

平成 21 年 3 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790240

研究課題名（和文） 幹細胞マーカーCD133 の固形癌における発現意義と機能解析

研究課題名（英文） The expression and function of CD133 in cancer cells

研究代表者

荒尾 徳三 （ARAO TOKUZOU）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：20441074

研究成果の概要：

がん細胞の幹細胞マーカーCD133 の発現は、mTOR シグナル阻害により発現が誘導され、低酸素および HIF-1A 誘導剤により発現が著明に抑制されることを見出した。本研究により CD133 発現制御メカニズムは、HIF-1A を介して抑制的に制御されていることを初めて明らかにした。この研究はがん幹細胞の発生初期のシグナル伝達およびがん幹細胞機能維持の原因解明につながる手がかりになると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	330,000	3,230,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学：病態医化学

キーワード：CD133、がん幹細胞、分子腫瘍学

### 1. 研究開始当初の背景

幹細胞マーカーCD133 は、造血器幹細胞・がん幹細胞・血管内皮前駆細胞などの未分化な細胞系列にのみ厳密に発現が制御されている分子である。その遺伝子発現の重要性にも関わらず発現制御機構および生物学的機能は明らかにされていない。我々は血管新生阻害薬の薬剤感受性研究中に、CD133 を強発現した胃癌細胞株が複数存在することを発見し、消化器癌において CD133 の発現メカニズムを明らかにするため本研究を計画した。

### 2. 研究の目的

(1) 消化器癌の CD133 発現と制御機構  
消化器癌を中心に CD133 の発現レベル・発現頻度・細胞内分布を明らかにし、消化器がん細胞における CD133 発現メカニズムを検討する。

(2) CD133 の機能解析  
siRNA による発現抑制系実験により、細胞増殖、薬剤感受性の変化、microarray を用いた遺伝子発現変化などの癌に関連する細胞形質変化を検出し CD133 の機能を解析する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 消化器癌の CD133 発現と制御機構

消化器癌における CD133 の mRNA 発現は 28 種類のがん細胞株に対して realtime RT-PCR で定量的に検出した。CD133 蛋白発現を 16 の消化器癌細胞株に対してウェスタンブロット法で検討した。CD133 の発現誘導実験は、主に大腸癌細胞株 WiDr、胃癌細胞株 IM95 および SNU-16 を用いて行った。

mTOR 阻害薬(Rapamycin)の濃度・時間を変えて検討した。Rapamycin の阻害薬として Tacrolimus を使用した。HIF-1A を誘導する目的で、低酸素下細胞培養、および HIF-1A 誘導剤である DFO を使用した。臨床検体の CD133, HIF-1A, HIF-1B, HIF-2A の mRNA 発現は、40 サンプルの胃癌臨床検体に対するマイクロアレイのデータを使用した。

#### (2) CD133 の機能解析

CD133 遺伝子発現抑制条件におけるマイクロアレイ遺伝子発現解析(Affymetrix GeneChip HG-U133 Plus2.0)は、CD133 に対する siRNA を用いて胃癌細胞 KATO-III に対して行った。CD133 の遺伝子変異の同定は胃癌細胞株 6 株に対して、full-length の cDNA にシークエンスを行った。CD133 の細胞形質に与える影響の検討は KATO-III に CD133-siRNA 暴露下に細胞増殖能および抗癌剤の感受性を検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 消化器癌の CD133 発現と制御機構

消化器癌における CD133 の発現を検討するため、CD133 の mRNA 発現を 28 のがん細胞株に対して、CD133 蛋白発現を 16 のがん細胞株に対して検討した(図 1A-C)。約 20%のがん細胞において CD133 の高発現を確認し、その多くは胃癌および大腸癌であった。

また胃癌臨床検体に対する CD133 の免疫染色の検討では、市販の病理スライドを使用して膜型の局在あるいは管腔内部に接する細胞膜側に CD133 蛋白発現を確認した(図 1D)。

次に CD133 発現と薬剤感受性についての検討実験中に、興味深いことに mTOR 阻害薬(Rapamycin)により CD133 の発現が誘導される現象を認めた。この作用は通常の抗癌剤である 5FU, CPT-11, Gemcitabine 暴露においては見られず、mTOR シグナル特異的であった。mTOR シグナル阻害によるがん細胞の CD133 発現誘導作用は、時間(12h, 24h, 48h)・用量(0.01, 0.1, 1 $\mu$ M)依存的に増強することが確認された。またその誘導作用は Rapamycin 拮抗薬の Tacrolimus によってキャンセルされることを示した。

最近低酸素状態が幹細胞の維持に関与することが報告され、本研究でも mTOR シグナルの下流分子である HIF-1A (hypoxia inducible factor 1, alpha) に注目し、同

分子の誘導と CD133 発現について検討した。がん細胞において Rapamycin による mTOR シグナル阻害により HIF-1A の発現は抑制された。一方で CD133 発現は亢進し、HIF-1A と逆相関の傾向を示した(図 2A-B)。次に強力な HIF-1A 誘導条件である低酸素下の細胞培養において、HIF-1A の発現亢進と CD133 の著明な発現抑制が観察された。これらの現象は WiDr, IM95, SNU-16 の複数のがん細胞株で確認された(図 2C-E)。

がん細胞における HIF-1A を介した CD133 発現抑制効果は、HIF-1A 誘導剤の DFO を用いても用量依存的(0, 2, 20, 200  $\mu$ M)に示された(図 4A-B)。最後に、HIF-1A を介した CD133 発現抑制効果が実際の臨床検体でも認められるかどうかを胃癌臨床検体において検討した。CD133 の mRNA 発現と、HIF-1A, HIF-1B, HIF-2A との相関を解析したところ、CD133 発現と HIF-1A 発現との間に強い逆相関( $R=-0.68$ )が認められた。(論文投稿準備中)

#### (2) CD133 の機能解析

CD133 のがん細胞における生物学的機能を探索する目的で、siRNA を用いた CD133 遺伝子発現抑制によって生じるがん細胞の遺伝子発現変化をマイクロアレイを用いて検出した。31 の遺伝子が 2 倍以上の発現変化を認めた(図 5A)。発現亢進遺伝子には細胞分化で増加する Keratin (keratin6, keratin17, keratin-associated protein)および L1CAM (L1 cell adhesion molecule)などが検出された。一方脳神経幹細胞マーカーの一つである MSI-2 の発現抑制が観察された。これらの結果から CD133 の機能は細胞を未分化にとどめる機能を有する可能性が示唆された。

一方、KATO-III に対する CD133-siRNA による遺伝子発現抑制は、がん細胞の細胞増殖効果に影響を及ぼさず、抗癌剤(5FU、パクリタキセル)に対する薬剤感受性をも変化させなかった。また、CD133 の遺伝子変異を検出する目的で胃癌細胞 6 株の CD133 の塩基配列を決定したところ、いずれもエクソン 3 がスキップされており、AC133-2 variant ががん細胞で優位であることを示した。

(論文投稿準備中)

#### (3) 研究成果のまとめ

- ①がん細胞の CD133 発現は mTOR シグナルに制御されることを示した。
- ②がん細胞の CD133 発現は転写因子 HIF-1A に抑制されることを示した。
- ③胃癌臨床検体において CD133 発現と HIF-1A 発現との間に強い逆相関を認めることを示した。
- ④がん細胞の CD133 発現はケラチンなどの分化マーカーの発現を抑制していることが示された。

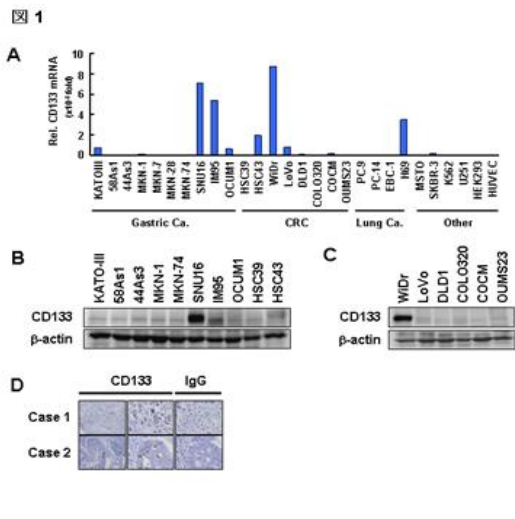
(4) 本研究の位置づけと今後の展望

がん細胞において CD133 の発現制御機構は現在までにメチル化に関する報告されていなかったが、本研究は、幹細胞マーカーCD133 遺伝子発現と mTOR シグナルの関連および転写因子 HIF-1A が CD133 発現制御に深く関与することを現時点で国内外を問わず初めて明らかにした。この点はきわめて新しい知見であり、今後の CD133 の発現制御機構に関する研究に大きく影響を与えると考えられる。

mTOR 阻害薬はすでにごん薬物療法として臨床的に有用性を示しており、がん幹細胞を標的とする治療の観点からも今後重要性を増すと考えられる。

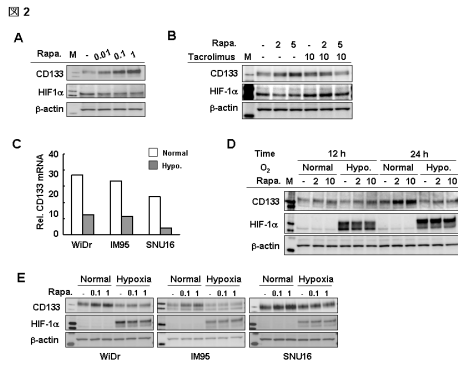
今後の研究テーマとしては、CD133 の発現を直接亢進する転写因子は本質的に「幹細胞」の機能を制御する転写因子と考えられるため、引き続いて HIF-1A との関連を含めて CD133 の発現制御機構について検討を行いたいと考えている。

【図 1】 がん細胞の CD133 発現.



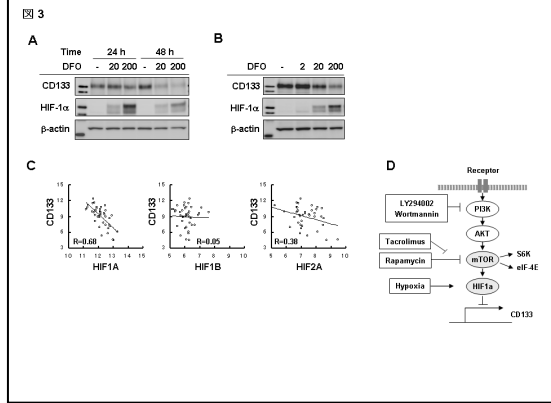
A がん細胞株の CD133 mRNA 発現. B 胃癌細胞株の CD133 蛋白発現. C 大腸癌細胞株の CD133 蛋白発現. D 臨床検体の免疫染色.

【図 2】 mTOR シグナルの阻害は CD133 の発現を誘導する.



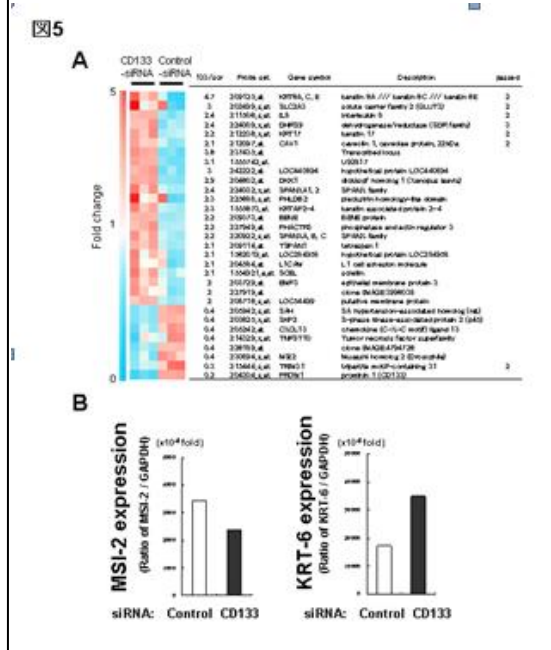
A Rapamycin 暴露による HIF-1A の発現抑制と CD133 誘導. B Rapamycin 暴露と拮抗薬 Tacrolimus による誘導効果のキャンセル. C 低酸素条件下における CD133 の発現抑制. D 低酸素下における Rapamycin 暴露と CD133 発現. E 他癌細胞株における再現性.

【図 3】 HIF-1A による CD133 の発現抑制.



A, B HIF-1A 誘導剤 DFO による CD133 の発現抑制効果. C 胃癌臨床検体における HIF-1A と CD133 の発現の相関. D まとめ図.

【図 4】 CD133 遺伝子発現抑制によって発現が変動する遺伝子群.



A マイクロアレイを用いて CD133-siRNA により遺伝子発現変化を受ける遺伝子群を特定した. B realtime RT-PCR による結果の再現性確認.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計9件）

すべて査読あり

- 1) Kawaishi M, Fujiwara Y, Fukui T, Kato T, Yamada K, Ohe Y, Kunitoh H, Sekine I, Yamamoto N, Nokihara H, Watabe T, Shimoda Y, Arao T, Nishio K, Tamura T, Koizumi F. Circulating endothelial cells in non-small cell lung cancer patients treated with carboplatin and paclitaxel. J Thorac Oncol. 4(2):208-13,2009.
- 2) Maegawa M, Arao T, Yokote H, Matsumoto K, Kudo K, Tanaka K, Kaneda H, Fujita Y, Ito F, Nishio K. Epidermal growth factor receptor lacking C-terminal autophosphorylation sites retains signal transduction and high sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Cancer Sci. 100(3):552-7,2009.
- 3) Matsumoto K, Shimizu C, Arao T, Andoh M, Katsumata N, Kohno T, Yonemori K, Koizumi F, Yokote H, Aogi K, Tamura K, Nishio K, Fujiwara Y. Identification of Predictive Biomarkers for Response to Trastuzumab Using Plasma FUCA Activity and N-Glycan Identified by MALDI-TOF-MS. J Proteome Res. 8(2):457-462,2009.
- 4) Yamada Y, Arao T, Gotoda T, Taniguchi H, Oda I, Shirao K, Shimada Y, Hamaguchi T, Kato K, Hamano T, Koizumi F, Tamura T, Saito D, Shimoda T, Saka M, Fukagawa T, Katai H, Sano T, Sasako M, Nishio K. Identification of prognostic biomarkers in gastric cancer using endoscopic biopsy samples. Cancer Sci. 99(11):2193-9,2008.
- 5) Morinaga R, Okamoto I, Fujita Y, Arao T, Sekijima M, Nishio K, Ito H, Fukuoka M, Kadota J, Nakagawa K. Association of

epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutations with EGFR amplification in advanced non-small cell lung cancer. Cancer Sci. 99(12):2455-60,2008.

- 6) Fukai J, Yokote H, Yamanaka R, Arao T, Nishio K, Itakura T. EphA4 promotes cell proliferation and migration through a novel EphA4-FGFR1 signaling pathway in the human glioma U251 cell line. Mol Cancer Ther. 7(9):2768-78,2008.
- 7) Matsumoto K, Yokote H, Arao T, Maegawa M, Tanaka K, Fujita Y, Shimizu C, Hanafusa T, Fujiwara Y, Nishio K. N-Glycan fucosylation of epidermal growth factor receptor modulates receptor activity and sensitivity to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor. Cancer Sci. 99(8):1611-7,2008.
- 8) Yanagihara K, Takigahira M, Tanaka H, Arao T, Aoyagi Y, Oda T, Ochiai A, Nishio K. Establishment and molecular profiling of a novel human pancreatic cancer panel for 5-FU. Cancer Sci. 99(9):1859-64,2008.
- 9) Nakayama T, Hieshima K, Arao T, Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Yamada Y, Fujii M, Oiso N, Kawada A, Nishio K, Yoshie O. Aberrant expression of Fra-2 promotes CCR4 expression and cell proliferation in adult T-cell leukemia. Oncogene. 27(23):3221-32,2008.

〔学会発表〕（計9件）

- 1) 荒尾徳三 Biomarker Discovery for Angiogenesis with Multi-Plex Immunoassay 第67回日本癌学会学術総会ランチョンセミナー31,名古屋, 2008. 10. 28-30.
- 2) 西尾和人 Multi-Plex Immunoassay (Bio-Plex) 第46回日本癌治療学会総会

- シンポジウム, 名古屋, 2008. 10. 30-11. 1.
- 3) 山田康秀 Microarray analysis for gastrointestinal cancer. 第 67 回日本癌学会学術総会ワークショップ 14-3, 名古屋, 2008. 10. 28-30.
  - 4) Arao T. Microarray analysis for EGFR tyrosine kinase inhibitor resistant cell line. American Association for Cancer Research Annual Meeting (AACR), San Diego, 2008. 4.12-16.
  - 5) Matsumoto K. Suppression of CD133 expression by siRNA modulated the expression of the genes associated with differentiation in cancer cells. AACR, San Diego, 2008. 4.12-16.
  - 6) Tanaka K. IMP-3 promotes cellular proliferation activity in gastric cancer. AACR, San Diego, 2008. 4.12-16.
  - 7) Fujita Y. Antitumor activity and mode of action of a unique interlocked molecule rotaxane. AACR, San Diego, 2008. 4.12-16.
  - 8) Maegawa M. Cells expressing EGFR lacking C-terminal are still hypersensitive to EGFR tyrosine kinase inhibitor. AACR, San Diego, 2008. 4.12-16.
  - 9) Kaneda H. FOXQ1 is a novel p21 regulator in colorectal cancer cells. AACR, San Diego, 2008. 4.12-16.

[図書] (計 4 件)

- 1) 荒尾徳三 松本和子 西尾和人 Cancer Treatment Navigator メディカルレビュー社 108-109, 2008
- 2) 荒尾徳三 金田裕靖 西尾和人 日本臨床増刊号・肺癌 日本臨床社 113-117, 2008
- 3) 木村英晴 荒尾徳三 日本臨床増刊号・肺癌 日本臨床社 51-58, 2008
- 4) 荒尾徳三 山田康秀 西尾和人 がんの分子標的治療 南山堂 383-386, 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 胃癌の判定方法  
発明者: 荒尾徳三、西尾和人他  
権利者: 近畿大学他  
番号: 特願 2008-126457  
出願年月日: 2008. 5. 13  
国内外の別: 国内

名称: N 結合糖鎖を利用した膵臓癌の診断方法  
発明者: 荒尾徳三、西尾和人他  
権利者: 近畿大学他  
番号: 特願 2008-123391  
出願年月日: 2008. 5. 9  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ  
近畿大学医学部ゲノム生物学教室  
<http://www.med.kindai.ac.jp/genom/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
荒尾 徳三 (ARAO TOKUZOU)  
近畿大学・医学部・講師  
研究者番号: 20441074

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

・研究協力者  
西尾 和人 (NISHIO KAZUTO)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 10208134