

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650632

研究課題名(和文)新規がん幹細胞特異的マーカーの同定

研究課題名(英文)Identification of specific cancer stem cell markers for diagnosis

研究代表者

今井 浩三 (IMAI, Kohzoh)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号：60117603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：「がん幹細胞(CSC)特異的マーカー」の同定を目的とした。現存するCSCマーカーは正常幹細胞の分取法に一致する。我々は、正常幹細胞に重要なPRDM14が乳がん特異的に発現亢進すること、さらに、EZH2が正常幹細胞に重要なKLF2の発現を抑制することを報告した。そこで、研究計画に沿い、セルソーターによるSP分画、Tumor sphere法によりCSC分画を採取した。分取したCSC分画と対応する正常細胞を使用して、発現が異なる候補遺伝子を次世代型シーケンサーにより絞り込み、機能解析を行った。以上より、有望な候補遺伝子が得られており、臨床検体における検証を開始している。

研究成果の概要(英文)：We started our project to identify specific cancer stem cell markers for diagnosis. ES cell markers and phenotypic markers of cancer proliferation are used to identify CSCs. We already have reported that PRDM14 expression is enhanced in clinical BC cases. We also show that KLF2 repression has an important role in EZH2 oncogenesis in breast and prostate cancers. PRDM14 and KLF2 are known to be important for ES cells maintenance. According to our planning, we collected sphere-forming cells or SP fraction using a cell sorter in order to obtain cancer cells with stemness phenotypes from clinical cancer tissues. After that, we applied samples from those cells and normal control cells for a next generation sequencer to obtain the candidate genes. We could obtain several candidate genes for specific cancer stem cell markers and already have finished functional analysis for them. Now, we proceed to analyse clinical breast and pancreatic cancer tissues for specific cancer stem cell markers.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、腫瘍診断学

キーワード：腫瘍マーカー がん幹細胞 がん 遺伝子 臨床

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は仮説の域を出ないが、少なくとも、がん患者の予後を決定する、「転移・浸潤」、「経年後の再発」、「薬剤耐性」、「放射線耐性」に深く関わるがん細胞群が存在することは立証されている。それらのがん細胞群は、いわゆる「がん幹細胞」として報告されている形質を示す。

現在、がん幹細胞マーカーとしては、表面抗原(CD抗原)マーカー Side population(SP)分画 ALDH1(aldehyde dehydrogenase)活性 Tumor sphere 形成能、が有用性の点で広く利用されている。がん患者の予後を左右する因子が、がん幹細胞形質に深く関わっている可能性が高いことから、がん幹細胞に特異的な形質を同定することは、予後診断、さらに、難治性がんの治療に繋がる。現在、世界的に同定され利用されている「がん幹細胞マーカー」は、組織特異的の蛋白や組織幹細胞を分離するマーカーが流用されているため、正常幹細胞とがん幹細胞を区別できないという欠点がある。

我々は癌エピゲノミクスを専門とし、Nature Genetics, PNAS, Gastroenterology 等に論文を発表してきた。その研究過程の中で、正常幹細胞維持に重要である「ヒストンメチル基転移酵素 PRDM14」が乳がん特異的に発現亢進することを報告している(Cancer Res 2007)。さらに、ごく最近、ポリコム遺伝子である EZH2 の作用で腫瘍細胞において、正常幹細胞維持に重要な「転写因子 KLF2」の発現が抑制されることを世界に先駆けて見出し報告した (Oncogene 2011)。

本研究課題では、上記の成果を踏まえた上で、正常幹細胞とがん幹細胞での発現が相反するがん幹細胞特異的なマーカーを同定することを目標とする。このことにより、臨床応用可能な腫瘍マーカー、さらには、がん幹細胞特異的な分子標的治療の基本となるマーカーが同定される。

2. 研究の目的

現在、幅広く利用されている「がん幹細胞マーカー」は、正常幹細胞とがん幹細胞を区別できないという欠点があり、診断、分子標的治療への応用が困難である。

上記の欠点を克服すべく、正常幹細胞とがん幹細胞での発現が相反する「新規がん幹細胞特異的マーカー」を同定することを目的とする。

我々は、「悪性腫瘍の幹細胞性」に関連する機能性分子に関する業績を有しており、上記目的の遂行が可能である。

「新規がん幹細胞特異的マーカー」の同定は、表面抗原であれば抗体治療の標的に

なり、さらに、機能性分子である場合、分子標的治療の有力な標的となる可能性が高い。

3. 研究の方法

1) 臨床検体からのがん幹細胞の分取・解析:
難治性であり早期診断が困難で、治療法が確立していない膵臓がんを照準を当てる。すでに報告されている手法のうち、組織特異的の蛋白や組織幹細胞を分離する表面マーカーを利用せずに、倫理的な手続きを経た膵臓がんの切除標本より、一部は、そのまま SP 分画に関して高性能セルソーターにより分取し(Rasheed ZA, et al. JNCI 2010)、残りの細胞を無血清培地による Tumor sphere 法によりがん幹細胞形質を有する細胞を採取する(Vescovi AL, et al. Nat Rev Cancer 2006)。可能であれば、パラフィン切片を作成する。採取されたがん細胞に関しては、既知の表面マーカーに関してフローサイトメトリーによる解析を施行しておく。

2) 分取したがん幹細胞群の自己複製能・多能性の確認:

上記過程で分取したがん細胞に関して、定法に従い、

少量の細胞をマウスに皮下移植して、元の腫瘍に似た腫瘍組織を構築できる

皮下で増殖した腫瘍塊を、同様の分離法で分取してがん幹細胞の割合が変化しない

で抽出したがん幹細胞と想定される細胞を別のマウスに移植して同様の腫瘍を再現

以上の実験でがん幹細胞の自己複製能・多能性を確認する。

3) がん幹細胞分画の網羅的発現・メチローム解析

分取したがん幹細胞分画のがん細胞と対応する正常組織由来の細胞を使用して、両者の間で有意差を持って変動する候補遺伝子を網羅的にスクリーニングする。

具体的には、次世代型シーケンサーによる網羅的な発現解析に加えて、同じく次世代シーケンサーを用いてメチローム解析を行う目的で、シトシンのメチル化状態をゲノムワイドに1塩基解像度で解明する全ゲノム・バイサルファイト・シーケンシング解析を行う。

双方から得られたデータを解析し、正常組織部分に比べて分取したがん幹細胞分画のがん細胞で変化した遺伝子を抽出する。同時に公共データベース (NCBI) および Gene ontology を利用して、候補遺伝子を絞り込む。具体的には、幹細胞性に関わる遺伝子、細胞表面抗原を中心に据えて比較解析する。

4) Tumor sphere を用いた候補遺伝子の絞込

96 ウェルプレート上に膀胱がん由来培養細胞株の Tumor sphere を分注し、網羅的発現・メチローム解析より絞り込んだ候補遺伝子に対する shRNA ライブラリーを合成し添加する。この中から、sphere を維持できない shRNA に対応する遺伝子を候補遺伝子とする。

5) 候補遺伝子の機能解析:

候補遺伝子の発現ベクター、shRNA ベクターを構築する。これらを、膀胱がん由来腫瘍細胞株、形質変換した線維芽細胞の発現プロファイルに応じて遺伝子導入し、細胞に与える機能を in vitro assay (MTT assay, colony formation assay, invasion assay など)で評価する。

さらに、3)及び4)の過程で得られた候補遺伝子の中で細胞表面抗原の可能性が高い分子に関しては、モノクローナル抗体を入手、もしくは、新規遺伝子の場合には作成する。その後、倫理上の手続きを経た臨床検体を用いて、高分解能セルソーターを使用し、同分子が発現している細胞を分取する。現在知られているがん幹細胞マーカー(表面抗原、SP 分画、ALDH1 活性)を同時に高分解能セルソーターで解析し、既存のマーカーと比較検討する。

その後、遺伝子導入株、及び、臨床検体より新規マーカーにより分取したがん細胞に関して、定法に従い免疫不全マウスでの腫瘍再構築が可能か評価すると同時に、同所移植モデル、肝転移モデルを作成し腫瘍に及ぼす影響を多角的に検討する(in vivo assay)。

6) 新規 in vivo assay 系による評価:

免疫不全マウスを用いた評価系の利用は、造腫瘍能を有する腫瘍細胞の頻度が極めて高くなる傾向があり多くの疑問が生じている(Quintana E, et al. Nature 2008)。そこで、最終的に免疫細胞ト化マウスによる in vivo 評価系を利用し評価する。

7) 臨床応用への基盤:

同候補分子が表面マーカーであれば抗体治療の標的になり、さらに、機能性分子である場合、下流のシグナル伝達経路が分子標的治療の有力な標的となる。特に前者の可能性を検討し、免疫系細胞と分取したがん幹細胞に抗体を加えて殺細胞能を評価し、in vitro での基礎データを得る。同時に、血中循環腫瘍細胞 (CTC) 測定を可能とする腫瘍マーカーとしての可能性を検討する。

4 . 研究成果

「新規がん幹細胞 (CSC) 特異的マーカー」を同定することを目的として研

究を開始した。現在利用されている、がん幹細胞マーカーは 表面抗原(CD 抗原)マーカー Side population (SP) 分画 ALDH1(aldehyde dehydrogenase)活性 Tumor sphere 形成能 であり、正常幹細胞の分取法を用いているに過ぎない。我々は癌エピゲノミクスを専門としており、先行研究で、正常幹細胞維持に重要である「ヒストンメチル基転移酵素 PRDM14」が乳がん特異的に発現亢進することを報告 (Cancer Res 2007)、さらに、ポリコム遺伝子である EZH2 の作用で腫瘍細胞において、正常幹細胞維持に重要な「転写因子 KLF2」の発現が抑制されることを報告している (Oncogene 2011)。そこで、研究計画に沿って、

CSC の関与が濃厚な乳がん、膵臓がんの臨床検体を用いた。

膵臓がん試料より、高性能セルソーターによる SP 分画採取に加えて、Tumor sphere 法によりがん幹細胞分画を採取した。

分取したがん幹細胞分画と対応する正常組織由来の細胞を使用して、両者の間で有意差を持って変動する候補遺伝子を次世代型シーケンサーにより網羅的にスクリーニングし候補遺伝子を絞り込んだ。

上記の候補遺伝子の遺伝子導入、ノックダウン株を用いて、候補遺伝子の機能解析を in vitro 及び in vivo assay で行った。

以上、研究実施計画の記載した研究を完了した。有望な候補遺伝子が得られており、臨床検体における検証を開始している。

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 15 件)

1. Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. STEM CELLS, 32(4):913-25. 2014 DOI: 10.1002/stem.1594.
2. Suzuki R, Yamamoto E, Nojima M, Maruyama R, Yamano HO, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Niinuma T, Sato A, Noshio K, Yamamoto H, Kai M, Sugai T, Imai K, Suzuki H, Shinomura Y. Aberrant methylation of microRNA-34b/c is a predictive marker of metachronous

- gastric cancer risk. *J Gastroenterol* [Epub ahead of print], 2013.
3. Shimizu T, Suzuki H, Nojima M, Kitamura H, Yamamoto E, Maruyama R, Ashida M, Hatahira T, Kai M, Masumori N, Tokino T, Imai K, Tsukamoto T, Toyota M. Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker for detection of bladder cancer. *Eur Urol* 63(6):1091-1100,2013
DOI: 10.1016/j.eururo.2012.11.030.
 4. Sawada T, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Shioi Y, Akasaka R, Kamimae S, Harada T, Ashida M, Kai M, Adachi Y, Yamamoto H, Imai K, Toyota M, Itoh F, Sugai T. Association between genomic alterations and metastatic behavior of colorectal cancer identified by array-based comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer*. 52(2):140-9, 2013
DOI: 10.1002/gcc.22013
 5. Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, Taniguchi H, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneto H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancreatobiliary fluids. *World J Gastroenterol* 19(11): 1718–1727, 2013.
DOI 10.3748/wjg.v19.i11.1718.
 6. Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Noshō K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumor Biol* 35(2): 973-85, 2014.
DOI 10.1007/s13277-013-1131-2.
 7. Watanabe S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nasuno M, Yamashita K, Idogawa M, Naishiro Y, Murata M, Adachi Y, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Conditioned mesenchymal stem cells produce pleiotropic gut trophic factors. *J Gastroenterol* 49(2):270-82. 2013.
doi: 10.1007/s00535-013-0901-3.
 8. Arimura Y, Isshiki H, Onodera K, Nagaishi K, Yamashita K, Sonoda T, Matsumoto T, Takahashi A, Takazoe M, Yamazaki K, Kubo M, Fujimiya M, Imai K, Shinomura Y. Characteristics of Japanese inflammatory bowel disease susceptibility loci. *J Gastroenterol* Aug 13. [Epub ahead of print], 2013.
 9. Maruyama R, Suzuki H, Yamamoto E, Imai K, Shinomura Y. Emerging links between epigenetic alterations and dysregulation of noncoding RNAs in cancer. *Tumor Biol*, 33(2):277-285, 2012.DOI: 10.1007/s13277-011-0308-9.
 10. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano H, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, Sawada T, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Suzuki R, Sato A, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Sugai T, Imai K, Shinomura Y, Toyota M. Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. *Am J Pathol*, 18: 1847-1861, 2012.
DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.08.007.
 11. Yasui H, Ishida T, Maruyama R, Nojima M, Ikeda H, Suzuki H, Hayashi T, Shinomura Y, Imai K. Model of translational cancer research in multiple myeloma. *Cancer Sci*, 103:1907-1912, 2012. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02384.x.
 12. Takamaru H, Yamamoto E, Suzuki H, Nojima M, Maruyama R, Yamano H, Yoshikawa K, Kimura T, Harada T, Ashida M, Suzuki R, Yamamoto H, Kai M, Tokino T, Sugai T, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Aberrant methylation of RASGRF1 is associated with an epigenetic field defect and increased risk of gastric cancer. *Cancer Prev Res*, 5: 1203-1212, 2012. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-12-0056
 13. Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, Noshō K, Yamamoto H, Takamaru H, Yamamoto E, Maruyama R, Nobuoka T, Miyazaki Y, Nishida T, Bamba T, Kanda T, Ajioka Y, Taguchi T, Okahara S, Takahashi H, Nishida Y, Hosokawa M, Hasegawa T, Tokino T, Hirata K, Imai K, Toyota M, Shinomura Y. Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in

gastrointestinal stromal tumors. Cancer Res, 2012, 72(5): 1126-1136, 2012. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1803.

14. Taniguchi H, Jacinto F.V., Villanueva A, Fernández AF, Yamamoto H, Carmona F.J, Puertas S, Marquez VE, Shinomura Y, Imai K, and Esteller M. Silencing of the Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. Oncogene, 31: 1988-1994. 2012. DOI: 10.1038/onc.2011.387.
15. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Cespedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J, Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. Genome Res, 22(2):407-19. 2011. DOI: 10.1101/gr.119867.110.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 谷口博昭、山本博幸、今井浩三.「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得」第 72 回日本癌学会学術総会 10/04/2013 パシフィコ横浜
2. 谷口博昭、山本博幸、伊東文生、今井浩三.「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得とその臨床応用」第 33 回日本分子腫瘍マーカー研究会 10/02/2013 パシフィコ横浜
3. 谷口博昭、山本博幸、越川直彦、清木元治、今井浩三.「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得」第 22 回日本

がん転移学会学術集会 07/11/2013
ホテルブエナビスタ松本(長野県松本市)

〔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〕
ホームページ等

<http://www.nctimsut.org/>

東京大学医科学研究所附属病院 抗体・ワクチンセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 浩三 (IMAI, Kohzoh)

東京大学・医科学研究所・特任教授

研究者番号: 60117603

(2) 研究分担者

谷口 博昭 (TANIGUCHI, Hiroaki)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号: 90563289