

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591978

研究課題名(和文) ROS産生からみたCD133陽性腫瘍細胞の癌幹細胞性と大腸がん治療への基盤研究

研究課題名(英文) Functional analysis of CD133 in the maintenance of stemness mediated by ROS production in colon cancer cell.

研究代表者

早田 浩明 (Souda, Hiroaki)

千葉県がんセンター(研究所)・医療局・消化器外科・研究員

研究者番号：90261940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞マーカーCD133の癌幹細胞性維持における機能を検討した。CD133のチロシンリン酸化は、ヒト大腸がん細胞の異種移植腫瘍ならびにスフェアの形成を亢進した。さらに、CD133との結合分子として受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素PTPRKを新たに同定し、チロシン脱リン酸化によるCD133の機能抑制を見出した。また、PTPRKは大腸がん患者の予後因子である可能性が示された。以上から、新規大腸がん治療としてCD133のチロシンリン酸化の抑制の応用が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As tyrosine residues of CD133 are phosphorylated in human colon cancer-derived cells, we sought for its functional significance in colon carcinogenesis. Consequently, we found that CD133 phosphorylation enhances xenograft tumor growth and sphere formation of colon cancer-derived cells. Additionally, we identified receptor-type protein tyrosine phosphatase (PTPRK), a novel binding-partner of CD133, which dephosphorylates CD133 and thereby suppressing CD133-mediated oncogenic function. Indeed, lower PTPRK expression significantly correlated to the poor prognosis of colon cancer patients with higher expression of CD133. Thus, our present findings strongly suggest that inhibition of CD133 phosphorylation is a crucial issue for improving colon cancer treatment in future.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード：癌幹細胞 CD133 活性酸素種

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞仮説

近年、種々の固形腫瘍細胞においても幹細胞様の性質を示し、免疫不全マウスでの腫瘍形成能力の高い細胞群の存在が続々と報告された (Polyak K *et al. Nature Med* 2006 など)。これらの研究から、幹細胞が正常な個体や組織を形成する過程を発がんにいたる過程に見立て、固形腫瘍においても、単一の癌幹細胞から複雑な階層構造を持つがん組織が生じる、という「癌幹細胞仮説」が提唱されている。当該細胞は、造血幹細胞と同様の高い色素排出能を備える細胞集団に含まれることから、化学療法後の再発や転移といったがんの難治性をもたらすと考えられている。

大腸がんでは、EpCAM/CD44 あるいは CD133 を指標にして癌幹細胞の候補となる細胞亜集団の存在が報告された (Todaro M *et al. Cell Stem Cell* 2007, Vermeulen L *et al. PNAS* 2008 など)。近年では、マーカー分子として、CD13 (Aminopeptidase N) などの新たな候補分子が報告され始めているが、依然として、腫瘍再構築能力の高い細胞亜群が単離されたというのが現状である。

2) 癌幹細胞関連分子としての CD133

CD133 は、骨髄に存在する CD34 陽性造血幹細胞が発現する 5 回膜貫通型の I 型細胞表面分子として同定され (Yin AH *et al. Blood* 1997)、マウス小腸陰窩底部の腸上皮幹細胞など、多くの組織幹細胞や前駆細胞で発現が見られる (Zhu L *et al. Nature* 2009)。また、脳腫瘍などの CD133 陽性細胞は高い腫瘍再構築能力と分化能を示すことから、癌幹細胞を規定するマーカーの有力な候補として考えられている (Singh SK *et al. Oncogene* 2004)。CD133 ノックアウトマウスは網膜機能の維持に機能することが示された (Zacchigna S *et al. J Neurosci* 2009)。また、CD133 は C 末端のチロシン残基が Src ファミリー分子によってリン酸化されることが報告された (Boivin D *et al.*

Biochemistry 2009)。しかし、このリン酸化の意義や、自己複製・治療抵抗性・腫瘍形成といった癌幹細胞性に対する CD133 の機能は、十分に解明されていない。さらに、CD133 は癌幹細胞マーカーの有力な候補であるにもかかわらず、予後因子としてのパワーが強いとする報告 (Takahashi S *et al. Oncology Rep* 2010) と相対的に弱いとする報告 (Kojima M *et al. Cancer Sci* 2008) があり、組織像に加えて、新たなパラメーターの検討が必要である。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト大腸がん臨床検体を用いて、1) 腫瘍組織中の EpCAM/CD44/CD133 の 3 重陽性かつ ROS 低産生腫瘍細胞の存在率と予後との再評価、2) CD133 が癌幹細胞の治療耐性を高める分子機構としての PI3 キナーゼ/ROS 産生へのシグナル伝達機構、および 3) CD133/PI3 キナーゼ経路を阻害する分子の探索から、癌幹細胞を標的とした大腸がんの診断および治療法の開発基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

臨床検体の採材は、千葉県がんセンターにおいて手術摘出され、インフォームドコンセントの得られた患者由来の大腸がん組織を用いた。このことについては、千葉県がんセンター内に設置された倫理審査委員会による審査を受け、すでに承認を得ている。

内在性 CD133 発現のノックダウンあるいは外因性 CD133 の強制発現はレンチウイルスを用いて shRNA あるいは cDNA を大腸がん細胞に導入した。当該細胞の ROS 産生レベルは蛍光試薬 DCFDA の蛍光強度を指標にして検討した。さらに、癌細胞性の検討はヌードマウス皮下に接種した場合の腫瘍形成能力、足場非依存的細胞増殖、および *in vitro* スフェア形成を指標としてした。さらに、当

該細胞を用いて、CD133 のリン酸化、腫瘍形成に深く関与する AKT キナーゼや β -カテニンの働きを *in vitro* で解析した。

CD133 と結合する蛋白質は酵母 Two-hybrid 法で探索した。5 段階のスクリーニングから候補遺伝子を単離し、その中から受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素 PTPRK に焦点を当てて解析した。

4. 研究成果

(1) 腫瘍組織中の EpCAM/CD44/CD133 の 3 重陽性腫瘍細胞の ROS 産生に関する解析
大腸がん培養細胞株およびヒト大腸がん臨床検体を用いて、CD133 発現と ROS 産生レベルについて検討した。その結果、CD133 ノックダウン細胞は、コントロール細胞と比較して平常時の ROS 産生レベルに大きな差が見られなかったが、過酸化水素による酸化ストレス条件下での ROS 産生レベルが上昇していた。このことから、CD133 は大腸がん細胞における酸化ストレス耐性に機能していることが示唆された。そこで、ヒト大腸がん組織における CD133 発現と ROS 産生との関連性をフローサイトメトリー法で検討した。ヒト大腸がん組織における CD133 発現細胞は、多くの腫瘍での癌幹細胞マーカーとして報告されている EpCAM と CD44 を同時に発現することが、明らかになった。また、CD133 陽性細胞の CD44 発現は CD133 陰性細胞のそれと比較して高かった (図 1)。CD44 は胃がん細胞において酸化ストレスの回避機構に関与することが報告されている。したがって、ヒト大腸がん組織においても、CD133 発現は CD44 を介して酸化ストレス耐性を発揮させる可能性が示唆された。

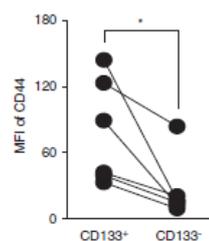


図 1. ヒト大腸がん初代細胞における CD133 と CD44 の発現。大腸がん組織から単離した初代細胞をフローサイトメトリーで解析した。

(2) CD133 のチロシンリン酸化の生物学的意義

ヒト大腸がん培養細胞株およびヒト大腸がん臨床検体を用いて、CD133 と PI3 キナーゼ経路との機能的連携の有無を検討した。まず、ヒト大腸がん初代培養細胞に CD133 を過剰発現させた場合、培養細胞株と同様に下流の AKT リン酸化は亢進した (図 2)。

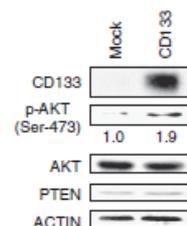


図 2. CD133 を強制発現させたヒト大腸がん初代細胞における AKT リン酸化。レンチウイルスを用いて、大腸がん組織から単離した細胞に CD133 を過剰発現させ、図に示した蛋白質をウェスタン法で解析した。

次に、CD133 のカルボキシル末端にある二つのチロシン残基 (828 番目と 852 番目) のリン酸化レベルを検討した。大腸がん由来 HT-29 細胞を EGF で刺激したところ、CD133 のチロシンリン酸化が誘導された。さらに、ヒト大腸がん由来 SW480 細胞に野生型 CD133 遺伝子 (CD133-WT) を導入したところ、AKT リン酸化レベルが上昇した。そこで、当該チロシン残基をグルタミン酸に置換した変異型 CD133 遺伝子 (CD133-EE、リン酸化を模倣) を SW480 細胞に導入した。

CD133-EE の発現は当該細胞の AKT リン酸化を亢進した。ところが、当該チロシン残基をフェニルアラニンに置換した変異型 CD133 遺伝子 (CD133-FF、リン酸化の消失) を発現させた細胞では AKT リン酸化は減弱した。またこのリン酸化は、下流の AKT リン酸化を活性化するだけでなく、ヌードマウス皮下腫瘍モデルでの腫瘍形成速度、ならびにスフェア形成速度をも上昇させた (図 3A および 3B)。これらの結果から、CD133 のチロシンリン酸化の持つ生物学的意義を初めて見出した。

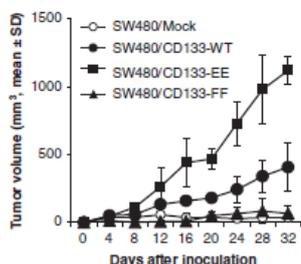


図 3A. 変異 CD133 を強制発現させたヒト大腸がん由来 SW480 細胞の異種移植腫瘍形成。各細胞をヌードマウス皮下に接種し、図に示した期間の腫瘍サイズを測定した。

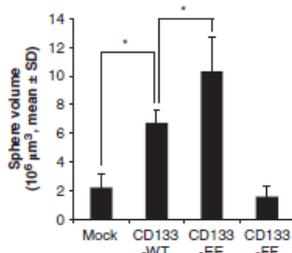


図 3B. 変異 CD133 を強制発現させたヒト大腸がん由来 SW480 細胞のスフェア形成。各細胞からスフェア形成を誘導し、7 日後の細胞塊の大きさを測定した。

(3) 新規 CD133 結合分子の同定と大腸がん進展における当該分子の機能解析

チロシン残基のリン酸化は多くの生物反応を惹起することが知られる。そこで、CD133 のカルボキシル末端部と会合し、PI3 キナーゼの活性化を制御するアダプター分子を酵母 Two-hybrid システムを用いて探索

したところ、複数の候補蛋白質が同定された。それらの中から細胞膜への局在性ならびにその機能を根拠として受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素 PTPRK に着目し、大腸がんにおけるその機能を解析した。PTPRK は、大腸がん由来 Caco-2 細胞において CD133 と細胞膜上で共局在し、その細胞内のフォスファターゼドメインを介して CD133 のカルボキシル末端部と直接会合していた。さらに CD133 でリン酸化される二つのチロシン残基のそれぞれは PTPRK の標的となり、直接脱リン酸化されることを見出した。さらに、この脱リン酸化反応は、CD133 シグナルの下流にある AKT リン酸化を減弱した (図 4)。したがって、PTPRK による CD133 の脱リン酸化は CD133 の機能を抑制的に制御する可能性が示唆された。つづいて、CD133/PTPRK 経路が大腸がんの進展に与える影響を検討するため、すでに報告のある大腸がんコホートの臨床情報を用いて、CD133 および PTPRK の発現量が無再発生存期間 (RFS) に与える影響を検討した。その結果、ヒト大腸がん組織における CD133 の高発現および PTPRK の低発現が患者の RFS の短縮につながることを示された。さらに、CD133 高発現の患者群においても PTPRK の低発現は RFS を短縮した。これらの結果をまとめると、PTPRK は脱リン酸化を介して、CD133 の持つ腫瘍形成を増強する機能を抑制している可能性が示唆された (図 5)。

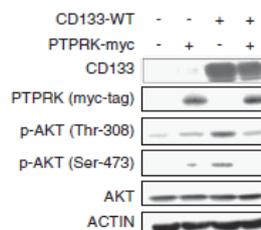


図 4. PTPRK による CD133 依存的 AKT リン酸化誘導の低下。CD133 と PTPRK を同時に過剰発現させ、AKT リン酸化レベルをウェスタン法で解析した。

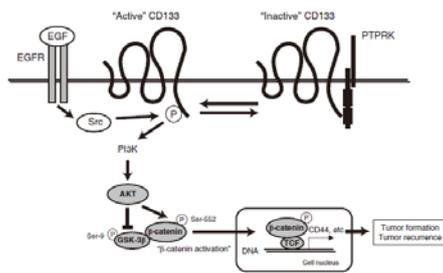


図 5. 本研究のまとめ。

(4) 得られた成果の国内外での位置づけと今後の展望

難治性がんに対する治療法を開発する上で、癌幹細胞の特性の理解は重要な課題である。CD133 は癌幹細胞を特定するマーカー分子として研究初期から注目されている分子であるが、腫瘍細胞に癌幹細胞性をもたらす作用およびその分子機構は不明であった。Boivin らによって Src キナーゼによる CD133 のチロシンリン酸化が見出され (Boivin *et al.* Biochemistry 2009)、Wei らはグリオーマの病期の進展に伴って CD133 のチロシンリン酸化レベルが上昇することを報告した (Wei Y *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2013)。これらの先行研究に対して本研究は①CD133 が腫瘍細胞に癌幹細胞性を付与する分子機構の一部として PI3K/AKT/ β -カテニン経路を利用すること、②CD133 のチロシンリン酸化の生物学的意義を新たに見出し、③CD133 に直接結合する分子として PTPRK を同定し、PTPRK による CD133 機能の抑制が大腸がんの進展に影響を与えることを見だし、これを世界に先駆けて報告した (Shimozato O *et al.* Oncogene 2014)。このことは、CD133 の特異的機能抑制は癌幹細胞を標的とした癌治療開発の標的となりうる可能性を示唆すると考える。一方、PTPRK は先行研究からがん抑制遺伝子である可能性が示されている (Starr TK *et al.*, Science 2009)。また近年、急性リンパ性白血病細胞では DNA メチル化によって PTPRK 発現が抑制されており、

DNA 脱メチル化剤による PTPRK 発現の再活性化は腫瘍細胞の細胞死を誘導することが示された (Stevenson WS *et al.* Leukemia 2013)。しかしながら、PTPRK の生理機能は不明な点が多いので、腫瘍組織における PTPRK の発現や酵素活性の調節機構、さらには CD133/PTPRK 経路の機能といった基礎研究の進展は、大腸がん治療の開発に発展する可能性が示唆され、今後の研究が期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

Shimozato O (14 人中 1 番目), Souda H (14 人中 4 番目), Receptor-type protein tyrosine phosphatase κ directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene* 2014,1-12, DOI: 10.1038/onc.2014.141、査読有

早田浩明 (他 9 名)、同時多発遠隔転移のある大腸癌治療への取り組みと予後因子。癌の臨床 59 巻、2013 年、623-627、査読なし。

[学会発表] (計 2 件)

下里 修 (他 5 名)、CD133 plays roles in keeping the undifferentiated status of human colon cancer cells via PI3K/AKT activation. 第 70 回日本癌学会学術集会、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場

下里 修、早田浩明 (他 4 名) 膜結合型チロシン脱リン酸化酵素 PTPRK によるチロシン脱リン酸化はがん幹細胞マーカー CD133 の機能を負に制御する。第 72 回日本癌学会学術集会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早田 浩明 (SOUDA HIROAKI)

千葉県がんセンター・医療局消化器外科
主任医長

研究者番号：90261940

(2) 研究分担者

下里 修 (SHIMOZATO OSAMU)

千葉県がんセンター (研究所)・発がん研究グループ

上席研究員

研究者番号：30344063