

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462069

研究課題名(和文) 膵癌幹細胞におけるCD133依存性シグナルの解明とシグナル反応性miRNAの解析

研究課題名(英文) CD133 dependent signals and microRNAs in cancer stem cells

研究代表者

松原 修一郎 (MATSUBARA, Shyuichiro)

鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発研究センター・准教授

研究者番号：60199841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：幹細胞マーカーCD133の機能は十分に解明されていない。我々は膵癌細胞株Capan-1においてCD133の発現が幹細胞様形質と相関することを明らかにし、CD133高発現の亜株を樹立した。この高発現細胞の性質をCD133ノックダウン細胞と比較し、CD133発現が上皮間葉転換(EMT)を誘導することを確認した。両者で発現の変化するタンパクおよびmiRNAを解析し、EMT制御タンパクSlug(転写因子)、miR-30ファミリーのEMT誘導への関与が示され、さらに低酸素では低酸素反応の鍵レギュレーターHIF-1 α の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The molecular function of CD133 in the maintenance of cancer stem cells has not been elucidated. The CD133+ population of Capan-1 pancreatic cancer cell line exhibits cancer stem cell (CSC)-like properties. We established a CD133+ cell-rich subline from Capan-1 cells. Using this subline and the CD133 knocked down cells, we have shown that CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pancreatic cancer cells. The protein level of EMT regulating transcription factor Slug and the miR-30 family of microRNA level are increased in CD133+ cells, and the expression of these factors can enhance mesenchymal phenotype. In addition, the protein level of HIF-1 α , which plays a major role in cancer cell survival and aggressiveness in hypoxia, increases in CD133+ cells and may enhance the mesenchymal phenotype.

研究分野：消化器外科学

キーワード：CD133 癌幹細胞 膵臓癌 マイクロRNA 上皮間葉転換 (EMT) Slug HIF-1 miR-30

1. 研究開始当初の背景

膵癌は癌死の4位を占め、罹患者数はさらに増加の傾向を示している。いっぽうで5年生存率は現在も10%以下であり、最も難治性の癌のひとつとして新たな治療法の開発が求められている。こうした中で、転移再発の起点となる癌幹細胞が治療標的として注目され、幹細胞様性質を維持するしくみの解明が研究の焦点となっている。

細胞表面抗原CD133は5回膜貫通型の糖タンパクで、幹細胞マーカーとして広く利用されているが、どのような機能を持っているかは十分解明されていない。これまで、目の遺伝性疾患においてCD133の突然変異(R373C)のあることが報告されており、プロトカドヘリン21(視細胞特異的プロトカドヘリン)およびアクチンと免疫沈降で共沈してくること、また、C末端領域(細胞内ドメイン)のチロシン(Y828およびY852)がSrcファミリーのキナーゼでリン酸化されることなどが断片的に報告されていたが、細胞外ドメインに結合するリガンドが存在するのか、また、下流のシグナルは何か、などについて目立った論文は知られていなかった。

近年、大腸癌細胞Caco2などで、CD133の第1細胞内ドメイン(アミノ酸133-445)にデアセチラーゼHDAC6が結合し、β-カテニンの脱アセチル化(安定化)を介してWntシグナルに関与していること、また、グリオーマ細胞において、フォスフォイノシチド3-キナーゼ(PI3K)の調節サブユニットp85がCD133のC末端Y828のリン酸化部位に直接結合し、この結果グリオーマ幹細胞においてPI3K/Akt経路が選択的に活性化されていることが示された。これらの報告はCD133の細胞機能を考えるうえで興味深いものであるが、同様のことが他の細胞においても広く認められる一般的な現象なのか、さらには異なる組織由来の癌幹細胞においても共通に働いているしくみなのか、などについてはさらに検討が必要であり、その評価は未だ定まっていない。

我々は、CD133の発現が膵癌の予後や転移と相関があり(Maeda et al. 2008)、膵癌細胞株Capan-1においてCD133陽性細胞集団は癌幹細胞様の性質を示すこと(Hayashi et al. 2012)を明らかにしてきた。また、Capan-1細胞から運動能を指標として選別を繰り返し、遊走能および浸潤能の高い亜株Capan-1M9を樹立したが、この亜株はCD133高発現(CD133陽性細胞率90%以上)の細胞集団となっていた(Ding et al. 2012)。

2. 研究の目的

(1) 申請者らの樹立したCapan-1M9がCD133高発現細胞集団であることに着目し、この細胞を膵癌幹細胞様のモデル細胞として、CD133の機能を細胞レベルおよび分子レベルで明らかにする。

(2) 近年、種々の生命現象において重要な役

割を担っていることが明らかにされ、細胞の癌化や腫瘍の進展にも深く関与することが注目されているマイクロRNA(miRNA)の発現がCD133の発現で変化するか、また、膵癌幹細胞におけるCD133の機能に関与していないかを検討する。

3. 研究の方法

CD133高発現細胞Capan-1M9を膵癌幹細胞様のモデル細胞として、shRNAを用いてCD133ノックダウン細胞を作製し、両者の比較からCD133の作用を明らかにする。また、CD133によって発現の変化するmRNAおよびmiRNAを網羅的に解析し、明らかになったタンパク因子やmiRNAについてさらに解析をすすめる。

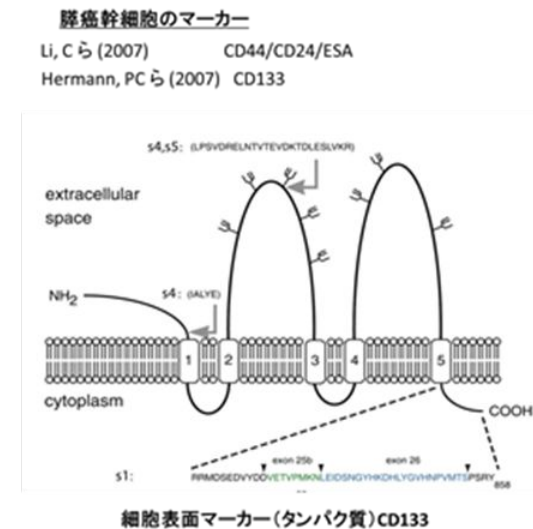


図1. 膵癌幹細胞マーカーとCD133の構造.

4. 研究成果

(1) CD133の発現は上皮間葉転換(EMT)を誘導する。

CD133高発現亜株Capan-1M9はCD133陽性細胞の比率が95%程度(図2a)となるとともに、親株であるCapan-1にくらべて間葉系マーカーのN-カドヘリン、フィブロネクチンのタンパクレベルが上昇し、さらに、EMT誘導因子Slugの発現も増加していた(図2b)。

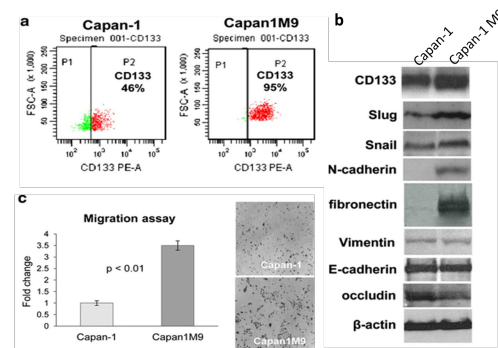


図2. CD133の発現はEMT(上皮間葉転換)と相関する。

上記のように、CD133の発現と膵癌細胞のEMTに相関があったことから、CD133がEMT

を誘導する可能性が考えられたので、これを確認するため、CD133 のノックダウンをおこなった。Capan-1M9 細胞にウイルスベクターを用いて、CD133shRNA と GFP あるいは GFP のみ (コントロール) を発現させた細胞 shCD133M9 および M9G を作製した。

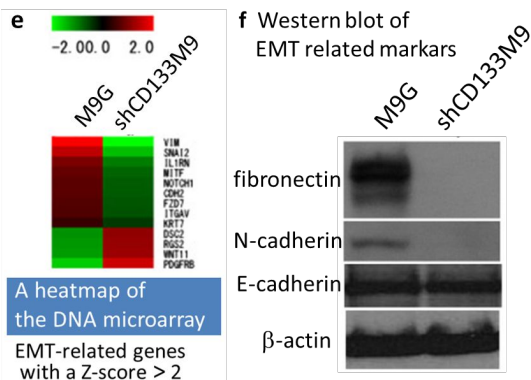
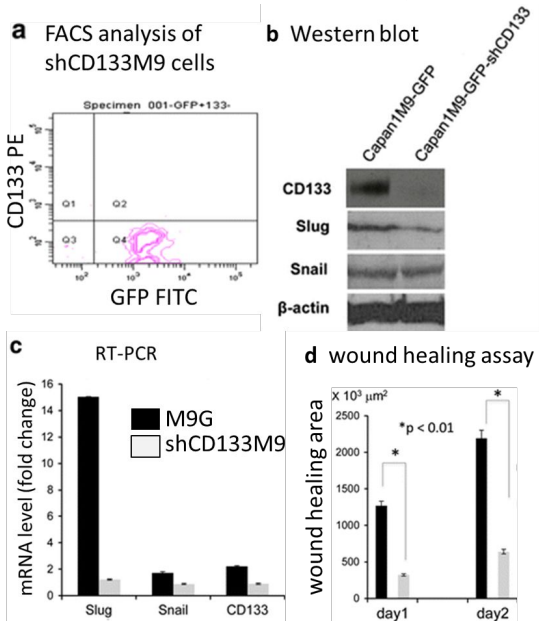


図3. CD133のノックダウンはEMTを抑制する。

CD133 ノックダウン細胞では遊走能が低下する (図 3d) とともに、間葉系マーカーの発現が抑制され (図 3f)、CD133 高発現細胞の EMT は CD133 の発現に依存していることが確認された。興味深いのは、この時 EMT 誘導因子 Slug の発現が大きく低下していること (図 3b、c、e) で、CD133 による EMT の誘導を Slug が仲介している可能性が考えられた。

(2) Slug は CD133 による上皮間葉転換 (EMT) 誘導を仲介する。

CD133 高発現細胞の EMT に対する Slug の作用を調べるため、Slug ノックダウン細胞 shSlugM9 を作製した。shSlugM9 細胞では、遊走能が低下する (図 4c) とともに、N-カドヘリンなどの間葉系マーカーの発現が低下した (図 4b、d)。したがって、Slug の発現は Capan-1M9 において、EMT に関与していると判断された。いっぽう、CD133 の発現は Slug

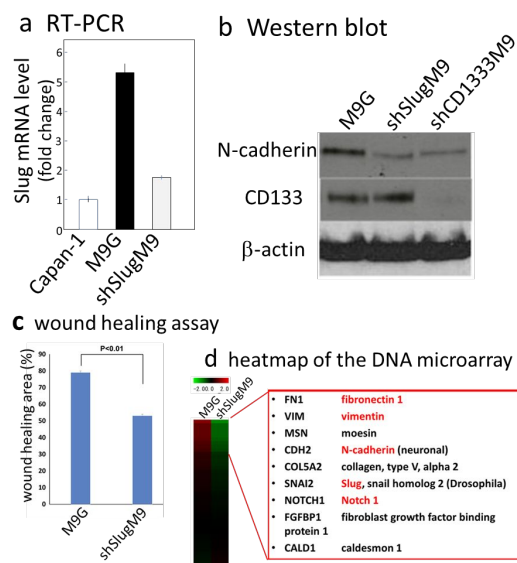


図4. Slug のノックダウンはEMTを抑制する。

のノックダウンによって変化しなかった (図 4b) ので、CD133 発現 Slug 発現誘導 EMT 誘導、というルートが考えられる。

(3) miR-30 は CD133 による上皮間葉転換 (EMT) 誘導を仲介する。

CD133 に依存した細胞内シグナルに miRNA が関与していないか調べるため、miRNA マイクロアレイ解析をおこない、CD133 高発現細胞 M9G と CD133 ノックダウン細胞 shCD133M9 で発現の変化する miRNA を調べた。

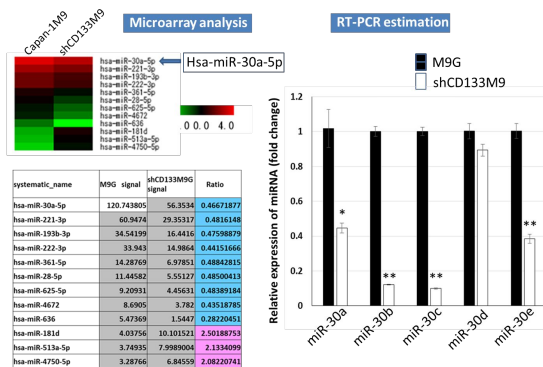


図5. CD133のノックダウンはmiR-30の発現を抑制する。

発現量を考慮して検討した結果、ノックダウン細胞では miR-30a-5p の発現が低下していた (図 5a)。そこで、RT-PCR によって miR-30 ファミリーの RNA レベルを調べたところ、miR-30a、b、c、e の発現量が低下していることがわかった (図 5b)。

次に、この miRNA の発現量の変化が細胞の表現型にどのような作用をするかをみるために、ウイルスベクターを用いて遺伝子導入し、miR-30a、miR-30b、miR-30c1 と RFP、あるいは RFP のみ (コントロール) を強制発現する細胞をつくった。これらの miR-30 強制発現細胞は、遊走能および浸潤能が上がる (図 6b、c) とともに、間葉系マーカーの発現が増

加し(図 5d)、EMT が促進されていると判断された。

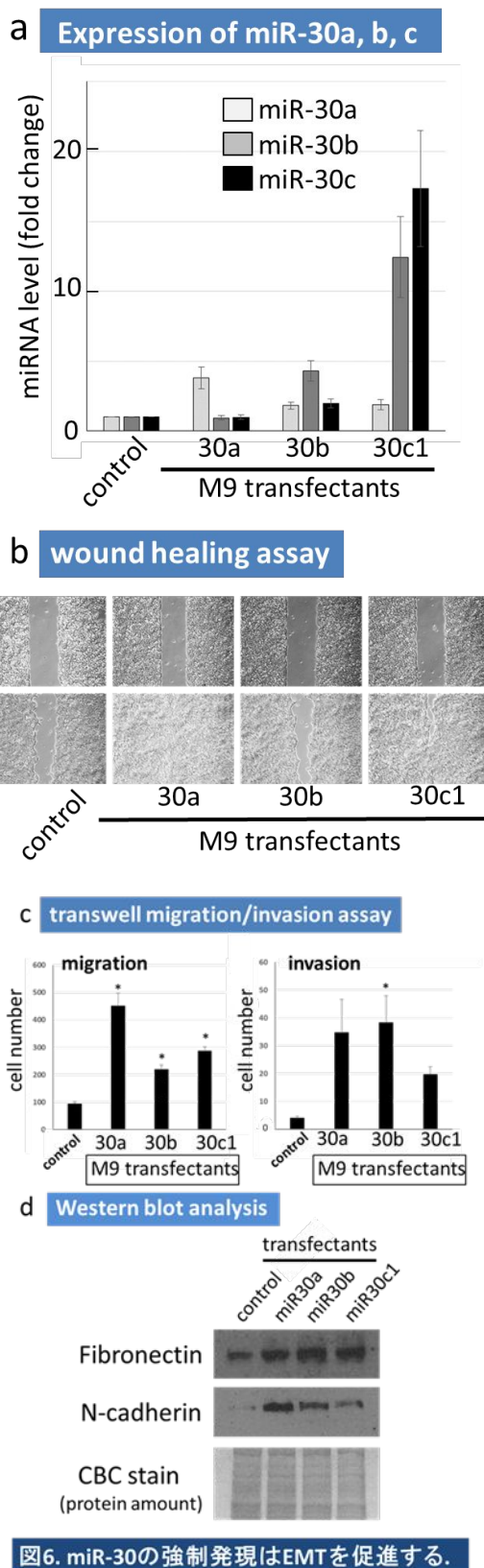


図6. miR-30の強制発現はEMTを促進する。

以上から、CD133 miR-30 発現誘導 EMT 誘導というルートが存在が考えられる。なお、TargetScanによる検索ではヒト CD133mRNA の 3' 非翻訳領域に mir-30 の標的配列が検出されるが、現在のところ miR-30 の発現による

CD133mRNA レベルの減少は確認できない。

(4) CD133 は低酸素条件下で HIF-1 の発現量を増加させる。

生体組織中の酸素濃度は 3-8%であり、大気中に比べると低酸素の状態にある。とくに、膀胱癌は間質反応が強いことが知られており、さらに低酸素となっているものと考えられる。HIF-1 α は低酸素状態で発現誘導(タンパクが安定化)され、HIF-1 β とヘテロダイマーを形成して低酸素反応のキーレギュレーターとして働いている。

HIF-1 α タンパクレベルに対する CD133 の作用を調べたところ、1%酸素下で CD133 ノックダウン細胞では HIF-1 α タンパク量が低下していることが明らかになった(図 7a)。

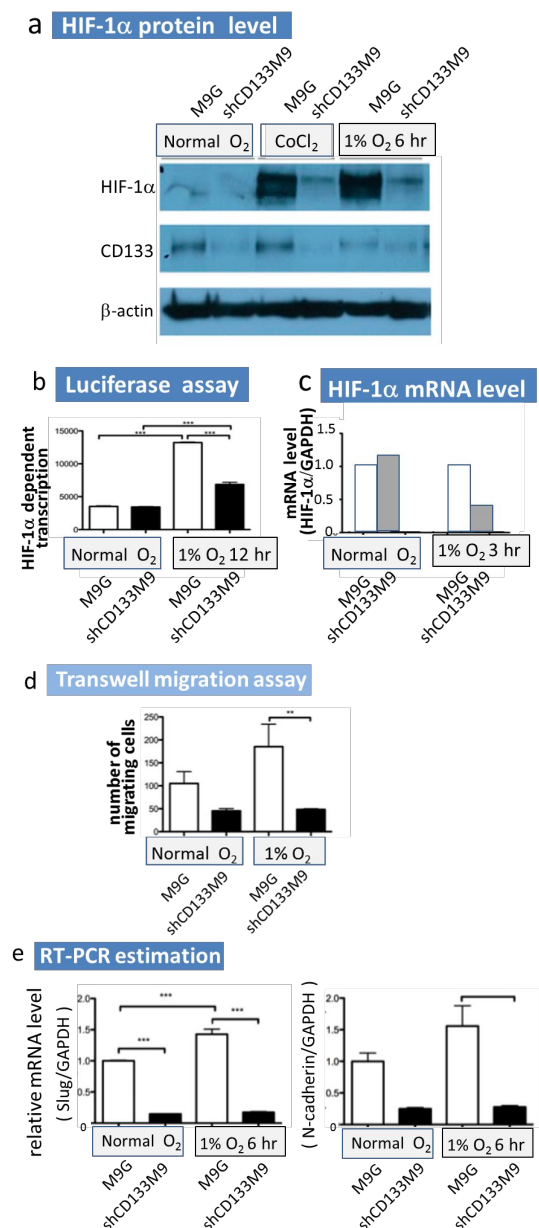


図7. CD133のノックダウンはHIF-1 α の発現を抑制する。

この結果、1%酸素下では CD133 高発現細胞 M9G の HIF-1 依存性転写はノックダウン細胞よりも高い(図 7b)。低酸素では HIF-1 α mRNA

レベルがノックダウン細胞で低下している(図7c)ので、このことがタンパク量の違いに反映している可能性がある。

CD133 高発現の M9 細胞では、低酸素で EMT 誘導因子 Slug の mRNA レベルが増加しており(図7e)、遊走能や間葉系マーカーの発現も増加する傾向がみられた。したがって、低酸素下での HIF-1 α 発現増強は EMT を促進している可能性がある。

これらの結果から考えると、低酸素下では、CD133 発現 HIF-1 α 発現誘導 Slug 発現誘導 EMT 誘導というルートの寄与が示唆される。

(5) 本研究をとおして明らかになった CD133 の機能・位置づけと展望

膵癌細胞 Capan-1M9 において CD133 は EMT を誘導する。CD133 の発現は EMT 誘導因子 Slug のタンパクレベル、miR30 ファミリーの miRNA レベルを上昇させ、これらが EMT の誘導を仲介している。また、低酸素条件では、CD133 は HIF-1 α のタンパクレベルを上昇させ、Slug の発現上昇を介して、EMT の誘導に寄与することが示唆された(図8)。

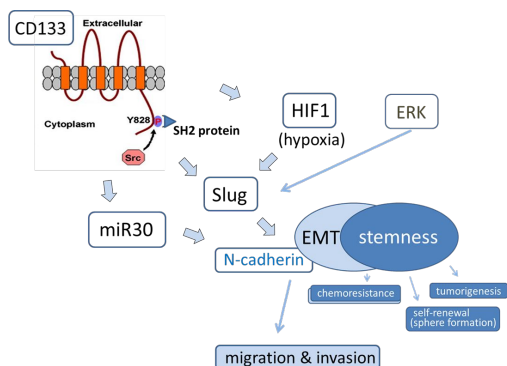


図8. CD133陽性膵癌細胞におけるEMT誘導。

Mani ら(2008)によって報告されて以来、EMT と癌幹細胞の関係については多くの論文があるが、我々が用いているモデル系についてどうなっているかは、今後さらに検討する必要がある。Slug や miR-30 の発現が薬剤耐性に影響を与えることはすでに確認している。

最近、ヒト大腸がん細胞において EGF 刺激が CD133 のリン酸化を誘導し(Shimozato et al. 2014)、また膵癌細胞で、CD133 が EGF レセプターと結合することが免疫沈降によって示され(Weng et al. 2016)、CD133 と EGF レセプター、さらに Src を含んだ 3 者の相互作用が一段と注目をあびるようになっている。下流のシグナルと想定されているのは Akt の活性化である。我々も CD133 高発現細胞 Capan-1M9 において mTOR (mammalian / mechanistic target of rapamycin) の 2 つの複合体 mTORC1 と mTORC2 が異なった作用で PI3K-Akt 経路に関係し、幹細胞様形質の維持に働いていることを示す結果を得ている(投稿準備中)。今回詳述した CD133 から、Slug、

miR-30、HIF-1 α を経て EMT に繋がる経路と PI3K-Akt-mTOR から幹細胞性の維持に繋がる経路の関係を明らかにしていくことによって、CD133 を起点とするシグナルの機能が明らかになり、新たな治療法の開発に資するものと考えられる。

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 10 件)

1. Maeda K, Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, Miyazaki Y, Tsukasa K, Hayashi T, Shinchi H, Natsugoe S, Takao S. (2016) CD133 Modulate HIF-1 Expression under Hypoxia in EMT Phenotype Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *Int J Mol Sci.* 17(7). pii: E1025. doi: 10.3390/ijms17071025. 査読有.

2. Tsukasa K, Ding Q, Miyazaki Y, Matsubara S, Natsugoe S, Takao S. (2016) miR-30 family promotes migratory and invasive abilities in CD133(+) pancreatic cancer stem-like cells. *Hum Cell.* 29(3):130-137. doi: 10.1007/s13577-016-0137-7. 査読有.

3. Miyazaki Y, Matsubara S, Ding Q, Tsukasa K, Yoshimitsu M, Kosai K, Takao S. (2016) Efficient elimination of pancreatic cancer stem cells by hedgehog/Gli inhibitor GANT61 in combination with mTOR inhibition. *Mol Cancer.* 15(1):49. doi: 10.1186/s12943-016-0534-2. 査読有.

4. Tsukasa K, Ding Q, Yoshimitsu M, Miyazaki Y, Matsubara S, Takao S. (2015) Slug contributes to gemcitabine resistance through epithelial-mesenchymal transition in CD133(+) pancreatic cancer cells. *Hum Cell.* 28(4): 167-174. doi: 10.1007/s13577-015-0117-3. 査読有.

5. Matsuo Y, Ding Q, Desaki R, Maemura K, Mataka Y, Shinchi H, Natsugoe S, Takao S. (2014) Hypoxia inducible factor-1 alpha plays a pivotal role in hepatic metastasis of pancreatic cancer: an immunohistochemical study. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 21(2):105-112. doi: 10.1002/jhbp.6. 査読有.

6. Ding Q, Miyazaki Y, Tsukasa K, Matsubara S, Yoshimitsu M, Takao S. (2014) CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer.* 13:15. doi: 10.1186/1476-4598-13-15. 査読有.

[学会発表](計 16 件)

1. 松原 修一郎、政 幸一郎、小原 徹、松山 隆美、高尾 尊身. mTOR 複合体

1(mTORC1) および 2(mTORC2)は CD133 陽性膵癌細胞の幹細胞様性質維持に異なる作用をもつ. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月 6 日 神戸国際展示場(神戸市).

2. 松原 修一郎、政 幸一郎、宮崎 優美、小原 徹、松山 隆美、高尾 尊身. mTOR 複合体 1(mTORC1) および 2(mTORC2)は CD133 陽性膵癌細胞の幹細胞様性質に關与する. 第 35 回日本ヒト細胞学会学術集会 2017 年 10 月 8 日 西之表市民会館(西之表市).

3. 前田 幸喜、丁 強、吉満 誠、桑畑 大作、宮崎 優美、政 幸一郎、林 知美、新地 洋之、夏越 祥次、高尾 尊身. 低酸素環境下における EMT 形質を有する膵癌幹細胞様性質を持つ細胞において CD133 は HIF-1 α の発現に關与する. 第 35 回 日本ヒト細胞学会学術集会 2017 年 10 月 8 日 西之表市民会館(西之表市).

4. 政 幸一郎、丁 強、宮崎 優美、松原 修一郎、上野 祥子、小原 徹、松山 隆美、高尾 尊身. CD133 陽性膵癌幹細胞様細胞において miR-30 family は遊走と浸潤を促進する. 第 35 回 日本ヒト細胞学会学術集会 2017 年 10 月 7 日 西之表市民会館(西之表市).

5. Matsubara S, Tsukasa K, Maeda K, Ding Q, Miyazaki Y, Obara T, Matsuyama T, Takao S. EMT inducing signals in CD133+ pancreatic cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 29 日 パシフィコ横浜(横浜市).

6. Matsubara S, Miyazaki Y, Tsukasa K, Obara T, Matsuyama T, Takao S. Hedgehog/GLI and mTOR signals in pancreatic cancer stem cells. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 6 日. パシフィコ横浜(横浜市).

7. Tsukasa K, Miyazaki Y, Ueno S, Obara T, Matsubara S, Yoshimitsu M, Matsuyama T, Takao S. The influence of miR-30 family to migration of a pancreatic cancer cell line, Capan-1. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日. 名古屋国際会議場(名古屋市).

8. Miyazaki Y, Yoshimitsu M, Tsukasa K, Matsubara S, Obara T, Ueno S, Matsuyama T, Takao S. CD133+ pancreatic cancer cells promote peritumoral fibrosis. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日名古屋国際会議場(名古屋市).

9. Matsubara S, Miyazaki Y, Tsukasa K, Obara T, Ueno S, Matsuyama T, Takao S. Significant signaling in KRAS downstream cascade maintaining the stem-like property of pancreatic cancer cells. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日名古屋国際会議場(名古屋市).

10. 松原 修一郎、政 幸一郎、宮崎 優美、小原 徹、高尾 尊身. 膵癌幹細胞と KRAS-mTOR 経路. 第 4 回 膵勉強会 2015 年 3 月 7 日. ホ

テルセントコスモ(鹿児島市).

11. Matsubara S, Miyazaki Y, Tsukasa K, Obara T, Ueno S, Takao S. Not only mTORC1 but also mTORC2 are involved in the function to maintain stem-like property of pancreatic cancer cells. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日. パシフィコ横浜(横浜市).

12. Tsukasa K, Matsubara S, Miyazaki Y, Obara T, Ueno S, Takao S. The role of miR-30a in the highly migratory pancreatic cancer cell line. 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日. パシフィコ横浜(横浜市).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 修一郎 (MATSUBARA Shyuichiro)
 鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発
 研究センター・准教授
 研究者番号：60199841

(2) 研究分担者

高尾 尊身 (TAKAO Sonshin)
 鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究
 員
 研究者番号：80171411

(3) 連携研究者

()
 研究者番号：

(4) 研究協力者

()