

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09470

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍の治療耐性におけるCD133クラスターの意義解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the Significance of the CD133 Cluster in Treatment Resistance of Malignant Brain Tumors and Development of Novel Therapies

研究代表者

下里 修 (SHIMOZATO, OSAMU)

千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・室長

研究者番号：30344063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性がんに対する革新的治療法開発の基盤構築として、治療抵抗性の本態と想定されている癌幹細胞の性質を理解することが求められている。そこで本研究は、大腸がんおよび神経膠芽腫(GBM)細胞を用いて、癌幹細胞が発現するCD133の機能を解析した。神経膠芽腫においてはCD133と相互作用するアダプター蛋白質14-3-3 と脱リン酸化酵素PTPRKの発現がGBM患者の予後に影響する可能性を見いだした。一方、大腸がんにおいては、がん組織内でしばしばみられる栄養飢餓条件におけるCD133の機能を検討した。その結果、CD133は腫瘍細胞の栄養ストレスに対する耐性を高める機能を有することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの発生・進展において幹細胞様の性質を示すがん細胞の亜集団「癌幹細胞」の重要性が示唆されている。CD133は正常幹細胞のみならず多くのがん細胞でも発現し、癌幹細胞の悪性形質と深く関連すると考えられてきたが、その機能は十分に解明されていなかった。本研究によってがん進展におけるCD133の機能の一端が明らかにされたことは、CD133の学術的な意義を明らかにしただけでなく、CD133を起点とした癌幹細胞を標的とする新しい治療戦略構築の基盤が形成されたことを示唆する。さらに、難治性がんの治療成績向上につながるなどの社会的意義も示され、今後の基礎研究の進捗が期待される。

研究成果の概要(英文)：As a basis for the development of innovative therapies against refractory cancers, it is necessary to understand the nature of cancer stem cells, which are assumed to be the main cause of therapeutic resistance. In this study, we investigated the function of CD133, a cancer stem cell marker, using colon cancer and glioblastoma cells. In glioblastoma, we found that the expression of the CD133-interacting adaptor protein 14-3-3 and the phosphatase PTPRK may affect the prognosis of glioblastoma patients. On the other hand, in colorectal cancer, we examined the function of CD133 under nutrient starvation conditions often found in cancer tissues. We found that CD133 functions to enhance tumor cell tolerance to nutritional stress by suppressing AKT-mediated cell death and promoting protein synthesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：脳腫瘍 CD133 癌幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は治療抵抗性の高い予後不良な難治性がんであり、革新的治療法開発の基盤構築が強く望まれる。これを達成するためには、治療抵抗性の本態と想定される「癌幹細胞」の理解を深めることが必須の課題である。申請者は癌幹細胞の発現する細胞膜蛋白質 CD133 が大腸がん腫瘍細胞の増殖促進に関与することを明らかにした (Shimozato et al., *Oncogene*, 34, 1949-1960, 2015)。このとき、CD133 との相互作用が示唆される新規アダプター蛋白質群を同定し、CD133 からの細胞増殖シグナルへの関与が示唆された。しかし、脳腫瘍における CD133 ならびに当該蛋白質群の役割は十分に解析されていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、(1) 悪性脳腫瘍が有する治療抵抗性における CD133 とアダプター蛋白質による複合体 (以下、CD133 クラスターという) の意義解明、および (2) CD133 クラスター関連遺伝子の発現抑制による悪性脳腫瘍幹細胞の治療抵抗性克服の可能性について検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) カプランマイヤー生存解析

オンラインツールの一つである R2 (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) を用いた。The Cancer Genome Atlas (TCGA) に保管される 540 例の神経膠芽腫患者について、マイクロアレイ法で得られた当該がん組織内の標的遺伝子の発現量から患者を 2 群に分け、その全生存期間をカプランマイヤー法ならびに Log-rank 法で解析した。

2) 細胞培養

ヒト神経膠芽腫由来細胞株 (U87MG および U251) は 10% ウシ胎児血清を含む alpha Modified Eagle medium で培養した。細胞株の認証は short tandem repeat を解析によって American Tissue Type Collection (ATCC) あるいは European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) 保有の細胞株と同一であることを確認した。293T 細胞は 10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle medium で培養した。

3) 遺伝子導入、フローサイトメトリー、細胞増殖解析

CD133 とその変異体遺伝子を含むレンチウイルスベクターは FuGENE HD を用いて 293T 細胞に導入し、その培養上清を用いて細胞株へ導入した。ピューロマイシン耐性細胞は、トリプシンを用いて培養ディッシュから回収し、PE 標識抗 CD133 抗体と反応させ、フローサイトメーター (FACS Calibur、日本ベクトンディッキンソン) で解析した。CD133 発現の確認された細胞株は 96-well プレートに 1000 個/well の濃度で播種し、画像撮影装置 (IncuCyte、エッセンバイオ) を用いて細胞を経時的に撮影し、得られた画像から細胞の占める面積を割り出し細胞数の増加を解析した。

4) 免疫沈降-ウェスタンブロット法

リポフェクタミン 3000 を用いて、*PROM1* および Flag-tagged *YWHAZ* 遺伝子を 293T 細胞に導入した。先行研究 (Shimozato et al., *Oncogene*, 34, 1949-1960, 2015) の方法に従い細胞を溶解した。ピオチン標識された抗 CD133 抗体 (AC133、ミルテニー) あるいはコントロールマウス IgG

とプロテイン A/G 磁気ビーズと反応させ、磁力を使って抗体を回収した。得られた蛋白質は定法にしたがってポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて分離し、セミドライ方式で PVDF 膜に転写した。得られた PVDF 膜は定法に従い、牛血清アルブミンでブロッキングし、1 次抗体(抗 CD133 抗体 : 293C3、ミルテニー ; 抗 DYKDDDDK Tag 抗体、WAKO) と反応させ、HRP-標識 2 次抗体と化学発光試薬と反応させ、画像撮影装置 (LAS4000mini、富士フィルム) で撮影した。

4 . 研究成果

1) 神経膠芽腫患者の生存期間と CD133 クラスター関連遺伝子の発現量との関連

神経膠芽腫における CD133 クラスターの意義を検討するために、The Cancer Genome Atlas (TCGA) に公開されている神経膠芽腫患者 540 症例のマイクロアレイ解析と予後情報のデータから、*PROM1* (CD133 蛋白質をコードする)、*PTPRK*、*YWHAZ* (14-3-3 蛋白質をコードする) 遺伝子の発現レベルと予後との関連を検討した。その結果、*PROM1* あるいは *YWHAZ* 遺伝子を高いレベルで発現する神経膠芽腫患者の全生存期間は有意に短かった。反対に、*PTPRK* 遺伝子を高発現する神経膠芽腫患者の全生存期間は有意に長かった (図 1)。以上から、*PROM1*、*PTPRK*、*YWHAZ* 遺伝子は神経膠芽腫の予後に影響を及ぼす可能性が示唆された。特に *PTPRK* はがん抑制的な機能が想定され、実際に Agarwal らは *PTPRK* の強制発現は神経膠腫細胞の増殖、運動、および浸潤を抑制し、同時に抗がん剤感受性を高めることを報告した (Agarwal et al., PLoS One, 5, e62852, 2013)。そこで、本研究では CD133 と 14-3-3 の役割に注目し、さらなる解析を行った。

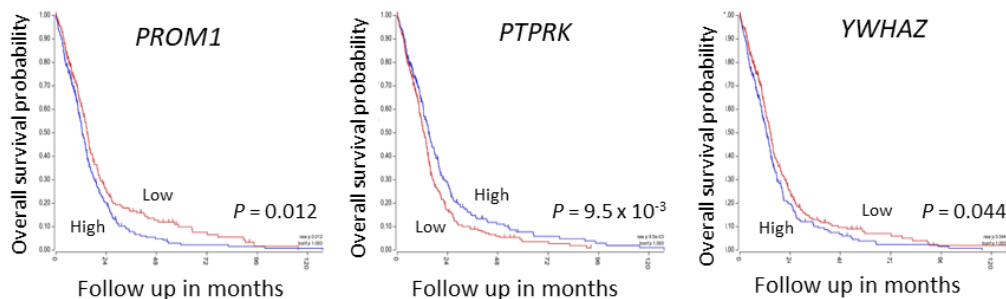


図1. カプランマイヤー生存解析

各遺伝子の発現量で2群に分けた神経膠芽腫患者540例の生存率を示す。青線は高発現群で、赤線は低発現群である。図の右下に示すように、2群の生存期間は有意に異なる結果であった。

2) 神経膠芽腫細胞における CD133 強制発現の影響

本研究で用いたヒト神経膠芽腫由来細胞株 (U87MG および U251) は、いくつかの先行論文では CD133 陽性であることが示されていたが、フローサイトメトリー法の結果から内在性 CD133 蛋白質を発現していなかった。そこで、本研究では CD133 を強制発現させた同細胞株を作製し実験に供した。CD133 の細胞内ドメインにはリン酸化される 828 番目と 852 番目のチロシン残基がある。先行研究で作製した、ふたつのチロシン残基をグルタミン酸に置換したチロシンリン酸化模倣型変異 CD133 (CD133-EE) あるいはフェニルアラニンに置換した非リン酸化型変異 CD133 (CD133-FF) あるいは野生型 CD133 (CD133-WT) を含むレンチウイルスベクターを用いて、これらの外因性 CD133 を U251 に導入した。フローサイトメトリー法によってこれらの外因性 CD133 蛋白質の発現を確認した (図 2A)。次に、これらの細胞の増殖速度を解析したところ、CD133 の強制発現は神経膠芽腫細胞の増殖にほとんど影響しなかった (図 2B)。ところで、同細胞株はクロスコンタミネーションを起こしている可能性が示唆されている (Allen et al., Sci Trans

Med., 31, 354re3, 2016)。そこで、STR 解析を用いて同細胞株を解析したところ、American Tissue Culture Collection (ATCC) あるいは European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC) の保有する細胞株と同一であることが確認された。

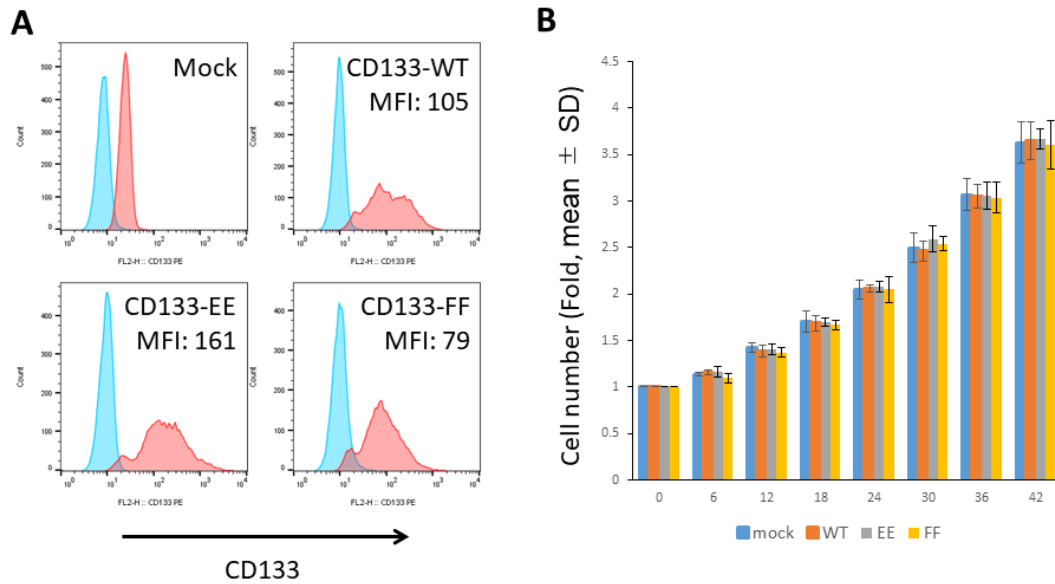


図2. CD133強制発現と細胞増殖への影響

- A) 神経膠芽腫細胞U251にCD133遺伝子を導入し、フローサイトメトリーでその発現を確認した。平均蛍光強度 (MFI)を図中に示す。
 B) 各細胞株を培養し、細胞数を経時的に計測した。

3) CD133 と 14-3-3 の相互作用

先行研究での酵母 2-hybrid スクリーニングから、14-3-3 が CD133 と相互作用する候補蛋白質の一つとして挙げられた。そこで、両者の相互作用を解析するため、293T 細胞に CD133 と Flag-tagged 14-3-3 を遺伝子導入し、免疫沈降-ウェスタンブロット法で両者の相互作用を解析した。図 3 に示すように、今回の実験系では、両者の相互作用を検出することはできなかった。前述したカプランマイヤーセゾン解析から、14-3-3 の発現量が神経膠芽腫患者の生存期間に影響することが示されている。14-3-3 はアダプター蛋白質であることから、CD133 とは異なるシグナルの制御によって神経膠芽腫患者の予後に影響した可能性が示唆された。この点について、14-3-3 と相互作用する細胞膜蛋白質を探索することで明らかにされると期待されるが、今後の課題である。

4) 栄養飢餓条件における CD133 の機能解析

がん組織内は内部の血管新生が十分でない場合があり、がん細胞にとっては必ずしも生存に適した環境でない、すなわち酸素や栄養の供給不足が報告されている。しかし、がん細胞はそのような環境下でも生存・増殖している。一方、CD133 陽性の癌幹細胞は様々なストレス耐性を有することが報告されている。そこで、がん細胞のストレス耐性における CD133 の機能を解明するために、培養液中のウシ胎児血清 (FBS) の添加量を減らすことで栄養不足を模倣した条件でがん細胞を培養し、CD133 発現の有無がその生存に及ぼす影響を検討した。CD133 発現レベルを cDNA や shRNA を導入することで人為的に変化させた大腸がん細胞を通常の 10% から 0.5% まで FBS の濃度を下げた条件で培養すると、CD133 陽性がん細胞は生存し続けるが、CD133 陰性がん細胞は死滅した (図 4)。様々な解析から、CD133 は下流にある AKT を介して細胞死抑制と蛋白質合

成促進によって細胞の生存を助長する役割があることを見出した。以上から、CD133は栄養飢餓条件でも癌幹細胞を生存させることでがんの発生や進展を促進する役割を持つことが示唆された。

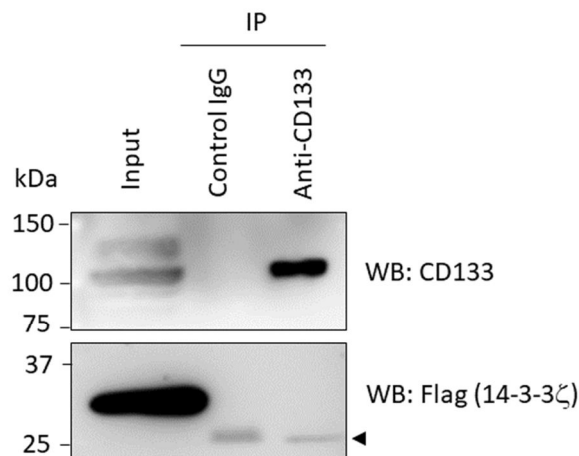


図3. CD133と14-3-3 ζ の相互作用

293T細胞に野生型CD133とFlagタグ付き14-3-3 ζ のcDNAを導入し、抗CD133抗体で免疫沈降した。得られた沈降物はSDS-PAGEで展開し、ウェスタンブロット法でCD133およびFlagタグに対する抗体で各蛋白質を検出した。

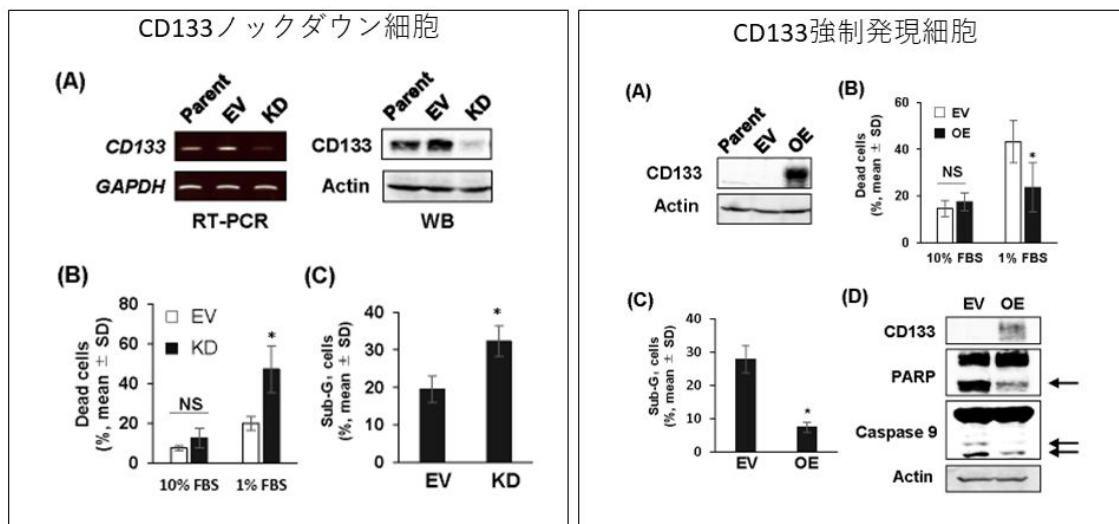


図4. 栄養飢餓におけるCD133の機能

(左) CD133陽性HT-29細胞にshRNAを導入してCD133をノックダウンした。RT-PCRおよびウェスタンブロット法でCD133発現を確認した (A)。10%あるいは1%ウシ胎児血清 (FBS) で培養し、死細胞の割合をトリパンブルー染色あるいはフローサイトメトリーで解析した (BとC)。

(右) CD133陰性SW480細胞には野生型CD133 cDNAを導入した (A)。10%FBSあるいは1%FBSで培養し、死細胞の割合をトリパンブルー染色あるいはフローサイトメトリーで解析した (BとC)。さらに、アポトーシスのマーカーであるPARPやカスパーゼ9の切断をウェスタンブロット法で解析した (D)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Mori (他7名) Osamu Shimozato	4. 巻 11
2. 論文標題 CD133 prevents colon cancer cell death induced by serum deprivation through activation of Akt mediated protein synthesis and inhibition of apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1382-1394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 下里 修
2. 発表標題 A cancer stem cell marker CD133 suppresses colon cancer cell death triggered by serum deprivation.
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	井内 俊彦 (IUCHI TOSHIHIKO) (80370881)	千葉県がんセンター (研究所)・脳神経外科・部長 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------