

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) TGF- $\beta$  シグナル制御因子 CD109 を標的とした抗体治療薬の開発研究  
(英語) Development of therapeutic antibodies targeting CD109, a regulator of TGF- $\beta$  signaling
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科総合医学専攻  
教授 高橋 雅英
- 所属 役職 氏名 : (英語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor,  
Masahide Takahashi
- 実施期間 : 平成 28 年 9 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) CD109 を標的としたがんの抗体治療薬の探索  
開発課題名 : (英語) Screening of anti-cancer therapeutic antibodies targeting CD109
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科総合医学専攻  
教授 高橋 雅英
- 所属 役職 氏名 : (英語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor,  
Masahide Takahashi
- 分担研究 (日本語) CD109 を標的としたがんの抗体治療薬の探索、およびグリオブラストーマ、  
皮膚扁平上皮癌の発生・悪性化における CD109 の機能解析  
開発課題名 : (英語) Screening of anti-cancer therapeutic antibodies targeting CD109, and  
functional analysis of CD109 in tumorigenesis and tumor progression  
of glioblastoma and skin squamous cell carcinoma

- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科総合医学専攻  
助教 三井 伸二
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Assistant Professor,  
Shinji Mii
- 分担研究 (日本語) グリオブラストーマ、皮膚扁平上皮癌の発生・悪性化における CD109 の  
機能解析
- 開発課題名 : (英 語) Functional analysis of CD109 in tumorigenesis and tumor progression  
of glioblastoma and skin squamous cell carcinoma
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科総合医学専攻  
准教授 浅井 直也
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Associate Professor,  
Naoya Asai
- 分担研究 (日本語) 診断マーカーとしての CD109 の意義の検討
- 開発課題名 : (英 語) Significance of CD109 as a diagnostic marker for cancers
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人名古屋大学 大学院医学系研究科総合医学専攻  
教授 若林 俊彦, 同 准教授 夏目 敦至
- 所属 役職 氏名 : (英 語) Nagoya University Graduate School of Medicine, Professor, Toshihiko  
Wakabayashi and Associate Professor, Atsushi Natsume

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（日本語）

我々はこれまで、 $\alpha_2$ -マクログロブリン/C3,C4,C5 ファミリーに属する GPI アンカー型膜タンパク質である CD109 が、肺・食道・子宮頸部・口腔などの扁平上皮癌で高発現することを報告してきた。CD109 は TGF- $\beta$  抑制因子であることが知られているが、その詳細な機能は不明である。

本課題では、皮膚扁平上皮癌における CD109 の役割を検討した。当教室で作製した CD109 を欠失したマウス(以下 CD109 ノックアウトマウス)を、皮膚発癌実験に適した FVB/N マウスへ戻し交配し、さらに 7,12-ジメチルベンズ( $\alpha$ )アントラセン(DMBA と略)および 12-O-テトラデカノイルフォルボール-13 アセテートを用いた二段階化学発癌による皮膚扁平上皮癌マウスモデルを作製し、CD109 発現の腫瘍発生に与える効果について検討した。

このマウスモデルを用いて解析したところ、CD109 ノックアウト群とコントロール群である野生型マウスとの間で、良性腫瘍である扁平上皮乳頭腫の悪性転化率や、皮膚扁平上皮癌の組織型・深達度には有意な差を認めなかったものの、CD109 ノックアウト群では、コントロール群と比べて皮膚腫瘍の個数および腫瘍体積が有意に減少することが明らかとなった。また、DMBA は DNA 損傷を惹起する薬剤であるが、これを皮膚に塗布した場合、CD109 ノックアウトマウスではコントロール群に比べて生じる *H-ras* 変異の頻度が有意に低かった。

さらに、免疫組織化学的解析により、CD109 ノックアウトマウスの真皮では TGF- $\beta$  1 が増加していること、表皮において Nrf2 の発現が増強していることを示すとともに、初代培養マウスケラチノサイトを用いた診断により、CD109 を欠失したケラチノサイトでは Smad2 のリン酸化が亢進し、Nrf2 の発現が増強していることを見出した。

以上の結果は、CD109 の欠失により TGF- $\beta$ /Smad/Nrf2 経路が活性化されることで皮膚腫瘍の発生が抑えられることを示すものであり、CD109 は皮膚扁平上皮癌の腫瘍発生に重要な役割を果たすだけでなく治療標的としても適すると言える。

また、我々は CD109 の持つ扁平上皮癌等の診断マーカーとしての可能性に着目し、近年注目されているエクソソームにおける CD109 の発現についても検討した。Flag タグを付加した CD109 を発現する HEK293 細胞の培養上清から、超遠心法により回収したエクソソーム分画に CD109 が発現することを示しただけでなく、免疫電子顕微鏡法により、CD109 を金コロイド標識した二次抗体で可視化することで、CD109 がエクソソーム上に存在することを明らかにした。さらに、免疫沈降法により、CD109 が各種エクソソームマーカーと共沈することを示し、CD109 がエクソソーム関連タンパク質であることを見出した。このことは CD109 を対象としたリキッドバイオプシーの実現可能性を示すものと言える。今後、扁平上皮癌患者の血清を集め、エクソソーム分画における CD109 の定量化を計画している。

(英語)

CD109 is a GPI-anchored glycoprotein, and is released from the cell surface to the culture medium *in vitro*. Although we previously reported that CD109 is highly expressed in squamous cell carcinomas and regulates differentiation of keratinocytes *in vivo*, the function of CD109 in tumorigenesis remains unknown. Here, we show the role of CD109 in skin tumorigenesis using a two-stage carcinogenesis model in CD109-deficient mice. Immunohistochemical analysis revealed a higher level of TGF- $\beta$  protein expression in the dermis of CD109-deficient mice than in that of wild-type mice. Additionally, immunofluorescence analysis showed that Smad2 phosphorylation and Nrf2 expression were enhanced in primary keratinocytes from CD109-deficient mice compared with in those from wild-type mice. Although no significant difference was found in conversion rates from papilloma to carcinoma between wild-type and CD109-deficient mice in the carcinogenesis model, we observed fewer and smaller papillomas in CD109-deficient mice than in wild-type mice. Apoptosis and DNA damage marker levels were significantly reduced in CD109-deficient skin compared with in wild-type skin at 24 h after 7,12-dimethylbenz ( $\alpha$ ) anthracene treatment. Furthermore, mutation-specific PCR revealed that the mutation frequency of the *H-ras* gene was less in CD109-deficient skin than in wild-type skin in this model. These results suggest that CD109 deficiency suppresses skin tumorigenesis by enhancing TGF- $\beta$ /Smad/Nrf2 pathway activity and decreasing the mutation frequency of the *H-ras* gene.

We also investigated the significance of CD109 as a diagnostic marker for cancers. Exosomes are 50~100-nm-diameter membrane vesicles released from various types of cells and thought to have potential applications in cancer diagnosis. We revealed that CD109 is a component of the exosome in conditioned medium. FLAG-tagged human CD109 (FLAG-CD109) in conditioned medium secreted from HEK293 cells expressing FLAG-CD109 (293/FLAG-CD109) was immunoprecipitated with anti-FLAG affinity gel, and the co-precipitated proteins were analyzed by mass spectrometry and western blotting. Exosomal proteins were associated with CD109. We revealed the presence of CD109 in exosome fractions from conditioned medium of 293/FLAG-CD109. Moreover, the localization of CD109 in the exosome was demonstrated using immuno-electron microscopy. Based on these findings, we are now planning to collect the sera from squamous cell carcinoma patients to compare the amounts of CD109 in the exosome fraction.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 2件）

1. Sunagawa M, Mii S, Enomoto A, Kato T, Murakumo Y, Shiraki Y, Asai N, Asai M, Nagino M, Takahashi M. Suppression of skin tumorigenesis in CD109-deficient mice. *Oncotarget*.2016, 7, 82836-50.
2. Han YP, Enomoto A, Shiraki Y, Wang SQ, Wang X, Toyokuni S, Asai N, Ushida K, Ara H, Ohka F, Wakabayashi T, Ma J, Natsume A, Takahashi M. Significance of low mTORC1 activity in defining the characteristics of brain tumor stem cells. *Neuro-Oncology*. 2017, 19, 636-47.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 大規模ゲノム解析から明らかとなった WHO grade II / III 神経膠腫における遺伝学的予後予測因子, 口頭, 青木 恒介, 鈴木 啓道, 中村 英夫, 松尾 恵太郎, 本村 和也, 大岡 史治, 椎名 諭, 山本 高士, 溝口 昌弘, 榎井 泰朋, 村垣 善浩, 眞田 昌, 宮野 悟, 小川 誠司, 夏目 敦至, 福岡国際会議場, 2016/10/1, 国内.
2. がん幹細胞における mTORC1 活性の役割とその制御機構, 口頭, 榎本 篤, Weng Liang, Han Yi-Peng, 高橋 雅英, パシフィコ横浜, 2016/10/7, 国内.
3. 慢性皮膚炎症を伴う CD109 ノックアウトマウスにおいて皮膚腫瘍形成は抑制される, ポスター, 三井 伸二, 砂川 真輝, 榎本 篤, 村雲 芳樹, 榎野 正人, 高橋 雅英, パシフィコ横浜, 2016/10/7, 国内.
4. Lower grade glioma における免疫組織化学染色での CD109 の発現は、予後と相関する, ポスター, 白木 之浩, 砂川 真輝, 三井 伸二, 浅井 直也, 榎本 篤, 百田 洋之, 夏目 敦至, 若林 俊彦, 高橋 雅英, パシフィコ横浜, 2016/10/7, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし.

(4) 特許出願

該当なし.