

- Blood*. 2012 Jun 28;119(26):6382-93. Epub 2012 May 9.
8. Kobayashi T, Kato-Itoh M, Yamaguchi T, Tamura C, Sanbo M, Hirabayashi M, Nakauchi H. Identification of Rat Rosa26 Locus Enables Generation of Knock-in Rat Lines Ubiquitously Expressing tdTomato. *Stem Cells Dev*. 2012 Jun 11. [Epub ahead of print]
 9. Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*. 2012 Jun 7;119(23):5405-16. Epub 2012 Apr 27.
 10. Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H. Generation of Kidney from Pluripotent Stem Cells via Blastocyst Complementation. *Am J Pathol*. 2012 Jun;180(6):2417-26. Epub 2012 Apr 14.
 11. Ghosn EE, Yamamoto R, Hamanaka S, Yang Y, Herzenberg LA, Nakauchi H, Herzenberg LA. Distinct B-cell lineage commitment distinguishes adult bone marrow hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 3;109(14):5394-8. Epub 2012 Mar 19.
 12. Wang J, Sun Q, Morita Y, Jiang H, Groß A, Lechel A, Hildner K, Guachalla LM, Gompf A, Hartmann D, Schambach A, Wuestefeld T, Dauch D, Schrezenmeier H, Hofmann WK, Nakauchi H, Ju Z, Kestler HA, Zender L, Rudolph KL. A Differentiation Checkpoint Limits Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal in Response to DNA Damage. *Cell*. 2012.148(5):1001-1014.
 13. Oguro H, Yuan J, Tanaka S, Miyagi S, Mochizuki-Kashio M, Ichikawa H, Yamazaki S, Koseki H, Nakauchi H, Iwama A. Lethal myelofibrosis induced by Bmi1-deficient hematopoietic cells unveils a tumor suppressor function of the polycomb group genes. *J Exp Med*. 209:445-454, 2012.
2. 学会発表
 1. 中内啓光, Stem Cell Niche and TGF-beta signaling, Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, EMBL Conference, Aug 31, 2012, Heidelberg, Germany
 2. 中内啓光, Glial cell regulation of hematopoietic stem cell hibernation in the bone marrow niche, ESGCT/SFTCC Congress, Oct 28, 2012, Versailles, France
 3. 金子新, iPS細胞を介した疾患抗原特異的 T 細胞の再生, CiRA Mini Symposium 2012 -iPS細胞、新しい医学への可能性-, 2012年10月10日、京都
 4. 金子新、高原特異的 T 細胞からの iPS 細胞誘導と細分化、第 9 回血液・腫瘍内科 Meet The Expert, 2012年10月22日、名古屋
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
- 1.特許取得
特になし。
 - 2.実用新案登録
特になし。
 - 3.その他
特になし。

難治性消化器癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療戦略の開発

研究分担者 佐谷秀行 慶應義塾大学医学部先端医科学研究所 教授

研究要旨

私たちは癌幹細胞マーカーとして広く知られている CD44 分子は、そのスプライスバリエーションフォーム（CD44v）が、細胞膜表面のシスチントランスポーターxCT の発現を安定化させることによって、細胞内の還元型グルタチオン量を増加させ、それによって酸化ストレスを減少させる作用があることを見出していた。今回、私たちは CD44v の発現は癌細胞の転移能、治療抵抗性に関与することを見出した。更に、xCT 阻害剤スルファサラジン投与によって、CD44v 発現細胞に特異的に細胞死が誘導でき、分子標的薬との併用で有意に腫瘍縮小効果が得られることを明らかにした。

A. 研究目的

私たちはこれまで、ヒトの大腸癌や胃癌の癌幹細胞マーカーとして広く知られている CD44 分子の癌幹細胞における機能解析を行う過程で、悪性度の高い難治性症例で高く発現することが知られているスプライスバリエーションフォームの CD44 (CD44v) が、細胞膜表面のシスチントランスポーターxCT と結合しそれを安定化させることによって、細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 量を増加させ、酸化ストレスを減少させる作用があることを見出した (Ishimoto et al., *Cancer Cell*, 2011)。

また、昨年は CD44 が癌細胞のエネルギー産生をミトコンドリアから解糖系にシフトさせることで酸化ストレスの産生を減少させ、抗癌剤をはじめとする治療ストレスに対して抵抗性を高めていることを見出した (Tamada et al., *Cancer Res* 2012; Tamada et al., *Clin Cancer Res* 2012)。本年は、CD44 を介した酸化ストレス抑制作用が癌の転移や抗がん剤抵抗性に直接関与することを調べることを目的として研究を行った。

B. 研究方法

1. マウス乳癌細胞の肺転移における CD44v の機能解析
2. 口腔内癌における抗がん剤治療抵抗性と CD44v 発現の関係についての解析
3. CD44v 発現腫瘍に対するシスチントランスポーター阻害剤スルファサラジンの効果検討

C. 研究結果

1. 4T1 マウス乳癌細胞の肺転移における CD44v の役割

高転移性のマウス乳癌細胞株 4T1 細胞を CD44v 陽性細胞と陰性の画分に分離し、それらの肺転移能について検討したところ、CD44v 陰性細胞に比べて明らかに CD44v 陽性細胞で高いことが分かった (図1)。

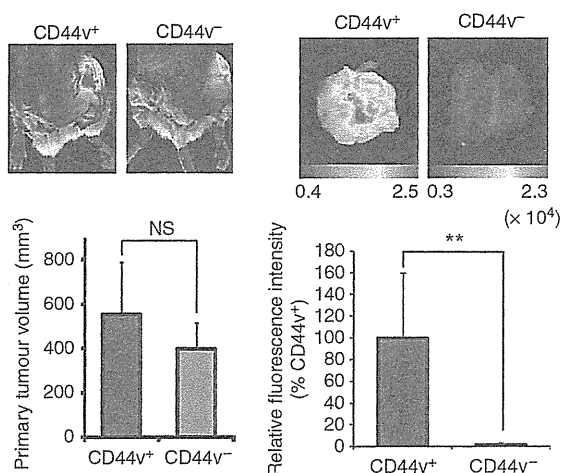


図1 マウス乳癌細胞 4T1 を CD44v 陽性細胞と陰性細胞に分離し、マウス乳腺にそれぞれ移植したところ、乳腺における腫瘍の増殖には両細胞間で有意な差は見られなかったが(左)、肺への転移は CD44v 陽性細胞を移植したマウスで有意に観察された(右) (文献 2 より引用)。

また、質量分析イメージングを用いて、CD44vを高発現する肺転移巣では GSH の産生が増加していることを見出した(図2)。

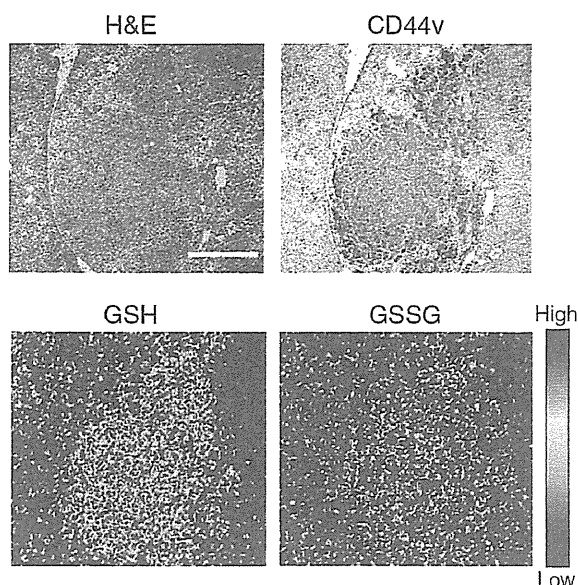


図2 CD44v 陽性細胞の肺転移巣では GSH の産生が上昇していた(文献2より引用)。

さらに、CD44 mRNA の選択的スプライシングの制御因子である ESRP1 タンパク質の発現を抑制すると、癌細胞表面の xCT の発現および細胞内 GSH 含有量は著明に低下し、肺転移を著明に抑制した。また、xCT の特異的阻害剤であるスルファサラジンによっても同様に肺転移を抑制できることなどから(図3)、ESRP1 タンパク質によって制御される CD44v の発現は、xCT の細胞膜における発現を上昇させることで抗酸化物質 GSH の合成を促進し、癌細胞が転移の過程で受ける酸化ストレスに対して抵抗性を高め、転移を促進することが分かった(Yae et al., Nat Commun 2012)。

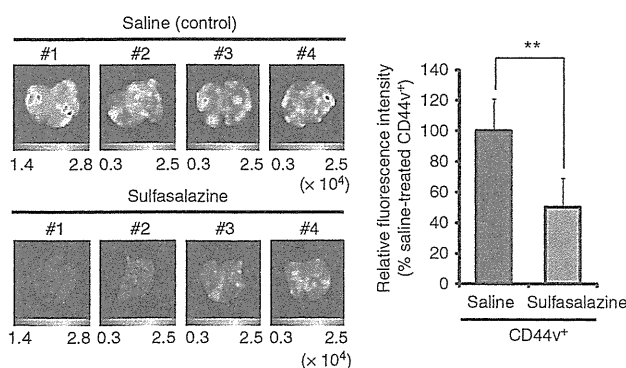


図3 CD44v 陽性細胞を尾静脈から注入した時の肺への転移を、スルファサラジン投与群と非投与群と比較した。スルファサラジン投与によって肺転移は有意に抑制された(文献2より引用)。

2. CD44v 陽性細胞の抗がん剤に対する耐性
ヒト口腔内扁平上皮癌において、抗がん剤投与を行わずに手術を行った症例と、あらかじめ抗がん剤を投与してから手術を行った症例で、CD44v の発現を免疫組織染色で確認したところ、抗がん剤を投与せずに手術をおこなった症例では、CD44v 陽性細胞と陰性細胞の双方が組織中に残存していたが、抗がん剤を投与した上で手術を行った症例では、CD44v 陽性細胞が有意に残っていた。この所見から、CD44v 陽性細胞は抗がん剤に抵抗性を持っていると考えられる。

3. CD44v 発現扁平上皮癌細胞に対するスルファサラジンと抗 EGFR 抗体の併用治療モデル
CD44v が発現している口腔内扁平上皮癌細胞 HSC-2 をヌードマウスに移植し、スルファサラジンを投与したところ、CD44v 陽性細胞に選択的にアポトーシスが誘導され、陰性細胞では EGFR のリン酸化が有意に上昇していることが分かった。そこで、スルファサラジンと抗 EGFR 抗体であるセツキシマブを併用したところ、有意に腫瘍の増殖を抑えることができた。

D. 考察

これまで得られた知見から CD44v を介した酸化ストレス回避機構は、腫瘍形成能の増大や治療に対する抵抗性のみならず、癌の転移にも寄与していることが明らかになった。つまり CD44v の発現が高い癌においては、CD44v や xCT を標的とした薬剤開発は、治療抵抗性や転移能を有するがん幹細胞に対する新たな治療法の確立につながることで期待されている。

スルファサラジンは潰瘍性大腸炎や関節リウマチの治療薬として長く使用されてきた化合物だが、この薬剤に xCT シスチントランスポーターの機能を抑制する活性があることが見出されている。そこでスルファサラジンを用いてマウスの移植腫瘍に対する効果を調べたところ、スルファサラジンは CD44v 陽性の癌幹細胞を含む細胞分画に特異的に細胞死を誘導する効果があることが分かった。また抗がん剤や分子標的薬剤と併用することで有意な効果を得ることができた。スルファサラジンは既にヒトへの投与が長く行われ、その安全性が十分に知られていることから、本薬剤を用いた臨床試験を間もなく開始する予定である。スルファサラジン

の問題点は経口投与にした場合、腸内細菌によって代謝されるため、スルファサラジンそのものの血中濃度が上昇しにくいことである。本プロジェクトでは、スルファサラジンをミセル化することによって、経静脈的に投与することで、より効果のある薬剤を開発することである。現在、共同研究者の片岡教授、西山教授とともに開発を進めている。

E. 結論

CD44v による酸化ストレス抑制機構は、癌の治療抵抗性、転移に関与することが分かった。CD44v と相互作用してグルタチオンの産生をコントロールする xCT シスチントランスポーターを標的にした治療は癌幹細胞の代謝を変化させて、その機能を抑制する可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res* 72: 1438-1448, 2012
- 2) Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H and Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat Commun* 3: 883, 2012 (doi:10.1038/ncomms1892)
- 3) Tamada M, Suematsu M and Saya H: Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clin Cancer Res* 18: 5554-5561, 2012
- 4) Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J and Hibi T: Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer

stem-like cells. *Cell Host & Microbe* 12: 764-777, 2012

- 5) Nagano O, Okazaki S and Saya H: Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene* 2013 (in press)

2. 学会発表

- 1) 佐谷秀行: CD44 のがん幹細胞における機能とそれに基づく治療戦略の考案。招聘講演 3。第 22 回日本サイトメトリー学会学術集会。6/30/2012、千里ライフサイエンスセンター、大阪
- 2) 佐谷秀行: A novel therapeutic approach targeting the CD44 variant functions. シンポジウム S4「Molecular targeting to cancer stem cell/cancer initiating cell」。第 71 回日本癌学会学術総会。9/19/2012、ホテルロイトン札幌、札幌

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

出願番号: 特許出願 2012-080323

出願日: 2012 年 3 月 30 日

出願人: 学校法人慶應義塾

発明者: Stéphane Fierro、栄長泰明、佐谷秀行、永野修

発明の名称: ダイヤモンド微小電極を用いた還元型グルタチオンの測定装置

2. 実用新案登録

特になし。

3. その他

特になし

癌幹細胞のマイクロ RNA 制御とエクソソーム DDS による治療応用

研究分担者 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

研究要旨

平成24年度は、膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性の解明と、癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療法を開発する目的で、STEM細胞の未分化能維持のために有用なmicroRNA27bの機能解析に焦点を当てた。その結果、正常細胞でmicroRNA27bの発現をノックダウンする事で、SP分画、いわゆる抗がん剤体制に匹敵する細胞集団が生まれてくる事を証明した。これによって、膵臓がんの癌幹細胞の生物学的特性を制御可能なmicroRNAの同定に成功し、平成24年度の計画を無事に遂行した。さらに、癌幹細胞特異的なエクソソームデリバリーの開発を目的として、膵臓がん細胞の分泌するエクソソームのプロテオーム解析を終了する等、本研究班の目的である癌幹細胞の代謝特性の異常を標的とした治療戦略が可能なmicroRNAの確定とデリバリー技術の基礎技術構築に至る重要な成果を上げた。

A. 研究背景、目的

(背景)

本研究の目的はマイクロRNAを主体とした核酸医薬による癌幹細胞の代謝特性の標的治療法の確立に有る。初年度は、1)膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性を解明する第一歩として、我々がSTEM細胞の未分化能維持のために開発したYPAC培地(PNAS, 2010)によるヒト膵臓がん細胞の培養を実施する、2)膵がん細胞特異的なDDSとして、細胞外分泌顆粒であるエクソソームに着目し、癌幹細胞特異的デリバリー方法の基盤研究を実施する、3)癌幹細胞を制御するマイクロRNAの全体像の把握する、等の項目に焦点を於いた研究を実施した。(分担者の研究背景)：落谷らは乳がんの薬剤耐性に関与する新しい分子RPN2を同定するとともに(Nat Med 2008)、RPN2が乳がんの中でも治療困難とされるトリプルネガティブの患者において高発現していることや、CD44+/CD24-の癌幹細胞にも強く発現している事を明らかにした。さらにはRPN2を抑制する核酸医薬を開発し、サルでの安全性やイヌの自然発生腫瘍での前臨床試験を実施中である。またmicroRNAの癌治療研究にも経験が豊富であり(Mol Ther 2010, 2011; J Cell Biol2011)、特にmicroRNAを補充する治療方法は独創的な方法であり、世界でも落谷らのDDSによる癌治療実験の報告(Proc Natl Acad Sci USA 2007)が最初の例である。これに加え

て、落谷らは癌細胞が分泌する小胞顆粒であるエクソソームに注目し、その中に包埋されるmicroRNAsが細胞間でデリバリーされる事を世界で初めて報告した3つのグループのひとつであり(JBiol Chem 2010)、エクソソームを用いた新規デリバリーシステムの開発に従事している。この他に、落谷らは、膵臓癌の動物発癌モデルを遺伝子改変ラットにおいて実現し(Carcinogenesis 2006)、このTgラットは世界中で膵臓癌のモデル動物として普及しつつある。さらに、落谷らはラットES細胞の樹立に成功し(Proc Natl Acad Sci USA 2010)、Oct4-venusTgラットを作製する等、成体の幹細胞をイメージングで追跡可能なin vivo技術を有することから、膵臓癌幹細胞による発がんモデル動物の作製をも視野に入れた研究が可能である。さらに、落谷らは、がん細胞が分泌する細胞外小胞顆粒であるエクソソームの先進的な研究を進めており、CD44Vがこのエクソソーム表面にアンカーする事を見いだす等、本研究を推進する基盤研究を整備している。

B. 研究方法

- 1)膵がん細胞特異的DDSの開発に関しては、膵がん細胞株の分泌するエクソソームを精製し、そのタンパク質解析を網羅的に実施し、エクソソーム表面に存在する膵がん特異的抗原の候補を同定する。
- 2)癌幹細胞を制御するマイクロRNAの

全体像の把握に関しては、ヒト乳がんでの microRNAs 探索の結果をもとにした candidate 解析から浮上した microRNA27b の癌幹細胞の制御メカニズムの解明を実施する。

(倫理面への配慮)

本研究で平成24年度に実施する内容はヒト

検体を扱わないため、倫理委員会への承認事項は生じないが、がん細胞や動物実験に関しては、倫理規定に沿った計画的な研究を実施する。

C. 研究結果

1) 膵がん細胞特異的 DDS の開発に関しては、膵がん細胞株の分泌するエクソソームを精製し、そのタンパク質解析のプロテオーム解析を実施した。その結果、エクソソーム表面に存在する膵がん特異的抗原の候補を複数同定する事に成功した。

2) エクソソームを腫瘍部位に標的化可能な基盤技術の開発に向けて、乳がん細胞の表面に発現する EGFR を標的化したエクソソームのエンジニアリングに成功し、動物に移植した腫瘍部位に、当該エクソソームを特異的にデリバリーするデータを得る事が出来た (Mol Ther, 2013)。

3) 癌幹細胞を抑制する効果の有る microRNA として miR-27b を選択した。正常細胞で microRNA27b の発現をノックダウンする事で、SP 分画、いわゆる抗がん剤体制に匹敵する細胞集団が新たに出現した。またこの microRNA27b は、CD44v の mRNA を制御する事も *in silico* および培養細胞を用いた解析から明らかになった。

D. 考察

本年度は、膵臓がんのがん幹細胞の生物学的特性の解明と、癌幹細胞の代謝特性を標的とした治療法を開発する目的達成の重要な鍵を握る、ステム細胞の未分化能維持にはたく non-coding RNA が、

microRNA27b である事を明らかにするお重大な成果を上げた。さらに、癌幹細胞特異的なエクソソームデリバリーの開発に必須である膵がん特異的エクソソームの表面タンパク質の候補決定を行なう等、膵臓がん特異的なデリバリーの開発のために必要な基盤情報の収集を完了した。また癌幹細胞のステムネスを維持したまま長期間培養可能な YPAC 培養系の構築も整う等、本研究班の最大の目的である、癌幹細胞の代謝特性の異常を標的とした治療戦略の基盤形成に至る重要な成果を上げた。

E. 結論

正常細胞で microRNA27b の発現をノックダウンする事で、癌幹細胞様の細胞集団が生まれてくる事を証明した。これによって、膵がんの癌幹細胞の生物学的特性を制御可能な microRNA の同定に成功した意義は大きい。さらに、癌幹細胞特異的なエクソソームデリバリーの開発にめどが立つ等、本研究班の目的である癌幹細胞の代謝特性の異常を標的とした治療戦略が可能な microRNA の確定とデリバリー技術の基礎技術構築に至る重要な成果を上げた。今後、癌幹細胞の代謝特性を制御する CD44v を microRNA でマネージメントする戦略の実現に向けた努力を継続する。

F. 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*, 287: 1397-1405, 2012.
2. Ono M, Fujiwara Y, Ochiya T. Breast cancer stem cell: translating to the clinic. *Stem Cells and Cancer Stem Cells*, Vol 4, Springer, pp 249-257, 2012.
3. Udagawa T, Narumi K, Goto N, Aida K, Suzuki K, Ochiya T, Makimoto A, Yoshida T, Chikaraishi T, Aoki K. Syngeneic hematopoietic stem cell transplantation enhances the antitumor immunity of intratumoral type I interferon gene transfer

for sarcoma. *Hum Gene Ther*, 23: 173-186, 2012.

4. Narumi K, Udagawa T, Kondoh A, Kobayashi A, Hara H, Ikarashi Y, Ohnami S, Takeshita F, Ochiya T, Okada T, Yamagishi M, Yoshida T, Aoki K. In vivo delivery of interferon- α gene enhances tumor immunity and suppresses immunotolerance in reconstituted lymphopenic hosts. *Gene Ther*, 19: 34-48, 2012.
5. Kawamata M, Ochiya T. Two distinct knockout approaches highlight a critical role for p53 in rat development. *Sci Rep*. 2: 945, 2012.
6. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau Chen Y, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T. LGR5-Positive Colon Cancer Stem Cells Interconvert with Drug-Resistant LGR5-Negative cells and are Capable of Tumor Reconstitution. *Stem Cells*. 30: 2631-2644, 2012.
7. Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T. Micromanaging Iron Homeostasis: hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*. 287: 34110-34119, 2012.
8. Hirose Y, Saijou E, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A. Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109: 4263-4268, 2012.
9. Kosaka N, Ochiya T. Unraveling the mystery of cancer by secretory microRNA: horizontal microRNA transfer between living cells. *Front Genet*, 2:97, 2012
10. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. *Mol Ther*. 21: 185-191, 2013.

2. 学会発表

(国際学会:招待講演のみ)

1. Ochiya T. 「Exosomes as a Novel Diagnostic and Therapeutic Tool for Cancer. DIAGNOSTIC APPLICATIONS OF EXOSOMES, Molecular Diagnostics Europe, London, England. May 7-13, 2012.
2. Ochiya T. 「RPN2 as a novel therapeutic target for breast cancer stem cells」. Asia 2012, Singapore. August 28-31, 2012.
3. Ochiya T. 「Exosome as a novel regulator of tumor microenvironment」. The International Center Microenvironment Society, Suzhou, China. November 12-18, 2012

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

細胞初期化技術を用いた癌幹細胞の分化転換および分化誘導方法の開発と、その癌治療への応用

研究分担者 山田泰広 京都大学 iPS 細胞研究所

研究要旨

本研究では、iPS 細胞作製技術を癌細胞に応用し、癌細胞の性質を変化させることで、癌治療への応用を試み、革新的な癌治療法の開発を目指そうとするものである。本年度は、*EWS/ATF1* 融合遺伝子を有する明細胞肉腫マウスモデルを作製／解析し、明細胞肉腫細胞株の細胞初期化を試みた。多くの癌細胞株と同様に樹立した肉腫細胞株も初期化に抵抗性を示すことが明らかとなった。しかしながら、癌遺伝子である *EWS/ATF1* 融合遺伝子発現を停止した状態では、肉腫細胞株から iPS 細胞様細胞株が樹立できた。樹立した細胞株は、多能性幹細胞のマーカーである *Nanog* を発現し、三胚葉に分化する奇形腫形成能を有し、キメラマウスへの寄与能を持つことが分かった。癌遺伝子の発現を制御することで、初期化抵抗性癌細胞の初期化が可能であることが示された。

A. 研究背景、目的 (背景)

体細胞に4つの転写因子、*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc*を強制発現させることで、体内のあらゆる細胞に分化しうる人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell; iPS細胞)の作製が可能となった。この事実は、iPS細胞作製技術により、細胞の運命を自由に制御することを示唆している。本研究では、iPS細胞作製技術を癌細胞に応用し、癌細胞の性質を変化させることで、癌治療への応用を試み、革新的な癌治療法の開発を目指そうとするものである。特に、iPS細胞作製技術を用いた癌細胞の分化転換に着目し、効率的な癌幹細胞の分化転換方法を開発することで、癌治療に応用しようとするものである。

現在まで世界中の多くの研究者が癌細胞の初期化を目指してきた。しかしながら、一部の癌細胞を除いて、大部分の癌細胞は初期化に抵抗性を示すことが明らかになりつつある。現在の所、この癌細胞の初期化抵抗性のメカニズムは明らかになっていない。癌幹細胞の分化転換を癌治療へと応用しようとする本研究において、効率的な癌細胞初期化方法の開発は必須である。さらには、癌細胞の初期化抵抗性メカニズムを解明することは、効率的な癌細胞の初期化のみならず、治療抵抗性癌細胞の性質解明に有用であることが示唆される。

B. 研究方法

本研究では、まず、腫瘍モデルの作製を行った。明細胞肉腫は筋膜近傍に生じる極めて

予後の悪い悪性間葉系腫瘍である。明細胞肉腫では染色体転座により *EWS/ATF1* 融合遺伝子が形成され、その融合遺伝子が発癌に促進的に働いていると考えられている。本研究では、明細胞肉腫の腫瘍モデル作製のために、明細胞肉腫で検出される癌遺伝子である *EWS/ATF1* 融合遺伝子を薬剤存在下 (ドキシサイクリン存在下) で誘導できる ES 細胞を樹立した。樹立した ES 細胞を、初期胚にマイクロインジェクションすることで、*EWS/ATF1* 融合遺伝子を誘導可能なマウスを作製した。

5-8週齢 *EWS/ATF1* 融合遺伝子誘導可能マウスに、ドキシサイクリンを投与し、腫瘍を誘発させ、分子病理学的解析を行った。*EWS/ATF1* 融合遺伝子誘導可能マウスに発生した腫瘍から肉腫細胞株を樹立し解析した。

樹立した肉腫細胞株に、レトロウイルスを用いて初期化因子 (*Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *Myc*) を導入し、iPS 細胞化を試みた。外来遺伝子を誘導した肉腫細胞株は、マウス胎仔線維芽細胞上で、ES 細胞培養用培地にて培養し、iPS 細胞の誘導を試みた。ドキシサイクリンの添加濃度を変えることで癌遺伝子の発現を調節しながら iPS 細胞の樹立を試みた。

樹立された腫瘍由来 iPS 細胞は、免疫不全マウス皮下に移植し、奇形腫形成能を評価した。また、得られた iPS 細胞は初期胚にマイクロインジェクションすることで、キメラマウスへの寄与能を評価した。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、動物実験実施機関(京都大学 iPS 細胞研究所)の動物実験委員会の承認を得た。動物愛護の精神に配慮し、3R に努めて実験を施行した。ヒト腫瘍検体の解析は、京都大学倫理委員会での承認を得て、インフォームドコンセントを得た検体について適切に解析を行った。

C. 研究結果

*EWS/ATF1*融合遺伝子誘導可能マウスにドキシサイクリンを投与すると、約1ヶ月後より全身の皮下組織に多発する腫瘍形成を認めた。腫瘍は組織学的にヒト明細胞肉腫に酷似しており、免疫組織学的にもヒト明細胞肉腫と同様のマーカー発現パターンを示した。樹立した肉腫細胞株の解析により、癌遺伝子である *EWS/ATF1* は Fos を活性化することで、明細胞肉腫の細胞増殖活性を誘導していることが明らかとなった。

マウス肉腫細胞株に初期化因子を導入しても iPS 細胞様のコロニーは出現せず、我々が樹立した肉腫細胞株も細胞初期化に抵抗性を示すことが確認された。癌遺伝子の発現が、癌細胞の初期化を阻害している可能性を考慮し、癌遺伝子 *EWS/ATF1* の発現を停止後に癌細胞初期化を試みた。その結果、癌遺伝子発現の非存在下においては、初期化因子誘導後 iPS 細胞様コロニーが出現することが確認された。肉腫細胞由来 iPS 細胞様細胞は、多能性幹細胞のマーカーである *Nanog* を ES/iPS 細胞と同等に発現していた。

得られた細胞を免疫不全マウス皮下に移植すると、2-3 週間で、異なる三つの胚葉に分化する奇形腫の形成を確認した。また、それらをマウス初期胚にマイクロインジェクションすることでキメラマウスの作製が可能であることを確認した。

D. 考察

明細胞肉腫マウスモデルから樹立した肉腫細胞株では癌遺伝子である *EWS/ATF1* の発現を停止しながら細胞初期化を試みると、三胚葉に分化し、キメラマウスへの寄与能を有する iPS 細胞が樹立できることが分かった。癌遺伝子による歪んだ転写ネットワークが癌細胞初期化を阻害している可能性が示唆された。

E. 結論

EWS/ATF1 融合遺伝子誘導可能遺伝子を用いて、明細胞肉腫マウスモデルを作製した。明細胞肉腫において Fos が有効な治療標的となりうることが示された。初期化抵抗性肉腫細胞株において、癌遺伝子の発現を制御することで、細胞初期化が可能であることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Ohno T, Aoki H, Semi K, Watanabe A, Moritake H, Shiozawa S, Kunisada T, Kobayashi Y, Toguchida J, Shimizu K, Hara A, Yamada Y. *EWS/ATF1* expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*. 2013 Jan 2.

Semi K, Matsuda Y, Ohnishi K, Yamada Y. Cellular reprogramming and cancer development. *International Journal of Cancer*. 2012 Nov 26.

Arioka Y, Watanabe A, Saito K, Yamada Y. Activation-induced cytidine deaminase alters the subcellular localization of Tet family proteins. *PLOS One*. 2012 7(9):e45031.

Aoki H, Hara A, Era T, Kunisada T and Yamada Y. Genetic ablation of Rest leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*. 139(4):667-77, 2012

2. 学会発表

Yamada Y, Transient expression of reprogramming factors in vivo results in cancer-like phenotype in mice, International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research, June, 2012, Ulm, Germany

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
特になし。
2. 実用新案登録
特になし。
3. その他
特になし。

固形がん幹細胞を標的とした革新的治療法の開発に関する研究

研究分担者 石井秀始 大阪大学大学院 消化器癌先進化学療法開発学寄附講座 教授

研究要旨

森総括班の方針に従い、前年度に引き続き、癌細胞の性質を大きく変化させるリプログラミング方法の医療応用の実現に向けて基盤構築を行った。最近注目されている epigenetic RP 誘導に加えて、本研究ではマイクロ RNA による RP 誘導の基盤を構築しメカニズム解析した。その結果、新たに癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP が方法論として構築され、特に、CD44バリエーションの下流に於ける非コード RNA の一亜型であるマイクロ RNA によるリプログラミングの分子基盤が明らかにされ、安全で効率的なリプログラミング技術の新構築に向けて、創薬シーズ開発まで展開し、代表的な癌幹細胞標的分子 CD44バリエーションに特徴付けられる難治性消化器癌の革新的な治療に向けて大きく進展した。

A. 研究背景、目的

平成24年度は研究計画の2年目にあたり、初年度で構築した基盤成果に立脚して、特に即効性のある創薬の出口戦略(短期計画)を着実に実現化しながら、また同時にトランスレショナル研究(中長期計画)を着実に具現化していく為に、具体的に難治性癌で重要な癌幹細胞分子 CD44バリエーションに軸足を据えながら事業を展開した。

(全体計画の背景)

造血器腫瘍等の化学療法に高感受性を示す腫瘍に対する治療では、治療により腫瘍の縮小を含む顕著な縮小効果が期待できて治癒を目指した治療戦略となるが、それとは対照的に、消化器癌等の固形癌では一般に化学療法に低感受性であり、手術不適応の進行癌は極めて難治性であり、その克服は国民の喫緊の課題である。その克服のために、癌幹細胞と呼ばれる治療抵抗性細胞の生物学的弱点を先端的基礎研究によって明らかにし、それらの所見を強力な共同研究体制によって融合、増幅することによりトランスレシヨナ

ル研究を推進し、最終的には革新的治療法の開発とその実施を達成することを目的とする。その目標達成のために、新しいリプログラミング技術を用いて癌幹細胞の性状を大きく変換させ、また同技術を用いて宿主免疫細胞(リンパ球・ニッチ)に対しては、リンパ球等免疫担当細胞の大幅な賦活化を図り、ニッチ制御による兵糧攻めを加えて、固形癌治療効果を最大限に高める。

(本年度計画の背景)

前年度までに、非コード RNA の一亜型であるマイクロ RNA によるリプログラミングの基本技術の整備を完成した。具体的に、3つのマイクロ RNA(miR-302, miR-200c, miR-369)を創薬シーズとして消化器癌幹細胞(CD44バリエーション)の標的化効果を研究し、基本医療技術として基盤を構築した。本年度は、更に進めて、その安全で効率的な革新的医療技術の新展開を目指して、応用可能なレベルにまで掘り下げるメカニズム解析に展開した。

B. 研究方法

就労年齢層に目に見える形で効果を期待できる消化器癌を対象として革新性の高い新医療技術を創出するために、消化器癌の癌幹細胞自体の生物学的な特徴を応用可能なレベルにまで掘り下げて解明し、安全で有効な細胞リプログラミングにつき橋渡し研究として基盤を構築する。特に、造血器腫瘍では一般に抗癌剤に高感受性を示すことが多いため造血幹細胞移植等の高度先進医療で完全治癒を期待することができるのとは対照的に、消化器癌に代表される固形癌では、早期には手術で完治を目指せるが腫瘍が残存した手術不適応の固形癌は化学療法に中ないし低感受性であり、多くの場合に一時的な腫瘍の縮小効果は実現ものの一定期間の効果の継続の後に腫瘍の再増大を来し、また腫瘍の病巣数が増加した状態となる(難治性、癌転移)。このように消化器癌で既存の抗癌剤耐性等の難治性を克服することは喫緊の課題である。この転移現象には癌幹細胞の関与が指摘されている(Nature 2002 他)。癌幹細胞の発見は、繰り返し化学療法を施行した後に完治が得られずして難治に陥った癌病態をよく説明でき(Nature Med 2007)、森らは消化器癌で世界に先駆けて癌幹細胞を報告し(Stem Cell 2006)、肝臓癌での癌幹細胞を同定した(J Clin Invest 2010)。本申請では総括班長森らと共同して、医療応用に於ける安全性の面からはゲノム挿入変異のないマイクロRNA 単独による新しい細胞リプログラミング技術の実用化と臨床応用を目指したい(国際特許申請中;論文投稿中)。マイクロ RNA 単独による方法は、人工合成オリゴ核酸分子を用いており、米国FDA分類でも遺伝子治療とは別個の医薬品としての位置付けとなることから、世界的に創薬競争が活発である。マイクロ

RNA による方法を含めて、分担者山田らとの協力により癌幹細胞をリプログラミング化することにより、細胞の性質を大きく変換させ、従来方法では到達できなかった治療感受性の確保を目指す。本申請のための準備段階として、例えば細胞周期静止期にある消化器癌細胞のマイクロ RNA を網羅的に探索すると、アポトーシスとDNA 修復に関わる分子を標的とするマイクロRNAが変化しており、治療抵抗性と再発の鍵を握ると示唆され、重要な標的分子として同定した(CD13, マイクロRNA182)。癌幹細胞の代謝特性と、リプログラミング(metabolic)を連携する分子マイクロRNAを開発研究し、特にCD44vに結合するPKM2の制御機構の解明と人為制御技術の開発を実施し、安全で効率的な革新的医療技術の実現に向けて基盤を構築する。更に、CD44 バリエントに代表される酸化ストレス応答分子を発現する消化器癌(肝臓癌)の癌幹細胞に関して、2種類(CD13+CD90-細胞周期静止期癌幹細胞と、CD13-CD90+活動期癌幹細胞)を同定した。細胞周期静止期癌幹細胞では、活性酸素の解毒制御が亢進し、酸化ストレス耐性の機構が明らかとなり、これが抗癌剤・放射線療法抵抗性の本態を成すことが明らかとなった。従来の薬剤を用いてもこの克服は困難であり、耐性の付加的獲得を繰り返すことから、根本的に革新的な創薬が望まれる状況である。

そこで本申請においては、更にスクリーニングを進めて、癌幹細胞の治療抵抗性に深く関わる標的分子を同定するとともに、この最も強い治療抵抗性を示す静止期癌幹細胞に対して、細胞の再プログラム化を誘導して、細胞の性質を大きく変換することを研究する。この

分子の酸化ストレス特性は佐谷らの分子 CD44 とも類似した特性を示すことから、これが癌幹細胞の本態であることを強く示唆することから協力して研究を進める。医療応用を目指す場合には、安全性と高効率化が要となるため、安全性は代表者森ら(人工合成核酸創薬)、分担者落谷・片岡ら、高効率化は分担者中内・山田らと密接に連携する。特に、3つのマイクロ RNA (miR-302, miR-200c, miR-369) の下流機構を解明する目的で、高精度のオーミックス解析を駆使し、また実験動物を使用した個体レベルの解析を進めた。また得られた核酸シーズの最適化を進め、即効性のある創薬展開に向けて基盤構築を進める。

(倫理面への配慮)

●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。

●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。

●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。

●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。

●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。

●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。

C. 研究結果

前年度までに、安全で有効なプログラミング技術を癌幹細胞の代謝特性を特徴とした癌細胞に対して実施するためには、癌細胞に対する理解を進めるとともに、正常細胞での機

構を応用可能なレベルにまで掘り下げて研究し、正常細胞に於ける座標軸を決定してその把握のもとで癌細胞を理解することが研究の推進上効果的である。山中4因子(転写因子 c-Myc, Oct4, Sox2, Klf4)により、消化器癌細胞から正常の細胞における iPS 誘導と類似の形質誘導が可能であり、癌細胞の悪性形質を大きく改変できることを示した(Proc Natl Acad Sci USA 2010)。リプログラミングに関してウイルスベクター等を用いる従来法である山中4因子を用いた方法よりも、安全でかつ有用な方法を開発する目的で、転写因子とは別にマイクロ RNA(miR200, 302, 369)によっても正常細胞と一部の癌細胞においてはリプログラミングが可能であることを明らかにした(Cell Stem Cell 2011)。その研究開発を癌研究に応用する目的で、消化器癌細胞にマイクロ RNA(miR200, 302, 369)を導入する実験を開始した。正常の ES 細胞を対照とした研究を進めた。またマイクロ RNA の生合成系の研究を開始し、癌細胞に特化したマイクロ RNA の標的化に着手した。特に、本年度は、癌幹細胞の微小環境の特徴である嫌気性代謝の特性に基づき、佐谷・森らと協力して事業を展開し、当初の計画を順調に推進し、更に本事業成果の活用により、飛躍的な発展の基盤を構築することができた。具体的に、①CD44v、CD13 を標的化、これらの機能性癌幹細胞分子を阻害剤(Sulfasalazine, Ubenimex)により、従来の抗癌剤放射線療法に上乗せして、画期的な治療成果を得ることを in vitro および in vivo で示した。②上流としてスプライシング異常を検討することにより、CD44v および大腸癌の癌幹細胞分子 Lgr5 の転写産物に新たな重要な特徴を見出した。すなわち、癌微小環境の低酸素環境で、スプライシング因子の発

現異常が原因となり、癌幹細胞の治療抵抗性となる(投稿中)。③下流として、CD44v の細胞内結合因子 PKM2 に焦点をあてた。大腸癌では90%以上がPKM2のスプライシング異常であった(投稿中)。④癌細胞リプログラミングとしてマイクロ RNA を検討したところ、miR200c は EMT(Epithelial Mesenchymat Transition)を介して、miR302は細胞周期調節を介して、miR369 は細胞内嫌気性代謝を介して、細胞ゲノムを低メチル化に誘導し、リプログラミング効率を高めることを明らかにした。

D. 考察

細胞のリプログラム化は1980年代から研究の対象となっていたが、核移植等の高度な技術に頼らざるを得なかった。本申請の分担者山田らは核移植を用いた腫瘍細胞のリプログラム化の草分けである(Gene Dev 2004)。ところが、2007年に京都大学の山中教授が世界に先駆けて限定された因子のみ(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)を用いて細胞のリプログラム化に成功し(iPS細胞;Cell 2007)、高度で簡便な方法によるリプログラム化に新たな道が拓かれた。ここにESが内包していた倫理と免疫の問題を解決できる見通しが立った。臨床応用までには、腫瘍化(ベクターに起因する癌と、未分化性に起因する胚性腫瘍の2つがある)の問題を解決する必要がある。

その後、iPSの研究は、因子数を減らし小分子化合物を補助的に用いてリプログラム化が試みられた。また山中原法ではレトロウイルスをベクターとして利用していたためにゲノム挿入変異が懸念されたが、挿入変異がない核内に入らない episomal や除去可能な PiggyBac ベクターが開発されたが、これらは依然として DNA 骨格を残存しており、理想的

とは言えなかった。また挿入変異がないとされる RNA センダイウイルスも利用されているが、ウイルスであることには変わりがない。さらに、mRNA や蛋白質を用いる方法が報告されているが煩雑な手技であり効率が低い。ごく最近、マイクロ RNA 搭載レンチウイルスによる方法が約10倍の効率であることが報告されたが (Cell Stem Cell 2011)、マイクロ RNA は未熟型であり、ウイルスを使用している。森らは、成熟型 RNA を用いてウイルスを使用せずに導入し iPS 細胞を誘導する技術を確立した(国際特許申請中・Cell Stem Cell 2011, in press)。この方法では人工合成核酸を使用して清潔であることから、臨床応用の点では大きな進歩である。

さらに、癌幹細胞の代謝特性として、CD44v の結合因子・xCT(細胞外シスチンの能動輸送を担い、グルタチオン還元系を介して癌幹細胞内の活性酸素濃度を低く保ち、治療抵抗性を示す)、および CD44v の結合因子・PKM2(嫌気性解糖系の鍵分子でありペントースリン酸側副路を介して還元型 NADPH の産生を通じて癌細胞のディフェンスに働く)を同定して解析した(佐谷ら、Cancer Cell 2011; Cancer Res 2012)。

癌細胞をリプログラム化するとどのようになるかは学問的には研究の余地が残されている。実験として山中因子を消化器癌細胞に導入すると、遺伝子発現では iPS 細胞に類似した変化が得られ、分化誘導剤と化学療法剤への感受性が亢進し、造腫瘍性が減弱した(森ら、Proc Natl Acad Sci USA 2010)。この現象には癌抑制遺伝子 p16INK4A のプロモーターの脱メチル化が関わっていることが示され、エピジェネティック制御の重要性が示唆される(森・山田ら)。前項の成熟型マイクロ

RNA を消化器癌細胞に導入すると、抗癌剤への感受性が増感され、免疫不全マウスに移植した腫瘍の抑制が観察された(本申請の準備段階;森ら)。この現象が複数の癌に共通して観察されることか、または個々の癌によって相違しているが内因性のマイクロ RNA 発現等を事前に計測することで予測可能であるのか、検討している。

前年度に引き続き私達を含む内外の研究により、癌幹細胞の性質を大きく変革できる技術開発の道が拓けた。現在可能な細胞リプログラミング(RP)方法には『3種類』が注目されている。第一は転写因子による epigenetic RP 誘導(京都大学山中先生 iPS 細胞/我々はこれを癌に応用した[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107(1), 40-45, 2010])。第二はマイクロ RNA による RP 誘導(我々[Cell Stem Cell, 8,376,2011]、および米国 Morrisey 博士[Cell Stem Cell, 8,633,2011] の mi-iPS 細胞)。第三は、癌幹細胞の根絶を目指す代謝特性を利用した metabolic RP であり、本申請で研究開発する。

三番目の metabolic RP に関しては、現在注目されている pathway は、嫌気性解糖系とアミノ酸合成系(特にグリシン)であり、『癌細胞では正常酸素分圧にも関わらず嫌気性解糖系が優位に働き、低いエネルギー産生効率の中で多量のバイオマスを生成している(Warburg 効果)』が知られている。鍵を握る酵素として、pyruvate kinase(PKM2), glycine decarboxylase(GLDC), Isocitrate dehydroxylase(IDH), phosphoglycerate dehydroxylase(PHGDH) の4つが知られているが、Bioinformatics から10個前後が Driver Enzymes とされる (Cell,148,1-14,2012)。本申請でこれらを同定し創薬シーズに上げる。

E. 結論

前年度に引き続き、革新的な医療を創出して出来るだけ早く臨床現場に展開するための創薬シーズの開発に向けて着実な基盤を構築した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kim H.M., 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.*19:S539-S548,2012.
- 2) Nishida N., Nagahara M., Sato T., Mimori K., Sudo T., Tanaka F., Shibata K., Ishii H., Sugihara K., Doki Y., Mori M. Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic microRNA clusters. *Clin.CancerRes.*18(11):3054-70,2012
- 3) Hoshino H., Nagano H., Haraguchi N., Nishikawa S., Tomokuni A., Kano Y., Fukusumi T., Saito T., Osaki M., Sakai D., Satoh T., Eguchi H., Sekimoto M., Doki Y., Mori M., Ishii H. (*) Hypoxia and TP53 deficiency for induced pluripotent stem cell-like properties in gastrointestinal cancer. *Intern. J. Oncol.* 40: 1423-1430, 2012.
- 4) Ishimaru, S., Mimori, K., Yamamoto, K., Inoue, H., Imoto, S., Kawano, S., Yamaguchi, R., Sato, T., Toh, H., Iinuma, H., Maeda, T., Ishii, H., Suzuki, S., Tokudome, S., Watanabe, M., Tanaka, J., Kudo, S.E., Sugihara, K., Hase, K., Mochizuki, H., Kusunoki, M., Yamada, K., Shimada, Y., Moriya, Y., Barnard, G.F., Miyano, S., Mori, M. Increased risk for CRC in diabetic patients with the nonrisk allele of SNPs at 8q24. *Ann. Surg.Oncol.*, 19(9):2853-2858, 2012
- 5) Nishikawa, S., Dewi, D.L., Ishii, H., Konno, M., Haraguchi, N., Kano, Y., Fukusumi, T., Ohta, K., Noguchi, Y., Ozaki, M., Sakai, D., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M. Transcriptome study of dormant gastrointestinal cancer stem cells. *Int. J. Oncol.* 41: 979-984, 2012.
- 6) Ohkuma, M., Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Kim, H.M., Shimomura, M., Hirose, H., Yanaga, K., Mori, M. Absence of CD71 transferrin receptor characterizes human gastric adenocarcinoma stem cells. *Ann. Surg. Oncol.* 19:1357-1364,2012.
- 7) Suzuki Y., Haraguchi N., Takahashi H., Uemura M., Nishimura J., Hata T., Takemasa I., Mizushima T., Ishii H., Doki Y., Mori M., Yamamoto H. SSEA-3 as a novel amplifying cancer cell surface marker in colorectal cancers. *Int. J. Oncol.*, 42(1):161-7, 2013.
- 8) Ohta K., Haraguchi N., Kano Y., Kagawa, Y., Konno M., Nishikawa S., Hamabe A., Hasegawa S., Ogawa H., Fukusumi T., Uemura M., Nishimura J., Hata T., Takemasa I., Nishimura T., Noguchi Y.,

Ozaki M., Kudo T., Sakai D., Satoh T., Fukami M., Ishii M., Yamamoto H., Doki, Y., Mori M., Ishii H.(*) Depletion of Jarid1b induces cellular senescence in human colorectal cancer.

Intern. J. Oncol. 2013 [Epub ahead of print]

2. 実用新案登録
特になし。

3. その他
特になし。

2. 学会発表

- 1) 石井秀始: 消化器癌幹細胞の最近の知見、第 112 回日本外科学会定期学術集会、2012 年 4 月 14 日 千葉
- 2) 石井秀始: Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming for Innovative Cell-Modifying Technology in Cancer、第 33 回日本炎症・再生医学会シンポジウム、2012 年 7 月 5 日 福岡
- 3) 石井秀始: 先端医療: がん幹細胞理論に基づく新規治療開発、第 10 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2012 年 7 月 28 日 大阪
- 4) 石井秀始: Cancer stem cell research for innovative cell-modifying technologies、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19 日 京都

G. 知的財産権の出願・登録状況

発明の名称: 誘導多能性幹細胞の製造方法

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

届出日: 平成 21 年 10 月 14 日

1. 特許取得

特になし。

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト

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
橋本恭一、波多野裕一郎、原明、坂井義治、山田泰広	消化器発癌モデルマウスを用いた癌エピジェネティクス研究	鯨岡 哲	分子消化器病	先端医学社	日本	2012	62-66

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
Miyagaki H, et.al	DOK2 as a marker of poor prognosis of patients with gastric adenocarcinoma after curative resection.	<i>Ann Surg Oncol</i>	19(5)	1560-1567	2012
Sugimura K, et.al	Let-7 expression is significant determinant of response to chemotherapy through the regulation of IL-6/STAT3 pathway in esophageal squamous cell carcinoma.	<i>Clin Cancer Res</i>	18(18)	5144-5153	2012
Yamada D, et.al	Role of the hypoxia-related gene, JMJD1A, in hepatocellular carcinoma: clinical impact on recurrence after hepatic resection.	<i>Ann Surg Oncol</i>	(3)	355-364	2012
Hinohara K, et.al	ErbB receptor tyrosine kinase/NF- κ B signaling controls mammosphere formation in human breast cancer.	<i>Proc Natl Acad Sci U S A</i>	109(17)	6584-6589	2012
Tanemura M, et.al	Rapamycin causes upregulation of autophagy and impairs islets function both in vitro and in vivo.	<i>Am J Transplant</i>	12(1)	102-114	2012

Takiguchi S, et.al	Mapping analysis of ghrelin producing cells in the human stomach associated with chronic gastritis and early cancers.	<i>Dig Dis Sci</i>	57(5)	1238-1246	2012
Takiguchi S, et.al	A comparison of postoperative quality of life and dysfunction after Billroth I and Roux-en-Y reconstruction following distal gastrectomy for gastric cancer: results from a multi-institutional RCT.	<i>Gastric Cancer</i>	15(2)	198-205	2012
Miyata H, et.al	Randomized study of clinical effect of enteral nutrition support during neoadjuvant chemotherapy on chemotherapy-related toxicity in patients with esophageal cancer.	<i>Clin Nutr</i>	31(3)	330-336	2012
Miyata H, et.al	Clinical relevance of induction triplet chemotherapy for esophageal cancer invading adjacent organs.	<i>J Surg Oncol</i>	106(4)	441-447	2012
Mizushima T, et.al	Laparoscopic bladder-preserving surgery for enterovesical fistula complicated with benign gastrointestinal disease.	<i>Case Rep Gastroenterol</i>	6(2)	279-284	2012
Nishida N, et.al	MicroRNA-10b is a prognostic indicator in colorectal cancer and confers resistance to the chemotherapeutic agent 5-fluorouracil in colorectal cancer cells.	<i>Ann Surg Oncol</i>	19(9)	3065-3071	2012
Kagawa Y, et.al	Transumbilical laparoscopic-assisted appendectomy for children and adults.	<i>Int J Colorectal Dis</i>	27(3)	411-413	2012
Miyagaki H, et.al	Performance comparison of peripherally inserted central venous catheters in gastrointestinal surgery: a randomized controlled trial.	<i>Clin Nutr</i>	31(1)	48-52	2012

Tomimaru Y, et.al	IGFBP7 downregulation is associated with tumor progression and clinical outcome in hepatocellular carcinoma.	<i>Int J Cancer</i>	130(2)	319-327	2012
Yamamoto H, et.al	Distinct expression of C4.4A in colorectal cancer detected by different antibodies.	<i>Int J Oncol.</i>	42(1)	197-201	2013
K. Osada, et.al	Bioactive polymeric metallosomes self-assembled through block copolymer-metal complexation.	<i>J. Am. Chem. Soc.</i>	134 (32)	13172-13175	2012
T. Suma, et.al	Smart multilayered assembly for biocompatible siRNA delivery featuring dissolvable silica, endosome-disrupting polycation, and detachable PEG.	<i>ACS Nano</i>	6 (8)	6693-6705	2012
F. Pittella, et.al	Pancreatic cancer therapy by systemic administration of VEGF siRNA contained in calcium phosphate/charge-conversional polymer hybrid nanoparticles.	<i>J. Control. Release</i>	161 (3)	868-874	2012
R. J. Christie, et.al	Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection.	<i>ACS Nano</i>	6 (6)	5174-5189	2012
Md. Rafi, et.al	Polymeric micelles incorporating (1,2-diaminocyclohexane)platinum (II) suppress the growth of orthotopic scirrhous gastric tumors and their lymph node metastasis.	<i>J. Control. Release</i>	159 (2)	189-196	2012
P. Mi, et.al	Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex micelles with high relaxivity for MR cancer imaging	<i>Biomaterials</i>	34 (2)	492-500	2013

Nishimura T, et.al	Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by pluripotency reprogramming and dedifferentiation.	<i>Cell Stem Cell</i>	12	114-126	2012
Oikawa T, et.al	SALL4, a stem cell biomarker in liver cancers.	<i>Hepatology</i>	[Epub ahead of print]	[Epub ahead of print]	2012
Nakajima-Takagi Y, et.al	Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells.	<i>Blood</i>	121	447-458	2012
Yamaguchi T, et.al	Development of an All-in-One Inducible Lentiviral Vector for Gene Specific Analysis of Reprogramming.	<i>PLoS One</i>	7	e41007	2012
Nakamura S, et.al	Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells.	<i>PLoS One</i>	7	e36209	2012
Kumano K, et.al	Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples.	<i>Blood</i>	119	6234-6242	2012
Tashiro Y, et.al	Inhibition of PAI-1 induces neutrophil-driven neoangiogenesis and promotes tissue regeneration via production of angiocrine factors in mice.	<i>Blood</i>	119	6382-6393	2012
Kobayashi T, et.al	Identification of Rat Rosa26 Locus Enables Generation of Knock-in Rat Lines Ubiquitously Expressing tdTomato.	<i>Stem Cells Dev</i>	21	2981-2986	2012
Nishida C, et.al	MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells.	<i>Blood</i>	119	5405-5416	2012