

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591912

研究課題名(和文) 癌におけるCD44を介したROS制御機構の解明と治療への応用

研究課題名(英文) The identification of functional role of CD44 in redox status and the application to therapeutic strategy in cancer

研究代表者

石本 崇胤 (ishimoto, takatsugu)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00594889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：腺癌および扁平上皮癌の腫瘍増大のみならず転移巣形成においてもCD44vはシスチントランスポーターであるxCTタンパク質との相互作用により癌細胞の酸化ストレス抵抗性を亢進させることを見出した。固形癌の原発巣だけでなく循環癌細胞であるCirculating Tumor CellにおいてもCD44/xCT相互作用が、重要な機能を果たすことを示した。さらにCD44発現を制御するmicroRNAとしてmiR-328を同定し、胃癌の発癌・進展における意義を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CD44v-xCT plays a key role in the maintenance of undifferentiated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) tumors rather than differentiated-type HNSCC tumors, and confers the ability of evasion from oxidative stress in several types of cancer and thereby promotes the lung metastasis. Furthermore, microRNA qRT-PCR array analysis identified miR-328 as one of the microRNAs targeting CD44 in gastric cancer. miR-328-CD44 signaling mediated by chronic inflammation is implicated in gastric cancer development and progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：CD44 xCT microRNA CTC 消化器癌

1. 研究開始当初の背景

癌は多様性のある不均一な細胞集団であり、階層性の頂点に位置する癌幹細胞は抗癌剤・放射線治療に対する抵抗性や再発に深く関わることが広く知られている。我々は主要な癌幹細胞マーカーである CD44 バリエーションアイソフォーム (CD44v) が、シスチントランスポーターの light subunit である xCT を細胞膜上に安定化させ、癌細胞内の活性酸素 (ROS) を抑制することを見出している。しかし、CD44v による ROS 制御システムが利用されている癌種および組織型、原発腫瘍の増殖から遠隔転移形成までの癌進展機序のうち、どのステップに寄与しているのか、など多くの点が不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで明らかになった CD44 による ROS 制御システムが利用されている癌種および組織型、癌進展のステップを明らかにすること。更には癌進展過程におけるエピジェネティックな CD44 発現制御の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 腺癌、扁平上皮癌など組織型が異なる癌細胞および高転移性細胞株を用いた腫瘍・転移形成能の解析、さらには胃癌自然発症マウスモデル (K19-Wnt1/c2mE) に対する xCT 分子を標的とした治療効果について生体レベルでの評価をおこなった。

(2) 消化器癌術後組織や血液検体からの癌幹細胞分画の分取および免疫不全マウスへの移植をおこない、癌幹細胞マーカー陽性 CTC (circulating tumor cell) の腫瘍形成能について解析をおこなった。

(3) 癌幹細胞のマーカーについて細胞株及び切除組織検体での蛋白発現解析をおこなうと同時に microRNA の発現について miRNA PCR Array を用いて網羅的に解析し癌幹細胞に特異的な microRNA ならびに標的遺伝子を同定した。網羅的な解析の結果、候補となった microRNA について標的遺伝子 3' UTR への結合能 (luciferase assay)、タンパク質発現制御、増殖・抗がん剤抵抗性など機能解析をおこなった。

4. 研究成果

(1) CD44v/xCT 相互作用による ROS 制御システムは胃癌、大腸癌、乳癌、口腔扁平上皮癌など癌種・組織型を越えて利用され腫瘍増大、治療抵抗性に寄与していた。更に CD44 mRNA の選択的スプライシング制御因子である ESRP1 を介した CD44v の発現は、原発腫瘍の増大だけでなく転移の過程で蓄積される ROS に対しても抵抗性を高め、肺転移巣の形成を促進することが分かった。

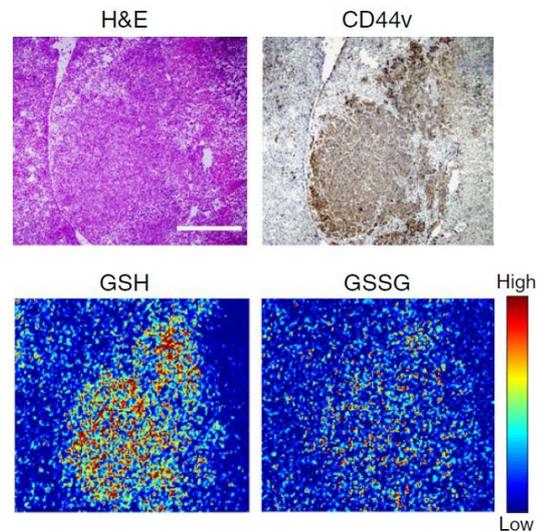


図 1: CD44v 陽性肺転移巣における抗酸化物質 (グルタチオン) の発現

(2) 消化器癌患者の末梢血中に存在する CTC の分離をおこない、免疫不全マウスへの移植継代をおこなった。腫瘍の細胞分画解析の結果、CD44 陽性 CTC は xenograft model における腫瘍形成能が高い事ならびに循環癌細胞である CTC においても CD44/xCT 相互作用が重要な機能を果たすことを示した。

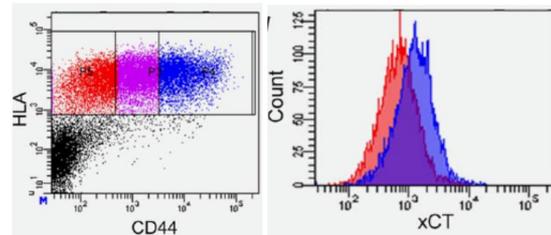


図 2: CTC における CD44 および xCT 発現解析

(3) エピジェネティックな CD44 発現制御メカニズム同定の為、miRNA PCR Array を用いた網羅的な解析により CD44 発現を制御する microRNA として miR-328 を見出した。更に腫瘍間質中に存在するマクロファージが産生する活性酸素により癌細胞の miR-328 発現が低下、その結果 CD44 発現が誘導される事を明らかにした。この発現制御メカニズムを介して高発現する CD44 は癌幹細胞としての性質獲得や維持に働いているだけでなく、胃癌の背景粘膜である化生胃粘膜上皮においても高発現しており、ヘリコバクターピロリを介した胃癌の発癌過程にも深く関わる可能性が示された。胃癌自然発症マウスモデル、肺転移モデルを用いた解析結果から CD44 は発癌から転移巣形成の過程で多くのステップに関与しており、CD44 並びにその関連分子は癌治療・予防における治療標的としての意義が大きい事が示唆された。

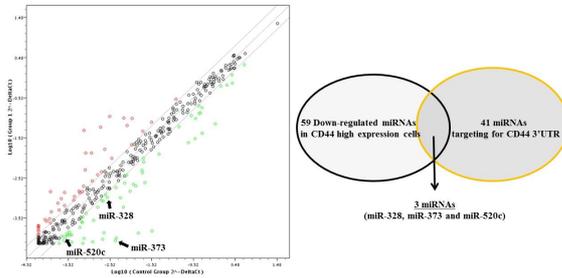


図3: miRNA PCR Array による CD44 発現を制御する microRNA の同定

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 8 件)

1. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H and Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat. Commun.* (査読有り) 2012 Jun 6;3:883.
2. Masuko K, Okazaki S, Satoh M, Tanaka G, Ikeda T, Torii R, Ueda E, Nakano T, Danbayashi M, Ohno Y, Yagi H, Yabe N, Yoshida H, Tahara T, Kataoka S, Oshino T, Shindo T, Niwa S, Ishimoto T, Baba H, Hashimoto Y, Saya H and Masuko T: Anti-Tumor Effect against Human Cancer Xenografts Elicited by a Fully Human Monoclonal Antibody to a Variant 8-Epitope of CD44R1. *PLoS One.* (査読有り) 2012;7(1) 2012 Jan 17
3. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H and Nagano O: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to

EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* (査読有り) 73: 1855-1866, 2013

4. Kinoshita H, Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Ishimoto T, Miyake K, Yokoyama N, Ishiko T, Baba H: Cystine/glutamic acid transporter is a novel marker for predicting poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* (査読有り) 29: 685-9, 2012
5. Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright NA, Furuhashi S, Hirashima K, Baba H, Kitagawa Y, Saya H, Nagano O: Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia. *Cancer Sci.* (査読有り) 2013 Oct;104(10):1323-9.
6. Ishimoto T, Sugihara H, Watanabe M, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Okabe H, Hidaka K, Yokoyama N, Miyake K, Yoshikawa M, Nagano O, Komohara Y, Takeya M, Saya H, Baba H: Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in cancer cells and promote redox adaptation. *Carcinogenesis* (査読有り) 35(5):1003-11, 2014.
7. Ishimoto T, Izumi D, Watanabe M, Yoshida N, Hidaka K, Miyake K, Sugihara H, Sawayama H, Imamura Y, Iwatsuki M, Iwagami S, Baba Y, Horlad H, Komohara Y, Takeya M, Baba H: Chronic inflammation with Helicobacter pylori infection is implicated in CD44 overexpression

through miR-328 suppression in the gastric mucosa. *J Gastroenterol* (査読有り) (in press)

8. Toyoshima K, Hayashi A, Kashiwagi M, Hayashi N, Iwatsuki M, Ishimoto T, Baba Y, Baba H, Ohta Y: Analysis of circulating tumor cells derived from advanced gastric cancer. *Int J Cancer* (査読有り) (in press)

[学会発表](計 11 件)

1. 石本崇胤、治療抵抗性がん癌幹細胞に対する新しい治療戦略、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012/4/13、千葉
2. 石本崇胤、腫瘍微小環境における癌幹細胞マーカーの発現制御、第 67 回日本消化器外科学会、2012/7/20、富山
3. 石本崇胤、消化器癌における酸化ストレス抵抗性を獲得する分子メカニズム、2012 年度日本消化器関連学会週間(JDDW 2012)、2012/10/13、神戸
4. 石本崇胤、消化器癌における癌幹細胞マーカー発現制御機構の解明、第 23 回日本消化器癌発生学会、2012/11/15、徳島
5. Ishimoto T, Tumor-associated-macrophage induces CD44 expression through microRNAs suppression promotes cancer progression and chemoresistance, AACR Annual Meeting 2013, 2013/4/10, Washington, DC
6. 石本崇胤、消化器癌幹細胞における CD44 の機能的役割と発現制御、第 113 回日本外科学会、2013/4/11、福岡
7. Ishimoto T, CD44 expression via miR-328 suppression in Helicobacter pylori infected gastric mucosa causes cancer initiation and progression, 10th IGCC Congress, 2013/6/20, Verona
8. 石本崇胤、消化器癌において癌幹細胞マーカーを制御する microRNA の同定と機能解析、第 68 回日本消化器外科学会、2013/7/17、宮崎
9. 石本崇胤、消化器癌における microRNA を介した CD44 発現制御の解明、第 51 回日本癌治療学会学術集会、2013/10/25、京都
10. Ishimoto T, Macrophage-derived reactive oxygen species suppress miR-328 targeting CD44 in gastrointestinal cancer cells and promote redox adaptation, AACR Annual Meeting 2014, 2014/4/7, California
11. 石本崇胤、消化器癌における CD44 発現制御機構を標的とした治療戦略、第 114 回日本外科学会定期学術集会、2014/4/5、

京都
[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石本 崇胤 (ISHIMOTO, takatsugu)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00594889

(2) 研究分担者

岩槻 政晃 (IWATSUKI, masaaki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50452777

(3) 研究分担者

別府 透 (BEPPU, toru)
熊本大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：70301372