

201118001A

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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 落谷 孝広

平成24(2011)年5月

(1冊)

# 目 次

I. 総括研究報告	1
幹細胞制御によるがん治療法開発のための基盤研究	
落谷 孝広	
II. 分担研究報告	9
1. 消化器がんの癌幹細胞の研究	
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	
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	
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	
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	
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	
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	
畑田 出穂	
8. がん幹細胞モデル構築とそれを用いての薬剤スクリーニング	
大岡 静衣	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	27
IV. 研究成果の刊行物・別刷	31

## I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）  
総括研究報告書

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。H23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、核酸医薬の前臨床試験を開始するなど、本研究事業から2件が臨床試験へ向けた準備に入る事が確定するなど、医療応用へ大きく前進する成果を上げた。

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

大岡静衣・国立がん研究センター・研究員

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

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も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に関しては、核酸医薬開発の前臨床試験として、大型動物のイヌの自然発生乳腺腫瘍症例での治療実験を4例実施した。特に、核酸医薬投与によるRPN2遺伝子の発現経過と、腫瘍の組織学的観察を主に行なった。さらに、核酸医薬合成に関する情報を収集し、前臨床試験に必要な準GLP規格での核酸合成に適合する化学合成プラントを有する企業の選定などに時間を要した。またトリプルネガティブ乳がん患者124症例を、国立がん研究センター中央病院の協力の下に実施し、RPN2発現とmtp53発現や、予後相関等を総合的に検討した。RPN2の分子メカニズムの完全解明に当たっては、国立がん研究センター研究所

のチームがあたり、GSK3beta を介した mtp53 の核内安定化に RPN2 が寄与する事を明らかにした。大型動物の前臨床試験は、連携研究者である東京農工大学の動物医療センターのチームによる協力のもとに実施された。(落谷孝広)

2) 森らは細胞表面抗原を詳細に解析することにより、細胞周期静止期にある癌幹細胞 (dCSC: CD13+CD90-) と増殖期にある癌幹細胞 (aCSC: CD13+CD90+) に峻別できることを明らかにした。本年度は特に細胞周期静止期にある癌幹細胞における DNA 損傷修復を研究し、従来の抗癌剤による genotoxic therapy (増殖盛んな癌細胞の DNA 損傷誘導を作用点とした治療法) では、dCSC において相同組み替え (HR) 型より末端結合 (NHEJ) 型損傷修復が相対的に優位に働き、変異は発生し易いことを明らかにした。また CD13 蛋白質機能は ROS を低く保つように作用し、そのために転移細胞が生存し続けて標的臓器でコロニーを形成することが明らかとなり、転移の根源としての dCSC を治療標的化することの重要性が示された。さらに CD13 機能阻害剤である Ubenimex 投与により、ROS が上昇、転移性 CSC が死滅することが明らかとなった。肝臓癌を対象として従来の 5-FU/IFN による殺細胞治療に加えて、CD13 機能阻害効果がある Ubenimex を加える臨床治験を開始するために倫理委員会の申請等必要な手続き中である。(森正樹)

3) 金子らは CDNA ライブラリースクリーニングを実施し、iPS 細胞特異的な膜蛋白、分泌蛋白を 40 種同定。各種データベースサーチにより、このうち iPS・ES 細胞特異的な発現が予測される 20 種類を選択、RT-PCR により、特異性を解析した。3 種類が、かなり iPS 細胞特異的であると考えられた。この 3 種類の大量発現した細胞株を抗原として、マウスもしくはラットモノクローナル抗体を作成、反応性の良いものをそれぞれ 1 種~2 種精製した。精製抗体を用いて、大量発現体及び iPS 細胞の反応性を解析し、どの抗体も iPS 細胞特異的な認識をすることを確認した。また 3 種類の分子につき、MEF に oct4, sox2, klf4, c-myc でリプログラミングする際に、同時に発現ベクターもしくは shRNA 用ベクターを導入し、その効率の差を比較した。3 種の分子のうち 1 種の分子の大量発現により、リプログラミング活性が向上すること、また shRNA ベクターの導入により、その効率が低下することが判明した。(金子周一)

4) ヒト大腸がん検体を用い、転移抑制マイクロ RNA の発現解析をリアルタイム定量 PCR 法にて行った。また、大腸がん由来のスフェロイド細胞、及び細胞株の解析を、フローサイトメトリー、ウェスタン法、定量 PCR 等により行った。(岡本康司)

5) MLL タンパク質が適切に分子内結合出来ない

遺伝子改変マウスとプロセッシングされない遺伝子改変マウスを作製し、解析した。その結果、プロセッシングは正常に起こるが分子内結合が出来ない変異体は転写活性化能及び造血幹細胞の自己複製能が著しく低下している事が、分子内結合は出来るがプロセッシングは受けない変異体は正常な転写活性化能と自己複製能を持つことが分かった。(横山明彦)

6) 固形がんでのがん幹細胞モデルを用い、がん幹細胞の *in vitro* 薬剤抵抗性スクリーニング系の確立に成功した。作製がん幹細胞モデルを用いて解明した、がん幹細胞維持に重要な分子群が、有糸分裂期に複合体を形成し、正常な細胞分裂進行に寄与することを明らかにした。(大岡静衣)

7) CDNA ライブラリースクリーニングを実施し、iPS 細胞特異的な膜蛋白、分泌蛋白を 40 種同定した。各種データベースサーチにより、このうち iPS・ES 細胞特異的な発現が予測される 20 種類を選択 RT-PCR により、特異性を解析した。3 種類が、かなり iPS 細胞特異的であると考えられた。この 3 種類の大量発現した細胞株を抗原として、マウスもしくはラットモノクローナル抗体を作成、反応性の良いものをそれぞれ 1 種~2 種精製した。精製抗体を用いて、大量発現体及び iPS 細胞の反応性を解析し、どの抗体も iPS 細胞特異的な認識をすることを確認した。また 3 種類の分子につき、MEF に oct4, sox2, klf4, c-myc でリプログラミングする際に、同時に発現ベクターもしくは shRNA 用ベクターを導入し、その効率の差を比較した。3 種の分子のうち 1 種の分子の大量発現により、リプログラミング活性が向上すること、また shRNA ベクターの導入により、その効率が低下することが判明した。(北村俊雄)

8) 癌幹細胞を多く含む薬剤耐性の癌細胞で共通して発現上昇しているマイクロ RNA をみつけ、その発現パターンがメチル化を制御する遺伝子と逆相関することをみいだした。そこでそれらのメチル化制御をおこなう遺伝子の 3'ノンコーディングを探すとマイクロ RNA のターゲットサイトが存在した。レポーター実験による結果では、このマイクロ RNA が一連のメチル化制御遺伝子を抑制していた。(畑田出穂)

9) 実験にはヒト膵臓がん由来の細胞株 AsPC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2, Panc-1 を用いた。前 2 者は高転移株とされ、後 2 者は低転移株とされている。各細胞株 100 万個と脂肪由来の培養間葉系細胞 50-150 万個を混合して、ヌードマウスの皮下に注射し、4 週間経過を観察した。経時的に腫瘍の大きさを測定し、腫瘍体積を長径 x 短径 x 短径 x 0.5 で計算した。4 種類の細胞株のうち MiaPaCa-2 のみが間葉系幹細胞の存在下で明らかに増殖の促進が見られた。また同様な実験を腹腔内投与でも行い、結果を解析中である。In vitro で癌細胞と間

葉系幹細胞の共培養を行い、腫瘍細胞の増殖に与える影響も検討したが、これまでのところ明らかな増殖促進作用は認められていない。アルギニンが11個連結したものは膜透過ドメインとよばれ、細胞に蛋白を導入する際に重要な役割を果たす。しかし転写因子の Sox2 や Oct3/4 に結合させると転写活性は低下する。ところが、細胞内で TEV(tobacco etch virus)由来の蛋白分解酵素により膜透過ドメインを切断すると、転写活性が高まることをマウス ES 細胞のコロニーアッセイ系を用いて証明した。(大河内仁志)

#### D. 考察：

1) RPN2 の核酸医薬に関しては、主任研究者の所属する国立がん研究センターが、厚生労働省による「早期・探索的臨床試験拠点整備事業」の拠点の1つとして選定され、本研究事業である第三次対がん総合戦略の研究成果である RPN2 核酸医薬によるトリプルネガティブ乳がんの治療が正式に採用された。今後、臨床応用に向けて、本事業の基礎研究成果が大いに活用される段階に入った。(落谷孝広)

1) 転移・再発の根源となる CSC 細胞を根絶するためには CD13 機能を阻害する治療戦略が有効であることから、肝臓癌を対象として従来の 5-FU/IFN による殺細胞治療に加えて、CD13 機能阻害効果がある Ube nimex を加える臨床治験を開始するために倫理委員会の申請等必要な手続きの整備に着手した。CD13 分子を標的化する新しい治療法は国立大学法人大阪大学の知的財産としても整備をすすめ、現在 JST 支援を得て海外指定国申請の段階にある(特願 2010-43353; 国際出願番号: PCT/JP2011/054287)。今後は CD13 分子での成功例を踏まえて、市販のほぼ全ての抗体を搭載した細胞膜に特化した網羅的発現解析による CSC の高精度の絞り込み研究を進めている。(森正樹)

3) 一般的に細胞における幹細胞性と抗がん剤抵抗性は密接な関連を示すが、その関連の詳細な機序は完全には解明されていない。本研究で金子らは核酸代謝経路の一部である dUTPase ががんや臓器発生シグナルのひとつである Wnt によって調節されている可能性を示しており、核酸代謝調節が発生シグナルによって直接制御を受けている可能性を示唆した。さらに dUTPase 活性化は肝細胞がんの外科切除例における予後不良および 5-FU 抵抗性に関わる可能性が示され、本研究成果により今後 dUTPase を用いた肝細胞がん外科切除例の予後予測、術後のアジュバント化学療法における治療薬選択に有用な情報を提供できる可能性がある。(金子周一)

4) 同定した新規がん転移抑制マイクロRNAの大腸がん肝転移における診断における有用性を

検証するとともに、マイクロRNA投与による治療的応用に向けた検討を開始する。又、大腸がん幹細胞を標的とした治療法開発にむけて、小分子化合物スクリーニングのプラットフォーム構築の準備を進める。(岡本康司)

5) これまでの結果から、MLL や MLL 融合タンパク質が幹細胞性を維持するために必要な様々なファクターが明らかになってきた。これらの知見は、将来的に造血幹細胞や白血病幹細胞の活性を制御する手法の開発に役立つ。新たに明らかにした成果は論文として発表し、実験材料は発表後無償で提供する。MLL は幹細胞性を維持するが、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。治療法開発には正常の MLL による幹細胞制御を完全に損なうことなく MLL 融合タンパク質の活性を抑制する方法を見いだす必要がある。今後、両者の制御メカニズムをさらに詳細に調べる必要がある。(横山明彦)

6) がん幹細胞維持に重要な分子群が有糸分裂期に重要な働きをすることから、有糸分裂期に作用する薬剤が、がん幹細胞標的薬の最有力候補である。in vitro 培養系の樹立により、今後の大腸がん幹細胞の解析が容易になると期待され、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。又、本実験結果より、miR-493 は、臨床応用上重要な役割を担う可能性が考えられた。

(大岡静衣)

7) 得られた3種類の抗原に対する抗体の染色性については、iPS 細胞を特異的に染めることが可能であったものの、感度は比較的弱かった。抗体の有用性を高めるため、ビオチン化抗体の作成など抗体の最適化を現在検討している。また LECT1 の発現に伴うリプログラミング効率の増強は、LECT1 が表面抗原であるため何らかのリセプターとの相互作用を介し、細胞内シグナルが活性化された可能性が考えられる。現在この分子の可溶性発現体や抗体を用いリプログラミング効率化の機構の解析を試みている。(北村俊雄)

8) アンチセンス鎖を用いて幹細胞特異的のマイクロRNAを抑制することによりDNAメチル化を変化させ癌幹細胞の性質を抑制する可能性を模索したい。(畑田出穂)

9) 癌細胞株と間葉系幹細胞の同時移植で血管新生による腫瘍の増殖促進効果が見られるのではないかと考えたが、細胞株の種類によって間葉系幹細胞に対する反応が異なることが示唆された。また間葉系幹細胞の数については腫瘍細胞の増殖にとって至適な条件が存在する可能性が示唆された。腹腔内投与の結果がまだ確定していないので、結論的なことは述べられないが、今後がん患者に間葉系幹細胞を投与する際の問題点が明

らかになる可能性がある。(大河内仁志)

#### E.結論:

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、核酸医薬の前臨床試験を開始するなど、本研究事業から2件が臨床試験へ向けた準備に入る事が確定するなど、医療応用へ大きく前進する成果を上げた。

#### 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. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*, in press
2. Kawamata M, Ochiya T. Gene-manipulated embryonic stem cells for rat transgenesis. *Cell Mol Life Sci*, 68:1911-1915, 2011
3. Murakami Y, Toyoda H, Tanaka M, Kuroda M, Harada Y, Matsuda F, Tajima A, Kosaka N, Ochiya T, Shimotohno K. The progression of liver fibrosis is related with overexpression of the miR-199 and 200 families. *PLoS One*, 6:e16081, 2011
4. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Mol Ther*, 19:1123-1130, 2011
5. Takahashi RU, Takeshita F, Fujiwara T, Ono M, Ochiya T. Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers*, 3:1311-1328, 2011
6. Xu D, Takeshita F, Hino Y, Fukunaga S, Kudo Y, Tamaki A, Matsunaga J, Takahashi RU, Takata T, Shimamoto A, Ochiya T, Tahara H. miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. *J Cell Biol*, 193:409-424, 2011
7. Yamamoto Y, Yoshioka Y, Minoura K, Takahashi RU, Takeshita F, Taya T, Horii R, Fukuoka Y, Kato T, Kosaka N, Ochiya T. An integrative genomic analysis revealed the relevance of microRNA and gene expression for drug-resistance in human

- breast cancer cells. *Mol Cancer*, 10:135, 2011
8. Kawamata M, Ochiya T. Establishment of embryonic stem cells and generation of genetically modified rats. In: Craig A (ed), *Methodological Advances in the Culture*. Croatia, InTech, pp 383-396, 2011
9. Kim HM, Haraguchi N, Ishii H, Ohkuma M, Okano M, Mimori K, Eguchi H, Yamamoto H, Nagano H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Increased CD13 Expression Reduces Reactive Oxygen Species, Promoting Survival of Liver Cancer Stem Cells via an Epithelial-Mesenchymal Transition-like Phenomenon. *Ann Surg Oncol*. 2011 Aug 31. [Epub ahead of print]
10. Dewi DL, Ishii H, Kano Y, Nishikawa S, Haraguchi N, Sakai D, Satoh T, Doki Y, Mori M. Cancer stem cell theory in gastrointestinal malignancies: recent progress and upcoming challenges. *J Gastroenterol*. 2011 Oct;46(10):1145-57. Epub 2011 Aug 20.
11. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, Nishikawa S, Tanemura M, Mimori K, Tanaka F, Saito T, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Ikeda M, Yamamoto H, Sekimoto M, Doki Y, Mori M. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*. 2011 Jun 3;8(6):633-8.
12. Ohkuma M, Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Kim HM, Shimomura M, Hirose H, Yanaga K, Mori M. Absence of CD71 Transferrin Receptor Characterizes Human Gastric Adenosquamous Carcinoma Stem Cells. *Ann Surg Oncol*. 2011 Apr 27. [Epub ahead of print]
13. Haraguchi N, Ishii H, Nagano H, Doki Y, Mori M. The future prospects and subject of the liver cancer stem cells study for the clinical application. *Gastroenterology*. 2011 Feb 23. [Epub ahead of print] No abstract available.
14. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells.
15. Haraguchi N, Ishii H, Mimori K, Tanaka F, Ohkuma M, Kim HM, Akita H, Takiuchi D, Hatano H, Nagano H, Barnard GF, Doki Y, Mori M.
16. *J Clin Invest*. 2010 Sep 1;120(9):3326-39. doi: 10.1172/JCI42550. Epub 2010 Aug 9.
17. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y,

- Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A.
18. *Nat Med.* 2011 Jul 31;17(8):944-51. doi: 10.1038/nm.2392.
  19. M Kudo, K Imanaka, N Chida, K Nakachi, WY Tak, T Takayama, JH Yoon, T Hori, H Kumada, N Hayashi, S Kaneko, H Tsubouchi, DJ Suh, J Furuse, T Okusaka, K Tanaka, O Matsui, M Wada, I Yamaguchi, T Ohya, G Meinhardt, K Okita. Phase III study of sorafenib after transarterial chemoembolisation in Japanese and Korean patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Eur J Cancer* 47(14):2117-27, 2011 Sep.
  20. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers.
  21. Kogo R, Shimamura T, Mimori K, Kawahara K, Imoto S, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Suzuki A, Komune S, Miyano S, Mori M. *Cancer Res.* 2011 Oct 15;71(20):6320-6. Epub 2011 Aug 23.
  22. Yokoyama A, Ficara, F., Murphy, M. J., Meisel, C., Naresh, A., Kitabayashi, I., and \*Cleary, M. L. Proteolytically cleaved MLL subunits are susceptible to distinct degradation pathways. *J Cell Sci* 124, 2208-2219.(2011)
  23. Yokoyama A Molecular mechanisms of leukemogenesis in MLL-leukemias. *Rinsho Ketsueki* 52, 679-685.(2011)
  24. A Kitao, O Matsui, N Yoneda, K Kozaka, R Shinmura, W Koda, S Kobayashi, T Gabata, Y Zen, T Yamashita, S Kaneko, Y Nakanuma. The uptake transporter OATP8 expression decreases during multistep hepatocarcinogenesis: correlation with gadoxetic acid enhanced MR imaging. *Eur Radiol* 21(10):2056-66, 2011 Oct.
  25. H Sunagozaka, M Honda, T Yamashita, R Nishino, H Takatori, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, S Kaneko. Identification of a secretory protein c19orf10 activated in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 129(7):1576-85, 2011 Oct.
  26. Y Tanaka, M Kurosaki, N Nishida, M Sugiyama, K Matsuura, N Sakamoto, N Enomoto, H Yatsubashi, S Nishiguchi, K Hino, S Hige, Y Itoh, E Tanaka, S Mochida, M Honda, Y Hiasa, A Koike, F Sugauchi, S Kaneko, N Izumi, K Tokunaga, M Mizokami. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet* 20(17):3507-16, 2011 Sep.
  27. Y Takata, Y Nakamoto, A Nakada, T Terashima, F Arihara, M Kitahara, K Kakinoki, K Arai, T Yamashita, Y Sakai, T Yamashita, E Mizukoshi, S Kaneko. Frequency of CD45RO(+) subset in CD4(+)CD25(high) regulatory T cells associated with progression of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 307(2):165-73, 2011 Aug.
  28. M Honda, K Takehana, A Sakai, Y Tagata, T Shirasaki, S Nishitani, T Muramatsu, T Yamashita, Y Nakamoto, E Mizukoshi, Y Sakai, T Yamashita, M Nakamura, T Shimakami, M Yi, SM Lemon, T Suzuki, T Wakita, S Kaneko; Hokuriku Liver Study Group. Malnutrition Impairs Interferon Signaling through mTOR and FoxO pathways in Patients with Chronic Hepatitis C. *Gastroenterology* 141(1):128-140. e2, 2011 Jul.
  29. T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Molecular mechanisms of hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 26(6):960-4, 2011 Jun.
  30. E Mizukoshi, Y Nakamoto, K Arai, T Yamashita, A Sakai, Y Sakai, T Kagaya, T Yamashita, M Honda, S Kaneko. Comparative analysis of various tumor-associated antigen-specific t-cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 53(4):1206-16, 2011 Apr.
  31. Y Nakamoto, E Mizukoshi, M Kitahara, F Arihara, Y Sakai, K Kakinoki, Y Fujita, Y Marukawa, K Arai, T Yamashita, N Mukaida, K Matsushima, O Matsui, S Kaneko. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin Exp Immunol* 163(2):165-77, 2011 Feb.
  32. T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto: Differential expression of nanog1 and nanogp8 in colon cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* In press (2011)
  33. M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. *Cancer Sci.* 102, 1615-21, 2011
  34. N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Ogata-Kawata, K. Okamoto, Y. Fujiwara, M. Nakai, A. Okabe, A.J. Schetter, E.D. Bowman, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, H. Aburatani, C.C. Harris, H. Nakagama: Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through



- post-transcriptional regulation of p21. *Cancer Res.* 71, 4628-4639, 2011
35. C. Ozeki, Y. Sawai, T. Shibata, T. Kohno, K. Okamoto, J. Yokota, F. Tashiro, S. Tanuma, R. Sakai, T. Kawase, I. Kitabayashi, Y. Taya, R. Ohki : Cancer Susceptibility Polymorphism of p53 at Codon 72 Affects Phosphorylation and Degradation of p53 Protein. *J Biol Chem.* 286,18251-18260 (2011)
  36. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. *Leukemia* in press.
  37. Tran, P.T., Bendapaudi, P.K., Lin, H.J., Choi, P., Koh, S., Chen, J., Horng, G., Hughs, N.P., Schwartz, L.H., Miller, J.H., Kawashima, T., Kitamura, T., Paik, D., and Felsher, D.W. Survival and death signals can predict tumor response to therapy after oncogene inactivation. *Science Translational Medicine*, in press.
  38. Nakamura, M., Kitaura, J., Enomoto, Y., Lu, Y., Nishimura, K., Isobe, M., Ozaki, K., Komeno, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kume, H., Homma, Y., and Kitamura, T. TSC-22 is a negative-feedback regulator of Ras/Raf signaling: Implications for tumorigenesis. *Cancer Science* in press.
  39. Suzuki, K., Ono, R., Ohishi, K., Masuya, M., Kataoka, I., Liu, B., Nakamori, Y., Ino, K., Monma, F., Hamada, H., Kitamura, T., Katayama, N., and Nosaka, T. (2012) IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncology* 40:53-62.
  40. Shibata-Minoshima, F., Oki, T., Doki, N., Nakahara, F., Kageyama, S., Kitaura, J., Fukuoka, J. and Kitamura, T. (2011) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression cloning. *Int J Oncology* in press.
  41. Enomoto, Y., Kitaura, J., Hatakeyama, K., Watanuki, J., Akasaka, T., Kato, N., Shimanuki, M., Nishimura, K., Takahashi, M., Taniwaki, M., Haferlach, C., Siebert, S., Dyer, M.J.S., Asou, N., Hideki Nakakuma, \*Kitamura, T., and \*Sonoki, T. (2011) Em/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia* in press.
  42. 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* 117:3617-3628.
  43. 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/EBPα mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117:221-233.
  44. Horii T, Suetake I, Yanagisawa E, Morita S, Kimura M, Nagao Y, Imai H, Tajima S, Hatada I. The Dnmt3b Splice Variant is Specifically Expressed in In Vitro-manipulated Blastocysts and Their Derivative ES Cells. *J Reprod Dev.* 2011; 57:579-585.
  45. Konno M, Masui S, Hamazaki TS, Okochi H. Intracellular reactivation of transcription factors fused with protein transduction domain. *J Biotechnol.* 154(4):298-303, 2011
  46. Hitoshi Okochi. *Adult Stem Cell: Sources and Characterization Tissue Engineering-From lab to Clinic.* edited by Norbert Pallua and Christoph V. Suschek Springer p83-92, 2011
  47. K. Okamoto, T. Ishiguro, Y. Midorikawa, H. Ohata, M. Izumiya, N. Tsuchiya, A. Sato, H. Sakai, H. Nakagama: miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. *EMBO J.* In press (2012)
2. 学会発表
- (海外)
1. Ochiya T. 「Ribophorin II (RPN2) as a novel therapeutic farget for cancer stem cells」. International Conference and Exhibition on Cancer Science and Therapy 15-17, Las Vegas, USA. August 12-18
  2. Ochiya T. 「Ribophorin II (RPN2) as a novel therapeutic farget for cancer stem cells」 「cancer cells and their tumorigenecity」. 16th European Meeting for Vascular Biology and Medicine, 2011, Krakow, Poland. September 4-10
  3. Ochiya T. 「nSMase 2 regulates metastatic ability of breast cancer cells through the regulation of exsome secretion」. Exosomes and Microvesicles 2011, Orlando, USA. October 14-19
  4. 「Ribophorin II (RPN2) as a novel therapeutic target for breast cancer stem

cells」、落谷孝広、The 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer (2011.9.20-21 大阪)

5. キーストーンシンポジア (2010, Montana, USA)
6. Yamashita T, Honda M, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Yamashita T, Arai K, Nio K, Hara Y, Wang XW, and Kaneko S. Distinct liver cancer stem cells defined by EpCAM and CD90 in human hepatocellular carcinoma. American Association of Study of Liver Diseases Annual Meeting 2011, San Francisco, U.S.A., 2011.
7. Yamashita T, Honda M, and Kaneko S. Cancer Stem Cells in Hepatocarcinogenesis. Asian Pacific Association for the Study of the Liver Single Topic Conference 2011, Jeju, Korea, 2011.
8. Makoto Tokuhara, Yukio Saito, Toshio Shimizu, Satsuki Fukuda, Chikako Ishiguro, Masamitsu Konno, Tatsuo S. Hamazaki, Hitoshi Okochi Do adipose tissue-derived stem cells (ASCs) promote tumor growth? IFAT Miami 11月 2011

(国内)

1. 「miRNA と発がん機構」、落谷孝広、第 100 回 日本病理学会総会 (2011.4.28-30 横浜)
2. 「遺伝子・核酸デリバリー」、落谷孝広、第 27 回 日本 DDS 学会学術集会、(2011.6.10 東京)
3. 「Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer for sarcoma」、落谷孝広、Japan Society of Gene Therapy 2011 17th Annual Meeting (2011.7.13 福岡)
4. 「エクソソームによる細胞間 microRNA デリバリー」、落谷孝広、2011 年アンチセンス・遺伝子・デリバリー合同シンポジウムでの招待講演 (2011.9.1-2 大阪)
5. 「Roles of non-coding RNAs in cancer development (including miRNAs)」、落谷孝広、第 70 回 日本癌学会学術総会 (2011.10.2-5 名古屋)
6. 「Exosome による遺伝情報の伝達と疾患とのかかわり」、落谷孝広、日本人類遺伝学会第 56 回大会 (2011.11.10 千葉)
7. 「エクソソームによる遺伝情報の伝達とがんの進展」、落谷孝広、10th 中国四国口腔癌研究会 (2011.11.25-26 松山)
8. 森正樹、他：大腸癌の発生経路・組織発生 —臨床と病理の立場から—、第 74

回 大腸癌研究会、2011 年 1 月 21 日、福岡

9. 森正樹：がん転移の病態と治療、第 20 回 日本がん転移学会学術集会・総会、2011 年 6 月 30 日～7 月 1 日、浜松
10. 森正樹：消化器癌の悪性度・予後における分子診断、第 53 回 日本消化器病学会大会、2011 年 10 月 20 日～10 月 22 日、福岡
11. 森正樹：癌幹細胞研究の現状と未来、第 22 回 日本消化器癌発生学会総会、2011 年 11 月 25 日～11 月 26 日、佐賀
12. 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞形質の多様性、日本臨床腫瘍学会総会、横浜、2011
13. 山下太郎、本多政夫、金子周一 肝癌幹細胞の特徴に応じたテーラーメイド医療の検討、日本肝臓学会総会、東京、2011
14. 岡本康司、第 70 回日本癌学会学術総会 「大腸がん肝転移を抑制する新規因子の同定及び解析」(平成 23 年 10 月、名古屋市)
15. 堀居、畑田 第 34 回日本日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13～16 日 横浜
16. 岡本康司、26 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 の同定及び解析」(平成 23 年 8 月、札幌市)
17. 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
18. 大岡静衣、岡本奈緒子、木下圭太、安川麻実、増富健吉 Tumor initiating cell maintenance and heterochromatin establishment during mitotic phase.第 34 回分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日～16 日 神奈川
19. 大岡静衣 がん幹細胞機能維持に関わる分子群のイメージング解析 第 4 回 NanoBio 若手ソーシャルネットワークワーキングシンポジウム 2011 年 6 月 3 日～4 日 札幌
20. Makoto Tokuhara, Yukio Saito, Toshio Shimizu, Satsuki Fukuda, Chikako Ishiguro, Masamitsu Konno, Tatsuo S. Hamazaki, Hitoshi Okochi Do adipose tissue-derived stem cells (ASCs) promote tumor growth? IFAT Miami 11月 2011

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
2. 特許出願中：  
発明の名称：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

特願 2008-521096

発明の名称：誘導多能性幹細胞の製造方法

発明者：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 本学整理番号：  
K20090215

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：森正樹, 原口直紹, 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：森正樹, 石井秀始, 永井健一, 富丸慶人, 三  
吉範克, 星野宏光, 齋藤俊行, 北川公恵

出願人：国立大学法人大阪大学

本学整理番号： K20090033

出願番号：特願 2009-241605

出願日：平成 21 年 10 月 20 日 (火)

発明の名称：癌幹細胞の製造方法

発明者：森正樹, 永井健一, 富丸慶人, 三吉範克, 星  
野宏光, 石井秀始

出願人：国立大学法人大阪大学

本学整理番号： K20080244

出願番号：特願 2009-241322

出願日：平成 21 年 10 月 20 日 (火)

3. 実用新案登録 なし

4. その他 なし

## II. 分担研究報告

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

消化器癌幹細胞の研究

研究分担者 森 正樹 大阪大学大学院 消化器外科 教授

研究要旨：

国民の2人に1人が何らかの癌に罹患する時代に突入しつつある。消化器癌はその過半数を占める。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つとして重要である。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転移との関連を検索し病態解明、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同定と分子病態の解明
- 2) 転移のメカニズムとの相関、治療への応用の基盤研究

B. 研究方法

- 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同定と分子病態の解明

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。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。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。

- 2) 転移のメカニズムとの相関、治療への応用の基盤研究
- 同定した癌幹細胞の腫瘍微小環境に於ける形質転換の機構を研究した。サイトカイン TGF $\beta$  で上皮間葉系形質転換を誘導した。細胞表面解析で癌幹細胞を分離解析した。

(倫理面への配慮)

- (1) 実験動物使用を含む研究計画：

動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示第71号）、大阪大学動物実験規則を遵守する。

- (2) ヒトゲノム・遺伝子解析研究を含む研究計

画：

平成16年度に改正された文部科学省、厚生労働省、経済産業省によるヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針に基づき研究を遂行する。ヘルシンキ条約に則りインフォームドコンセントを行い、同意の得られた検体のみを使用し、個人情報 の匿名化と守秘は厚生労働省および大阪大学の既定に則って行う。

- (3) 遺伝子組換え実験を含む研究計画：

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う。

- (4) 臨床研究に関する倫理指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

- (5) 疫学研究に関する倫理指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

- (6) ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針：

厚生労働省（臨床研究に関する倫理指針）および大阪大学の既定の指針および細則、規則に則って、円滑に臨床研究を行うために研究者等が遵守すべき事項に従う。

- (7) 被験者の安全性の確保

被験者の安全性を確保するために、責任者及び分担者は、以下の基本的事項を遵守する。

- 1) 責任者又は分担者は、被験者の選択基準及び除外基準を遵守する。

2)被験者が本研究の責任者と分担者以外の医師の治療を受ける場合には、本研究に参加していること及び本研究の内容を文書にて当該医師に通知する。

3)本研究終了後も出来る限り長期にわたって診察を行い、有害事象の発現の有無について注意を払う。

4)被験者が健康状態の異常を感じた場合には直ちに責任者又は分担者に連絡するよう指導する。

5)責任者又は分担者は、被験者に有害事象が生じ、治療が必要であると認めるときは、その旨を当該患者に伝え、適切な医療を提供する。

#### (8) 有害事象発現時の対応

有害事象の発現に際しては、適切な救急処置を施し、被験者の安全の確保に留意し、必要に応じて専門医師による診断を受けることにより原因究明に努める。被験者の臨床研究参加中及びその後を通じて、臨床上前問題となる有害事象に対して十分な医療措置を講じる。

責任者は症例報告書に種類、発現日、程度、重篤か否か、経過及び臨床研究との因果関係等を記載する。また、発生した有害事象、特に本研究との因果関係が否定できない事象については、可能な限り追跡調査を行う。

### C. 研究結果

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同定と分子病態の解明

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。

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)と、aCSC (CD13—CD90+：活性酸素 ROS 産生が低い。抗癌剤に感受性であるが増殖が早く浸潤した)とに分けて解析し、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。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。さらに通常の抗癌剤 5-FU に上乗せして細胞表面の分子 CD13 の阻害剤 Ubenimex を作用させると、中和抗体におけると同様の抗癌効果があることを見いだした。Ubenimex 血液学領域で使用されてきた薬剤であることから倫理委員会に諮り現在の効果を調べる study を検討している。

2) 転移のメカニズムとの相関、治療への応用の基盤研究

同定した癌幹細胞の腫瘍微小環境に於ける形質転換の機構を研究した。細胞周期静止期にある癌

細胞はサイトカイン TGFβ の影響下にあり、TGFβ により上皮間葉系形質転換を来した。TGFβ により細胞内の活性酸素 (ROS) が上昇し、その毒性を中和する働きが癌幹細胞マーカー分子にあることを見いだした。癌幹細胞は細胞表面に ROS を発現することで転移現象に於ける形質転換ストレスを生き延びていることが示唆され、この点 が治療の作用点となることが明らかとなった。

### 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。このような癌幹細胞の性質は、転移現象においても重要な位置を占める。その際の鍵分子は、抗癌剤や放射線治療の抵抗性と同一の分子であることが明らかとなり、治療抵抗性から転移現象まで、統一的な疾病制御が可能である。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

高齢化社会で特に問題となっている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. Nishimura J., Nakajima K., Souma Y., Takahashi T., Ikeguchi N., Takenaka R., Shinohara N., Nishida T., Doki Y., Mori M. Potential use of Fibrin-based Collagen for local delivery of antibiotics. *Surg Today*. 2011 (in press)
2. Kobayashi S., Nagano H., Marubashi S., Wada H., Eguchi H., Takeda Y., Tanemura M., Doki Y., and Mori M. Fibrin sealant with PGA felt for prevention of bile leakage after liver resection. *Hepato gastroenterology*. 2011 (in press)
3. Nagano H., Kobayashi S., Marubashi S., Wada H., Eguchi H., Tanemura M., Tomimaru Y., Umeshita K., Doki Y., Mori M. Combined IFN-α and 5-FU treatment as a postoperative-adjuvant following surgery for hepatocellular carcinoma with portal venous tumor thrombus. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2011 (in press)
4. Eguchi H., Nagano H., Tanemura M., Takeda Y., Marubashi S., Kobayashi S., Wada H., Umeshita K., Mori M., Doki Y.

A Thick Pancreas Is a Risk Factor for Pancreatic Fistula after a Distal Pancreatectomy: Selection of the Closure Technique according to the Thickness. *Dig Surg.*28(1):50-56,2011

5. Tomimaru Y., Eguchi H., Marubashi S., Wada H., Kobayashi S., Tanemura M., Umeshita K., Doki Y., Mori M., Nagano H. "Advantage of autologous blood transfusion in surgery for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.*17(32): 3663-3760,2011
6. Akita H., Takeda Y., Hoshino H., Wada H., Kobayashi S., Marubashi S., Eguchi H., Tanemura M., Mori M., Doki Y., Nagano H. Mural Nodule in Branch Duct Type Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas is a Marker of Malignant Transformation and Indication for Surgery. *Am J Surgery.*202(2):214-219,2011
7. Miyata H., Yamasaki M., Kurokawa Y., Takiguchi S., Nakajima K., Fujiwara Y., Mori M., Doki Y. Multimodal treatment for resectable esophageal cancer. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.*59(7): 461-466,2011

## 2. 学会発表

1. 森正樹、他：大腸癌の発生経路・組織発生 —臨床と病理の立場から—、第74回 大腸癌研究会、2011年1月21日、福岡
2. 森正樹：がん転移の病態と治療、第20回 日本がん転移学会学術集会・総会、2011年6月30日～7月1日、浜松
3. 森正樹：消化器癌の悪性度・予後における分子診断、第53回 日本消化器病学会大会、2011年10月20日～10月22日、福岡
4. 森正樹：癌幹細胞研究の現状と未来、第22回 日本消化器癌発生学会総会、2011年11月25日～11月26日、佐賀

## 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 本学整理番号：K20090215

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

本学整理番号：K20090033

出願番号：特願2009-241605

出願日：平成21年10月20日(火)

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

本学整理番号：K20080244

出願番号：特願2009-241322

出願日：平成21年10月20日(火)

## 2. 実用新案登録

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：

我々が開発した画期的な膜蛋白質および分泌蛋白同定法であるシグナルシーケンストラップ SST-REX を用い、iPS 細胞特異的な表面抗原を網羅的な検索を行い 40 種類の iPS 細胞由来の表面抗原を同定した。これらの表面抗原のうち、iPS 細胞に特異性の高い 3 種 LECT1, PUNC, PCOLCE に着目し解析を進めた。3 種の抗原に対し抗体、大量発現体や shRNA などの系を用いて機能解析やリプログラミング機構への影響を解析した。

A. 研究目的

幹細胞を同定、制御する技術は、再生医療のみならずがん幹細胞の同定や腫瘍の治療にも非常に意味がある。本研究では、SST-REX を用い、iPS 細胞特異的な表面抗原を網羅的に検索、表面抗原の細胞カタログ化を進めるとともに、抗 iPS 細胞抗体を作成する。こうした抗体を用いて iPS 細胞の標準化、分離の効率化、未分化 iPS の除去など効率的な再生医療のツールを開発する。また iPS 細胞特異的な表面抗原とリプログラミング機構、iPS 細胞の未分化維持機構との関連、分化能に対する影響を検討し、幹細胞マーカーと未分化性の関連については、がん幹細胞解析技術への応用を考える。

B. 研究方法

ヒト iPS 細胞株より抽出した c-DNA を基に c-DNA ライブラリーを作成、シグナルシーケンストラップ SST-REX を用い、iPS 細胞特異的な表面抗原の網羅的な検索を行った。同定された表面抗原の中から、各種細胞、各種臓器の RT-PCR を行い、その中で iPS 細胞に特異性の高い 3 種類の分子を選択した。この 3 種の表面抗原について特異的なモノクローナル抗体を作成し、iPS 細胞等の染色性について解析した。さらに大量発現体や shRNA を作成、MEF や各種細胞株に導入し、機能解析やリプログラミング機構への影響を解析した。

(倫理面への配慮)

動物実験、遺伝子組み換え実験等に関わる各種倫理規定及びガイドラインを遵守し研究を遂行した。

C. 研究結果

SST-REX 法を利用して、40 種類の iPS 細胞由来の表面抗原を同定し、そのうち iPS 細胞に特異性の高い 3 種 LECT1, PUNC, PCOLCE に着目し解析を進めた。LECT1、PUNC は膜蛋白、PCOLCE は分泌蛋白である。3 種の抗原に対し抗体を作成したところ、iPS 細胞特異的な免疫染色に応用可能であった。

これら 3 種について大量発現や shRNA などの系を用いてリプログラミング効率を比較したところ、このうち LECT1 の発現がリプログラミング効率を増強した。

D. 考察

得られた 3 種類の抗原に対する抗体の染色性については、iPS 細胞を特異的に染めることが可能であったものの、感度は比較的弱かった。抗体の有用性を高めるため、ビオチン化抗体の作成など抗体の最適化を現在検討している。また LECT1 の発現に伴うリプログラミング効率の増強は、LECT1 が表面抗原であるため何らかのリセプターとの相互作用を介し、細胞内シグナルが活性化された可能性が考えられる。現在この分子の可溶性発現体や抗体を用いリプログラミング効率化の機構の解析を試みている。

E. 結論

今回の解析により、iPS 特異的な表面抗原を数種類同定することができた。そのうちのひとつ LECT1 はその発現が MEF のリプログラミング効率を増強することが示され、リプログラミング機構や未分化性の維持機構に関わる非常に重要な蛋白であることが示唆された。今後は LECT1 のこうした機能のメカニズムを探るとともに、がん幹細胞の機能解析への応用を考え



ていきたい。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Doki, N., Kitaura, J., Inoue, D., Kato, N., Kagiya, Y., Uchida, T., Togami, K., Isobe, M., Ito, S., Maehara, A., Izawa, K., Oki, T., Harada, Y., Nakahara, F., Harada, H., and Kitamura, T. (2012) Fyn is not essential for Bcr-Abl-induced leukemogenesis in mouse bone marrow transplantation models. *Int. J. Hematol.* 95:167-175.
2. Oki, T., Kitaura, J., Watanabe-Okochi, N., Nishimura, K., Maehara, A., Uchida, T., Komeno, Y., Nakahara, F., Harada, Y., Sonoki, T., Harada, H., and Kitamura, T. (2011) Aberrant expression of RasGRP1 cooperates with gain-of-function NOTCH1 mutations in T-cell leukemogenesis. *Leukemia* in press.
3. Tran, P.T., Bendapudi, P.K., Lin, H.J., Choi, P., Koh, S., Chen, J., Hong, G., Hughs, N.P., Schwartz, L.H., Miller, J.H., Kawashima, T., Kitamura, T., Paik, D., and Felsher, D.W. (2011) Survival and death signals can predict tumor response to therapy after oncogene inactivation. *Science Translational Medicine*, in press.
4. Nakamura, M., Kitaura, J., Enomoto, Y., Lu, Y., Nishimura, K., Isobe, M., Ozaki, K., Komeno, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kume, H., Homma, Y., and Kitamura, T. (2011) TSC-22 is a negative-feedback regulator of Ras/Raf signaling: Implications for tumorigenesis. *Cancer Science* in press.
5. Suzuki, K., Ono, R., Ohishi, K., Masuya, M., Kataoka, I., Liu, B., Nakamori, Y., Ino, K., Monma, F., Hamada, H., Kitamura, T., Katayama, N., and Nosaka, T. (2012) IKAROS isoform 6 enhances BCR-ABL-mediated proliferation of human CD34+ hematopoietic cells on stromal cells. *Int J Oncology* 40:53-62.
6. Shibata-Minoshima, F., Oki, T., Doki, N., Nakahara, F., Kageyama, S., Kitaura, J., Fukuoka, J. and Kitamura, T. (2012) Identification of RHOXF2 (PEPP2) as a cancer-promoting gene by expression

cloning. *Int J Oncology* 40:93-98.

7. Kawamura, S., Sato, I., Wada, T., Yamaguchi, K., Li, Y., Li, D., Zhao, X., Ueno, S., Aoki, H., Tochigi, T., Kuwahara, M., Kitamura, T., Takahashi, K., Moriya, S., and Miyagi, T. (2012) Plasma membrane-associated sialidase (NEU3) regulates progression of prostate cancer to androgen-independent growth through modulation of androgen receptor signaling. *Cell Death and Differentiation* 19:170-179.
8. Enomoto, Y., Kitaura, J., Hatakeyama, K., Watanuki, J., Akasaka, T., Kato, N., Shimanuki, M., Nishimura, K., Takahashi, M., Taniwaki, M., Haferlach, C., Siebert, S., Dyer, M.J.S., Asou, N., Hideki Nakakuma, \*Kitamura, T., and \*Sonoki, T. (2011) Em/miR-125b transgenic mice develop lethal B-cell malignancies. *Leukemia* 25:1849-1856.
9. 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) Evil represses PTEN expression by interacting with polycomb complexes and activates PI3K/AKT/mTOR signaling. *Blood* 117:3617-3628.
10. 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/EBPα mutations play distinct roles in leukemogenesis: Lessons from clinical data and BMT models. *Blood* 117:221-233.

### 2. 学会発表

なし

## G. 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

厚生労働科学研究費補助金（平成 23 年度 第 3 次対がん総合戦略研究事業）  
分担研究報告書

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 国立がん研究センター研究所 分野長

研究要旨：

前年度樹立した大腸がん幹細胞のスフェロイド形成による *in vitro* 継代培養系の解析をすすめる、がん幹細胞における CD44 誘導の重要性を確立した。又、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。

又、大腸がん肝転移に抑制的に働く新規マイクロ RNA である miR-493 の発現解析及び機能解析を行った。その結果、miR-493 の発現は肝転移と逆相関しており、又その発現は 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-493 の診断、治療における有用性が示唆された。

などの系を用いて機能解析やリプログラミング機構への影響を解析した。

A. 研究目的

前年度樹立した大腸がん幹細胞の *in vitro* 培養系を用いた解析をすすめる、がん幹細胞の本態解明及び臨床応用をめざす。

大腸がん肝転移の抑制に働く新規マイクロ RNA 因子である、miR-493 の機能解析及び発現解析を行い、miR-493 の臨床的重要性の確立に努める。

B. 研究方法

ヒト手術検体由来の大腸がん幹細胞の *in vitro* 継代培養系を用い、大腸がん幹細胞の発現解析、及び種々の生物学的解析をおこなった。

ヒト大腸検体を用いた miR-493 の発現解析等を行った。

miR-493 による転移抑制メカニズムの解析を行った。

肝細胞特異的因子である Nanog の大腸がん細胞における役割を検討した。

（倫理面への配慮）

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。

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なった。

C. 研究結果

1. 前年度までの大腸スフェロイド細胞の解析の結果、スフェロイド形成を促進する事、及びスフェロイド中の CD44 高発現細胞は大腸がん幹細胞としての特質を有する事が示された。本年度の研究により、がん幹細胞の維持には、ROCK kinase の活性低下による CD44 の誘導が重要な役割を果たす事が明らかになった。さらに、スフェロイドにおいて CD44 高発現細胞と低発現細胞は互いに移行し、がん幹細胞は分化可塑性を有していると考えられた。

2. ヒト原発大腸がん標本における miR-493 の発現解析により、ヒト原発がんでは、肝転移（+）の症例において、miR-493 の有意な低下が認められた。

3. miR-493 の、ターゲット遺伝子の検索の結果、IGF1R が miR-493 により、直接抑制された。又 IGF1R の抑制により、肝転移が部分的に抑制された。これらの結果より、miR-493 による肝転移の抑制は IGF1R 等の抑制を介していると考えられた。

4. 大腸がん細胞における Nanog1 及びその retrogene である NanogP1 の発現解析、機能解析を行い、これらの遺伝子の大腸がん増殖、転移における役割を明らかにした。

D. 考察

*in vitro* 培養系の樹立により、今後の大腸が

ん幹細胞の解析が容易になると期待され、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。又、本実験結果より、miR-493 は、臨床応用上重要な役割を担う可能性が考えられた。

#### E. 結論

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。miR-493 は大腸がん肝転移を抑制するのみならず、ヒト肝転移症例でその発現が低下しており、大腸がん肝転移の診断、治療の双方で臨床応用につながる可能性が示唆された。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. K. Okamoto, T. Ishiguro, Y. Midorikawa, H. Ohata, M. Izumiya, N. Tsuchiya, A. Sato, H. Sakai, H. Nakagama: miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver. EMBO J. In press (2012)
2. T. Ishiguro, A. Sato, H. Ohata, H. Sakai, H. Nakagama, K. Okamoto: Differential expression of nanog1

and nanogp8 in colon cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 418, 199-204 (2012)

3. M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. Cancer Sci. 102, 1615-21 (2011)
4. N. Tsuchiya, M. Izumiya, H. Ogata-Kawata, K. Okamoto, Y. Fujiwara, M. Nakai, A. Okabe, A.J. Schetter, E.D. Bowman, Y. Midorikawa, Y. Sugiyama, H. Aburatani, C.C. Harris, H. Nakagama: Tumor-suppressor miR-22 determines p53-dependent cellular fate through post-transcriptional regulation of p21. Cancer Res. 71, 4628-4639 (2011)

##### 2. 学会発表

1. 第 70 回日本癌学会学術総会「大腸がん肝転移を抑制する新規因子の同定及び解析」(平成 23 年 10 月、名古屋市)
2. 第 26 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 の同定及び解析」(平成 23 年 8 月、札幌市)

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 横山 明彦 国立がん研究センター研究所 ユニット長

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。

又、大腸がん肝転移に抑制的に働く新規マイクロ RNA である miR-493 の発現解析及び機能解析を行った。その結果、miR-493 の発現は肝転移と逆相関しており、又その発現は 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-493 の診断、治療における有用性が示唆された。

などの系を用いて機能解析やリプログラミング機構への影響を解析した。

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 融合遺伝子産物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

前々年度は MLL 融合遺伝子産物が 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。前年度は、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。今年度は MLL による幹細胞性の維持には MLL-N/MLL-C 複合体形成が必要であるが、その解離が抑制のメカニズムではない事を示した（論文投稿中）。

D. 考察

MLL の働きは幹細胞性の維持に特化しており、分化の進行に伴って MLL の活性は抑制される。この抑制には、

MLL-N/MLL-C 複合体の解離が関与する事が考えられたが、解離できない変異体を発現する遺伝子改変マウスが異常を示さなかったので別の抑制メカニズムがある事が示唆された。

E. 結論

MLL は幹細胞性を維持するが、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抑制する方法を見いだす必要がある。今後、両者の制御メカニズムをさらに詳細に調べる必要がある。

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)

124(13) 2208-2219 \*co-corresponding author

2. 学会発表

キーストーンシンポジア  
2010, Montana, USA)

日本癌学会 (2010、大阪)

日本血液学会 (2010、横浜)