

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659659

研究課題名(和文)脳腫瘍幹細胞マーカーCD133の生物学的機能の解明とその応用

研究課題名(英文)Elucidation of biological functions of CD133, a marker for brain tumor-initiating cells, and its application

研究代表者

井澤 一郎 (IZAWA, Ichiro)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号：20311441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：CD133は、神経膠腫の腫瘍幹細胞マーカーとして用いられているが、その生理学的機能の全容は明らかではない。CD133の機能を解明するために、プルダウン法、免疫沈降法や酵母two-hybrid法を用いて、CD133と結合する蛋白質の同定を試みた。一方、ヒト胎児性がん由来のNTERA-2細胞において、CD133は、上皮-間葉転換(EMT)の制御に關与するRNAスプライシング因子であるEpithelial Splicing Regulatory Protein 1 (ESRP1)の発現を抑制していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：CD133 is utilized as a marker for tumor-initiating cells of glioma, but its physiological function is still not well understood. To dissect the function of CD133, we tried to identify CD133-binding proteins, using pull-down methods, immunoprecipitation assays, and yeast two-hybrid techniques. On the other hand, we found that in human embryonic carcinoma NTERA-2 cells, CD133 suppresses the expression of Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 (ESRP1), an RNA splicing factor that regulates epithelial-mesenchymal transition (EMT).

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 がん幹細胞 CD133

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫(悪性グリオーマ)は抗がん剤や放射線治療に対する顕著な抵抗性を持ち、先人の様々な試みの甲斐もなく、未だその生存率を改善できない。最近、様々な血液腫瘍や固形がんにおいて、がん幹細胞が存在することが明らかとなり、悪性神経膠腫や髄芽腫などからも脳腫瘍幹細胞が分離・同定された。CD133(別名 prominin-1)は、様々な上皮細胞や血液幹細胞・前駆細胞に発現している5回膜貫通型蛋白質で、代表的な正常幹細胞の細胞表面マーカーであるが、脳腫瘍幹細胞はCD133陽性であることが報告された。すなわち、ヒト脳腫瘍組織から分離したCD133陽性細胞は、*in vitro*で自己複製能および多分化能を有し、また、少数のCD133陽性細胞を免疫不全マウスの脳内に移植すると脳腫瘍を形成できること(腫瘍形成能)が*in vivo*で示された。この後、脳腫瘍を含むいくつかの悪性腫瘍で、CD133は有用ながん幹細胞マーカーであることが判明したが、最近、脳腫瘍や大腸がんにおいて、CD133陰性細胞の中にも腫瘍形成能を有するがん幹細胞が存在することが報告され、その特異性に疑問が生じている。その上さらに問題である点は、CD133のがん幹細胞における機能を説明する分子メカニズムが全く解明されていないことである。すなわち、CD133が、なぜ正常幹細胞や脳腫瘍幹細胞で特異的に発現しているのか、あるいは、その発現が幹細胞の性質維持にどのように寄与しているのか、についての答えを現在誰ももち合わせていない。

一方、これまでに、CD133(別名 prominin-1)のノックアウトマウスの解析から、CD133が網膜の光受容体細胞の機能に重要な役割を果たしていることが判明している。一方、ヒトにおいても、CD133遺伝子の変異によって、遺伝性に網膜の黄斑部変性をきたす Stargardt 病の1タイプ(STDG4)が引き起こされることが報告されている。しかし、これらの網膜のフェノタイプを説明する分子メカニズムは不明である。また現時点で、この他にはCD133の機能を説明する確固たる実験結果は見当たらず、CD133が正常幹細胞や脳腫瘍幹細胞において果たしている役割も全く不明である。

2. 研究の目的

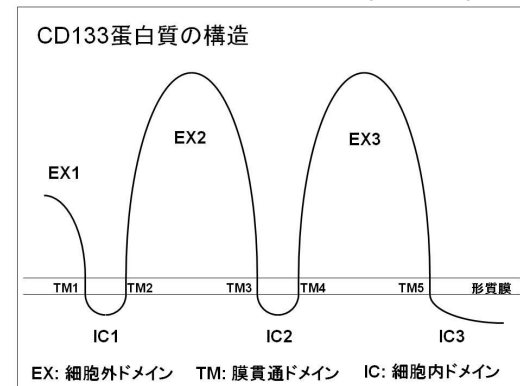
本研究において私共は、CD133と相互作用する分子を同定し、その生物学的機能を解明することを目指す。まず、CD133結合候補蛋白質の同定を行い、その後、その生化学的・分子細胞生物学的解析を行って、CD133の生理学的機能を明らかにしたい。さらに、CD133結合蛋白質が新しい脳腫瘍幹細胞マーカーとなりうるのかを検討する。

がん幹細胞は、長い休眠期をもつこと(ドーマンシー)や高い薬剤排出能およびDNA修復能を示すことなどにより、抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示すことがわかってき

ており、脳腫瘍においても脳腫瘍幹細胞をいかに撃退するかが新規治療法開発の最も重要なターゲットである。本研究によって、新規のCD133結合蛋白質を同定して新規の脳腫瘍幹細胞マーカーが得られれば、脳腫瘍幹細胞をより特異的・効率的に分離できることが可能となる。また、CD133の脳腫瘍幹細胞での機能解明により、脳腫瘍幹細胞がその性質を維持するための分子メカニズムを解明できれば、脳腫瘍幹細胞が示す抗がん剤および放射線治療に対する抵抗性の原因解明の糸口となり、将来的には、脳腫瘍幹細胞の弱点をついた治療法の開発につながる事が期待される。

3. 研究の方法

CD133は5回膜貫通型の膜蛋白質で、糖修飾(glycosylation)された2つの細胞外ループを持ち、また、細胞内ドメインは分断した短いペプチドで構成されている(図参照)。



本研究では、以下に述べる3種類の方法を用いて、CD133結合蛋白質の同定を試みる。

(1) アフィニティー精製法を用いた同定

Agilent社のInterPlay Mammalian TAP Systemというキットを用い、CD133にSBPタグとCBPタグという2つのタグをつけて細胞に強制発現し、SBPタグとCBPタグを利用して2回アフィニティー精製(tandem affinity purification)を行い、結合蛋白質を質量分析装置で解析する。まず、ヒトグリオーマ細胞であるU251MGに恒常的にCD133-SBP-CBPを発現する細胞を作製し、それを大量培養して細胞抽出液を作製し、CD133結合蛋白質をアフィニティー精製する。

セルフリーサイエンス社のコムギ無細胞蛋白質翻訳反応用試薬を用い、GSTタグをつけたCD133のリコンビナント蛋白質を試験管内で大量に作製する。そして、精製したGST-CD133とヒト胎児性がん由来細胞(NTERA-2細胞)より作製した細胞抽出液を反応させた後に、GST-CD133をアフィニティー精製してCD133結合蛋白質を分離し、質量分析装置で解析する。通常の大腸菌を用いたGST融合蛋白質の作製法では、CD133ほど大きな膜貫通蛋白質の精製はほとんど不可能

であるが、この系では高い純度で精製することが可能である。

(2) 免疫沈降法を用いた同定

内在性の CD133 を抗 CD133 抗体で免疫沈降し、結合蛋白質を質量分析装置で同定する。細胞としては、ヒト網膜芽細胞種由来の WERI-Rb-1 細胞、ヒト大腸がん由来の Caco-2 細胞、およびヒト胎児性がん由来の NTERA-2 細胞を用い、これらの 3 種の細胞を大量培養して、十分な量の CD133 を免疫沈降する。

(3) 酵母 two-hybrid 法を用いた同定

CD133 の全長を bait として用いた酵母 two-hybrid screening を行い、CD133 結合蛋白質を同定する。ライブラリーとしては、ヒト脳 cDNA ライブラリーを用いる。

(4) CD133 結合候補蛋白質の検討

上記の種々の方法で同定した CD133 結合候補蛋白質について、これらが *in vivo* で結合しているかを免疫沈降法にて確認する。

(5) ヒト胎児性がん由来 NTERA-2 細胞を用いた CD133 の機能解析

CD133 の機能解明の糸口を見出すため、ヒト胎児性がん由来 NTERA-2 細胞において、CD133 の発現を RNA 干渉法でノックダウンし、幹細胞性維持や上皮-間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) の制御に参与する種々の蛋白質の発現量の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) アフィニティー精製法を用いた CD133 結合蛋白質の同定

ヒトグリオーマ細胞である U251MG に恒常的に CD133-SBP-CBP を発現する細胞を作製し、Agilent 社の InterPlay Mammalian TAP System というキットを用い、CD133 結合蛋白質をプルダウンして、質量分析を行った。その結果、calnexin、Grp78 などの候補蛋白質が同定された。

コムギ無細胞蛋白質翻訳反応で作製した GST-CD133 とヒト胎児性がん由来細胞 (NTERA-2 細胞) より作製した細胞抽出液を反応させた後に、CD133 結合蛋白質をアフィニティー精製し、質量分析装置で解析した。この結果、poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP1)、Nucleolin、Ras GTPase-activating protein-binding protein 1 (G3BP1)、Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) などを CD133 結合候補蛋白質として同定した。

(2) 免疫沈降法を用いた CD133 結合蛋白質の同定

ヒト網膜芽細胞種由来細胞 (WERI-Rb-1 細胞)、ヒト大腸がん由来細胞 (Caco-2 細胞) およびヒト胎児性がん由来細胞 (NTERA-2

細胞) の細胞抽出液から内在性の CD133 を抗 CD133 抗体で免疫沈降し、結合蛋白質を質量分析装置で同定した。この結果、GRP78、Fascin、Actin などを CD133 結合候補蛋白質として同定した。

(3) 酵母 two-hybrid 法を用いた CD133 結合蛋白質の同定

CD133 の全長を bait として酵母 two-hybrid screening を行い、CD133 結合候補蛋白質として、SRSF3 (Serine/Arginine-Rich Splicing Factor、別名 SRp20)、TPP1 (別名 ACD) を同定した。

(4) CD133 結合候補蛋白質の検討

これまで、アフィニティー精製法や酵母 two-hybrid 法などで同定した上記の CD133 結合候補蛋白質の中で、CD133 の機能に参与する可能性が高いと推測されたものについて、内在性蛋白質のレベルで CD133 と結合するかを検討した。ヒト胎児性がん由来細胞 NTERA-2 細胞を用いて内在性の CD133 を免疫沈降し、CD133 免疫沈降物に SRSF3 (別名 SRp20)、calnexin、Grp78、Fascin などが含まれているかを見たが、現在のところ、内在性蛋白質のレベルでの結合は確認できていない。

(5) ヒト胎児性がん由来 NTERA-2 細胞を用いた CD133 の機能解析

CD133 の機能を解明するため、ヒト胎児性がん由来 NTERA-2 細胞において、CD133 の発現を RNA 干渉法でノックダウンし、種々の蛋白質の発現量を調べたところ、Epithelial Splicing Regulatory Protein 1 (ESRP1) の発現が上昇することを認めた。ESRP1 は、上皮特異的に発現する RNA スプライシング因子で、上皮-間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) の制御に参与しており、また、マウス ES 細胞の多能性 (Pluripotency) に影響を与えている可能性も報告されている分子である。これらのことは、CD133 が、ESRP1 の発現を抑制して、NTERA-2 細胞の間葉-上皮転換 (Mesenchymal-Epithelial Transition, MET) を阻害することで、NTERA-2 細胞の未分化能の維持に貢献している可能性を示唆している。

今後、CD133 がどのような分子メカニズムで ESRP1 の発現を抑制するのかについて探究し、CD133 の脳腫瘍幹細胞における役割を解明していきたいと考えている。

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)

Matsuyama, M., Tanaka, H., Inoko, A., Goto, H., Yonemura, S., Kobori, K., Hayashi, Y., Kondo, E., Itoharu, S., Izawa, I.

and Inagaki, M. Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 288: 35626-35635, 2013

Kasahara, K., Goto, H., Izawa, I., Kiyono, T., Watanabe, N., Elowe, S., Nigg, E.A. and Inagaki, M. PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3 γ and is required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Commun.* 4: 1882, doi: 10.1038/ncomms2879, 2013

〔学会発表〕(計3件)

Izawa, I. Interaction of Cell Polarity Regulator Scribble with Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4). 第72回日本癌学会学術総会. 2013年10月4日. パシフィコ横浜(横浜).

井澤一郎. 細胞極性制御因子 Scribble は MRP4/ABCC4 と相互作用する. 第65回日本細胞生物学会大会. 2013年6月20日. ウィンク愛知(名古屋).

Izawa, I. LAP family protein Scribble interacts with Multidrug Resistance Protein 4 (MRP4/ABCC4). 第71回日本癌学会学術総会. 2012年9月20日. ロイトン札幌(札幌).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center>

6. 研究組織

(1)研究代表者

井澤 一郎 (IZAWA, Ichiro)
愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長
研究者番号: 20311441

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: