

# 癌幹細胞特異的糖鎖による 膵癌の早期発見と癌幹細胞標的治療法の開発

東京都健康長寿医療センター研究所  
主任級研究員 佐々木 紀彦

(共同研究者)

東京都健康長寿医療センター研究所	研究員	板倉 陽子
東京都健康長寿医療センター研究所	研究副部長	豊田 雅士
東京都健康長寿医療センター研究所	研究部長	石渡 俊行

## はじめに

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。

## 結 果

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の一つであるPANC-1細胞に導入し、G418で1ヶ月程セレクションを行い、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。これらの細胞について、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な蛍光タンパクを発現するベクターを

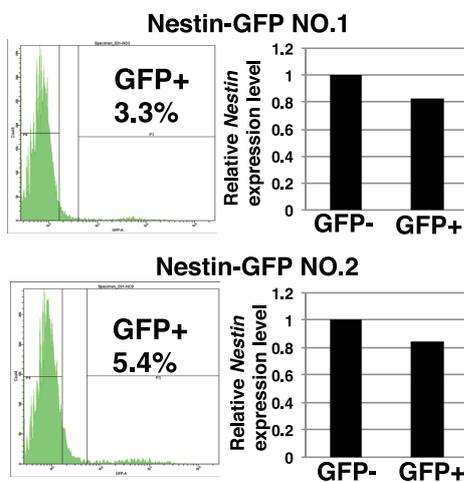


図1 Nestin-promotor-GFPを安定的に導入したPANC-1膵癌細胞のクローンNO.1とNO.2についてGFPで細胞を分離し、Q-PCRでnestinの発現を確認した。

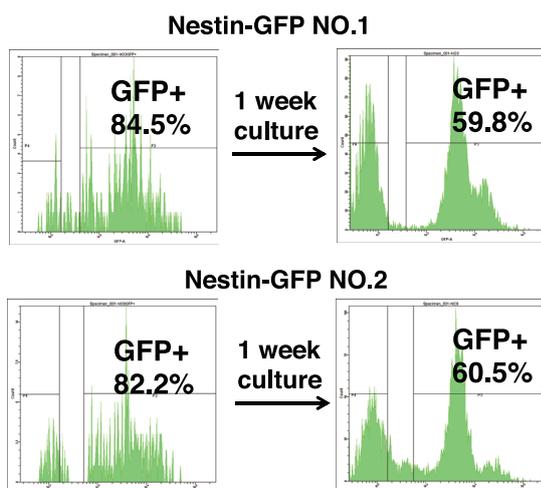


図2 Nestin-promotor-GFPを安定的に導入したPANC-1膵癌細胞のクローンNO.1とNO.2についてGFP陽性細胞を分離後、1週間培養し、GFPの発現を検討した。

PANC-1細胞およびnestinを高発現している膵癌細胞株のPK-45P細胞に導入し、Zeocinでセクションを行い、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。

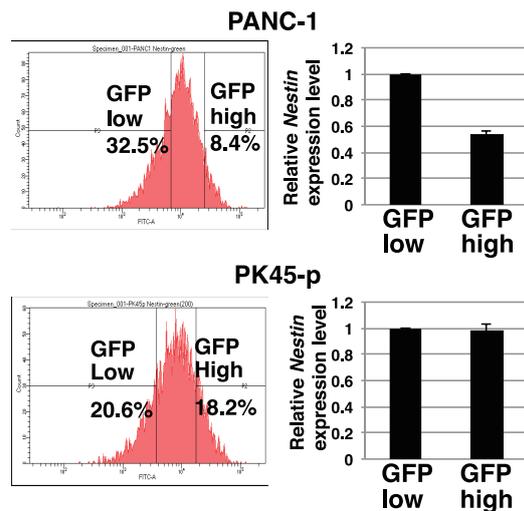


図3 Nestin-promotor-GFP(destabilized)を安定的に導入したPANC-1またはPK45-p膵癌細胞についてGFPの高発現と低発現で細胞を分離し、Q-PCRでnestinの発現を確認した。

## 考 察

GFPを安定的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、不安定的な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。今後は、このような仮説についてさらに検討を進めていく予定である。

## 要 約

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、通常の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、今後、さらに検討を進めて行く予定である。

## 文 献

本研究助成金により、膵癌の癌幹細胞性と抗癌剤耐性、転移抑制に関する以下の論文を発表した。

1. Sasaki N, Toyoda M, Yoshimura H, Matsuda Y, Arai T, Takubo K, Aida J, Ishiwata T. H19 long non-coding RNA contributes to sphere formation and invasion through regulation of CD24 and integrin expression in pancreatic cancer cells. *Oncotarget*, 9: 34719 – 34734, 2018.
2. Sasaki N, Ishiwata T, Hasegawa F, Michishita M, Kawai H, Matsuda Y, Arai T, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Toyoda M. Stemness and anti-cancer drug resistance in ABCG2 highly expressed pancreatic cancer is induced on 3D-culture condition. *Cancer Science*, 109: 1135 – 1146, 2018.