

# 審査結果の要旨

氏名 鈴木 美穂

癌転移における細胞接着分子 CD44 の分子基盤の解明と題する本論文は、細胞接着分子 CD44 に存在するリガンドであるヒアルロン酸 (HA) 結合親和性の異なる 2 状態の構造平衡が細胞運動に与える影響について研究成果を述べたものである。本論文は、全 4 章から構成されており、第 1 章に序論、第 2 章に実験材料および実験方法が記されている。第 3 章においては、実験結果および結果に対する考察を記述している。第 4 章では、総括と今後の展望について述べている。

第 3 章では、CD44 が関与する細胞運動のうち、細胞のローリング、細胞の浸潤の 2 種の運動に着目し、それらの細胞運動と CD44 に存在する HA 結合親和性の異なる 2 状態の構造平衡について構造を固定した変異体を用いて解析していた。

CD44 は一回膜貫通型の蛋白質で、HA をはじめとした細胞外マトリックスとの相互作用を介し免疫応答を担う分子で、近年、癌転移にも関与することが報告されている。また、CD44 の細胞外領域に存在する HA 結合ドメイン (HABD) が HA の有無にかかわらず HA 結合親和性の異なる 2 状態 (O-state、PD-state) の構造平衡にあることが解明されている。これまでの構造生物学的な解析から CD44 の HA 認識様式やそれに伴う構造平衡については詳細に解明されたが、CD44 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は不明であった。これに対し、本論文では CD44 HABD の構造平衡を片側に固定した変異体を用いて解析を行なっている。

まず、CD44 を介した細胞のローリングに CD44 の構造平衡が与える影響を調べるため、内在性 CD44 が発現していないヒト肺がん由来 VMRC-LCD 細胞を用いて野生型 CD44、各変異体安定発現細胞を調製している。抗 CD44 抗体を用いた FCM 解析により、野生型、各変異体とも同程度に蛍光強度が増大することから細胞膜上に同程度発現していること、Western blotting 解析により野生型、各変異体とも移動度に大きな変化が観測されないことから変異導入により糖鎖修飾が変調を受けていないことを確認していた。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  $0.25 \text{ dyn/cm}^2$  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ていた。この結果、野生型 CD44 発現細胞、HA 低親和性の 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。

一方、HA 高親和性の PD-state 変異体発現細胞では 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を解明していた。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ており、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ていた。これより 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を示していた。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ていた。

次に、膜貫通型のメタロプロテアーゼによる CD44 の細胞外領域切断に着目していた。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、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ていた。

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、各変異体発現細胞を 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 解析により調べており、PD-state 変異体のみ切断産物に由来するバンドが観測されていた。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していた。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 法により調べていた。その結果、均一  $^{15}\text{N}$  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、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 (90% 以上が PD-state) に対してより強く相互作用することが明らかと示唆していた。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る一方、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ていた。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していた。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提唱していた。

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ていた。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可能となると期待できる。

以上、本研究の成果は、構造生物学的な解析方法の発展に大きく貢献するものであり、これを行った学位申請者は博士（薬学）の学位を得るにふさわしいと判断した。