

CD44 を介する乳癌細胞の クラスター形成機構の解明

河口 まどか

目次

| | |
|--|----|
| 要旨..... | 1 |
| 略語表..... | 3 |
| 序論..... | 5 |
| 第一章 CD44 の二量体化形成能の検証..... | 13 |
| 1-1: 緒言..... | 14 |
| 1-2: 材料と方法..... | 14 |
| 1-3: 結果..... | 16 |
| 1-4: 考察..... | 19 |
| 第二章 CD44 の二量体形成に必要なアミノ酸の同定および二量体形成の阻害による クラスター形成への影響..... | 25 |
| 2-1: 緒言..... | 26 |
| 2-2: 材料と方法..... | 26 |
| 2-3: 結果..... | 27 |
| 2-4: 考察..... | 29 |
| 第三章 CD44 の二量体形成が乳癌細胞に与える影響..... | 36 |
| 3-1: 緒言..... | 37 |
| 3-2: 材料と方法..... | 37 |
| 3-3: 結果..... | 38 |
| 3-4: 考察..... | 39 |
| 第四章 CD44 の二量体化阻害による乳癌細胞の転移の抑制効果の検証..... | 45 |
| 4-1: 緒言..... | 46 |

| | |
|------------------|----|
| 4-2: 材料と方法 | 46 |
| 4-3: 結果 | 47 |
| 4-4: 考察 | 48 |
| 総括..... | 52 |
| 参考文献..... | 55 |
| 謝辞..... | 67 |

要旨

癌は世界第2位の死因であり、癌患者の死亡の 90%は転移による。そのため、癌の転移機構の理解とともに、予防・治療方法の確立が急務である。転移の過程において、血中に存在する循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells: CTCs) には、単一細胞で存在するシングル CTCs と、二細胞以上が集まってクラスターを形成するクラスターCTCs がある。クラスター CTCs は、全 CTCs に対して 2-5%と少数であるにも関わらず、シングル CTCs の 23-50 倍の転移能を有する。したがって、癌細胞のクラスター形成の抑制は、転移を抑制する新規治療法の開発につながると期待できる。しかし、クラスターCTCs の形成機構は不明であった。

CD44 を発現している癌細胞は、自己複製能が高く、少数の細胞でも腫瘍を形成する能力を有しており、転移性が高く、予後が悪い。また、CD44 はクラスターCTCs を構成している約 80%の細胞で発現することが知られている。そこで本研究では、CD44 を標的としたクラスターの形成機構の解明を目的とした。CD44 は一回膜貫通型のタンパク質であることから、NOTCH など、他の細胞膜貫通型タンパク質と同様に、細胞間での二量体の形成が、クラスターの形成に重要である可能性がある。そこで本研究では、クラスターの形成機構として、「CD44 が細胞間で二量体を形成する」ことを仮説とし、その検証を行った。

本研究では初めに、乳癌細胞における二量体化した CD44 の存在の有無を、細胞表面で発現しているタンパク質間の相互作用を安定化するクロスリンカー (disuccinimidyl suberate: DSS) および抗 CD44 抗体を用いたウエスタンブロット法により検証した。その結果、予想通り二量体化した CD44 の存在が検出された。次に、CD44 の二量体化が、細胞間で形成される可能性を検証するため、CD44 に FLAG または HA を融合したプラスミド DNA (CD44-FLAG および CD44-HA) を用いた共免疫沈降を行なった。サンプルには、内在性の CD44 の発現がない HEK293 細胞に、CD44-FLAG を強制発現し、CD44-HA を強制発現させた HEK293 細胞と共培養することでクラスターを形成したものをを用いた。その後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行った後、抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行うことで、CD44-FLAG および CD44-HA の共沈を確認した。この結果は、CD44 が細胞間で二量体を形成することを示唆する。

また、二量体化に必要なアミノ酸を同定するため、共同研究者による計算機シミュレーション結果を基に変異型 CD44 を作製し、共免疫沈降法により二量体化形性能を評価した。その結果、CD44 の二量体化には、細胞外ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸とドメイン II 内の 5 個のアミノ酸でカバーされる領域が必要であることが明らかとなった。さらに、二量体化形成能を失った変異型 CD44 を用いてクラスターアッセイを行なった結果、クラスターの形成が阻害された。これらの結果により、CD44 の二量体化の形成阻害によりクラスターの形成が抑制されることが示唆された。

次に、CD44 をノックダウンすることにより、二量体化形成の下流で変化のあるタンパク質を

探索した結果、クラスター形成に関わる候補因子として p21-activated kinase 2 (PAK2) を同定した。また、CD44 と PAK2 の相互作用を検証するため共免疫沈降を行なった結果、これらのタンパク質間での相互作用が確認された。さらに、CD44 の二量体化に伴い PAK2 のリン酸化が促進される可能性を、PAK2 の Ser20 に対するリン酸化抗体を用いたウェスタンブロット法により検証した。その結果、CD44 の二量体形成能を失った変異型 CD44 では、PAK2 の Ser20 のリン酸化が抑制された。PAK2 は、Ser20 がリン酸化されることで、細胞死抑制効果を持つことが報告されている。したがって、これらの結果から、CD44 の二量体化によるクラスター形成が、PAK2 のリン酸化を介した細胞死の抑制を引き起こすことにより、癌転移率を増加させる可能性が考えられる。また、細胞表面で CD44 が多量体化した結果、細胞内での PAK2 が接近することとなり、PAK2 間での相互リン酸化が引き起こされた可能性が示唆された。

最後に、野生型及び二量体形性能を失った変異型 CD44 を発現させた乳癌細胞を、マウスに尾静脈注射した後、それらの細胞の肺での検出量を評価した。その結果、CD44 のドメイン II の 5 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異型 CD44 において、野生型と比較し、肺での検出量が有意に減少した。したがって、これら 5 つのアミノ酸がカバーする部位を標的とした抗体の作製により、転移を抑制する治療への応用につながる可能性が示された。

略語表

Arg: arginine

Asn: asparagine

BSA: bovine serum albumin

cDNA: complementary DNA

CD44fl: CD44 full length

CD44s: CD44 standard form

CD44v: CD44 variant form

CTCs: circulating tumor cells

Cys: cysteine

DNA: deoxyribonucleic acid

DSS: disuccinimidyl suberate

FBS: fetal bovine serum

FDA: food and drug administration

GFP: green fluorescent protein

Gln: glutamine

Glu: glutamic acid

HA: hemagglutinin

HER2: human epidermal growth factor receptor 2

His: histidine

HRP: horse radish peroxidase

IgG: immunoglobulin G

Ile: isoleucine

JUP: plakoglobin

Lys: lysine

NANOG: nanog homeobox

OCT4: octamer-binding transcription factor 4

PAK2: p21-activated kinase 2 (PAK2)

PBS: phosphate-buffered saline

Phe: phenylalanine

PKM2: pyruvate kinase isozymes M2

pPAK2: phospho-PAK2

Pro: proline

RNA: ribonucleic acid

SDS: sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Ser: serine

SIN3A: sin3 transcription regulator family member A

siRNA: small interfering ribonucleic acid

SOX2: sry-related hmg-box (SOX) family 2

TAE: tris-acetate-EDTA

TBS: tris-buffered saline

TBST: tris-buffered saline/tween-20

Tyr: tyrosine

Val: valine

WHO: world health organization

序論

序論

癌による死亡率

世界保健機関 (WHO) による2018年の統計調査では、癌は世界第2位の死因であり、年間960万人 (6人に1人の割合) が癌で亡くなっていると報告されている (WHO, 2018)。日本においては、癌は死因の第1位であり、癌は加齢に伴い発症率が増加する病気であることから、高齢化社会が進む我が国における癌の死亡者数は、ますます増加することが予測される (厚生労働省, 2019)。一方、我が国や欧米など、先進国における5年生存率は多くの癌で改善傾向にあり (厚生労働省, 2019; Steeg, 2016)、これは、早期発見の診断技術や早期癌における外科手術、放射線治療、薬物療法や分子標的薬など、多くの治療法が発展してきた結果であると考えられる。しかし、転移を伴う進行癌に対しては、有効な治療法が少なく、予後の改善も限定的であり (Steeg 2016)、癌死の90%は転移に起因すると言われている (Chaffer and Weinberg 2011; Blumenthal 1996)。薬物療法や分子標的薬は、転移を伴う癌に対しても一定の効果を示すものの (Anderson *et al.* 2019)、進行癌では癌細胞の性質が多様化するため寛解に至るのが難しく、現在のところ有効な治療法とは言えない。したがって、転移に至る前の、転移過程の癌細胞を標的とした治療法の開発が必要である。

癌の転移に関する研究の歴史と定義

Μετάσταση (メタスタシと発音。日本語訳で転移。) という言葉は、ギリシャ語で、ある場所から別の場所へ移動することを意味しており、1829年 Joseph Claude Anthelm Recamier によって初めて使用された (Carr and Carr 1934; Fidler 2003)。Joseph Claude Anthelm Recamier は、23名の乳癌患者を手術し、13名において他の部位にも癌があることから、この現象を転移と表現した。

癌細胞の転移が生じるメカニズムについての最初の提唱は、1858年 Rudolf Virchow によって行われた (VIRCHOW 2009)。Rudolf Virchow は、病変した細胞や組織を顕微鏡下で詳細に観察することで、癌細胞の転移は、癌細胞が血管内で詰まり、血流という物理的な刺激により血管から押し出され、播種されることで生じる、つまり、ランダムに生じるという最初の提唱を行なった。一方 1889年、イギリスの外科医である Stephen Paget は、735人の乳癌患者の検死体を精査し、転移先が高頻度で肝臓・卵巣・特定の骨、そして低い確率で脾臓であったことから、転移の発生はランダムではないと結論づけた。そして、癌細胞を種子 (Seed) に、臓器の環境を土壌 (Soil) に例え、「癌細胞がある特定の臓器でのみ増殖できるのは、土壌であるその臓器の環境が、癌細胞の増殖に適しているからである」とする”Seed and Soil”説を提唱した (Paget, 1889)。この説に対し、1929年に James Ewing が、「転移は、原発巣と転移先の臓器の間にある、血管やリンパ管の解剖学的特徴に沿った機

械的な力に依存する」、という新たな説を提唱した。実際、大腸癌では肝転移が多くみられ、これは大腸から流れ出る血液は、まず肝臓へと流れるためであると考えられている。しかし、この説だけでは、乳癌細胞の骨転移など、癌細胞の特定の臓器への転移が説明できず、現在では、Stephen Paget が提唱した”Seed and Soil”説が支持されている (Talmadge and Fidler 2010)。

転移の実験系については、1915年 Makoto Takahashi により世界で初めて転移のマウスモデルが作製された。Makoto Takahashi は、肉腫細胞を尾静脈注射によりマウスの血流に注入し、肺へ転移する実験系を作製した (Takahashi 1915)。その後、1970年 Isaiah Fidler が、色素細胞が癌化した腫瘍である B16 悪性黒色腫細胞を放射標識し、静脈注射によって血流へ注入した後、細胞の生存率を観察する実験を行なった。その結果、24時間後には細胞の生存率は0.1%以下に減少し、0.01%以下の細胞が肺へ転移することが明らかとなった。この結果は、転移は生き残ったごくわずかな数の細胞によって引き起こされることを示唆する (Fidler 1970)。その後、癌細胞の転移の機構の解明を目指した様々な研究が行われ (Salo *et al.* 1982, 1983)、1986年には Liotta らにより転移は、1) 癌細胞基底膜の原発巣あるいは標的臓器の血管壁への接着、2) 血管基底膜の分解、3) 癌細胞の血管内又は標的臓器の組織内への遊走、の3段階により起こるという転移の概念が確立され、Three Step Theory と名付けられた (Liotta 1986b, 1986a; Gay and Felding-Habermann 2011)。1988年には Patricia Steeg らにより初めて、癌細胞の転移を抑制する遺伝子 (NM23) が報告され (Steeg *et al.* 1988)、現在ではさらに様々な転移の分子メカニズムが解明されてきている (Neophytou *et al.* 2018; Celià-Terrassa and Kang 2018; Schroeder *et al.* 2012)。

以上の経緯により、今日では、転移という用語は、「癌細胞が原発巣から他の臓器へ広がり増殖すること」、と定義されている。また、癌細胞の転移は、癌細胞基底膜への接着、基底膜の分解、癌細胞の遊走の3段階を生き抜いたごく少数の細胞が、生存・増殖に適した環境を持つ臓器で起こすと理解されている。

CTCs の発見と治療への応用の可能性

本研究では、癌の転移を抑制する治療戦略として、血中に存在する循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells: CTCs) に着眼して研究を行なった。CTCs は 1869 年に Thomas Ashworth によって最初に報告された (Wang *et al.* 2017; Smerage and Hayes 2006; Hong *et al.* 2016)。1950-1960 年代には、さらなる顕微鏡観察の結果が報告されており、例えば、血中にはシングル細胞で存在しているもの、二つ以上の細胞が集まりクラスターを形成しているもの、また細胞が肥大化しているものなど、様々な形態の癌細胞の存在が報告された (Moore *et al.* 1960; Engell 1959)。その後、1976年に Three Step Theory を唱えた Lance

Allen Liotta らによってシングル細胞と比較し、クラスターを形成している CTCs 細胞における高い転移の生着率が報告された (Liotta *et al.* 1976)。2014 年には、Nicola Aceto らがマウスを用いて、クラスターを形成している CTCs ではシングル CTCs と比較し、転移の成功率が 23-50 倍も高いことを報告した (Cheung *et al.* 2016; Aceto *et al.* 2014)。以上の先行研究をうけ、私は、クラスターCTCs の形成の抑制により、癌細胞の転移を抑制できるのではないかとこの着想に至った。

実際、他のグループの研究により、クラスターCTCs の形成に関わる遺伝子 (OCT4、NANOG、SOX2、AIN3A) が同定され、また、それらの発現領域では DNA の低メチル化が生じていることなど、クラスターCTCs 形成のメカニズムが解明されつつある (Gkountela *et al.* 2019)。さらに、JUP のノックダウンや、FDA が認可している薬品である Na⁺/K⁺ATPase の阻害薬がクラスター形成を抑制するなど、治療への応用を目指した研究も盛んに行われている (Aceto *et al.* 2014; Gkountela *et al.* 2019)。また、CTCs は、患者の生体から簡便に採取できること、血中から CTCs が発見された場合は予後の悪さと関連していること、さらに、CTCs の解析により癌の性質を詳細に判別できることから、癌の再発や転移の予見の判断や治療方の選別にも利用されている (Umer *et al.* 2018; Bardia and Haber 2014; Yu *et al.* 2014; Heubner *et al.* 2011; Rostami *et al.* 2019)。

CD44 の構造と機能

CD44 は細胞膜上に存在する1回膜貫通型のタンパク質であり (Naor *et al.* 1997)、1980 年に白血球の表面抗原として同定された (Dalchau *et al.* 1980; Ponta *et al.* 2003)。1989 年から現在に至るまで、ヒト、マウス、ラット、など 12 種類を超える多くの種から cDNA が分離・解析され、アミノ酸残基とその機能はほ乳類で高度に保存されていることが報告されている (Aruffo *et al.* 1990; Thorne 2003; Stamenkovic *et al.* 1989; Nottenburg *et al.* 1989; Idzerda *et al.* 1989)。

ヒト CD44 は第 11 番染色体上にあり (Sen and Yip 2011)、20 個のエキソンより構成される (図 4-A)。20 個のエキソンは、細胞外ドメイン (エキソン 1 から 17)、膜貫通ドメイン (エキソン 18)、細胞質ドメイン (エキソン 19 と 20) の 3 つのドメインをコードしている。エキソン 6 から 15 は、選択的スプライシングによりエキソン 5 と 16 の間に様々な組み合わせで挿入される (Inoue and Fry 2015; Prochazka *et al.* 2014; Zöller 2011; Zhou *et al.* 1989; Goodison *et al.* 1999)。選択的スプライシングにより生成された CD44 バリエントアイソフォーム (CD44 variant form: CD44v)、およびバリエントエキソンを持たない標準型 CD44 (CD44 standard form: CD44s) は、胎児から成人に至るまで、ほぼ全ての臓器で広範囲に発現している (Naor *et al.* 1997)。CD44 は、リン酸化、グリコシル化、グリコサミノグリカン鎖の付加など、広範にわたる翻訳後修飾を受けることが報告されおり (Naor *et al.* 1997; Zhou *et al.* 1989)、翻訳後修飾によってヒアルロン酸など、基質との結合の強度が変化することが知られている (Sleeman *et al.* 1996a)。

CD44 は、それ自身にはレセプターキナーゼ活性やホスファターゼ活性も持たないが、ヒアルロン酸 (Underhill and Toole 1980; Underhill *et al.* 1987; Toole 2004; Isacke and Yarwood 2002) をはじめとする、コラーゲン (Faassen 1992)、ラミニン (Naor *et al.* 1997)、ファイブロネクチン (Jalkanen and Jalkanen 1992) などの細胞外基質と結合し、CD44 の細胞内ドメインに結合するタンパク質を介して細胞外基質との結合情報を伝達する (Okamoto *et al.* 1999; Ponta *et al.* 2003; Okamoto *et al.* 2001)。近年では、細胞外基質との接着、細胞運動、T 細胞の活性化、リンパ球のホーミング現象、神経細胞の軸索誘導、造血、細胞死など (Naor *et al.* 1997; Huet *et al.* 1989; Denning *et al.* 1990; Gallatin *et al.* 1983; Ries *et al.* 2007)、様々な生命現象に関与することが報告されている。

CD44 と癌細胞

U. Gunthert らは 1991 年に、転移性の高い膵臓癌である BSp73ASML 細胞株において、CD44 のバリエントアイソフォームである CD44v6 が高発現していること、また、CD44v6 は転移を促進する作用を持つことから、癌細胞における CD44 のバリエントアイソフォームの発現は、遠隔転移と関連していることを報告した (Tanabe *et al.* 1993; Günthert *et al.* 1991)。一方、1997 年、Schmits. R らは、CD44 欠損マウスでは、野生型と比較し、腸管に寄生する原虫であるクリトスポリジウムを感染させた際に早期に肉芽腫が形成されたことから、CD44 が癌形成を抑制すると報告した (Ponta *et al.* 2003; Schmits *et al.* 1997)。これらの報告は、CD44 がその多様なバリエントアイソフォームにより役割が異なることを示唆しており、癌研究分野において CD44 が注目される契機となった。その後の研究により、CD44 は、舌扁平上皮癌、大腸癌、乳癌、リンパ腫、膵臓癌、胃癌など多岐にわたる癌細胞で高発現していることが報告された。また、CD44 の発現量や (Guo *et al.* 1994)、発現している CD44 のバリエントの種類 (Xia and Xu 2016; Zhang *et al.* 2019; Sy *et al.* 1991; Sleeman *et al.* 1996b; Lau *et al.* 2014; Yae *et al.* 2012; Basakran 2015)、翻訳後修飾の有無 (Azevedo *et al.* 2018; Dasgupta *et al.* 1996)は、腫瘍の悪性度や転移の有無に影響を与えることも報告されている。

1997 年には、急性骨髄性白血病の未分化型 (M1)、骨髄単球性 (M4)、および単球性 (M5)において細胞表面に CD34 抗原をもち CD38 抗原を持たない細胞 (CD34+CD38-) が幹細胞と同様の特徴を持つことが示され、癌幹細胞と定義された (Dick and Bonnet 1997)。その後、2003 年に乳癌細胞では、CD44+CD24-/low を示す細胞が癌幹細胞であると提唱された (Al-Hajj *et al.* 2003)。現在では乳癌以外にも、卵巣癌、前立腺癌、子宮頸癌、胃癌、胃腺癌、扁平上皮癌、膵臓癌において、CD44 は癌幹細胞マーカーとされている (Morrison *et al.* 2011; Toledo-Guzmán *et al.* 2018; Slomiany *et al.* 2009)。

乳癌全体の約 10-15%にみられるトリプルネガティブ乳癌細胞は、転移性が高く、エストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2 の発現をもたない性質を持つ (Adorno-Cruz *et al.* 2015; Neophytou *et al.* 2018)。このトリプルネガティブ乳癌細胞は、正常細胞と比較して

CD44 の発現量が増加していることが報告されている (Liu *et al.* 2019; Louderbough and Schroeder 2011)。私が所属していた米国ノースウエスタン大学血液・腫瘍学部門におけるトリプルネガティブ乳癌細胞を用いた研究では、CD44 タンパク質の発現の阻害によりクラスターの形成が抑制されることが示されていた。トリプルネガティブ乳癌細胞は、抗癌剤への抵抗性も高く、最適な抗体治療もないことから、未だに効果的な治療法が確立していない (Dashzeveg *et al.*, 2017; Garrido-Castro *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2008)。そのため、本研究ではトリプルネガティブ乳癌細胞を用いて、CD44 を介するクラスター形成機構を明らかにすることを目的とした。

本研究の仮説と各章の概要

米国ノースウエスタン大学血液・腫瘍学部門における乳癌細胞を用いた研究では、CD44 タンパク質の発現の阻害によりクラスターの形成が抑制されることが示されていた (Liu *et al.* 2019)。この結果は、CD44 がクラスターの形成に関与することを示唆する。CD44 を介するクラスター形成機構として、CD44 のリガンドとして知られているヒアルロン酸などの細胞外基質が関与している可能性があるが、細胞外基質の有無はクラスターの形成に影響を及ぼさないことから (Liu *et al.* 2019)、細胞外基質非依存的なクラスター形成機構の存在が想定される。CD44 は、1回膜貫通型のタンパク質である。そのため、他の細胞膜貫通型受容体である NOTCH (Bray 2006)、E-cadherin (Perrais *et al.* 2007; Varelas *et al.* 2014)、PECAM1 (Varelas *et al.* 2014; Muller *et al.* 1993) のように細胞間で二量体を形成する可能性がある。そこで私は、CD44 が細胞間で二量体を形成することが乳癌細胞のクラスター形成の分子機構ではないかと仮説を立て、その検証を行なった。

本論第一章では、CD44 が細胞外ドメインを介して二量体を形成する可能性について論じる。まず、トリプルネガティブ乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞内に二量体化した CD44 が存在するかを検証した。検証には、細胞表面で発現しているタンパク質間の相互作用を安定化させるクロスリンカー処理および、CD44 抗体を用いたウエスタンブロット法を用いた。次に、CD44 が細胞間で二量体を形成する可能性を、FLAG または HA タグをつけた二種類の CD44 発現プラスミドそれぞれを別の細胞集団に導入し、2 種類の細胞集団を混合してクラスターを形成させた後、細胞を溶解し、共免疫沈降を行うことで検証した。さらに、CD44 の細胞外ドメインを介して直接結合する可能性を検証するため、CD44 の細胞外ドメインを用いた solid-phase self-interaction アッセイを行なった。

第二章では、CD44 の二量体化形成に必要なアミノ酸部位の同定および、二量体形成の阻害によるクラスター形成への影響についての検証を行なった。まずは、共同研究者による計算機シミュレーション結果を基に、変異アミノ酸部位の異なる三種類の変異型 CD44 を発

現させるプラスミドを作製した。その後、発現させた変異型 CD44 に対して共免疫沈降法を行うことで、細胞外ドメインを介した二量体が形成されるかを検証した。さらに、変異型 CD44 発現細胞を用いてクラスターアッセイを行うことで二量体形成の阻害がクラスター形成に与える影響について評価した。

第三章では、CD44 の二量体形成が乳癌細胞に与える影響を解明することで、クラスター CTCs がシングル CTCs と比較して高い転移能を有する起源を解析した。まずは、CD44 の二量体形成が乳癌細胞に与える影響を解明する糸口として、PAK2 に着目した。そして、共免疫沈降法により CD44 と PAK2 の相互作用の確認を行った。さらに、PAK2 を活性化する Ser20 のリン酸化と CD44 の二量体形成の関連を、ウエスタンブロット法を用いて検証した。

第四章では、CD44 の二量体形成の阻害が乳癌細胞の転移を抑制する可能性を検証した。具体的には、野生型及び二量体形成性能を失った変異型 CD44 を発現させた乳癌細胞を、マウスに尾静脈注射することで、肺での検出量を評価した。

本論

第一章

CD44 の二量体化形成能の検証

1-1: 緒言

本研究で証明しようとする仮説は、「CD44 が細胞間で二量体を形成することで、クラスターが形成される」である。CD44 は既に、マウス胎仔由来線維芽細胞において単一細胞内で二量体を形成する (*cis*-dimer) ことが報告されているが (Hartmann *et al.* 2015; Liu and Sy 1997)、細胞間における二量体の形成 (*trans*-dimer) については報告されていない。そこでまずは、乳癌細胞内で二量体化した CD44 の検出の有無を検証することとした。本研究では、乳癌細胞株の中でも、CD44 の過剰発現を認め、未だ効果的な治療法のないトリプルネガティブ乳癌細胞株である MDA-MB-231 乳癌細胞を使用した。細胞表面で発現しているタンパク質間の相互作用をクロスリンカー処理により安定化させた後、SDS-PAGE で展開後に CD44 抗体を用いてウエスタンブロットを行うことで、二量体を形成している CD44 の存在を検証した。

次に、CD44 の二量体形成が細胞外ドメインを介する可能性を検証した。そのために、FLAG または HA タグを付加した二種類の CD44 発現プラスミドをそれぞれ細胞導入し、クラスターを形成させた後、共免疫沈降を行うことで検証した。また、CD44 の細胞外ドメインを用いた solid-phase self-interaction アッセイも行ない、同様の結果が得られるかを検証した。

1-2: 材料と方法

1-2-1: 細胞株および細胞培養

細胞株は、継代回数が 20 回以下の MDA-MB-231 乳癌細胞と HEK-293 細胞を使用した。細胞の培養には、10% FBS (Takara Bio, 631106) と 1% penicillin-streptomycin (P/S) (Sigma-Aldrich, P4333-100ML) を添加した DMEM (Thermo Fisher Scientific, SH30243FS) を使用し、37 °C、5%CO₂ 環境下で培養した。細胞の継代、回収には 0.25%の Trypsin-EDTA (Fisher Scientific, 25-200-056) を使用した。

1-2-2: タンパク質の架橋

細胞内のタンパク質の架橋には PBS で 2.5 mM に希釈した DSS (Thermo Fisher Scientific, 21655) を用いた。氷上で 2 時間インキュベートした後、10 mM となるように Tris-HCl (pH 7.5) を加え、氷上で 15 分インキュベートした。

1-2-3: 共免疫沈降法とウエスタンブロット法

細胞は氷上で 30 分間、protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific, 78440) を加

えた RIPA buffer (cell signaling, 9806S) または IP lysis buffer (Thermo Fisher Scientific, 87787) で溶解した。タンパク質の濃度の測定には Protein Assay Dye Reagent (Bio-RAD, 500-0006) を用いた。

共免疫沈降法には、等量のタンパク質を Anti HA Magnetic Beads (Thermo Fisher Scientific, 88836) または Anti-FLAG M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich, M8823-5ML) に加え、4 °C で一晩振盪させたものを用いた。その後、製造元のプロトコルにしたがってビーズを洗浄した。タンパク質の溶出は、0.1 M glycine (pH 2-3) を加えて室温で 5-10 分振盪させた後、等量の TAE buffer を添加した。

ウエスタンブロットには、10% β -mercaptoethanol を加えた SDS-PAGE loading buffer (Bio-RAD 4Laemmli Sample Buffer Cat. #161-0747) を使用した。4-20%または 7.5%の SDS-PAGE gel を用いてタンパク質を分離した。タンパク質の転写にはニトロセルロースメンブレン (0.2 μ m) を用いた。ブロッッキングは、5% BSA in TBS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.6) /0.1% Tween 20 を用いて室温で一時間振盪した。一次抗体は、以下に示した種類のをそれぞれ記載した希釈濃度で使用し、室温で一時間または 4 °C で一晩振盪した。メンブレンを TBS/0.1% Tween 20 で 10 分 3 回洗浄した後、HRP 標識二次抗体に浸し、室温で一時間振盪した。一次抗体と二次抗体の希釈には 5% BSA in TBS/0.1% Tween 20 を用いた。目的タンパク質の検出には enhanced chemiluminescence (ECL) (Thermo Fisher Scientific, 32132) を用いた。

使用した一次抗体

CD44 monoclonal antibody (1:1000, Thermo Fisher Scientific, MA513890)

FLAG (1:1000, Sigma-Aldrich, F1804-200UG)

HA (1:500, Santa Cruz, 12CA5)

β -actin (1:5000, Sigma, A5441)

使用した二次抗体

mouse IgG (1:10000, Promega, W402B)

rabbit IgG (1:10000, Promega, W4011)

1-2-4: トランスフェクション

HEK-293 細胞に PolyJet (SigmaGen Laboratories, SL100688) を用いてプラスミド DNA のトランスフェクションを行なった。細胞導入の方法は、製造元のプロトコルにしたがった。細胞導入から 48 時間後に、シングル細胞とクラスターを形成した細胞を作製した。シングル細胞

は、トリプシン処理を行なった後、35 μm のフィルターを用いて選別した。細胞のクラスターは、Poly-HEMA (Sigma-Aldrich, P3932-10G) でコートした細胞培養ディッシュの上で 3-6 時間インキュベートすることにより作製した。集めた細胞は、クロスリンカー試薬を用いた実験、共免疫沈降法、および、ウエスタンブロット法に用いた。

使用したプラスミド DNA

pCMV3-C-GFPspark Control Vector (Sino Biological, CV026)

pCMV3-CD44-HA (Sino Biological, HG12211-CY)

pCMV6-Flag-CD44 (OriGene, RC221820)

M-CD44N5Q mutant

1-2-5: PNGase F 処理

CD44 の N 型糖鎖の切断には、1000U の PNGaseF (New england Biolabs, P0704S) を使用した。また、その後のウエスタンブロットには 20 μg の細胞可溶化液を用いた。

1-2-6: solid-phase self-interaction アッセイ

TBS (pH 7.4) で希釈した Recombinant Human CD44 protein (His tag) (Abcam, ab173996) または BSA を 1 $\mu\text{g}/\text{well}$ の濃度で High binding EIA/RIA microplate (Corning) に添加し、一晚室温で静置した。その後、5%BSA/TBS を加え 2 時間室温で振盪した後、ブロッキングを行い、binding buffer (TBS, 0.1%BSA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2) に溶解させた biotin-labeled CD44 (Thermo Scientific, EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit) を各ウェルに添加し、2 時間室温に静置した。ビオチンで標識された Biotin-labelde CD44 は、Streptavidin-HRP (Thermo Scientific) を各ウェルに加えた後、tetramethylbenzidine (TMB) substrate react kit (Pierce) を用いて定量した。また、定量には 450 nm の波長を用いた。

1-2-7: 統計処理

データの解析は、student's t-test を用いて統計処理を行った。P 値<0.05 を有意とみなした。

1-3: 結果

<結果の概要>

DSS 処理を行った MDA-MB-231 乳癌細胞を用いてウエスタンブロットを行った結果、二量体形成を示唆する CD44 が検出できた。さらに、FLAG および HA タグを融合した CD44

発現プラスミドを用いた共免疫沈降法と、solid-phase self-interaction アッセイを行った結果、CD44 は細胞外ドメインを介して二量体を形成することが示唆された。

1-3-1: 乳癌細胞における二量体化した CD44 の検出

MDA-MB-231 乳癌細胞において、二量体化した CD44 が検出できるかを検証した。検証には、シングル細胞およびクラスターを形成させた細胞を対象に、DSS を用いてタンパク質を架橋した後、ウエスタンブロット法を用いた。その結果、シングル細胞およびクラスターを形成させた細胞で共通した3つのバンド (*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa) が検出された。また、クラスターを形成している細胞では、これら3つのバンド以外にも3つのバンド (**: ~100kDa、###: ~120kDa、^^: ~160kDa) が検出された (図 1-B)。

MDA-MB-231 乳癌細胞では、~80kDa を示す CD44s がドミナントに発現していることが報告されているが (図 1-A) (Liu *et al.*, 2019)、CD44 のバリエーションアイソフォームである CD44v8-10 も、微量ではあるが、発現していることが報告されている (Hiraga and Nakamura 2016)。また、CD44s は糖鎖修飾の違いにより、分子量が変化することが報告されている。そのため、これらの大きさの異なる3つのバンド (*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa) は、CD44 のバリエーションアイソフォームまたは翻訳後修飾の異なる CD44s である可能性が考えられる。今回検出された3つのバンド (*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa) は、内在性の CD44 の発現のない HEK-293 細胞に CD44s-FLAG 発現プラスミドを強制発現させた際にも検出された (図 2-A と B)。そのためこの結果は、これら3つのバンドが CD44 のバリエーションアイソフォームではなく CD44s に由来する可能性を示唆する。また、これら3つのバンドは、その分子量より、翻訳後の糖鎖修飾の異なる CD44s である可能性が高い (Zhou *et al.* 1989; Okamoto *et al.* 1999; Bartolazzi *et al.* 1996)。そこで、次にこの可能性を検証するため、CD44s の N 型糖鎖修飾部位と想定される 5 個のアスパラギンを全てグルタミンに置換した CD44N5Q-FLAG 発現プラスミドおよび、CD44s-FLAG プラスミドを、内在性の CD44 の発現のない HEK293 細胞に強制発現させた後、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。その結果、CD44N5Q-FLAG では、~50kDa の大きさを示すバンドが明瞭に検出された (図 1-C)。この結果は、N 型糖鎖修飾の無い CD44s は~50kDa の大きさを示すことを示唆する。また、糖鎖修飾を切断する PNGase F 処理を行い、抗 CD44 抗体を用いたウエスタンブロットを行なった結果、PNGase F 処理を行った場合には、~60kDa の大きさを示すバンドが検出された (図 1-D)。CD44N5Q-FLAG の結果とこの結果を考え合わせると、PNGase F では切断され難い CD44s の糖鎖修飾が存在する可能性を示唆している。

CD44s は CD44fl と共通した細胞外ドメインを有している (図 1-A)。そのため、CD44fl においても二量体化した CD44 が検出されるかを検証した。検証は、HEK293 細胞に HA を融

合させた CD44fl-HA を強制発現させ、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットにより行なった。その結果、シングル細胞およびクラスターを形成している細胞において、共に 2 つのバンドが検出された (@: ~125kDa、@@: ~250kDa)。約 250kDa のバンドは、DSS 依存的に検出されたため、二量体化した CD44fl であると推定される (図 1-E)。

1-3-2: CD44 が細胞外ドメインを介して二量体を形成する可能性の検証

二量体化には、単一細胞内で二量体を形成する *cis-dimer* と細胞間で二量体を形成する *trans-dimer* の二種類が存在する。そこで、CD44 が *trans-dimer* を形成する可能性を内在性の CD44 の発現のない HEK293 細胞を用いて共免疫沈降法を行うことにより検証した。サンプルは、CD44 の C 末端に HA または FLAG を融合させた CD44 発現プラスミドをそれぞれ別の細胞集団に強制発現させた後、2 種類の細胞集団を混合し、Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上でインキュベートすることによりクラスターを形成させたものを使用した。クラスターを形成した細胞を回収後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体でウエスタンブロットを行なった。その結果、シグナルは強いものでは無かったが、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったサンプルから CD44-HA が検出されたことから、CD44 は細胞外ドメインを介して *trans-dimer* を形成する可能性が示された (図 2-A)。

次に、CD44 が *cis-dimer* を形成する可能性を検証した。検証には、CD44 の C 末端に HA または FLAG を融合させた CD44 発現プラスミドを用いた。HEK293 細胞に 2 種類の CD44 プラスミドを細胞導入し強制発現させ、トリプシンおよびフィルター処理を用いてシングル細胞に分離した後、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体でウエスタンブロットを行なった。その結果、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行なったサンプルから CD44-HA が検出されたことから、CD44 は *cis-dimer* を形成する可能性が示された (図 2-B)。

1-3-3: CD44 の細胞外ドメイン同士の相互作用

共免疫沈降法は、タンパク質同士の結合を強く示唆するが、何かを介して間接的に結合している可能性を否定できない。そこで、CD44 の細胞外ドメイン同士が直接結合する可能性を *solid-phase self-interaction* アッセイを用いて検証した。検証には、CD44 の細胞外ドメインまたは BSA に、ビオチンで標識された CD44 (biotin-labeled CD44) を添加し、450 nm の吸光度を用いてビオチンを測定することで結合量を定量した。その結果、biotin-labeled CD44 に CD44 の細胞外ドメインを混合した場合には、BSA と混合した場合と比較し、有意に結合量が増加した (図 3)。

1-4: 考察

1-4-1: 乳癌細胞には二量体化した CD44 が存在する

抗 CD44 抗体によるウェスタンブロットを行い、内在性の CD44 を検出した結果、クラスターを形成している MDA-MB-231 乳癌細胞では、クラスターを形成していない細胞で観察される3つのバンド (*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa)に加えて、さらに3つのバンド (**:~100kDa、##: ~120kDa、^^: ~160kDa)が検出された (図 1-B)。一般的に、同一タンパク質の二量体化により、分子量は 2 倍になることが知られている (Zhou *et al.* 2016)。また、CD44fl-HA 発現プラスミドを HEK293 細胞に強制発現させた実験においても、過去の報告と同様に、二量体化した CD44 では分子量が 2 倍になった (図 1-E) (Hartmann *et al.* 2015)。さらに、CD44 発現プラスミドおよび solid-phase self-interaction アッセイを用いた実験から、CD44 が *cis-dimer* および *trans-dimer* を形成する可能性が示唆された (図 2 と 3)。これらを考え合わせると、**は二量体化した*、##は二量体化した#、^^は二量体化した^である可能性が考えられる。また、クラスターを形成させ、DSS を添加したサンプルでは、シングル細胞と比較し、単量体であると考えられる CD44 (*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa) のシグナルが減少していた。これはクラスターを形成させた細胞では、CD44 が二量体形成に使用されたため単量体が減少した可能性が考えられる。

1-4-2: クラスター形成における *trans-dimer* の必要性

HA または FLAG を融合させた CD44 発現プラスミドを用いた実験において、CD44 が *cis-dimer* を形成する可能性が示された (図 1-B)。このことから、シングル状態の MDA-MB-231 乳癌細胞で薄く検出された二量体形成を示唆する CD44 は、*cis-dimer* を形成した CD44 であると考えられる。一方、シングル細胞と比較し、クラスターを形成している MDA-MB-231 乳癌細胞では、二量体化した CD44 が増加していた (図 1-B)。CD44 は *cis-dimer* だけでなく *trans-dimer* を形成することから (図 1-A)、クラスターを形成した細胞で見られた二量体化した CD44 の増加は *trans-dimer* によると考えられる。実際、器官の発生過程や免疫細胞に見られる細胞のクラスターは、カドヘリンや ICAM1など細胞表面に存在するタンパク質を介して、細胞間で結合することで形成される (Natsuaki *et al.* 2014; Matsui *et al.* 2011)。したがって、乳癌細胞においてもクラスター形成には、細胞表面に存在するタンパク質である CD44 が、細胞間で *trans-dimer* を形成することが重要である可能性が推察される。これを検証するためには、今後は *cis-dimer* または *trans-dimer* の形成を特異的に阻害する条件下で、クラスター形成の有無を定量することが課題である。

1-4-3: クラスター形成とN型糖鎖修飾の関係

N型糖鎖修飾が無いと考えれる CD44 (~50kDa) でも二量体化が検出された (図 1-B)。また、二量体化の量は N 型糖鎖修飾が無いと考えられる CD44 で最も多く検出されたことから、N 型糖鎖修飾が無くても二量体化は起こると推察される。CD44 の二量体化と N 型糖鎖修飾の関係についてはこれまでに報告がないが、CD44 とヒアルロン酸の結合において、N 型糖鎖修飾は結合の有無ではなく結合効率に影響することが報告されており (Barkeer *et al.* 2018; Catterall *et al.* 1999; Katoh 1995)、N 型糖鎖修飾は結合の有無には影響しないという観点において、今回の結果と一致する。

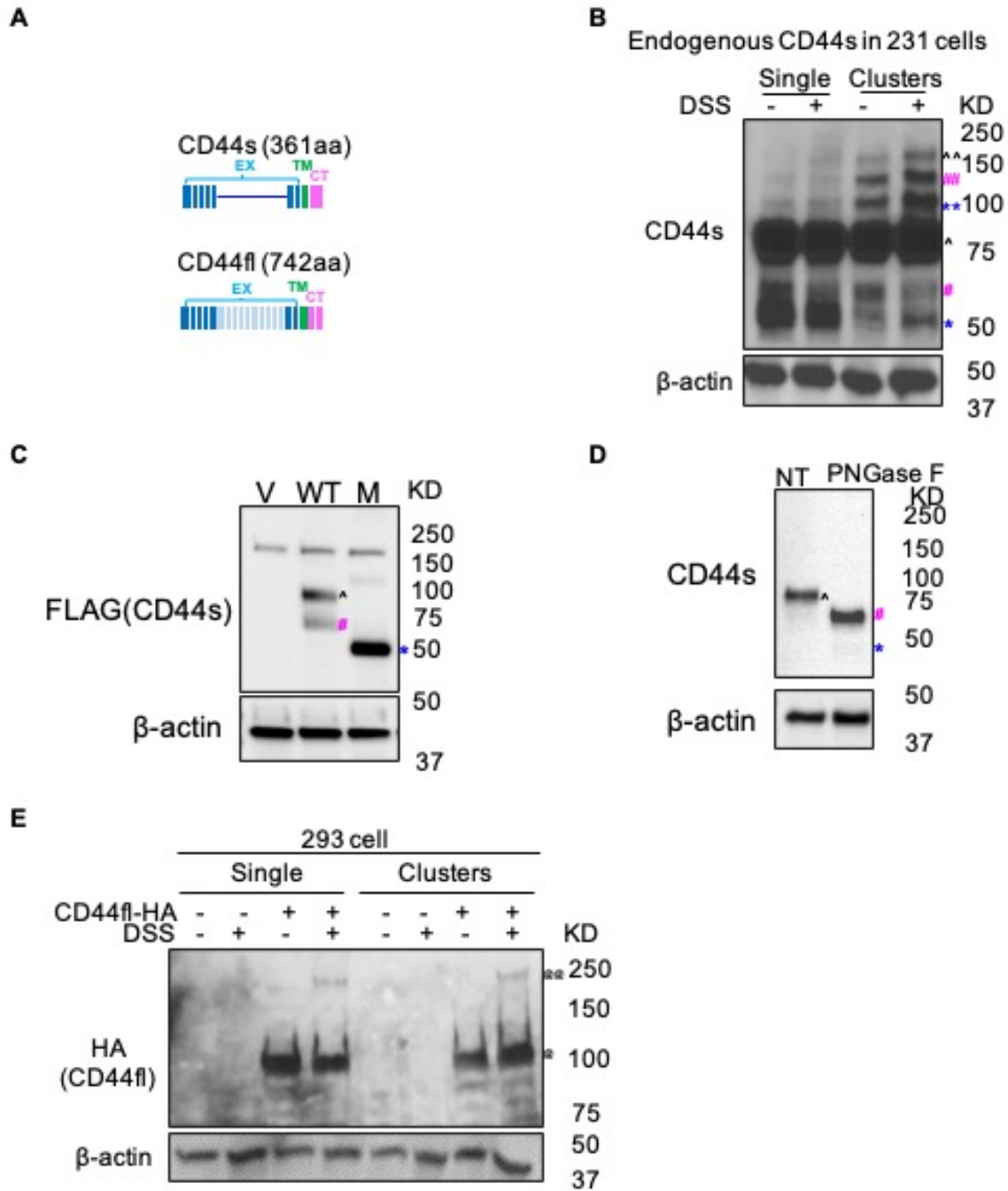


図 1: CD44 は二量体を形成する

A. CD44fl と CD44s の模式図。CD44 は細胞外ドメイン (extracellular ドメイン: EX)と膜貫通ドメイン (transmembrane ドメイン: TM) と細胞質側末端 (cytoplasmic tail: CT) の3つの部位から構成される。

B. MDA-MB-231 乳癌細胞に内在性に発現している CD44 を、抗 CD44 抗体を用い

たウエスタンブロット法により検出した。シングル細胞は、トリプシンおよびフィルター処理によって選別した。クラスターを形成した細胞は、Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上でインキュベートすることにより作製した。サンプルは、細胞を回収後、細胞表面で発現しているタンパク質間の相互作用を安定化させるため DSS を用いて架橋処理を行なった。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。(*: ~50kDa、#: ~60kDa、^: ~80kDa、 **: ~100kDa、 #: ~120kDa、 ^^: ~160kDa)

- C. 5 カ所の N 型糖鎖修飾部位のアスパラギン酸を全てグルタミンに置換した CD44N5Q-FLAG は、~50kDa の大きさを示す。MDA-MB-231 乳癌細胞に、CD44s-FLAG または CD44N5Q-FLAG 発現プラスミドを強制発現させ、抗 FLAG 抗体でウエスタンブロットを行った。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。(*: ~50kDa、 #: ~60kDa、 ^: ~80kDa)
- D. PNGase F 処理を行った CD44 は、~50kDa および~60kD の大きさを示す。MDA-MB-231 乳癌細胞に、N 型糖鎖修飾を切断する PNGase F 処理を行い、抗 CD44 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことで CD44 を検出した。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。(*: ~50kDa、 #: ~60kDa、 ^: ~80kDa)
- E. HEK293 細胞に HA 融合 CD44fl 発現プラスミドを強制発現させ、DSS 処理後、抗 HA 抗体を用いたウエスタンブロットを行うことで、CD44fl の二量体形成能を評価した。シングル細胞は、トリプシンおよびフィルター処理によって選別した。クラスターを形成している細胞は、Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上でインキュベートすることにより作製した。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。(@: ~125kDa、 @@: ~250kDa)

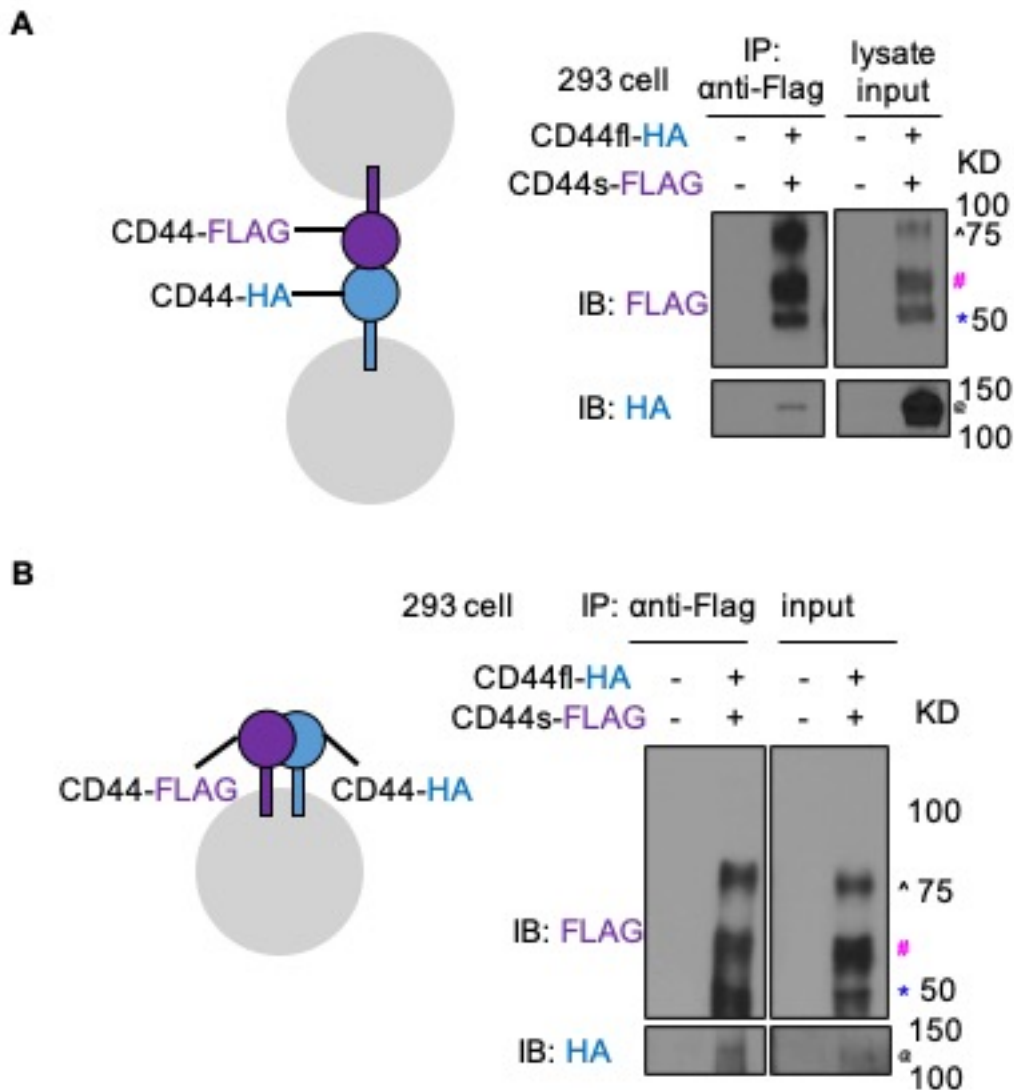


図 2: CD44 は *trans-dimer* および *cis-dimer* を形成する

- A. CD44 が *trans-dimer* を形成する可能性を検証した (左図)。C 末端に HA または FLAG を融合させた CD44 発現プラスミドを用いて、それぞれの CD44 プラスミドを HEK293 細胞に強制発現させた後、2 種類の細胞集団を混合し、Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上でインキュベートすることによりクラスターを形成した細胞を作製した。その後、細胞を回収、溶解し、抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降を行った (右図)。ウエスタンブロットには、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いた。
- B. CD44 が *cis-dimer* を形成する可能性を検証した (左図)。C 末端に HA または FLAG を融合した CD44 発現プラスミドを混合し、HEK293 細胞に強制発現させた後、

トリプシンおよびフィルター処理を行い、シングル細胞を選別した。その後、細胞を回収、溶解し、抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降を行なった (右図)。ウエスタンブロットには、抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いた。

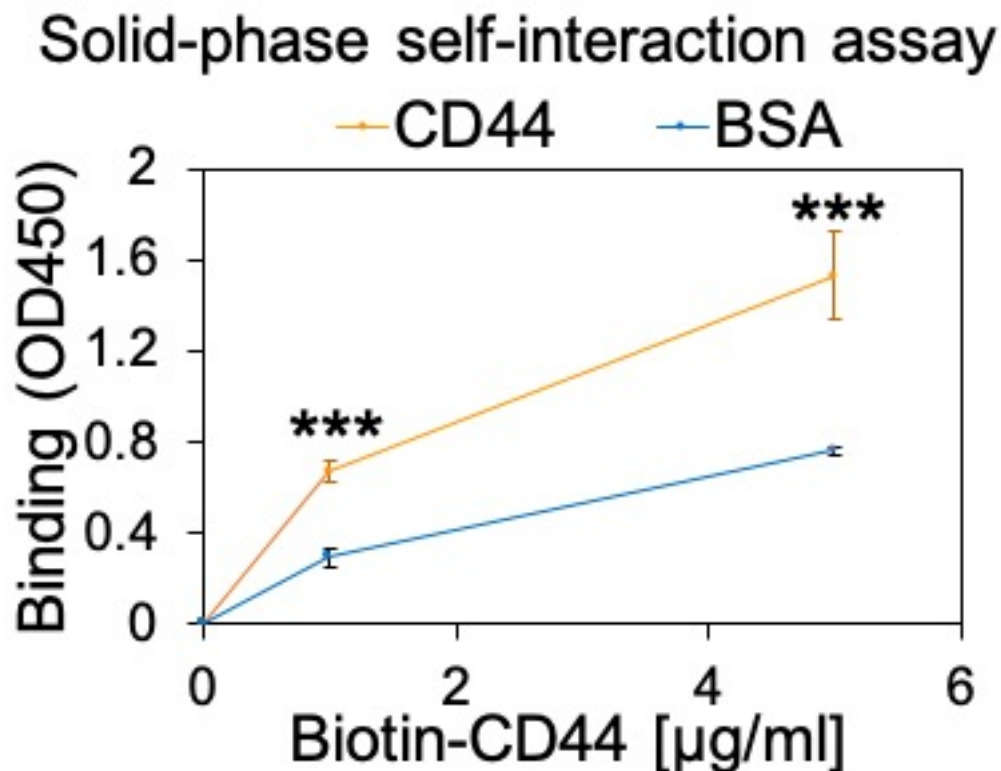


図 3: CD44 の細胞外ドメイン同士は直接結合する

CD44 の細胞外ドメインまたは BSA をコートした 96 ウェルプレートに、ビオチンで標識された CD44 を添加し、450 nm の吸光度を用いてビオチンを測定することで CD44 の細胞外ドメインと CD44 の結合を評価した。Student's t-test による有意差検定を行なった。エラーバー: S.D、*** $p < 0.001$ 。

第二章

CD44 の二量体形成に必要な
アミノ酸の同定
および
二量体形成の阻害による
クラスター形成への影響

2-1: 緒言

第一章において、CD44 は細胞外ドメインを介して細胞間で二量体を形成する可能性が示された。CD44 の細胞外ドメインを介する二量体の形成が、クラスターの形成に寄与しているのであれば、二量体形成能を失った CD44 では、クラスターの形成が抑制されるはずである。そこで第二章では、まず共同研究者による計算機シミュレーション結果を基に変異型 CD44 発現プラスミドを作製した。そして、変異型 CD44 では二量体形成が阻害されるかを、共免疫沈降法を用いて検証した。最後に、二量体形成能を失った変異型 CD44 では、クラスター形成が抑制されるかを、クラスターアッセイを用いて検証することとした。

2-2: 材料と方法

2-2-1: 変異 CD44 プラスミドの作製

新規に作製した3つのプラスミド、CD44s- Δ Nd21_97-FLAG、CD44s-Domain I-FLAG、CD44s-Domain II-FLAG は、pCMV6-FLAG-CD44 (OriGene, RC221820) を基に GeneScript に委託して作製した。

2-2-2: クラスターアッセイ

HEK293 細胞にプラスミドをトランスフェクションし、48 時間経過後、トリプシンと 35 μ m のフィルターを用いて細胞をシングルにした。その後、Poly-HEMA をコートした 12 ウェルプレートに細胞を等量ずつ撒き、光学顕微鏡下で 2 時間、30 分おきに観察した。

使用したプラスミド

pCMV3-C-GFPspark Control Vector (Sino Biological, CV026)

pCMV6-FLAG-CD44 (OriGene, RC221820)

CD44s- Δ Nd21_97-FLAG (GeneScript)

CD44s-Domain I-FLAG (GeneScript)

CD44s-Domain II-FLAG (GeneScript)

その他の材料、方法については第一章に記載の内容と同様。

2-3: 結果

<結果の概要>

共同研究者による計算機シミュレーションにより、細胞外ドメインを介する CD44 の二量体化には、ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸およびドメイン II 内の 5 個のアミノ酸が関与している可能性が予測された。そこで、CD44s のアミノ酸配列を基に、三種類の変異型 CD44 発現プラスミド (ドメイン I の欠損・ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸のアラニンへの置換・ドメイン II 内の 5 個のアミノ酸のアラニンへの置換) を作製した。そして、これらの変異型 CD44 における二量体化形成能を、共免疫沈降法およびウエスタンブロット法により評価した。その結果、三種類全ての変異型 CD44 発現プラスミドで細胞外ドメインを介する二量体の形成が抑制された。さらに、クラスター形成に与える影響を検証するため、クラスターアッセイを行なった結果、三種類全ての変異型 CD44 でクラスターの形成が減少した。

以上の結果より、CD44 のドメイン I 内の 10 個のアミノ酸とドメイン II 内の 5 個のアミノ酸でカバーされる領域が、CD44 の細胞外ドメインを介する二量体の形成に必要なことが明らかとなった。また、二量体形成の阻害により、クラスターの形成が抑制されることが示された。

2-3-1: 細胞外ドメインを介する CD44 の二量体化に必要なアミノ酸の推定

共同研究者による計算機シミュレーションにより、CD44 の細胞外ドメインは、ドメイン I、ドメイン II、ドメイン III の3つに分かれていることが示された (図 4-A)。また、CD44 が細胞間で細胞外ドメインを介して二量体を形成しているとするならば、ドメイン I とドメイン II が関与する可能性が高いことが推定された (図 4-B)。具体的には、ドメイン I に存在する 12 個 (Ser-45、Glu-48、Phe-74、Cys-77、Arg-78、Tyr-79、Ile-88、Arg-90、His-92、Pro-93、Asn-94、Cys-97) および、ドメイン II に存在する 5 個 (Ile-106、Tyr-155、Val-156、Gln-157、Lys-158) の、合計 17 個のアミノ酸が二量体化に関与していると推定された (図 4-C)。この結果を基に、CD44s のアミノ酸配列から、ドメイン I の主要なアミノ酸部位である Q21-C97 を欠損させた変異型 CD44 プラスミドを作製した。以下、この変異型 CD44 発現プラスミドを Δ Nd21_97 と記す。また、ドメイン I に含まれる 12 個のアミノ酸のうち、His-92 と Pro-93 を除く 10 個のアミノ酸をアラニンに置換した CD44 発現プラスミドも作製した。以下、この変異型 CD44 を Domain I mutant と記す。His-92 と Pro-93 は、ドメイン I とドメイン II をつなぐターン構造上に存在しており、CD44 の安定性に関与していると考えられるため変異は入れなかった。さらに、ドメイン II に存在する 5 つのアミノ酸をアラニンに置換した CD44 発現プラスミドも作製した。以下、この変異型 CD44 発現プラスミドを Domain II mutant と記す。これら三種類の変異型 CD44 発現プラスミドを用いて以下の実験を行った。

2-3-2: 変異型 CD44 の二量体形成能の評価

作製した三種類の変異型 CD44 (Δ Nd21_97, Domain I mutant, Domain II mutant) の二量体形成能を評価するため、DSS 処理および抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロットを行なった。その結果、野生型の CD44s の発現では、~50kDa、~60kDa、~80kDa、さらに~120kDa のシグナルが得られた。一方、 Δ Nd21_97 では、40kDa と 50kDa の 2 カ所のみシグナルが得られた。50kDa と~60kDa ではなく、~40kDa と~50kDa の所でシグナルが得られた理由は、 Δ Nd21_97 では 76 個のアミノ酸を欠損させた結果、分子量が低下したためであると考えられる。また、Domain I mutant と Domain II mutant も同様に 50kDa、60kDa の 2 カ所のみシグナルが得られた (図 5-A)。これらの結果は、作製した変異型 CD44 では *cis* の二量体形成能が消失していることを示唆する。

次に、変異型 CD44 では、細胞外ドメインを介した *trans* の二量体化が抑制されるかを、共免疫沈降法およびウエスタンブロット法によって検証した。サンプルは、野生型 CD44s と作製した三種類の変異型 CD44 の発現プラスミドを、それぞれ HEK293 細胞に強制発現させた後、CD44-HA 発現プラスミドを強制発現させた HEK293 細胞と Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上で共培養を行うことでクラスターを形成させたものを用いた。クラスター形成後、抗 FLAG 抗体もしくは抗 HA 抗体を用いて共免疫沈降を行なった。抗 FLAG 抗体を用いて共免疫沈降を行なった場合も、抗 HA 抗体を用いて共免疫沈降を行なった場合も野生型の CD44s でのみシグナルが得られた (図 5-B)。この結果は、作製した変異型 CD44 では、細胞外ドメインを介する二量体の形成が抑制されることを示唆する。

2-3-3: 変異型 CD44 のクラスター形成能

CD44 の二量体化の阻害により、クラスター形成が抑制されるかを検証するため、作製した変異型 CD44 発現プラスミドを用いてクラスターアッセイを行なった。野生型の CD44s および三種類の変異型 CD44 発現プラスミドをそれぞれ強制発現させた HEK 293 細胞を、等量ずつ Poly-HEMA でコートした 12 ウェルプレートで培養し、クラスター形成の有無を光学顕微鏡下で観察した。その結果、野生型の CD44 発現プラスミドを導入した細胞では、クラスターの形成が確認されたが、三種類の変異型 CD44 発現プラスミドを強制発現させた細胞では、クラスターの形成数が有意に減少した (図 6-A と B)。この結果は、CD44 の二量体化の阻害によりクラスターの形成が抑制されることを示唆する。

2-3-4: 二量体化形成に必要なアミノ酸部位の同定

上述した結果より、CD44 の細胞外ドメインを介した二量体の形成には、ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸とドメイン II 内の 5 個のアミノ酸でカバーされる領域が必要であることが明らかと

なった。これらの結果を踏まえ、各々のアミノ酸と結合する可能性が高いアミノ酸部位の一覧を共同研究者の協力のもと作製した (図 7)。

2-4: 考察

2-4-1: 変異型 CD44 では二量体形成が抑制される

Domain I mutant、および Domain II mutant では、二量体化した CD44 が検出されなかった (図 5-A と B) ことから、CD44 の二量体化には、ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸および、ドメイン II 内の 5 つのアミノ酸でカバーされる領域が必要であると考えられる。この結果は、ドメイン I とドメイン II が互いに結合することで二量体化を形成するという予測と一致する (図 4-B と図 7)。一方、本実験では、細胞間でドメイン I 同士が結合する可能性、および、ドメイン II 同士が結合する可能性までは明らかにできていない。実際、CD44 のリガンドとしてよく知られるヒアルロン酸は、ドメイン I に結合部位が存在するものの、ドメイン II にも結合に必要なアミノ酸が存在することが知られている (Bajorath *et al.* 1998; Teriete *et al.* 2004)。そのため例えば、ドメイン I 同士が結合することで CD44 の二量体は形成されるが、ドメイン II にも結合に重要なアミノ酸が存在するため、Domain II mutant でも二量体化が抑制された可能性も考えられる。今後は、図 7 に示した通り、対となるアミノ酸をアラニンに置換した CD44 発現プラスミドの作製や、X 線を用いた結晶構造解析を行うことで、CD44 の二量体化形成に必要な十分なアミノ酸を同定することが課題である。

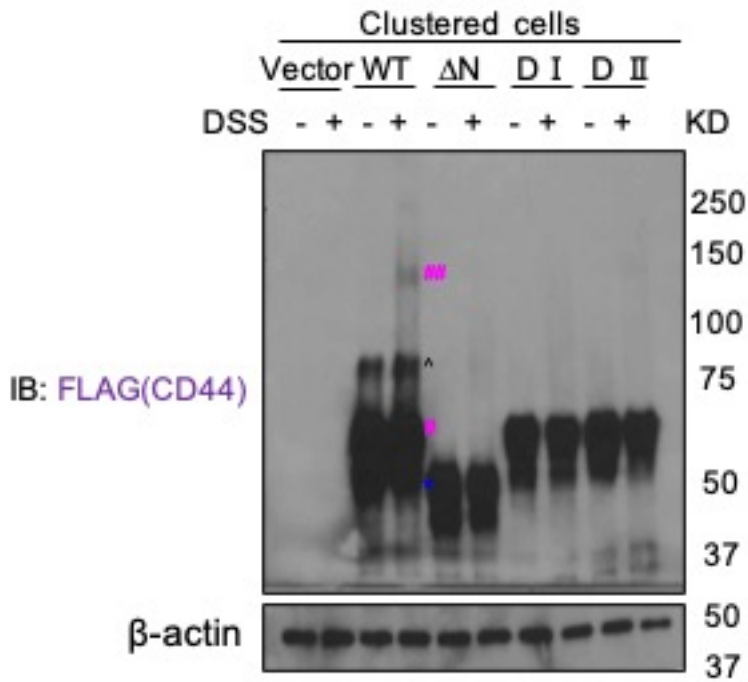
変異型 CD44 発現プラスミドにおいて、~80kDa の所でシグナルが検出されなかった理由は (図 5-A)、N 型糖鎖修飾が不完全になるためであると考えられる。実際、 ΔN_{d21-97} では、N 型糖鎖修飾を受けるアスパラギン酸が 2 ヶ所欠損している。Domain I mutant、および Domain II mutant には N 型糖鎖修飾を受けるアミノ酸の置換は含まれていないが、アミノ酸置換による構造の変化によって N 型糖鎖修飾が抑制された可能性が考えられる。

2-4-2: CD44 の二量体化の障害はクラスター形成を抑制する

クラスターアッセイにより、二量体形成能を失った変異型 CD44 は、クラスターの形成が抑制されることが示された。今回使用した変異型 CD44 の発現では、*cis-dimer* および *trans-dimer* の形成が抑制されるため、どちらの二量体化がクラスター形成に寄与しているかは不明である。しかし、本結果は少なくとも、細胞外ドメインを介する CD44 の二量体形成により、クラスターが形成されることを示唆すると考えられる。

メイン II 内でアラニンに置換したアミノ酸を青色で示した。H92 と P93 はドメイン I とドメイン II をつなぐ上で重要であると想定されたターン構造上に存在しており、アラニンへ置換すると CD44 の安定性が低下する可能性があることから、これら 2 つのアミノ酸は、アラニンへ置換しなかった。

A



B

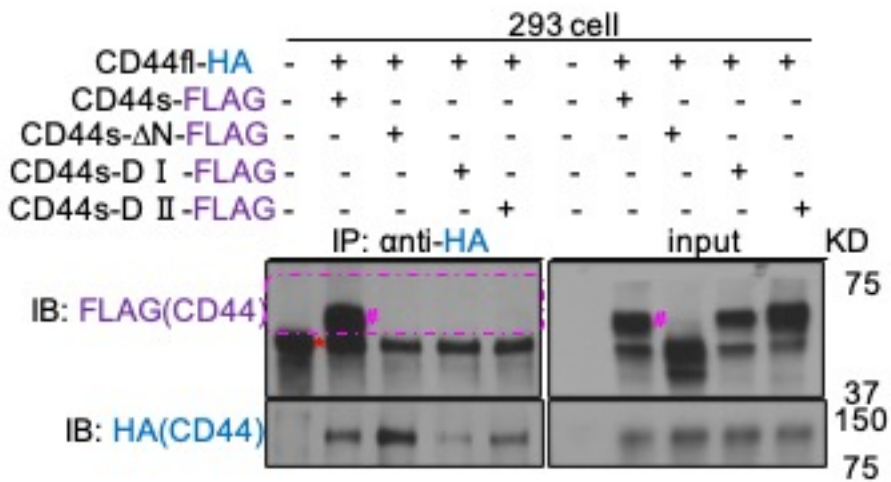


図 5: 変異型 CD44 は二量体形成能を消失する

- A. 三種類の変異型 CD44 発現プラスミドにおける二量体形成能の評価。HEK 293 細胞に三種類の変異型 CD44 発現プラスミドをそれぞれ強制発現させた後、Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上でインキュベートすることによりクラスターを形成させた。その後、DSS を用いて細胞表面で発現しているタンパク質間の結合を安定化させ、抗 FLAG 抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。変異型の CD44 発現プラスミドには、 ΔN_{21-97} (ΔN)、Domain I mutant (DI)、Domain II mutant (DII)の三種類を

使用した。ローディングコントロールとして β -actin を使用した。(*: ~50kDa、 #: ~60kDa、 ^: ~80kDa、 ##: ~120kDa)

- B. 変異型 CD44 発現プラスミドにおける細胞外ドメインを介した二量体形成能の評価。WT、 Δ Nd21_97、Domain I mutant および Domain II mutant をそれぞれの HEK293 細胞に強制発現させ、CD44fl を強制発現させた HEK293 細胞と共に Poly-HEMA でコートした細胞培養ディッシュの上で共培養を行いクラスターを形成させた。クラスター形成後、抗 FLAG 抗体または抗 HA 抗体を用いて共免疫沈降を行なった。また、抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。(#: ~60kDa、*: Anti-FLAG M2 Magnetic Beads 由来のバックグラウンド)

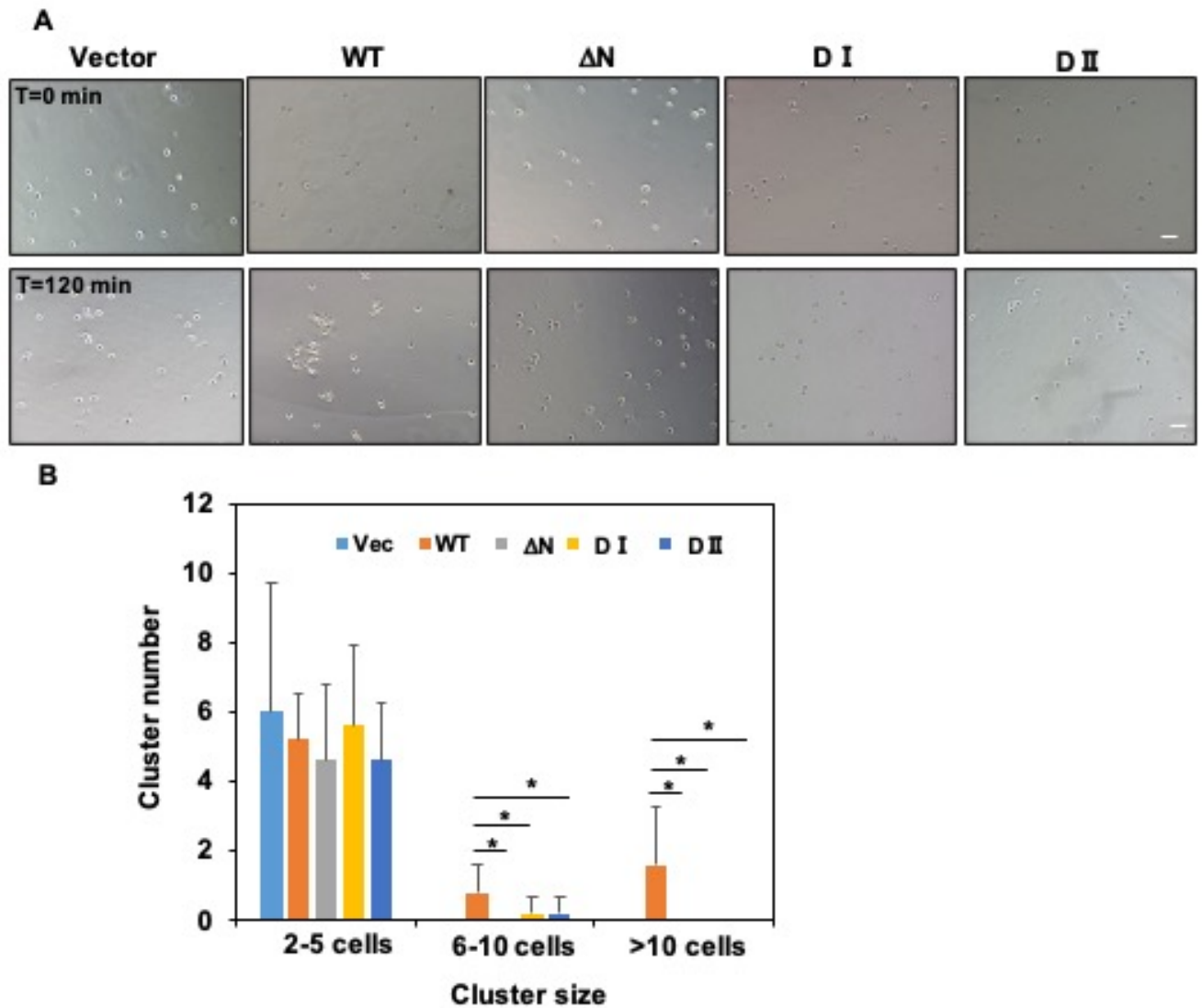


図 6: 変異型 CD44 の発現でクラスター形成が抑制される

- A. 変異型 CD44 発現におけるクラスター形成能を評価するため、クラスターアッセイを行った。三種類の変異型 CD44 発現プラスミドをそれぞれ強制発現させた HEK 293 細胞を等量ずつ 12 ウェルプレートに入れ、直後もしくは 120 分後にクラスターが形成されるかどうかを光学顕微鏡下で観察した。12 ウェルプレートは Poly-HEMA でコートしたものを用いた。スケールバー: 100 μm
- B. A の結果を student's t-test を用いて統計解析した結果。* $p < 0.05$ 。

| Domain | CD44-Molecule A | CD44-Molecule B in dimer | Probabilities |
|--------|-----------------|--------------------------|-------------------------------|
| I | S45 | Y105 | 0.366 |
| | E48 | K158/T197 | 0.731/0.366 |
| | F74 | Y114/Y105/L107/T116/T153 | 0.731/0.366/0.366/0.366/0.366 |
| | C77 | Q157/K158 | 0.366 |
| | R78 | K158/D177 | 0.731 |
| | Y79 | Y105 | 0.731 |
| | I88 | E37 | 0.731 |
| | R90 | E37/K38/N39/G40/Y42 | 0.731/0.731/0.731/0.731/0.366 |
| | N94 | K38/V36/E37 | 0.731/0.366/0.366 |
| | C97 | H35/E37/I96/C97/V36/K38 | 0.366 |
| II | I106 | I72/G73 | 0.731/0.366 |
| | Y155 | E75/T76 | 0.731/0.366 |
| | V156 | E75/T76 | 0.731 |
| | Q157 | E75/T76/C77 | 0.731 |
| | K158 | E48/T76/C77/R78 | 0.731 |

図 7: CD44 の二量体形成に関わる可能性のある 15 個のアミノ酸と結合するアミノ酸部位の推定

共同研究者の計算機シミュレーションにより推定された、CD44 の二量体形成に関わる可能性のある 15 個のアミノ酸と結合する可能性の高いアミノ酸部位。

第三章

CD44 の二量体形成が 乳癌細胞に与える影響

3-1: 緒言

第二章で、細胞外ドメインを介する CD44 の二量体化により、クラスターが形成されることが示された。CD44 は、それ自身にはレセプターキナーゼ活性もホスファターゼ活性を持たないが、細胞内ドメインに結合するタンパク質を介して細胞内に情報を伝達することが知られている (Ponta *et al.* 2003)。そこで、本章では CD44 の二量体化が乳癌細胞に与える影響を解明することで、なぜクラスター CTCs がシングル CTCs と比較して高い転移能を有するのかについて解析を行った。

CD44 の二量体化形成が乳癌細胞に与える影響を解明する糸口として、本章では PAK2 に着目した。PAK2 は卵巣癌や乳癌で転移を促進することが報告されている (Siu *et al.* 2010; Coniglio *et al.* 2008)。また乳癌細胞を用いた研究において、PAK2 の発現阻害は、クラスターの形成を抑制することが報告されているため (Liu *et al.* 2019)、私は、CD44 との関連を予想した。そこで、まずは共免疫沈降法により CD44 と PAK2 の相互作用を検証した。次に、乳癌細胞における CD44 と PAK2 の関連を検証するため、MDA-MB-231 乳癌細胞を用いて CD44 のノックダウンを行い、ウエスタンブロット法により PAK2 の発現量およびリン酸化を評価した。そして最後に、CD44 の二量体化に伴う PAK2 との相互作用および PAK2 のリン酸化を評価するため、二量体形成能を失った変異型 CD44 発現プラスミドを用いて共免疫沈降およびウエスタンブロットを行なった。

3-2: 材料と方法

3-2-1: プラスミドおよび siRNA のトランスフェクション

プラスミド DNA のトランスフェクションは、第一章に記載した内容と同様の方法で行なった。第一章および第二章で使用したプラスミド DNA 以外に、本章で新たに使用したプラスミド DNA を以下に示す。

siRNA のトランスフェクションは、100 nM の濃度で siRNA を使用し、Dharafect (Dharmacon, T-2001-03) を用いて行なった。製造元のプロトコルに従いトランスフェクションを行った。また、初回のトランスフェクションの 24 時間後に、培地を交換した後、2 回目のトランスフェクションを行った。

使用したプラスミド DNA

pCMV3-FLAG-PAK2 (Sino Biological, HG10085-CF)

pCMV3-HA-PAK2 (Sino Biological, HG12211-CY)

使用した siRNA

negative control (Dharmacon, D-001810-10-50)

CD44 (Dharmacon, L-009999-00-0010)

PAK2 (Dharmacon, L-003597-00-0020)

3-2-2: 共免疫沈降法

免疫沈降には、第一章に記載の方法と同様の方法でサンプルを回収、溶解した後、一部を whole cell lysate サンプルとして分取した後、抗 HA 抗体または IgG 抗体を添加し、4 °C で一時間回転盤を用いて攪拌した。その後、ProteinA/G PLUS-Agarose (Santa Cruz, AG1000) を添加し、4 °C で一晩振盪させた。サンプルを遠心後、上清を除去し、washing buffer (TBS/0.1% Tween 20) を用いてビーズを洗浄した。

3-2-3: ウェスタンブロット

ウェスタンブロットは、第一章に記載した内容と同様の方法で行なった。第一章および第二章で使用した一次抗体以外に、本章で新たに使用した一次抗体を以下に示す。

使用した一次抗体

PAK2 (1:1000, Protein Tech, 19979-1-AP)

phospho-PAK2 (1:1000, Cell Signaling Technology, 2607T)

その他の材料、方法については第一章に記載の内容と同様。

3-3: 結果

<結果の概要>

共免疫沈降法により CD44 と PAK2 の相互作用が確認された。また、乳癌細胞を用いた CD44 のノックダウンにより、PAK2 のリン酸化が抑制されたことから、PAK2 のリン酸化は CD44 の下流で生じることが示唆された。これらの結果をふまえ、PAK2 との相互作用およびリン酸化が CD44 の二量体化に影響を受ける可能性を、共免疫沈降法およびウェスタンブロット法により検証した。その結果、PAK2 との相互作用に変化は見られなかったが、CD44 の二量体化に伴い PAK2 のリン酸化が促進された。

3-3-1: CD44 と PAK2 の相互作用

CD44 と PAK2 が相互作用する可能性を検証するために、共免疫沈降を行った。共免疫沈降には、HA を CD44 に付加した CD44-HA 発現プラスミドと FLAG を PAK2 に付加した FLAG-PAK2 発現プラスミドを同時に HEK293 細胞に強制発現させた後、クラスターを形成させたサンプルを用いた。そして、抗 HA 抗体を用いて免疫沈降を行なった結果、得られた免疫沈降サンプルから PAK2-FLAG が検出された。この結果は、CD44 と PAK2 が相互作用することを示唆する (図 8)。

3-3-2: CD44 ノックダウンにおける PAK2 への影響

次に、癌細胞において、CD44 の発現阻害による PAK2 発現量および PAK2 のリン酸化の変化をノックダウン法およびウエスタンブロット法により検証した。その結果、CD44 の発現阻害に伴い PAK2 の減少にはばらつきがあるものの、PAK2 のリン酸化は減少することが明らかとなった (図 9)。この結果は、CD44 の下流で PAK2 のリン酸化が生じることを示唆する。

3-3-3: CD44 の二量体化が PAK2 との相互作用およびリン酸化に与える影響

CD44 の二量体化が PAK2 および PAK2 のリン酸化に与える影響を調べるため、まずは共免疫沈降法を用いて CD44 の二量体化の阻害により CD44 と PAK2 の相互作用に影響があるかを検証した。その結果、野生型 CD44 と PAK2 および変異型 CD44 と PAK2 の共沈の量に顕著な差は検出されなかった (図 10-A)。

一方、CD44 の二量体化に伴い PAK2 のリン酸化に変化があるかを、ウエスタンブロット法を用いて検証した結果、野生型の CD44s と比較し、三種類の変異型 CD44 の発現では PAK2 のリン酸化の減少が観察された (図 10-B)。

3-4: 考察

3-4-1: CD44 と PAK2 は相互作用を行う

共免疫沈降法を用いて、CD44 と PAK2 の相互作用を検証した結果、CD44 と PAK2 の相互作用が確認できた (図 8)。一方、CD44 と PAK2 の相互作用は、CD44 のドメイン I の欠損やアミノ酸の置換、およびドメイン II に存在する 5 つのアミノ酸の変異による CD44 の二量体化の阻害による影響は確認されなかった。この結果と、PAK2 は細胞内に局在する (Bokoch 2003) ことを考え合わせると、CD44 と PAK2 の相互作用は CD44 の細胞内ドメインで起こると考えられる。

本検討は CD44 および PAK2 を共に過剰発現させた系を用いて行なわれたものである。

そのため、理想的には、MDA-MB-231 乳癌細胞や、ヒト乳癌細胞を移植して作製されたモデルマウス (Liu *et al.* 2019) から単離した細胞を用いて、内在性の CD44 と PAK2 の相互作用を確認することが必要と考えられる。

3-4-2: CD44 の二量体化の阻害は、PAK2 のリン酸化を抑制する

MDA-MB-231 乳癌細胞を用いて CD44 のノックダウンを行った実験において、PAK2 のリン酸化が抑制されたことから (図 9)、PAK2 のリン酸化は CD44 の下流で起こると考えられる。癌細胞の浸潤や増殖の過程においても、CD44 とヒアルロン酸の結合により PAK2 のリン酸化が促進されることが報告されており (Louderbough and Schroeder 2011)、PAK2 が CD44 の下流に存在するという観点において、この結果は過去の報告とも一致する。

PAK2 のリン酸化は、CD44 の二量体化の阻害によって抑制された。今回検証した PAK2 のリン酸化部位は、Ser20 である。Ser20 は、自己リン酸化によりリン酸化が生じることが報告されている (Yurdagul *et al.* 2013; Gatti *et al.* 1999)。また、CD44 の二量体化には細胞外ドメイン I と II の両方が必要であったこと (図 5-B)、および、ドメイン I はドメイン I と、ドメイン II はドメイン I と結合する可能性が高いと推定された (図 7) ことを考え合わせると、本解析で認められた Ser20 のリン酸化は、細胞表面で CD44 が多量体化した結果、細胞内での PAK2 が近接することとなり、PAK2 間での相互リン酸化が引き起こされた可能性がある (図 11)。この点は、今後の解析が必要である。また、CD44 の過剰発現が認められる膵臓癌では、PKM2 によって PAK2 の Ser20 がリン酸化されることが報告されている (Cheng *et al.* 2018)。また結直腸癌では、CD44 が PKM2 と結合することが報告されている (Tamada *et al.* 2012)。これらのことを考え合わせると、乳癌細胞においても、CD44-PKM2-PAK2 が複合体を形成することで PAK2 の Ser20 をリン酸化を引き起こす可能性も考えられる。

PAK2 の Ser20 残基のリン酸化は、アポトーシスの抑制による細胞生存の促進 (Tang *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2019; Marlin *et al.* 2009; Jakobi *et al.* 2001) および細胞の移動 (Zhou *et al.* 2003) に関与することが知られている。このことから、クラスターCTCs がシングル CTCs と比較して高い転移率を示す理由として、CD44 の二量体化に伴い細胞死と細胞移動の促進が原因であると考えられる。そのため今後は、CD44 の二量体化の有無、あるいは、PAK2 の Ser20 残基のリン酸化の有無により、細胞死や細胞の移動に影響があるかを検証することが課題である。

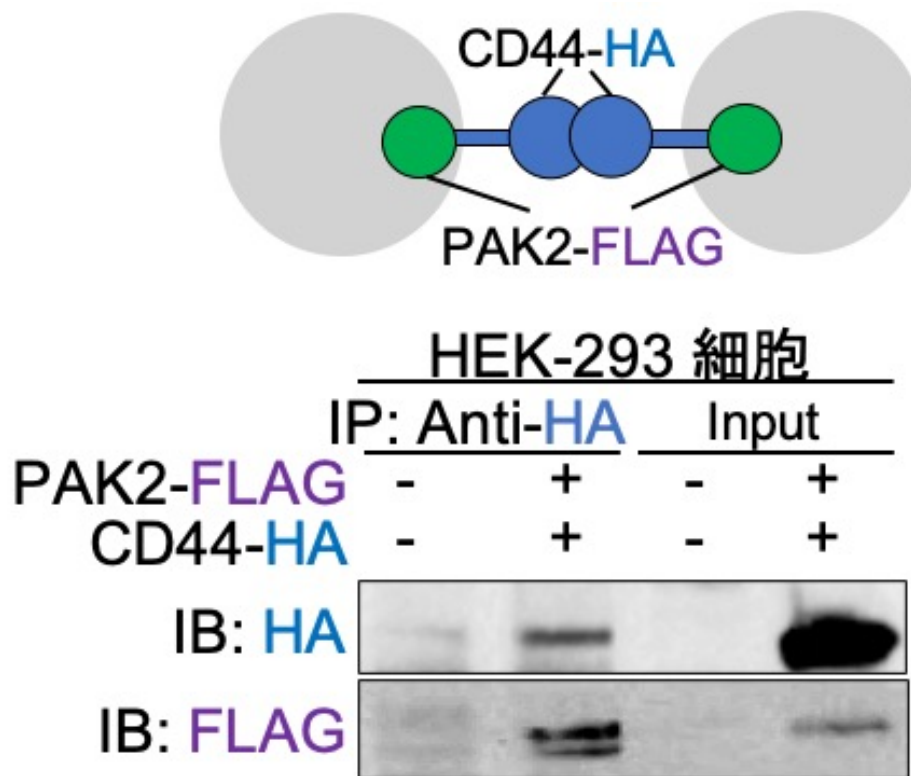


図 8: CD44 と PAK2 の相互作用

共免疫沈降法を用いて CD44 と PAK2 の相互作用を検証した。HEK293 細胞に CD44-HA および PAK2-FLAG 発現プラスミドを導入後、48 時間後に Poly-HEMA でコートした 10 cm ディッシュ上で培養することでクラスターを作製し、細胞を回収後、溶解し、proteinA/G PLUS-Agarose ビーズを用いて共免疫沈降を行なった。Whole cell lysate および免疫沈降サンプルを SDS-PAGE により展開し、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。

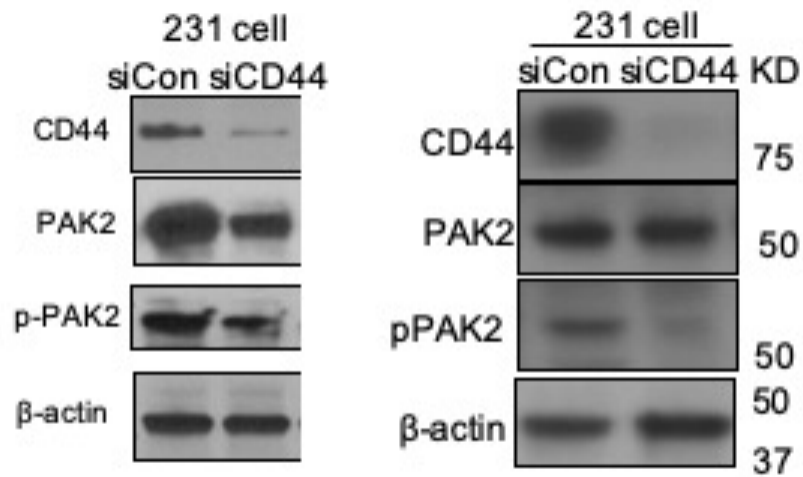
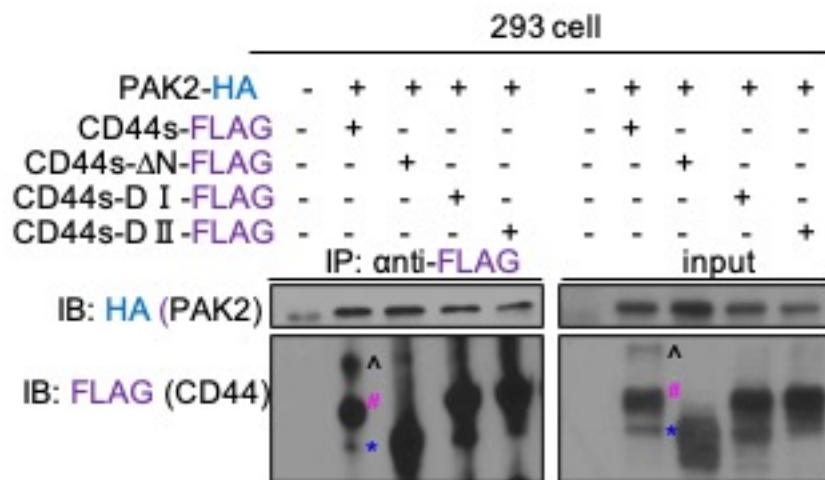


図 9: CD44 ノックダウンにおける PAK2 の蛋白質量および PAK2 のリン酸化への影響

CD44 のノックダウンが PAK2 および PAK2 のリン酸化に与える影響を検証するため、コントロール siRNA および siCD44 を、MDA-MB-231 乳癌細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションは 24 時間おきに 2 日間行った。トランスフェクション 48 時間後に細胞を回収、溶解後、各タンパク質に特異的な抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。同様の実験を 2 回行なった結果を示す。

A



B

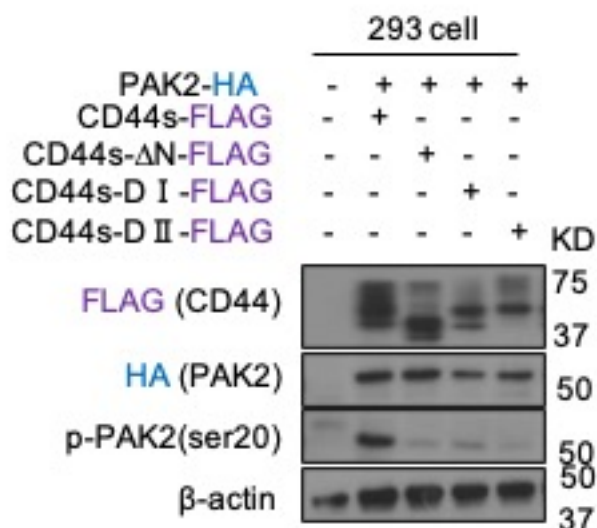


図 10: CD44 の二量体化が PAK2 との相互作用および、PAK2 のリン酸化に与える影響

- A. CD44 の二量体化が CD44 と PAK2 の相互作用に影響を与えるかを検証した。HEK293 細胞に野生型または変異型 CD44-FLAG、および PAK2-HA 発現プラスミドを導入後、48 時間後に Poly-HEMA でコートした 10 cm ディッシュ上で培養することでクラスターを形成させ、細胞を回収後、溶解し、Anti-FLAG M2 Magnetic Beads を用いて共免疫沈降を行なった。Whole cell lysate および免疫沈降サンプルを SDS-PAGE により展開し、抗 FLAG 抗体および抗 HA 抗体を用いてウエスタンブロットを行なった。
- B. A のサンプルを用いて PAK2 の発現量およびリン酸化を、ウエスタンブロットを用いて検証した。ローディングコントロールとしてβ-actin を使用した。

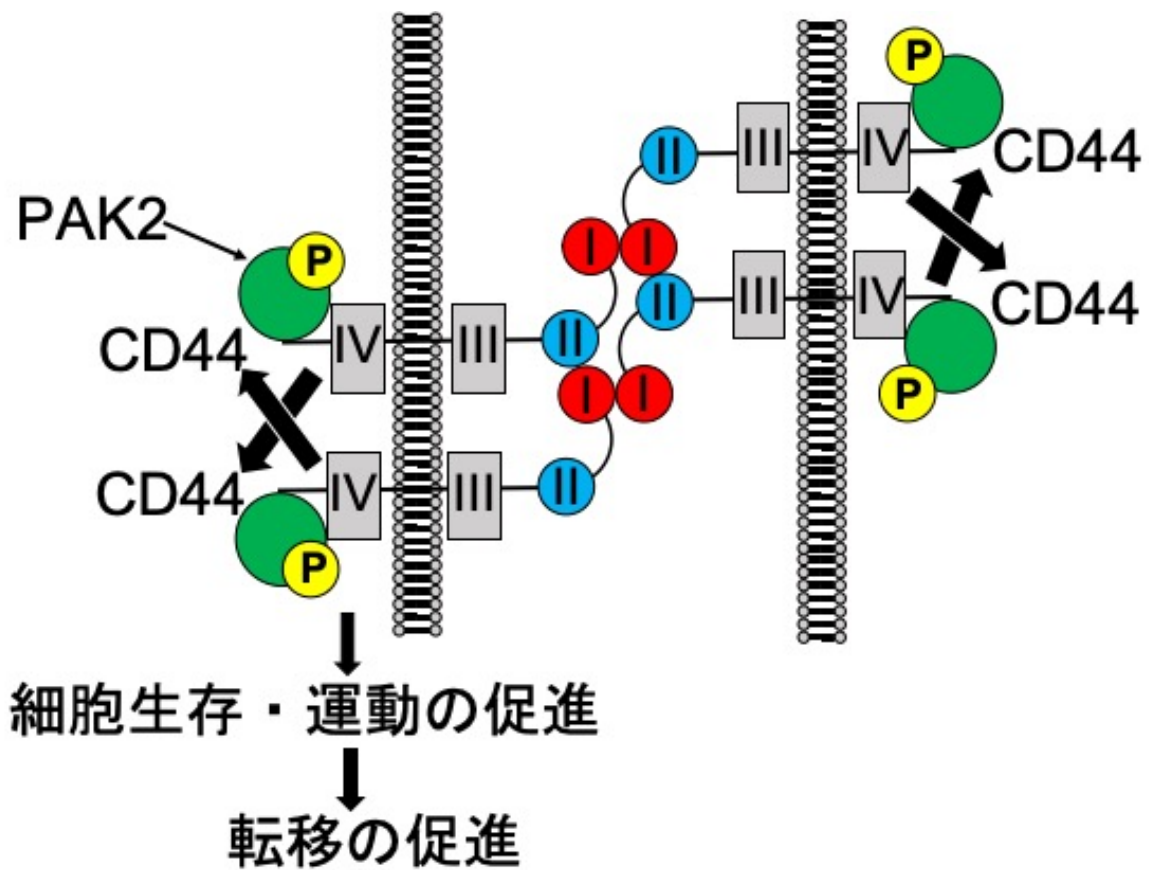


図 11: CD44 の多量体化による PAK2 のリン酸化機構のモデル図

本研究より考察される CD44 の二量体化による PAK2 のリン酸化機構。CD44 の細胞外ドメイン I と I、ドメイン II と I が結合することにより CD44 が細胞表面で多量体化した結果、細胞内での PAK2 が近接することとなり、PAK2 間での相互リン酸化が引き起こされる可能性が考えられる。

第四章

CD44 の二量体化阻害による乳癌細胞の 転移の抑制効果の検証

4-1: 緒言

前章までの結果から、二量体化形成能を失った変異型 CD44 は、野生型と比較し、クラスター形成が抑制されることが示された。クラスターCTCs はシングル CTCs と比較し高い転移能を有するという先行研究から (Aceto *et al.* 2014)、変異型 CD44 を発現した乳癌細胞では、クラスター形成の抑制に伴い、転移能が低下することが予想された。そこで、本章では、変異型 CD44 発現プラスミドおよび野生型の CD44s 発現プラスミドをそれぞれ強制発現させた HEK293 細胞または MDA-MB-231 乳癌細胞をマウスの血液に尾静脈注射することで、肺での検出が抑制される可能性を検証した。これらの検証結果から、今後の治療への応用の可能性について考察する。

4-2: 材料と方法

4-2-1: 使用した実験動物

本実験には、8 週から 10 週齢のメスの重度複合免疫不全マウス (NOD/SCID マウス) を使用した。実験動物は Northwestern University における動物実験の実施に関する基本指導に従い実施した。また、Northwestern University の動物実験講習会を受講し、学内で動物実験を行うために必要な教育講習を終えた後に実験を行なった。

4-2-2: 尾静脈注射と肺の単離

野生型、Domain I mutant、Domain II mutant を HEK293 細胞または CD44 ノックアウト L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞に強制発現させた後、 5×10^5 個の細胞をそれぞれ NOD/SCID マウスに尾静脈注射を行なった。HEK293 細胞を用いた実験では、尾静脈注射を行なってから 24 時間後にマウスを安楽死させた後、肺を単離した。CD44 ノックアウト L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞は、GFP とルシフェラーゼを発現している MDA-MB-231 乳癌細胞 (Liu *et al.* 2019) である。この細胞を用いた実験では、尾静脈注射を行なってから 0 時間後と 24 時間後に生物発光イメージングを行なった。そして 48 時間後にマウスを安楽死させた後、肺を単離した。単離した肺は氷上で冷やした PBS を用いて洗浄し、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性の細胞を指標に、クラスターの数を計測した。

4-2-3: 生物発光イメージング

尾静脈注射後、0 時間および 24 時間後のマウスに、100 μ l の D-luciferin (30 mg/ml, Gold Biotechnology, 115144-35-9) を腹腔内注射し、Spectral Instrument Imaging Spectral

Lagos (SII LAGO) を用いて生物発光画像を取得した。腹腔内注射は、イソフルランを用いた吸入麻酔下で行なった。得られたシグナルは、解析ソフト (Aura, version 2.2.1.1) を用いて Total Flux (photons/second) を測定することで数値化を行なった。

4-2-4: 蛍光顕微鏡観察と統計処理

蛍光顕微鏡は Leica DM IL LED を使用し、10 倍または 20 倍の対物レンズを用いて観察、画像取得を行なった。各々のマウスから、5 枚以上の画像を撮影し、統計処理を行なった。

その他の材料、方法については前章に記載の内容と同様。

4-3: 結果

<結果の概要>

CD44 の二量体化の阻害が、肺への転移を抑制する可能性を検証するため、二量体化能を失った変異型 CD44 である Domain I mutant と Domain II mutant を HEK293 細胞または MDA-MB-231 乳癌細胞に強制発現させ、NOD/SCID マウスへの尾静脈注射を行うことにより肺での検出量を評価した。その結果、HEK293 細胞を用いた実験では、両方の変異型 CD44 の発現において有意に肺での検出量が減少した。一方、MDA-MB-231 乳癌細胞を用いた実験では、Domain II mutant でのみ肺での検出量が減少した。

4-3-1: HEK293 細胞を用いた肺転移への影響

CD44 の二量体化の阻害が、肺への転移を抑制する可能性を検証するため、二量体化能を失った変異型 CD44 である Domain I mutant と Domain II mutant を強制発現させた細胞を、尾静脈注射により NOD/SCID マウスにインジェクションした後、24 時間後に肺を単離した。細胞は、GFP でラベルされた HEK293-GFP 細胞を用いた。その後、単離した肺を蛍光顕微鏡下で観察し、GFP 陽性の細胞を数えた。その結果、野生型と比較し、Domain I mutant と Domain II mutant を強制発現させた細胞を注射したマウスでは、GFP 陽性の細胞数が有意に減少した (図 12A と B)。

4-3-2: MDA-MB-231 乳癌細胞を用いた肺転移への影響

上記の実験により、CD44 の二量体化が阻害される Domain I mutant と Domain II mutant では、肺への転移が抑制される可能性が示された。そこで次に、乳癌細胞である L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を用いて同様の実験を行なった。また、MDA-MB-231 乳癌細胞は

通常状態で CD44 が発現しているため、CD44 をノックアウトした L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を用いた。肺での検出は、尾静脈注射を行ってから 0 時間後と 24 時間後に生物発光イメージングを行なうことで評価した。その結果、野生型と比較し、Domain II mutant において有意な減少が確認できた (図 13A)。また、48 時間後に肺を単離し、蛍光顕微鏡下で GFP 陽性の細胞数を計測した結果、生物発光イメージング結果と同様に、Domain II mutant において有意な減少が確認できた (図 13B)。

4-4: 考察

Domain II mutant では肺での検出が減少する

HEK293 細胞および L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を用いた実験において、二量体化およびクラスター形成能を失った Domain II mutant では、肺での検出量が有意に減少した。この結果は、細胞外基質を介さない、CD44 そのものの二量体化に伴うクラスター形成が転移を促すことを示唆する初めての知見であると言える。Domain II mutant は、CD44 の細胞外ドメイン II に存在する 5 つのアミノ酸 (Ile-106、Tyr-155、Val-156、Gln-157、と Lys-158) をアラニンに置換した変異型 CD44 発現プラスミドである。そのため、これら 5 つのアミノ酸がカバーする領域を標的とした抗体の作製により、転移を抑制する治療法の開発へつながる可能性がある。また、CD44 のドメイン II は、全ての CD44 アイソフォームに共通しており、多くの種類の癌細胞が共有しているドメインである。したがって、CD44 の二量体化を阻害する本戦略は、癌の種類に限定されない治療法に発展する可能性を有している。

L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を用いて肺での検出量を検証した実験において、Domain I mutant では野生型と比較し減少傾向が見られたものの、有意ではなかった。これまで HEK293 細胞を用いて二量体形成能・クラスター形成能・PAK2 のリン酸化・肺での検出量を評価した実験において、Domain I mutant は Domain II mutant と同様の挙動を示していたことから、Domain I mutant においても有意な変化が得られると予測していたため、この結果は意外である。同様の結果が得られなかった理由としては、単純に Domain I mutant と比較し Domain II mutant の方がより強く二量体化が抑制される可能性が考えられる。実際、Domain II mutant に含まれるアミノ酸の方が Domain I mutant に含まれるアミノ酸と比較し、高い確率で二量体化形成に関与している可能性があった (図 7)。また、わずかではあるが PAK2 のリン酸化も Domain II mutant でより抑制されていた (図 10-B)。その他の理由としては、使用した細胞種の違いにより CD44 に対する N 型糖鎖修飾が異なることが考えられる。実際、HEK293 細胞で CD44 を過剰発現させた系では N 型糖鎖修飾が抑制されていた (図 1-B)

と 2-A)。Domain I mutant および Domain II mutant には N 型糖鎖修飾部位のアミノ酸置換は含まれていないが、N 型糖鎖修飾部位の多くは Domain II に存在する。また、図 1-B の結果より N 型糖鎖修飾は二量体化を抑制すると考えられるため、L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞内において Domain II mutant は N 型糖鎖修飾が抑制され二量体化およびそれに伴う転移がしやすかった可能性が考えられる。

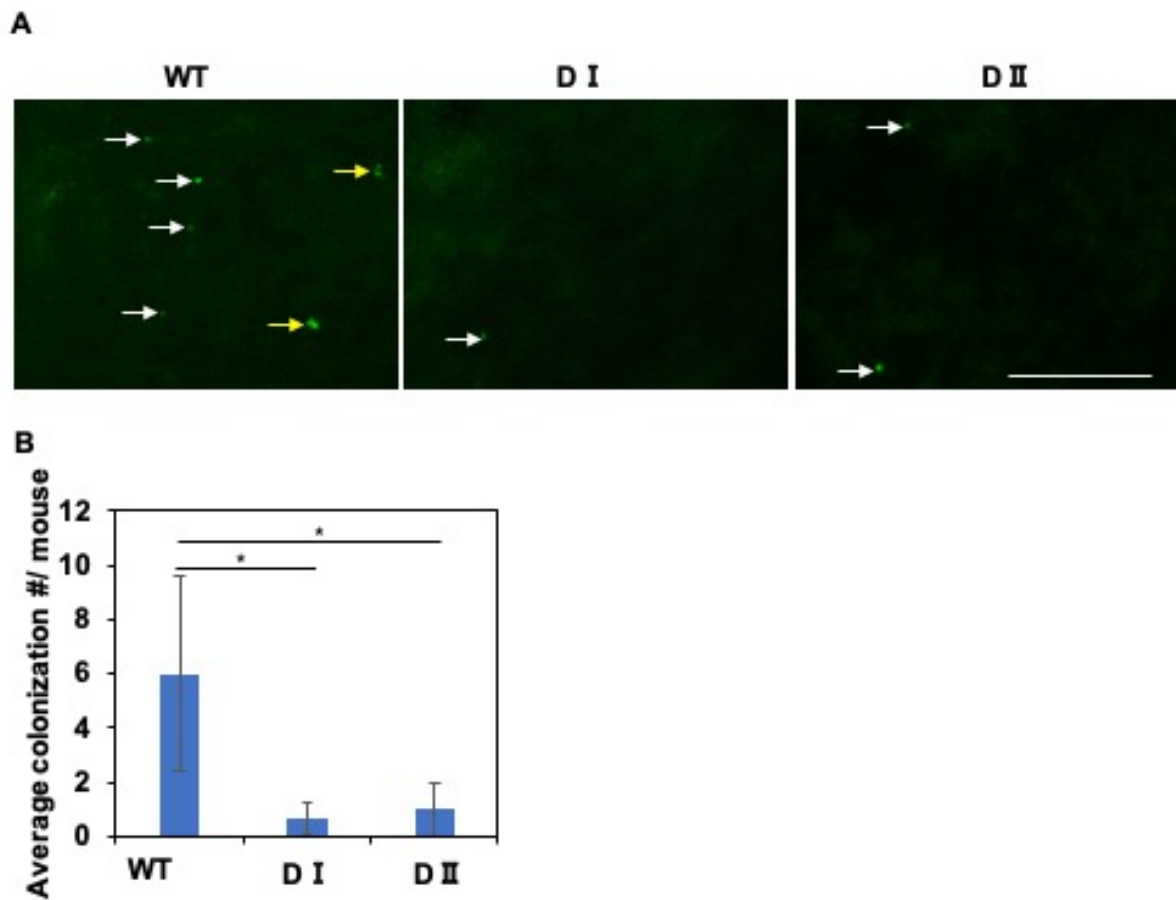


図 12 変異型 CD44 を発現させた HEK293 細胞は肺への転移が抑制される

- A. CD44 の二量体化の阻害が、肺への転移を抑制する可能性の検証。二量体化能を失った変異型 CD44 発現プラスミドである Domain I mutant と Domain II mutant を強制発現させた HEK293-GFP 細胞を、尾静脈注射によりマウスにインジェクションした。24 時間後に肺を単離し、GFP 陽性の細胞を指標に、クラスターの数を蛍光顕微鏡下で計測した。スケールバー: 100 μm 、白色矢印: シングル細胞、黄色矢印: クラスターを形成している細胞。
- B. A の結果を student's t-test を用いて統計解析した結果。* $p < 0.05$ 。

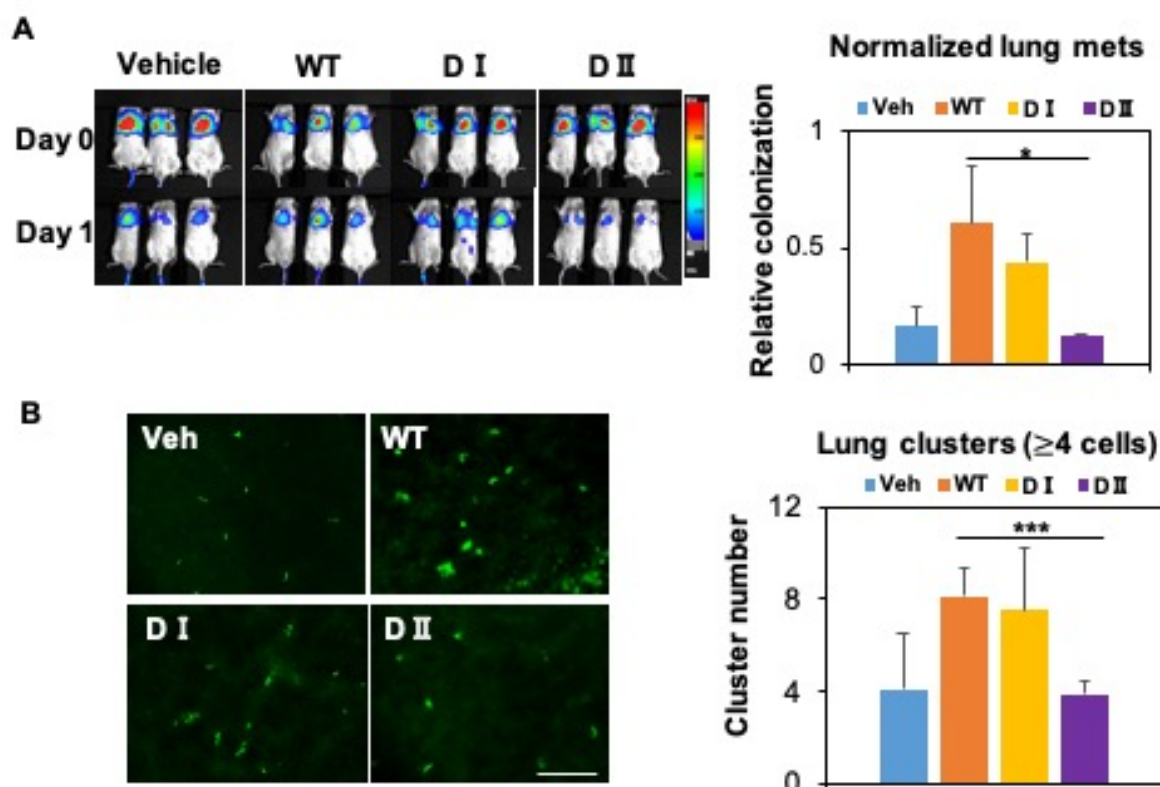


図 13: Domain II mutant を発現させた L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞は肺への転移が抑制される

- A.** CD44 の二量体化の阻害が、肺への転移を抑制する可能性の検証。(左) 二量体化能を失った変異型 CD44 発現プラスミドである Domain I mutant と Domain II mutant を強制発現させた CD44 ノックアウト L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を、尾静脈注射によりマウスにインジェクションした。その後、0 時間、および 24 時間後に生物発光イメージングを行なった。(右) 左の結果を student's t-test を用いて統計解析した結果。 $*p < 0.05$ 。
- B.** (左) 二量体化能を失った変異型 CD44 発現プラスミドである Domain I mutant と Domain II mutant を強制発現させた CD44 ノックアウト L2G-MDA-MB-231 乳癌細胞を、尾静脈注射によりマウスにインジェクションした。48 時間後に肺を単離し、GFP 陽性の細胞を指標に、4 細胞以上の細胞で形成されたクラスターの数を蛍光顕微鏡下で計測した。スケールバー: 100 μm 。(右) 左の結果を student's t-test を用いて統計解析した結果。 $*p < 0.05$ 、 $***p < 0.001$ 。

総括

総括

癌患者の血中に存在するクラスターCTCsは、シングルCTCsと比較して高い転移能を有する (Cheung *et al.* 2016; Aceto *et al.* 2014)。したがって、癌細胞のクラスター形成を抑制できれば、転移を抑制する新規治療法の開発に貢献できると期待できるが、クラスターCTCsの形成機構は不明であった。

本研究では、癌細胞がクラスターを形成する機構の一つとして、CD44 が細胞間で細胞外ドメインを介して二量体化を形成することを見出した。また、CD44 の二量体には、細胞外ドメイン I 内の 10 個のアミノ酸とドメイン II 内の 5 個のアミノ酸でカバーされる領域が必要であること、および、二量体化形成により PAK2 のリン酸化が促進されることを示した。そして、これらの結果から、本解析で認められた Ser20 のリン酸化は、細胞表面で CD44 が多量体化した結果、細胞内での PAK2 が近接することとなり、PAK2 間での相互リン酸化が引き起こされた可能性を提示するに至った。また、以前の研究より、PAK2 の Ser20 におけるリン酸化は、アポトーシスの抑制による細胞生存の促進 (Tang *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2019) および細胞の移動 (Zhou *et al.* 2003) を促進することが知られている。このことから、クラスターCTCs がシングルCTCsと比較して高い転移率を示す理由として、CD44 の二量体化に伴い細胞死の抑制と細胞移動の促進が原因であることが考えられる。さらに、本研究では CD44 ドメイン II 内に存在する 5 つのアミノ酸 (Ile-106, Tyr-155, Val-156, Gln-157, Lys-158) の変異により、CD44 の二量体化および、それに伴うクラスター形成が阻害された結果、転移も抑制されることを明らかにした。以上の結果は、これら 5 つのアミノ酸部がカバーする領域を標的とした抗体の作製により、転移を抑制する治療の応用へとつながる可能性も示す。しかし、依然として以下のような課題が残されている。

まず、CD44 と PAK2 の結合部位の同定が挙げられる。本研究では、過剰発現の系を用いることで、CD44 と PAK2 の相互作用を確認したが (図 8)、内在性の相互作用や結合部位の同定には至っていない。例えば、計算機シミュレーションを用いて結合部位を予測し、変異型 CD44 または PAK2 を作製することで結合部位を同定することができれば、これらのタンパク質の相互作用を示す強い根拠と考えられる。本研究では、CD44 の下流で PAK2 のリン酸化が促進されるという知見が得られた (図 10-B)。頭頸部癌・乳癌・T 細胞白血病において、PAK2 の過剰発現は予後不良と相関があることが報告されている (Gupta *et al.* 2018; Liu *et al.* 2019; Chung *et al.* 2019)。また、膵臓癌や卵巣癌では、CD44 の過剰発現や PAK2 のリン酸化が促進されていることが報告されている (Cheng *et al.* 2018; Siu *et al.* 2010)。PAK2 と予後不良の関係についてはこれまでその詳細なメカニズムは不明であったが、これらの癌組織では CD44 の過剰発現も認められているため、これらの癌細胞においても、CD44 の下流で生じる PAK2 のリン酸化が癌細胞の生存や移動の促進に関与し、癌細胞の

悪性化に寄与している可能性がある。以上のことから、これらのタンパク質の結合部位を同定することができれば、これらの癌細胞において、CD44 との相互作用より生じる PAK2 のリン酸化を標的とした、新たな創薬の開発にもつながると考えられる。

また、CD44 の二量体化形成に必要十分なアミノ酸の同定も課題として挙げられる。本研究では、5 つのアミノ酸 (Ile-106、Tyr-155、Val-156、Gln-157、Lys-158) がカバーする領域を標的とした抗体の作製により、転移を抑制する治療の応用へつながる可能性を示したものの (図 13)、実際の転移の過程で二量体化の阻害を狙う本戦略が、どの程度寄与するのかはさらなる検討が必要である。今後は、図 7 に示した CD44 の二量体形成に関わる可能性のある 15 個のアミノ酸と結合するアミノ酸部位の推定結果を指標に、変異型 CD44 発現プラスミドを作製することで、二量体化に必要十分なアミノ酸を同定し、同定したアミノ酸を標的とした抗体を作製することで、転移の抑制への寄与の解明が求められる。

参考文献

- Aceto N, Bardia A, Miyamoto DT, Donaldson MC, Wittner BS, Spencer JA, Yu M, Pely A, Engstrom A, Zhu H, et al. 2014. Circulating tumor cell clusters are oligoclonal precursors of breast cancer metastasis. *Cell* **158**: 1110–1122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.013>
- Adorno-Cruz V, Kibria G, Liu X, Doherty M, Junk DJ, Guan D, Hubert C, Venere M, Mulkearns-Hubert E, Sinyuk M, et al. 2015. Cancer Stem Cells: Targeting the Roots of Cancer, Seeds of Metastasis, and Sources of Therapy Resistance. *Cancer Res* **75**: 924–929. <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-14-3225>.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. 2003. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* **100**: 3983–3988. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0530291100>.
- Anderson RL, Balasas T, Callaghan J, Coombes RC, Evans J, Hall JA, Kinrade S, Jones D, Jones PS, Jones R, et al. 2019. A framework for the development of effective anti-metastatic agents. *Nat Rev Clin Oncol* **16**: 185–204. <http://dx.doi.org/10.1038/s41571-018-0134-8>.
- Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. 1990. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**: 1303–1313. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749090694A>.
- Azevedo R, Gaiteiro C, Peixoto A, Relvas-Santos M, Lima L, Santos LL, Ferreira JA. 2018. CD44 glycoprotein in cancer: A molecular conundrum hampering clinical applications. *Clin Proteomics* **15**: 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12014-018-9198-9>.
- Bajorath J, Greenfield B, Munro SB, Day AJ, Aruffo A. 1998. Identification of CD44 Residues Important for Hyaluronan Binding and Delineation of the Binding Site. *J Biol Chem* **273**: 338–343. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.273.1.338>.
- Bardia A, Haber DA. 2014. Solidifying Liquid Biopsies: Can Circulating Tumor Cell Monitoring Guide Treatment Selection in Breast Cancer? *J Clin Oncol* **32**: 3470–3471. <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2014.57.1505>.
- Barkeer S, Chugh S, Batra SK, Ponnusamy MP. 2018. Glycosylation of Cancer Stem Cells: Function in Stemness, Tumorigenesis, and Metastasis. *Neoplasia (United States)* **20**: 813–825. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.06.001>.
- Bartolazzi A, Nocks A, Aruffo A, Spring F, Stamenkovic I. 1996. Glycosylation of CD44 is implicated in CD44-mediated cell adhesion to hyaluronan. *J Cell Biol* **132**: 1199–1208. <https://rupress.org/jcb/article/132/6/1199/15225/Glycosylation-of-CD44-is-implicated-in>.
- Basakran N. 2015. CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *SAUDI Med J* **36**: 273–279. <http://www.smj.org.sa/index.php/smj/article/view/smj.2015.3.9622>.
- Blumenthal EZ. 1996. On the origin of cancer. *Med Hypotheses* **46**: 581–583. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030698779690136X>.

- Bokoch GM. 2003. Biology of the p21-Activated Kinases. *Annu Rev Biochem* **72**: 743–781. <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.biochem.72.121801.161742>.
- Bray SJ. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**: 678–689. <http://www.nature.com/articles/nrm2009>.
- Campbell HK, Salvi AM, O'Brien T, Superfine R, DeMali KA. 2019. PAK2 links cell survival to mechanotransduction and metabolism. *J Cell Biol* **218**: 1958–1971. <https://rupress.org/jcb/article/218/6/1958/61831/PAK2-links-cell-survival-to-mechanotransduction>.
- Carr J, Carr IAN. 1934. THE ORIGIN OF CANCER. *J Am Med Assoc* **102**: 214. <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1934.02750030046014>.
- Catterall JB, Jones LMH, Turner GA. 1999. Membrane protein glycosylation and CD44 content in the adhesion of human ovarian cancer cells to hyaluronan. *Clin Exp Metastasis* **17**: 583–591. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006756518500>.
- Celià-Terrassa T, Kang Y. 2018. Metastatic niche functions and therapeutic opportunities. *Nat Cell Biol* **20**: 868–877. <http://dx.doi.org/10.1038/s41556-018-0145-9>.
- Chaffer CL, Weinberg RA. 2011. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. *Science (80-)* **331**: 1559–1564. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1203543>.
- Cheng TY, Yang YC, Wang HP, Tien YW, Shun CT, Huang HY, Hsiao M, Hua KT. 2018. Pyruvate kinase M2 promotes pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis through phosphorylation and stabilization of PAK2 protein. *Oncogene* **37**: 1730–1742. <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-017-0086-y>.
- Cheung KJ, Padmanaban V, Silvestri V, Schipper K, Cohen JD, Fairchild AN, Gorin MA, Verdone JE, Pienta KJ, Bader JS, et al. 2016. Polyclonal breast cancer metastases arise from collective dissemination of keratin 14-expressing tumor cell clusters. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E854–E863. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1508541113>.
- Chung EY, Mai Y, Shah UA, Wei Y, Ishida E, Kataoka K, Ren X, Pradhan K, Bartholdy B, Wei X, et al. 2019. PAK Kinase Inhibition Has Therapeutic Activity in Novel Preclinical Models of Adult T-Cell Leukemia/Lymphoma. *Clin Cancer Res* **25**: 3589–3601. <http://clincancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/1078-0432.CCR-18-3033>.
- Coniglio SJ, Zavarella S, Symons MH. 2008. Pak1 and Pak2 Mediate Tumor Cell Invasion through Distinct Signaling Mechanisms. *Mol Cell Biol* **28**: 4162–4172. <https://mcb.asm.org/content/28/12/4162>.
- Dalchau R, Kirkley J, Fabre JW. 1980. Monoclonal antibody to a human leukocyte-specific membrane glycoprotein probably homologous to the leukocyte-common (L-C) antigen of the rat. *Eur J Immunol* **10**: 737–744. <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.1830101003>.
- Dasgupta A, Takahashi K, Cutler M, Tanabe KK. 1996. O-linked Glycosylation Modifies CD44 Adhesion to Hyaluronate in Colon Carcinoma Cells. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 110–117. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X96914758>.

- Dashzeveg NK, Taftaf R, Ramos EK, Torre-Healy L, Chumakova A, Silver DJ, Alban TJ, Sinyuk M, Thiagarajan PS, Jarrar AM, et al. 2017. New Advances and Challenges of Targeting Cancer Stem Cells. *Cancer Res* **77**: 5222–5227. <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-17-0054>.
- Denning SM, Le PT, Singer KH, Haynes BF. 1990. Antibodies against the CD44 p80, lymphocyte homing receptor molecule augment human peripheral blood T cell activation. *J Immunol* **144**: 7–15. <https://www.jimmunol.org/content/144/1/7.long>.
- Dick JE, Bonnet D. 1997. Human Acute Myeloid Leukaemia is organised as a hierarchy that originates from a primitive haematopoietic cell. *Nat Med* **3**: 730–737. <http://www.nature.com/naturemedicine>.
- Engell HC. 1959. Cancer Cells in the Blood. *Ann Surg* **149**: 457–461. <http://journals.lww.com/00000658-195904000-00001>.
- Faassen AE. 1992. A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol* **116**: 521–531. <http://www.jcb.org/cgi/doi/10.1083/jcb.116.2.521>.
- Fidler IJ. 1970. Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst* **45**: 773–82. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5513503>.
- Fidler IJ. 2003. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* **3**: 453–458. <http://www.jstor.org/stable/2562207>.
- Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. 1983. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* **304**: 30–34. <http://www.nature.com/articles/304030a0>.
- Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. 2019. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov* **9**: 176–198. <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-18-1177>.
- Gatti A, Huang Z, Tuazon PT, Traugh JA. 1999. Multisite Autophosphorylation of p21-activated Protein Kinase γ -PAK as a Function of Activation. *J Biol Chem* **274**: 8022–8028. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.274.12.8022>.
- Gay LJ, Felding-Habermann B. 2011. Contribution of platelets to tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **11**: 123–134. <http://www.nature.com/articles/nrc3004>.
- Gkountela S, Castro-Giner F, Szczerba BM, Vetter M, Landin J, Scherrer R, Krol I, Scheidmann MC, Beisel C, Stirnimann CU, et al. 2019. Circulating Tumor Cell Clustering Shapes DNA Methylation to Enable Metastasis Seeding. *Cell* **176**: 98–112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.046>.
- Goodison S, Urquidi V, Tarin D. 1999. CD44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **52**: 189–196. <http://mp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/mp.52.4.189>.

- Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zöller M, Haußmann I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* **65**: 13–24. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/009286749190403L>.
- Guo Y, Ma J, Wang J, Che X, Narula J, Bigby M, Wu M, Sy MS. 1994. Inhibition of human melanoma growth and metastasis in vivo by anti-CD44 monoclonal antibody. *Cancer Res* **54**: 1561–1565. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/54/6/1561.long>.
- Gupta A, Ajith A, Singh S, Panday RK, Samaiya A, Shukla S. 2018. PAK2–c-Myc–PKM2 axis plays an essential role in head and neck oncogenesis via regulating Warburg effect. *Cell Death Dis* **9**. <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-018-0887-0>.
- Hartmann M, Parra LM, Ruschel A, Lindner C, Morrison H, Herrlich A, Herrlich P. 2015. Inside-out Regulation of Ectodomain Cleavage of Cluster-of-Differentiation-44 (CD44) and of Neuregulin-1 Requires Substrate Dimerization. *J Biol Chem* **290**: 17041–17054. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.610204>.
- Heubner M, Wimberger P, Dahlmann B, Kasimir-Bauer S, Kimmig R, Peters J, Wohlschlaeger J, Sixt SU. 2011. The prognostic impact of circulating proteasome concentrations in patients with epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **120**: 233–238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.10.014>.
- Hiraga T, Nakamura H. 2016. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. *Oncol Lett* **12**: 2962–2969. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2016.4985>.
- Hong Y, Fang F, Zhang Q. 2016. Circulating tumor cell clusters: What we know and what we expect (Review). *Int J Oncol* **49**: 2206–2216. <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3747>.
- Huet S, Groux H, Caillou B, Valentin H, Prieur AM, Bernard A. 1989. CD44 contributes to T cell activation. *J Immunol* **143**: 798–801. <https://www.jimmunol.org/content/143/3/798.long>.
- Idzerda RL, Carter WG, Nottenburg C, Wayner EA, Gallatin WM, St John T. 1989. Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 4659–4663. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.86.12.4659>.
- Inoue K, Fry EA. 2015. Aberrant Splicing of Estrogen Receptor, HER2, and CD44 Genes in Breast Cancer. *Genet Epigenet* **7**: GEG.S35500. <http://journals.sagepub.com/doi/10.4137/GEG.S35500>.
- Isacke CM, Yarwood H. 2002. The hyaluronan receptor, CD44. *Int J Biochem Cell Biol* **34**: 718–721. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272501001662>.

- Jakobi R, Moertl E, Koeppl MA. 2001. p21-activated Protein Kinase γ -PAK Suppresses Programmed Cell Death of BALB3T3 Fibroblasts. *J Biol Chem* **276**: 16624–16634. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M007753200>.
- Jalkanen S, Jalkanen M. 1992. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol* **116**: 817–825. <https://rupress.org/jcb/article/116/3/817/56039/Lymphocyte-CD44-binds-the-COOHterminal>.
- Katoh S. 1995. Glycosylation of CD44 negatively regulates its recognition of hyaluronan. *J Exp Med* **182**: 419–429. <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.182.2.419>.
- Lau WM, Teng E, Chong HS, Lopez KAP, Tay AYL, Salto-Tellez M, Shabbir A, So JBY, Chan SL. 2014. CD44v8-10 Is a Cancer-Specific Marker for Gastric Cancer Stem Cells. *Cancer Res* **74**: 2630–2641. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-13-2309>.
- Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu M-F, Hilsenbeck SG, Pavlick A, Zhang X, Chamness GC, et al. 2008. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI J Natl Cancer Inst* **100**: 672–679. <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djn123>.
- Liotta L. 1986a. Biochemical Interactions of Tumor Cells with the Basement Membrane. *Annu Rev Biochem* **55**: 1037–1057. <http://biochem.annualreviews.org/cgi/doi/10.1146/annurev.biochem.55.1.1037>.
- Liotta LA. 1986b. Tumor invasion and metastases--role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* **46**: 1–7. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/46/1/1.long>.
- Liotta LA, Saidel MG, Kleinerman J. 1976. The significance of hematogenous tumor cell clumps in the metastatic process. *Cancer Res* **36**: 889–94. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/36/3/889.long>.
- Liu D, Sy MS. 1997. Phorbol myristate acetate stimulates the dimerization of CD44 involving a cysteine in the transmembrane domain. *J Immunol* **159**: 2702–11. <https://www.jimmunol.org/content/159/6/2702.long>.
- Liu X, Taftaf R, Kawaguchi M, Chang Y-F, Chen W, Entenberg D, Zhang Y, Gerratana L, Huang S, Patel DB, et al. 2019. Homophilic CD44 Interactions Mediate Tumor Cell Aggregation and Polyclonal Metastasis in Patient-Derived Breast Cancer Models. *Cancer Discov* **9**: 96–113. <http://cancerdiscovery.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/2159-8290.CD-18-0065>.
- Louderbough JM V., Schroeder JA. 2011. Understanding the Dual Nature of CD44 in Breast Cancer Progression. *Mol Cancer Res* **9**: 1573–1586. <http://mcr.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1541-7786.MCR-11-0156>.

- Marlin JW, Eaton A, Montano GT, Chang YWE, Jakobi R. 2009. Elevated p21-Activated Kinase 2 Activity Results in Anchorage-Independent Growth and Resistance to Anticancer Drug-Induced Cell Death. *Neoplasia* **11**: 286–297. <http://dx.doi.org/10.1593/neo.81446>.
- Matsui T, Thitamadee S, Murata T, Kakinuma H, Nabetani T, Hirabayashi Y, Hirate Y, Okamoto H, Bessho Y. 2011. Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organogenesis. *Proc Natl Acad Sci* **108**: 9881–9886. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017248108>.
- Moore GE, Sandberg AA, Watne AL. 1960. The comparative size and structure of tumor cells and clumps in the blood, bone marrow, and tumor imprints. *Cancer* **13**: 111–117. <http://doi.wiley.com/10.1002/10970142%28196001%2F02%2913%3A1%3C111%3A%3AAID-CNCR2820130121%3E3.0.CO%3B2-Y>.
- Morrison R, Schleicher SM, Sun Y, Niemann KJ, Kim S, Spratt DE, Chung CH, Lu B. 2011. Targeting the Mechanisms of Resistance to Chemotherapy and Radiotherapy with the Cancer Stem Cell Hypothesis. *J Oncol* **2011**: 1–13. <http://www.hindawi.com/journals/jo/2011/941876/>.
- Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med* **178**: 449–460. <https://rupress.org/jem/article/178/2/449/50282/PECAM1-is-required-for-transendothelial-migration>.
- Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. 1997. CD44: Structure, Function and Association with the Malignant Process. pp. 241–319. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065230X08601013>.
- Natsuaki Y, Egawa G, Nakamizo S, Ono S, Hanakawa S, Okada T, Kusuba N, Otsuka A, Kitoh A, Honda T, et al. 2014. Perivascular leukocyte clusters are essential for efficient activation of effector T cells in the skin. *Nat Immunol* **15**: 1064–1069. <http://www.nature.com/articles/ni.2992>.
- Neophytou C, Boutsikos P, Papageorgis P. 2018. Molecular Mechanisms and Emerging Therapeutic Targets of Triple-Negative Breast Cancer Metastasis. *Front Oncol* **8**. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2018.00031/full>.
- Nottenburg C, Rees G, St John T. 1989. Isolation of mouse CD44 cDNA: structural features are distinct from the primate cDNA. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 8521–8525. <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.86.21.8521>.
- Okamoto I, Kawano Y, Murakami D, Sasayama T, Araki N, Miki T, Wong AJ, Saya H. 2001. Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway. *J Cell Biol* **155**: 755–762. <https://rupress.org/jcb/article/155/5/755/32435/Proteolytic-release-of-CD44-intracellular-domain>.

- Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, Sasaki J, Nakao M, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Nakajima M, Saya H. 1999. CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* **18**: 1435–1446. <http://www.nature.com/articles/1202447>.
- Paget S. 1889. THE DISTRIBUTION OF SECONDARY GROWTHS IN CANCER OF THE BREAST. *Lancet* **133**: 571–573. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673600499150>.
- Perrais M, Chen X, Perez-Moreno M, Gumbiner BM. 2007. E-Cadherin Homophilic Ligation Inhibits Cell Growth and Epidermal Growth Factor Receptor Signaling Independently of Other Cell Interactions ed. J. Schwarzbauer. *Mol Biol Cell* **18**: 2013–2025. <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e06-04-0348>.
- Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. 2003. CD44: From adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 33–45. <http://www.nature.com/articles/nrm1004>.
- Prochazka L, Tesarik R, Turanek J. 2014. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell Signal* **26**: 2234–2239. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.011>.
- Ries A, Goldberg JL, Grimpe B. 2007. A novel biological function for CD44 in axon growth of retinal ganglion cells identified by a bioinformatics approach. *J Neurochem* **103**: 1491–1505. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1471-4159.2007.04858.x>.
- Rostami P, Kashaninejad N, Moshksayan K, Saidi MS, Firoozabadi B, Nguyen NT. 2019. Novel approaches in cancer management with circulating tumor cell clusters. *J Sci Adv Mater Devices* **4**: 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2019.01.006>.
- Salo T, Liotta LA, Keski-Oja J, Turpeenniemi-Hujanen T, Tryggvason K. 1982. Secretion of basement membrane collagen degrading enzyme and plasminogen activator by transformed cells – role in metastasis. *Int J Cancer* **30**: 669–673. <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.2910300520>.
- Salo T, Liotta LA, Tryggvason K. 1983. Purification and characterization of a murine basement membrane collagen-degrading enzyme secreted by metastatic tumor cells. *J Biol Chem* **258**: 3058–63. <https://www.jbc.org/content/258/5/3058.long>.
- Schmits R, Filmus J, Gerwin N, Senaldi G, Kiefer F, Kundig T, Wakeham A, Shahinian A, Catzavelos C, Rak J, et al. 1997. CD44 Regulates Hematopoietic Progenitor Distribution, Granuloma Formation, and Tumorigenicity. *Blood* **90**: 2217–2233. <https://ashpublications.org/blood/article/90/6/2217/103950/CD44-Regulates-Hematopoietic-Progenitor>.
- Schroeder A, Heller DA, Winslow MM, Dahlman JE, Pratt GW, Langer R, Jacks T, Anderson DG. 2012. Treating metastatic cancer with nanotechnology. *Nat Rev Cancer* **12**: 39–50. <http://www.nature.com/articles/nrc3180>.

- Sen Y, Yip G. 2011. CD44 (CD44 molecule (Indian blood group)). *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol* **14**: 95–102. <http://hdl.handle.net/2042/44676>.
- Siu MKY, Wong ESY, Chan HY, Kong DSH, Woo NWS, Tam KF, Ngan HYS, Chan QKY, Chan DCW, Chan KYK, et al. 2010. Differential expression and phosphorylation of Pak1 and Pak2 in ovarian cancer: effects on prognosis and cell invasion. *Int J Cancer* **127**: 21–31. <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25005>.
- Sleeman J, Rudy W, Hofmann M, Moll J, Herrlich P, Ponta H. 1996a. Regulated clustering of variant CD44 proteins increases their hyaluronate binding capacity. *J Cell Biol* **135**: 1139–1150. <https://rupress.org/jcb/article/135/4/1139/56554/Regulated-clustering-of-variant-CD44-proteins>.
- Sleeman JP, Arming S, Moll JF, Hekele A, Rudy W, Sherman LS, Kreil G, Ponta H, Herrlich P. 1996b. Hyaluronate-independent metastatic behavior of CD44 variant-expressing pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* **56**: 3134–41. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/56/13/3134.long>
- Slomiany MG, Dai L, Tolliver LB, Grass GD, Zeng Y, Toole BP. 2009. Inhibition of Functional Hyaluronan-CD44 Interactions in CD133-positive Primary Human Ovarian Carcinoma Cells by Small Hyaluronan Oligosaccharides. *Clin Cancer Res* **15**: 7593–7601. <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-09-2317>.
- Smerage JB, Hayes DF. 2006. The measurement and therapeutic implications of circulating tumour cells in breast cancer. *Br J Cancer* **94**: 8–12. <http://www.nature.com/articles/6602871>.
- Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. 1989. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* **56**: 1057–1062. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0092867489906387>.
- Steeg PS. 2016. Targeting metastasis. *Nat Rev Cancer* **16**: 201–218. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.25>.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. 1988. Evidence for a Novel Gene Associated With Low Tumor Metastatic Potential. *JNCI J Natl Cancer Inst* **80**: 200–204. <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/80.3.200>.
- Sy MS, Guo YJ, Stamenkovic I. 1991. Distinct effects of two CD44 isoforms on tumor growth in vivo. *J Exp Med* **174**: 859–866. <https://rupress.org/jem/article/174/4/859/24291/Distinct-effects-of-two-CD44-isoforms-on-tumor>.
- Takahashi M. 1915. An experimental study of metastasis. *J Pathol Bacteriol* **20**: 1–13. <http://doi.wiley.com/10.1002/path.1700200102>.

- Talmadge JE, Fidler IJ. 2010. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Res* **70**: 5649–5669. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-10-1040>.
- Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, et al. 2012. Modulation of Glucose Metabolism by CD44 Contributes to Antioxidant Status and Drug Resistance in Cancer Cells. *Cancer Res* **72**: 1438–1448. <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-11-3024>.
- Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. 1993. Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet* **341**: 725–726. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0140673693904908>.
- Tang Y, Zhou H, Chen A, Pittman RN, Field J. 2000. The Akt Proto-oncogene Links Ras to Pak and Cell Survival Signals. *J Biol Chem* **275**: 9106–9109. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.275.13.9106>.
- Teriete P, Banerji S, Noble M, Blundell CD, Wright AJ, Pickford AR, Lowe E, Mahoney DJ, Tammi MI, Kahmann JD, et al. 2004. Structure of the Regulatory Hyaluronan Binding Domain in the Inflammatory Leukocyte Homing Receptor CD44. *Mol Cell* **13**: 483–496. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1097276504000802>.
- Thorne RF. 2003. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in coordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci* **117**: 373–380. <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.00954>.
- Toledo-Guzmán ME, Bigoni-Ordóñez GD, Hernández MI, Ortiz-Sánchez E. 2018. Cancer stem cell impact on clinical oncology. *World J Stem Cells* **10**: 183–195. <https://www.wjgnet.com/1948-0210/full/v10/i12/183.htm>.
- Toole BP. 2004. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **4**: 528–539. <http://www.nature.com/articles/nrc1391>.
- Umer M, Vaidyanathan R, Nguyen NT, Shiddiky MJA. 2018. Circulating tumor microemboli: Progress in molecular understanding and enrichment technologies. *Biotechnol Adv* **36**: 1367–1389. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.05.002>.
- Underhill CB, Green SJ, Comoglio PM, Tarone G. 1987. The hyaluronate receptor is identical to a glycoprotein of Mr 85,000 (gp85) as shown by a monoclonal antibody that interferes with binding activity. *J Biol Chem* **262**: 13142–6. <https://www.jbc.org/content/262/27/13142.long>.
- Underhill CB, Toole BP. 1980. Physical characteristics of hyaluronate binding to the surface of simian virus 40-transformed 3T3 cells. *J Biol Chem* **255**: 4544–9. <https://www.jbc.org/content/255/10/4544.long>.

- Varelas X, Bouchie MP, Kukuruzinska MA. 2014. Protein N-glycosylation in oral cancer: Dysregulated cellular networks among DPAGT1, E-cadherin adhesion and canonical Wnt signaling. *Glycobiology* **24**: 579–591. <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M114.563585>.
- VIRCHOW R. 2009. As Based upon Physiological and Pathological Histology. *Nutr Rev* **47**: 23–25. <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/003591574603901219>.
- Wang Y, Zhou Y, Hu Z. 2017. The functions of circulating tumor cells in early diagnosis and surveillance during cancer advancement. *J Transl Intern Med* **5**: 135–138. <https://content.sciendo.com/view/journals/jtim/5/3/article-p135.xml>.
- Xia P, Xu X-Y. 2016. Prognostic significance of CD44 in human colon cancer and gastric cancer: Evidence from bioinformatic analyses. *Oncotarget* **7**: 45538–45546. <https://www.oncotarget.com/lookup/doi/10.18632/oncotarget.9998>.
- Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, et al. 2012. Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun* **3**: 883. <http://www.nature.com/articles/ncomms1892>.
- Yu M, Bardia A, Aceto N, Bersani F, Madden MW, Donaldson MC, Desai R, Zhu H, Comaills V, Zheng Z, et al. 2014. Ex vivo culture of circulating breast tumor cells for individualized testing of drug susceptibility. *Science (80-)* **345**: 216–220. <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.1253533>.
- Yurdagul A, Chen J, Funk SD, Albert P, Kevil CG, Orr AW. 2013. Altered nitric oxide production mediates matrix-specific PAK2 and NF-κB activation by flow ed. M.H. Ginsberg. *Mol Biol Cell* **24**: 398–408. <https://www.molbiolcell.org/doi/10.1091/mbc.e12-07-0513>.
- Zhang H, Brown RL, Wei Y, Zhao P, Liu S, Liu X, Deng Y, Hu X, Zhang J, Gao XD, et al. 2019. CD44 splice isoform switching determines breast cancer stem cell state. *Genes Dev* **33**: 166–179. <http://genesdev.cshlp.org/lookup/doi/10.1101/gad.319889.118>.
- Zhou DF, Ding JF, Picker LJ, Bargatze RF, Butcher EC, Goeddel D V. 1989. Molecular cloning and expression of Pgp-1. The mouse homolog of the human H-CAM (Hermes) lymphocyte homing receptor. *J Immunol* **143**: 3390–5. <https://ohsu.pure.elsevier.com/en/publications/molecular-cloning-and-expression-of-pgp-1-the-mouse-homology-of-t-2>.
- Zhou G-L, Zhuo Y, King CC, Fryer BH, Bokoch GM, Field J. 2003. Akt Phosphorylation of Serine 21 on Pak1 Modulates Nck Binding and Cell Migration. *Mol Cell Biol* **23**: 8058–8069. <https://mcb.asm.org/content/23/22/8058>.

- Zhou X, Tan M, Nyati MK, Zhao Y, Wang G, Sun Y. 2016. Blockage of neddylation modification stimulates tumor sphere formation in vitro and stem cell differentiation and wound healing in vivo. *Proc Natl Acad Sci* **113**: E2935–E2944. <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.1522367113>.
- Zöller M. 2011. CD44: Can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat Rev Cancer* **11**: 254–267. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3023>.
- 厚生労働省. 平成30年(2018) 人口動態統計月報年計(概数)の状況p10
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai18/dl/gaikyou30-190626.pdf>

謝辞

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Madoka Kwaguchi, Nurmaa Dashzeveg, Yue Cao, Yuzhi Jia, Xia Liu, Yang Shen, Huiping Liu.

Extracellular Domains I-II of cell-surface glycoprotein CD44 mediate its *trans*-homophilic dimerization and tumor cluster aggregation.

Journal of Biological Chemistry, 295(9), 2640-2649, 2020

本研究を行うにあたり、多くの方々のご指導、ご尽力がありました。心から感謝申し上げます。学位論文をまとめるにあたり、本学生命科学研究科 高次生命科学専攻 高次生体統御学分野 垣塚彰 教授には終始暖かいご指導、ご鞭撻をいただきました。謹んでお礼申し上げます。在学中、中間報告の機会などで貴重なご指導、ご助言をいただきました本学生命科学研究科 福澤秀哉 教授、上村匡 教授に心より感謝申し上げます。

実験の実施にあたっては、Northwestern University Feinberg School of Medicine Pharmacology and Medicine, Huiping Liu 准教授、Xia Liu 助教、Nurmaa Dashzeveg 博士、Yuzhi Jia 助教、Dhwani B. Patel さんにご協力いただいたことをここに記すとともに、厚く御礼申し上げます。また、タンパク質の構造解析に関して、Texas A&M University, Electrical and Computer Engineering、Yang Shen 博士、Yue Cao さんにご協力いただきました。厚く御礼申し上げます。

在学中には、本学生命科学研究科 高次生命科学専攻 高次生体統御学分野の研究室構成員の皆様、同期の仲間、そして、修士課程からご指導いただきました奈良先端科学技術大学院大学 佐藤匠徳 元教授、赤沼啓志 元助教、高田智夫 元特任助教、浦山恭次 元特任助教、小林未明 助教、には様々な面で研究を支援していただきました。深く感謝致します。また、公私にわたり、海外での研究生活を様々な形で支えて頂きました Northwestern University Feinberg School of Medicine Pharmacology and Medicine の研究室構成員の皆様に心から感謝申し上げます。

最後に、研究生活を送るにあたり経済的にも精神的にも支えてくれた家族、友人に心より感謝申し上げます。特に夫 河口智也はいつも一番の味方でいてくれました。これまで本当にありがとうございました。