

## 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25年 5月27日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590299

研究課題名（和文）MDMX/MDM2 癌遺伝子産物によるがん幹細胞の制御機構

研究課題名（英文）Regulation of cancer stem cells by MDMX/MDM2 oncoproteins

研究代表者

岡本 康司 (OKAMOTO KOJI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：80342913

研究成果の概要（和文）：大腸がん幹細胞の*in vitro*スフェロイド培養系を樹立し、その生化学的、生物学的解析を行なった。とりわけ、この培養系を用い、p53がん抑制因子、及びその主要制御因子であるMDMX/MDM2 癌がん因子による、がん幹細胞の制御機構について細胞分子生物学的研究を行なった。実験系としては、大腸がん幹細胞の培養系において、これらがん幹細胞の血清添加による分化誘導前後における各種がん関連因子の変化をウエスタン法等により検討した。複数のがん幹細胞で確認を行なったが、p53の発現には明らかに変化は認められないものの、その下流因子であるp21の発現の増加が分化誘導時に認められた。さらに、これら因子を含めた、発がん制御因子の解析を進めた。その結果、がん幹細胞において、がん増殖促進に働くAkt経路の活性化や、HGF-cMet経路の活性化、さらには、解糖系酵素の活性化等が認められた、これら発がん経路のダイナミックな制御が、幹細胞性を制御している事が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We have established *in vitro* system for cultivation of colon cancer stem cells. Using this system, we have performed biological and biochemical analyses of the p53 pathway and the associated oncoproteins, Mdm2 and Mdmx. We have found that p21, a target gene of p53, is induced upon the differentiation of the cancer stem cells. Further we discovered the activation of the Akt pathway, the HGF-c-Met pathway and glycolytic enzymes. These data suggest that dynamic regulation of the oncogenic pathways are involved in regulation of colon cancer stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	870,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

白血病由来のがん細胞の研究からがん幹細胞の研究が始まったが、ここ数年の研究により白血病のみならず、消化器がん、皮膚がん、乳がん、神経系由来のがん等の多くの固形がんより、がん幹細胞の存在が同定された。白血病以外のがんにおいては、がん幹細胞の発がんにおける意義は完全に確立されたわけではないが、難治性の固形がんの治療を考えた上での潜在的な重要性は計り知れない。その為、国内、国外の両方において、固形癌由来のがん幹細胞の研究は、内科的がん治療をめざした研究領域の中で最も注目をあびている分野の一つとなりつつある。

がん幹細胞は、正常組織の幹細胞と同様に、未分化状態での永久増殖能を有すると同時に分化能を有し組織形成を促す。近年の多くの研究グループの研究結果は、がん幹細胞の挙動が癌全体の増殖能や治療抵抗性を決定づける事を示しており、その制御機構の解析は急務である。

2. 研究の目的

これまでの研究で申請者らが樹立した、大腸がん幹細胞の *in vitro* スフェロイド培養系を用い、p53、Rb及びその抑制因子であるMDMX/MDM2による、がん幹細胞の制御機構について細胞分子生物学的研究を進める。まず、がん幹細胞の制御因子のRNA及び蛋白レベルでの発現状態、細胞内局在、蛋白修飾状態、遺伝子の変異の有無等を検討し、p53/Rbを介在したがん抑制経路が正常に機能しているか、又は破綻しているか検討する。同様の実験を、放射線

や抗癌剤処理下にて行い、癌治療抵抗性とこれらががん抑制経路の異常との関係を調べる。これらの実験により、p53又はRb経路に特定の異常が認められた場合、これらの異常ががん幹細胞の生存、増殖に貢献しているかどうか検討する。以上の方法により、がん幹細胞におけるがん抑制経路破綻の有無、さらに破綻が有ればその機能的役割を明らかにする。これらの知見をがん幹細胞の増殖制御、ひいては癌治療に役立てる事を目指す。

3. 研究の方法

国立がんセンター消化器外科、及び病理部の協力をもとに得られたヒト大腸がん標本を、コラゲナーゼ、DNaseによる酵素処理の後、大腸がん幹細胞に特異的な表面マーカー(CD133、CD44)の発現を指標として、がん幹細胞を精製する。精製したがん幹細胞は、低吸着性プレートを用い、改良したES用培地中でスフェロイドの状態で培養、継代を行う。がん幹細胞としての正統性は、主に以下の実験により検証する。1) 大腸がん組織由来の精製がん幹細胞及び非がん幹細胞の一部を、免疫不全マウス(NOD-SCID)に皮下注射し、がん幹細胞の特異的腫瘍形成能を検証する。2) 生成したスフェロイドの一部を血清の存在下で培養し、分化能を有する事を確認する。3) 継代培養後に、1)の実験及び、表面マーカー発現の再確認を行い、幹細胞としての性質が *in vitro* 培養により変化しない事を確かめる。上記実験により正統性が確認されたがん幹細胞を用い、p53、Rb経路の解析を開始する。まず正常培養状態において、p53、R

b、MDM2、MDMXのRNA及び蛋白レベルの発現を調べる。またp53に関してはゲノムにおけるcoding領域のDNA塩基配列を決定し、野生型か変異型かを検証する。次に各蛋白の細胞内局在状態を決定する。とりわけMDM2/MDMXによるp53の細胞内への拘束が、p53不活性化のメカニズムの一つである事を申請者が報告しており、がん幹細胞においてもp53の核内局在が抑制されているか検討する。Rbに関しては、そのリン酸化やユビキチン化状態をウェスタン法により検討し、CDKキナーゼの活性化によるリン酸化やMDM2を介したユビキチン化亢進による不活性化の有無を検討する。これらの実験の比較対照群としては、正常幹細胞、正常大腸上皮、大腸がん細胞、iPS細胞、分化誘導後のがん幹細胞等を用い、制御機構の破綻と、がん化や幹細胞化との関係を理解する。

#### 4. 研究成果

複数のがん幹細胞でMDM2/MDMX/p53経路の解析を行なったが、p53の発現には明らかに変化は認められないものの、その下流因子であるp21の発現の増加が分化誘導時に認められた。さらに、これら因子を含めた、発がん制御因子の解析を進めた。その結果、がん幹細胞において、がん増殖促進に働くAkt経路の活性化や、HGF-cMet経路の活性化、さらには、解糖系酵素の活性化等が認められた、これら発がん経路のダイナミックな制御が、幹細胞性を制御している事が示唆された。

#### 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)

1. H. Ohata, T. Ishiguro, Y. Aihara, A. Sato, H. Sakai, S. Sekine, H. Taniguchi, T. Akasu, S. Fujita, H. Nakagama, \* K. Okamoto, Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. **Cancer Res.** 72, 5101-5110 (2012).
2. 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.** 31, 1752-1763 (2012)

3. 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)
4. M. Izumiya, N. Tsuchiya, K. Okamoto, H. Nakagama: Systematic exploration of cancer-associated microRNA through functional screening assays. **Cancer Sci.** 102, 1615-21 (2011)
5. 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)

[学会発表] (計7件)

1. 岡本 康司、大腸がん転移の抑制に働くマイクロRNA及びshRNAの機能的スクリーニング、第19回日本がん転移学会学術集会総会、平成22年6月16日、金沢ニューグランドホテル(金沢市、石川県)
2. 岡本 康司、大腸がん転移を抑制する新規因子の同定及び解析、平成22年9月22日、大阪国際会議場(大阪市)
3. 岡本 康司、大腸がん転移の抑制に働くマイクロRNA及びshRNAの機能的スクリーニング、第70回日本癌学会学術総会、平成23年10月5日、名古屋国際会議場(名古屋市)
4. 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、平成23年8月30日、ルネッサンスサッポロホテル(札幌市)
5. 岡本 康司、機能的スクリーニングによる大腸がん肝転移制御因子の同定、第3

- 5回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～2012年12月14日、福岡市
6. 岡本 康司、miR-493による大腸がん転移の抑制機構、第21回日本がん転移学会学術集会総会、2012年07月12日～2012年07月13日、広島市
7. 岡本 康司、マウスモデルにおける蛍光イメージングを用いた大腸がん転移制御因子の機能スクリーニング系の確立、第71回日本癌学会学術総会、2012年09月19日～2012年09月21日、札幌市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岡本 康司 (OKAMOTO KOJI)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：8 0 3 4 2 9 1 3

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：