

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860904

研究課題名(和文)皮膚癌におけるKM48モノクローナル抗体反応性CD44変異体の役割の研究

研究課題名(英文) Study of the role of CD44 variant recognized by KM48 monoclonal antibody in Skin SCC

研究代表者

TEYE KWESI (TEYE, KWESI)

久留米大学・皮膚細胞生物学研究所・研究員

研究者番号：30599303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は、抗KM48抗体に反応するCD44を特定し、正常とガンにおける機能を明らかにすることである。まず、我々はヒト表皮におけるCD44の転写産物の18すべてを分離することに成功した。また、KM48は皮膚ガン(SCC)で発現が認められなかったことから、扁平上皮ガンのような上皮ガンの進行に関与しているのではないかと考えられた。さらに、血清添加や無添加状態において、正常とガン表皮細胞では異なるCD44転写産物が発現していた。最後に、CD44vが抗KM48抗体と反応することがわかり、バリエーションのいずれかが、KM48抗原であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is to identify the variant of CD44 recognized by KM48 antibody and to assess its functional role in normal and human skin cancer by various methods. Expression of more than 800 transcripts of CD44 is possible but not all are expressed and the expression is tissue and context dependent. For the first time, all CD44 transcripts in human epidermis were isolated. It was found that human epidermis express a total of 18 transcripts. Because KM48 expression is lost in SCC, regulation of expression of CD44 transcripts was analyzed and compared between normal and malignant keratinocytes. It was found that malignant and normal keratinocytes produce different CD44 transcripts and respond differently to serum stimulation and subsequent serum starvation. By designing an optimal expression system, we were able to identify the CD44 variant recognized by the KM48 antibody. Our studies should aid further studies of CD44/KM48 function in human skin.

研究分野：皮膚科

キーワード：KM48 CD44 Skin SCC Keratinocyte

### 1. 研究開始当初の背景

1986年、ヒト表皮細胞懸濁液で免疫したマウスより IgM class のモノクローナル抗体が検出され、抗 KM48 抗体と命名された[1]。免疫学的研究によって、抗 KM48 抗体は表皮細胞の細胞膜、特に、皮膚バリア機能に不可欠なデスモゾームに反応することが証明された。このことより、デスモゾームの KM48 抗原は desmosealin と名づけられ、デスモゾームを構成する蛋白を早期分解から守ることに関与していることがわかった。

我々の予備実験で、KM48 抗原はヒトの皮膚ガン(SCC)では発現していなかったことから、KM48 抗原を同定し、SCC における治療の可能性をさぐることは非常に重要であると考えられた。しかし、抗 KM48 抗体に関しては不明な点が多く、世界のどの研究室でも、長い間抗原同定に至らなかった。

そんな中、我々は最近、抗 KM48 抗体の抗原が CD44 であることを初めて発見した。ところが、CD44 には、alternative splicing により多くの variant が存在し、それぞれの variant は正常や病気の各段階で、独自の役割を果たしているのではないかと予測され、非常に複雑であることがわかった。したがって、抗 KM48 抗体に反応する CD44 variant (KM48 抗原) を同定することが必要と思われた。

### 2. 研究の目的

この研究の目的は、抗 KM48 抗体に反応する CD44 の variant (KM48 抗原) を同定し、正常と皮膚ガンにおけるその機能を、さまざまな方法を用いて評価し、皮膚ガンの治療に結びつけることである。

### 3. 研究の方法

(1) 表皮 cDNA の作製には、健常成人の包茎手術後の不要な包皮を用いた。まず、包皮をチオシアン酸ナトリウム溶液で処理し、表皮と真皮に分けた[2,3]。表皮は Biomasher II でホモジナイズし、RNeasy Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて RNA を抽出した。その後、SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) で合成した cDNA を用いて、CD44 の PCR を施行した。PCR には、Primestar MAX DNA polymerase (Takara Bio, Shiga, Japan) を用い、PCR 産物をアガロースとポリアクリルアミドゲルで泳動し、確認を行った。また、CD44 の cDNA を pcDNA-Myc-His (Invitrogen) または、pLV-Sin-Puro lentiviral vector (Clontech Laboratories, Mountain View, CA) の 2 つのベクターに挿入した。

(2) (1) で説明したように、RNA 抽出、cDNA 合成、PCR 法を用いて、いろいろな細胞における CD44 転写産物を比較・検討した。

(3) 正常およびガン表皮細胞において、さまざまな薬剤添加による CD44 発現の変動を検討した。培養した細胞に様々な試薬を添加し、CD44 転写産物を、前述の方法を用いて

測定した。

(4) 個々の CD44 転写産物を挿入したプラスミド (CD44/pLV-SIN plasmid) を Xfect transfection reagent (Clontect) を用いて Lenti-X 293T cells (Clontech) にトランスフェクションした。その後、RIPA buffer にて細胞懸濁液を作製した。得られたタンパクを SDS-PAGE 法にて分離し、ニトロセルロース膜にトランスファーした後、anti-His-Tag と KM48 抗体にてウエスタンブロットを施行した。

### 4. 研究成果

(1) まず、ヒト皮膚における CD44 standard (CD44s) と variant の発現を明らかにした。CD44s は、薄切皮膚片の表皮と真皮の両方に顕著な発現を認めた (図1)。一方、variant 6 などの variant は、表皮の細胞表面に特異的な発現を示した。(図1)

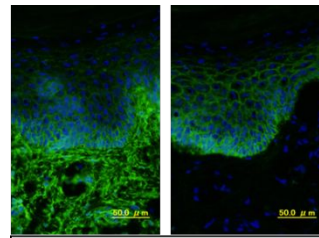


図1 ヒト皮膚における CD44s (左) と CD44v6 (右) の発現

(2) そこで我々は、ヒト表皮と皮膚におけるすべての CD44 転写産物を分離・特定することができるクローニング法を、初めて開発した。(図2)

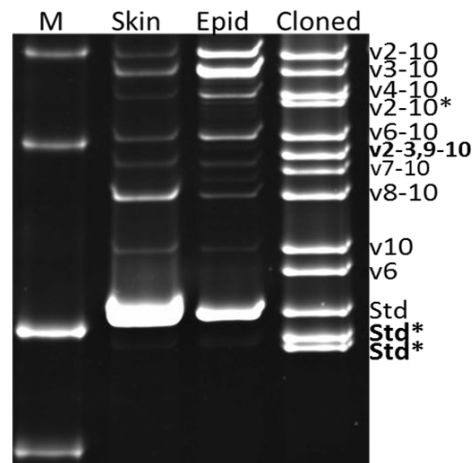


図2: ヒト表皮における CD44 転写

(3) 次に、さまざまな細胞における CD44 の発現を調べ、違う細胞ではそれぞれ違う CD44 の転写産物が発現していることを見出した。Hela 細胞と fibroblast では、CD44s のみが発現していたが、正常およびガン表皮細胞では、すべての CD44 転写産物がそれぞれに決まった割合の発現を示した。(図3)

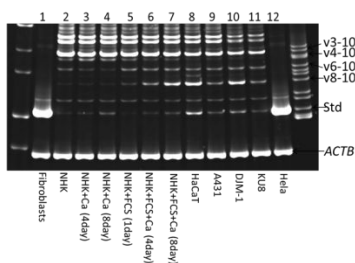


図3：さまざまな細胞における CD44 転写産物の測定結果

(4) 続いて、ヒト皮膚における CD44 分子の機能を明らかにする目的で、我々は様々な薬品を正常表皮細胞に添加し、CD44 転写産物の発現を調べた。その結果、色々な薬品、特に epidermal growth factor, hydrogen peroxide, phorbol 12-myristate 13-acetate, retinoic acid, calcium, fetal calf serum を添加した場合、それぞれ特徴的な CD44 転写産物の発現パターンを示した。(図4)

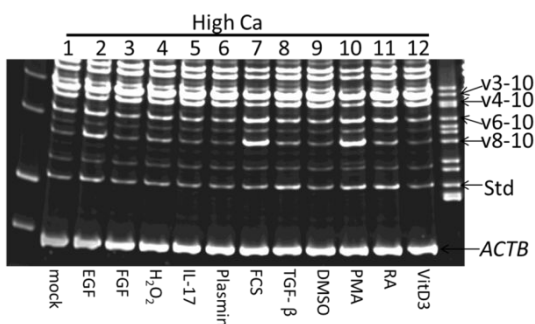


図4：高カルシウム条件下で各薬品を添加した、正常表皮細胞における CD44 転写産物の測定結果

(5) さらに、我々は正常とガン表皮細胞における血清への CD44 転写産物の反応を調べた。その結果、正常表皮細胞とガン表皮細胞では、血清添加刺激に対して、異なる CD44 転写産物が増減していることがわかった。このことから、異なる CD44 が関わる生物学的経路を介して、特定の CD44 転写産物が腫瘍形成に関与しているのではないかと考えられた。(図5)

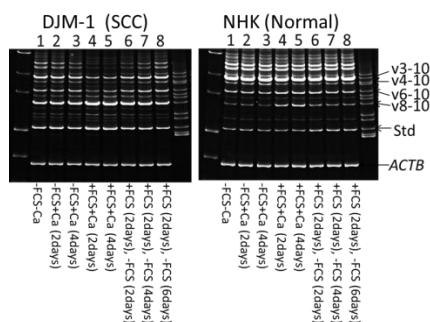


図5：血清添加時の正常およびガン表皮細胞における CD44 転写産物の測定結果

(6) 最後に、我々は、KM48 抗原に反応する CD44 variant を特定するために、ウエスタンブロットを行った。pLV-Sin vector を、Lenti-X 293T にトランスフェクションし、そのタンパク混濁液を抗 KM48 抗体と抗 His-Tag 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。その結果、抗 KM48 抗体は、CD44s ではなく CD44 variant に反応し、variant のうちのいずれかが、KM48 抗原である可能性が示唆された。(図6)

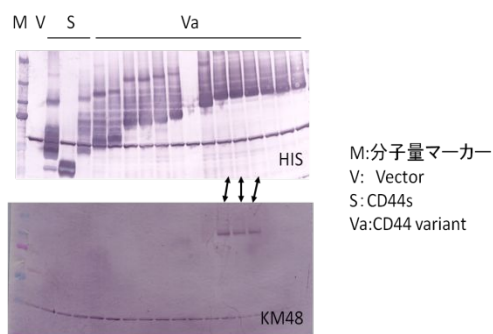


図6：抗 KM48 および抗 His-tag 抗体を用いた 293T 細胞のウエスタンブロット

#### <引用文献>

Haftek M, Viac J, Cordier G, Thivolet J. (1986) Flow cytometry for separation of keratinocyte subpopulations from the viable epidermis. *J Invest Dermatol.* Oct;87(4):480-4.

Trost A, Bauer JW, Lanschutzer C, Laimer M, Emberger M, et al. (2007) Rapid, high-quality and epidermal-specific isolation of RNA from human skin. *Exp Dermatol* 16: 185-190.

Clemmensen A, Thomassen M, Clemmensen O, Tan Q, Kruse TA, et al. (2009) Extraction of high-quality epidermal RNA after ammonium thiocyanate-induced dermo-epidermal separation of 4 mm human skin biopsies. *Exp Dermatol* 18: 979-984.

#### 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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Kwesi Teye 他、Isolation of all CD44 transcripts in human epidermis and regulation of their expression by various agents. 第 29 回表皮細胞研究会、2015.11.14、ホテルニューオータニ佐賀.

Kwesi Teye 他、Identification of CD44 transcripts that segregate with proliferation, redox and

differentiation activities in human  
keratinocytes. The 40th Annual Meeting  
of the Japanese Society for  
Investigative Dermatology.  
2015.12.11-13.  
Okayama Convention Center.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

テイエ クエシ (TEYE Kwesi)  
久留米大学皮膚細胞生物学研究所・研究員  
研究者番号：30599303

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：