

研究報告書表紙

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

研究分野2：がんの臨床的特性の分子基盤に関する研究  
「がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究」

平成18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 横田 淳

平成19(2007)年 4月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告

がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究  
横田 淳

II. 分担研究報告

1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

横田 淳

2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

清野 透

3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

落谷孝広

4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

堺 隆一

5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

神奈木玲児

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

総括研究報告書

がんの生物学的特性の分子基盤の解明とその臨床応用に関する研究

主任研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

MYO18B の結合蛋白質として HOMER2 を同定し、HOMER2 は MYO18B の足場非依存性増殖抑制能を増強する作用があることを明らかにした。原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似性と不均一性を明らかにし、候補転移抑制遺伝子の染色体部位を同定した。LKB1 遺伝子は喫煙等が原因で起こり、肺がん細胞の分化抑制を引き起こすと考えられた。子宮頸がんの *in vitro* 発がんモデルを作製した。即ち、TERT で不死化した子宮頸部上皮細胞に HPV16-E6E7 を導入すると3次元培養で上皮内がん様組織像を呈し、軟寒天培地中で微小コロニーを作るようになった。さらに、HrasV12 を導入するとヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-myc を導入すると造腫瘍性の強い細胞集団が樹立された。独自に開発した分化誘導システムを用いて、脂肪由来のヒト間葉系幹細胞から肝細胞の性質を有する細胞を作製した。この細胞はアルブミン産生やアンモニア解毒能を有し、肝障害モデルマウスに移植すると肝臓に生着して肝機能を改善することが分った。肺がん細胞の足場非依存性増殖に関わるリン酸化蛋白質として CDCP-1 を同定した。CDCP-1 は芽球状態で誘導されるアポトーシスを抑制し、その発現を抑えると腫瘍の転移能が著明に低下した。糖鎖の硫酸化が低下している大腸がんでは非がん大腸上皮細胞に比べて硫酸基のトランスポーター *DTDST* の mRNA が著明に低下していることを見出した。

分担研究者

1. 横田 淳 国立がんセンター研究所 部長
2. 清野 透 国立がんセンター研究所 部長
3. 落谷 孝広 国立がんセンター研究所 室長
4. 堺 隆一 国立がんセンター研究所 部長
5. 神奈木玲児 愛知県がんセンター研究所 部長

A. 研究目的

細胞内に遺伝子異常が蓄積して発生・進展していくがんの罹患率と死亡率を減少させるためには、がんの生物学的特性の分子基盤を解明し、その情報を臨床へ導入していく必要がある。本研究の目的は、多様性のあるがんの生物学的特性を細胞内に蓄積した遺伝子異常との対応で把握し、がんの個性診断や分子標的療法の開発に有用な分子情報を得ることである。本研究は、がんの多様性の分子基盤解明を目指すもので、個々のがんにもっとも適した治療法を提供する予知医療の実現へ向けて、必須の、且つ、極めて重要な研究課題である。この20余年のがん研究によりがんの本態が解明されつつある。そして、その情報はがん患者の予後診断やがんの分子標的療法などへ応用され始め、一部のがんでは予後の改善が見られている。しかし、まだ多くのがんでは、個々のがんの個性を分子レベルで把握するには至らず、治療の標的となる分子も同定されていない。

一方、近年、網羅的な遺伝子・蛋白質解析技術の確立など、解析技術も急速に進歩している。従って、個々のがん細胞内に蓄積した遺伝子異常を網羅的に解析することも可能になった。また、近年、ヒト不死化細胞や各種

幹細胞の樹立法の進歩により、がんの生物学的機能解析に有用な手法や材料も充実してきており、がんの生物学的特性を分子レベルで解明できる情報、材料、技術が整ってきた時期と言える。そんな背景の中で、がんの本態解明研究をさらに推進することは極めて重要であり、今後の研究により、がん細胞で特異的に起こっている遺伝子異常に関して、その生物学的意義が解明され、その制御法が開発されれば、新たながんの予防法・診断法・治療法の開発へ繋がり、がんの罹患率や死亡率の激減へ大きく貢献できる。

本研究では、各班員によって独自に単離された遺伝子や解析法を中心にがんの生物学的特性の分子基盤に関する研究を進めるとともに、がん化との関連では研究が遅れている蛋白質リン酸化や細胞接着糖鎖にも着目して研究を進める。特に、細胞不死化や幹細胞培養の技術に優れた研究者とゲノム解析技術に優れた研究者が共同で多段階的な発がん過程の再現による分子基盤の解明を試みるとともに、ゲノム解析では解決できないリン酸化や糖鎖構造に関して優れた解析技術を持つ構成員によるがんの新たな制御法の開発も進める。本研究は、世界的にもその重要性が認識されているものの、研究の展開が遅れている分野であり、ゲノム解析、細胞不死化、幹細胞解析、リン酸化蛋白質、細胞接着糖鎖など、細胞がん化機構解明に重要な各分野で独自の研究歴を持つ本研究班の構成員による飛躍的な研究の発展が望まれるものである。3年目の今年には、がん細胞の特性を規定する新規分子もいくつか同定されたので、以下に本年度の研究手法とその成果を列記する。

## B. 研究方法

### 1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

#### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

Yeast two-hybrid screen 法を用いてヒト MYO18B 蛋白質の C 末領域 (2020-2567 アミノ酸) と結合する蛋白質を探索した。候補として同定された Sug1 と HOMER2 に関して、種々の抗体を用いて結合を確認した。さらに、種々の発現ベクターを作製して、軟寒天コロニー形成法などの生物学的機能解析を行った。

#### 2) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

ヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍から DNA を抽出し、ゲノム網羅的に約 10,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip, Mapping 10k array を用いて染色体の欠失領域を探索した。転移腫瘍で高頻度に第 11 染色体短腕の欠失を検出したので、その領域のマイクロサテライトマーカーのプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失領域の詳細な解析を行なった。

#### 3) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

ヒト肺がん細胞株と肺腺がん臨床検体もにおける LKB1 遺伝子の欠失と変異について解析し、その臨床病理学的意義や他の遺伝子異常との関連性を検討した。

### 2. 正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

正常ヒト細胞を TERT 単独あるいはこれに加え HPV16 E7 や E6 あるいは bmi-1, p16-shRNA の導入により不死化し、細胞種毎に異なる不死化機構を明らかにする。また、不死化したヒト細胞に、各がんを高頻度に見つかる異常を、がん遺伝子の強制発現やがん抑制遺伝子の RNA 干渉法を用いた発現抑制を行い、がん化過程を in vitro で再現する。導入遺伝子としては hTERT, bmi-1, HPV16 E6, 種々の変異 E6, E7, E6E7, KrasV12, HrasV12, 活性型 Akt (myr-Akt), erbB2, c-myc などを用いた。shRNA は puromycin 耐性レトロウイルスにより、H1 promoter 制御下に発現し、p16, PTEN, p53 などの各遺伝子をノックダウンした。多段階発がんモデルの解析方法としては、不死化から、細胞増殖能、足場非依存性増殖能、ヌードマウスでの造腫瘍能などの細胞トランスフォーメーション検出法を用いると共に、その間に起きる遺伝子発現、蛋白質修飾の変化などを DNA マイクロアレイや Western ブロットング法などを用いて解析した。

### 3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

独自に開発した肝細胞を ES 細胞から分化誘導する培養系を用いて、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞を作製した。まず、がん患者 6 名の皮下脂肪組織から間葉系幹細胞を分離培養した後、CD105 陽性分画を精製し、in vitro で肝細胞に分化誘導する操作を行った。この細胞の肝細胞としての性状を、肝特異的遺伝子の発現、肝特異的蛋白質の発現と培養上清中への産生、四塩化炭素によって肝不全状態になった動物へ移植した際の肝機能回復機能の有無を検討した。

### 4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

### 1) 肺がんの足場非依存性増殖に関わるチロシンリン酸化蛋白質の同定

足場非依存性が強い細胞においては、特に浮遊状態においてチロシンリン酸化蛋白質 CDCP1 という機能不詳の膜蛋白質がリン酸化しているが、今年度は、CDCP1 がどのように浮遊状態での細胞生存に関わるシグナルを媒介しているかを明らかにするため、RNAi 法などによる機能解析を行った。

### 2) ephrin-B1 のがん浸潤における役割

ephrin-B1 が EphB の刺激によって特定のメタプロテアーゼ分泌を促すメカニズムの詳細について解析した。

### 3) Cas によるメカニカルストレスの受容

メカニカルストレスのシグナル伝達における Cas 蛋白質の役割を、米コロロンビア大学の澤田泰宏先生の開発した細胞外基質の伸長による解析法と、我々の樹立した Cas の各ドメインに対する抗体やリン酸化特異的抗体、RNAi の手法を用いて解析した。

### 5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

低酸素により誘導される N-グリコリル型シアル酸含有糖鎖のうち、がんを選択的に増加するガングリオシド、N-グリコリル GM2 を発現するマウス同系腫瘍のクローンを作製し、これを N-グリコリル型シアル酸含有糖鎖を発現する腫瘍のモデルとした。N-グリコリル型のシアル酸はヒトに対して免疫原性があるのは、ヒトにおいては N-グリコリル型シアル酸の合成酵素 CMP-NeuAc hydrolase 遺伝子が欠損しているためである。これに対して通常のワイルドタイプマウスはこの遺伝子を持つため、N-グリコリル型シアル酸は免疫原性がない。このため CMP-NeuAc hydrolase 遺伝子欠損マウスを宿主に用いて in vivo の腫瘍増生実験を行った。シアル酸トランスporter とあわせてヒトがん細胞における硫酸基トランスporter についても検索を行った。

(倫理面への配慮)

手術で得られたヒト正常細胞とヒト間葉系幹細胞の使用は、倫理審査委員会の承認を得て、提供者に不利益の生じないように、また、同意を確認して行っている。ヒトがん組織の使用に当たっては、「臨床研究に関する倫理指針」に従い、個人情報保護に十分に配慮し、必要に応じて倫理審査委員会の承諾を得て進めている。動物の操作は、各施設の動物倫理委員会の定める規則に基づいて、動物愛護の観点から動物の生命の尊重と苦痛を伴う実験への十分な配慮のもとに進めている。

## C. 研究結果

### 1. がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

#### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

これまでの本研究で、肺がんを高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) から MYO18B 遺伝子を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の約 50% で変異、欠失、過メチル化等により失活していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにしてきた。そこで、MYO18B 遺伝子の生物学的機能を明らかにするため、Yeast two-hybrid

screen 法を用いて MYO18B 蛋白質に結合する蛋白質を探索した。その結果、Sug1 と HOMER2 と言う2つの蛋白質の結合が示唆されたので、さらに詳細な解析を進めた。Sug1 は 26S proteasome の 19S regulator subunit で、proteasome 阻害剤や siRNA を用いた Sug1 の機能・発現抑制により、MYO18B 蛋白質量の増加とポリユビキチン化が観察され、MYO18B 蛋白質は proteasome で Sug1 との結合を介して分解される基質のひとつであることが示唆された。HOMER2 は Homer/Ves1 ファミリー蛋白質のひとつで、細胞膜の突起部分とアクチンのストレスファイバーで共局在していることが示唆された。MYO18B 蛋白質の発現はヒト肺がん細胞株の足場非依存性増殖を抑制するので、さらに、この機能における HOMER2 の作用を解析した結果、HOMER2 の共発現によりソフトアガーでの肺がん細胞株のコロニー形成能がさらに減弱した。これらの結果より、HOMER2 蛋白質は MYO18B 蛋白質との結合を介して、MYO18B 蛋白質のがん抑制機能を制御していることが示唆された。

## 2) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

Affymetrix 社から発売された「Mapping 10k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 210-kb 間隔で調べることのできるマイクロアレイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、8 セットのヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍における染色体欠失の分布状態をゲノム網羅的に解析した。その結果、各腫瘍に 5-20 ヶ所の欠失が検出され、同一患者から得られた腫瘍では原発巣と転移巣で 67%以上の欠失が一致していた。しかし、原発巣あるいは転移巣のみで検出される欠失もあり、それぞれの部位でがん細胞が増殖する過程で新たなクローンが出現していることが分った。特に転移腫瘍の 50%(4/8)で第 11 染色体短腕の欠失が蓄積しており、この領域に転移能を規定する遺伝子の存在が示唆された。

## 3) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

消化管に過誤種様ポリープを形成する遺伝性疾患 Poutz-Jeghers syndrome の原因遺伝子 LKB1 は肺がんでも変異が報告されているが、その詳細は不明である。そこで、まず多くの肺がん細胞株を用いて欠失と変異の検索を行った。その結果、30%(21/70)の細胞株で遺伝子異常が検出され、特に非小細胞肺がんでは頻度が高く(39%,20/51)、その異常は KRAS 変異と共存することが有意に多かった。そこでさらに、多くの肺腺がん臨床検体で変異検索を行ったところ、変異は男性喫煙者のみで検出され、女性あるいは非喫煙者には全く検出されなかった。また、組織学的には、低分化型で有意に多かった。以上より、LKB1 遺伝子の変異は喫煙によって誘導され、低分化型腺がんの形成に関わっていると考えられた。

## 2.正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

昨年度のヒト子宮内膜がんの in vitro モデル作製に続き、ヒト子宮頸がんの in vitro モデルの作製に成功した。hTERT のみで不死化した正常子宮頸部上皮細胞株(HCK1T)を用いた。この細胞株は 20 番染色体のトリソミーを除いて正常 2 倍体であり、分化能や、3 次元培

養における組織像も正常である。HPV16E6 の導入により、新たに同定した DLG4 を始め、種々の PDZ ドメイン含有蛋白質の分解促進を確認した。また、E6 の新たな機能として ErbB2 の安定化や角化細胞の分化誘導因子である Notch1 の発現抑制を見だし、これらが p53 の分解を介した機能であることを示した。HCK1T に HPV16 E6, E7 を導入すると、3 次元培養で CIN3 様組織像を呈し、軟寒天培地中で微小コロニーを作った。しかし、1000 万個の細胞を接種しても腫瘍を形成することはなかった。さらに、HrasV12 を追加導入し血清入り培地で培養すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3 次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-myc を追加導入すると軟寒天培地中でサテライトを伴う巨大なコロニーを作る非常に造腫瘍能の強い細胞集団が得られた。この細胞集団は、僅か 200 個の細胞接種により腫瘍を形成した。さらに新たに手術材料 11 検体から HCK2-12 の培養細胞を得、E6, E7+HrasV12 のみで造腫瘍能を獲得することを確認した。

同様に卵巣がんの in vitro モデル作製のため、手術材料 2 検体から、hTERT+E7 や hTERT+cdk4+cyclin D により不死化した卵巣表層上皮細胞株(HOSE1, HOSE2)を樹立した。これらは世界初の正常 2 倍体卵巣表層上皮細胞株である。現在までに種々の遺伝子導入により造腫瘍能を獲得した細胞株をようやく得た。

また、ウイルス遺伝子の替わりに bmi-1 あるいは p16-shRNA を用いて、乳腺上皮細胞、肺気管支上皮、皮膚角化細胞などを不死化する方法を開発し対応する各がんの in vitro モデル作製の基礎を確立した。

## 3.幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

ドナーの年齢は 36-54 歳であり、そのヒト皮下脂肪組織中には 3-8%の間葉系幹細胞が存在していた。この細胞は容易に継代培養や凍結保存が可能であり、細胞の倍加時間は 18-22 時間程度、継代数が 5 代を越えると細胞の倍加能力に明らかな低下が認められた。脂肪、軟骨、骨への分化能は 5-8 世代までは高い分化能を示すこともわかった。肝細胞への分化は、増殖因子の処理後 3-5 日ごろから顕著になり形態的にも機能的にも肝臓の特徴を示した。特に、アルブミンの産生やアンモニア解毒能等は顕著に発現され、肝不全動物への移植実験では 2-4 時間後に血中アンモニアレベルを有意に低下させた。

## 4.蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

Fyn に対する親和性と足場非依存性に関連したチロシンリン酸化の 2 つの特性によって肺がん細胞から同定された CDCP1 は、RNAi を用いた発現抑制により、浮遊状態におけるアポトーシスを選択的に誘導することを明らかにした。その作用のためには CDCP1 のチロシンリン酸化部位が必要であること、更に CDCP1 と結合してチロシンリン酸化を受けるプロテインキナーゼ C $\delta$  が足場非依存性に必要であることがわかった。これと関連して CDCP1 は腫瘍の遠隔転移にも関与することが示された。

ephrin-B1 を高発現する腺がん細胞で、EphB の刺激により ephrin-B1 の細胞外ドメインの切断が著明に誘導されることを発見した。各種阻害剤を用いてその切断がマトリックスメタロプロテアーゼ特に MMP8 の働きによることがわかった。更に ephrin-B1 は EphB の刺激によってマトリックスメタロプロテアーゼの発現ではなく分

泌を誘導するという新しい機能が明らかになり、現在そのシグナルの解明を急いでいる。

Src キナーゼが活性化したがん細胞では Cas 蛋白質の恒常的なチロシンリン酸化が観察されるが、正常細胞における Cas 蛋白質のチロシンリン酸化は、接着斑など、ごく限られた部位に限局してみられる。このような細胞の足場をストレッチすることによりメカニカルストレスを加えたところ、Cas 蛋白質のチロシンリン酸化が著明に亢進した。蛍光分子断片によって Cas 蛋白質の N 末と C 末をラベルすることにより相互の距離を推定すると、Cas が外力により伸長しうる構造であることが示された。またストレッチによる刺激で活性化される Rap 1 蛋白質などの活性化は Cas 蛋白質の発現をブロックすることで抑えられるので、Cas 蛋白質が外力による細胞の伸長を分子の構造変化として受け止めるセンサーであり、下流にメカニカルストレスのシグナルを伝える分子であることが明らかになった。

#### 5.細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

##### 1) NeuGc-GM2 を発現するマウス同系腫瘍の in vivo での腫瘍増殖

マウスの同系腫瘍で N-グリコリル GM2 を強発現するものを検索したところ、T細胞性リンパ腫である EL4 由来の細胞株に N-グリコリル GM2 の発現が見られた。陽性細胞を限界希釈法でクローン化し、安定的に N-グリコリル GM2 を強発現するマウスの同系腫瘍を得た。この同系腫瘍を用いて腫瘍移植実験を行ったところ、ワイルドタイプマウスでは腫瘍が順調に生育した。これに対して、N-グリコリルシアル酸の合成酵素を欠くノックアウトマウスでは、腫瘍の増大が統計的に有意に遅延した。また腫瘍を移植したノックアウトマウスの一部の血清中に、きわめて高タイトーの抗 N-グリコリル GM2 抗体が検出された。抗 N-グリコリル GM2 抗体が検出された個体では腫瘍の増大が著しく遅延したが、抗体価が上昇しなかった個体でも腫瘍の増大の遅延が観察された。

##### 2) がんにおける硫酸基トランスポーターと細胞増殖能

正常大腸上皮は多量の硫酸化糖鎖を含有するが、がん化に伴って糖鎖の硫酸化が低下する。我々は以前、正常大腸上皮がシアリル 6-スルホルイス X を含有し、がん化に伴って糖鎖の硫酸化が低下するために、がんでは硫酸基を持たないシアリルルイス X が蓄積することを見いだした。しかし、がん化に伴う糖鎖硫酸化の減少の分子生物学的背景は不明であった。本年度、大腸がんでは非がん大腸上皮細胞に比べて、硫酸基のトランスポーターの mRNA が著明に低下していることが患者組織の検討から判明した。がん化に伴う糖鎖硫酸化の減少の分子生物学的背景と考えられる。硫酸基トランスポーター発現の消失した培養大腸がん細胞に硫酸基トランスポーター発現を誘導すると、細胞の増殖速度が低下した。硫酸基トランスポーターは、細胞増殖の正常な抑制機構と関連していると考えられた。

#### D. 考察

##### 1.がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

MYO18B のがん抑制遺伝子としての機能を明らかにす

るため、細胞内で結合している蛋白質を探索し、HOMER2 を同定した。HOMER2 は MYO18B の足場非依存性増殖抑制能を増強する作用があり、MYO18B のがん抑制遺伝子としての機能解明の糸口になると考えられた。

転移の分子機構を明らかにするために、原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似点・相違点を検討した。その結果、原発腫瘍内に新たなクローン細胞が出現し、その細胞が、ある時には原発腫瘍内で優位に増殖し、ある時には選択的に転移を起こすことが分かった。この結果は、転移腫瘍の鑑別診断や特異的治療を考える上で貴重な情報である。今後は転移形質発現の原因となるゲノム異常を明らかにし、診断のマーカー、治療の標的を同定していきたい。

肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異に関しては、まだ報告が少なく、その実態や意義が明らかでなかった。本研究では、高頻度に変異している重要な遺伝子であることを確認するとともに、男性喫煙者に多く、低分化型腺がんの形成に関わっていることを示すことができた。肺腺がんの悪性度を規定する遺伝子のひとつであると考えられるので、今後は生物学的機能解析を進めるとともに、診断・治療の標的分子としての可能性も追求していきたい。

##### 2.正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

昨年度、不死化子宮頸部角化細胞(HCK1T)に、E6E7 導入後であっても、HrasV12 を導入すると細胞死が誘導される事を見いだした。HrasV12 高発現細胞は維持できず、in vitro がん化モデル作製の困難さを感じた。しかし、この細胞死誘導機構の解析から、無血清の角化細胞培地の特異性が関与していることが明らかになった。通常血清入り培地では HCK1T 細胞は最終分化誘導がかかるが、同培地中で E6E7+HrasV12 被導入細胞は、分化抵抗性と共に、高い増殖性を示した。これらの細胞は HrasV12 の発現も高レベルで維持していることが明らかになった。また、足場非依存性増殖と共にヌードマウスにおける造腫瘍性を示したことから、HCK1T 細胞のがん化には E6E7 に加えがん遺伝子の活性化1つのみで可能であることが示された。これが、HCK1T に特異的ではなく、独立の初代 HCK12 は、E6E7+HrasV12 のみで造腫瘍性を獲得することが示された。HCK1T+E6E7+HrasV12 細胞にさらに種々のがん遺伝子を導入するとその造腫瘍能は増加したが、特に c-myc により著しい造腫瘍能の増加が見られた。50 万個の細胞接種では数日後から腫瘍の増大が確認され、接種した細胞の多くが腫瘍形成に関わっていることが示唆された。実際、200 個の細胞接種によっても 6/6 で腫瘍を形成したことから、がん幹細胞様の細胞集団であることが示唆された。今後、がん幹細胞の理解や、同細胞を標的とした治療における標的分子の同定に有効であると考えられる。

子宮頸部角化細胞と同様に、皮膚、食道などの角化細胞や気管支・肺上皮細胞などは、血清やカルシウムにより分化が誘導されるため、無血清、低カルシウム培地という特殊培地で培養されている。我々の用いてきた特殊培地では活性型 ras の導入によりこれらの細胞には細胞死が誘導され in vitro におけるがん化は一時困難に思われた。しかし今回の成果は、食道がんや肺がんなどの in

in vitro 発がんモデル作製においても応用可能であり研究の進展が期待される。今後、他の細胞種でも in vitro がん化モデルを作製する事で異なる細胞種間での特異性や共通性を明らかに出来るものと考えられる。

### 3. 幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

本研究によってがん患者の脂肪組織中の間葉系幹細胞に肝細胞の機能を有する細胞へと分化する可塑性があることが証明された。この細胞は確かにいくつかの肝臓の機能を発現し、また細胞移植による肝不全動物の肝機能の改善に有効であったが、この細胞が本来の肝臓とどこまで機能的に近いのか、あるいは動物への移植に関する安全性についても多くの課題が明らかとなった。

### 4. 蛋白質リン酸化を介する運動能・接着能の調節機構とその分子経路の解明

蛋白質チロシンリン酸化は正常細胞においては細胞膜の外からの刺激を細胞内に伝えるために広く用いられている分子スイッチであり、腫瘍細胞においてはそのスイッチの時間的・空間的コントロールが破綻している状態だと考えられている。様々な遺伝子変異の集積として得られた無秩序な増殖や転移など幾つかの腫瘍特異的な特性が、それぞれどのようなチロシンリン酸化の異常によって引き起こされるかを整理することは、腫瘍特異的な治療薬を考える上でも極めて重要である。今回の研究で、CDCP1 が足場喪失時の細胞死を抑制すること、ephrin-B1 がメタロプロテアーゼ分泌を促進すること、Cas が腫瘍の外力に対する感受性をコントロールすることが明らかになり、これらの分子の恒常的なリン酸化が、腫瘍に正常細胞とは違う S 特性を与えていることが強く示唆された。このような分子の恒常的なチロシンリン酸化のシグナルをブロックすることによって腫瘍の異常な特性のみを効果的に抑制する更なるモデルを構築することが重要である。

### 5. 細胞接着糖鎖を介する運動能・接着能・血管新生能の調節機構とその分子経路の解明

今回の実験結果から、N-グリコリル型のシアル酸を有する糖鎖、とくにガングリオシド N-グリコリル GM2 が、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞の良い治療ターゲットとなることが示唆された。体液性の免疫応答も関与するが、実験結果からは N-グリコリル型シアル酸に対する細胞性免疫の関与も示唆される。ガングリオシドの抗原提示は MHC 分子ではなくて CD1 分子によるとされているが、今回用いた同系腫瘍細胞には CD1d の発現が見られ、この分子の関与について今後検討する必要がある。

進行期のがん細胞で N-グリコリル型のシアル酸が増加するのは、シアル酸トランスポーター SIALIN の転写誘導のためである。糖鎖を修飾して陰性荷電を与えるもう一つの修飾に関わる硫酸基トランスポーターの転写は、がん細胞では逆に低下している。今回の検索で硫酸基トランスポーターは、細胞増殖の正常な抑制機構と関連することが判明したが、これが糖鎖の硫酸化と関連しているかどうか、またどのような分子種の硫酸化糖鎖と関連しているかを今後検討する必要がある。

## E. 結論

MYO18B 遺伝子のがん抑制機能を支持し、その機構解

明に結びつく結果を得た。原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似性と不均一性を明らかにし、候補転移抑制遺伝子の染色体部位を同定した。LKB1 遺伝子は喫煙等が原因で起こり、肺がん細胞の分化抑制を引き起こすと考えられた。

子宮頸がんの in vitro 発がんモデルの作製に成功した。実際のがん細胞では染色体異常を含め多数の異常が蓄積しているためどれががん化に関連した異常であるかを見極めることは困難である。正常細胞に限られた数の特定の異常を導入することでがん化を再現する本研究の手法により、多段階発がんの一見複雑にみえるステップを単純化することが出来る。これまでに子宮頸がんの in vitro モデル作製から得られた結果から、本研究計画の有用性と応用範囲の広さが改めて確認できた。

がんの治療によって失われる正常臓器の機能を回復させるために再生医療は重要な役割を果たすが、がん患者の、しかも脂肪組織から得た幹細胞から患者さん自身の肝細胞を作り出す可能性を示せたことは意義深い。今後はこの肝細胞の有する肝臓特異的機能を網羅的遺伝子発現解析やメチル化等の観点から検討するとともに、免疫不全動物の肝臓へ移植した場合の有効性、安全性の問題や、さらに肝臓としての分化をより詳細に検討するための基盤が出来上がった。

チロシンキナーゼを阻害する薬剤は、基質のリン酸化に関わるキナーゼを完全に抑えるので、多くの場合、強い副作用をもたらす。今回、チロシンキナーゼと特定の基質の組み合わせがその腫瘍細胞の転移・浸潤能、足場非依存性増殖能に関わっていることが明らかになった。これはキナーゼの代わりに特定の基質のシグナルをブロックすることで、キナーゼ活性化が伝える多くのシグナルのうちあるものを選択的にブロックできる可能性を示唆し、腫瘍の特性や組織系に照準を絞った次世代の分子標的治療の絶好のターゲットとなり得る。とくに CDCP1 や ephrin-B1 のような膜に局在する基質分子は、その細胞外ドメインとの結合分子をデザインすることにより、細胞膜を透過しなくても細胞内シグナルをブロックできる可能性があり、現在そのような形でのチロシンリン酸化シグナルの阻害モデルを作成している。

N-グリコリル型のシアル酸を有する糖鎖、とくに N-グリコリル GM2 ガングリオシドが、ヒトなどのように N-グリコリル型のシアル酸の合成遺伝子を欠く生体において免疫応答を引き起こすことが可能であり、低酸素抵抗性を獲得したがん細胞の免疫治療の良いターゲットとなることを示した。また、がん細胞における硫酸基トランスポーターの転写低下は、細胞表面糖鎖の変化を引き起こすと同時に、細胞増殖能に大きく影響することが判明した。

## F. 健康危険情報

全ての実験の研究内容は、組換え DNA 安全委員会に計画書を提出し、適切な計画が基準に従った施設において行われていることが承認されている。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki,

- K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:2498-2504, 2006.
- 2) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
  - 3) Yanaiharu, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Takana, T., Calin, G. A., Liu, C.-G., Croce, C. M. and Harris, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9:189-198, 2006.
  - 4) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342:829-834, 2006.
  - 5) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 119:1491-1494, 2006.
  - 6) Akca, H., Tani, M., Hishida, T., Matsumoto, S. and Yokota, J. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 54:25-33, 2006.
  - 7) Kohno, T. and Yokota, J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair*, 5(9-10):1273-1281, 2006.
  - 8) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13(1):11120, 2007.
  - 9) Edakuni, N., Ikuta, K., Yano, S., Nakatani, E., Muguruma, H., Uehara, H., Tani, Masachika, Yokota, J., Aizawa, H. and Sone, S. Restored expression of the MYO18B gene suppresses orthotopic growth and the production of bloody pleural effusion by human malignant pleural mesothelioma cells in SCID mice. *Oncol. Res.*, 16:235-243, 2006.
  - 10) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, in press, 2007.
  - 11) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D. and Yokota, J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, in press, 2007.
  - 12) Ajima, R., Kajiyama, K., Inoue, T., Tani, M., Shiraishi-Yamaguchi, Y., Maeda, M., Segawa, T., Furuichi, T., Sutoh, K. and Yokota, J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2007.
  - 13) Yokota, J., Matsumoto, S. and Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int. J. Cancer*, 120:1832-1833, 2007.
  - 14) Goto, H., T. Kiyono, Y. Tomono, A. Kawajiri, T. Urano, K. Furukawa, E. A. Nigg, and M. Inagaki. Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. *Nat Cell Biol* 8:180-187, 2006.
  - 15) Hashimoto N., Kiyono T., Wada M.R., Shimizu S., Yasumoto S., and Inagawa M., Immortalization of human myogenic progenitor cell clone retaining multipotentiality. *Biochem Biophys Res Commun*, 348: 1383-1388, 2006.
  - 16) Mizumoto Y., Kyo S., Ohno S., Hashimoto M., Nakamura M., Maida Y., Sakaguchi J., Takakura M., Inoue M., and Kiyono T., Creation of tumorigenic human endometrial epithelial cells with intact chromosomes by introducing defined genetic elements. *Oncogene*, 25: 5673-5682, 2006.
  - 17) Tatsumi, Y., Sugimoto, N., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Kiyono, T. and Fujita, M., Deregulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability. *J. Cell Sci.*, 119:3128-3140, 2006.
  - 18) Yamashita, Y., Tsurumi, T., Mori, N. and Kiyono, T., Immortalization of Epstein-Barr virus-negative human B lymphocytes with minimal chromosomal instability. *Pathol. Int.*, 56:659-667, 2006.
  - 19) Morishima S., Akatsuka Y., Nawa A., Kondo E., Kiyono T., Torikai H., Nakanishi T., Ito Y., Tsujimura K., Iwata K., Ito K., Kodera Y., Morishima Y., Kuzushima K., and Takahashi T., Identification of an HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocyte epitope from human papillomavirus type-16 E6: The combined effects of bortezomib and interferon-gamma on



- the presentation of a cryptic epitope. *Int. J. Cancer*, 120:594-604, 2007.
- 20) Haga, K., Ohno, S., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Fujita, M., Sakamoto, M., Galloway, D. A. and Kiyono, T. Efficient immortalization of primary human cells by p16<sup>Ink4a</sup>-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci.*, 98:147-154, 2007.
  - 21) Handa, K., Yugawa, T., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J. Virol.*, 81:1379-89, 2007.
  - 22) Shima, Y., Okamoto, T., Aoyama, T., Yasura, K., Ishibe, T., Nishijo, K., Shibata, K. R., Fukiage, K. Kiyono, T. and Toguchida, J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 353:60-6, 2007.
  - 23) Narisawa-Saito, M., Handa, K., Yugawa, T., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, in press.
  - 24) Yugawa, T., Handa, K., Narisawa-Saito, M., Ohno, S., Fujita, M. and Kiyono, T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol. Cell Biol.*, in press.
  - 25) Banas, A., Quinn, G., Yamamoto, Y., Teratani, T. and Ochiya, T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, in press.
  - 26) Morita, S., Hori, T., Kimura, M., Goto, Y., Ochiya, T. and Hatada, I. One Argonaute family member, eIF2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, in press.
  - 27) Watanabe, H., Ochiya, T., Ueda, S., Kominami, Y., Gon, R., Nishiki, M., Hayashi, M., Sasaki, A., Shiraiishi, M., Kashimoto, N., Myojin, Y. and Kamiya, K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 354:841-845, 2007.
  - 28) Banas, A., Quinn, G., Yamamoto, Y., Teratani, T. and Ochiya, T. "Stem cells into liver"—basic research and potential clinical applications. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 585:3-17, 2006.
  - 29) Takeshita, F., Kodama, M., Yamamoto, H., Ikarashi, Y., Ueda, S., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tamatani, T., Kanegasaki, S., Ochiya, T. and Quinn, G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49:2948-2958, 2006.
  - 30) Kosaka, N., Kodama, M., Sasaki, H., Yamamoto, Y., Takeshita, F., Takahama, Y., Sakamoto, H., Kato, T., Terada, M., Ochiya, T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J.* 20:1484-1485, 2006.
  - 31) Katsumoto, T., Aikawa, Y., Iwama, A., Ueda, S., Ichikawa H., Ochiya, T. and Kitabayashi, I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev.* 20:1321-1330, 2006.
  - 32) Fukaya, M., Isohata, N., Ohta, H., Aoyagi, K., Ochiya, T., Nakanishi, Y., Taniguchi, H., Sakamoto, H., Shimoda, T., Nimura, Y., Yoshida, T. and Sasaki, H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131:14-29, 2006.
  - 33) Ochiya, T., Honma, K., Takeshita, F. and Nagahara, S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov.*, 2:159-167, 2007.
  - 34) Hanai, K., Takeshita, F., Honma, K., Nagahara, S., Maeda, M., Minakuchi, Y., Sano, A. and Ochiya, T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1082:9-17, 2006.
  - 35) Kurokawa, Y., Honma, K., Takemasa, I., Nakamori, S., Kita-Matsuo, H., Motoori, M., Nagano, H., Dono, K., Ochiya, T., Monden, M. and Kato, K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int. J. Oncol.*, 28:383-391, 2006.
  - 36) Fujii, T., Saito, M., Iwasaki, E., Ochiya, T., Takei, Y., Hayashi, S., Ono, A., Hirao, N., Nakamura, M., Kubushiro, K., Tsukazaki, K. and Aoki, D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int. J. Oncol.*, 29:541-548, 2006.
  - 37) Yanagihara, K., Takigahira, M., Takeshita, F., Komatsu, T., Nishio, K., Hasegawa, F. and Ochiya, T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res.*, 66:7532-7539, 2006.
  - 38) Takeshita, F. and Ochiya, T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci.* 97:689-696, 2006.
  - 39) Fukasawa, M., Morita, S., Kimura, M., Hori, T., Ochiya, T. and Hatada, I. Genomic imprinting in Dicer1-hypomorphic mice. *Cytogenet.*

- Genome Res., 113:138-143, 2006.
- 40) Ueda, S., Fukamachi, K., Matsuoka, Y., Takasuka, N., Takeshita, F., Naito, A., Iigo, M., Alexander, D. B., Moore, M. A., Saito, I., Ochiya. T. and Tsuda, H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis*, 27:2497-2510, 2006.
  - 41) Huang, J., Sakai, R. and Furuichi, T. The docking protein Cas links tyrosine phosphorylation signaling to elongation of cerebellar granule cell axons. *Mol. Biol. Cell.*, 17:3187-3196, 2006.
  - 42) Sawada, Y., Tamada, M., Dubrin-Thaler, B., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S. and Sheetz, M. P. Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas. *Cell*, 127:1015-1026, 2006.
  - 43) Varki, A., Kannagi, R., and Toole, B. P. Glycosylation changes in cancer. In: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, G.W. Hart and J.D. Marth (eds.), *Essentials of Glycobiology*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, in press.
  - 44) Kannagi, R., Miyazaki, K., Kimura, N., and Yin, J. Selectin-mediated metastasis of tumor cells: Alteration of carbohydrate-mediated cell-cell interactions in cancers induced by epigenetic silencing of glycogenes. In: C. Sansom and O. Markman (eds.), *Glycobiology*, pp. 274-287, Bloxham, Oxfordshire, UK: Scion Publishing Ltd., 2007.
  - 45) Kontani, K., Teramoto, K., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Ishida, H., Kajino, K., Fujino, S., Yamauchi, A., Taguchi, O., Kannagi, R., Yokomise, H., and Ogasawara, K. Preparation of fully activated dendritic cells capable of priming tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with metastatic cancer using penicillin-killed streptococcus pyogenes (OK432) and anti-CD40 antibody. *Oncol. Rep.*, 17: 895-902, 2007.
  - 46) Koyama, H., Hibi, T., Isogai, Z., Yoneda, M., Fujimori, M., Amano, J., Kawakubo, M., Kannagi, R., Kimata, K., Taniguchi, S., and Itano, N. Hyperproduction of hyaluronan in Neu-induced mammary tumor accelerates angiogenesis through stromal cell recruitment: Possible involvement of versican/PG-M. *Am. J. Pathol.*, 170: 1086-1099, 2007.
  - 47) Li, G., Hu, R., Kamijo, Y., Nakajima, T., Aoyama, T., Inoue, T., Node, K., Kannagi, R., Kyogashima, M., and Hara, A. Establishment of a quantitative, qualitative, and high-throughput analysis of sulfatides from small amounts of sera by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Anal. Biochem.*, 362: 1-7, 2007.
  - 48) Teramoto, K., Kontani, K., Fujita, T., Ozaki, Y., Sawai, S., Tezuka, N., Fujino, S., Itoh, Y., Taguchi, O., Kannagi, R., and Ogasawara, K. Successful tumor eradication was achieved by collaboration of augmented cytotoxic activity and anti-angiogenic effects following therapeutic vaccines containing helper-activating analog-loaded dendritic cells and tumor antigen DNA. *Cancer Immunol. Immunother.*, 56: 331-342, 2007.
  - 49) Akutagawa, A., Fukami, K., Banno, Y., Takenawa, T., Kannagi, R., Yokoyama, Y., Oda, K., Nagino, M., Nimura, Y., Yoshida, S., and Tamiya-Koizumi, K. Disruption of Phospholipase C $\delta$ 4 Gene Modulates the Liver Regeneration in Cooperation with Nuclear Protein Kinase C. *J. Biochem. (Tokyo)*, 140: 619-625, 2006.
  - 50) Chen, G.-Y., Osada, H., Santamaria-Babi, L.F., and Kannagi, R. Interaction of GATA-3/T-bet transcription factors regulates expression of sialyl Lewis X homing receptors on Th1/Th2 lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 16894- 16899, 2006.
  - 51) Helal Uddin, BM., Hasegawa, H.H., Aminur, RM., Huang, P., Mon, N.N., Ruhul Amin, A.R., Senga, T., Kannagi, R., and Hamaguchi, M. SHP-2-Erk signaling regulates Concanavalin A-dependent production of TIMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 348: 1145-1149, 2006.
  - 52) Kamiyama, S., Sasaki, N., Goda, E., Ui-Tei, K., Saigo, K., Narimatsu, H., Jigami, Y., Kannagi, R., Irimura, T., and Nishihara, S. Molecular cloning and characterization of a novel 3'-phospho- adenosine 5'-phosphosulfate transporter, PAPST2. *J. Biol. Chem.*, 281: 10945- 10953, 2006.
  - 53) Kanoh, A., Seko, A., Ideo, H., Yoshida, M., Nomoto, M., Yonezawa, S., Sakamoto, M., Kannagi, R., and Yamashita, K. Ectopic expression of N-acetylglucosamine 6-O-sulfotransferase 2 in chemotherapy-resistant ovarian adenocarcinomas. *Glycoconj. J.*, 23: 453-460, 2006.
  - 54) Kyogashima, M., Tamiya-Koizumi, K., Ehara, T., Li, G., Hu, R., Hara, A., Aoyama, T., and Kannagi, R. Rapid demonstration of diversity of sulfatide molecular species from biological materials by MALDI-TOF MS. *Glycobiology*, 16: 710-728, 2006.
  - 55) Ohmori, K., Fukui, F., Kiso, M., Imai, T., Yoshie, O., Hasegawa, H., Matsushima, K., and Kannagi, R. Identification of cutaneous lymphocyte-associated antigen as sialyl 6-sulfo

Lewis x, a selectin ligand expressed on a subset of skin-homing helper memory T cells. *Blood*, 107: 3197-3204, 2006.

- 56) Sobue, S., Iwasaki, T., Sugisaki, C., Nagata, K., Kikuchi, R., Murakami, M., Takagi, A., Kojima, T., Banno, Y., Akao, Y., Nozawa, Y., Kannagi, R., Suzuki, M., Abe, A., Naoe, T., and Murate, T. Quantitative RT-PCR analysis of sphingolipid metabolic enzymes in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 20: 2042-2046, 2006.
- 57) Zhuo, L., Kanamori, A., Kannagi, R., Itano, N., Wu, J., Hamaguchi, M., Ishiguro, N., and Kimata, K. SHAP potentiates the CD44-mediated leukocyte adhesion to the hyaluronan substratum. *J. Biol. Chem.*, 281: 20303-20314, 2006.
- 58) Yin, J., Hashimoto, A., Izawa, M., Miyazaki, K., Chen, G.-Y., Takematsu, H., Kozutsumi, Y., Suzuki, A., Furuhashi, K., Cheng, F.-L., Lin, C.-H., Sato, C., Kitajima, K., and Kannagi, R. Hypoxic culture induces expression of sialin, a sialic acid transporter, and cancer-associated gangliosides containing non-human sialic acid on human cancer cells. *Cancer Res.*, 66: 2937-2945, 2006.

#### H. 知的財産権の出願・登録情報

##### 1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」出願中

「(抗HPV16 E6) モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマおよびキット」出願中

「ヒト肝細胞様細胞及びその利用」出願中 (特許出願番号2005-042364)

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

がん細胞の生物学的特性を規定する遺伝子の研究

分担研究者 横田 淳 国立がんセンター研究所生物学部・部長

研究要旨

肺がんで高率に欠失している第 22 染色体長腕から単離した候補がん抑制遺伝子 MYO18B と結合する蛋白質として Sug1 と HOMER2 を同定し、HOMER2 は MYO18B と協調して足場非依存性増殖の抑制に関わっていることを明らかにした。Mapping 10k array を用いて約 1Mb 間隔で全ゲノムに互り染色体欠失のスクリーニングを行い、肺がんの原発腫瘍と転移腫瘍ではゲノム異常の約 70%以上が同じであり、その他に、それぞれの腫瘍で特異的に蓄積しているゲノム異常があることを明らかにした。この結果は、転移性のある肺がん細胞が原発腫瘍の中にクローナルに出現することを意味している。さらに、肺がん転移抑制遺伝子が第 11 染色体短腕上に存在する可能性を示した。肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異は男性喫煙者の低分化腺がんでは特異的に起こり、その多くは KRAS 遺伝子の変異と共存していることを明らかにした。EGFR 変異型ではなく、KRAS 変異型の腺がんにおける悪性度を規定する遺伝子のひとつと考えられた。

A. 研究目的

我が国で最も死亡率の高い肺がんを対象に、がん細胞でゲノム異常を起こしている遺伝子を同定し、その異常によって発現するがん細胞の生物学的特性を明らかにすることを目的として研究を進めている。がん抑制遺伝子とがん遺伝子を標的とし、肺がん細胞で高頻度に見られる染色体欠失領域から遺伝子を単離して、変異や発現の検討により候補がん抑制遺伝子を同定する手法を取っている。がん遺伝子に関しては、その機能などから候補遺伝子を絞り込み、変異検索を行っている。また、肺がんで異常が報告された遺伝子に関しては、その臨床病理学的意義を追求している。今年度は以下の3課題について研究を進めた。1) 我々の研究室で単離した MYO18B 候補肺がん抑制遺伝子の生物学的機能解析、2) 原発性肺がんと転移性肺がんにおけるゲノム異常の蓄積状態の類似性と不均一性の解析、3) 肺がんにおける LKB1 遺伝子異常と臨床的特性の関連性に関する研究。それぞれの課題について研究方法とその結果を以下に列記する。

B. 研究方法

1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

Yeast two-hybrid screen 法を用いてヒト MYO18B 蛋白質の C 末領域 (2020-2567 アミノ酸) と結合する蛋白質を、ヒト肺組織とヒト骨格筋の cDNA ライブラリーから探索した。候補として同定された Sug1 と HOMER2 に関して、種々の抗体を用いて、*in vitro* 及び *in vivo* で結合を確認し

た。さらに、種々の発現ベクターを作製して、軟寒天コロニー形成法などの生物学的機能解析を行った。2) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

8 セットのヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍から DNA を抽出し、ゲノム網羅的に約 10,000 ヶ所の遺伝子座を認識する DNA Chip、Mapping 10k array を用いて染色体の欠失領域を探索した。脳転移腫瘍で高頻度に第 11 染色体短腕の欠失を検出したので、さらに、その領域のマイクロサテライトマーカーのプライマーを用いたゲノム PCR 法で欠失領域の詳細な解析を行なった。また、二相性肺芽腫の一症例についても同様の解析を行い、腫瘍組織の病理学的非均一性についてゲノム異常の蓄積状態から考察した。

3) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

多くのヒト肺がん細胞株と様々な病期の肺腺がん臨床検体もにおける LKB1 遺伝子の欠失と変異について解析し、その臨床病理学的意義や他の遺伝子異常との関連性を検討した。

(倫理面への配慮)

手術検体を用いた研究は、倫理委員会での承認を得て、臨床病理学的診断の後に残った組織を対象として、検体をコード化し、患者に不利益がないよう、プライバシーを厳守して行なった。動物を用いた実験は「国立がんセンターにおける動物実験に関する指針」に従い、動物の生命や苦痛に対して十分な配慮を払って行った。

## C. 研究結果

### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

これまでの本研究で、肺がんで高頻度に欠失がみられる第 22 染色体長腕 (22q) から MYO18B 遺伝子を単離し、この遺伝子がヒト肺がん細胞の約 50% で変異、欠失、過メチル化等により失活していること、ヒト肺がん細胞株への遺伝子導入によって足場非依存性増殖を抑制することを明らかにしてきた。そこで、MYO18B 遺伝子の生物学的機能を明らかにするため、Yeast two-hybrid screen 法を用いて MYO18B 蛋白質に結合する蛋白質を探索した。その結果、Sug1 と HOMER2 という 2 つの蛋白質の結合が示唆されたので、さらに詳細な解析を進めた。

Sug1 は 26S proteasome の 19S regulator subunit で、MYO18B 蛋白質との結合は GST 蛋白質の解析、共免疫沈降法、免疫細胞学的解析で確認された。さらに、proteasome 阻害剤や siRNA を用いた Sug1 の機能・発現抑制により、MYO18B 蛋白質量の増加とポリユビキチン化が観察され、MYO18B 蛋白質は proteasome で Sug1 との結合を介して分解される基質のひとつであることが示唆された。

HOMER2 は Homer/Ves1 ファミリー蛋白質のひとつで、やはり MYO18B 蛋白質との結合は GST 蛋白質の解析、共免疫沈降法、免疫細胞学的解析で確認された。局在に関しては、細胞膜の突起部分とアクチンのストレスファイバー共局在していることが示唆された。MYO18B 蛋白質の発現はヒト肺がん細胞株の足場非依存性増殖を抑制するので、さらに、この機能における HOMER2 の作用を解析した結果、HOMER2 の共発現によりソフトアガーでの肺がん細胞株のコロニー形成能がさらに減弱した。これらの結果より、HOMER2 蛋白質は MYO18B 蛋白質との結合を介して、MYO18B 蛋白質のがん抑制機能を制御していることが示唆された。

### 2) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

Affymetrix 社から発売された「Mapping 10k array」という DNA チップは、全ゲノムに亘り、一塩基多型を平均約 210-kb 間隔で調べることのできるマイクロアレイである。本年度はこのマイクロアレイを用いて、8 セットのヒト肺がん原発腫瘍と転移腫瘍における染色体欠失の分布状態をゲノム網羅的に解析した。また、組織学的に上皮様成分と中皮様成分を含む二相性肺芽腫 (biphasic pulmonary blastoma) の一例で、上皮様腫瘍と中皮様腫瘍をマイクロダイセクションで取り分けて解析した。

原発腫瘍と転移腫瘍の比較解析では、各腫瘍に 5~20 ヶ所の欠失が検出され、同一患者から得られた腫瘍では原発巣と転移巣で 67% 以上の欠失が一致していた。しかし、原発巣あるいは転移巣のみで検出される欠失もあり、それぞれの部位でがん細胞が増殖する過程で新たなクローンが出現していることが分かった。特に転移腫瘍の 50% (4/8) で第 11 染

色体短腕の欠失が蓄積しており、この領域に転移能を規定する遺伝子の存在が示唆された。

二相性肺芽腫の解析では、上皮様腫瘍と中皮様腫瘍の両者に共通して  $\beta$ -catenin の変異と第 14, 17 染色体の欠失が検出され、単一の細胞に由来する腫瘍であることが分かった。また、中皮様腫瘍特異的に第 3, 9 染色体欠失と p53 変異が検出され、上皮様腫瘍特異的に第 6 染色体欠失が検出された。この結果から、肺芽腫が二相性の腫瘍を含む原因は蓄積している遺伝子異常が異なるためと考えられた。

### 3) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究

消化管に過誤種様ポリープを形成する遺伝性疾患 Poutz-Jeghers syndrome の原因遺伝子 LKB1 は肺がんで変異が報告されているが、その詳細は不明である。そこで、まず多くの肺がん細胞株を用いて欠失と変異の検索を行った。その結果、30% (21/70) の細胞株で遺伝子異常が検出され、特に非小細胞肺がんで頻度が高く (39%, 20/51)、その異常は KRAS 変異と共存することが有意に多かった。そこでさらに、多くの肺腺がん臨床検体で変異検索を行ったところ、変異は男性喫煙者のみで検出され、女性あるいは非喫煙者には全く検出されなかった。また、組織学的には、低分化型で有意に多かった。以上より、LKB1 遺伝子の変異は喫煙によって誘導され、低分化型腺がんの形成に関わっていると考えられた。

## D. 考察

本年度は以下の 3 課題に関して研究を進めたので、それぞれの結果について個別に考察する。

### 1) 候補がん抑制遺伝子 MYO18B の造腫瘍抑制能に関する生物学的機能解析

MYO18B のがん抑制遺伝子としての機能を明らかにするため、細胞内で結合している蛋白質を探索し、Sug1 と HOMER2 を同定した。特に HOMER2 は MYO18B の足場非依存性増殖抑制能を増強する作用があることが分かった。この結果は、MYO18B のがん抑制遺伝子としての機能を確認できたものであり、さらに、その分子機構解明の糸口になるものである。MYO18B は多機能であることが予想されるので、今後は他の機能についても解析を進め、肺がんにおける MYO18B 異常と肺がんの特性との関連性を明らかにしていきたい。

### 2) マイクロアレイを用いた肺がん組織の不均一性と転移形質発現の関連性に関する研究

転移の分子機構を明らかにするために、原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似点・相違点を検討した。その結果、原発腫瘍内に新たなクローン細胞が出現し、その細胞が、ある時には原発腫瘍内で優位に増殖し、ある時には選択的に転移を起こすことが分かった。この結果は、転移腫瘍の鑑別診断や特異的治療を考える上で貴重な情報である。今後は転移形質発現の原因となるゲノム異常を明らかにし、診断のマーカー、治療の標的を同定していきたい。

3) 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異と臨床病理学的所見との関連性に関する研究  
 肺腺がんにおける LKB1 遺伝子の変異に関しては、まだ報告が少なく、その実態や意義が明らかでなかった。本研究では、高頻度に変異している重要な遺伝子であることを確認するとともに、男性喫煙者に多く、低分化型腺がんの形成に関わっていることを示すことができた。肺腺がんの悪性度を規定する遺伝子のひとつであると考えられるので、今後は生物学的機能解析を進めるとともに、診断・治療の標的分子としての可能性も追求していきたい。

#### E. 結論

MYO18B 遺伝子のがん抑制機能を支持し、その機構解明に結びつく結果を得た。原発腫瘍と転移腫瘍に蓄積しているゲノム異常の類似性と不均一性を明らかにし、候補転移抑制遺伝子の染色体部位を同定した。LKB1 遺伝子は喫煙等が原因で起こり、肺がん細胞の分化抑制を引き起こすと考えられた。

#### F. 健康危険情報 特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Kohno, T., Suzuki, K., Matsuno, Y., Yamamoto, S., Noguchi, M., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in non-invasive bronchioloalveolar carcinoma. *Int. J. Cancer*, 118:2498-2504, 2006.
- 2) Takahashi, K., Kohno, T., Ajima, R., Sasaki, H., Minna, J. D., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Homozygous deletion and reduced expression of the DOCK8 gene in human lung cancer. *Int. J. Oncol.*, 28:321-328, 2006.
- 3) Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R. M., Okamoto, A., Yokota, J., Takana, T., Calin, G. A., Liu, C.-G., Croce, C. M. and Harris, C. C. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9:189-198, 2006.
- 4) Inoue, T., Kon, T., Ajima, R., Ohkura, R., Tani, M., Yokota, J. and Sutoh, K. MYO18B interacts with the proteasomal subunit Sug1 and is degraded by the ubiquitin-proteasome pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342:829-834, 2006.
- 5) Matsumoto, S., Takahashi, K., Iwakawa, R., Matsuno, Y., Nakanishi, Y., Kohno, T., Shimizu, E. and Yokota, J. Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma. *Int. J. Cancer*, 119:1491-1494, 2006.
- 6) Akca, H., Tani, M., Hishida, T., Matsumoto, S. and Yokota, J. Activation of the AKT and STAT3 pathways and prolonged survival by a mutant EGFR in human lung cancer cells. *Lung Cancer*, 54:25-33, 2006.
- 7) Kohno, T. and Yokota, J. Molecular processes of chromosome 9p21 deletions causing inactivation of the p16 tumor suppressor gene in human cancer: Deduction from structural analysis of breakpoints for deletions. *DNA Repair*, 5(9-10):1273-1281, 2006.
- 8) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonal and parallel evolution of primary lung cancers and their metastases revealed by molecular dissection of cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 13(1):11120, 2007.
- 9) Edakuni, N., Ikuta, K., Yano, S., Nakatani, E., Muguruma, H., Uehara, H., Tani, Masachika, Yokota, J., Aizawa, H. and Sone, S. Restored expression of the MYO18B gene suppresses orthotopic growth and the production of bloody pleural effusion by human malignant pleural mesothelioma cells in SCID mice. *Oncol. Res.*, 16:235-243, 2006.
- 10) Takahashi, K., Kohno, T., Matsumoto, S., Nakanishi, Y., Arai, Y., Fujiwara, T., Tanaka, N. and Yokota, J. Clonality and heterogeneity of pulmonary blastoma from the viewpoint of genetic alterations: A case report. *Lung Cancer*, in press, 2007.
- 11) Matsumoto, S., Iwakawa, R., Takahashi, K., Kohno, T., Nakanishi, Y., Matsuno, Y., Suzuki, K., Nakamoto, M., Shimizu, E., Minna, J. D. and Yokota, J. Prevalence and specificity of LKB1 genetic alterations in lung cancers. *Oncogene*, in press, 2007.
- 12) Ajima, R., Kajiya, K., Inoue, T., Tani, M., Shiraiishi-Yamaguchi, Y., Maeda, M., Segawa, T., Furuichi, T., Sutoh, K. and Yokota, J. HOMER2 binds MYO18B and enhances its activity to suppress anchorage independent growth. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2007.
- 13) Yokota, J., Matsumoto, S. and Kohno, T. Letter to the Editor: Comments to the letter by Edmond S. K. Ma et al. *Int. J. Cancer*, 120:1832-1833, 2007.

#### H. 知的財産権の出願・登録情報 特になし

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・**分担**）研究報告書

正常ヒト細胞を用いた多段階発がんの分子機構の把握

分担研究者 清野 透 国立がんセンター研究所ウイルス部 部長

研究要旨 ヒト子宮頸がんのin vitro発がんモデルを作製した。hTERTのみで不死化した2倍体正常子宮頸部角化細胞株（HCK1T）に、HPV16 E6, E7を導入すると3次元培養でCIN3様組織像を呈し、軟寒天培地中で微少コロニーを作った。E6が分化誘導因子Notch1の発現抑制やErbB2の安定性増加に寄与していること、Notch1はp53の直接の標的遺伝子であることを明らかにした。E6, E7に加えHrasV12を追加導入し血清入り培地で培養すると、ヌードマウスでの造腫瘍能を獲得し、3次元培養で浸潤像を呈した。さらに、c-mycを追加導入すると、HeLa細胞を凌駕する極めて強い造腫瘍性を示した。新たに手術材料11検体からHCK2-12の培養細胞を得、再現性を確認している。同様に卵巣がんのin vitroモデル作製のため、手術材料2検体から、hTERT+E7などにより不死化した卵巣表層上皮細胞株（HOSE1, HOSE2）を樹立した。これらは世界初の正常2倍体卵巣表層上皮細胞株である。また、ウイルス遺伝子を用いずに、乳腺上皮細胞、肺気管支上皮、皮膚角化細胞などを不死化する方法を開発し対応する各がんのin vitroモデル作製の基礎を確立した。

#### A. 研究目的

本研究の目的は、多段階発がんの分子機構をより正確に把握することである。そのため、ヒト正常細胞を用い不死化からがん化に至る過程をできるだけin vivoに近い形で再現したin vitro発がんモデルを作製する。このモデルを使うことで、多段階発がんの各ステップを人為的に再現することができ、各ステップで起きている現象を詳細に解析することが可能となる。さらには、がん化の予防や治療法の開発につながる分子標的の同定にも有用である。

#### B. 研究方法

まず、固形がんの母体となる正常ヒト細胞をTERT単独あるいはこれに加えHPV16 E7やE6あるいはbmi-1, p16-shRNAの導入により不死化し、細胞種毎に異なる不死化機構を明らかにする。また、これまでに不死化した種々のヒト細胞を用いて、これにさらに各がんで高頻度に見つかる異常をがん遺伝子の導入やがん抑制遺伝子のRNA干渉法を用いた発現抑制により導入し、そのがん化過程をin vitroで再現を試みた。正常初代培養細胞にも効率よく遺伝子導入可能な組換えレトロウイルスを用いることにより遺伝子挿入部位に依存しない細胞がん化過程をモニターした。組換えレトロ

hTERT+E7やhTERT+cdk4+cyclin Dにより不死化した卵巣表層上皮細胞株 (HOSE1, HOSE2) を樹立した。これらは世界初の正常2倍体卵巣表層上皮細胞株である。現在までに種々の遺伝子導入により造腫瘍能を獲得した細胞株をようやく得た。

また、ウイルス遺伝子の代わりにbmi-1あるいはp16-shRNAを用いて、乳腺上皮細胞、肺気管支上皮、皮膚角化細胞などを不死化する方法を開発し対応する各がんのin vitroモデル作製の基礎を確立した。

#### D. 考察

昨年度、不死化子宮頸部角化細胞 (HCK1T) に、E6E7導入後であっても、HrasV12を導入すると細胞死が誘導される事を見いだした。HrasV12高発現細胞は維持できず、in vitroがん化モデル作製の困難さを感じた。しかし、この細胞死誘導機構の解析から、無血清の角化細胞培地の特異性が関与していることが明らかとなった。通常の水入り培地ではHCK1T細胞は最終分化誘導がかかるが、同培地中でE6E7+HrasV12被導入細胞は、分化抵抗性と共に、高い増殖性を示した。これらの細胞はHrasV12の発現も高レベルで維持していることが明らかとなった。また、足場非依存性増殖と共にヌードマウスにおける造腫瘍性を示したことから、HCK1T細胞のがん化にはE6E7に加えがん遺伝子の活性化1つのみで可能あることが示された。これが、HCK1Tに特異的ではなく、独立

の初代HCK12は、E6E7+HrasV12のみで造腫瘍性を獲得することが示された。HCK1T+E6E7+HrasV12細胞にさらに種々のがん遺伝子を導入するとその造腫瘍能は増加したが、特にc-mycにより著しい造腫瘍能の増加が見られた。50万個の細胞接種では数日後から腫瘍の増大が確認され、接種した細胞の多くが腫瘍形成に関わっていることが示唆された。実際、200個の細胞接種によっても6/6で腫瘍を形成したことから、がん幹細胞様の細胞集団であることが示唆された。今後、がん幹細胞の理解や、同細胞を標的とした治療における標的分子の同定に有効であると考えられる。

子宮頸部角化細胞と同様に、皮膚、食道などの角化細胞や気管支・肺上皮細胞などは、血清やカルシウムにより分化が誘導されるため、無血清、低カルシウム培地という特殊培地で培養されている。われわれの用いてきた特殊培地では活性型rasの導入によりこれらの細胞には細胞死が誘導されin vitroにおけるがん化は一時困難に思われた。しかし今回の成果は、食道がんや肺がんなどのin vitro発がんモデル作製においても応用可能であり研究の進展が期待される。今後、他の細胞種でもin vitroがん化モデルを作製する事で異なる細胞種間での特異性や共通性を明らかに出来るものと考ええる。実際のがん細胞では染色体異常を含め多数の異常が蓄積しているためどれががん化に関連した異常であるかを見極めることは困難である。正



primary human cells by p16<sup>Ink4a</sup>-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci*, 98: 147-154, 2007.

Handa K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M, and Kiyono T E6AP-dependent degradation of DLG4/PSD95 by high-risk human papillomavirus type 18 E6 protein. *J. Virol*, 81:1379-89, 2007.

Shima Y, Okamoto T, Aoyama T, Yasura K, Ishibe T, Nishijo K, Shibata KR, Fukiage K, Otsuka S, Uejima D, Nakayama T, Nakamura T, Kiyono T, Toguchida J. In vitro transformation of mesenchymal stem cells by oncogenic H-rasVal12. *Biochem Biophys Res Commun*, 353:60-6, 2007.

Narisawa-Saito M, Handa K, Yugawa T, Ohno S, Fujita M, and Kiyono T HPV16 E6-mediated stabilization of ErbB2 in neoplastic transformation of human cervical keratinocytes. *Oncogene*, in press

Yugawa T, Handa K, Narisawa-Saito M, Ohno S, Fujita M and Kiyono T. Regulation of Notch1 gene expression by p53 in epithelial cells. *Mol Cell Biol*, in press.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

「不死化子宮内膜腺上皮細胞株及びその作製方法」 出願中

「(抗HPV16 E6) モノクローナル抗体またはその結合活性断片、ハイブリドーマおよびキット」 出願中

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

幹細胞を用いた細胞分化・増殖・がん化機構の研究

分担研究者 落谷孝広 国立がんセンター研究所がん転移研究室・室長

研究要旨：間葉系幹細胞、胚性幹細胞(ES 細胞)などの幹細胞を用いた肝細胞の分化・増殖ならびに発がんモデルを開発し、発がんや転移に係わる遺伝子群の発現がその分化・増殖に及ぼす影響を細胞、動物個体レベルで解析することで、がんの生物学的特徴を規定する分子基盤の基礎的情報を明らかにする。本年度はヒトがん患者の脂肪組織に存在する間葉系幹細胞から肝細胞の機能を持つ細胞の分化系の構築とその機能解析をおこない、体性幹細胞から肝細胞を分化しうることを明らかにした。またこの細胞は、肝不全動物の肝機能を改善する効果も確認出来た。

A. 研究目的

間葉系幹細胞、胚性幹細胞(ES 細胞)などの幹細胞を用いた肝細胞の分化・増殖ならびに発がんモデルを開発し、発がんや転移に係わる遺伝子群の発現がその分化・増殖に及ぼす影響を細胞、動物個体レベルで解析することで、がんの生物学的特徴を規定する分子基盤の基礎的情報を明らかにする。

脂肪組織から、間葉系幹細胞を分離培養した後、CD105 陽性分画を精製、in vitro で肝細胞に分化誘導する操作を行った。この細胞の肝細胞としての性状を、肝特異的遺伝子の発現、肝特異的蛋白質の発現と培養上澄中への産生、四塩化炭素によって肝不全状態になった動物へ移植した際の肝機能回復機能の有無を中心に検討した。

B. 研究方法

独自に開発した肝細胞を ES 細胞から分化誘導する培養系を用いて、ヒト間葉系幹細胞から肝細胞を作成した。まずインフォームドコンセントのもとに得られたがん患者 6 名の皮下脂

C. 研究結果：

ドナーの年齢は 36～54 歳であり、そのヒト皮下脂肪組織中にはおよそ 3～8%の間葉系幹細胞が存在していた。この細胞は容易に継代培養や凍結保存が可能であり、細胞の倍加時間は 18～

22 時間程度、継代数が5代を越えると細胞の倍加能力に明らかな低下が認められた。脂肪、軟骨、骨への分化能は5～8世代までは高い分化能を示すこともわかった。肝細胞への分化は、増殖因子の処理後35日ごろから顕著になり形態的にも機能的にも肝臓の特徴を示した。特に、アルブミンの産生やアンモニア解毒能等は顕著に発現され、肝不全動物への移植実験では24時間後に血中アンモニアレベルを有意に低下させた。

#### D. 考察：

本研究成果によってがん患者の脂肪組織中の間葉系幹細胞に肝細胞の機能を有する細胞へと分化する可塑性があることが証明された。この細胞は確かにいくつかの肝臓の機能を発現し、また細胞移植による肝不全動物の肝機能の改善に有効であったが、この細胞が本来の肝臓とどこまで機能的に近いのか、あるいは動物への移植に関する安全性についても多くの課題が明らかとなった。

#### E. 結論：

がんの治療によって失われる正常臓器の機能を回復させるために再生医療は重要な役割を果たすが、今回の成果は、初めて実際のがん患者の、しかも脂肪組織から得た幹細胞から患者さん自身の肝細胞を作り出す可能性を示せたことは意義深

い。今後はこの肝細胞の有する肝臓特異的機能を網羅的遺伝子発現解析やメチル化等の観点から検討するとともに、免疫不全動物の肝臓へ移植した場合の有効性、安全性の問題や、さらに肝臓としての分化をより詳細に検討するための基盤が出来上がった。

#### F. 健康危惧情報：

本実験計画においては、倫理に関わるようなヒトに関する受精卵等は全く扱うことはない。ヒト間葉系幹細胞の培養、分化操作に関する実験は倫理審査委員会に承認を得ている。また、動物の操作は、すべて国立がんセンター研究所動物倫理委員会の定める規則に基づいて行われた。

#### G. 研究発表：

##### 1. 論文発表

1. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y, Teratani T, Ochiya T. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, in press.
2. Morita S, Horii T, Kimura M, Goto Y, Ochiya T, Hatada I. One Argonaute family member, eIF2c2 (Ago2), is essential for development and appears not to be involved in DNA methylation. *Genomics*, in press
3. Watanabe H, Ochiya T, Ueda S, Kominami Y, Gon R, Nishiki M, Hayashi M, Sasaki A, Shiraishi M, Kashimoto N, Myojin Y, Kamiya K. Differentiation of a hepatic phenotype after heterotropic transplantation of heart, kidney, brain, and skin tissues into liver in F344 rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 354: 841-845, 2007.
4. Banas A, Quinn G, Yamamoto Y,

- Teratani T, Ochiya T. "Stem cells into liver"--basic research and potential clinical applications. *Adv Exp Med Biol*. 585: 3-17, 2006.
5. Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 49: 2948-2958, 2006.
6. Kosaka N, Kodama M, Sasaki H, Yamamoto Y, Takeshita F, Takahama Y, Sakamoto H, Kato T, Terada M, Ochiya T. FGF-4 regulates neural progenitor cell proliferation and neuronal differentiation. *FASEB J*. 20: 1484-1485, 2006.
7. Katsumoto T, Aikawa Y, Iwama A, Ueda S, Ichikawa H, Ochiya T, Kitabayashi I. MOZ is essential for maintenance of hematopoietic stem cells. *Genes Dev*. 20:1321-1330, 2006.
8. Fukaya M, Isohata N, Ohta H, Aoyagi K, Ochiya T, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sakamoto H, Shimoda T, Nimura Y, Yoshida T, Sasaki H. Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse type gastric cancer. *Gastroenterology*, 131: 14-29, 2006.
9. Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov*. 2: 159-167, 2007.
10. Hanai K, takeshita F, Honma K, nagahara S, maeda M, Minakuchi Y, Sano A, Ochiya T. Atelocollagen-mediated systemic DDS for nucleic acid medicines. *Ann N Y Acad Sci*. 1082: 9-17, 2006.
11. Kurokawa Y, Honma K, Takemasa I, Nakamori S, Kita-Matsuo H, Motoori M, Nagano H, Dono K, Ochiya T, Monden M, Kato K. Central genetic alterations common to all HCV-positive, HBV-positive and non-B, non-C hepatocellular carcinoma: A new approach to identify novel tumor markers. *Int J Oncol*, 28: 383-391, 2006.
12. Fujii T, Saito M, Iwasaki E, Ochiya T, Takei Y, Hayashi S, Ono A, Hirao N, Nakamura M, Kubushiro K, Tsukazaki K, Aoki D. Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer. *Int J Oncol*. 29: 541-548, 2006.
13. Yanagihara K, Takigahira M, Takeshita F, Komatsu T, Nishio K, Hasegawa F, Ochiya T. A new photon counting technique for quantitatively evaluating progression of peritoneal tumor dissemination. *Cancer Res*. 66: 7532-7539, 2006.
14. Takeshita F, Ochiya T. Therapeutic potential of RNA interference against cancer. *Cancer Sci*. 97: 689-696, 2006.
15. Fukasawa M, Morita S, Kimura M, Horii T, Ochiya T, Hatada I. Genomic imprinting in *Dicer1*-hypomorphic mice. *Cytogenet Genome Res*. 113: 138-143, 2006.
16. Ueda S, Fukamachi K, Matsuoka Y, Takasuka N, Takeshita F, Naito A, Iigo M, Alexander DB, Moore MA, Saito I, Ochiya T, Tsuda H. Ductal origin of pancreatic adenocarcinomas induced by conditional activation of a human Ha-ras oncogene in rat pancreas. *Carcinogenesis*. 27: 2497-2510, 2006.

## 2. 学会発表

### (国内発表)

- 1) イメージング技術によるがん細胞の可視化とRNAi治療評価系への応用、落谷孝広、第1回医療バイオワークシヨップ (2006. 4. 24 東京工業大学) 招待講演
- 2) ヒト幹細胞から分化した肝細胞、落谷孝広、第13回HAB研究機構学術年会 シンポジウム (2006. 5. 19 東京) 招待講演
- 3) Functional screening of the genes correlated with drug resistance in breast cancer using Atelocollagen-mediated siRNA delivery *in vitro* and *in vivo*. Kimi Honma, Kyoko Iwao-Koizumi, Fumitaka Takeshita, Kazuki Nemoto, Jun Onodera, Yu Aso, Hiroshi Itoh, Kikuya Kato, Takahiro Ochiya 第20回国際生化学・分子生物学会議 (2006. 6. 22 京都)
- 4) ステム細胞の肝細胞分化制御、落谷孝広、(シンポジウム) 第13回肝細胞研究会 (2006. 7. 1 旭川) 招待講演