



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



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エントが存在し、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エントや他の 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ェ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 ($p<0.05$)、Ceacam1L 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。