

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20770161
 研究課題名（和文）ヒアルロン酸マトリクス代謝およびCD44細胞外ドメイン切断阻害による癌浸潤抑制
 研究課題名（英文）Development of new cancer therapy to invasive cancer targeting hyaluronic acid matrix remodeling and CD44 ectodomain cleavage
 研究代表者
 永野 修（NAGANO OSAMU）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：30404346

研究成果の概要（和文）：3Dゲル内培養における浸潤癌細胞におけるCD44切断を検出する方法を開発し、ヒアルロン酸合成に伴うCD44切断を抑制する薬剤を見出すことに成功した。またマウスモデルを用いてCD44が胃癌進展に及ぼす影響を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed the method for the evaluation of CD44 cleavage of matrix-invading cancer cells. By using this method, we screened chemical compounds and found several inhibitors for CD44 cleavage and matrix invasion. Furthermore, we established the functional role of CD44 in gastric tumorigenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：癌、遺伝子、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 高浸潤性の癌細胞では細胞自身の運動能の上昇とともに癌細胞周囲を取り巻く細胞外マトリクスの代謝機構が亢進していると考えられている。私達はこれまでに細胞周囲マトリクスの形成に関わる接着分子であるCD44が、タンパク切断によって制御されており、なかでもADAMファミリーメタロプロテアーゼであるADAM10やADAM17によってそれぞれ異なる経路で行われていることを見出している。

しかしながら、浸潤性癌細胞において、CD44の切断を活性化に関わると考えられている

癌細胞自身のヒアルロン酸の産生や癌細胞によって形成される細胞外マトリクスが腫瘍進展にどのような影響を与えるかということとは分かっていない。そこでこのメカニズムを明らかにすると共に阻害剤を見つけることは浸潤・転移性癌の治療として期待できると考えられる。

(2) 胃癌の進行においてCD44の発現上昇が悪性度と相関することが示されているものの、実験的にCD44や腫瘍間質のヒアルロン酸との相互作用が腫瘍の進展にどのような役割を果たしているかをマウス個体レベル

で解析した報告はこれまでにない。そこでマウス胃癌発生モデルの解析はCD44の機能を解析することが出来ると共に薬剤ターゲットとしての検討にも重要である。

2. 研究の目的

本研究は、癌細胞自身のヒアルロン酸産生のなかでも特に、ADAM17を活性化し、CD44の切断を行っている低分子量ヒアルロン酸の産生機序を明らかにし、癌細胞自身によって形成される細胞外マトリクスのリモデリング機構がどのように癌細胞の運動能や浸潤能に影響を与えるかを明らかにするとともに、RNAiを用いた遺伝子発現抑制によるヒアルロン酸合成酵素やADAMファミリーメタロプロテアーゼの特異的阻害が癌の浸潤転移抑制治療と成り得るかについて検討を行うことを目的とし、行った。

また、ヒアルロン酸合成と癌細胞におけるCD44発現の上昇が癌進展に関わるかを明らかにするために胃癌マウスモデルを用いた解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 浸潤性癌細胞株 U251MG 細胞を用いた3Dゲル内培養法および我々が独自に開発したCD44細胞内ドメイン抗体を使用した2重蛍光免疫染色にて細胞浸潤時のCD44切断を評価する共に細胞外ドメイン切断阻害を誘導する薬剤スクリーニングを行った。

(2) ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) RNAi 安定発現株の樹立

(3) 胃癌自然発生モデル *K19-^{fl}Wnt1/C2mE* マウスを用いて腫瘍間質マトリクスの変化についての検討およびCD44ノックアウト胃癌マウスの作成と解析を行った。

(4) 胃癌自然発生モデル *K19-^{fl}Wnt1/C2mE* マウスと癌細胞の主要なヒアルロン酸レセプターである接着分子CD44ノックアウトマウスを掛け合わせCD44ノックアウト胃癌マウスを作成し、胃腫瘍形成に及ぼす影響について調べた。

4. 研究成果

(1) 浸潤性癌細胞株 U251MG 細胞を用いて3Dゲル内培養によって浸潤細胞におけるCD44切断をCD44細胞外領域および我々が独自に作成した細胞内領域に特異的な抗体を利用した、蛍光免疫染色によって検出する方法を開発した。その結果、浸潤性癌細胞が3Dマトリクス内浸潤する際にはCD44の切断が誘導されていることを初めて検出することに成功した。

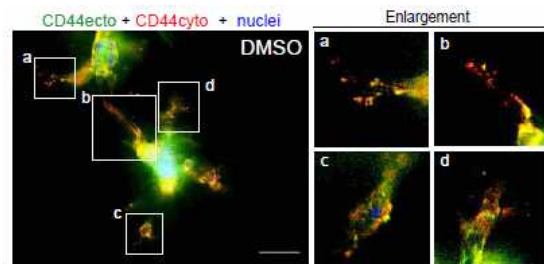
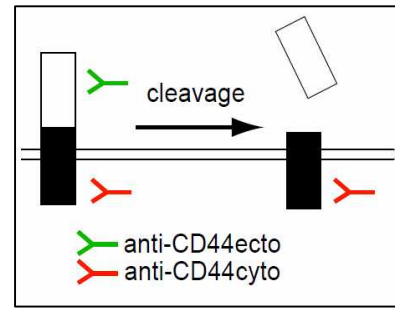


図1 3Dマトリクス内浸潤癌細胞におけるCD44切断の検出(上図;染色法の模式図、下図;緑はCD44細胞外領域に対する抗体、赤はCD44細胞内領域に対する抗体反応を示す。)

(2) CD44切断を阻害するRNAiおよび薬剤をスクリーニングした結果、CD44やヒアルロン酸相互作用に関わる数種類の分子を阻害することで癌細胞浸潤を抑制できることが分かった。

また薬剤スクリーニングによりCD44切断機構に対して阻害的に働く数種類の既存薬が見つかった。これらの薬剤はU251MG細胞の3Dゲル内浸潤およびヒアルロン酸のリモデリングを阻害することが分かり、癌浸潤・転移阻害薬と成り得ると考えられた。

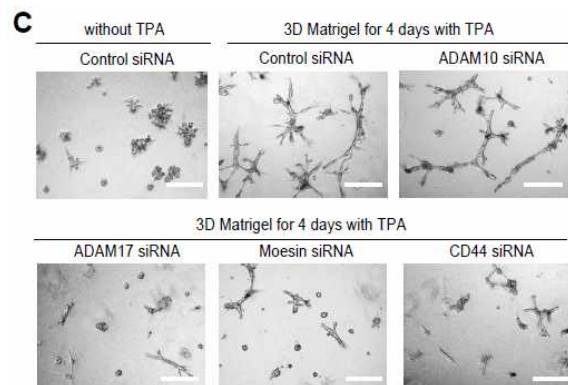


図2 RNAiを用いた3Dマトリクス内癌細胞浸潤の抑制効果(マトリクス内における浸潤性癌細胞の形態)

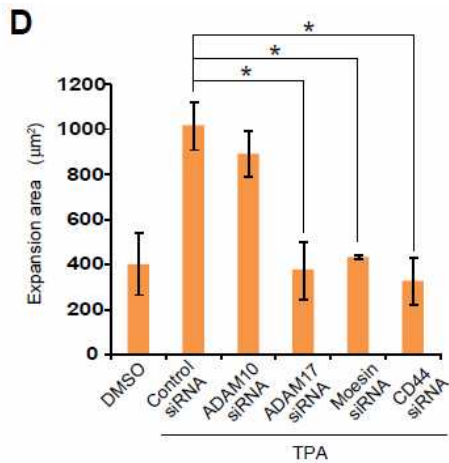


図 2 RNAi を用いた 3D マトリクス内癌細胞浸潤の抑制効果 (マトリクス内における浸潤性細胞の面積を定量化したもの)

(3) ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) RNAi 安定発現株の樹立を浸潤性癌細胞株 U251MG 細胞にて行った。HAS のなかでも特に CD44 切断を誘導する低分子量ヒアルロン酸産生に関わる酵素である HAS3 の RNAi について行った。その結果、HAS3RNAi は浸潤性癌細胞の特徴である細胞の伸長化を抑制するものの細胞死は誘導しないことが分かり、HAS3 をターゲットとすることは癌細胞の浸潤能を特異的に抑制する創薬のターゲットになる可能性を示唆している。

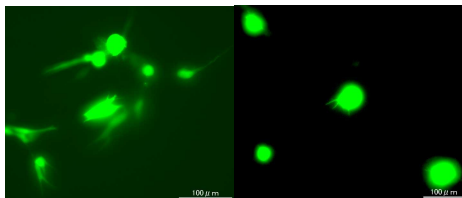


図 1 3D マトリクス内浸潤癌細胞における HAS の浸潤性に及ぼす影響についての検討 (左は control、右は HAS3RNAi の安定発現 U251MG 細胞)

(4) 胃癌自然発生モデル *K19-Wnt1/C2mE* マウスを用いて胃癌発生過程にはヒアルロン酸マトリクスの蓄積と接着分子 CD44 の発現増加に伴う事を組織染色より明らかにした。

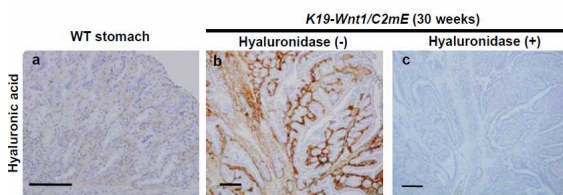


図 2 胃癌形成に伴うヒアルロン酸マトリクスの蓄積

(5) 胃癌マウスモデルを用いて CD44-ヒアルロン酸相互作用の重要性を調べるために CD44 ノックアウト胃癌マウスを作成し、腫瘍抑制効果を確認した。

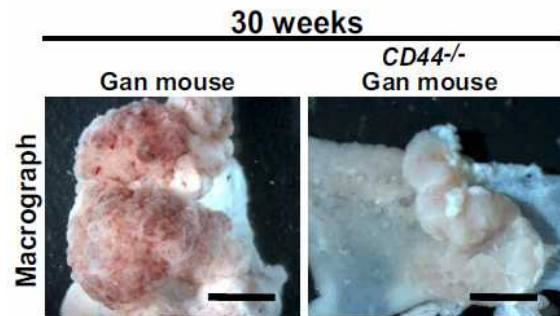


図 3 CD44 ノックアウトによる胃癌形成の抑制効果 (肉眼所見)

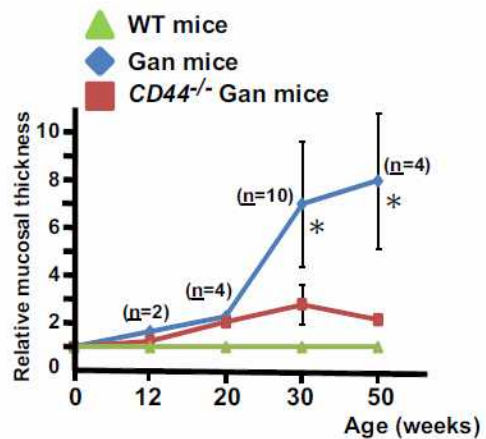


図 4 CD44 ノックアウトによる胃癌形成の抑制効果

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)

Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H, Tanihara H and Saya H. Tumor necrosis factor-alpha regulates transforming growth factor-beta-dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-moesin interaction. *J Biol Chem.* (査読有) 285:4060-4073, 2010

Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H and Nagano O. CD44⁺ slow-cycling tumor cell expansion is

triggered by cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H and Nagano O. Cancer Sci. (査読有) 101:673-678, 2010

〔学会発表〕(計2件)

永野修、石本崇胤、佐谷秀行、胃癌幹細胞様細胞の拡大および腫瘍進展におけるCD44の役割、第9回日本再生医療学会総会、平成22年3月19日、広島国際会議場

永野修、胃癌幹細胞様細胞の拡大および腫瘍進展におけるCD44の役割、第98回日本病理学会総会、平成21年5月1日、第98回日本病理学会総会、国立京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 修 (NAGANO OSAMU)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30404346

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし