

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：24601
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659188
研究課題名（和文） 幹細胞特異的塩基性アミノ酸リン酸化の網羅的解析と治療への応用
研究課題名（英文） Global analysis of cancer stem cell-specific phosphorylation of basic amino acids for application to cancer treatment
研究代表者 國安 弘基 (KUNIYASU HIROKI) 奈良県立医科大学・医学科・教授 研究者番号：00253055

研究成果の概要（和文）：塩基性アミノ酸のリン酸化は、古くからその存在が知られていたにも関わらずその不安定な性質からほとんど解析が試みられて来なかった。本課題では、遊離リン酸化塩基性アミノ酸が癌幹細胞ポピュレーションの増大とともに増加することを見いだした。特に、リン酸化アルギニンはピルビン酸キナーゼ活性を低下し好気性解糖系を亢進させることにより、癌幹細胞のエネルギー代謝の制御に深く関与することが明らかとなった。この好気性解糖系を抑制し酸化的リン酸化を誘導することにより癌幹細胞の stemness は抑制された。一方、ヒストン・リジン残基のリン酸化によるエピジェネティクスへの影響は、アセチル化、トリメチル化との関連に何らかの影響を与えるものの、単純な競争阻害にはなっておらず、むしろアセチル化やメチル化の遷移状態に関連する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Phosphorylation of basic amino acids were an old knowledge; however, it was hardly examined from their marked lability. We found the free phosphorylated basic amino acids were increased in stem cell-enriched cancer population. Especially, phosphoarginine inhibited pyruvate kinase activity, which induced aerobic glycolysis. Inhibition of the aerobic glycolysis and induction of oxidative phosphorylation decreased stemness of cancer cells. Thus, phosphoarginine might be associated with the energy production of cancer stem cells and stemness maintenance. We also examined the effect of phosphorylation of histone lysine residue on the epigenetics. Histone lysine phosphorylation did not show a simple inhibition of acetylation or methylation of the lysine residue. Histone lysine phosphorylation might induce a transitional status to acetylation or methylation of the lysine residue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
23年度	1,600,000	480,000	2,080,000
24年度	1,300,000	390,000	1,690,000
計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：人体病理学

科研費の分科・細目：

キーワード：塩基性アミノ酸、リン酸化アミノ酸、がん幹細胞、大腸癌、リン酸化酵素

1. 研究開始当初の背景

塩基性アミノ酸のリン酸化は古くは 1967 年に報告が認められるが(1)、その後解明は進まず、その制御機構や役割は未だ不明なままである。近年になり原核生物では、蛋白質のヒ

スチジン残基側鎖のリン酸化を介した two-component system での phospho-relay を行う、重要な情報伝達系として知られており、同様の機構は一部の高等真核生物においても報告されている。哺乳動物においても

Smith らの報告が見られる(2)。その生体における役割には、肝再生の促進(3)、Ras 活性化に伴う癌化(4)等の報告が見られるが、近年新たな解析は見られない。申請者らは、1990 年代に塩基性アミノ酸脱リン酸化酵素の単離を行ってきたが(5-7)、その生体における機能解析は停滞したままであった。申請者らは、塩基性アミノ酸リン酸化が癌幹細胞において非常に高いレベルで観察されることを見出した。幹細胞マーカー CD133 でソーティングした大腸癌細胞における塩基性アミノ酸リン酸化レベルを HPLC で測定すると CD133 陽性細胞では 12 倍を超えるレベルに増加していた。この他、マウス胚性幹細胞における塩基性アミノ酸リン酸化レベルを検討すると胎芽期には高レベルであるが分化誘導とともにそのレベルが低下することを見出した。これらの結果から、塩基性アミノ酸リン酸化が幹細胞に深く関連した現象であり、stemness の維持に重要であるという仮説を立てた。本申請では、この仮説を証明しさらに幹細胞を標的とする癌治療法の開発、iPS 細胞などによる再生医療への応用への可能性を探索する。

塩基性アミノ酸リン酸化は、このようにこれまで明らかにされていない領域である。哺乳動物のリン酸化アミノ酸の内これまで解明されてきた Ser/Thr リン酸化や Tyr リン酸化は 10-20% を占めるのみで、残りの大半は塩基性アミノ酸リン酸化でありその役割は到底看過できない。しかし、塩基性アミノ酸リン酸化は pH 変化に非常に脆弱であり研究の大きな障害となってきた。このため塩基性アミノ酸リン酸化研究は停滞し PubMed による検索でも原核・真核両生物を含めてもここ 5 年での論文は 30 に満たない。現在も真核動物での塩基性アミノ酸リン酸化研究を継続しているのはオーストラリアの Piggott らのグループのみと言っても過言ではない。塩基性アミノ酸リン酸化は生物学的・生化学的に生命の根幹に関わる重要なシステムであることが示唆されているにも関わらず解明されずにいる未開の分野と言える。

- 1) Zetterqvist O: Isolation of I-³²P phosphohistidine from rat-liver cell sap after incubation with ³²P adenosine triphosphate. *Biochim.Biophys.Acta* 136:279-285, 1967.
- 2) Smith DL, ET AL: New histone kinases in nuclei of rat tissue. *Nature* 246:103-104, 1973.
- 3) Chen CC, et al: Phosphorylation of nuclear proteins in rat regenerating liver. *Biochemistry* 16:4852-55, 1977.
- 4) Cooper JA and Hunter T: Changes in protein phosphorylation in Raus sarcoma virus-transformed chicken embryo cells. *Mol Cell Biol* 1:165-178, 1981.
- 5) Yokoyama K, Ohmori H et al: Isolation of

N-omega-phosphoarginine hydrolase from rat liver and its physical properties. *J Biochem.* 113:236-240, 1993.

6) Ohmori H et al: Two phosphatases for 6-phospholysine and 3-phosphohistidine from rat brain. *J Biol Chem.* 268:7625-7627, 1993.

7) Ohmori H et al: 3-Phosphohistidine/6-phospholysine phosphatase from rat brain as acid phosphatase. *J Biochem.* 116:380-385, 1994.

2. 研究の目的

本申請では、幹細胞に高い特異性を持って検出される塩基性アミノ酸 (Arg, Lys, His) のリン酸化に対して、そのリン酸化経路の解明、塩基性アミノ酸リン酸化の正常組織、癌組織、および、胚性幹細胞の分化状態との関連を検討し、さらに、塩基性アミノ酸リン酸化酵素のノックアウト、酵素阻害などによる、組織幹細胞・癌幹細胞、および、胚性幹細胞における塩基性アミノ酸リン酸化の役割を解明する。また、臨床応用可能な塩基性アミノ酸リン酸化制御法の基礎的研究までを本申請の研究範囲とする。塩基性アミノ酸リン酸化研究の結果は、幹細胞の基礎的制御機構の理解を深めるとともに、iPS を含む胚性幹細胞の分化と腫瘍形成の阻害、癌の発生進展の抑制など広く臨床応用が可能な治療法の開発につながると考えられる。本申請の着目点は他に類を見ないユニークなものである。申請者らも 1994 年に論文を発表したのち研究は進捗していなかったが、塩基性アミノ酸リン酸化が幹細胞と強く関連することを最近発見した。この発見は現在未発表であり、学会や文献上類似する発表はまったく見られていない。この発見はこの分野の研究の強力な推進力となると考えられ、本研究を他国に先行することはこの分野の研究に対して大きなアドバンテージとなる。

その重要性は以下の 4 点にまとめられる。

1) 前項で述べたように塩基性アミノ酸リン酸化が生物に重大な役割を担うと考えられる「未開領域」であり、生物学、生化学、そして、病理学・疾病学の教科書に新たな章を加える「真実の発見」をもたらす可能性が挙げられる。

2) 幹細胞研究が広汎な分野にわたり極めて精力的に取り組まれている現在においても、幹細胞が有する幹細胞特異的生化学的特性は明らかになったとは言い難い。遺伝子発現プロファイルは検討されているが、塩基性アミノ酸リン酸化酵素・脱リン酸化酵素の遺伝子群が同定されていない現状では、この試みからは塩基性アミノ酸リン酸化機構は解明されないままである。本申請によるアプローチにより幹細胞の本態を解明できる可能性が高い。

3) Tyr や Ser・Thr リン酸化でもそうであっ

たように、遺伝子発現ではなくリン酸化レベルの変化を捉えなければリン酸化シグナルの本態は解明できない。本申請ではリン酸化塩基性アミノ酸特異的抗体の作成により塩基性アミノ酸リン酸化シグナルの全体像を解明可能である。

4) 本研究により解明される幹細胞の生物学的・生化学的特性は、癌幹細胞の切り口において癌の発生・進展・転移における癌幹細胞を標的とする治療戦略の開発につながると考えられるのみならず、胚性幹細胞の切り口からは、再生医療におけるiPS細胞など全能性幹細胞の未分化と分化の制御法の発見が期待される。これらは、単なる遺伝子や遺伝子産物の導入や付与によるものに留まらず、根源的なシグナルを標的とするものになることから、より効果的で有用な分子標的治療戦略が可能になると考えられる。また、塩基性アミノ酸リン酸化の刺激となる細胞外因子を解明することにより、幹細胞のニッチの役割にも新たな知見をもたらし、ニッチを標的とする治療の開発をも可能にすると期待される。

3. 研究の方法

塩基性アミノ酸リン酸化酵素・脱リン酸化酵素の単離と遺伝子同定を行い、遺伝子配列に基づきノックダウン系を作成、トランスクリプトーム解析およびリン酸化プロテオーム解析を施行し、塩基性アミノ酸リン酸化の経路およびリガンドを明らかにする。また、ノックアウト・マウスを作成し塩基性アミノ酸リン酸化の生体の形質に及ぼす影響を検討する。また、リン酸化塩基性アミノ酸に対する抗体を作成し、リン酸化塩基性アミノ酸動態の解析を行う。また、動物・ヒトの正常組織・癌組織・胚性幹細胞を用いて免疫染色によるリン酸化塩基性アミノ酸の分布や組織形質との関連を検討する。さらに、塩基性アミノ酸リン酸化の阻害物質・阻害法を検討し癌の進展や胚性幹細胞の分化への影響、幹細胞の維持に与える変化、さらに、正常組織への毒性について検討し、幹細胞ターゲティングへの応用の可能性を検討する。

1) 塩基性アミノ酸リン酸化酵素群の蛋白の単離（リジンリン酸化酵素、アルギニンリン酸化酵素、ヒスチジンリン酸化酵素）とその遺伝子同定、ならびに、塩基性アミノ酸リン酸化酵素群の蛋白の単離（リジン脱リン酸化酵素、アルギニン脱リン酸化酵素、ヒスチジン脱リン酸化酵素）とその遺伝子同定を行い、塩基性アミノ酸リン酸化・脱リン酸化を直接行う機構を解明する。また、より上流・下流の遺伝子発現変化を明らかにするため、ノックダウン系を用いて発現変化を網羅的に解析する。

2) 1) により同定した遺伝子のノックダウ

ン系を用い、リン酸化蛋白のプロテオーム解析を行い、塩基性アミノ酸リン酸化の有無によるリン酸化蛋白プロファイルの変化を検討する。そこからリン酸化シグナルマップを作成し、塩基性アミノ酸リン酸化経路を同定する。さらにこの経路上にある蛋白のリン酸化を確認する。

3) リン酸化塩基性アミノ酸に対する特異的抗体を作成する。pArg, pLys, pHisのいずれも高pH条件でしか安定しないため、免疫可能な抗原を作成することは技術的困難があった。pLysに対する抗体を本申請では作成する。pLysを選択した理由は、リジン残基は多くの蛋白で種々の修飾を受ける高い活性を有する残基であること、ヒストン・コードに関係しpArgやpHisに比較しより広汎な細胞内機能を担う可能性があること、さらに、水酸化リジンなどで置換することによりリジン残基を不活性化できるためである。作成した抗体により、培養細胞、実験動物の正常組織・癌組織・胎児組織におけるリン酸化塩基性アミノ酸の分布をウェスタン法・免疫染色法により同定・解析する。また、ES細胞とその分化過程における変化や癌組織（原発巣・転移巣）における変化を検討する。これらの検討により、正常、胎児発生、再生、癌におけるリン酸化塩基性アミノ酸の役割を解明する。

4) 同定した遺伝子に基づいてノックアウト・マウスを作成し、その形質を検討する。致死の場合には、Tet/onシステムにより遺伝子発現を調節する。また、ノックアウト・マウスの胎芽および諸臓器における幹細胞を単離し、その形質を明らかにする。なお、ノックアウト・マウス作成も予算上の制約から、まずリジンリン酸化酵素について行う。

5) 塩基性アミノ酸リン酸化を生じる細胞外刺激に対する受容体をノックダウン系の遺伝子発現プロファイル、および、リン酸化蛋白プロファイルの変化から見出す。このとき予算上の制約からリジンリン酸化酵素のノックダウン系を用いて検討を行う。さらにそのリガンドを検索することで、塩基性アミノ酸リン酸化を生じる細胞外刺激そのものを解明する。この細胞外刺激から幹細胞ニッチを明らかにすることが可能である。さらにリガンドを生合成し幹細胞を処理することにより、幹細胞ニッチへの影響を確認する。

6) 塩基性アミノ酸リン酸化の阻害法について、ニッチ内塩基性アミノ酸リン酸化刺激、塩基性アミノ酸リン酸化受容体、塩基性アミノ酸リン酸化シグナル、塩基性アミノ酸リン酸化酵素・塩基性アミノ酸脱リン酸化酵素などを標的として検討を行う。今回特に検討の対象としているリジン残基のリン酸化阻害については、水酸化リジンを細胞内に投与しリジン残基を置換する方法も検討する。阻害の判定はin vitroにおける塩基性アミノ酸リ

ン酸化により行う。

7) 塩基性アミノ酸リン酸化阻害法について動物実験によりその生体内幹細胞・癌幹細胞への影響を検討する。胎児発生、癌の増大・転移、組織再生の変化を評価することにより、塩基性アミノ酸リン酸化阻害法を評価する。

8) このほか、塩基性アミノ酸リン酸化カスケードが明らかになるに従い、これまでに知られていなかった塩基性アミノ酸リン酸化特異的な複数のシグナル、遺伝子転写経路、エピジェネティクスが発見される可能性がある。これらについても重要なものは適宜その検討を行う。とくにリジン残基はH4ヒストンにおいてアセチル化を受け遺伝子発現の調節に深く関与していることから、H4ヒストン・リジン残基のリン酸化のエピジェネティクスへの関与は特に検討を行う。

4. 研究成果

1) がん幹細胞におけるリン酸化塩基性アミノ酸レベルの検討: 大腸癌培養株 CT26、HT29 を用いて spheroid assay によりがん幹細胞の比率が高い細胞を選別し生化学的方法によりリン酸化塩基性アミノ酸を測定したところ、pArg, pHis, pLys いずれのレベルも spheroid を形成しない細胞群よりも 2.5~4.8 倍に増大していた。

2) がん幹細胞におけるリジン残基リン酸化抑制の影響: 水酸化リジンはリジンアミノ基へのリン酸化等の修飾が不能な安定体である。これをリジン(-)培養液に混じて投与し、大腸癌細胞の継代を行ったところ、経時的にがん幹細胞に特異的とされるアルデヒド・デヒドロゲナーゼ活性のレベルは低下し、増殖速度も低下した。4週培養後に spheroid assay を行うと spheroid 形成能は約 1/4 に低下した。このように、リジンリン酸化抑制はがん幹細胞の抑制をもたらしたと考えられる。

3) ヒスチジンリン酸化酵素群の大腸癌における発現: すでにヒスチジンリン酸化活性を持つことが報告されている、nm23H2, LHPP, PDK1 などの発現をヒト大腸癌病理標本を用い免疫染色にて検討した。このうち、nm23H2 は腫瘍内の限定的なポピュレーションに発現していたが、CD133 陽性細胞よりも数倍の数の細胞に陽性であった。LHPP はほとんどのがん細胞で過剰発現を示していた。いずれも、がんにおいて何らかの役割を担っているが、がん幹細胞特異性は低いと見なされた。

4) pArg はいわゆる phosphagen と呼ばれ、その蓄積は pyruvate kinase (PK) の活性を抑制し、TCA サイクル/酸化的リン酸化を抑制し、いわゆる Warburg 効果と呼ばれる aerobic glycolysis をもたらす。塩基性アミノ酸リン酸化

化が癌幹細胞に果たす役割を検討するため、リン酸化アルギニン(pAgr)を用いて、大腸癌細胞株におけるその効果を検討した。CT26 マウス大腸癌細胞を pAgr により処理すると、濃度依存性に pyruvate kinase 活性が低下した。CT26 細胞では、PKM2 が主に発現しており、PKM1 の発現はごく低レベルである。pyruvate kinase 活性の低下に伴い、乳酸発酵による乳酸の生成が増大した。一方、ミトコンドリアにおける ATP 産生は低下し、同時に ROS の産生も減少した。さらに、pAgr 処理により ADHL 陽性癌幹細胞数は増加した。このように pAgr により、癌細胞に aerobic glycolysis が亢進し、stemness の増大が誘導される可能性が示唆された。

これに対して、PKM1 遺伝子を導入し過剰発現させると、pArg によっても酸化的リン酸化から好気性解糖へのスイッチングは惹起されなかった。このような状態では、stemness マーカーである CD133 や nucleostemin の発現のレベルは減少した。このように、塩基性アミノ酸レベルは癌幹細胞の stemness 維持をエネルギー代謝の面から制御していることが示唆された。

5) ヒストン・リジン残基の修飾はヒストン・コードとも呼ばれ、遺伝子のエピジェネティックな変化に重要な役割を担っている。H4 ヒストン K9 および H3 ヒストン K27 のリン酸化とアセチル化、トリメチル化、ならびに、CpG メチル化、遺伝子発現について p16 遺伝子について HT29 ヒト大腸癌を用いて検討した。H4 ヒストン K9 のリン酸化とアセチル化および非アセチル化状態は、必ずしも排他的事象ではなく、ChIP アッセイでは、H4 ヒストン K9 リン酸化を促進してもアセチル化レベルは必ずしも減少せず、H3 ヒストン K27 リン酸化を増加しても、トリメチル化の量的変化は一定しなかった。ヒストン・リジン残基のリン酸化は比較的不安定であると考えられ、アセチル化、メチル化などの修飾の遷移的状態となっている可能性が考えられた。

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 26 件)

(1) Kuniyasu H, Multiple roles of angiotensin in colorectal cancer. World J Clin Oncol 3(12):150-4, 2012

(2) Sasahira T, Ueda N, Yamamoto K, Bhawal UK, Kurihara M, Kirita T, Kuniyasu H, Trks are novel oncogenes involved in the induction of neovascularization, tumor progression, and nodal

metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Clin Exp Metasta* 30:165–176, 2013.

(3) Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, Sasahira T, Kuwada M, Fujiwara R, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H, High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur J Cancer* 49(3):741-751, 2013.

(4) Sasahira T, Ueda N, Kurihara M, Matsushima S, Ohmori H, Fujii K, Bhawal UK, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H, Tropomyosin receptor kinases B and C are tumor progressive and metastatic marker in colorectal carcinoma. *Hum Pathol*, in press.

(5) Goto K, Kawahara I, Luo Y, Obata K, Misawa H, Ishikawa T, Kuniyasu H, Nabekura J, Takaki M, In vivo imaging of enteric neurogenesis in the deep tissue of mouse small intestine. *Pros One*, 8(1): e54814, 2013.

(6) Kurihara M, Kirita T, Sasahira T, Ohmori H, Matsushima S, Yamamoto K, Bosserhoff AK, Kuniyasu H, Protumoral roles of melanoma inhibitory activity 2 in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 108(7):1460-9, 2013.

(7) Chihara Y, Kanai Y, Fujimoto H, Sugano K, Kawashima K, Liang G, Jones PA, Fujimoto K, Kuniyasu H, Hirao Y, Diagnostic markers of urothelial cancer based on DNA methylation analysis. *BMC Cancer*, in press.

(8) Aoki K, Obata K, Kurihara M, Kuniyasu H, Kirita T, Takaki M, Clinically observed taste disorder-related peripheral mechanism in an anticancer drug, S-1 administered rats. *Int J Clin Oncol*, in press.

(9) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kitayoshi M, Tanabe E, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y, AKT activation and telomerase reverse transcriptase expression are concurrently associated with prognosis of gastric cancer. *Pathobiol*, in press.

(10) Kawahara I, Kuniyasu H, Matsuyoshi H, Goto K, Obata K, Misawa H, Fujii H, Takaki M, The comparison of effects of a selective 5-HT reuptake inhibitor versus a 5-HT-4 receptor agonist on in vivo neurogenesis at the rectal anastomosis in rats. *Am J Physiol Gastroenterol Liver* 302: G588–G597, 2012.

(11) Sasaki T, Kuniyasu H, Luo Y, Kato D, Shinya S, Fujii K, Ohmori H, Yamashita Y. Significance of epithelial growth factor in the epithelial- mesenchymal transition of human gallbladder cancer cells. *Cancer Sci* 103(6):1165-71, 2012.

(12) Ito Y, Bhawal UK, Sasahira T, Toyama T, Sato T, Matsuda D, Nishikiori H, Kobayashi M, Sugiyama M, Hamada N, Arakawa H, Kuniyasu H. Involvement of HMGB1 and RAGE in IL-1 β -induced gingival inflammation. *Arch Oral Biol* 57(1):73-80, 2012.

(13) Luo Y, Ohmori H, Fujii K, Chihara Y, Maruyama S, Kuniyasu H. High matrix metalloproteinase-to-E-cadherin ratio measured by bicolor fluorescent in situ hybridization is associated with lymphangiogenesis and lymph node metastasis in prostate cancer. *Urol Oncol-Semin Ori* 30:306-313, 2012.

(14) Shimomoto T, Luo Y, Ohmori H, Chihara Y, Sasahira T, Fujii K, Kuniyasu H. Advanced glycation end products (AGE) induce the receptor for AGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. *J Gastroenterol* 47(10):1073-83, 2012.

(15) Shimomoto T, Ohmori H, Luo Y, Chihara Y, Denda A, Sasahira T, Tatsumoto N, Fujii K, Kuniyasu H, Diabetes-associated angiotensin activation enhances liver metastasis of colon cancer. *Clin Exp Metasta* 29(8):915-925, 2012.

(16) Sasahira T, Kurihara M, Bhawal UK, Ueda N, Yamamoto K, Kirita T, Kuniyasu H, Downregulation of miR-126 induces angiogenesis and lymphangiogenesis and targets VEGF-A in oral cancer. *Br J Cancer* 107(4):700-6, 2012.

(17) Bhawal UK, Sato F, Sasahira T, Ito Y, Kuniyasu H, Kajima H, Abiko Y. IL-1 β -mediated upregulation of DEC1 in Akt/HIF-1 α -dependent pathway. *J Cell Biochem* 113(10):3246-53, 2012.

(18) Chihara Y, Fujimoto K, Hirao Y, Kuniyasu H, Evaluation of metastatic potential of prostate cancer. *Oncol Rev* 5:103-107, 2011

(19) Sasahira T, Yamamoto K, Kurihara M, Bhawal UK, Chihara Y, Kirita T, Kuniyasu H. The roles of HMGB1 related angiogenesis and lymphangiogenesis in oral cancer. *Oncol Rev* 5:49-55, 2011.

(20) Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H, Non-histone nuclear factor HMGB1 as a target in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Tar* 15(2):183-193, 2011

(21) Luo Y, Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Sasahira T, Chihara Y, Fujii K, Ohmori H, Kuniyasu H, Determinants of the epithelial-muscle axis on embryonic stem cell-derived gut-like structures. *Pathobiology* 77(5):253-259, 2010.

(22) Matsuyoshi H, Kuniyasu H, Okumura M, Misawa H, Katsui R, Zhang GX, Obata K, Takaki M, A 5-HT4-receptor activation-induced neural plasticity enhances in vivo reconstructs of enteric nerve circuit insult. *Neurogastroenterol Motil* 22(7):806-814, 2010.

(23) Sasahira T, Kurihara M, Yamamoto K, Bhawal UK, Kirita T, Kuniyasu H. Downregulation of runt-related transcription factor 3 (RUNX3) associated with poor prognosis of adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary gland. *Cancer Sci* 102(2):492-497, 2011

(24) Takaki M, Misawa H, Matsuyoshi H, Kawahara I, Goto K, Zhang GX, Obata K, Kuniyasu H. In vitro enhanced differentiation of neural networks in ES gut-like organ from mouse ES cells by a 5-HT4-receptor activation. *Biochem Biophys Res Commun* 406(4):529-533, 2011.

(25) Luo Y, Ohmori H, Shimomoto T, Fujii K, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H. Anti-angiotensin and hypoglycemic treatments suppress liver metastasis of colon cancer cells. *Pathobiology* 78(5):285-290, 2011

(26) Bhawal UK, Sato F, Arakawa Y, Fujimoto K, Kawamoto T, Tanimoto K, Ito Y, Sasahira T, Sakurai T, Kobayashi M, Kashima I, Kajima H, Kuniyasu H, Abiko Y, Kato Y, Sato S, Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. *J Pathol*, 224(3):420-429, 2011

〔学会発表〕（計 9 件）

(1) 羅 奕、千原良友、笹平智則、桑田正臣、栗原 都、國安弘基、間欠的カロリー制限のがん幹細胞への影響、「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2013、大津市、2013.2.6-7

(2) Luo Y, Kitadai Y, Chihara Y, Fujiwara R, Fujimoto K, Kuniyasu H, Effect of intermittent calorie restriction on cancer stem cells. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Washington, DC, 2013.4.6-10

(3) 國安弘基、脂肪酸のがん幹細胞への影響。第 6 回臨床アミノ酸研究会「がんとアミノ酸」、東京都、2012.12.15

(4) 羅 奕、千原良友、下元貴澄、大森 斉、藤井 澄、國安弘基、高血糖の大腸癌肝転移に及ぼす影響。「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2012、大津市、2012.1.18-19

(5) Luo Y, Chihara Y, Ohmori H, Fujii K, Yoshikawa M, Kuwata M, Fujimoto K, Hirao Y, Kitadai Y, Kuniyasu H, Angiotensin in colorectal cancer metastasis. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Chicago, 2012.3.31-4.4

(6) 國安弘基、脂肪酸の癌転移への影響。第 20 回日本癌病態治療研究会、ワークショップ 1「食成分と癌病態」、東京都、2011.6.17-18

(7) 國安弘基、羅 奕、栗原 都、笹平智則、千原良友、傳田阿由美、トランス脂肪酸であるエライジン酸の大腸癌への影響。第 26 回発癌病理研究会、研究会 8、札幌市、2011.8.29-31

(8) Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, Shimbo K, Eto S, Fujii K, Sasahira T, Chihara Y, Kuniyasu H, HMGB1 affects plasma amino acid profiles in colon carcinogenesis. 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Florida, 2011.4.2-6.

(9) Fujiwara R, Kanaoka K, Luo Y, Kuniyasu H, Cellular and tissue injury by nano particles. 21st Hiroshima Cancer Seminar International Symposium, Hiroshima, 2011.11.06

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國安 弘基 (KUNIYASU HIROKI)
奈良県立医科大学・医学科・教授
研究者番号：00253055

(2) 研究分担者

大森 斉 (OHMORI HITOSHI)
奈良県立医科大学・医学科・博士研究員
研究者番号：80213875