

膵癌幹細胞の糖鎖を標的とした新規診断・治療法の開発

地方独立行政法人 東京都健康長寿医療センター研究所

佐々木 紀彦

I 要 旨

膵癌の幹細胞マーカーである nestin は細胞質内に存在しており、生きた状態で nestin 陽性の癌幹細胞を分離同定することは困難である。今回、nestin 陽性膵癌細胞の細胞表面の糖鎖に着目し、nestin 陽性の膵癌細胞を生存した状態で分離し、癌幹細胞に特異的な糖鎖マーカーを同定するため、最初のステップである nestin 陽性細胞の分離を試みた。Nestin 陽性細胞としては、nestin のプロモーター支配下で蛍光を発するベクターを導入することで蛍光を発現する細胞を指標にしてセルソーターで分離した。蛍光タンパクについては、通常 GFP と不安定的に発現する GFP の 2 種類で検討した。いずれの場合も、GFP の発現量 (nestin の転写活性) に応じた nestin の遺伝子レベルでの発現を確認することはできなかった。Nestin の発現には、エピジェネティックな制御や miRNA などが関与していることが示唆された。一方、nestin のタンパクレベルについては GFP の発現量と相関し、幹細胞性の指標の一つであるスフェア形成能も GFP 陽性細胞で高いことがわかった。今後、さらに検討を進めて行く予定である。

II 目 的

膵癌は各種治療法の進歩にも関わらず極めて予後不良の癌であり、5 年生存率は約 8% と、30 年前とほとんど変わっていない。膵癌は発

見時には 80% が手術不能の進行した状態であり、抗癌剤治療が選択されるが、生存期間は半年から 1 年程度である。手術が可能な症例でも、術後に高頻度に再発や肝転移がおり完治は困難である。膵癌は 60 歳以上に増加する、高齢者癌であり、高齢化社会の到来により本邦はもとより世界的に患者数が急増している。米国では、2030 年には、膵癌が肺癌に次いで癌死の第二位になると予想されている。このように、今後増加する膵癌を①早期発見する方法と、②膵癌に著効を示す革新的な治療法の開発は高齢化社会における喫緊の課題となっている。

近年、膵癌細胞の中に少数存在する癌幹細胞が、発癌と転移、再発に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。現在までに報告されている膵癌の癌幹細胞マーカーの中で nestin は、その発現やリン酸化を抑制することで、動物実験レベルで唯一、治療効果が証明されている極めて有望な治療標的である。しかし nestin は細胞質内に存在しており、生きた状態で nestin 陽性の癌幹細胞を分離同定することは困難であった。今回、申請者は膵癌の癌幹細胞の早期発見と難治性の癌幹細胞に対する新たな分子標的治療法の開発のため、nestin 陽性膵癌細胞の細胞表面の糖鎖に着目した。本研究では、nestin 陽性の膵癌細胞を生存した状態で分離し、癌幹細胞に特異的な糖鎖マーカーを同定することを目的とした。これにより、癌幹細胞特異的糖鎖による膵癌の早期診断法と、癌幹細胞に対する分子標的治療法の開発を目指す。

Ⅲ 方 法

まず、nestin のプロモーター領域の下流で安定的な GFP を発現するベクターを膵癌細胞株に導入し、G418 で1ヶ月程セクションを行い、安定的に nestin プロモーター GFP がゲノムに組み込まれた細胞を樹立した。セクションされたコロニーをクローニングして、複数のクローンを得た。得られたクローンについて、フローサイトメトリー解析で GFP の発現を確認し、セルソーターで GFP 陽性と陰性に分離した。Nestin 遺伝子発現量について Q-PCR 解析を行い、タンパク発現量についてウェスタンブロット解析を行った。さらに、幹細胞の指標の一つであるスフェア形成能について、低吸着プレートに FGF2 と EGF を添加した血清フリー培地で1週間培養し、写真撮影を行った。

Ⅳ 結 果

Nestin プロモーター GFP 安定発現細胞について、フローサイトメトリー解析を行い、GFP の発現を確認した。クローンごとに GFP の陽性率が異なっていた。PANC-1 細胞での nestin の発現が数パーセントであることが知られていることから、10%以内で GFP を発現しているクローンについて GFP 陽性または陰性細胞をセルソーターで分離し、Q-PCR 解析で nestin の遺伝子レベルの発現を確認した (図1)。Nestin の発現について GFP 陽性との相関はほとんどみられなかった。さらに、GFP 陽性細胞を再度培養し、GFP の発現性を検討した結果、1週間培養しても、GFP の陽性率は高く保たれていた (図2)。次に、nestin のプロモーター領域の下流で不安定的な蛍光タンパクを発現するベクターを PANC-1 細胞および nestin を高発現している膵癌細胞株の

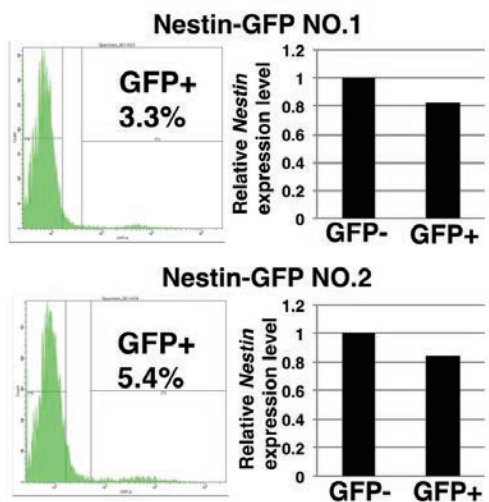


図1

Nestin-promotor-GFP を安定的に導入した PANC-1 膵癌細胞のクローン NO.1 と NO.2 について GFP で細胞を分離し、Q-PCR で nestin の発現を確認した。

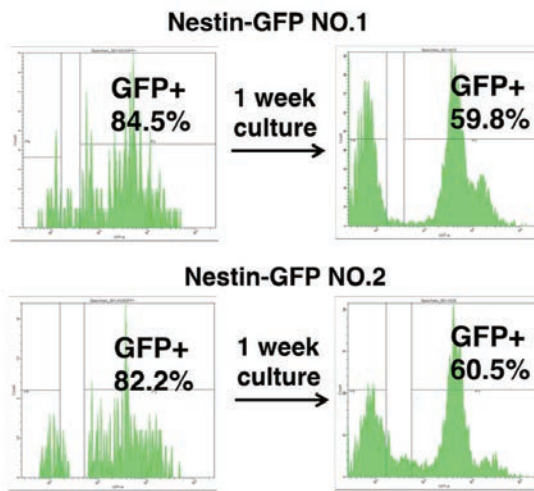


図2

Nestin-promotor-GFP を安定的に導入した PANC-1 膵癌細胞のクローン NO.1 と NO.2 について GFP 陽性細胞を分離後、1週間培養し、GFP の発現を検討した。

PK-45P 細胞に導入し、Zeocin でセレクションを行い、安定導入株を得た。フローサイトメトリー解析の結果、すべての細胞で GFP が陽性であった (図 3)。GFP 陽性集団の中で、高発現と低発現についてセルソーターで分離し、Q-PCR 解析で nestin の遺伝子レベルの発現を確認した (図 3)。結果は、GFP の発現と nestin の遺伝子レベルの発現に相関はみられなかった。Nestin プロモーター GFP 安定細胞株の一つ (クローニング前) について、GFP 陽性と陰性細胞においてウェスタンブロット解析を行った結果、遺伝子発現とは異なり、GFP 陽性細胞で nestin のタンパク量が高いことがわかった (図 4)。さらに、これらの細胞についてスフェア形成能について検討した結果、GFP 陽性細胞のほうでスフェア形成能が高いことがわかった (図 5)。

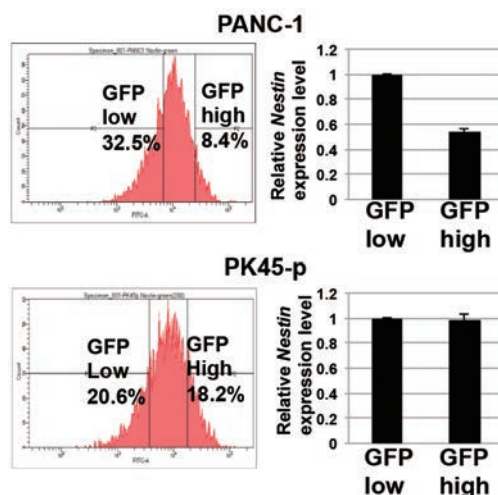


図3

Nestin-promotor-GFP (destabilized) を安定的に導入した PANC-1 または PK45-p 膵癌細胞について GFP の高発現と低発現で細胞を分離し、Q-PCR で nestin の発現を確認した。

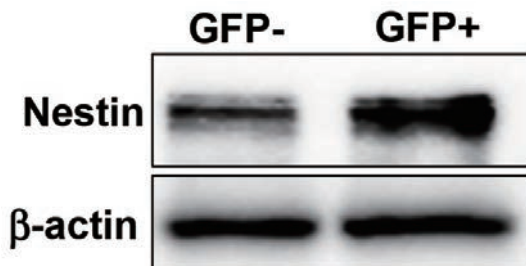


図4

Nestin-promotor-GFP を安定的に導入した PANC-1 膵癌細胞について GFP の高発現と低発現で細胞を分離し、ウェスタンブロットで nestin の発現を確認した。

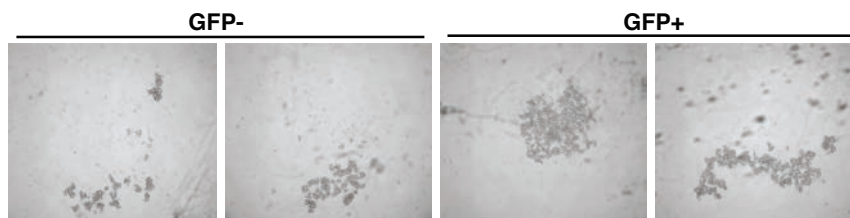


図5

Nestin-promotor-GFP を安定的に導入した PANC-1 膵癌細胞について GFP の高発現と低発現で細胞を分離し、スフェア形成を比較した。

V 考 察

GFP を安定に発現するベクターを導入した場合には、GFP の発現に応じて分離した細胞において、上記の結果のように nestin の遺伝子発現に GFP の発現と相関がみられず、また GFP 陽性率が長期培養でも高く保たれていた。この結果については、GFP が安定的に発現するため、nestin の転写活性を失った細胞でも GFP の発現がある程度続くことにより、GFP の発現に応じて分離しても nestin の遺伝子発現とは相関しなかったと考えられる。幹細胞と分化細胞が短い時間で移行していることも考えられる。また、不安定な GFP を発現するベクターを導入した場合には、すべての細胞で GFP が陽性であった。この結果からは、PANC-1 および PK-45P 膵癌細胞において nestin の転写活性がすべての細胞で存在することが示唆された。しかしながら、転写活性 (GFP の発現量) に応じてセルソーターで分離した細胞について nestin の遺伝子発現との相関はみられなかった。Nestin の発現には、エピジェネティックな制御や miRNA などによる翻訳レベルでの制御が厳密に働いていることが示唆された。クローニング前の Nestin プロモーター GFP 安定発現細胞について、GFP 陽性と陰性で分離し、nestin のタンパク発現とスフェア形成能について GFP 陽性のほうでいずれも高いことがわかり、クローニングした細胞において、より顕著な結果がみられる可能性がある。

VI 結 語

Nestin プロモーター GFP の安定発現および不安定発現のいずれによらず、GFP の発現と nestin の遺伝子発現については相関がみられなかった。一方で、nestin のタンパク発現については、GFP の発現と相関がみられる結果が得られた。今後は、nestin の発現制御について検討を進めていくと同時に、タンパクレベルで

nestin 陽性細胞と陰性細胞に分離される細胞について、さらに幹細胞性や糖鎖発現解析を行っていく予定である。

参考文献

本研究助成金により、癌幹細胞と糖鎖の総説および培養条件の違いによる膵癌のスフェア形成の比較について以下の論文を発表した。

- 1) [Sasaki N](#), Toyoda M, Hasegawa F, Fujiwara M, Gomi F, Ishiwata T. Fetal bovine serum enlarges the size of human pancreatic cancer spheres accompanied by an increase in the expression of cancer stem cell markers. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jun 18;514(1):112-117.
- 2) [Sasaki N](#), Itakura Y, Gomi F, Hirano K, Toyoda M, Ishiwata T. Comparison of functional glycans between cancer stem cells and normal stem cells. *Histol Histopathol*. 2019 Sep;34(9):995-1007.