

# CD133 のリガンド同定によるがん幹細胞特性の解析

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 細胞生物学教室  
阪口 政清

## 1. はじめに 目的

CD133は細胞膜に局在する約100 kDa の5回膜貫通型のタンパク質で、がん幹細胞の同定や単離のための標的抗原として使われてきた。しかし、受容体なのか、接着分子なのか、その機能については依然として不明な点が多い。また、どのようなシグナルを細胞内に発しているのかについても殆ど理解されていない。siRNA等の発現抑制実験により、CD133はがん幹細胞の増殖、転移に決定的な影響力をもつことが報告されている。申請者は最近、がん幹細胞表面マーカーであるCD133のリガンド候補SCX（仮称）を同定するに至った。従って、本計画では、当最新の知見を基盤に、CD133の受容体としての機能を切り口にして、がん幹細胞におけるCD133の信号伝達機構、機能的役割の解明を目指した。

## 2. 方法

**細胞**：本研究には以下の細胞を使用した。ヒト胎児腎細胞株 (HEK293、ATCC社)-リコンビナントタンパク質発現に使用、ヒト前立腺がん細胞株 (PC3、ATCC社)。これら細胞は、10% FBSを含むDMEM/F12培地 (Gibco 社) にて培養した。

**リコンビナントタンパク質**：ヒトCD133細胞外領域 (N末から、#1、#2、#3)、ヒトSCXファミリータンパク質に関しては、HEK293細胞で産生させ、アフィニティークロマトグラフィーで精製した。

**抗体**：Western blot 解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (CST)、mouse anti-Flag tag (Sigma-Aldrich)、mouse anti-human tubulin antibody (Sigma-Aldrich社)

**哺乳動物発現コンストラクト**：CMV イントロンプロモーター (CMVi) を導入した PDNR1r ベクター (プロモーターレスドナーベクター; Clontech 社) を構築し、CMVi の下流にヒトCD133 (C末に6His-2HA tag が付加) をコードする cDNAを挿入した (全長、細胞外領域発現コンストラクト)。ヒトSCXファミリータンパク質 (C末にFlag tag) 発現ベクターも上記と同様に作製した。各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正しいことを確認した。

**プラスミドベクターの細胞内導入**：高純度精製発現コンストラクトの細胞へのトランスフェクションは FuGENE-HD (Roche社) トランスフェクション試薬を用いて行った。

**免疫沈降**：細胞に強制発現させたtag付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose (Sigma-Aldrich社) を使用した。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

## 3. 結果 研究成果

### リガンド候補SCX（仮称）の発見：

CD133は5回膜貫通タンパク質であるため、細胞外領域に結合するタンパク質を回収する操作は容易ではない。膜タンパク質全体を溶解してしまうと、構造がとれなく失活してしまう。全長を溶解してプルダウンする方法、三つの細胞外領域 (N末から、#1、#2、#3) を発現させそ

れを回収する方法共に、候補タンパク質を単離するには至らなかった。それで、「各細胞外領域を環状化させれば構造をきちんと取り安定化するのでは」いうアイデアを思いつき、細胞外に放出させる形で発現させたところ、期待通りの結果が得られ（しっかりとしたバンドが検出できた）、一つの分泌性のタンパク質（SCX）をCD133細胞外領域（#3領域）特異的結合タンパク質として質量分析計にて同定することに成功した。

#### SCXのCD133への結合特異性の検討：

SCXはタンパク質ファミリーを形成しているため、他のSCX（SCW, SCY, SCZ, いずれも仮称）についてCD133への結合を検討した。精製CD133細胞外#3領域組み換えタンパク質と各精製SCX familyタンパク質とのIn vitro結合実験を行った結果、SCX以外にSCYもCD133細胞外#3領域に結合できることが明らかとなった。

#### SCXとSCYのCD133への結合性の評価：

SCXとSCYのCD133への結合に関して、親和性の評価を行った。PC3ヒト前立腺がん細胞株にCD133全長を発現させ、SCX、SCY、それぞれの希釈系列を調整し、発現細胞に各リガンドを希釈系列にそって添加した。細胞を洗浄した後に細胞を回収し、細胞表面に結合しているリガンドの量をWestern blotにより検出判定した。その結果、SCYはSCXに比較してCD133に対する親和性が約100倍高いことが判明した。このことより、CD133へのリガンドとしてSCYに注目していくことに決めた。

#### SCY-CD133結合による細胞の形質変化：

内在性CD133を発現する細胞のみをクローン化する方法を新規に開発し（未発表）、当研究に供した。完全無血清の状態でも当細胞にSCYを添加する事で、増殖、走化性がどのように変化するかを検討した。結果として、SCY-CD133結合は当細胞の増殖性を上昇させる機能があることが判明した。これは、自己複製能の亢進機能によることも明らかとなった。一方、走化性を上昇させる機能は認められなかった。

#### SCY-CD133の下流信号伝達：

自己複製能の亢進に結びつくCD133の下流信号伝達の分子機構を明らかにするため、CD133細胞質領域に結合するタンパク質を、免疫沈降法-LC-Ms/Ms解析により検討した。その結果、Notch経路、Wnt経路の活性化につながる一つのタンパク質（Ad-M、仮称）が同定できた。このタンパク質は幹細胞で過剰に発現している特性を示す。現在、当タンパク質を介した信号伝達分子機構を解析中である。

## 4. 考察 まとめ

治療標的としてのがん幹細胞の重要性と、その維持に微小環境が大きな役割を果たしているという想定は広く受け入れられているが、微小環境の本態を分子レベルで理解することは未だ困難である。一方、CD133は多くのがん幹細胞のマーカーであり、細胞膜に存在する受容体であると考えられているが、リガンド、信号伝達機構共に不明である。この問題解決に関して、当成果は大きく貢献できたと考えている。なぜなら、当計画より、1) CD133のリガンドSCYを同定する事ができたこと、2) SCY-CD133が細胞の自己複製を制御していること、3) SCY-CD133信号伝達分子機構解明の糸口をみいだしたこと、の成果を得る事ができたからである。リガンドSCYは、がん微小環境中に過剰に存在する事が知られていることより、がん微小環境とがん幹細胞の関係を理解する上でも、当成果は大きな意義を持つものと考えている。

## 5. 発表論文、参考文献

- 1 Jin Y, Murata H, **Sakaguchi M**, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by downregulation of BRPK/PINK1. **Oncol Rep.** 27: 695-699, 2012.
- 2 Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, **Sakaguchi M**, Huh N. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in mouse squamous epithelia. **Clin Exp Dermatol.** 37: 428-431. 2012.

- 3 Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. **Acta Med Okayama**. 66: 7-16, 2012.
- 4 Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. **Oncol Lett**. 3: 1149-1153, 2012.
- 5 Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Kobayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M, Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. **Int J Oncol**. 41: 559-564, 2012.
- 6 Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3-encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. **Int J Oncol**. 28: 1645-1652, 2012.
- 7 Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. **Oncol Rep**. 29: 1073-1079, 2013.
- 8 Putranto EW, Murata H, Yamamoto K, Kataoka K, Yamada H, Futami J, Sakaguchi M, Huh NH. Inhibition of RAGE signaling by intracellular delivered-inhibitor peptides using PEI-cationization. **Int J Mol Med**. 32: 938-944 2013.
- 9 Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. **Cancer Res**. 73: 172-183, 2013.
- 10 Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Huh NH. SARM1 and TRAF6 bind to and stabilize PINK1 on depolarized mitochondria. **Mol Biol Cell**. 24: 2772-2784.
- 11 Saito K, Sakaguchi M, Iioka H, Matsui M, Nakanishi H, Huh NH, Kondo E. Coxsackie and adenovirus receptor is a critical regulator for the survival and growth of oral squamous carcinoma cells. **Oncogene** 2013. doi: 10.1038/onc.2013.66. (in press).  
(Saito K and Sakaguchi M were equally contributed to this work.)