

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5月28日現在

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21592198
 研究課題名（和文） 頭頸部扁平上皮癌細胞における CD44 バリエントアイソフォームの機能解析
 研究課題名（英文） Analysis of CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma
 研究代表者
 村上 大造（MURAKAMI DAIZO）
 熊本大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：70398212

研究成果の概要（和文）：

頭頸部扁平上皮癌組織において標準型 CD44 の高発現を確認したが、CD44 バリエントアイソフォームの発現は少量であった。CD44 切断フラグメントも確認され、1 サンプルでは CD44 全長が認められないにも関わらず、切断フラグメントのみ確認され、CD44 切断機構の亢進が示唆された。さらに、CD44 切断が亢進したサンプルの免疫染色では核内に CD44 が確認され、切断後核移行するという過去の研究結果を裏付けるものとなった。

研究成果の概要（英文）：

The expression of CD44 variant isoforms is very low in head and neck squamous cell carcinoma although the expression level of CD44s is high. Cleavage fragment of CD44 was also detected. Moreover, immunostaining of HNSCC revealed the translocation of CD44 to nucleus. This result supports our in vitro data of the sequential cleavage of CD44 and function as a signal transduction molecule.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：頭頸部癌 CD44 バリエントアイソフォーム 連続的切断

1. 研究開始当初の背景

頭頸部扁平上皮癌は局所での腫瘍増殖が速く、また、高率にリンパ節転移を来すため、初回診断時にはすでに進行癌であることが多く予後不良である。治療成績の改善には、現在の外科的治療や放射線・化学療法の充実

もさることながら、癌組織の特性を解明し、得られた知見の臨床診療への応用も必須である。

CD44 はヒアルロン酸を主なりガンドとする接着分子である。癌細胞における高発現が確認されており、その増殖能、浸潤・転移能

において中心的な役割を担うと考えられている。頭頸部扁平上皮癌における高発現も多く報告されている。申請者はこれまでにこの CD44 機能制御機構として細胞膜外領域、細胞膜貫通領域における連続的切断機構があることを報告してきた。CD44 細胞外領域切断はこの細胞外基質との着脱のサイクルを早めることにより癌細胞運動能を亢進させていること、さらに、引き続き惹起される細胞膜領域の切断により遊離される CD44 細胞内領域のフラグメントは転写因子として遺伝子発現を促し、癌細胞の増殖に作用する可能性を解明してきた。

これら研究は主に標準型 CD44 (CD44s) についての解析であるが、CD44 には他に選択的スプライシングによって生じる様々なバリエーションアイソフォームの存在 (CD44v) が知られている。

のスプライシングによって挿入されるバリエーションエクソン (v1~10) の種類によって、癌細胞のもつ特性は様々に修飾され、さらに多様となると考えられている。頭頸部扁平上皮癌においても、v3、v6、v8-10 をもつバリエーションアイソフォームの存在が報告されている。

2. 研究の目的

本研究では、今まで我々が行ってきた癌細胞における CD44 の機能解析について、標準型 CD44 のみならず、頭頸部扁平上皮癌において高発現しているバリエーションアイソフォームにまで範囲を広げ解析することを目的としている。また、CD44 細胞外領域に対するモノクローナル抗体の癌細胞増殖能、浸潤・転移能に及ぼす影響を検討することにより、臨床応用への可能性についても考察する。

3. 研究の方法

(1) 対象

外科的切除を行った頭頸部扁平上皮癌組織 (HNSCC) 5 サンプルで診断、治療に影響しない一部を凍結保存したもの。

(2) 方法

(1) の頭頸部癌の凍結保存組織を Lysis buffer (QIAGEN ; Qproteome Protein Prep Kit) を用いて溶解後に、BCA 法で蛋白量を測定後 Laemlli sample buffer により SDS 化した。蛋白量 10 μ g を SDS-PAGE で電気泳動 (BIORAD ; precast gel 4-15%)

、PVDF 膜 (BIORAD) へ転写し、抗 CD44 細胞内領域抗体 (慶応大学 佐谷秀行教授より供与) を用いてウエスタンブロット法で CD44s、CD44v の発現を確認した。また、同時に CD44 切除フラグメントの有無を確認した。

また、(1) と同様の組織を用いて、クリオスタットにて 5 μ m の薄切切片を準備し、1 次抗体に抗 CD44 細胞内領域抗体、2 次抗体に抗ウサギ FITC 標識抗体を用いて免疫染色を行い、CD44 発現の有無と頭頸部扁平上皮癌細胞内の局在を確認した。また、各染色にはヘキスト染色を用いた。

4. 研究成果

(1) 結果

ウエスタンブロットの結果を図 1 に示す。

正常咽頭粘膜と比較して、HNSCC 4 サンプル CD44s の発現亢進が確認された。CD44v も 3 サンプルで発現を認めているが、CD44s と比較すると発現量は極めて低かった。また、サンプル 5 では糖鎖修飾を受けていない CD44 immature の発現を認

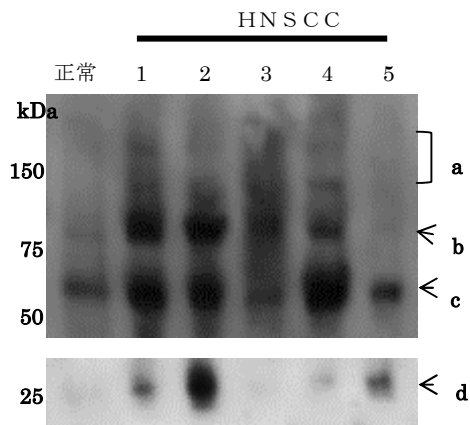


図 1

- a CD44v ; CD44バリエントアイソフォーム
- b CD44s ; 標準型CD44
- c CD44immature ; 糖鎖未修飾CD44
- d CD44EXT ; CD44切断フラグメント

めるものの、CD44s、CD44vの発現は低かった。また、細胞外領域で切断されたフラグメントCD44EXTは4サンプルで確認された。

サンプル2の免疫染色の結果を図2に示す。

CD44はおもに細胞膜上に発現しているが、一部細胞では核内にも発現が確認された。

(2) 考察

研究当初は頭頸部扁平上皮癌組織においてCD44バリエントアイソフォームが高発言していることを予想していた。しかしながら、実験によりその発現の多くは標準型CD44であり、バリエントアイソフォームの発現量は微量であった。したがって、頭頸部扁平上皮癌においてはその機能の多くは標準型CD44が担っていることが予想される。しかしながら、近年の研究により、癌幹細胞においてCD44バリエントアイソフォームが重要な役割を担っていることが報告されている。した

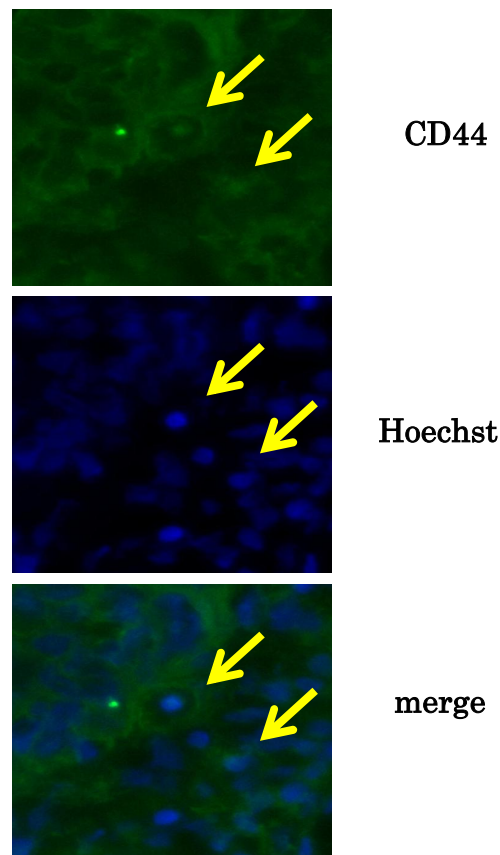


図 2

がって、発現量は少ないものの、癌化や癌の進展においてCD44バリエントアイソフォームが重要な役割を担っている可能性は臆すべきでない。

興味深いことにCD44切断フラグメントも腫瘍サンプルで確認された。我々は以前、*in vitro*においてCD44が細胞膜外領域、細胞膜貫通領域において連続的切を受けること、CD44細胞外領域切断はこの細胞外基質との着脱のサイクルを早めることにより癌細胞運動能を亢進させていること、さらに、引き続き惹起される細胞膜領域の切断により遊離されるCD44細胞内領域のフラグメントは転写因子として遺伝子発現を促し、癌細胞の増殖に作用する可能性を報告してきた。今回、臨床サンプルにおいても切断フラグメント

が確認され、in vitro での研究結果が実際の腫瘍組織内でも起きていることを裏付ける結果となった。サンプル5では標準型 CD44 の発現がほとんど見られないにも関わらず、切断フラグメントが検出されており、この切断機構が亢進している可能性も示唆された。

切断フラグメントが強く確認されたサンプル2での免疫染色では、細胞膜上でお CD44 の発現に加え、核内にも CD44 が確認され、連続的切断後に核内に移行するという我々の過去の報告を裏付けるものとなった。臨床サンプルでの核内への CD44 移行の確認は本研究が初めてであり、非常に意義深いものであると言えよう。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 大造 (MURAKAMI DAIZO)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70398212

(2) 研究分担者

養田 涼生 (MINODA RYOSEI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：30284772
(H22→23：連携研究者)