

論文の内容の要旨

論文題目 癌転移における細胞接着分子 CD44 の分子基盤の解明

氏名 鈴木 美穂

【背景】

癌転移は①原発巣からの脱離、②組織への浸潤、③脈管への浸潤、④運搬、⑤臓器脈管へのトラップと脈管外への脱出、⑥2次臓器への浸潤と再増殖からなり、これらの過程では様々な細胞接着分子が関与している。細胞外マトリックスの主成分であるヒアルロン酸 (HA) 受容体 CD44 は多くの癌細胞において発現が亢進しており、癌転移における脈管外へのトラップ (⑤)、組織への浸潤 (②,⑥) に関与していると考えられている。これまでの構造生物学的解析から、CD44 の細胞外領域に存在する HA 結合ドメイン (HA binding domain HABD) は、C 末端領域が一定の構造を形成し HA に対して低親和性の “Ordered (O)-state” (Fig.1A) と、C 末端領域が構造を形成していない HA 高親和性の “Partially disordered (PD)-state” (Fig.1B) の 2 状態をとり、その間を常に交換していること、その平衡が HA 結合に伴い PD-state に移行することが判明している。CD44 の HA 認識様式やそれに伴う構造平衡の変化は構造レベルで詳細に解明されたが、このような HABD の 2 状態平衡が CD44 を介した細胞レベルの現象にどのように関与しているか不明である。そこで本研究では CD44 の構造平衡を O-state および PD-state の片方に固定し

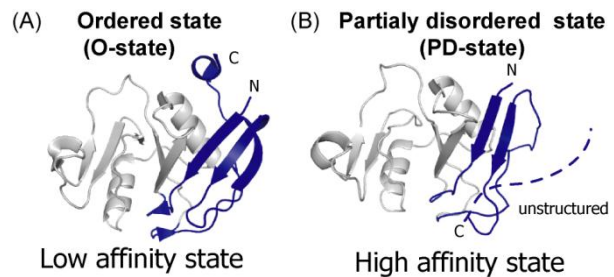


Fig. 1 CD44 HABD の構造

(A) HA 非存在下の HABD の結晶構造 (PDB code 1UUH)、(B) HA 存在下の HABD の NMR 構造 (PDB code 2I83)、グレイ HA 結合タンパク質間にて保存性の高いリンクモジュール、青 付加配列領域

た変異体を発現する細胞を用いて、癌転移と関連する CD44 の細胞運動活性への影響を解析することにより、構造レベルの知見と細胞レベルの現象を統合的に理解することを目的とした。

【結果】

1. 癌細胞のローリングと CD44 の構造平衡

CD44 を介して癌細胞が脈管外に漏出する際、まず、血管内皮細胞上の HA と一過的な相互作用によってローリングと呼ばれる細胞運動が起こる。そこで、CD44 HABD の HA 結合親和性の異なる 2 状態の平衡が癌細胞のローリングに与える影響を野生型 CD44、平衡を制御した変異体を発現する細胞を用いて調べた。まず内在性 CD44 が発現していないヒト肺癌由来 VMRC-LCD 細胞を用いて野生型 CD44 (CD44s)、PD-state 変異体、O-state 変異体の安定発現細胞株を調製した。抗 CD44 抗体を用いた FCM 解析により、野生型 CD44 発現細胞、各変異体発現細胞とも発現量が同程度であることを確認した。次に、長鎖 HA を固定したキャピラリーに野生型、各変異体発現細胞を流速 0.25 dyn/cm^2 にて灌流し、ローリングおよび接着を示す細胞の数を調べた。HA 表面上に接着後、15 秒間に $10 \mu\text{m}$ 以上の移動距離を示す細胞をローリング、それ以下の移動距離を示す細胞を強い接着としてカウントした結果、野生型 CD44 発現細胞、O-state 変異体発現細胞では HA 上に強く接着する細胞よりもローリングする細胞が多く観測された (Fig.2)。一方、PD-state 変異体発現細胞は HA 上に強く接着する細胞の割合が顕著に多いことから、HA 高親和性の PD-state のみでは HA と強く接着したまま適切に解離せず、ローリング活性が損なわれることが判明した (Fig.2)。さらに、野生型発現細胞、O-state 変異体発現細胞の挙動を比較するため、HA 接着後の瞬間移動速度および合計移動距離をプロットした。その結果、野生型発現細胞では HA と接着すると安定にローリングが持続するのに対し、O-state 変異体発現細胞では HA と接着後、頻繁に解離を繰り返す様子が観測された (Fig.3)。よって、HA 低親和性の O-state のみでは HA との接着が弱く、ローリングを持続できないことがわかった。以上より、CD44 を介した細胞のローリングには CD44 HABD が HA 結合親和性の異なる 2 状態を交換していることが必須であると結論した (Fig.4)。

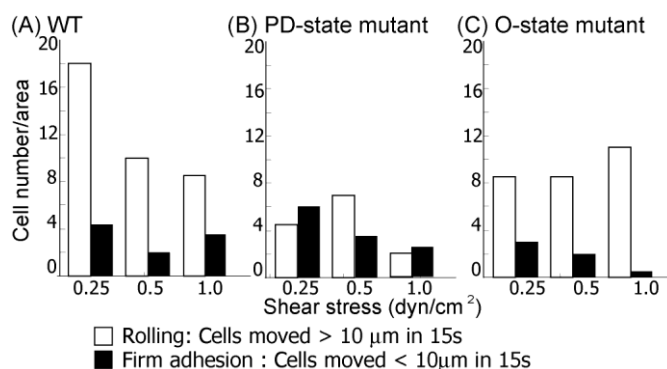


Fig. 2 CD44 発現細胞を用いたローリング実験

(A)野生型、(B) PD-state 変異体、(C) O-state 変異体、細胞が 15 秒間に $10 \mu\text{m}$ 以上移動したものをローリング (□)、移動しなかったものを強い接着 (■)として示した。

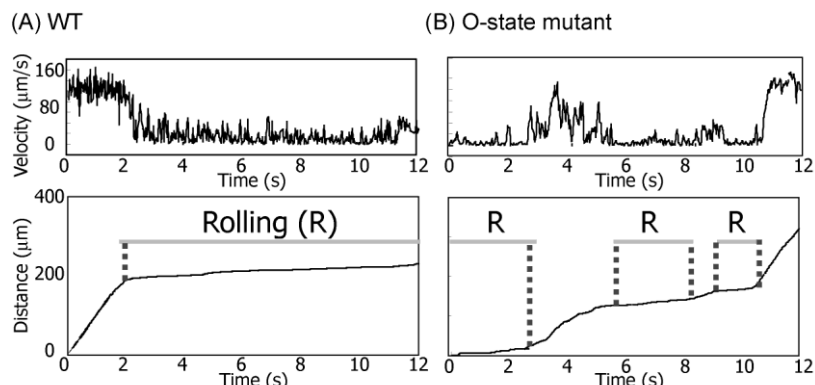


Fig.3 CD44 発現細胞のローリングの挙動

(A) 野生型 (B) O-state 変異体、1 フレーム (0.33 秒) ごとの細胞の瞬間移動速度、合計移動距離をプロットした。



Fig.4 細胞のローリングと CD44 HABD の構造平衡の関係

2. 癌細胞の組織への浸潤と CD44 の構造平衡

CD44 は膜貫通型のメタロプロテアーゼにより HABD と膜貫通ドメインの間の細胞外領域にて切断を受ける。この CD44 の切断が CD44 自身の発現・分解のターンオーバーを亢進させることで、細胞外マトリックスとの着脱が促進され、細胞運動能が上昇することが提唱されている。さらに転移陽性患者では血清中に CD44 細胞外領域の切断産物が多いことが報告され、癌細胞の転移と CD44 の切断が着目されつつある。CD44 の切断は、炎症時等に誘導される低分子量 HA によっても促進されることが報告されている。そこで HABD の構造平衡が CD44 の切断に与える影響を調べることにした。

CD44 の細胞外領域を切断するメタロプロテアーゼ MMP14 は細胞外に酵素 (CAT) ドメインと hemopexin (HPX) ドメインを持つ 1 回膜貫通型タンパク質である。まず、野生型 CD44 (CD44s)、PD-state 変異体、O-state 変異体発現細胞を MMP14 を共発現させ、培地中に存在する CD44 の細胞外領域の切断産物を抗 CD44 抗体を用いた Western blotting 解析により調べた。その結果、PD-state 変異体のみ切断産物に由来するバンドが観測された (Fig.5)。これより、HABD の構造依存的に CD44 が切断を受けることが示唆された。

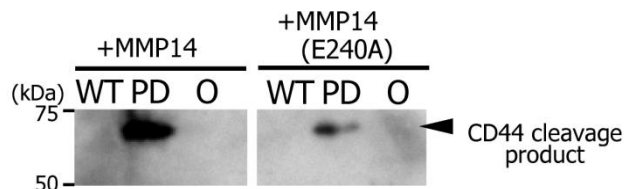


Fig.5 CD44 HABD 構造依存的な細胞外領域の切断

野生型 CD44、各変異体と MMP14 (左: 野生型、右: 活性中心残基 E240 を Ala に置換した変異体) を共発現した。培養上清に放出された CD44 切断産物を抗 CD44 抗体を用いて検出した。

次にこれまでに CD44 との相互作用が示唆されている MMP14 の HPX ドメインと HABD との相互作用を NMR 法により調べた。その結果、均一 ¹⁵N 標識 HPX に対して過剰量の野生型 HABD (90% 以上が O-state) を

添加した条件では複合体形成に伴うシグナル強度の減少が観測された (Fig.6A)。さらにこのサンプルに 22mer の低分子 HA を添加して HABD の平衡を PD-state にシフトさせると、HPX のシグナルがさらに減少したことから、HPX は HA 結合状態の HABD に対してより強く相互作用することが明らかとなった (Fig. 6A)。HPX に非標識 O-state 変異体 (100% O-state) を添加すると、HA 添加に伴いシグナル強度減少が観測されたものの、その減少率はわずかであった (Fig.6B)。また、HPX に PD-state 変異体 (100% PD state) を添加すると、HA の有無にかかわらず、野生型 HABD と HA を添加した条件と同程度の顕著なシグナル強度減少が観測された (Fig.6C)。これより、HPX は O-state よりも PD-state を形成した HABD と強く相互作用することが示唆された。以上の結果より、炎症時に産生される低分子量 HA との結合により PD-state を形成した HABD を MMP14 が強く認識し、CD44 の細胞外領域の切断が誘起されるというモデルを考えた。

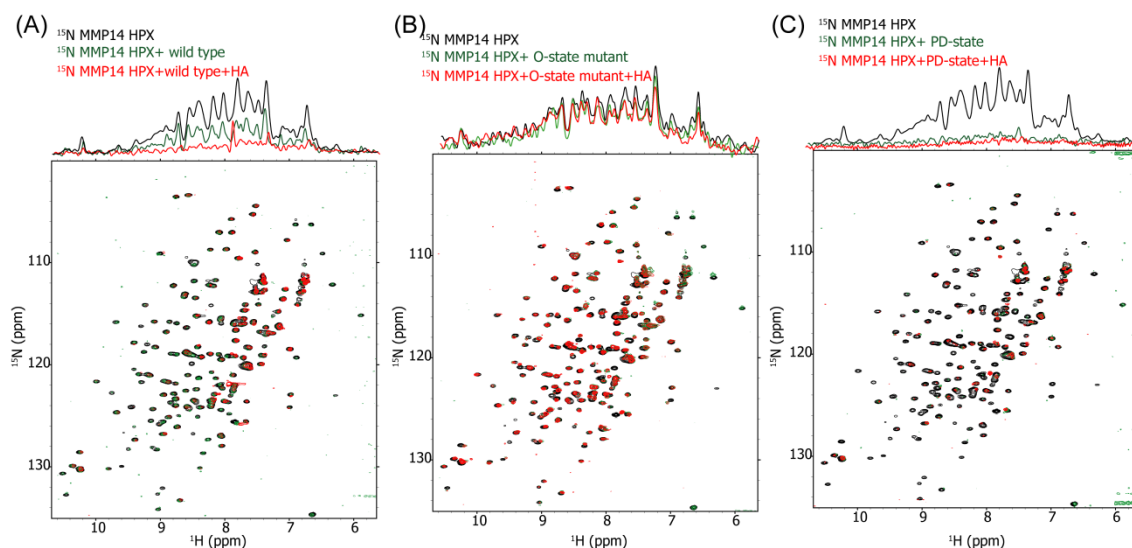


Fig.6 HPX との相互作用における CD44 HABD の構造依存性

^{15}N 標識した MMP14 HPX 単独を黒、非標識 CD44 を添加した条件を緑、さらに過剰量の HA (22mer) を添加した条件を赤にて重ねて示した。(A) では野生型 CD44 HABD (HPX に対して 2 等量)、(B) では O-state 変異体を (HPX に対して 2 等量) (C) では PD-state 変異体 (0.75 等量) を添加したものを支援した。なお、HPX 濃度が (A)、(C) では 0.2 mM、(B) では 0.04 mM である。

【総括】 本研究では、CD44 依存的な細胞のローリング、および CD44 細胞外領域の切断において、HABD の 2 状態の構造平衡が重要な役割を果たしていることを示した。これらの現象は CD44 依存的な癌転移と関連すると考えられることから、CD44 HABD の構造平衡を O-state または PD-state の片方に制御する抗体や低分子化合物を見出すことにより、新しい作用機序を持った癌転移阻害薬の開発が期待される。