

平成22年 4 月 9 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790259  
 研究課題名（和文）膜型増殖因子ファミリーががん幹細胞の細胞周期制御に果たす分子基盤の  
 解明

研究課題名（英文） Role of the membrane-anchored growth factor in the cell cycle  
 regulation of cancer stem cells

## 研究代表者

福田 信治 (FUKUDA SHINJI)  
 愛媛大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：70398238

研究成果の概要（和文）：がん派生メカニズムとしてがん幹細胞の存在が注目されている。本研究はがん幹細胞で発現が認められる膜型増殖因子 Amphiregulin（アンフィレギュリン，以下 AREG）に着目し、細胞増殖制御機構の解明に取り組んだ。その結果、ヒト肝癌細胞株 Huh7 のがん幹細胞画分において発現が認められる AREG-regulating protein（ARP）が、細胞増殖活性を持つ分泌型 AREG（AREG N 末断片）の産生を制御することが明らかになった。本研究成果は幹細胞の細胞増殖制御の新しい分子機構を提示する基盤となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Recent studies suggests that tumors arise from cancer stem cells. Here, we focused on a membrane-anchored growth factor, Amphiregulin (AREG), which is thought to be expressed in side-population (SP) of hepatocyte cell line, Huh7. We identified AREG-regulating protein (ARP), whose expression is also detected in Huh7 SP. ARP promotes the production of soluble AREG (N-terminal fragment of AREG), thus might be involved in the cell cycle regulation of hepatocyte stem cell regulation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：分子腫瘍学、膜型増殖因子

1. 研究開始当初の背景

わが国におけるがんの治療成績は、

年々着実に向上しているものの、根治には未だ至っておらず、肝臓がんや肺がんの5年生存率は依然として低い状況にある。がん組織はがん幹細胞から派生することが提唱されているが、現在の一般的な癌治療では分裂速度の早い細胞が標的となるため、分裂速度の極めて遅いがん幹細胞は治療に抵抗性を示すことが予想される。したがって今後のがん対策としてがん幹細胞を根絶する治療法の開発は急務であり、そのためにはがん派生の原因と考えられるがん幹細胞の性質を厳密に理解することが必要である。現在までに多くの腫瘍においてがん幹細胞が同定されているが、これらは正常な組織幹細胞が異常な状態へと変化したものと考えられている。正常な組織幹細胞の中には Hoechst33342 によって弱く染色される集団 side population (SP) が存在する。SP では薬剤の汲み出しに関わる ABC トランスポーターが高い発現量を示すことが既に知られている。SP を分離し、その性質に関連する分子の機能を詳細に明らかにすることができれば、がん幹細胞の性質の理解に貢献できると考えられた。

## 2. 研究の目的

我々のグループは、epidermal growth factor (EGF) ファミリーのメンバーである heparin binding-EGF (HB-EGF) 及び Amphiregulin (AREG) による細胞増殖制御機構の解明に取り組んできた。これらの分子は細胞膜上で切断を受けた後、N 末側が分泌型 HB-EGF, AREG として細胞増殖を制御する。我々は、細胞外における分泌因子としての HB-EGF の機能に加え、膜上に残った C 末断片が核内へ移行して転写抑制因子 promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) を核外へ排出することを見いだした。そしてこの結果サイクリン A プロモーターの転写活性が上昇し、細胞増殖を

促進するという独自の知見を提示した (Nanba, 2003, JCB)。

注目すべきことに、ヒト肝癌細胞株 Huh7 の SP において AREG が高い発現量を示すこと (Haraguchi, 2006, Stem Cells)、そして AREG はヒト肝がん細胞の悪性腫瘍化に寄与すること (Castillo, 2006, Cancer Res) が示された。EGF ファミリーが細胞増殖やがん化を引き起こすことは広く認知されていることから、AREG と SP が関連することも十分に示唆されるが、両者の関係は明らかにされていない。本研究は、EGF ファミリーの膜貫通型増殖因子 AREG が細胞周期制御に果たす役割を解明することによって、がん幹細胞の本質を理解するための基盤を築くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Huh7 からの SP の分離

Huh7 を Hoechst33342 で染色し、ベックマン社製セルソーターepics altra を用いて蛍光強度の低い細胞集団 (side population) の採取を試みた。同時に main population (MP) をコントロールとして採取した。回収した細胞集団全体より RNA を抽出し、RT-PCR 解析を行った。また、メチルセルロース培地を用いて足場非依存的に増殖する細胞集団の培養を試みた。

### (2) AREG 結合分子の同定

ヒト繊維芽肉腫 HT1080 に AREG を強制発現し、免疫沈降法と質量分析によって AREG 結合因子の同定を試みた。この結果、新規蛋白質 AREG-regulating protein (ARP) の同定に至った。

### (3) AREG 結合分子の機能解析

ARP の機能を解析するために、細胞増殖活性をもつ分泌型 AREG の産生に及ぼす影響を調べた。解析にはアルカリフォスファターゼタ

グを付加した AREG を利用し、アルカリフォスファターゼ活性を測定することによって、培地中に遊離された AREG を定量化した。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト肝癌細胞株Huh7をHoechst 33342で染色し、セルソーターを用いて蛍光強度の低い細胞集団(SP)の同定を試みた。図1に示すようにベラパミル処理によってシグナルが消失する細胞集団が認められた。

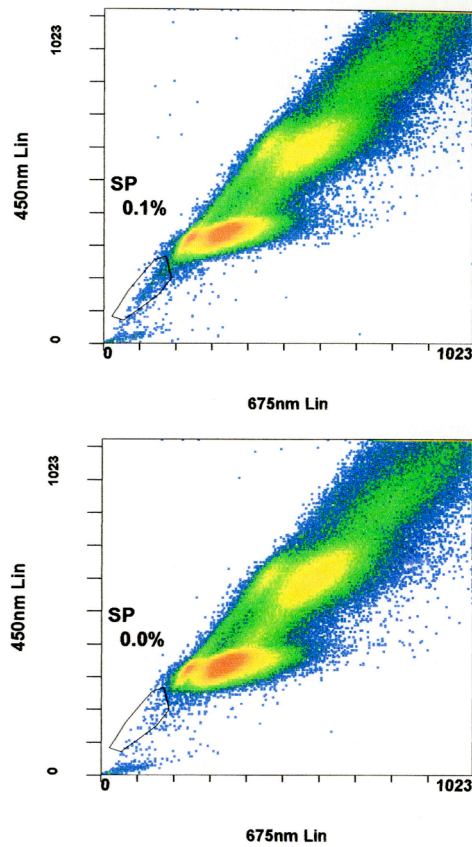


図1: ヒト肝癌細胞株Huh7におけるSPの検出 (上段: ベラパミル非存在下、下段: ベラパミル存在下)

この細胞群よりRNAを抽出し、RT-PCR解析を行ったところ、ABCトランスポーターであるMDR1及びBCRP1が発現していたことから、SPが採取されていることが確認できた。しかし、この集団をメチルセルロース培地に播種したとこ

ろ、足場非依存的に増殖できる細胞集団を得ることができなかった。細胞の分離速度など、分取の条件を改善させる必要が考えられるため、現在、新たに導入されたベクトン社製FACS Ariaを使用することによって実験条件の最適化を行っている。

(2) 上述の通り、FACSによる細胞分離が困難であったため、並行して、AREGとSPを関連付ける分子の同定を行った。ヒト繊維芽肉腫HT1080にAREGを強制発現し、免疫沈降法によってAREGを含む蛋白質複合体を分離した。質量分析によってAREGと相互作用する分子を同定し、過去の論文で報告されているHuh7のSP分画に発現している分子リストと比較することにより、SPで発現しており、かつAREGと相互作用する新規蛋白質AREG-regulating protein (ARP)の同定に至った。ARPの機能はほとんど明らかにされていないため、膜型増殖因子による新たな幹細胞増殖制御機構の解明への手がかりとなると考えられた。

(3) ARPによる細胞増殖制御の分子機構を理解するため、増殖因子として作用する分泌型AREG (AREG N末断片)の産生に対する影響を検討した。アルカリフォスファターゼタグを付加したAREGを安定的に発現するHT1080株を用い、産生されて培地中に遊離したアルカリフォスファターゼ活性を測定することによって、分泌型AREGを定量化した。図2に示すように、ホルボールエステル(TPA)による刺激を受けて分泌型AREGの産生量が上昇する。一方で、ARPの発現をsiRNAを用いてノックダウンすると、その産生量が減少することが明らかになった。即ち、ARPは遊離型増殖因子の産生量を正に制御する作用を持つことが示唆された。

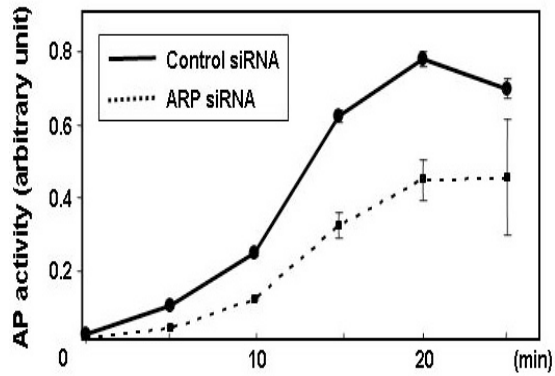


図 2. ARP ノックダウンが細胞増殖活性を持つ分泌型 AREG の産生に及ぼす影響. (実線: コントロール siRNA, 破線: ARP に対する siRNA. AREG を安定的に発現する HT1080 細胞株を TPA で処理し、遊離型 AREG の産生量を定量化した)

以上の解析より、幹細胞の細胞増殖制御に AREG 及び ARP が関与することが示唆された。今後は、遊離型 ARP の産生メカニズムの解明と、実際に side-population の細胞集団に及ぼす影響を検討したい。このためには FACS による細胞分離法と培養系の改善が課題である。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

(1) 大貫秀隆、井上博文、福田信治、中山寛尚、三輪大輔、遠藤弥重太、東山繁樹. 血管新生を制御する新規転写制御因子 ZF50 の同定とその機能. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 9 日. パシフィコ横浜、横浜.

(2) 中山寛尚、福田信治、井上博文、東山繁樹. 新規 amphiregulin 結合蛋白質 ARP35 による shedding 制御機構解析. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日. 神戸ポ

ートアイランド、神戸.

(3) 福田信治. ADAM による膜型増殖因子 shedding と cell cycle 制御. 第 14 回日本病態プロテアーゼ学会. 2009 年 8 月 22 日. 千里ライフサイエンスセンター、大阪.

(4) 東山繁樹、檜枝美紀、磯兼真由美、福田信治. 膜型増殖因子 proHB-EGF および proAREG の核膜内膜移行と遺伝転写制御. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008 年 12 月 10 日. 神戸ポートアイランド、神戸.

(5) 中山寛尚、福田信治、井上博文、東山繁樹. 膜貫通型増殖因子 amphiregulin の shedding 制御機構の解析. 第 31 回日本分子生物学会年会. 2008 年 12 月 9 日. 神戸ポートアイランド、神戸.

[図書] (計 1 件)

(1) 田賀哲也、鹿川哲史、清水健史、福田信治、羊土社、分子生物学イラストレイテッド (編集、田村隆明、山本雅)、2009、269-275 ページ(8 章 3 節分担)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 信治 (FUKUDA SHINJI)

愛媛大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 70398238