

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462023

研究課題名(和文) CD24発現制御による胃癌制癌療法への応用

研究課題名(英文) Therapeutic application to gastric cancer by CD24 expression control

研究代表者

田邊 和照 (TANABE, Kazuaki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・准教授

研究者番号：40379847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞表面に発現するCD24が胃癌の悪性因子の一つとなり得るのではと考え研究を行った。CD24陽性細胞は細胞接着能・運動能・浸潤能が高くCD24は胃癌細胞の浸潤能維持に必須の因子と考えた。またCD24は低酸素環境下で発現誘導し、低酸素環境下で運動能、浸潤能もそれぞれ1.4倍、1.3倍に亢進した。その発現誘導にはHIF-1 およびHIF-2 が関与していた。免疫組織学的解析ではCD24は胃癌の予後不良因子であり、HIFs発現と有意な相関を認めた。以上よりCD24は胃癌の多様性を規定するマーカーとしてだけでなく胃癌細胞悪性化マーカーとなり得ると考え新たな標的因子の一つとなる可能性があると考えた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the involvement of CD24 in gastric cancer aggressiveness. Purely sorted CD24-negative gastric cancer cells showed strong alteration into the CD24-positive cell type, and reached to steady expression levels. Our clinicopathological study revealed that CD24 positivity was an independent prognostic factor of gastric cancer. CD24 expression was correlated with the advanced stages, invasiveness, and lymph node metastasis of gastric cancer. Silencing of CD24 in cultured cells significantly decreased cell migration and invasion. Hypoxic treatment upregulated CD24 expression, and simultaneously induced cell motility and invasion of gastric cancer cells. Hypoxic treatment-induced CD24 expression was significantly attenuated by knockdown of hypoxia-inducible transcription factors. CD24 would be an attractive marker to define not only the heterogeneity but also the aggressiveness of gastric cancer cells.

研究分野：上部消化管外科の臨床・研究

キーワード：胃癌 CD24 低酸素

1. 研究開始当初の背景

近年診断技術の進歩により胃癌は早期発見されることが多くなってきたが、遠隔転移や高度リンパ節転移を伴う高度進行胃癌の予後は他癌種と比較しても未だ不良で新たな治療戦略が望まれている。胃癌の特性の一つとして腫瘍内での heterogeneity が挙げられ治療抵抗性に関与している可能性がある。近年、癌細胞の中に癌幹細胞様の細胞が存在し、癌細胞集団全体の運命を左右するような決定的な役割を担う可能性があると考えられており、胃癌においては CD44 や Side Population 細胞の報告以後さまざまな報告がされている。

われわれはこのような状況の中、癌細胞表面に発現する CD24 が胃癌の悪化因子としてのみでなく治療標的となる可能性があると考えた。CD24 は細胞膜蛋白で、ヒト正常組織では B リンパ球前駆細胞の膜表面に発現しており P-selectin のリガンドとして機能し、上皮細胞や血小板への接着分子としての機能が知られている。悪性新生物において CD24 は乳癌や膀胱癌などで高発現し予後因子との報告がされている。胃癌においても CD24 発現と臨床病期に相関があり予後因子になり得るとの報告があるが、CD24 発現と転移に関する解析は未だ未解決な問題である。(Chou YY et al. Ann Surg Oncol. 2007 14:2748-2758)。

本研究により CD24 発現調節機構などが解明されると胃癌の浸潤・転移機構の解明と新規治療戦略の 1 つの可能性となり得るのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで解明してきた胃癌進展と CD24 発現にかかわるシグナル機構の解析をもとに、CD24 発現制御のメカニズムを解明し、胃癌の転移・伸展を制御するための基盤的研究を行う事である。CD24 の生物学的特性を明らかにすることで、新たな胃癌治療戦略への展開へとつながるものと考えられる。計画している具体的な研究題目は次のものである

- (1)CD24 の機能解析
- (2)CD24 発現制御メカニズムの解明
- (3)臨床病理学的検討

3. 研究の方法

- (1)CD24 の機能解析
複数の胃癌細胞株(TMK-1, 44As3)を用いて CD24 陽性/陰性にソーティングし、それぞれの細胞特性を接着能・運動能・浸潤能について解析する。
- (2)CD24 発現制御メカニズムの解明
同胃癌細胞株を用いて通常培養環境下で継代培養を行い、CD24 発現変化の有無について検討を行う。さらに CD24 発現誘導に関わる因子を探索する目的で promotor 領域の検

索を行い、そこより見いだした HIF binding site に着目し、低酸素環境下での CD24 発現誘導の有無ならびにその発現誘導機序について Western Blot 法を用いて解析し、さらに遺伝子発現抑制などで検証する。

(3)臨床病理学的検討

2001年から2008年の間の当院での胃癌根治手術症例のうち転帰が確認できた119例について、CD24 発現と予後に関連する Stage, T・N 因子、脈管侵襲の有無などについて検討を行う。

4. 研究成果

(1)CD24 の機能解析

各種胃癌細胞での癌幹細胞マーカーの発現を検討したところ、CD44、CD133 は均一な発現様式であったが、CD24 は陽性細胞と陰性細胞の混在型あるいは陰性型に分類され、多様性を規定する因子の一つである可能性が示唆された(図1)。

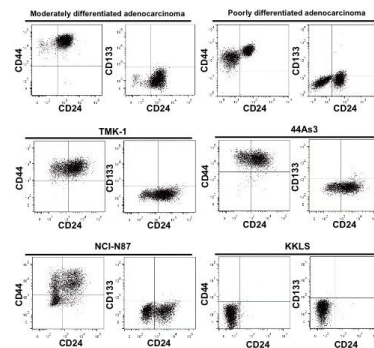


図1.各種胃癌細胞における癌幹細胞マーカー

次に、CD24 陽性・陰性細胞の細胞特性について検討したところ、CD24 陽性胃癌細胞は陰性細胞と比較して、細胞増殖能には差を認めなかったが、細胞接着能、運動能、浸潤能が有意に高かった(図2)。

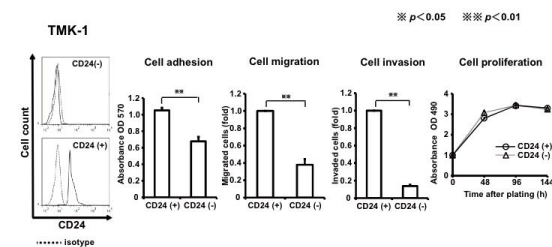


図2. CD24 (+) TMK-1細胞の接着/運動/浸潤能

さらに TMK-1 および 44As3 細胞株に RNAi 法を用いて CD24 発現抑制したところ、いずれの株においても細胞接着能、運動能、浸潤能が維持されず、CD24 は胃癌細胞の浸潤能維持に必須の因子であると考えられた(図3)。

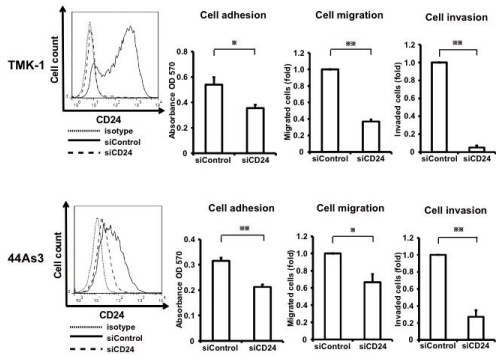


図3. CD24 KOによる接着/運動/浸潤能変化

(2)CD24 発現制御メカニズムの解明

CD24 のプロモーター領域には Hypoxia Responsive Element が複数存在することから、HIF が胃癌細胞の CD24 発現を制御するとの仮説を立てた。そこで胃癌細胞を低酸素環境 (O₂ 1%) に曝露すると、まず HIF-1 の発現が 24 時間以内に安定化し、その後 HIF-2 の発現が安定化した。癌幹細胞マーカーについては CD44 や CD133 の発現には変化を認めなかったが、CD24 陽性割合は経時的に 63.0%から 86.9%に増加した(p < 0.001)(図 4)。

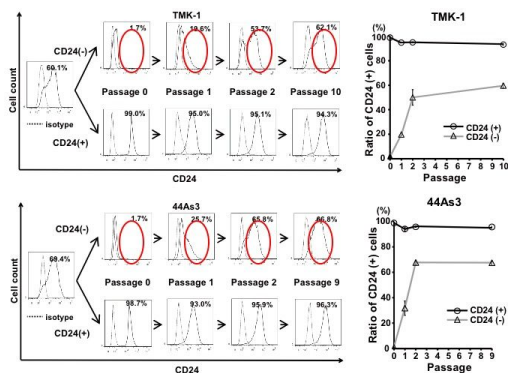


図4. 低酸素環境下でのCD24発現変化

また、低酸素環境下で運動能、浸潤能もそれぞれ約 1.4 倍、1.3 倍に亢進した(p = 0.025, p = 0.042)。さらに HIF-1 および HIF-2 の発現を抑制すると、低酸素で誘導された CD24 発現が有意に抑制された。この事から胃癌細胞は低酸素環境下で HIF-1 および HIF-2 を介して CD24 の発現が亢進し悪性度が増強するものと考えられた (図 5)。

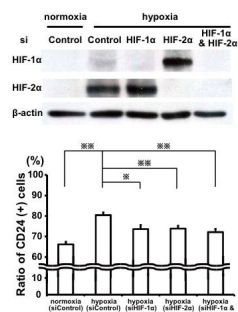


図5. HIFsによるCD24の発現誘導

(3)臨床病理学的検討

当院での手術症例 119 例について、臨床病理学的検討を行った。Lauren 分類では有意差を認めなかったが、CD24 発現例は有意に高 stage であり、腫瘍深達度・リンパ節転移・脈管侵襲を有していることが明らかとなった (図 6)。

Characteristics	CD24 (-) n (%)	CD24 (+) n (%)	OR (95% CI)	p value
Gender				
male	31 (42.5%)	42 (57.5%)	1 (Reference)	0.086
female	27 (58.7%)	19 (41.3%)	0.519 (0.245-1.098)	
Age				
≤ 65	33 (46.5%)	38 (53.5%)	1 (Reference)	0.549
< 65	25 (52.1%)	23 (47.9%)	0.799 (0.384-1.664)	
Location				
Upper	15 (48.4%)	16 (51.6%)	1 (Reference)	-
Middle	25 (50.0%)	25 (50.0%)	0.938 (0.383-2.298)	0.888
Low	18 (47.4%)	20 (52.6%)	1.042 (0.403-2.692)	0.933
Lauren classification				
Diffuse type	35 (57.4%)	26 (42.6%)	1 (Reference)	0.054
Intestinal type	23 (39.7%)	35 (60.3%)	2.048 (0.966-4.255)	
Stage				
I-II	46 (54.8%)	38 (45.2%)	1 (Reference)	<u>0.044</u>
III	12 (34.3%)	23 (65.7%)	2.32 (1.022-5.266)	
Depth of invasion				
m-sm	27 (61.4%)	17 (38.6%)	1 (Reference)	0.036
mp	31 (41.3%)	44 (58.7%)	2.254 (1.053-4.826)	
Lymphnode metastasis				
No	40 (56.3%)	31 (43.7%)	1 (Reference)	0.045
Yes	18 (37.5%)	30 (62.5%)	2.151 (1.017-4.549)	
Lympho-vascular invasion				
No	26 (68.4%)	12 (31.6%)	1 (Reference)	0.004
Yes	32 (39.5%)	49 (60.5%)	3.318 (1.467-7.505)	

図6. CD24発現と臨床病理学的検討

また、組織型にかかわらず、CD24 は胃癌根治手術後の予後因子となることが明らかとなった(図 7)。

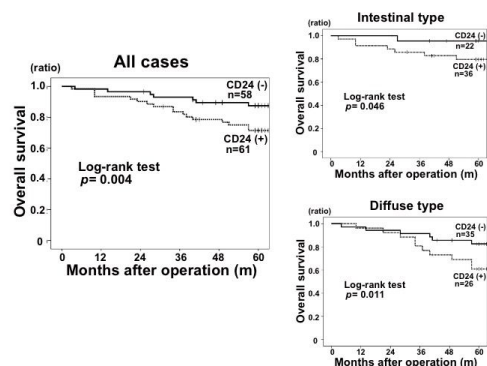


図7. CD24発現と胃癌根治術後生存期間

以上の結果より CD24 は胃癌の多様性を規定するマーカーとしてだけでなく、胃癌細胞の悪性化のマーカーになり得るものと考えられた。CD24 は低酸素によって安定化する HIF-1 や HIF-2 により発現誘導され胃癌細胞の浸潤能を亢進すると考えられた。CD24 やそれを制御する HIF-1 や HIF-2 を標的とした治療戦略は、高度進行胃癌における新たな選択枝の一つとなる可能性があると考えられた。

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 1件)

Fujikuni, N. Yamamoto, H. Tanabe, K. Naito, Y. Sakamoto, N. Tanaka, Y. Yanagihara, K. Oue, N. Yasui, W. Ohdan, H. Hypoxia-mediated CD24 expression is correlated with gastric cancer aggressiveness by promoting cell migration and invasion. Cancer Science

105(11),2014, pp. 1411-1420
DOI: 10.1111/cas.12522 (査読有)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1)藤國宣明、山本英喜、田邊和照、三隅俊博、大段秀樹 低酸素は胃癌細胞の浸潤能亢進因子である CD24 の発現を促進する。第 115 回日本外科学会総会,2015 年 4 月 16 日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

(2)藤國宣明、山本英喜、内藤寛、坂本直哉、田中友加、五十嵐友香、三隅俊博、ボウ・ダン、鈴木崇久、徳本憲昭、田邊和照、安井弥、大段秀樹 胃癌細胞の浸潤能亢進因子である低酸素が誘導する胃癌細胞浸潤能促進因子 CD24 の発現は HIF-2a によって制御される。第 72 回日本消化器外科学会総会,2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/home2ge/research/stomach/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田邊 和照 (TANABE, Kazuaki)

広島大学大学院・医歯薬保健学研究院
(医)・准教授

研究者番号: 40379847