

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790300

研究課題名（和文） 癌性幹細胞ニッチ構築における幹細胞マーカーCD133 分子の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of a stem cell marker CD133 in the construction of stem cell niche.

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・研究員

研究者番号：30344063

研究成果の概要：

腫瘍細胞中の幹細胞マーカー発現細胞群（癌性幹細胞）は、免疫不全マウスへの移植において腫瘍形成能力が高い。そこで、CD133 分子を内因性に発現するヒト大腸がん細胞株を用いて、幹細胞マーカーとして注目される CD133 分子の腫瘍形成における機能を検討した。その結果、CD133 分子が、細胞増殖の亢進ならびに発がんに関連の深いβ-カテニン分子の調節に関与し、腫瘍形成に直接的に機能することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、癌性幹細胞、CD133、幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌性幹細胞仮説

骨髄細胞中の造血幹細胞を豊富に含む分画であるサイドポピュレーション（SP）細胞群が、腫瘍細胞株にも含まれることが示された。以来、様々な臓器由来の固形腫瘍細胞においても同様の報告が蓄積されつつある。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、幹

細胞様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。化学療法後のがん再発は癌性幹細胞仮説によって説明できると考えられ、新規抗がん剤開発へと発展させるべく、その探索が進められている。

(2) 癌性幹細胞マーカー：CD133

CD133 は、ユニークな 5 回膜貫通型の I 型細胞表面分子として同定された。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維持することから、幹細胞に特徴的に発現するマーカー分子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多分化能を持つ 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一つに用いられている。しかし、その機能や意義は不明である。

(3) 腫瘍形成と腫瘍関連間質形成

腫瘍形成には、血管新生などの腫瘍関連間質の構築が必須であり、腫瘍の悪性度との相関はすでに多くの報告がある。例えば、実験的腫瘍転移モデルにおいて、腫瘍細胞は、自身が転移する組織に骨髄由来前駆細胞を派遣し、そこであらかじめ間質を構築させて、自身の転移を亢進することが報告された。一方、腫瘍細胞中の幹細胞様細胞群は腫瘍形成能力が高いことが知られる。これらのことから、申請者は、癌性幹細胞に関して、1) 原発巣で微小環境が劣悪になった腫瘍細胞の一部が、幹細胞マーカー分子を発現し、間質構築能力の高い幹細胞様細胞に変化する、2) 従来からの”Seed and soil”説とは反対に、幹細胞様細胞が細胞外環境へ積極的に作用して、がん細胞に対する生物学的適所(ニッチ)が構築されて、腫瘍の悪化あるいは転移に繋がる、という仮説を着想するに至った。

2. 研究の目的

ヒト固形腫瘍細胞における幹細胞マーカー発現の意義を、がん細胞におけるニッチ、すなわち腫瘍関連間質の形成能力という面から検討する。とりわけ、膜蛋白質である CD133 分子が腫瘍形成における機能を解析する。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍細胞の CD133 遺伝子発現レベルの強弱が腫瘍形成におよぼす影響

RNA 干渉法によって、CD133 遺伝子発現を低下させたヒト大腸がん細胞株(CD133KD 細胞)を作製した。当該細胞の足場非依存的細胞増殖およびヌードマウス皮下における腫瘍形成の観察、およびヘマトキシリン・エオジン染色による同腫瘍組織の病理学的解析から、腫瘍細胞の CD133 発現が腫瘍ならびに間質形成に与える影響を検討した。

(2) CD133 遺伝子ノックダウンが与える細胞生物学的影響の評価

この CD133 陽性の大腸がん細胞株は、前駆細胞様の性質を持ち、酪酸ナトリウム刺激によって大腸上皮細胞様の細胞へ分化することが報告されている。そこで、CD133KD 細胞を酪酸ナトリウムで分化誘導させ、細胞周期停止、細胞の形状変化、分化マーカー(c-Myc, p21^{Waf-1}, アルカリフォスファターゼなど)の発現変化を解析した。

(3) CD133 分子の機能解析

前述したように、CD133の生理的機能は十分に解析されていない。そこで、細胞外および細胞内の一部を失ったCD133変異体を作製し、細胞増殖を亢進する機能が失われるかどうか検討した。

4. 研究成果

(1) 主な成果

①CD133の大腸がん形成における機能解析
代表的な幹細胞マーカーである CD133 遺伝子は、大腸がんおよび肝がん由来の細胞株において高率に発現していた。そこで、RNA 干渉によって人為的に CD133 発現レベルを低下させた大腸がん細胞(CD133KD 細胞)を作製し、造腫瘍能における CD133 の機能を検討した。その結果、CD133KD 細胞では、

足場非依存的増殖能力が低下し、ヌードマウス皮下腫瘍モデルにおいても、腫瘍形成能力が低下していた。しかしながら、当該細胞の腫瘍組織像は、対照群と比較して、大きな差は観察されなかった。

ところで、CD133 陽性の大腸がん細胞株は、興味深いことに、前駆細胞様の性質を持ち、ある種の化学試薬などで大腸上皮細胞様の細胞へ分化することが報告されている。そこで、CD133KD 細胞の、酪酸ナトリウムによる分化誘導を解析した。その結果、CD133 発現の低下は、がん遺伝子 c-Myc 発現の急速な低下による細胞周期停止の開始を早める影響をもたらした。また、CD133KD 細胞では、癌性幹細胞マーカーの候補の一つである CD44 分子の発現低下が見られた。

これらの遺伝子は、 β -カテニン/TCF 経路の標的遺伝子として知られることから、CD133 と β -カテニン/TCF 経路の関連性を検討した。その結果、当該経路を制御するために重要な β -カテニン蛋白質量に異常があることが明らかになった。

以上から、CD133 は腫瘍形成能力を賦与する機能を持ち、 β -カテニン/TCF 経路の制御に関連することが示唆された（平成20年日本癌学会にて報告）。

②CD133 分子からのシグナル伝達について

正常型 CD133 分子はヒト神経芽腫由来細胞株の足場非依存的細胞増殖を促進させた。そこで、細胞外および細胞内ドメインの一部を失った変異型 CD133 分子を作製し、当該細胞に発現させたところ、変異型 CD133 分子はその作用を失った。このことは、CD133 分子の機能が、失われた部分を経て発揮されていることが示唆された（平成20年度日本小児がん学会にて報告）。

（2）国内外における位置づけ

癌性幹細胞に関する研究は、現在萌芽期で

あり、幹細胞様の腫瘍細胞の探索に焦点が当てられている。しかし残念ながら、2004年に脳腫瘍の起源となる神経幹細胞マーカー陽性細胞が同定されて以来、その他の株化した腫瘍細胞からの幹細胞様サイドポピュレーション細胞の単離以上の進展がないのが現状である。癌性幹細胞仮説はがんの再発や転移を説明するための仮説としては興味深い、証明すべき課題が山積みとなっている。例えば、癌性幹細胞の起源を考えた場合、1) 組織幹細胞と同様に、癌性幹細胞が生来存在する、あるいは 2) 組織性幹細胞が従来から報告されている遺伝子損傷などの機序によって腫瘍化して幹細胞様の腫瘍細胞が生じる、3) 従来からの腫瘍細胞が脱分化などで幹細胞化する、4) 腫瘍細胞と幹細胞との細胞融合によって幹細胞様腫瘍細胞が生じる、という可能性が想定される。これらの可能性を検討することは、癌性幹細胞を証明するための今後の中心的課題と考える。その中で申請者は、従来の"Seed and soil"説から見た癌性幹細胞研究、すなわち必然的に運命決定された癌性幹細胞の証明、とは異なり、癌性幹細胞の誘導的な運命決定という視点からアプローチする研究として、本課題を位置づけている。

これまでに、腫瘍細胞を CD133 分子の発現レベルに応じて分離精製した細胞を用いて、腫瘍形成能力を比較した報告がなされているが、このアプローチでは、CD133 分子が腫瘍形成において直接的な機能を発揮するかどうかは言及できないと考える。したがって、本研究の成果は、CD133 分子が、癌性幹細胞に高い腫瘍形成能力を直接的に賦与する機能分子であることを初めて示したと考える。また、CD133 分子が癌性幹細胞特異的ながん治療の標的分子となりうる可

能性を示すことができ、新たながん治療法
開発への発展性が示されたと考える。

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0件)

[学会発表] (計3件)

① 発表者：下里 修 (6名中1番)

標題名：大腸がん細胞株の分化誘導と
がん形成における幹細胞マーカーCD133
分子の機能解析

学会名：第67回日本癌学会学術総会

発表年月日：平成20年10月29日

場所：愛知県名古屋市・名古屋国際会議場

② 発表者：下里 修 (6名中1番)

標題名：神経芽腫細胞における造腫瘍能を
担う幹細胞マーカーCD133分子の機能ドメイ
ンの解析

学会名：第24回日小児がん学会学術総会

発表年月日：平成20年11月14日

場所：千葉県千葉市・幕張メッセ

③ 発表者：下里 修 (4名中1番)

標題名：Antibody against cancer stem cell
marker CD133 down-regulates cell cycle
progression in colon cancer cells

学会名：第66回日本癌学会学術総会

発表年月日：平成19年10月3日

場所：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]

ありません

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・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