

福島県立医科大学 学術機関リポジトリ



Title	核内受容体の新規調節機構の発見と病理学への展開
Author(s)	杉本, 幸太郎; 千葉, 英樹
Citation	福島医学雑誌. 73(3): 65-71
Issue Date	2023
URL	http://ir.fmu.ac.jp/dspace/handle/123456789/2242
Rights	© 2023 福島医学会
DOI	10.5387/fmedj.73.3_65
Text Version	publisher

This document is downloaded at: 2024-06-30T16:19:46Z

〔総説〕

核内受容体の新規調節機構の発見と病理学への展開

杉本幸太郎, 千葉 英樹

福島県立医科大学 医学部 基礎病理学講座
(受付 2023 年 4 月 27 日 受理 2023 年 9 月 28 日)

A novel signaling pathway linking cell-cell adhesion to nuclear receptors

Kotaro Sugimoto and Hideki Chiba

Department of Basic Pathology, Fukushima Medical University School of Medicine

要旨: 核内受容体は様々な脂質を天然リガンドとする転写因子で、ヒトではレチノイン酸受容体、ビタミン D 受容体、性ホルモン受容体、副腎皮質ホルモン受容体、および甲状腺ホルモン受容体など 48 種類が同定されている。核内受容体の転写活性は、基本的には特異リガンドとの結合によって調節されているが、実際にはリン酸化などの翻訳後修飾も影響する。我々は最近、細胞間接着から核内受容体のセリンリン酸化に至る新規のシグナル伝達経路を発見し、これが幹細胞分化および子宮体癌と乳癌の悪性形質増強に寄与することを明らかにした。本総説ではその一連の研究を紹介する。

索引用語: 核内受容体, 細胞間接着, 子宮体癌, 乳癌, 上皮分化

Abstract: Nuclear receptors are transcription factors that recognize various lipids as natural ligands. In humans, 48 types of such proteins, including retinoic acid receptors (RARs), vitamin D receptors (VDR), estrogen receptors (ERs), and thyroid hormone receptors (TRs), have been identified. Although the transcriptional activity of nuclear receptors is primarily regulated by binding to specific ligands, post-translational modifications such as phosphorylation also influence it. Recently, we discovered a novel signaling pathway leading from cell-cell adhesion to serine phosphorylation of several nuclear receptors, contributing to both stem cell differentiation and the malignancy of endometrial cancer and breast cancer. This review will introduce the series of studies that led to these discoveries.

Key words: Nuclear receptors, cell-cell adhesion, endometrial cancer, breast cancer, epithelial differentiation

1. はじめに

個体の発生や恒常性維持には、個々の細胞が外的環境を感知し、状況ごとに適切な対応をとることが必要である。その際には、既に細胞内に存在するタンパク質や細胞内小器官の場所や活性状態を変えるだけで十分なこともあるが、多くの場合は遺伝子の転写と翻訳によって新たにタンパク質を作り出す必要がある。こうした一連の反応は、具体的には、主に細胞膜に存在する受容体などの様々な分子に端を

発するシグナル伝達が、最終的に核内に存在する転写因子の状態を変化させることによって達成される。シグナル起点となる外的要因には熱や放射線などの物理学的因子、塩濃度など化学的因子、および病原体への暴露などがある。内的因子には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などがある。

核内受容体は DNA 結合ドメインを有する転写因子で、ヒトでは 48 種類が知られている (1)。レチノイン酸 (RA)、ビタミン D、性ホルモン、副腎皮

質ホルモン、および甲状腺ホルモンなどの様々な脂質を天然リガンドとし、それらと結合することによって下流標的因子の発現を調節している。個体発生、性成熟、恒常性維持、炎症や感染防御、および組織の再生と修復など、様々な生命現象が核内受容体によって制御されている (2)。さらに核内受容体は腫瘍の発生や進展にも深く関与しており、例えばエストロゲン受容体 (ER) やプロゲステロン受容体 (PR) は乳癌や婦人科癌の、アンドロゲン受容体 (AR) は前立腺癌の進行を促進し、一方でレチノイン酸受容体 (RAR) やビタミン D 受容体 (VDR) は多くのがんに対して抑制的に作用する。実際に性ホルモン受容体に対する様々なアンタゴニストが抗腫瘍薬として応用されている (3, 4)。

古典的理解によれば、核内受容体は天然特異リガンドとの結合によってその三次元構造が変化し、細胞内分布や共因子との結合状態を変えることで標的遺伝子の転写を正負に制御している (1) (図 1 左)。しかしながら実際にはそれに加えてリン酸化などの翻訳後修飾も核内受容体の活性状態に大きく影響する (5, 6) (図 1 右)。核内受容体の翻訳後修飾に関する研究は、核内受容体がクローニングされた直後の 1990 年代後半までは盛んに行われていた (7-9) もの、化合物ライブラリを用いた新規リガンドの探索などと比べると、メカニズムの解明や創薬への応用などは相対的に立ち遅れている。我々は細胞間接着から核内受容体のセリンリン酸化に至る新規の

シグナル伝達経路を発見し、これが幹細胞分化や、子宮体癌や乳癌の悪性形質増強に寄与することを明らかにした (図 2) (10-13)。この総説ではその一連の研究を紹介する。

2. 細胞間接着による幹細胞の上皮分化誘導

我々のグループはマウス F9 幹細胞を用いて幹細胞の上皮分化について研究してきた。マウス F9 幹細胞はマウスの 7 日胚を雄マウスの精巣に移植して得られた胎児性癌細胞株 (14) で、RA などを処理することによって始原内胚葉上皮などいくつかの限定的な上皮系細胞に分化誘導することができる (15, 16)。胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ESC) と異なり、F9 細胞はフィーダー細胞や特殊な液性因子を必要とせず、通常の培養条件で安定して維持できることから、上皮細胞の分化や維持機構の研究でよく用いられおり、実際に E-カドヘリンなど多数の細胞間接着分子が F9 細胞からクローニングされてきた (17)。まず上皮分化過程を厳密に評価するためには、時間的に制御された状態で目的遺伝子を発現させる必要があることから、タモキシフェン添加で Cre-loxP 遺伝子組換えを誘導するための Cre-ER^T と、ドキシサイクリン添加で遺伝子発現を誘導するための rtTA を恒常発現させたコンディショナルシステムを構築した (18)。この系を用いて、核内受容体の 1 つである HNF4 α (hepatocyte nuclear factor -4 α) が F9 幹細胞を上皮分化させることを見

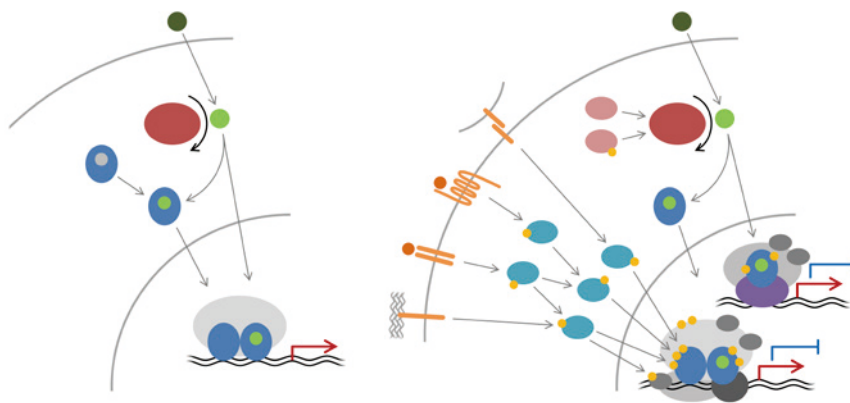


図 1. 核内受容体の転写調節機構。左は古典的な理解による核内受容体活性化機構を示す。脂質リガンド (深緑) が細胞内に取り込まれ、代謝酵素 (赤) によって活性化型 (黄緑) に変換される。活性化したりガンドは核内受容体 (青) と結合して標的遺伝子の発現を亢進または抑制する。核内受容体にはリガンドと結合することで核内に移行するもの (AR など) と、常に核内で標的配列に結合しリガンドの有無によって転写活性を変えるもの (RAR など) がある。右は最近の知見に基づく核内受容体の転写調節機構を示す。核内受容体 (青) はリン酸化 (橙色) に代表されるシグナル伝達の終着点であり、リガンド (深緑) を細胞内で活性化型 (黄緑) に代謝する酵素 (赤) やその調節因子 (桃色)、核内受容体と転写因子複合体を形成するパートナー分子 (灰色と紫)、および核内受容体を翻訳後修飾するシグナル分子 (水色) など様々な内因性蛋白質によって制御されている。

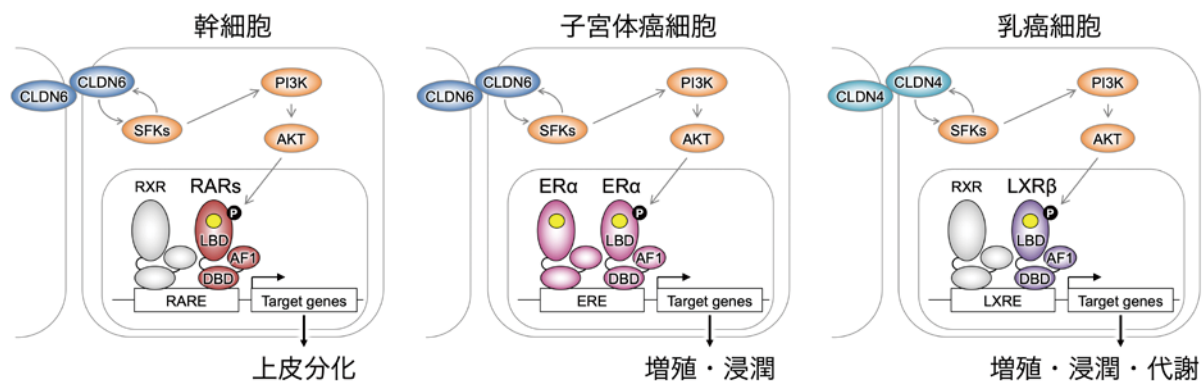


図2. 細胞間接着から核内受容体に至るシグナル経路が制御する生命現象。CLDN6-RAR γ 経路は幹細胞の上皮分化を、CLDN6-ER α 経路は子宮体がんの、CLDN4-LXR β 経路は乳がんの進展を制御する。

いだし (19), 上皮分化における細胞間接着装置複合体 (20) および微絨毛 (21) の成熟過程を詳細に明らかにした。続いて F9 幹細胞の上皮分化過程の早期から高発現する細胞間接着分子クローディン-6 (CLDN6) に着目した。クローディンは密着結合の形成に必須の 4 回膜貫通分子で、哺乳類では 20 種類以上からなるファミリーを形成している。そのうち CLDN6 は発生期の消化管や表皮など胎児性に発現する一方で、成体の正常組織ではほとんど発現しないという際立った特徴を有している。そこで CLDN6 が上皮分化における細胞間接着の成熟に貢献するのではないかという仮説を立て、F9 幹細胞に CLDN6 を過剰発現させた。その結果、強制発現された CLDN6 は未熟な F9 幹細胞の細胞間接着領域に分布し、さらに CLDN6 の導入によって上皮様の形態変化、他の CLDN など上皮マーカーの発現亢進、および微絨毛の形成を含む明瞭な上皮分化が認められた。さらに CLDN6 による上皮分化誘導はマウス ESC の浮遊培養により構築した胚様体でもみられた。ところでウェルシュ菌腸型毒素の C 末端ペプチド (CPE) は CLDN の細胞外ドメインと結合し、細胞膜を透過させて細胞を破壊する。一方で CPE の C 末端ペプチド (C-CPE) は細胞毒性をきたすことなく CLDN 同士の対合のみを阻害する。すなわち C-CPE で細胞を処理すると、CLDN の蛋白質発現量を保ったまま細胞間接着領域から CLDN を取り除くことができる。CLDN6 を過剰発現した F9 幹細胞や ESC は C-CPE 存在下では上皮分化が抑制された。これは CLDN6 による隣接細胞との細胞間接着に端を発するシグナルが、何らかの転写因子に影響して下流標的遺伝子の転写と翻訳を制御す

ることで、幹細胞の運命決定因子として働くことを示唆する (22)。

3. CLDN6-NR 経路の発見

CLDN6 接着シグナルの下流を同定すべく、CLDN6 を過剰発現した F9 幹細胞に様々な阻害剤を処理したところ、SFK (Src-family kinase)/PI3K/AKT 経路の阻害剤が上皮分化を阻害した。また CLDN6 の変異体を用いた免疫沈降と分化誘導実験により、CLDN6 が C 末端にある 2 つのチロシン残基依存性に SFK と結合し、互いの活性化を介して上皮分化を誘導することがわかった。

次に、CLDN6 による上皮分化で誘導される遺伝子群が RA およびレチノイン酸受容体 (RAR) で誘導されるものと類似していたことから、CLDN6 接着シグナルは RAR に帰結すると仮説を立てた。RAR には RAR $\alpha/\beta/\gamma$ の 3 種類およびそれらのスプライシング・バリエーションがあるが、このうち F9 の上皮分化を制御するのは RAR γ 2 であることがわかってきた (16, 23)。AKT はセリン・スレオニンキナーゼであるから、RAR γ 2 の潜在的 AKT 標的セリンおよびスレオニンをバイオインフォマティクスにより予測したところ、10 箇所が候補として抽出された。そこでこれらのセリン・スレオニンをアラニンに置換した RAR γ 2 の変異体 (リン酸化不応体) を作製し、RAR γ のノックアウト細胞 (16) に CLDN6 と共にレスキュー導入したところ、第 379 番セリン (ヒト RAR γ 2 では第 390 番セリンに相当) の変異体のみ上皮分化を誘導できなかった。また常時リン酸化状態を模倣するグルタミン酸に置換した場合は、CLDN6 などの上流シグナルがない状態でも上皮分

化誘導された。よって CLDN6 接着シグナルは SFK/PI3K/AKT 経路を介して RAR γ 2 の第 379 番セリンのリン酸化に帰結すると結論された (図 2 左) (10)。

第 379 番セリンは RAR γ 2 のリガンド結合ポケットと三次元的に近接しており (図 3), リン酸化による電荷の変化によってリガンド感受性に影響することが示唆された。RAR γ 2 は当然ながら RA を天然リガンドとするが, 核内受容体とそのリガンドは強固な一対一対応ではなく連続性をもった結合性を示し, 様々な脂質に種々の程度で結合し活性化する。また F9 幹細胞の培地に添加されるウシ胎児血清 (FBS) には, RA を含む様々な脂質が生理的な種類と濃度で含まれている。これまでの実験は培地中に RA を添加せずに行ってきたが, 核内受容体のリン酸化がリガンド感受性を高めるという報告 (24) があることから, 本実験系においては第 379 番セリンのリン酸化を受けた RAR γ 2 が微量な生理的濃度の RA あるいは他の脂質リガンドに反応しているのではないかと考えた。そこで FBS を活性炭で一晩処理して脂質リガンドを完全に除去したところ, CLDN6 過剰発現細胞や RAR γ 2 の第 379 番セリン-グルタミン酸置換体レスキュー細胞は上皮分化を示さなくなった。また通常 F9 幹細胞の上皮分化誘導には 200-1,000 nM の RA が必要であるが, CLDN6 接着シグナルがある状態や第 379 番セリン-グルタミン酸置換体では 1 nM の RA で上皮分化誘導が観察された。よって RAR γ 2 の第 379 番セリン・リン酸化は RA に対する感受性を著しく亢進させることが示された (10)。

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る (図 3)。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 ファミリーのみならず, 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 による上皮分化だけでなく, 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。そこで次にヒト乳癌細胞株 MCF-7 細胞を用いて同経路がエストロゲン受容体 (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わかった。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 (10)。

4. CLDN6 と ER α の連関は子宮体癌の悪性形質を増強する

次に我々は 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 高発現が子宮体癌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

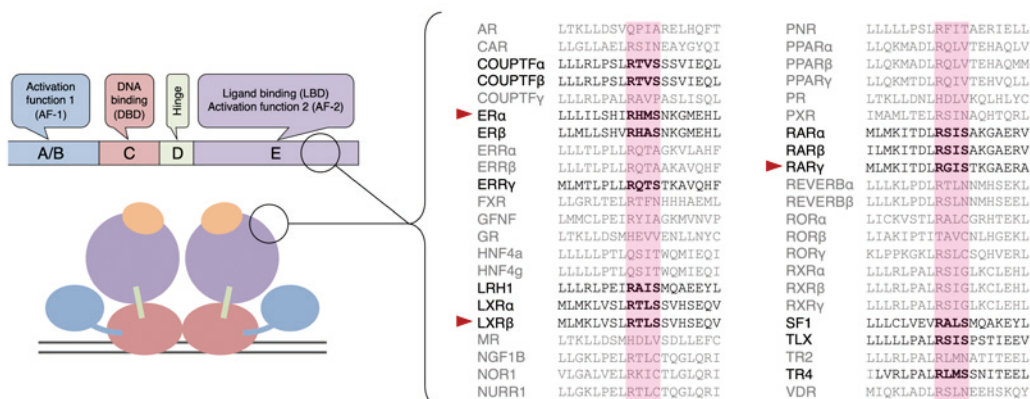


図 3. 核内受容体のリガンド結合ドメインにある AKT 標的セリン残基は 14 種類に保存されている。左は核内受容体の各ドメインを簡略化した模式図を示す。AKT 標的セリン残基はリガンド結合ドメインの C 末端側, 立体構造ではリガンド結合ポケットの近傍に位置する。右は 48 種類のヒト核内受容体スーパーファミリーについて, RAR γ で同定した AKT 標的セリン残基を含むアミノ酸配列を示す。AKT 標的セリン残基は 14 種類に分布している。本総説では赤の矢頭で示すものについて解説する。

パラフィン包埋手術標本を免疫組織化学法で染色可能な CLDN6 モノクローナル抗体を開発し、子宮体癌手術症例約 160 例について腫瘍細胞での CLDN6 発現と患者の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 年生存率は約 30% と、低発現群の約 90% 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 (25)。

続いて培養細胞を用いて子宮体癌における CLDN6 の分子機能を解析した。よく用いられる子宮体癌細胞株 5 種類について CLDN6 発現を評価したところ、高発現株は 1 つもなかった。これは子宮体癌手術標本における CLDN6 高発現例が 10% 程度であったことと矛盾しない結果である。そこで ER α 発現陽性の Ishikawa について、CLDN6 過剰発現株を樹立し、その悪性形質を親株と比較した。その結果、CLDN6 高発現により増殖能と遊走能が亢進し、SFK のリン酸化も促進され、さらに RNA シークエンスでは ER α コンセンサス標的遺伝子群の発現量も上昇していた。また TALEN 法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みられなくなった。また ER α ノックアウト細胞において野生型の ER α はレスキュー効果を示したのに対し、第 518 番セリンのアラニン置換体 (リン酸化不応体) は示さなかった。これらの結果は ER α 発現陰性の HEC-1A 細胞株を親株とした機能獲得実験でも再現された。以上より子宮体癌細胞株において CLDN6 シグナルは 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癌では悪性形質増強に作用していることが解明された (図 2 中央) (11)。

5. CLDN4 と肝 X 受容体 (Liver X receptor ; LXR) の連関が 乳癌の脂質代謝と進展に関わる

子宮体癌だけでなく乳癌でも ER α が腫瘍の進展に関与する。そこで CLDN6-ER α シグナルが乳癌の悪性形質制御に関わるかどうか明らかにしようと試みた。子宮体癌の場合と同様に、乳癌手術検体約 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。なお乳癌の 25% で CLDN6 が高発現するとい

う先行研究 (26) があるが、我々が検証した結果、一般に使われているウサギ抗 CLDN6 抗体は、CLDN ファミリーの中で CLDN6 と近縁な CLDN4 と交差反応を示すことが確認され (25)、先行研究で CLDN6 高発現とされた症例は CLDN4 高発現を検出している可能性が考えられた。一方で CLDN4 には SFK の活性化に必要な C 末端のチロシン残基が保存されていることもふまえ、CLDN4 に着目して研究を進めることにした。乳癌細胞株のうちホルモン受容体陽性の MCF-7 と T47D は CLDN4 陽性であり、低分化でホルモン受容体と HER2 のいずれも陰性のトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) の形質を有する MDA-MB-231 は CLDN4 陰性であった。そこで前 2 者の CLDN4 陽性細胞株では CRISPR 法による CLDN4 ノックアウトを、後者では遺伝子導入による 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わかった。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 のコンセンサス下流標的遺伝子に発現変化が認められたことから、CLDN4-LXR 経路に焦点をあてることにした。LXR には LXR α と LXR β の 2 つのアイソザイムがあるため、まず乳癌における発現プロファイルを検討した。その結果、手術検体と細胞株のいずれにおいても、LXR β は種々の程度で発現していた一方で LXR α の発現はほとんどみられず、乳癌では LXR β が優位であることがわかった。そこで LXR β のノックアウト細胞株を樹立し、CLDN4 の有無と LXR β の有無で悪性形質を比較したところ、CLDN4 と LXR β を共に高発現している場合のみ細胞増殖や遊走能が高かった。また RAR γ や ER α と同様の AKT 標的である第 432 番セリンのアラニン置換体 (リン酸化不応体) はノックアウト細胞の悪性形質減弱をレスキューできなかった。さらに乳癌手術材料を組織病理学的に評価したところ、CLDN4 と LXR β はそれぞれ単独では予後や臨床病理学的因子と関連性がみられなかったが、TNBC では CLDN4 と LXR β が共に強陽性の症例で全生存率と無再発生存率が低下していた。以上の結果から、乳癌では CLDN4-LXR β 経路が脂質代謝、細胞増殖、浸潤などの悪性形質増強にはたらくことが示された (図 2 右) (13)。

6. まとめと展望

以上のように、我々は細胞間接着に端を発するシグナル伝達が核内受容体の転写調節に影響し、これが上皮分化やがんの進展に関与することを明らかにした。この事実は核内受容体の翻訳後修飾に関わる分子が潜在的な診断治療標的であることを示唆するものである(図1)。現在我々は、本経路による細胞制御機構の解明を他の疾患に展開すると同時に、CRISPRスクリーニングを用いた順遺伝学的手法によって核内受容体の翻訳後修飾に関わる内因性の遺伝子産物を網羅的に同定すべく研究を進めている。

謝 辞

本研究は福島県立医科大学医学部基礎病理学講座 富川直樹講師(現関西医科大学)、柏木惟人助教(現獨協医科大学)、小林信助教、産婦人科学講座小島学准教授、乳腺外科学講座村上祐子助教(現北福島医療センター)らと共に、日本学術振興会科研費、上原記念生命科学財団、武田科学振興財団、金原一郎記念医学医療振興財団、小野医学研究財団、および高松宮妃癌研究基金からの研究助成によって実施された。

文 献

- Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1; **5**(3): a016709, 2013.
- Frigo DE, Bondesson M, Williams C. Nuclear receptors: from molecular mechanisms to therapeutics. *Essays Biochem*, 17; **65**(6): 847-856, 2021.
- Dhiman VK, Bolt MJ, White KP. Nuclear receptors in cancer - uncovering new and evolving roles through genomic analysis. *Nat Rev Genet*, **19**(3): 160-174, 2018.
- De Bosscher K, Desmet SJ, Clarisse D, et al. Nuclear receptor crosstalk - defining the mechanisms for therapeutic innovation. *Nat Rev Endocrinol*, **16**(7): 363-377, 2020.
- Treviño LS, Weigel NL. Phosphorylation: a fundamental regulator of steroid receptor action. *Trends Endocrinol Metab*, **24**(10): 515-524, 2013.
- Filtz TM, Vogel WK, Leid M. Regulation of transcription factor activity by interconnected post-translational modifications. *Trends Pharmacol Sci*, **35**(2): 76-85, 2014.
- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270**(5241): 1491-1494, 1995.
- Hu E, Kim JB, Sarraf P, et al. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPARgamma. *Science*, **274**(5295): 2100-2103, 1996.
- Shupnik MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene*, **23**(48): 7979-7989, 2004.
- Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Kashiwagi K, et al. Cell adhesion signals regulate the nuclear receptor activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **116**(49): 24600-24609, 2019.
- Kojima M, Sugimoto K, Kobayashi M, et al. Aberrant Claudin-6-Adhesion Signaling Promotes Endometrial Cancer Progression via Estrogen Receptor α . *Mol Cancer Res*, **19**(7): 1208-1220, 2021.
- Sugimoto K, Chiba H. The claudin-transcription factor signaling pathway. *Tissue Barriers*, **9**(3): 1908109, 2021.
- Murakami-Nishimagi Y, Sugimoto K, Kobayashi M, et al. Claudin-4-adhesion signaling drives breast cancer metabolism and progression via liver X receptor β . *Breast Cancer Res*, **25**(1): 41, 2023.
- Bernstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, Ephrussi B. Alkaline Phosphatase Activity in Mouse Teratoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **70**(12): 3899-3903, 1973.
- Strickland S, Mahdavi V. The induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells by retinoic acid. *Cell*, **15**(2): 393-403, 1978.
- Chiba H, Clifford J, Metzger D, et al. 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*, **139**(3): 735-747, 1997.
- Nagafuchi A, Shirayoshi Y, Okazaki K, et al. Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, **329**(6137): 341-343, 1987.
- Chiba H, Chambon P, Metzger D. F9 embryonal carcinoma cells engineered for tamoxifen-dependent Cre-mediated site-directed mutagenesis and doxycycline-inducible gene expression. *Exp Cell Res*, **260**(2): 334-339, 2000.
- Chiba H, Gotoh T, Kojima T, et al. Hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha triggers formation of functional tight junctions and establishment of polarized epithelial morphology in F9 embryonal carcinoma cells. *Exp Cell Res*, **286**(2): 288-297, 2003.
- Satohisa S, Chiba H, Osanai M, et al. Behavior of tight-junction, adherens-junction and cell polarity proteins during HNF-4alpha-induced epithelial polarization. *Exp Cell Res*, **310**(1): 66-78, 2005.
- Chiba H, Sakai N, Murata M, et al. The nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha acts as a morphogen to

- induce the formation of microvilli. *J Cell Biol*, **175**(6) : 971-980, 2006.
22. Sugimoto K, Ichikawa-Tomikawa N, Satohisa S, et al. The tight-junction protein claudin-6 induces epithelial differentiation from mouse F9 and embryonic stem cells. *PLoS One*, **8**(10) : e75106, 2013.
23. Chiba H, Clifford J, Metzger D, et al. Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **17**(6) : 3013-3020, 1997.
24. Marsaud V, Gougelet A, Maillard S, et al. Various phosphorylation pathways, depending on agonist and antagonist binding to endogenous estrogen receptor alpha (ERalpha), differentially affect ERalpha extractability, proteasome-mediated stability, and transcriptional activity in human breast cancer cells. *Mol Endocrinol*, **17**(10) : 2013-2027, 2003.
25. Kojima M, Sugimoto K, Tanaka M, et al. Prognostic Significance of Aberrant Claudin-6 Expression in Endometrial Cancer. *Cancers* [Internet], **12**(10), 2020. Available from : <http://dx.doi.org/10.3390/cancers12102748>
26. Liu Y, Jin X, Li Y, et al. DNA methylation of claudin-6 promotes breast cancer cell migration and invasion by recruiting MeCP2 and deacetylating H3Ac and H4Ac. *J Exp Clin Cancer Res*, **35**(1) : 120, 2016.