選択を行なった。最終的にクラスター解析で CLDN-18.2 の高低で 2 群に分けることのできた各 18

症例を解析対象とした。Differentially Expressed Genes (DEG) 解析の際には False Discovery Rate (FDR)を 5%とした。

3-3. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)

GSEA には GSEA version 4.1.0 [89]を用いた。上記の解析によって得られた DEG の遺伝子群を query として、Gene set と chip set にはそれぞれ c5.go. (bp or cc or mf) .v7.2.symbols.gmt、Human_ENSEMBL_Gene_ID_MSigDB.v7.2.chip を用いた。

3-4. Pathway Analysis

Pathway Analysis には Bioconductor のパッケージである Pathview を使用した。具体的には、Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG)が公表しているパスウェイマップをダウンロードし、上記の解析により得られた DEG を query として該当遺伝子をマッピングした。マッピングした遺伝子は M value の値に応じて色分けをした。

4. 統計解析

統計解析はすべて Prism 8 version 8.4.3 (GraphPad Software, California, USA)を用いて行なった。臨床検体の OS の解析は Kaplan-Meier 法を用い、群間の比較は Log rank test を用いた。連続変数の二群間比較は Mann-Whitney u test を用いた。Cell Proliferation Assay、Soft Agar Focus Formation Assay では同一検体で複数の時点のデータを取得したため、解析は two-way ANOVA を用いて行なった。いずれの解析でも有意水準は 5%とした。細胞株を用いた実験は少なくとも 3 回以上の独立した実験を行い、その結果は中央値と最小・最大値で示した。

結果

1. CLDN-18.2 の発現頻度と OS への影響についての解析

1-1. TCGA データベースを利用した解析

TCGA のデータベースを利用してヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の頻度と、CLDN-18.2 の発現有無が Overall Survival (OS)に与える影響を検討した。TCGA のデータベースから得た腺癌症例の CLDN-18.2 の FPKM 値は図 4 の通りであった。CLDN-18.2 の異所性発現に関する既報[57]を参考に、おおよそ同程度の頻度となるように FPKM 値 100 をカットオフ値として 2 群に分けて解析したところ、CLDN-18.2 の発現頻度は 7.8 % (515 症例中の 40 症例)であった。各群の患者背景を表 5 に、対象症例のドライバー変異の有無を表 6 に示す。患者背景は両群で差はなく、ドライバー変異については EGFR の変異が CLDN-18.2 低発現群で高い傾向にあったが、統計学的な有意差はなかった (Fisher's exact test, $P = 0.068$)。また、CLDN-18.2 高発現群について、症例ごとのドライバー変異の詳細を図 5 に示す。Kaplan-Meier 法により OS を比較したところ、両者に統計学的に有意な差は認めなかった (図 6)。

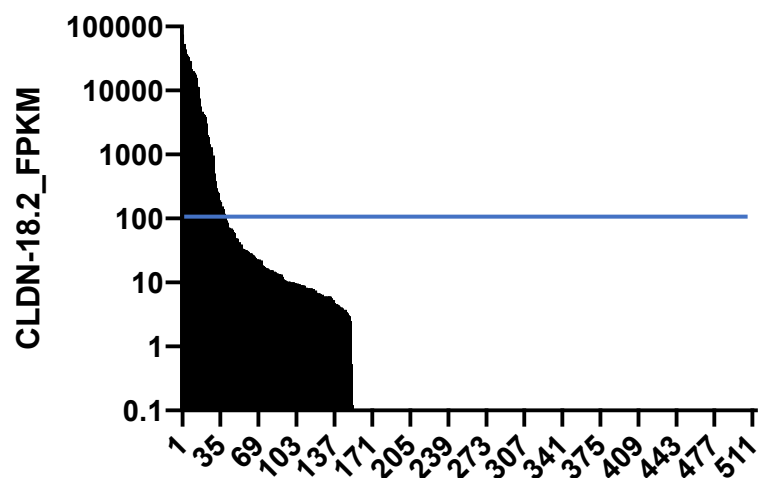


図4. TCGAに登録されている肺腺癌症例における CLDN-18.2 の FPKM 値。FPKM 値の分布を参考に、100 をカットオフ値として高発現群と低発現群の2群に分けて以下の解析を行なった。

表5. TCGA データベースから得た肺腺癌症例の患者背景

		CLDN-18.2 高発現		CLDN-18.2 低発現	
		N = 40	%	N = 475	%
性別	(女性)	11	(27.5)	266	(56.0)
人種	White	31	(77.5)	357	(75.2)
	Black or African American	5	(12.5)	47	(9.9)
	Asian	0	(0)	8	(1.7)
	American Indian or Alaska Native	0	(0)	1	(0.2)
	Undefined	4	(10.0)	62	(13.1)
Stage	I	21	(52.5)	254	(53.5)
	II	13	(32.5)	109	(22.9)
	III / IV	5	(12.5)	105	(22.1)
	Undefined	1	(2.5)	7	(1.5)

表 6. CLDN 18 発現高低別の Driver mutation の頻度

	CLDN-18.2 高発現群 (%)	CLDN-18.2 低発現群 (%)
EGFR	2 (5.0)	80 (16.8)
ALK	3 (7.5)	33 (6.9)
KRAS	14 (35)	152 (32.0)
ROS1	1 (2.5)	32 (6.7)
BRAF	2 (5)	45 (9.5)
NTRK1	1 (2.5)	46 (9.7)
RET	1 (2.5)	20 (4.2)
MET	3 (7.5)	32 (6.7)
ERBB2	3 (7.5)	17 (3.6)
MAPK1	1 (2.5)	11 (2.3)

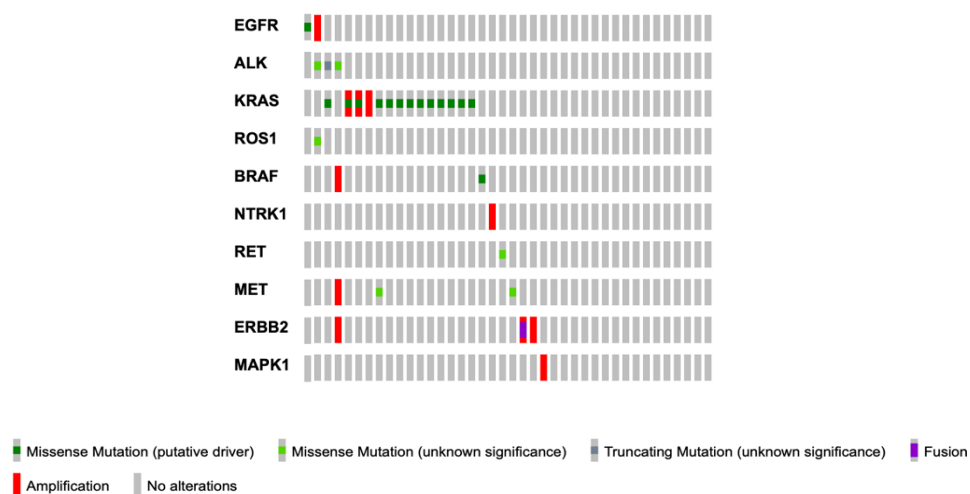


図 5. CLDN-18.2 高発現症例の遺伝子変異詳細
TCGA データベースにおいて CLDN-18.2 の発現が高い 40 症例について、
ドライバー変異の有無を検索した。

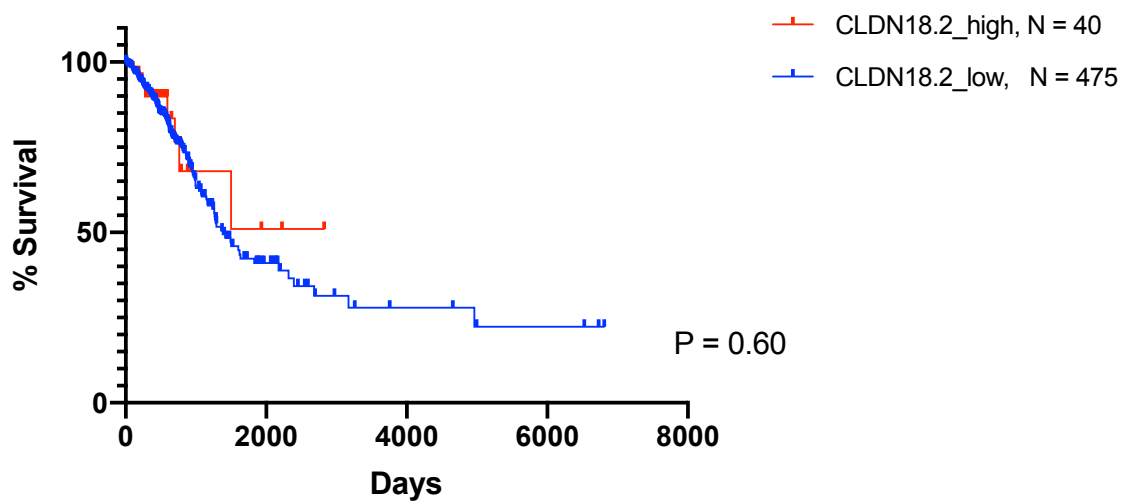


図 6. TCGA データベースを用いた CLDN-18.2 の発現有無による OS の比較
 TCGA データベースの肺腺癌症例について、CLDN-18.2 の発現高低で 2 群に分けて Kaplan-Maier 法で OS を比較した。両者に統計学的に有意な差は見られなかった。

1-2. 臨床検体を用いた解析

1-2-1. 患者背景

東京大学医学部附属病院で手術が行われ、病理学的に腺癌と確認された100 症例について解析した。解析を行なった100 症例の患者背景を表7 に示す。年齢の中央値は70 歳 (範囲は34 歳から85 歳)、50 人が女性、53 人が非喫煙者であった。病期はI 期が最多で80 人であり、II 期とIII/IV期はそれぞれ8 人と12 人であった。

表7. 腺癌100 例の患者背景

		N = 100
年齢 (median, years)		70 (34 - 85)
性別 (女性)		50
Never Smoker		53
Stage	I	80
	II	8
	III / IV	12

1-2-1. 臨床検体での CLDN-18.1, -18.2 の発現と OS

臨床検体を用いて CLDN-18.1 および-18.2 の mRNA の発現量を調べた。発現量の結果を図 7 - 8 に示す。図 7 に示す通り、CLDN 18.2 は 6 症例 (6 %) で特に高発現であり、既報や TCGA データベースでの結果と同程度の頻度であった。qPCR の結果を確認するため、CLDN-18.2 高発現と判定した 3 症例と低発現と判定した 3 症例について病理組織の免疫染色を行い、タンパクレベルでの CLDN-18.2 の発現を確認した。図 9 に示す通り、qPCR の結果と一致したタンパクの発現を認めた。CLDN-18.1、-18.2 の発現量と病期との関係を検討するために病期毎に発現量を集計し、分散分析を行ったところ統計学的に有意な差は認めなかった (CLDN 18.1; $P=0.78$, CLDN 18.2; $P=0.25$)。結果を図 10 に示す。また、CLDN -18.2 の発現量が高かった 6 症例の臨床的特徴を表 8 に示す。

CLDN-18.2 が高発現している 6 症例とその他の 94 症例に分けて Kaplan-Meier 法により全生存期間を比較したところ、両者に統計学的に有意な差は認めなかった。結果を図 11 に示す。

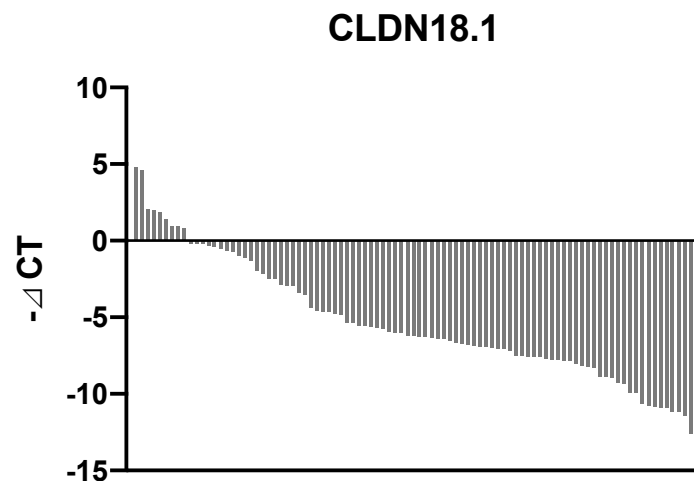


図 7. 手術検体 100 症例を用いた CLDN-18.1 発現量解析
手術検体から抽出した RNA を用いて qPCR により CLDN-18.1 の発現量を
定量した。

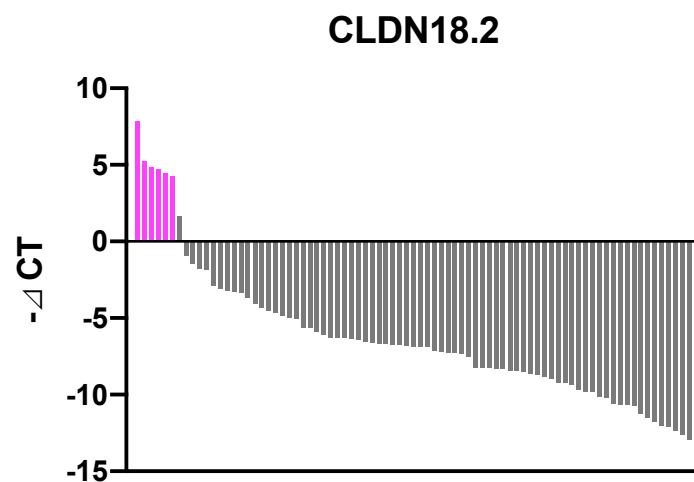


図 8. 手術検体 100 症例を用いた CLDN-18.2 発現量解析
正常な肺組織では発現していない CLDN-18.2 が 6 症例で強く発現していた。

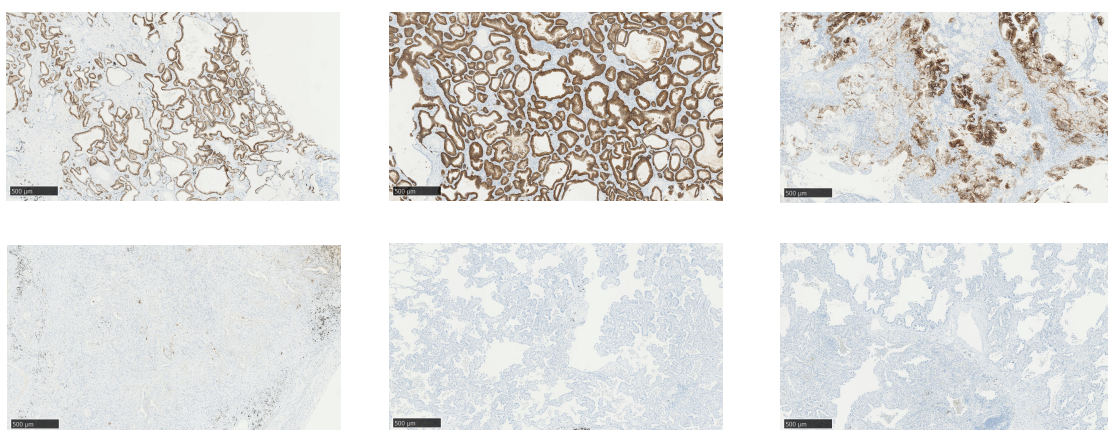


図 9. 組織標本を用いた CLDN-18.2 の発現確認

qPCR で CLDN-18.2 の発現が高いと判定した 3 症例（上段）と発現が低いと判定した 3 症例（下段）について、組織標本を用いた CLDN-18.2 の免疫組織染色を行った。qPCR で CLDN-18.2 の発現を認めた 3 症例ではタンパクレベルでも発現があることがわかった。また、qPCR で CLDN-18.2 の発現が低いと判定した 3 症例ではタンパクレベルでも発現がないことが確認された。

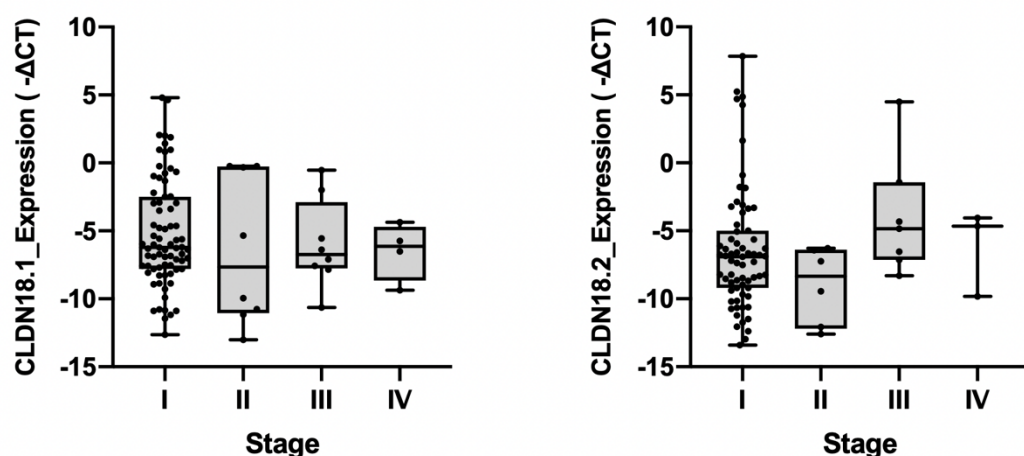


図 10. 肺癌の Stage ごとの CLDN-18.1 および-18.2 の発現量
分散分析を行なった結果、Stage による CLDN-18.1、-18.2 の発現量に統計学的な差は認めなかった。

表 8. CLDN-18.2 高発現症例の患者背景

	CLDN-18.2 高発現		CLDN-18.2 低発現	
	N = 6	%	N=94	%
年齢 (median, years)	72 (66 - 78)		70 (34 - 85)	
性別 (女性)	1	(17)	49	(52)
Never Smoker	2	(33)	51	(54)
Stage				
I	5	(83)	75	(79)
II	0	(0)	8	(9)
III / IV	1	(17)	11	(12)
術後経過				
無再発終診	2	(33)	31	(33)
無再発通院中	1	(17)	20	(21)
再発	1	(17)	19	(20)
不明	2	(33)	14	(15)
BSC, 死亡	0	(0)	26	(28)

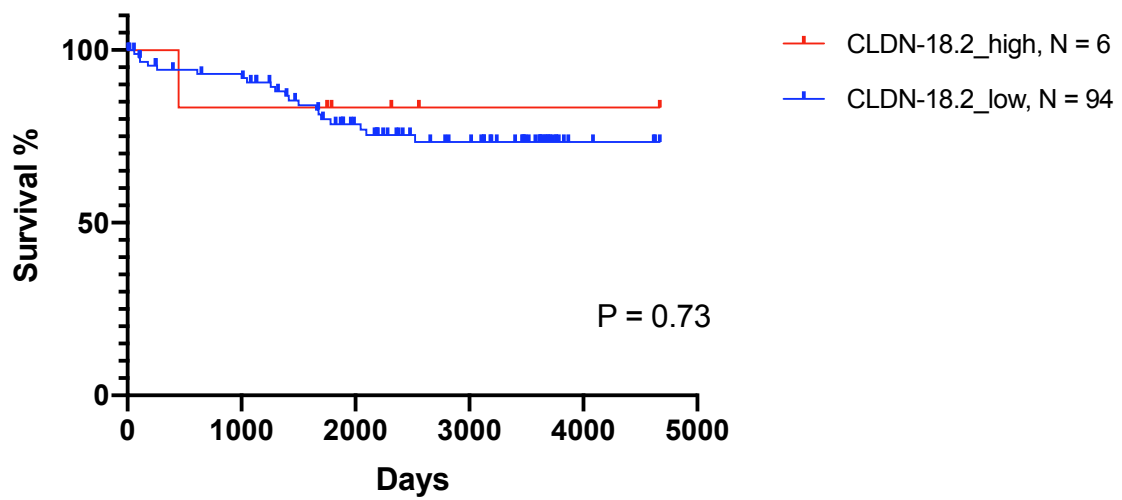


図 11. 全生存期間の比較

CLDN-18.2 の $-\Delta Ct$ 値の大きい 6 症例とその他の 94 症例とで全生存期間について Kaplan-Meier 法で比較した。統計学的に有意な差は認めなかった。

2. 細胞株を用いた CLDN 18.2 の機能解析

2-1. CLDN-18.2 強制発現細胞株の作成

NIH-3T3、A549、H1975、HCC827 にレンチウイルスベクターを用いて CLDN-18.2 を強制発現させた細胞株から total RNA を回収し、qPCR によって CLDN-18.2 の mRNA 発現量を定量し、control と比較した。いずれの細胞株においても強制発現株で CLDN-18.2 の発現量が増加していることを確認した (すべて $P < 0.001$)。qPCR での発現解析の結果を図 12 に示す。

また、作成した細胞株を CLDN-18.2 特異的な抗体を用いて免疫染色を行ったところ、図 13 に示す通り CLDN-18.2 強制発現株のみが染色され、タンパクとして発現していることが確認された。

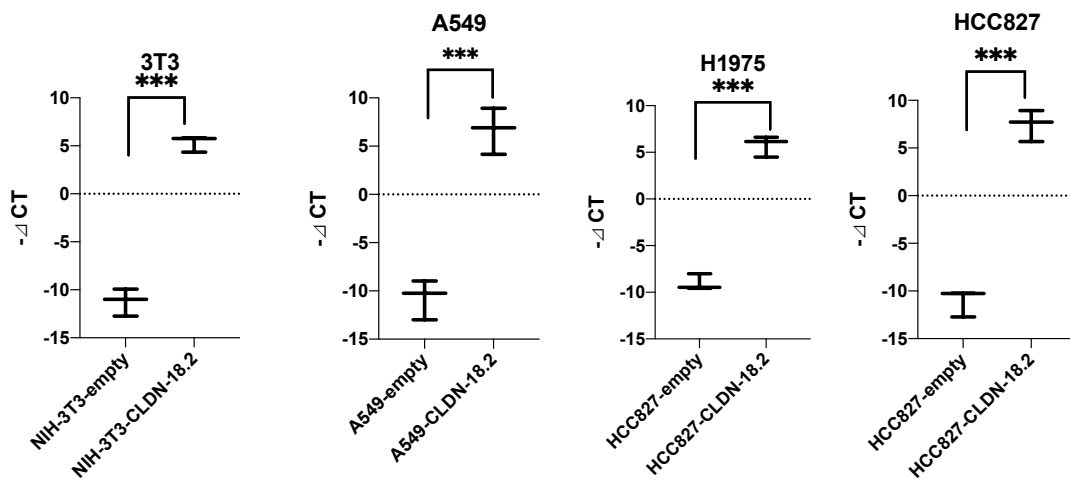


図 12. CLDN-18.2 強制発現株での発現量

CLDN-18.2 強制発現細胞とコントロール細胞から回収した RNA を用いて qPCR により CLDN-18.2 の発現量を解析した。解析は Mann-Whitney u-test で行なった。P < 0.001 を***で表示している。

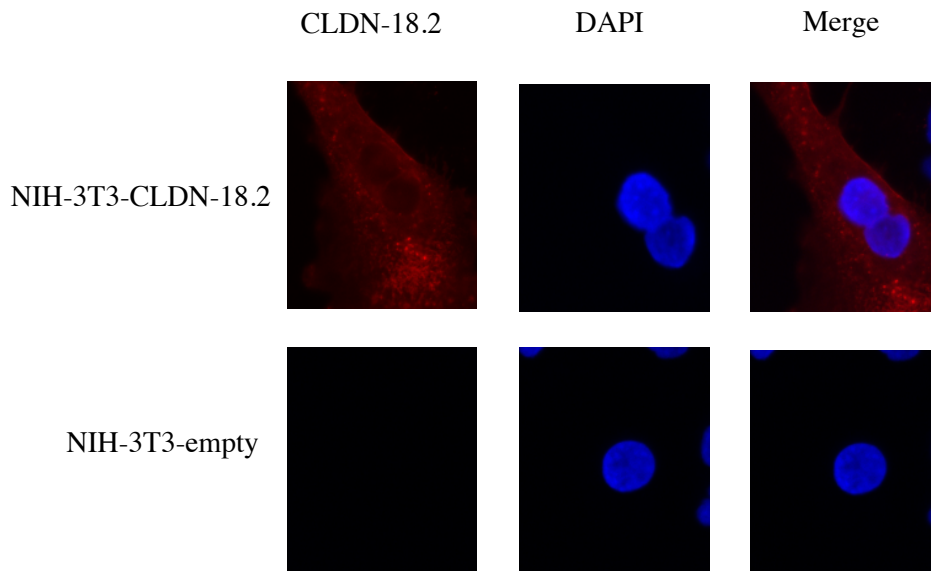


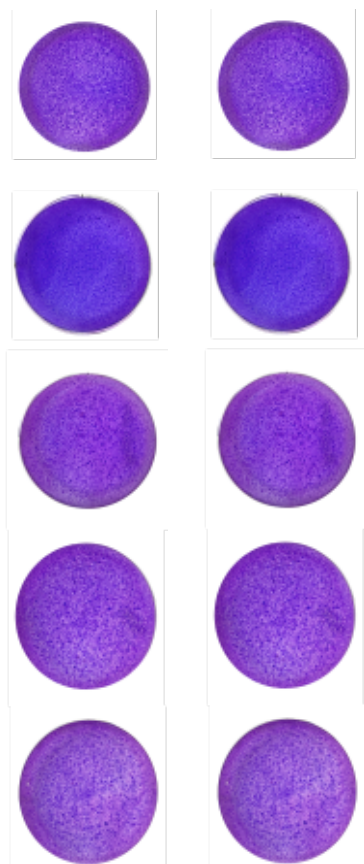
図 13. CLDN-18.2 免疫染色

2-2. Focus Formation Assay

CLDN-18.2 による形質転換能を検討するため、NIH-3T3 の CLDN-18.2 強制発現株と empty vector 導入株を用いて、Focus Formation Assay を行なった。結果を図 14 に示す。21 日後に染色をして Focus を計測したところ、CLDN-18.2 強制発現株とコントロール細胞とで、well の面積に占める focus の面積の割合に有意な差は認めなかった。

(A)

NIH-3T3-empty NIH-3T3-CLDN 18.2



(B)

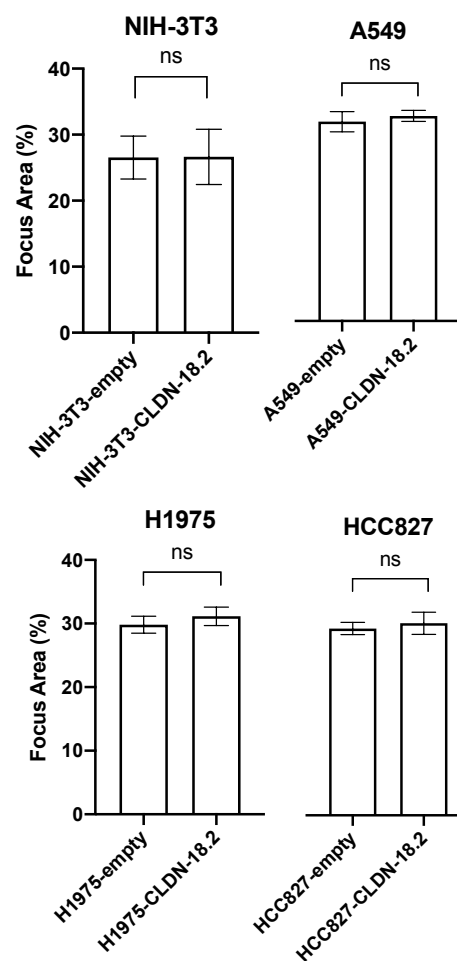


図 14. Focus Formation Assay

(A) NIH-3T3 を用いた Focus Formation Assay で 21 日経過後に Giemsa 染色をした画像。異なるレンチウイルス のバッチを用いて N = 5 で実験を行なった。

(B) 画像を ImageJ で解析し well に占める Focus の割合を算出し、比較した結果。いずれの細胞株でも CLDN-18.2 強制発現細胞とコントロールとの間に統計学的に有意な差は認めなかった。

2-3. Cell Proliferation Assay

CLDN-18.2 の細胞増殖に与える影響について検討した。CLDN-18.2 強制発現細胞と empty vector をトランスフェクションしたコントロールの細胞を用いて、細胞数の測定を行なった。いずれの細胞株においても、CLDN-18.2 強制発現細胞とコントロールの細胞との間で、細胞数に有意な差は認めなかった。結果を図 15 に示す。

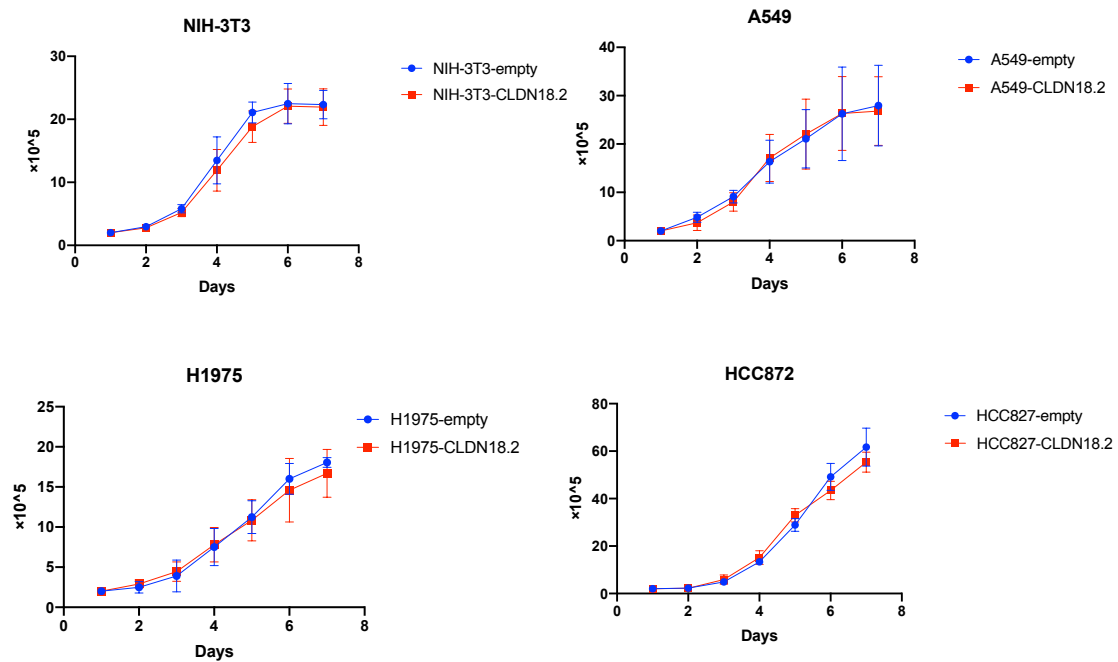


図 15. Cell Proliferation Assay

いずれの細胞株でも CLDN-18.2 強制発現株とコントロールとの間に統計学的に有意な差は認めなかった。

2-3. Soft Agar Colony Formation Assay

足場非依存性の細胞増殖能を検討するため、個細胞化した細胞が低濃度 agar を含んだ培地の中でコロニーを形成するかどうかを検証した。NIH-3T3 を用いた検討では CLDN-18.2 強制発現株ではコントロールに比べて統計学的に有意にコロニーの数が多かった ($P < 0.001$)。一方で、A549、HCC827 を用いて同様の検討を行なったところ、強制発現株とコントロールとの間に統計学的に有意な差は認めなかった。結果を図 16 に示す。

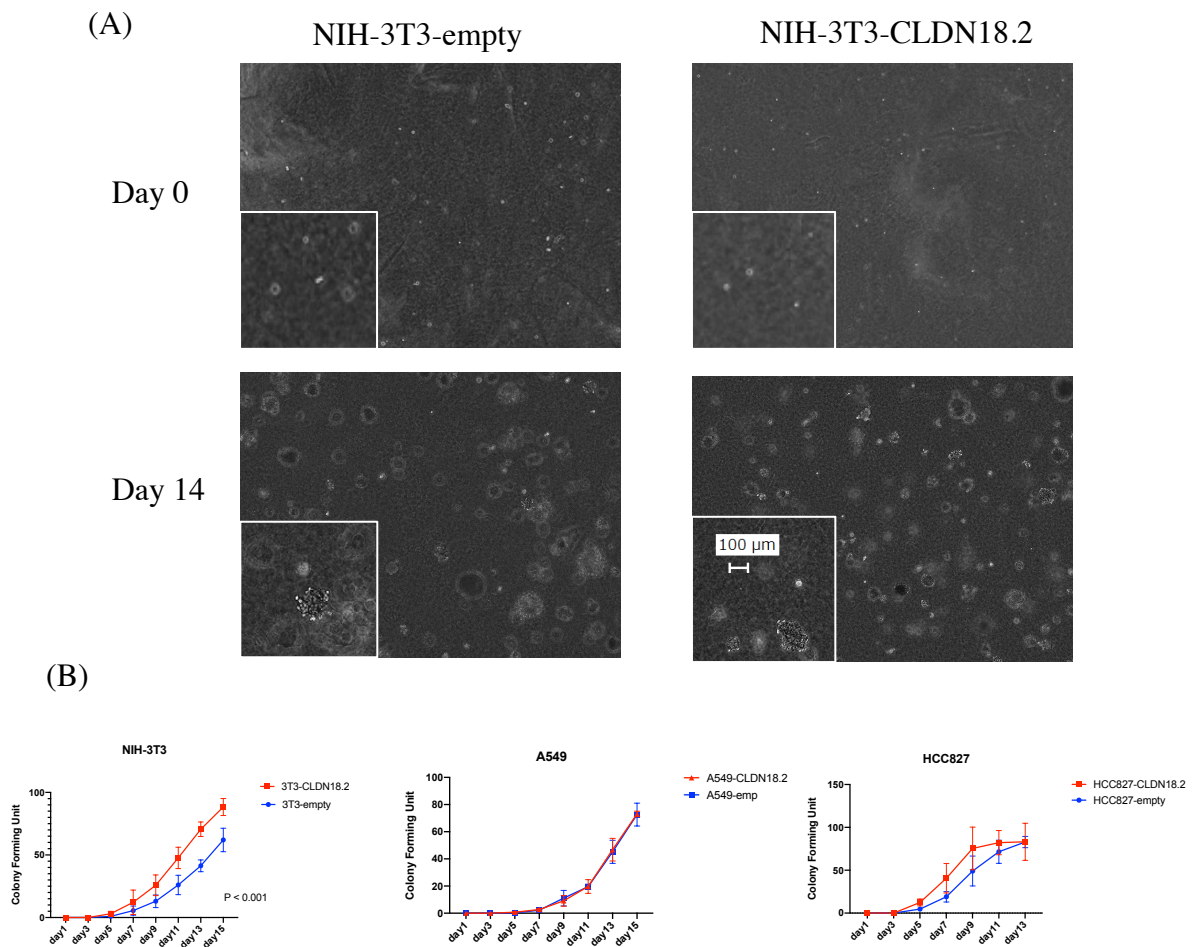


図 16. Soft Agar Colony Formation Assay

(A) 上段は day 0 の顕微鏡像。左下に拡大図を示す。CLDN-18.2 強制発現株、コントロールともに細胞が個細胞化している。下段は day 14 の顕微鏡像。左下の拡大図に示す通り、細胞がコロニーを形成している。100 μm を超える大きさのコロニーを計測対象とした。

(B) 細胞株ごとに経時的なコロニー数の変化をプロットした。NIH-3T3 では CLDN-18.2 とコントロールとの間に有意にコロニー数の差を認めた ($P < 0.001$)。

2-4. Adhesion Assay

Adhesion Assay を行い、CLDN-18.2 が細胞接着能に及ぼす影響を検討した。いずれの細胞株においても CLDN-18.2 強制発現株とコントロールとで統計学的に有意な差は認めなかった。結果を図 17 に示す。

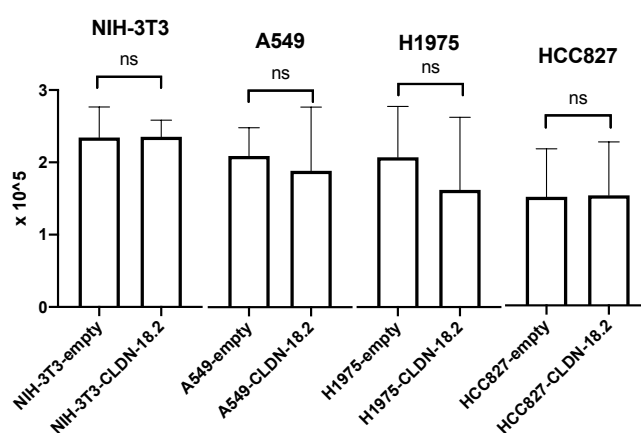


図 17. Adhesion Assay

細胞を播種した 1 時間後に培養プレートに接着した細胞数をカウントした。いずれの細胞株を用いた実験においても CLDN-18.2 の強制発現細胞とコントロールとの間に統計学的に有意な差は認めなかった。

2-5. Migration Assay

CLDN-18.2 が細胞の遊走能に与える影響を検討した。NIH-3T3 では CLDN-18.2 強制発現株の方が細胞の移動速度、一定時間経過後の間隙の被覆率が有意に高かった (移動速度 $P = 0.032$ 、被覆率 $P = 0.016$)。肺癌細胞株の A549、H1975、HCC827 では強制発現株とコントロールとの間に有意な差は認めなかった。結果を図 18 に示す。

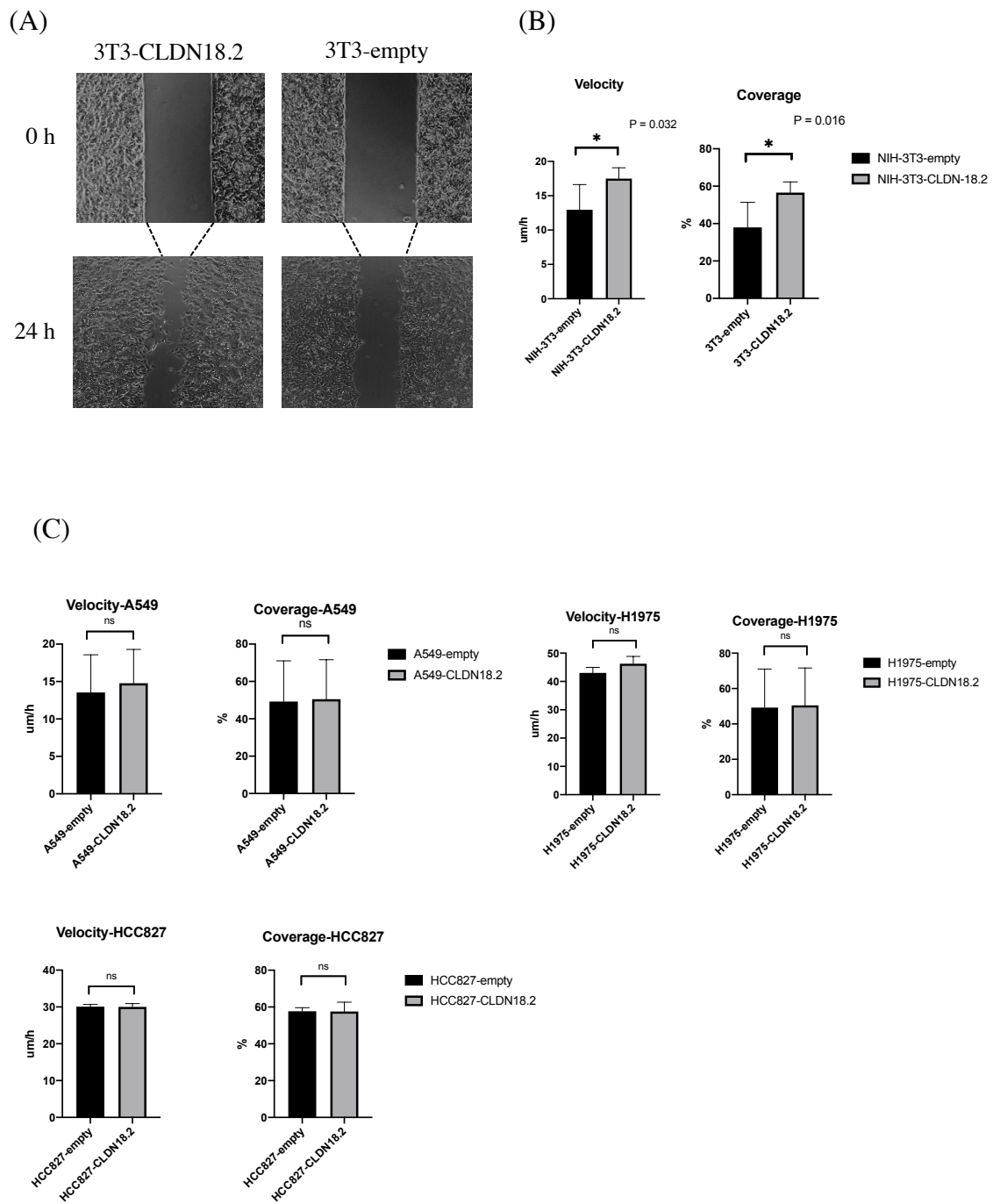


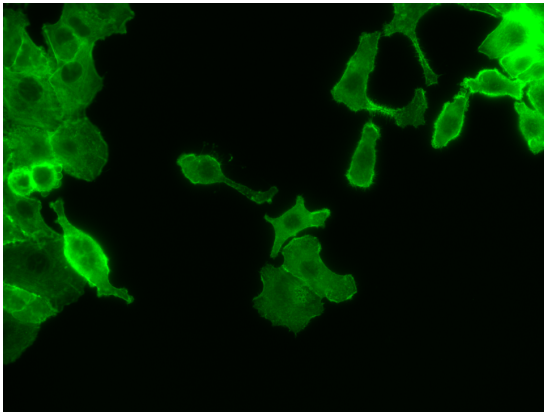
図 18. Migration Assay

(A) Migration Assay の顕微鏡画像。上段は culture insert を除去した直後。下段は 24 時間 incubate 後。(B) NIH-3T3 を用いた実験の結果。N = 5。(C) A549、H1975、HCC827 を用いた実験の結果。いずれも N = 3。

2-6. アクチン免疫染色

細胞の形態、運動機能を評価するため、アクチンの免疫染色を行なった。CLDN 18.2 強制発現株とコントロール細胞とでは、細胞形態、アクチンの分布に明らかな違いを認めなかった。図 19 に画像を示す。

NIH-3T3-empty



NIH-3T3-CLDN18.2

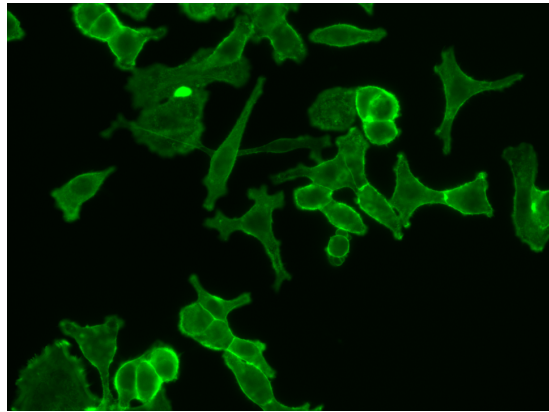


図 19. アクチン免疫染色の画像

3. TCGA data base を利用した *in silico* 解析

3-1. CLDN-18.1、-18.2 のプロモーター領域のメチル化

CLDN-18.2 が異所性に発現する機序に関して、TCGA のデータを用いて解析した。腫瘍部の組織検体においては CLDN-18.1 のプロモーター領域のメチル化が起きている一方、CLDN-18.2 のプロモーター領域では DNA の脱メチル化が起きていることがわかった。結果を図 20 に示す。

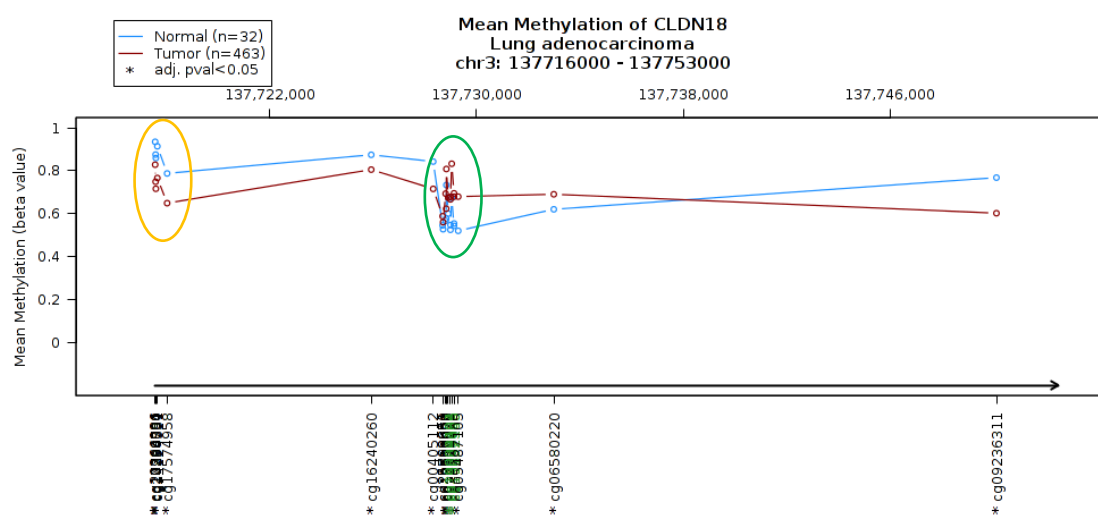


図 20. CLDN-18 のプロモーター領域におけるメチル化の程度
赤線は腫瘍部、青線は正常組織の検体。黄色の円で囲んだ部分が CLDN-18.2 のプロモーター領域。緑の円で囲んだ部分が CLDN-18.1 のプロモーター領域。横軸はゲノム DNA 上の位置、縦軸は DNA のメチル化を表す beta value を示す。いずれも測定部位の Mean の値を plot している。正常では CLDN-18.1 のプロモーター領域はメチル化の程度が低いが、腫瘍ではメチル化の程度が増加している。CLDN-18.2 のプロモーター領域は逆に正常部でよりメチル化されており、腫瘍部では脱メチル化されている。

3-2. 解析対象症例の選択

in vitro の実験結果を踏まえ、大規模データベースを用いて CLDN-18.2 が異所性に発現している肺癌を特徴づける遺伝子群を特定するため、*in silico* 解析を行なった。まず、肺腺癌症例の RNA-sequence のデータについて、isoform ごとの CLDN-18 のリードデータを TSVdb[84]を利用して得た。次に、上記のデータの中から CLDN-18.2 高発現症例と低発現症例を各 30 症例、合計 60 症例選択した。この 60 症例について行った多次元尺度構成法、主成分分析、クラスター分析の結果を図 21 に示す。図 21 に示す通り、選択した 60 症例は CLDN-18.2 の有無のみでは 2 群に分かれておらず、目的とする CLDN-18.2 の機能解析に適していないため症例の選択が必要であると考えられた。

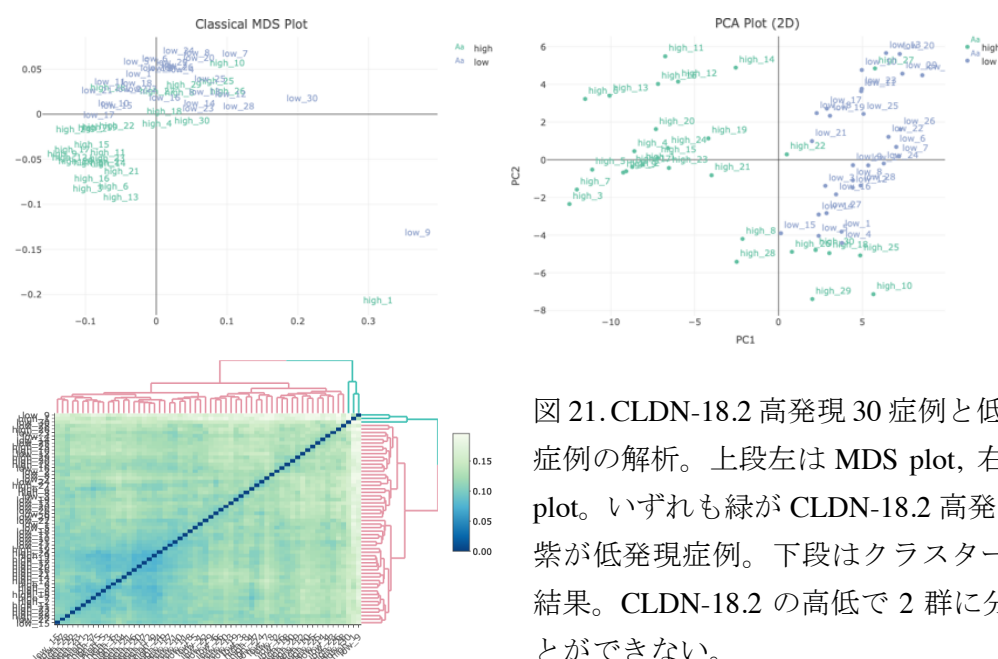


図 21. CLDN-18.2 高発現 30 症例と低発現 30 症例の解析。上段左は MDS plot, 右が PCA plot。いずれも緑が CLDN-18.2 高発現症例。紫が低発現症例。下段はクラスター分析の結果。CLDN-18.2 の高低で 2 群に分けることができない。

上記の 60 症例の中から、MDS plot、PCA plot を参考に他と傾向が大きく異なる症例を 1 症例ずつ削除し、再度 MDS、PCA plot を描画して確認するという方法によって、症例を取捨選択した。最終的に両群 18 症例ずつ、合計 36 症例を選択した。最終的に選択した 36 症例の MDS plot、PCA plot、クラスター分析の結果を図 22 に示す。

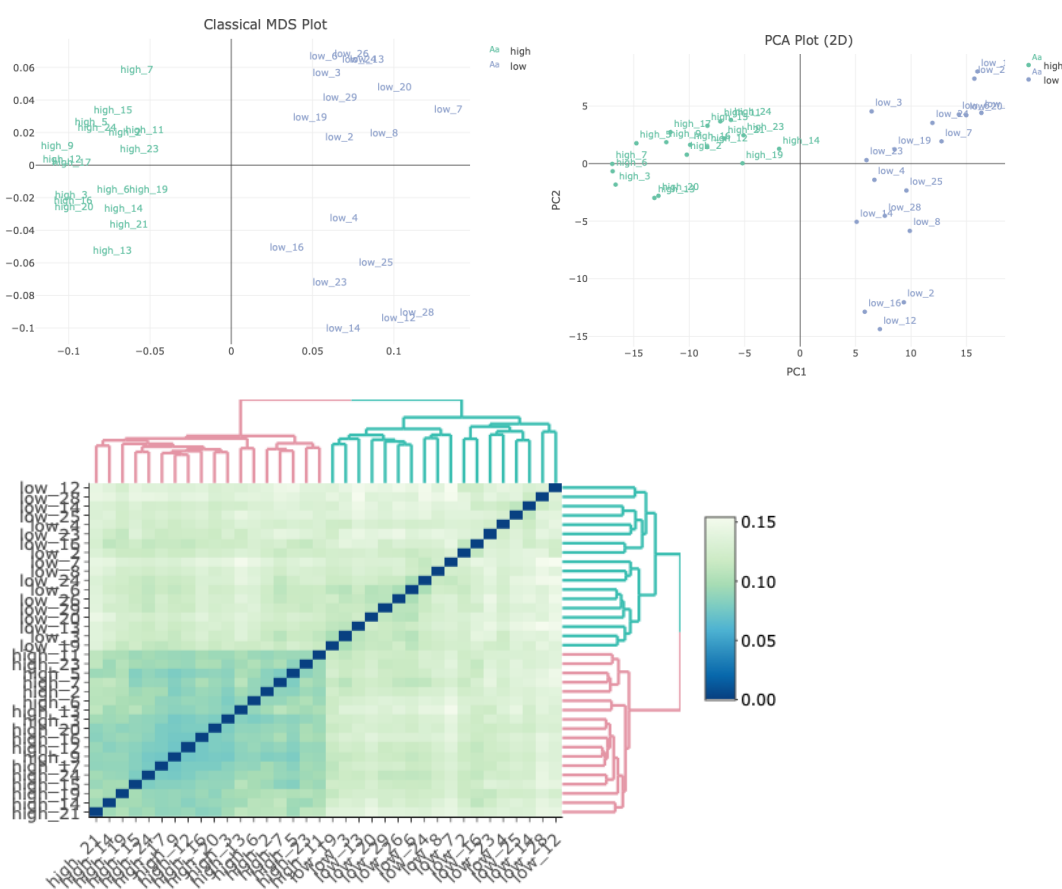


図 22. 選択した 36 症例の解析の結果

MDS plot、PCA plot により、外れ値となる症例を除外し、最終的に CLDN-18.2 の有無で 2 群に分かれるように症例を選択した。図は最終的に解析対象とした症例の PCA および MDS plot。緑の点は CLDN-18.2 が異所性に発現している症例、青の点は CLDN-18.1, -18.2 いずれも発現していない症例。下段はクラスター分析の結果。CLDN-18.2 の高低により 2 群に分かれることを確認した。

3-3. 発現変動遺伝子の検索

上記の方法により選択した症例で発現が変動している遺伝子を検討した。FDR 0.05 で DEG と判定されたのは 3,974 遺伝子であった。MA plot と Volcano plot の結果を図 23 に示す。MA plot では CLDN-18.2 の高発現群と低発現群の 2 群間で遺伝子の発現がどのように変化しているかを図示している。個々の点が遺伝子を表わし、DEG と判定された遺伝子は赤色で示している。図の横軸は平均発現量である A value ($\log_2(G2; \text{CLDN-18.2 低発現}) + \log_2(G1; \text{GLDN-18.2 高発現})$)を表しており、全体に低発現の遺伝子は左に、高発現の遺伝子は右にプロットされる。縦軸は発現比である M value ($\log_2(G2) - \log_2(G1)$)を表しており、CLDN-18.2 高発現群で発現が増加しているものは上側に、発現が低下している遺伝子は下側にプロットされる。一方、volcano plot では発現比 (M value) と P 値を表している。

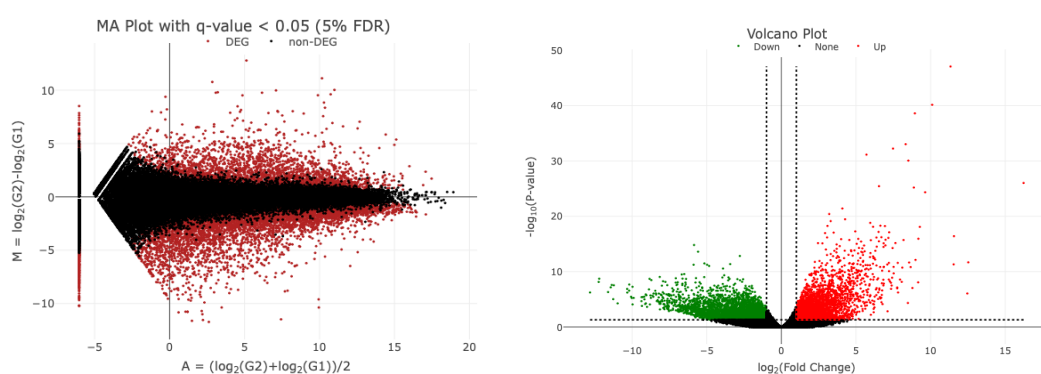


図 23. MA plot (左)と Volcano plot (右)

MA plot では DEG を赤で示す。3,974 個の遺伝子が DEG と判定された。Volcano plot では発現が増加している遺伝子を赤で、減少している遺伝子を緑で示す。

3-4. Pathway Analysis

DEG と判定された遺伝子群を用いて Pathway 解析を行なった。代謝、シグナル伝達については、有意に enrich された経路は認めなかった。Cell Cycle に関する遺伝子群については、その多くが CLDN-18.2 高発現症例において CLDN-18.2 低発現症例と比較して発現が低下していた。結果を図 24 に示す。

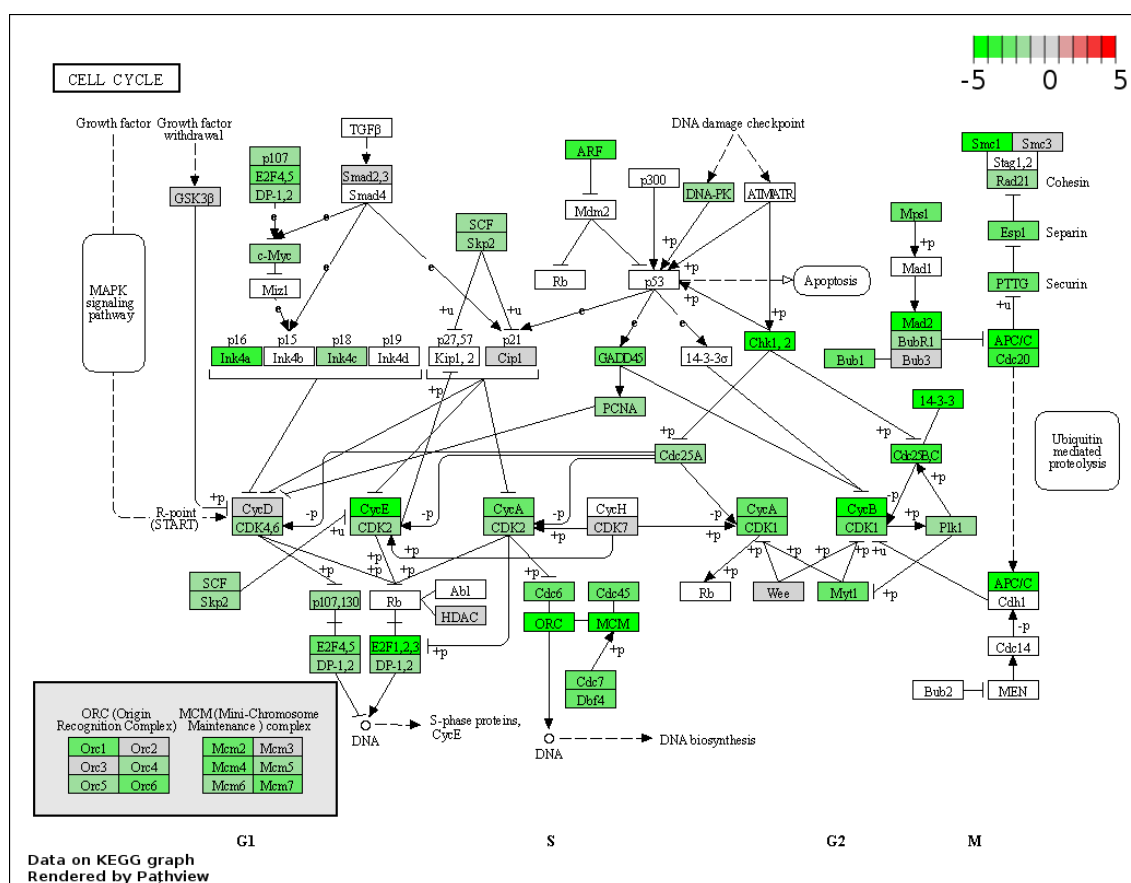


図 24. Pathway Analysis

Cell Cycle に関する Pathway 図を KEGG から得て、DEG 判定された遺伝子群を Mapping した。CLDN-18.2 高発現群で発現が上昇している遺伝子は赤に、発現が低下している遺伝子は緑色に表示している。

3-5. Gene Set Enrichment Analysis

上記により DEG と判定された遺伝子群について、GSEA を行なった。

GO term の BP (Biological Process)、MF (Molecular Function)で行なった解析では

enrich されていると思われる gene set は指摘できなかった。一方で、CC (Cell

Compartment)に関する解析では、Apical Plasma Membrane や Cell Projection

Membrane の gene set が enrich されていた。結果を図 25 に示す。

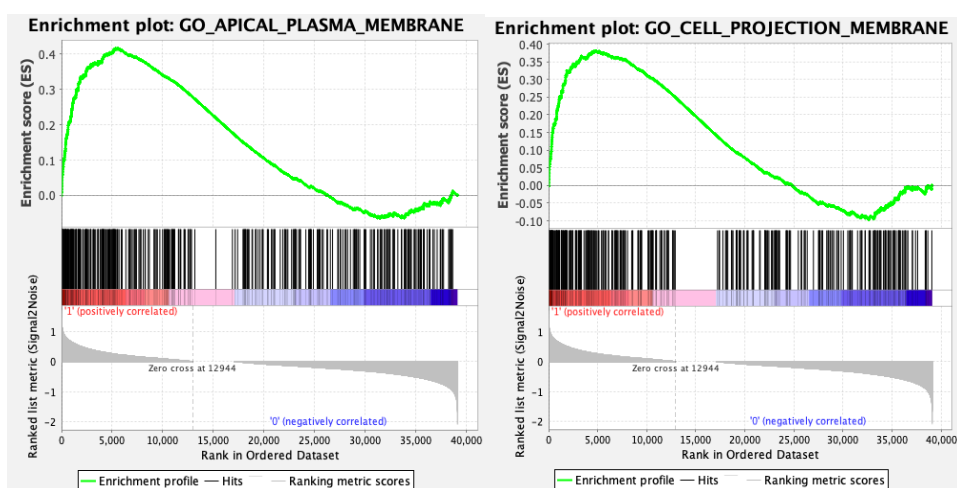


図 25. GSEA analysis

GSEA analysis では Apical Plasma Membrane (上段)や Projection Membrane (下段)の gene set が enrich されていた。

考察

ヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の臨床的、分子生物学的な意義を検討した。臨床検体の解析により、ヒト肺腺癌の 6%程度で CLDN-18.2 が異所性に発現していることを明らかにした。細胞株を用いた機能解析により、一部の細胞では CLDN-18.2 の発現によって足場非依存的な増殖や細胞の遊走において優位性を獲得する可能性が示唆された。しかし、肺癌の細胞株を用いた実験では足場非依存性の増殖能・遊走能のいずれにおいても CLDN-18.2 の発現による優位性は認めなかった。したがって、CLDN-18.2 の発現が肺癌の形質に与える影響についてはさらなる検討が必要である。大規模データベースの解析により、CLDN-18.2 が異所性に発現している肺腺癌では細胞膜に関する遺伝子群の発現が増加していることを明らかにした。

1. 肺腺癌における CLDN-18.2 の発現頻度と発現機序

TCGA のデータベースの解析により、正常な肺組織検体では CLDN-18.2 のプロモーター領域がメチル化されているが、肺癌検体では同領域が脱メチル化されていることが判明した。CLDN-18.2 の異所性発現の機序として、プロモーター領域のメチル化が寄与している可能性が示唆された。

Micke らは免疫組織染色法を用いた解析によって、肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の頻度を 3.7 %としている[57]。本研究で TCGA に登録されている肺腺癌症例の RNA シークエンスのデータを用いて解析したところ、7.8 %で CLDN-18.2 の発現を認めた。また、臨床検体を用いた qPCR 法を用いた検討でも 6 %と同程度の発現頻度であった。肺腺癌でよく知られている遺伝子変異である EML4 - ALK 融合遺伝子は腺癌の約 7%、ROS1 や BRAF、RET はおよそ 2 %の頻度と言われており、CLDN-18.2 の異所性発現が比較的高い頻度で起きていることが明らかとなった。このことは、CLDN-18.2 が腫瘍細胞の増殖・生存に有利な作用を及ぼしている可能性を示唆している。

2. CLDN-18.2 が肺癌患者の生命予後に与える影響

CLDN ファミリーの発現が腫瘍抑制的に機能するか、腫瘍促進的に機能するかは様々な要因に左右されるため、予測することが難しい。CLDN-18.2 の場合、前述の通り既知のドライバー変異と同程度の頻度で発現していることから、腫瘍の形成・進展に促進的に作用している可能性が考えられた。肺癌細胞で CLDN-18.2 が異所性に発現した場合の影響を検証するため、TCGA のデータベースを用いて CLDN-18.2 の発現と OS の関係を検討したが、CLDN-18.2 の発現の高低と OS との間に明らかな関係を認めなかった。当院の手術検体を用い

て CLDN-18.2 の発現と病期や OS との関係を検証したが、いずれも明らかな関連は認めなかった。以上の結果から、CLDN-18.2 の異所性発現は肺腺癌患者の生命予後に影響しないと考えられた。

3. CLDN-18.2 の機能解析

CLDN-18.2 を異所性に発現している細胞の形質を調べるため、*in vitro* の検討を行なった。比較的高い頻度で CLDN-18.2 の異所性発現が認められることから、CLDN-18.2 は何らかの増殖優位性を有していると仮定し、まず細胞の増殖能を比較検討した。培養 dish 内の二次元培養環境において、CLDN-18.2 の有無は細胞増殖能に影響を及ぼさなかった。足場非依存性の増殖能を検証した Soft Agar Colony Formation Assay では、NIH-3T3 細胞を用いた実験で CLDN-18.2 強制発現細胞が増殖優位性を獲得していた。以上の検証結果より、CLDN-18.2 はある種の細胞においては足場非依存的な細胞増殖を促進すると考えられた。ただし、肺癌細胞においては CLDN-18.2 の発現による優位性は認められず、CLDN-18.2 と肺癌の形質との直接の関係性は特定できなかった。仮説として、低悪性の細胞で CLDN-18.2 が異所性に発現すると足場非依存性の増殖能を獲得して周囲の正常細胞よりも生存優位性を獲得するが、

高悪性度の細胞においては CLDN-18.2 が及ぼす優位性は相対的に小さくなる可能性は考えられるが、今回の実験では結論には至らなかった。

Migration Assay でも同様な傾向が見られた。NIH-3T3 細胞を用いた実験では CLDN-18.2 強制発現細胞がコントロールと比較して遊走能の亢進を認めたが、ヒト肺癌細胞では差を認めなかった。*in silico* の解析では CLDN-18.2 高発現腫瘍では細胞突起に関わる遺伝子群が **enrich** されていることから、CLDN-18.2 の発現は細胞の運動や周囲環境との接着に関与する遺伝子群の発現増加を引き起こし、遊走能の増加をもたらす可能性が示唆された。ただし、細胞増殖と同様に CLDN-18.2 の発現による変化は悪性度の高い肺癌細胞ではその優位性は明らかではなくなるようである。

4. TCGA データベースの解析

大規模データベースを使った解析により、ヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現は患者の生命予後に影響を与えないことが明らかになった。発現変動遺伝子の解析で、CLDN-18.2 高発現腫瘍では細胞周期に関与する遺伝子群の発現が低下していることから、CLDN-18.2 の異所性発現が肺腺癌の増殖能に直接的に関与する可能性は低いと考えられた。一方で、細胞突起の形成・維持に関与する遺伝子群や頂端部膜タンパクを構成する遺伝子

群の発現が増加していることから、腫瘍と細胞外環境との相互作用や遊走・浸潤において何らかの優位性を獲得している可能性が示唆された。例えば CLDN-18.2 高発現検体ではインテグリン $\alpha 8$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 6$ の発現が高い傾向にあり、これら CLDN 以外の細胞接着因子の発現変化も形質の変化に影響を与えている可能性があり、今後の検討課題である。

5. 本研究の限界

本研究では、CLDN-18.2 の発現を主に mRNA を qPCR 法によって定量することで解析しており、すべての実験においてタンパクの発現を確認しているわけではない。また、CLDN-18.2 の発現による形質の変化については細胞株を用いて解析しており、動物実験を行っていない点も限界として挙げられる。

上記の限界はあるものの、本研究はヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現の臨床検体における解析から *in vitro*、*in silico* まで網羅的に解析した初めての報告である。胃癌においては CLDN-18.2 に対するモノクローナル抗体である IMAB362 の臨床試験が進行中であるが、肺癌においては CLDN-18.2 の治療標的としての価値については未解明な部分が多く、今後の研究が期待されるところである。

結語

ヒト肺腺癌では CLDN-18.2 が約 6%程度の頻度で異所性に発現している。
CLDN-18.2 の異所性発現は一部の細胞に対して足場非依存的な増殖能の亢進
や遊走能の増加をもたらす可能性がある。

引用文献

1. Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Wu Y-L, Paz-Ares L. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *The Lancet*. 389: 299-311; 2017.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA Cancer J Clin*. 70: 7-30; 2020.
3. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 136: E359-386; 2015.
4. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 68: 394-424; 2018.
5. Herbst RS, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature*. 553: 446-454; 2018.
6. Ma T, Ajiki W, Marugame T, Ioka A, Tsukuma H, Sobue T. . Population-based survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1999 in Japan: a chronological

and international comparative study. *Japanese Journal of Clinical Oncology*. 41: 40-51; 2020.

7. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 141: 1539-1550; 1998.

8. Hashimoto Y, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Claudin-targeted drug development using anti-claudin monoclonal antibodies to treat hepatitis and cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 1397: 5-16; 2017.

9. Li G, Flodby P, Luo J, Kage H, Sipos A, Gao D, Ji Y, Beard LL, Marconett CN, DeMaio L, Kim YH, Kim KJ, Laird-Offringa IA, Minoo P, Liebler JM, Zhou B, Crandall ED, Borok Z. Knockout mice reveal key roles for claudin 18 in alveolar barrier properties and fluid homeostasis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 51: 210-222; 2014.

10. Singh AB, Uppada SB, Dhawan P. Claudin proteins, outside-in signaling, and carcinogenesis. *Pflugers Arch*. 469: 69-75; 2017.

11. Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins: expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 1397: 66-79; 2017.

12. Gunzel D, Yu AS. Claudins and the modulation of tight junction permeability. *Physiol Rev.* 93: 525-569; 2013.
13. Tsukita S, Tanaka H, Tamura A. The Claudins: From Tight Junctions to Biological Systems. *Trends Biochem Sci.* 44: 141-152; 2019.
14. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szigyarto CAK, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 347: 1260419-1260419; 2015.
15. Hagen SJ. Non-canonical functions of claudin proteins: Beyond the regulation of cell-cell adhesions. *Tissue Barriers.* 5: e1327839; 2017.
16. Leiz J, Schmidt-Ott KM. Claudins in the Renal Collecting Duct. *Int J Mol Sci.* 21; 2019.
17. Seker M, Fernandez-Rodriguez C, Martinez-Cruz LA, Muller D. Mouse Models of Human Claudin-Associated Disorders: Benefits and Limitations. *Int J Mol Sci.* 20; 2019.

18. Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, Syder AJ, Panis M, Wolk B, Hatzioannou T, McKeating JA, Bieniasz PD, Rice CM. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*. 446: 801-805; 2007.
19. Fukasawa M, Nagase S, Shirasago Y, Iida M, Yamashita M, Endo K, Yagi K, Suzuki T, Wakita T, Hanada K, Kuniyasu H, Kondoh M. Monoclonal antibodies against extracellular domains of claudin-1 block hepatitis C virus infection in a mouse model. *J Virol*. 89: 4866-4879; 2015.
20. Ma X, Yu X, Zhou Q. The IL1beta-HER2-CLDN18/CLDN4 axis mediates lung barrier damage in ARDS. *Aging (Albany NY)*. 12: 3249-3265; 2020.
21. Osanai M, Takasawa A, Murata M, Sawada N. Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Arch*. 469: 55-67; 2017.
22. French AD, Fiori JL, Camilli TC, Leotlela PD, O'Connell MP, Frank BP, Subaran S, Indig FE, Taub DD, Weeraratna AT. PKC and PKA phosphorylation affect the subcellular localization of claudin-1 in melanoma cells. *Int J Med Sci*. 6: 93-101; 2009.
23. Zwanziger D, Badziong J, Ting S, Moeller LC, Schmid KW, Siebolts U, Wickenhauser C, Dralle H, Fuehrer D. The impact of CLAUDIN-1 on follicular thyroid carcinoma aggressiveness. *Endocr Relat Cancer*. 22: 819-830; 2015.

24. Kleinberg L, Holth A, Trope CG, Reich R, Davidson B. Claudin upregulation in ovarian carcinoma effusions is associated with poor survival. *Hum Pathol.* 39: 747-757; 2008.
25. Seo KW, Kwon YK, Kim BH, Kim CI, Chang HS, Choe MS, Park CH. Correlation between Claudins Expression and Prognostic Factors in Prostate Cancer. *Korean J Urol.* 51: 239-244; 2010.
26. Chao YC, Pan SH, Yang SC, Yu SL, Che TF, Lin CW, Tsai MS, Chang GC, Wu CH, Wu YY, Lee YC, Hong TM, Yang PC. Claudin-1 is a metastasis suppressor and correlates with clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med.* 179: 123-133; 2009.
27. Bhat AA, Syed N, Therachiyil L, Nisar S, Hashem S, Macha MA, Yadav SK, Krishnankutty R, Muralitharan S, Al-Naemi H, Bagga P, Reddy R, Dhawan P, Akobeng A, Uddin S, Frenneaux MP, El-Rifai W, Haris M. Claudin-1, A Double-Edged Sword in Cancer. *Int J Mol Sci.* 21; 2020.
28. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E, Myal Y. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* 454: 647-656; 2009.

29. Luo J, Chinge NO, Zhou B, Flodby P, Castaldi A, Firth AL, Liu Y, Wang H, Yang C, Marconett CN, Crandall ED, Offringa IA, Frenkel B, Borok Z. CLDN18.1 attenuates malignancy and related signaling pathways of lung adenocarcinoma in vivo and in vitro. *Int J Cancer*. 143: 3169-3180; 2018.
30. Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, Powell SM, Roche J, Crowe S, Moskaluk CA, El-Rifai We. Expression of Tight-Junction Protein Claudin-7 Is an Early Event in Gastric Tumorigenesis. *The American Journal of Pathology*. 167: 577-584; 2005.
31. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 22: 2021-2033; 2003.
32. Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 57: 919-928; 2005.
33. Wang K, Xu C, Li W, Ding L. Emerging clinical significance of claudin-7 in colorectal cancer: a review. *Cancer Manag Res*. 10: 3741-3752; 2018.
34. Zhang L, Feng T, Spicer LJ. The role of tight junction proteins in ovarian follicular development and ovarian cancer. *Reproduction*. 155: R183-R198; 2018.

35. Hahn-Stromberg V, Askari S, Ahmad A, Befekadu R, Nilsson TK. Expression of claudin 1, claudin 4, and claudin 7 in colorectal cancer and its relation with CLDN DNA methylation patterns. *Tumour Biol.* 39: 1010428317697569; 2017.
36. Ip YC, Cheung ST, Lee YT, Ho JC, Fan ST. Inhibition of hepatocellular carcinoma invasion by suppression of claudin-10 in HLE cells. *Mol Cancer Ther.* 6: 2858-2867; 2007.
37. Cherradi S, Martineau P, Gongora C, Del Rio M. Claudin gene expression profiles and clinical value in colorectal tumors classified according to their molecular subtype. *Cancer Manag Res.* 11: 1337-1348; 2019.
38. Espinoza JA, Riquelme I, Sagredo EA, Rosa L, Garcia P, Bizama C, Apud-Bell M, Leal P, Weber H, Benavente F, Vargas S, Romero D, Kalergis AM, Roa JC. Mucin 5B, carbonic anhydrase 9 and claudin 18 are potential theranostic markers of gallbladder carcinoma. *Histopathology.* 74: 597-607; 2019.
39. Matsusaka K, Ushiku T, Urabe M, Fukuyo M, Abe H, Ishikawa S, Seto Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kaneda A, Fukayama M. Coupling CDH17 and CLDN18 markers for comprehensive membrane-targeted detection of human gastric cancer. *Oncotarget.* 7: 64168-64181; 2016.

40. Moldvay J, Fabian K, Jackel M, Nemeth Z, Bogos K, Furak J, Tiszlavicz L, Fillinger J, Dome B, Schaff Z. Claudin-1 Protein Expression Is a Good Prognostic Factor in Non-Small Cell Lung Cancer, but only in Squamous Cell Carcinoma Cases. *Pathol Oncol Res.* 23: 151-156; 2017.
41. Paschoud S, Bongiovanni M, Pache JC, Citi S. Claudin-1 and claudin-5 expression patterns differentiate lung squamous cell carcinomas from adenocarcinomas. *Mod Pathol.* 20: 947-954; 2007.
42. Ikari A, Taga S, Watanabe R, Sato T, Shimobaba S, Sonoki H, Endo S, Matsunaga T, Sakai H, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J. Clathrin-dependent endocytosis of claudin-2 by DFYSP peptide causes lysosomal damage in lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta.* 1848: 2326-2336; 2015.
43. Jun KH, Kim JH, Jung JH, Choi HJ, Chin HM. Expression of claudin-7 and loss of claudin-18 correlate with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Surg.* 12: 156-162; 2014.
44. Takasawa K, Takasawa A, Osanai M, Aoyama T, Ono Y, Kono T, Hirohashi Y, Murata M, Sawada N. Claudin-18 coupled with EGFR/ERK signaling contributes to the malignant potentials of bile duct cancer. *Cancer Lett.* 403: 66-73; 2017.

45. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*. 2010: 541957; 2010.
46. Frank JA. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Ann N Y Acad Sci*. 1257: 175-183; 2012.
47. Koval M. Claudin heterogeneity and control of lung tight junctions. *Annu Rev Physiol*. 75: 551-567; 2013.
48. Tureci O, Koslowski M, Helftenbein G, Castle J, Rohde C, Dhaene K, Seitz G, Sahin U. Claudin-18 gene structure, regulation, and expression is evolutionary conserved in mammals. *Gene*. 481: 83-92; 2011.
49. Shimobaba S, Taga S, Akizuki R, Hichino A, Endo S, Matsunaga T, Watanabe R, Yamaguchi M, Yamazaki Y, Sugatani J, Ikari A. Claudin-18 inhibits cell proliferation and motility mediated by inhibition of phosphorylation of PDK1 and Akt in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1863: 1170-1178; 2016.
50. Akizuki R, Shimobaba S, Matsunaga T, Endo S, Ikari A. Claudin-5, -7, and -18 suppress proliferation mediated by inhibition of phosphorylation of Akt in human lung squamous cell carcinoma. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 1864: 293-302; 2017.

51. Akizuki R, Eguchi H, Endo S, Matsunaga T, Ikari A. ZO-2 Suppresses Cell Migration Mediated by a Reduction in Matrix Metalloproteinase 2 in Claudin-18-Expressing Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Biol Pharm Bull.* 42: 247-254; 2019.
52. Zhang WC, Zhang ZF, You J, Wang CL. Global gene expression differentiating pure bronchioloalveolar carcinoma from adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features. *Eur J Cardiothorac Surg.* 43: 765-771; 2013.
53. Wan YL, Dai HJ, Liu W, Ma HT. miR-767-3p Inhibits Growth and Migration of Lung Adenocarcinoma Cells by Regulating CLDN18. *Oncol Res.* 26: 637-644; 2018.
54. Suzuki K, Sentani K, Tanaka H, Yano T, Oshima M, Yasui W, Tamura A, Tsukita S. Deficiency of Stomach-Type Claudin-18 in Mice Induces Gastric Tumor Formation Independent of H pylori Infection. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 8: 119-142; 2019.
55. Zhou B, Flodby P, Luo J, Castillo DR, Liu Y, Yu FX, McConnell A, Varghese B, Li G, Chinge NO, Sunohara M, Koss MN, Elatre W, Conti P, Liebler JM, Yang C, Marconett CN, Laird-Offringa IA, Minoo P, Guan K, Stripp BR, Crandall ED, Borok Z. Claudin-18-mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis. *J Clin Invest.* 128: 970-984; 2018.
56. Hagen SJ, Ang LH, Zheng Y, Karahan SN, Wu J, Wang YE, Caron TJ, Gad AP, Muthupalani S, Fox JG. Loss of Tight Junction Protein Claudin 18 Promotes

Progressive Neoplasia Development in Mouse Stomach. *Gastroenterology*. 155: 1852-1867; 2018.

57. Micke P, Mattsson JS, Edlund K, Lohr M, Jirstrom K, Berglund A, Botling J, Rahnenfuehrer J, Marincevic M, Ponten F, Ekman S, Hengstler J, Woll S, Sahin U, Tureci O. Aberrantly activated claudin 6 and 18.2 as potential therapy targets in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 135: 2206-2214; 2014.

58. Sahin U, Koslowski M, Dhaene K, Usener D, Brandenburg G, Seitz G, Huber C, Tureci O. Claudin-18 splice variant 2 is a pan-cancer target suitable for therapeutic antibody development. *Clin Cancer Res*. 14: 7624-7634; 2008.

59. Tanaka M, Shibahara J, Fukushima N, Shinozaki A, Umeda M, Ishikawa S, Kokudo N, Fukayama M. Claudin-18 is an early-stage marker of pancreatic carcinogenesis. *J Histochem Cytochem*. 59: 942-952; 2011.

60. Rohde C, Yamaguchi R, Mukhina S, Sahin U, Itoh K, Tureci O. Comparison of Claudin 18.2 expression in primary tumors and lymph node metastases in Japanese patients with gastric adenocarcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 49: 870-876; 2019.

61. Tanaka H, Takechi M, Kiyonari H, Shioi G, Tamura A, Tsukita S. Intestinal deletion of Claudin-7 enhances paracellular organic solute flux and initiates colonic inflammation in mice. *Gut*. 64: 1529-1538; 2015.

62. Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, Cao J, Chen YH. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology*. 142: 305-315; 2012.
63. Lu Z, Kim DH, Fan J, Lu Q, Verbanac K, Ding L, Renegar R, Chen YH. A non-tight junction function of claudin-7-Interaction with integrin signaling in suppressing lung cancer cell proliferation and detachment. *Mol Cancer*. 14: 120; 2015.
64. Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S. claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol*. 21: 7380-7390; 2001.
65. Fujita H, Hamazaki Y, Noda Y, Oshima M, Minato N. Claudin-4 deficiency results in urothelial hyperplasia and lethal hydronephrosis. *PLoS One*. 7: e52272; 2012.
66. Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S, Tsukita S. Megaintestine in claudin-15-deficient mice. *Gastroenterology*. 134: 523-534; 2008.
67. Kage H, Flodby P, Zhou B, Borok Z. Dichotomous roles of claudins as tumor promoters or suppressors: lessons from knockout mice. *Cell Mol Life Sci*. 76: 4663-4672; 2019.

68. Zhang WH, Zhang SY, Hou QQ, Qin Y, Chen XZ, Zhou ZG, Shu Y, Xu H, Hu JK.

The Significance of the CLDN18-ARHGAP Fusion Gene in Gastric Cancer: A

Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol.* 10: 1214; 2020.

69. Tanaka A, Ishikawa S, Ushiku T, Yamazawa S, Katoh H, Hayashi A, Kunita A,

Fukayama M. Frequent CLDN18-ARHGAP fusion in highly metastatic diffuse-type

gastric cancer with relatively early onset. *Oncotarget.* 9: 29336-29350; 2018.

70. Hashimoto T, Ogawa R, Tang TY, Yoshida H, Taniguchi H, Katai H, Oda I, Sekine

S. RHOA mutations and CLDN18-ARHGAP fusions in intestinal-type

adenocarcinoma with anastomosing glands of the stomach. *Mod Pathol.* 32: 568-575;

2019.

71. Shu Y, Zhang W, Hou Q, Zhao L, Zhang S, Zhou J, Song X, Zhang Y, Jiang D,

Chen X, Wang P, Xia X, Liao F, Yin D, Chen X, Zhou X, Zhang D, Yin S, Yang K, Liu

J, Fu L, Zhang L, Wang Y, Zhang J, An Y, Cheng H, Zheng B, Sun H, Zhao Y, Wang Y,

Xie D, Ouyang L, Wang P, Zhang W, Qiu M, Fu X, Dai L, He G, Yang H, Cheng W,

Yang L, Liu B, Li W, Dong B, Zhou Z, Wei Y, Peng Y, Xu H, Hu J. Prognostic

significance of frequent CLDN18-ARHGAP26/6 fusion in gastric signet-ring cell

cancer. *Nat Commun.* 9: 2447; 2018.

72. Singh P, Toom S, Huang Y. Anti-claudin 18.2 antibody as new targeted therapy for advanced gastric cancer. *J Hematol Oncol.* 10: 105; 2017.
73. Sahin U, Schuler M, Richly H, Bauer S, Krilova A, Dechow T, Jerling M, Utsch M, Rohde C, Dhaene K, Huber C, Tureci O. A phase I dose-escalation study of IMAB362 (Zolbetuximab) in patients with advanced gastric and gastro-oesophageal junction cancer. *Eur J Cancer.* 100: 17-26; 2018.
74. Hashimoto Y, Tada M, Iida M, Nagase S, Hata T, Watari A, Okada Y, Doi T, Fukasawa M, Yagi K, Kondoh M. Generation and characterization of a human-mouse chimeric antibody against the extracellular domain of claudin-1 for cancer therapy using a mouse model. *Biochem Biophys Res Commun.* 477: 91-95; 2016.
75. Romani C, Cocco E, Bignotti E, Moratto D, Bugatti A, Todeschini P, Bandiera E, Tassi R, Zanotti L, Pecorelli S, Sartori E, Odicino FE, de Marco A, Santin AD, Ravaggi A, Mitola S. Evaluation of a novel human IgG1 anti-claudin3 antibody that specifically recognizes its aberrantly localized antigen in ovarian cancer cells and that is suitable for selective drug delivery. *Oncotarget.* 6: 34617-34628; 2015.
76. Hashimoto Y, Okada Y, Shirakura K, Tachibana K, Sawada M, Yagi K, Doi T, Kondoh M. Anti-Claudin Antibodies as a Concept for Development of Claudin-Directed Drugs. *J Pharmacol Exp Ther.* 368: 179-186; 2019.

77. Fujiwara-Tani R, Sasaki T, Luo Y, Goto K, Kawahara I, Nishiguchi Y, Kishi S, Mori S, Ohmori H, Kondoh M, Kuniyasu H. Anti-claudin-4 extracellular domain antibody enhances the antitumoral effects of chemotherapeutic and antibody drugs in colorectal cancer. *Oncotarget*. 9: 37367-37378; 2018.
78. Tureci O, Sahin U, Schulze-Bergkamen H, Zvirbule Z, Lordick F, Koeberle D, Thuss-Patience P, Ettrich T, Arnold D, Bassermann F, Al-Batran SE, Wiechen K, Dhaene K, Maurus D, Gold M, Huber C, Krivoschik A, Arozullah A, Park JW, Schuler M. A multicentre, phase IIa study of zolbetuximab as a single agent in patients with recurrent or refractory advanced adenocarcinoma of the stomach or lower oesophagus: the MONO study. *Ann Oncol*. 30: 1487-1495; 2019.
79. Hashimoto Y, Yagi K, Kondoh M. Current progress in a second-generation claudin binder, anti-claudin antibody, for clinical applications. *Drug Discov Today*. 21: 1711-1718; 2016.
80. Suzuki M, Kato-Nakano M, Kawamoto S, Furuya A, Abe Y, Misaka H, Kimoto N, Nakamura K, Ohta S, Ando H. Therapeutic antitumor efficacy of monoclonal antibody against Claudin-4 for pancreatic and ovarian cancers. *Cancer Sci*. 100: 1623-1630; 2009.

81. Kato-Nakano M, Suzuki M, Kawamoto S, Furuya A, Ohta S, Nakamura K, Ando H. Characterization and evaluation of the antitumour activity of a dual-targeting monoclonal antibody against claudin-3 and claudin-4. *Anticancer Res.* 30: 4555-4562; 2010.
82. Li X, Iida M, Tada M, Watari A, Kawahigashi Y, Kimura Y, Yamashita T, Ishii-Watabe A, Uno T, Fukasawa M, Kuniyasu H, Yagi K, Kondoh M. Development of an anti-claudin-3 and -4 bispecific monoclonal antibody for cancer diagnosis and therapy. *J Pharmacol Exp Ther.* 351: 206-213; 2014.
83. Ben-David U, Nudel N, Benvenisty N. Immunologic and chemical targeting of the tight-junction protein Claudin-6 eliminates tumorigenic human pluripotent stem cells. *Nat Commun.* 4: 1992; 2013.
84. Sun W, Duan T, Ye P, Chen K, Zhang G, Lai M, Zhang H. TSVdb: a web-tool for TCGA splicing variants analysis. *BMC Genomics.* 19: 405; 2018.
85. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9: 671-675; 2012.
86. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K. TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics.* 14: 219; 2013.

87. Kadota K, Nishiyama T, Shimizu K. A normalization strategy for comparing tag count data. *Algorithms for Molecular Biology*. 7; 2012.
88. Robinson MD, Oshlack A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*. 11: R25; 2010.
89. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102: 15545-15550; 2005.

謝辞

本研究の実施にあたり御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院医学系研究科器官病態内科学講座呼吸器内科学 長瀬隆英教授に深く感謝いたします。また、研究の立案から論文執筆に至る研究全般で直接の御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科器官病態内科学呼吸器内科学 鹿毛秀宣講師に深く感謝いたします。最後に、数々の御助言を賜りました東京大学医学部附属病院呼吸器内科 305 研究室の諸氏に深く御礼申し上げます。