

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

がん幹細胞のエピゲノムプロファイリング

研究分担者 横山 明彦 国立がんセンター研究所 室長

**研究要旨**

本研究の目的は、MLL 融合タンパク質によってがん幹細胞性がいかにして獲得されるかを解明する事である。我々は、MLL 融合タンパク質が AEP というタンパク質複合体を介して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**

正常造血および白血病の発症に深く関与する MLL 及び MLL 融合遺伝子産による幹細胞制御メカニズムを解明し、その知見に基づく治療法の開発を試みる。

**B. 研究方法**

MLLが造血幹細胞においてどのように機能しているかを遺伝子改変マウスを用いて調べる。また、様々な変異を導入した MLL 融合タンパク質による骨髓前駆細胞のトランスフォーメーション活性をマウス白血病モデルにて調べる事で MLL の作用機序を解明する。

本研究における倫理面への配慮については、本研究においてはヒトサンプルを用いず、動物実験は国立がんセンター研究所の倫理規定に従って行う事で対応した。

**C. 研究結果**

難治性である MLL 遺伝子変異を伴う白血病のがん幹細胞が幹細胞性を獲得するメカニズムについての研究を行った結果、白血病を起こす MLL 融合遺伝子産物は野生型 MLL と同様に、AEP というタンパク質複合体を介して造血幹細胞の自己複製能を活性化する働きがある事がわかった。野生型 MLL は分化の進行に伴って負の制御を受けるが、MLL 融合遺伝子産物はその負の制御を受けず、分化刺激を受けても自己複製能の活性化が止まらず、その結果、細胞ががん化する事が分かった。

**D. 考察**

難治性の MLL 白血病のがん幹細胞性は AEP による自己複製能の活性化による事が分かったことは、今後の研究を AEP の制御

へと焦点を絞ることができた点で意義深い。

今後は AEP がどのような負の制御を受けるのかを解明する事が重要である事が示唆された。

**E. 結論**

MLL による造血幹細胞制御及び MLL 融合タンパク質による白血病幹細胞制御には AEP 複合体が必要である。

**F. 健康危険情報**

（分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入）

**G. 研究発表**

1. 論文発表

・ \*Yokoyama A, Lin M, Naresh A, Kitabayashi I, \*Cleary ML A higher-order complex containing AF4- and ENL-family proteins with P-TEFb facilitates oncogenic and physiologic MLL-dependent transcription. Cancer Cell. 17;198-212. \*:co-corresponding author

2. 学会発表

アメリカ血液学会

（2009、ニューオーリンズ）

日本生化学会シンポジウム

（2009、神戸）

（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

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 金子 周一 金沢大学医薬保健研究域医学系・恒常性制御学 教授

研究要旨：肝細胞がんは全世界で年間約62万人が罹患し、早期発見を行いかつ初回治療で根治的な治療が施されても、経過で再発を繰り返し死に至る世界第3のがん死亡原因である。近年正常組織と同様ながん組織においても幹細胞性を有する一部のがん細胞（がん幹細胞：Cancer Stem Cell (CSC)）が同定され、高い腫瘍形成能、転移能、抗がん剤抵抗性などがんの維持に必須な細胞集団であることが明らかにされつつある。本研究において我々は、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遺伝子発現パターンから幹細胞型と肝細胞型に分類可能であることを見出した。さらに我々は、幹細胞型肝細胞がんは若年発症であること、門脈浸潤傾向が強いこと、Wntシグナル活性が高いこと、EpCAM陽性細胞がCSCの特徴を示し高い浸潤能、腫瘍形成能を有すること、Wntシグナルによって自己複製や非対称性分裂の制御を受けること、抗がん剤抵抗性を示す事を同定した。EpCAMが細胞表面に存在しWntシグナル伝達を制御すること、EpCAMの発現抑制がCSCによる腫瘍形成、浸潤能を著しく阻害すること、現在抗EpCAM抗体開発が進行中であることから、EpCAMは幹細胞型肝細胞がんのCSCを標的とする治療法の開発において有力な標的分子であると考えられた。

A. 研究目的

肝細胞癌は全世界で年間約62万人が罹患し、発症率としては第5位、癌死亡原因としては第3位に位置している。肝細胞癌の殆どはB型もしくはC型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝発癌のメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返す壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前癌病変から高分化型肝癌、進行肝癌へと進行していくと考えられている。この過程において異常をきたす様々な遺伝子・蛋白異常が報告されているが、全体像については未だ不明な点が多い。

近年、一部の血液がんや固形がんにおいて幹細胞様の特徴を示す細胞群（がん幹細胞：Cancer Stem Cell (CSC)）の存在が明らかになり、がんの維持、転移や治療抵抗性のメカニズムに深く関わっている可能性が示唆されている。肝細胞癌においてもいくつかの幹細胞マーカーを用いたCSCの

分離が行われ、免疫不全マウスを用いた検討で強い腫瘍形成能力と自己複製能力、非対称性分裂能力を有していることが報告されている。さらに、CSCは従来用いられている抗がん剤や放射線療法に対して高い抵抗性を有し、がん治療後の再発への関与が示唆されていることから、がん治療における重要な標的として認識されている。

最近我々は細胞表面マーカーの一つであるEpCAMが、正常肝や慢性肝炎に比べ肝細胞がん発症の高危険因子である肝硬変組織で発現が亢進していること、一部の肝細胞がんがで強発現していることを同定した。さらに最近他のグループから、EpCAM陽性細胞が胎児肝、正常成人肝における幹細胞マーカーであることが報告された。しかしながら、肝細胞がんにおけるEpCAM発現の意義についてはこれまで十分な検討がなされていない。

本研究において我々は、肝細胞がんを肝幹細胞マーカーであるEpCAMとAFPを用いて分類し、遺伝子発現パターンの特徴や生物学的な悪性度などについて評価を行った。さらにEpCAM陽性肝細胞が

んにおけるEpCAM陽性細胞の形質につき培養細胞および新鮮外科切除標本を用いて評価を行った。

## B. 研究方法

**サンプル** 臨床サンプルとして、金沢大学付属病院および上海の Fudan 大学で肝切除が行われた合計 235 例の肝細胞がんおよび背景肝組織をマイクロアレイ解析および免疫組織化学解析に用いた。培養細胞は HuH1, HuH7, Hep3B, HLE, HLF, SK-Hep-1 細胞を用い、DMEM - 10 % FBS 培地で培養した。また、ヒト初代培養肝細胞並びにヒト肝幹細胞は Pittsburgh 大学および North Carolina 大学から供与を受け、PCR 解析に用いた。

**マイクロアレイ** 156 例の肝細胞がんサンプルを oligo-array (Qiagen, Valencia, CA) で解析、NCBI にデータ登録した (GSE5975)。

**免疫組織化学** 79 例のホルマリン固定肝細胞がん標本を用いて EpCAM, AFP, CK19 の発現を免疫組織化学で評価した。クエン酸バッファーを用いて抗原賦活を行った後に、EnVision+キット (DAKO, Carpinteria, CA)、抗 CK19 抗体 (DAKO)、抗 AFP 抗体 (DAKO)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) で免疫染色を施行した。

**細胞増殖、浸潤、スフェロイド形成解析** 細胞増殖はMTS試薬 (Promega, Madison, WI) を用いて解析した。細胞遊走、浸潤能についてはBD BioCoat™ Matrigel Matrix (BD Biosciences, San Jose, CA) を用いて解析した。スフェロイド形成能についてはUltra-low attachment plate (Corning, Corning, NY) を用いて評価を行った。

**細胞分離およびフローサイトメーター** 培養細胞はトリプシン処理後機械的に単一浮遊細胞に調整した。肝細胞がん切除標本はコラゲナー

ゼ処理後単一浮遊細胞に調整し、赤血球を溶血破砕後にCD45陽性白血球を除去した。EpCAM陽性、陰性細胞はMACSを用いて分離し、純度はFACSscanで確認した。

**皮下腫瘍移植モデル** CSCの腫瘍形成能については希釈系列を用いたNOD/SCIDマウスへの皮下腫瘍形成について経時的に評価を行った。

### (倫理面の配慮)

サンプルを提供する患者には、研究内容の説明及び研究協力への依頼につき説明文書を用いて説明し (①遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、②研究の目的・方法、③研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤プライバシーの保護及び機密保持、⑥経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

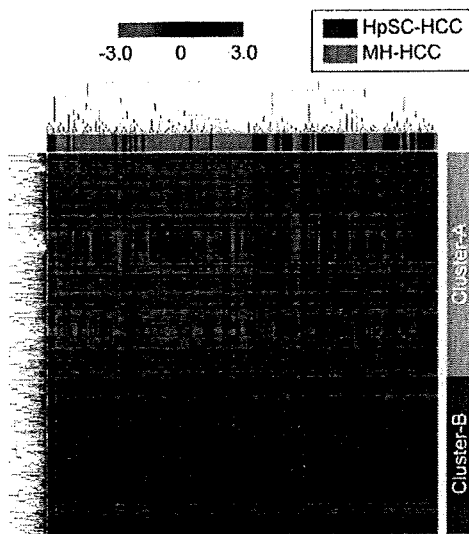
個人に関する情報の保護と管理は、文部科学省・厚生労働省・経済産業省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。連結可能匿名化後、個人情報分担管理者の管理の下に保存、データは研究室に設置した専用コンピューターにて一括管理し、データアクセスは研究従事者がパスワードを用いて行った。

## C. 研究結果

背景肝に比べEpCAMとAFPが2倍以上発現亢進している肝細胞がんを幹細胞型肝細胞がん (HpSC-HCC)、EpCAMとAFPがともに背景肝に比べ2倍未満の肝細胞がんを肝細胞型肝細胞がん (MH-HCC) と定義し、遺伝子発現パターンを解析したところ、HpSC-HCCとMH-HCCで発現が統計的に有意に異なる793遺伝子が判明した

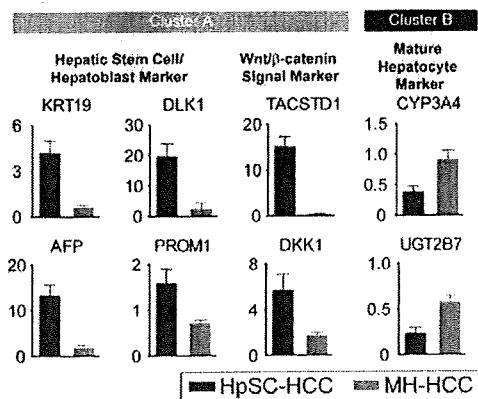
(図1、Yamashita T et al, Gastroenterology 2009 より引用)。興味深いことに、HpSC-HCC では肝幹細胞マーカーである KRT19, AFP, DLK1, PROM1 や Wnt シグナルの標的遺伝子である DKK1 の発現亢進が認められ、MH-HCC では CYP3A4 や UGT2B7 など薬物代謝遺伝子の発現亢進が認められた (図2)。

図1 肝細胞がんの階層的クラスター解析



HpSC-HCC と MH-HCC は大きく2つのグループに分かれ、それぞれに特異的な遺伝子発現パターンを呈している。

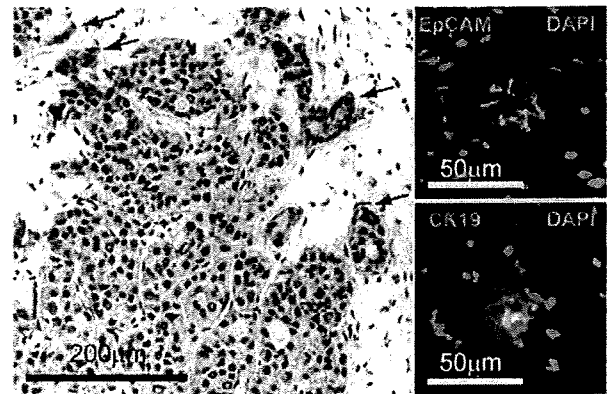
図2 代表的な肝細胞マーカー、幹細胞マーカーの遺伝子発現パターン



更に興味深いことに、HpSC-HCC は統計的に有意に若年発症であった (data not shown)。次いで、

HpSC-HCC における EpCAM 発現を免疫組織化学で評価したところ、EpCAM 陽性細胞は腫瘍に均一に分散して存在するわけではなく、むしろ腫瘍の辺縁で間質細胞に接している、invasive front area に多く存在すること、EpCAM 陽性細胞は AFP 陽性、CK19 陽性であることが判明した (図3)。

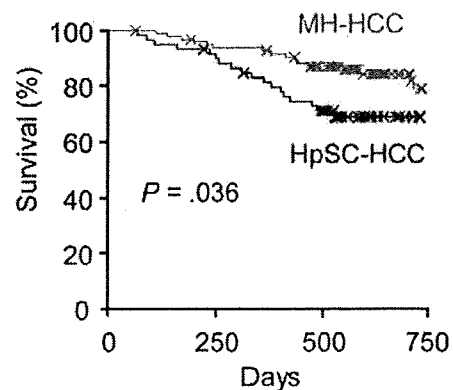
図3 EpCAM, AFP, CK19 の蛋白発現



(Yamashita T et al Gastroenterology 2009 より引用)

実際に HpSC-HCC は MH-HCC に比べ門脈浸潤傾向が強く、外科切除後の生存率でも、HpSC-HCC では統計学的に有意に生存率の低下が認められた (図4)。

図4 Kaplan-Meier 生存曲線

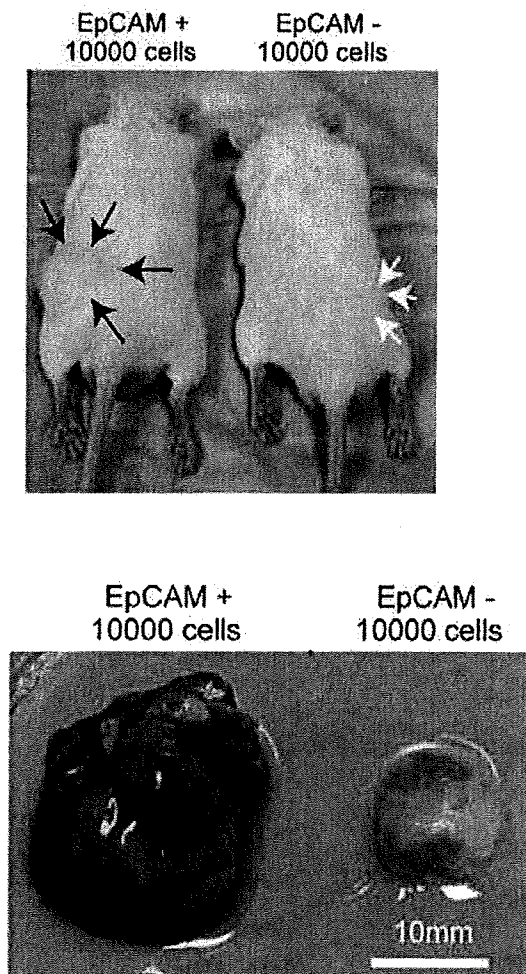


(Yamashita T et al Gastroenterology 2009 より引用)

HpSC-HCC における EpCAM 陽性細胞と陰性細胞

の腫瘍形成能の違いを免疫不全マウスを用いて評価したところ、EpCAM 陽性細胞は陰性細胞に比べ、同一細胞数を皮下移植したにも関わらず、より大きな腫瘍血管に富む肝細胞がんを形成した (図5)。

図5 EpCAM 陽性、陰性細胞のNOD/SCID マウスに対する皮下移植モデル



また、代表的な抗がん剤である5-FU投与後には、EpCAM 陽性細胞のみが生存可能であることが判明した (data not shown)。

以上の結果から、HpSC-HCC では Wnt シグナルの活性化が認められ、EpCAM 陽性細胞は浸潤傾向が高く抗がん剤抵抗性であり、かつ腫瘍形成能が高い細胞集団であることが明らかになった。

そこで、Wnt シグナルが HpSC-HCC において果たしている役割について、HpSC-HCC の形質を有する培養細胞である HuH7 を用いて検討した。通常の培地に比べ Wnt10b 添加培地で7日間培養したところ、EpCAM 陽性 CD133 陽性細胞分画の増加が認められた (図6)。更に Wnt のターゲット遺伝子の一つである EpCAM の遺伝子発現を si-RNA を用いて抑制したところ、細胞増殖に与える影響は少ないものの、細胞浸潤能 (data not shown)、スフェロイド形成能の著しい低下を認めた (図7)。

図6 Wnt10b が EpCAM と CD133 陽性細胞分画に与える影響 (HuH7 を用いた検討)

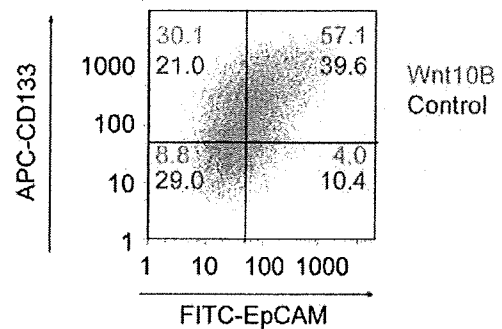
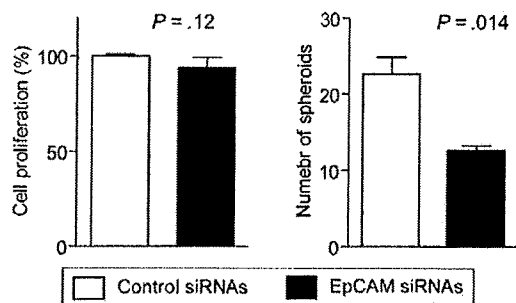


図7 細胞増殖、スフェロイド形成解析



(Yamashita T et al Gastroenterology 2009 より引用)

#### D. 考察

近年の CSC 仮説においては、正常幹細胞が正常臓器の維持に重要な役割を果たしているのと

同様に、CSC はがん組織の維持に重要な役割を果たしていると考えられている。一方、すべてのがんにおいて CSC が存在するか否かについては未だ十分に明らかにはなっていない。本研究において、EpCAM 陽性 AFP 陽性の HpSC-HCC では Wnt シグナルの活性化と肝幹細胞マーカーの発現亢進、若年発症、強い門脈浸潤傾向、予後不良傾向が認められることが明らかになった。特に HpSC-HCC においては、EpCAM 陽性細胞が強い腫瘍形成能、浸潤能、抗がん剤抵抗性を有し、CSC の特徴を有していることから、CSC 仮説は少なくとも HpSC-HCC においては矛盾せずあてはまることが判明した。実際に Wnt シグナルの活性化により EpCAM 陽性細胞の増加が認められ、EpCAM の発現抑制によりスフェロイド形成能が著しく障害されることから、Wnt シグナル、EpCAM は HpSC-HCC 治療における重要な標的分子、シグナル伝達系であると考えられた。

EpCAM の遺伝子発現抑制がなぜ CSC の浸潤能、腫瘍形成能に影響を与えるかについては未だ不明な点が残されている。以前に我々は EpCAM が Wnt シグナルのターゲット遺伝子の一つであることを同定、Wnt が活性化しているがんでは EpCAM の遺伝子発現が亢進しがんの悪性度が高いと報告した。一方最近、EpCAM そのものが 2 量体を形成、プロテアーゼにより切断を受けてシグナル伝達物質となり Wnt シグナルを活性化することが報告されている。現在いくつかの抗 EpCAM 抗体が複数の製薬会社で開発中であり、特に CSC で発現亢進が認められることからその有用性に関する研究報告が待たれる。一方、抗 EpCAM 抗体が逆に EpCAM の 2 量体形成を促し CSC における Wnt シグナルの活性化を起こす可能性も考えられ、その安全性についても十分な評価が必要である。抗体治療のみならず、Wnt シグ

ナルをターゲットにした薬剤開発も含め、EpCAM 陽性細胞の生物学的悪性度を規定する分子機構の解明は、肝がん CSC に対する治療法開発における重要な課題であると考えられた。

## E. 結論

肝細胞がんは EpCAM と AFP により幹細胞型 (HpSC-HCC) と肝細胞型 (MH-HCC) に分類可能であり、HpSC-HCC は若年発症、予後不良、門脈浸潤傾向などがんとした生物学的悪性度が高いことが明らかになった。特に HpSC-HCC において EpCAM 陽性細胞はがん幹細胞 (CSC) として機能し、EpCAM は CSC を標的とする治療法の開発において重要な情報基盤を提供するものと考えられた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Yamashita T. et al., EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*. 2009; 136(3):1012-24.

### 2. 学会発表

1) EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor initiating cells with stem/progenitor cell features. AACR 2009 Annual Meeting, Minisymposium, Cancer and Stem Cell Biology

2) ゲノミクスからみた肝細胞癌の幹細胞性とその診断、治療への応用、犬山シンポジウム、2009 年

3) EpCAMを用いた肝細胞癌分類の確立、肝癌幹細胞の同定とその治療への応用、日本肝臓学会総会、ワークショップ 2009 年

G. 知的所有権の出願・取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

皮膚の間葉系幹細胞の性状解析に関する研究

研究分担者 国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部 大河内仁志

**研究要旨：** 皮膚の真皮や脂肪組織には間葉系幹細胞の存在が知られているが、腫瘍組織や炎症部への遊走能については定説がないため、本研究では脂肪由来の間葉系幹細胞をマウスに静脈注射して腫瘍組織や炎症部への遊走能を検討した。今回、間葉系幹細胞の明らかな腫瘍組織や炎症部への集積は認められなかったが、免疫抑制作用が認められた。

### A. 研究目的

骨髄をはじめとする様々な組織に間葉系幹細胞が存在しており、筋肉や骨、軟骨などへの多分化能をもつことや免疫調節作用が報告されている。再生医療の細胞ソースとして間葉系幹細胞は有望と考えられている。骨髄由来の間葉系幹細胞研究がすすんでいるが、近年、脂肪組織にも骨髄と同様な多分化能をもった間葉系幹細胞の存在が報告され、採取の容易さと比較的大量に採取できることから注目されるようになってきた。これまで我々もヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞から肝細胞を誘導することに成功している。一般的に、間葉系幹細胞は創傷部や炎症部に集積しやすいとの報告があるが、腫瘍組織への遊走に関しては集積しやすいという報告や逆に集積しないという報告もみられて、定説がない。また間葉系幹細胞が産生する種々の因子により血管新生作用も指摘されている。間葉系幹細胞を治療手段として移植に用いる際にも、もし宿主に腫瘍が存在していると血管新生作用による腫瘍の増殖促進効果が危惧される。特に癌切除後の場合は腫瘍細胞の残存の可能性を常に考慮する必要がある。したがって本研究では骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞をマウスに静脈注射して腫瘍組織や炎症部への遊走能と抗炎症作用を検討することを目的とする。

### B. 研究方法

#### 1 腫瘍組織への遊走と増殖促進効果の検討

ヒト膵臓癌由来の細胞株MiaPaCa-2細胞を100万個ヌードマウスの皮下に接種したのち、ヒト脂肪組織由来の間葉系幹細胞をCM-Dilで標識して150万個をマウスの尾静脈から注入した。対照群はPBSのみ注入した。腫瘍の大きさを経時的に測定するとともに2週間後に組織標本を作製して移植細胞の生着を検討した。腫瘍は肉眼的に外部から観察可能になる9日後の大きさを基準として腫瘍の増殖率を計算した。

#### 2 皮膚炎症部への遊走能の検討

Balb/cマウスの接触皮膚炎モデルを用いて脂肪組織由来の間葉系幹細胞の炎症部への遊走を検討し、同時に免疫調整作用の検討を行った。DNFBを

感作物質として用い、高濃度の物(0.5%, 50ul)をマウス腹部に塗布した後、惹起は5日後片方の耳に低濃度の物を塗布した(0.2%, 10ul)。惹起6時間後に骨髄ないし脂肪組織由来の間葉系幹細胞を100万個、尾静脈より注入した。接触皮膚炎の反応の強さは惹起後の経時的な耳の厚さの測定ならびに病理組織像で評価した。

#### 3 脂肪組織由来の間葉系幹細胞のケモカイン受容体の検討

マウス脂肪組織由来の間葉系幹細胞の初代培養、P1、P2の細胞からRNAを抽出し、CCRは1から10まで、CXCRは1から6まで発現をRT-PCR法により検討した。またマウスの種差による違いを明らかにするためにC57/B6とBalb/cのマウスを用いて検討した。

#### (倫理面への配慮)

ヒト由来の細胞は市販されているものあるいは手術時に同意の得られた組織から細胞を分離して用いた。マウス由来の細胞は施設の動物実験委員会において動物実験計画の承認を受け、動物の愛護上の配慮をもって、実験を行った。

### C. 研究結果

#### 1 腫瘍組織への遊走と増殖促進効果の検討

ヒト膵臓癌由来の細胞株MiaPaCa-2細胞をヌードマウスへ移植し、経時的に腫瘍の大きさを計測したところ、腫瘍の増大が認められた。脂肪組織由来の間葉系幹細胞を尾静脈より、24時間後に投与して経過を観察した。明らかな腫瘍の促進効果ならびに抑制効果を示さなかった。腫瘍細胞移植後、ある程度腫瘍が大きくなった17日あるいは21日後に間葉系幹細胞を注入して効果を検討したが、いずれの場合も腫瘍増大促進効果は認められなかった。逆に、腫瘍の増殖を抑制する作用も認められなかった。(表1、図1)

2週間後に組織切片を作製して、移植細胞の生着を検討したが、腫瘍部において特に生着は認められなかった。しかし肝臓、肺、脾臓には多数の移植細胞を検出した。(図2)

#### 2 皮膚炎症部への遊走能を検討



DNFBを腹部に塗布し、5日後に片方の耳に再塗布して炎症を惹起した。再塗布の6時間後に脂肪組織または骨髄由来の間葉系幹細胞を尾静脈より、投与して経過を観察した。対照群はPBSの投与とした。

対照群では再塗布2日目に耳の厚さは最大となったが、脂肪組織または骨髄由来の間葉系幹細胞の投与により、著明に耳の腫脹は抑制された。(図3)

GFPマウス由来の細胞を移植して1日後、2日後、3日後に耳の組織標本を作製し、抗GFP抗体による免疫染色を行った。骨髄由来の間葉系幹細胞は1切片あたり、10-50個の移植細胞を検出できたが、脂肪組織由来の間葉系幹細胞は1切片あたり、1-2個程度と移植細胞の数は少なかった。

### 3 脂肪組織由来の間葉系幹細胞のケモカイン受容体の検討

脂肪組織由来の間葉系幹細胞のケモカイン受容体をRT-PCR法により検討した。CCR1-10のうち、CCR4の発現が脾臓の細胞と同等なレベルで高く認められたが、CCR1の弱い発現以外に、ほかの受容体の発現はほとんど認められなかった。CXCRに関してはCXCR6の発現と弱いCXCR1の発現が認められた。(図4)

C57/B6とBalb/cのマウスの比較実験ではCCR1, 4ともに発現を認めたが、Balb/cのマウスの方がより強い発現を認めた。(図5)

### D. 考察

ヒト脾臓癌由来の細胞株を用いた研究では脂肪組織由来の間葉系幹細胞は特に腫瘍部に集積を認めなかった。また明らかな腫瘍の増大を促進する作用も認められなかった。1種類の癌細胞だけで安全性を論じることはできないので、他の細胞株でも検討する予定である。移植後2週間で腫瘍組織には移植した細胞が認められず、肝臓、肺、脾臓には多数の移植細胞が認められたことから、腫瘍組織特異的あるいは臓器特異的なホーミングというよりは毛細血管の発達した組織にトラップされた可能性が高いと考えられた。

炎症部への間葉系幹細胞のホーミングを検討するために耳の接触性皮膚炎モデルを用いたが、片方の耳に炎症を惹起することができ、左右差の比較ができる利点がある。脂肪組織由来の細胞と骨髄由来の細胞を移植した場合に著明に耳の腫脹が抑制されたので、移植細胞による免疫反応抑制作用が示唆された。しかし予想に反して、炎症を起こしている皮膚の局所には移植細胞がほとんど検出されなかった。これらの結果から、間葉系幹細胞に免疫反応を抑制する能力があることが示唆されたが、局所における直接作用というよりは液性因子を介した間接的な作用である可能性が示唆された。

局所の皮膚への炎症細胞数に差はみられなかったことより、炎症細胞の浸潤自体に大きな影響を与えているとは考えにくい。そこで炎症細胞のサイトカイン産生などに影響を与えているのではないかと思われた。

間葉系幹細胞のケモカイン受容体の検索を行っ

たが、CCR4とCCR1のみの発現が認められた。今回局所の炎症部への遊走がほとんどみられなかった原因としてはCCR4のリガンドであるCCL17やCCL22を発現している細胞が少なかった可能性が考えられる。今回用いた間葉系幹細胞は定常状態にある組織から単離したものであるため、何も刺激を受けておらず、したがって遊走能が高くなかったのではないかと考えられた。

### E. 結論

脂肪組織由来の間葉系細胞は脾臓がん由来の細胞に対して腫瘍増殖を促進する作用は認められなかった。脂肪組織由来の間葉系細胞に抗炎症作用を認めたが、局所における直接作用は証明できなかった。

### F. 健康危険情報

なし。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Banas A, Teratani T, Yamamoto Y, Tokuhara M, Takeshita F, Osaki M, Kato T, Okochi H, Ochiya T. Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:70-7. 2009

#### 2. 学会発表

1. 大河内仁志 皮膚に存在する幹細胞、特に脂肪組織由来幹細胞 第73回日本皮膚科学会東部支部学術大会、甲府、9月、2009

2. Tokuhara M, Hamazaki TS, Fukuda S, Okochi H, Omentum as a potential source of cell therapy for acute liver damage IFATS Oct, Daegu, Korea, 2009

### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録  
なし。

mouse	腫瘍	移植	腫瘍面積 (cm <sup>2</sup> ) ※									
			Day 9	Day 12	Day 15	Day 19	Day 21	Day 23	Day 27	Day 30	Day 35	
緑1	有	早期 (24hr) ASCs	43.2	94.2	117.8	—	—	—	—	—	—	
緑2	有	早期 (24hr) ASCs	27.5	27.5	22.0	—	—	—	—	—	—	
緑3	有	早期 (24hr) ASCs	23.6	27.5	44.0	—	—	—	—	—	—	
黒1	有	早期 (24hr) PBS	15.7	23.6	42.4	—	—	—	—	—	—	
黒2	有	早期 (24hr) PBS	23.6	33.0	49.5	69.1	91.9	91.9	99.0	110.0	138.2	
黒3	有	早期 (24hr) PBS	25.1	39.3	66.0	88.0	117.8	125.7	133.5	164.1	179.1	
赤1	有	後期 (Day21) ASCs	18.8	37.7	55.0	69.1	69.1	69.1	75.4	81.7	91.9	
赤2	有	後期 (Day21) ASCs	60.5	91.9	99.0	121.0	138.2	160.2	183.8	194.0	219.9	
赤3	有	後期 (Day21) ASCs	33.0	49.5	69.1	91.9	110.0	117.8	129.6	150.8	173.6	
青1	有	後期 (Day21) PBS	39.3	60.5	75.4	91.9	117.8	138.2	146.9	155.5	188.5	
青2	有	後期 (Day21) PBS	28.3	31.4	34.6	35.3	47.1	39.3	47.1	51.8	66.0	
青3	有	後期 (Day21) PBS	37.7	55.0	66.0	99.0	110.0	106.0	125.7	146.9	160.2	

mouse	腫瘍	移植	相対腫瘍面積 (%) ※				
			Day 21	Day 23	Day 27	Day 30	Day 35
黒2	有	早期 (24hr) PBS	100	100	108	120	150
黒3	有	早期 (24hr) PBS	100	107	113	139	152
赤1	有	後期 (Day21) ASCs	100	100	109	118	133
赤2	有	後期 (Day21) ASCs	100	116	133	140	159
赤3	有	後期 (Day21) ASCs	100	107	118	137	158
青1	有	後期 (Day21) PBS	100	117	125	132	160
青2	有	後期 (Day21) PBS	100	83	100	110	140
青3	有	後期 (Day21) PBS	100	96	114	134	146

Day21 を100とする増殖率 (B)

表1 腫瘍組織に対する間葉系幹細胞の増殖促進効果の検討

図1 間葉系幹細胞移植時を100としたときの相対的腫瘍増殖率

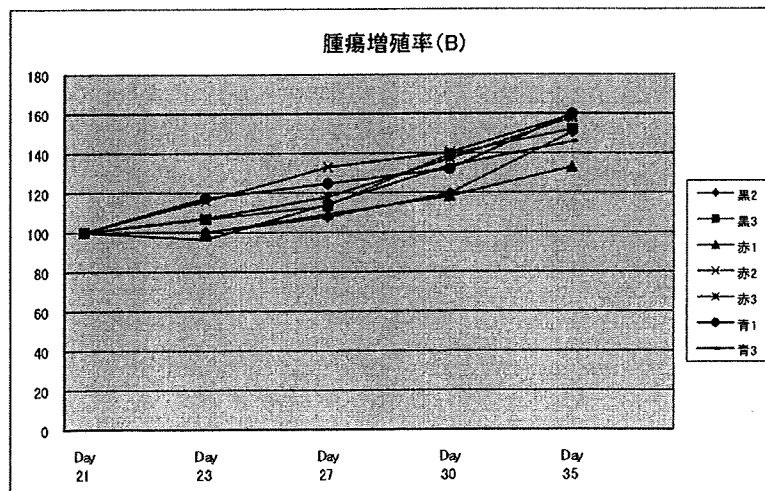




図3 脂肪組織由来の間葉系幹細胞移植による接触性皮膚炎の抑制効果

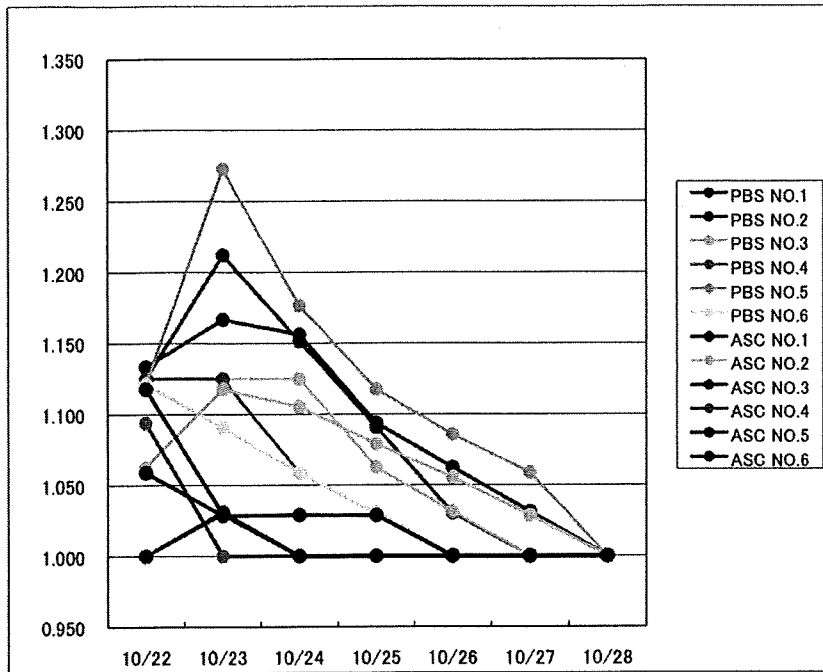


図4 脂肪由来間葉系幹細胞のケモカイン受容体の発現検討

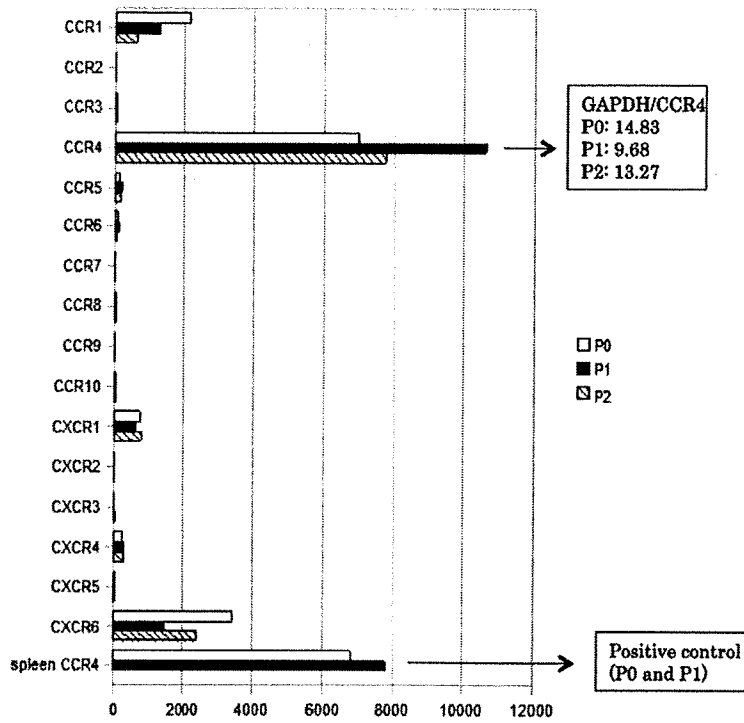
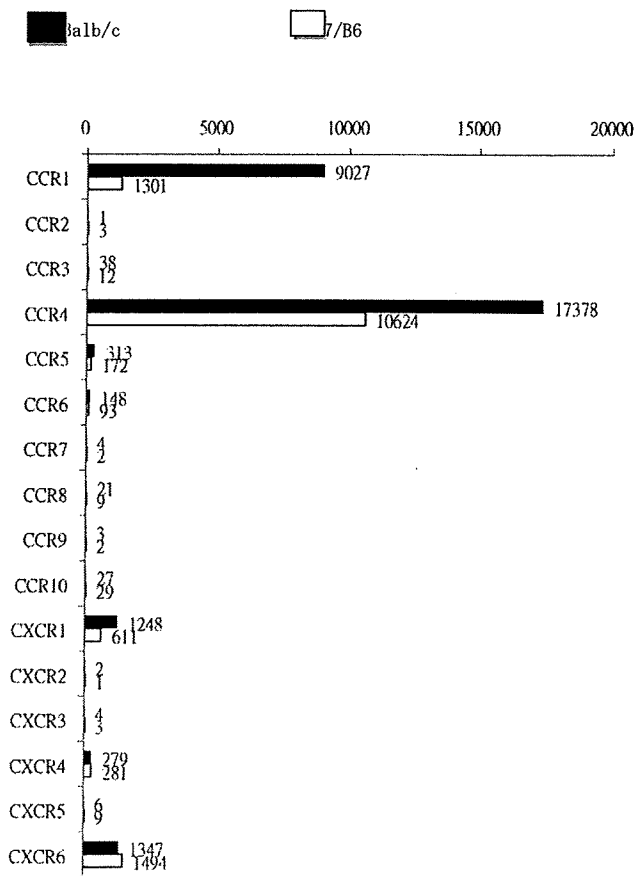


図5



がん幹細胞のエピゲノムプロファイリング

研究分担者 畑田 出穂 群馬大学准教授

**研究要旨**

網羅的なメチル化解析をおこない、肺がんでメチル化されている遺伝子を調べたところ、胚性幹細胞でポリコーム蛋白質のターゲットとなっていることが多いことがわかった。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**

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いる。この研究で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。

**B. 研究方法**

自ら開発した網羅的メチル化解析法 (MIAMI法) を用いて肺がんでメチル化されている遺伝子をスクリーニングし、その特徴を調べた。  
(倫理面への配慮)

群馬大学ゲノム倫理委員会の規定に従っておこなった。

**C. 研究結果**

肺がんでメチル化されている遺伝子をスクリーニングし、その特徴を調べたところ、胚性幹細胞で活性型と不活性型の両方のヒストン修飾を受けている Bivalent 遺伝子が多いことがわかった。これらは胚性幹細胞でポリコーム蛋白質のターゲットになっているものと一致する。またメチル化されている遺伝子が多いがんほどポリコーム遺伝子の発現が多いことがわかった

**D. 考察**

上記の結果からがんが幹細胞様の細胞に由来することが示唆される。また DNA メチル化酵素 DNMT3B は Bivalent 遺伝子をターゲットとすることから、がんにおけるメチル化はポリコーム遺伝子と DNMT3B が関与するらしいことがわかった。

**E. 結論**

がんのメチル化プロファイリングにより、がんが幹細胞に由来すること、またメチル

化はメチル化酵素 DNMT3B とポリコーム遺伝子により起こることが示唆された。

**F. 健康危険情報**

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

**G. 研究発表**

1. 論文発表

(1) Morita S et al. PLoS One. 2009;4:e4212.

(2) Horii T et al. submitted

2. 学会発表

Hatada I. 68<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Symposium) Oct.2 2009 Yokohama

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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
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
Yokobori, T. Mimori, K., Iwatsuki, M., Ishii, H., Onoyama, I., Fukagawa, T., Kuвано, H., Nakayama, K.-I. Mori, M.	p53-altered FBXW7 expression determines poor prognosis in gastric cancer cases.	Cancer Res	69	3788-3794	2009
Miyoshi N, Ishii H, Nagai K,	Defined factors induced	Proc Natl Acad	107	40-45	2010



Hoshino H, Mimori K, Tanaka K, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M.	reprogramming of gastrointestinal cancer cells	Sci USA			
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
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
Shibata F, Goto-Koshino Y, Morikawa Y, Komori T, Ito M, Fukuchi Y, Houchins JP, Tsang M, Li DY, Kitamura T, Nakajima H.	Roundabout 4 is expressed on hematopoietic stem cells and potentially involved in the niche-mediated regulation of the side population phenotype.	Stem Cells	27(1)	183-190	2009
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	138	1312-20	2010
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 and therapeutic target in colorectal cancer	Ann Surg Oncol	17	967-72	2010
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	17	1664-70	2009

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
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	153-9	2009
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	457-64	2009
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	319-22	2009
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	1070-1	2009
Ishii H, Haraguchi N, Ieta K, Mimori K, Mori M.	Cancer stem cells:gastrointestinal cancers.	Stem Cells and Cancer,Human PressEds		155-163	2009
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	2035-41	2009
Ieta K, Tanaka F, Yokobori T, Kita Y, Haraguchi N, Mimori K, Kato H, Asao T,	Clinicopathological significance of stanniocalcin 2 gene expression in colorectal	Int J Cancer	15	926-31	2009

Inoue H, Kuwano H, Mori M.	cancer.				
Iwatsuki M, Fukagawa T, Mimori K, Nakanishi H, Ito S, Ishii H, Yokobori T, Sasako M, Baba H, Mori M.	Bone marrow and peripheral blood expression of ID1 in human gastric carcinoma patients is a bona fide indicator of lymph node and peritoneal metastasis.	Br J Cancer	16	1937-42	2009
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	113-118	2009
原口直紹、森 正樹	大腸癌における癌幹細胞	実験医学	27	52-57	2009
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	21-26	2009
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	14-17	2009
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	386-392	2009
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
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., <u>Kitamura, T.</u> , and Tanaka, H.	Draxin, a novel repulsive guidance protein for spinal cord and forebrain commissures.	Science	323	388-393	2009
Komono, Y., Kitaura, J. and <u>Kitamura, T.</u>	Molecular bases of myelodysplastic syndromes: Lessons from animal models.	J Cell. Physiol.		529-534	2009
Kawashima, T., Bao, Y.C.,	A Rac GTPase activating	Mol Cell Biol	29	1796-1813	2009

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 <u>Kitamura, T.</u>	protein MgcRacGAP is an NLS-containing nuclear chaperone in the activation of STAT transcription factors.				
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 <u>Kitamura, T.</u>	Possible involvement of RasGRP4 in leukemogenesis.	Int J. Hematology	89	470-481	2009
Izawa, K., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Matsuoka, T., Kaitani, A., Sugiuchi, M., Takahashi, M., Maehara, A., Enomoto, Y., Oki, T., Takai, T. and <u>Kitamura, T.</u>	An 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	2009
Doki, N., Kawashima, T., Nomura, Y., Tsuchiya, A., Oneyama, C., Akagi, T., Nojima, Y. and <u>Kitamura, T.</u>	A Rac GTPase activating protein MgcRacGAP is constitutively phosphorylated on serine 387 in the v-Src-transformed NIH3T3 cells.	Cancer Science	100	1675-1679	2009
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., <u>Kitamura, T.</u> , Nakamura, T., and Honda, H.	Enhanced expression of p210BCR/ABL and aberrant expression of Zfp423/ZNF423 induce blast crisis of chronic myelogenous leukemia.	Blood	113	4702-4710	2009
Nakajima, H., Ito, M.,	Wnt modulators, SFRP-1 and	Biochem.	390	65-70	2009