

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：90101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670086

研究課題名(和文)毛根チップによる、超非侵襲的ながんの監視・モニタリング

研究課題名(英文) Non-invasive identification and monitoring of cancer using hair follicle gene expression profiling

研究代表者

千葉 眞子 (Chiba, Masako)

医療法人徳洲会札幌東徳洲会病院附属臨床研究センター・IVR・癌研究部・研究員

研究者番号：50647592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：がんが発育・進展する過程において、原発巣が引き起こす全身的な攪乱刺激による間質細胞の活性化が見られることに着目し、非侵襲的に採取が可能な毛根細胞に備わっているであろう「がんセンサー機能」を利用したスクリーニング法を提案した。本研究課題では、大腸癌患者を対象に、毛根細胞の遺伝子発現を網羅解析し、癌患者特異的な発現変化の見られる遺伝子群を見いだした。このような発現プロファイルは革新的ながんスクリーニングの基盤情報となることが期待され、大規模な臨床研究への展開を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：The involvement of primary tumors on the host systemic environment and resulting tumor-supportive role for host-derived stromal cells are of particular interest. Non-invasive monitoring such stromal activation may encourage technological innovation in cancer screening for high-risk patient. We obtained gene expression profiles of the hair follicles, including stem-like cells that has self-renewal capability and can differentiate to hair and skin. Colon cancer patients have significantly different expression profiles in subset of genes involved in cell-differentiation and metabolic regulation relative to healthy individuals. Qualitative evaluation of the gene expressions in hair follicle cells in larger scale patients will be required to establish effective approach for cancer screening.

研究分野：薬学

キーワード：癌 低侵襲診断 毛根

1. 研究開始当初の背景

がんの難治性の一因に、腫瘍血管を含む間質の「異常性」があげられる。異常血管は腫瘍内に「低酸素領域」を形成し、がん細胞には高度の浸潤・転移能、薬剤抵抗性が付与される。我々は、腭がんが自然発症する遺伝子改変マウスモデルを用いて、健全な個体より調整した Tie2 陽性骨髄前駆細胞の移植によって、腫瘍血管・間質の異常性を修復可能なことを見出す (Sasajima J, et al. *Cancer Res* 2010)。すなわち、生体は本来、損傷に対する修復応答機構を有しており、「正常な」骨髄前駆細胞には、いったん生じた間質異常をリセットする能力を備えていると考えられる。

それでは、実際の発癌に際して、生体内ではどのように幹細胞・前駆細胞による組織修復能が失われ、血管や間質の異常が生じるのだろうか？われわれはこれまで、KRAS シグナルが HIF 非依存性の低酸素応答を誘導し (Mizukami Y, et al. *Nat Med* 2005, *J Biol Chem* 2006)、間質での morphogenesis 経路の賦活化により、骨髄前駆細胞の動態制御を介して間質異常を増強することを報告してきた (Yamazaki M, et al. *Cancer Sci* 2008, Nakamura K, et al, *PLoS One* 2010, *AJP* 2012)。このような「がん・骨髄クロストーク」は発癌の後期段階に完成するが、これまでに前癌病変の段階で既に骨髄前駆細胞が活性化される知見を得ている (未発表)。このことは、がん患者の末梢血中にわずかに含まれる前駆細胞においても再現されるため、血球細胞の一分画を利用して血管を含む間質異常をモニタリングできる可能性がある。最近の研究により、これら前駆細胞での変化は、「原発巣による内分泌攪乱 (McAllister, *Cell* 2008)」や「Exosome による骨髄前駆細胞教育 (Peinado, *Nat Med* 2012)」を介することも明らかにされつつある。このような、原発巣による遠隔臓器におよぶシステム的な変化は、他の組織幹細胞においても成り立つ可能性がある。もしそうであれば、それらは癌の存在を鋭敏に捉えるセンサーとして利用が可能であると考えられる。

毛根 (毛胞) 組織には、二種類の幹細胞が共存する。毛根で活発に細胞増殖する部位は、最も深いところに位置する毛母であり、毛根を作り出す幹細胞は従来より毛母に存在すると考えられていた。しかし、バルジ領域に存在する細胞が表皮や汗腺、皮脂腺のすべての皮膚関連臓器を再生する多能性を有することが、近年の研究により証明された (Elaine Fuchs. *Nature* 2007)。すなわち毛根は体表付近に存在し、比較的低侵襲に採取可能な組織幹細胞であるため、その遺伝子発現等の特性を調べることにより、生体が、がんに関与しているかを判定できる可能性を考えた。実際に毛根 RNA を調べることで、体内時計の攪乱モニタリングが可能とする

報告もあり (Akashi M, *PNAS* 2010)、このような視点から毛根を用いたがん診断への応用も可能であろう。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、毛根細胞 (毛根幹細胞) が、がん間質の異常性を誘導する生体シグナルのセンサーとして利用可能かを明らかにすることである。

組織修復を担う幹細胞 (前駆細胞) は「侵襲」を鋭敏に感知しているという仮説のもとに、その特性を侵襲的な組織採取を必要としないがん診断へと応用しようとするものである。がんや一部の難治性炎症では、このような生体が本来有する組織修復機構がハイジャックされ、その仕組みが病気の進行や治療抵抗性の獲得に悪用されていると考えられる。このことは逆に、病気の早期発見や生命予後の予測に利用できる可能性がある。「がん間質の成り立ち」に関わる細胞間ネットワークを非侵襲的に監視・モニタリングする系を確立し、革新的ながんスクリーニングの導入による先進医療の基盤作りをすることを目的とした。さらに、組織修復が悪用されるメカニズムやマーカーとなる遺伝子発現等の情報が得られれば、これまで明らかにされてこなかった細胞・分子ネットワークの発見につながる可能性があり、がん基礎研究の発展にも貢献できる。

3. 研究の方法

(1) 仮説の予備検証 (動物実験)

腭癌を自然発症するマウスモデル (Pdx-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+}) を用いて、腭前癌病変 (PanIN) あるいは浸潤癌を形成した段階で骨髄 Lin-cKit+単核球 (前駆細胞) を磁気ビーズ法分離し (Milltenyie Biottech 社製; AutoMACS)、これらの遺伝子発現ならびに機能解析を行った。

(2) 仮説の実証 (臨床検体)

大腸癌患者 (6 例) ならびに健常人 (4 例) を対象として、本人の同意の下に毛髪 20 本程度を採取し、バルジ領域を含む毛根部 (cell-rich follicles) を清潔なハサミにて切断し直ちに RNA later による安定化処理を 4°C にて一晩行った後に、安定化液を取り除き凍結処理した。これを RNeasy micro kit (Qiagen; ビーズ破砕による homogenize 処理を併用) を用いて精製し、SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing. v3 (Clontech 社製) を使用して RNA 10ng を増幅した後に、IonTorrent PGM (Thermo Life Technologies 社製) を用いて Ampliseq ライブラリを作成し、RNA-sequence を行った。

(3) 探索

「大腸癌患者 vs. 健常人」の比較で発現に有意差の見られた遺伝子について、その発現変化を定量的 RT-PCR により確認する。毛母ならびにバルジ領域における幹細胞の特定（局在確認）には、Sox2 および CD200 抗体などをマーカーとした免疫組織化学的手法を用い、がん患者の毛根での特異的に遺伝子発現の局在確認を行う。

当初は、がん患者の毛根幹細胞において高い特異性をもって発現が変化する遺伝子リストをもとにカスタムパネルを作成し、癌の予測が可能かについて検証する計画であったが、2年間の研究期間内に実施できたのは、(2)までの過程で、研究計画全体を完遂させることができなかった。

4. 研究成果

(1) 仮説の予備検証

膵発癌の時間軸を個体レベルで再現するために膵癌を自然発症するマウスモデル (Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+}) を用いた。膵前癌病変 (PanIN) を有する Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D} マウス、浸潤癌を形成する Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D};p53^{lox/+} をいずれも 12 週齢で屠殺した後、骨髄単核球を磁気ビーズ法によって分離し、骨髄 Lin-cKit+ 単核球 (前駆細胞分画) を得た。対象として、Pdx1-Cre マウスを用いた。前駆細胞分画における血管新生関連の遺伝子発現を Mouse Angiogenesis DNA Microarray (Oligo GEArray; SABiosciences 社製) を用いて解析したところ、前癌病変 PanIN の段階から既に健常マウスと比較して発現レベルの上昇する遺伝子が複数みとめられ (図 1A)、この現象は定量的 RT-PCR によって再現性をもって確認することができた。次に、これらの前駆細胞分画の基質接着性を検証するために、type-I collagen コートした培養皿への接着率を比較した。図 1B に示す様に、前癌病変を有する個体由来の細胞での接着率の上昇を認め、担癌個体においてはその傾向はより顕著であった。

図 1A

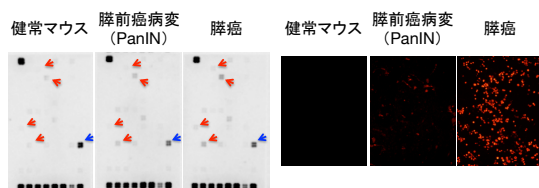
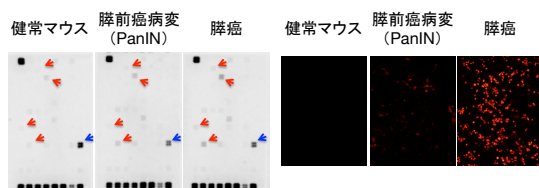


図 1B



このような骨髄由来の前駆細胞でみられる「変化」は、腫瘍血管を軸とする間質異常の要因となっていると考えられるが、骨髄前駆細胞分画は膵発癌を浸潤癌の形成に至る

前段階より腫瘍が形成される局所から何らかの生体シグナルを「受容」し、その機能を変化させている可能性が示唆された。

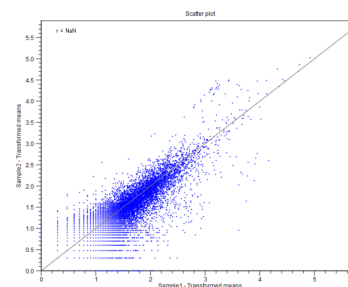
(2) 大腸癌患者の毛根における遺伝子発現

引き続き、臨床検体を用いた解析を行った。検体 (バルジ領域を含む毛根) の採取は徳洲会グループ共同倫理委員会の承認のもと (承認番号 TGE00358-012)、被験者本人の同意を得たうえで行った。

Stage III 以上の男性の大腸がん患者と、年齢をマッチさせた健常人の頭皮より毛根部の付着した毛髪を採取し、毛根部を切断のうえ直ちに RNA later による安定化処理を行い (4°C にて一晩インキュベート)、安定化液を取り除いた後に -80°C で凍結保存した。この試料を融解後に金属ビーズによる組織破砕を行い、RNeasy micro kit (Qiagen 社製) を用いて精製した。毛根 10-20 本より 100ng 程度の RNA が採取可能であることが報告されているが (Akashi M, PNAS 2010)、実際に採取できた RNA 量は 10ng 以下であった。直接 RNA-sequence による発現解析を行うのは困難であったため、SMARTer Ultra Low Input RNA Kit for Sequencing, v3 を使用して RNA の増幅を行った後に、IonTorrent PGM を用いて Ampliseq ライブラリを作成し、RNA-sequence を行った。これまでに大腸がん患者 6 人、健常人 4 人分のデータを得て、癌患者の毛根において特異的な遺伝子発現パターンが見られることを確認している (図 2)。

未発表のため、遺伝子名は示さないが、特に細胞分化や代謝に関連する複数の遺伝子発

図 2



現、健常人と癌患者で大きな違いが認められることが現時点で確認されている。

現在、大腸癌患者群と健常人群との比較解析をもとに、両者間での発現の異なる複数の遺伝子による診断アルゴリズムの構築を進めている。Stage II 以下の大腸癌、特に早期浸潤癌の判定が可能かについて、今後 validation sample set を用いてのより大規模な検証が必要と考えている。

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6件; 全て査読あり)

- 1) Imai K, Karasaki K, Ono Y, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K and Mizukami Y. Metachronous pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias (PanINs). *The Journal of Pathology: Clinical Research* 1;76-82 (2015) DOI: 10.1002/CJP2.8
- 2) Gala MK, Mizukami Y, Le LP, Moriichi K, Austin T, Yamamoto M, Lauwers GY, Bardeesy N, Chung DC. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas. *Gastroenterology* 146;520-9 (2014) DOI: 10.1053/j.gastro.2013.10.045
- 3) Watanabe K, Karasaki H, Mizukami Y, Kawamoto T, Kono T, Imai K, Einama T, Taniguchi M, Kohgo Y, Furukawa H. Cyst infection of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas: management of a rare complication: report of 2 cases. *Pancreas* 43(3):478-81 (2014) doi: 10.1097/MPA.0000000000000036.
- 4) Deschênes-Simard X, Mizukami Y, Bardeesy N. Macrophages in pancreatic cancer: starting things off on the wrong track. *J Cell Biol* 202(3):403-5 (2013) DOI: 10.1083/jcb.201307066
- 5) Kawamoto T, Sasajima J, Sugiyama Y, Nakamura K, Tanabe H, Fujiya M, Nata T, Iuchi Y, Ashida T, Torimoto Y, Mizukami Y, Kohgo Y. Ex vivo activation of angiogenic property in human peripheral blood-derived monocytes by thrombopoietin. *Int J Hematol* 98;417-29 (2013) DOI: 10.1007/s12185-013-1423-8.
- 6) Aburakawa Y, Kawabe J, Okada M, Yamauchi A, Asanome A, Kabara M, Matsuki M, Takehara N, Nakagawa N, Okumura S, Minami Y, Mizukami Y, Yuhki K, Ushikubi F, Hasebe N. Prostacyclin stimulated integrin-dependent angiogenic effects of endothelial progenitor cells and mediated potent circulation recovery in ischemic hind limb model. *Circ J* 77(4):1053-62 (2013) DOI: 10.1253/circj.CJ-12-0897

〔学会発表〕(計5件)

- 1) Ono Y, Karasaki H, Imai K, Sasajima J, Chiba S, Funakoshi H, Muraki M, Hanaoka H, Furukawa T, Furukawa H, Kono T, Nagashima K, Mizukami Y. Metachronous

pancreatic cancer originating from disseminated founder pancreatic intraductal neoplasias. General Poster Session B (Board #B51): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 330): San Francisco, Jan 16, 2015

- 2) Karasaki H, Kono T, Ono Y, Maejima T, Mizukami Y. Adenosquamous cell carcinoma derived from intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas confirmed by genetic analysis. General Poster Session B (Board #A46): Cancers of the Pancreas, Small Bowel, and Hepatobiliary Tract, 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium: J Clin Oncol 33, 2015 (suppl 3; abstr 275): San Francisco, Jan 16, 2015
- 3) Mizukami Y, Imai K, Chiba S, Ono Y, Sasajima J, Karasaki H, Kono T, NAGASHIMA K. A case of metachronous ductal adenocarcinomas (PDAs) with unique KRAS mutation. 膵臓、その他。ポスター発表。第73回日本癌学会学術総会(2014年10月26日; 横浜)
- 4) Sasajima J, Kawamoto T, Sugiyama Y, Mizukami Y, Iuchi Y, Ashida T, Tanabe H, Torimoto Y, Kohgo Y. Increased angiogenic property of human peripheral blood monocytes by ex vivo culture with c-Mpl agonists in hindlimb ischemia mouse model. American Society of Hematology. Poster session. Dec 5-8, 2013 (New Orleans, LA)
- 5) 蘆田知史、奈田利恵、井内康之、千葉眞子、加藤邦子、福岡亜衣、森木彩名、永幡美鈴、薄木亜也、松原由佳、原 愛里、八戸大輔、山崎誠治、水上裕輔。Single venous accessによる末梢血単核球分離とその効率。第12回日本再生医療学会総会(2013年3月21日; 横浜)

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

http://www.higashi-tokushukai.or.jp/clinical_study/index.php

6. 研究組織

（1）研究代表者

千葉 眞子 （CHIBA, Masako）

医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
IVR・癌研究部
研究員
研究者番号：50647592

（2）研究分担者

佐々木 勝則 （SASAKI, Katsunori）

旭川医科大学・医学部
消化管再生修復医学講座
特任教授
研究者番号：60336394

水上 裕輔 （MIZUKAMI, Yusuke）

医療法人 徳洲会 札幌東徳洲会病院
附属臨床研究センター
臨床生体情報解析部
部門長
研究者番号：30400089

（3）連携研究者

該当者なし