

主論文の要旨

**The CD44/COL17A1 pathway promotes the formation
of multilayered, transformed epithelia**

〔 発がんにおける CD44/COL17A1 の役割 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
神経科学講座 神経情報薬理学分野

(指導：山田 清文 教授)

小澤 慶

【緒言】

生体内で生じるがんの約 80%は肺、腸、膵臓などの上皮組織から起こる。多くの場合、がんが発生する最初の段階では、正常組織内に一つのがん原性の遺伝子変異が生じ、がん原性変異細胞が出現することが知られている。しかしながら、現在のがんの診断や治療は、がん原性の変異が更に蓄積し既になんかの過程が進んだ段階をターゲットとしており、このような段階では病理学的に形態変化を伴う進行がんとなることが多い。早期に発見し治療介入することは治療成績を大いに向上させることが期待される。この目的を達成するために本研究では、現在の診断および治療の対象外である遺伝子変異の少ない段階での超早期病変、すなわち超早期がん細胞を検出して病変を診断する方法の確立を目指した。

【方法と結果】

我々は、超早期の変異細胞に集積し特異的に機能する分子を同定するためにファージ抗体ディスプレイ法によって網羅的にスクリーニングを行った。特に、バイオマーカーや抗体試薬への応用を考慮し、細胞膜上へ局在を示す分子に対する抗体の単離と同定を行った。腎上皮由来の正常の MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞とファージライブラリを反応させ、正常細胞に結合するファージを除いた。次にライブラリの上清を正常細胞と RasV12 変異細胞の 1:1 混合培養に反応させ、混合培養条件下で特異的に結合するファージ候補を 6,000-7,000 クローン得た。次にファージ候補クローンから得た抗体を用いて蛍光免疫染色法によるスクリーニングを行った。1)正常細胞のみ、2)正常細胞と Ras 変異細胞の混合培養、3)Ras 変異細胞のみ、の 3つの条件で細胞を培養し、Ras 変異細胞の細胞膜特異的に染色を示す 2つの候補クローン抗体を得た。そこで、これらの抗体のエピトープ分子を同定するために、免疫沈降実験を行い結合する分子の質量分析を行ったところ、2つの抗体は同じ膜貫通型 2 型コラーゲンタンパク質 (COL17A1) を認識することが分かった。この COL17A1 は、トランスメンブレンドメインを持つ膜タンパク質であり、皮膚などにおける表皮接着因子としての役割などは知られているが、発がんにおける意義については研究が十分には進んでおらず、役割は未だ明らかにされていない (Figure 1)。そこで、変異細胞における COL17A1 の役割について明らかにするために、まず Ras 変異以外のがん遺伝子の変異を持つ細胞での COL17A1 の発現を検討した。がん遺伝子として知られている Src もしくは ErbB2 を発現する変異細胞においても COL17A1 の細胞膜上への集積が亢進した。これら Ras、Src や ErbB2 などのがん原性変異が正常な単層上皮細胞内に生じると接触阻害機構が破綻し、多層上皮構造を形成することが知られている。そこで変異細胞の多層構造部分における COL17A1 の発現を確認したところ、多層部位において COL17A1 の集積が強く見られた。さらに、Ras 変異細胞において COL17A1 を CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトを行ったところ、多層構造の形成が減弱した。以上の事から、培養細胞系において COL17A1 が Ras 変異による多層上皮構造の形成を正に制御することが示唆された。さらに、COL17A1 と前がん段階病変との関連を検討するために、遺

伝子改変マウスを用いた解析を行った。K-Ras および p53 に変異を持つ KPC マウス (LSL-KrasG12D/+; LSL-Trp53R172H/+; Pdx-1-Cre) では、若齢の段階で膵臓がんの前がん病変である PanIN (pancreatic intraepithelial neoplasia、膵上皮内腫瘍性病変) を形成することが知られている。まず正常のマウスの膵管上皮で COL17A1 発現を検討したところ、非常に弱いものであった。一方 KPC マウスの膵管上皮では、PanIN を形成した多層病変部位で COL17A1 の発現が認められた。以上の事から、マウスにおいても多層化した前がん病変部で COL17A1 の集積が生じることが示唆された (Figure 2)。さらに我々は、別の Cell Surface Marker Screening Panel (BD Biosciences) というスクリーニングから、Ras 変異細胞の細胞膜において膜タンパク質 CD44 の集積が亢進することを見出した。この CD44 の発がんにおける役割は、進行がんなどでは報告されているが、初期段階での役割は未解明である。我々はこの CD44 が、1) Ras 変異細胞に加えて Src 変異細胞においても膜局在が亢進すること、2) Ras 変異細胞および Src 変異細胞の多層構造部分において更に強く集積すること、3) CD44 をノックダウンした際に Ras 変異多層構造が減弱すること、を明らかとした。また、マウスを用いた病理解析を行ったところ、正常の膵管上皮では CD44 の発現は弱かった一方で、KPC マウスにおける多層化した PanIN 病変部において、CD44 の強い発現が認められた。以上の事から、培養細胞系において CD44 が Ras 変異による多層上皮構造の形成を正に制御し、実際にマウスにおいても多層化した前がん病変部で CD44 の集積が生じること明らかとなった。COL17A1 と CD44 ががん原性変異による多層構造形成において似た役割を担うことが示唆された。そこで CD44 と COL17A1 の関連を検証するために、CD44 を Ras 変異細胞内でノックダウンし COL17A1 への影響を検証したところ、多層構造部分における COL17A1 の膜集積が抑制された (Figure 3)。以上のことから、Ras 変異細胞内において CD44 が COL17A1 の膜局在を正に制御することにより、変異細胞の多層構造の形成を促進することが示唆された。

【結語】

本研究では、ファージ抗体ディスプレイスクリーニングおよび Cell Surface Marker Screening Panel スクリーニングを行い、がん原性変異を持つ細胞において細胞膜上で発現が集積する COL17A1 と CD44 を同定した。その上で、これまで発がんの初期段階での役割が未解明であった CD44/COL17A1 が、がん原性変異による多層上皮構造の形成を促進させることを示した。さらに実際に膵臓がんのモデルマウスである KPC マウスにおいて、CD44/COL17A1 の発現が多層前がん病変部で集積することを確認した。以上のことから、CD44/COL17A1 の発がんの初期段階における役割の一端が明らかとなり、前がん病変部に対するバイオマーカーの候補分子としての可能性が示唆された。今後更なる機能解析を進めることで、予防的がん治療法の確立に貢献することが期待される。