HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of Ceacam1 that is expressed in the glioblastoma-initiating cells [an abstract of entire text]
Author(s)	金子, 貞洋
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2141 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/59048
Type	doctoral thesis
File Information	Sadahiro_Kaneko_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文（要約）

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)

2015 年 3 月

北海道大学
金子貞洋
Sadahiro KANEKO

学 位 論 文（要約）

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)

2015 年 3 月

北海道大学
金子貞洋
Sadahiro KANEKO

緒言

神経膠腫（グリオーマ）とはグリア細胞由来の腫瘍であり本邦の原発性脳腫瘍の約 19.5%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Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、ⅣとWHO分類が行われ、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）である。

分子生物学的にはグリオーマの発生過程において遺伝子変化が起こることが解明されており、特にGBMでは急速な臨床経過をたどり、当初からGBMと診断されるprimary GBMと、グレードⅡあるいはⅢの星細胞腫から進行してGBMとなるsecondary GBMに分類される。前者ではEGFR増幅やPTEN変異などが、後者ではIDH1変異、TP53変異などが高頻度に認められる。これらの研究によって遺伝子学的分類と、その予後予測において多大な成果を認めている。

臨床上では GBM の治療は脳という臓器の特異性から手術のみでの治療は困難であり放射線や化学療法を併用して行われている。現在まで様々な研究のもと治療法が検討されており、2005年にはアルキル化剤であるテモゾロマイドと放射線化学療法を併用した治療で生存率の改善を認めたが生存期間中央値は14.6ヶ月と極めて予後不良であることに変わりはない。

1997 年に急性骨髄性白血病においてその腫瘍細胞起源を示す癌幹細胞（Cancer Stem Cells; CSCs あるいは Cancer initiating Cells; CICs）の概念が示唆されてからは、乳癌や前立腺癌、大腸癌など様々な固形癌においても同様の報告が続いている。

その概念は幹細胞生物学研究の発展により確立されているが、その同定方法には確立したものがなく、それぞれの癌種に特異的な幹細胞マーカーが陽性で、強い自己複製能と腫瘍形成能を有する癌細胞を一般的に癌幹細胞と呼称している。

脳腫瘍の分野においてもグリオーマ幹細胞（Glioma initiating Cells; GICs）の存在が提唱されており、GICsは、その他の癌幹細胞と同様に強い自己複製能を持ち、神経幹細胞のもつCD133やCD15、Nestinといった特異的タンパク質を有し強い腫瘍形成能をもつ細胞とされている。またこれらの GICs が優れた薬剤排出能力や修復能力を有していること、正常組織幹細胞と同じくニッチ(微小環境)内で守られていることなどから、通常の癌細胞を標的とした放射線および抗がん剤治療に対して強い抵抗性を持つとされ、GICsの性状や機能の解析はGBMの治療成績改善につながると考えられている。

治療の開発には大きく分けて、癌幹細胞を標的としたものと癌幹細胞ニッチを標的としたものが考えられている。前者では、正常細胞と同じく癌幹細胞に

おいても自己複製に関わる分子機構である Wnt、Notch、Hedgehog、EGFR を標的としたものや、正常細胞の分化誘導に関わる因子を利用した癌幹細胞の分化誘導法の開発が行われているが、正常幹細胞に関わる分子機構を標的とした場合には正常組織にも影響を及ぼすため幹細胞に特異性の高い分子機構の解明が必要とされている。後者に関して脳腫瘍の分野では、血管内皮細胞と隣接したCD133陽性脳腫瘍細胞が強い自己複製能と腫瘍形成能を有するといった血管性ニッチの存在や、低酸素ニッチ内で癌幹細胞が転写因子 HIF1/2 を誘導することにより、その幹細胞性を維持しかつ癌幹細胞が休眠状態として維持されることで治療抵抗性を示すことを利用した研究や治療が行われており、血管性ニッチの解消も期待されていた血管内皮細胞増殖因子阻害剤のベバシツマブがGBMの治療適応となったが生存期間の優位な延長は認めなかった。

北海道大学遺伝子病制御研究所・幹細胞生物学教室では、癌幹細胞を標的とした治療を目標とすべく新たな特異的分子機構を解明するために、強い腫瘍形成能を有する人工マウスGICs(NSCL61)を樹立した。その細胞の遺伝子発現解析から GICs 特異的遺伝子群を同定し、その後にヒト GBM 組織とその組織から分離し樹立したヒト GICs 濃縮細胞群を用いた解析を行い、特異的遺伝子群の中から GICs 特異的細胞膜タンパク質として Ceacam1(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule)を同定した。これまでに Ceacam1 は GBM での活性化が知られている IGFR(insulin growth factor receptor)やEGFR(epidermal growth factor receptor)の基質であることが明らかになっており、Ceacam1 が GBM および GICs に関与している事が示唆されていた。

現在までに Ceacam1 は、非小細胞肺がん、大腸がん、前立腺がん、乳がんなどで腫瘍形成能に関わっていることが報告されているが、GBM を含む脳腫瘍におけるその働きは明らかにされていない。更には Ceacam1 と癌幹細胞の関係についての報告はない。そこで本研究では GBM における Ceacam1 の機能を明らかにするとともに GICs での Ceacam1 シグナル伝達系を明らかにすることを目的とした。

略語表

ABC(トランスポータ)：ATP-binding cassette transporters
bFGF：basic fibroblast growth factor
BSA：bovine serum albumin
CA：constitute active
CC1:Ceacam1
CEACAM：Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule
CIC：cancer initiating cell
CSC：cancer stem cell
DMEM：Dulbecco’s modified Eagle’s medium
DN：dominant negative
FGC1L：p3XFLAG-GCSFR-Ceacam1L ベクター
FGC1S：p3XFLAG-GCSFR-Ceacam1S ベクター
EGF：epidermal growth factor
EGFP：enhanced green fluorescent protein
EGFR：epidermal growth factor receptor
FCS：fetal calf serum
GBM：glioblastoma multiforme
GFAP：glial fibrillary acidic protein
GIC：glioma initiating cell
IGFR：insulin growth factor receptor
IRES: internal ribosomal entry sequence
ITIM：immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
NSC：neural stem cell
PBS：phosphate buffered saline
p-cSrc：phospho-cSrc
PE：phycoerythrin
PFA：paraformaldehyde
p-STAT3：phospho-STAT3
p-PTPN11：phospho-PTPN11
PTPN：protein tyrosine phosphatase, non-receptor type
shRNA：short hairpin RNA
STAT3：signal transducer and activator of transcription 3
VEGF：vascular endothelial growth factor

第一章　GBM での Ceacam1 発現と性状の検討

【緒言】

前述のとおり北海道大学遺伝子病制御研究所・幹細胞生物学教室では、癌幹細胞を標的とした治療を目標とする新たな特異的分子機構を解明するために、強い腫瘍形成能を有する人工マウス GICs(NSCL61)を樹立した。その NSCL61 の遺伝子発現解析とヒト GBM 組織から分離し樹立したヒト GICs 濃縮細胞群を用いた解析から、GICs 特異的細胞膜タンパク質として Ceacam1(Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule)を同定した。

1965 年の Gold と Freedman 両博士による CEA 遺伝子発見後、多くの関連遺伝子が発見され 1999 年にそれらを「CEACAM family gene」と改名統一した。その遺伝子群の中のひとつが Ceacam1 である。CEACAM family 遺伝子は染色体 19q13.2 に存在し、現在までに 18 の遺伝子と 11 の偽遺伝子が明らかになっている。また、CEACAM 遺伝子には多くのスプライシングバリアントが存在し、膜タンパク型と分泌型に大別されるが、共通して N 末端細胞外領域に複数(1～3)の Ig-like domain を持っていることが特徴である。Ceacam1(CD66a)には 11 の variant があり、7 つが膜タンパク質として存在している。膜タンパク質としては細胞内ドメインが短いもの(Ceacam1S)と ITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)を持つ細胞内ドメインが長いもの(Ceacam1L)にわけられる。Ceacam1 は、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) とのヘテロ二量体を形成する場合と、細胞内 Ca イオン濃度などの影響により、単量体としても存在する場合があるとされている。それぞれの状態により異なる細胞内シグナルを伝達すると考えられており、特に Ceacam1L は GBM での活性化がいわれている IGFR(insulin growth factor receptor)や EGFR(epidermal growth factor receptor)の基質であることが明らかになっている。

こういった過去の知見からも Ceacam1 が GBM および GIC に関与していることが示唆され、これらを実証するため北海道大学遺伝子病制御研究所・幹細胞生物学教室では GICs に Ceacam1 特異的な short hairpin RNA (shRNA)とコントロール shRNA を導入したものと、ceacam1 強制発現ベクターとコントロールベクターを導入したものを作製し、それらの細胞の遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いた網羅的な解析を行った。DNA マイクロアレイでは 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)。

DNA マイクロアレイの結果を基礎にし、培養された神経幹細胞およびマウス/ヒト GIC の PCR と蛍光免疫染色を行いマウス/ヒト GIC にのみ Ceacam1 を認めることを明らかにし、次いでそれぞれの細胞に Ceacam1 および shCeacam1 を強制発現した細胞について BrdU アッセイ、ソフトアガーアッセイを行い Ceacam1 が発現することで増殖能やコロニー形成能が増強することを明らかにした。またマウス脳への Ceacam1 強制発現 GIC 移植ではマウスに通常の GIC を移植したマウスよりも早く腫瘍死に至らしめ、その腫瘍組織は多くの血腫を伴うなど臨床的にもより悪性を示した。

以上から Ceacam1 が GBM において腫瘍形成や幹細胞性などの重要な役割を果たしている可能性が示唆されていた。

そこで本章では①手術で得られたヒト GBM 組織を幹細胞マーカーと Cecama1 の 2 重免疫染色を行うことで Ceacam1 の局在を示すこと、②フローサイトメトリーを用いて培養したヒト GBM 細胞で幹細胞マーカーと Ceacam1 の関連を明らかにすること、③Ceacam1 強制発現およびノックダウン細胞の分化能を検討することで幹細胞性の評価と Ceacam1 が幹細胞性の維持にどのように作用するかを明確にすることを目的とした。また Ceacam1 と Ceacam family との相互作用により Ceacam1 のシグナルが機能する可能性を検討するためにヒトで発現が確認されている Ceacam family についてヒト GBM 組織で RT-PCR を実施した。

【結果】

組織内での Ceacam1 発現を確認するためヒト GBM 組織の免疫染色を行った。Ceacam1 は CD15 と共陽性を認め正常細胞との境界に近い部位に局在していた。さらに Ceacam1 はグリオーマで増幅が言われている EGFR とも共陽性であった。培養細胞での CD15 との関連を確認するために行ったフローサイトメトリーでは 9.4%が Ceacam1 陽性となり、その中でもより強い染色を認めるものが CD15 陽性(3.2%)であった。

Ceacam1 の有無で GIC が変化するかを検討するために行った side population 法では、Ceacam1 を導入した GBM でコントロールと比較し染色を受けない GIC と考えられる細胞比率は有意に上昇し、shCeacam1 を導入した GBM では有意に減少した。

GIC は多分化能を有しているとされており、われわれが使用する細胞もこれに当てはまることの確認と、その特性を調べるため分化誘導実験を行った。

結果としてはCecaam1の強制発現やノックダウンに関わらずさまざまな細胞への分化能、つまり幹細胞の特性を有していること判明した。

特記すべきはまずCeacam1ノックダウンでネスチンの発現が低下しているのと比較しCeacam1強制発現で若干の増加を認めている事とCeacam1を強制発現した細胞でGFAPの出現が増加している事であった。これによりCeacam1が幹細胞性の維持に関与している可能性が考えられた。

Ceacam1とCeacam familyとの相互作用によりCeacam1のシグナルが機能すると仮定し、それを検討するためにヒトで発現が確認されているCeacam familyについてヒトGBM組織でRT-PCRを実施した。結果はCeacam1のみが全てのGBMで共通して存在しておりその仮定は否定された。

【考察】

Ceacam1はGBM組織において正常脳組織との境界領域でCD15とともに存在していた。またCeacam1陽性細胞はEGFR陽性細胞のなかに含まれることがわかった。EGFRは脳腫瘍でその遺伝子が増幅していることが言われているタンパク質であり、CD15は前述のとおり神経幹細胞マーカーとしてよく知られている。すなわち組織免疫染色からCeacam1はGBM組織の中で幹細胞性を有する細胞に認められていることが明らかになった。

またフローサイトメトリーではCeacam1陽性細胞のうち強陽性を示した約30%、つまり全体の3.2%がCD15陽性を示していた。Side population法および分化実験ではCeacam1Lが幹細胞性の維持に働くことを明らかにした。

これらの結果からCeacam1がGICの新たなマーカーとして利用することができる可能性のある膜タンパク質であると考えられた。またRT-PCRの結果からCeacam1はその他のCEACAM familyとの共存によりGICで機能を発現するわけではないことも判明し、Ceacam1シグナルを発現するためのその他の因子を検索が必要となった。

第二章　NSCおよびGICでのCeacam1シグナル伝達の解析

【緒言】

第一章ではCeacam1がGIC特異的なタンパク質であることを明らかにしたが、

その機能と細胞内でのシグナル伝達機能についてはいまだ解析されていない。また CEACAM family の相互作用により Ceacam1 の機能が発現するとの仮定は第一章での結果から否定された。

Ceacam1 の強制発現により大きく変動している遺伝子群から Ceacam1 が STAT3 と関連を示すことが間接的に示唆された。また STAT3 はすでに GBM の幹細胞性や腫瘍形成能に関わることがよく知られているタンパク質であった。

以上から Ceacam1 が STAT3 を介してその機能を示すという仮定がたてられた。これを証明するため、GIC に発現している内因性 Ceacam1 の影響をできるたけ除去できるように NSC の Ceacam1 強制発現によって STAT3 シグナルがリン酸化されるかを免疫染色にて明らかにした。次に Ceacam1/STAT3 経路がターゲットとする遺伝子を明らかにするために冒頭で述べた Ceacam1 ノックダウンで明らかな減少を認めていた幹細胞関連遺伝子のうち STAT3 との結合部位を持つものを the Champion Chip Transcription Factor Search Portal based on the SABioscience’s propietory database を利用しいくつか候補を挙げ、それらの発現を dnSTAT3 と shCeacam1 を形質導入させた GIC を用いた RT-PCR で調査した。また GIC で STAT3 および Ceacam1 の抑制によってどのような影響が及ぶかを免疫染色で明らかにした。

【結果】

NSC に Ceacam1 を強制発現することで STAT3 がリン酸化され核に集簇し GFAP を産生させることを明らかにした。

Ceacam1 ノックダウンで明らかな減少を認めていた幹細胞関連遺伝子をマーカーとして Ceacam1 ノックダウンと dnSTAT3 の関連を RT－PCR で検討した。dnSTAT3 と shCeacam1 を導入した GIC でいずれの mRNA 発現も同じ傾向を持って低下していた。免疫染色では通常培地で培養した dnSTAT3-EGFP 強制発現 GIC においては STAT3 の下流にある GFAP が産生されないこと示した。また BrdU アッセイでは dnSTAT3 を強制発現した GIC で control と比較して増殖率が有意に減少することが明らかにした。

【考察】

神経幹細胞において Ceacam1 の強制発現が STAT3/GFAP 経路の活性化を促進することを明らかにした。また Ceacam1/STAT3 経路が幹細胞マーカーをターゲ

ットとしているのと同時に細胞増殖に関与していることが判明した。この結果からCeacam1はSTAT3を活性化しSTAT3経路を介してGFAPの産生および幹細胞マーカーの発現や細胞増殖を制御していることが明らかになった。

第三章　Ceacam1-STAT3経路の詳細な解析

【緒言】

これまでにCeacam1がGICに特異的に存在しSTAT3の活性化に関与していることを明らかにしてきた。本章ではCeacam1がどのようなシグナルを介してSTAT3のリン酸化を引き起こしているかを詳細に解明することを目的とした。

過去にCeacam1LはSrcとPTPN6および11がCeacam1Lの細胞内ドメインにある様々なチロシンリン酸化受容体によってリン酸化を受けることが明らかになっている。SrcはSTAT3の活性をあげ、PTPN6がSTAT3に抑制的に機能することが知られていることから、まずはGICでもそれらが機能していると仮定し実験を計画した。PTPN11についてはEGFRを活性化することが言われておりGBMの発生に関与する可能性が考えられたため同様に実験を行った。

最初にGICでのSrcとPTPN6、PTPN11のmRNA発現量をRT-PCRで明らかにした。次にFLAG-Ceacam1Lを強制発現させたGICをFLAGで免疫沈降しウエスタンブロットでCeacam1Lと共沈されるタンパク質を検出した。

以上からceacam1/STAT3経路にSrcの関与が示唆されたため、Srcを強制発現したGICについてウエスタンブロットを行い活性化状態であるSrcの下流でSTAT3のリン酸化が起きていることを明らかにし、BrdUアッセイで増殖能を調べた。最後にCeacam1LおよびCeacam1Sが細胞膜でどのように存在するときに前述のシグナルが働くかを明らかにすることを目的としてFLAG抗体の投与によって二量体を作ることができるCeacam1キメラタンパク質を発現させるベクターを構築しNSCとGICに形質導入し免疫沈降とウエスタンブロットでその機能を明らかにした。

【結果】

RT-PCRでGICにはSrcとPTPN11が発現し、STAT3に抑制的に働くPTPN6は発現していないことが明らかになった。またSrcおよびPTPN11は共沈実験でCeacam1Lと結合しかつリン酸化されていることを明らかにした。この結果から

Ceacam1 に依存した STAT3 活性化のネガティブフィードバックは GIC には存在しないと判明した。

次いで caSrc と dnSrc を強制発現させた GIC を比較したところ caSrc を強制発現した GIC では STAT3 のリン酸化反応が増強し、その下流である GFAP の産生も認めた。また BrdU アッセイで caSrc 発現 GIC が dnSrc 発現 GIC と比べ優位に増殖能が上がっていた。

Ceacma1 は前述のように細胞膜上で 2 量体を形成して存在していたり、単量体として存在していることが言われている。そこで存在形式を規定することができる実験系を作製し Ceacam1 の発現形式によるシグナル伝達を明らかにすることとした。

まずは NSC に FGC1L(p3XFLAG-GCSFR-Ceacam1L ベクター)および FGC1S(p3XFLAG-GCSFR-Ceacam1S ベクター)を強制発現させ FLAG 抗体処理をおこなった場合と行っていない場合について PTPN11、STAT3 および c-Src のリン酸化と GFAP の産生を評価した。

Ceacam1L の細胞内ドメインをもつ NSC において FLAG 抗体未処理のもの、つまり単量体のもののみが GFAP とリン酸化された Src、STAT3、PTPN11 の発現を認めた。また共沈実験でそれらが Ceacam1L キメラタンパク質に結合されていることを明らかにした。

次いで GIC についても同様の実験をおこなった。結果は同様であり Ceacam1L キメラタンパク質を強制発現した細胞の FLAG 抗体処理をしていないもの、つまり単量体の細胞で GFAP とリン酸化された c-Src、STAT3、PTPN11 の発現を認め、共沈実験で Ceacam1L 細胞内ドメインにこれらが結合していることを明らかにした。

【考察】

過去の文献では Ceacam1L と Src、PTPN6、PTPN11 の関連性が言われていたが GIC においては Src と PTPN11 が関与していることを明らかにした。また前述のとおり Src は STAT3 の活性化に関連することが知られていたが、NSC および GIC では Ceacam1L と結合し活性化することで STAT3 を活性化することが解明され、この活性化によって腫瘍増殖能が増強することも明らかとなった。またこれらは Ceacam に様々なスプライシングバリアントがあるなかでも Ceacam1L でありかつ Ceacam1L が細胞膜で単量体として存在しているときに Ceacam1/cSrc/STAT3 経路としてシグナルが出現することも判明した。

併せて Ceacam1 が PTPN11 の活性化を促進することは、STAT3 のみでなく EGFR

の発現にも関与している可能性が考えられた。

考察

Ceacam1 は様々な腫瘍細胞における増殖、血管新生、腫瘍形成や、免疫細胞におけるサイトカイン産生や細胞障害活性の抑制などがその機能として知られている。我々は、Ceacam1L が強制発現された GIC を用いて、ソフトアガーアッセイで腫瘍増殖の亢進を、マウス脳に移植された腫瘍ではより早い腫瘍形成を認めかつ出血傾向を持っていることを明らかにした。腫瘍からの出血傾向に関しては、Ceacam1 が VEGF による血管新生に強く影響しているという以前の知見と、当研究における Ceacam1L の強制発現が Angpt1 の発現を増強させるという結果から腫瘍血管の新生が要因として考えられた。血管新生の亢進は GBM の特徴であり、それらの血管からの腫瘍内出血は予後を悪化させることが明らかである。このことから Ceacam1 の制御により Angpt1 を抑制できれば GBM の治療ターゲットとして発展していく可能性が考えられた。また臨床的応用としては本実験では免疫学的解析を行っていないものの、Markel らが 2002 年に発表した Ceacam1 が癌細胞を免疫細胞の攻撃から保護する可能性などについても検討する余地があることを示した。

Ceacam1 は CD15 や SSEA1 でよく知られている Lewis X 構造を持つ高度にグリコシル化されたタンパク質であることがわかっている。CD15 や SSEA1 は既知の幹細胞マーカーであり胚性幹細胞、骨髄幹細胞および NSC と GIC などを含む多くの細胞で発現している。本研究にて注目すべきは CD15 陽性の GIC のほとんどが Ceacam1 陽性であり、Ceacam1 が細胞膜に存在する幹細胞マーカーである可能性を強く示唆するという結果である。また免疫染色は TritonX100 などの界面活性剤を用いて行ったものであり、細胞膜のみでなく細胞質内に存在する Ceacam1 も検出していたと考えられる。GIC において Ceacam1 の細胞質内での機能は明らかにされていないが、Ceacam1 が休止 T 細胞の表面に低いレベルで発現されると、T 細胞が活性化され細胞内から細胞表面に Ceacam1 が動員されるという報告が GIC において細胞質内 Ceacam1 を細胞膜に動員するメカニズムの解明の手がかりとなり、より詳細な機能解析を可能とすると考えられる。

我々は Ceacam1 がその下流で GIC における幹細胞性関連遺伝子の発現を調整していることを明らかにした。特に Ceacam1 が ALDH family と ABC トランポータの発現を調整していることは、GIC の薬剤耐性を ceacam1 が間接的もしくは直接的に制御していることを示している。また Ceacam1 は DLL1、Notch3、hey1、

Sox やアストロサイトマーカーである GFAP、S100β などの Notch 関連因子の発現にも関与していた。FGC1L を強制発現させた GIC は NSC 培地においてより大きな sphere を形成する傾向にあり、通常培地でもニューロンマーカー陽性細胞にはあまり分化を示さないことがわかっている。GFAP 陽性アストロサイトは、成人の脳室壁に存在し多能性神経幹細胞として機能することが知られており[51,52]今回得られたこれらの知見は、Ceacam1 が GIC の幹細胞性の維持を行っている可能性を示唆するものである。Ceacam1 下流遺伝子の全ての発現調整が STAT3 に関与していることは考えづらく、STAT3 以外の転写因子を同定することは Ceacam1 の幹細胞性維持の可能性をより強固にするものであるとともに、GIC の薬剤耐性メカニズムを解明し治療反応性の向上につながると考えられた。

Ceacam1 は c-src、PTPN6、PTPN11 を活性化し細胞依存性に EGFR からのシグナルに影響を及ぼすことがわかっている。偶然にも本研究で JAK/STAT 経路に対し抑制的機能を持つ PTPN6 が GIC では mRNA レベルで検出されないことを明らかにした。これはつまり Ceacam1 に依存した STAT3 へのネガティブフィードバックは GIC には存在しないということである。また PTPN11 が EGFR を c-Src が STAT3 を活性化するということは、Ceacam1 が GIC において EGFR および STAT3 の経路を増幅していることを示している。

我々は Ceacam1L の細胞内ドメインが単量体であるときに c-Src/STAT3 シグナル経路を活性化することを明らかにした。また同時に二量体である時にはそのシグナルが働かないことも明らかにしている。単量体であるか二量体であるかという Ceacam1 の GIC での存在形式は Ceacam1L や Ceacam1S または可溶性の Ceacam1 や Ceacam5 が存在しているかという環境に完全に依存している。

以前の報告では B16F10 メラノーマの肺転移が Ceacam1 ノックダウンマウスでは有意に減少するとされている。これは癌の転移が腫瘍周囲の細胞での Ceacam1 発現が重要な役割を果たしていることを示している。今後は腫瘍微小環境の中でどのようにして GIC の増殖に Ceacam1 が分子スイッチとして関わってくるかを解明することが課題となる。

総括および結論

1）マウスおよびヒト脳腫瘍組織において Ceacam1 が既知の幹細胞マーカーの一つである CD15 と共局在しかつ Ceacam1 の発現により GIC が増加すること、また Ceacam1 の発現により腫瘍の増殖能が増強することを示した。これらはグリオーマにおいて Ceacam1 が新たな腫瘍幹細胞マーカーとして期待で

きることを示唆した。

2）Ceacam1 は GIC 内で STAT3 の活性化を担っていることを明らかにし、STAT3 の活性化が GIC の増殖能を増加させることを示した。また Ceacam1 がその下流で STAT3 に関連する幹細胞マーカーの発現を調整することも明らかにした。

3）Ceacam1L が細胞膜に単量体として存在するときにのみに、その細胞内ドメインに C-Src が結合しリン酸化され、c-Src/STAT3 経路を活性化し増殖能の増加や幹細胞性の維持に働くことを示した。

4）Ceacam1 が GIC における特異的膜タンパク質であり、その増殖や幹細胞性の維持と GIC の薬剤耐性に関与していることが本研究で明らかとなった。

5）これらの知見を鑑み今後の治療標的として研究が展開されていくことが期待できる。

【方法】

1） 細胞培養

GBM 細胞は 10%FCS を含む DMEM に 10%ペニシリン/ストレプトマイシンを混合した培地で培養した(通常培地)。NSC および GIC はサイトカイン bFGF(10ng/ml)と EGF(10ng/ml)を含む DMEM/F12(WAKO, Japan)で培養した(NSC 培地)。オリゴデンドロサイトやニューロンへの分化を促す場合には 1%FCS を含む DMEM に 10%ペニシリン/ストレプトマイシンを混合した培地で培養した(分化培地)。

ここでヒト GBM 細胞は便宜的に E3,E6 と呼称することとした。

2） 組織免疫染色

脱パラフィンを行ったのちに 2%PFA 溶液で室温にて 5 分間固定したあと、抗原賦活化のために HistoVT (Nacalai Tesque, Japan) で 90℃、20 分間の処理を行い 0.3%TritonX100 と 2%スキムミルクを含む PBS で 1 時間ブロッキングを行った。その後に一次抗体を 4℃で 16 時間、二次抗体を常温にて 1 時間反応させた。核を DAPI にて対比染色してマウンティングを行い検鏡した。

3） フローサイトメトリー

培養皿の細胞を酵素処理してシングルセルとして収集し一次抗体を室温で30分、二次抗体を室温で30分反応させた後にPropidium Iodideを加えた。FACSCantII(日本BD)で解析を行いPI陽性細胞は死細胞として除外した。

４） side population法

ABCGトランスポータ阻害薬を投与することで強い薬剤排泄能をもつ幹細胞が染色性を持つようになるという性質つまりside populationが減少するという性質を利用したものであり、その差が幹細胞を示すと考えられている。フローサイトメトリーと同様の方法でHoechst33342(2.5μg/ml)を用いて核の染色を行いABCトランスポータ阻害薬であるレセルピン(10μM)の添加の有無で染色細胞の比率を検討した。

５） RT-PCR

各細胞を培養皿より回収し、全RNAをRNeasy(Qiagen, Germany)を用いて精製し、First-Strand cDNA synthesis kit(Invitrogen, USA)を使用してcDNAを合成した。1μℓのcDNA、1pMの各オリゴヌクレオチドプライマー対、1uのTaq DNA polmeraseを含む10μℓ反応液を調整しサイクルパラメータは94℃ 20秒、58℃ 30秒および72℃ 45秒を35サイクル、gapdhについては94℃ 15秒、53℃ 30秒および72℃ 90秒を22サイクルとして、以下のオリゴヌクレオチドDNAプライマーを合成しRT-PCR反応を行った。

６） 形質導入

$2x10^6$個のNSCまたはGICとコントロールベクターもしくは目的としたインサートを含んだベクターのいずれか10μgをNSC Nucleofector Solution 100μl中に懸濁し、Nucleofector(AMAXA)デバイスにて形質導入した。細胞は適切な培養液中で培養し形質導入された細胞は0.5μg/mlのピューロマイシンで選択した。

７） GICへのレトロウイルスの感染

遺伝子導入の前日にレトロウイルスのパッケージング細胞である PLAT-E細胞を 10% FCS (v/v) と 1 μg/ml gentamycin を含んだ DMEM 中に培養した。翌日ポリエチレンイミンを用いて pMY-IRES-EGFP ベクターもしくはインサートを含んだpMY-IRES-EGFP ベクターのいずれかをPLAT-E細胞に導入した。48時間後、上清を回収し、1 μg/ml polybrene を加えたものをウイルス溶液とし、培養 2 日目の GIC に加えた。9 時間培養した後にウイルス溶液を GIC から除き標準培地を加え培養を続けた。また、それぞれのベクターが細胞に発現して

いることはWestern blotting により確認した。

８） ベクター構築

dn(dominant negative form(Y705F))STAT3 発現ベクターは北海道大学遺伝子病研究所幹細胞生物学分野　近藤教授より提供していただいた。

野生型 ceacam1L の全長 cDNA はマウス NSC の cDNA と GeneBank にある ceacam1L の配列を元にして作製した primer を用いて RT-PCR にて単離し pcDNA3.1-hyg (Invitrogen)と pcDNA3-2xFLAG-c ベクターに挿入した。

PCR 断片はベクターにクローニングした後、シークエンサーを用いて配列に変異が入っていないことを確認した。

９） 免疫染色

細胞を 2%PFA 溶液で室温に 5 分間固定した後、0.2%Triton X-100 を含む 10%FCS ブロッキング溶液で室温にて 30 分間の前処理を来ない、一次抗体を室温にて 60 分間、二次抗体を室温にて 60 分間反応させた。核は DAPI で対比染色した。抗原を検出するために以下の抗体を使用した。

またBrdUアッセイはBrdU(20μM/medium)となるように調整した培養液で37℃にて60分間培養後に免疫染色を行い複数視野での陽性細胞数を分析した。

１０） ウエスタンブロット

培養皿から酵素処理してシングルセルとして収集した各細胞を Lysis buffer 内で処理し抽出液を回収し SDS-PAGE にてタンパク分離後に Hybond-P へ転写した。5%スキムミルクを含む TBS-T でブロッキングを 20 分間行い一次抗体に 4℃で 16 時間、一次抗体に対応した HRP 標識二次抗体を常温で一時間反応させ、標識されたタンパク質を化学発光システム (ECL; Amersham Bioscience Corp, USA) により検出した。

１１） ベクター構築

ca(constitutive active form(Y527F)), dn(dominant negative form(K295M))-c-Src 発現ベクターは大阪大学小根山千歳先生より提供していただいた。

マウス GCSFR の細胞外ドメイン(AA309-626)を pBOS-I62(京都大学 長田重一先生より提供)から精製し、Ceacam1L の細胞内ドメインを前述の pcDNA3.1-hyg-hCeaca1L から精製した。これらのフラグメントを p3XFLAG-CMV-9 (SIGMA)に挿入し p3XFLAG-GCSFR-Ceacam1L ベクター (FGC1L 発現ベクター) を作製した。同様にして FGC1S 発現ベクターも作製した。これらのベクターを強

制発現することにより FLAG 抗体を培養液中に投与することで強制的に細胞膜上の二量体をつくるキメラタンパク質の強制発現細胞を作製することに成功した。

１２） 免疫沈降とウエスタンブロット

細胞を氷上で lysis buffer (0.5% (v/v) Nonidet-40, 10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 2 mM Na_3VO_4, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 5 μg/ml aprotinin; pH7.6) に懸濁した。懸濁液を遠心分離 (15,000 rpm, 10min, 4℃) し、沈殿を除いた上清にコントロール IgG、もしくは抗 GFP 抗体 (Medical & Biological Labiratories CO. LTD., Nagoya, Japan) と Protein A Sepharose (PAS; GE Healthcare, Milwaukee, Wis, USA) を加えて免疫沈降を行った。4℃で 2 時間ローテーターで回転させた後、PAS を 3 回 lysis buffer で洗浄し、sample buffer に懸濁した。この溶液を前述のウエスタンブロットと同様の方法で処理しタンパク質の検出を行った。

謝辞

稿を終えるにあたり、共同で本研究を進めてくださり、ご指導、ご協力を賜わりました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野および遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野の教室員をはじめ多くの関係者の皆様に心より感謝申し上げます。また、本研究の機会をくださいました北海道大学大学院医学研究科脳神経外科学分野寶金清博教授ならびに北海道大学遺伝子病制御研究所幹細胞生物学分野近藤亨教授に謝意を表します。最後に本研究にご協力いただきました脳神経外科教室員および秘書の皆様に厚く御礼申し上げます。