

## 論文の内容の要旨

論文題目 ヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現に関する検討

氏名 属増 晃一

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。毎年約 200 万人が新規に発症し、約 160 万人が死亡している。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。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、日本国内の調査では肺癌の 5 年相対生存率は 34.9 % に留まっており、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。

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、これまでに 27 種類が報告されている。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。

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。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。一方で、前立腺癌や肺腺癌では腫瘍抑制的に働くことが報告されている。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、陰性の腫瘍では tumor promotive に機能していることが知られており、さまざまな要因により同じタンパクでも全く逆の機能を果たすことがある。

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。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。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。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。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ることから、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。一方で、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。肺腺癌の 3.7 % で CLDN-18.2 が陽性であったとの報告もあるが、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。

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 の機能解析を行った。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。

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、東京大学医学部附属病院の手術検体を用いた quantitative PCR (qPCR)法による検討でも 6%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 融合遺伝子は肺腺癌の約 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。

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 Overall Survival (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。東京大学医学部附属病院の手術検体を用いて CLDN-18.2 の発現量と病期や 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。

次に、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* で機能解析を行なった。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 は細胞周期を直接的に促進して細胞増殖を亢進させる作用には乏しいと思われるが、一部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、悪性度の高い肺癌細胞においては CLDN-18.2 の発現は細胞の増殖・生存において優位にはならないようである。Migration Assay でも同様な傾向が見られ、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。

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一方で、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。また、CLDN-18.2 高発現腫瘍では細胞突起に関わる遺伝子群や頂端部膜タンパ

クを構成する遺伝子群が **enrich** されていることから、CLDN-18.2 の発現は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。

本研究はヒト肺腺癌における CLDN-18.2 の異所性発現について、臨床検体を用いた解析から *in vitro* の機能解析、大規模データベースを用いた *in silico* の解析まで、網羅的に解析した初めての報告である。