

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：87207

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07223

研究課題名(和文) がん幹細胞マーカーCD133とオートファジーの関連機構の解明

研究課題名(英文) Toward understanding the mechanism of the relationship between CD133 and autophagy

研究代表者

泉 秀樹 (IZUMI, HIDEKI)

地方独立行政法人佐賀県医療センター好生館(ライフサイエンス研究所)・ライフサイエンス研究所・部長

研究者番号：10397987

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：CD133は、幹細胞の膜貫通型タンパク質であり、一部細胞質にも局在することが報告されているが、細胞質CD133の作用機序と機能はこれまで不明のままであった。本研究では、細胞膜性CD133がHDAC6と相互作用し、ダイニンを介して内在化およびエンドソーム形成後に中心体周辺領域に輸送され、オートファジーの開始を阻害し、さらに、一次繊毛形成や神経突起伸長などの細胞分化を抑制した。またエンドソームCD133自身は、p62 / SQSTM1を介した選択的オートファジーによって分解されることがわかった。さらにエンドソームCD133は核のベータ・カテニンと協力して、非対称分裂を誘導した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの研究成果は、中心体近傍型のCD133エンドソームが癌細胞の未分化状態を維持する上で重要な役割を果たすことを示し、また、中心体近傍型のCD133エンドソームは、核のベータ・カテニンと協力して、オートファジー活性に基づく非対称分裂を誘導することを示し、がん幹細胞マーカーの新しい機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：CD133 is a transmembrane protein and has been recently reported to be localized in cytoplasm. However, the mechanism of action and function of cytoplasmic CD133 remains unknown. In this study, CD133 interacts with HDAC6 and is transported via the dynein-based transport system to the pericentrosome region. Subsequently, endosomal CD133 inhibits the initiation of autophagy, resulting in suppression of cell differentiation such as neurite outgrowth and primary cilia formation. Furthermore, endosome CD133 itself was found to be degraded by p62 / SQSTM1-mediated selective autophagy. Finally, endosomal CD133 cooperated with nuclear beta-catenin to induce asymmetric cell division.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：CD133 がん幹細胞 オートファジー 中心体 非対称分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞集団の中にごく少数存在し、この細胞が治療抵抗性のほか、がんの再発や転移の原因となることが強く示唆されている。

現在、様々ながんでがん幹細胞が発見されており、これらのがん幹細胞は、それぞれ特有の細胞表面タンパク質を発現しており、これらをごん幹細胞マーカーと呼ぶ。CD133は、当初、正常造血幹細胞および血液前駆細胞の細胞表面マーカーとして同定されたが、その後CD133は、脳腫瘍、大腸がん、肝細胞がん、肺がん、神経芽腫などの多くの固形腫瘍のがん幹細胞マーカーとして注目されるようになった。実際、上記のがん細胞集団のうち、CD133陽性の細胞集団は、CD133陰性の細胞集団に比べて自己複製能が高いほか、悪性度や予後と相関することが明らかになっている。

CD133は細胞膜を5回貫通する膜タンパク質であり、そのリガンドは依然不明のままであるが、細胞内ドメインをSrc-familyチロシンキナーゼによりリン酸化され、その結果PI-3K(Phosphoinositide 3-kinase)のp85サブユニットと結合し、Aktなどの下流に細胞増殖シグナルを促進する。また、CD133はヒストンデアセチラーゼ6(HDAC6)と結合することで安定化し、ベータ・カテニン(beta-catenin)による細胞核内での転写活性を高め、がん細胞の増殖を促進していることが報告されている。さらにCD133はオートファジーに関連していることがいくつかのがんで報告され始めているが、その分子機構の多くは依然不明のままであった。

興味深いことに私たちは、CD133が細胞内局在の変化によって、オートファジー活性が制御されることを見出した。また私たちは、がん幹細胞が非対称分裂する際にCD133が非対称に娘細胞に分配され、その際にオートファジーが深く関与している事実を突き止めた。

2. 研究の目的

(1) CD133が、どのようにして細胞膜局在から、細胞質や中心体に局在するようになるのか、その輸送メカニズムと生理的意義の解明

これまでの予備実験から、CD133の局在は、細胞内外の環境の違いによって、変化することがわかってきている。そこで、CD133が細胞内に分布するようになる際に、どのような機構で細胞内を移動し、生理機能を発揮しているのかを明らかにする。

(2) CD133のSrc-family kinaseによるリン酸化と細胞内局在変化のメカニズムの解明

細胞の種類によっては、Srcキナーゼの活性は異なる。そこで、Srcキナーゼの活性を上昇させたり、また逆に阻害剤などを用いることにより活性を低下させると、CD133の細胞局在がどのように変化するかを解析し、併せてCD133の輸送メカニズムとの関係を明らかにする。

(3) 中心体近傍局在するCD133がどのようにオートファジーと関連しているのか、そのメカニズムとその生理的意義の解明

上述のように私たちは、CD133が細胞内外の環境の変化によって、オートファジーの活性を制御していることを見出しているため、どのようなメカニズムでこのような制御が行われるのかを明らかにする。

(4) オートファジー活性に基づく腫瘍の不均一性に対するオートファジー誘導剤と抗癌剤の

併用効果について

非対称分裂により、様々なオートファジー活性を持つ娘細胞が出現するので、これら不均一な細胞集団を治療する目的で、オートファジー誘導剤やペプチドを用いて、細胞集団のオートファジー活性を一時的に上昇させ、引き続き、抗癌剤処理を行い、細胞死の状態を測定し、治療法を探る。

3. 研究の方法

(1) 細胞は、主にヒト神経芽腫の培養細胞である SK-N-DZ をメインで用い、その他実験の目的に照らし合わせて、いずれも CD133 が陽性であるヒト肝細胞がん細胞 Huh-7 や大腸がん細胞 Caco-2 などを用いて、CD133 の細胞内局在パターンをノックダウン法や、ノコダゾール、シリオブレビン、Src 阻害剤、オートファジー誘導剤、オートファジー阻害剤などの薬剤を用いて、ウェスタンブロッティングや蛍光免疫染色法により解析する。

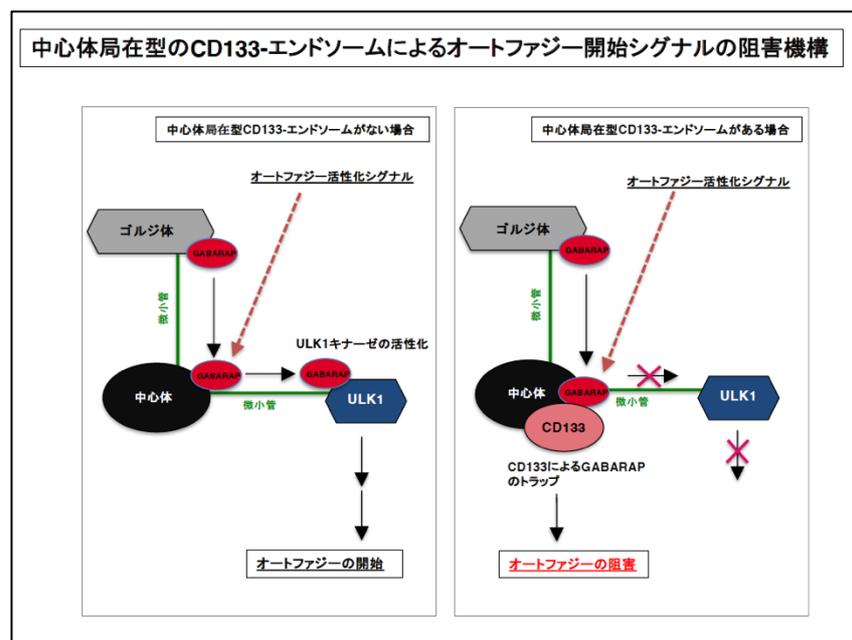
(2) 非対称分裂の計測は、主に蛍光免疫染色法を用いる。また細胞死の誘導実験では、オートファジー誘導剤のほか、サイドエフェクトの少ないオートファジー誘導ペプチドを用い、また抗癌剤としては、doxorubicin(アドリアミン)を用いて解析する。

4. 研究成果

(1) CD133 が、どのようにして細胞膜局在から細胞質や中心体に局在するようになるのか、その輸送メカニズムの解明：私たちは、細胞が低栄養状態に晒された時や、Src によるリン酸化が低下した時に、CD133 はエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれやすくなり、その結果、HDAC6 と dynein にアシストされて、微小管をマイナスエンドへ輸送され、最終的に細胞の中心体近傍に局在することを明らかにした。

(2) 中心体近傍に局在する CD133 がどのようにオートファジーと関連しているのか、そのメカニズムとその生理的意義の解明：中心体近傍に局在する CD133 は、オートファジー開始の調節因子である GABARAP

をトラップしてしまい、その結果、GABARAP が ULK1 キナーゼに結合できにくくすることでオートファジーの活性化を抑制することがわかった。さらに、中心体近傍型の CD133 は、オートファジーを阻害することにより、一次繊毛形成や神経突起伸長などの細胞分化を抑制した。これらの結果



から、中心体近傍型の CD133 は、がん細胞を未分化状態に維持する上で重要な役割を果たすことが明らかになった。

(3) CD133 は、p62/SQSTM1 と結合して選択的オートファジーにより分解される：私たちは、CD133 がエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれやすくなり、最終的に細胞内の中心体に局在することを明らかにしたが、一方、CD133 は、細胞内に取り込まれるとオートファジーにより、分解されることが報告されている。そこで私たちは、どのようなメカニズムで CD133 がオートファジーにより分解されるのかを探ったところ、p62 と CD133 の細胞内発現量が逆相関しており、p62 をロックダウンすると相対的に CD133 のタンパク質量が増えること、また、薬剤によりオートファジー活性を一時的に抑制すると、CD133 と p62 が複合体を形成することを見出した。これらの結果から、CD133 は p62 を介して選択的オートファジーにより分解されることが強く示唆された。

(4) CD133 は、細胞質分裂時に中心体に局在するようになり、オートファジー活性に基づく非対称分裂を誘導する：私たちは CD133 が細胞分裂時に中心体局在がなくなるが、細胞質分裂時に再び中心体に局在するようになり、またその局在の強弱により、オートファジー活性が高い娘細胞と低い娘細胞とを生み出す非対称分裂が起こることを発見した。

(5) CD133 による非対称分裂時に、ベータ・カテニンの細胞核局在と相関について：最近、ベータ・カテニンが、p62 の発現を抑制していることが報告されたが、私たちの見ている非対称分裂は、CD133 の発現が高い娘細胞と p62 の発現が高い娘細胞とに分かれるものであり、この非対称性にベータ・カテニンが絡んでいるのではないかと解析を続けたところ、CD133 の発現が高い娘細胞で、ベータ・カテニンの核局在が高くなっており、一方の p62 の発現が強い娘細胞では、ベータ・カテニンは、細胞膜局在であることを発見した。このことから、CD133 とベータ・カテニンが協調して p62 に拮抗してオートファジーを抑制することが示唆された。

(6) オートファジー活性に基づく腫瘍の不均一性に対するオートファジー誘導剤と抗癌剤の併用効果について：CD133 が細胞質分裂中に中心体周辺領域に不均等に（非対称的に）継承され、さまざまなオートファジー活性を持つ娘細胞が出現した。そこでオートファジー誘導活性を有する薬剤またはペプチドを用いて細胞内のエンドソーム CD133 の機能を阻害し、さらに細胞を抗がん剤で処理することを行った結果、この併用療法は CD133 陽性の治療抵抗性が高い細胞に対して、細胞死を有意に誘導することがわかった。このことから、抗がん剤とオートファジー活性をアップレギュレートする薬剤を組み合わせることによる新しい治療の可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件(うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件)

1. 著者名 Izumi Hideki, Kaneko Yasuhiko, Nakagawara Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 The Role of MYCN in Symmetric vs. Asymmetric Cell Division of Human Neuroblastoma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 570815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2020.570815	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 -

1. 著者名 Hideki Izumi	4. 巻 1
2. 論文標題 CD133 and centrosomes- How CD133 inhibits autophagy and induces the undifferentiated state of cancer cells at centrosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 7-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.46439/cancerbiology.1.002	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 -

1. 著者名 Koguchi Motofumi, Nakahara Yukiko, Ito Hiroshi, Wakamiya Tomihiro, Yoshioka Fumitaka, Ogata Atsushi, Inoue Kohei, Masuoka Jun, Izumi Hideki, Abe Tatsuya	4. 巻 19
2. 論文標題 BMP4 induces asymmetric cell division in human glioma stem-like cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1247-1254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2019.11231	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 -

1. 著者名 Hideki Izumi, Yuanyuan Li, Masami Shibaki, Daisuke Mori, Michio Yasunami, Seiji Sato, Hisashi Matsunaga, Takao Mae, Kenji Kodama, Takehiko Kamijo, Yasuhiko Kaneko & Akira Nakagawara	4. 巻 9
2. 論文標題 Recycling endosomal CD133 functions as an inhibitor of autophagy at the pericentrosomal region	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39229-8.	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 -

1. 著者名 Irina Shakhova, Yuanyuan Li, Fan Yu, Yoshiki Kaneko, Yohko Nakamura, Miki Ohira, Hideki Izumi, Takao Mae, Svetlana R. Varfolomeeva, Alexander G. Rumyantsev, Akira Nakagawara	4. 巻 58
2. 論文標題 PPP3CB contributes to poor prognosis through activating nuclear factor of activated T cells signaling in neuroblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 426-435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.22939	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 泉 秀樹、金子安比古、中川原 章
2. 発表標題 腫瘍不均一性の原動力となるCD133陽性神経芽腫細胞のオートファジーに基づく新たな非対称分裂機構の解明
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motofumi Koguch, Hideki Izumi, Yukiko Nakahara, Hiroshi Ito, Tomihiro Wakamiya, Fumitaka Yoshioka, Atsushi Ogata, Kohei Inoue, Jun Masuoka, Tatsuya Abe
2. 発表標題 BMP4 induces to asymmetric cell division in human glioma stem-like cells
3. 学会等名 The 24th Annual Scientific Meeting and Education Day of The Society for Neuro- Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 泉 秀樹
2. 発表標題 がん幹細胞マーカーCD133は細胞内に輸送されて中心体近傍に局在し、オートファジ ーを抑制してがん細胞の未分化能を維持する
3. 学会等名 第37回 分子病理学研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 泉 秀樹、李 元元、上條岳彦、金子安比古、中川原 章
2. 発表標題 がん幹細胞マーカーCD133は細胞内に輸送されて中心体近傍に局在し、オートファジ ーを抑制してがん細胞の未分化能を維持する
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>がん細胞の親玉の分化抑えるたんぱく質の機能解明 https://www.asahi.com/articles/ASM2N3WOPM2NTTHB003.html 好生館ライフサイエンス研究所部長 泉秀樹さん / 佐賀 https://mainichi.jp/articles/20190224/ddl/k41/070/180000c がん幹細胞の悪性維持 タンパク質の関与解明 好生館研究者ら発表 治療法に期待 https://www.nishinippon.co.jp/nnp/medical/article/492581/ がん幹細胞マーカーの機能解明 県医療センター好生館研究所 https://www.saga-s.co.jp/articles/-/339834</p>

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	李 元元 (Li Yuanyuan) (00392259)	千葉県がんセンター(研究所)・その他部局等・その他 (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
---------	---------