



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Functional analysis of Ceacam1 that is expressed in the glioblastoma-initiating cells
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11659
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/60197
Type	doctoral thesis
File Information	Sadahiro_Kaneko.pdf



学 位 論 文

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

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

目次

発表論文目録および学会発表目録	1 頁
緒言	2 頁
略語表	4 頁
第一章 緒言	5 頁
方法	6 頁
結果	10 頁
考察	13 頁
第二章 緒言	14 頁
方法	14 頁
結果	16 頁
考察	17 頁
第三章 緒言	18 頁
方法	18 頁
結果	20 頁
考察	23 頁
考察	24 頁
総括および結論	26 頁
謝辞	27 頁
引用文献	28 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は英文雑誌に現在投稿中である。

Sadahiro KANEKO, Yuka NAKATANI, Tetsuya TAKEZAKI, Takuichiro HIDE, Naoki OHTSU, Daisuke YAMASHITA, Shiro OHUE, Takanori OHNISHI, Hideo NAKAMURA, Jun-ichi KURATSU, Shunsuke TERASAKA, Kiyohiro HOUKIN, and Toru KONDO

Monomeric Ceacam1L regulates the proliferation of glioblastoma-initiating cells through the activation of c-Src/STAT3 signaling pathway

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 金子貞洋、近藤亨

神経膠芽腫幹細胞膜タンパク質 Glim2 の機能解析

第 79 回インターフェロン・サイトカイン学会 2014 年 6 月 19 日 札幌

2. 金子貞洋、寺坂俊介、宝金清弘、近藤亨

神経膠芽腫幹細胞膜タンパク質 Glim2 の機能解析

日本脳神経外科学会 第 73 回学術総会 2014 年 10 月 9 日 東京

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¹。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²。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³。

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^{4,5}。

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⁶、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⁷⁻⁹。

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^{10,11}。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¹²、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¹³⁻¹⁵。

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

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¹⁶⁻¹⁸。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¹⁹、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²⁰、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^{21,22}。

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^{23,24}。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²⁵、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、非小細胞肺癌、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^{26,27}、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(トランスポーター) : 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、p53 欠損マウス神経幹細胞に活性型 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 GICs (NSCL61) を樹立した^{23,24}。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²⁸、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²⁹。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エーションが存在し、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^{26,27,30,31}。Ceacam1 は、ホモ二量体およびスプライシングバリエーションや他の 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 Ca²⁺ 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^{26,27,30}、特に Ceacam1L は GBM での活性化がいられている 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いる²⁵。

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)。また 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、SOCS3、S100b、Angpt1、Agt が含まれていた。Ceacam1 のノックダウンでは Notch およびその関連因子と ALDHs、SRY-box 転写因子、ABC トランスポーター、angpt1、egfr、cxcr4、patcd1、stat3 といった幹細胞関連遺伝子の明らかな減少を認めた。

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 移植ではマウスを 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 Ceacam1 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。

【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°C、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。その後一次抗体を 4°C で 16 時間、二次抗体を室温にて 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。

抗体は以下のものを使用した。

一次抗体 : mouse monoclonal anti-CD15 (1:200; BD Pharmingen, USA)、rabbit or mouse anti-Ceacam1 (1:50; R&D systems, USA)、rabbit polyclonal anti-EGFR (1:50; Cell Signaling Technology, USA)、anti-GFAP (1:500; Chemicon, Germany, 1:400; Sigma-Aldrich, USA)、anti-Nestin (1:1200; BD Pharmingen, USA)、anti- β III-Tubulin (1:100; Cell Signaling Technology, USA)、anti-O4 (1:2; self-made)、anti-GC (1:2; self-made)

二次抗体 : goat anti IgG -Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, USA)、Alexa488-conjugated goat anti-rabbit (1:500; Molecular Probes, USA)、Alexa568-conjugated goat anti-rabbit (1:500; Molecular Probes, USA)

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。

抗体は以下のものを使用した。

一次抗体 : mouse monoclonal anti-CD15 (1:200; BD Pharmingen, USA)、rabbit anti-Ceacam1 (1:50; R&D systems, Minneapolis, USA)

二次抗体 : goat anti IgG -Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, USA)、alexa488-conjugated goat anti-rabbit (1:500; Molecular Probes, USA)

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 (2.5 μ g/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 (10 μ M) 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。1 μ l の cDNA、1pM の各オリゴヌクレオチドプライマー対、1u の Taq DNA polymerase を含む 10 μ l 反応液を調整しサイクルパラメータは 94°C 20 秒、58°C 30 秒および 72°C 45 秒を 35 サイクル、gapdh については 94°C 15 秒、53°C 30 秒および 72°C 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。

Ceacam1 用 : 5' プライマー ; 5' - CAGTGACCCAGTCACCTTGA-3'、 3' プライマー ; 5' - AACGGATGGAGATTCCAGTG-3' ;

Ceacam3 用 : 5' プライマー ; 5' -TACCAAGAAAATGCCCCAGG-3'、 3' プライマー ; 5' -GTGGTCCATCCGGCAGTAAA-3' ;

Ceacam4 用 : 5' プライマー ; 5' -GTCACAGCAGCTCTGACAAG-3'、 3' プライマー ; 5' - ATCCTTTCCCTCTGCAGCAC-3' ;

Ceacam5 用 : 5' プライマー ; 5' -CTCTAACCCATCCCCGAG-3'、 3' プライマー ; 5' -AATGAAGAACTACACCAGGGCTG-3' ;

Ceacam6 用 : 5' プライマー ; 5' -CCTGACCAGAGCATTCTGG-3'、 3' プライマー ; 5' -GGAAGTGTCCGGTTGCTTCT-3' ;

Ceacam7 用 : 5' プライマー ; 5' -AACCCTGCTGATCCAGAACG-3'、 3' プライマー ; 5' -GGGTCCTGTTGTGAGTGGAG-3' ;

Ceacam8 用 : 5' プライマー ; 5' -AAGATCACGCCACTGGACTG-3'、 3' プライマー ; 5' -AAAAATTAGCCGGGCGTTGTG-3' ;

Ceacam19 用 : 5' プライマー ; 5' -CCTCTTTTCCTGGGCCTCTG-3'、 3' プライマー ; 5' -TCTTTGAGAAGCAGCCCTGG-3' ;

Ceacam20 用 : 5' プライマー ; 5' -CAAAGTCTCACCCACCCTGT-3'、 3' プライマー ; 5' -CAGTTCCAGACCTCACAGGC-3' ;

gapdh 用 : 5' プライマー ; 5' - ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'、 3' プライマー ; 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3

6) 形質導入

2x10⁶ 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 10 μ g を NSC Nucleofector Solution 100 μ l 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 0.5 μ g/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。

ヒト Ceacam1L 作製用プライマー

5' -AGCTAGCGCCACCATGGGGCACCTCTCAGCCCC-3'

5' -ACTCGAGTTACTGCTTTTTTACTTCTGAATA-3'

FLAG-ヒト Ceacam1L 作製用プライマー

5' -AGAATTCGCCACCATGGGGCACCTCTCAGCCCC-3'

5' -ACTCGAGCTGCTTTTTTACTTCTGAATAAATTAT-3'

マウス Ceacam1L 作製用プライマー

5' -AGAATTCGCCACCATGGAGCTGGCCTCAGCACA-3'

5' -ACTCGAGCTTCTTTTTTACTTCTGAATAAAC-3'

ヒトおよびマウス ceacam1 遺伝子をノックダウンするために siRNA

Wizard(InvivoGen)にてヘアピン配列を作製して psiRNA-h7SKhygro G1 ベクター(InvivoGen)に挿入した。

shceacam1 ターゲット

5' -ACCTCGGATGGCAACCGTCAAATTGTTCAAGAGACAATTTGACGGTTGCCATCCTT-3'

5' -ACCTCGGAAACACTACGGCTATAGATCAAGAGTCTATAGCCCGTAGTGTTCCTT-3'

PCR 断片はベクターにクローニングした後、シーケ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。

【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。この結果では 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(図 1A)。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(図 1B)。

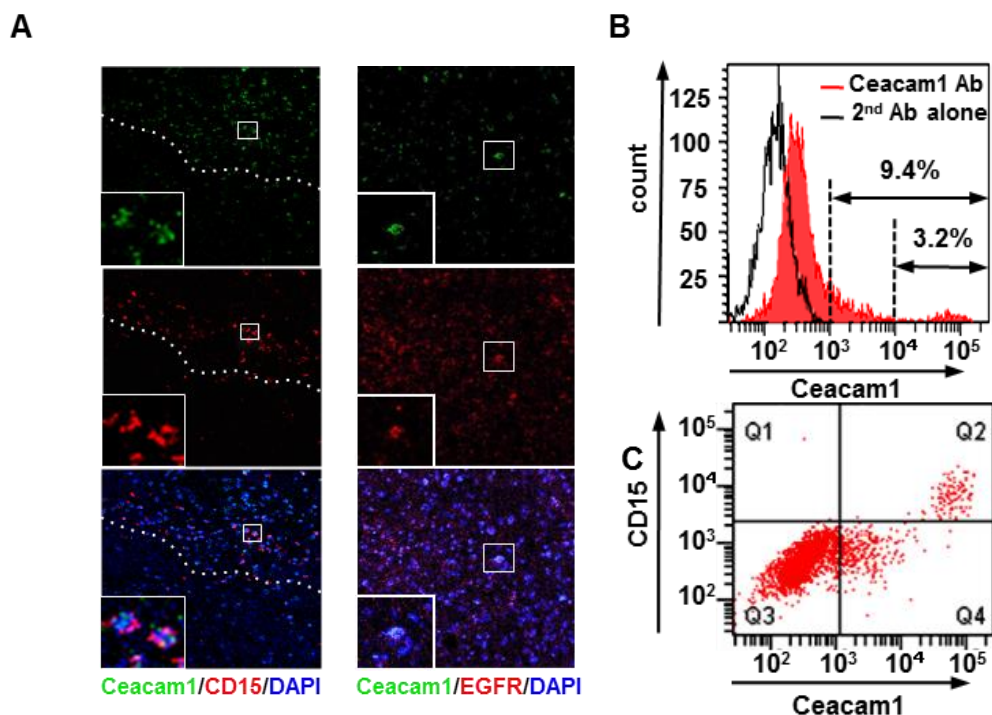


図 1. Ceacam1 はグリオーマ幹細胞により多く存在する。(A) ヒト GBM 組織を Ceacam1 (緑) と CD15 (赤) で染色したもの (左) と同じ GBM 組織を Ceacam1 (緑) と EGFR (赤) で染色したもの (右)。(B) 培養ヒト GBM 細胞の CD15 および Ceacam1 共染色のフローサイトメトリー結果。

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(図 2)。具体的には左図の Ceacam1 を導入したヒト GBM で side population は 9 から 30 パーセントに増加し右図の Ceacam1 ノックダウンにより 9 から 1.2 パーセントに減少した。

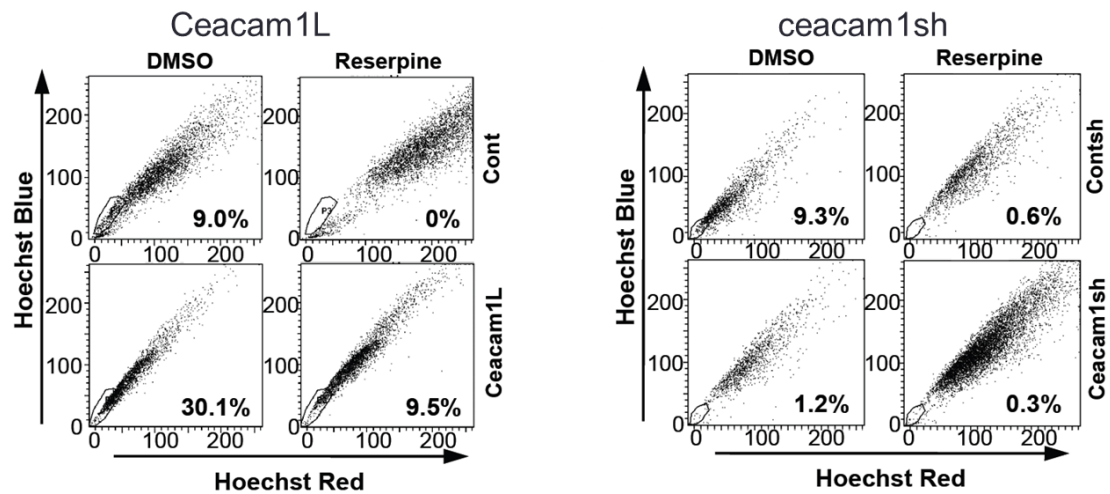


図 2. Ceacam1 の発現によりグリオーマ幹細胞が増加することを side population 法で明らかにした。(左)Ceacam1L 強制発現細胞での side population 法と(右)Ceacam1sh 強制発現細胞での side population 法の結果。

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。ここでは培地としてアストロサイトへの分化を誘導する 10%血清入りとオリゴおよびニューロンへの分化を誘導する 1%血清入りと幹細胞性を維持するといわれている無血清培地を使用した。

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。

特記すべきはまず上段のネスチンに関しては右列の Ceacam1 ノックダウン細胞でネスチンの発現が低下しているのと比較し左列の Ceacam1 強制発現細胞で若干の増加を認めている事と二段目の左列の Ceacam1 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 (図 3)。

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。

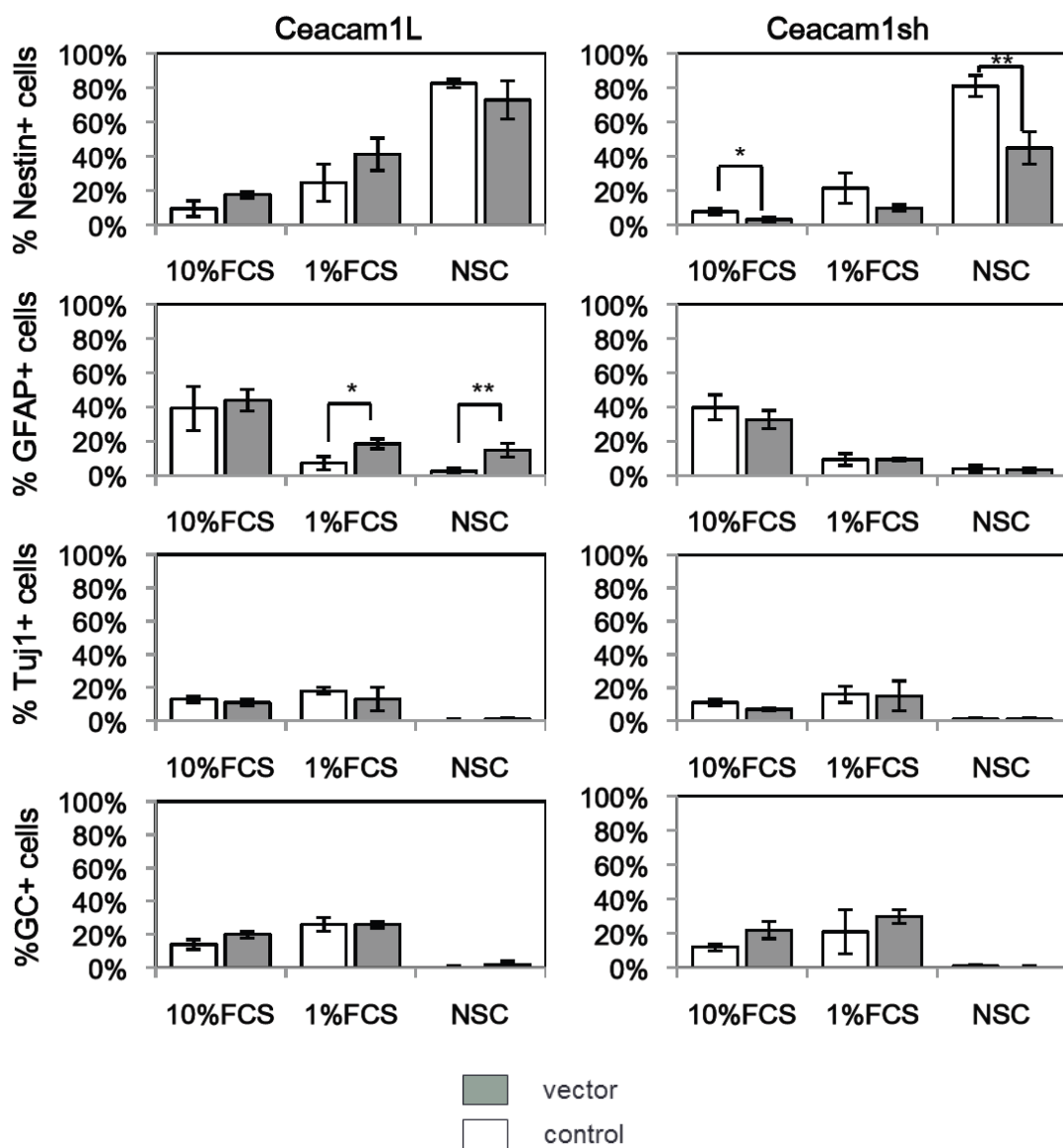


図 3. ヒト脳腫瘍細胞 Ceacam1 強制発現および Ceacam1 ノックダウンにおいても分化誘導は可能である。(左)Ceacam1 強制発現による分化誘導実験(右)shCeacam1 を用いた Ceacam1 ノックダウンによる分化誘導実験。

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 (図 4)。

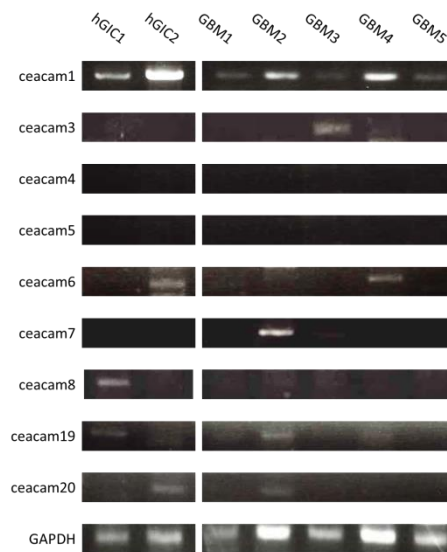


図 4. GBM 細胞 5 種類とグリオーマ幹細胞 2 種類の RT-PCR 結果。

【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。

第一章で述べたように 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、SOCS3、S100b、Angpt1、Agt が含まれていた。ここで GFAP、SOCS3 が STAT3 により制御されているシグナルであるという過去の知見から、GIC において 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³²⁻³⁶。

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 の影響をできるだ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 Notch およびその関連因子と ALDHs、SRY-box 転写因子、ABC トランスポーター、angpt1、egfr、cxcr4、patcd1 といっ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 proprietary 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。

【方法】

1) 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 (20 μ M/medium) となるように調整した培養液で 37°C 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。

一次抗体 ; mouse anti-Ceacam1 (1:50; R&D systems, USA)、rat monoclonal anti-GFP (1:500 ; Nacalai Tesque, Japan)、rabbit polyclonal anti-phosphorylated STAT3(Tyr705) (Cell Signaling Technology, USA)
二次抗体 ; Alexa568-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500 Molecular Probe, USA)、Alexa488-conjugated goat anti-mouse, -rabbit, or -rat IgG (1:500; Molecular Probe, USA) and goat anti-mouse IgG-Cy3 (1:500; Jackson ImmunoResearch, USA).

2) ウェスタンブロット

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°C 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。

一次抗体 ; mouse monoclonal anti-Nestin (1:200; BD Pharmingen, USA), GFAP, p-STAT は免疫染色と同様の抗体を使用した。

3) RT-PCR

前述と同様の方法を用いて新たに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。

sox1 用 : 5' プライマー ; 5'-AGGGCTACATGAGCGCGTCG-3'、3' プライマー ; 5'-CTAGATGTGCGTCAGGGGCA-3' ;
aldh1a1 用 : 5' プライマー ; 5'-AGGGGCAGCCATTCTTCTC-3'、3' プライマー ; 5'-GGCAATGCGCATCTCATCTG-3'
cxcr4 用 : 5' プライマー ; 5'-CTGACCTCCTCTTTGTCATCAC-3'、3' プライマー ; 5'-GTCTTGAGGGCCTTGCCTT-3'
dl11 用 : 5' プライマー ; 5'-TGGTGGTCTGCGTCCGGCTG-3'、3' プライマー ; 3' primer was 5'-ACCGACTGGTACTTGGTGTC-3'
notch3 用 : 5' プライマー ; 5'-ATGGTGGAAGAGCTCATCGC-3'、3' プライマー ; 5'-TGGCCTCCTGCTCTTCTTGG-3'
hey1 用 : 5' プライマー ; 5'-GCGGACGAGAATGGAACTTG-3'、3' プライマー ;

5' -AGTCCTTCAATGATGCTCAGAT-3'

【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(図5A, B)。またウエスタンブロットにおいても同様にCeacam1Lを強制発現させたNSCでリン酸化STAT3され、その下流のGFAPが検出された(図5C)。

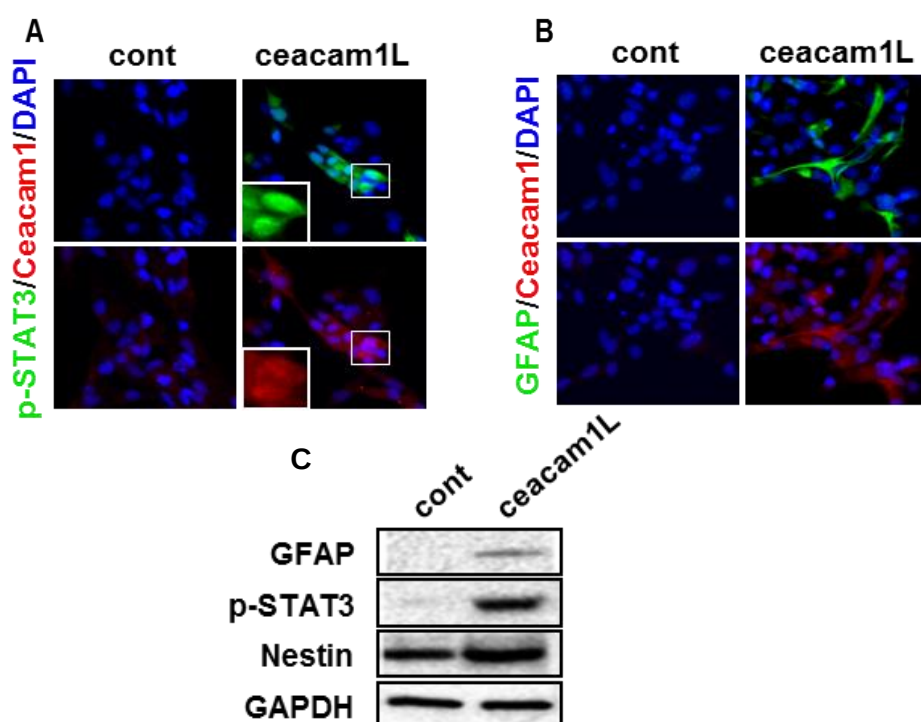


図5. NSCにおいてCeacam1強制発現でSTAT3/GFAP経路が活性化される。(A, B)コントロールNSCおよびCeacam1強制発現NSCをphosphorylated STAT3(p-STAT3, 緑)とCeacam1(赤)で免疫染色した結果(A)、GFAP(緑)とCeacam1(赤)での免疫染色した結果(B)。(C)Ceacam1の強制発現でNSCのpSTAT3およびGFAP発現が上昇する。

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はsox1, aldh1a1, cxcr4, dll1, notch3, hey1

などであったためこれらの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(図 6A, B)。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(図 6C)。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(図 6D)。

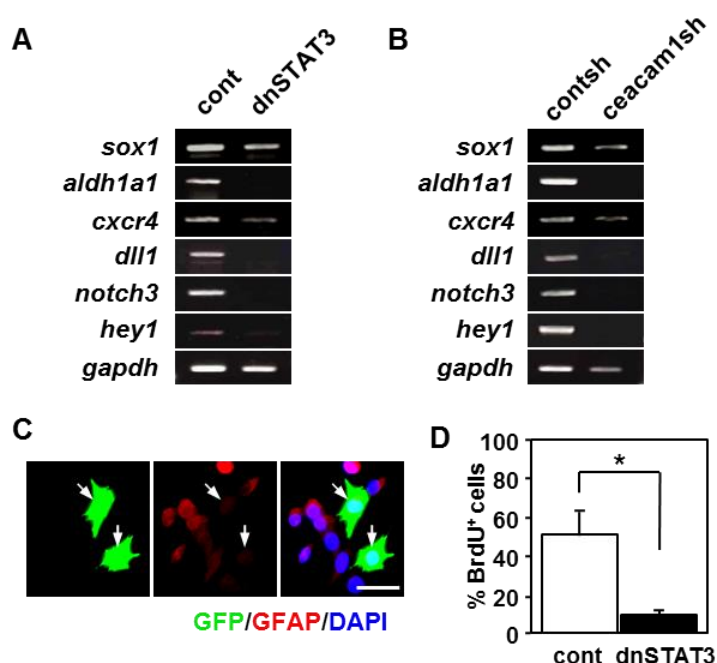


図 6. dnSTAT3 は GIC での幹細胞関連遺伝子や GFAP の発現を低下させ増殖を阻害する。(A, B) *sox1*, *aldh1a1*, *cxcr4*, *dll1*, *notch3*, *hey1* の発現を RT-PCR で解析したもので、GIC に dnSTAT3 を強制発現(A)した結果のと Ceacam1 ノックダウン(B)した結果。(C) dnSTAT3 発現細胞(矢印)は通常培地においても GFAP を発現しない。(D) dnSTAT3 の発現により細胞増殖

【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²⁶。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³⁷⁻⁴⁰、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。

【方法】

1) RT-PCR

前述と同様の方法を用いて新たに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。

c-Src 用 : 5' プライマー ; 5' - ACATCCCCAGCAACTACGTG-3'、3' プライマー ; 5' - AGCTTCTTCATGACCTGGGC-3'

ptpn6 用 : 5' プライマー ; 5' - GTGTCCTCAGCTTCCTGGAC-3'、3' プライマー ; 5' - GTCTGTCCATCGCGAAATGC-3

ptpn11 用 : 5' プライマー ; 5' - AAAGGGGAGAGCAATGACGG-3'、3' プライマー ;

5' - ATTCACCGTGTTTTGCAGGC-3

2) 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。

GCSFR 細胞外ドメイン作製用プライマー

5' -TGCGGCCGCGCGATGCATTCGCTCATCTCTG-3'

5' -AAGATCTCTCGAGTTACTGCTTTTTTACTTCTGAATA-3 '

Ceacam1L 細胞内ドメイン作製用プライマー

5' -TCCATCTGACATTGTGATTGGAGTAGTGGC-3'

5' -ACTCGAGTTACTGCTTTTTTACTTCTGAATA-3 '

Ceacam1S 細胞内ドメイン作製用プライマー

5' -TGCGGCCGCGCGATGCATTCGCTCATCTCTG-3'

5' -AAGATCTCTCGAGTCATTGGAGTGGTCCTGAGCT-3'

3) 免疫沈降とウェスタンブロット

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 Na₃VO₄, 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°C) 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 Laboratories 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°C で 2 時間ロ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ェ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。

一次抗体 ; mouse anti-Ceacam1 (1:50; R&D systems, USA)、anti-Nestin (1:1000; BD Pharmingen, USA for mouse cells, 1:200; Chemicon, Germany for human cells), anti-GFAP (1:1000; BD Pharmingen, USA for mouse cells, 1:200; Chemicon, Germany for human cells), rabbit anti-STAT3 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA), rabbit anti-phospho-STAT3 (Tyr705) (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), rabbit anti-PTPN11 (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), rabbit anti-phospho-PTPN11 (Tyr542) (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), rabbit anti-c-Src (1:1000; Cell Signaling Technology, USA), rabbit anti-phospho-c-Src (Tyr416) (1:1000; Cell Signaling Technology, USA) mouse anti-GAPDH antibody (1:1000; Chemicon, Germany).

【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(図 7A)。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(図 7B)。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。

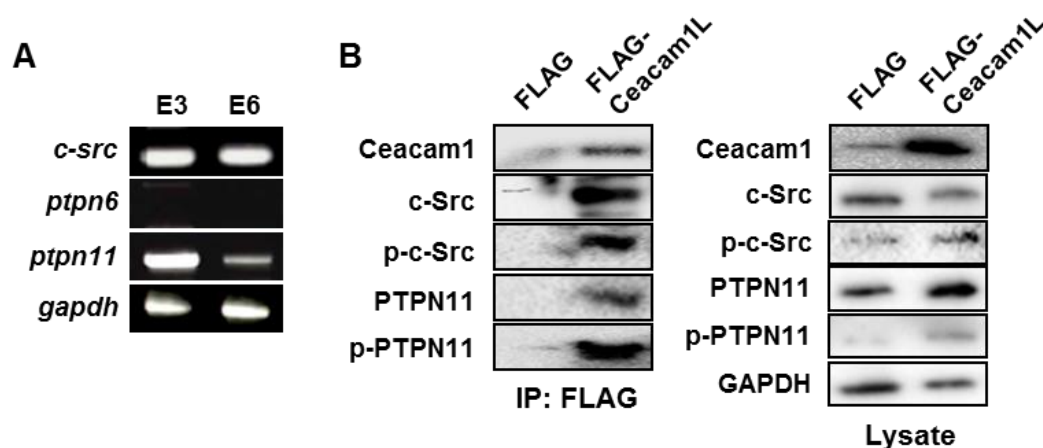


図 7. Ceacam1 単量体は c-Src/STAT3 回路を活性化する。(A) ヒト GIC における c-Src, ptpn6, ptpn11 の RT-PCR 結果。(B) Ceacam1 強制発現 GIC での p-cSrc と p-PTPN11 の FLAG-Ceacam1 共沈実験(左)と全サンプルのウェスタンブロット(右)

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(図 8A)。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(図 8B)。

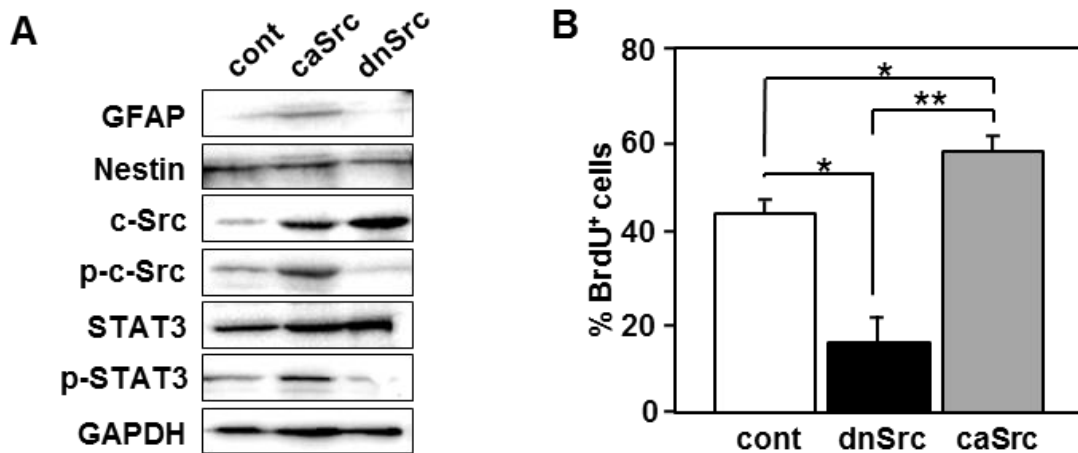


図 8. caSrc 強制発現 GIC は STAT3/GFAP 回路を活性化し増殖能を症状させる。(A)GIC における caSrc、dnSrc 強制発現で GFAP、Nestin、STAT3、p-STAT3 の発現をウエスタンブロットにて解析。(B)BrdU アッセイを用いて caSrc、dnSrc 強制発現 GIC の増殖能を比較。(* $p < 0.01$ 、** $p < 0.001$)

Ceacam1 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するために、GCSF レセプターの一部と FLAG を細胞外ドメインにもつことで FLAG 抗体の添加時にのみホモ 2 量体となる性質をもつキメラタンパク質を発現するベクターを作製し、細胞内に ceacam1 の L および S のドメインを持つ細胞を用いて 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(図 9A)。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(図 9B)。

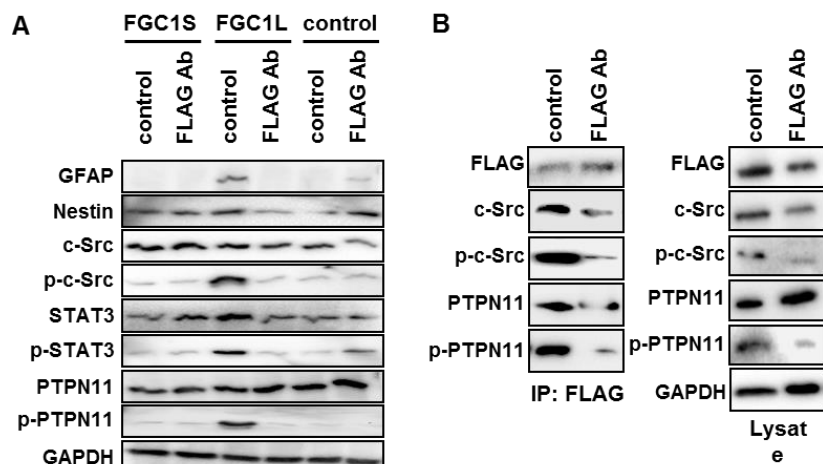


図 9. Ceacam1 単量体はマウス NSC の c-Src、STAT3、PTPN11 をリン酸化し GFAP 発現を増加させる。(A) FLAG 抗体の有無により FGC1S、FGC1L 発現 NSC が GFAP、Nestin と c-Src、STAT3、PTPN11 およびそれぞれのリン酸化タンパク質の発現をウエスタンブロットで解析した。(B) FGC1L 強制発現 NSC での FLAG 抗体有無による共沈実験(左)と全サンプル(右)のウエスタンブロット。

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(図 10A)、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(図 10B)。

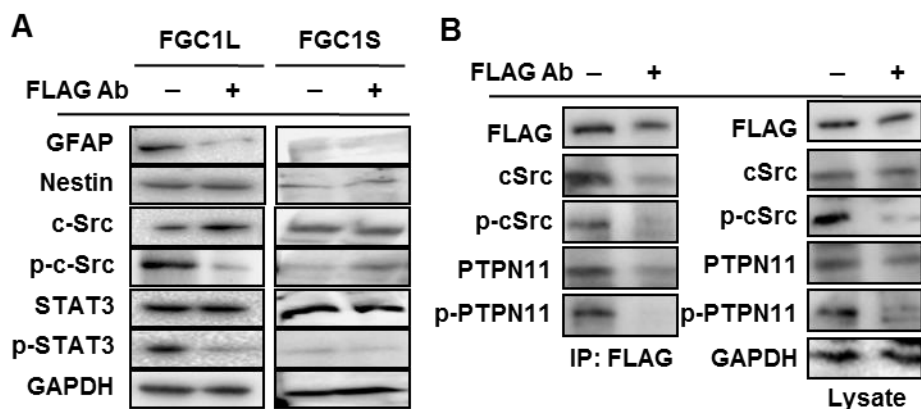


図 10. GIC において Ceacam1L 単量体は c-Src/STAT3 経路を活性化する。(A) FLAG 抗体の有無により FGC1S、FGC1L 発現 GIC が GFAP、Nestin と c-Src、STAT3 およびそれぞれのリン酸化タンパク質の発現をウエスタンブロットで解析した。(B) FGC1L 強制発現 GIC での FLAG 抗体有無による共沈実験(左)と全サンプル(右)のウエスタンブロット。

【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³⁷⁻⁴⁰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エントがあるなかでも^{26, 27}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(図 11)。

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。

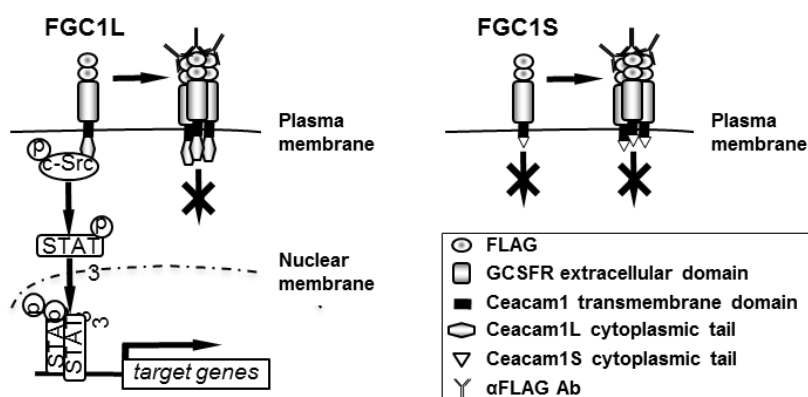


図 11. Ceacam1 単量体が GIC において c-Src、STAT3、PTPN11 のリン酸化を誘導し、GFAP の産生を促進する。

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^{41,42}。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^{41,43}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⁴⁴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^{45,46}。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^{10,47-49}。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⁵⁰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、S100 β 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^{31, 53, 54}。偶然にも本研究で JAK/STAT 経路に対し抑制的機能を持つ PTPN6⁵⁵ 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^{35, 38}、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^{26, 27, 30}。

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⁵⁶。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。

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實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。

引用文献

- 1 Nakamura, H., Makino, K., Yano, S., & Kuratsu, J., Epidemiological study of primary intracranial tumors: a regional survey in Kumamoto prefecture in southern Japan--20-year study. *Int. J. Clin. Oncol.* 16, 314-321 (2011).
- 2 Ichimura, K., Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain. Tumor. Pathol.* 29, 131-139 (2012).
- 3 Boots-Sprenger, S.H. *et al.*, Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution. *Mod. Pathol.* 26, 922-929 (2013).
- 4 Stupp, R. *et al.*, Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet. Oncol.* 10, 459-466 (2009).
- 5 Stupp, R. *et al.*, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352, 987-996 (2005).
- 6 Bonnet, D. & Dick, J.E., Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* 3, 730-737 (1997).
- 7 Ricci-Vitiani, L. *et al.*, Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445, 111-115 (2007).
- 8 Richardson, G.D. *et al.*, CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J. Cell. Sci.* 117, 3539-3545 (2004).
- 9 Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., & Clarke, M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100, 3983-3988 (2003).
- 10 Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J., & Fine, H.A., SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440-452 (2009).
- 11 Singh, S.K. *et al.*, Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer. Res.* 63, 5821-5828 (2003).
- 12 Kondo, T., Setoguchi, T., & Taga, T., Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 101, 781-786 (2004).

- 13 Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., & Dirks, P.B., Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23 (43), 7267–7273 (2004).
- 14 Kondo, T., Brain cancer stem-like cells. *Eur. J. Cancer.* 42, 1237–1242 (2006).
- 15 Vescovi, A.L., Galli, R., & Reynolds, B.A., Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer.* 6, 425–436 (2006).
- 16 Sato, A. *et al.*, Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl. Med.* 1, 811–824 (2012).
- 17 Massard, C., Deutsch, E., & Soria, J.C., Tumour stem cell-targeted treatment: elimination or differentiation. *Ann. Oncol.* 17, 1620–1624 (2006).
- 18 Sell, S., Potential gene therapy strategies for cancer stem cells. *Curr. Gene. Ther.* 6, 579–591 (2006).
- 19 Calabrese, C. *et al.*, A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11, 69–82 (2007).
- 20 Li, Z. *et al.*, Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells. *Cancer Cell* 15, 501–513 (2009).
- 21 Gilbert, M.R. *et al.*, A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 699–708 (2014).
- 22 Chinot, O.L. *et al.*, Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 370, 709–722 (2014).
- 23 Hide, T. *et al.*, Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. *Cancer. Res.* 69, 7953–7959 (2009).
- 24 Hide, T. *et al.*, Combination of a ptgs2 inhibitor and an epidermal growth factor receptor-signaling inhibitor prevents tumorigenesis of oligodendrocyte lineage-derived glioma-initiating cells. *Stem. Cells.* 29, 590–599 (2011).
- 25 Fuller, G.N. & Bigner, S.H., Amplified cellular oncogenes in neoplasms of the human central nervous system. *Mutat. Res.* 276, 299–306 (1992).
- 26 Gray-Owen, S.D. & Blumberg, R.S., CEACAM1: contact-dependent control of immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 433–446 (2006).
- 27 Kuespert, K., Pils, S., & Hauck, C.R., CEACAMs: their role in physiology and pathophysiology. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 18, 565–571

- (2006).
- 28 Gold, P. & Freedman, S. O., Specific carcinoembryonic antigens of the human digestive system. *J. Exp. Med.* 122, 467–481 (1965).
 - 29 Beauchemin, N. *et al.*, Redefined nomenclature for members of the carcinoembryonic antigen family. *Exp. Cell. Res.* 252, 243–249 (1999).
 - 30 Nagaishi, T., Iijima, H., Nakajima, A., Chen, D., & Blumberg, R. S., Role of CEACAM1 as a regulator of T cells. *Ann. NY Acad. Sci.*, 155–175 (2006).
 - 31 Unkeless, J. C. & Jin, J., Inhibitory receptors, ITIM sequences and phosphatases. *Curr. Opin. Immunol.* 9, 338–343 (1997).
 - 32 Bromberg, J. F. *et al.*, Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295–303 (1999).
 - 33 Carpenter, R. L. & Lo, H. W., STAT3 Target Genes Relevant to Human Cancers. *Cancers* 6, 897–925 (2014).
 - 34 Liu, Y., Li, C., & Lin, J., STAT3 as a Therapeutic Target for Glioblastoma. *Anticancer. Agents. Med. Chem.* 10, 512–519 (2010).
 - 35 Silva, C. M., Role of STATs as downstream signal transducers in Src family kinase-mediated tumorigenesis. *Oncogene* 23, 8017–8023 (2004).
 - 36 Voskas, D., Ling, L. S., & Woodgett, J. R., Signals controlling un-differentiated states in embryonic stem and cancer cells: role of the phosphatidylinositol 3' kinase pathway. *J. Cell. Physiol.* 229, 1312–1322 (2014).
 - 37 Chong, Z. Z. & Maiese, K., The Src homology 2 domain tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2: diversified control of cell growth, inflammation, and injury. *Histol. Histopathol.* 22, 1251–1267 (2007).
 - 38 Qu, C. K., Yu, W. M., Azzarelli, B., & Feng, G. S., Genetic evidence that Shp-2 tyrosine phosphatase is a signal enhancer of the epidermal growth factor receptor in mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96, 8528–8533 (1999).
 - 39 You, M., Flick, L. M., Yu, D., & Feng, G. S., Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J. Exp. Med.* 193, 101–110 (2001).
 - 40 You, M., Yu, D. H., & Feng, G. S., Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT

- pathway. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2416-2424 (1999).
- 41 Ergun, S. *et al.*, CEA-related cell adhesion molecule 1: a potent angiogenic factor and a major effector of vascular endothelial growth factor. *Mol. Cell.* 5, 311-320 (2000).
- 42 Markel, G. *et al.*, Pivotal role of CEACAM1 protein in the inhibition of activated decidual lymphocyte functions. *J. Clin. Invest.* 110, 943-953 (2002).
- 43 Horst, A.K. *et al.*, Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 modulates vascular remodeling in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 116, 1596-1605 (2006).
- 44 Markel, G. *et al.*, CD66a interactions between human melanoma and NK cells: a novel class I MHC-independent inhibitory mechanism of cytotoxicity. *J. Immunol.* 168, 2803-2810 (2002).
- 45 Bogoevska, V. *et al.*, CEACAM1, an adhesion molecule of human granulocytes, is fucosylated by fucosyltransferase IX and interacts with DC-SIGN of dendritic cells via Lewis x residues. *Glycobiology* 16, 197-209 (2006).
- 46 Lucka, L. *et al.*, Identification of Lewis x structures of the cell adhesion molecule CEACAM1 from human granulocytes. *Glycobiology* 15, 87-100 (2005).
- 47 Capela, A. & Temple, S., LeX/ssea-1 is expressed by adult mouse CNS stem cells, identifying them as nonependymal. *Neuron* 35, 865-875 (2002).
- 48 Fox, N., Damjanov, I., Martinez-Hernandez, A., Knowles, B.B., & Solter, D., Immunohistochemical localization of the early embryonic antigen (SSEA-1) in postimplantation mouse embryos and fetal and adult tissues. *Dev. Biol.* 83, 391-398 (1981).
- 49 Solter, D. & Knowles, B.B., Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 75, 5565-5569 (1978).
- 50 Nakajima, A. *et al.*, Activation-induced expression of carcinoembryonic antigen-cell adhesion molecule 1 regulates mouse T lymphocyte function. *J. Immunol.* 168, 1028-1035 (2002).
- 51 Chojnacki, A.K., Mak, G.K., & Weiss, S., Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat. Rev. Neurosci.* 10, 153-163 (2009).

- 52 Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., & Alvarez-Buylla, A., Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716 (1999).
- 53 Abou-Rjaily, G.A. *et al.*, CEACAM1 modulates epidermal growth factor receptor--mediated cell proliferation. *J. Clin. Invest.* 114, 944-952 (2004).
- 54 Poy, M.N., Ruch, R.J., Fernstrom, M.A., Okabayashi, Y., & Najjar, S.M., Shc and CEACAM1 interact to regulate the mitogenic action of insulin. *J. Biol. Chem.* 277, 1076-1084 (2002).
- 55 Bousquet, C., Susini, C., & Melmed, S., Inhibitory roles for SHP-1 and SOCS-3 following pituitary proopiomelanocortin induction by leukemia inhibitory factor. *J. Clin. Invest.* 104, 1277-1285 (1999).
- 56 Arabzadeh, A. *et al.*, Host-related carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 promotes metastasis of colorectal cancer. *Oncogene* 32, 849-860 (2013).