

氏 名 三輪 武史
みわ たけし

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 225 号

学位授与年月日 平成 29 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 Isoform switch of CD44 standard to variant present
different chemotactic and tumorigenic ability in
gallbladder cancer
(胆嚢癌細胞はCD44 isoform switch に伴ってEMTが進行し，遊走
能，腫瘍形成能を獲得する)

論文審査委員

(主査) 教授 北村 寛
(副査) 教授 井村 穰二
(副査) 教授 森 寿
(副査) 教授 杉山 敏郎
(指導教員) 教授 北島 勲

論文内容の要旨

〔目的〕

胆嚢癌 (gallbladder cancer: GBC) は予後不良な癌腫であり、唯一の根治的治療は外科的切除であるが、遠隔転移や局所進行により根治的切除が不可能である症例は多く、GBC における転移の機序解明は患者の予後向上に有益である。

CD44 はヒアルロン酸をリガンドとする糖蛋白であり、腫瘍細胞における増殖、薬剤耐性、および癌幹細胞の機能に寄与するとされる。CD44 は 20 の exon からなり、10 exon からなる standard isoform の他に 10 exon (v1-v10) の選択的スプライシングにより複数の variant isoform を形成する。抗 CD44 抗体の多くは standard isoform と共に variant isoform を認識する。CD44 抗体の抗原が特定の isoform か pan-CD44 の何れであるかを明らかにすることが重要である。

CD44v9 は腫瘍細胞の増殖、アポトーシスの抑制、化学療法抵抗性、上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT)、および予後不良に関連することが報告されている。CD44v9 は早期胃癌における再発と関連し、膵癌および肝細胞癌において予後不良と関連した。またグルタチオン合成に寄与することで抗酸化作用を発揮し、FAS に作用してアポトーシスを抑制し、また multidrug resistance protein 1 (MRP1) を産生し化学療法抵抗性を示した。CD44 mRNA のスプライシングによる variant から standard への isoform switch が EMT に不可欠であり、スプライシングに epithelial splicing regulatory protein 1 (ESRP1) が抑制的に作用することが報告された。CD44v9 陽性細胞が高い腫瘍形成能を示すことが結腸癌、乳癌で報告されている。膵癌細胞において分裂期にある細胞が CD44v9 を発現していることが報告されている。

GBC における CD44 発現と腫瘍形成、EMT に関する報告はあるものの、CD44 isoform に基づく報告は少なく、GBC の増殖、転移における CD44 isoform の役割は明らかではない。本研究の目的は GBC における CD44 isoform と EMT、遊走能、腫瘍形成能の関係性を明らかにすることである。

〔方法〕

胆嚢癌細胞株の培養とフローサイトメトリー

胆嚢癌細胞株 NOZ を 37°C, 5% CO₂ 下で DMEM/Ham's F-12 培地(10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic 100x)で培養した. 表面マーカー標識には Fluorescein isothiocyanate (FITC) と allophycocyanin (APC)で標識したモノクローナル抗ヒト CD44 抗体 (clone BD105; Miltenyi Biotec)および抗ヒト epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)抗体 (clone HEA-125; Miltenyi Biotec), FITC 標識抗ヒト CD44 standard (CD44std)モノクローナル抗体 (clone SFF-2; Affymetrix), 抗ヒト CD44 variant 9 (CD44v9)ラットモノクローナル抗体 (clone RV3; Cosmo Bio) を用いた. CD44v9 に対する二次抗体として FITC 標識抗ラット IgG2a モノクローナル抗体 (clone RG7/1.30; Miltenyi Biotec)を用いた. 表面マーカー測定及びソーティングには FACS Aria II cell sorter および BD FACS Diva software (BD Biosciences)を使用した. 単層培養された NOZ を 0.025% Trypsin with 0.01% EDTA (Life Technologies)で浮遊化し 0.5% BSA 入り PBS に懸濁した. FITC および APC にて標識し, 死細胞除去のため 7-aminoactinomycin D (7-AAD; BIO-RAD)で染色した. CD44^{high}-CD44std⁺-CD44v9⁻-EpCAM^{low} (CD44s) および CD44^{low}-CD44std⁻-CD44v9⁺-EpCAM^{high} (CD44v)をそれぞれソーティングし, 以後の実験に用いた. ソートした細胞を再度培地に播種培養し, 癌細胞の生存及び増殖を確認した. 更に 1~2 週間培養した細胞を再度 CD44, EpCAM で染色し, 表面マーカーの変化を観察した. 表面マーカーの経時的変化を確認するため, 培養及びソーティングを 3 回繰り返した.

Migration assay (Boyden chamber assay) and invasion assay

遊走能測定として migration assay (Boyden chamber assay)を行った. 8µm 径の小孔膜を持つセルカルチャーインサート (Corning)をプレートにセットし, lower chamber に 10% FBS 入り培地を入れた. upper chamber にはソートした CD44s および CD44v 細胞 50,000 個を懸濁した無血清培地を入れ, 37°C, 5% CO₂ 下に 24 時間インキュベートした. lower

chamber 側に遊走した細胞を Differential Quik Stain Kit (Polysciences)で染色した。200 倍の視野で無作為に選んだ 3 視野について遊走細胞を計測した。

浸潤能測定には invasion assay を用いた。セルカルチャーインサートを 0.5mg/ml の matrigel で覆い、lower chamber に 10% FBS 入り培地を入れた。upper chamber にはソートした CD44s および CD44v 細胞 50,000 個を懸濁した無血清培地を入れ、24 時間インキュベートした。Differential Quik で染色し 200 倍の視野で無作為に選んだ 3 視野について浸潤細胞を計測した。

RNA 抽出およびリアルタイム PCR(RT-PCR)

NucleoSpin RNA (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて RNA 抽出し、cDNA 作製には PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio) を用いた。RT-PCR には SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio)を用い Mx3000P real-time qPCR system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)で測定した。mRNA 発現の測定には $\Delta\Delta C_t$ 法を用いた。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)を用いて標準化した。

腫瘍形成能評価

生後 6 週 of メスのヌードマウス(BALB/c-nu, Charles River Laboratories)を用いた。NOZ-CD44s および CD44v 細胞を PBS-matrigel 混合液 (1:1) に懸濁し、マウスの両腰部に皮下注射 (100-10,000 細胞/0.1ml) した。10,000 細胞のマウスは 4 週で犠死し腫瘍径と重量を測定した。腫瘍の体積は次の式で計算した： $(\text{長径}(\text{mm})/2) \times (\text{短径}(\text{mm})/2)^2 \times 4\pi/3$ 。マウスは生着した腫瘍が触知可能となった 8 週まで観察した。

組織マイクロアレイ (Tissue samples and tissue microarray: TMA).

1997 年から 2010 年までに当科で外科的切除を行った胆嚢癌 52 例を用いて TMA を行った。パラフィン包埋ブロックより切り出した 1.0mm 径のコアより TMA ブロックを作成し HE 及び免疫組織染色を行った。一次抗体には抗 CD44v9 モノクローナル抗体 (Cosmo Bio)を使用した。CD44v9 標識は細胞膜で観察し、TMA スコアを distribution score

と intensity score より算出した。distribution score は腫瘍細胞中の陽性細胞の割合によって 0 (0-10%), 1 (11-50%), 2 (51-100%) と定義した。また intensity score は 0 (no staining of cancer cells), 1 (weak), 2 (moderate), 3 (marked) と定義した。CD44v9 高発現は distribution score と intensity score の合計値 4 以上と定義し、低発現は 3 以下と定義した。

統計解析

データは平均 ± 標準偏差で表した。検定には Wilcoxon 順位和検定および Fisher の正確検定を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い log-rank テストで検定した。統計解析には JMP pro 11.2 (SAS) を使用し、 $p < 0.05$ を有意とした。

〔結果〕

細胞表面解析

GBC 細胞株 NOZ の CD44 発現解析では陽性細胞を 90% 認め、二峰性の分布を示した。二重染色で NOZ には CD44 isoform の異なる 2 分画を認めた。CD44 強発現群は NOZ の 70% を占め、EpCAM 低発現、CD44std 陽性、CD44v9 陰性を認めた。CD44 弱発現群は NOZ の 30% を占め、EpCAM 高発現、CD44std 陰性、CD44v9 陽性を認めた。CD44s: CD44^{high}-CD44std⁺-CD44v9⁻-EpCAM^{low} および CD44v: CD44^{low}-CD44std⁻-CD44v9⁺-EpCAM^{high} としてソーティングした。CD44s 細胞は紡錘形の形態を認め、CD44v 細胞は円形の形態に一部紡錘形または多角形の細胞を認めた。ソート細胞の経時的表面マーカー解析では CD44v 細胞から CD44v 細胞とともに CD44s 細胞が出現したが、CD44s 細胞からは CD44s 細胞しか出現しなかった。本結果から CD44s 細胞は CD44v 細胞より由来する可能性が示唆された。

遊走能浸潤能評価

migration assay, invasion assay では CD44s で高い遊走能、浸潤能を認めた。migration assay では一視野当たりの遊走細胞数で CD44s vs CD44v: 51.2 ± 27.7 cells/field vs 6.1 ± 4.1 cells/field ($p < 0.0001$)であった。invasion assay では一視野当たりの浸潤細胞数で CD44s vs

CD44v: 16.7±13.6 cells/field vs 4.6±2.7 cells/field (p<0.0001)であった。

RT-PCR

CD44s で間葉系形質，CD44v で上皮系形質を認めた。EMT マーカーは CD44s で有意に vimentin 高発現，E-cadherin 低発現を認めた。転写因子 ZEB1，ZEB2 は共に CD44s で有意に高発現していた。CD44 isoform switch を抑制的に調節するスプライシング因子 ESRP1 は CD44v で有意に高発現を認めた。

マウス異種移植による腫瘍形成能評価

CD44v は高い腫瘍形成能を示した。CD44s / CD44v で長径 $6.8 \pm 2.8 / 15.7 \pm 4.5$ mm (p<0.001)，体積 $131 \pm 160 / 1401 \pm 1013$ mm³ (p<0.001)，重量 $0.09 \pm 0.12 / 1.15 \pm 0.80$ g (p<0.001)で CD44v において有意に高かった。100 細胞群では CD44v 群において 12 部位中 10 部位で腫瘍形成を認めた一方，CD44s 群では腫瘍形成を認めなかった。

組織マイクロアレイ

CD44v9 強発現は予後不良，高 CEA と相関した。胆嚢癌 TMA52 例中，9 症例は不適切なコア，染色不良のため除外し，43 症例を対象とした。CD44v9 強発現は 23 例に認められた。CD44v9 発現による年齢，性別，血清 CD19-9 値，T 因子，N 因子に差は認めなかった。血清 CEA 値，および静脈浸潤は CD44v9 強発現群で有意に高かった。リンパ管浸潤，遠隔転移は CD44v9 強発現群で多く見られたが有意差は認めなかった。全生存期間は CD44v9 強発現群で有意に短かった。

〔総括〕

GBC 細胞株 NOZ において CD44s と CD44v の 2 分画を認め，CD44s は間葉系形質と高い遊走能・浸潤能を示し，CD44v は上皮系形質を認め，腫瘍形成能を認めた。CD44v 群からは CD44s 細胞への switch を認めた。CD44 isoform switch は腫瘍の増殖，転移に重要な役割を果たしており，本機序の更なる解明が胆嚢癌治療成績向上に寄与するもの考える。