

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462033

研究課題名(和文)大腸癌幹細胞に関するCD133/PTPRK経路を標的としたゲノム・プロテオーム解析

研究課題名(英文)Functional analysis of PTPRK-CD133 regulatory axis in colon cancer progression.

研究代表者

早田 浩明 (Souda, Hiroaki)

千葉県がんセンター(研究所)・消化器外科・主任医長

研究者番号：90261940

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)：受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素PTPRKの大腸がん進展における機能を解析した。shRNAを用いたPTPRKのノックダウン(PTPRK-KD)は、ヒト大腸がん由来細胞株のヌードマウス皮下腫瘍の形成ならびに低栄養条件下での増殖を促進したが、その効果はCD133に依存していた。さらに、PTPRK-KDとCD133発現は大腸がん細胞において協調してAKTを活性化し、その下流分子のBadを強く活性化した。その結果、抗がん剤による細胞死誘導を相乗的に抑制した。したがって、PTPRK-CD133制御系はがん細胞の悪性を高め、大腸がん進展における重要な機能を担う可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：As a higher expression of receptor-type protein tyrosine phosphatase (PTPRK) is considered to be a good prognostic factor for the CD133-expressing colon cancer patients, we sought to investigate the functional significance of the PTPRK-CD133 regulatory axis in the malignant properties of colon cancer cells. Based on our present observations, forced expression of CD133 enhanced a xenograft tumor growth of colon cancer cells and knockdown of PTPRK further promoted the CD133-induced tumor formation in vivo. PTPRK is directly implicated in the dephosphorylation of CD133 in human colon cancer cells. Additionally, PTPRK-depletion dramatically stimulated an anti-apoptotic function of Bad through the activation of the oncogenic CD133-AKT pathway, and thereby significantly reduced an anti-tumor drug-induced cell death. Together, our present observations strongly suggest that the PTPRK-CD133 regulatory axis plays a pivotal role in the regulation of colon cancer progression and drug resistance.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 癌性幹細胞 CD133 PTPRK

1. 研究開始当初の背景

厚生労働省がまとめた「がん統計」によると、2011年の大腸がん死亡者数は4.5万人(がん全体の3位であり、男性3位、女性1位)を超え、その罹患数・死亡者数はともに2030年まで増加傾向を示している(がん・統計白書2012)。大腸がんの治療は外科的切除が中心で、切除可能な早期がんに対する治療奏功率は比較的高い。一方、切除不能な進行がんでは化学療法および放射線療法が選択されるが、その奏効率は依然として低い。そのため、進行性大腸がんの治療成績を向上させる新規治療法開発が望まれている。

申請者らは、癌幹細胞関連分子CD133が大腸がん細胞の腫瘍形成を亢進する分子機序の一端を明らかにし、さらに、受容体型チロシン特異的脱リン酸化酵素PTPRKがその脱リン酸化を介してCD133の機能を抑制することを新たに見出した。加えて、*in silico*での予備実験から、CD133遺伝子を高発現する大腸がん患者ではPTPRK遺伝子の低発現は予後不良である可能性が示唆された。したがって、大腸がんにおけるPTPRKの臨床的意義は大きいと推察されるが、がん臨床検体を用いた解析は十分でないのが現状である。

2. 研究の目的

進行性大腸がんに対する新規の診断法および治療法への基盤研究として、癌幹細胞におけるPTPRK-CD133経路の機能とその臨床的意義の探求を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 内在性PTPRK発現のノックダウンあるいは外因性CD133の強制発現はレンチウイルスを用いて、shRNAあるいはcDNAを大腸がん細胞に導入した。さらに、癌細

胞性の検討は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、および*in vitro*スフェア形成を指標として解析した。さらに、当該細胞を用いて、CD133のリン酸化、腫瘍形成および細胞死に深く関与するAKTキナーゼやBadなどの蛋白質の働きを*in vitro*で解析した。

(2) PTPRKの標的蛋白質を探索するため、PTPRKをノックダウンした細胞から蛋白質を抽出した。上皮細胞成長因子(EGF)受容体などの受容体型キナーゼ群およびそれらの下流蛋白質群に標的を絞り、抗体アレイ(Cell Signaling Technology #7982)を用いてそれらのリン酸化レベルを解析した。

4. 研究成果

(1) 受容体型チロシン脱リン酸化酵素 (PTPRK) のノックダウンは CD133 陽性大腸癌細胞の造腫瘍能を高める

PTPRKの機能を解析するため、代表的なヒト大腸癌細胞株(Caco-2、HT-29、LoVo、SW480)のPTPRK発現レベルを検討した。RT-PCRおよびWestern blot法での解析結果から、上記の細胞株はPTPRKを発現することが確認された。特にHT-29細胞のPTPRK発現レベルは非常に高かったが、その他の細胞株間での差はほとんど見られなかった。そこで、2種類のshort hairpin RNA(shRNA)を用いてHT-29細胞のPTPRK発現レベルを人為的に低下させた。#1と#2と名付けたこれらのshRNAはPTPRK発現を転写レベルで低下させたが、蛋白質レベルでの発現抑制効果の高かった#2を以後の実験でも使用した(図1A)。つづいて、PTPRKをノックダウンしたHT-29細胞の造腫瘍能を解析した。当該細胞を軟寒天培地中で足場非依存的に培養した結果、PTPRKのノックダウン(PTPRK-KD)は細胞のコロニー数を増加させた。さらに、これらの細胞をヌードマウスの皮下に接種して形成された腫瘍の成

長を経時的に測定した結果、*PTPRK-KD* は腫瘍形成速度を加速することが観察された (図 1B)。

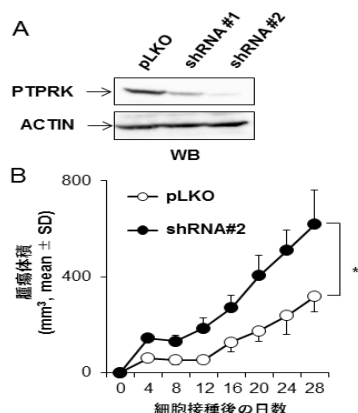


図 1. *PTPRK-KD* は大腸がん細胞の腫瘍形成を増強する

(A) shRNAを導入したHT-29細胞のPTPRK発現をウェスタンブロット法で検討した。(B) *PTPRK-KD*したHT-29細胞をヌードマウス皮下に移植し腫瘍形成を観察した。アスタリスクは有意差を示す ($P < 0.05$)。

申請者らの先行研究から *PTPRK* とがん幹細胞マーカーCD133には機能的連携が示唆される。HT-29細胞は内因性CD133を発現するので、次にCD133陰性のSW480細胞を用いて造腫瘍形成能に対する*PTPRK-KD*の影響を解析した。この検討を行うため、外因性CD133を強制発現すると同時に*PTPRK*をノックダウンしたSW480 (SW480/CD133/KD)細胞を作製した (図 2A)。これらの細胞のヌードマウスでの腫瘍形成を解析すると、申請者らの先行研究で報告したようにCD133の強制発現はSW480細胞のヌードマウス皮下腫瘍形成を増強したが、*PTPRK-KD*はCD133発現SW480細胞の造腫瘍形成能をさらに増強することが観察された (図 2B)。しかし、*PTPRK-KD*単独ではSW480細胞の造腫瘍形成能に全く影響を与えなかった (図 2B)。これらの結果から、*PTPRK*はCD133依存的な大腸がん進展に寄与する可能性が示唆された。

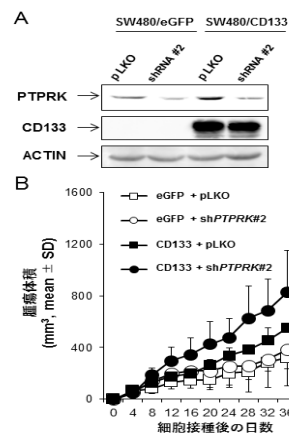


図 2. *PTPRK-KD* はCD133依存性の腫瘍形成を増強する
(A) 作製したSW480細胞のPTPRKおよびCD133発現をウェスタンブロット法で検出した。(B) 作製したSW480由来細胞をヌードマウスに接種し腫瘍形成を観察した。アスタリスクは有意差を示す ($P < 0.05$)。

(2) *PTPRK-KD* は低栄養条件下でのがん細胞の増殖をCD133依存的に増強する

がん形成の初期段階では血管新生が不十分な状態にあり、大腸がん組織が成長するためには初期のがん細胞が低栄養条件下でも生存しなければならないことが推察される。そこで、前述したSW480/CD133/KD細胞を用いて低栄養条件下 (1%ウシ胎児血清存在下)における細胞増殖を解析した。対照群となる*PTPRK-KD*のみ、あるいはCD133強制発現のみを導入したSW480細胞では低栄養条件下に反応して増殖速度が遅くなったのに対して、SW480/CD133/KD細胞は低栄養条件下でも活発に増殖し続けた。

近年、がん細胞を3次元培養した「がん細胞スフェア」は癌幹細胞のモデルとして用いられる。このとき、スフェア内部のがん細胞は低栄養状態に陥ることが推定される。そこで、上記のSW480由来細胞を9日間3次元培養することで得られたスフェアのサイズを解析した。対照群となるSW480細胞と比較して、CD133強制発現はSW480細胞から誘導されるスフェアのサイズを若干大きくした。興味深いことに、SW480/CD133/KD細胞はそれを上回るサイズのスフェアを形成した。しかし、*PTPRK-KD*のみのSW480

細胞のスフェアのサイズは対照群の細胞と比べて有意な差はなかった(図3)。以上の結果から、PTPRK-CD133経路はがん細胞の低栄養条件下での生存を高める作用がある可能性が示された。

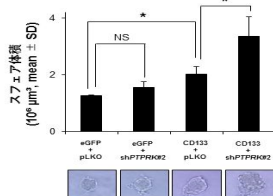


図 3. PTPRK-KD は CD133 依存的なスフェア形成を促進する

SW480 由来細胞株を 3 次元培養し、そのスフェアの大きさから体積を求めた。アスタリスクは有意差を示す ($P < 0.05$)。

(3) PTPRK-KD は CD133 リン酸化を介した AKT 活性化を増強する

申請者らの先行研究では CD133 のチロシンリン酸化は AKT の活性化を誘導すると同時に、PTPRK は CD133 のチロシン残基からリン酸基を除去することが *in vitro* での実験で観察された。そこで、大腸がん細胞における CD133 のリン酸化レベルが PTPRK によって制御されるかどうかを解析した。その結果、PTPRK-KD は CD133 のリン酸化レベルを増強させ(図 4A)、反対に、PTPRK を過剰発現させた場合 CD133 のリン酸化レベルは減弱することが観察された(図 4B)。

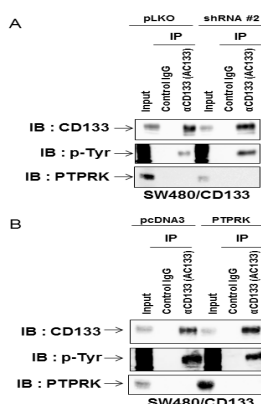


図 4. PTPRK は大腸がん細胞内においても CD133 を脱リン酸化する

CD133 を発現する SW480 細胞に PTPRK-KD (A) あるいは PTPRK 強制発現 (B)、免疫沈降-ウェスタンブロット法で CD133 のリン酸化レベルを解析した。

この結果を踏まえて、同細胞における AKT の活性化を検討した。SW480 細胞における AKT のリン酸化は CD133 の強制発現によって上昇し、PTPRK-KD は CD133 によって誘導された AKT リン酸化をさらに高めていた(図 5)。

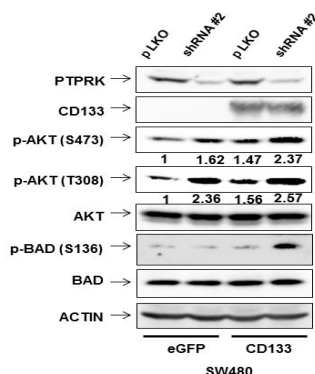


図 5. PTPRK-KD は CD133 依存的 AKT 活性化を亢進する

SW480 由来細胞株からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロット法で AKT ならびに Bad のリン酸化を検討した。

(4) PTPRK-KD は CD133-AKT-Bad 経路を活性化し、抗がん剤によって誘導される細胞死を抑制する

AKT のリン酸化は自身の酵素活性を高めることが知られ、様々な細胞の生存や細胞死の抑制につながる事が報告されている。そこで、SW480/CD133/KD 細胞を用いて AKT の下流標的分子を観察したところ、抗アポトーシス作用を持つ Bad のリン酸化が著しく高まっていた(図 5)。Bad のリン酸化はミトコンドリア経由アポトーシス反応を阻害することが知られる。Bad リン酸化レベルの亢進にともなって、SW480/CD133/KD 細胞のオキサリプラチンに対する抵抗性を増強していた(図 6A)。興味深いことに、上記の形質は対照となる CD133 強制発現のみ、あるいは PTPRK-KD のみの SW480 細胞では観察されなかった。(図 6B)

以上から、CD133-PTPRK 制御系は大腸がん細胞が高い悪性度(細胞生存能力と薬剤耐性)を持つ仕組みの中で重要な役割を担っ

ている可能性が示唆された(論文投稿準備中)

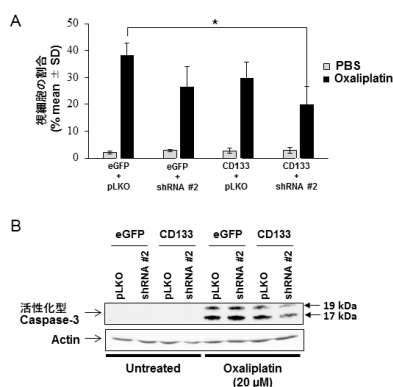


図 6. PTPRK-KD は抗がん剤による細胞を抑制する

(A) SW480 由来細胞をオキサリプラチン存在下で培養し、48 時間後の死細胞の割合をフローサイトメトリーで測定した。(B) 前述の細胞からタンパク質を抽出し、アポトーシス経路の活性化をウェスタンブロット法で検討した。アスタリスクは有意差を示す ($P < 0.05$)。

(5) PTPRK の新規基質タンパク質の探索

前述した先行研究から *PTPRK* 遺伝子の高発現は大腸がんの予後良好因子である可能性が示された。また、*PTPRK* は細胞膜上に存在することから、腫瘍細胞の増殖を促進する液性因子からの増殖シグナルを制御する可能性が考えられる。そこで、*PTPRK*-KD した HT-29 細胞を用いて、腫瘍増殖を促進する受容体型チロシンキナーゼ (EGFR、IGFR、FGFR および PDGFR) を介したシグナル伝達経路の活性化レベルを検討した。その結果、コントロール細胞と比較して *PTPRK*-KD した HT-29 細胞においてチロシンリン酸化が亢進しているタンパク質を複数同定し、当該タンパク質群が *PTPRK* の標的分子である可能性が示唆された。それぞれの候補タンパク質についての検証は今後の課題として残された。

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)

[学会発表](計 3 件)

松下雅司、下里修(8人中2番目)、早田浩明(8人中3番目)、*PTPRK* によるがん幹細胞マーカーCD133 の脱リン酸化を介した大腸癌進展の抑制。第 25 回日本癌病態治療研究会、2016 年 6 月 8 日、三井ガーデンホテル千葉

松下雅司、下里修(7人中2番目)、早田浩明(7人中3番目)、Receptor-type protein tyrosine phosphatase *PTPRK* attenuates CD133-mediated tumorigenesis of colon cancer cells through the down-regulation of pro-oncogenic CD133-PI3K-AKT pathway. 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1-4 日、神戸ポートアイランド

下里修(7人中1番目)、早田浩明(7人中2番目)、上條岳彦(7人中5番目)、受容体型蛋白質チロシン脱リン酸化酵素 *PTPRK* は CD133 を脱リン酸化し、その下流につながる AKT 経路の活性化を鎮静化する。第 73 回日本癌学会学術集会、2014 年 9 月 25-27 日、パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早田 浩明 (SOUDA Hiroaki)
千葉県がんセンター・医療局消化器外科
主任医長
研究者番号：90261940

(2) 研究分担者

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
上條 岳彦 (KAMIJO Takehiko)
埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・臨床腫瘍研究所
所長
研究者番号：90262708