

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06006

研究課題名(和文) イヌ癌幹細胞における放射線耐性能力に関わるCD44バリエーション分子の役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of CD44 variant molecule in radiation resistance ability in canine cancer stem cells

研究代表者

佐原 弘益 (Sahara, Hiroeki)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：10260762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCD44バリエーションフォーム、CD44vが多くのイヌ腫瘍組織で発現され、イヌ乳癌細胞での機能解析では、CD44vが内在性抗酸化剤グルタチオン合成を促進し、放射線照射耐性を高めることを明らかにした。さらに、イヌのシスチントランスポーター(xCT)発現を乳癌組織と周辺正常組織で比較すると、腫瘍組織で有意に発現亢進し、イヌ乳癌細胞を使ったxCTの阻害剤の実験から、xCTが酸化ストレス耐性獲得に影響を及ぼすことを明にした。これらの結果は、CD44vとxCTがイヌ腫瘍における放射線治療抵抗性において重要な影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では実際のイヌの腫瘍症例において、CD44バリエーションフォームが存在し、それと相互作用して酸化ストレス耐性を獲得するとされるxCT分子の腫瘍組織での発現を見いだしたのは、本研究が初めてである。その成果は国際学術雑誌であるVet. Med. Sci., 2021, 7: 577-585.にも掲載された。そして本知見は放射線治療の抵抗性に関するものと関連し、獣医癌治療の改善にも寄与することが考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, CD44 variant form, CD44v, was expressed in canine tumor tissues, and functional analysis by using canine breast cancer cells showed that CD44v induces synthesis of the endogenous antioxidant glutathione and increased radiation resistance. Furthermore, when the gene expression of canine cystine transporter (xCT) was compared between breast cancer tissue and surrounding normal tissue, it was significantly upregulated in tumor tissue, and xCT was found to be resistant to oxidative stress from experiments with xCT inhibitors using canine breast cancer cells. These results suggest that CD44v and xCT have important effects on radiotherapy resistance relating in oxidative stress in canine tumors.

研究分野：腫瘍学

キーワード：CD44 癌 放射線治療 xCT イヌ

## 研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトなどの癌組織を構成する癌細胞は遺伝的に均質な細胞集団(Homogenous)ではなく、Heterogenicity な状態にあり、その中でも癌幹細胞は自己複製能と多種類の癌に分化しうる 分化能を持つ細胞を非平衡的に産生することが知られている。そして癌幹細胞は抗ガン剤耐性と放射線耐性の能力をもち、癌の再発の主原因となっている。よって、いかなる治療法においても、癌幹細胞を標的にすることができなければ癌の完治は望めないとも言える。そしてヒト癌幹細胞において CD44 分子のバリエーションアイソフォーム (CD44v) が高発現し、その分子がシスチントランスポーター (xCT) の機能を亢進することが明らかとなった。すなわち CD44v はシスチンの取り込みを高め、内在性の抗酸化物質 GSH 生合成を亢進させることで、酸化ストレス耐性能力を獲得し、抗がん剤や放射線耐性能力を高めていることが明らかとなった。

そこで、イヌにおいても、ヒト癌幹細胞のように CD44v が発現し酸化ストレス耐性に寄与している否かが課題であった。そこで我々は本研究の準備として、イヌ乳癌細胞株においても CD44v が発現している否かを調べた結果、発現していることが明らかとなった。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では以下の3つの項目を中心に解析した。

- 1) イヌ乳癌細胞で発現していた CD44v の発現と GSH 生合成の亢進における xCT との分子相互作用を検討する。
- 2) 抗イヌ CD44v8-10 モノクローナル抗体を作成して、イヌ癌組織標本における免疫組織化学的検索に基づいて、癌の進行度と CD44v8-10 の発現の関係、発現強度と予後の関係を検討する。
- 3) CD44v8-10 非依存的 xCT 機能亢進における分子機構を検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) の研究課題における方法と結果

まずは CD44v の発現形態を7種類、乳癌、口腔扁平癌、メラノーマ、肥満細胞腫、軟部組織肉腫、血管肉腫、リンパ腫における腫瘍組織とその腫瘍辺縁正常組織、39 症例 (外科的切除サンプル) を用いて調べた。その結果、腫瘍辺縁正常組織における CD44v の発現は 37 例中 2 例であったのに対して、腫瘍組織では 37 例中 17 例に発現が認められた。これらの結果は、癌化に伴って CD44v の発現が誘発されることを示唆するものであった。次に癌化に伴って発現誘導された CD44v (特にヴァリエーションエクソン 8, 9, 10) が実際の機能、すなわち酸化ストレス耐性に寄与しているどうかを見るために、イヌ乳

癌細胞株に CD44v8-10 遺伝子を導入し、放射線照射を行った結果、有意に放射線体制が獲得された。これは、CD44v 発現腫瘍組織が放射線などの酸化ストレス耐性が高いことを意味することで、治療の成否を左右する重要な指標となった。

次に CD44v における酸化ストレス耐性は xCT 相互作用で生じるとされるので、xCT の解析を行った。まずはその発現をイヌ乳がん細胞株を用いて、ウエスタンブローディング (W.B.) で解析した。その結果、xCT は検出できなかった。タンパク質レベルでの検出ができなかったため、次に xCT 遺伝子発現を Real Time RT-PCR 法で調べた。その結果、その発現量は CD44v に比較して極めて低いことが判明し、W.B. で検出できないことが理解された。それに加えて、膜タンパク質の可溶化による抽出が難しい (非効率) ということも起因している。しかしながら乳がん細胞株で xCT が発現していることが確認できたので、実際に xCT が機能しているのかを確かめため、xCT の阻害剤、スルファサラジン (SSZ) を添加して GSH の生産量ならびに酸化ストレス耐性の減弱を調べた。その結果、SSZ 処理によって酸化ストレス耐性が減弱したことから、乳がん細胞における xCT は酸化ストレス耐性に機能していることが明らかとなった。しかしながら、直接 CD44v と xCT が分子会合をしていることは、見るところはできなかった。

## 2)と 3)の課題における研究方法と結果

「抗イヌ CD44v8-10 モノクローナル抗体の開発」に関しては、その抗原となるイヌ CD44v8-10 の抗原性を高めるために、イヌ CD44v8-10cDNA とヒト IgG-Fc 部分とを融合させたキメラ抗原 cDNA を作成して、発現ベクターに組み込んだ。キメラ分子を抗原として用いる理由は、まずは異種の IgG-Fc 部分は高い免疫原性があること、さらには Fc 部分があることによって、分泌タンパク質として効率が高いことである。そしてそのプラスミドをヒト胎児腎細胞株 293T 細胞に導入し、培養上清中に分泌されるキメラ抗原タンパク質を精製した。Balb/c マウスにキメラ抗原を免疫して、血清抗体価が十分に得られたことを確認した後に、免疫脾臓を摘出し、マウスミエローム細胞、SP2/0 細胞と定法によって融合した。その後 HAT 培地で選択培養をし、融合したオリゴクローンから分泌される抗体をウエスタンブローディング (W.B.) によって解析した。

抗原免疫 融合によるハイブリドーマの作成し、オリゴクローナル抗体産生細胞までは取ることが出来たが、最終的なモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを作成することはできなかった。途中のポリクローナル抗体による WB で使用できるか否かも試みたが、特異性の問題があつて、使用を断念した。したがって、腫瘍組織を用いた免疫組織化学的観察は本研究では達成できなかった。

さらに、モノクローナル抗体が作成したことを受けて、免疫沈降実験を用いて CD44v と xCT の分子会合を証明しようとしたが、行うことができなかった。また、ポリクローナル抗体を用いての実験も試みたが、xCT 分子の検出はできなかった。様々な原因が考えられるが、その 1 つにはやはり CD44v ポリクローナル血清抗体の親和性の低さがあると考えら

れた。

#### 4 . 研究の成果

本研究を通じて、明らかにできたことは：

- 1 . 癌化に伴ってイヌ腫瘍組織では、辺縁正常組織には見られない CD44 バリエントフォーム (CD44v) の発現が誘導される。
- 2 . CD44v 特にバリエントエクソン v8, 9, 10 (v8-10) をイヌ乳癌細胞に導入すると、放射線耐性が得られた。
- 3 . xCT 阻害剤をそれらの細胞に処置すると、内在性抗酸化物質グルタチオンの生合成の低下が観察され、酸化ストレス耐性が低下することから、xCT は酸化ストレス耐性に関与することが明らかとなった。

#### 本研究の成果論文

1. Tanabe A, Kobayashi D, Maeda H, Taguchi M and Sahara H. Angiogenesis-related gene expression profile in clinical cases of canine cancer. *Veterinary Medical and Science*. 2019, 5:19-29.
2. Tanabe A, Kimura K, Tazawa H, Taguchi M, Maruo T, Sahara H. Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine tumors. *Veterinary Medical and Science*, 2021, 7:577-585.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tanabe A, Kobayashi D, Maeda H, Taguchi M, Sahara H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Angiogenesis-related gene expression profile in clinical cases of canine cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 19-29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.127.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanabe Atsushi, Kimura Kento, Tazawa Hana, Maruo Takuya, Taguchi Masayuki, Sahara Hiroeki	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine tumours	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 577 ~ 585
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.397	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tanabe A, Ichige J, Kawanami A, Yamaga H, Sahara H.
2. 発表標題 The role of CD44 variant and xCT in therapy resistance of canine tumors.
3. 学会等名 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐原弘益、田辺敦、古屋綾乃、田澤花菜、田口正行
2. 発表標題 イヌ癌細胞におけるCD44バリエーションとxCTの機能解析
3. 学会等名 日本獣医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tanabe A, Tazawa H, Furuya A, Ichige J, Kawanami K, Yamaga H, Sahara H
2. 発表標題 Functional analysis of CD44 variants and xCT in canine cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------