

# 論文内容要旨

Hypoxia-mediated CD24 expression is correlated  
with gastric cancer aggressiveness by promoting  
cell migration and invasion

(低酸素によって促進される CD24 の発現は胃癌細胞の運動・浸潤能亢進因子である)

Cancer Science, 2014, in press.

主指導教員：大段 秀樹 教授  
(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)  
副指導教員：越智 光夫 教授  
(統合健康科学部門 整形外科学)  
副指導教員：田代 裕尊 准教授  
(応用生命科学部門 消化器・移植外科学)

藤國 宣明

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

## 【目的】

CD24は膜結合型の糖蛋白質で、ヒト正常組織では、Bリンパ球前駆細胞の膜表面に発現しており、P-selectinのリガンドとして機能し、上皮細胞や血小板への接着分子として知られている。悪性新生物においては、乳癌、肝細胞癌、膀胱癌などの癌種で、その発現の有無と癌転移や癌幹細胞性との関連性が報告されている。このようにCD24の重要性を報告した多くの研究があるにもかかわらず、胃癌領域においては、CD24の果たす役割や発現誘導機序については未だ十分に検討されているとは言えない。我々は、胃癌細胞の幹細胞性因子を探索する過程で、CD24の胃癌細胞における特異な発現様式を見出し、その機能解析や発現誘導機序について解析を行った。

## 【方法】

胃癌患者の腹水中から採取した胃癌細胞およびヒト胃癌細胞株を用いて、これまで複数の癌種で報告のある癌幹細胞マーカーの発現をフローサイトメトリーを用いて検討した。次にCD24の発現の有無による胃癌細胞の特性について検討した。続いて、RNAi法を用いてCD24の発現を抑制した胃癌細胞の特性について検討した。CD24発現誘導機序の検討では、胃癌細胞を低酸素環境に曝露し、CD24の発現をフローサイトメトリーを用いて評価し、さらにRNAi法を用いてHIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$ の発現を抑制して、CD24の発現変化を検討した。また、当科での胃癌根治手術症例119例を対象として免疫組織学的解析を行い、CD24と臨床病理学的因子や予後との関連性を検討した。さらにCD24とHIF-1 $\alpha$ およびHIF-2 $\alpha$ の発現の関連についても検討した。

## 【結果】

各種胃癌細胞での癌幹細胞マーカーの発現を検討したところ、CD44、CD133は均一な発現様式であったが、CD24は陽性細胞と陰性細胞の混在型あるいは陰性型に分類され、多様性を規定する因子の一つである可能性が示唆された。次にCD24陽性細胞と陰性細胞の特性を検討したところ、通常酸素環境下でCD24陰性細胞を長期継代培養すると、CD24陽性細胞割合は、TMK-1細胞で約1%から62%と増加し、44As3細胞でも約1%から67%と増加し定常状態に達した。次に、CD24が胃癌細胞の悪性度に及ぼす影響について解析したところ、CD24陽性胃癌細胞は陰性細胞と比較して、細胞増殖能には差を認めなかったが、細胞接着能、運動能、浸潤能が有意に高かった。さらにCD24発現を抑制すると、細胞接着能、運動能、浸潤能が維持されず、CD24は胃癌細胞の浸潤能維持に重要な因子であると考えられた。次にCD24の発現誘導機序について検討した。CD24のプロモーター領域にはHypoxia Responsive Elementが複数カ所存在することから、HIFが胃癌細胞のCD24発現を制御するとの仮説を立てた。そこで胃癌細胞を低酸素環境(O<sub>2</sub> 1%)に曝露すると、まずHIF-1 $\alpha$ の発現が24時間以内に安定化し、その後HIF-2 $\alpha$ の発現が安定化した。癌幹細胞マーカーについてはCD44やCD133の発現には変化を認めなかったが、CD24陽性割合

は経時的に 63.0%から 86.9%に増加した( $p < 0.001$ )。また、低酸素環境下で運動能、浸潤能もそれぞれ約 1.4 倍、1.3 倍に亢進した( $p = 0.025$ ,  $p = 0.042$ )。さらに HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  の発現を抑制すると、低酸素で誘導された CD24 発現が有意に抑制された。このことから胃癌細胞は低酸素環境下で HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  を介して CD24 の発現が亢進し悪性度が増強するものと考えられた。臨床病理学的検討では、CD24 陽性は 61 例(51%)、HIF-1 $\alpha$  陽性 25 例(21%)、HIF-2 $\alpha$  陽性 45 例(38%)に認めた。CD24 発現は組織型とは相関を認めなかったが、進行病期、腫瘍深達度、リンパ節転移、脈管侵襲と有意な相関を認めた( $p = 0.044$ ,  $p = 0.036$ ,  $p = 0.045$ ,  $p = 0.004$ )。また、組織型に関わらず CD24 は胃癌の予後規定因子になることを確認した。CD24 と HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$  の発現は有意な相関関係があった( $p < 0.001$ ,  $p = 0.002$ )。これらの結果から、CD24 は胃癌の悪性化マーカーであると同時に予後規定因子となり得ると考えられた。

#### 【結語】

CD24 は胃癌の多様性を規定するマーカーとしてだけでなく、胃癌細胞の悪性化のマーカーになり得るものと考えられた。CD24 は低酸素によって安定化する HIF-1 $\alpha$  や HIF-2 $\alpha$  により発現誘導され胃癌細胞の浸潤能を亢進すると考えられた。CD24 やそれを制御する HIF-1 $\alpha$  や HIF-2 $\alpha$  を標的とした治療戦略は、高度進行胃癌における新たな選択枝の一つとなる可能性があると考ええる。