

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590438

研究課題名（和文） 癌幹細胞における p53 誘導型細胞死耐性とその制御機構

研究課題名（英文） Resistance of cancer stem cells to p53-induced cell death and its mechanism

研究代表者

高橋 玲 (TAKAHASHI REI)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60144565

研究成果の概要（和文）：癌の治療法のひとつには、p53 遺伝子の過剰発現を誘導して癌細胞をアポトーシスによって死なせることである。本研究では人工的に p53 発現を誘導することができる乳癌細胞を誘導し、それを用いて、細胞死を免れた細胞を解析した。この細胞死耐性を示す乳癌細胞は、乳癌幹細胞のマーカーのひとつとされている ALDH1 遺伝子を発現していることが明らかになった。癌幹細胞集団を詳細に調べることで新しい治療薬開発の基礎的知見を提供できる。

研究成果の概要（英文）：One of the therapeutic measures against cancer is to cause apoptotic cell death introduced by inducing p53 overexpression. In this study, we constructed a special breast cancer cell, by which apoptosis-resistant cells are analyzed. These apoptosis-resistant cancer cells were found to express. The ALDH1 gene that is considered as a marker of the breast cancer stem cell. Development of new drug can be promoted through the detail analyzes of the cancer stem cell population.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：遺伝子・バイオテクノロジー・病理学・癌・細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞の発見が報告され、乳癌においても ALDH1 をはじめとするいくつかの癌幹細胞マーカーが提供されていた。p53 発現の調節と細胞死を免れた細胞を繰り返し解析できる in vitro の実験系の構築はユニークであった。

2. 研究の目的

p53 発現の人為的調節によってアポトーシスを誘導し、細胞死をひきおこした際に抵抗性を示して生き残った細胞が乳癌幹細胞としての特徴を有しているかどうかを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

ヒト乳癌由来の HCC1937 細胞にはドキシサイクリンで発現誘導できる p53 遺伝子が安定的に導入した実験系を樹立し、実験を反復して再現性を確認した。ドキシサイクリン投与で誘導される p53 発現亢進では、1 週間後に約 95% の細胞がアポトーシスで消失し、残り 5% の細胞を用いて ALDH1 遺伝子を中心に解析した。具体的には、mRNA レベルは RT-PCR により、単一細胞の蛋白発現レベルでは FACS、そしてスライドグラス上で形態観察と蛋白レベルの発現を併せて解析するには免疫染色を行った。

4. 研究成果

RT-PCR 法による ALDH1 遺伝子の mRNA 発現は対照細胞群に比べて亢進していた。発現増加のピークは 48 時間から 36 時間後であり、蛋白レベルでの発現に比べて早い段階で見られた。ALDH1 蛋白の発現量は、抗 ALDH1 抗体を用いた FACS 解析では増加したが ALDEFUOR による酵素活性が、Dox 投与後 36 時間をピークに観察された。これらは、ALDH1 陰性細胞アポトーシスにより死滅し、ALDH1 陽性細胞の割合が相対的に増加したこともあるが、さらに ALDH1 酵素活性陰性細胞群が陽性に変化することが明らかとなった。細胞形態の観察では、細胞の大きさから 3 つのグループに分類できるが、ドキシサイクリン 1 週間投与後では中間サイズの細胞が消失し、大型および小型細胞が残存していた。培養細胞を用いた免疫染色では、ALDH1 陽性細胞が大型細胞を主体に集塊状に観察された。従来、癌幹細胞で発現するとされる ALDH1 遺伝子は、我々の結果からアポトーシス誘導後に一過性に発現亢進を示し、幹細胞から進行した前駆細胞レベルで発現している可能性を示唆する結果である。乳癌培養細胞 HCC1937 におけるアポトーシス誘導から免れた細胞で、乳癌幹細胞のマーカーのひとつとされている ALDH1 遺伝子の発現が増加することが確認できたが、発現は一過性に動くことの原因について、我々は、乳癌幹細胞から少し分化段間の進行した前駆細胞レベルにおいて ALDH1 発現が亢進するのではないかという新たな仮説を立てた。これを立証するためには、この ALDH1 陽性細胞を生細胞の状態に分離し、さらなる時系列での解析を行うことが期待される。

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 8 件)

① Guan X, Nishikawa M, Li H, Takahashi

R, Takahashi Y, Takakura Y, Comparison of antigen expression from plasmid DNA in tumor-free and antigen-expressing tumor-bearing mice, *Human Vaccines & immunotherapeutics*, 査読有、Vol. 8, No. 2, 2012, pp. 194-200、DOI:10.4161/hv.18370

- ② Sato K, Misawa N, Nie C, Satou Y, Iwakiri D, Matsuoka M, Takahashi R, Kuzushima K, Ito M, Takada K, Koyanagi Y, A novel animal model of Epstein-Barr Virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis in humanized mice, *BLOOD*, 査読有、Vol. 117, No. 21, 2011, pp. 5663-5673、DOI:10.1182/blood-2010-09-305979
- ③ Yoshida T, Ariei Y, Hino K, Sawatani I, Tanaka M, Takahashi R, Bando T, Mukai K, Fukuo K, HIGH HATCHING RATES AFTER CRYOPRESERVATION OF HYDRATED CYSTS OF THE BRINE SHRIMP *A. franciscana*, *CryoLetters*, 査読有、Vol. 32, No. 3, 2011, pp. 206-215
- ④ Yoshida H, Nishikawa M, Kiyota T, Uno S, Toyota H, Takahashi R, Narita M, Takakura Y, 5' -Phosphate oligodeoxynucleotides enhance the phosphodiester-CpG DNA-induced inflammatory response in macrophages, *Eur. J. Immunol*, 査読有、Vol. 41, 2011, pp. 425-436、DOI:10.1002/eji.201040396
- ⑤ Chandana P. S. E., Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, Kondo S, Oh J, Takahashi R, Yoshida Y, Kawashima S, Alexander. B. D., Kitayama H, Takahashi C, Tabata Y, Matsuzaki T, Noda M, Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice, *BMC Developmental Biology*, 査読有、Vol. 10, No. 84, 2010, pp. 1-13、DOI:10.1186/1471-213X-10-84
- ⑥ 高橋 玲、トップジャーナルの症例集を用いた医学英語勉強会の試み、*Journal of Medical English Education*, 査読有、Vol. 1, No. 9, 2010, pp. 48-51
- ⑦ Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi Y, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y, Sustained Exogenous Expression of Therapeutic Levels of IFN- γ Ameliorates Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice via Th1 Polarization, *Journal of Immunology*, 査読有、Vol. 184, 2010, pp. 2729-2735、DOI:10.4049/jimmunol.0900215

- ⑧ Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Toyota H, Kiyota T, Takahashi R, Takakura Y, TLR9-dependent systemic interferon- β production by intravenous injection of plasmid DNA/cationic liposome complex in mice, THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, 査読有, Vol. 11, 2009, pp. 708-717, DOI:10.1002/jgm.1348

〔学会発表〕(計17件)

- ① 井上沙奈、竹内理恵、大塚裕子、伊佐みゆき、増山紗永子、村上元庸、高橋 玲、アポトーシス抵抗性ヒト乳癌細胞におけるALDH1とGATA3発現様式の解析、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道大学(北海道)
- ② 田中梨紗、伊佐みゆき、増山紗永子、村上元庸、高橋 玲、エトポシド抵抗性を示すヒト乳癌細胞の遺伝子発現様式の解析、日本薬学会第132年会、2012年3月30日、北海道大学(北海道)
- ③ 井澤優希、伊佐みゆき、増山紗永子、村上元庸、高橋 玲、アポトーシス誘導における乳癌幹細胞マーカーALDH1酵素活性の経時的解析、日本薬学会第132年会、2012年3月29日、北海道大学(北海道)
- ④ 高橋 玲、細胞レベルにおける飲用アルカリ性電解水の機能解析、第10回日本機能水学会大会、2011年10月23日、コクヨホール(東京都)
- ⑤ 木枕英俊、三木陽子、松下早苗、藤井英明、西山隆一、岡 裕也、藤村和代、高橋 玲、尿細胞診で組織型を推定し得た腎原発小細胞癌の一例、第50回日本臨床細胞学会秋季大会、2011年10月23日、京王プラザホテル(東京都)
- ⑥ Watcharanurak K, Nishikawa M, Takahashi R, Kabashima K, Takahashi R, Takakura Y, Regulation of immunological balance by sustained interferon- γ gene transfer for atopic dermatitis in mice, 第27回日本DDS学会学術集会、2011年6月10日、東京大学本郷キャンパス(東京都)
- ⑦ 山本実佳、福沢真由、濱屋佳奈子、田中有美、黒田陽子、杉山晶子、高橋 玲、天ヶ瀬紀久子、竹内孝治、村上元庸、Mongolian gerbilsにおけるHelicobacter pylori感染後の壁細胞消失過程の検討、日本薬学会第131年会、2011年3月30日(東日本大震災により中止)、静岡コンベンションツアーセンター「グランシップ」・ツインメッセ静岡(静岡県)
- ⑧ 福沢真由、山本実佳、濱屋佳奈子、田中有美、杉山晶子、黒田陽子、高橋 玲、

天ヶ瀬紀久子、竹内孝治、村上元庸、ヘリコバクターピロリ感染 Mongolian gerbils の胃粘膜壁細胞およびE-カドヘリン変化、日本薬学会第131年会、2011年3月30日(東日本大震災により中止)、静岡コンベンションツアーセンター「グランシップ」・ツインメッセ静岡(静岡県)

- ⑨ 濱屋佳奈子、山本実佳、福沢真由、黒田陽子、田中有美、杉山晶子、高橋 玲、天ヶ瀬紀久子、竹内孝治、村上元庸、Helicobacter pylori感染によるスナネズミの胃粘膜細胞系統への影響：萎縮腺境界形成とその組織学的特徴、日本薬学会第131年会、2011年3月29日(東日本大震災により中止)、静岡コンベンションツアーセンター「グランシップ」・ツインメッセ静岡(静岡県)
- ⑩ 田中有美、杉山晶子、高橋 玲、天ヶ瀬紀久子、竹内孝治、村上元庸、アレンドロネートのラット胃粘膜 E-cadherinへの影響、日本薬学会第131年会、2011年3月29日(東日本大震災により中止)、静岡コンベンションツアーセンター「グランシップ」・ツインメッセ静岡(静岡県)
- ⑪ 山本真子、松崎朋子、高橋 玲、安達栄治郎、清成寛、大島尚子、山口幸代、北山仁志、森岡洋子、糸原重美、中村考志、秋山治彦、野田亮、マウス胚芽パターン形成におけるReckの役割 A role for Reck in limb patterning, 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑫ 佐藤佳、三沢尚子、Chuanyi Nie、佐藤賢文、松岡雅雄、高橋 玲、伊藤守、高田賢蔵、小柳義夫、ヒト化マウスを用いたEBV関連血球貪食性リンパ組織球症モデルマウスの確立、第58回日本ウイルス学会学術集会、2010年11月9日、徳島県郷土文化会館あわぎんホール(徳島県)
- ⑬ 高橋 玲、伊佐みゆき、村上元庸、細胞レベルにおけるアルカリイオン水の機能解析、日本機能水学会第9回学術大会、2010年10月30日、琵琶湖ホテル(滋賀県)
- ⑭ Hattori K, Nishikawa M, Watcharanurak K, Ikoma A, Kabashima K, Toyota H, Takahashi R, Takahashi R, Watanabe Y, Takakura Y, PREVENTION OF ATOPIC DERMATITIS BY PLASMID-BASED SUSTAINED TRANSGENE EXPRESSION OF INTERFERON γ IN NC/NGA MICE, AMERICAN SOCIETY OF GENE & CELL THERAPY 13th ANNUAL MEETING, 2010年5

月、Marriott Wardman Park (Washington, DC USA)

- ⑮ 林裕司、吉田章子、馬場真次、末吉範行、伊藤元彦、奥村嘉章、井上徹也、高橋 玲、膀胱癌における超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診の有用性、第 48 回日本臨床細胞学会秋期大会、2009 年 10 月 30 日、JAL リゾートシーホークホテル福岡（福岡県）
- ⑯ 森 美幸、重野恭子、高橋 玲、安井 寛、末梢血中に出現した異型リンパ球を契機として診断に至った IVL の一症例、第 50 回日本臨床細胞学会総会（春期大会）、2009 年 6 月 27 日、京王プラザホテル（東京都）
- ⑰ 高橋 玲、癌基礎研究の奔流～染色体解析から癌幹細胞研究までを振り返って、歯周病集学治療研究会 (PIO クラブ)、2009 年 5 月 28 日、PIO 国際歯科センター（京都府）

〔図書〕（計 6 件）

- ① 高橋 玲、土田勝晴、村上元庸、株式会社アルク、キクタンメディカル 6. 薬剤編、2011 年、191 ページ
- ② 平野美津子、高橋 玲（シリーズ監修）、株式会社アルク、キクタンメディカル 5. 看護とケア編、2011 年、191 ページ
- ③ 押味貴之、高橋 玲（シリーズ監修）、株式会社アルク、キクタンメディカル 4. 保健医療編、2011 年、195 ページ
- ④ 高橋玲、株式会社アルク、キクタンメディカル 3. 診療と臨床検査編、2010 年、191 ページ
- ⑤ 高橋 玲、株式会社アルク、キクタンメディカル 2. 症候と疾患編、2010 年、191 ページ
- ⑥ 高橋 玲、株式会社アルク、キクタンメディカル 1. 人体の構造編、2010 年、187 ページ

〔その他〕

ホームページ等

- ① 高橋 玲、日経メディカルオンライン連載 [実用講座] 医師のための医学英語、日経メディカル、2009 年 11 月～2010 年 5 月（毎週連載）、<http://medical.nikkeibp.co.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 玲 (TAKAHASHI REI)
同志社女子大学・薬学部・教授
研究者番号：60144565

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：