

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26830114

研究課題名(和文) 悪性中皮腫治療に向けたCD26による細胞運動・浮遊増殖能獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells.

研究代表者

古宮 栄利子 (Komiya, Eriko)

順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・博士研究員

研究者番号：90647009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：悪性胸膜中皮腫(MPM)は、胸膜に裏打ちされた中皮細胞から発生する侵襲性の高いがんである。一般的にアスベスト暴露歴との関連が知られているが予後が悪く、悪性化の分子メカニズムの解明が遅れている。本研究では、CD26の発現上昇とMPM細胞運動能の促進について、インテグリン接着因子に着目して研究を行った。その結果、CD26がペリオスチンの発現上昇を引き起こし、MPMの遊走・浸潤能を亢進することが示された。またペリオスチンの発現上昇は、CD26がSrcをリン酸化し、転写因子Twist 1の核内移行を促進した結果であることを示した。以上の結果は、MPMの新たな治療戦略に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Malignant pleural mesothelioma (MPM) is an aggressive malignancy arising from mesothelial lining of pleura. It is generally associated with a history of asbestos exposure and has a very poor prognosis, partly due to the lack of a precise understanding of the molecular mechanisms associated with its malignant behavior. In the present study, we expanded on our previous studies on the enhanced motility and increased CD26 expression in MPM cells, with a particular focus on integrin adhesion molecules. We found that expression of CD26 upregulates periostin secretion by MPM cells, leading to enhanced MPM cell migratory and invasive activity. Moreover, we showed that upregulation of periostin expression results from the nuclear translocation of the transcription factor Twist1, a process that is mediated by CD26-associated activation of Src phosphorylation. These findings may lead to the development of novel therapeutic strategies for MPM.

研究分野：腫瘍学

キーワード：CD26 periostin 細胞遊走 浸潤 転写調節

1. 研究開始当初の背景

悪性中皮腫は難治性のがんである。現在の治療法をもってしても、生存期間中央値は約一年と短い。また潜伏期間が長く、わが国での発症数のピークは 2030 年頃と考えられている。世界的にも患者数が増加しており、悪性中皮腫に対する治療法の確立は急務である。

以上の背景から、申請者の所属研究室では悪性中皮腫の分子標的治療薬の創製に向けて研究を行っている。所属研究室が標的としている CD26 は、同グループが同定した細胞表面抗原であり、正常組織に比べ悪性胸膜中皮腫に顕著に高発現している。同グループが開発したヒト化抗 CD26 抗体 YS110 は、マウスモデルにおいて、中皮腫治療薬としての有用性 (抗腫瘍作用) を示す (Clin. Cancer Res. 2007)。現在、YS110 の臨床応用に向け、既にフランスでの臨床試験を終え、日本での臨床試験が行われている。

ヒト化抗 CD26 抗体 YS110 は、現在中皮腫への第一選択薬であるシスプラチン・ペメトレキセドの併用療法などと同様、増殖抑制作用を示す。さらに他の中皮腫治療薬とは異なり、抗体依存性細胞障害 (ADCC) 活性免疫系を介した抗腫瘍活性および補体依存性細胞障害活性 (CDC) を示し、CD26 を認識した抗体が免疫系による攻撃を受けることでがん細胞を殺傷する (Clin. Cancer Res. 2007)。よって YS110 は中皮腫治療薬の中でも特に優れた抗腫瘍活性が期待される。

これまでの研究から、CD26 は *in vitro* (遊走実験)、マウスにおける *in vivo* 実験においてがん浸潤を促進しており、YS110 が浸潤抑制作用を有することも示されている。しかしながら、CD26 が浸潤・転移を促進する機序は不明な点が多く、YS110 の臨床応用の際に不安要素になりうる。

申請者は予備実験において、無血清培養条件における CD26 強制発現株が、非発現細胞よりも接着能が低いことを見出した(図 1)。更に同株は、耐寒天培地条件において、浮遊増殖能を亢進させた (図 2)。これらの検討結果より、申請者は、CD26 が中皮腫株の細胞接着を低下させ、反対に足場非依存的な条件での細胞運動能を亢進させることにより、悪性中皮腫の浸潤・転移や浮遊増殖性を亢進しているのではないかと考えた。

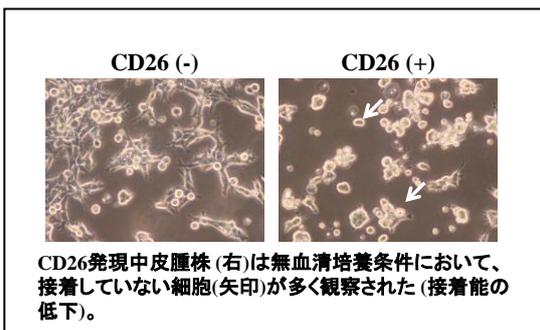


図 1 CD26 発現中皮腫株の接着能低下

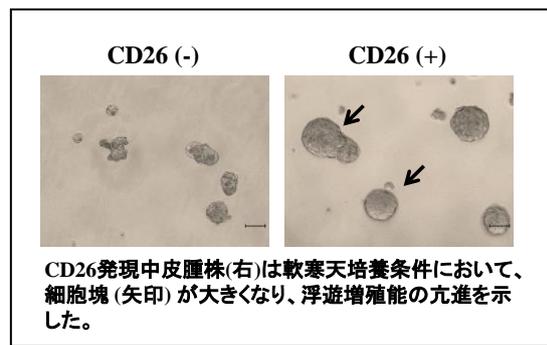


図 2 CD26 発現中皮腫株における浮遊増殖能の亢進

2. 研究の目的

上記の背景の下、ヒト化抗 CD26 抗体 YS110 を臨床適応する際の詳細な分子基盤の確立を目指し、CD26 が悪性中皮腫の浸潤・転移を促進する機序を分子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

悪性中皮腫細胞株として、MSTO-211H (MSTO) 株および JMN 株を使用した。CD26 強制発現系として、MSTO 株に完全長 CD26 および CD26/CD10 キメラ体、およびコントロールベクターを恒常的に発現させた、CD26MSTO 株、CD26 キメラ株、CtlMSTO 株を使用した。また CD26 ノックダウン系として、CD26 を内在的に発現している JMN 株に 2 種類の CD26shRNA ベクターおよび 1 種類のコントロール sh ベクターをそれぞれ恒常的に発現させ、shCD26JMN 株および cshJMN 株を確立して使用した。全ての細胞株は、通常 10% 血清 RPMI1640 培地にて培養した。

(2) ペリオスチンのノックダウン

Sigma-Aldrich 社より 2 種のペリオスチン siRNA を購入し、 $4 \times 10^4$  cells/well にて播種した悪性中皮腫株に添加した。添加後翌日に細胞遊走実験および浸潤実験に使用した。両 siRNA とともに、3 日以上ノックダウン効果があることを確認した。

(3) 細胞遊走実験・浸潤実験

細胞遊走実験は、ノンコート の 24-well transwell chamber (8  $\mu$ m pore, costar 社) を使用した。Transwell chamber の下層に 0.75 ml の 10% 血清入り RPMI1640 培地を添加し、上層に 0.1% 血清入り RPMI1640 培地にて  $1 \times 10^5$  cells/ml に調整した各種悪性中皮腫株を 0.5 ml 添加した。浸潤実験には、マトリゲルコートした 24-well transwell chamber (BD Bioscience 社) を使用し、細胞遊走実験と同様の細胞濃度・血清条件で細胞を播種した。播種後、細胞遊走実験は 2 日、浸潤実験は 1 日後に細胞を固定し、ディフクイック染色によって遊走・浸潤した細胞数を比較した。

#### (4) 血清飢餓条件における生存実験

各種悪性中皮腫株を 0 もしくは 0.1% 血清条件にて播種し、5~6 日目に生存細胞を定量した。細胞は、 $2.5 \times 10^5$  cells/well の細胞濃度にて低吸着 24-well プレート (IWAKI 社) または単層培養用 24-well プレート (Costar 社) へ播種し、血球板を用いて計数した。もしくは 96-well プレート (Nunc 社) に  $3 \times 10^4$  cells/well の細胞濃度にて播種し、6 日後に Cell counting kit を用いて吸光度を定量した。

#### (5) ウェスタンブロット (細胞溶解液の調製)

Twist1 の細胞内分布の観察では、核分画、細胞質分画を専用キットにより調整し、ウェスタンブロットに供した。Src の発現観察では、RIPA バッファーを用いて全細胞分画の細胞溶解液を調製した。もしくはショ糖密度勾配遠心法を用いて細胞質分画と脂質ラフト分画に分け、ウェスタンブロットのサンプルとした。各種生存シグナルおよびアポトーシス関連因子のウェスタンブロットでは、24-well プレートへ無血清条件にて播種した 6 日後に、形成されたスフェロイドを回収して RIPA バッファーにて細胞溶解液を調製し、ウェスタンブロットへ供した。

#### (6) 定量的リアルタイム PCR

RLT バッファーを加えて各種細胞を溶解後、Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen 社) を用いてトータル RNA を抽出した。逆転写反応は PrimeScript RT reagent kit (Takara 社) を用いた。定量的リアルタイム PCR は Applied Biosystems Fast Real-time PCR (Applied Biosystems 社) にて解析した。内在性コントロールとして hypoxanthine phosphoribosyl-transferase 1 (HPRT1) を使用した。

#### (7) 統計学的処理

全ての統計解析は Prism6.0 software (GraphPad Software 社) を用いて行った。全てのデータは Tukey-Kramer post-hoc test 後 one-way または two-way ANOVA にて解析し、 $p < 0.05$  以下を有意差ありと判定した。

### 4. 研究成果

CD26 が細胞接着能の低下により浮遊増殖能の亢進を引き起こしているかを評価するため、低吸着プレートを用いて 10% 血清条件下で培養したところ、CD26 強制発現株 (CD26MSTO) と非発現株の浮遊増殖能の間に有意な差は観察されなかった。一方、同プレートに悪性中皮腫株を血清飢餓条件で培養すると、CD26 発現株は非発現株よりも生存能を亢進することが示された。これらの結果より、CD26 は細胞接着能の低下、もしくはそれによる細胞運動能の獲得によってではなく、栄養飢餓状態におけるがん細胞の生存能を亢進させることでその増悪に寄与していることが示唆された。そこで申請者は、細胞運動性の促進作用から離れ、マイクロア

レイの結果から、当初からの目的である① CD26 が悪性中皮腫の浸潤・転移を亢進するメカニズムの解明を行った。さらに、② CD26 が栄養飢餓条件において悪性中皮腫の生存能を亢進させるメカニズムについても解明を試みた。

#### ① CD26 が悪性中皮腫の浸潤・転移を亢進するメカニズムの解明

申請者は、既に行われていたマイクロアレイの結果から、CD26 の発現により最も発現が上昇した接着/遊走関連因子 (分子) として、ペリオスチンに着目した。ペリオスチンは、約 90kDa の細胞外タンパク質で、インテグリンを介した細胞遊走促進作用が広く知られている。そこで申請者は、ペリオスチンの発現上昇が、CD26 の発現を介した浸潤・転移能の促進に重要な役割を果たしている可能性に着目し、そのメカニズムの解明を行った。

まず CD26 強制発現 MSTO 株および、CD26 を内在的に発現している JMN 株において、ペリオスチンをノックダウンしたところ、細胞遊走実験および浸潤実験 (マトリゲルコート) において、有意な遊走・浸潤能の低下が観察された (図 3)。この結果より、ペリオスチンの発現が、CD26 発現悪性中皮腫細胞の浸潤能に大きく寄与していることが示された。

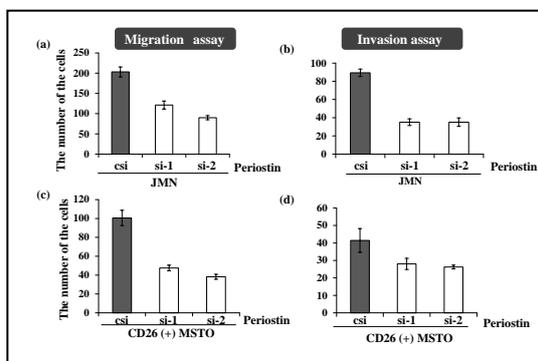


図 3 CD26 発現中皮腫株の細胞遊走能・浸潤能におけるペリオスチンノックダウンの影響

そこで次に、CD26 の発現がペリオスチンの発現を制御しているかを検証した。CD26 強制発現系 (CD26MST 株) および、内在的 CD26 発現細胞からのノックダウン系 (shCD26JMN 株) 双方において、リアルタイム PCR および ELISA を行ったところ、ペリオスチンの発現は mRNA レベルとタンパク質レベルともに、CD26 の発現と正の相関を示して増減していた。更に、CD26 の細胞内ドメインを CD10 の配列に置換した、キメラ CD26 発現 MSTO 株では、ペリオスチンの発現上昇は観察されなかった (図 4)。以上の結果より、悪性中皮腫細胞において CD26 は、mRNA レベルからペリオスチンの発現を正

に調節していること、その調節には CD26 の細胞内ドメインが関与していることが示された。

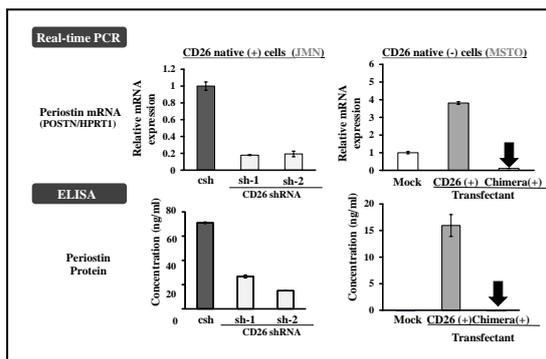


図4 CD26の発現調節によるペリオスチンの発現変動

次に、CD26がペリオスチンの mRNA 発現を促進するメカニズムを明らかにするため、ペリオスチンの転写因子との報告のある Twist1 に着目した。Twist1 は活性化されると、核内に移行して転写を促進することが知られている。そこで、上述の CD26 強制発現株 (MSTO) およびノックダウン株 (JMN) について、細胞質と核分画に分け、Twist1 抗体によりウエスタンブロットを行った。その結果、CD26 の発現が高い株 (CD26MSTO および CtlJMN 株) において、Twist1 の核分画への集積が観察された。一方、CD26 キメラ株では、Twist1 の発現は主に細胞質分画に観察された。以上から、CD26 の高発現により、Twist1 の核内移行が促進され、Twist1 によってペリオスチンの転写が促進されていることが示唆された。また、Twist1 の核内移行は、CD26 の細胞内ドメインを介して促進されていると考えられた。

さらに、Twist1 の上流因子として Src に着目した。Src インヒビター PP2 を上記 2 種の CD26 発現悪性中皮腫株に添加したところ、核内分画の Twist1 の発現が減少し、細胞質分画で上昇していた。同時にリアルタイム PCR と ELISA の結果から、上述の CD26 発現株 2 種において、PP2 はペリオスチンの発現を抑制することも示された。以上から、悪性中皮腫において Twist1 は Src によって核内移行され、ペリオスチンの転写を促進していることが示唆された。

最後に、CD26 と Src の相互作用について解明を行った。CD26 強制発現株およびノックダウン JMN 株をウエスタンブロットにおいて Src リン酸化を調べたところ、完全長 CD26 を発現している株でのみ、リン酸化が観察された。さらにシヨ糖密度勾配遠心分離法を行ったところ、完全長 CD26 発現 MSTO 株では、脂質ラフト分画に CD26 とともにリン酸化 Src が観察されたのに対し、キメラ株では殆ど観察されなかった (図 5)。従って CD26 は脂質ラフト上にて Src と共局在し、

細胞内ドメインを介して Src のリン酸化を促進している可能性が示された。

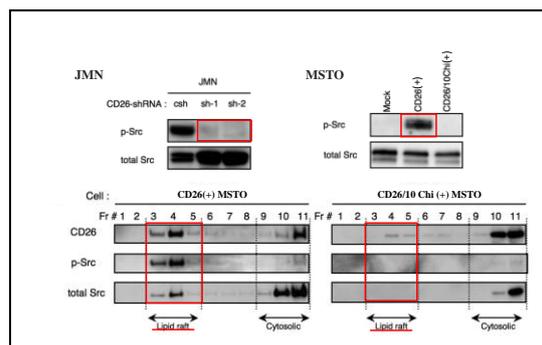


図5 CD26発現悪性中皮腫株における Src のリン酸化

以上の結果より、CD26 は、細胞内ドメインが Src と脂質ラフト上で会合することで、Src リン酸化を促進すると考えられる。リン酸化された Src は Twist1 を活性化して核内への移行を促進し、核内移行した Twist1 がペリオスチンの転写レベルを上昇させると考えられる (図 6)。その結果、ペリオスチンの産生が促進され、悪性中皮腫の遊走・浸潤能が促進されると考えられる。

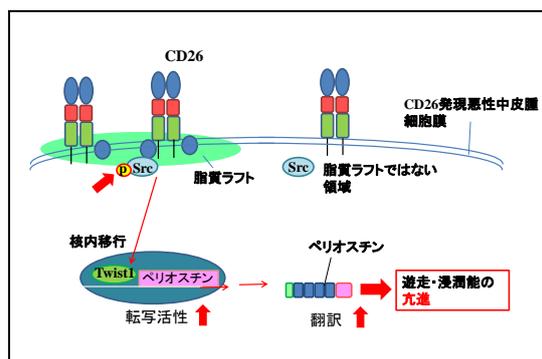


図6 CD26によるペリオスチンの発現上昇を介した遊走・浸潤能の亢進メカニズム

② CD26 が栄養飢餓条件において悪性中皮腫の生存能を亢進させるメカニズムの解明  
 上述したように、CD26 発現株を低吸着プレートで培養しても、その浮遊増殖能は非発現株と同等であったが、血清飢餓条件では MSTO および JMN 両株において、CD26 発現株の方が生存能を顕著に促進させることが示された。また、低吸着用プレートではなく、通常の培養用プレートを用いた場合でも、CD26 発現株は血清飢餓条件において生存能を亢進させた。その際 CD26 発現株では、図 2 に見られるものと類似したスフェロイドの形成が観察された。そこでそのスフェロイドを回収し、各種生存シグナルおよびアポトーシス関連因子をウエスタンブロットにより観察した。その結果、CD26 発現細胞において ERK, MEK, JNK などの生存シグナルが顕著に活性化されていた反面、CD26 の発現の

有無によって Caspase-3 などのアポトーシス関連因子には大きな差は観察されなかった。以上のことから、CD26 はアポトーシスを抑制するのではなく、生存シグナルの活性化により栄養飢餓状態での悪性中皮腫の生存能を亢進していると考えられる。

悪性中皮腫 (悪性胸膜中皮種) は、胸膜内に胸水を貯留し、その中で浮遊増殖してゆく。その胸水は、細胞にとって必ずしも常に栄養豊富な状態とは言いきれない。CD26 はそんな胸水中の栄養飢餓状態において、がん細胞の生存を顕著に亢進し、悪性中皮腫の病態悪化に寄与していると考えられる。

#### 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 5 件)

①Ohnuma K, Hatano R, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Iwao N, Kaneko Y, Yamada T, Dang NH, Morimoto C: A novel role for CD26/dipeptidyl peptidase IV as a therapeutic target in selected immune disorders and cancers. *Front Biosci*. 査読有 23:1754-1779, 2018. doi 10.2741/4671

②Komiya E, Hatano R, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Yamada T, Dang NH, Tominaga M, Suga Y, Kimura U, Takamori K, Morimoto C, Ohnuma K: A possible role for CD26/DPPIV enzyme activity in the regulation of psoriatic pruritus. *J Dermatol Sci*. 査読有 86:212-221, 2017. doi 10.1016/j.jdermsci.2017.03.005

③Nomura S, Iwata S, Hatano R, Komiya E, Dang N H, Iwao N, Ohnuma K, Morimoto C: Inhibition of VEGF-dependent angiogenesis by anti-CD82 monoclonal antibody 4F9 through regulation of lipid raft microdomains. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 474:111-117, 2016. doi 10.1016/j.bbrc.2016.04.081

④Hatano R, Ohnuma K, Otsuka H, Komiya E, Taki I, Iwata S, Dang N.H, Okumura K, Morimoto C: CD26-Mediated Induction of EGR2 and IL-10 as Potential Regulatory Mechanism for CD26 Costimulatory Pathway. *J Immunol*. 査読有 194:960-972, 2015. doi 10.4049/jimmunol.402143

⑤Komiya E, Ohnuma K, Yamazaki H, Hatano R, Iwata S, Okamoto T, Dang N H, Yamada T, Morimoto C: CD26-mediated regulation of periostin expression contributes to migration and invasion of malignant pleural mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 447:609-615, 2014. doi 10.1016/j.bbrc.014.04.037

[学会発表] (計 7 件)

①Komiya E, Hatano R, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Suga Y, Kimura U, Yamada T, Tominaga M, Takamori K, Ohnuma K, Morimoto

C: The regulation of pruritus in psoriasis and atopic dermatitis-a possible role for CD26/DPPIV, 9<sup>th</sup> World congress on itch, October 2017, Wroclaw, Poland.

②Komiya E, Hatano R, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Tominaga M, Takamori K, Ohnuma K, Morimoto C: CD26/DPPIV regulates mechanical itch in a mechanistically distinct manner from chemical itch. 日本研究皮膚科学会 第 42 回年次学術大会・総会, 高知市文化プラザかるぼーと(高知), 2017 年 12 月 15-17 日

③Komiya E, Hatano R, Otsuka H, Itoh T, Yamada T, Tominaga M, Takamori K, Ohnuma K, Morimoto C: CD26/DPPIV-mediated regulation of pruritus in psoriasis. 日本研究皮膚科学会 第 41 回年次学術大会・総会, 仙台国際会議場(仙台), 2016 年 12 月 9-11 日

④古宮 栄利子, 波多野 良, 大塚 春奈, 伊藤 匠, 山田 健人, 富永 光俊, 高森 建二, 大沼 圭, 森本 幾夫: 乾癬において CD26/DPPIV は substance P の切断を促進してかゆみを調節する, 第 31 回日本乾癬学会学術大会, ホテル東日本宇都宮 (宇都宮), 2016 年 9 月 2-3 日

⑤Komiya E, Yamazaki H, Yamada T, Morimoto C: CD26 promotes invasiveness of malignant pleural mesothelioma cell via upregulation of periostin. 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 名古屋国際会議場 (名古屋), 2015 年 10 月 8-10 日

[図書] (計 1 件)

① The use of the humanized anti-CD26 monoclonal antibody YS110 as a novel targeted therapy for refractory cancers and immune disorders, **Advances in Medicine and Biology**: Hatano R, Ohnuma K, Yamada T, Okamoto T, Komiya E, Otsuka H, Itoh T, Yamazaki H, Iwao N, Kaneko Y, Dang NH, Morimoto C., Nova Science Publishers, Inc., New York, 2018

[その他]

招待講演 1 件

①古宮 栄利子: 乾癬において CD26/DPPIV は substance P の切断を促進してかゆみを調節する, 第 12 回 Tokyo scientific forum for Atopic Dermatitis and Psoriasis -乾癬とアトピー性皮膚炎の基礎と臨床を考える会-, 霞山会館(東京), 2016 年 12 月 3 日

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古宮 栄利子 (KOMIYA, Eriko)  
順天堂大学・大学院医学研究科・  
博士研究員  
研究者番号: 90647009