

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23800055

研究課題名 CD133 陽性卵巣癌細胞の足場非依存的増殖に必須な新規分子機構の解明

研究課題名 Understanding the molecular mechanism required for an anchorage-independent growth of CD133-positive ovarian cancer cells

## 研究代表者

荒木 真理人 (ARAKI MARITO)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80613843

## 研究成果の概要（和文）：

ヒトの腫瘍は、不均質な細胞集団により構成されており、その不均質さが、腫瘍の抗がん剤への抵抗性、腫瘍の再発に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では、がん性幹細胞マーカーCD133 陽性卵巣癌細胞に高発現する遺伝子として、HEG 遺伝子を同定し、HEG1-3 が、足場非依存的な増殖に重要な役割を果たすことを明らかにした。今後の解析により、CD133 陽性卵巣癌細胞における足場非依存的な細胞増殖に関わる詳細な分子メカニズムが明らかになることが期待される。

## 研究成果の概要（英文）：

Solid tumors are comprised of heterogeneous cells, which seem to play crucial roles in the establishment of drug-resistance and the recurrence of tumor. In this study, we identified genes highly expressed in CD133-positive ovarian cancer cells, named them HEG (Highly-expressed genes in CD133-positive cells), and showed that HEG1-3 play an important role for the anchorage-independent cell growth. Further studies would reveal more precise molecular mechanisms of the anchorage-independent cell growth in CD133-positive ovarian cancer cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：腫瘍生物学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：CD133、卵巣癌、足場非依存性、がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

1994 年に John Dick のグループにより、急性骨髄性白血病細胞中に少数の幹細胞が存在するというモデルが提唱され(Lapidot, T. et al, Nature, Vol.367, p645-8)、以後、白血病においては、正常な血球細胞の分化と

同様に、白血病幹細胞から段階的分化を経て、白血病細胞が形成されることを支持する報告が多数なされている。また、多くの固形腫瘍においても、腫瘍中の一部の細胞集団だけが、腫瘍を再構築する能力を有することが報告されている。しかし、固形腫瘍の中には、

大部分の腫瘍細胞が腫瘍を再構築できるものが報告されていることや(Quintana, E., et al, Nature, Vol. 456, p. 593-9)、多段階モデルではなく確率モデルを支持する報告もある(Odoux, C., et al, Cancer Res, Vol. 68, p. 6932-41)。

ただし、どちらのモデルにおいても、腫瘍が形質の異なる不均質な腫瘍細胞集団により形成されている事は、組織学的にも細胞生物学的にも明らかである。しかし、腫瘍細胞中の特定の細胞集団の有する形質が、どのような分子メカニズムの上で成立しているかという点については、未知な部分多く残されている。そして、このような分子メカニズムの解明は、腫瘍の不均質性の理解による科学的知識の増大だけでなく、腫瘍の診断や治療への応用が大いに期待される。

## 2. 研究の目的

ヒトの腫瘍は、不均質な腫瘍細胞により構成されており、その不均質さが、腫瘍の抗がん剤への抵抗性、再発に重要な役割を果たしていると考えられている。これらの細胞の中で、腫瘍組織を再構築する能力を有する腫瘍細胞は、幹細胞様の表現形を示す事から、がん性幹細胞と呼ばれている。がん性幹細胞は、表面抗原マーカーを用いて、ある程度分離濃縮することができるが、なぜ、それらの細胞が他の腫瘍細胞よりも高い薬剤耐性能や腫瘍再生能を有しているかについては、未解明な部分が多い。

本研究では、がん性幹細胞マーカーCD133を不均質に発現する卵巣癌細胞株をモデルに用いて、CD133 陽性卵巣癌細胞に特異的に見られる、足場非依存的増殖に必須な、新規の分子基盤を明らかにすることを研究目的とした。

## 3. 研究の方法

がん性幹細胞研究は、主に、患者由来の腫瘍から得られた腫瘍細胞を用いて研究されている。これらの腫瘍細胞は、免疫不全マウスへの移植により、維持や増殖が可能であるが、試験管内での培養は容易ではない。そのため、がん性幹細胞特異的に維持されている、腫瘍形成に必要な機構について研究を行なうことは、困難である。

そこで、申請者は、培養や様々なアッセイが容易に行なえる培養細胞株中に、がん性幹細胞に存在する機能を研究するモデルとなるような細胞株の探索を行なった。すでに、卵巣癌細胞株の中に、卵巣癌を含む上皮性腫瘍のがん性幹細胞マーカーとして頻用されるCD133に陽性の細胞が、陰性細胞へと段階的に分化するとの報告があったことから(Baba, T., et al, Oncogene, Vol. 28, p209-18)、これらの細胞を入手し、CD133 陽

性と陰性の細胞集団をセルソーターにより分離した後、軟寒天培地中に植え込み、足場非依存的な細胞増殖能の違いについて検討を行なった。その結果、図1のように、CD133 陽性細胞は、陰性細胞に比べて、軟寒天培地中においても、強い増殖能を有することが確認された。これは、CD133 陽性細胞が、足場を失ったときに誘導されるアノイキスに対して、抵抗性を獲得していると考えられる。つまり、均質であると通常考えられる細胞株の中においても、形質の明らかに異なる細胞集団が混在していることが示された。

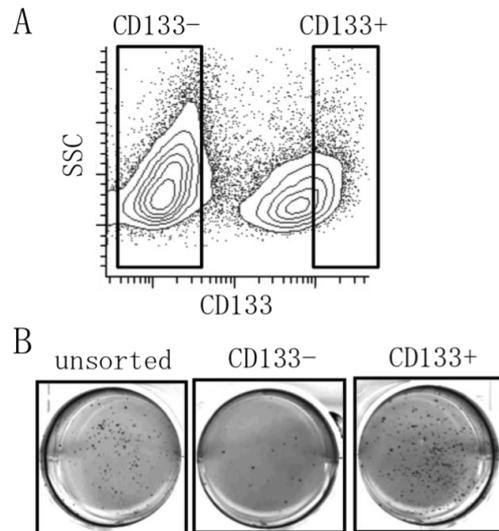


図1：卵巣癌細胞のCD133による分離  
卵巣癌培養細胞株をCD133により陽性群と陰性群に分離し、黒枠内の細胞について(A)、軟寒天培地中における足場非依存的細胞増殖能について検討したところ、CD133 陽性細胞は陰性細胞に比べて有為に高い、増殖能を示した(B)。

## 4. 研究成果

つづいて、このようなCD133 陽性細胞特異的な足場非依存的な細胞増殖能が、どのような分子メカニズムにより獲得されているのかを明らかにする目的で、CD133 陽性細胞群とCD133 陰性細胞群をセルソーターにより分離し、それぞれの細胞集団からtotal RNAの抽出を行なった後、affimetrix社のマイクロアレイを用いて、遺伝子発現プロファイリングを行なった。その結果、CD133 陽性卵巣癌細胞に高発現する遺伝子を同定し、HEG(Highly-expressed genes in CD133-positive cells)1-10と名付けた。

HEG1-10 遺伝子のうち、HEG1から3は、固形腫瘍における機能が明らかになっていないことから、さらに解析を進めた。まず、HEG1の機能を明らかにする目的で、HEG1 遺伝子発現の抑制を行なった。Sigma社のレンチウイ

ルスベクターpLK01に、HEG1に対するshRNA配列を組み込んだ後、ヘルパーベクターgag/polとVSVGと共に293T細胞にトランスフェクションし、ウイルスを産生させた。続いて、産生されたウイルスをCD133陽性の卵巣癌細胞に感染させ、遺伝子の発現抑制を行ない、抑制効率をウエスタンブロット法により評価した後(図2A)、軟寒天培地中におけるコロニー形成や、液体培地中における細胞増殖について、解析を行なった。その結果、図2に示すように、HEG1の発現が抑制された細胞では、軟寒天中のコロニー形成能が消失していた。また、HEG1の発現抑制は、細胞増殖を停止させるわけではないものの、液体培地中において、細胞増殖のスピードが著しく低下していた。これらのことから、HEG1が、CD133卵巣癌細胞の増殖や足場非依存的な増殖に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

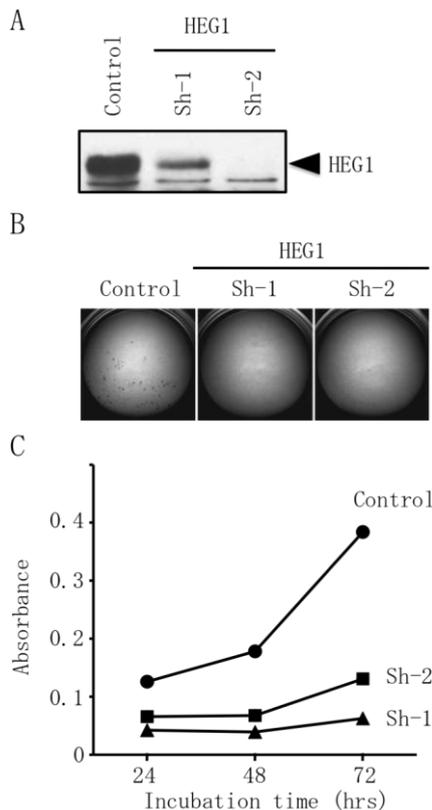


図2: HEG1はCD133陽性卵巣癌細胞の増殖に重要な役割を果たしている  
レンチウイルスベクターを用いてnon-targeting shRNAもしくはHEG1に対する2つの異なるshRNA配列を細胞に導入し、発現させた。shRNAによりHEG1蛋白質の発現は、著しく低下した(A)。HEG1遺伝子の発現抑制は、軟寒天培地中のコロニー形成能(B)や液体培地中の増殖能(C)を著しく阻害した。

同様の手法を用いて、HEG2,3についても解析を行ない、HEG2,3共に、HEG1同様に発現を抑制させた細胞において、増殖速度の低下や軟寒天培地中でのコロニー形成能の消失を見いだした。これらのことから、HEG1-3は、CD133陽性卵巣癌細胞の増殖や足場非依存的な増殖になんらかの役割を果たしていることが強く示唆された。

一方、shRNAを用いた遺伝子発現抑制実験では、shRNAの過剰発現により、標的遺伝子以外の発現異常が引き起され、それがアッセイの結果として評価されることが起きることが知られている(off-target効果)。そこで、足場非依存的な増殖に必要と判定されたHEG1-3遺伝子に関して、shRNAに非感受性のサインレンス変異を導入したcDNAを発現させ、shRNA発現下においても、足場非依存的な増殖能の再獲得が観察されるか検討し、足場非依存的増殖に必須な遺伝子としての定義付けを試みた。

膜蛋白質であるHEG-1とHEG-3については、N端もしくはC端にエピトープタグを着け、複数の異なる強さの発現プロモーターの下流に挿入し、発現を試みたが、発現の確認はかろうじてできたものの、膜への局在は確認できなかった。これは、蛋白質の末端構造がHEG1や3の膜への局在を制御しているため、エピトープタグの付加により、膜への局在のプロセスから外れてしまったためと考えられた。HEG2についても同様の実験を行ない、HEG2の卵巣癌細胞における足場依存的な増殖に必須な遺伝子としての定義付けを行なっている。今後の研究により、CD133陽性卵巣癌細胞における足場依存的な細胞増殖に関わる詳細な分子メカニズムが明らかになることが期待される。

## 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1件)

Yoshitaka Sunami, Marito Araki, Yumi Hironaka, Soji Morishita, Masaki Kobayashi, Ei Leen Liew, Yoko Eda Hiro, Miyuki Tsutsui, Akimichi Ohsaka, Norio Komatsu, Inhibition of the NAD-dependent protein deacetylase SIRT2 induces granulocytic differentiation in human leukemia cells, PLoS One. 8(2):e57633, 2013, 査読有

[学会発表] (計3件)

Yoshitaka Sunami, Marito Araki, Soji Morishita, Yumi Hironaka, Yoko Eda Hiro, Akimichi Ohsaka, Norio Komatsu, Inhibition of the NAD-dependent protein deacetylase SIRT2 induces granulocytic

differentiation in human leukemia cells、  
文部省新学術領域国際シンポジウム「細胞運  
命制御」、2012年11月6～7日、京都

Yoshitaka Sunami, Marito Araki, Soji  
Morishita, Yumi Hironaka, Yoko Edahiro,  
Akimichi Ohsaka, Norio Komatsu、The  
Sirtuin inhibitor induces APL cell  
differentiation、The 3rd JSH International  
Symposium in Kawagoe、2012年05月26日  
～2012年05月27日、川越

Yoshitaka Sunami, Marito Araki, Soji  
Morishita, Yumi Hironaka, Yoko Edahiro,  
Akimichi Ohsaka, Norio Komatsu、The SirT1  
Inhibitor Tenovin-6 Induces Monocytic  
Differentiation in APL Cells、53回米国  
血液学会(53rd. ASH annual meeting)、2011  
年12月10日、サンディエゴ

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：急性前骨髄性白血病治療薬のスクリー  
ニング方法

発明者：荒木真理人、小松則夫、角南義孝

権利者：荒木真理人、小松則夫、角南義孝

種類：特許

番号：特願2012-181369

出願年月日：2012年08月20日

国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

荒木 真理人 (ARAKI MARITO)

順天堂大学・医学研究科・准教授

研究者番号:80613843