慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	骨軟部腫瘍におけるCD44およびADAM17の発現および機能解析
Sub Title	Expression and functional analysis of CD44 and ADAM17 in bone and soft tissue tumors
Author	中山, タラント ロバート(Nakayama, T. Robert)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	上皮系悪性腫瘍は浸潤能・転移能を獲得する際、上皮性細胞としての性格を失い、間葉系細胞様に変化するEpithelial Mesenchymal Transition (EMT)という過程を経る。EMTの中でも中心的な役割を担うCD44とTNFα converting enzyme (TACE/ADAM17)がそもそも間葉系由来の悪性腫瘍である、原発性悪性骨・軟部腫瘍の浸潤能・転移能獲得においてどのように機能しているかに関して、その臨床検体を用いて解析を行った。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2009～2011 課題番号：21791413 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21791413seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2009～2011
課題番号：21791413
研究課題名（和文）
骨軟部腫瘍における CD44 および ADAM17 の発現および機能解析
研究課題名（英文）
Expression and functional analysis of CD44 and ADAM17 in bone and soft tissue tumors
研究代表者
中山　タラント　ロバート（ROBERT T. NAKAYAMA）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00365298

研究成果の概要（和文）：
上皮系悪性腫瘍は浸潤能・転移能を獲得する際、上皮性細胞としての性格を失い、間葉系細胞様に変化する Epithelial Mesenchymal Transition （EMT）という過程を経る。EMT の中でも中心的な役割を担う CD44 と TNFα converting enzyme (TACE/ADAM17) がそもそも間葉系由来の悪性腫瘍である、原発性悪性骨・軟部腫瘍の浸潤能・転移能獲得においてどのように機能しているかに関して、その臨床検体を用いて解析を行った。

研究成果の概要（英文）：
Many types of epithelial cancer are known to show their invasive motility and metastatic potential through a process called Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), in which cancer cells lose their epithelial morphology and acquire mesenchymal characteristics. We analyzed the clinical samples to elucidate expression and functions of CD44 and TNFα converting enzyme (TACE/ADAM17), key molecules in EMT, in primary malignant bone and soft tissue tumors which originally arise in the mesenchymal tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総　計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野： 医歯薬学
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学
キーワード：①癌　②シグナル伝達　③遺伝子　④蛋白質

１．研究開始当初の背景

細胞は種々の膜型蛋白を介し周囲との環境の相互作用を図り、増殖・遊走など様々な機能を調節する。この過程において、近年、膜型蛋白が細胞膜上において受ける蛋白分解作用である ectodomain shedding（以下 shedding）が、膜型蛋白の活性化・不活化・細胞内シグナル伝達など多岐にわたる機能的修飾の重要な因子であるとして注目を集めている（図 1 参照）。我々の着目する TNFα converting enzyme (TACE/ADAM17)は膜型蛋白として産生される TNFα 前駆体を shedding する酵素として同定された遺伝子であるが、その後の研究からヒアルロン酸リセプターである CD44 を含む極めて多くの膜型蛋白の機能修飾に関与していることが明らかになった（Nagano O *et al.* J Cell Biol. 2004; 165:893-902.）。

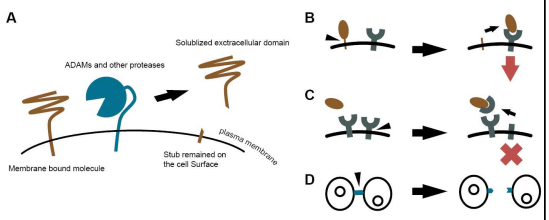

図 1. Shedding の概要. **A**. ADAM17 と基質の模式図. **B-D**. Shedding による代表的な機能. Shedding は膜型リガンドの可溶化（**B**）もしくはリセプターを切断することによりシグナリングを調節する（**C**）. また一方で、接着分子を切断することにより細胞-細胞もしくは細胞-細胞外基質の接着・遊離に関与する（**D**）.

CD44 は広範な発現様式を有する膜型蛋白であるが、一部の癌腫において高発現していることが知られており、これが悪性度に関連のあることが報告されている。CD44 は ADAM17 に切断されたのち、さらに細胞内で切断を受け、細胞内ドメインが核内へ移行し転写因子として機能する。その標的遺伝子の一つが CD44 自身であることから、ADAM17 による shedding をトリガーとしたポジティブフィードバック機構の存在が示唆されている。興味深いことに、腫瘍細胞の遊走に際し ADAM17 による CD44 の shedding が重要な役割を果たすことが解明され、CD44 の Shedding という現象が腫瘍細胞の遊走阻害のターゲットとしても注目されている。一方で、細胞膜上の CD44 は EGFR や c-Met の co-receptor として機能しこれらのシグナリングを増幅すること、さらにその CD44 の発現が p53 の機能不全によって増強することが報告されている(Godar S *et al*. Cell. 2008: 134: 62-73)。これらの知見から CD44 は腫瘍細胞遊走のみならず腫瘍細胞の増殖・生存においても深くかかわっていることが示唆されるが、CD44 の増殖シグナル増幅作用に ADAM17 がどのように関与しているのかこれまで知見がない。我々は、ADAM17 による CD44 の shedding が CD44 の転写亢進、および増殖シグナルの増幅という腫瘍の悪性度を規定する二つの要素を CD44 の上流で制御している可能性があると考えている。しかしながらこれまでの CD44 の研究は主に上皮性腫瘍を中心になされており、元来間葉系由来の骨軟部腫瘍に関してはほとんどその知見がない。また上皮性腫瘍の遊走能は EMT を経て獲得するものであるが、はたしてもともと Mesenchymal（間葉系由来）である骨軟部腫瘍に上皮性腫瘍の EMT に相当するものがあるのか、もしくは骨軟部腫瘍には本質的に遊走能が備わっているのか、明らかでない。

研究代表者はこれまでの研究で、10 種 105 検体の骨軟部腫瘍の臨床検体を対象に、マイクロアレイを用いたゲノム網羅的な遺伝子発現解析を行い、いわゆる悪性線維性組織球腫（Malignant Fibrous Histocytoma；MFH）を代表とする、病理学的には紡錘形細胞や多形細胞を特徴とする、高悪性度の腫瘍群に CD44 の発現が高い傾向にあることを示した（Nakayama R *et al*. Mod Pathol. 2007: 20:749-59.）。また、臨床検体を用いた同遺伝子発現解析の中で、CD44 と癌抑制遺伝子である p53 の発現に逆相関を認めた(図 2 参照)。これらの知見から、骨軟部腫瘍においても CD44 / ADAM17 が病理学的悪性度、腫瘍細胞の遊走能に関与している可能性が示唆された。しかし、われわれの渉猟し得た範囲ではこのような方向性で骨軟部腫瘍を解析した報告はなく、本研究プロジェクトを立案するに至った。

２．研究の目的

原発性骨・軟部腫瘍（以下、骨軟部腫瘍）は間葉系由来の悪性腫瘍である。1970 年以降、骨軟部腫瘍の治療は、切除縁の概念の導入、有効な化学療法の導入によって大幅な局所制御率の向上、患肢温存率の上昇をみた。しかし、強力な補助化学療法の施行にもかかわらず、現在でも約半数の症例は、経過中に遠隔転移を生じ不幸な転帰を辿る。我々骨軟部腫瘍を専門とする医師にとって最大の標的は遠隔転移の予防、治療であることは言うまでもない。

悪性腫瘍は浸潤能・転移能を獲得するという点において良性腫瘍と決定的に異なり、これらを抑制することにより、治療成績の飛躍的な向上が期待される。胃がんや肺がん、乳がんなど上皮性由来の悪性腫瘍は、浸潤能・転移能を獲得する際に EMT、すなわち一度上皮性細胞としての性格を失い、間葉系細胞様の性格への変化する、という過程を経る。近年、その EMT の分子生物学的メカニズムが解明されつつあり、その中でも中心的な役割を担う分子に今回我々の研究対象となる CD44 と TNFα converting enzyme (TACE/ADAM17、以下 ADAM17)が含まれる。しかしながら、元来間葉系由来の悪性腫瘍である骨軟部腫瘍において、はたして EMT に対応するものが存在するのか全く知見がない。

近年の分子生物学の飛躍的な進歩は、骨軟部腫瘍における特異的融合遺伝子の発見、網羅的遺伝子発現解析に基づく骨軟部腫瘍の再分類など、骨軟部腫瘍の疾患概念自身をも大きく変えつつある。本研究の目的は CD44 を手掛かりに、その発現様式を骨軟部腫瘍の臨床検体を用いて評価し、in vitro の実験系とともに骨軟部腫瘍における CD44 /

ADAM17 の機能および EMT の細胞生物学的な意味付けの一端を明らかにすることである。本研究を通して、骨軟部腫瘍の浸潤、転移の分子病態に関するきわめて有用な基礎的情報を提供するとともに、個々人の腫瘍に最も適した治療法の選択や、新しい治療標的分子の同定などを通して、治療成績向上に貢献することが期待される。

３．研究の方法

(1)臨床検体を用いた CD44 / ADAM17 発現様式の詳細な検討

骨軟部腫瘍における CD44 の発現に関する報告は限られている。研究代表者のマイクロアレイを用いたゲノム網羅的遺伝子発現解析のデータから、いわゆる悪性線維性組織球腫（Malignant Fibrous Histocytoma；MFH）を代表とする、病理学的に紡錘形細胞や多形細胞を特徴とする、高悪性度の腫瘍に mRNA レベルで CD44 の発現が高い傾向にあることが示された。本研究の第一段階として、病理組織学的に多彩な骨軟部腫瘍の中から特に発症頻度の高い MFH を中心に、CD44 および ADAM17 の発現様式を詳細に検討し、組織形および病理組織学的悪性度との関連を解析した。解析対象サンプルは、本学部の倫理委員会の承認を得た上で、整形外科手術の際に得られる臨床検体を利用した。得られた臨床検体は、凍結保存あるいは初代培養を行った。CD44 / ADAM17 の発現は mRNA レベルでは、凍結保存組織から mRNA を抽出し RT-PCR にて解析を行った。蛋白レベルでは、パラフィン切片を用いた免疫組織化学染色、凍結保存組織から蛋白を抽出し Western blotting、および初代培養株を用いた細胞染色で行った。上述のごとく腫瘍の遊走において ADAM17 による CD44 の shedding が重要であることから、CD44 の細胞内および細胞外ドメインに対してもそれぞれを認識する抗体を利用して発現を観察した。

(2)ADAM17 による CD44 の shedding の機能解析

本研究の第二の目標は、腫瘍の遊走・増殖ともに関与が示唆されている CD44 に対し、ADAM17 がどのような関与をしているかを明らかにすることである。そのために、ADAM17 欠損線維芽細胞に large T antigen（p53 を不活化→CD44 の発現亢進）を導入した細胞株を用いて、ADAM17 の CD44 に対する機能の解析を試みた。これらの知見をさらに上記の臨床検体のデータに照らし合わせ、vitro で認められた結果が演繹可能であるかを検討した。

４．研究成果

(1)臨床検体の収集、保存、および細胞株の樹立

骨軟部腫瘍は非常に稀な疾患であり、治療専門施設も少ない。我々慶應義塾大学病院整形外科は年間約 200 例の悪性腫瘍の治療に当たる、国内有数の骨軟部腫瘍専門施設であり、臨床検体を用いた骨軟部腫瘍の基礎研究を通して骨軟部腫瘍の予後改善を図るのは我々の使命である。慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認のもと、一般施設では収集困難な骨軟部腫瘍の臨床検体に関して、本研究前に 300 を越える臨床検体の蓄積があった。本研究期間に臨床検体の収集を進め、約 200 の検体の収集・蓄積、および初代培養を行うことができた。加えて、臨床病理学的な情報とリンクさせ、データベースを作成した。その作業の中で、高悪性度肉腫の細胞株 2 株の樹立に成功した（図 2 参照）。非常に稀な疾患であるため、細胞株の樹立は今後の *in vitro/in vivo* での解析に非常に有用であり、世界中の肉腫研究に寄与する可能性が高いため、今後も引き続き細胞株の生物学的解析や、細胞株を用いた肉腫の細胞生物学的研究を継続していく。また、臨床病理データベース作成による成果として、粘液型脂肪肉腫の転移様式に関して論文として報告することができた（Asano *et al.* Sarcoma 2012 *in press*）。

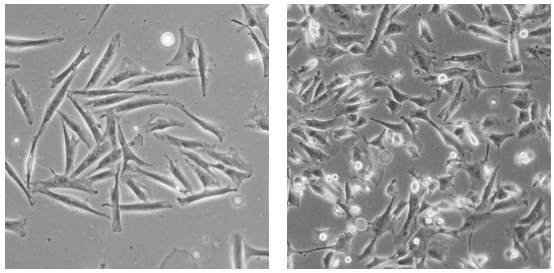

図 2. 樹立した細胞株。左：高悪性度粘液線維肉腫. 右：高悪性度未分化多形性肉腫.

(2)臨床検体における CD44 の発現解析

既存の凍結保存検体に加え、整形外科手術の際に得られる新規臨床検体を用いて、mRNA レベル、および蛋白レベルでの CD44 発現解析を行った。MFH の初代培養を用いた細胞蛍光染色と Western blotting の結果を図 3 に示す。この検体のように、マイクロアレイの結果同様、いわゆる MFH など高悪性度紡錘形多形細胞肉腫検体で多く発現が確認される傾向があったものの、骨軟部腫瘍は病理組織学的に非常に多彩であり、症例（腫瘍）間で発現にばらつきが大きく、発現様式が多様性を克服し、その臨床病理学的な意義を見出すことはできなかった。一方で、CD44 および p53 の mRNA 発現レベルの相関を調べたところ図 4 にあるように、明らかな逆相関を認め、骨軟部腫瘍において p53 の機能不

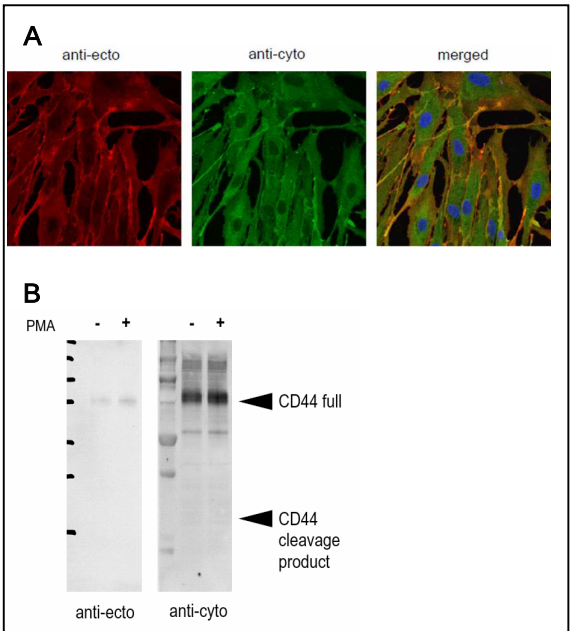

図 3 MFH 初代培養を用いた CD44 発現の検討. 細胞外ドメイン（Anti-ecto)、細胞内ドメイン(Anti-cyto)に対する抗体を用いた. A 細胞蛍光染色. B Western blotting.

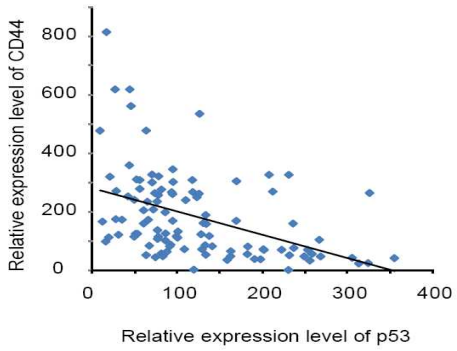

図 4. 骨軟部腫瘍における CD44 および p53 の mRNA 発現様式の相関.

全を介して CD44 の発現が亢進していることが示唆された.

(3) ADAM17 による CD44 の shedding の機能解析

機能解析を行うに当たり、骨肉腫細胞株 MG63 における CD44 の発現、および Shedding 誘導剤 PMA による Shedding を確認した。これまでの諸家の報告から、酸化ストレス、小胞体ストレスなど、種々の細胞ストレスによって CD44 の Shedding が誘導されることが知られていたが、MG63、および PMA 刺激で非常に強く Shedding がおこる Glioma 細胞株 U257 において、酸化ストレス（H2O2)、小胞体ストレス（TUN）に対する CD44 の Shedding を確認することができなかった（図 5 参照)。同様に、CD44 の Ligand として知られるヒアルロン酸の各分子量（Oligo、5kDa、30kDa）を用いて刺激を行ったが、CD44 の Shedding を確認することができなかった（図 6 参照)。

図 5 細胞ストレスによる Shedding 誘導. (U257：Glioma 細胞株/Shedding positive control, H2O2：酸化ｽﾄﾚｽ, Tun：小胞体ｽﾄﾚｽ, PMA：Shedding 誘導剤)

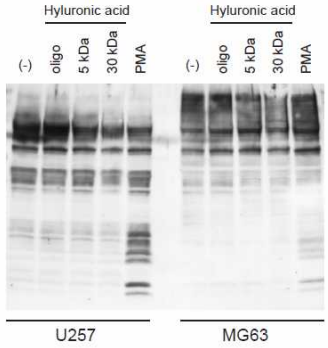

図 6 ﾋｱﾙﾛﾝ酸(HA)による Shedding の誘導.

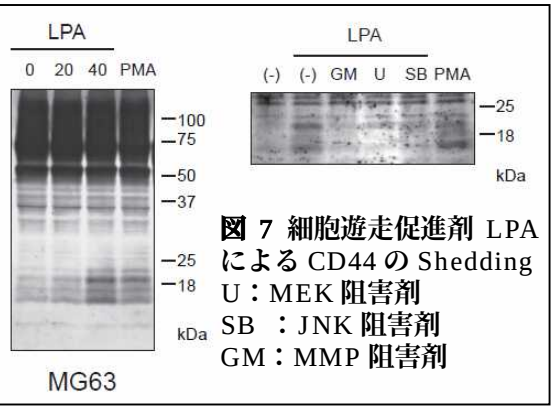

図 7 細胞遊走促進剤 LPA による CD44 の Shedding
U：MEK 阻害剤
SB ：JNK 阻害剤
GM：MMP 阻害剤

一方、骨肉腫細胞株 MG63 を細胞遊走促進剤である lysophosphatidic acid (LPA)を用いると、容量依存的に CD44 の Shedding を確認することができた。LPA による CD44 の Shedding は、下流の MAPK 阻害剤や ADAM17 阻害剤によって抑制される（図 7 参照）ことから、MAPK、および ADAM17 依存性の Shedding であることが確認できた。以上の結果を踏まえ、今後は、種々の細胞株を用いて、細胞遊走能獲得と、CD44 の Shedding との関連に関して、さらに解析を進めたいと考えている。

５．主な発表論等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計１件）

①N Asano, M Susa, S Hosaka, R Nakayama, et al. Metastatic Patterns of Myxoid/Round Cell Liposarcoma: A Review of a 25-Year Experience Sarcoma, 2012 in press（**査読あり**）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.keio-mog.jp/

６．研究組織
(1)研究代表者
中山　タラント　ロバート
（ROBERT T. NAKAYAMA）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：00365298