

平成24年4月5日提出

対象研究テーマ：マウスモデルを用いた消化器がんの発がん分子機序に関する基礎研究

研究期間：2011年4月1日～2012年3月31日

研究題目：消化器がん幹細胞制御因子のマウス発がん過程における制御機構

研究代表者：国立がん研究センター研究所 分野長 岡本康司

研究成果の概要：

ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養法を確立したが、この培養系において、がん幹細胞マーカーCD44の発現が、がん幹細胞としての特質維持に重要である事を明らかにした。樹立したCD44陽性がん幹細胞において、幹細胞性の維持に重要な役割を果たす候補制御因子、及びCD44バリエントフォームを同定しつつある。これらのがん幹細胞制御因子は、発がん過程において重要な役割を担うと予想される。従って、がん幹細胞制御因子の消化器発がんにおける役割を明らかにする目的で、胃がんモデルマウスにおける発現プロファイルを検討すべく準備を進めている。

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞、大腸がん、CD44

1. 研究開始当初の背景

CD44は大腸がんのみならず、膵がん、乳がん、前立腺がん等、さまざまな種類のがん幹細胞に特異的なマーカーである。モデルマウス (*K19-Wnt1/C2mE*) における胃がんの発がん過程においてもSCJ領域に存在する幹細胞様細胞に特異的な発現を示す事が明らかになってきており、消化器がん幹細胞の形成過程に普遍的な役割を果たす事が予想される。又、CD44 (とりわけそのバリエントフォーム) のがん幹細胞の成立における機能的な重要性も報告されている。

研究代表者のグループは、最近の研究により、ヒト大腸がん検体より大腸がん幹細胞の継代培養が可能となるスフェロイド培養法を確立した。さらに各種マーカーの発現、分化能の検討、免疫不全マウスにおける造腫瘍性の検討等により、スフェロイド中のCD44陽性細胞が典型的ながん幹細胞としての形質を有する事を明らかにした。

2. 研究の目的

本共同研究においては、消化器がん幹細胞の成立に重要な役割を果たすと予想されるCD44経路の解析を行う事により、胃がん発生過程におけるがん幹細胞の成立機序を明らかにする事を目的とする。

がん幹細胞制御におけるCD44を介した制御機構を明らかにする目的で、がん幹細胞の*in vitro*培養系を用いて、CD44により発

現制御をうける遺伝子群の同定を進める。同定されたCD44関連因子の機能解析を行う一方、これら新規因子の消化器発がん過程における発現様式の解明をマウス胃発がんモデルの系で行う。これらの研究で得られるCD44経路の新たな知見を統合解析する事により、消化器発がんにおけるがん幹細胞の発生及び進展過程を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

申請者らが樹立した複数の大腸がん幹細胞をフローサイトメトリーによりCD44高発現細胞と低発現細胞に分け、CD44高発現細胞において有意に上昇ないし低下している遺伝子群を同定する。同定した遺伝子に対応するshRNAのプールを構築し、がん幹細胞の増殖、転移に対する各遺伝子の発現抑制の効果を検証する。

CD44にはスタンダードフォームの他に幾つかのバリエントフォームの存在が知られている。バリエントフォームのがん化における重要性が示唆されている事から、これらのアイソフォームをレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入によりがん幹細胞に高発現させ、がん幹細胞の増殖、転移能に対する影響を検討する。

4. 研究成果

ヒト大腸がん由来がん幹細胞を含むスフ

エロイド in vitro 培養系を用い、スフェロイド中の CD44 陽性細胞と陰性細胞を、フローサイトメトリーを用いて分離し、両細胞より RNA を抽出後、遺伝子発現マイクロアレイを用いて陽性細胞又は陰性細胞に特異的に発現する遺伝子群の同定を行った。同定したがん幹細胞制御因子の役割を、対応する shRNA の細胞導入による機能解析により検討中である。又、スフェロイド細胞、マウス xenograft 等における発現解析により、同定した候補因子の CD44 依存的な発現パターンの検証を行っている。さらに、これらの CD44 関連因子の、マウス胃発がんモデルの系における検証の準備を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

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.** doi: 10.1038/emboj.2012.25 (2012)

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)

M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. **Cancer Sci.** 102, 1615-21 (2011)

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)

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)

[学会発表] (計 4 件)

岡本康司、大畑広和、石黒竜也、緑川泰、中釜斉「大腸がん肝転移を抑制する新規因子の同定及び解析」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

大畑広和、石黒竜也、岡本康司、中釜斉「大腸がん幹細胞における分化可塑性の解析」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

石黒竜也、大畑広和、岡本康司、中釜斉「新たな卵巣癌スフェロイド培養法の確立」
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011 年 10 月)

岡本康司「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」
第 26 回発癌病理研究会 (札幌市、2011 年 8 月)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

国立がん研究センター研究所 ・ 分野長
岡本康司

(2) 研究分担者

国立がん研究センター研究所 ・ 研究員
大畑広和

国立がん研究センター研究所 ・ リサーチ
レジデント 石黒達也

(3) 本研究所担当者

腫瘍遺伝学 ・ 教授 大島正伸