

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32620
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：25670196
研究課題名(和文)がん細胞のリセット(初期化)のシステムの確立

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：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、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、「がん細胞のリセット=良性化・リハビリテーション」のシステムの確立を目指す。具体的には、Knudsonの2ヒットが適用される遺伝性腎臓がんモデルである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iPS細胞と比較する。さらに、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、エピジェネティックな要因を特定するための、実験系を確立する。

研究成果の概要(英文)：Eker rats have a germline mutation in tuberous sclerosis 2 gene (Tsc2). Heterozygous mutants develop renal cell carcinomas (RCCs) within one year after birth, whereas homozygous mutants are embryonic lethal. To explore new strategies for treatment of cancer using epigenetic modification, we started studies with reprogramming of Eker rat's cancer cells as a model case. For that, we first tried to generate Tsc2-deficient ES cells (ESCs) and embryonic fibroblast-derived iPS cells (iPSCs) from Eker rat's, and analyzed effects of Tsc2-deficiency on pluripotency. We are characterizing them in terms of stemness and pluripotency.

研究分野：実験病理学

キーワード：癌 病理学 再生医療 遺伝子 ips化 Tsc遺伝子

1. 研究開始当初の背景

2012年のノーベル医学・生理学賞は「成熟細胞が初期化され多能性をもつことの発見」で山中伸弥教授(京都大学)とガードン教授(英ケンブリッジ大学)に贈られた。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」を立ちあげ現在に至っている。「細胞の初期化 vs 癌化」は、これからの「癌研究」の大きなテーマの一つである。日本国は「化学癌の創始国」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 の言葉が「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、2005年の「クボタショック」の直後、わが国で初めて順天堂大学に「アスベスト・中皮腫外来」を開設し、現在も診療を進めており(2005~2014年度、のべ外来来訪者数;5401人)、日本国にとって緊急を要する大切なテーマに迅速に取り組み、次世代のアジア貢献にも展開出来る研究実績を持っている。

長年の「遺伝性腎がんラットモデル」の原因遺伝子(*Tsc 1 & Bhd*)の同定(Nat Genet,

Proc. Natl. Acad. Sci)と多段階癌の研究から、中皮細胞特異的遺伝子、*ERC/Mesothelin*を発見し、発現蛋白が、中皮腫の血液中で高い値を示すことを明らかにした。加えて、中皮腫の血液中でN末端ERC/Mesothelinを定量することのできる「中皮腫診断キット」(特許第5143018号)の開発とキット化にも成功している。また、本キットを利用し、2007年2月から2012年3月まで、東京土建健保組合との共同研究で建築作業員等を対象とした大規模研究型検診を推進することで、3名の発症前診断に成功し、自覚症状のまだ無い中皮腫の発症前診断が出来る可能性(2014)と、治療後再発のモニタリングへの有効性を明らか(2013)にしており、早期発見・早期診断が難しいアスベストによる中皮腫の診断マーカーの開発に貢献してきた。現在も引き続き、研究型検診により中皮腫ハイリスク群とされた対象に、「中皮腫の診断キット」を利用した追跡調査を行い、臨床データおよび検診データ比較、解析し、有効性を検証する研究を行っているほか、候補者が中心となり順天堂大学・順天堂医院内の各科が連携し、中皮腫の早期診断・早期治療を目指した総合的診療システムの確立を行う取り組みも行われている(「中皮腫対策 国家戦略で」、読売新聞、2013年2月21日付け、「中皮腫 発症前に診断」朝日新聞、2012年6月4日付け)。

さらに、2013年に国際シンポジウム「先導的国際がん研究の動向, Mesothelioma due to asbestos exposure ~ Innovative Approach for Risk Identification and Prevention of Environmental Carcinogenesis ~ アスベスト曝露による中皮腫 ~ 環境癌のリスク予知と予防への新しい展開 ~」の主催やタイ病理学会(IAP2014)(2014年バンコク)で講演し、タイおよびベトナムとの交流実績を持つ。アジア地域における診断の技術や教育の質

の向上を目指した交流も行なっている。加えて、2013年11月15日、第4回国際環境発がん制御研究会シンポジウム「アスベスト 予防と早期診断と治療」、そして2014年11月13日、第5回国際環境発がん制御研究会シンポジウム「アスベスト 予防と早期診断と治療&福祉」を開催するなど、アスベスト曝露と関連が深い中皮腫の早期発見・早期治療法の開発に向けた広報・教育活動も積極的に行っている。

さらに、環境発がんのうち、アスベストによる発がん研究をモデルとし、その研究の反省を生かし、「先楽後憂」ではなく「先憂後楽」の精神で、環境発がんリスクの問題を科学的に検討することを目標に、長年研究に従事した経歴をもっており、今後も環境発がん研究をリードしていくと考えられる。2014年度には「国際環境発がん制御研究センター」を順天堂大学病理・腫瘍学内に設置し、環境発がん因子に起因する「がん」を未然に防ぐ為の研究を推進し、環境リスクの重要性を伝える教育やがんの正しい知識を正しく伝えることのできる医療従事者を育てる「がん教育」も積極的に行っている。

我々が推進する中皮腫診断システムの確立、環境発がん研究および低頻度の環境リスクの重要性を伝える教育が普及し、日本のみならずアジアの人々が安全に安心して健康な生活を送ることの出来る社会の構築が実現するものと大いに期待できる。我が国で、日本結節性硬化症（理事長）、リンチ症候群研究会（代表）を立ち上げ、遺伝性腫瘍分野への貢献に務めている。

このように、我々の研究開始当初の背景には、「遺伝性発がん&環境発がん」という対極的なテーマの懸け橋を目指し、発がん研究に、独創性と新規性を与えようとするものがあり、本研究の最終目標は、「がん細胞のリセット（初期化・良性化）システムの確立」

に資することである。

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、「がん細胞のリセット(初期化) = 良性化・矯正(リハビリテーション)」のシステムの確立を目指すものである。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子より誘導多能性幹細胞 (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 iPS 細胞と比較する。さらに、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ための、実験系を確立する。

3. 研究の方法

以下の項目で腫瘍発生過程で惹起されるエピゲノムのリセット異常の解明を進める。

1. Eker ラット線維芽細胞由来の *Tsc2* 欠損 iPS 様細胞の樹立と未分化状態の分析
2. 三胚葉分化実験
3. キメララットの作製
4. 腎がん細胞株由来 iPS 様細胞の樹立
5. 網羅的な遺伝子発現解析
6. エピゲノム分析

4. 研究成果

iPS細胞のプロトコールを阻害剤の投与タイミングなどを見直し、*Tsc2*^{+/+}, *Tsc2*^{+/-}, *Tsc2*^{-/-} 全ての遺伝子型のEkerラットの胎児線維芽細胞を用いたiPS細胞樹立の確立を行った。胎生12.5日のEkerラットの胎児を摘出し、各々の線維芽細胞を初代培養し、RT-PCR法を用いて遺伝子型を調べた。Takahashiらの方法(Takahashi K. et al. Cell. 2007)に準じ、レトロウイルスベクターを用いて、山中4因子

(OCT3/4,SOX2,Klf4,c-MYC)とD_s-REDを、Ekerラット胎児線維芽細胞に導入した。まず *Tsc2*^{+/+} Ekerラット胎児線維芽細胞で、効率的にiPS様細胞のコロニーが形成される条件の至適化を進めた。ウイルス感染後の線維芽細胞をフィーダー細胞(マウス胎児線維芽細胞)上に再播種したのち、2i法により培養を続け、iPS様コロニーを得た。このコロニーを単離培養し、さらに継代培養を行い、多能性を証明するアルカリフォスファターゼ染色が陽性のコロニーを得た。

同様の条件下で *Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞もiPS化を行い、*Tsc2*^{+/+} Ekerラット胎児線維芽細胞とのコロニー形成能の比較を行った。*Tsc2*^{+/+} Ekerラット胎児線維芽細胞からはアルカリホスファターゼ陽性のiPS細胞様コロニーが多数得られる条件において、*Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞からはコロニーが全く形成されなかった。従って、ラットにおいて *Tsc2*欠損は多能性幹細胞へのリプログラミングを阻害すると考えられた。

*Tsc2*欠損によって惹起されるmTORC1活性の亢進がリプログラミング阻害の主要因である可能性を考え、山中4因子の導入後、mTOR阻害剤であるラパマイシン存在下でiPS様細胞の樹立を試みた。まず既に樹立したEkerラットのES細胞を用いて、ES細胞の増殖に影響無しにmTORC1経路の阻害を認めるラパマイシン濃度を探った。この前実験により得られた濃度に準じて、*Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞からのiPS細胞樹立過程でラパマイシンを加えるも、コロニー形成の割合に変化は認められなかった。これらの結果から、少なくとも誘導期間のみのmTORC1抑制ではリプログラミング能は回復しないものと推察された。

Tsc2^{+/+} Ekerラット胎児線維芽細胞と、*Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞のコロニー形成能の差から、mTORC1活性の亢進がリプログラミングを阻害すると考えられた。

ラパマイシン投与下の樹立実験により、誘導期間のmTORC1抑制のみでは変化がないことも推察され、この実験系が腫瘍抑制遺伝子変異とリプログラミングの分子機構の関連を調べる上で、大変有用であると考えられた。今後さらに mTORC1 阻害の期間を様々な条件で検討し、リプログラミングのどのタイミングで mTORC1 活性が関わるのか、また、他の経路の関与があるのかを明確にする必要がある。

これまでのところ、線維芽細胞からのiPS様細胞樹立について、一定の成果を得ており、*Tsc2*^{-/-}細胞において不完全なリプログラミングが生ずる可能性を示すことが確認できた。*Tsc2*欠損腫瘍をモデルとし、腫瘍抑制遺伝子変異とリプログラミングの分子機構の関連を調べる上で、本実験系が有用であることが確信された。

今後、*Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞のリプログラミング阻害の要因を明らかにし、その是正によるリプログラミングを達成する。また、現在のiPS細胞のプロトコールを用いて、Ekerラットの腎癌の細胞からのiPS化を行う。この際、*Tsc2*^{-/-} Ekerラット胎児線維芽細胞と同様にコロニー形成がみられない可能性がある。この場合も線維芽細胞で見出したリプログラミング阻害要因の是正による樹立を試みる。

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5件)

1. Sugiura H., Yasuda S., Katsurabayashi S., Kawano H., Endo K., Takasaki K., Iwasaki K., Ichikawa M., Kobayashi T., Hino O. and Yamagata K.: Rheb activation disrupts spine synapse formation through accumulation of syntenin in

- tuberous sclerosis complex. Nature Communications, 6: 6842, 2015 (DOI: 10.1038/ncomms7842) (査読有り)
2. Ito Y., Kawano H., Kanai F., Nakamura E., Tada N., Takai S., Horie S., Arai H., Kobayashi T. & Hino O.: Establishment of *Tsc2*-deficient rat embryonic stem cells. Int. J. Oncology, 46: 1944-1952, 2015 (doi: 10.3892/ijo.2015.2913) (査読有り)
 3. Yasuda S., Sugiura H., Katsurabayashi S., Shimada T., Tanaka H., Takasaki K., Iwasaki K., Kobayashi T., Hino O. and Yamagata K.: Activation of Rheb, but not of MTORC1, impairs spine synapse morphogenesis in tuberous sclerosis complex. Science Rep. 3; 4: 5155, Jun 2014. (doi; 10.1038/srep05155) 「オープンアクセス」(査読有り)
 4. Shiono M., Kobayashi T., Takahashi R., Ueda M., Ishikawa C. and Hino O.: Transgenic expression of the N525S-tuberin variant in *Tsc2* mutant (Eker) rats causes dominant embryonic lethality. Scientific Reports, Aug 4: 5927, 2014 (doi:10.1038/srep05927) 「オープンアクセス」(査読有り)
 5. Hino O.: Cancer Philosophy ~ Thinking “Cancer Cells” Deeply. Juntendo Medical Journal. 60: 200-209, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕(計1件)

河野春奈、伊藤敬孝、高井節夫、新井一、堀江重郎、小林敏之、樋野興夫：Eker ラット ES 細胞、iPS 細胞による腎癌発生メカニズムの解析。第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日～5 日、横浜 p153

(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

(