

201438012A

厚生労働科学研究委託費  
(革新的がん医療実用化研究事業)

スキルスがんにおける癌幹細胞  
悪性形質獲得機構に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 土屋 輝一郎

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究費委託事業による委託業務として、業務主任者 土屋輝一郎が実施した平成26年度「スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

## 序

スキルスがんは胃に代表されるように若年者に発症し急速な進行から予後が極めて不良な難治性疾患である。いまだ根本的な治療法が無く、生存期間が非常に短いことから社会活動、家族環境などに深刻な影響を及ぼしている。一方腸管に目を転じると、近年本邦において炎症性腸疾患の罹患患者が増加し、長期炎症に伴い癌が高率に発症することが問題視されている。注視すべきは、通常の大腸がんとは異なり粘膜下への浸潤傾向が強く、進展が早いことが特徴であり、奇しくも胃スキルスがんと類似した特性を持つことである。「スキルス」とは、ギリシャ語の *skirros* (硬い腫瘍) を語源としており、間質が多く、びまん性に浸潤していく腫瘍を指し示す。以前より、予後が不良であることの代名詞として使われるなど世間に広く認知はされているものの、その本態を直接的に解明することを目的とした大規模な研究は未だない。

そこで、消化管の部位に特定せず「スキルス」の性質に特化して研究を推進することで、その病態を明らかにすると共に、スキルスがんの発症原因・治療標的探索を行うことで革新的医薬品の開発までつなげることを目標として、革新的がん医療実用化研究事業のもと本研究班を設立した次第である。その目標達成のために本研究班では、「癌幹細胞」「ゲノム解析」を鍵として班員を組織した。これまで継続して実りある研究成果を挙げていただいた諸先生のご賛同により、東京医科歯科大学の総力を結集した日本トップクラスのチームを構成できたことに深謝致したい。さらに今後はスキルスがんを研究される先生にご参集いただき、全国的な規模へと拡充していく予定である。

本年度は10年計画という大きなプロジェクトの1年目ではあるが、分担研究者・協力研究者の諸先生のご協力により、班会議の使命である質の高い基礎研究で大きな成果を得ることができた。来年度以降、この研究班を更に発展させ、日本の総力をあげて取り組むことで、革新的医薬品の開発から炎スキルスがんの自然史を変え、医療経済的・社会経済的問題解決に繋がる貢献が可能であると信じている。今後とも諸先生方のご協力を賜れば幸いである。

平成27年3月

業務主任者 土屋 輝一郎

# 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	1
スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究 土屋輝一郎（東京医科歯科大学消化管先端治療学）	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
スキルスがん癌幹細胞解析プロジェクト	
スキルスがん初代培養プロジェクト	
スキルスがん癌幹細胞解析及び初代培養系の確立	9
土屋輝一郎（東京医科歯科大学消化管先端治療学）	
スキルスがんゲノムプロジェクト	
上皮間葉転換を基軸としたがん悪性化に関する遺伝子群の探索	14
稲澤譲治（難治疾患研究所 分子細胞遺伝）	
III. 学会等発表実績	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	25
V. 研究成果の刊行に関する一覧	75
VI. 知的財産権・社会活動報告	77
VII. 研究事業報告	79
VIII. 研究班構成	83

## I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業  
「スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究」  
委託業務成果報告（総括・業務項目）

スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究

業務主任者 土屋 輝一郎 東京医科歯科大学消化管先端治療学 准教授

研究要旨

スキルスがんは比較的若年で発症し急速な進行により悲劇的な転帰をとることが問題となっている。その組織は印環細胞癌が多く、胃においてはヘリコバクターピロリ除菌治療の普及のみではスキルス胃癌の減少は期待できない。さらに小腸・大腸においては炎症発がんにより粘液産生癌・印環細胞癌が多く認められ、近年炎症性腸疾患患者の急増によりスキルス小腸・大腸癌の発生が危惧されている。しかし印環細胞癌の発生機序、悪性形質獲得機序に関してはほとんど解析されず、特にびまん性浸潤・転移能・抗癌剤耐性など予後と直結する臨床的特性の分子基盤は全く確立されていない。

そこで申請者は解明の糸口として、細胞・形態異型が強く病理学的には「未分化がん」であるが、細胞形質は粘液産生など「分化状態」にある病理学的特徴に着目し、通常の癌では分化が抑制され増殖が異常亢進するが、印環細胞癌では分化シグナルが抑制されないまま増殖シグナルが亢進するという「分化」と「増殖」の共存が臨床的特性の分子基盤であると予想した。

本研究ではスキルスがんの初代培養による癌幹細胞特性、癌幹細胞から粘液産生細胞へのニッチ機構による分化形質獲得機構を解析し、「分化」と「増殖」の共存による悪性形質獲得機構の解明を目的とする。そのため、独自に開発した大腸上皮初代培養及び移植モデルを応用し、スキルスがん初代培養によりがん細胞のみに純化した状態で機能解析・ゲノム解析を行う予定であり、さらには臨床的特性に関わる分子標的を抽出し、新規治療薬の開発を行うものである。得られた成果はスキルスがんの予防、予後改善に寄与するだけでなく、がんの分化度を従来の病理学的評価から進化させ個々の細胞レベルでの分化度としての評価が可能となり、オーダーメイドがん治療にまで寄与することが期待される。倫理面においてはプライバシーの保護を厳密に行い、各審査等で適切な審査・承認を受けて研究を遂行する。

A. 研究目的

スキルスがんは急速びまん性な進展により予後不良な転帰をたどる。その組織は胃、大腸においてほとんどが印環細胞癌であるが、印環細胞癌の発原因、悪性形質獲得機構は詳細に解明されていない。我々は印環細胞癌が病理学的には「未分化」がんとして定義されるにも関わらず、粘液産生という分化形質を獲得しており「細胞の分化度」は保たれていることに注目した。最初に腸管上皮細胞の分化制御因子である転写因子 Atoh1 制御を解析し、散発性大腸癌では Wnt シグナルの異常亢進が Atoh1 蛋白を分解し、「分化」から「増殖」にスイッチすることでがん細胞の分化形質が抑制される事を発見した。しかしヒト大腸・小腸印環細胞癌においては Atoh1 蛋白発現を認めたことから、散発性大腸癌に Atoh1 を安定発現させると、粘液産生のみならず癌幹細胞形質、遊走能、抗癌剤耐性など印環細胞癌

の臨床的特性と類似した形質を獲得した。さらに腫瘍形成においては一部の細胞の形態が印環細胞様に形質転換するなど、「分化」と「増殖」がスイッチせず「共存」することで、より悪性度の高い印環細胞癌の形質を獲得することを初めて示した。そこで初年度は我々が独自に開発した大腸上皮初代培養系 (Nat Med 2012) を用いて、ヒト印環細胞癌の初代培養から印環細胞癌特有の癌幹細胞特性を明らかにすると共に、粘液産生細胞へのニッチ機構を解明する。また研究分担者である稲澤は網羅的ゲノム解析により印環細胞癌形成機構の解明を試みる。次年度以降は、独自に構築した大腸上皮細胞の腸管移植モデルを進展させて印環細胞癌の腸管移植による悪性度評価モデルを構築し、悪性形質獲得分子標的に対する新薬の開発の評価を行う予定である。これまでは個々の悪性形質に対する解析は行われているが、その根幹に細胞の分化形質が増殖と共存

することに着眼したのは申請者のみであり、がんにおける細胞分化が病理学的な未分化を獲得するという概念は独創的であると思われる。さらにヒト疾患を体外で再現し、半永続的に評価できるモデル構築は病態解明・新規医薬品開発に有用であり、新しい開発システムとして期待できる。

具体的なプロジェクト (p) 体系は以下の通りである。

【p-A プロジェクトの総合推進】

【p-B 印環細胞癌幹細胞解析プロジェクト】

B-(1) 印環細胞癌幹細胞可視化解析

B-(2) 印環細胞癌幹細胞機能解析

【p-C 印環細胞癌初代培養プロジェクト】

【p-D 印環細胞癌ゲノム解析プロジェクト】

D-(1) 病理組織におけるゲノム解析

D-(2) 初代培養細胞におけるゲノム解析

p-A) プロジェクトの総合推進では、各プロジェクトとの連携・情報交換を通して、総合推進を図ることを目的とする。また実用化のために必要な研究課題を抽出し、適宜研究分担者・研究協力者を追加することで研究班の組織改変を図る。p-B) 印環細胞癌幹細胞解析プロジェクトでは、スキルスがん、印環細胞癌のがん幹細胞機能解析を行い、病態、病型への関与を明らかとすることを目的とした。p-C) 印環細胞癌初代培養プロジェクトでは、スキルスがん患者の内視鏡もしくは手術検体からがん細胞の初代培養を構築することで、がん特性を明らかとするとともに、がん細胞のみに純化された検体でのゲノム解析や薬剤スクリーニング系を確立することを目的とした。p-D) 印環細胞癌ゲノム解析プロジェクトでは、網羅的ゲノム解析により、印環細胞癌特異的な遺伝子変異を描出し、病態への関与及び新規医薬品の標的を探索することを目的とした。(倫理面への配慮)

プロジェクトの遂行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要

性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮する。マウスの実験に関しても国際社会がヒトの健康のためとはいえども、実験および飼育管理の過程において動物に対して不必要な苦痛を与えないように努めるという人道的な配慮を求めていることを十分認識し、各大学の動物実験ガイドラインに沿って実施する。また臨床治験においては1) 倫理委員会及び医薬品等臨床研究審査委員会を審査し承認を得る。2) 被験者の自由意志に基づいて同意を得られた場合にのみ治験参加とする等の十分な配慮をおこなった。

B. 研究成果

平成26年度成果の総括

当初目的に掲げた研究計画を十分遂行することができた。初年度であったが複数のプロジェクトが着実に進行し、多くの論文発表を行い、当該領域の一流誌に多くの研究成果が掲載された。

以下に各々のプロジェクト研究の成果を記す。

【p-A プロジェクトの総合推進】

本研究会発足後に班会議を開催した。スキルスがんの現状及び研究準備状況を会議にて共有することができた。また各プロジェクトにおける進捗状況を把握し、研究遂行のために必要なステップの確認、新規治療薬の標的となる候補の選定を行うなどプロジェクトの推進事項を確認した。さらに各プロジェクトの補完を目的として研究分担者・協力者を追加し班構成をより強固なものにしたことから、総合推進の目的は達成されている。

研究協力者

東京医科歯科大学 分子腫瘍医学分野

深町博史、島田 周、田中真二

東京医科歯科大学 ゲノム病理学分野

石川俊平

東京医科歯科大学 疾患バイオリソースセンター

大西威一郎

東京医科歯科大学 医学部付属病院病理部

明石 巧

東京医科歯科大学 包括病理学

北川昌伸

東京医科歯科大学 人体病理学

江石義信

東京医科歯科大学 腫瘍外科学分野

植竹宏之

東京医科歯科大学 胃外科

小嶋一幸

#### 【p-B 印環細胞癌幹細胞解析プロジェクト】

##### B-(1) 印環細胞癌幹細胞可視化解析

最初に、初代培養細胞に蛍光遺伝子導入を行い細胞の可視化を試みた。培地のマトリゲル内にレンチウイルスを混和させることで上皮細胞への遺伝子導入を可能とした。また幹細胞マーカーである Lgr 5 のプロモーターに GFP を結合した幹細胞可視化システムを構築中であり、ヒト初代培養におけるがん幹細胞可視化モデルを完成させる手順を整備した。

##### B-(2) 印環細胞癌幹細胞機能解析

印環細胞などの粘液産生癌においては、腸管上皮細胞の分泌系細胞への分化を制御する Atoh1 遺伝子に着目し、Atoh1 タンパクの発現機構解析および Atoh1 発現におけるがん特性獲得機構を明らかとした。

#### 【p-C 印環細胞癌初代培養プロジェクト】

スキルスがん患者の内視鏡生検検体もしくは手術切除検体から初代培養を構築することを目的としている。今回研究協力者として深町を加え、既に胃スキルスがん、未分化がんの初代培養を確立済みであり、日本癌学会学術総会にて発表している。さらにスキルスがんのがん幹細胞マーカー解析を開始しており、候補遺伝子の選定を行った。小腸・大腸に関しては、倫理審査に承認され、解析可能な状況にある。ヒト正常小腸・大腸上皮細胞の初代培養に関しては、内視鏡生検検体から培養可能であることは既に確認している。

#### 【p-D 印環細胞癌ゲノム解析プロジェクト】

##### D-(1) 病理組織におけるゲノム解析

倫理審査に承認され解析可能な状況にしている。研

究室内に Laser Capture Micro dissection System を導入し、がん部だけのゲノムを抽出できる環境を整備した。さらに病理部を研究分担者・協力者に加え研究遂行の効率化を図った。またゲノム解析には分担者に石川を加え、胃スキルスがんのゲノム解析により RhoA の遺伝子変異を世界で初めて明らかとした。

##### D-(2) 初代培養細胞におけるゲノム解析

倫理審査にて承認され、解析可能な状況とした。初代培養を行うためには新規に患者のリクルートが必要な状況である。大腸肛門外科、胃外科の協力も得て、幅広く患者スクリーニングを行える体制を整えた。

#### C. 評価

##### 1) 達成度について

複数のプロジェクトを設定しスタートした本研究班では、当初の目標どおりの成果をほぼ達成できたと考える。

印環細胞癌の粘液形質とがん悪性度の関連を明らかとするなどスキルスがん特性を明らかとしている。さらに胃スキルスがんに関しては初代培養に成功しており、さらなる解析を可能とした。またゲノム解析においてもスキルスがん特異的遺伝子変異を明らかとし、今後機能解析を行う予定であるとともに、より大規模の解析のための体制を整備する事ができていることから、当初の目的を果たすことができた。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

学術的には、腸管上皮幹細胞の動態、新規免疫制御機構の解明、疾患特異的腸内細菌の同定及び機能解析といずれのプロジェクトも学術的に高い意義を持ち、国際的にも評価されるものと考えている。これらの病態解明から革新的医薬品を開発するという社会的意義に合致した成果と考える。大腸スキルスがんに関しては発症症例が少ないため、患者のリクルートに対するさらなる工夫と対象例の探索が必要である。

##### 3) 今後の展望について

本研究班の成果を基礎として、今後も個々において質の高い複数のプロジェクトを、多角的に、研究者の有機的連携をもってすすめることにより、我が国におけるスキルスがんの病態解明及び革新的医薬品の開発



を行う。各プロジェクトの知見を集約し、初代培養での解析を構築することでスキルスがんを総合的に評価できることが期待できる。医薬品の開発だけでなく、現在進行中の治験薬の安全性・有効性確認にも大きな役割を果たせる。

#### 4) 研究内容の効率性について

目標を着実に遂行できた部分が多く、期待された効率で成果があげられた。分担研究者・研究協力者班員の密接な連携が今後のさらなる効率的研究の進展を促進するものと考えている。

#### D. 結論

研究代表者、分担研究者および研究協力者の協調的研究体制により、スキルスがんに対する実用化のためのプロジェクトを遂行した。初年度であったが、当初目指した成果が確実にあげられた。非常に予後が不良であり、悲劇的な転帰をたどるスキルスがん患者に対し、基礎研究で得られた知見に基づく新しい治療法開発とその臨床応用、およびこれに基づく正しい情報の普及が可能になるものと期待される。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oshima H, Nakayama M, Han T, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo M, Oshima M. Suppressing TGF- $\beta$  signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. **Cancer Res.** 2014 (in press)
- 2) Horita N, Tsuchiya K\*, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Yasuhiro Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. **Biochem Biophys Res Commun.** 454:493-499, 2014 (\* correspondence) (contributed equal)
- 3) Sasazuki T, Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K, Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T: Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. **Genes Immun.** 2014 Nov 6[Epub ahead of print]
- 4) Matsuzawa Y, Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. **Biochem Biophys Res Commun.** 2014 (in Press)
- 5) Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M. Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. **PeerJ** 2:e370, 2014
- 6) Murano T, Ito G, Nakata T, Hibiya S, Shimizu H, Fujii S, Kano Y, Mizutani T, Yui S, Akiyama-Morio J, Nemoto Y, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. Hes1 promotes the IL-22-mediated antimicrobial response by enhancing STAT3-dependent transcription in human intestinal epithelial cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 443:840-6, 2014
- 7) Matsumoto H, Zaha K, Nakamura Y, Hayashi S, Inazawa J, Nonoyama S. Chromosome 9q33q34 microdeletion with early infantile epileptic encephalopathy, severe dystonia, abnormal eye movements, and nephroureteral malformations. **Pediatr Neurol.** 51:170-5, 2014.
- 8) Uno M, Saitoh Y, Mochida K, Tsuruyama E, Kiyono T, Imoto I, Inazawa J, Yuasa Y, Kubota T, Yamaoka S. NF- $\kappa$ B inducing kinase, a central signaling component of the non-canonical pathway of NF- $\kappa$ B, contributes to ovarian cancer progression. **PLoS One.** 2014 9:e88347, 2014
- 9) Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto

- T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y: Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med.* 370:632–9. 2014
- 10) Yamamoto S, Inoue J, Kawano T, Kozaki K, Omura K, Inazawa J: The impact of miRNA-based molecular diagnostics and treatment of NRF2-stabilized tumors. *Mol Cancer Res.* 12:58–68. 2014
- 11) Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura H, Yamamoto S, Shinbrot E, Hama N, Lehmkuhl M, Hosoda F, Arai Y, Walker K, Dahdouli M, Gotoh K, Nagae G, Gingras MC, Muzny DM, Ojima H, Shimada K, Midorikawa Y, Goss JA, Cotton R, Hayashi A, Shibahara J, Ishikawa S, Guiteau J, Tanaka M, Urushidate T, Ohashi S, Okada N, Doddapaneni H, Wang M, Zhu Y, Dinh H, Okusaka T, Kokudo N, Kosuge T, Takayama T, Fukayama M, Gibbs RA, Wheeler DA, Aburatani H, Shibata T. Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nat Genet.* 2014 [Epub ahead of print].
- 12) Ibrahim R, Matsubara D, Osman W, Morikawa T, Goto A, Morita S, Ishikawa S, Aburatani H, Takai D, Nakajima J, Fukayama M, Niki T, Murakami Y. Expression of PRMT5 in lung adenocarcinoma and its significance in epithelial-mesenchymal transition. *Hum Pathol.* 45:1397–405, 2014.
- 13) Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, \*Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 46:583–7, 2014. (\* Corresponding)
- 14) Hamanaka W, Motoi N, Ishikawa S, Ushijima M, Inamura K, Hatano S, Uehara H, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, Aburatani H, Matsuura M, Iwasaki A, Ishikawa Y. A subset of small cell lung cancer with low neuroendocrine expression and good prognosis: a comparison study of surgical and inoperable cases with biopsy. *Hum Pathol.* 45:1045–56, 2014.
- 15) Tanaka M, Suzuki HI, Shibahara J, Kunita A, Isagawa T, Yoshimi A, Kurokawa M, Miyazono K, Aburatani H, Ishikawa S, Fukayama M. EVI1 oncogene promotes KRAS pathway through suppression of microRNA-96 in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene.* 8:2454–63, 2014.
- 16) Hayashi A, Yamauchi N, Shibahara J, Kimura H, Morikawa T, Ishikawa S, Nagae G, Nishi A, Sakamoto Y, Kokudo N, Aburatani H, Fukayama M. Concurrent activation of acetylation and tri-methylation of H3K27 in a subset of hepatocellular carcinoma with aggressive behavior. *PLoS One.* 10:e91330, 2014.
- 17) Kon A, Shih LY, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, Yoshida K, Okuno Y, Bando M, Nakato R, Ishikawa S, Sato-Otsubo A, Nagae G, Nishimoto A, Haferlach C, Nowak D, Sato Y, Alpermann T, Nagasaki M, Shimamura T, Tanaka H, Chiba K, Yamamoto R, Yamaguchi T, Otsu M, Obara N, Sakata-Yanagimoto M, Nakamaki T, Ishiyama K, Nolte F, Hofmann WK, Miyawaki S, Chiba S, Mori H, Nakauchi H, Koeffler HP, Aburatani H, Haferlach T, Shirahige K, Miyano S, Ogawa S. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. *Nat Genet.* 46:583–7, 2014.
- 18) Tanaka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2014. (in press)
- 19) Matsunaga H, Tanaka S, Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A,

- Nakamura N, Arii S, Tanabe M. A novel therapeutic combination targeting sequentially Aurora B and Bcl-xL in hepatocellular carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, 2014. (in press)
- 20) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arii S. EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. **Annals of Surgical Oncology** 21:1314-22, 2014.
- 21) Uetake H, Yasuno M, MISHIGURO M, Kameoka S, Shimada Y, Takahashi K, Watanabe T, Muro K, Baba H, Yamamoto J, Mizunuma N, Tamagawa H, Mochizuki I, Kinugasa Y, Kikuchi T, Sugihara K. A multicenter phase II trial of mFOLFOX6 plus bevacizumab to treat liver-only metastases of colorectal cancer that are unsuitable for upfront resection (TRICC0808). **Ann Surg Oncol**, 2014. (in press)
- 22) Nakagawa M, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Sugita H, Otsuki S, Kojima M, Uetake H, Sugihara K. Erythropoietin-Producing Hepatocellular A1 is an Independent Prognostic Factor for Gastric Cancer. **Ann Surg Oncol**, 2014. (in press)
- 23) Kojima K, Inokuchi M, Kato K, Motoyama K, Sugihara K, Peterson's hernia after laparoscopic distal gastrectomy with Roux-en-Y reconstruction for gastric cancer. **Gastric Cancer** 17:146-151, 2014.
- 24) Nakagawa M, Kojima K, Inokuchi M, Kato K, Sugita H, Sugihara K. Patterns, timing and risk factors of recurrence of gastric cancer after laparoscopic gastrectomy: Reliable results following long-term follow-up. **EJSO** 2014. (in press)
- 25) Motoyama K, Kojima K, Hayashi M, Kato K, Inokuchi M, Sugihara K.  $\beta$ -Shaped intracorporeal Roux-en-Y reconstruction after totally laparoscopic distal gastrectomy. **Gastric Cancer** 17:588-593, 2014.
- 26) Inokuchi M, Kato K, Kojima K, Sugihara K. Critical analysis of the potential for therapeutic targeting of mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastric cancer. **Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy** 4: 39-48, 2014.
- 27) Murase H, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Kojima K, Sugihara K. Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. **Molecular and Clinical Oncology** 2:509-517, 2014.
- 28) Onishi I, Nakagawa Y, Murayama T, Hidaka M, Yamamoto K, Abe-Suzuki S, Abe S, Kurata M, Kitagawa M. Expression of multidrug resistance 1 gene in association with CXCL12 in chronic myelogenous leukemia. **Pathology**, 2014 (in press).
- 29) Shishido-Hara Y, Kitagawa M, Uchihara T. JC viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: Scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) grow with cell cycle transition through S-to-G2-like state in the enlarging nuclei of oligodendrocytes. **J Neuropathol Exp Neurol**, 2014 (in press).
- 30) Daggett RN, Kurata M, Abe S, Onishi I, Miura K, Sawada Y, Tanizawa T, Kitagawa M. Expression dynamics of CXCL12 and CXCR4 during the progression of mycosis fungoides. **Br J Dermatol**, 2014 (in press).
- 31) Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Nashimoto M, Murayama T, Hidaka M, Kitagawa M. CXCL12<sup>+</sup> stromal cells as bone marrow niche for CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. **Lab Invest**, 2014 (in press).
- 32) Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, Maruyama J,

- Iwasa H, Bao Y, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata S, Nishina H, Abe S, Kitagawa M, Hata Y. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol Cell Biol* 34:1607-1621, 2014.
- 33) Bae Y, Ito T, Iida T, Uchida K, Sekine M, Nakajima Y, Kumagai J, Yokoyama T, Kawachi H, Akashi T, Eishi Y : Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS One*. 9:e90324, 2014
- 34) Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG:  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Hum Pathol*. 45:331-41, 2014
- 35) Yamada I, Hikishima K, Miyasaka N, Tokairin Y, Kawano T, Ito E, Kobayashi D, Eishi Y, Okan H, Shibuya H: Diffusion-tensor MRI and tractography of the esophageal wall ex vivo. *J Magn Reson Imaging*. 40:567-76, 2014
- 36) Ueno H, Shirouzu K, Shimazaki H, Kawachi H, Eishi Y, Ajioka K, Okuno K, Yamada K, Sato T, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Kojima M, Ochiai A, Murata A, Akagi Y, Nakamura T, Sugihara K: Study group of Perineural Invasion projected by the Japanese Society for Cancer of Colon and Rectum (JSCCR). Histogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study. *J Gastroenterol*. 49:400-7, 2014
- H. 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む。）
1. 特許取得
- 【研究代表者 土屋 輝一郎】  
荒木 昭博、土屋輝一郎、大島茂：ダブルバルーン内視鏡用係止具及び内視鏡用アダプタ  
(特許5103610号) 特許登録日平成24年10月12日
- 【研究協力者 田中 真二】  
取得  
United States Patent 6,528,479  
Dominant negative mutants of IRS-1 and uses thereof  
Tanaka S, Wands JR (2003)  
申請  
US 61/811,360  
Compositions and methods for detection and treatment of hepatocellular carcinoma  
Tanaka S, MacDonald G (2013)  
PCT/CA2014/050373  
Compositions and methods for detection and treatment of hepatocellular carcinoma  
Tanaka S, MacDonald G (2014)
- 【研究協力者 小嶋 一幸】  
P 2009-239576 生体組織識別装置及び方法（特許取得）
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業  
「スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究」  
委託業務成果報告（業務項目）

スキルスがん癌幹細胞解析及び初代培養系の確立

業務主任者 土屋 輝一郎 東京医科歯科大学消化管先端治療学 准教授

研究要旨：炎症性腸疾患特に潰瘍性大腸炎に付随する大腸がん(Colitic cancer)は早期発見が困難であり、難治性であることが問題となっている。そのため、慢性の炎症持続による発がん機構、がん進展機構、治療抵抗性機構について理解が必要な状況である。本研究では炎症発がんによく認められる粘液産生形質に着目し腸管上皮細胞分化制御における必須遺伝子である Atoh1 の大腸がんにおける機能を解析した。その結果、大腸がんにおける Atoh1 発現は粘液形質発現のみならず、がん幹細胞形質を発現し抗がん剤耐性を獲得することを明らかとした。粘液形質と幹細胞形質の共存が新たな悪性形質獲得機構である可能性を示唆し、Colitic cancer の難治性の改善を期待できる成果と思われる。

共同研究者

堀田伸勝<sup>1</sup>、福島啓太<sup>2</sup>、林 亮平<sup>2</sup>、日比谷秀爾<sup>2</sup>、  
岡本隆一<sup>3</sup>、深町博史<sup>4</sup>、島田 周<sup>4</sup>、田中真二<sup>4</sup>、大塚和朗<sup>5</sup>  
大西威一郎<sup>6</sup>、明石巧<sup>7</sup>、北川昌伸<sup>8</sup>、江石義信<sup>9</sup>、植竹宏之<sup>10</sup>、  
小嶋一幸<sup>11</sup>  
東京医科歯科大学 腫瘍センター<sup>1</sup>、消化器病態学<sup>2</sup>、  
再生医療研究センター<sup>3</sup>、分子腫瘍医学<sup>4</sup>、光学医療診療部<sup>5</sup>  
疾患バイオリソースセンター<sup>6</sup>、病理部<sup>7</sup>、包括病理学<sup>8</sup>、  
人体病理学<sup>9</sup>、腫瘍外科学分野<sup>10</sup>、胃外科<sup>11</sup>

A. 研究目的

スキルスがんは粘膜下への浸潤が非常に強く、容易に遠隔転移をおこすため、非常に予後が悪い。さらに発症頻度は少ないものの比較的若年者に発症することから、社会活動、家族周囲に多大な影響を及ぼしている。しかしながら、その浸潤性、転移性を根本的に解決する手段、原因は未だ明らかとされていない。そこで本研究では「スキルス性」を主題として病態解明を行うことを目的とする。特にスキルスがんは粘液産生細胞、印環細胞の形態を多く示すことから、病理学的特徴と細胞形質との関連性を明らかにすることでその病態理解への足がかりとする。以前より我々は大腸の炎症性腸疾患にともなう癌 (Colitis associated cancer; CAC) は散発性大腸がんとは発がん形式が異なり、内視鏡で発見が困難であるため進行がんで発見されることが多いこと、抗がん剤耐性を示し予後不良である

こと、粘液産生形質を有することなど胃スキルスがんと同様の特徴を有することに注目してきた。そこで、大腸がん細胞の分化度に着目し、その機能解析として大腸上皮細胞の分化制御に必須な蛋白に注目した。転写因子である Atoh1 は腸管上皮細胞の分泌系細胞への分化に必須であることが報告されており、Atoh1 は非粘液大腸癌では発現していないことを以前我々は報告している。さらに Atoh1 は APC 変異による Wnt シグナル亢進が Atoh1 の積極的な蛋白分解を誘導し Atoh1 の発現を抑制することで非粘液形質を維持することを証明している。近年粘液産生大腸がんでは Atoh1 が発現していることが報告され大腸がんにおける Atoh1 発現の意義を解析した。

また我々が独自に構築した、大腸上皮細胞の初代培養の系は上皮細胞機能を体外で模倣しており、解析ツールとして非常に有用であり、現在は他の研究グループから同様の手法で、小腸、胃上皮細胞の初代培養は既に確立されている。この系をさらに発展させることで、胃・小腸・大腸のスキルスがんの初代培養が可能であることが示唆されたことから、初代培養の確立及び機能解析を目的としている。

B. 研究方法

1) 大腸がん細胞への Atoh1 蛋白発現。  
種々の Atoh1 変異体の解析により蛋白分解認識部位を同定し、さらに分解認識部位の変異体を用いて大腸が

んに Atoh1 を安定して発現する系を構築する。

さらに大腸がん、粘液形質を有する大腸がん、炎症性腸疾患に付随した大腸がんの Atoh1 発現を免疫染色にて解析を行う。

#### 2) Atoh1 発現における形質発現解析。

Atoh1 安定発現大腸がん作成ののち、そのがん細胞の粘液産生性、がん幹細胞マーカー発現を解析する。Atoh1 発現により複数の癌幹細胞マーカーが新たに発現するため、ソーティングにてそれぞれの癌幹細胞マーカー発現細胞の同定を行い、種々の印環細胞癌特性を反映する癌幹細胞を抽出する。

#### 3) Atoh1 蛋白安定化発現機構解析

散発性大腸がんでは Atoh1 は積極的蛋白分解により、蛋白発現を認めないが、炎症関連大腸がんでは Atoh1 蛋白発現を認めたことから、炎症と Atoh1 蛋白安定化との関連を解析する。

#### 4) Atoh1 発現大腸がんの悪性度解析。

Atoh1 発現大腸がんの細胞増殖、抗がん剤耐性、migration 活性を解析し、Atoh1 における大腸がん悪性度への影響を評価する。

#### 5) スキルスがん初代培養系の構築

ヒト印環細胞癌初代培養に関しては、倫理審査委員会にて承認のもと、ヒト胃・小腸・大腸の印環細胞癌の生検を行い、3次元初代培養を行う。既存の癌幹細胞マーカーの発現検討を行うと同時に、レポーター結合 GFP を初代培養に導入することで印環細胞癌幹細胞を可視化する。同時に散発小腸・大腸癌からも初代培養を行い、癌幹細胞を同様に可視化する。それぞれの癌幹細胞を SCID マウスに移入し、浸潤能・遠隔転移・抗がん剤耐性について比較検討を行い、印環細胞癌幹細胞の特性を明らかとする。さらに Mucin2 や TFF3 など粘液産生を可視化するため、レポーターベクターを作成する。幹細胞マーカーレポーターと共導入し、癌幹細胞を GFP、粘液産生細胞を mCherry などで可視化する。幹細胞-粘液細胞移行をライブイメージングにて追跡することで分化形質誘導機構を解析する。また印環細胞癌幹細胞を抽出した後、小分子化合物ライブラリーにて抗がん作用を有する小分子を同定し、新規治療薬の可能性を詳細に検討する。

#### (倫理面への配慮)

以上の研究の施行に当たっては、厚生科学審議会の「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等」に対応するための

指針」などに準じて、1) 倫理審査委員会で研究の適否などを議論・審査し承認を得る。2) 意義と必要性を説明しその自由意志に基づき同意を得られた場合にのみ検体提供を受ける。検体提供の有無により、治療など不利益を被ることはない。3) 個人のプライバシーの保護を厳密に行う。4) 希望に応じ検体提供者やその保護者への研究結果の説明を行う。5) 研究目的でのみ検体を使用し、その他の目的では使用しない等、人権及び利益の確保を行うよう配慮した。動物実験に関しては、当施設の動物実験ガイドラインに準拠して、動物実験委員会の承認を受けて実施した。

#### C.D. 研究結果及び考察

##### 1) 大腸がん細胞への Atoh1 蛋白発現。

Atoh1 蛋白は GSK3 依存性に分解されることを証明し、さらに GSK3 によってリン酸化される部位を検索したところ、5 個のセリン残基を同定した。このセリンをすべてアラニン残基に変換した変異体を作成し大腸がん細胞に導入したところ安定した蛋白発現を認めた。

また臨床検体を用いて、各種大腸がんの Atoh1 発現解析を行ったところ、非粘液形質大腸がんでは Atoh1 発現を認めないが、粘膜深部の粘液形質発現部では Atoh1 発現を認めた。さらに潰瘍性大腸炎付随がんでは粘液形質がんを認め、同部位での Atoh1 発現を認めた事から Atoh1 発現と粘液形質発現の関連が示唆された(論文投稿中)。

##### 2) Atoh1 発現における形質発現解析。

マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現解析、GSEA 解析によるクラスタリングにより、Wnt シグナル関連遺伝子の発現、ALDH1 などの幹細胞マーカーの発現、がん転移巣に認められる遺伝子発現を認めた。本年度はさらに最も多く発現誘導する遺伝子を同定し、その機能解析を開始している。さらに初代培養細胞に蛍光遺伝子導入を行い細胞の可視化を試みた。培地のマトリゲル内にレンチウイルスを混和させることで上皮細胞への遺伝子導入を可能とした。また幹細胞マーカーである Lgr 5 のプロモーターに GFP を結合した幹細胞可視化システムを構築中であり、ヒト初代培養におけるがん幹細胞可視化モデルを完成させる手順を整備した。

##### 3) Atoh1 蛋白安定化発現機構解析

野生型 Atoh1 蛋白の大腸がんにおける安定条件を検討した。LPS, Flagellin などの腸内細菌構成成分および炎

症性サイトカインである TNF $\alpha$  刺激により Atoh1 蛋白の安定化、定常発現を認めた。TNF からのシグナル伝達経路を解析したところ、Akt の活性化から GSK3 $\beta$  が不活化し、Atoh1 がリン酸化を介した蛋白分解から解除されることを明らかとした（論文投稿中）。

#### 4) Atoh1 発現大腸がんの悪性度解析。

以上より Atoh1 発現による粘液産生は本来の細胞形質を獲得した分化誘導だけでなく、幹細胞形質も獲得したことから悪性度について解析を行った。

細胞増殖については、MTS アッセイと FUCCI システムを用いて解析を行ったところ、細胞増殖は Atoh1 発現により抑制されていたが、G0/G1 期が延長しており、幹細胞形質である G0 アレストを起こすことが明らかとなった。また migration アッセイにて増殖はしないまま遊走能は亢進していた。さらに大腸がん治療に用いられる種々の抗がん剤にて処理したところ、Atoh1 発現は有意にアポトーシスを抑制し抗がん剤耐性を示した（論文投稿中）。大腸がんをヌードマウスに皮下接種した in vivo の系においても同様の結果がえられた。In vivo においては Lgr5 陽性細胞と粘液産生細胞がそれぞれ別の細胞に分かれたことから、ニッチを形成することが示唆された。

#### 5) スキルスがん初代培養系の構築

スキルスがん患者の内視鏡生検検体もしくは手術切除検体から初代培養を構築することを目的としている。今回研究協力者として深町を加え、既に胃スキルスがん、未分化がんの初代培養を確立済みであり、日本癌学会学術総会にて発表している。さらにスキルスがんのがん幹細胞マーカー解析を開始しており、候補遺伝子の選定を行った。小腸・大腸に関しては、倫理審査に承認され、解析可能な状況にある。ヒト正常小腸・大腸上皮細胞の初代培養に関しては、内視鏡生検検体から培養可能であることは既に確認している。

#### 4. 評価

##### 1) 達成度について

本研究の目的に沿って研究計画をほぼ遂行することができた。臨床情報に基づいた思考過程によって得られた基礎的データから新たな治療法への可能性を示すことができ、画期的治療法が確立できるものと考えられる。よって本研究の達成度は高いと思われる。スキルスがんの発症頻度が低いいため、解析のための患者選定をより広範囲に行う必要がある。

##### 2) 研究成果の学術的・国際的・社会的意義について

本研究結果に関しては炎症関連がんにおける難治性のメカニズムに貢献でき、がん幹細胞形質獲得の新たなシステムの解明はがん医療への可能性も示し学術的にも高く評価され、実際インパクトの高い海外学術雑誌に多数掲載されたことより国際的評価も高いと考えられる。

##### 3) 今後の展望について

Atoh1 が、がん幹細胞形質を獲得する機構をさらに詳細に検討することで、がん幹細胞を標的とした大腸スキルスがん新規治療法の開発を試みる。動物モデルの構築も既に確立しているためヒトへの応用も実現可能と思われる。今後ヒト初代培養の症例数を蓄積させることにより、ヒトに特化した体外スキルスがんモデルを構築し、がん特性機構を解明していく。

##### 4) 研究内容の効率性について

当初たてた目標を着実に遂行できており一定の効率性は挙げられた。

#### E. 結論

粘液産生形質発現機構はがん幹細胞形質の獲得及びがん悪性度と密接に関与することが示された。今後、がん幹細胞の動態解析を行うことで、スキルスがんの発がん予防、有効ながん治療法の開発が期待できる。

#### F. 健康危険情報 なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Oshima H, Nakayama M, Han T, Naoi K, Ju X, Maeda Y, Robine S, Tsuchiya K, Sato T, Sato H, Taketo M, Oshima M. Suppressing TGF- $\beta$  signaling in regenerating epithelia in an inflammatory microenvironment is sufficient to cause invasive intestinal cancer. *Cancer Res.* 2014 (in press)
- 2) Horita N, Tsuchiya K\*, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Yasuhiro Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M. Fluorescent labelling of intestinal epithelial cells reveals independent long-lived intestinal stem cells in a crypt. *Biochem Biophys Res Commun.* 454:493-499, 2014 (\* correspondence) (contributed equal)
- 3) Sasazuki T, Oryoji D, Hisamatsu T, Tsuchiya K,



- Umeno J, Ueda S, Yamamoto K, Matsumoto T, Watanabe M, Hibi T: Associations of HLA class I alleles in Japanese patients with Crohn's disease. *Genes Immun.* 2014 Nov 6[Epub ahead of print]
- 4) Matsuzawa Y, Oshima S, Nibe Y, Kobayashi M, Maeyashiki C, Nemoto Y, Nagaishi T, Okamoto R, Tsuchiya K, Nakamura T, Watanabe M. RIPK3 regulates p62-LC3 complex formation via the caspase-8-dependent cleavage of p62. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 (in Press)
  - 5) Shimizu H, Okamoto R, Ito G, Fujii S, Nakata T, Suzuki K, Murano T, Mizutani T, Tsuchiya K, Nakamura T, Hozumi K, Watanabe M. Distinct expression patterns of Notch ligands, Dll1 and Dll4, in normal and inflamed mice intestine. *PeerJ* 2:e370, 2014
  - 6) Tanaka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of pancreatic cancer. *Annals of Surgical Oncology*, 2014. (in press)
  - 7) Matsunaga H, Tanaka S, Aihara A, Ogawa K, Matsumura S, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Arii S, Tanabe M. A novel therapeutic combination targeting sequentially Aurora B and Bcl-xL in hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, 2014. (in press)
  - 8) Ogawa K, Tanaka S, Matsumura S, Murakata A, Ban D, Ochiai T, Irie T, Kudo A, Nakamura N, Tanabe M, Arii S. EpCAM-targeted therapy for human hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* 21:1314-22, 2014.
  - 9) Uetake H, Yasuno M, MISHIGURO M, Kameoka S, Shimada Y, Takahashi K, Watanabe T, Muro K, Baba H, Yamamoto J, Mizunuma N, Tamagawa H, Mochizuki I, Kinugasa Y, Kikuchi T, Sugihara K. A multicenter phase II trial of mFOLFOX6 plus bevacizumab to treat liver-only metastases of colorectal cancer that are unsuitable for upfront resection (TRICC0808). *Ann Surg Oncol*, 2014. (in press)
  - 10) Nakagawa M, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Sugita H, Otsuki S, Kojima M, Uetake H, Sugihara K. Erythropoietin-Producing Hepatocellular A1 is an Independent Prognostic Factor for Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol*, 2014. (in press)
  - 11) Kojima K, Inokuchi M, Kato K, Motoyama K, Sugihara K, Peterson's hernia after laparoscopic distal gastrectomy with Roux-en-Y reconstruction for gastric cancer. *Gastric Cancer* 17:146-151, 2014.
  - 12) Nakagawa M, Kojima K, Inokuchi M, Kato K, Sugita H, Sugihara K. Patterns, timing and risk factors of recurrence of gastric cancer after laparoscopic gastrectomy: Reliable results following long-term follow-up. *EJSO* 2014. (in press)
  - 13) Motoyama K, Kojima K, Hayashi M, Kato K, Inokuchi M, Sugihara K.  $\beta$ -Shaped intracorporeal Roux-en-Y reconstruction after totally laparoscopic distal gastrectomy. *Gastric Cancer* 17:588-593, 2014.
  - 14) Inokuchi M, Kato K, Kojima K, Sugihara K. Critical analysis of the potential for therapeutic targeting of mammalian target of rapamycin (mTOR) in gastric cancer. *Gastrointestinal Cancer: Targets and Therapy* 4: 39-48, 2014.
  - 15) Murase H, Inokuchi M, Takagi Y, Kato K, Kojima K, Sugihara K. Prognostic significance of the co-overexpression of fibroblast growth factor receptors 1, 2 and 4 in gastric cancer. *Molecular and Clinical Oncology* 2:509-517, 2014.
  - 16) Onishi I, Nakagawa Y, Murayama T, Hidaka M, Yamamoto K, Abe-Suzuki S, Abe S, Kurata M, Kitagawa M. Expression of multidrug resistance 1 gene in association with CXCL12 in chronic myelogenous leukemia. *Pathology*, 2014 (in press).
  - 17) Shishido-Hara Y, Kitagawa M, Uchihara T. JC viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: Scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies (PML-NBs) grow with cell cycle transition through S-to-G2-like state in the enlarging nuclei of oligodendrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2014 (in press).
  - 18) Daggett RN, Kurata M, Abe S, Onishi I, Miura K, Sawada Y, Tanizawa T, Kitagawa M. Expression dynamics of CXCL12 and CXCR4 during the progression of mycosis fungoides. *Br J Dermatol*, 2014 (in press).
  - 19) Abe-Suzuki S, Kurata M, Abe S, Onishi I, Kirimura S, Nashimoto M, Murayama T, Hidaka M, Kitagawa M. CXCL12<sup>+</sup> stromal cells as bone marrow niche for CD34<sup>+</sup> hematopoietic cells and their association with disease progression in myelodysplastic syndromes. *Lab Invest*, 2014 (in press).
  - 20) Yang Z, Nakagawa K, Sarkar A, Maruyama J, Iwasa H, Bao Y, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata S, Nishina H, Abe S, Kitagawa M, Hata Y. Screening with a novel cell-based assay for TAZ activators identifies a compound that

enhances myogenesis in C2C12 cells and facilitates muscle repair in the muscle injury model. *Mol Cell Biol* 34:1607-1621, 2014.

- 21) Bae Y, Ito T, Iida T, Uchida K, Sekine M, Nakajima Y, Kumagai J, Yokoyama T, Kawachi H, Akashi T, Eishi Y : Intracellular *Propionibacterium acnes* infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS One*. 9:e90324, 2014
- 22) Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG:  $\gamma$ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Hum Pathol*. 45:331-41, 2014
- 23) Yamada I, Hikishima K, Miyasaka N, Tokairin Y, Kawano T, Ito E, Kobayashi D, Eishi Y, Okan H, Shibuya H: Diffusion-tensor MRI and tractography of the esophageal wall ex vivo. *J Magn Reson Imaging*. 40:567-76, 2014
- 24) Ueno H, Shirouzu K, Shimazaki H, Kawachi H, Eishi Y, Ajioka K, Okuno K, Yamada K, Sato T, Kusumi T, Kushima R, Ikegami M, Kojima M, Ochiai A, Murata A, Akagi Y, Nakamura T, Sugihara K: Study group of Perineural Invasion projected by the Japanese Society for Cancer of Colon and Rectum (JSCCR). Hisogenesis and prognostic value of myenteric spread in colorectal cancer: a Japanese multi-institutional study. *J Gastroenterol*. 49:400-7, 2014

## 2. 学会発表

- 1) 日比谷 秀爾、土屋 輝一郎、福島 啓太、林 亮平、堀田 伸勝、加納 嘉人、大島 茂、岡本 隆一、中村 哲也、渡辺 守: Continuous stimulation with cytokines acquires irreversible accumulation of NF- $\kappa$ B signaling in primary colonic epithelial cells. がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 公開シンポジウム. 東京, 2015年1月28日
- 2) 林 亮平、土屋 輝一郎、渡辺 守: クローン病病態解明を主眼とした  $\alpha$ -defensin 発現制御機構解析. 第52回 小腸研究会. 東京, 2014年11月15日
- 3) 福島啓太、土屋 輝一郎、渡辺 守: 炎症性発癌大腸癌における Atoh1 蛋白発現と癌幹細胞形質獲得機構. 第22回日本消化器関連学会週間. 神戸, 2014年10月23日
- 4) Hayashi R, Tsuchiya K, Hibiya S, Fukushima K, Horita N, Okada E, Araki A, Ohtsuka K, Watanabe

M: Human alpha-defensin 6 regulated by both Atoh1 and beta-catenin might be the pathogenesis of crohn's disease. UEGW2014. (欧州消化器病学会) オーストリア (ウィーン), 2014年10月22日

- 5) Shuji Hibiya, Kiichiro Tsuchiya, Mamoru Watanabe: Long-term stimulation with cytokines leads to irreversible NF- $\kappa$ B signaling activation in colonic epithelial cells. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜, 2014年9月25日
- 6) Tsuchiya K, Hibiya S, Watanabe M: Innate immune spiral of intestinal epithelial cells by the long-term inflammation. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜, 2014年9月25日
- 7) 土屋 輝一郎、堀田伸勝、福島啓太、林 亮平、日比谷秀爾、水谷知裕、大島 茂、永石宇司、岡本隆一、中村哲也、大塚和朗、渡辺 守: 腸管上皮初代培養細胞を用いた体外病態モデルの構築 厚生労働科学研究 難治性疾患克服研究事業「難治性炎症性腸管障害に関する調査研究」東京, 2014年7月25日
- 8) Horita N, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Hibiya S, Fukuda M, Kano Y, Mizutani T, Nemoto Y, Yui S, Okamoto R, Nakamura T, Watanabe M: Establishment of the gene transduction into the primary intestinal organoid identified the subpopulation of the stem cells in a crypt. 12th Stem Cell Research Symposium. 福岡, 2014年5月30日
- 9) 林 亮平、土屋 輝一郎、渡辺 守: 小腸生検検体を用いたクローン病病態解析. 第100回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月26日
- 10) 岡田英理子、土屋 輝一郎、渡辺守: NSAIDs・抗血小板薬による小腸粘膜障害の病理学的検討. 第100回日本消化器病学会総会. 東京, 2014年4月26日

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得、実用新案登録  
なし

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業  
「スキルスがんにおける癌幹細胞悪性形質獲得機構に関する研究」  
委託業務成果報告（業務項目）

上皮間葉転換を基軸としたがん悪性化に関与する遺伝子群の探索

研究分担者 稲澤譲治 難治疾患研究所 分子細胞遺伝 教授

上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition)は、がん転移を含めたがん悪性形質の獲得の原因となることがわかってきているが、EMT を制御する遺伝子ネットワークは未だ不明な点が多い。そこで、我々は膵臓がん・胃がんを対象に EMT を制御する新規遺伝子・新規化合物の探索を目的とした EMT 可視化システムの構築を行った。本システムは、*CDHI* (上皮系マーカー)および *VIM* (間葉系マーカー)のプロモーター活性を指標としており、各種ライブラリーを用いた機能的スクリーニングと組み合わせることにより、EMT 関連分子を同定することができる。我々は、EMT/MET 可塑性を有する膵がん細胞株での *CDHI* プロモーター活性を指標として、470 種類の *miRNA* 配列の *in vitro* 機能的スクリーニングを施行し、新規 EMT 抑制性 *miRNA* である *miR-655* を、その標的遺伝子として *ZEB1* と *TGFBR2* を同定した。現在、EMT/MET 可塑性を有するスキルス胃がん細胞株での *VIM* プロモーター活性を指標として、EMT 促進性 *miRNA* の探索を行っている。この解析により、スキルス胃がんにおける浸潤・転移機構の解明ならびに新規治療分子の同定が期待され、EMT を基軸とした新たな治療法の確立の足掛かりになると考えられる。

A. 研究目的

現在、がんは本邦において 2 人に 1 人が罹患し、3 人に 1 人が死因となる疾患であることから、その本態解明は急務である。特に、がんの悪性化の要因の一つであるがん転移は、複雑かつ多段階のステップによって成立する事象であり、これまでも様々な分子機序が報告されてきた。しかし、従来のがん転移に関する研究では、有用な *in vitro* / *in vivo* 解析モデル系が十分でなく、具体的な解析法には制約があり、転移に関与する分子やシグナル経路の同定は困難であった。また、このことから推察されるように膵臓がんやスキルス胃がんのように浸潤傾向の強いがんに対する効果的な治療法も確立していないのが現状である。そ

こで我々は、がん転移の鍵となる現象として知られる上皮間葉転換 (EMT: Epithelial Mesenchymal Transition)に焦点を当てて、研究を遂行した。EMT は、正常細胞では胚発生、創傷治癒、組織の線維化に寄与することが知られているが、がん細胞においては、浸潤・転移能を促進させるだけでなく薬剤への耐性をも獲得させるがん悪性化の原因である。EMT 形質の獲得は、細胞接着分子 *CDHI* (E-カドヘリン)の発現低下、細胞骨格分子 *VIM* (ビメンチン)の発現上昇を指標としているが、その EMT 制御は、様々な転写因子によって調節されている。これら転写因子には、*CDHI* を直接的に抑制する zinc finger 型転写因子の *Snai* ファミリー (*Snai1*, *Snai2*)、*ZEB* ファミリー (*ZEB1*, *ZEB2*)、

間接的に制御する bHLH 型転写因子の *Twist* などがあり、これらは EMT 促進性遺伝子であることが明らかとなっている。また、これら転写因子とは他に *CDHI* のゲノム・エピゲノム異常によりその機能が消失することにより EMT が誘導される場合も少なくない。さらに、機能性低分子 RNA である *microRNA* (*miRNA*) の制御も次第に明らかとなってきており、*miR-200* ファミリーが、上皮系形質の維持に重要な機能を果たしていることは、周知の事実となってきている。しかし、これら EMT を制御する遺伝子ネットワークは、不明な点も多く残っているのが現状である。

このことから、本研究では、EMT の可塑性を有する膵臓がんおよび胃がん細胞株を用いて、*CDHI*、*VIM* のプロモーター活性を指標とした EMT 可視化システムを構築し、これによる新規 EMT 制御因子の探索基盤を確立することを目的とした。さらに、本システムを用いて *miRNA* ライブラリーによる新規 EMT 関連 *miRNA* の同定を試みた。

## B. 研究方法

### EMT 可塑性の評価

膵臓がん・胃がん細胞株における E-カドヘリンとビメンチンの発現パターンを定量的 PCR 法とウェスタン法で検討し、各細胞株を上皮系あるいは間葉系に分類した。さらに、*miR-200* ファミリーの導入および TGF- $\beta$  の添加により、EMT/MET 可塑性を有する細胞株を選択した(膵臓がん: *Panc1*, *KP1N*、胃がん: *MKN1* (スキルス由来))。

### EMT 可視化システムの構築

本システムは、*CDHI* および *VIM* プロモーター活性依存的に蛍光タンパク質を発現するレポーターコンストラクトを細胞へ導入し、蛍光タンパク質の蛍光強度を指標に EMT/MET 変化を可視化

することが可能である。レポーターコンストラクトの作製には、プロモーターレスベクターの *pZsGreen1-1* (Clontech Laboratories) および *pTurboRFP* (Evrogen) を用いた。*CDHI* および *VIM* のプロモーター領域を PCR にて増幅した後、上記ベクターに挿入することでレポーターコンストラクトを作製し、細胞へ導入した。導入した細胞は、蛍光タンパク質の発現の有無によりクローニングを行い、蛍光タンパク質発現安定株を樹立した。それら安定発現株に *miR-200* や EGF などの EMT/MET 誘導刺激を行い、本システムが正しく機能しているかの評価し、網羅的スクリーニングへと進んだ。

東京医科歯科大学 難治疾患研究所の倫理委員会において、承認を受けた上で行っている。

### 網羅的スクリーニング解析

上記で確立した EMT 可視化システムを用いて *miRNA* ライブラリー (*Pre-miR<sup>TM</sup> miRNA Precursor Library-Human V2* (328 *miRNAs*) および *V3* (470 *miRNAs*)) (*Ambion*) による機能的スクリーニングを施行し、EMT 関連 *miRNA* の同定を行った。その後、同定された *miRNA* の分子機序を明らかにすべく、*miRNA* 標的探索公共データベースである *TargetScan* により、その標的を絞り込んだ後、分子生物学的手法を用いて解析を行った。

### 臨床検体を用いた解析

同定された EMT 関連 *miRNA* を対象に口腔扁平上皮がん (OSCC)、食道扁平上皮がん (ESCC) 臨床検体を用いて、その発現と予後との相関を検討した。これら臨床検体は、東京医科歯科大学 難治疾患研究所の倫理委員会承認を得た上で適切に取り扱った。

## C. 研究結果

膵臓がん、胃がん細胞株を用いた EMT ステータスの検討とモデル細胞の選出