

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791216
 研究課題名(和文) 非ステロイド系消炎剤による CD44 を介した頭頸部癌遠隔転移抑制効果の基礎的研究
 研究課題名(英文) The effect of NSAIDs on inhibition of head and neck cancer metastasis through CD44
 研究代表者
 村上 大造 (MURAKAMI DAIZO)
 熊本大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70398212

研究成果の概要：

がんの浸潤・転移を抑制する NSAIDs の CD44 連続的切断に対する影響について検討した。

Sulindac sulfide (SS)、Meclofenamic acid (MA) 処理で CD44 切断亢進が確認された。これら薬剤による CD44 連続的切断のうち細胞外領域切断は metalloprotease 阻害剤により、膜貫通領域切断は α -secretase 阻害剤により抑制された。また、MA の切断活性は EGTA、PKC 阻害剤では抑制されなかった。これら薬剤処理後、経時的に CD44 の発現動態を検討したところ、scrape 処理では全長蛋白の turn over が確認されたのに対し、NSAIDs 処理では時間経過と共にその発現量は低下した。本実験結果は、その癌転移抑制作用の一機序として、接着分子の細胞膜上での切断、及び新規合成の抑制による機能的な接着分子の発現低下を介していることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	0	2,700,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	180,000	3,480,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 転移 CD44 NSAIDs

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌において遠隔転移が生じた後の予後はきわめて不良であり、癌治療

において局所制御のみならず、遠隔転移が予後を大きく左右する因子であることは周知

の事実である。治療成績向上のためには遠隔転移の防止は重要な治療戦略であり、主に全身化学療法が行われているが十分な効果をあげているとはいえない状況である。

遠隔転移の発生機序は、癌細胞が以下のステップを経ることで成立する。

- (1) 原発巣からの離脱
- (2) 基底膜の破壊・細胞間質の分解
- (3) 細胞間質の移動
- (4) 脈管内への侵入
- (5) 脈管を介した運搬
- (6) 遠隔部位での脈管より組織内への移動
- (7) 遠隔臓器での生着、転移巣の形成

これらのステップは癌細胞が浸潤能（基底膜の破壊、細胞間質の分解、間質内や脈管内外への移動能）、血管新生誘導能、接着非依存性生存能（脈管内運搬中の生存）を獲得することによって成立する。分子生物学的解析により接着分子の発現変化、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を代表とする蛋白分解酵素、血管内皮増殖因子（VEGF）などの増殖因子の発現、分泌能がこの癌転移機構で重要な役割を担っていることが解明されてきている。近年、これらの分子を標的として、MMP 阻害剤、増殖因子阻害剤等が臨床応用されてきてはいるが、いまだ十分な効果は得られておらず、新しい観点からのアプローチも必要ではないかと考えられる。

CD44 はヒアルロン酸を主なりガンドとする接着分子である。癌細胞における高発現が確認されており、その増殖能、浸潤・転移能において中心的な役割を担うと考えられている。申請者はこれまでにこの CD44 機能制御機構として Ca シグナル、PKC 活性による細胞膜外領域、細胞膜貫通領域における連続的切断機構があることを報告してきた（*JBiol Chem.* 275: 29628-29635, *J Cell Biol.* 155: 755-762, *Oncogene.* 22: 1511-1516, *J Cell*

Biol. 165: 893-902）。細胞は接着分子を介して細胞外基質と接着及び接着の解除を繰り返すことにより移動していると考えられているが、CD44 細胞外領域切断はこの細胞外基質との着脱のサイクルを早めることにより癌細胞運動能を亢進させていると考えられる。

今回この CD44 切断に作用する薬剤として非ステロイド系消炎剤（NSAIDs）に着目した。NSAIDs はその作用のうち Cox2 阻害効果により腫瘍増殖を抑制する薬剤である。その一方で悪性腫瘍の遠隔転移を抑制する可能性も示唆されているが、その機序はいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

NSAIDs は L-selectin、アミロイド前駆蛋白といった膜蛋白質の切断に影響することが既に報告されており、申請者は NSAIDs のうち Sulindac sulfide、Meclofenamic acid の処理により CD44 の切断の亢進と細胞膜上での発現が低下することを確認している（*Cancer Science* 95 ; Suppl. 262）。この現象は NSAIDs 処理が切断という機構を介して癌細胞転移で重要な”足”としての働きをする接着分子 CD44 の細胞膜上での発現を低下さ、癌細胞転移を抑制させるのではないかという仮説の証明を目的としている。

3. 研究の方法

本研究では CD44 を高発現させた頭頸部扁平上皮癌細胞（SCC-CD44-HA 細胞）を用いる予定であったが、同細胞の十分な培養が行えなかったため、CD44 を高発現したヒトグリオーマ培養細胞を用いて実験を行った。

- (1) 細胞膜蛋白切断に対する NSAIDs の作用機序は不明であり、どのカテゴリーの薬剤が効果的かも分かっていないため、後述の各種 NSAIDs 処理を行い、まず CD44

切断に影響する薬剤のスクリーニングを行う。なお、使用薬剤候補は既に報告されている L-selectin、アミロイド前駆蛋白切断に影響する薬剤、癌細胞増殖・転移抑制効果が確認されている薬剤を中心に選択した。

Cox 非選択的薬剤；

Aspirin, Indomethasin, Sulindac, Sulindacsulfide, Ibuprofen, Fulbiprofen, Ketoprofen, Mefenamic acid, Meclofenamic acid

Cox2選択的薬剤；

Celecoxib, Valdecoxib

ヒトグリオーマ細胞をDMEM-F12培地で12時間培養後、上記薬剤を含む培地へ交換し、5時間処理後に回収した。コントロールとして同濃度の溶媒のみの培地を用いた。各種薬剤濃度は過去の文献を参考に10-300 μ Mに設定した。

SDS-PAGE bufferにて回収し、SDS-PAGE後にCD44細胞内領域に対する抗体を用いたウエスタンブロット法でCD44切断後フラグメント量を比較した。

- (2) スクリーニングに用いた薬剤を Cox2 選択的もしくは非選択的に分類し、Cox 依存性を検討すると共に、現在までに解明されている CD44 切断機構のうち、Ca イオン細胞内流入、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性化経路を確認し、NSAID s の CD44 への作用機序を検討する。

ヒトグリオーマ細胞をDMEM-F12培地で12時間培養後、CD44切断抑制NSAID sを含む培地、さらにCaイオンキレート剤(EGTA)、

PKC阻害剤 (GF109203X) を追加した培地を5時間処理後に回収した。コントロールとして同濃度の溶媒のみの培地を用いた。SDS-PAGE bufferにて回収し、(1)と同様に、ウエスタンブロット法でCD44切断後フラグメント量を比較した。

- (3) で得られた薬剤をヒトグリオーマ細胞に投与し浸潤能を解析する。

ポイデンチャンバー上段ウエルで溶媒のみの培地、CD44 切断抑制 NSAID s を含む培地にてヒトグリオーマ細胞を培養後に下段ウエルに浸潤した細胞数をカウントし、細胞運動に及ぼす NSAID s の影響を解析した。

4 . 研究成果

接着分子 CD44 は癌細胞の増殖能、浸潤・転移能に関与することが多くの研究によって示されている。我々はその機能を制御する機構のひとつとして、カルシウムシグナルや PKC 活性による細胞外領域切断機構に着目し、がんの浸潤・転移を抑制する NSAID s の CD44 連続的切断に対する変化について検討した。

Sulindac sulfide (SS)、Meclofenamic acid (MA) 処理で CD44 切断亢進が確認された。これら薬剤による CD44 連続的切断のうち細胞外領域切断は metalloprotease 阻害剤により、膜貫通領域切断は -secretase 阻害剤により抑制された。また、MA の切断活性は EGTA、PKC 阻害剤では抑制されなかった。これら薬剤処理後、経時的に CD44 の発現動態を検討したところ、scrape 処理では全長蛋白の turn over が確認されたのに対し、NSAIDs 処理では時間経過と共にその発現量は低下した。

NSAIDs による癌転移抑制についてはすでに報告されているが、その分子生物学的機序

はいまだ不明な点が多い。本実験結果は、その癌転移抑制作用の一機序として、接着分子の細胞膜上での切断、及び新規合成の抑制による機能的な接着分子の発現低下を介していることを示唆している。

5．主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6．研究組織

(1)研究代表者

村上 大造 (MURAKAMI DAIZO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70398212

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし