HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of Ceacam1 that is expressed in the glioblastoma-initiating cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	金子, 貞洋
Description	配架番号：2141
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第11659号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59047
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sadahiro_Kaneko_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　金子　貞洋

学 位 論 文 題 名

Functional analysis of Ceacam1 that is expressed in the glioblastoma-initiating cells

（膠芽腫幹細胞に発現されている膜タンパク質 Ceacam1 の機能解析）

【背景と目的】神経膠腫（グリオーマ）とはグリア細胞由来の腫瘍であり原発性脳腫瘍の約 25%を占める。その組織学的所見と生物学的な指標からグレード II、III、IV と WHO 分類が行われる。特に WHO グレード III、IV は悪性グリオーマと言われ、その存在組織の重要性から広範囲にわたる組織切除は不可能であり、術後に放射線・化学療法が併用される。膠芽腫（glioblastoma multiforme; GBM）はその最も悪性度の高いグリオーマ（WHO グレード IV）であり、過去数十年間で顕著な治療成績の向上が見られず、2 年生存率は未だ 20%未満である。

これまでに脳腫瘍を含む様々な悪性腫瘍に自己複製能や腫瘍形成能、多分化能といった特徴をもち、化学放射線療法に抵抗性を示す癌幹細胞の存在が明らかにされている。それらの特性から基礎的研究のみならず臨床的にも、癌幹細胞を標的とした画期的な治療法の創出に期待が集っている。しかし、一部の腫瘍を除き癌幹細胞の精製は困難であることから、その性状解析と新規治療標的の同定は進んでおらず、また脳腫瘍に関しても同様にその応用が進んでいるとは言えないのが現状である。

我々は、p53 欠損マウス神経幹細胞（NSC）に活性型 H-Ras 遺伝子を導入し、強い腫瘍形成能を有する人工マウス GBM 幹細胞（GBM-initiating cell, GIC）を樹立した。更に、マウス GIC、ヒト GBM から樹立した GIC 濃縮細胞群とヒト GBM 組織を用いた解析から GIC 特異的細胞膜タンパク質の１つとして Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1（Ceacam1)を同定した。Ceacam1 が GIC の増殖と腫瘍形成に重要な働きを担っていることを BrdU アッセイやソフトアガーアッセイ、マウス脳移植実験で確認後に DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、Ceacam1 の強制発現により 1,347 遺伝子と 1,286 遺伝子の発現がそれぞれ亢進・抑制されていた(Log2 が 2 以上)。また、Ceacam1 のノックダウンにより 438 遺伝子と 468 遺伝子の発現がそれぞれ亢進・抑制されていることも明らかとなった（Log2 が 10 以上）。Ceacam1 の強制発現により大きく変動している遺伝子群には、GFAP（163 倍）、SOCS3（27 倍）、S100b（4 倍）が含まれ、Ceacam1 が STAT3 の活性化を介して GIC の幹細胞性の維持と増殖に関与している事を突き止めていた。

Ceacam1 とは、1965 年に Gold と Freedman 両博士により発見された CEA 遺伝子を端緒とする「CEACAM family member」の１つであり以下の特徴を有する。（１）Ceacam1 には 11 のスプライシングバリアントが存在し、そのうち 7 つが膜タンパク質である。（２）細胞内ドメインの長さにより Ceacam1S（細胞内領域が短鎖）と Ceacam1L（細胞内領域が長鎖）に大別される。（３）Ceacam1L の細胞内領域は ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を有するが、Ceacam1S に既知の機能ドメインは存在しない。（４）Ceacam1 は、単体、ホモ二量体およびスプライシングバリアントや他の Ceacam メンバー（Ceacam5 等）と共にヘテロ二量体を形成するなどの存在形式を有し、多様に機能する。（５）Ceacam1 は、大腸がん、前立腺がん、乳がん等の腫瘍形成に関わっていることが報告されているが、GBM を含む脳腫瘍との関わりは報告されていない。また、癌幹細胞の関係についての報告は皆無である。

これまでの結果と報告から、Ceacam1 がどのように GIC の機能に関わっているのか、そのシグナル伝達系を解明することを目的として研究を遂行した。

【材料と方法】（１）ヒトGBM細胞にCeacam1が存在していることを検証するためにRT-PCRを行った。次にCeacam1がGBM組織内のGICで発現しているのかを確認するために、Ceacam1とGICマーカーの１つCD15に対しての２重染色した。（２）Ceacam1Lが幹細胞性に関与しているかを検討するために、ヒトGICにCeacam1Lを強制発現またはノックダウンし各種幹細胞マーカーのRT-PCRを行った。また幹細胞性の指標のである side population (SP) の比率をそれぞれの細胞検討し、細胞分化能について様々な濃度のウシ血清を混合した培地で培養し免疫染色で評価した。（３）Ceacam1強制発現と抑制型(dn)STAT3強制発現系を用いてGICにおけるSTAT3シグナルの重要性を免疫染色とBrdUアッセイで確かめた。（４）Ceacam1Lのシグナル伝達に関わる候補因子c-srcとPTPN(protein tyrosine phosphatases non-receptor type)の発現と機能について、GBM細胞でのRT-PCRとceacam1L強制発現細胞と活性型(ca)-およびdn-Srcの強制発現系での免疫染色を行い検討した。（５）FLAGタグ／GCSF受容体の細胞外領域の一部／Ceacam1LまたはS細胞内領域を結合したキメラタンパク質を作製してGICに強制発現させ、STAT3の活性化に関わるCeacam1の存在様式を免疫沈降とウエスタンブロットを用いて解明した。

【結果】（１）Ceacam1が検討した７検体のヒトGBMのすべてに発現していることをRT-PCRで確認した。また組織免疫染色で3.2%のCeacam1陽性GBM細胞がCD15と共染されることが明らかとなった。（２）Ceacam1Lノックダウンと dnSTAT3強制発現が幹細胞マーカーのsox1, aldh1a1, cxcr4, dll1, notch3, hey1の発現を抑制することを発見した。SPの結果でCeacam1L強制発現では25.4%と優位に上昇し（$p<0.05$)、Ceacmam1Lノックダウンでは1.1%と優位に減少（$p<0.01$）していることが明らかになった。また、それぞれの細胞が分化能を有することを示し、特にCeacam1L強制発現では幹細胞培地でのアストロサイトマーカーの増加と分化用培地での幹細胞マーカーの増加をみとめ、Ceacam1Lノックダウンでは幹細胞マーカーが幹細胞および分化用培地のいずれでも低下を示した。（３）Ceacam1Lの強制発現が内在性 STAT3 をリン酸化し、核への移行を誘導することを免疫染色法により確認した。また、dnSTAT3の強制発現がGICの細胞増殖抑制に働くことをBrdU取り込み率を指標に確認した（$p<0.01$)。（４）GICにおいてc-srcおよびPTPN11の発現をRT-PCRで確認した。Ceacam1L を強制発現させた GIC を用いた免疫沈降実験により両タンパク質がCeacam1を介してリン酸化されることが判明した。更に、caSrcがSTAT3のリン酸化を誘導すること、caSrcはGIC増殖を促進し、dnSrcは抑制することを明らかにした（$p<0.001$)。（５）Ceacam1キメラタンパク質発現細胞を樹立して、Ceacam1L単量体にc-srcが結合し活性化されることでc-src/STAT3 pathwayが活性化されることを明らかにした。

【考察】Ceacam1は、これまでにさまざまな腫瘍で細胞増殖、血管増生、腫瘍化などの生物活性を有していることが報告されていたが、今回我々ははじめて GBM で Ceacam1L がc-src/STAT3 pathwayを介して特にGICの幹細胞性と細胞増殖に重要な働きを担っていることを明らかにした。本研究の成果は、Ceacam1とその下流イベントがGBM治療の優れた標的であることを示唆し、新規治療薬の創出につながるものと期待される。

【結論】ヒトGICにおいて単量体Ceacam1Lがc-src/STAT3 pathwayを制御することにより幹細胞性、増殖能や腫瘍形成能に重要な働きを担っていることを解明した。これらの結果からCeacam1Lを標的とした新たなGBM治療法の開発が期待できる。