

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 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2012

課題番号：23689019

研究課題名（和文）大腸癌における癌幹細胞の発生・維持に関わる機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of colon cancer stem cell self-renewal and pluripotency

研究代表者 川崎 善博 (KAWASAKI YOSHIHIRO)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：10376642

研究成果の概要（和文）：癌組織内において微量に存在する癌幹細胞が癌の再発・転移の大きな原因になっていると考えられている。我々は異種移植腫瘍からFACSを用いてヒト大腸癌由来癌幹細胞と非癌幹細胞を分取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析によって癌幹細胞で発現が増大している遺伝子を374種類見出した。さらに、siRNAを用いた解析によって癌幹細胞の増殖に関与する遺伝子13種類を同定することに成功した。今後、得られた増殖制御因子が癌幹細胞の発生・未分化性維持機構における役割を明らかにする。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells are thought to be responsible for both metastasis and cancer recurrence. We utilized FACS sorting to isolate cancer stem cells (CSCs) and non-cancer stem cells from xenograft human colon tumors to analyze gene expression. RNA-seq analysis revealed that 374 genes were significantly up-regulated in CSCs. Furthermore, we found that knockdown of any of 13 genes resulted in decreased growth of CSCs. Hereafter, we will investigate the importance of these genes in CSC behavior.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2012年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,500,000	6,450,000	27,950,000

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：癌幹細胞、大腸癌

1. 研究開始当初の背景

様々な組織には幹細胞と組織特異的な機能を有する成熟細胞が存在している。幹細胞は、様々な細胞に分化できる能力（多分化能）と自己と同じ幹細胞を維持する能力（自己複製能）を持つことを大きな特徴としている。生体内において成熟細胞は細胞死や組織損傷によって絶えず失われているが、幹細胞から新しい細胞の供給を受けることによって細胞の置き換わりが起こり、組織は恒常性を維持することが出来ている。正常幹細胞システムと類似して、癌組織内においても不均一な細胞集団が階層性を形成しており、大多数を占める癌細胞は腫瘍を形成する能力がなく、微量しか存在しない癌幹細胞と呼ばれる細胞のみが強い造腫瘍性を持つと考えられるようになってきた。癌幹細胞は正常幹細胞と類似して分裂速度が非常に遅く、高い薬剤排出能を有すると考えられ、強い放射線耐性や抗癌剤耐性を示す。その為、癌幹細胞は治療後の癌の再発や転移の大きな原因となっていると考えられ、少数集団ではあるが癌幹細胞こそは癌根治療法の本質的な標的であると考えられている。

2. 研究の目的

我々はこれまで一貫して大腸癌発症における癌抑制遺伝子 APC の機能解析を進めてきた。APC は大腸癌抑制の中心的役割を果たしていると考えられており、さらに最近、H. Clevers らが腸管上皮幹細胞のみにおける APC の変異が腸管ポリープの発生に繋がることを報告した。しかしながら、大腸癌における癌幹細胞の発生、未分化性維持、及び腫瘍形成能に関わる分子機構は未だ全く明ら

かにされていない。そこで、本研究では大腸癌幹細胞マーカーの発現量を指標にした RNAi ライブラリーの網羅的スクリーニングと癌幹細胞を用いたトランスクリプトーム解析によって、大腸癌幹細胞に造腫瘍性を付与している因子を同定する。さらに、既に造腫瘍性との関連性を見出している 7 回膜貫通型受容体 GPRX、及び新たに得られた造腫瘍性関連因子を介するシグナル伝達のネットワークの全体像を明らかにすることによって、大腸癌幹細胞の発生・未分化性維持に関わる分子機構を解明し、癌幹細胞を標的とした新しい分子標的治療法開発の為の足掛かりを得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、大腸癌由来の癌幹細胞が造腫瘍性を維持するメカニズムを明らかにすることによって、癌幹細胞を標的とした治療法開発の為の足掛かりを得ることを目的としている。まず、次世代シーケンサーを用いた網羅的手法によって造腫瘍性に差がある細胞間（癌幹細胞と非癌幹細胞）で発現が変動している因子を同定し、癌幹細胞の発生・維持機構の解明に繋がる情報基盤を確立する。さらに、得られた因子の中から癌幹細胞の増殖に関わる因子を絞り込む為に、siRNA を用いて候補遺伝子の発現を抑制することで癌幹細胞の増殖に与える影響を検討する。次に、スクリーニングで同定した因子を中心としたシグナル伝達経路を幅広く解析することによって、癌幹細胞に造腫瘍性を付与している機構の全体像解明を目指す。

4. 研究成果

1) 造腫瘍性に差がある細胞間（癌幹細胞と非癌幹細胞）で発現が変動している遺伝子の探索

近年、FACS/MACS を用いることによって様々な細胞表面マーカーを指標として、生体癌組織から癌幹細胞が多く含まれる細胞集団を精製できることが明らかにされてきた。我々は免疫不全マウスの異種移植腫瘍から FACS を用いて精製したヒト大腸がん組織由来 CD44+CD133+細胞が CD44-CD133-細胞と比べて極めて高い造腫瘍能をもつことを見出し、CD44+CD133+細胞は癌幹細胞を多く含んでいる細胞集団であることを確認した。従来、我々が用いていた CD44 或いは CD133 のいずれかの分子を指標として分取した細胞集団と比べると、CD44+CD133+細胞は癌幹細胞をより多く含む細胞集団であると考えられた。そこで、CD44+CD133+細胞と CD44-CD133-細胞から抽出した RNA を用いて次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子発現解析を行い、造腫瘍性に差がある細胞間において発現が変化している 374 種類の遺伝子（coding 遺伝子：301 種類、non-coding 遺伝子：73 種類）を同定した。ヒト大腸癌由来癌幹細胞で発現している遺伝子の RNA-seq による網羅的発現解析に関しては、本研究計画遂行中においても国内外から類似の研究は現れず、新規性・独自性が高い成果を挙げ得た。

2) 癌幹細胞の増殖に関与する遺伝子の同定得られた因子の中から癌幹細胞の増殖に関わる因子を絞り込む為に、siRNA を用いて候補遺伝子の発現を抑制することで CD44+CD133+細胞の増殖に与える影響を検討した。その結果、癌幹細胞の増殖制御因

子として ncRNA-X を含む 6 種類の新規 non-coding RNA を見出すことに成功した。

3) 新規遺伝子 ncRNA-X の性状解析
siRNA を用いて ncRNA-X の発現を抑制すると CD44+CD133+細胞の増殖だけでなく、幹細胞マーカー Lgr5 の発現も減衰することを見出した。さらに、幹細胞性の維持に重要な Wnt シグナルの抑制 (β -catenin の発現抑制) によって ncRNA-X の発現が減少することを突き止めた。また、ENCODE プロジェクトの成果から ncRNA-X のプロモーター領域には Wnt シグナル経路の一般的転写因子 TCF4 が結合していることが示されている。これらの結果から、ncRNA-X は Wnt シグナルの標的因子であり、癌幹細胞の増殖に関与していることが示唆された。今後は、ncRNA-X が癌幹細胞の自己複製・未分化性維持に与える影響について詳細な解析を遂行し、大腸癌発症機構の解明を目指す。

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 1 件）

① Differences in the localization of the APC-Asef/ Asef2 complex between APC wild-type and mutant cells : 川崎善博・古川史織・佐藤梨奈・秋山徹 : Cancer Science, in press (査読有り)

〔学会発表〕（計 2 件）

① miR-1-Notch3-Asef経路は大腸癌細胞の運動能亢進に重要である : 川崎善博・古川

史織・秋山徹：第35回日本分子生物学会年会
福岡 2012年12月14日

② 癌抑制遺伝子産物APCの機能解析：川崎
善博・秋山徹：第70回日本癌学会年会 名古屋
2011年10月5日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 善博 (KAWASAKI YOSHIHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号：10376642