

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 31 日現在

機関番号：32620
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659206
 研究課題名（和文） 革新的ながん治療法の開発—がん細胞の良性化・矯正（リハビリテーション法）の開発
 研究課題名（英文） Rehabilitation of cancer cells

 研究代表者
 樋野 興夫 (HINO OKIO)
 順天堂大学・医学部・教授
 研究者番号：90127910

研究成果の概要（和文）：

ラットES細胞の樹立を試み成功した。それらのES様細胞において幹細胞マーカーである *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* の mRNA が発現していることを確認した。さらに、分化培地中における胚様体形成を行い、三胚葉の分化マーカーが発現すること、それに伴う細胞の形態変化が生ずることを確認した。次に、Ekerラットの *Tsc2* ホモ変異体、ヘテロ変異体、野生型胎仔よりES細胞株を樹立に成功した。*Tsc2* ホモ変異体胚盤胞に由来する *Tsc2* 欠損ES細胞も樹立可能であることが判明した。腎皮膜下への移植に伴う奇形腫の形成にも成功した。興味あることに、ホモ変異体細胞の奇形腫においては、Ekerラットの腎腫瘍組織像を彷彿とさせる上皮様の構造異常が散見された。

研究成果の概要（英文）：

Normal rat's and Eker (*Tsc2*^{+/-}) rat's ESCs were established. *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* were expressed in these ERCs. We injected ESCs under the kidney capsule of nude mice. *Tsc2*^{-/-} teratomas were capable to differentiate into various cell types derived from three germ layers. However, they showed abnormal epithelial structures, resemble to RCC tissues in Eker rats. We suggest that tissue specific-abnormal cellular differentiation caused by *Tsc2*-deficiency was recaptured by teratoma formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：病理学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

2009年 山中伸弥教授らと「ips細胞を用いた癌研究について、落ち着いて考える会」を

立ちあげた。「細胞の初期化 vs 癌化」は、これからの「発がん研究」の大きなテーマの一つである。日本国は「化学発がんの創始国」であり、山極勝三郎(1863-1930)と吉田富三(1903-1973)が築いた「癌化の本流」がある。歴史的に一番早く stem cell が「癌研究」に出てくるのは吉田富三の 1952 年の論文と考える (JNCI, Vol. 12, No. 5, April, 1952, P43-P65)。山極勝三郎の「発癌の形成的刺激」、吉田富三の「癌の良性化」の命題は、「昔の命題であり、今日の命題でもあり、将来の命題でもある」と考える。「癌細胞の良性化」(吉田富三)、「癌細胞のリハビリテーション」(Knudson) も ips 細胞を用いることによって、具象化され実現化される様相を呈してきた。「ips 細胞と癌細胞」は対極に位置する楕円形の 2 つの中心点の如きで「癌細胞はリセットされる」という命題がスローガンとして提唱される時代到来と考える。その可能性については、既に 1960 年代の McKinnell による「カエルの腎細胞癌の核移植によるオタマジャクシの作製」がある。

我々は、Eker ラット (*Tsc2* 変異ラット) や *Tsc1*, *Tsc2* ノックアウト (KO) マウスを利用し、ヒト結節性硬化症 (TSC) 遺伝子 (*TSC1*, *TSC2*) 変異による腫瘍発生機構の解明を進めている。これらモデル動物のヘテロ変異体における Knudson の 2 ヒット、それに伴う mTORC1 活性化の分析などを元に、TSC の治療法の開発が世界的に進められている。現在では、ホモ変異体の致死を回避して行う、各種コンディショナル KO マウスの実験系が多く研究者によって用いられている。しかしながら、様々な病変に特徴的な分化異常や細胞移動の異常について考慮しながら分析を進めるための、使い易い培養実験系は確立されていないのが現状である。我々は ES 細胞がその候補の一つになると

考えている。

2. 研究の目的

本研究は、原因遺伝子が明らかとなっている動物のがんをモデルとし、腫瘍細胞のリプログラミングの状態を調べ、さらにそれと原因遺伝子変異や他の異常との関連を調べるシステムを確立することを提案するものである。具体的には、Knudson の 2 ヒットが適用される遺伝性腎発がんモデルである Eker (*Tsc2*) 変異ラットの腫瘍と胎生致死となるホモ変異体胎仔より ES 細胞、誘導多能性幹細胞 (iPS 細胞) 様の細胞群を樹立し、リプログラミングの様子を野生型 ES 細胞、iPS 細胞と比較すると共に、原因遺伝子 (*Tsc2*) 導入による腫瘍由来 iPS 様細胞のリプログラミング状態の変化を明らかにする。これらの解析により、腫瘍細胞を正常細胞のようにリプログラムするために必要な、原因遺伝子以外のエピジェネティックな要因を特定することを目標とする。これらの細胞に由来する iPS 様細胞の樹立効率や、分化の様子の違い等を *in vitro*, *in vivo* において調べ、ヒトがん細胞を用いた実験では困難な初期がん細胞のリプログラミングの可能性を追求する。そのための予備作業として、本研究では、まず、Eker ラット由来の *Tsc2* 欠損 ES 細胞を樹立する。

3. 研究の方法

Buehr ら (*Cell* 135, 1287-1298, 2008) に準じた方法で、Eker ラットより ES 細胞を樹立する。具体的には、Eker ラット胎生 4.5 日の受精卵 (胚盤胞) を、子宮からの還流によって採取し、マウス胚線維芽細胞上で、N2B27 培地に 2 つの阻害剤 (MEK 阻害剤、GSK3 阻害剤) 及び LIF を添加し

た培地 (2i+LIF) にて培養し、繰り返し継代を行う。ES 細胞の評価として、アルカリフォスファターゼ染色や、RT-PCR による多能性マーカー(Oct4、Sox2、Nanog)の確認、および、胚様体形成から ES 細胞を分化させ、三胚葉分化マーカー(Nestin、Sox17、Flk-1)の蛍光免疫染色による確認を行う。樹立した Eker ラット由来 ES 細胞を Wistar ラット胚盤胞に注入後、子宮内移植を行い、キメララットを作出する。また、ES 細胞をヌードマウス腎被膜下に移植し、奇形腫を形成させ、遺伝子型による違いを評価する。

下記の各解析を進めてそれぞれの細胞群の特徴を比較し、*Tsc2* 変異によって惹起されるエピジェネティックな異常や腫瘍化によって獲得された異常などを捉え、腫瘍細胞のリプログラミングに必要な要因を明らかにする。

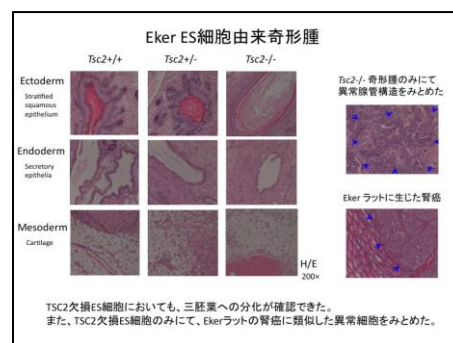
- 1) ES 細胞群の樹立
- 2) ES 細胞群のマーカー遺伝子発現分析と多分化能の基礎解析
- 3) キメララットの作製と観察
- 4) 網羅的な遺伝子発現解析と DNA メチル化・ヒストン修飾の解析
- 5) *in vitro* 分化誘導系を用いた解析

4. 研究成果

我々は、まずラットES細胞の樹立を試み成功した。それらのES様細胞において幹細胞マーカーである *Oct4*、*Sox2*、*Nanog* の mRNA が発現していることを RT-PCR により確認した。さらに、分化培地中における胚様体形成を行い、三胚葉の分化マーカーが発現すること、それに伴う細胞の形態変化が生ずることを RT-PCR や免疫染色により確認した。次に、

Eker ラットのヘテロ変異体同士を交配し、*Tsc2* ホモ変異体胚盤胞由来の ES 細胞樹立にも成功した。Eker ラットの *Tsc2* ホモ変異体、ヘテロ変異体、野生型胎仔より ES 細胞株を樹立に成功した意義は大きい。特に、*Tsc2* ホモ変異体からの ES 細胞株の樹立の応用性は高い。さらに、腎皮膜下への移植に伴う奇形腫の形成に成功した。*Tsc2* ホモ変異体、ヘテロ変異体、野生型胎仔に由来する ES 細胞株間における違いを検討した。また、ES 細胞群の Brown Norway 系統の胚盤胞への細胞注入によりキメララットの作製を試みた。がん細胞に生じた様々な異常をリプログラムし、人為的に遺伝子発現を制御することを基盤とする治療の可能性を追求することが現実的に可能になってきたと言える。

mTORC1 活性の亢進は、造血幹細胞や上皮幹細胞などの枯渇を引き起こすことが報告されているが、*Tsc2* 野生型 ES 細胞、*Tsc2* ヘテロ欠損型 ES 細胞の樹立のみならず、mTORC1 活性が亢進している *Tsc2* ホモ欠損型細胞からも、ES 細胞を樹立することができた。奇形腫形成実験では、樹立した 3 種類の ES 細胞すべてが奇形腫を形成し、外胚葉、内胚葉、中胚葉すべての組織型を示したが、*Tsc2* ホモ欠損型細胞においては、Eker ラットの腎腫瘍組織像を彷彿とさせる上皮様の構造異常が散見された。



【結語】

癌抑制遺伝子である *TSC1* または *TSC2* における生殖細胞系列変異は、結節性硬化症 (tuberous sclerosis; TSC) を引き起こす。TSC の発生機序は、*TSC1/2* 欠損による mTOR の活性亢進に関わると考えられているが、*TSC1/2* 欠損が腫瘍形成などの表現型にどのように影響するのかは、あまり解っていない。Eker ラットは、*Tsc2* に変異を持ち、腎細胞癌や、脳皮質における巨細胞などの病変を発生する動物モデルである。近年、ラットから ES 細胞を樹立する方法が報告されたことを受け、我々は、Eker ラットから ES 細胞を樹立することにより、*Tsc2* の病態発生における役割を解析するための ES 細胞を利用した実験系の開発を行った。

Eker ラットより *Tsc2* 野生型 ES 細胞、*Tsc2* ヘテロ欠損型、*Tsc2* ホモ欠損型細胞の ES 細胞を樹立した。*Tsc2* ホモ欠損型 ES 細胞の奇形腫の様子は、*Tsc2* 欠損による異常発生の組織特異性を反映しているものと推察している。今回樹立した ES 細胞群は、培養レベルでの分化実験などを通じて病態発生機構に迫るための有力なツールになると期待される。

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 11 件)

1. Takamura A., Komatsu M., Hara T., Sakamoto A., Kishi C., Waguri S., Eishi Y., Hino O., Tanaka K. and Mizushima N.: Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Gene & Development*, 25: 795-800, 2011.
2. Nakamura H., Aoki H., Hino O. and Moriyama M.: HCV core protein promotes heparin binding EGF-like growth factor expression and activates Akt. *Hepatology Research* 4: 455-462, 2011
3. Inami Y., Waguri S., Sakamoto A., Kouno T., Nakada K., Hino O., Watanabe S., Andoh J., Iwadate M., Yamamoto M., Lee M-S., Tanaka K. and Komatsu M.: Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J. Cell Biology*, 193: 275-284, 2011.
4. Yasen M., Obulhasim G., Kajino K., Mogushi K., Mizushima H., Tanaka S., Tanaka H., Hino O. and Arai S.: DNA binding protein A expression and methylation status in hepatocellular carcinoma and the adjacent tissue. *Int. J. Oncology*, 40: 789-797, 2012.
5. Goncharova E. A., Goncharov D. A., Fehrenbach M., Khavin I., Ducka B., Hino O., Colby T. V., Merrilees M. J., Haczku A., Albelada S. M. and Krymskaya V.: Preventing of alveolar destruction and airspace enlargement in a mouse Model of pulmonary lymphangiomyomatosis (LAM). *Science Translational Medicine*. 4: 1-10, 2012
6. Sato A., Kasai S., Kobayashi T., Takamatsu Y., Hino O., Ikeda K. and Mizuguchi M.: Rapamycin reverses impaired social interaction in mouse models of tuberous sclerosis complex.

- Nature Communications 2295:1-9, 2012.
7. Ito M., Kajino K., Abe M., Fujimura T., Mineki R., Ikegami T., Ishikawa T. and Hino O.: NP-1250, an ABCG2 inhibitor, induces apoptotic cell death in breast carcinoma MCF7/mitoxantrone-resistant cells via a caspase-independent pathway. *Oncology Reports*, 29: 1492-1500, 2013
 8. Osawa M., Kobayashi T., Okura H., Igarashi T., Mizuguchi M. and Hino O.: TSC1 controls distribution of actin fibers through its effect on function of Rho family of small GTPases and regulates cell migration and polarity. *Plos One*, 8: 1-13 (e54503-54516), 2013.
 9. Obulhasim G., Yasen M., Kajino K., Mogushi K., Tanaka S., Mizushima H., Tanaka H., Arai S. and Hino O.: Up-regulation of dbpA mRNA in hepatocellular carcinoma associated with metabolic syndrome. *Hepatol. Int*, 7: 215-225, 2013
 10. Hirano S., Kakinuma S., Amasaki Y., Nishimura M., Imaoka T., Fujimono S., Hino O. and Shimada Y.: Ikaros is a critical target during simultaneous exposure to X-rays and N-ethyl-N-nitrosourea in mouse T-cell lymphomagenesis. *International J. Cancer* in press.
 11. Okura H., Kobayashi T., Koike M., Ohsawa M., Zhang D., Arai H., Uchiyama Y. and Hino O.: Tuberin activates and controls the

distribution of Rac1 via association with p62 and ubiquitin through the mTORC1 signaling pathway. *Int. J. Oncology*, in press.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋野興夫 (HINO OKIO)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：90127910