

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501313

研究課題名(和文) 卵巣明細胞癌幹細胞を標的とした治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapy that targets ovarian clear cell carcinoma stem cells

研究代表者

那須 亮 (Nasu, Ryo)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30466859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣明細胞癌は、抗癌剤耐性を示すため最も予後が悪い卵巣上皮癌である。本研究では明細胞癌幹細胞を標的とした新規治療法の開発を目指した。我々が樹立した明細胞癌幹細胞の遺伝子発現パターンを解析した結果、幹細胞マーカーLGR5の高発現を認めた。さらに、R-spondin-LGR5軸によるWntシグナル活性化の分子機構を解析した結果、R-spondin/Wnt刺激が、Axin1の新規リン酸化を促進することによりWntシグナルを活性化することを見出した。従って、LGR5の細胞外領域を標的とする抗体と、Axin1のリン酸化修飾を標的とする低分子化合物の両方が新規抗癌剤として期待される。

研究成果の概要(英文)：Clear cell carcinoma of the ovary (CCC) has the worst prognosis among epithelial ovarian cancers because of its chemoresistance. In this study, we tried to develop a new therapy that targets CCC stem cells. We analyzed the gene expression profile of CCC stem cells established by our group and found the high expression of the stem cell marker LGR5. Moreover, we analyzed the molecular mechanisms of the activation of Wnt signaling by the R-spondin-LGR5 axis and found that R-spondin/Wnt stimuli activate Wnt signaling via promoting novel phosphorylation of Axin1. Thus, both antibodies that target the extracellular domain of LGR5 and small molecules that inhibit Axin1 phosphorylation hold promise as novel anti-tumor reagents.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 癌幹細胞 卵巣明細胞癌 CD133 Wntシグナル LGR5

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡率が高い。特に日本人の卵巣癌の約 25%を占める明細胞癌は高い抗癌剤耐性を示すため予後が悪く、新しい治療法の開発が必要とされている。

最近の研究により、腫瘍組織中には幹細胞様性質を維持する癌幹細胞とそれ以外の分化した癌細胞が混在し、その一部の癌幹細胞のみが強い腫瘍形成能を有することが明らかにされた。さらに癌幹細胞は抗癌剤や放射線に対して耐性を有し、癌の再発や転移の元凶になると考えられている。そのため癌幹細胞を標的とする腫瘍制御技術の開発が急務となっている。

2. 研究の目的

我々は卵巣明細胞癌幹細胞を手術検体より濃縮し、無血清培地を用いて幹細胞様性質を維持したまま継代培養することに上皮性腫瘍で初めて成功した。この明細胞癌幹細胞は、癌幹細胞マーカーとして知られている CD133 を強く発現している。しかし、血清含有培地中で培養すると分化し、細胞形態およびシャーレ内での増殖速度に大きな違いは認められないが、CD133 の発現低下と腫瘍形成能の消失が観察される。

5 回膜貫通型の糖蛋白質である CD133 は、様々な正常および腫瘍組織の幹細胞マーカーとして報告されている。しかし、CD133 の機能は未だ明らかにされていない。我々は、CD133 の発現を抑制した明細胞癌幹細胞の腫瘍形成能が低下することを見出した。この結果から CD133 が癌幹細胞特異的な機能を有していると考え、大量培養した明細胞癌幹細胞から内在性 CD133 複合体を精製した。この複合体を質量分析を用いて解析した結果、細胞接着装置デスモソームの構成因子を複数同定した。実際に明細胞癌幹細胞において CD133 は細胞接着部位に特異的に局在し、デスモソームカドヘリンである desmoglein-2

と共局在することが明らかになった。さらに、CD133 の発現を抑制すると desmoglein-2 の発現量が低下することにより、デスモソームの形成が阻害されることを見出した。Desmoglein-2 は様々な悪性腫瘍で発現亢進が認められることから、CD133 がデスモソーム形成を介して明細胞癌幹細胞の腫瘍形成能維持に寄与している可能性が見出された (Koyama-Nasu et al, *PLoS One* 2014)。

癌幹細胞の幹細胞様性質と腫瘍形成能には相関があることが知られており、幹細胞様性質の維持に必要な遺伝子および機能的 RNA (microRNA, lincRNA, etc.) を同定することは、癌幹細胞の分化誘導を標的とした新しい治療法の実現につながると思われる。我々は CD133 の発現を指標に、In cell analyzer を用いたハイスループットな RNAi スクリーニングを行っている。リン酸化酵素、核内受容体、膜蛋白質等、数千遺伝子のスクリーニングが完了し、複数の候補遺伝子を同定した。全遺伝子のスクリーニング完了後には、機能的 RNA のスクリーニングを進める。特に lincRNA (large intergenic noncoding RNA) は様々な細胞機能に関与していることが明らかにされてきているため、新たな治療標的として着目している。

本研究はこれらの実験結果をふまえて、卵巣明細胞癌幹細胞を標的とした治療法を開発することを目的としている。

3. 研究の方法

1) 卵巣明細胞癌幹細胞の継代培養

卵巣明細胞癌の手術検体を解剖用ハサミで細切し、コラゲナーゼ消化を行う。分散した細胞を B27 supplement、basic FGF、EGF を含む無血清培地中に播種する。同様に 10%ウシ胎児血清を含む培地にも播種する。卵巣明細胞癌と子宮内膜症の高頻度な併発が認められることから、子宮内膜 (幹) 細胞の増殖に関与していることが報告されているホル

モンと増殖因子の検討を行い、継代培養の成功率を高める。特に卵巣明細胞癌で発現が上昇していることが知られている LGR7 のリガンドである増殖因子 relaxin の効果を確認する。さらに細胞外基質の検討と、マトリゲル等を用いた 3 次元培養の評価を行う。継代可能であることを確認した後に、50%マトリゲルに懸濁して免疫不全マウスの皮下へ移植する。腫瘍生育の経時変化を観察した後に、腫瘍を摘出して組織化学的解析を行う。

2) CD133 によるデスモソーム制御の腫瘍形成における役割の解析

Desmoglein-2 の発現を抑制した明細胞癌幹細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能を確認する。CD133 によるデスモソーム制御の分子メカニズムを明らかにするために、CD133 の各種変異体を作成して desmoglein-2 の発現維持に必要な領域を明らかにする。さらに CD133-デスモソーム複合体の構成因子を免疫沈降法にて決定した後に、CD133 と直接相互作用するデスモソームタンパク質を *in vitro* の結合実験で評価する。また、CD133 および desmoglein-2 の発現を抑制した明細胞癌幹細胞を用いた sphere formation assay および soft agar assay を行い、CD133 によるデスモソーム制御の幹細胞様性質維持および固形腫瘍形成における役割を明らかにする。

デスモソームの構成因子の一つである plakoglobin は、幹細胞性維持や腫瘍細胞の増殖に重要な Wnt シグナル経路を制御していることが知られている。CD133 の発現を抑制した細胞の Wnt シグナル活性を評価し、腫瘍形成能との関連を調べる。

3) Desmoglein-2 を標的とした卵巣明細胞癌幹細胞に対する分子標的治療の開発

Desmoglein-2 はカドヘリンファミリーに属する 1 回膜貫通型タンパク質である。卵巣明細胞癌検体に対して免疫組織染色を行い、desmoglein-2 の発現を確認する。

Desmoglein-2 の細胞外領域に対する抗体を作製し、腫瘍増殖に対する効果を評価する。さらに desmoglein-2 はアデノウイルスのレセプターであることが報告されているため、ウイルスやウイルス蛋白質を用いた分子標的治療の可能性も検討する。

4) 卵巣明細胞癌幹細胞特異的に発現する遺伝子および機能的 RNA の探索

明細胞癌幹細胞および癌分化細胞から抽出した RNA に対してディープシーケンスを行う。両細胞の発現を比較し、癌幹細胞特異的に発現している遺伝子および機能的 RNA を同定する。同様の解析を CD133 陽性細胞と陰性細胞についても行う。

5) 卵巣明細胞癌幹細胞の幹細胞様性質と腫瘍形成能の維持に重要な遺伝子、機能的 RNA の探索

明細胞癌幹細胞に RNAi ライブラリーを導入し、CD133 の蛍光抗体染色を行う。さらに、In cell analyzer を用いて癌幹細胞マーカー CD133 の発現を評価する。幹細胞様性質維持への寄与が示された遺伝子に対しては、レンチウイルスを用いて shRNA を導入することにより発現を抑制した癌幹細胞を免疫不全マウスに移植し、腫瘍形成能の低下を確認する。同様に機能的 RNA のスクリーニングを行う。このスクリーニングは、4) において同定された癌幹細胞特異的に発現している遺伝子および機能的 RNA に対して優先的に行う。本スクリーニングは製薬企業と共同で行う予定である。

6) 卵巣明細胞癌幹細胞の分化誘導を目的とした分子標的治療の開発

5) において同定された明細胞癌幹細胞の幹細胞様性質と腫瘍形成能の維持に重要な遺伝子および機能的 RNA については、分子機構の詳細と意義を追及する。遺伝子産物についてはモノクローナル抗体またはアンタゴニスト（膜タンパク質とリガンド）、インヒビター（リン酸化酵素等の酵素活性を有するタ

ンパク質)の作製を試みる。機能的 RNA に対してはアンチセンスオリゴやデコイの作製を試みる。

4. 研究成果

腸管上皮幹細胞マーカーとして同定された 7 回膜貫通型タンパク質 LGR5 は、Wnt アゴニストとして知られていた分泌タンパク質である R-spondin ファミリーがリガンドであることが判明し、Wnt シグナルの新たな構成因子として注目を集めている。卵巣明細胞癌幹細胞の遺伝子発現パターンを解析した結果、LGR5 の発現を認めたことから、Wnt シグナル伝達経路の重要性が示唆された (図 1)。

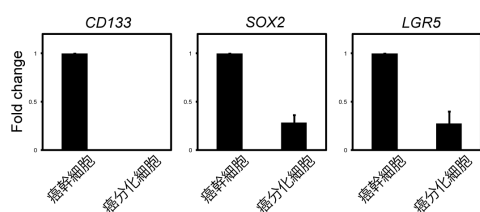


図 1: 明細胞癌幹細胞および分化細胞における幹細胞マーカーの発現

R-spondin-LGR5 軸の分子機構を解析するために、LGR5 の相互作用因子を調べた結果、Wnt シグナルの主たる制御因子である β -catenin 分解複合体との相互作用を見出した。さらに、R-spondin/Wnt 刺激により、LGR5 複合体から Axin1 が解離することを明らかにした。疑似リン酸化変異体を用いた実験から、Axin1 160 番目のスレオニン残基のリン酸化修飾が、Axin1-APC 相互作用の解離を促進していることを見出した (図 2) (Koyama-Nasu et al, *BBRC* 2015)。

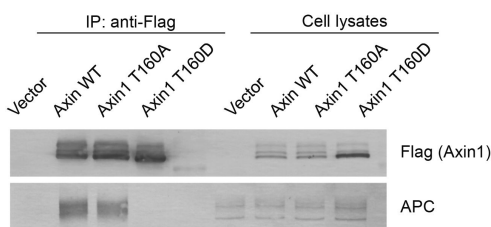


図 2: Axin1 T160 非リン酸化型および疑似リン酸化型変異体と APC との相互作用

リン酸化特異的抗体を用いた実験により、実際に R-spondin/Wnt 刺激が Axin1 スレオニ

ン 160 番のリン酸化修飾を促進することを見出したことから、R-spondin-LGR5 軸が、Axin1 の新規リン酸化修飾を介して β -catenin 分解複合体の解離を促進し、Wnt シグナルを活性化すると考えられた。従って Axin1 T160 リン酸化は、Wnt シグナルのオン/オフを調節する新規 Wnt シグナル分子スイッチであると考えられ、これを基盤とする Wnt シグナル制御技術の開発が見込まれた。

以上の知見を統合すると、卵巣明細胞癌幹細胞の治療標的として新たに R-spondin-LGR5 軸を見出した。さらに、その下流に位置する Axin1 の新規リン酸化修飾を同定した。したがって LGR5 を標的とする抗体と、Axin1 のリン酸化修飾を標的とする低分子化合物の両方が新規治療法として期待される。

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 9 件)

Hiraoka K, Hayashi T, Kaneko R, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Kawasaki Y & Akiyama T. SOX9-mediated upregulation of LGR5 is important for the tumorigenicity of glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 460, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.03.012

Koyama-Nasu R, Hayashi T, Nasu-Nishimura Y, Akiyama T & Yamanaka R. Thr160 of Axin1 is critical for the formation and function of the β -catenin destruction complex. *Biochem Biophys Res Commun* 459, 2015. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.02.118

Takai H, Masuda K, Sato T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Katou Y, Ogawa H, Morishita Y, Kozuka-Hata H, Oyama M, Todo

T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Toyoshima C, Shirahige K & Akiyama T.

5-hydroxymethylcytosine plays a critical role in glioblastomagenesis by recruiting the CHTOP-methylosome complex. *Cell Rep* 9, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.celrep.2014.08.071

Koyama-Nasu R, Haruta R, Nasu-Nishimura Y, Taniue K, Katou Y, Shirahige K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Saito N, Matsui M, Takahashi R, Hoshino-Okubo A, Sugano H, Manabe E, Funato K & Akiyama T. The pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 33, 2014. 査読有

DOI: 10.1038/onc.2013.168

Echizen K, Nakada M, Hayashi T, Amura S, Furuta T, Nakai M, Koyama-Nasu R, Nishimura Y, Taniue K, Morishita Y, Hirano S, Terai K, Todo T, Ino Y, Mukasa A, Takayanagi S, Ohtani R, Saito N & Akiyama T. PCDH10 is required for the tumorigenicity of glioblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 444, 2014. 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.138

Koyama-Nasu R, Takahashi R, Yanagida S, Nasu-Nishimura Y, Oyama M, Kozuka-Hata H, Haruta R, Manabe E, Hoshino-Okubo A, Omi H, Yanaihara N, Okamoto A, Tanaka T & Akiyama T. The cancer stem cell marker CD133 interacts with plakoglobin and controls desmoglein-2 protein levels. *PLoS One* 8, 2013. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0053710

Koyama-Nasu R, Nasu-Nishimura Y, Todo T, Ino Y, Saito N, Aburatani H, Funato K,

Echizen K, Sugano H, Haruta R, Matsui M, Takahashi R, Manabe E, Oda T & Akiyama T.

The critical role of cyclin D2 in cell cycle progression and tumorigenicity of glioblastoma stem cells. *Oncogene* 32, 2013. 査読有

DOI: 10.1038/onc.2012.399.

Kozuka-Hata H, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Ao-Kondo H, Tsumoto K, Akiyama T & Oyama M. Global proteome analysis of glioblastoma stem cells by high-resolution mass spectrometry. *Curr Top in Pept Protein Res* 13, 2012. 査読有
URL:www.researchtrends.net/tia/title.aspx?id=26

Kozuka-Hata H, Nasu-Nishimura Y, Koyama-Nasu R, Ao-Kondo H, Tsumoto K, Akiyama T & Oyama M. Phosphoproteome of human glioblastoma initiating cells reveals novel signaling regulators encoded by the transcriptome. *PLoS One* 7, 2012. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0043398

〔学会発表〕(計2件)

那須 亮, 春田 諒, 西村 教子, 谷上 賢端, 加藤 由起, 白髭 克彦, 藤堂 具紀, 稲生 靖, 武笠 晃丈, 齊藤 延人, 松井 真弓, 高橋 理那, 大久保 明美, 菅野 陽元, 眞鍋 瑛美, 船戸 洗佑, 秋山 徹. The SOX2-pleiotrophin-ALK axis is required for tumorigenicity of glioblastoma stem cells. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月12日, 福岡, 福岡国際会議場

那須 亮, 高橋 理那, 柳田 聡, 西村 教子, 尾山 大明, 秦 裕子, 春田 諒, 眞鍋 瑛美, 大久保 明美, 尾見 裕子, 矢内原 臨,

岡本 愛光, 田中 忠男, 秋山 徹. The cancer stem cell marker CD133 is required for desmosome formation. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月20日, 北海道, イトン札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

那須 亮 (NASU RYO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号： 30466859

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：