

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 4 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009～2011

課題番号：21591003

研究課題名（和文） CD44 を標的とした中皮腫抗がん剤耐性機構の解明と治療戦略

研究課題名（英文） Mechanism of multidrug resistance in mesothelioma cells, and the treatment strategy targeting CD44

研究代表者

高橋 和久 (Kazuhisa Takahashi)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：80245711

研究成果の概要（和文）：

悪性中皮腫は胸腹膜などを原発とする極めて予後不良の悪性腫瘍であり、各種抗癌剤に対して耐性であることが知られている。一方、悪性胸膜中皮腫の組織、胸水中には以前からヒアルロン酸 (Hyaluronic acid; HA) やオステオポンチン (Osteopontin; OPN) が豊富に存在し、ともに CD44 のリガンドであることから、中皮腫に発現する CD44 と HA および OPN との相互作用は中皮腫の病態に深く関与していると考えられる。我々はヒト中皮腫細胞株である ACC-MESO-1 に OPN 遺伝子の導入を行い、OPN 強発現 ACC-MESO-1/OPN を樹立した。ACC-MESO-1/OPN は著明に各種抗癌剤に耐性を示し、HA への接着も亢進した。また ACC-MESO-1/OPN では HA との接着を低下させる exon 14 (V10) を含む High Molecular weight CD44 が著明に減少しており、ACC-MESO-1 での CD44 V10 の knockdown は各種抗癌剤耐性を誘導した。CD44 や OPN の knockdown や CD44 中和抗体を用いた CD44 - HA 相互作用の阻害は ACC-MESO-1/OPN の各種抗癌剤への多剤耐性を減弱させた。また ACC-MESO-1/OPN では AKT のリン酸化も亢進しており、CD44 knockdown によりこの AKT リン酸化は抑制され、AKT 阻害剤により OPN による抗癌剤多剤耐性は reverse した。OPN は CD44 の HA への接着を亢進させ、CD44 を介して AKT pathway を活性化させて抗癌剤多剤耐性に関与していることが示唆された。CD44 と OPN および HA との相互作用の阻害は悪性中皮腫の有効な治療戦略の一つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is resistant to chemotherapy and thus shows a dismal prognosis. Osteopontin (OPN) and hyaluronate (HA), both of which are CD44 ligands, are highly detected in the pleural effusion and tissues of MPM, and suggested to be involved in the pathogenesis of MPM. However, the precise role of CD44, OPN, and HA, especially in the multidrug resistance of MPM, remains to be elucidated. We therefore established stable transfectants (ACC-MESO-1/OPN) of human mesothelioma cell line, which constitutively express OPN, to determine its role in the chemoresistance observed in MPM. The introduction of the OPN gene provides MPM cells with upregulated multidrug resistance through the mechanism of enhanced HA binding. The expression of CD44 variant isoforms, which inhibit HA binding, significantly decreased in ACC-MESO-1/OPN cells in comparison to control transfectants. Interestingly, the inhibition of the HA-CD44 interaction abrogated multidrug resistance in the ACC-MESO-1/OPN, thus suggesting the involvement of the surviving signal emanating from the HA-CD44 interaction. An enhanced level of the p-Akt in ACC-MESO-1/OPN cells was observed, and was diminished by CD44 siRNA. Inhibition of the Akt phosphorylation increased in number of the cells underwent apoptosis induced by chemotherapeutic drugs, such as NVB, VP-16 and GEM. Collectively, these results indicate that OPN is strongly involved in multidrug resistance by enhancing the CD44 binding to HA.

Inhibition of interaction between CD44, OPN, and HA, may be one of the promising treatment strategy for patients with MPM.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科

キーワード：悪性中皮腫、抗癌剤多剤耐性、CD44、オステオポンチン、ヒアルロン酸

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫はアスベストを原因とする胸腹膜などを原発とする予後不良の悪性腫瘍であり、今後日本において増加することが予想されている。しかし多くの症例が手術不能例であり、その内科的治療成績の向上が望まれている。中皮腫に対する化学療法は pemetrexed と CDDP の併用が標準的治療とされるが (J Clin Oncol 2003; 21: 2636-44)、中皮腫は一般的に抗がん剤耐性であり、悪性中皮腫の病態に基づく抗癌剤耐性克服が求められている。

癌細胞の抗癌剤耐性には、腫瘍を取り巻く微小環境、特に間質が抗がん剤の感受性に大きく影響を与えることが明らかになっているが (Nat Med 1999; 5:662-8)、悪性中皮腫は特異的微小環境下で増殖することが知られている。すなわち胸水中にはヒアルロン酸 (HA) やオステオポンチン (OPN) などの細胞外マトリックス (ECM) が豊富であることから (Cancer 2001; 92:1224-30)、ECM が中皮腫の in vivo での進展に深く関与し、治療反応性に影響を与えていることは想像に難くない。実際、胸水中 HA や血清 OPN は中皮腫の診断に有用との報告 (N Engl J Med 2005; 353: 1564-73) から、これら ECM の中皮腫病態への関与が示唆されている。従って、この難治性疾患である中皮腫の治療戦略を考える場合、微小環境、特に ECM との会合を阻害する治療法の開発が必須である。HA や OPN などの ECM はともに膜貫型蛋白 CD44 を受容体とすることから、中皮腫細胞表面に発現する CD44 は中皮腫の理想的標的分子と考えられる。しかし現在までに、CD44 を治療標的とした報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1) 悪性中皮腫の細胞機能および抗癌剤耐性に及ぼす CD44 と、そのリガンドである OPN, HA の役割の解析、2) OPN, HA 共通の受容体である CD44 を分子標的とした抗がん剤耐性克服に関する基礎的検討を行うことである。具体的には in vitro において、CD44 がリガンドと結合することで抗がん剤に対してより耐性化するかを観察し、耐性化した場合は CD44 の機能を阻害することによって抗がん剤耐性の感受性化を試みる。また、CD44 のリガンドである HA および OPN の機能抑制もあわせて行うことで強固に CD44 を介する抗がん剤耐性シグナルを阻害し、より強い抗がん剤の感受性化を図る。

3. 研究の方法

CD44 リガンドである OPN の遺伝子導入株の作成 ヒト中皮腫細胞株は、愛知がんセンター 関戸博士より供与して頂き ACC-MESO-1 (肉腫型) を用いた。また OPN の遺伝子導入には、OPN cDNA を組み込んだ BMG-Neo 発現ベクター (BMG-Neo-OPN) を用いた。

中皮腫細胞株の HA、OPN に対する細胞接着性に関する検討 HA, OPN を固相化した 96-well plate を用い細胞接着試験を行う。細胞接着の阻害効果は抗 CD44 抗体を用いる。また HA および OPN との接着による抗がん剤感受性に及ぼす影響も検討する。

抗がん剤感受性に及ぼす影響

上記細胞 (parent, transfectants) を用いて、cisplatin (CDDP), gemcitabine (GEM),

vinorelbine (VNR), VP-16 に対する抗がん剤感受性試験を行う。また HA, OPN を添加、あるいは固相化し、抗がん剤に対して耐性を示すかについても検討する。

CD44 と CD44 アイソフォームの発現検討

RT-PCR, Western blot, FACS など CD44 アイソフォームの発現検討を行う。

CD44 や OPN の knockdown や CD44 中和抗体を用いた CD44 - HA 相互作用の阻害 siRNA を用いた knockdown や中和抗体を用いて、接着能や抗癌剤耐性に及ぼす影響を検討する。

4. 研究成果

ヒト中皮腫細胞株である ACC-MESO-1(肉腫型)、ACC-MESO-4(上皮型)、Y-MESO-14(二相性)、H28(肉腫型)、H2452(上皮型)、MSTO-211H(二相性)における OPN 発現を検討し、OPN 発現を認めない ACC-MESO-1 に BMG-Neo 発現ベクターおよび BMG-Neo-OPN を導入して、ACC-MESO-1/Neo と ACC-MESO-1/OPN を樹立した。ACC-MESO-1/OPN の OPN 強発現は、RT-PCR および ELISA で確認した。OPN 遺伝子導入により ACC-MESO-1 の HA への接着は亢進し、抗癌剤 CDDP に対しては耐性を示さなかったが、GEM, NVB, VP-16 に対しては耐性を示した。また CD44 variant isoform を検討したところ、ACC-MESO-1/OPN では HA との接着を低下させる exon 14 (V10) を含む High Molecular weight CD44 が著明に減少していた。また興味深いことに、ACC-MESO-1 での CD44 V10 の knockdown は各種抗癌剤耐性を誘導した。siRNA による CD44 や OPN の knockdown や、CD44 中和抗体を用いた CD44 - HA 相互作用の阻害は、ACC-MESO-1/OPN の各種抗癌剤への多剤耐性を減弱させた。また ACC-MESO-1/OPN では AKT のリン酸化も亢進しており、CD44 knockdown はこの AKT リン酸化を抑制した。AKT 阻害剤により OPN による抗癌剤多剤耐性も reverse したことから、OPN は CD44 の HA への接着を亢進させ、CD44 を介して AKT pathway を活性化させて抗癌剤多剤耐性に関与していることが示唆された。CD44 と OPN および HA との相互作用の阻害は、悪性中皮腫の有効な治療戦略の一つと考えられる。臨床応用を考えて In vivo マウスモデルの作成も試みたが、現在のところ構築できていない。今後は NOG 高度免疫不全マウスも用いて、OPN 強発現中皮腫細胞株である ACC-MESO-1/OPN でマウス中皮腫モデル作成を試みる予定である。現在までに得られた我々のデータは CD44 と OPN および HA の相互作用を標的とした治療戦略は、悪性中皮腫の抗癌剤耐性克服に有用であることを示唆しており、In vivo マウスモデルの早急な確立と治療実験を目

指している。

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)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Tajima K, Ohashi R, Takahashi K et al.
Osteopontin-mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells.
Oncogene 29(13):1941-51. (2010) 査読有

2. Ohashi R, Tajima K, Takahashi K, et al.
Osteopontin modulates malignant pleural mesothelioma cell functions in vitro
Anticancer Res 29(6):2205-14. (2009) 査読有

[学会発表] (計 3 件)

1. Tajima K, Ohashi R, Takahashi K, et al.
Osteopontin mediated enhanced hyaluronan binding induces multidrug resistance in mesothelioma cells.
104th American Thoracic Society (ATS), San Diego, USA, May 19, 2009

2. Ohashi R, Takahashi K, et al.
Role of osteopontin in malignant pleural mesothelioma cell line.
102th American Thoracic Society (ATS), San Francisco, USA, May 23, 2007

3. Ohashi R, Takahashi F, Takahashi K et al.
Expression of osteopontin and CD44 in malignant pleural mesothelioma cell lines (poster session).
11th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR). Japan, Nov 21, 2006

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 和久 (Kazuhisa Takahashi)
順天堂大学・医学部・教授
研究者番号：80245711

(2) 研究分担者

鈴木 勉 (Tsutomu Suzuki)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：40206503