

---

# 総説

---

## 非タイトジャンクション・クローディン-4の機能

奈良県立医科大学分子病理学講座

谷 里 奈, 國 安 弘 基

### Function of non-tight junction claudin-4

RINA FUJIWARA-TANI and HIROKI KUNUYASU

*Department of Molecular Pathology Nara Medical University School of Medicine*

Received April 17, 2023

#### *Abstract*

Claudin-4 (CLDN4) is a key component of tight junctions (TJs) in epithelial cells. CLDN4 is over-expressed in many epithelial malignancies and correlates with cancer progression. Changes in CLDN4 expression have been associated with epigenetic factors (such as hypomethylation of promoter DNA), inflammation associated with infection and cytokines, and growth factor signaling. CLDN4 helps to maintain the tumor microenvironment by forming TJs and acting as a barrier to the entry of anticancer drugs into tumors. Decreased expression of CLDN4 is a potential marker of epithelial-mesenchymal transition (EMT), and decreased epithelial differentiation due to reduced CLDN4 activity is involved in EMT induction. Non-TJ CLDN4 also activates integrin beta 1 and YAP to promote proliferation, EMT, and stemness. These roles in cancer have led to investigations of molecular therapies targeting CLDN4 using anti-CLDN4 extracellular domain anti-bodies, gene knockdown, Clostridium perfringens enterotoxin (CPE), and the C-terminus domain of CPE (C-CPE), which have demonstrated the experimental efficacy of this approach. CLDN4 is strongly involved in promoting malignant phenotypes in many epithelial cancers and is regarded as a promising molecular therapeutic target.

---

**Key words :** claudin-4, tight junction, EMT, YAP

#### はじめに

タイトジャンクション (TJ) は、分極した上皮細胞および内皮細胞の lateral membrane の先端に存在するタンパク質複合体である<sup>1)</sup>。これらの構造の主な機能は、細胞間の接着と極性を調節することである。したがって、癌の浸潤および転移の初期段階には、TJ の障害および付随する細胞間接着の喪失が必要で

あると考えられる。しかし、クローディン (CLDN) などの TJ タンパク質が接着だけでなく、腫瘍の進行と転移に寄与する細胞内シグナル経路の活性化にも重要な役割を果たすことが近年明らかになりつつある。CLDN は、TJ の細胞間接着成分であり、TJ の細胞外接着成分の 27 の高度に相同的なメンバーを有するタンパク質ファミリーを形成している<sup>2,3)</sup>。CLDN4 は、腸や肺などの上皮細胞の TJ に関する主要な CLDN

であり、多くの上皮悪性腫瘍と関連している<sup>4,5)</sup>。このレビューでは、CLDN4の種々の機能のなかでも、TJによらない機能(非TJ)CLDN4の機能に関する最新の知見を示す。

### CLDN4 とがん幹細胞性

上皮間葉転換(EMT)では、上皮細胞は上皮分化を失い、上皮からの脱分化と幹細胞性の増強を伴う間葉への移行を示す<sup>6)</sup>。がんの幹細胞性は、腫瘍原性、自己複製、分化、および腫瘍の不均一性、転移、治療抵抗性の原因となることが明らかになってきた<sup>7)</sup>。腫瘍の上皮マーカーであるCLDN4の発現低下は、EMTを反映し、転移とも関連している<sup>8,9)</sup>。EMTは、CLDN4プロモーターの過剰メチル化と関連し、CLDN4の発現抑制を引き起こすが<sup>10)</sup>、転写因子Bach1はCLDN4とE-cadherinの発現を直接抑制してEMTを誘導する<sup>11)</sup>。したがって、CLDN4の発現は上皮形質のマーカーであり、その減少はEMTを示唆していると考えられる。しかし、Ma *et al.*は、CLDN4発現の抑制が乳癌細胞株の浸潤と転移を抑制することを報告している<sup>12)</sup>。最近の研究は、CLDN4が上皮分化の維持に積極的な役割を果たすことを示しており、CLDN4ノックダウンは、細胞増殖と浸潤能の増強、アポトーシスの抑制をもたらす、転移能を促進する<sup>13,14)</sup>。このとき、間葉系マーカーであるvimentin発現誘導は認められないものの、上皮性のE-cadherinの減少と間葉系のN-cadherinの発現の増加が見られEMTを示している。この現象をもたらすシグナル伝達として、CLDN4発現の減少がGSK-3 $\beta$ リン酸化、 $\beta$ -catenin核移行によるWntシグナルの活性化、PI3K/AKTシグナル活性化、およびTwist発現の誘導をもたらすことが報告されている<sup>13,14)</sup>。この結果、CLDN4発現減少により細胞増殖と抗がん剤耐性が強化される<sup>15)</sup>。

### 非TJ CLDN4

CLDN4は主にTJの構造タンパク質として機能するが、最近の研究により、このタンパク質は多様な非TJ機能も示すことが明らかになってきた<sup>16)</sup>。これらには、TJに含まれない細胞膜上に存在するCLDN4(非

TJ細胞膜CLDN4)の機能と、細胞質内のCLDN4の機能が含まれる。

### 非TJ細胞膜CLDN4

CLDN4は、プロモーターDNAの低メチル化により、膀胱癌で過剰発現している<sup>17)</sup>。アザ-2'-デオキシシチジン(AZA)処理によるさらなる脱メチル化は、TJ機能に必要なレベルを超えるレベルまでCLDN4の発現を誘導する。これに伴い、TJ内に取り込まれないCLDN4モノマーの形成を生じる<sup>17)</sup>。このプロセスは、非TJCLDN4を生成するメカニズムの1つと考えられる。胃癌では、細胞膜CLDN4は高分化癌で過剰発現しているのに対し、低分化癌ではE-cadherinおよびTJを形成する細胞膜CLDN4は減少しており、逆に非TJCLDN4が増加しEMTの表現型を反映している<sup>18)</sup>。

### 細胞質CLDN4

CLDN4は、TJから離脱し、非細胞膜CLDN4(細胞質CLDN4)を形成することがある(Fig. 1)。Clostridium perfringensのenterotoxin(CPE)のC末端ドメインがCLDN4の2番目の細胞外ループに結合し、homogenicなクローニン結合を破壊しTJ障害することで、下痢を引き起こすことが知られている。その結果、CLDN4はTJから放出され、細胞質に移動する<sup>19,20)</sup>。さらに、細胞膜上のEphA2がそのリガンドであるephrin A1に結合し活性化されると、隣接するTJにあるCLDN4のC末端チロシン残基がEphA2によってリン酸化される。この結果、TJからのCLDN4が離脱し、細胞質への移行が起こる<sup>21)</sup>。さらに、細胞質のCLDN4は、プロテインキナーゼC(PKC)- $\epsilon$ によるC末端のセリン残基のリン酸化により核に輸送される<sup>21)</sup>。

### 非TJ CLDN4の機能

#### インテグリン $\beta$ 1活性化

インテグリン $\beta$ 1は接着斑キナーゼ(FAK)を活性化し、Notchシグナル伝達を介してOct4, Sox2, Nanogなどの幹細胞関連遺伝子の発現を誘導

する<sup>22, 23)</sup>。非 TJ CLDN4 はインテグリン  $\beta 1$  に結合し、癌細胞の幹細胞性、抗アポトーシス効果、薬剤耐性、および転移能を促進する (Fig. 1A.)<sup>17, 18)</sup>。低分化胃癌では、TJ 形成が減少するが、EMT は非 TJ CLDN4 によって促進される<sup>18)</sup>。CLDN4 と同様に、CLDN7 もインテグリン  $\beta 1$  に結合し、下流の FAK リン酸化を引き起こす<sup>24, 25)</sup>。CLDN4 は、インテグリン  $\beta 1$  に対して CLDN7 の約 40% の親和性を示す<sup>18)</sup>。

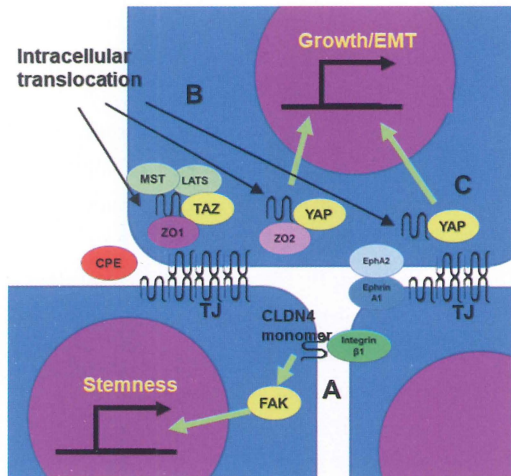


Fig. 1. Function of non-TJ CLDN4. (A) CLDN4 monomer that does not form TJs is a binding partner for integrin  $\beta 1$  expressed in neighboring tumor cells, activates FAK, and promotes expression of stemness-associated genes. (B) CLDN4 translocates into the cytoplasm from TJs disrupted by CPE and forms a stable complex with TAZ, MST, LATS, and ZO1, but YAP is released from the complex and translocates into the nucleus with ZO2 to induce expression of YAP target genes, leading to proliferation and EMT. (C) EphA2 activated by Ephrin A1 expressed on the surface of neighboring cells phosphorylates CLDN4 and releases it from TJs. The released CLDN4 is translocated into the nucleus with YAP. CLDN4, claudin-4; TJ, tight junction; CPE, Clostridium perfringens enterotoxin; TAZ, tafazzin; YAP, yes-associated protein; ZO, zonula occludens; MST, mammalian Ste20-like kinase; LATS, large tumor suppressor kinase; Eph A2, ephrin type-A receptor 2; FAK, focal adhesion kinase; EMT, epithelial-mesenchymal transition.

### YAP 活性化

細胞質 CLDN4 も YAP 活性化に関与しています<sup>20, 21, 26)</sup>。腸内細菌叢の *C. perfringens* の CPE によって細胞質に移動した CLDN4 は、TAZ, HIPPO 抑制系の LATS, MST, および ZO-1 を含む安定した複合体を形成する。YAP コアクチベーター TAZ のこの HIPPO 系による隔離により、YAP は自由に ZO-2 に

結合し核に移行する。その結果、cyclin E や snail などの標的遺伝子の発現を促進し、増殖亢進や EMT を誘導する (Fig. 1B.)<sup>26)</sup>。その結果、大腸の前癌病変である SSA/P-D の発癌を促進し、大腸癌の BRAF 変異と関連している<sup>26)</sup>。対照的に、口腔扁平上皮癌では、口腔細菌叢の *C. perfringens* の CPE によって細胞質に離脱した CLDN4 が YAP および ZO-2 に結合し、核に移行して増殖促進と EMT を誘導する<sup>20)</sup>。核 CLDN4 は、口腔扁平上皮癌の 39% および口腔 *C. perfringens* 陽性症例の 81% に認められる<sup>20)</sup>。腎細胞癌では、多くの上皮性悪性腫瘍とは異なり CLDN4 発現レベルは低いが、核内 CLDN4 は腫瘍の 2% で観察され、そのすべてが進行したステージにある<sup>21)</sup>。腎細胞癌では、EphA2/Ephrin A1 および PKC  $\epsilon$  が YAP を結合した CLDN4 を核に移行させる。その結果、YAP が活性化され、がん細胞の悪性度が促進される (Fig. 1C.)<sup>21)</sup>。CLDN による YAP の活性化は、CLDN6 および CLDN18 でも報告されており、LATS による YAP リン酸化の阻害<sup>27)</sup>、CLDN6-ZO2-YAP 相互作用<sup>28)</sup>、および CLDN18 と YAP の結合<sup>29)</sup> を含むいくつかの要因が YAP の核移行と活性化に関与し、胃癌では予後不良因子となっている<sup>30)</sup>。

### おわりに

非 TJ CLDN4 の機能は最近明らかになってきたもので、これまで知られてきた TJ タンパクとしての CLDN4 の機能とは異なり、癌悪性度に強く関連することが認められる。非 TJ CLDN4 は、今後、新規ながん悪性度マーカー、あるいは、がん分子治療の標的として重視される。今後のさらなる発展が望まれる分野と考えられる。

### 利益相反

論文内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などはない。

### 文 献

- 1) Otani, T. and Furuse, M.: Tight Junction Structure and Function Revisited. Trends in cell biol-

- ogy **30**: 805-817, 2020.
- 2) Hashimoto, Y., Fukasawa, M., Kuniyasu, H., Yagi, K. and 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.
  - 3) Osanai, M., Takasawa, A., Murata, M. and Sawada, N.: Claudins in cancer: bench to bedside. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **469**: 55-67, 2017.
  - 4) Morin, P. J.: Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res* **65**: 9603-9606, 2005.
  - 5) Neesse, A., Griesmann, H., Gress, T. M. and Michl, P.: Claudin-4 as therapeutic target in cancer. *Arch Biochem Biophys* **524**: 64-70, 2012.
  - 6) Najafi, M., Mortezaee, K. and Majidpoor, J.: Cancer stem cell (CSC) resistance drivers. *Life Sci* **234**: 116781, 2019.
  - 7) Ayob, A. Z. and Ramasamy, T. S.: Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci* **25**: 20, 2018.
  - 8) Kwon, M. J.: Emerging roles of claudins in human cancer. *Int J Mol Sci* **14**: 18148-18180, 2013.
  - 9) Kyuno, D., Yamaguchi, H., Ito, T., Kono, T., Kimura, Y., Imamura, M., Konno, T., Hirata, K., Sawada, N. and Kojima, T.: Targeting tight junctions during epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* **20**: 10813-10824, 2014.
  - 10) Papageorgis, P., Lambert, A. W., Ozturk, S., Gao, F., Pan, H., Manne, U., Alekseyev, Y. O., Thiagalingam, A., Abdolmaleky, H. M., Lenburg, M. and Thiagalingam, S.: Smad signaling is required to maintain epigenetic silencing during breast cancer progression. *Cancer Res* **70**: 968-978, 2010.
  - 11) Sato, M., Matsumoto, M., Saiki, Y., Alam, M., Nishizawa, H., Rokugo, M., Brydun, A., Yamada, S., Kaneko, M. K., Funayama, R., Ito, M., Kato, Y., Nakayama, K., Unno, M. and Igarashi, K.: BACH1 Promotes Pancreatic Cancer Metastasis by Repressing Epithelial Genes and Enhancing Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cancer Res* **80**: 1279-1292, 2020.
  - 12) Ma, X., Miao, H., Jing, B., Pan, Q., Zhang, H., Chen, Y., Zhang, D., Liang, Z., Wen, Z. and Li, M.: Claudin-4 controls the proliferation, apoptosis, migration and in vivo growth of MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep* **34**: 681-690, 2015.
  - 13) Lin, X., Shang, X., Manorek, G. and Howell, S. B.: Regulation of the Epithelial-Mesenchymal Transition by Claudin-3 and Claudin-4. *PLoS One* **8**: e67496, 2013.
  - 14) Shang, X., Lin, X., Alvarez, E., Manorek, G. and Howell, S. B.: Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 control tumor growth and metastases. *Neoplasia* **14**: 974-985, 2012.
  - 15) Luo, J., Wang, H., Chen, H., Gan, G. and Zheng, Y.: CLDN4 silencing promotes proliferation and reduces chemotherapy sensitivity of gastric cancer cells through activation of the PI3K/Akt signalling pathway. *Experimental physiology* **105**: 979-988, 2020.
  - 16) Fredriksson, K., Van Itallie, C. M., Aponte, A., Gucek, M., Tietgens, A. J. and Anderson, J. M.: Proteomic analysis of proteins surrounding occludin and claudin-4 reveals their proximity to signaling and trafficking networks. *PLoS One* **10**: e0117074, 2015.
  - 17) Maesaka, F., Kuwada, M., Horii, S., Kishi, S., Fujiwara-Tani, R., Mori, S., Fujii, K., Mori, T., Ohmori, H., Owari, T., Miyake, M., Nakai, Y., Tanaka, N., Bhawal, U. K., Luo, Y., Kondoh, M., Fujimoto, K. and Kuniyasu, H.: Hypomethylation of CLDN4 Gene Promoter Is Associated with Malignant Phenotype in Urinary Bladder Cancer. *Int J Mol Sci* **23**: 6516, 2022.
  - 18) Nishiguchi, Y., Fujiwara-Tani, R., Sasaki, T., Luo, Y., Ohmori, H., Kishi, S., Mori, S., Goto, K., Yasui, W., Sho, M. and Kuniyasu, H.: Targeting claudin-4 enhances CDDP-chemosensitivity in gastric cancer. *Oncotarget* **10**: 2189-2202, 2019.
  - 19) Fujiwara-Tani, R., Sasaki, T., Luo, Y., Goto, K.,

- Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Kishi, S., Mori, S., Ohmori, H., Kondoh, M. and 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.
- 20) Nakashima, C., Yamamoto, K., Kishi, S., Sasaki, T., Ohmori, H., Fujiwara-Tani, R., Mori, S., Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Mori, T., Kondoh, M., Luo, Y., Kirita, T. and Kuniyasu, H.: Clostridium perfringens enterotoxin induces claudin-4 to activate YAP in oral squamous cell carcinomas. *Oncotarget* **11**: 309-321, 2020.
- 21) Owari, T., Sasaki, T., Fujii, K., Fujiwara-Tani, R., Kishi, S., Mori, S., Mori, T., Goto, K., Kawahara, I., Nakai, Y., Miyake, M., Luo, Y., Tanaka, N., Kondoh, M., Fujimoto, K. and Kuniyasu, H.: Role of Nuclear Claudin-4 in Renal Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* **21**: 8340, 2020.
- 22) Gardelli, C., Russo, L., Cipolla, L., Moro, M., Andriani, F., Rondinone, O., Nicotra, F., Sozzi, G., Bertolini, G. and Roz, L.: Differential glycosylation of collagen modulates lung cancer stem cell subsets through  $\beta 1$  integrin-mediated interactions. *Cancer Sci* **112**: 217-230, 2021.
- 23) Moon, J. H., Rho, Y. S., Lee, S. H., Koo, B. S., Lee, H. J., Do, S. I., Cho, J. H., Eun, Y. G., Park, M. W., Shin, H. A. and Lim, Y. C.: Role of integrin  $\beta 1$  as a biomarker of stemness in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **96**: 34-41, 2019.
- 24) Lu, Z., Kim, D. H., Fan, J., Lu, Q., Verbanac, K., Ding, L., Renegar, R. and Chen, Y. H.: 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.
- 25) Kim, D. H., Lu, Q. and Chen, Y. H.: Claudin-7 modulates cell-matrix adhesion that controls cell migration, invasion and attachment of human HCC827 lung cancer cells. *Oncol Lett* **17**: 2890-2896, 2019.
- 26) Fujiwara-Tani, R., Fujii, K., Mori, S., Kishi, S., Sasaki, T., Ohmori, H., Nakashima, C., Kawahara, I., Nishiguchi, Y., Mori, T., Sho, M., Kondoh, M., Luo, Y. and Kuniyasu, H.: Role of Clostridium perfringens Enterotoxin on YAP Activation in Colonic Sessile Serrated Adenoma/ Polyps with Dysplasia. *Int J Mol Sci* **21**: 3840, 2020.
- 27) Yu, S., Zhang, Y., Li, Q., Zhang, Z., Zhao, G. and Xu, J.: CLDN6 promotes tumor progression through the YAP1-snail1 axis in gastric cancer. *Cell Death Dis* **10**: 949, 2019.
- 28) Kong, F. E., Li, G. M., Tang, Y. Q., Xi, S. Y., Loong, J. H. C., Li, M. M., Li, H. L., Cheng, W., Zhu, W. J., Mo, J. Q., Gong, Y. F., Tang, H., Zhao, Y., Zhang, Y., Ma, S., Guan, X. Y., Ma, N. F., Xie, M. B. and Liu, M.: Targeting tumor lineage plasticity in hepatocellular carcinoma using an anti-CLDN6 antibody-drug conjugate. *Sci Transl Med* **13**: eabb6282, 2021.
- 29) Zhou, B., Flodby, P., Luo, J., Castillo, D. R., Liu, Y., Yu, F. X., McConnell, A., Varghese, B., Li, G., Ching, N. O., Sunohara, M., Koss, M. N., Elatre, W., Conti, P., Liebler, J. M., Yang, C., Marconett, C. N., Laird-Offringa, I. A., Mino, P., Guan, K., Stripp, B. R., Crandall, E. D. and Borok, Z.: Claudin-18-mediated YAP activity regulates lung stem and progenitor cell homeostasis and tumorigenesis. *J Clin Invest* **128**: 970-984, 2018.
- 30) Kohmoto, T., Masuda, K., Shoda, K., Takahashi, R., Ujiro, S., Tange, S., Ichikawa, D., Otsuji, E. and Imoto, I.: Claudin-6 is a single prognostic marker and functions as a tumor-promoting gene in a subgroup of intestinal type gastric cancer. *Gastric Cancer* **23**: 403-417, 2020.