

尿路上皮癌患者における尿中 CD44 の発現

神戸大学医学部泌尿器科学教室 (主任 : 守殿貞夫教授)

原 勲, 三宅 秀明, 郷司 和男
荒川 創一, 守殿 貞夫

EXPRESSION OF CD44 VARIANT ISOFORM IN URINE SAMPLES OF UROTHELIAL CANCER PATIENT

Isao HARA, Hideaki MIYAKE, Kazuo GOHJI,
Soichi ARAKAWA and Sadao KAMIDONO

From the Department of Urology, School of Medicine, Kobe University

CD44v8-10 variant isoform is frequently expressed in many kinds of cancers. We have already reported that 77% of bladder cancer specimens expressed CD44v8-10 and using CD44v8-10/CD44v10 competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (CC-RT-PCR), we detected exfoliated urothelial cancer cells in urine samples of urothelial cancer patients (*Int J Cancer* **79** : 560, 1998, *J Urol* **160** : 2004). In this paper, we review the expressing of CD44 variant isoform in various kinds of cancers, and the principle of CC-RT-PCR which can be a novel screening method for urothelial cancer. (Acta Urol. Jpn. **45** : 589-592, 1999)

Key words : CD44 isoform, Transitional cell carcinoma, Competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (CC-RT-PCR)

緒 言

CD44 はリンパ球のホーミング現象にかかわる接着分子として発見された。血液中のリンパ球はリンパ節の皮質と髄質との間にある高内皮細静脈の血管壁を通過し、輸出リンパ管、胸管から再び血液中に戻り再循環 (ホーミング) が行われる。この最初におこるリンパ球が高内皮細静脈へ接着することは再循環には必須であり、その関与する接着分子をホーミングレセプターと呼んでいる。CD44 はリンパ球上に存在しホーミング現象にかかわる接着分子の一つであり、膜貫通型糖タンパク質で20個のエクソンから構成される。そして細胞外領域の10個のバリエントエクソン (v1~v10) の alternative splicing によって多数のバリエントアイソフォームが存在する (Fig. 1)。これらのうち、CD44v8~10 が癌組織中において高率に発現されることが報告されてきた¹⁻⁴⁾ われわれは、膀胱癌においても CD44v8~10 が高率に発現していることおよび尿中での膀胱癌細胞を CD44v8~10, CD44v10 を同時に競合的に増幅する PCR 法 (CD44v8~10/CD44v10 competitive RT-PCR: CC-RT-PCR) を用いて検出できることを報告してきた^{5,6)} これらの詳細なデータについては既に論文として報告されているため参照されたい。CD44 に関する秀れた総説もたくさんあるが⁷⁻⁹⁾、ここでは種々の癌細胞における CD44 バリエントアイソフォーム (CD44v) の発現お

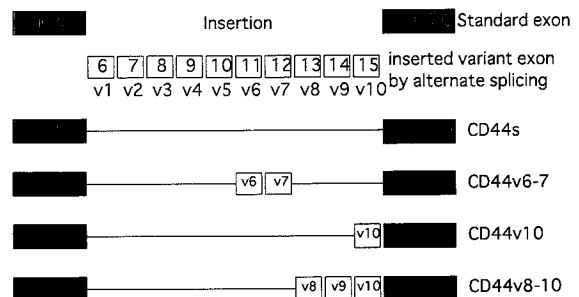


Fig. 1. Splice isoform of CD44. The CD44 molecule is composed of 20 exons. The standard form CD44 (CD44s) is composed of 10 exons (exon 1-5, exon 16-20), not including exon 6-15 which correspond to variant exons 1-10 (v1-10). There are many kinds of variant isoforms (CD44v) according to the insertion pattern of these variant exons (modified from I. Okamoto, H. Saya, CD44 and tumor metastasis. *Jikken Igaku* **16** : 2048-2054).

および CC-RT-PCR の原理につき簡単に総説したい。

接着分子としての CD44

1) CD44 の構造 (Fig. 1)

前述したごとく CD44 は細胞外領域の10個のバリエントエクソン (v1~10) の alternative splicing によって多数の CD44v が存在する。最も広範に発現している標準型 CD44 (CD44s) はバリエントエクソン

が挿入されておらず約 45 kDa のコアタンパク質として翻訳され糖付加により約 80~90 kDa の成熟糖タンパク質となる。

2) CD44 の機能

CD44 はもともと細胞外マトリックスの成分の一種であるヒアルロン酸のレセプターとして発見された。その機能としては (1) リンパ球ホーミング, (2) リンパ球活性化, (3) 細胞間および細胞基質間接着, (4) 細胞運動, (5) 癌細胞増殖, 転移など様々な生物現象にかかわることが報告されている。

癌細胞における CD44 バイアント アイソフォーム

1) CD44v6 と癌転移

CD44v は胎生期のマウスでは血液系細胞や上皮系細胞に広く発現しているが, 成人期では皮膚, 消化管上皮, 腺組織などの限定された増殖の盛んな細胞に発現する。CD44v が癌細胞において特異的に発現しているのを報告したのは Gunthert らが最初である¹⁰⁾ 彼等はラット膀胱癌細胞の高転移細胞株において CD44v6 が特異的に発現していることを発見した。その後たくさんの種類の癌組織において CD44v6 の発現が調べられたが, 予後や転移能との間に関連があったとする報告と関連を認めなかったとする双方の報告がなされており, CD44v6 の癌組織中における明確な役割は未だ明らかにはなっていない。

2) CD44v8~10 の癌組織中の分布

結腸癌⁴⁾, 肺癌³⁾, 乳癌¹¹⁾, 胃癌¹²⁾ などにおいて CD44v8~10 の発現が亢進していることが報告されている。われわれは膀胱癌あるいは精巣腫瘍の一種である non seminomatous germ cell tumor において CD44v8~10 の発現が亢進していることを報告した^{1,6)} また CD44v8~10 を強発現している細胞株に CD44s を遺伝子導入させるとヒアルロン酸との結合力が上がり, ノードマウスにおける腫瘍増殖能, 転移能は著明に低下した¹³⁾ このことは癌細胞の増殖, 転移に関して CD44 の alternate splicing が何らかの役割を果たしていることを示唆する。しかしながら, その分子機構については未だ明らかにされておらず, 今後の解析が望まれる。

3) CD44v8~10/CD44v10 competitive RT-PCR (CC-RT-PCR)

癌細胞が高頻度に CD44v8~10 を発現していることから, PCR 法を組み合わせることにより高感度な癌細胞の検出が試みられてきた。CD44v8~10 は癌細胞のみならず白血球なども発現しているため, 単に CD44v8~10 に特異的な primer で PCR を行っても癌細胞の存在を証明することにはならない。そこで考案されたのが CD44v8~10/CD44v10 competitive

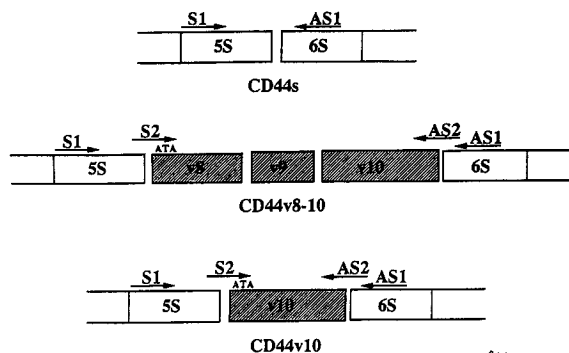


Fig. 2. Principle of CD44v8-10/CD44v10 competitive RT-PCR (CC-RT-PCR). Every kind of CD44 variant isoforms were amplified by S1 and AS1 primer. On the contrary, CD44v8-10 and CD44v10 were specifically and competitively amplified by S2 and AS2 primers which contain the initial common sequence (ATA) of v8 and v10 (from Miyake H, Okamoto I, Hara I, et al.: Highly specific and sensitive detection of malignancy on urine samples from patients with urothelial cancer by CD44v8-10/CD44v10 competitive RT-PCR. *Int J Cancer* **79**: 560-564, 1998).

RT-PCR (CC-RT-PCR) 法である (Fig. 2)。これは CD44v8 と CD44v10 の最初の 3 塩基がどちらも ATA であることを利用し, これを含む primer を設定することにより CD44v8~10 と CD44v10 の双方を競合的に増幅し PCR product の比を算定するものである。白血球の場合 CD44v8~10 の方が CD44v10 より少ないためその比率は約 0.3~0.4 付近で一定である。これに対し癌細胞ではその割合が逆転する (CD44v8~10/CD44v8 ratio は 1 以上となる)。白血球および CD44v8~10 を発現している cell line を用いた希釈系列の実験では白血球 2×10^6 個に対し, 癌細胞 10^3 個 (白血球 2,000 個に対し癌細胞 1 個の割合) でもって, 癌細胞の検出が可能であった。

4) CC-RT-PCR 法を用いた尿中移行上皮癌細胞の検出

以上の実験結果をふまえ, 尿を用いた移行上皮癌に対するスクリーニング検査の有用性につき検討した。尿路上皮癌患者 80 例および泌尿器科良性疾患患者 50 例の計 130 例の自然尿を用いた。CC-RT-PCR の結果, CD44v8~10 の発現量が CD44v10 の発現量に比し, 有意に高かったものは尿路上皮癌患者 80 例中 62 例 (78%) であった。一方泌尿器科良性疾患患者 50 例中, CD44v8~10 の発現量が CD44v10 より多かった者は認められなかった。代表的な CC-RT-PCR の結果を Fig. 3 に示す。腫瘍の grade 別に見た CC-RT-PCR 法の陽性率は G1: 69%, G2: 74%, G3: 84% であり, grade に関係なくほぼ同じような陽性率であった。また検体保存に関する検討では, 4°C にて最高

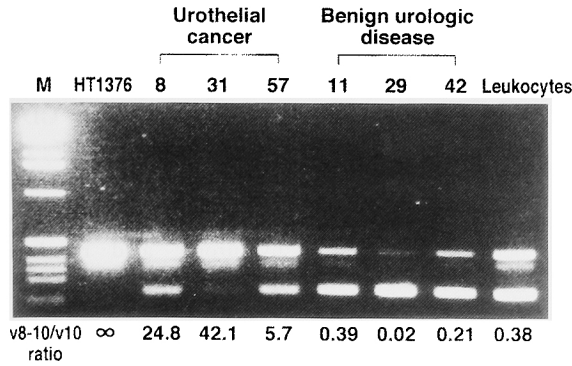


Fig. 3. Representative results of CC-RT-PCR. M: molecular marker. HT1376: bladder cancer cell line expressing strongly CD44v8-10. Case No. 8, 31, 57: Urine sample of urothelial cancer patient, CD44v8-10/CD44v10 ratio > 1. Case No. 11, 29, 42: Urine sample of benign urologic disease patient, CD44v8-10/CD44v10 ratio < 1. Leukocytes: Leucocyte sample from healthy donor, CD44v8-10/CD44v10 ratio < 1 (from Miyake H, Okamoto I, Hara I, et al.: Highly specific and sensitive detection of malignancy on urine samples from patients with urothelial cancer by CD44v8-10/CD44v10 competitive RT-PCR. *Int J Cancer* **79**: 560-564, 1998).

24 hr まで保存しても実験の再現性に関しては問題なく CD44 variant form の CC-RT-PCR 法は特異性および感度ともに優れた検査法であることが示された⁶⁾ ただ問題点として, 尿中に細胞成分をほとんど有さない健康人の場合, CC-RT-PCR 法による満足な増幅が得られない場合があり, 今後こうした場合には少量の CD44v10 を競合的な template として尿に加えるなどの操作が必要になる可能性も考えられた。

さらに CC-RT-PCR 法と尿細胞診との比較検討を行った⁵⁾ 腫瘍の grade 別にみた感度の比較では, 尿細胞診の陽性率が G1: 25%, G2: 54%, G3: 85% と grade が上がるにつれて陽性率は上昇した。これに対し CC-RT-PCR 法の陽性率は G1: 67%, G2: 77%, G3: 85% であり, G1, G2 では CC-RT-PCR 法の方が有意に陽性率は高かった。特異性に関しては CC-RT-PCR 法, 尿細胞診それぞれ 100% と 98% であり, 双方とも false positive が少ない検査であることが示された。さらに尿細胞診と CC-RT-PCR の双方を組み合わせると移行上皮癌患者 71 例中 64 例 (90%) において診断が可能であり, それぞれの単独の診断法に比べ有意に診断率の向上が認められた。さらに術前に CD44v8-10/CD44v10 の比が高値であった 24 症例中 23 例が術後陰性化しており, 術後再発のモニタリングとしての有用性も示唆された。

近年, bladder tumor antigen (BTA)¹⁴⁾, fibrin/fibrinogen degradation product¹⁵⁾, nuclear matrix

protein (NMP)¹⁶⁾ などが膀胱癌の尿中 marker として注目を集めている。これらの検査は概して感度は良好であるが, 特異度は満足すべきものではない。その点 CC-RT-PCR 法は特異度はきわめて高いため, より実用度の高いスクリーニング検査法として臨床応用が望まれる。

5) 他科領域における CC-RT-PCR 法の臨床応用

CD44v8-10 は肺の非小細胞癌 (NSCLC) において約 90% の頻度で発現している。このことより NSCLC の診断に関して胸水を用いた CC-RT-PCR 法が報告されている³⁾ 胸水 75 例を解析し, 非癌性胸水 34 例中 32 例では CD44v8-10/CD44v10 の比が 1 以下であったのに対し, 癌性胸水 41 例中 31 例において CD44v8-10/CD44v10 の比が 1 以上であった。これらの症例の中には従来の細胞診のみでは診断困難であり, CC-RT-PCR 法にて NSCLC が疑われた症例も何例もあり, 補助診断としての有用性が示唆された。

結 語

現段階では CD44 variant isoform の持つ機能的な意義あるいは分子生物学的機構については未だ解明されるべき点が多々あるものと思われる。しかしながら CD44v8-10 が種々の癌組織において高頻度に認められることは事実であり, このことを利用した CC-RT-PCR 法は感度や特異度の面からも非常に秀れた診断法であるといえる。今のところ, 尿と胸水がターゲットのサンプルとして研究が進められているが, 他のサンプルを用いた検討も含め将来的な臨床応用が望まれる検査法であると考えられる。

本稿を執筆するに際し多大な助言をいただいた熊本大学医学部腫瘍医学教室, 岡本 勇先生および佐谷秀行先生に心よりお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Miyake H, Hara I, Yamanaka K, et al.: Expression patterns of CD44 adhesion molecule in testicular germ cell tumors and normal testes. *Am J Pathol* **152**: 1157, 1998
- 2) Okamoto I, Morisaki T, Sasaki J, et al.: Molecular detection of cancer cells by competitive reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of specific CD44 variant RNAs. *J Natl Cancer Inst* **90**: 307, 1998
- 3) Sasaki J, Tanabe KK, Takahashi K, et al.: Expression of CD44 splicing isoforms in lung cancers: dominant expression of CD44v8-10 in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* **12**: 525, 1998
- 4) Tanabe KK, Ellis LM and Saya H: Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas

- and metastases. *Lancet* **341**: 725, 1993
- 5) Miyake H, Hara I, Gohji K, et al.: Urinary cytology and competitive reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of a specific CD44 variant to detect and monitor bladder cancer. *J Urol* **160**: 2004-2008, 1998
 - 6) Miyake H, Okamoto I, Hara I, et al.: Highly specific and sensitive detection of malignancy on urine samples from patients with urothelial cancer by CD44v8-10/CD44v10 competitive RT-PCR. *Int J Cancer* **79**: 560-564, 1998
 - 7) 岡本 勇, 佐々木治一郎, 安藤正幸, ほか: 肺がんにおける CD44 発現と診断の応用. *最新医* **52**: 2674-2679, 1997
 - 8) 五井孝憲, 山口明夫, 中川原儀三, ほか: 癌転移の分子病理と臨床—接着分子群と細胞外マトリックスを中心に—接着分子 CD44. *日臨* **53**: 1688-1720, 1995
 - 9) 岡本 勇, 佐谷秀行: CD44 と癌転移. *実験医* **16**: 2048-2054, 1998
 - 10) Gunthert U, Hoffman M, Rudy W, et al.: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13-24, 1991
 - 11) Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, et al.: CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* **64**: 347-354, 1995
 - 12) Miwa T, Watanabe A, Yamada Y, et al.: Progression in gastric carcinoma relative to the ratio of CD44 epithelial variant transcript to CD44 hematopoietic variant transcript. *Cancer* **77**: 25-29, 1996
 - 13) Miyake H, Hara I, Okamoto I, et al.: Interaction between CD44 and hyaluronic acid regulates human prostate cancer development. *J Urol* **160**: 1562, 1998
 - 14) Sarosdy MF, deVere White RW, Soloway MS, et al.: Results of a multicenter trials using the BTA test to monitor for and diagnose recurrent bladder cancer. *J Urol* **154**: 379, 1995
 - 15) Schmetter BS, Habicht KK, Lamm DL, et al.: A multicenter trial evaluation of the fibrin/fibrinogen degradation products test for detection and monitoring of bladder cancer. *J Urol* **158**: 801, 1997
 - 16) Soloway MS, Briggman V, Carpinito GA, et al.: Use of new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol* **156**: 363, 1996

(Received on May 25, 1999)
(Accepted on June 30, 1999)