

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830097

研究課題名(和文) 虚血性環境下で卵巢癌細胞において発現誘導されるCD69の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of CD69 induced in CCC cells cultured under serum starvation and hypoxia

研究代表者

金山 知彦 (Kanayama, Tomohiko)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：40401187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本人において頻度の高い、予後不良がんである明細胞型卵巢癌の治療標的分子の探索にあたり、我々は固形癌の微小環境において認められる低酸素環境の中で、我々が新たに見出した癌応答メカニズム(HIFs-Sp1)に着目した。我々は本研究において低酸素、低血清環境の共存する環境下で明細胞型卵巢癌細胞を培養すると、CD69分子が顕著に発現誘導されることを初めて明らかとした。また低酸素、低血清環境下CD69はがん細胞の運動能、浸潤能を促進することが、*in vitro*実験により示された。そのメカニズムとして癌細胞におけるインテグリンの活性化を介した細胞外接着分子依存的な細胞接着能亢進が挙げられた。

研究成果の概要(英文)：Ovarian clear cell carcinoma (CCC) is poor prognostic and frequent in Japan. We found that expression of CD69 gene is robustly and synergistically activated in CCC cells in response to serum starvation and hypoxia. CD69 is well known as a T cell activation marker, and is supposed to regulate the adequate immune response through its expressing on the surface of immune cells. However, the expression and characteristics of CD69 in solid tumor has never been characterized. To characterize the role of CD69 in CCCs, we performed the cell characteristic analyses under SSH condition. Then, CD69 dependent enhancement of cell migration and invasion activities with fibronectin as a chemoattractant were determined. In order to understand how CD69 facilitates association of CCC cells with FN, we performed various *in vitro* experiments. Our results suggest that CD69 enhances CCC cell-FN interaction through activation of cell surface integrin.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 ハイポキシア CD69 インテグリン

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんの中でも明細胞型卵巣癌(CCC)は、日本人においてその頻度が高い一方で、予後不良がんであることが知られており、有用な新規治療法の開発が急務となっている。新たな治療標的分子の探索を行うにあたり、我々は癌組織において低酸素領域における従来の hypoxia inducible factors (HIFs)-HRE を介した細胞応答メカニズムの他に、HIFs-Sp1 による遺伝子発現メカニズムを見出した。(引用文献①)我々はこのメカニズムは低酸素環境と低血清環境が共存することにより増強されることを示しており、この新たに提唱された遺伝子発現メカニズムにより制御される遺伝子によるがん細胞の低酸素応答メカニズムを明らかにすることをめざした。

2. 研究の目的

我々は cDNA マイクロアレイ解析によって CCC 細胞株である OVSAYO cell では、低酸素環境と低血清環境が共存する環境下 (Serum-Starvation and Hypoxia; SSH)において、CD69 遺伝子が顕著に発現誘導されることを見出した。CD69 は C タイプレクチンとして活性化型 T 細胞、活性化型 B 細胞やマクロファージにおいて細胞膜上に発現が認められ、これらの細胞免疫応答において何らかの役割を担っていることが示唆されているが、これまで固形癌細胞における発現、機能とともに報告例はなかった。我々は CCC 細胞のような固形癌における低酸素環境下での CD69 の機能解析を行うことで低酸素環境下におけるがん細胞の細胞応答について、新たな知見を得ることができると考えた。また新たな治療標的分子としての可能性についても視野に入れて研究を進めていくこととした。

3. 研究の方法

(1)CCC 細胞における CD69 の発現様式  
各種 CCC 細胞における低酸素・低血清環境下培養後の CD69 の発現について検討するとともに、細胞外への放出を考慮するため、超遠心法により Microvesicles (Exosome) 画分を調製し、CD69 の発現を検討した。

(2)培養細胞を用いた固形癌細胞での CD69 の機能解析

CD69 特異的 siRNA を用いた一過性の CD69 発現抑制および shRNA 発現ベクターを用いて、定常的な CD69 遺伝子抑制 CCC 細胞株を作製して、様々な細胞の性質について検討した。細胞増殖能、低酸素環境下での生存能を検討した。細胞運動能、細胞浸潤能、細胞外基質に対する細胞接着能をそれぞれ通常酸素濃度、低酸素濃度および無血清環境下において検討した。

(3)CD69 によるインテグリン活性化の可能

性を検討するため以下の方法を用いた。

①インテグリンの活性化評価のため、活性化型インテグリンβ1 を認識する特異的抗体、総インテグリンβ1 蛋白質を認識する抗体を用いて、フローサイトメトリーにより CCC 細胞膜表面のインテグリンβ1 活性化状態を評価した。

②細胞外基質である fibronectin による刺激を与える目的で、fibronectin coating した培養プレートに CD69 を低酸素・無血清環境下発現誘導させた CCC 細胞を接着させ、30 分後に細胞を回収、特異的抗体によって FAK のリン酸化レベルについて検討した。

(4) 臨床サンプル由来ヒト卵巣癌組織における CD69 の発現解析

外科切除癌組織由来の標本組織切片を用いてヒト卵巣癌組織内の CD69 発現について特異的抗体による免疫染色を行った。

4. 研究成果

(1) CCC 細胞、OVSAYO cell について低酸素 (1% O<sub>2</sub>)・無血清環境下、培養した後、total RNA および細胞抽出液を調製し、qPCR, Western Blotting により CD69 の発現について確認したところ、16 時間以降において顕著に発現上昇が認められ、少なくとも 48 時間までは発現が維持されること、蛋白質レベルでは長時間暴露においてその発現がより強く認められた。(図 1)

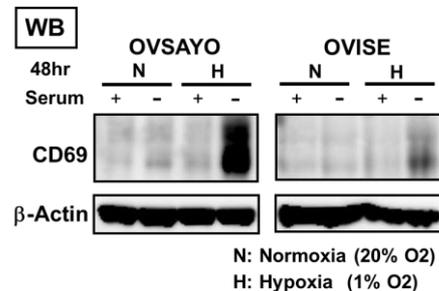


図1 CCC細胞株において低酸素・無血清環境下培養することでCD69は顕著な発現誘導を示す。

他の CCC 細胞株についても蛋白質レベルでの発現を確認したところ、10 株中 6 株の CCC 細胞株において CD69 の発現を認めた。(OVSAYO, OVISE, JHOC-7, JHOC-8, JHOC-9, HAC-2)このうち低酸素・無血清環境下に発現上昇が認められたのは OVSAYO に加えて OVISE, JHOC-7, HAC-2 にとどまったものの、JHOC-7~9 においては通常培養条件下でも少なからず発現が認められた。しかしながら今回の検討において漿液性卵巣癌や粘液性卵巣癌細胞株においては CD69 の発現誘導は認められなかった。(OVSAHO, OVKATE, Kuramochi (Un-differentiated), MCAS)。

また OVSAYO cell を無血清培地にて 48 時間培養した培養上清から、Microvesicles 画分を調製したところ、低酸素環境での培養時において、CD69 蛋白質が存在していることが明

らかとなった。

(2) 低酸素・低血清環境下で発現誘導される CD69 の機能を解析するため、CCC 由来の OVSAYO cell を用いて非特異的 shRNA あるいは、CD69 遺伝子特異的 shRNA を導入した shRNA 定常発現株を作製し、これらについてさまざまな機能解析を行った。その結果、通常の培養条件下では両細胞の増殖能には変化が認められない上、低酸素・無血清環境下培養時の生存活性においても、CD69 遺伝子の発現は影響を与えないことが明らかとなった。一方で、低酸素・無血清環境下において行った Boyden chamber を用いた Migration assay, Invasion assay の結果、Fibronectin 依存的な細胞運動能、浸潤能が CD69 遺伝子のノックダウンによって減弱することを明らかにした。また CD69 のノックダウン株においては低酸素・無血清環境下において Fibronectin に対する細胞接着能が減弱されることが示され、誘導し CD69 が活性化されたことによる細胞接着能の亢進によ

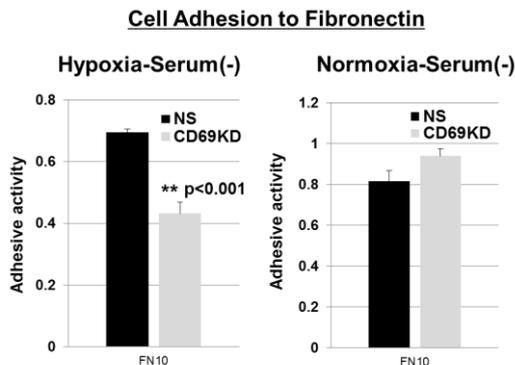


図2 CD69遺伝子抑制により、OVSAYO細胞における低酸素無血清環境下ではfibronectinに対する細胞接着能減弱を示す

り CCC 細胞の運動能・浸潤能が亢進することが考えられた。(図 2)

(3) こうした CD69 依存的な細胞接着能の亢進が CD69 によるインテグリンの活性化に由来する可能性を考え、低酸素・無血清条件下誘導された CD69 が CCC 細胞膜上のインテグリン活性に及ぼす影響を検討した。Fibronectin coating した培養 dish への CD69 依存的な細胞接着能の亢進は fibronectin 由来 RGD ペプチド共存下において緩和され、さらにインテグリン  $\beta 1$  特異的阻害抗体によっても中和された。これにより、こうした細胞接着能の亢進が細胞膜上インテグリンを介した fibronectin との相互作用によることが示唆された。さらに活性化型インテグリン特異的抗体を用いた FACS 解析をおこなったところ、CD69 ノックダウン細胞において活性化型インテグリン  $\beta 1$  の発現が総インテグリン  $\beta 1$  に比して減弱していることが明らかとなった。さらにインテグリン活性化についてインテグリンの下流シグナルカスケードについて

検討した。低酸素・無血清環境下で CD69 が誘導された OVSAYO cell では fibronectin を介した細胞接着刺激により、Integrin - fibronectin を介した細胞接着後において活性化することが知られている FAK のチロシン残基のリン酸化(Y397, Y576, Y861)が顕著に亢進していることが明らかとなった。(図 3)

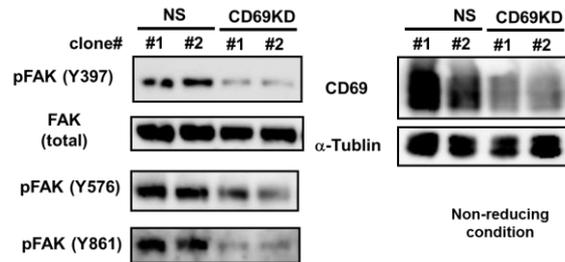


図3 低酸素無血清条件下で誘導されたCD69は細胞接着後のFAKのリン酸化を亢進する

インテグリンの活性化メカニズムを解析するためにさらに検討を行った。細胞膜表面上に発現しているインテグリンは  $\alpha$  サブタイプと  $\beta$  サブタイプがヘテロダイマーを形成している。この複合体は活性化される過程において構造変化が起きることが知られている。インテグリンの inside-out と呼ばれる活性化過程ではカルシウム濃度上昇といった刺激によりシグナルカスケードが活性化され、その結果としてインテグリンの C 末端、細胞質側において Talin などをはじめとしたインテグリンと直接的に相互作用する分子を含んだ特徴的な複合体が形成されることが報告されていた。この複合体の中で最近 Talin 蛋白質の Serine-425 リン酸化がインテグリン複合体の活性化において重要であるという報告がなされた。そこで今回我々が Talin の Serine-425 リン酸化について WB 解析にて観察したところ、CCC 細胞を低酸素・無血清環境下培養した条件下では、CD69 依存的にこの Serine-425 のリン酸化が亢進されていることが、明らかとなった。これらの結果より、低酸素・無血清環境において CCC 細胞では CD69 はインテグリン  $\beta 1$  の活性化を促進していることが示唆された。我々の研究によりこれまで不明であった CD69 分子の固形癌細胞での役割の一端について示すことができたと言える。

以上の結果より、CCC 細胞において、低酸素および無血清環境下が共存することによって、CD69 は顕著な発現上昇を示すこと明らかとした。この発現誘導が、我々が先に示した ICAM1 と全く同じ制御メカニズムであるかどうかは議論の余地があるものの、NFkB や Sp1 といった転写因子の結合サイトが CD69 promoter 上に存在することが報告されており、また我々の研究においても NFkB や Sp1 の遺伝子ノックダウンによって CD69 の遺伝子誘導は緩和されることが認められ

ている。この現象は ICAM1 におけるそれと一致している。(引用文献.②)

(4) 神奈川県立がんセンターにて保有している、書面において癌研究への包括的同意が得られているヒト臨床検体由来を用いて、パラフィン包埋組織より組織切片を作製した。これらの組織切片に対して CD69 特異的抗体を用いて免疫染色を行った。抗体処理については先に、フォルボールエステルによって活性化させた Jurkat 細胞、低酸素無血清環境下培養した OVSAYO 細胞に対して標本切片を作製したものをポジティブコントロールとして用いて、条件の最適化を行った。ヒト卵巣癌組織検体に対する染色は現在おおむね終了しており、現在臨床情報との照合を行っているところである。

先に述べたように CD69 は低酸素・無血清環境下培養した CCC 細胞由来の Microvesicles に含まれ、このことはヒト体内においても難治で知られる CCC 細胞由来の Microvesicle 成分として認められる可能性を示している。癌細胞から Exocytosis などの経路を介して放出される Microvesicles には蛋白質の他に microRNA などの核酸も含まれていることが知られている。脂質二重膜に覆われた顆粒状となって体液を介して伝播されるこれらの分子は細胞間、組織間のシグナル伝達等において重要な役割を担っていることが示唆されてきており、近年その構成成分にも治療標的候補分子として注目が集まってきている。このような候補分子、あるいはバイオマーカーとして CD69 分子が機能するかどうかについては今後の検討課題であると言える。

<引用文献>

① Koizume S, Ito S, Miyagi E, Hirahara F, Nakamura Y, Sakuma Y, Osaka H, Takano Y, Ruf W, Miyagi Y., HIF2 $\alpha$ -Sp1 interaction mediates a deacetylation-dependent FVII-gene activation under hypoxic conditions in ovarian cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40,5389-5401

② Koizume S, Ito S, Nakamura Y, Yoshihara M, Furuya M, Yamada R, Miyagi E, Hirahara F, Takano Y, Miyagi Y., Lipid starvation and hypoxia synergistically activate ICAM1 and multiple genes in an Sp1-dependent manner to promote the growth of ovarian cancer. *Mol Cancer.* 2015 ,14, 77

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)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 金山知彦、小井詰史朗、宮城洋平

虚血性環境下発現誘導される CD69 は卵巣明細胞癌において細胞運動能、浸潤能を亢進する. 第 11 回がんとハイポキシア研究会、2013 年 12 月 13 日-12 月 14 日、東北大学(宮城県・仙台市)

(2) 金山知彦、小井詰史朗、宮城洋平  
明細胞卵巣癌細胞において虚血性環境下相乗的に発現誘導される CD69 は細胞運動能と浸潤能を促進する. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日-9 月 27 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(3) 金山知彦、小井詰史朗、宮城洋平  
卵巣明細胞癌において虚血性環境下相乗的に発現誘導される CD69 は integrin を介した細胞接着能を亢進する. 第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014 年 11 月 21 日-11 月 22 日、ホテルマリタール創世佐賀(佐賀県・佐賀市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 知彦 (KANAYAMA, Tomohiko)

研究者番号: 40401187

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター、臨床研究所 研究員