

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861244

研究課題名(和文)悪性中皮腫における癌幹細胞CD44アイソフォームの解析と下流シグナル経路の解明

研究課題名(英文)Analysis of CD44 variant isoform status and signal passway in malignant mesothelioma

研究代表者

川口 晃司(Kawaguchi, Koji)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：10402611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性中皮腫は、アスベストに関連し発症する予後不良の疾患である。中皮腫では胸水中にヒアルロン酸が過剰に分泌されているため、我々は樹立した中皮腫細胞株を用いて、ヒアルロン酸の受容体であり癌幹細胞の表面マーカーでもあるCD44の発現およびバリエーション解析を行った。またヒアルロン酸分泌の原因遺伝子の探索、CD44の下流シグナル経路の解明に向けた統合解析を行った。その結果、一部の悪性中皮腫細胞株でヒアルロン酸の過剰分泌とその原因遺伝子としてHAS2の高発現を確認した。さらにHAS2高発現の中皮腫細胞株では、CD44バリエーションv2-v7の発現が上昇していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)： Malignant mesothelioma is one of poor prognostic disease, which is associated with asbestos exposure. In pleural effusion of malignant mesothelioma patients, much amount of hyaluronic acid are released and used for a diagnostic marker. Using malignant mesothelioma cell lines, we analyzed CD44 expression level and variant isoforms status, which is known to hyaluronic acid receptor and surface marker of cancer stem cell. Furthermore, we also investigated causative genes of secreting hyaluronic acid and conducted integrative analysis to detect CD44 target signal in malignant mesothelioma. As the result, some mesothelioma cell lines secreted much amount of hyaluronic acid and showed high expression level of HAS2 as one of the responsibility gene. Moreover, mesothelioma cell lines harboring HAS2 high expression showed high expression level of CD44 variant isoform v2-v7.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 CD44 バリエーションアイソフォーム ヒアルロン酸 細胞株樹立

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫はアスベスト曝露に関連した予後不良の疾患であり、今後も患者数の増加が予測されている。現在は化学療法、外科的治療に放射線療法を加えた集学的治療が行われているが、生存期間中央値は約1年といまだにその予後は極めて厳しい状況である。

近年、CD44は癌幹細胞表面マーカーとして注目を集め、cDNAの19exon中10exonが選択的スプライシングを受け、現在までに16種類のアイソフォーム(CD44R)が発見されている。癌細胞においては、乳癌・大腸癌でCD44R(v5-v10)の発現が正常組織に比べ増加していることが報告され、細胞外マトリックスに対する接着に関わることから癌細胞の転移との関連が示唆されている。また、CD44v6の発現した乳癌症例の予後が悪いことも報告されている。

一方、悪性胸膜中皮腫の組織・胸水中にはヒアルロン酸を含めた細胞外マトリックス蛋白が豊富に存在し、CD44のリガンドであることが以前から報告されていた。我々は以前より悪性中皮腫の細胞学的特性を明らかにするために、患者検体より中皮腫の細胞株の樹立を行っている。これらの細胞株を用いて発現プロファイリングを行い、正常中皮細胞株と比較して多数の中皮腫細胞株においてCD44の発現量の増加ならびにCD44v6の発現を確認していた。

2. 研究の目的

中皮腫細胞株におけるヒアルロン酸とCD44の発現の相関・アイソフォームの関係を解析し、それらの増殖能・浸潤能・転移能の違いを明らかにすることで細胞学的特徴を解明する。

また悪性胸膜中皮腫に特徴的なシグナル伝達経路の機能不全にHippo pathwayの不活性化が挙げられ、CD44の発現量・アイソフォームの違いとHippo pathway cascadeの関連を下流の転写のcoactivatorであるYAPを標的に関連の検証を行う。

さらにこれらの検討を主軸に、悪性中皮腫における新規の治療標的を探索同定する。

3. 研究の方法

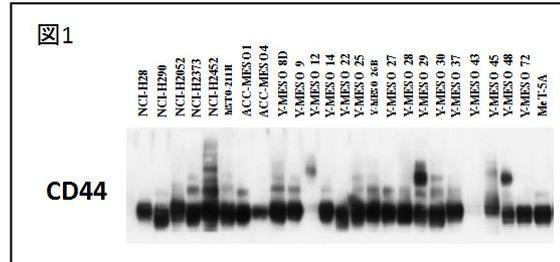
日本人由来の中皮腫細胞株を含む約20株を用いてCD44の発現をWestern blot法やFACS (fluorescence activated cell sorting)法を用いて検討を行った。その結果、ほとんどの中皮腫細胞株でCD44が高発現していることを確認した。バリエーションアイソフォームに関しては、リアルタイムPCRを主体に解析を進め、細胞株によって異なったバリエーションアイソフォームを確認した。

ヒアルロン酸の分泌に関しては、樹立した中皮腫細胞株の培養液を用いて、ELISA法でその分泌量を測定し、さらにヒアルロン酸分泌の主因となる遺伝子の発現解析のため

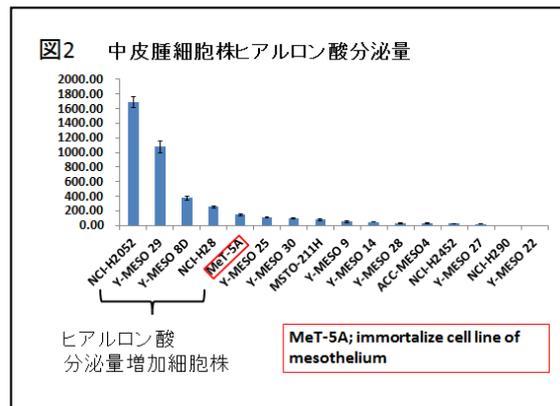
expression array, リアルタイムPCRを施行し検討した。またそれらの結果と、CD44の発現レベル・バリエーションアイソフォームに加えて、CD44の下流のシグナル伝達として想定していたHippo pathwayの標的因子YAPのリン酸化レベルとの統合解析を行った。

4. 研究成果

我々が樹立し日本人由来のものを多く含む中皮腫細胞株を用いて、CD44の発現レベルの解析を行った。Western blot法では、ほとんどの細胞株でCD44の高発現を認めた(図1)。



CD44がヒアルロン酸の受容体としても機能することに着眼し、中皮腫細胞株のヒアルロン酸分泌について、細胞培養液を用いてELISA法で解析を行った(図2)。その結果、不死化した正常中皮の細胞株MeT-5Aと比較して、4つの細胞株でヒアルロン酸の分泌量の増加が確認された。実臨床において悪性中皮腫で胸水中にヒアルロン酸が多量に認められる要因として、中皮腫細胞そのもののヒアルロン酸過剰分泌が一因であると想定された。



またヒアルロン酸分泌上昇の原因遺伝子検索のため、Expression array・リアルタイムPCRを用いて検討を行った。その結果、HAS2のmRNAレベルの発現とヒアルロン酸分泌に有意な相関を認め(図3)、中皮腫細胞株においてヒアルロン酸分泌上昇の主因がHAS2の発現上昇に起因することを確認した。

Okami J, Saito H. Trimodality Therapy for Lung Cancer With Chest Wall Invasion: Initial Results of a Phase II Study. *Ann Thorac Surg.* 2014 Oct;98(4):1184-91.

Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Nishimura M, Yokoi K. Primary malignant melanoma of the thymus: report of a case. *Surg Today.* 2014 Jul 29. [Epub ahead of print]

Ozeki N, Iwano S, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F, Fukumoto K, Nakamura S, Hirakawa A, Yokoi K. Therapeutic surgery without a definitive diagnosis can be an option in selected patients with suspected lung cancer. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014 Nov;19(5):830-7.

Yokoi K, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Fukui T, Ishiguro F. Surgical management of locally advanced lung cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2014 Sep;62(9):522-30.

Ozeki N, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ito S, Sakao Y, Mitsudomi T, Hirakawa A, Yokoi K. Significance of the serum carcinoembryonic antigen level during the follow-up of patients with completely resected non-small-cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Apr;45(4):687-92

Fukui T, Taniguchi T, Kawaguchi K, Yokoi K. Spontaneous regression of thymic epithelial tumours. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2014 Mar;18(3):399-401

Kawaguchi K, Taniguchi T, Usami N, Fukui T, Ishiguro F, Nakamura S, Yokoi K. FDG PET/CT is useful for detecting infiltration to the port site in patients with malignant pleural mesothelioma. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2014 Mar;62(3):157-62

Ozeki N, Kawaguchi K, Taniguchi T, Yokoi K. Primary pulmonary solitary fibrous tumour with brain metastases. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2014 Feb;45(2):386-8

Nakamura S, Fukui T, Taniguchi T, Usami N, Kawaguchi K, Ishiguro F, Hirakawa A, Yokoi K. Prognostic impact of tumor size eliminating the ground glass opacity component: modified clinical T descriptors of the tumor, node, metastasis classification of lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2013 Dec;8(12):1551-7.

Ishikawa Y, Kato K, Taniguchi T, Kawaguchi K, Yokoi K. Imaging of a Case of Metaplastic Thymoma on 18F-FDG PET/CT. *Clin Nucl Med* 2013 Dec;38(12):e463-4)

Iwano S, Yokoi K, Taniguchi T, Kawaguchi K, Fukui T, Naganawa S. Planning of segmentectomy using three-dimensional computed tomography angiography with a virtual safety margin: Technique and initial experience. *Lung Cancer.* 2013 Sep;81(3):410-5.

[学会発表](計 11 件)

川口晃司 「一般ビデオ」前方および後方からのアプローチを必要とした肺尖部胸壁浸潤肺癌の2例 第55回 日本肺癌学会総会 2014年11月14日~16日 於 京都府 国際会議場

川口晃司 「ポスター」局所進行T4肺癌切除例の検討 第66回 日本胸部外科学会定期学術集会 2014年9月30日~3日 於 福岡県博多市 国際会議場

川口晃司 「一般ビデオ」ロボット支援下胸腺全摘術の有用性の検討 第31回 日本呼吸器外科学会総会 2014年5月29日~30日 於 東京都港区台場・ホテル日航東京

川口晃司 IVa期胸腺腫に対する胸骨正中切開と側方開胸による胸腺全摘+胸膜肺全摘術を施行した3例 第15回 胸骨正中経路による肺癌手術懇話会 2014年4月12日 於 東京都 武田薬品工業株式会社 東京支店

川口晃司 「パネルディスカッション」大腸癌肺転移巣の増殖速度からみた肺切除の適応について - 呼吸器外科の立場から 第114回 日本外科学会定期学術集会 2014年4月3-5日 於 京都府 国際会議場

Chemoradiotherapy and Surgical Resection for Non-Small Cell Lung Cancer with Chest Wall Invasion: Initial Results of the Central Japan Lung Study Group Trial 0801 The Society of Thoracic Surgeons 50th Annual Meeting 2014.1.25-29 in Orlando, FL

川口晃司 「一般」上縦隔と下縦隔の同時性腫瘍に対する1期的ロボット支援下摘除術 第26回 内視鏡外科学会総会 2013年11月28日~30日 於 福岡県博多市 国際会議場

川口晃司 「ポスター」肺癌の臓側胸膜浸潤についての検討 第54回 日本肺癌学会総会 2013年11月21日~22日 於 東京都 ホテルニューオータニ東京

川口晃司 「一般」上縦隔と下縦隔の同時性腫瘍に対する1期的ロボット支援下摘除術 第3回 呼吸器外科ロボット手術手技研究会 2013年10月18日 於 宮城県仙台市 国際会議場

川口晃司 「ポスター」当院での区域切除術における術前CTでの切除区域の評価法と切除マージンに関する検討 第65回 日本胸部外科学会定期学術集会 2013年10月16日~19日 於 宮城県仙台市 国際会議場

川口晃司 「一般ビデオ」胸腔鏡下横隔膜縫縮術の工夫とピットホール 第30回 日本呼吸器外科学会総会 2013年5月9日~10日 於 愛知県名古屋市 国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

川口晃司、横井香平
文光堂 病理と臨床 33巻7号
胸腺病理の基礎と臨床 第4章 胸腺腫瘍の治療 2015 印刷中

6. 研究組織

(1)研究代表者

川口 晃司 (KAWAGUCHI KOJI)
名古屋大学・医学部附属病院・病院講師
研究者番号：10402611

(2)研究分担者

なし