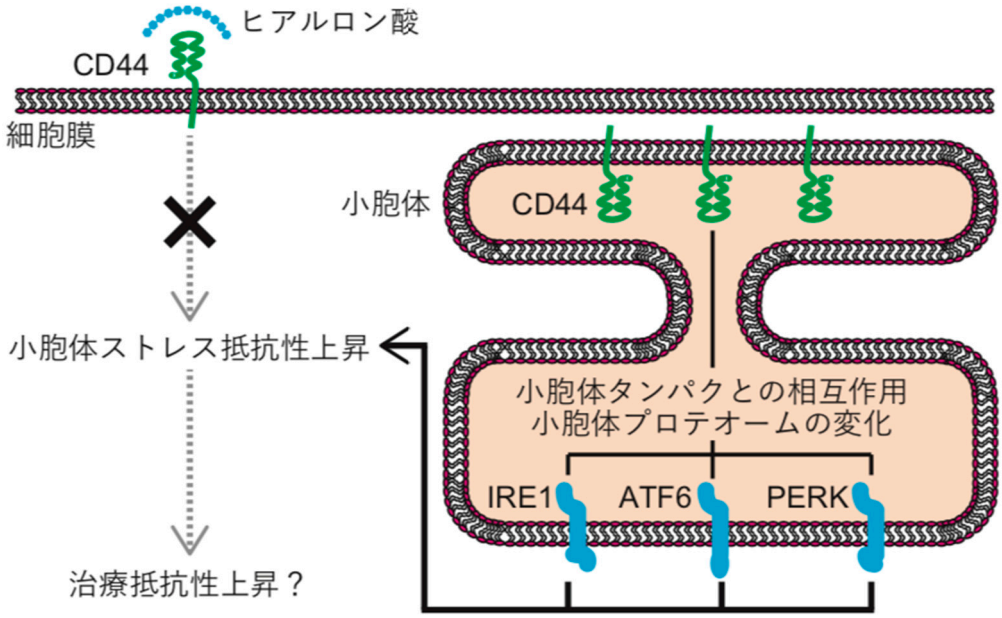
148　HA受容体CD44によるがん幹細胞代謝特性制御機構の解明	高杉　征樹

【目的】超高齢化社会を迎えつつある中でがんの予防・治療に向けた基礎研究の重要性が増している。加齢は発がんの主要なリスク要因であり、そのメカニズムを明らかにする事で効率的ながん予防および治療法の開発が可能となる事が期待される。我々は最近、発がん抵抗性の超長寿齧歯類であるハダカデバネズミが産生する超高分子ヒアルロン酸がCD44 を覆い隠す事でそのタンパク質間相互作用を抑制し、がん抑制作用を発揮する事を見出した。しかしながら、CD44 のタンパク質間相互作用がどのようにして発がんに結びつくのかについては未だに大部分不明なままである。そこで、CD44 のタンパク質間相互作用プロファイルを共免疫沈降 - 質量分析により解析したところ、興味深い事にこれまで基本的に細胞膜上にのみ発現すると考えられていた CD44 がミトコンドリアマトリックスにも局在する可能性が示唆された。CD44 はがん幹細胞の最も一般的なマーカーでもあることから、CD44 による新規ミトコンドリア調節機構ががん幹細胞の代謝特性の制御に関わっている可能性が考えられる。そこで、本研究では CD44 に着目したがん幹細胞克服の新たな戦略の創出を目指した。

【方法】先ずは我々が CD44 の機能評価をこれまでも進めてきたヒト正常線維芽細胞 IMR90 を用いて、CD44 の細胞内局在を共焦点顕微鏡で詳細に解析し、局在が認められたオルガネラの機能との関わりを主に CD44 ノックダウン細胞に生ずる変化を調べる事で明らかにした。

【結果】CD44 とオルガネラマーカーとの共焦点顕微鏡解析から、CD44 がミトコンドリアではなく、同じく共免疫沈降 - 質量分析データから局在が示唆され、かつがん幹細胞の代謝特性に関わりうる小胞体に局在する事が示された。解析の結果、CD44 はがん幹細胞の幹細胞性の制御に重要な働きを示す事が知られる小胞体ストレス応答制御因子 ATF6 の活性を高める事が明らかとなった。CD44 は小胞体に局在し、多数の小胞体タンパクと相互作用するだけでなく小胞体プロテオームを変化させ、小胞体の膜タンパクの可溶性を低下させ ATF6 のゴルジ体移行を促進させる事が示された。結果、CD44 は ATF6 を含む unfolded protein response（UPR）制御因子依存的かつヒアルロン酸非依存的に細胞の小胞体ストレス抵抗性を高める事が示された。

CD44 を UPR 制御因子依存的に細胞の小胞体ストレス抵抗性を上昇させる



148. HA 受容体 CD44 によるがん幹細胞代謝特性制御機構の解明

高杉　征樹

大阪市立大学 医学研究科 分子生体医学講座 病態生理

Key words：CD44，小胞体ストレス応答，ATF6

緒　言

超高齢化社会を迎えつつある中でがんの予防・治療に向けた基礎研究の重要性が増している。加齢は発がんの主要なリスク要因であり、そのメカニズムを明らかにする事で効率的ながん予防および治療法の開発が可能となる事が期待される。我々は最近、発がん抵抗性の超長寿齧歯類であるハダカデバネズミが産生する超高分子ヒアルロン酸が CD44 を覆い隠す事でそのタンパク質間相互作用を抑制し、がん抑制作用を発揮する事を見出した［1］。しかしながら、CD44 のタンパク質間相互作用がどのようにして発がんに結びつくのかについては未だに大部分不明なままである。そこで、CD44 のタンパク質間相互作用プロファイルを共免疫沈降 - 質量分析により解析したところ、興味深い事にこれまで基本的に細胞膜上にのみ発現すると考えられていた CD44 がミトコンドリアマトリックスにも局在する可能性が示唆された。CD44 はがん幹細胞の最も一般的なマーカーでもあることから、CD44 による新規ミトコンドリア調節機構ががん幹細胞の代謝特性の制御に関わっている可能性が考えられる。そこで、本研究では CD44 に着目したがん幹細胞克服の新たな戦略の創出を目指した。

方　法

1.　CD44 とオルガネラマーカーの免疫染色による共局在解析

ディッシュに敷いたカバーグラス上に IMR90 を播種し、2 日後に培地を除いて PBS で wash を行ってから 4% PFA/PBPS で 10 分固定した。PFA を除き wash を行い、0.05% Triton-X 100／PBS で 5 分間透過処理を行った。Triton-X 100 を除き wash を行い、10% FBS／PBS にて室温で 20 分ブロッキングを行ってから、同ブロッキング液にウサギ由来の CD44 抗体（Cat. 15675-1-AP、Lot. 00099584、Proteintech）とマウス由来のオルガネラマーカー抗体をそれぞれ 1／200 希釈で加えて 4℃で一晩反応させた。オルガネラマーカー抗体としては、ミトコンドリアマーカーを認識する mtTFA 抗体（cat. sc-376672、SantaCruz）と小胞体マーカーを認識する HSP47 抗体（cat. sc-5293、SantaCruz）、ERp57 抗体（cat. sc-23886、SantaCruz）、そして Rpn2 抗体（cat. sc-166421、SantaCruz）を用いた。抗体反応液を除き wash を行い、AlexaFluor-594 標識抗ウサギ IgG 抗体と AlexaFluor-488 標識抗マウス抗体をそれぞれ 1／1,000 倍希釈で加えた 10% FBS／PBS 中、室温で 1 時間反応させた。最後に、抗体反応液を除き wash を行い、DAPI 染色を行ってから封入操作を行い共焦点顕微鏡 LSM800（ZEISS）による観察を行った。

2.　小胞体ストレス抵抗性の測定

細胞の小胞体ストレス抵抗性測定にあたっては、ルシフェラーゼないしは CD44 を標的とした 2 種類の shRNA を安定的に発現する、hTert の過剰発現により不死化させた IMR90 細胞を 96 ウェルプレート上に播種し、翌日以降、0.5 μg/ml のツニカマイシン（Sigma）と、必要に応じて更に各種試薬を添加した培地で 6 日間細胞を培養し、その後生存している細胞の数を CyQaunt cell proliferation assaay kit（Thermo Fisher Science）を用いて測定した。ヒアルロン酸（1,000 kDa、500 kDa、50 kDa、もしくは oligo-HA）は Echelon Biosciences、IRE1 阻害剤 4μ8C、ATF6 阻害剤 PF429242、PERK 阻害剤 GSK2606414 は Cayman Chemicals、Erk 阻害剤 SCH772984、p38 阻害剤 SB202190 は Selleck、CD44 中和抗体（clone KM114、BD Bioscience）、HA 分解酵素 Streptomyces hyaluronidase は Sigma

より入手した。

結果および考察

我々のこれまでの研究によって明らかにされた CD44 の結合タンパク質群［1］の特徴を GO ontology enrichment analysis によって調べたところ、それらの中にミトコンドリアタンパクや小胞体タンパクが多く含まれている事が判明した（図 1A）。この結果を受けて、CD44 がミトコンドリアや小胞体の中に存在している可能性を検証するため、CD44 とオルガネラマーカーの共染色を行い、共焦点顕微鏡を用いた共局在解析を行ったところ、CD44 はミトコンドリアにはほとんど局在していなかったものの、少なくとも IMR90 においては CD44 が小胞体にも明確に局在する事が明らかとなった（図 1B）。ウェスタンブロット解析から、細胞に含まれる CD44 のほぼ全てが完全な糖鎖修飾を受けている事が判明し、したがって小胞体中の CD44 は合成途上の CD44 ではなく、少なくともゴルジ体で糖鎖修飾を受けてから逆行輸送により小胞体に引き戻されたものであると考えられた。CD44 は、小胞体の中でも特に UPR に関わる因子と多く相互作用をしており、CD44 を shRNA によりノックダウンした細胞では UPR のマスター転写因子の一つである ATF6 の標的遺伝子の発現が低下する事が qPCR 解析により明らかとなった。逆に、CD44 を過剰発現させた細胞では ATF6 標的遺伝子群の有意な発現上昇傾向を認めた。さらに、CD44 をノックダウンした IMR90 では小胞体ストレス誘導剤ツニカマイシンに対する感受性が増加していた。CD44 が細胞の小胞体ストレス抵抗性を制御するメカニズムを明らかにするため、まずは CD44 により制御を受ける事が示唆された ATF6 を初めとする UPR マスター制御因子（ATF6、PERK、IRE1）の関与を調べた。結果、ATF6 や PERK、IRE1 を siRNA でノックダウンしたりインヒビターで抑制したりすると、コントロール細胞と CD44 ノックダウン細胞との間でのツニカマイシン感受性の差異が大幅に縮小し、これらの因子が CD44 による小胞体ストレス抵抗性の制御を仲介している可能性が示唆された。一方で、細胞膜上の CD44 とヒアルロン酸との結合により惹起される事が知られる MAPK パスウェイをインヒビターで抑制しても、コントロール細胞と CD44 ノックダウン細胞との間のツニカマイシン感受性の差異には変化が認められなかった（図 1C）。また、細胞膜上の CD44 をブロックする中和抗体、あるいはヒアルロン酸分解酵素や様々な分子量のヒアルロン酸を培地に添加しても IMR90 のツニカマイシンに対する感受性には変化が認められなかった。以上の事から、これまで細胞膜上でのみ機能するものと考えられてきた CD44 が、実は小胞体にも局在を示し、細胞膜上の CD44 やヒアルロン酸とは一部独立に、小胞体内でのタンパク質間相互作用を介して UPR を制御し、細胞の小胞体ストレス抵抗性を高める役割を有している事が明らかとなった（図 2）。

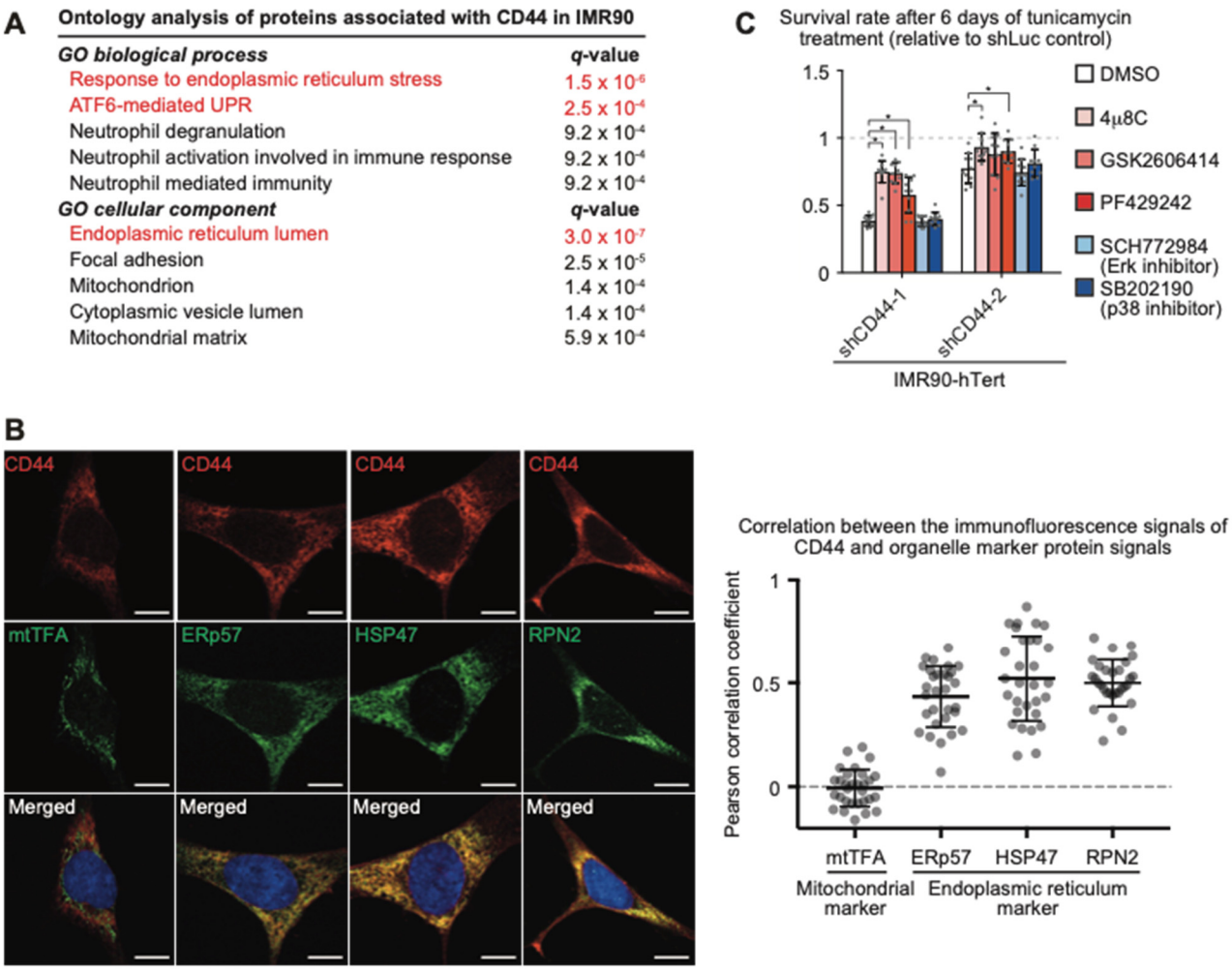


図 1. CD44 は小胞体に局在し UPR 制御因子依存的に小胞体ストレス抵抗性を増加させる

A) CD44 抗体と control IgG によるクロスリンク免疫沈降-質量分析を行い、CD44 抗体で 10 倍以上高いレベルで出された 41 個の CD44 結合タンパクについて行ったオントロジー解析の結果。q 値はフィッシャーの正確確率検定により算出されたもの。

B) IMR90 細胞を CD44 抗体（赤）とオルガネラマーカーに対する抗体（緑）で染色し、共焦点顕微鏡解析により得られた画像。青は DAPI により染められた細胞核を示す（スケールバー：10 μm）。右のプロット図は各点が一つの細胞における CD44 シグナルとオルガネラマーカーシグナルのピアソン相関係数を示す。

C) コントロール shRNA（shLuc）を発現させた細胞を 0.5 μg/ml ツニカマイシンで 6 日間処理した後の生存率を 1 として、二種類の shCD44 RNA を発現させた IMR90-hTert の相対的な生存率を示す。ツニカマイシン処理に際しては、併せて培地に vehicle（DMSO）、XBP1 インヒビター4 μ 8C（50 μ M）、PERK インヒビターGSK2606414（20 nM）、S1P インヒビターPF429242（10 μ M）、Erk インヒビターSCH772984（5 nM）、もしくは p38 インヒビターSB202190（20 μ M）を培地に添加した。* $p<0.05$（two-way ANOVA with *post-hod* Dunnett's test）。p 値は shCD44-1 vs shLuc（4 μ 8C、GSK2606414、PF429242）：いずれも $p<0.0001$、shCD44-2 vs shLuc（4 μ 8C）：$p=0.0017$、shCD44-2 vs shLuc（PF429242）：$p=0.0157$。

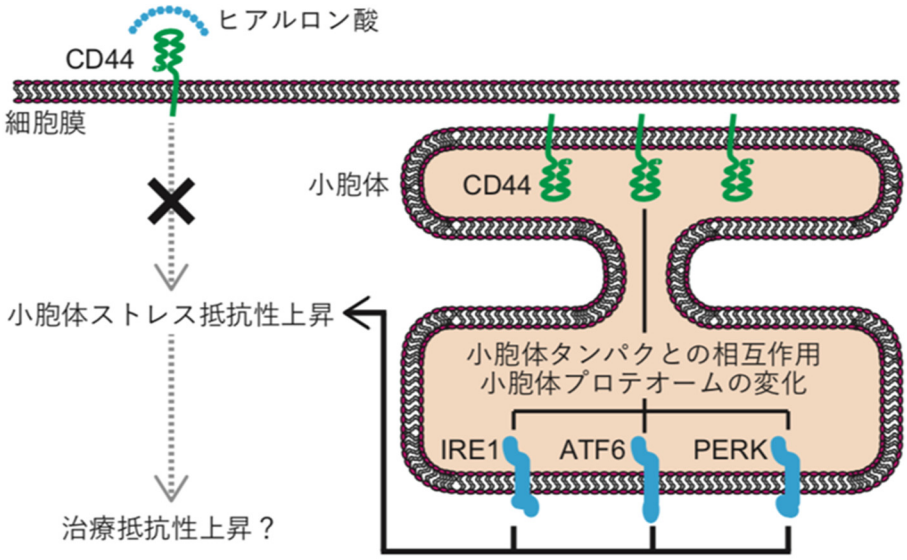


図 2. 本研究のまとめ

CD44 は小胞体に局在し、多数の小胞体タンパクと相互作用し、小胞体プロテオームを変化させる。さらに CD44 はヒアルロン酸非依存的かつ UPR 制御因子依存的に小胞体ストレス抵抗性を増加させる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪市立大学大学院医学研究科病態生理学研究室の大谷直子教授ならびに修士課程学生の武村和明君である。

文　献

1） Takasugi M, Firsanov D, Tombline G, Ning H, Ablaeva J, Seluanov A, Gorbunova V. Naked mole-rat very-high-molecular-mass hyaluronan exhibits superior cytoprotective properties. Nat Commun. 2020;11(1):2376. Epub 2020/05/14. doi: 10.1038/s41467-020-16050-w. PubMed PMID: 32398747; PMCID: PMC7217962.