

CD44 の新規小胞体調節機能の癌における役割の解明

大阪公立大学 大学院医学研究科 病態生理学
高杉 征樹

研究の背景と目的

社会の超高齢化が進む先進諸国において、代表的な加齢性疾患であるがんに対する効果的な治療法の開発が一層強く求められている。特に、がんの抗がん剤に対する治療抵抗性を規定するメカニズムを明らかにする事は進行がんの克服に向けた重要な課題である。我々は最近、発がん抵抗性齧歯類として知られるハダカデバネズミにおいて、治療抵抗性を示すがん幹細胞や予後不良がんが発現が高い事が知られるCD44とそのリガンドであるヒアルロン酸との相互作用によりp53シグナルが一部抑制される事で細胞のストレス抵抗性が上昇している事を報告した (Takasugi *et al.*, 2020, *Nat Commun*)。これは、ハダカデバネズミ細胞の産生するヒアルロン酸分子のポリマー長が他の哺乳動物種よりも大きいために見られる現象で、巨大なヒアルロン酸がCD44同士のクラスタリングを抑制するために引き起こされるものと考えられる。また、ハダカデバネズミ細胞においては高分子ヒアルロン酸のCD44に対する結合は独特の細胞増殖停止応答 (Early contact inhibition) を引き起こす (Tian *et al.*, 2013, *Nature*)。このようなCD44の機能は、ヒトやマウスにおいては認められない。しかしながら短命哺乳動物種と長命哺乳動物種の種間比較トランスクリプトーム解析 (Takasugi *et al.*, 2023, *Nucleic Acids Res*) により、オリゴデンドロサイト前駆細胞や線維芽細胞、皮膚、肝臓において、CD44の発現レベルが種の最大寿命と相関を示す事が明らかとなった。ヒトやマウスにおいて、CD44は治療抵抗性がんや予後不良がんが発現が高く、またその主な機能としてMAPKパスウェイの活性化など、がん細胞の成長を促進こそすれ寿命の延長に寄与するとは考えられていない役割を果たす事が知られている。CD44ががんにおいて個体の生存に有害な作用を発揮する一方で、最大寿命の延長、ないしは個体の恒常性維持にも寄与しているならば、その二面性を支配するCD44の機能とは何なのであろうか？この問いに答え、がんにおいて重要な役割を果たすCD44の知られざる機能を明らかにし、がんの治療法開発に寄与する事を目指して本研究を行なった。

結果

我々の種間比較トランスクリプトーム解析により、CD44の発現レベルがオリゴデンドロサイト前駆細胞や線維芽細胞といった正常細胞において、哺乳動物種の最大寿命と正の相関を示す事が明らかとなった。そこで、ハダカデバネズミ由来のオリゴデンドロサイト前駆細胞とヒト線維芽細胞 (IMR90) におけるCD44の役割を包括的に調べるため、それぞれの種においてコントロール細胞と2種類のCD44ノックダウン細胞 (ノックダウンのターゲット配列が異なる) を用意し、CD44依存的な発現を示す遺伝子群を抽出・解析した。その結果、両細胞種において、小胞体ストレス応答遺伝子の発現低下が、CD44のノックダウンにより引き起こされる主要な影響である事が認められた。小胞体ストレス応答遺伝子の発現を司る上流制御因子としては、XBP1、PERK、そしてATF6が知られており、CD44をノックダウンした細胞ではATF6標的遺伝子の発現が低下していた。さらに、広範な組織、細胞種の大量の遺伝子発現データを元に作成されたGene Co-Expression Databaseを用いた解析から、CD44と共発現する遺

伝子と、ATF6と共発現する遺伝子の間に有意な重複を認めた。このような関係性は、CD44とXBP1、並びにCD44とATF4 (PERK下流で活性化される転写因子)の間には認められなかった。したがって、ATF6は広範な細胞種においてATF6標的遺伝子の発現レベルに寄与しているものと考えられる。

ATF6は、PERK、そしてXBP1の制御を司るIRE1と同様に小胞体膜に存在するタンパク質であり、小胞体内腔に正常に折り畳まれていないタンパク質が蓄積すると活性化し、下流遺伝子の発現を惹起する事が知られている。なお、これらの制御因子は特別外部からのストレスがない状態でも、一定の恒常活性を発揮し、恒常性維持に寄与している事が報告されている。ATF6の場合、活性化に際してはまずゴルジ体に移行し、そこでSite-1プロテアーゼ (S1P)による切断を受け、N末端部分が細胞質に放出され、核内に以降し転写因子として機能する。

CD44を抑制した細胞では、非ストレス存在下におけるATF6のゴルジ体局在レベルが減少していた。したがって、CD44はATF6の恒常活性を上昇させる事でその標的遺伝子の発現に寄与しているものと考えられる。機能的には、CD44を抑制したヒト線維芽細胞、ハダカデバネズミオリゴデンドロサイト前駆細胞、そしてヒト骨肉腫細胞U2OSでは小胞体ストレス誘導剤であるツニカマイシンによる細胞死の誘導がより高いレベルで認められた。逆に、CD44を過剰発現させたマウスオリゴデンドロサイト前駆細胞はツニカマイシン処理に対する抵抗性の上昇が認められた。ヒト線維芽細胞において、ATF6の過剰発現はCD44ノックアウトにより引き起こされるツニカマイシン感受性の上昇を抑制した。また、ATF6をsiRNAや阻害剤により抑制した細胞では、CD44をノックダウンしてもツニカマイシン感受性に変化が認められなかった。これらの結果より、CD44はATF6を介して細胞の小胞体ストレス抵抗性を上昇させる働きを持つ事が示された。

次に、CD44がどのようにして小胞体ストレス抵抗性を制御しているのかを調べるため、まずはCD44のリガンドであるヒアルロン酸がCD44の同機能に関わっているかを解析した。まずヒアルロン酸を培地に添加し、細胞の小胞体ストレス抵抗性に対する影響を調べたところ、用いるヒアルロン酸のポリマー長に依らず影響は認められなかった。ヒアルロン酸分解酵素を培地に添加してヒアルロン酸を除去したり、CD44の中和抗体を添加しても細胞の小胞体ストレス抵抗性には影響が認められなかった。これらの結果は、CD44による小胞体ストレス抵抗性の制御において、細胞膜表面におけるCD44のリガンド結合は重要ではないという事を示している。

そこでCD44が細胞内のどの領域において小胞体ストレス制御系と結びついているかを調べるため、CD44が細胞内で結合しているタンパク質を共免疫沈降と質量分析により解析した。その結果、CD44は小胞体ストレス応答に関わる小胞体タンパク質、特にATF6の制御に関わる小胞体タンパク質と相互作用している事が明らかとなった。共焦点顕微鏡解析により、CD44が小胞体マーカータンパク質と共局在を示す事も明らかとなり、CD44が小胞体の中からATF6並びに小胞体ストレス抵抗性を制御している可能性が浮上した。

CD44が小胞体に及ぼす影響をトランスクリプトーム以外の観点からも調べていくため、コントロール細胞とCD44ノックダウン細胞の小胞体のプロテオーム解析を行なったところ、CD44ノックダウン細胞では小胞体のタンパク質組成にも変化が生じている事が明らかとなった。また、コントロール細胞とCD44ノックダウン細胞の小胞体膜タンパクを強力な界面活性剤であるSDSを2%含むlysis bufferで回収した場合にはATF6を含む小胞体膜タンパク質のレベルに差が認められなかったものの、比較的弱い界面活性剤であるTriton X-100を1%含むlysis bufferで回収した場合にはCD44ノックダウン細胞においてATF6を含む小胞体膜タンパク質のレベルが高くなっている事が示された。すなわちCD44は小胞体膜タンパク質の可溶性を減少させており、これはCD44が小胞体膜の性質を変化させている事を意味している。

実は最近、ATF6が小胞体内のミスフォールドタンパク質の蓄積に際して活性化される以外にも、小胞体膜の脂質組成が変化するだけでも活性の変動を示す事が報告されている (Tam *et al.*, 2018, *Dev Cell*)。ATF6の小胞体内腔部分に位置する567番目のチロシンをアスパラギンに変異させたATF6 Y567Nはミスフォールドタンパク質の蓄積に対する応答能を喪失し、小胞体膜脂質組成の変化に対する応答能は維持している。一方、ATF6の膜

貫通領域に位置する392番目のチロシンをシステインに変異させたATF6 Y392Cは小胞体膜脂質組成の変化に対する応答能を喪失し、スフォールドタンパク質の蓄積に対する応答能は維持している。そこで、CD44が小胞体膜の性質を変化させる事で細胞の小胞体ストレス抵抗性を向上させている可能性を検討するため、ヒト骨肉腫細胞U2OSにおいてCRISPRを用いてATF6をノックアウトし、そこに野生型のATF6、ATF6 Y567N、もしくはATF6 Y392Cを導入した。その結果、野生型のATF6とATF6 Y567Nを導入した細胞においてはCD44のノックダウンによる小胞体ストレス抵抗性の低下が認められたものの、ATF6 Y392Cを導入した細胞ではCD44をノックダウンしても小胞体ストレス抵抗性に影響が認められなかった。したがって、CD44は小胞体膜の性質を変化させる事で細胞の小胞体ストレス抵抗性を上昇させているものと考えられる。以上の成果は今年 *Cell Reports* 誌に発表した (Takasugi *et al.*, 2023, *Cell Rep*)。

考察

CD44の発現レベルは様々な種類のがんにおいて予後の悪さと相関する事が報告されており、その代表的な原因はCD44の下流シグナルにおいて細胞の生存を促すMAPKやPI3Kパスウェイが正に制御されているためと考えられてきた。しかし、本研究の結果は、CD44はMAPK/PI3Kパスウェイよりもむしろ小胞体ストレス応答制御因子ATF6を制御する事で細胞のストレス抵抗性を高めている事を示している。本研究は、がんにおいて重要な働きを示すと考えられ、がん幹細胞に至ってはマーカーとすらされているCD44の、基本的な機能の一側面を明らかにするものである。がんに限らず、今後CD44の働きを調べる上では細胞表面上におけるCD44の役割だけでなく、小胞体におけるCD44の役割についても検討を行う事が重要となってくる。特に、CD44をがん治療の標的として検討する際には、従来試みられていたように中和抗体を用いては小胞体内に隠れたCD44の細胞生存促進作用を抑制する事はできない点について留意をする必要がある。CD44の発現レベルが哺乳動物種の最大寿命と相関する事を踏まえれば、CD44による小胞体ストレス抵抗性の上昇は恒常性維持を促進し、(がんの予後の悪さに関わりうる事を度外視すれば) 寿命の延長に寄与している可能性がある。したがって本研究は、生物の加齢に伴う機能低下とその抑制法の理解・解明にも寄与するものと考えられる。

本研究のlimitationとしては、CD44がどのようにして、具体的にどのように小胞体膜を変化させているのかという点と、CD44の小胞体局在がどのように制御されているのかについて明らかにされていない点が挙げられる。もっとも、CD44を含め膜タンパク質は基本的に小胞体を経由するため、CD44が細胞表面に運ばれる際に一過的に小胞体に存在しているだけの可能性は否定できない。これらの点を明らかにしていく事は、CD44とその関連シグナルを標的としたがんの抑制方法を開発する上で基盤となる情報であり、今後の重要な課題であると考えられる。