

201019003A ($\frac{1}{2}$)

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成23(2011)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. 消化器がんの癌幹細胞の研究	7
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	14
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	16
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	17
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	21
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	23
畑田 出穂	
8. がん幹細胞モデル構築とそれを用いた薬剤スクリーニング	24
増富 健吉	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	26
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

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分子細胞治療研究分野・分野長

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。H22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を制御する分子であるRPN2、CD13、CD90、EpCAM等の分子やそれらの標的分子の機能解明を進めるとともに、これらの分子の阻害剤の開発や動物モデルを用いた治療の実証研究を推進した。

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・分野長
横山明彦・国立がん研究センター・ユニット長
金子周一・金沢大学医学部・教授
大河内仁志・国立国際医療研究センター・部長
畑田出穂・群馬大学・教授
増富健吉・国立がん研究センター・分野長

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

1) 本研究によって、抗癌剤開発を従来の癌細胞を標的とするのではなく癌幹細胞を標的とする方向へ大きく転換させることが期待でき、これまで治療が困難であった消化器がんをはじめ、白血病や薬剤耐性の乳がん、肺がんなどの癌治療成績の格段の向上とQOLが維持された心身ともに健全な高齢化社会の実現を目指す。また、本研究では、がん幹細胞のマーカーを多面的に解析することで、これらの幹細胞の維持やエピゲノムに関与する分子を特異的に遮

断する創薬へと結びつく可能性があり、社会への貢献も大である。本年度の研究成果に示すように、本研究班では、乳がん、大腸がん、肝細胞がんなどのがん幹細胞の性状に鋭いメスを入れる事に成果を上げ、特に乳がんのRPN2に関しては、イヌを用いた自然発症がんの治療研究の段階に入っており、実際の臨床への応用に極めて近づいた研究成果を上げている。また、本研究で作製したがん幹細胞モデルは、現在知られているがん幹細胞の特徴である転移能、治療抵抗性という特徴を維持していることが確認された。今後、本モデルを用いての薬剤スクリーニングの基盤になることが確認されたことになり、今後は、がん幹細胞を標的とした薬剤の同定が期待される。

2) 間葉系幹細胞のがん治療、再生医療への研究成果は、高度線維化を有する肝臓に対して投与された間葉系幹細胞の安全性と動態および効果、周辺環境とがん幹細胞との関連が明らかにされる。ヒトの慢性肝炎に類似するモデルを用いた検討であり、幹細胞を用いた肝再生および肝発がん抑制の臨床への応用実現に向けた研究が促進される。またC型肝炎患者は肝硬変から高率に肝臓がんを発症することが知られており、肝臓切除後に間葉系幹細胞移植によって、肝再生が促進されれば、新しい治療法の開発につながるため、厚生労働行政に大きく貢献できる。

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、乳がんをはじめ、大腸がん、肺がんのがん幹細胞で強く発現しており、ヒト乳がんのCD44+CD24-がん幹細胞のRPN2の発現抑制は、動物個体モデルでの造腫瘍性と転移を完全に抑制するなど、がん幹細胞の性質を強く阻害した。さらに、RPN2は、臨床検体のトリプルネガティブの乳がんの中でも、特に予後の悪い症例で強く発現していた。また、前臨床試

験の一貫として、イヌの自然発生乳がん 33 小症例中、15 例で正常乳腺組織と比較して RPN2 の 2 倍以上の発現上昇を確認した。

2) 消化器がん幹細胞の同定と解析

消化器癌幹細胞を、冬眠型の癌幹細胞（表面抗原 CD13+CD90-分画）と増殖型の癌幹細胞（表面抗原 CD13-CD90+分画）の 2 型の峻別に成功し、癌病巣では相互が移行し合うことで抗癌剤・放射線治療等に対するストレス耐性システムを担っていることを明らかにした。また CD13+CD90-癌幹細胞では、癌病巣中の低酸素領域（ニッチ）に特徴的な活性酸素種のスカベンジャー活性が高く、抗癌剤・放射線治療により誘導される遺伝子損傷を低レベルに抑制して生存することを明らかにし、この制御に関わる複数の責任分子（FBXW7, microRNAs など）を同定、癌幹細胞に於ける治療抵抗性のメカニズムの一端を明らかにした。またマウス転移モデルを用いた機能的スクリーニングにより、ヒト大腸がんの肝転移を制御するマイクロRNA、及び膜局在蛋白（インテグリン）を同定した。又、ヒト大腸がん標本から、スフェロイド継代培養によりがん幹細胞を樹立した。大腸がん幹細胞の解析により、幹細胞性が CD44 表面マーカーの発現に依存する事が明らかになった。さらに、培養スフェロイド細胞の一部において CD44 陰性から陽性細胞への移行が認められ、樹立したがん幹細胞が分化可塑性を有する事が強く示唆された。

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。さらに 5-FU 代謝に関わる酵素を解析したところ、dUTPase をコードする遺伝子である DUT のプロモーターが Wnt シグナルによって調節を受け、がん幹細胞における 5-FU 抵抗性に関わる可能性を同定した。

4) がん幹細胞に対しての特異的抗がん作用を有する薬剤のスクリーニング

固形がんでのがん幹細胞モデルを用いて、がん幹細胞の転移能、治療抵抗性に関しての検討を行った。その結果、作製がん幹細胞では、放射線感受性の低下および EMT (epithelial mesenchymal transition) を伴う転移能の亢進を認めた。

D. 考察：

1) 乳がん治療標的分子 RPN2 のがん幹細胞制御のメカニズム解明と前臨床試験

RPN2 の阻害はがん幹細胞の消失につながる。さらに RPN2 分子はがん幹細胞において、mutant p53 を制御することでその治療抵抗性を維持するメカニズムも明らかにした。今後は、前臨床試験の位置づけである、RPN2 陽性イヌの自然発生腫瘍での RPN2siRNA の治療効果を判定する過程に進む。

2) 治療抵抗性を克服するための標的分子の同定
CD13+CD90-癌幹細胞の CD13 分子を阻害することにより癌幹細胞の治療後生存が阻害され、個体レベルでの腫瘍の縮小に寄与できることを見出した。原発巣ニッチから逸脱して標的臓器に至り、新たなニッチを創成する転移の成立過程に於いて、CD13 分子の役割解明に発展させる。CD44 を標的にした核酸治療薬の開発を試みる可能性が生まれた。

3) がん幹細胞に対しての特異的抗がん作用を有する薬剤のスクリーニング

作製した、がん幹細胞モデルを用いて、抗がん剤ライブラリー、および製薬企業から提供をうけた天然化合物ライブラリー（共同研究契約締結にてすでに提供いただいている）を対象として、がん幹細胞に対しての特異的抗がん作用を有する薬剤のスクリーニングを検討する。

E. 結論：

平成 22 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) などの分子メカニズムの解析を進めるとともに、これらの標的分子の阻害剤の開発にも着手し、動物実験等での成果を上げた。今後はこれらの阻害剤を臨床に結びつけるための努力を継続する。

F. 健康危険情報：

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

- 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*. 2010, 18:181-187.
2. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*, 2010, 285:17442-17452.
 3. Ochiya T, Yamamoto Y, Banas A. Commitment of stem cells into functional hepatocytes. *Differentiation*, 2010, 79:65-73.
 4. Kawamata M, Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010, 107: 14223-14228.
 5. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 2010, 101: 2087-2092.
 6. Tanooka H, Tatsumi K, Tsuji H, Noda Y, Katsube T, Ishii H, Ootsuyama A, Takeshita F, Ochiya T. Mutant mouse *p53* transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther*, 2010, 17:1-10.
 7. Kosaka N, Izumi H, Sekine K, Ochiya T. microRNA as a new immune-regulatory agent in breast milk. *Silence*, 2010, 1: 7.
 8. Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, Inoue H, Tsurumaru M, Kajiyama Y, Kato H, Igaki H, Furuta K, Fujita H, Tanaka T, Tanaka Y, Kawashima Y, Natsugoe S, Setoyama T, Tokudome S, Mimori K, Haraguchi N, Ishii H, Mori M.: Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on oesophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*. 59:1457-1464, 2010
 9. 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* .138:1312-1320, 2010
 10. 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(1):40-45, 2010
 11. Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon JH, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, Mori M, Doki Y. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res*. 2010
 12. Uemura M, Yamamoto H, Takemasa I, Mimori K, Hemmi H, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Doki Y, Mori M. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin Cancer Res*, 16(18), 4636-4646, 2010
 13. Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Kim T, Doki Y, Mori M. Multidetector computed tomography for preoperative prediction of postsurgical prognosis of patients with extrahepatic biliary cancer. *J Surg Oncol*, 101:376-383, 2010
 14. Marubashi S, Nagano H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Monden M, Doki Y, Mori M. Evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in adult liver transplant recipients. *J Clin Pharmacol*, 50:705-709, 2010
 15. Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. TDGF1 is a novel predictive marker for metachronous metastasis of colorectal cancer. *Int J Oncol*, 36:563-568, 2010
 16. Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, Toh H, Onoyama I, Nakayama K, Baba H, Mori M. Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance. *Int J Cancer*, 126:1828-1837, 2010
 17. Yamamoto H, Hemmi H, Gu JY, Sekimoto M, Doki

- Y, Mori M. Minute liver metastases from a rectal carcinoid: A case report and review. *World J Gastro Surg*, 2(3):89-94, 2010
18. Nagai K, Ishii H, Miyoshi N, Hoshino H, Saito T, Sato T, Tomimaru Y, Kobayashi S, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Long-term culture following ES-like gene-induced reprogramming elicits an aggressive phenotype in mutated cholangiocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 395:258-263, 2010
 19. Yamashita T. et al., Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Res* 2010;70:4687-97.
 20. Takatori H. et al., dUTP pyrophosphatase expression correlates with a poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2010;30:438-46.
 21. Hodo Y, et al., Comprehensive gene expression analysis of 5'-end of mRNA identified novel intronic transcripts associated with hepatocellular carcinoma. *Genomics* 2010;95:217-23.
 22. Sunagozaka H, et al., Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2010 In press.
 23. Yamashita T et al. Chapter 16. Heterogeneity of Liver Cancer Stem Cells. In: *Molecular Genetics of Liver Neoplasia*. Springer New York 2010.
 24. 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*. 2010 17(2):198-212.
 25. Nakajima H, Ito M, Smookler DS, Shibata F, Fukuchi Y, Morikawa Y, Ikeda Y, Arai F, Suda T, Khokha R, Kitamura T. TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. *Blood*. 2010 116(22):4474-4482.
 26. Ando Y, Maida Y, Morinaga A, Burroughs AM, Kimura R, Chiba J, Suzuki H, Masutomi K, Hayashizaki Y. Two-step cleavage of hairpin RNA with 5' overhangs by human DICER. *BMC Molecular Biology* 2011, 12:6
 27. Maida Y, Masutomi K. RNA-dependent RNA polymerase in RNA silencing. *Biological Chemistry* 2011; 392: 299-304
 28. Horii T et al. Cell Reprogram. 12:551-563, 2010.
 29. Konno M, Hamazaki TS, Fukuda S, Tokuhara M, Uchiyama H, Okazawa H, Asashima M, Okochi H. Efficiently differentiating vascular endothelial cells from adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in serum-free culture. *Biochem Biophys Res Commun*. 400:461-5, 2010
2. 学会発表
- (海外)
- 1) Ochiya T. 「Discovery of RNAi Drugs Targeting Cancer Stem Cells」. World Cancer Congress 2010, Singapore. June 23-25
 - 2) Ochiya T. 「Secretory mechanisms and intercellular transfer of micro RNAs in living cells in vitro and in vivo」. International Workshop on EXOSOMES (IWE) 2011, paris. January 18-24
 - 3) Ochiya T. 「Secretory microRNAs in Cancer Development and Diagnosis」. IMolecular Mes TRI-CON 2011, San Francisco. February 22-28
 - 4) Yamashita T., Honda M., and Kaneko S. Signaling pathways responsible for self-renewal and differentiation in liver cancer stem cells. Japanese Cancer Association Annual Meeting 2010, Osaka, 2010.
 - 5) Yamashita T., Honda M., Nakamoto Y., Yamashita T., Arai K., Takatori H., Nio K., Hara Y., Takamura H., Tani T., Ikeda H., Zen Y., Wang X. W., and Kaneko S. Heterogeneity and Hierarchy of Cancer Stem Cells in Human Liver Cancer. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2010, Boston, 2010.
 - 6) Yamashita T, Honda M., Nio K., and Kaneko S. Oncostatin M renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-fluorouracil by inducing

- hepatocytic differentiation. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting 2010, Washington D.C., 2010.
- 7) Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., and Kitamura, T. 「TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
- 8) Enomoto, Y., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Izawa, K., Takai, Y., and Kitamura, T. 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg.」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
- 9) Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N., Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第39回国際実験血液学会 招待講演 2010年9月16日メルボルン
- 10) 榎本豊 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with mouseLMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg」2nd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE 2010年3月2日東京
- (国内)
- 1) 落谷孝広、「間葉系幹細胞の生物学的特性の解明と再生医療への応用」、日本医工学治療学会第26回学術大会 (2010.4.2-4 東京)
- 2) 落谷孝広 「microRNA によるがん幹細胞制御」、日本エピジェネティクス研究会第4回年会 (2010.5.27-30 米子)
- 3) 落谷孝広 「Micromanaging Cancer Stem Cells」、第11回Pharmaco-Hematology Symposium・講演 (2010.6.18-19 東京)
- 4) 落谷孝広 「がん転移計測技術と医療応用」、第20回日本サイトメトリー学会学術集会・講演 (2010.6.27 東京)
- 5) 落谷孝広 「Molecular Therapy Targeting Cancer Stem Cells」、第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会・講演 (2010.7.1-3 宇都宮)
- 6) 落谷孝広 「糖鎖修飾分子によるがん幹細胞制御の実態」、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会・講演 (2010.12.7-10 神戸)
- 7) 石井秀始、他：消化器癌の癌幹細胞研究、第19回 日本がん転移学会学術集会・総会、2010年6月16日～6月17日 金沢
- 8) 石井秀始、他：消化器の癌幹細胞、第69回 日本癌学術総会、2010年9月22日～9月24日大阪
- 9) 山下太郎、本多政夫、金子周一 Oncostatin Mを用いた幹細胞様肝癌の分化誘導療法の検討、日本肝臓学会総会、山形、2010年。
- 10) 沖俊彦、北村俊雄 「Screening of surface antigens on iPS cells with SST-REX」第8回幹細胞シンポジウム ポスター 2010年5月10日 淡路夢舞台国際会議場
- 11) 中原史雄、坂田(柳元)麻実子、北浦次郎、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉 滋、北村俊雄 「Hes1による造血前駆細胞の不死化と、慢性骨髄性白血病の急性転化誘導」第6回麒麟塾 口演 2010年6月5日 東京
- 12) 榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄 「A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月栃木
- 13) 榎本豊、北浦次郎、西村耕太郎、北村俊雄 「Development of new pMXs-based retrovirus vectors expressing shRNA」第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月 栃木
- 14) 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 「MiR125 induces hematological malignancies in vivo」第72回日本血液学会学術集会 プレナリー 2010年9月 横浜
- 15) 中村真樹、北村俊雄 「TSC-22の発現はRas/MAPKの活性化により上昇する」第69回日本癌学会学術総会 ポスター 2010年9月22日～24日大阪
- 16) 畑田他 第二回日本RNAi研究会 2010年8月27日 広島
- 17) 大河内仁志 教育講演12 皮膚の再生医療：現状と展望 皮膚の幹細胞と再生医療 第109回日本皮膚科学会総会、4月、大阪、2010
- 18) 2. 大河内仁志 皮膚は幹細胞の宝庫 組織幹細胞研究の最前線 第10回日本再生医療学会、3月、東京、2011
- H. 知的財産の出願・登録状況

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：石井秀始：三吉範克：土岐祐一郎：種村匡弘：星野宏光：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

2. 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

3. 実用新案登録 なし

4. その他 なし

消化器がんの癌幹細胞制御の研究
研究分担者 森 正樹 大阪大学 消化器外科

研究要旨

癌治療で重要な2点として、治療抵抗性と転移・再発に焦点をあることにより、両者に共通して関わる癌幹細胞の生物学的特徴の解明を実施した。かかる治療抵抗性および転移・再発に関わる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をすすめ、重要課題である転移・再発に関わる病態の解明を推進し、治療への応用に向けて基盤を構築した。

A. 研究目的

昨年度に得られた細胞表面抗原の候補の標的化の研究を進め、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) 転移・再発を特徴付ける細胞表面抗原の網羅的解析
- 3) 上記で同定した細胞表面抗原が関わる分子病態の解明
- 4) 低酸素下での癌幹細胞の動態
- 5) 活性酸素の制御
- 6) 治療への応用研究

B. 研究方法

昨年度までに細胞表面抗原の候補の標的化の研究を進めたところであるが、本年度はさらに癌幹細胞が転移・再発に関わる分子病態を解明し治療応用への基盤を構築した。

- 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) 転移・再発
転移・再発に関わる生物学的機構として上皮間葉系形質転換 (EMT) が知られている。本研究でも消化器癌幹細胞を特徴付ける細胞表面抗原 CD13, CD44, CD90 などの分子を標識として癌幹細胞を分離し、

EMT 現象の関与を試験管内および個体レベル (動物実験) で検討した。

4) 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。特異的な阻害剤の効果を検討した。

(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

前年度に引き続き、癌幹細胞の特徴を究明し、特に転移・再発に関わるメカニズムの解明、そこを作用点とする新しい治療法の開発に展開した。

- 1) 消化器癌幹細胞の同定と解析
消化器癌幹細胞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：休眠型癌幹細胞(d)CSC, 活性型癌幹細胞(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) EMT 現象

消化器癌幹細胞では活性酸素スカベンジャーの発現亢進により特徴的に活性酸素が低くもたれている。暴露および EMT 現象にともなって細胞内活性酸素の上昇が過度にならないように制御されていることが明らかとなった。

4) 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、データ数を増やして検討した。さらに EMT 現象として、VIM, aSMA, N-Cad など代表される分子で追跡したところ、ROS スカベンジャー経路を急激に遮断して活性酸素を上昇させると癌細胞に顕著な細胞死が誘導された。効果的な治療法を検討している。

D. 考察

昨年度に明らかにした如く、癌幹細胞は2種類の細胞群からなる応答システムで構築されている (dCSC と aCSC)。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。

消化器癌幹細胞では特徴的に活性酸素が低くもたれており、暴露および EMT 現象にともなって細胞内活性酸素の上昇が過度にならないように制御されていることが明らかとなった。この機構は、生命機能の作動原理に基づく生理的なストレス応答機構と考えられるが、癌幹細胞ではこの機構を逆手に取って抗癌剤や放射線治療後のストレスに耐えて生存し、危険なクローンが転移・再発を来すことが明らかとなった。

さらに本研究では、このようなクローンに特徴的に

発現する細胞表面蛋白質に対する特異的な阻害剤を用いることにより有効な治療効果を期待できる事につき CD13 を消化器癌の典型例として明らかにした。

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、転移・再発など癌の悪性度を特徴付ける病態解明、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) Tanaka F, Yamamoto K, Suzuki S, Inoue H, Tsurumaru M, Kajiyama Y, Kato H, Igaki H, Furuta K, Fujita H, Tanaka T, Tanaka Y, Kawashima Y, Natsugoe S, Setoyama T, Tokudome S, Mimori K, Haraguchi N, Ishii H, **Mori M**.: Strong interaction between the effects of alcohol consumption and smoking on oesophageal squamous cell carcinoma among individuals with ADH1B and/or ALDH2 risk alleles. *Gut*.59:1457-1464, 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* .138:1312-1320, 2010
- 3) 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(1):40-45, 2010
- 4) Hamano R, Miyata H, Yamasaki M, Kurokawa Y, Hara J, Moon JH, Nakajima K, Takiguchi S, Fujiwara Y, **Mori M**, Doki Y. Overexpression of miR-200c induces chemoresistance in esophageal cancers mediated through activation of the Akt signaling pathway. *Clin Cancer Res*. Epub ahead of print, 2010
- 5) Uemura M, Yamamoto H, Takemasa I, Mimori K, Hemmi H, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Doki Y, **Mori M**. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin Cancer Res*, 16(18), 4636-4646, 2010
- 6) Kobayashi S, Nagano H, Marubashi S, Wada H, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Kim T, Doki Y, **Mori M**. Multidetector computed tomography for preoperative prediction of postsurgical prognosis of patients with extrahepatic biliary cancer. *J Surg Oncol*, 101:376-383, 2010
- 7) Marubashi S, Nagano H, Kobayashi S, Eguchi H, Takeda Y, Tanemura M, Umeshita K, Monden M, Doki Y, **Mori M**. Evaluation of a new immunoassay for therapeutic drug monitoring of tacrolimus in adult liver transplant recipients. *J Clin Pharmacol*, 50:705-709, 2010
- 8) Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Sekimoto M, Doki Y, **Mori M**. TDGF1 is a novel predictive marker for

- metachronous metastasis of colorectal cancer.*Int J Oncol*, 36:563-568, 2010
- 9) Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, Takatsuno Y, Sato T, Toh H, Onoyama I, Nakayama K, Baba H, **Mori M.** Loss of FBXW7, a cell cycle regulating gene, in colorectal cancer: clinical significance.*Int J Cancer*, 126:1828-1837, 2010
- 10) Yamamoto H, Hemmi H, Gu JY, Sekimoto M, Doki Y, **Mori M.** Minute liver metastases from a rectal carcinoid: A case report and review.*World J Gastro Surg*, 2(3):89-94, 2010
- 11) Nagai K, Ishii H, Miyoshi N, Hoshino H, Saito T, Sato T, Tomimaru Y, Kobayashi S, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, **Mori M.** Long-term culture following ES-like gene-induced reprogramming elicits an aggressive phenotype in mutated cholangiocellular carcinoma cells.*Biochem Biophys Res Commun*, 395:258-263, 2010
2. 学会発表
- 19) 石井秀始、他：消化器癌の癌幹細胞研究、第19回 日本がん転移学会学術集会・総会、2010年6月16日～6月17日 金沢

- 20) 石井秀始、他：消化器の癌幹細胞、第69回 日本癌学術総会、2010年9月22日～9月24日大阪

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

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）
分担研究報告書

間葉系幹細胞マーカー検索と解析

分担研究者 東京大学医科学研究所 北村俊雄

研究要旨

多くの先進国においてがんによる死亡は死因の一位を占め、がんの早期診断早期治療は社会的にも重要な課題である。近年、がんの診断や治療は着実に進歩し早期発見によって完治するケースが多くなってきた。しかしながら早期診断が困難ながんは発見された時には既に根治が難しい、比較的早期に発見されても抗がん剤耐性で根治が難しい等の課題もある。これらの原因の一つとして、近年がん幹細胞の存在について積極的な議論がされている。また、分化する前の幹細胞と分化した後の組織細胞のがん化（がん細胞）において、一見離れたステージの細胞と考えられるが、未成熟期に発現する蛋白質が共通に発現しているなど、幹細胞とがん細胞の関係や機能は学術的にも興味深い。

本研究の目的は、幹細胞側の研究をテーマに、がん細胞との共通性、悪性度判定、予後判定など新しいがん治療法開発に向けた知見を見出す事にある。この成果により、幹細胞を制御する事で、既存の抗がん剤にはない機構で新しいがん治療を実現化する事を目標としている。

A. 研究目的

本研究の目的は、幹細胞側の研究をテーマに、がん細胞との共通性、悪性度判定、予後判定など新しいがん治療法開発に向けた知見を見出す事にある。この成果により、幹細胞を制御する事で、既存の抗がん剤にはない機構で新しいがん治療を実現化する事を目標としている。

B. 研究方法

本研究では、間葉系幹細胞（MSC: mesenchymal stem cell）を材料として SST-REX 法にて膜蛋白質・分泌蛋白質を解析し、その中からターゲット因子を絞り込み、モノクローナル抗体を開発した。また本研究では、組織染色法を用いて脳腫瘍を中心としたがん組織との交叉性を確認するため、ホルマリン固定した細胞を免疫することにより、組織染色で使用可能な抗体の開発も試みた。

本研究で使用する SST-REX 法（シグナルシーケンストラップ法）は、当研究室で開発した手法であり、材料とする細胞（cDNA ライブラリー）から、膜蛋白質・分泌蛋白質に特化して単離、解析できる技術である。本方法では、単離、解析すると同時に、各因子

を細胞膜上に発現させた、“蛋白質発現細胞”が樹立できる。これらの細胞をマウスに免疫することによってモノクローナル抗体を作製する。モノクローナル抗体のスクリーニングは、全てフローサイトメトリー法で行い、発現細胞の宿主は動物細胞由来であることから、実際の細胞膜上に発現する蛋白質を効率よく認識するモノクローナル抗体を効率良く作製することができる。

C. 研究結果

MSC のシグナルシーケンストラップを行い、MSC 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している SST クローンを樹立した。発現データベースなどによって興味深い発現分布を示す分子を提示する SST クローンを中心にモノクローナル抗体開発候補として選択した。選択した細胞を抗原固定化処理し、マウスに免疫することによりモノクローナル抗体を作製した。

1. 各種がん細胞株のシグナルシーケンストラップ法

我々は、MSC 細胞を用いて、膜蛋白質および分泌蛋白質の発現解析を行った。シグナルシーケン

トラップ法に使用したライブラリーは、力価： 1×10^6 、平均サイズ：1.0kbp の基準を満足する高品質のもの

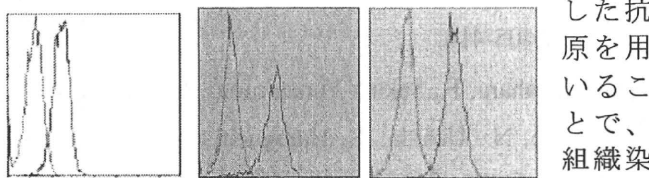
Table1 MSC 細胞による SST-REX 法

を使用した。178 クローンを得て、56 種類の遺伝子発現リストを作成した。得られた因子の特長を分別すると Table1 のとおりであった。

2. MSC 細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質に対するモノクローナル抗体作製

本研究プロジェクトの特徴は、マウス細胞がヒト癌細胞由来の膜蛋白質あるいは分泌蛋白質を一種類ずつ細胞表面に発現している SST クローンを免疫源として簡便にマウスモノクローナル抗体を作製する点である。

さらに今回、細胞を免疫原とする際に 10%ホルマリンで固定化し、固定化処理抗原を免疫原とする事、さらにはスクリーニングに用いる抗原も固定化処理



した抗原を用いることで、組織染色等の

変性抗原への反応性を有するよう工夫した。

抗 THB-2

抗 SMOC-1

抗 MRC-2

選択した抗原は、Thrombospondin-2 (THB-2)、SMOC-1、Mannose Receptor-2 (MRC-2) の 3 種類で、それぞれ得られた抗体の反応性を下記に示す。(赤のラインは、Isotype control を示し、青のラインが抗体反応を示す)。また、これらの抗体について、下記のがん細胞との交差反応性を評価した。

- ・ 胃がん細胞株：MKN1、GCIY
- ・ 脳腫瘍：T98G、U251、U857MG
- ・ 膵臓がん：AsPC1、BxPC3

局在分類	数
膜蛋白質	29 種類
分泌蛋白質	21 種類
Golgi 蛋白質	5 種類
ER 蛋白質	なし
不明	1 種類

- ・ 前立腺がん：Du145、PC3
- ・ 膀胱がん：T24

その結果、抗 THB-2 抗体では交差反応性を示さなかったものの、抗 SMOC-1 抗体、抗 MRC-2 抗体では、それぞれ U87MG、T98G といった脳腫瘍由来の細胞株に対して交叉反応性を示した。

3. 高集積がん組織アレイを利用した抗体評価

上記の抗体に関して実際の臨床サンプルにおける発現を調べるために、富山大学病理の福岡順也博士が作製した高集積がん組織アレイを利用する予定である。このアレイには各種がんの臨床サンプルがスライドあたり 1500 近く搭載されている。また、正常組織の標本もある。高集積がん組織アレイを利用して SMOC-1 および MRC-2 の発現分布を調べる前に、その準備段階として同じ固定法で作製した標本数の少ないアレイをパイロット実験で染色してみた。残念ながら、上記の抗体はこれらの標本の組織染色には使用できないか感度が弱いことが判明した。

この原因として作製したモノクローナル抗体は生細胞上に発現させた分子を認識するのに対して、組織アレイ標本はパラホルムアルデヒド固定されており抗原性が変化している可能性が考えられる。そこで同じ固定法で固定した抗原発現細胞を免疫源として、スクリーニングも固定細胞を利用してモノクローナル抗体を選別した。このような方法で、SMOC-1 および MRC-2 に対する複数のモノクローナル抗体を新たに樹立したので、今後高集積組織マイクロアレイに利用できるか検証する。

D. 考察

SST クローン免疫法によるモノクローナル抗体作製は、ほぼ順調に進んでいる。しかし、なかにはうまく作製できない場合があった。これらの事象に対しては、ラット細胞(Y3AG1,2,3)に蛋白質を発現させ、ラットに免疫する事によって得られるラットモノクローナル抗体の作製/検討を行う事で、ある程度の改善がみられる傾向は、過去の経験から確認している。

組織染色(パラフィン切片)に使用できるモノクローナル抗体の作製は困難であり、本研究でもそれほど多くの抗体を作製する事ができていない。今年度、固定化細胞を免疫源として作製したモノクローナル抗体の評価を含め、継続して組織染色に使用できるモノクローナル抗体の作成を行う。これらの抗体を利用して MSC 由来分子で、がんと交差反応性を示す分子の各種がん細胞における発現プロファイルを調べる予定である。

E. 結論

本年度は SST-REX 法により効率良く SST クローン(MSC 細胞由来膜蛋白質あるいは分泌蛋白質とヒトサイトカインレセプターMPL の細胞内、膜貫通ドメインの融合蛋白質を発現している Ba/F3 細胞)を樹立し得た。これらの SST クローンのうち一部をマウスに免疫することにより、効率良くモノクローナル抗体を作製することができた。

さらに、組織染色で使用できるよう工夫した新法にて、高集積がん組織アレイでの評価を可能とする事ができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

3. Yoshimi, Y., Goyama, S., Watanabe-Okochi, N., Yoshiki, Y., Nannya, Y., Nitta, E., Arai, S., Sato, T., Shimabe, M., Nakagawa, M., Imai, Y., Kitamura, T. and Kurokawa, M. (2011) Evi1 represses PTEN expression by interacting with polycomb complexes and activates PI3K/AKT/mTOR signaling. **Blood**, in press.
4. Lordier, L., Chang, Y., Jalil, A., Aurade, F., Garçon, L., Lécluse, Y., Larbret, F., Kawashima, T., Kitamura, T., Larghero, J., Debili, N. and Vainchenker, W. (2011) Aurora B is dispensable for megakaryocyte polyploidization, but contributes to the endomitotic process. **Blood**, in press.
5. Kato, N., Kitaura, J., Doki, N., Komeno, Y., Watanabe-Okochi N., Togami, K., Nakahara, F., Oki, T., Enomoto, Y., Fukuchi, Y., Nakajima, H., Harada, Y., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Two types of C/EBPa mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. **Blood** 117:221-233.
6. Nakajima, H., Ito, M., Smookler, D.S., Shibata, F., Fukuchi, Y., Morikawa, Y., Ikeda, Y., Arai, F., Suda, T., Khokha, R. and Kitamura, T. (2010) TIMP-3 recruits quiescent hematopoietic stem cells into active cell cycle and expands multipotent progenitor pool. **Blood** 116:4474-4482.
7. Enomoto, Y., Yamanishi, Y., Izawa, K., Kaitani, A., Takahashi, M., Maehara, A., Oki, T., Kajikawa, M., Takai, T., Kitamura, T., and Kitaura, J. (2010) Characterization of leukocyte mono-Ig receptor 7 (LMIR7)/CLM3 as an activating receptor: Its similarities to and differences from LMIR4/CLM5. **J. Biol. Chem.** 285: 35274-35283.
8. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., Kaitani, A., Komeno, Y., Nakamura, M., Yamazaki, S., Enomoto, Y., Oki, T., Akiba, H., Komori, T., Morikawa, Y., Kiyonari, H., Takai, T., Okumura, K., and Kitamura, T. (2010) TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b and LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury. **J. Exp. Med.** 207:1501-1511.
9. Minobe, K., Ono, R., Matsumine, A., Shibata-Minoshima, F., Izawa, K., Oki, T., Kitaura, J., Iino, T., Iwamoto, S., Hori, H., Komada, Y., Uchida, A., Hayashi, Y., Kitamura, T. and Nosaka, T. (2010) Expression of ADAMTS4 in Ewing's sarcoma. (2010) **Int. J. of Oncol.** 37:569-581.
10. 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.
11. 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. (2010) Hes1 immortalizes committed progenitors and plays a role in blast crisis transition in chronic myelogenous leukemia. **Blood** 115: 2872-2881.
12. 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** 24:1018-1024.

2. 学会発表

1. Yamanishi, Y., Kitaura, J., Izawa, K., and Kitamura, T. 「TIM1 is an endogenous ligand for LMIR5/CD300b: LMIR5 deficiency ameliorates mouse kidney ischemia/reperfusion injury」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
2. Enomoto, Y., Kitaura, J., Yamanishi, Y., Izawa, K., Takai, Y., and Kitamura, T. 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with LMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg.」第14回国際免疫学会議 ワークショップ 2010年8月神戸
3. Kitamura, T., Nakahara, F., Kato, N.,

Watanabe-Okochi, N., Komeno, Y., Doki, N., Togami, K., Uchida, T., Kagiya, Y., Inoue, D., Enomoto, Y., Oki, T., Harada, H., and Kitaura, J. Molecular Basis for AML, MDS and MPN 第39回国際実験血液学会 招待講演 2010年9月16日メルボルン

4. 榎本豊 「Comparative analysis of leukocyte mono-Ig-like receptor 7 (LMIR7)/CLM-3 with mouseLMIR4/CLM-5 as an activating receptor: lessons from association with FcRg」 2nd Symposium of the IMSUT & RCAST Global COE 2010年3月2日東京
5. 沖俊彦、北村俊雄「Screening of surface antigens on iPS cells with SST-REX」 第8回幹細胞シンポジウム ポスター 2010年5月10日 淡路夢舞台国際会議場
6. 中原史雄、坂田(柳元)麻実子、北浦次郎、加藤菜穂子、黒川峰夫、千葉 滋、北村俊雄「Hes1による造血前駆細胞の不死化と、慢性骨髄性白血病の急性転化誘導」第6回麒麟塾 口演 2010年6月5日 東京
7. 榎本豊、北浦次郎、園木孝志、中熊秀喜、北村俊雄 「A functional analysis of microRNA aberrantly expressed in leukemic cells」 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月栃木
8. 榎本豊、北浦次郎、西村耕太郎、北村俊雄 「Development of new pMXs-based retrovirus vectors expressing shRNA」 第16回日本遺伝子治療学会学術集会 ポスター 2010年7月 栃木
9. 榎本豊、島貫栄弥、畠山金太、谷脇雅史、麻生範雄、中熊秀喜、北村俊雄、園木孝志 「MiR125 induces hematological malignancies in vivo」 第72回日本血液学会学術集会 プレナリー 2010年9月 横浜
10. 中村真樹、北村俊雄 「TSC-22 の発現は Ras/MAPK の活性化により上昇する」 第69回日本癌学会学術総会 ポスター 2010年9月22日～24日 大阪

H. 知的財産権の出願・登録状況

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）
分担研究報告書

消化器系がん幹細胞の解析

研究分担者 岡本 康司 国立がん研究センター研究所 分野長

研究要旨

これまでの研究により、大腸がん肝転移に抑制的に働く新規マイクロ RNA を同定したが、同定した転移抑制マイクロ RNA (mir-X) の発現解析及び機能解析を行った。発現解析の結果、mir-X の発現は肝転移と逆相関していた。又、mir-X の発現は IGF1R の誘導及び肝転移がん細胞の細胞死を誘導する事が示された。これらの結果より、mir-X の診断、治療における有用性が示唆された。さらに、前年度樹立した大腸がん幹細胞のスフェロイド継代培養系の解析をすすめ、スフェロイド中に2種類のがん幹細胞が存在しそれらの間に可逆的移行が起きている事を発見した。

A. 研究目的

前年度に同定した大腸がん肝転移を抑制する新規マイクロ RNA 因子 (mir-X) の機能解析及び発現解析を進め、mir-X の転移診断、及び転移治療における重要性を検討する。又、前年度樹立した大腸がん幹細胞のスフェロイド継代培養系の解析をすすめ、明らかになってきた大腸がん幹細胞の分化可塑性の研究をさらに進める事により、がん幹細胞の本態解明及び臨床応用を目標とする。

B. 研究方法

1. 前年度同定した、転移抑制的マイクロ RNA である mir-X の発現解析等を行った。
2. 前年度同定した、転移抑制的マイクロ RNA である mir-X の転移抑制メカニズムの解析を行った。
3. 前年度樹立した、ヒト手術検体由来の大腸がん幹細胞の in vitro スフェロイド培養系を用い、大腸がん幹細胞の生物学的性質の詳細な検討をおこなった。

(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. mir-X の大腸がん及びヒト原発大腸がん標本における発現解析を行った。用いた大腸

がん細胞株の全て(7株)において、発現が認められなかったのに対し、大腸正常粘膜由来の細胞で発現が認められた。ヒト原発がんでは、肝転移(+)の症例において、mir-X の有意な低下が認められた。

2. Mir-X の誘導により、肝転移がん細胞の細胞死が誘導される事が示された。又、ターゲット遺伝子の検索の結果、IGF1R が mir-X により、直接抑制される事が示された。これらの結果より、mir-X は IGF1R 等の抑制を介した細胞死の誘導により、肝転移を抑制すると考えられた。

3. 複数の大腸スフェロイド細胞を検討した結果、これらの細胞の大部分は CD133 陽性細胞であるが、その中でも CD44 高発現細胞と低発現細胞に分かれる事が示された。免疫不全マウスを用いた検討により、CD44 高発現細胞は造腫瘍能を有し、又形成された腫瘍は原発症例と同じ腺管形成病理像を示す事等より、CD44 高発現細胞は典型的ながん幹細胞であると考えられた。一方、CD44 低発現細胞も CD44 高発現細胞の約 1/10 程度の腫瘍能を有し、異形性の強い腺管形成病理像を示した。興味深い事にスフェロイド中において、高発現細胞と低発現細胞は互いに移行し、がん幹細胞は CD44 高発現型と低発現型の間を遷移していると考えられた。

D. 考察

これまでにながん肝転移の抑制因子として働くマイクロ RNA の報告はなく、これまでの我々の研究結果より、mir-X は、臨床応用上重要な役割を担う可能性が考えられた。

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。またスフェロイド中に複数の種類のがん幹細胞が存在

する事は今後の治療戦略の構築上大きな意味を持つと考えられる。

E. 結論

転移抑制に働く新規マイクロ RNA として mir-X を同定した。mir-X は肝転移症例で低下しており、大腸がん肝転移の診断、治療の双方で有用である可能性が示唆された。又、大腸がん幹細胞の解析により得られた知見は、がん幹細胞をターゲットとした新たな治療戦略の礎となりうると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

M. Izumiya, K. Okamoto, N. Tsuchiya, H. Nakagama: Functional screening using a microRNA virus library and microarrays: a new high-throughput assay to identify tumor-suppressive microRNAs.

Carcinogenesis, 31, 1354-1359 (2010)

2. 学会発表

1. 第 69 回日本癌学会学術総会「大腸がん転移を抑制する新規因子の同定及び解析」(平成 22 年 9 月、大阪市)

2. 第 19 回日本がん転移学会学術集会「大腸がん肝転移を抑制に働くマイクロ RNA 及び shRNA の機能的スクリーニング」(平成 22 年 6 月、石川県)

3. 第 120 回ゲノム医学研究センター学術集会「大腸がん細胞の転移能及び幹細胞性の制御メカニズムの解析」(平成 23 年 2 月、埼玉県日高市)

研究要旨

本研究の目的は、MLLタンパク質によって造血幹細胞の幹細胞性が維持されるメカニズム及びMLL融合タンパク質ががん幹細胞性を獲得するメカニズムを解明する事である。

A. 研究目的

正常造血および白血病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する。

B. 研究方法

MLLが造血細胞の幹細胞制御においてどのように働きをしているかを遺伝子改変マウスを用いて調べる。また、MLL融合タンパク質によるがん幹細胞性の獲得のメカニズムをマウス白血病モデルにて調べる。

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った。

C. 研究結果

前年度はMLL融合遺伝子産物が野生型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事を明らかにした。今年度はMLL欠損マウスを用いて正常のMLLによる幹細胞制御を調べた結果、MLLは造血幹細胞の幹細胞性の維持は必要だが、分化には必要ない事を見いだした。さらに、野生型のMLLは特殊な分解制御を受けるが、MLL融合タンパク質はその制御を免れる事を見いだした。

D. 考察

MLLの働きは幹細胞性の維持に特化している事が分かった。また、分化の進行に伴ってMLLの活性は抑制されると思われるが、その時、MLLは前述の分解制御

を受けているかもしれない事が示唆された。

E. 結論

本来MLLは幹細胞性を維持する働きがあるが、その活性は分化の進行に伴って低下する。一方で、異常なMLL融合タンパク質は恒常的に幹細胞性を維持するために白血病を引き起こす。治療法の開発には正常のMLLによる幹細胞制御を完全に損なう事なくMLL融合タンパク質の活性を制御する方法を見いだす必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

*Yokoyama A, Ficara F, Murphy M, Meisel C,

Naresh A, Kitabayashi I, *Cleary ML Proteolytically

cleaved MLL subunits are susceptible to distinct

degradation pathways. **J Cell Sci.** (2011)

in press *co-corresponding author

2. 学会発表

キーストーンシンポジウム

(2010, Montana, USA)

日本癌学会

(2010, 大阪)

日本血液学会

(2010, 横浜)

日本分子生物学会

(2010, 神戸)

間葉系幹細胞を用いた肝発がん抑制効果の研究

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

近年正常組織と同様に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）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。これまで我々は、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、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 陽性細胞ががん幹細胞の特徴を示し高い浸潤、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などを同定した。さらに本研究において、我々は EpCAM 陽性肝がんにおける核酸代謝経路の遺伝子発現パターンを解析し、ヌクレオチドプールを調整している DUT 遺伝子が高発現していること、Wnt シグナルが DUT 遺伝子のプロモーター活性を調節していること、DUT 遺伝子の発現抑制によりがん幹細胞の 5-FU 抵抗性が改善することを同定した。本研究の成果から、DUT はがん幹細胞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

肝細胞がんは全世界で年間約 62 万人が罹患し、発症率としては第 5 位、がん死亡原因としては第 3 位に位置している。肝細胞がんの殆どは B 型もしくは C 型慢性肝炎、肝硬変を背景に発症する。肝発がんのメカニズムとしてはウイルス蛋白そのものに加えて、繰り返し壊死、炎症、再生過程を背景に遺伝子異常が蓄積され、前がん病変から高分化型肝がん、進行肝がん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）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。肝細胞がんにおいてもいくつかの幹細胞マーカーを用いたがん幹細胞の分離同定が行われ、NOD/SCID 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た。さらに、がん幹細胞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、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 陽性細胞ががん幹細胞の特徴を示し高い浸潤、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、5-FU などの抗がん剤に対し抵抗性を示す事などを同定した。しかしながら、

EpCAM 陽性 AFP 陽性がん幹細胞がなぜ抗がん剤抵抗性を示すのか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、5-FU 代謝に関わる遺伝子の発現についてがん幹細胞とそれ以外の細胞に分類して解析を行った。さらに我々はがん幹細胞において高発現している遺伝子の発現抑制ががん幹細胞の 5-FU 感受性にどのような影響を与えるかについても解析を行った。

B. 研究方法

サンプル 臨床サンプルとして、金沢大学附属病院で肝切除が行われた合計 107 例の肝細胞がんおよび背景肝組織を免疫組織化学解析に用いた。また、ヒト胎児肝組織については市販の tissue array を用いて解析を行った（BioChain Institute, Inc., Hayward, CA）。培養細胞は HuH1, HuH6, HuH7, Hep3B, HLE, HLF, SK-Hep-1 細胞を用い、DMEM-10%FBS 培地で培養した。

免疫組織化学および蛍光免疫染色 ホルマリン固定肝細胞がん標本を用いて EpCAM, dUTPase 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 dUTPase 抗体 (Abcam)、抗 EpCAM 抗体 VU1D9 (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) で免疫染色を施行した。蛍光免疫染色の 2 次抗体には Alexa-488 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

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、赤血球を溶血破碎後に 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。抗体は抗 EpCAM 抗体 BerEP-4 (DAKO) を用いた。

ルシフェラーゼリポーターアッセイ DUT 遺伝子のプロモーター活性については pGL3-DUT plasmid, pRL-SV40 plasmid および Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて解析を行った。また、Wnt シグナルの活性化には低分子化合物である BIO および MeBIO を用いた。

(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

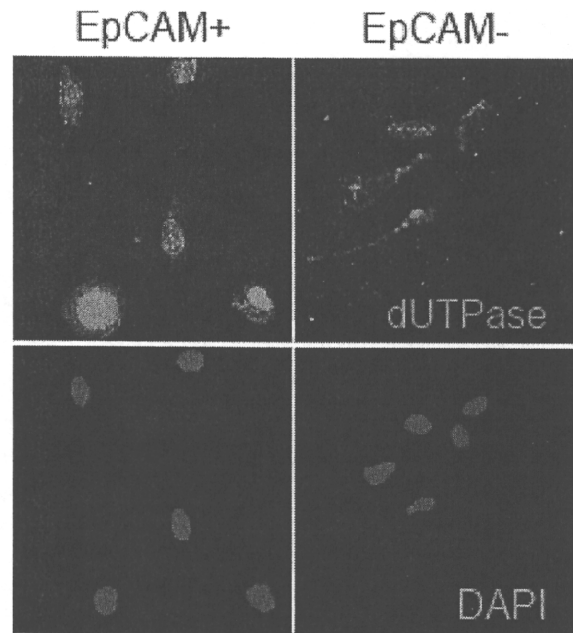
(①遺伝子、転写産物、蛋白発現解析について、②研究の目的・方法、③研究用サンプルを提供することに伴う危険性及び利益、④同意撤回及びサンプルの廃棄、⑤プライバシーの保護及び機密保持、⑥経済的な利益等の項目)、研究協力への同意が得られた患者のサンプルを解析に用いた。

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

HuH1 および HuH7 細胞において 5-FU を $2.5\mu\text{M}$ で 3 日間投与したところ、いずれの細胞でも EpCAM 陽性細胞分画の増加が認められた。そこで、各細胞において EpCAM 陽性細胞と陰性細胞に分離し、TYMS, DPYD, UMPS, TK1, DUT などの 5-FU 代謝に関わる遺伝子群につきリアルタイム RT-PCR で解析を行ったが、両者に統計的に有意な遺伝子発現変動は認められなかった。一方、これらの遺伝子のなかで DUT は dUTPase というヌクレオチドプールを調節する酵素をコードし、mitochondria isoform と nuclear isoform の 2 つのスプライスヴァリエントの存在が報告されていたため、この遺伝子についてはさらに蛋白量について蛍光免疫染色にて検討を行った。すると、興味深いことに細胞質内に認められる dUTPase の量は EpCAM 陽性、陰性細胞で特に変化が認められない一方、核内に認められる dUTPase は EpCAM 陰性細胞ではほとんど認められず、EpCAM 陽性細胞でのみ認められた (図 1)。

図 1 EpCAM 陽性、陰性細胞における dUTPase の発現パターン (蛍光免疫染色)



EpCAM 陽性細胞では核内に強い nuclear dUTPase isoform の発現が認められる。

次に組織アレイを用いて胎児肝組織と成人肝組織における dUTPase の発現を免疫組織化学で検討したところ、nuclear dUTPase は胎児肝の hepatoblast では認められたが成人肝の hepatocyte では認められなかった。興味深いことに EpCAM の発現も同様に検討したところ、EpCAM と nuclear dUTPase の発現は hepatoblast でのみ認められた。そこで、さらに 107 例の肝細胞がん組織における EpCAM と dUTPase の発現につき免疫組織化学で検討したところ、38 例が EpCAM 陽性、39 例が nuclear dUTPase 陽性の肝細胞がんであった。EpCAM と dUTPase の発現には統計的に有意な正の相関が認められた ($P = 0.012$)。

次に、dUTPase の 2 つのスプライスヴァリエントの発現がどのように調節されているか、特に nuclear isoform のプロモーター領域について着目すると、nuclear isoform の転写開始点の上流 240 塩基の領域に TCF/ β -catenin 結合領域が存在していることが判明した。実際に我々は EpCAM 陽性肝がんにおいては Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が認められることをこれまでに報告しており、nuclear isoform が EpCAM 陽性肝がん細胞で特に強く誘導されているメカニズムの一つとしてプロモーターを介したスプライスヴァリエントの転写調節が関与している可能性が示唆された。そこで、小分子化合物で GSK3- β 活性を阻害する BIO と阻害活性を持たない Me-BIO を用いて HuH7 細胞で検討したところ、 $2.5\mu\text{M}$ の BIO で 3 日間処理後、nuclear dUTPase 発現の著明な上昇が認められたが cytoplasmic dUTPase に特に変動はなく、かつ MeBIO 処理では nuclear dUTPase の発現に有意な変動は認められなかった (図 2)。

図 2 Wnt シグナル伝達系による dUTPase の発現調節 (蛍光免疫染色)