

甲状腺乳頭癌におけるオステオポンチンおよび その受容体 CD44 の免疫組織化学的局在

¹東京女子医科大学医学部病理学（第一）

²東京女子医科大学内分泌外科

³東京女子医科大学病理診断科

カトウ ヨウイチロウ ホリウチ キ ヨ ミ ヤマモト トモコ シバタ ノリユキ
加藤陽一郎¹・堀内喜代美²・山本 智子^{1,3}・柴田 亮行^{1,3}
サワダ タツオ オカモト タカヒロ コバヤシ マキオ
澤田 達男^{1,3}・岡本 高宏²・小林 槇雄^{1,3}

（受理 平成22年12月28日）

Immunohistochemical Localization of Osteopontin and CD44v6 in Papillary Thyroid Carcinoma

Yoichiro KATO¹, Kiyomi HORIUCHI², Tomoko YAMAMOTO^{1,3}, Noriyuki SHIBATA^{1,3},
Tatsuo SAWADA^{1,3}, Takahiro OKAMOTO² and Makio KOBAYASHI^{1,3}

¹Department of Pathology, Tokyo Women's Medical University School of Medicine

²Department of Endocrine Surgery, Tokyo Women's Medical University

³Department of Surgical Pathology, Tokyo Women's Medical University

Osteopontin (OPN), a secretory glycoprotein, is significantly overexpressed in a variety of malignant neoplasms. Moreover, increased levels of OPN have been detected in the blood of patients with metastatic carcinoma. We previously demonstrated the immunohistochemical localization of OPN in papillary thyroid carcinoma (PTC). To elucidate the mechanisms of OPN signaling in PTC, we investigated an immunohistochemical analysis of the OPN receptor subunit CD44v6 and compared the results with those of OPN in 10 PTC cases. Immunoreactive signals for Cd44v6 were localized mainly in the cytoplasm of PTC cells, and were more intense at the interface between the PTC tissues and the surrounding stroma. The immunohistochemical localization of CD44v6 was similar to that of OPN. The present results suggest the involvement of CD44v6 in OPN signaling as well as cancer invasion in autocrine and paracrine manners.

Key Words: CD44v6, immunohistochemistry, osteopontin, papillary thyroid carcinoma

緒 言

オステオポンチン (OPN) は、分子量 44～66kDa の分泌型リン酸化糖蛋白である¹⁾。OPN はカルシウム結合能を有し、トロピンによって切断されると、N 末端側はインテグリンとの結合能を、C 末端側は CD44 との結合能をそれぞれ獲得する。OPN の分子量は、発現する細胞の種類と翻訳後修飾のされ方によって異なる。OPN は、正常組織中の種々の細胞に発現しており、骨形成や免疫機能の調節などに関与している^{2)~4)}。OPN はまた種々の病態にも関連しており、炎症組織の石灰化や尿路結石の形成に関わるほか、乳癌、肺癌、悪性黒色腫などの腫瘍細胞に発

現することから、腫瘍の転移や石灰化における関与も指摘されている^{5)~8)}。腫瘍における OPN の機能は、細胞のアポトーシスの誘導を阻害し、細胞外基質の分解酵素であるマトリックスメタプロテアーゼ (MMP)、細胞の増殖に関与するウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター (uPA) などの発現レベルを上昇させている。これらのことにより腫瘍細胞は、細胞の不死化および遊走性と浸潤能を獲得する⁹⁾¹⁰⁾。

OPN の受容体として、インテグリンと CD44 の二種類の受容体が知られている。インテグリンは、 α と β の 2 つのサブユニットで 2 量体を形成してお

Table 1 Clinical features of cases

Case No	Age	Sex	Pathological diagnosis	Calcification	Metastasis of lymph node
1	69	♀	PTC	+	-
2	84	♂	PTC	+	+
3	62	♂	PTC	+	+
4	55	♀	PTC	+	+
5	58	♀	PTC	+	+
6	59	♀	PTC	-	+
7	24	♂	PTC	+	+
8	27	♀	PTC	+	-
9	29	♀	PTC	-	+
10	63	♂	PTC	+	-

PTC, papillary thyroid carcinoma.

り、その下流に存在する非受容体型チロシンキナーゼである cSrc を介して、細胞内シグナル伝達機構を作動させ、腫瘍細胞の増殖や転移などに与る¹¹⁾。マウスの培養細胞を用いた研究によると、cSrc の活性化抑制が OPN の発現レベルを低下させるという¹²⁾。我々は最近、ヒト甲状腺乳頭癌 (PTC) 組織における cSrc と OPN の免疫組織化学的局在が一致し、組織抽出物のイムノブロットでの両者の発現レベルが相関することを報告した¹³⁾。これらの事実は、OPN がインテグリン-cSrc 経路を伝って機能を発揮している可能性を示唆する。一方、もう一つの OPN の受容体である CD44 は、遺伝子上 20 個のエクソンからなる蛋白であり、N 末端側の 5 個と C 末端側の 5 個のエクソンに由来するドメインは恒常的に発現しているのに対し、中央にある 10 個のエクソンはスプライシングバリエーションを生じうる¹⁴⁾。CD44 のシグナル伝達は、Akt を介して細胞の生存に関わるといわれる。いくつかの研究知見は、腫瘍組織における CD44 のスプライシングバリエーション CD44v6 が OPN の受容体として重要な役割を窺わせる¹⁵⁾¹⁶⁾。これまでにも肝細胞癌、乳癌、肺癌、胃癌、大腸癌において CD44v6 が転移能のマーカーとして報告されている¹⁷⁾¹⁸⁾。今回我々は、PTC における腫瘍浸潤能および転移能と OPN と CD44v6 との相関を明らかにするため、腫瘍組織中の OPN と CD44v6 の免疫組織化学的局在を解析した。

材料と方法

検索を行った症例は、本学内分泌外科で切除手術を受けた PTC 患者のうち、事前に手術材料の研究使用に関する承諾が得られた 10 例で、研究は本学倫理委員会の承認後に実施された (承認番号 341) (Table 1)。各症例の PTC 組織のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックから 4 μ m 厚の切片を作製し、

ヘマトキシリン・エオジン染色と免疫組織化学染色に用いた。一次抗体は、マウス抗 OPN モノクローナル抗体 (Clone sc-21742, 1 : 1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) およびマウス抗 CD44v6 モノクローナル抗体 (Clone 2F10, 1 : 100, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) である。脱パラフィン処理、親水処理、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止、リン酸緩衝食塩水洗浄、3% ウシ血清アルブミン前処理を経た切片に、一次抗体を 4 $^{\circ}$ C 下で一晩反応させた。免疫反応産物は、ポリマーイムノコンプレックス (PIC) 法 (Envision system, Dako Cytomation, Kyoto, Japan) により検出し、ジアミノベンチジンで可視化した。なお、抗 CD44v6 抗体の反応に先立って、0.1M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中での加熱処理により抗原性の賦活化を施した。

結 果

本研究では、癌組織中心部の乳頭状配列を呈する領域 (Fig. 1e, f) と OPN は癌の浸潤を示す領域において高発現が認められることから、癌組織周辺部の間質浸潤像を呈する領域 (Fig. 1b) を特に詳しく観察した。間質への浸潤部ではマクロファージやリンパ球などの炎症細胞が浸潤していた。一次抗体との反応を省いた陰性反応対照切片に免疫反応産物の沈着は認めなかった (data not shown)。腫瘍細胞における CD44v6 免疫活性は、その細胞質および細胞表面に局在しており (Fig. 1c, g, k)、OPN 免疫活性の局在に概ね一致していた (Fig. 1d, h, l)。腫瘍組織中心部においては CD44v6 の免疫活性を示さない細胞も認められた (Fig. 1c 矢頭)。間質に浸潤する炎症細胞には、OPN 免疫活性が検出されたが (Fig. 1l 矢印)、CD44v6 免疫活性は観察されなかった (Fig. 1k)。非腫瘍部では、OPN ならびに CD44v6 の有意な免疫活性は検出されなかった (Fig. 1n, o)。腫瘍の

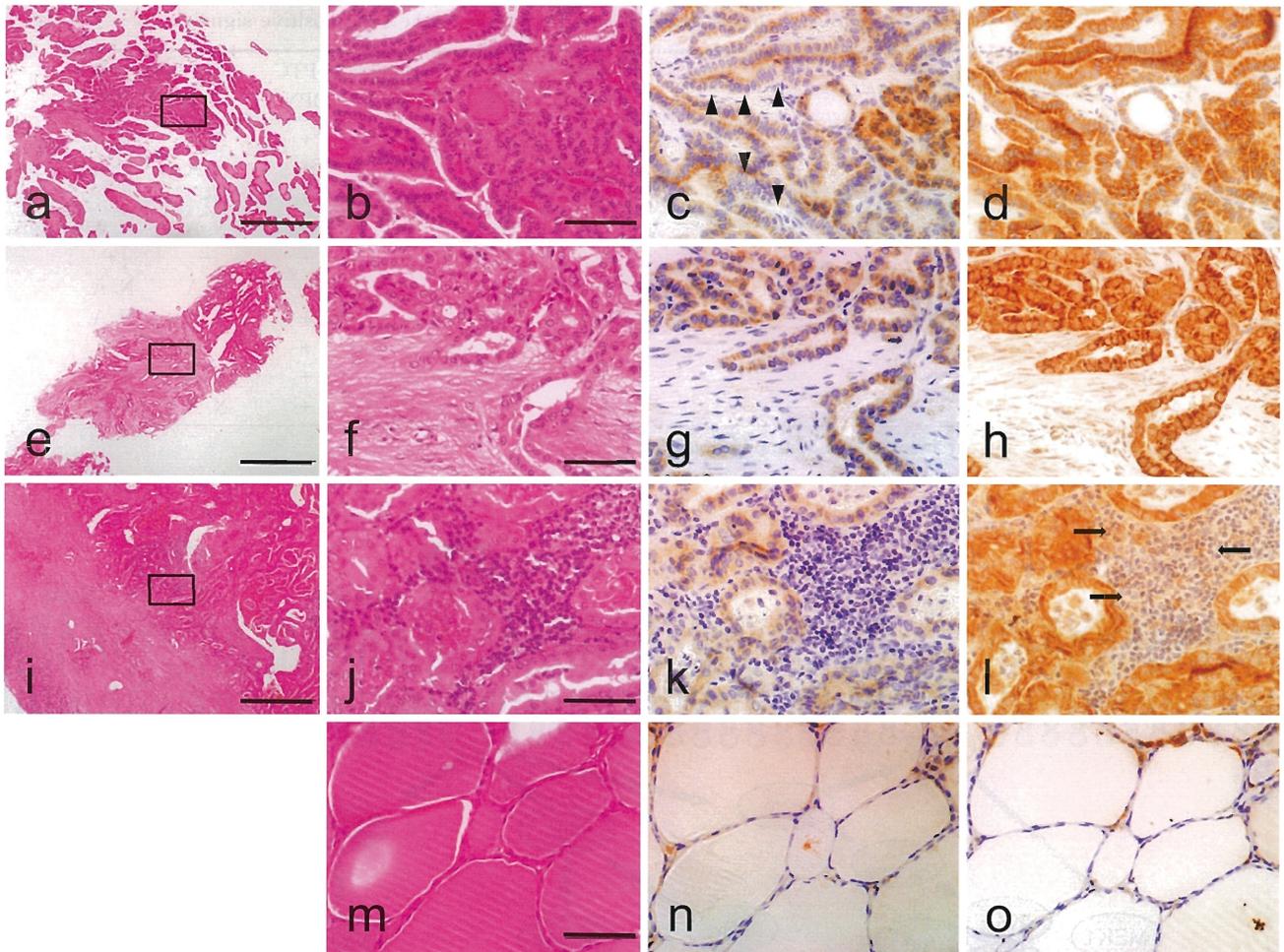


Fig. 1 Histopathological and immunohistochemical observations of OPN and CD44v6 in the center (a, b, c, d), the periphery (e, f, g, h) and inflammatory cells in the stroma of PTC lesions and the surrounding thyroid parenchyma (m, n, o)

Panels (a, e, m) show low magnifications, and panels (b, f, j, m) show high magnifications of histopathological features on H&E-stained sections. Panels (c, g, k, n) and panels (d, h, l, o) show immunohistochemical findings of CD44v6 and OPN, respectively. Arrowheads indicate a weak signal of CD44v6 in PTC. Arrows indicate inflammatory cell infiltrates in the stroma at the interface between the tumor and the surrounding thyroid parenchyma. Scale bar = 1 mm (a, e, i), 100 μ m (b, f, j, m).

H&E, hematoxylin-eosin; OPN, osteopontin; PTC, papillary thyroid carcinoma.

石灰化，リンパ節転移と今回免疫組織化学的に検索した CD44v6 および OPN の陽性像とは，明らかな相関は認められなかった (Table 2).

考 察

OPN は，骨芽細胞と破骨細胞の機能に関連した骨の合成や再吸収に重要な役割を果たすばかりでなく，障害を受けた血管の再構築や炎症細胞の遊走にも関与していることが判っている。このように，OPN は生体の恒常性を維持する重要な分泌蛋白であることは明らかである¹⁹⁾²⁰⁾。一方，OPN が大腸癌，乳癌，悪性黒色腫，子宮頸癌など種々の悪性腫瘍で過剰発現する^{5)~8)}ことは以前から知られており，こ

の過剰な OPN は周囲に浸潤集積するマクロファージを含む炎症細胞に由来するものと考えられていた²¹⁾。近年，乳癌や扁平上皮癌の腫瘍細胞自身が OPN を発現しているという報告が相次ぎ²²⁾，我々も PTC の腫瘍細胞が OPN を発現することを報告した¹³⁾。興味深いことに OPN は，細胞外基質を分解するプロマトリックスメタロプロテナーゼ (pro-MMP-2) の発現レベルを上昇させるのに加え⁹⁾，ウロキナーゼプラスミノージェンアクチベーター (u-PA) の発現レベルを上昇させるという¹⁰⁾。これらの事実は，腫瘍細胞の間質浸潤における OPN の関与を物語っている。

Table 2 Correlation between clinical features and immunohistochemical positive signals

Case No	Calcification	Metastasis of lymph node	Center of PTC		Peripheral of PTC		Infiltration cells	
			CD44	OPN	CD44	OPN	CD44	OPN
1	+	-	+	+	+	+	N. A.	N. A.
2	+	+	±	+	+	+	N. A.	N. A.
3	+	+	+	+	+	+	-	+
4	+	+	+	+	+	+	N. A.	N. A.
5	+	+	+	+	+	+	-	+
6	-	+	±	+	+	+	N. A.	N. A.
7	+	+	+	+	+	+	N. A.	N. A.
8	+	-	+	+	+	+	-	+
9	-	+	+	+	+	+	N. A.	N. A.
10	+	-	+	+	+	+	N. A.	N. A.

PTC, papillary thyroid carcinoma. N. A., not applicable.

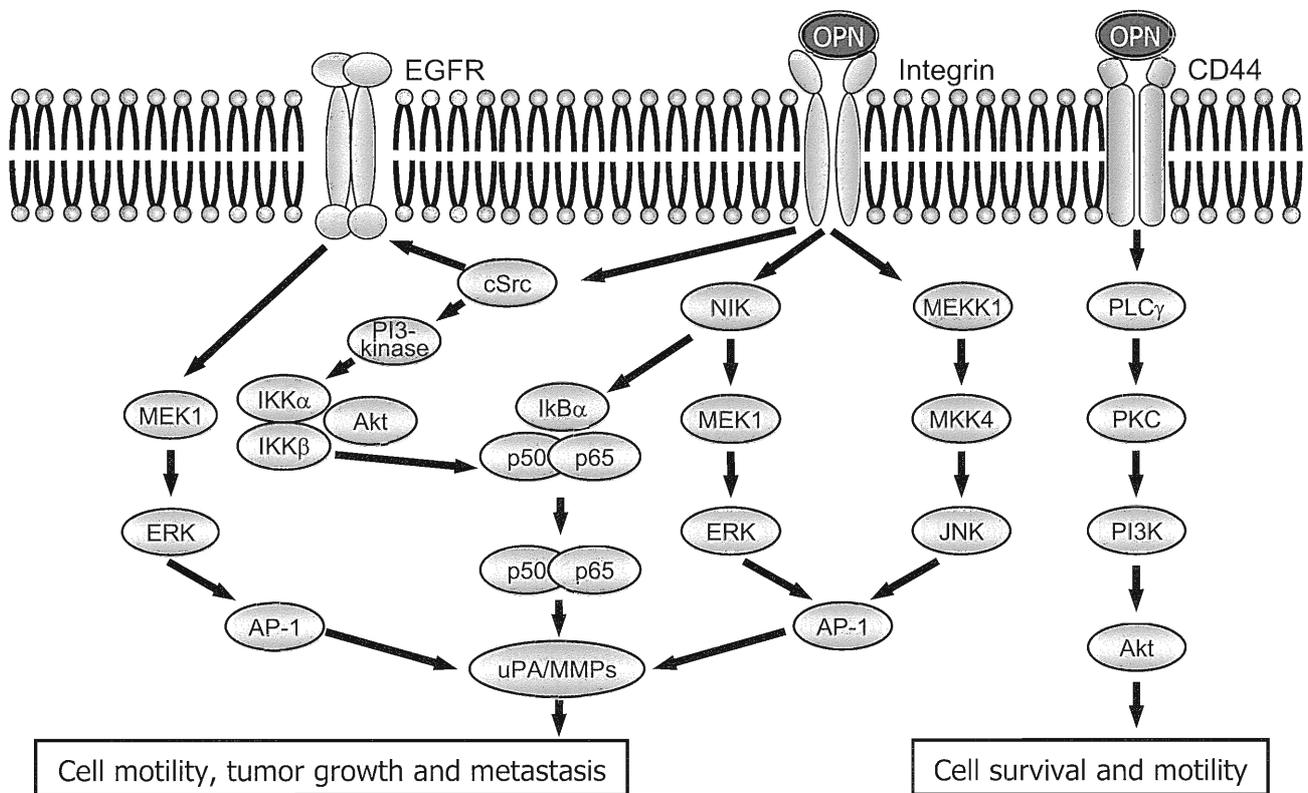


Fig. 2 Scheme of mechanism of OPN-induced tumor growth and metastasis through integrin and CD44 mediated pathways

OPNの主な受容体は、インテグリンとCD44である。インテグリンは α と β の2種類のサブユニットで構成され、細胞の種類により様々な組み合わせが生じる。これらのうちOPNは、 $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha4\beta1$, $\alpha5\beta1$, $\alpha8\beta1$ または $\alpha9\beta1$ と結合する¹¹⁾²³⁾。インテグリンの中で $\alpha\beta3$ は、転移能の低い培養癌細胞と比較して転移能の高い培養癌細胞で過剰発現している。OPNと $\alpha\beta3$ との結合は、細胞の増殖や遊走に関連するパキシリン、テンシンおよびSrcを活性

化すると同時に、アポトーシスの誘導を阻害する¹¹⁾。

もう一つのOPN受容体であるCD44は、多様なスプライシングバリエントを有する¹⁴⁾。CD44は細胞の生存と遊走に関与し、腫瘍による発現レベルは予後と関連している。OPNが最も高い親和性を示すCD44バリエントはCD44v6であり、これらの間の特異的な結合が腫瘍細胞の生存と遊走を促進する¹⁵⁾。肝細胞癌でのCD44の発現の上昇は、発現していない症例に比べて生存期間が短い傾向が示さ

れ²⁴⁾、消化管腫瘍の80%以上にCD44の活性が認められ、OPNとの相互作用による細胞増殖に関連していることが示された²⁵⁾²⁶⁾。また、ヒト乳癌由来細胞のヌードマウス接種研究では、骨転移部においてヒアルロン酸、OPN、CD44が協調して破骨細胞を分化、活性化して骨の破壊を進行させるという報告もある²⁷⁾。さらに、OPNとCD44あるいはインテグリンとの特異的に結合する部分に対するアプタマーを加えることにより、PI3K、JNK1/2、Src、Akt、MMP、uPAが劇的に減少することが報告されている²⁸⁾。これに関連して、OPNやcSrcと同様に、CD44v6が癌の先進部において強発現していた本研究の結果は、CD44v6が癌の浸潤に深く関わるとの基礎的知見を支持する。興味深いことに、OPNとインテグリン $\alpha\beta 3$ の結合はCD44v6の発現を誘導するとの報告がある¹⁴⁾。これは、今回我々が呈示したPTC組織におけるOPNとCD44v6の共存という形態学的所見と符号する。ただし、OPNとcSrcが腫瘍細胞のみならず間質に浸潤する炎症細胞でも発現するのに対し、CD44v6が腫瘍細胞のみに発現することは、慎重に考慮すべき問題を提起する。すなわち、インテグリン-cSrc経路へ向かうOPNシグナルは、腫瘍細胞と炎症細胞の双方が参加するオートクリン・パラクリン機序を介するのに対し、CD44v6-Akt経路へ向かうOPNシグナルは、腫瘍細胞のみで発生するとの仮説が成立する(Fig. 2)。以上の問題を解決することは、OPNシグナルの理解とPTCの分子標的薬の開発に繋がる研究の端緒となることが期待される。

結 論

甲状腺乳頭癌におけるOPNの陽性像は腫瘍細胞と周囲に存在する炎症細胞に認められたが、CD44v6の陽性所見は腫瘍細胞のみに認められた。これらのことは、OPNとその受容体CD44v6の発現が、腫瘍細胞の増殖と周囲に存在する間質組織への浸潤に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

謝 辞

稿を終えるに当たり、技術協力をいただいた刈田瑞穂、竹入英幸、坂寄紀子、村松文章および岩崎秀一の各氏に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Denhardt DT, Guo X: Osteopontin: A protein with diverse function. *FASEB J* **7**: 1475-1482, 1993
- 2) Shi YF, Zou MJ, Schimdt H et al: High rates of ras

- codon 61 mutation in thyroid tumors in an iodide-deficient area. *Cancer Res* **15**: 2690-2693, 1991
- 3) Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T et al: Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol* **13**: 367-376, 2001
- 4) Higuchi Y, Tamura Y, Uchida T et al: The roles of soluble osteopontin using osteopontin-transgenic mice in vivo: proliferation of CD4⁺ T lymphocytes and the enhancement of cell-mediated immune responses. *Pathobiology* **71**: 1-11, 2004
- 5) Oates AJ, Barraclough R, Rudland PS: The role of osteopontin in tumorigenesis and metastasis. *Invas Metast* **17**: 1-15, 1997
- 6) El-Tanani MK, Platt-Higgins A, Rudland PS et al: Ets gene PEA3 cooperates with beta-catenin-Lef-1 and c-jun in regulation of osteopontin transcription. *J Biol Chem* **279**: 20794-20806, 2004
- 7) Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B et al: Osteopontin expression and distribution in human carcinoma. *Am J Pathol* **145**: 610-623, 1994
- 8) Zhou Y, Dai DL, Martinka M et al: Osteopontin expression correlates with melanoma invasion. *J Invest Dermatol* **19**: 1706-1711, 2004
- 9) Philip S, Bulbule A: Osteopontin stimulates tumor growth and activation of promatrix metalloproteinase-2 through nuclear factor-kappa B-mediated induction of membrane type 1 matrix metalloproteinase in murine melanoma cells. *J Biol Chem* **276**: 44926-44935, 2001
- 10) Tuck AB, Hota C, Wilson SM et al: Osteopontin-induced migration of human mammary epithelial cells involves activation of EGF receptor and multiple signal transduction pathway. *Oncogene* **22**: 1198-1205, 2003
- 11) Wai PY, Kuo PC: The role of osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* **121**: 228-241, 2004
- 12) Chackalaparampil I, Peri A, Nemir M et al: Cells in vivo and in vitro from osteopetrotic mice homozygous for c-src disruption show suppression of synthesis of osteopontin, a multi functional extracellular matrix protein. *Oncogene* **12**: 1457-1467, 1996
- 13) Kato Y, Zhu H, Tanaka R et al: Osteopontin expression may be induced by c-Src in papillary thyroid carcinoma. *Acta Histochem Cytochem* **34**: 193-199, 2001
- 14) Georgolios A, Batistatou A, Charalabopoulos A et al: The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol* **28**: 94-98, 2006
- 15) Weber GF, Ashkar S: Interaction between CD44 and osteopontin as a potential basis for metastasis formation. *Proc Assoc Am Physician* **109**: 1-9, 1997
- 16) Gao C, Guo H, Downey L et al: Osteopontin-dependent CD44v6 expression and cell adhesion in HepG2 cells. *Carcinogenesis* **24**: 1871-1878, 2003
- 17) Goodson S, Urquidi V, Tarin D: CD 44 cell adhesion molecules. *Mol Pathol* **52**: 189-196, 1999
- 18) Panta H, Sherman L, Herrlich PA: CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 33-45, 2003

- 19) **Sodek J, Ganss B, Mckee MD**: Osteopontin. *Crit Rev Oral Med* **11**: 279–303, 2001
 - 20) **Mazzali M, Kipari T, Ophascharoensuk V et al**: Osteopontin—a molecule for all seasons. *QJ Med* **95**: 3–13, 2002
 - 21) **Furger KA, Menon RK, Tuck AB et al**: The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med* **1**: 621–632, 2001
 - 22) **Rittling SR, Chambers AF**: Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* **90**: 1877–1881, 2004
 - 23) **Standal T, Borset M, Sundan A**: Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol* **26**: 179–184, 2004
 - 24) **Yang GH, Fan J, Xu Y et al**: Osteopontin combined with CD44, a novel prognostic biomarker for patients with hepatocellular carcinoma undergoing curative resection. *The Oncologist* **13**: 1155–1165, 2008
 - 25) **Hsu KH, Tsai HW, Lin PW et al**: Clinical implication and mitotic of CD44 cleavage in relation to osteopontin/CD44 interaction and dysregulated cell cycle protein in gastrointestinal stromal tumor. *Am Surg Oncol* **17**: 2199–2212, 2010
 - 26) **Hsu KH, Tsai HW, Lin PW et al**: Osteopontin expression in an independent adverse prognostic factor in resectable gastrointestinal stromal tumor and its interaction with CD44 promotes tumor proliferation. *Am Surg Oncol* **17**: 3043–3052, 2010
 - 27) **Nakamura H, Hiraga T, Ninomiya T et al**: Involvement of cell-cell and cell-matrix interaction in bone destruction induced by metastatic MDA-MB-231 human breast cancer cells in nude mice. *J bone Miner Metab* **26**: 642–647, 2008
 - 28) **Mi Z, Guo H, Russell MB et al**: RNA aptamer blockade of osteopontin inhibits growth and metastasis of MDA-MB231 breast cancer cells. *Mol Therapy* **17**: 153–161, 2009
-