

200924040A (1/2)

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

幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成22(2010)年5月

(1/2冊)

## 目次

### I. 総括研究報告

- 幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究 ————— 1  
落谷 孝広

### II. 分担研究報告

1. 消化器癌幹細胞の研究に関する研究 ————— 6  
森 正樹
2. 幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究に関する研究 —— 10  
北村 俊雄
3. 幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究に関する研究 —— 17  
岡本 康司
4. がん幹細胞のエピゲノムプロファイリングに関する研究 ————— 19  
横山 明彦
5. 幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究 ————— 20  
金子 周一
6. 皮膚の間葉系幹細胞の性状解析に関する研究 ————— 26  
大河内 仁志
7. がん幹細胞のエピゲノムプロファイリングに関する研究 ————— 33  
畑田 出穂
1. 研究成果の刊行に関する一覧表 ————— 34
2. 研究成果の刊行物・別刷 ————— 42

幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究

研究代表者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所がん転移研究室・室長

研究要旨:本研究の目的はがんの治療抵抗性を説明しうるがん幹細胞の性状を明らかにし、新たながん治療の方法の開発を実現する事にある。初年度は、乳がん、大腸がん、肝細胞がんのがん幹細胞の生物学的特性の理解を、薬剤耐性を制御する分子であるRPN2、幹細胞表面マーカーであるCD13, CD90, EpCAM等の特徴的分子の発現やそれらの標的分子の解明などの観点から進めた。さらにリプログラミングによるがん細胞の悪性形質の変換の可能性を明らかにした。

研究分担者氏名・所属研究機関名及

び所属研究機関における職名

森 正樹・大阪大学大学院・教授

北村俊雄・東京大学医科学研究所・教授

岡本康司・国立がん研究センター・室長

横山明彦・国立がん研究センター・室長

金子周一・金沢大学医学部・教授

大河内仁志・国立国際医療センター・部長

畑田出穂・群馬大学・準教授

A. 研究目的

癌の発生・進展・転移・再発・治療抵抗性の全ての段階に於いて「がん幹細胞」が深く関わる。本研究の目的はがん幹細胞の生物学的特徴の解明や、がんで失った臓器を様々な幹細胞で再生する基盤技術を開発することで、幹細胞の制御をもとにした新た

ながん治療法の創出につなげる研究を推進する。そのためには、がん幹細胞の分子標的化をはじめ、がん幹細胞の分子及び細胞生物学的特徴の把握と応用を、消化器がん、乳がん、肺がん、白血病を中心に明らかにし、がん幹細胞を標的にした新規治療法を開発する。がん幹細胞を直接・間接に攻撃することにより現行のがん治療成績の向上に寄与することが期待できる。

B. 研究方法

森らの消化器癌幹細胞の発見(Stem Cell, 2006 他)から造血器腫瘍と消化器癌の癌幹細胞の異同が解明され、がん幹細胞の直接標的化とがんニッチを介する間接兵糧攻めの両側面からのアプローチが現実味を帯びつつある。消化器癌幹細胞研究では森らの研究グループが先鞭を切っており、既に肝臓癌・大腸癌において精度の高い癌幹細胞の同定と遺伝子解析に成功し、また同時に肝臓・食道・大腸における正常組織幹細胞マーカーの同定と遺伝子発現解析にも成功

しており、世界の研究をリードする独創性の高い研究である。落谷らは乳がんの薬剤耐性細胞で発現する新しい分子を同定しており (Nat Med, 2008)、がんステム細胞との関連を microRNA をツールとして解析する方法は新規性が高い研究である。また北村らの進める、SST-REX ではマウス細胞上にヒト骨髄由来間葉系幹細胞の膜蛋白質を一種類ずつ発現する SST クローンを直接マウスに免疫することによって簡便に良い抗体を作成できる独創的な研究である。横山らはヒト型 MLL 白血病及び同様の特性を示す MOZ 白血病モデルを独自に構築し、白血病幹細胞の特性を調べ、得られた知見に基づいた新規治療法の開発に取り組む点が独創的である。iPS 細胞の研究からもわかるようにがん幹細胞の特徴はエピゲノムにより裏打ちされており、畑田らの研究は、独自のエピゲノムプロファイリング法を用いてがん幹細胞のエピゲノムの特徴を探る画期的な研究である。また、間葉系幹細胞の生体調節機能は近年、世界中で大きな注目を浴びており、その抗線維化作用、肝臓機能回復効果、発がん抑制効果、組織修復作用、がん幹細胞との関連を検討することは臨床研究を進める上で極めて重要であり、独創性の高い研究である。

### C. 研究結果：

#### 1) RPN2を標的とした乳がん幹細胞の治療法の開発

薬剤耐性を制御する因子として発見したRPN2遺伝子は、乳がんや大腸がんのがん幹細胞で強く発現していることを新た

に見いだした。ヒト乳がんのCD44+CD24-がん幹細胞のRPN2の発現抑制は、in vitroでのコロニー形成能や浸潤能、およびin vivoでの腫瘍形成能やリンパ節転移を顕著に抑制し、がん幹細胞の性質を強く阻害した。

#### 2) 消化器がん幹細胞の同定と解析

大腸がんなどの消化器がん幹細胞を特徴づける表面抗原としてCD13, CD90を同定し、CD13+CD90-のがん幹細胞が薬剤耐性克服のための標的細胞であることをつきとめ、特に細胞周期G0期制御分子であるFBXW7の発現が予後と強く相関することを明らかにした。また大腸がんの手術検体から調整したがん幹細胞でその発現が低下し、肝転移と相関する複数のmicroRNAを同定した。

#### 3) 肝細胞がんのがん幹細胞の同定と解析

正常肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いることで肝細胞がんを幹細胞タイプと肝細胞タイプに分類する方法を確立、幹細胞タイプの肝細胞がんではEpCAM陽性細胞ががん幹細胞としての性質を有すること、Wntシグナルによって自己複製制御を受けていること、5-FU抵抗性であること、EpCAMの遺伝子発現抑制ががん幹細胞の性質を失わせることを見出した。

### D. 考察：

#### 1) 新規治療標的分子RPN2のがん幹細胞制御のメカニズム解析

RPN2をノックダウンすることでがん幹細胞の機能を阻害する戦略が可能である

ことが明らかとなった。RPN2分子は薬剤耐性制御においてはP-gpなどのABCトランスポーターのN型糖鎖修飾を制御することを解明したが、がん幹細胞において、他のどのような標的分子をいかなるメカニズムで制御しているのかをプロテオーム等の手法で網羅的かつ詳細に解析する。

## 2) 消化器がんのがん幹細胞の標的分子の機能解析

肝細胞がん、大腸がんにおけるがん幹細胞の生物学的特徴を説明しうる分子の更なる同定とメカニズム解析や、本年度の成果で明らかとなった分子

(FBXW7, EpCAM, microRNAsなど)の治療効果の検討を、細胞、動物個体で実施する。

## 3) リプログラミング (RP) による癌細胞の悪性形質の変換

がん細胞を iPS 技術で RP することにより iPC (induced pluripotent cancer) 細胞を誘導すると、がん細胞の生物学的な悪性度を打ち消すことが in vitro の研究で示唆された。この研究成果は iPS 技術を利用した RP によるがん幹細胞の新たな治療法の可能性を示すものである。

## E. 結論 :

平成 21 年度の研究成果としては、おもに各種のがんにおけるがん幹細胞の分子生物学的な性状をゲノム、エピゲノムなどの観点から解析することで、がん幹細胞の特異的分子マーカーと考えられる RPN2(乳がん、大腸がん)、CD13, CD90 (大腸がん)、EpCAM (肝細胞がん)などを明らかにした。

さらに iPS 技術によるリプログラミングが、がん細胞の悪性度を転換する可能性を示す事が出来た。

## 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。ヒトがん幹細胞の培養、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、すべて当該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精神に基づいて行われた。

## G. 研究発表 :

### 1. 論文発表

1. Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*, 14:529-538, 2009
2. Honma K, Takemasa I, Matoba R, Yamamoto Y, Takeshita F, Mori M, Monden M, Matsubara K, Ochiya T. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. *Int J Gen Med*, 2:243-257, 2009
3. Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi RU, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T. Systemic Delivery of Synthetic MicroRNA-16 Inhibits the Growth of Metastatic Prostate Tumors via Downregulation of Multiple

- Cell-cycle Genes. *Mol Ther.* 18: 181-187, 2010.
4. Yokobori, T. Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Onoyama, I., Fukagawa, T., Kuwano, H., Nakayama, K.-I. Mori, M. p53-altered *FBXW7* expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res.* 2009, 69:3788-3794.
5. Miyoshi N, Ishii H, Nagai K, Hoshino H, Mimori K, Tanaka K, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Defined factors induced reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107: 40-45, 2010.
6. Yamashita T., Ji J., Budhu A., Forgues M., Yang W., Wang HY., Jia H., Ye QH., Qin LX., Wauthier E., Reid LM., Minato H., Honda M., Kaneko S., Tang ZY., and Wang XW. EpCAM-Positive Hepatocellular Carcinoma Cells Are Tumor-Initiating Cells With Stem/Progenitor Cell Features. *Gastroenterology*, 136: 1012-1023, 2009.
7. Morita S, Hara A, Kojima I, Horii T, Kimura M, Kitamura T, Ochiya T, Nakanishi K, Matoba R, Matsubara K, Hatada I. Dicer is required for maintaining adult pancreas. *PLoS One.* 4(1): e4212, 2009.
8. Shibata F, Goto-Koshino Y, Morikawa Y, Komori T, Ito M, Fukuchi Y, Houchins JP, Tsang M, Li DY, Kitamura T, Nakajima H. *Stem Cells*, 27(1): 183-190, 2009
2. 学会発表  
(海外)
1. Ochiya T and Takeshita F. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009
2. Ochiya T and Takeshita F. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36<sup>TH</sup> ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen, Denmark. July 16-24, 2009
3. Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for cancer drug resistance. 9th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Brussels, Belgium. September 12-18, 2009
- (国内)
1. 「間葉系幹細胞肝細胞による再生医療」、落谷孝広、第10回日本肝臓医生物研究会(2009.4.18-19 金沢)
2. 「幹細胞由来肝細胞の定義づけに関する勉強会」、落谷孝広、The Okayama 2009 Joint Conference of CTS & JSOPMB 会議(2009.4.20-21 岡山)
3. 「small RNA の drug delivery system の開発」(先端技術シンポジウム)、落谷孝広、第82回日本内分泌学会・招待講演(2009.4.24 群馬)

4. 「ヒト間葉系幹細胞を用いた薬物の安全性・毒性試験」、落谷孝広、日本薬物動態学会 第 2 回ビジョンシンポジウム (2009. 6. 5-6 東京大学)
5. 「micro RNA as a Novel Modality for Cancer Therapy」、落谷孝広、第 2 回 DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo (2009. 7. 7-9 がんセンター研究所)
6. 「核酸デリバリーが拓く non-coding small RNA による疾患解明」、落谷孝広、遺伝子・デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム (2009. 7. 9-11 大阪)
7. 「microRNA によるがんの診断治療」、落谷孝広、第 1 回日本 RNAi 研究会 (2009. 8. 28-29 広島大学)
8. 「マイクロ RNA によるがんの診断と治療」、落谷孝広、第 68 回日本癌学会学術総会 (がんにおける microRNA 制御異常シンポジウム/講演) (2009. 10. 1-3 横浜)
9. 「RPN2 による糖鎖修飾を介した薬剤耐性、浸潤転移の制御機構」、落谷孝広、第 82 回日本生化学会学会 (/講演) (2009. 10. 21-25 神戸)
10. 「RNAi-based oligonucleotides therapy」、落谷孝広、Kashiwa Symposium on Cancer Biology 2009 (2009. 11. 13 がんセンター東病院)
11. 「microRNA による Cancer Stem Cell Therapy の可能性」、落谷孝広、第 32 回日本分子生物学会 (/講演) (2009. 12. 9-12 横浜)

特許出願中：  
 特願2008-521096 RPN2遺伝子抑制剤の用途  
 発明者 落谷孝広・加藤菊也・本間紀美  
 実用新案登録 なし  
 その他 なし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得 なし

消化器癌幹細胞の研究

研究分担者 森 正樹 大阪大学 消化器外科

**研究要旨**

治療抵抗性の消化器癌幹細胞を根絶することは癌治療成績の向上に直結することから、現行の癌医療に於ける最重要課題の1つとして内外の学際的な注目を集めている。本研究課題では治療後に細胞周期静止期に残存する細胞を網羅的に解析することにより、消化器癌の治療抵抗性クローンの性状を究明し、それを峻別できる表面抗原分子の同定と病態解明、治療への応用に向けて基盤を構築した。

**A. 研究目的**

消化器癌幹細胞に焦点を当てることにより現行の治療抵抗性を克服し治療成績を格段に向上させることを目指すのが目的であり意義である。その目的に沿って、

- 1) 治療抵抗性の消化器癌幹細胞を特徴付ける細胞表面抗原の網羅的解析
- 2) 同定した細胞表面抗原が関わる分子病態の解明
- 3) 治療への応用の基盤研究

**B. 研究方法**

- 1) 細胞表面抗原の網羅的解析

特殊なヘキスト染色により、side population (SP) と呼ばれる傍集団と非 SP との比較検討により細胞表面抗原の網羅的解析を実施。膜貫通型疎水性アミノ酸構造を持つと予測される分子を絞り込み、細胞周期、表面抗原間の相互関係を解明した。

- 2) 分子病態の解明

同定したアミノ酸・蛋白質から予測される機能に焦点を当てて細胞生物学的な手法を駆使して機能的な意義を解明、癌に於ける分子病態を究明した。

- 3) 治療への応用の基盤研究

同定した分子情報伝達経路を人為的に操作することで、治療応用のためにシーズを開発した。

(倫理面への配慮)

・遺伝子組換え実験を含む申請概要：「遺伝子組み換え生物等の使用等の規制による生物多様性の確保に関する法律（「バイオセーフティに関するカルタヘナ議定書」に基づくカルタヘナ法）」の定める細則と、

文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定

める細則、ならびに施設内の組み換え DNA

実験指針の基準に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従って DNA 組み換え実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行った。

・動物実験を含む申請概要：施設内の「動物実験等の実施に関する基本指針」の基準ならびに文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則に従って、定められた基準に適合することを確認し、指針に従って動物実験委員会等の倫理審査委員会の審査を経る手続きを適切に行った。

・ヒトゲノム・遺伝子解析研究は、「ヒトゲノム遺伝子解析研究に関する倫理指針」、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の定める細則に従って、倫理審査委員会の審査を経る手続きを行った。

・関係箇所では COI での審議に諮りその決定するところを遵守した。

**C. 研究結果**

- 1) 消化器がん幹細胞 (CSC) の同定と解析

消化器 CSC を特徴付ける表面抗原を同定した。その解析により、CSC は以下の2種類に分かれることが判明した：休眠型(d)CSC, 活性型(a)CSC。この2種類のうち dCSC が薬剤耐性克服のための標的である可能性が強く示唆された。

- 2) 分子病態の解明

dCSC : CD13+CD90—, 活性酸素 ROS 産生が低い。低酸素ニッチで抗癌剤に耐えて生存した。

aCSC : CD13—CD90+, 活性酸素 ROS 産生が低かった。抗癌剤に感受性であるが増殖が早く浸潤した。

特に、2つの CSC の形質転換を制御する分

子機構につき、細胞周期 G0 期制御に関わる FBXW7 を候補として重要性を明らかにした。

### 3) 治療応用

CD13 が関わる ROS のスカベンジャー経路は細胞内のチオール環境の制御を介して、癌細胞の抗癌剤耐性に関わることが明らかとなった。CD13 の阻害剤は動物実験で顕著な実験腫瘍の抑制効果が観察され、その詳細を検討している。

## D. 考察

dCSC を維持する機構の解明は今後の癌研究の動向として重要な課題であると考えられる。本研究ではその基盤となる内容として dCSC が低酸素ニッチの中に存在し、抗癌剤耐性であることを明らかにした。今後はその耐性機構の分子メカニズムを解明し、創薬を通じて癌克服に生かす。さらに次世代の段階として現行の抗癌剤放射線療法で残存する dCSC に特化して標的化できる新しい療法の確立を目指して基盤を整備できる。

## E. 結論

消化器癌の有効で安全な新しい治療法の開発に向けて、病態解明、治療への応用に向けて基盤を構築した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyoshi N., Ishii H., Nagai K., Hoshino H., Mimori K., Tanaka F., Nagano H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M. Defined factors induced reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 107:40-45, 2010
- 2) Adachi S, Takiguchi S, Okada K, Yamamoto K, Yamasaki M, Miyata H, Nakajima K, Fujiwara Y, Hosoda H, Kangawa K, Mori M., Doki Y. Effects of ghrelin administration after total gastrectomy. A prospective randomized placebo-controlled phase II study. *Gastroenterology*. in press
- 3) Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Hitora T., Tei M., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., TGM2 is a novel marker for prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* .in press
- 4) Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Takatsuno Y., Kim H., Hirose H., Sekimoto M., Doki Y.,

Mori M. Abnormal expression of TRIB3 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis.

*Br J Cancer* in press

5) Miyoshi N., Ishii H., Mimori K., Tanaka F., Hitora T., Tei M., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., TGM2 is a novel marker for prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* in press

6) Motoyama K, Inoue H, Takatsuno Y, Tanaka F, Mimori K, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Over- and under-expressed micro RNAs in human colorectal cancer. *Int J Oncol* 34:1069-1075, 2009

7) Kita Y, Fukagawa T, Mimori K, Kosaka Y, Ishikawa K, Aikou T, Natsugoe S, Sasako M, Mori M. Expression of uPAR mRNA in peripheral blood is a favourite marker for metastasis in gastric cancer cases.

*Br J Cancer* 13;100(1), 2009

8) Danno K, Ikeda M, Sekimoto M, Sugimoto T, Takemasa I, Yamamoto H, Doki Y, Monden M, Mori M. Diameter of splenic vein is a risk factor for portal or splenic vein thrombosis after laparoscopic splenectomy *Surgery* 145(5):457-64, 2009

9) Tanemura M, Saga A, Kawamoto K, Machida T, Deguchi T, Nishida T, Sawa Y, Doki Y, Mori M., Ito T. Adenovirus-mediated gene expression of the human c-FLIP(L) gene protects pig islets against human CD8(+) cytotoxic T lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Transplant Proc* 41(1):319-322, 2009

10) Mimori K, Iwatsuki M, Yokobori T, Mori M. Important matters to identify robust markers for metastasis and recurrence in solid cancer. *Ann Surg Oncol* 16(4):1070-1, 2009

11) Yokobori T, Mimori K, Iwatsuki M, Ishii H, Onoyama I, Fukagawa T, Kuwano H, Nakayama KI, Mori M. p53-altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases. *Cancer Res* 69(9):3788-3794, 2009

12) Ishii H, Haraguchi N, Ieta K, Mimori K, Mori M. Cancer stem cells: gastrointestinal cancers. *Stem Cells and Cancer, Human Press Eds* 155-163, 2009

13) Mimori K, Kataoka A, Yamaguchi H, Masuda N, Kosaka Y, Ishii H, Ohno S, Mori M. Preoperative u-PAR gene expression in bone marrow indicates the potential power of recurrence in breast cancer cases *Ann Surg Oncol* 16 2035-2041, 2009

14) Ieta K, Tanaka F, Yokobori T, Kita Y, Haraguchi N, Mimori K, Kato H, Asao T,

Inoue H, Kuwano H, Mori M. Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal cancer *Int J Cancer* 125 926-931, 2009

15) Iwatsuki M, Fukagawa T, Mimori K, Nakanishi H, Ito S, Yokobori T, Sasako M, Baba H, Mori M. Bone marrow and peripheral blood expression of ID/in human gastric carcinoma patients is a bona fide indicator of lymph node and peritoneal metastasis *Br J Cancer* 100 1937-1942, 2009

16) 岩槻政晃、三森功士、石井秀始、井上裕、馬場秀夫、森 正樹 癌幹細胞と新しい治療戦略 *日本臨床* 67(1):113-118, 2009

17) 原口直紹、森 正樹 大腸癌における癌幹細胞 *実験医学* 27(2):52-57, 2009

18) 星野宏光、石井秀始、原口直紹、永野浩昭、土岐祐一郎、森 正樹 癌幹細胞を標的とした治療法の開発 *Surgery Frontier* 16(1):21-26, 2009

19) 石井秀始、森 正樹 消化器系癌における癌幹細胞 *メディカルサイエンスダイジェスト* 35(9):14-17, 2009

20) 山本浩文、原口直紹、大熊誠尚、石井秀始、土岐祐一郎、森 正樹 消化器癌における癌幹細胞 *Biotherapy* 23(5):386-392, 2009

21) 永野浩昭、石井秀始、土岐祐一郎、森 正樹 癌幹細胞と薬剤耐性 *Cancer Frontier* 11 100-105, 2009

## 2. 学会発表

1) Akiyoshi S, Mimori K, Haraguchi N, Ohkuma M, Ishii H, Mori M.

Comprehensive analysis to identify the CD133 expression committed genes in colorectal cancer 62th Annual cancer symposium, 2009. 3.4-3.8(Phoenix)

2) Matsuzaki S, Tanaka F, Mimori K, Tahara K, Inoue H, Mori M.

Clinical significance of CDC28 binding protein regulatory subunit 2 expression in human gastric cancer 62th Annual cancer symposium, 2009. 3.4-3.8(Phoenix)

3) 永原 誠、高角康志、石丸神矢、石川健二、三森功士、田中文明、田原光一郎、井上 裕、杉原健一、森 正樹：大腸癌における間質細胞の重要性：microRNA array 解析を用いた検討

第 109 回 日本外科学会定期学術集会 2009.4.2 (福岡)

4) 原口直紹、大熊誠尚、三森功士、田中文明、水島恒和、竹政一伊知朗、池田正孝、山本浩文、関本貢嗣、土岐祐一郎、森 正樹：癌幹細胞概念から見た、固形癌の転移および治療抵抗性のメカニズムの解明

第 109 回 日本外科学会定期学術集会 2009.4.2 (福岡)

5) 太田大介、片岡明美、三森功士、大野真司、森 正樹：乳癌患者の骨髄中における miR21 の余後・再発予測因子としての意義 第 109 回 日本外科学会定期学術集会 2009.4.4 (福岡)

6) 原口直紹、石井秀始、竹政伊知朗、池田正孝、山本浩文、関本貢嗣、土岐祐一郎、森 正樹：Cancer stem cells in gastrointestinal system 第 27 回 日本ヒト細胞学会学術集会、2009.8.22-.8.23 (東京)

7) 森 正樹、三吉範克、原口直紹、石井秀始：癌幹細胞研究と治療への応用

第 29 回 日本分子腫瘍マーカー研究会、2009.9.30 (神戸)

8) 石井秀始、原口直紹、森 正樹：消化器癌幹細胞の制御：第 51 回 日本消化器病学会大会、2009.10.14-.10.17 (京都)

## G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

### 1. 特許取得

発明の名称：誘導多能性幹細胞の製造方法

発明者 1：森 正樹

発明者 2：石井 秀始

発明者 3：三吉 範克

発明者 4：土岐 祐一郎

発明者 5：種村 匡弘

発明者 6：星野 宏光

発明者 7：大村 仁昭

出願人：国立大学法人大阪大学：K20090215 (平成 21 年 10 月 20 日)

出願日：平成 22 年 2 月 18 日

出願番号：特願 2010-34008

発明の名称：癌幹細胞の機能的標識

発明者 1：森 正樹

発明者 2：原口 直紹

発明者 3：石井 秀始

出願人：国立大学法人大阪大学：

本学整理番号：K20090177 (平成 21 年 9

月 1 日)

申請中

発明の名称：未分化細胞の識別方法

発明者 1：森 正樹

発明者 2：石井 秀始

発明者 3：永井 健一

発明者 4：富丸 慶人

発明者 5：三吉 範克

発明者 6：星野 宏光

発明者 7：齋藤 俊行

発明者 8：北川 公恵

出願人：国立大学法人大阪大学

大阪大学整理番号(発明届出受付番号)：

K20090033

出願番号：特願 2 0 0 9 - 2 4 1 6 0 5

出願日：平成 21 年 10 月 20 日 (火曜日)

発明の名称：癌幹細胞の製造方法

発明者 1：森 正樹

発明者 2：永井 健一

発明者 3：富丸 慶人

発明者 4：三吉 範克

発明者 5：星野 宏光

発明者 6：石井 秀始

出願人：国立大学法人大阪大学

大阪大学整理番号(発明届出受付番号)：

K20080244

出願番号：特願 2 0 0 9 - 2 4 1 3 2 2

出願日：平成 21 年 10 月 20 日 (火曜日)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究

研究分担者 北村俊雄 東京大学医科学研究所 教授

研究要旨

間葉系幹細胞は骨、軟骨、筋肉、脂肪細胞への分化能を有する未熟な細胞であり、再生医療への応用が期待されている。本年度は、ヒト間葉系幹細胞でシグナルシーケンストラップを行い130クローン、31種の遺伝子を同定した。このうち膜蛋白質が11種類、分泌蛋白質が17種類であった。現在、間葉系細胞特異的な膜蛋白質に対するモノクローナル抗体を中心として抗体を作成中である。このことからがんが幹細胞に由来することが示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は間葉系幹細胞でシグナルシーケンストラップを行うことにより間葉系幹細胞が発現している膜蛋白質を網羅的に同定し、間葉系幹細胞に特異的に発現している膜蛋白質に対するモノクローナル抗体を作成し、間葉系幹細胞の精製・分離に役立てることである。また、間葉系幹細胞に対する抗体の中で、造血幹細胞、iPS、癌幹細胞など他の幹細胞も認識するものがないかも調べる。

B. 研究方法

研究分担者のグループが開発したレトロウイルスベクターを利用したシグナルシーケンストラップ法 SST-REX は効率良くかつ正確に膜蛋白質、分泌蛋白質を同定することを可能にした (Kojima and Kitamura, Nat Biotechnol, 1999)。SST-REX 法の原理は、恒常的活性型のトロンボポイエチンレセプターの細胞外部位およびシグナルシー

クエンスの部分に cDNA 断片を組み込み、cDNA 断片がシグナルシーケンスを有する時のみ融合蛋白質が細胞膜上に運ばれて細胞の自律増殖を誘導することである。ライブラリーはレトロウイルスベクター pMX で作成し、マウス IL-3 依存性細胞株 Ba/F3 に導入する。本実験法 SST-REX では、IL-3 非存在下で増殖してくるクローン (SST クローン) がほぼ 100%シグナルシーケンスを有する cDNA 断片を有しており、効率良くかつ正確に膜蛋白質および分泌蛋白質を同定することができる。また SST クローンは細胞表面上にトロンボポイエチンレセプターとの融合蛋白質を発現している。本研究では、ヒト間葉系幹細胞のライブラリーを作成して間葉系幹細胞由来の膜蛋白質および分泌蛋白質を SST-REX で同定する過程において、ヒト間葉系幹細胞由来の膜蛋白質および分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現するマウス細胞のカタログを得ることができる。これらの SST クローンを免疫する

ことによって特異的モノクローナル抗体を作成するのが本研究の戦略である。

＜倫理面への配慮＞ ヒト間葉系細胞は購入したものであり倫理面での問題はない。また、実験は今のところマウスの培養細胞で行っているだけであり倫理的な問題は発生しない。

#### C. 研究結果

間葉系幹細胞のライブラリーを作製してシグナルシーケンストラップを行った。

1回の実験で120の SST クローンを解析したところ、膜蛋白質11種、分泌蛋白質17種、ゴルジ蛋白質2種、その他(不明)1種、で計31種の遺伝子を同定した(表)。

#### D. 考察

シグナルシーケンストラップ法 SST-REX で効率良く間葉系幹細胞由来の膜蛋白質を同定できることが確認された。も

う少しスクリーニングを継続することによって、より多くの膜蛋白質を同定することが期待できる。また、分泌蛋白質でも興味深い分子が同定される可能性がある。来年度は取得した膜蛋白質のうち間葉系幹細胞に比較的特異的に発現していると考えられる分子を選び、SST クローンを Ba/F3 と同系の Balb/c マウスに免疫することによってモノクローナル抗体を樹立し、解析する。

#### E. 結論

研究分担者が開発したシグナルシーケンストラップ法 SST-REX を利用して間葉系幹細胞が発現している膜蛋白質11種類、分泌蛋白質17種類を同定した。

MSC	NM_000088	collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	35
MSC	NM_000089	collagen, type I, alpha 2 (COL1A2),	23
MSC	NM_001554	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61 (CYR61), mRNA.	7
MSC	NM_002178	insulin-like growth factor binding protein 6 (IGFBP6)	6
MSC	NM_021913	AXL receptor tyrosine kinase (AXL), transcript variant 1,	5
MSC	NM_000599	insulin-like growth factor binding protein 5 (IGFBP5), mRNA.	4
MSC	NM_001627	activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), mRNA.	4
MSC	NM_001728	basigin (Ok blood group) (BSG), transcript variant 1, mRNA.	3
MSC	NM_001784	CD97 molecule (CD97), transcript variant 2, mRNA.	3
MSC	NM_001901	connective tissue growth factor (CTGF), mRNA.	3
MSC	NM_007742	Mus musculus procollagen, type I, alpha 1 (Col1a1), mRNA.	2
MSC	BC050745	mRNA similar to NADH dehydrogenase 1 (cDNA clone IMAGE:3887778)	2
MSC	NM_000610	CD44 molecule (Indian blood group) (CD44), transcript variant 1, mRNA.	2
MSC	NM_000660	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease) (TGFB1), mRNA.	2
MSC	NM_001025160	CD97 molecule (CD97), transcript variant 3, mRNA.	2
MSC	NM_001497	UDP-Gal:betaGlcNAc beta 1,4- galactosyltransferase, polypeptide 1 (B4GALT1), mRNA.	2
MSC	NM_002826	quiescin Q6 (QSCN6),	1
MSC	NM_003714	stanniocalcin 2 (STC2), mRNA.	1
MSC	NM_004393	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1) (DAG1), mRNA.	1
MSC	NM_005545	immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat (ISLR), transcript variant 1, mRNA.	1
MSC	NM_005576	lysyl oxidase-like 1 (LOXL1), mRNA.	1
MSC	NM_006288	Thy-1 cell surface antigen (THY1), mRNA.	1
MSC	NM_015881	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis) (DKK3), transcript variant 1, mRNA.	1
MSC	NM_016548	golgi phosphoprotein 2 (GOLPH2), transcript variant 1,	1
MSC	NM_024809	chromosome 12 open reading frame 38 (C12orf38), mRNA.	1
MSC	NM_000393	collagen, type V, alpha 2 (COL5A2), mRNA.	1
MSC	NM_173981	Bos taurus aggrecan 1 (AGC1), mRNA.	1
MSC	NM_000501	elastin (supravalvular aortic stenosis, Williams-Beuren syndrome) (ELN), mRNA.	1
MSC	NM_001034852	SPARC related modular calcium binding 1 (SMOC1), transcript variant 1, mRNA.	1
MSC	NM_006039	mannose receptor, C type 2 (MRC2), mRNA.	1
MSC	NM_013227	aggrecan 1 (chondroitin sulfate proteoglycan 1, large aggregating proteoglycan, antigen identified by monoclonal antibody A0122) (AGC1), transcript variant 2, mRNA.	1

120

side population phenotype. Stem cells 27:183-190.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Shibata, F., Goto-Koshino, Y., Morikawa, Y., Komori, T., Ito, M., Fukuchi, Y., Hauchins, J.P., Tsang, M., Kitamura, T., and Nakajima, H. (2009) Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the

2. Islam, S.M., Shinmyo, Y., Okafuji, T., Su, Y., Naser, I.B., Ahmed, G., Zhang, S., Chen, S., Ohta, K., Kiyonari, H., Abe, T., Tanaka, S., Nishinakamura, R., Terashima, T., Kitamura, T., and Tanaka, H. (2009) Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures. Science 323:388-393.

3. Komeno, Y., Kitaura, J. and Kitamura, T. (2009) Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models. *J Cell. Physiol.* 529-534.
4. Kawashima, T., Bao, Y.C., Minoshima, Y., Nomura, Y., Hatori, T., Hori, T., Fukagawa, T., Takahashi, N., Nosaka, T., Inoue, M., Sato, T., Kukimoto-Niino, M., Shirouzu, M., Yokoyama, S., and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors. *Mol Cell Biol.*, 29:1796-1813.
5. Watanabe-Okochi, N., Oki, T., Komeno, Y., Kato, N., Yuji, K., Ono, R., Harada, Y., Harada, H., Hayashi, Y., Nakajima, H., Nosaka, T., Kitaura, J., and Kitamura, T. (2009) Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis. *Int J. Hematology* 89: 470-481.
6. Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T. and Kitamura, T. (2009) Activating and inhibitory signals from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcRg in mast cells. *J. Immunol.* 183:925-936.
7. Doki, N., Kawashima, T., Nomura, Y., Tsuchiya, A., Oneyama, C., Akagi, T., Nojima, Y. and Kitamura, T. (2009) A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is constitutively phosphorylated on serine 387 in the v-Src-transformed NIH3T3 cells. *Cancer Science*, 100:1675-1679.
8. Miyazaki, K., Yamasaki, N., Oda, H., Kuwata, T., Kanno, Y., Miyazaki, M., Komeno, Y., Kitaura, J., Honda, Z., Warming, S., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kitamura, T., Nakamura, T., and Honda, H. (2009) Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia. *Blood* 113:4702-4710.
9. Nakajima, H., Ito, M., Morikawa, Y., Komori, T., Fukuchi, Y., Shibata, F., Okamoto, S., and Kitamura, T. (2009) Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 are expressed in osteoblasts and differentially regulate hematopoietic stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 390:65-70.
10. Oki, T., Eto, K., Izawa, K., Yamanishi, Y., Inagaki, N., Frampton, J., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2009) Evidence that integrin alpha 2b beta

- 3-dependent interaction of mast cells with fibrinogen exacerbates chronic inflammation. *J. Biol. Chem.* 284:31463-31472.
11. Ono, R., Kumagai, H., Nakajima, H., Hishiya, A., Taki, T., Horikawa, K., Takatsu, K., Satoh, T., Hayashi, Y., Kitamura, T., and Nosaka T. (2009) Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23:2197-209.
  12. Wada, T., Kikuchi, J., Nishimura, N., Shimizu, R., Kitamura, T., and Furukawa, Y. Expression levels of histone deacetylases determine the hematopoietic progenitors. (2009) *J. Biol. Chem.* 284:20673-30683.
  13. Kubagawa, H., Oka, S., Kubagawa, Y., Torii, I., Takayama, E., Kang, D.W., Gartland, G.L., Bertoli, L.F., Mori, H., Kitamura, T., Ohno, H., and Wang, J-Y. (2009) Identity of the elusive IgM Fc receptor (FcmR) in humans. *J. Exp. Med.* 206:2773-2793.
  14. Kitamura, T. Lessons from mouse models for leukemia, MDS and MPD. 日米血液腫瘍ワークショップ、ハワイ島、March, 2009.
  15. Kitamura, T. "Learning from mouse BMT models for MDS and MPD". MDS/MPN Meeting 招待講演 MDアンダーソン 癌センター、ヒューストン、April, 2009.
  16. Ikeya, M., Fukushima, K., Kawada, M., Onishi, S., Furuta, Y., Yonehara, S., Kitamura, T., Nosaka, T., and Sasai, Y. (2010) Cv2, functioning as a pro-BMP factor via twisted gastrulation, is required for early development of nephron precursors. *Dev. Biol.* 337:405-414.
  17. Nakahara, F., Sakata-Yanagimoto, M., Komeno, Y., Kato, N., Uchida, T., Haraguchi, K., Kumano, K., Harada, Y., Harada, H., Kitaura, J., Ogawa, S., Kurokawa, M., Kitamura, T., and Chiba, S. (2009) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. *Blood* in press.
  18. Komeno, Y., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Kato, N., Oki, T., Nakahara, F., Harada, Y., Harada, H., Shinkura, R., Nagaoka, H., Hayashi, Y., Honjo, T., and Kitamura, T. (2010) AID-induced T-lymphoma or B-leukemia/lymphoma in a mouse BMT model. *Leukemia*, in press.
2. 学会発表
    1. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽

- 一、北村俊雄、黒川峰夫（2009年10月京都）EVI1 Downregulates PTEN Transcription and Activates AKT/mTOR Through Interaction with Polycomb Group. 第71回日本血液学会学術集会、口演
2. 中島秀明、森川吉博、小森忠介、福地由美、柴田文、岡本真一郎、北村俊雄（2009年10月京都）Wnt modulators, SFRP-1 and SFRP-2 differentially regulate hematopoietic stem cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演
3. 和田妙子、北村俊雄（2009年10月京都）ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）による血球分化の制御と白血病発症への関与の説明. 第71回日本血液学会学術集会、口演
4. 土岐典子、川島敏行、殿塚行雄、箕嶋幸範、北村俊雄（2009年10月京都）Constitutive phosphorylation of a RacGAP is involved in v-Src-induced transformation of NIH3T3 cells. 第71回日本血液学会学術集会、口演
5. 小埜良一、榎屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉（2009年10月京都）MLL-ENL 融合遺伝子は造血幹細胞のみを標的として形質転換を生じる. 第71回日本血液学会学術集会、口演
6. 加藤菜穂子、米野由希子、渡辺直子、中原史雄、土岐典子、原田浩徳、原田結花、北浦次郎、北村俊雄（2009年10月京都）Analysis of C/EBPA mutations in AML, MDS by a mouse BMT model. 第71回日本血液学会学術集会、口演
7. 中原史雄、北浦次郎、坂田-柳本麻美子、米野由希子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄（2009年10月京都）Hes1 confers self-renewal capability on committed progenitors and induces CML BC-like disease. 第71回日本血液学会学術集会、口演
8. 中原史雄、坂田-柳本麻美子、米野由紀子、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉滋、北村俊雄（2009年10月横浜）Hes1 による骨髓前駆細胞への自己複製能付与と、慢性骨髓性白血病における急性転化の誘導. 第68回日本癌学会学術総会、口演
9. 小埜良一、榎屋正浩、宮田恵里、中島秀明、上迫努、伊藤守、鈴木圭、片山直之、北村俊雄、野阪哲哉（2009年10月横浜）MLL-ENL 融合遺伝子による形質転換は造血幹細胞のみを標的として生じる. 第68回日本癌学会学術総会、口演
10. 土岐典子、川島敏行、小根山千歳、赤城剛、北村俊雄（2009年10月横浜）MgcRacGAP の恒常的リン酸化は v-Src による NIH3T3 細胞の transform に関与する. 第68回日本癌学会学術総会、ポスター

11. 吉見昭秀、渡辺-大河内直子、合山進、南谷泰仁、仁田英里子、荒井俊也、佐藤智彦、島辺宗健、中川正宏、今井陽一、北村俊雄、黒川峰夫（2009年10月横浜）EVI1はポリコーム群を介してPTENの転写を抑制しAKT/mTORシグナルを活性化する。第68回日本癌学会学術総会、口演
  12. 山西吉典、北浦次郎、伊沢久未、貝谷綾子、榎本豊、沖俊彦、秋葉久弥、高井俊行（2009年12月大阪）LMIR5のリガンドとしてTIM1およびTIM4を同定した。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
  13. 伊沢久未、北浦次郎、山西吉典、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）LMIR3 ノックアウトマウスの解析；LMIR3 欠損はマウス腹膜炎モデルにおける致死率を改善する。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
  14. 沖俊彦、北浦次郎、山西吉典（2009年12月大阪）マスト細胞上のインテグリン $\alpha$ IIb $\beta$ 3と慢性炎症。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
  15. 高橋まり子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、榎本豊、貝谷綾子、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）ヒトLMIR/CD300ファミリー分子の解析：CD300CはFcR $\gamma$ と会合して活性化シグナルを伝達する。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
  16. 貝谷綾子、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）LMIR8/CLM-6はpDCマーカーである。第39回日本免疫学会総会・学術集会、口演
  17. 榎本豊、北浦次郎、山西吉典、伊沢久未、沖俊彦、高井俊行、北村俊雄（2009年12月大阪）活性化レセプターLMIR7とLMIR4の比較解析：FcR $\gamma$ との会合から得られた知見。第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター
  18. 前原明絵、伊沢久未、山西吉典、貝谷綾子、高橋まり子、榎本豊、沖俊彦、高井俊行、北浦次郎、北村俊雄（2009年12月大阪）An activating and inhibitory signal from an inhibitory receptor LMIR3/CLM-1: LMIR3 augments LPS response through association with FcR $\gamma$  in mast cells. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、ポスター
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究

研究分担者 岡本 康司 国立がんセンター研究所 室長

研究要旨

がん幹細胞の造腫瘍性、転移性を明らかにする目的で、大腸がん幹細胞のスフェロイド継代培養系を確立し、各種生物学的実験によりスフェロイドにがん幹細胞が存在する事を確認した。又、機能的スクリーニングにより、転移抑制的に働くマイクロ RNA を同定した。造血幹細胞特異的な自己複製能の活性化する事を見いだした。

A. 研究目的

がん幹細胞は幾つかのがん腫において、がんの造腫瘍性、転移性の根源である可能性が提唱されている。大腸がんを例にとり、そのがん幹細胞を *in vitro* で継代培養し解析する事により、がん幹細胞の生物学的本態を明らかにする。又、がん転移を抑制する因子を機能的スクリーニングにより同定し、さらにこれらの因子のがん幹細胞における役割を明らかにする。これらの方法により、がん幹細胞の造腫瘍性、転移性を引きおこすメカニズムを明らかにする事を目標とする。

B. 研究方法

1. 前年度に引き続き、NOG マウスを用いた高効率な大腸がん肝転移モデルを用いた、大腸がん転移を抑制するマイクロ RNA 及び coding 遺伝子 shRNA のレンチウイルスライブラリーを用いた機能的スクリーニング (drop-out assay) を行った。さらに同定された転移抑制的マイクロ RNA の機能解析、発現解析等を行った。

2. ヒト手術検体由来の大腸がん幹細胞の *in vitro* スフェロイド (球状体) 培養系の培養条件の改善を行い、さらに培養スフェロイド細胞のがん幹細胞としての生物学的性質の詳細な検討をおこなった。

3. 継代培養されたがん幹細胞のがん制御経路の検討に先立ち、p53 又は NF- $\kappa$ B の制御因子である Mdm2、Mdmx、A20 の解析を行った。(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、動物の苦痛軽減を可能な限り配慮し、国立がんセンターにおける動物実験に関する指針にそって動物実験を行った。

ひとと大腸がん由来の検体に関しては、平成15年厚生労働省告示第255号「臨床研究に関する倫理指針」に従い、倫理面に充分配慮して研究を進め、書面により包括同意を得られた患者の標本のみ用いた。研究計画については、同研究所の倫理審査委員会の審査にて承認を受けた研究計画の枠内で行わ

れた。

C. 研究結果

1. NOG マウスを用いた網羅的な機能スクリーニングの結果、大腸がん肝転移を再現性よく抑制するマイクロ RNA を2種同定した。さらにそのうちの一種は、正常大腸上皮細胞に比し多種類の大腸がん細胞株で発現レベルの激減が認められ、転移抑制に働くマイクロ RNA としての働きが強く示唆された。

2. 大腸がん幹細胞のスフェロイド継代培養に指適な培養条件 (増殖因子、継代方法、保存法) の検討により、細胞の生存率の向上を認めた。又、細胞の造腫瘍能、分化能、特異的マーカーの発現等を検討し、スフェロイド中にがん幹細胞が存在する事 (30~40%) を確認した。

3. p53、NF- $\kappa$ B 等により制御される経路の異常が大腸発がんにおいて重要な役割を果たす事が知られている。大腸がん由来のスフェロイド細胞におけるこれらのがん制御経路の検討に先立ち、これらの経路において重要な役割を果たす Mdm2、Mdmx、A20 の生物学的、遺伝学的検討を行った。

D. 考察

ヒト大腸がん由来のがん幹細胞の詳細な生物学的解析を報告した例は未だない。これは、大腸がん幹細胞の培養が技術的に困難である事によると考えられるが、本例がその最初の報告となる事が期待される。又、転移抑制因子の同定に用いられた機能的スクリーニングのプラットフォームはがん幹細胞抑制因子の同定にも転用可能であると考えられる。

E. 結論

ヒト大腸がん幹細胞は、スフェロイド培養により *in vitro* において安定した継代培養が可能である事が示された。又、転移抑制に働くマイクロ RNA が存在する事が示され、がん治療へ応用の可能性が示唆された。

G. 研究発表

## 1. 論文発表

1. K. Okamoto, Y. Taya, H. Nakagama: Mdmx enhances p53 ubiquitination by altering the substrate preference of the Mdm2 ubiquitin ligase. *FEBS Lett.* 583, 2710-2714 (2009)
2. C. Ohtsubo, D. Shiokawa, M. Kodama, C. Gaidon, H. Nakagama, A. G. Jochemsen, Y. Taya, and K. Okamoto: Cytoplasmic Tethering is involved in Synergistic Inhibition of p53 by Mdmx and Mdm2. *Cancer Sci.* 100, 1291-1299 (2009)
3. M. Kato (the names of 21 authors omitted) K. Okamoto, K. Tobinai, H. Nakagama, T. Nakahata, T. Yoshino, Y. Kobayashi, and S. Ogawa: Frequent inactivation of A20 in B-cell lymphomas. *Nature* 459, 712-716 (2009)

## 2. 学会発表

1. 第68回日本癌学会学術総会「大腸がん転移を抑制する新規 miRNA の同定」(平成21年10月、横浜市)
2. 第24回発癌病理研究会「大腸がん転移を抑制する新規マイクロRNA の同定」(平成21年8月、石川県)
3. 第8回日韓がんシンポジウム  
「microRNA-mediated regulation of stemness and metastatic function during colon carcinogenesis」(平成21年11月、金沢市)
4. 第8回日中がんシンポジウム  
「microRNA-mediated regulation of stemness and metastatic function during colon carcinogenesis」(平成21年10月、大阪市)