

## 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 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790397

研究課題名（和文）癌性幹細胞の未分化維持と腫瘍形成における CD133 の機能解析とその臨床応用

研究課題名（英文）Functional analysis of CD133 in tumorigenesis and stemness of cancer stem cell

研究代表者：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

研究成果の概要（和文）：

固形腫瘍においても、幹細胞様の性質を示す細胞群（癌性幹細胞）の存在が示唆されている。この癌性幹細胞のマーカーとして注目されるが機能不明な CD133 の腫瘍形成および幹細胞性維持における機能を、ヒト大腸がん細胞を用いて検討した。その結果 CD133 は直接的に腫瘍形成を増強する機能を持つことが明らかになった。その分子機序として、AKT を介した  $\beta$ -catenin の活性化が見出され、その結果、分化誘導の抑制にも関与することが明らかになった。さらに、CD133 遺伝子の転写調節には GATA6 が関与する可能性が示唆された。これらの結果から、CD133 はヒト大腸がん細胞の腫瘍形成と未分化性の維持に関与することが示された。

研究成果の概要（英文）：

CD133 is a putative cancer stem cell marker of several malignancies but its roles still remain unclear. We here examined roles of CD133 in tumorigenesis and stemness of human colon cancer cells. Knocked-down of CD133 retarded tumor formation of colon cancer cells in nude mice and suppressed anchorage-independent cell growth. CD133-knockdown reduced transactivation activity of  $\beta$ -catenin resulting from AKT inactivation; subsequently accelerated the enterocyte differentiation of colon cancer cells upon sodium butyrate treatment. Furthermore, we found a novel transcriptional regulation of *CD133* gene by GATA6 transcription factor, which is bound to the upstream region of *exon2* of *CD133* gene. These data collectively suggest that CD133 is involved in keeping undifferentiated-status and tumorigenesis of colon cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

癌性幹細胞仮説

1970 年代後半においてすでに記述されて

いた血液腫瘍の幹細胞（癌性幹細胞；A.W. Hamburger *et al.* 1977. *Science*）に、がん研究者の注目が再び集まっている。すなわち、

種々の固形腫瘍細胞においても幹細胞様の性質を示す細胞群の存在が報告され、蓄積されつつある (K. Polyak *et al.* 2006. *Nature Med.*)。これらの研究から、発がんにいたる過程を幹細胞が正常な個体や組織を形成する過程に見立て、固形腫瘍においても、癌性幹細胞からがん組織が生じるという「癌性幹細胞仮説」が提唱された。胎性幹細胞などが高い薬剤耐性を示すことから、化学療法後のがん再発などは癌性幹細胞仮説によって説明できると考えられる。そのため、新規抗がん剤開発へと発展させるべく、その探索および検証が進められている。

### 癌性幹細胞関連分子としての CD133

CD133 は、骨髄に存在する CD34 陽性造血幹細胞で発現される 5 回膜貫通型の I 型細胞表面分子として同定された (A.H. Yin *et al.* 1997. *Blood* 90: 5002-5012)。CD133 は造血幹細胞以外に、内皮細胞前駆細胞や胎性脳幹細胞などの広範な幹細胞にも発現し、これらの CD133 陽性細胞は分化能を示すことから、幹細胞性を示すマーカーとして考えられている。また、脳腫瘍細胞や血液腫瘍などで CD133 陽性細胞の存在が報告され、癌性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。しかし、その機能や意義は十分に解明されていない。

#### 2. 研究の目的

癌性幹細胞の特徴である高い腫瘍形成能力と幹細胞性の維持における幹細胞マーカー CD133 分子の役割を検討する。

#### 3. 研究の方法

レンチウイルスによる shRNA 導入を用いて内在性 CD133 発現をノックダウンしたヒト大腸がん細胞株を作製し、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を検討した。さらに、当該細胞を用いて、腫瘍形成に深く関与する AKT キナーゼや  $\beta$ -catenin の働きを *in vitro* で解析した。

ヒト大腸がん培養細胞株から抽出したゲノム DNA から CD133 遺伝子の第 2 エクソン上流領域をクローニングした。当該領域の下流にレポーター遺伝子を連結してプロモーター活性を評価する。さらに、転写調節に重要な DNA 領域を決定し、当該領域に結合する転写調節因子の同定を試みた。

#### 4. 研究成果

##### ① CD133 の大腸がん形成における機能解析

1. CD133 陽性の大腸がん細胞株から、RNA 干渉によって CD133 発現レベルを低下させた大腸がん細胞株を作製した。当該

細胞はヌードマウス皮下において腫瘍形成能力が低下し、さらに、足場非依存的増殖能の低下していた。

- 腫瘍形成が低下した分子機序を解明するため、大腸がんでも発がん機序に深く関与する PI3K/AKT 経路の活性化を検討した。その結果、CD133 発現低下細胞株は、PI3K 阻害剤によって容易に細胞死が誘導され、さらに PI3K によって正に制御される AKT はその酵素活性が低下していた。
- AKT は、 $\beta$ -catenin の核内移行を促進し、その転写誘導能を活性化することで、がん化を亢進する。CD133 発現低下細胞株では、核内の  $\beta$ -catenin 量が減少し、その転写活性化能も低下していた。 $\beta$ -catenin の不活性化は大腸幹細胞の終末分化を引き起こすが、当該細胞でも、分化誘導が促進される結果が得られた。
- ヒト大腸がん臨床検体中に含まれる CD133 陽性細胞の性状をフローサイトメトリー法で検討した。その結果、CD133 は EpCAM および CD44 の 2 重陽性細胞の一部にのみ発現し、その存在率は 0.5%~5%程度であった。この数字は西洋人検体で行われた報告と同程度であった。
- ヒト大腸がん臨床検体中に含まれる EpCAM、CD44 および CD133 の 3 重陽性細胞中の AKT 活性化をそのリン酸化レベルで検討したところ、EpCAM、CD44 および CD133 の 3 重陽性細胞中の AKT は、EpCAM および CD44 の 2 重陽性細胞と比較して、強く活性化していた。
- AKT は  $\beta$ -catenin を活性化し、その標的遺伝子の一つである CD44 発現を誘導する。そこで、ヒト大腸がん組織から単離した細胞の CD133 および CD44 の発現レベルをフローサイトメトリー法で検討した。その結果、CD133 陽性細胞の CD44 発現レベルは、CD133 陰性細胞と比較して、統計的に有意な差を持って高いことが明らかになった。

以上の結果から、CD133 は PI3K/AKT 経路を経て  $\beta$ -catenin の活性化を正に制御し、その結果、分化誘導の抑制や腫瘍形成能力を高めている可能性が示めされた。このことは、実際のヒト大腸がんの内部においても AKT/ $\beta$ -catenin 経路を介して、発がん増強に機能している可能性が示唆された。(平成 21、23 年度、日本癌学会にて口頭発表、論文投稿準備中)

②GATA6 による CD133 遺伝子の転写調節機構の解析

1. PCR 法でヒト CD133 第2エクソン遺伝子の5'上流 2200塩基対の DNA を単離し、ルシフェラーゼ遺伝子と連結した。これを大腸がん細胞に導入すると、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導されたことから、プロモーター活性を持つことが示された。さらに、段階的に 5'上流領域を欠失させた変異プロモーターの解析から、約 200塩基上流部は転写調節に重要な cis-element であることが示された。
2. データベースによる遺伝子配列の検索から、当該領域には GATA ファミリーに属する転写因子の認識配列が含まれていた。大腸がん細胞株では、GATA6 の発現が CD133 の発現と一致した。また、GATA6 は酪酸ブチルによって発現抑制されることを見出し、これは CD133 の発現低下と一致した。
3. 遺伝子導入および RNAi による発現抑制によって GATA6 発現量を変化させると、CD133 遺伝子の発現が同様に变化した。また、クロマチン免疫沈降の結果から、GATA6 が当該領域に結合することを見出した。

以上の結果から、CD133 第2エクソン遺伝子の5'上流には、GATA6 によって制御される CD133 遺伝子の新たな転写調節領域が含まれる可能性が示めされた（平成 22 年日本癌学会にて報告、投稿準備中）。

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）

Takenobu H, Shimozato O, (他6名)  
CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. Oncogene 2011 年 30 巻、97-105 査読有  
DOI: 10.1038/onc.2010.383

〔学会発表〕（計 6 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 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日 名古屋国際会議場

下里 修 (他 5 名)

GATA-6 transactivates a novel promoter

for stem cell marker *CD133* gene in human colorectal cancer cells. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月23日 大阪国際会議場

下里 修 (他 5 名)

幹細胞マーカーCD133分子はβ-cateninの制御を通じて大腸がん細胞の腫瘍形成を亢進する 第68回日本癌学会学術総会 平成21年10月1日神奈川県横浜市パシフィコ横浜

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし