

200720023A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略事業

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 落合 淳志

平成20(2008)年4月

目 次

I	総括研究報告書	1
	がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく	
	診断・治療法の開発に関する研究	3
	落合 淳志	
II	分担研究報告書	
	1. 体內的における MMP/ADAM の作用機構および機能評価法の開発	9
	岡田 保典	
	2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構の解明	15
	坂元 亨宇	
	3. 消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用	19
	加藤 光保	
	4. がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化	21
	平尾 敦	
	5. 発現解析によるがん間質相互作用における重要分子の同定	23
	中西 幸浩	
	6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発	25
	神奈木 玲児	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	31

I 総括研究報告書

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

落合 淳志

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

総括研究者 落合 淳志 国立がんセンター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部・部長

がん生物像にかかわる病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する生物学的意義をがん細胞とがん微小環境との相互作用として検討し、新しい診断法や治療法開発を目指すものである。本年度は、1) がん間質細胞の起源として、骨髄由来線維芽細胞が存在すること、がん患者血液中には間葉系幹細胞が存在している事を初めて示した。2) がんの特徴的な病理・病態学的な代表として膵がんの神経浸潤モデルを樹立し、がん細胞が産生するラミニンが神経進展に重要である事を明らかにした。3) がん間質とがん細胞の相互作用としてのがん組織特異的血管新生の分子機構の解明、ならびに4) がん幹細胞の存在する微小環境（ニッチ）と間質細胞との相互作用を目的に、新しい扁平上皮がんのがん幹細胞マーカーを明らかにできた。これらヒトがん病理・病態に関わる動物モデルを用いて、がん微小環境によるがん浸潤増殖の分子基盤の解明とその治療法開発を行う。

A.研究目的

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化の積み重ねにのみ規定されるだけでなくがん周囲微小環境が重要な役割を果たしていると考えられる。特に、がんの特異的な病理・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を規定する分子基盤に関わっていることが強く推察される。本研究班ではこれらのがん生物像にかかわる病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する生物学的意義をがん細胞とがん微小環境との相互作用として検討するものである。本年度は、1) がん間質細胞の起源とがん間質細胞の有するがん生物像に関わる意義を明らかにする。2) がんの特徴的な病理・病態学的な代表として膵がんの神経浸潤モデルを作製し、膵がんの特徴的ながん性疼痛や悪液質の分子機構を明らかにする。3) がん間質とがん細胞の相互作用としてのがん組織特異的血管新生の分子機構の解明をする。4) がん幹細胞の存在する微小環境（ニッチ）と間質細胞との相互作用を検討し、がん細胞の存在とがん微小環境のかかわりを明らかにする。それに加え、これらの分子機構を標的とした新しい治療法の開発や機能的診断法の開発を目指す。

B.研究方法

がん病理形態特性に関わる分子基盤の解析として、以下の4点に付いて検討した。

1) ヒトがん間質細胞を構成する線維芽細胞の起源と機能

がん組織はがん細胞と間質を構成する線維芽細胞、血管、リンパ管、そしてマクロファージやリンパ球など炎症細胞から構成される。がん組織の間質線維芽細胞の起源を明らかにする目的で、GFPにより標識されたRag1欠失免疫不全マウスを作製し、その骨髄細胞を免疫不全マウスに移植し、様々なヒトがん細胞を移植し、がん細胞の間質線維芽細胞が骨髄由来かを検討した。また、ヒト肺がん患者の肺動静脈由来ならびに動脈外膜にがん間質に分化する線維芽細胞前駆細胞が存在するかを検討した。また、これらの細胞がどのような形質を有しているかを検討した。

2) ヒトがん病理・病態を模倣する動物モデルの作製

ヒト膵臓がんの病理形態の特徴である神経浸潤モデルを作製した。ヒト膵がん細胞株を免疫不全マウスの座骨神経内に移植し、経時的にがん細胞の運動性を確認するとともに、神経進展機構の分子機構を検討した。また、神経浸潤マウスのラミニン産生によるがん神経進展の分子機構を明らかにし、ヒト膵がん細胞株を用いたマウス神経浸潤

によるがん性疼痛、悪液質モデルの作製を試みた。

3) がん組織では、血管新生が亢進している事が知られているが、このがん組織特異的に起こる血管新生スイッチの分子機構は、これまでのところ必ずしも明らかになっていない。がん間質細胞はがん細胞に比べ多量の血管新生因子であるVEGFを産生するが、試験管内ではこの産生されたVEGFは不活化されていることより、どのような分子機構がこの活性化に関わるかを、動物モデルおよび試験管内モデルを作製し検討した。

4) がん組織を作り出すがん幹細胞の微小環境(ニッチ)を明らかにするためには、がん幹細胞の新しいマーカーを見いだす必要がある。形態学的にはヒト扁平上皮がんは基底側に正常扁平上皮と同様な幹細胞が存在すると考えられる。そこで分化型扁平上皮がん細胞のがん幹細胞を、基底細胞において発現する分子を元にスクリーニングし、新しい分化型扁平上皮がんのがん幹細胞マーカーを検索した。

C. 研究結果

ヒトがん間質細胞を構成する線維芽細胞の起源と機能

動物モデルを用い、がん間質組織には骨髄由来線維芽細胞が存在し、その割合は、腫瘍全体の60%に及ぶ事が明らかになった。このことはがんの間質を構成する間質細胞ががん細胞により動員されている事、および間質細胞はがん細胞の種類により動員される割合が異なり、また同一がん細胞においてもがん細胞が増殖する臓器やその微小環境において変化する事が示された。

また、肺がん切除患者のがん周囲近傍の血管である肺動脈、肺静脈内にはがん間質線維芽細胞の前駆細胞が流れている事を初めて示した。血液内前駆細胞は脂肪細胞および骨細胞への分化を示し、間葉系幹細胞の性質を有している事が示された。

2. 膵臓がんの形態学的特徴である神経浸潤モデルを作製し、ヒト膵がん培養細胞株を用いて神経内進展を検索したところ、ヒトがん組織に認められる所見と一致して、高分化型腺癌の形質を示すと同時に中枢側へ進展していく事が示された。その進展機構を検索したところ、がん細胞が産生する基底膜構成分子ラミニン5の発現が、神経

内浸潤の距離と相関する事が示された。実際の切除ヒトがん組織を用い、神経内進展を腫瘍からの距離として計測すると、ラミニン5 γ 鎖の発現と相関する事が示された。また、神経進展モデルマウスを用いてがん性疼痛および悪液質の程度を検討したところ異痛症が起こる事が示され、膵がん細胞の神経進展により膵がんの特徴的ながん性疼痛のモデルが作製されたと考えられた。また、食餌量の変化が変わらない時期から体重減少、脂肪量の減少が起こる事も示され、膵がん患者の病態の特徴である悪液質のモデルが作製されたと考えられた。今後、膵がん細胞神経進展モデルを用いて、がん性疼痛の分子機構とその治療法ならびに悪液質の形成とがんの進展機構を解明し、新たな治療法の開発を目指す。

3. 血管新生は、これまでがん細胞が産生する血管新生因子により起こると考えられていたが、今回の検討で、がん間質を形成する線維芽細胞が産生する血管新生因子の活性化により、がん組織においてのみ血管新生スイッチが活性化される機構が、がんの産生するMMP7により起こる事を初めて示した。これらの結果は、現在、がん治療に血管新生阻害剤が用いられているが、この血管新生阻害はこれら分子機構をともに障害する事により、より強くなると考えられた。

4. がん組織を作り出すがん幹細胞の微小環境(ニッチ)を明らかにするためにヒト扁平上皮がん細胞のがん幹細胞の新しいマーカーの検出を試み、新規マーカーである分子を見いだした。この分子は扁平上皮の基底細胞にのみ発現し、試験管内では5%程度の細胞にのみ発現している。免疫不全マウスを用いて、増殖能を調べたところ、このマーカーが陽性細胞は陰性細胞に比べ100倍程度がん組織形成能を示す事より、本マーカーが、がん幹細胞のマーカーになり得ると考えられた。

D. 考察

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化の積み重ねにのみ規定されるだけでなくがん周囲微小環境が重要な役割を果たしていると考えられる。特に、がんの特異的な病理・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を

規定する分子基盤に関わっていることが強く推察される。本研究ではこれらのがん生物像にかかわる病理・病態の分子基盤と、その分子機構が有する生物学的意義をがん細胞とがん微小環境との相互作用として検討するものである。今年度は、第1年度でありがんの病理・病態の特徴を示すモデルを作製する事を第一の目標として検討したところ、がん間質細胞の起源を明らかにするモデル作製、膵がん神経進展機構解析モデルから、がん性疼痛モデルそしてがん悪液質モデルの作製ができた。また、がん局所における血管新生機構をがん細胞と間質細胞との相互作用から明らかにする事が出来た。そして、がん微小環境を明らかにするためには、がん細胞の条件を一定にする必要があるが、今年度は扁平上皮がんのがん幹細胞マーカーを、形態像を元に検索し、初めて明らかにする事が出来た。このマーカーは形態学的には扁平上皮の基底にのみ存在し、また試験管内においても5%程度の細胞にのみ発現し、これら細胞が増腫瘍性を示した。これらの結果は、分化型扁平上皮がん細胞には、がん幹細胞と考えられる細胞が存在している事、また生体におけるがん組織の増殖はがん幹細胞の存在により規定されている事などが考えられた。

今年度作製した、神経進展モデルではマウスの挫骨神経に移植したひと膵がん細胞にはその種類により神経内進展距離が異なり、その進展距離とがん細胞が産生する基底膜構成分子ラミニン5 γ 鎖が重要な役割を果たす事が示された。興味深い事に、本動物モデルががん性疼痛のモデルになる事、またがん性悪液質のモデルにもなる事が示された。これらの結果は、膵がんの形態学的特徴の一つである高度な神経浸潤が、膵がん患者の病態の一つである、がん性疼痛やがん悪液質に深く関わっている事がこのモデルにより示される事による。今後、今年度開発したモデルを用いて、なぜ、神経進展をするとどのような機構によりがん性疼痛が強くなるのか、またがん悪液質が進行するのに関わる分子機構を解明するとともにこれら膵がん患者の特徴的病態の治療法を開発する。

E. 結論

がん生物像は、がん細胞の遺伝子変化の積

み重ねにのみ規定されるだけでなくがん周囲微小環境が重要な役割を果たしていると考えられる。特に、がんの特異的な病理・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を規定する分子基盤に関わっていることが強く推察される。今年度は、がん間質細胞の起源の一つが骨髄由来である事を初めて明らかにし、特徴的な病理形態像を示す膵がん神経進展モデルを作製し、その分子基盤を明らかに出来た。分化型扁平上皮がんにおけるがん幹細胞のマーカーを新たに同定した。また、がん組織特異的血管新生機構ががん細胞と間質線維芽細胞との相互作用で起こる事も明らかに出来た。今後は、今年度作製したモデルを基にがんに特徴的な病理形態と病態に関わる分子機構を解明し、新しい治療法を開発する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamauchi C, Hasebe T, Iwasaki M., Imoto S., Wada N., Fukayama M., Ochiai A. Accurate assessment of lymph vessel tumor emboli in invasive ductal carcinoma of the breast according to tumor areas, and their prognostic significance. *Human Pathol* 38(2):247-259, 2007.
2. Imoto S, Wada N, Hasebe T, Ochiai A, Kitoh T. Serum c-erbB-2 protein is a useful marker for monitoring tumor recurrence of the breast. *Int J Cancer*. 15; 120(2): 357-61 2007.
3. Saijo T, Ishii G, Ochiai A, Hasebe T, Yoshida J, Nishimura M, Nagai K. Evaluation of extratumoral lymphatic permeation in non-small cell lung cancer as a means of predicting outcome. *Lung Cancer*. 55(1): 61-66, 2007.
4. Miyamoto S, Nakamura M, Yano K, Ishii G, Hasebe T, Endoh Y, Sangai T, Maeda Hi, Zhang S-C, Chiba T, Ochiai A. Matrix Metalloproteinase-7 Triggers the Matricrine Action of Insulin-like Growth Factor-II via Proteinase Activity on Insulin-like Growth Factor Binding Protein 2 in the Ex-

- tracellular Matrix *Cancer Science*, 98(5): 685-691,2007.
5. Ishii G, Ito TK, Aoyagi K, Fujimoto H, Chiba H, Hasebe T, Fujii S, Nagai K, Sasaki H, Ochiai A. Presence of human circulating progenitor cells for cancer stromal fibroblasts in the blood of lung cancer patients. *Stem Cells*. 2007 Mar 22; [Epub ahead of print]
 6. Yonou H, Ochiai A, Ashimine S, Maeda H, Horiguchi Y, Yoshioka K, Ogawa Y, Hatano T, Tachibana M. The bisphosphonate YM529 inhibits osteoblastic bone tumor proliferation of prostate cancer. *Prostate*. 2007 Apr 17;67(9):999-1009
 7. Sano A, Sangai T, Maed H, Nakamura M, Hasebe T, Ochiai A. Kallikrein 11 expressed in human breast cancer cells releases insulin-like growth factor through degradation of IGFBP-3. *Int J Oncol*. 30(6):1493-8.2007.
 8. Aokage K, Ishii G, Nagai K, Kawai O, Naito Y, Hasebe T, Nishimura M, Yoshida J, Ochiai A. Intrapulmonary metastasis in resected pathologic stage IIIB non-small cell lung cancer: possible contribution of aerogenous metastasis to the favorable outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 134(2):386-91, 2007
 9. Ito TK, Ishii G, Chiba H, Ochiai A. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells. *Oncogene*. 26(51):7194-7203,2007.
 10. Mitsunaga S, Hasebe T, Kinoshita T, Konishi M, Takahashi S, Gotohda N, Nakagohri T, Ochiai A. Detail histological analysis of nerve plexus invasion in invasive ductal carcinoma of the pancreas and its prognostic impact. *Am J Surg Pathol*, 31(11):1636-1644,2007.
 11. Kawaura K, Fujii S, Murata Y, Hasebe T, Ishii G, Itoh T, Sano Y, Saito N, Ochiai A. Lymphatic infiltration identified by D2-40 monoclonal antibody predicts lymph node metastasis in submucosal invasive colorectal cancer. *Pathobiology*, 74(6):328-325,2007.
 12. Hasebe T, Konishi M, Iwasaki M, Nakagohri T, Takahashi SI, Gotohda N, Kinoshita T, Ochiai A. Primary tumor/-vessel tumor/-nodal tumor classification of extrahepatic bile duct carcinoma. *Hum Pathol*. 39(1): 37-48, 2007.

II 分担研究報告書

1. 体内的における MMP/ADAM の作用機構および機能評価法の開発
岡田 保典
2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの発育進展機構の解明
坂元 亨宇
3. 消化管腫瘍の病理組織像に対する Wnt シグナルと TGF- β シグナルの作用
加藤 光保
4. がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化
平尾 敦
5. 発現解析によるがん間質相互作用における重要分子の同定
中西 幸浩
6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発
神奈木 玲児

体内的におけるMMP/ADAMの作用機構および機能評価法の開発

分担研究者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室・教授

我々の研究グループが先駆的に研究してきたMMP（matrix metalloproteinase）とADAM（a disintegrin and metalloproteinase）遺伝子ファミリー分子の生体内での作用機構を検討し、これらによる癌組織内微小環境因子代謝での役割解析とともに、ヒト肺癌の診断や治療効果判定を目指したアッセイ法の開発を試みた。MMP-13ノックアウト（KO）マウスを開発し、MMP-13が細胞外マトリックス代謝、血管新生、軟骨・骨代謝、細胞運動、筋線維芽細胞の分化などの作用を有し、線維芽細胞由来MMP-13は前立腺癌細胞の生着・増殖に必須であることを示した。ADAM28はP-selectin glycoprotein ligand-1(PSGL-1)と結合し、PSGL-1を発現する細胞の血管内皮細胞への接着能および血管外遊走能を促進した。また、ADAM28を測定できるアッセイ系を開発し、血清中でのADAM28蛋白濃度は健常者に比べて肺癌患者で有意に高値であることを明らかにした。

A.研究目的

細胞外マトリックス分解に主役を演じるMMP遺伝子ファミリーのうち、MT1-MMPやMMP-7は癌細胞自身で発現し、癌細胞の増殖・浸潤・転移に深く関わっていることが明らかとなってきた。一方、癌間質細胞に由来するMMPが組織内微小環境のモジュレーションにより癌細胞の増殖・浸潤・転移に関わる可能性が最近指摘されている。本研究課題では、MMP-13 KOマウスを用いて、癌細胞増殖・浸潤・転移における癌間質線維芽細胞由来MMP-13（コラゲナーゼ-3）の役割解析を計画した。そのためMMP-13 KOマウスを独自に開発し、成長に伴う表現型の解析とともに骨折や皮膚創傷後の治癒過程における作用を調べるとともに、マウス前立腺癌細胞株移植後の発育・増殖・浸潤におけるMMP-13の役割を解明する。一方、MMP近縁遺伝子ファミリーであるADAMに関しては、これまでの我々の研究からADAM28が肺癌と乳癌で癌細胞特異的に高発現し、肺癌ではリンパ節転移と相関することが明らかとなっている。本研究では、ADAM28の転移機構の解析とともに、肺癌患者血清中におけるADAM28濃度を定量できるELISA系を開発し、それにより肺癌の診断、進展・再発の予測、治療効果判定ができるかを検討する。

B.研究方法

MMP-13 KOマウスの表現型と傷害後治癒過程でのMMP-13の作用解析：MMP-13 遺伝子のメタロプロテアーゼドメインを含む exon 1-4をhomologous recombination法により欠失させたMMP-13 KOマウスを作製し、胎児期から生後12週までの発育状態を肉眼的および組織学的に検討した。中足骨、脛骨、大腿骨、上腕骨については、骨端での軟骨細胞層をmorphometryにより計測した。骨折モデル実験では、8週齢のMMP-13 KOおよび野生型マウスの脛骨中部を骨鋸により横断後、骨釘により固定した。術後10週までの経過をX線、CTおよび組織学的に観察し、石灰化率、骨密度、軟骨と骨基質の比率を定量的に解析した。また、II型およびX型コラーゲン、MMP-9、CD31、cathepsin K、TRAP染色を行った。さらに、軟骨細胞をアテロコラーゲン内で三次元培養し、軟骨ペレットの収縮と軟骨細胞外マトリックスの形成を調べ、軟骨ペレットに対する血管内皮細胞のsproutingをアッセイした。皮膚創傷治癒実験では、MMP-13 KOマウスと野生型マウス背部皮膚に径8 mmの全層性皮膚欠損を作製し、創傷治癒過程を肉眼的および組織学的に経時的に観察し、表皮細胞の増殖能をPCNA染色で検討した。表皮細胞の運動能をI型コラーゲン上でのin vitro wound healing assay法により検討した。また、創傷部肉芽組織における血管新生の程度と筋線

維芽細胞の出現をそれぞれCD31とα-smooth muscle actinの免疫染色により解析した。

MMP-13 KOマウスを用いた前立腺癌細胞株移植実験：MMP-13 KOマウスと野生型マウスの脛骨骨髓内へマウス前立腺癌細胞株（TRAMP-C1細胞株）を移植し、骨髓内での生着・増殖能を検討した。同様に、癌細胞株を皮下組織および脛骨骨膜周囲に移植し、これら癌細胞の生着率と増殖能を肉眼的および組織学的に解析した。

ADAM28のPSGL-1への結合と血管内皮細胞への接着実験：分泌型ADAM28のC末端ドメインをbaitにして酵母two-hybrid法により結合蛋白をスクリーニングし、結合能をbinding assay、免疫沈降、免疫染色法により検討した。PSGL-1遺伝子を発現する形質導入株と白血病細胞株（HL-60細胞）を用いてP-selectinおよび血管内皮細胞への接着実験を行った。また、LPS処理したマウスの尾静脈内へ、ADAM28とインキュベート処理・未処理のBCECF-AM標識HL-60細胞を注入し、肺毛細血管内に捕捉された細胞数を共焦点顕微鏡で計測した。

ADAM28のELISA系の開発とそれによる肺癌患者の血液検体での定量：ADAM28のメタロプロテアーゼドメインを認識する2種類の特異的モノクローナル抗体を作製し、一方をプレートに塗布し、他方をペリオキシダーゼ標識して、ADAM28蛋白を測定できるELISA系を開発した。本ELISA系の特異性検討のために、精製したMMP-1, 2, 3, 7, 9, 13およびADAM8, 9との交差反応を調べた。さらに、ヒト肺癌患者（n=90）および対照健康者（n=12）より血液を採取し、血清中のADAM28蛋白を定量した。

倫理面への配慮：ヒト肺癌患者および対照健康者の血液を用いたADAM28の解析にあたっては、患者および健康者本人のインフォームドコンセントを得た上で測定した。また、組み換えDNA分子の生細胞への導入、MMP-13遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いた実験は、遺伝子組み換え・動物実験に該当することから、これらの実験にあたっては法令を遵守し、安全対策と動物への苦痛排除など十分な注意を払って行っている。以上の実験は、慶應義塾大学倫理委員会と遺伝子組み換え実験安全委員会と動物実験委員会の承諾を得て行っている。

C.研究結果

1. 間質細胞由来MMP-13の組織内での機能解析

(i) MMP-13 KOマウスの表現型と傷害後治癒過程での作用解析：

我々が開発したMMP-13 KOマウスは、長管骨において一次性および二次性骨化の遅延を示した。野生型マウスに比べ、MMP-13 KOマウスにおいては、胎生16.5日から生後1日までの中足骨において一次性骨化の遅延を示した。生後2週では、中足骨や脛骨の骨端板過形成性軟骨層は野生型マウスと比較して約2倍延長していた。また、生後1～8週において、上腕骨の二次性骨化中心における血管侵入の減少とともに、骨化中心の形成遅延が認められた。MMP-13 KOマウスにおける骨の発育遅延は生後8週までにほぼ回復したが、生後10週以降の成熟マウスにおいては、破骨細胞の形成と機能障害により全身骨において骨硬化を認めた。骨折治癒モデルでは、骨折後2～4週において、MMP-13 KOマウスは骨折部に形成された仮骨内軟骨の吸収遅延と血管侵入の減少を示した。軟骨細胞をアテロコラーゲンゲル中で三次元培養すると、MMP-13 KOマウス軟骨細胞ではペレットの収縮低下と軟骨細胞外マトリックスの合成低下が認められた。軟骨細胞ペレットと血管内皮細胞との共培養系では、MMP-13 KOマウス軟骨細胞ペレットに対する内皮細胞のsproutingは有意に低下していた。皮膚創傷治癒実験では、MMP-13 KOマウスにおいて表皮細胞の上皮化に明らかな遅延がみられたが、表皮細胞増殖能には変化が認められなかった。一方、表皮細胞を用いたin vitro wound healing assayでは、細胞運動にMMP-13活性が必要であることが証明された。また、MMP-13 KOマウスでは、肉芽組織形成期での血管新生は低下しており、筋線維芽細胞の形成能も低下していた。

(ii) MMP-13 KOマウスへのマウス前立腺癌細胞株移植実験：

MMP-13 KOと野生型マウスを用いて、マウス前立腺癌細胞株（TRAMP-C1細胞株）を脛骨骨髓内、皮下組織、脛骨骨膜周囲へ移植し、癌細胞の生着・増殖能を移植後12週まで検討した。その結果、脛骨骨髓内ではいずれのマウス群においても癌細胞は生着しなかったが、皮下組織や脛骨骨膜周囲で

の生着率は、MMP-13 KOマウスでは30%以下であるのに対し、野生型マウスでは80%以上に認められた。現在、増殖・浸潤能の違いとそれらのメカニズムについて詳細に解析中である。

2. ADAM28の癌組織内での作用と血清中での測定法開発

(i) ADAM28のPSGL-1への結合による血管内皮接着促進作用：

酵母two-hybrid法により、ADAM28の結合候補分子としてPSGL-1を見出し、binding assay、免疫沈降法、免疫染色法によりADAM28がPSGL-1と結合することを明らかにした。また、PSGL-1遺伝子導入株とnative PSGL-1を発現する白血病細胞株（HL-60細胞）のP-selectinあるいは血管内皮細胞への接着能は、ADAM28蛋白存在下で特異的に亢進し、ADAM28はPSGL-1/P-selectin結合を促進することが明らかとなった。さらに、マウス尾静脈中への標識HL-60細胞注入実験において、ADAM28蛋白処理により肺毛細血管内皮細胞への接着能および肺腔内への浸潤能の特異的亢進を認めた。これらのデータから、ADAM28はPSGL-1との結合を介して、P-selectin発現血管内皮細胞への接着・浸潤促進作用を有すると考えられた。

(ii) ADAM28蛋白測定系の開発とヒト肺癌患者血清中での測定：

メタロプロテアーゼドメインを認識する2種類のモノクローナル抗体を組み合わせ、ADAM28蛋白を認識するELISA系を作製した。本アッセイ系の検出限界は1 ng/mlであり、MMP-1, 2, 3, 7, 9, 13やADAM8, 9とは交差反応しないことを確認した。ADAM28濃度は、対照健常者の血清中では平均値で1.3 ng/mlであるのに対し、肺癌患者血清では7.8 ng/ml、肺癌再発例では13.0 ng/mlといずれも有意に高値を示した。現在、症例数を増やし、血清中での濃度と肺癌の病期、転移の有無、腫瘍径、などの臨床病理学的因子との相関を検討中である。

D. 考察

MMP-13（コラゲナーゼ3）はMMP遺伝子ファミリーの中でコラゲナーゼ群に分類され、MMP-1（間質性コラゲナーゼ）、MMP-8（好

中球コラゲナーゼ）と並んで線維性コラーゲン分解酵素と考えられてきた。しかし、MMP-13はゼラチンやIV型コラーゲン分解活性が強く、他の非細胞外マトリックス成分の分解能を有し、コラゲナーゼ群のMMP分子の中でも特異な存在である。MMP-13 KOマウスの表現型からみて、本酵素は生理的な発育状態においては、骨端板での軟骨細胞の細胞外マトリックス代謝、血管新生、骨代謝に重要な役割を担っていることは明らかである。また、骨折や皮膚創傷の治癒過程において、血管新生、細胞運動、筋線維芽細胞への分化、などに作用していることが示された。MMP-13はヒト乳癌細胞からクローニングされた分子であり、癌細胞でしばしば発現されるが、病的状態では線維芽細胞、血管内皮細胞、骨膜細胞などでも高発現する。また、ヒト前立腺癌組織における我々の免疫染色学的検討では、癌細胞とともに間質の線維芽細胞に発現を認めている。したがって、MMP-13 KOマウスへの癌細胞の移植実験では、癌細胞巢に侵入した線維芽細胞由来MMP-13の機能解析が容易である。実際、これまでのデータでは、MMP-13 KOマウスでは前立腺癌細胞株の生着率が野生型マウスに比較して有意に低率であることから、MMP-13は組織内微小環境因子代謝を通して癌細胞の生着や増殖に必須の役割を担う可能性が考えられる。MMP-13は線維性コラーゲンや基底膜コラーゲンに加えて、種々のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子、膜蛋白などの代謝にも関わっており、今後のそのメカニズムの検討が重要である。

ADAM28はヒト肺癌と乳癌で癌細胞特異的に高発現し、その発現レベルは癌細胞の増殖能とリンパ節転移の有無と相関することを報告してきた。乳癌では、癌細胞由来のADAM28がinsulin-like growth factor binding protein-3（IGFBP-3）を分解し、IGFBP-3との複合体形成でブロックされていたIGF-Iの増殖因子活性が賦活化され、癌細胞の増殖促進が生じることを報告してきた。一方、転移との関係についてはこれまで全く不明であった。本研究におけるADAM28のPSGL-1との結合と白血病細胞株の血管内皮細胞への接着促進作用は、ADAM28の転移との関係を考える上で興味深い。一部の癌細胞はPSGL-1を発現することが最近報

告されており、ADAM28によるPSGL-1/P-selectinを介した接着促進作用は、PSGL-1発現腫瘍細胞の組織内への浸潤・転移に関わる新しい制御機構の存在を示唆しており、今後、種々の腫瘍組織において両分子の発現を検討していく予定である。一方、ヒト肺癌や乳癌においては、ADAM28は癌細胞特異的に発現することから、これら癌の診断や経過および治療効果判定をモニターするマーカー蛋白として使える可能性が考えられる。実際、我々はADAM28のメタロプロテアーゼドメインを認識するモノクローナル抗体を用いてADAM28蛋白を特異的に検出するELISA系を開発し、肺癌患者血清中での濃度が対照の健常者血清より有意に高値であり、再発症例では更に高値であることを示した。今後症例を増やして有用性を検証したい。

E. 結論

MMP-13 KOマウスを用いた実験から、MMP-13はマウスの発育や組織傷害後の治癒過程において、軟骨細胞外マトリックスの代謝、血管新生、骨代謝、細胞運動、筋線維芽細胞への分化に関わり、移植癌細胞の生着・増殖に必須の役割を果たす可能性が示された。また、ADAM28はPSGL-1との結合により腫瘍細胞の血管外への浸潤・転移に関わる可能性が示され、血中でのADAM28のモニターを可能にするアッセイ系を開発した。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaishi H., Kimura T., Dalal S., Okada Y. and D'Armiento J.: Joint diseases and matrix metalloproteinases: A role for MMP-13. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 9:47-54, 2008.

Okada Y.: Modulation of the microenvironment and adhesion of cancer cells by ADAMs (a disintegrin and metalloproteinases). *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 91:29-38, 2007.

Mochizuki S. and Okada Y.: ADAMs in cancer cell proliferation and progression. *Cancer Sci.* 98:621-628, 2007.

Taniwaki K., Fukamachi H., Komori K., Ohtake Y., Nonaka T., Sakamoto T., Shiomi T., Okada Y., Itoh T., Itoharu S., Seiki M. and Yana I.: Stroma-derived matrix metalloproteinase (MMP)-2 promotes membrane type 1-MMP-dependent tumor growth in mice. *Cancer Res.* 67:4311-4319, 2007.

Shimoda M., Hashimoto G., Mochizuki S., Ikeda E., Nagai N., Ishida S. and Okada Y.: Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 282: 25864-25874, 2007.

Kosaki N., Takaishi H., Kamekura S., Kimura T., Okada Y., Minqi L., Amizuka N., Chung U., Nakamura K., Kawaguchi H., Toyama Y. and D'Armiento J.: Impaired bone fracture healing in matrix metalloproteinase 13 (MMP-13) deficient mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 354:846-851, 2007.

Horiuchi K., Kimura T., Miyamoto T., Takaishi H., Okada Y., Toyama Y. and Blobel C.P.: TNF α -converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock. *J. Immunol.* 179: 2686-2689, 2007.

2. 学会発表

第95回日本病理学会 (2006年5月、東京)
下田将之、橋本学爾、望月早月、池田栄二、永井紀博、石田晋、岡田保典: ADAM28による血管内皮細胞への炎症細胞接着促進作用。日本病理学会誌 95:242, 2006.

Shimoda M., Hashimoto G., Mochizuki S., Ikeda E., Nagai N., Ishida S. and Okada Y.: Role of ADAM28 in tumor cell adhesion to endothelial cells and transendothelial migration through interaction with P-selectin glycoprotein ligand-1. The 11th International Congress of Metastasis Research Society jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association, Abstract p98, 2006.

下田将之、橋本学爾、望月早月、池田栄二、永井紀博、石田晋、岡田保典: ADAM28はPSGL-1発現腫瘍細胞の血管内皮細胞への接着と組織内浸潤を促進する。第65回日本癌学会学術総会記事 p86, 2006.

下田将之、橋本学爾、望月早月、池田栄二、

岡田保典：炎症細胞-血管内皮細胞接着におけるADAM28の役割（シンポジウム）。第39回日本結合組織学会学術大会・第54回マトリックス研究会大会合同学術集会プログラム・抄録集 p65, 2007.

病理材料・in vivoモデルを用いたがんの発育進展機構の解明

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室・教授

研究要旨：卵巣がん・皮膚基底細胞がん・肺腺がん・肝細胞がん・膵管がん・大腸がんを主な対象として、特有な組織型・組織像、多段階発がん過程、特有の浸潤転移過程を規定する分子機構の解明をめざす。以上の病理病態を示す実際の病理組織材料を用いた遺伝子・蛋白の発現解析を行うと共に、それらの病理像を忠実に反映する免疫不全マウス移植モデルの作成と、同モデルを用いたin vivoでの機能解析を行う。これまでに、G蛋白共役型受容体GPR49が皮膚基底細胞がん過剰発現し、SHhシグナル伝達系の下流で発現が制御されていること、基底細胞がんの増殖、さらにはがん化に関与していることを明らかにした。さらに膵がん細胞株の一部でも過剰発現を認め、その発現抑制により、極性の喪失が誘導される可能性を示した。マウス卵巣高転移モデルを樹立し、卵巣好性に転移する性格にE-cadherin発現の消失が関与している可能性を示した。今後、同定された分子のがん個別化診断・分子標的治療への応用をめざす。

A.研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な発育進展様式を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。本研究では、病理組織ならびにin vivoモデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにすることを目的とする。そして、同定された分子の悪性度診断、予後予測への有用性を検討すると共に、病態特異的治療標的分子としての可能性を検討する。以上の成果をもとに、新規の個別化診断法・分子標的治療法の確立をめざす。

B.研究方法

卵巣がん・皮膚基底細胞がん・肺腺がん・肝細胞がん・膵管がん・大腸がんを主な対象として、以下の3つのアプローチを統合的に行う。

(1)病理材料に発現する遺伝子・蛋白の網羅的解析。

(2)病理像を忠実に反映するヒトがんの増殖転移モデル開発と、それを用いた発現解析ならびに機能解析

(3)臨床材料・in vivoモデルでの診断・治療への有用性検証。

(1)の遺伝子・蛋白発現解析には、DNAマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析・LC-MSによるプロテオーム解析を行うが、得られた遺

伝子・分子群は、in situ hybridization、免疫組織化学による組織での発現の局在、病理像との対応を詳細に検討し病態との関連を絞り込む。

(2)では、免疫不全マウスを用いたがん細胞ないしがん組織の同所移植による増殖転移モデルにつき、既に樹立した系を含めて解析を行う。モデルの腫瘍組織を用いて(1)と同様に網羅的発現解析を行う。また(1)で同定された分子を導入あるいはknock-downし、in vitroとin vivoでの機能解析を行うことで、分子の病態への直接的関与を明らかにする。このモデルを用いた転移の抑制などの治療実験は、前臨床試験として有用であるのみならず、分子の病態への関与をより明らかにすることが期待される。以上の解析で同定された分子群について病態の解明と診断・治療への応用の検討を行うために、(3)臨床材料・in vivoモデルにおける診断・治療への有用性の検証を行い、実際の臨床応用を目指す。治療への応用としては、遺伝子操作以外に、特異的阻害剤、抗体などの利用につき検討する。

(倫理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析ならびにがん組織の移植による機能解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同

による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号15-57-2, 15-59, 16-34, 16-90）。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C. 研究結果

1) 新規がん・幹細胞関連遺伝子 GPR49/LGR5 のがんにおける発現と機能解析

DNAマイクロアレイデータベースならびに当院の症例を用いたアレイ解析にて、基底細胞がん有意に発現が認められる新規遺伝子である G-protein-coupled receptor 49 (GPR49/LGR5) を同定し、定量的PCRにて有意に高発現していることを確認した。各検体における GPR49 の発現量は Gli 1 の発現量と高い相関性を示した。in situ hybridization 法により GPR49 が腫瘍細胞内に特異的に発現していることを確認した。マウス基底細胞がん細胞株 ASZ001 を用いて、細胞株に Hedgehog signaling pathway を抑制する化学物質である cyclopamine を投与することにより、Gpr49 の発現の低下を認め、一方、Gli 1 発現ベクターの導入あるいは hedgehog の agonist である purmorphamine を添加する事により、GPR49 の発現量の増加を認めた。ASZ001 に対して GPR49 に対する RNA interference を施行し、GPR49 の発現低下とともに細胞増殖が低下することを確認した。逆に、HaCaT 細胞に対して GPR49 の発現ベクターを導入した細胞は、有意に細胞増殖が亢進すること、免疫不全マウスへの移植により有棘細胞がん様の病理像を呈する腫瘍を形成することを示した。

また、膵がんにおいても、その腫瘍発生に Hedgehog signaling pathway の関与が報告され注目されていることから、膵がん細胞株 9 種類における発現を検討した。その結果、3 種類の株にて、GPR49 の高発現を認め、Gli 発現との相関を認めた。未だ解析の途中ではあるが、少なくとも一部の細胞株では、基底細胞がんと同様に、GPR49 の発現抑制

により増殖能の低下を認めた。また、GPR49 の発現抑制に伴い上皮様の極性の消失が見られることを、位相差蛍光像の観察から明らかにした。

2) 卵巣転移機構の解析

10 種類のがん細胞株を、腹腔内投与・静注・皮下注により NOD/SCID マウスに移植し卵巣への転移能を調べたところ、静注により高率に卵巣に転移する細胞株 2 種類が得られた。また腹腔内投与による移植においては、4 種類について明らかな卵巣転移の所見が認められたが、3 種類では、肝転移や腹膜播種、卵巣への直接浸潤は認めたものの明らかな卵巣転移はなく、細胞株により卵巣への転移能に特異性のあることが示唆された。卵巣への転移が認められた細胞株について、卵巣転移を認めなかった株と比較し、特異的に発現する、ないしは発現が消失する分子（接着分子、receptor、cytokine など）を検索したところ、前者ではいずれも E-cadherin の発現が消失もしくは遺伝子に一部欠失のあることが明らかになった。In vivo での造腫瘍性が乏しい Krukenberg 腫瘍細胞株においても、E-cadherin が発現していないことが western blot により確認された。そこで卵巣高転移株 1 種類について、E-cadherin の強制発現を行い、in vivo での卵巣転移能の変化を調べた。E-cadherin 導入 clone 3 株、MOCK 4 株を静注により NOD/SCID マウスに移植したところ、MOCK ではいずれも高率に卵巣転移を認めたが、E-cadherin 導入 clone においては卵巣転移を全く認めなかった。なお、肺など他臓器への転移性は、E-cadherin 導入 clone をふくめいずれの株でも維持されていた。

D. 考察

1) 新規がん・幹細胞関連遺伝子 GPR49/LGR5 のがんにおける発現と機能解析

基底細胞がんでの結果より、GPR49 は Sonic Hedgehog signaling pathway の標的遺伝子として発現し、癌遺伝子としての機能を有する可能性が示唆された。本遺伝子は膜蛋白質をコードすることから、治療標的としても興味深いと考えられる。今後 GPR49 を皮膚特異的に過剰発現した transgenic mouse を作成し、皮膚の易腫瘍形成性の有無を検

討する予定である。一方、本遺伝子は、成体における組織幹細胞の特異的マーカーとなることも報告されており、治療標的としてのみならず、腫瘍発生と幹細胞との関連を考える上でも興味深いと考えられる。膵がん細胞株にて見出された極性維持への関与を示唆する知見は、本遺伝子の幹細胞での機能を考える上でも興味深い。今後膵がんを含む複数のがんでの機能解析を進めると共に、タンパクの解析を可能とする抗体作成を重点的に行う。

2) 卵巣転移機構の解析

転移性卵巣腫瘍は卵巣腫瘍全体の約15%を占め、原発部位は消化管が多い。特に胃がんからの転移が7割を占めるが、胃粘膜がんなど原発巣が初期の場合でも卵巣転移の報告があり、卵巣に特異的に転移する機序の存在が示唆される。また、Krukenberg腫瘍では卵巣間質のsarcomatoid proliferationが認められ、腫瘍細胞と卵巣間質細胞との相互作用が存在する可能性がある。本研究は、卵巣への転移機序の解明及び腫瘍細胞と卵巣間質細胞との相互作用の解明を目的とし、がん治療戦略の一助となることを目指している。今回の結果は、E-cadherinの発現低下が、卵巣好転移に関与している可能性を示している。また頻度は少ないが、卵巣転移が系静脈性に成立することを示した。また、卵巣転移巣では、間質の増生を認めたことから、間質反応の誘導が転移形成に関与している可能性も示唆される。今後臨床例との対比も含め、E-cadherinがどのように卵巣転移性を制御しているのか解明を目指す。

E. 結論

病理組織ならびにin vivoモデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な病理像の背景の分子基盤を明らかにし、病態の解明に加えて、臨床応用可能な新しい診断・治療法を開発することを目的に研究を行った。皮膚基底細胞がんを対象としたSHh系の標的分子同定と機能解析、卵巣特異的転移機構の解明については、順調に成果が出ており、今後は特にGPR49の発現解析、機能解析を一層推進する。

F. 健康危険情報
該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Iwasaki Y, Ueda M, Yamada T, Kondo A, Seno M, Tanizawa K, Kuroda S, Sakamoto M, Kitajima M: Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. *Cancer Gene Therapy* 14: 74-81, 2007.
- 2) Haga K, Ohno S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Fujita M, Sakamoto M, Galloway DA, Kiyono T: Efficient immortalization of primary human cells by p16INK4a-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Sci* 98: 147-154, 2007.
- 3) Higashiguchi A, Yamada T, Susumu N, Mori T, Suzuki A, Aoki D, Sakamoto M: Specific Expression of Hepatocyte Nuclear Factor-1 β in the Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and its Application to Cytological Diagnosis. *Cancer Sci* 98: 387-391, 2007.
- 4) Loukopoulos P, Shibata T, Katoh H, Kokubu A, Sakamoto M, Yamazaki K, Kosuge T, Kanai Y, Hosoda F, Imoto I, Ohki M, Inazawa J, Hirohashi S: Genome-wide array-based comparative genomic hybridization analysis of pancreatic adenocarcinoma: Identification of genetic indicators that predict patient outcome. *Cancer Sci* 98: 392-400, 2007.
- 5) Hayashi M, Kondoh K, Nakata Y, Kinoshita A, Mori T, Takahashi T, Sakamoto M, Yamada T: Establishment of a novel childhood acute myeloid leukemia cell line, KOPM-88, containing partial tandem duplication of the MLL gene and an in vivo model for childhood acute myeloid leukemia using NOD/SCID mice. *Br J Haematol* 137: 221-232, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし。

消化管腫瘍の病理組織像に対するWntシグナルとTGF- β シグナルの作用
分担研究者 加藤 光保 筑波大学大学院人間総合科学研究科実験病理学研究室・教授

TGF- β シグナルが腫瘍の形態像に及ぼす作用を明らかにすることを目的として、消化管粘膜上皮にTGF- β 1やTGF- β の標的遺伝子として注目した $ephrin-A1$ を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらと消化管腺腫を多発する $Apc^{min/+}$ マウスを交配してTGF- β 1または $ephrin-A1$ を過剰発現する消化管腫瘍の組織像を解析した。 Apc 遺伝子の単独変異をもつマウスと比較して Apc 遺伝子の変異と $ephrin-A1$ の過剰発現の両者をもつ複合変異マウスでは、腫瘍の組織構造に2次元切片上明らかな変化は見られなかったが、浸潤を示す腫瘍をもつマウスの数は、大腸で0/20(0%)から6/20(30%)、消化管全体では5/20(25%)から15/20(75%)へと優位に増加した。以上より、 $ephrin-A1$ の発現亢進は腫瘍組織の脱分化を伴わずに浸潤能を亢進させることが明らかになった。

A.研究目的

ヒトとマウスで共通に見られる Apc 遺伝子の欠失による消化管腺腫の発生を元に、TGF- β シグナルやその標的遺伝子の発現変化が腫瘍組織の形態変化に及ぼす作用を明らかにし、腫瘍組織の進展時における形態変化の分子機序を明らかにする。

B.研究方法

消化管粘膜上皮に活性化変異を加えたTGF- β 1やTGF- β の標的遺伝子として注目した $ephrin-A1$ を過剰発現するトランスジェニックマウスを作製し、これらと Apc 遺伝子に機能喪失型変異をもち消化管腺腫を多発する $Apc^{min/+}$ マウスを交配してTGF- β 1または $ephrin-A1$ を過剰発現する消化管腫瘍の形態学的特徴を病理組織学ならびに免疫組織化学的に解析する。

C.研究結果

Apc 遺伝子の単独変異をもつマウスと比較して Apc 遺伝子の変異と $ephrin-A1$ の過剰発現の両者をもつ複合変異マウスでは、消化管に発生する腫瘍の総数には優位な変化がみられなかったが、大腸に発生する腫瘍の数は、3倍程度に増加した。さらに腺腫の組織構造に2次元切片上明らかな変化は見られなかったが、大腸に浸潤を伴う腫瘍をもつマウスの数は0/20(0%)から6/20(30%)、消化管全体では5/20(25%)から15/20(75%)へと増加し、1個体あたりの浸潤を伴う腫瘍の

数も、大腸で0から0.5、消化管全体で0.25から1.45へと優位に増加した。

D.考察

腫瘍の進展には、種々の癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異の蓄積が関与することが示唆されているが、変異の蓄積と病理組織像や浸潤能・転移能の獲得との関連については不明な点が多い。TGF- β シグナルの異常は腫瘍組織の分化度の低下と浸潤能・転移能の獲得をもたらすことが種々のモデル実験から明らかにされているが、その標的遺伝子のひとつである $ephrin-A1$ の発現亢進は腫瘍組織構造の脱分化を伴わずに浸潤能を亢進させることが明らかになった。また、本研究の過程で正常の内分泌上皮細胞に内因性の $ephrin-A1$ が強く発現していることが明らかとなり、内分泌上皮の性格をもつ腫瘍の悪性度が一般に高いことが一般に知られているが、このことに $ephrin-A1$ の発現が関与している可能性が示唆された。

E.結論

$ephrin-A1$ の発現は、腫瘍組織の脱分化を伴わずに $Apc^{min/+}$ マウスの消化管腫瘍の浸潤能を亢進させる。

F.健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

論文発表

Shi L, Itoh F, Itoh S, Takahashi S, Yamamoto M and Kato M. Ephrin-A1 promotes the malignant progression of intestinal tumors in *Apc^{min/+}* mice. *Oncogene in press*.

学会発表

時亮、加藤光保：癌の浸潤・転移に関与しているTGF-βシグナルの標的遺伝子の同定。
第96回日本病理学会総会（大阪）

Liang Shi and Mitsuyasu Kato. Ephrin-A1 promotes the malignant progression of intestinal tumors in *APC^{min/+}* mice. 第24回日本疾患モデル学会総会（つくば）

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

がん組織の階層構造の解明と起源細胞の可視化

分担研究者 平尾 敦 金沢大学がん研究所がん幹細胞研究センター
遺伝子・染色体構築研究分野・教授

癌幹細胞の動態を病理的な観点からアプローチする目的で、幹細胞標識システムの開発を行った。同時に固形腫瘍のモデルの構築に取り組み、多形性膠芽腫モデルの確立に成功した。これらの成果により、癌幹細胞の性状を理解するための技術基盤を構築できた。

A.研究目的

生体内における癌幹細胞の動態を病理的な観点から理解することを目的とし、将来の新しい癌の診断・治療法の開発を目指す。本年度の目標として、幹細胞標識システムの開発と固形腫瘍のモデルの構築に取り組んだ。

B.研究方法

1) 幹細胞標識システムの開発

核小体蛋白NucleosteminプロモーターによってGFPが発現する幹細胞標識レポーターシステム(NS-GFP)をもつトランスジェニックマウスの神経組織における解析を行った。胎生14.5日のマウス脳組織を用い、GFPの輝度と神経分化マーカーとの相関、ニューロスフィア形成能を定量した。

2) 多形性膠芽腫モデルの作成

p16INK4a/p19Arf欠損マウス由来の神経幹細胞を分離し、ニューロスフェア培養法により増殖させた後、活性型K-ras遺伝子を導入した。遺伝子導入された神経幹細胞を大脳基底核に注入した。

C.研究結果

1) 胎生14.5日のNS-GFPトランスジェニックマウス脳組織におけるGFPの発現を観察したところ、脳室層に強い発現が認められた。一方、ニューロン細胞マーカーTuJ1陽性細胞では、GFPの輝度が低下していた。GFPの輝度の高い細胞集団には、ニューロスフィア形成能の高い集団が濃縮されていた。

2) K-rasを導入した神経幹細胞を移植すると、脳腫瘍が発生し全例死亡した。腫瘍は、多形性を示し、壊死巣とその周囲に堤防状に腫瘍細胞が配列するpseudopalisade、血管増殖、巨

細胞などを認めた。部分的に、ニューロンマーカーTuJ1、グリアマーカーGFAPが陽性であった。

D.考察

NS-GFPシステムは、胎児期の神経系においても生体内での幹細胞マーキングに有用であった。今後、成体組織での評価あるいは、他の組織での有用性について検討が必要である。また、多形性膠芽腫モデルは、ヒトの腫瘍と同様の病理学的所見を示し、モデルとして有用であると考えられた。

E.結論

幹細胞標識システムおよび脳腫瘍モデルの構築により、癌幹細胞の性状を理解する上での基盤の構築ができた。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takubo K, Ohmura M, Azuma M, Nagamatsu G, Yamada W, Arai F, Hirao A, Suda T. Stem cell defects in ATM-deficient undifferentiated spermatogonia through DNA damage-induced cell cycle arrest. *Cell Stem Cell*, 2:170-182, 2008

Miyamoto K, Araki YK, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, and Hirao A. Foxo3a is essential for maintenance of the hematopoietic stem cell pool. *Cell Stem Cell*, 1, 101-112, 2007

Ohtani N, Imamura Y, Yamakoshi K, Hirota F, Nakayama R, Kubo Y, Ishimaru N, Takahashi A, Hirao A, Shimizu T, Mann DJ, Saya H, Hayashi Y, Arase S, Matsumoto M, Kazuki N, Hara E. Visualizing the dynamics of p21Waf1/Cip1 cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. Proc Natl Acad Sci U S A. 104:15034-9, 2007

Iwanaga A, Sato T, Sugihara K, Hirao A, Takakura N, Okamoto H, Asano M, Yoshioka K. Neural-specific ablation of the scaffold protein JSAP1 in mice causes neonatal death. Neurosci Lett. 429:43-8, 2007.

2. 学会発表

大村昌子、仲 一仁、木下雅史、玉 瀬玲、新井文用、永松 剛、田久保圭誉、照田展大、須田年生、平尾 敦 第5回 幹細胞シンポジウム、Nucleosteminの発現による組織幹細胞の可視化と同定、平成19年5月17-19日、兵庫

仲 一仁、大村昌子、野口亜希、石原正彦、宮地宏昌、須田年生、平尾 敦、第66回日本癌学会、Nucleostemin プロモーターGFPトランスジェニックマウスによる造血幹細胞標識システムの樹立、平成19年10月3-5日、横浜

平尾 敦 第66回日本癌学会学術総会 Stemness genes in cancer.平成19年10月3日、横浜

平尾 敦、第69回日本血液学会総会 造血幹細胞の自己複製と老化 平成19年10月7日、横浜

平尾 敦、第10回日本組織工学会 幹細胞制御における組織間共通性 平成19年11月8日、東京

Naka K, Ohmura M, Arai F, Suda T, Hirao A. The 5th International Society of Stem Cell Research, 2007. 6. 17-20, Cairns, Australia.

Naka K, Ohmura M, Suda T, Hirao A. The 49th American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition, 2007. 12. 8-11, Atlanta, USA.

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし