

## 日中韓フォーサイト事業 平成 21 年度 実施報告書

### 1. 拠点機関

日本側拠点機関：	札幌医科大学
中国側拠点機関：	Sun Yat-sen University (中山大学)
韓国側拠点機関：	Sookmyung Women's University (淑明女子大学校)

### 2. 研究交流課題名

(和文)： 乳癌幹細胞の病理学的性質を規定する microRNA 機構の解明  
(交流分野： エピジェネティクス )

(英文)： The microRNA mediated mechanisms underlying the pathological behavior of breast cancer initiating cells  
(交流分野： epigenetics )

研究交流課題に係るホームページ：<http://web.sapmed.ac.jp/im1/>

### 3. 開始年度

平成 21 年度 ( 1 年目 )

### 4. 実施体制

#### 日本側実施組織

拠点機関：札幌医科大学

実施組織代表者 (所属部局・職・氏名)：理事長・島本和明

研究代表者 (所属部局・職・氏名)：医学部・助教・鈴木 拓

協力機関：

事務組織：札幌医科大学附属産学・地域連携センター

#### 相手国側実施組織 (拠点機関名・協力機関名は、和英併記願います。)

(1) 中国側実施組織

拠点機関：(英文) Sun Yat-sen University

(和文) 中山大学

研究代表者 (所属部局・職・氏名)：(英文) Dept of Breast Surgery, No. 2 Affiliated Hospital・Professor, Vice president of the hospital・Erwei Song

協力機関：(英文) Shanghai Jiaotong University

(和文) 上海交通大学

(2) 韓国側実施組織

拠点機関：(英文) Sookmyung Women's University

(和文) 淑明女子大学校

研究代表者(所属部局・職・氏名)：(英文) Department of Biological Science・Professor・  
Jong Hoon Park

協力機関：(英文) National Cancer Center

(和文) 国立がんセンター

## 5. 全期間を通じた研究交流目標

癌研究は、ポストゲノム時代における最も重要な研究課題のひとつである。癌は遺伝子の疾患であり、遺伝子変異は発癌を引き起こす主要なメカニズムのひとつである。近年ではこれに加えて、DNA やヒストンのメチル化状態により遺伝子の働きが抑えられるエピジェネティクスという現象が注目されている。代表的なエピジェネティクスの例として、ゲノム上で遺伝子をコードする領域の DNA がメチル化すると、その遺伝子の転写が抑制されることが知られている。癌細胞では、癌抑制遺伝子が過剰なメチル化により機能を失う、あるいは癌遺伝子がメチル化低下により活性化するといった現象が頻繁に起きている。

【解説】 遺伝子変異は、蛋白をコードする塩基配列が別の配列に変わることによって正常な蛋白が作られなくなる。一方、DNA のメチル化は、塩基配列そのものには影響しないが、メチル化された領域の遺伝子がメッセンジャーRNA に転写されるのを抑制することで遺伝子の機能を不活性化する。最近の研究では癌細胞では数百～千個程度の遺伝子にメチル化異常が起きていることがわかっている。DNA の塩基配列を伴わずに、遺伝子機能を制御する仕組みを、ジェネティクス(遺伝子学)と対比させて、エピジェネティクスと呼ぶ。

また近年では、蛋白を作らない短い RNA 分子(microRNA)が、遺伝子の働きに重要な役割を担っていることが急速に明らかにされつつある。これまで数百種類の microRNA が発見されており、特に発生・分化や細胞増殖の調節に関わっていると考えられている。癌では正常細胞と比べ、多くの microRNA 発現が変化しており、癌遺伝子あるいは癌抑制遺伝子として機能する microRNA が多数存在すると考えられている。

【解説】 遺伝子は全てタンパク質をコードするものと従来考えられていた。しかし近年、タンパク質をコードしない RNA(non-coding RNA: 非コード RNA) が多数存在することが明らかとなり注目されている。中でも近年、研究が進んでいるのが

microRNA と呼ばれる短い RNA 分子である。microRNA は 20 塩基程度の短い一本鎖 RNA で、これまで数百種類が発見されている。microRNA は、特定のメッセンジャーRNA と結合し、蛋白への翻訳を抑制する働きがある。細胞の分化、増殖、アポトーシス、癌化など様々なプロセスにおいて microRNA は遺伝子の働きを調節する重要な役割を担っていると考えられている。

さらに、癌の増殖は一部の癌幹細胞と呼ばれる細胞が担っていると考えられている。癌幹細胞の正体については未だ不明な点が多く、他の多くの癌細胞と癌幹細胞を見分けるマーカーを発見するための努力が多く、多くの研究者によりなされている。また、癌幹細胞の性質を規定する遺伝子を明らかにする事も重要である。これらの研究により、癌幹細胞を標的とした治療法の開発が促進されると期待されている。

今回我々は、3カ国においてそれぞれの持ちうる研究技術を共有し、共同研究および交流の場を設けることで、microRNA とエピジェネティクス、癌幹細胞という近年注目される分野を結びつけた研究を行うことで、乳癌幹細胞の病態における役割を明らかにし、世界をリードする研究成果を挙げることを目標とした。まず札幌医大では、癌のエピジェネティクス研究において多くの実績を残してきた。これまで、胃癌、大腸癌、肝臓癌、膵臓癌、乳癌、血液腫瘍など様々な癌においてメチル化異常を来す遺伝子を数多く同定し、論文発表を行っている。また、中国の中山大學 Dr Song の研究室では、これまで乳癌幹細胞研究において特定の microRNA が重要な役割を果たすことを世界に先駆けて発表するなど顕著な業績を上げている。さらに韓国の淑明女子大学の Dr Park は癌の遺伝子プロファイルおよびマーカー研究において著明な成果を上げている。本プロジェクトでは、これらの機関と共同研究を行うことで、乳癌幹細胞の性質を規定する microRNA を明らかにし、癌幹細胞を標的とした新たな治療法の開発につながる成果をあげることを目標とする。

また近年では、マイクロアレイや次世代シーケンサーといった新技術による網羅的解析が進歩し、大量の研究データをいかに扱い、新たな知見をその中から探り出していくかという能力が要求される。本研究ではこれら最先端のテクノロジーを積極的に利用することで、網羅的解析時代に対応できる若手研究者の育成を目指す。

また本プロジェクトは、まず乳癌の幹細胞研究を目的としているが、本研究で構築される拠点およびネットワークそして人的つながりは、様々な癌研究においても重要と考えられる。特に、胃癌や大腸癌の幹細胞については未だ不明な点が多く、今回構築される共同研究体制を維持し、有効活用させていきたいと考えている。特に、中国における幹細胞研究技術、複数の次世代シーケンサー、申請者らのマイクロアレイ、エピジェネティクス研究技術を用いることで、今後の癌エピゲノムプロジェクトの推進が可能に

なると考えられる。さらにエピゲノムプロジェクトについて、アジアは大きく欧米の後塵を拝しているため、今回の事業で構築される拠点体制は重要であると考えられる。

## 6. 平成21年度研究交流目標

本研究では、乳癌幹細胞の性質を規定する仕組みを明らかにすることを目的としている。Sun Yat-sen University の Dr. Song の研究室では、近年、乳癌幹細胞の性質をもつ細胞 (Tumor-initiating cell : 癌源細胞) の単離に成功している。平成21年度は、この乳癌源細胞の性質を規定する microRNA を明らかにすることを目指す。さらに microRNA の発現を調節する上で、DNA メチル化やヒストンメチル化などのエピジェネティックな修飾がどのように関わっているのかを明らかにすることを目指す。

中国 Sun Yat-sen University の Dr. Song 研究室は、研究対象とする乳癌源細胞を作成し、マウスを用いた腫瘍形成能の検討を行う。淑明女子大学校の Dr. Park 研では細胞の遺伝子発現プロファイリング解析およびマーカー探索の研究を行う。札幌医大では、DNA メチル化やヒストン修飾の解析を担当する。研究の進捗状況につき情報交換し、研究推進の意見交換のための会議の場を定期的に設ける。また、平成21年度の後半に、研究の進捗状況をとりまとめ、全体の討議をするためのセミナーを開催する。

## 7. 平成21年度研究交流成果

### 7-1 研究協力体制の構築状況

平成21年11月21日・22日に中国広州市に、日中韓の研究代表者および主な研究メンバーが集合し第1回会議が開かれた。この席上で各施設の研究設備および技術を紹介し、今後の研究協力体制の構築について話し合い、以下のような分担体制を構築することで合意がなされた。

1. 札幌医科大学は、パイロシークエンサーによる DNA メチル化解析、マイクロアレイ実験装置による遺伝子発現解析、さらに次世代シークエンサー SOLiD3 によるエピゲノム解析のプラットフォームを提供する。
2. 中国 Sun Yat-sen University の Dr. Song 研究室では、培養細胞からの乳癌幹細胞の抽出を行う。また外科切除された乳癌組織検体を収集する。
3. 中国 Shanghai Jiaotong University の Dr. Zhu 研究室では、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膀胱癌、食道癌などの臨床検体をストックしており、乳癌以外に研究を広げることが可能である。
4. 韓国 Sookmyung Women's University の Dr. Park 研究室は、DNA メチル化解析ならびに遺伝子機能解析などの生化学的解析を担当する。

5. 韓国 National Cancer Center (NCC)は、MassARRAY による DNA メチル化解析プラットフォームを提供する。

## 7-2 学術面の成果

癌では多くの microRNA 発現が変化しており、癌遺伝子的あるいは癌抑制遺伝子的に機能する microRNA が多数存在すると考えられている。しかし microRNA の発現を制御する仕組みには不明な点が多く、癌における発現変化のメカニズムも明らかではない。札幌医科大学では、マイクロアレイ、DNA メチル化およびヒストンメチル化の解析結果を統合して、癌においてエピジェネティックに不活化される microRNA のリストを作成した。DNA メチル化異常が不活化の原因となっている microRNA 遺伝子を約 20 個特定した。

中国 Sun Yat-sen University では、乳癌幹細胞において機能的に重要な microRNA を複数同定した。これらの microRNA の中には、正常細胞と比べ、癌細胞において発現が低下しているものも含まれており、エピジェネティックに不活化されている可能性が考えられた。また、癌細胞に直接導入することで癌の増殖を抑制しうる microRNA を複数同定した。

韓国 Sookmyung Women's University および National Cancer Center では MassARRAY によるハイスループットな DNA メチル化解析システムを確立した。

## 7-3 若手研究者養成

本研究には札幌医科大学の大学院生 2 名、若手研究者（助教クラス）4 名が参加している。さらに国内の協力研究者として、聖マリアンナ医科大学より若手研究者 3 名、愛知県がんセンターより大学院生 3 名が参加している。札幌医科大学ではこれら若手研究者に対し、本研究で今後必要となるエピゲノム解析技術（パイロシークエンサー、マイクロアレイ、次世代シークエンサー）の指導を行った。

2010 年 2 月には研究代表者（鈴木）および若手研究者 1 名を共同研究のため韓国 Sookmyung Women's University および韓国 National Cancer Center へ派遣し、韓国側若手研究者および大学院生に癌エピジェネティクスに関するレクチャーを行った。特に DNA メチル化を癌診断マーカーとして応用する試みについて、韓国側若手研究者・大学院生から高い関心が寄せられた。

また札幌での癌エピジェネティクスセミナーでは若手研究者および大学院生が多数参加し、中国および韓国の研究者と討論・意見交換する機会を得た。このセミナーでは中国 Sun Yat-sen University の Dr. Song より癌肝細胞と microRNA に関する発表、中国 Shanghai Jiaotong University の Dr. Zhu より次世代シークエンサーの活用法の提示、韓国 Sookmyung Women's University の Dr. Park より多発嚢胞腎における DNA メチル化異常に関する発表など、最先端の情報を学ぶことが出来、日本側若手研究者にとって大きな刺激となった。

2009年11月には研究代表者を含む4名の研究者を広州へ派遣し、中国 Sun Yat-sen University の若手研究者・大学院生と共同研究を行った。Sun Yat-sen University の若手研究者および大学院生に対し、DNAメチル化解析手法についてのレクチャーを行った。

#### 7-4 社会貢献

癌は日本人における死亡原因第一位の疾患であり、高齢化社会が進行する中で、的確な診断法、優れた治療法のさらなる開発が求められている。本研究では、microRNA とエピジェネティクスの解析を通して新たな癌診断・治療法につなげることで社会に貢献することを目指している。初年度は、この目的に向けた下地を固めることができた。

#### 7-5 今後の課題・問題点

本年度の共同研究では、日中韓の間の研究者派遣は短期間に留まり、日数を要する共同実験を行うことは出来なかった。ゲノムを扱う研究では、実験に数日～数週間を要することもしばしばある。今後共同研究をさらに加速させるために、大学院生・若手研究者を2～4週間程度、相互に派遣し、共同実験を行う機会を設けるべきと考えられた。また、次年度には外部に向けて発表できる研究成果が出始めると予想されるので、研究概要および成果を公開するためのホームページを次年度の早期に作成する必要があると考えられた。

#### 7-6 本研究交流事業により発表された論文

平成21年度論文総数 2本

うち、相手国参加研究者との共著 0本

うち、本事業が JSPS の出資によることが明記されているもの 0本

(※ 詳細は別紙「論文リスト」に記入して下さい。)

### 8. 平成21年度研究交流実績概要

#### 8-1 共同研究

本研究において札幌医科大学は、次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析拠点を担当する。それに向け、2009年6月に導入された高速シーケンサー SOLiD3 の稼働を開始した。平成21年度には大腸癌細胞を用いた ChIP-seq によるヒストンメチル化の網羅的解析を行った。これにより癌細胞のゲノムでエピジェネティックな制御を受けている領域を特定することが可能となる。また、乳癌細胞、大腸癌細胞、胃癌細胞を DNAメチル化阻害剤で処理し、発現が誘導される microRNA をマイクロアレイで同定した。これによりエピジェネティックな制御を受けている microRNA の候補を同定することができる。これらのデータを統合することで、癌においてエピジェネティックに不活化される microRNA 遺

伝子を同定するために重要な知見が得られた。

2009年11月には研究代表者を含む4名の研究者を広州へ派遣し、中国 Sun Yat-sen University の若手研究者・大学院生と共同研究を行った。Sun Yat-sen University の若手研究者および大学院生に対し、DNA メチル化解析手法についてのレクチャーを行った。また同日、日中韓の研究代表者による合同会議が開かれ、共同研究体制の構築について合意がなされた。

2010年2月には研究代表者（鈴木）および若手研究者1名を共同研究のため韓国 Sookmyung Women's University および韓国 National Cancer Center へ派遣し、韓国側若手研究者および大学院生に癌エピジェネティクスに関するレクチャーを行った。また、MassARRAY を用いたハイスループット DNA メチル化解析の共同実験を行った。

## 8-2 セミナー

A3フォーサイト参加研究者22名（日本15名、韓国5名、中国2名）が出席し、特に日本人若手研究者にとって中韓の研究者と討論・意見交換する機会を作ることができた。発表演題数は10題であり、各演題について十分な発表時間と討論時間を確保したため、活発な討論が行われた。演題は、癌エピジェネティクスを中心に、microRNA、癌幹細胞、免疫、ゲノム解析など幅広い研究内容が発表され、セミナー参加者にとって有益な情報を得ることができた。さらに3カ国の研究代表者が全員参加したことで、次年度の共同研究およびセミナー開催について十分なディスカッションを行うことができた。セミナーの概要は以下の通りである。

中国側研究者

- Dr. Song：乳癌における microRNA についての発表
- Dr. Zhu：次世代シーケンサーを応用した網羅的 DNA メチル化解析

韓国側研究者

- Dr. Park：多発性嚢胞腎における DNA メチル化異常
- Dr. Kim：腫瘍免疫寛容におけるインターロイキンの役割
- Dr. Lee：癌における DNA メチル化のハイスループット解析

日本側研究者

- 鈴木：消化器癌における microRNA のエピジェネティックな異常
- 豊田：次世代シーケンサーを応用した癌エピゲノム解析
- 近藤：肝癌のエピジェネティクス異常
- 渡邊：DNA メチル化の癌診断マーカーとしての応用
- 宮本：乳癌のエピジェネティクス異常

## 8-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

該当なし。

## 9. 平成21年度研究交流実績人数・人日数

### 9-1 相手国との交流実績

派遣先 派遣元		日本	中国	韓国	合計
		<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>
日本 <人/人日>	実施計画		3/9	3/9	6/18
	実績		4/16	2/6	6/22
中国 <人/人日>	実施計画	6/14			6/14
	実績	2/7			2/7
韓国 <人/人日>	実施計画	4/8	(5/15)		4/8(5/15)
	実績	5/15	(8/58)		5/15(8/58)
合計 <人/人日>	実施計画	10/22	3/9(5/15)	3/9	16/40(5/15)
	実績	7/22	4/16(8/58)	2/6	13/44(8/58)

※各国別に、研究者交流・共同研究・セミナーにて交流した人数・人日数を記載してください。(なお、記入の仕方の詳細については「記入上の注意」を参考にしてください。)

※日本側予算によらない交流についても、カッコ書きで記入してください。(合計欄は( )をのぞいた人・日数としてください。)

### 9-2 国内での交流実績

実施計画	実 績
19/42 <人/人日>	37/86 <人/人日>

## 10. 平成21年度研究交流実績状況

### 10-1 共同研究

—研究課題ごとに作成してください。—

整理番号	R-1	研究開始年度	平成 21 年度	研究終了年度	平成 24 年度
研究課題名	(和文) 乳癌幹細胞の病理学的性質を規定する microRNA 機構の解明 (英文) The microRNA mediated mechanisms underlying the pathological behavior of breast cancer initiating cells				
日本側代表者 氏名・所属・ 職	(和文) 鈴木 拓・札幌医科大学・助教 (英文) Hiromu Suzuki・Sapporo Medical University・Assistant professor				
相手国側代表者 氏名・所属・ 職	Erwei Song・Sun Yat-sen University・Professor Jong Hoon Park・Sookmyung Women's University・Professor				
交流人数 (※日本側予算 によらない交流 についても、カ ッコ書きで記入 のこと。)	① 相手国との交流				
	派遣先	日本	中国	韓国	計
	派遣元	<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>
	日本 <人/人日>	実施計画	3/9	3/9	6/18
		実績	4/16	2/6	6/22
	中国 <人/人日>	実施計画	2/6	0/0	2/6
		実績	0/0	0/0	0/0
	韓国 <人/人日>	実施計画	0/0	(5/15)	0/0(5/15)
		実績	0/0	(8/58)	0/0(8/58)
	合計 <人/人日>	実施計画	2/6	3/9(5/15)	8/24(5/15)
		実績	0/0	4/16(8/58)	6/22(8/58)
	② 国内での交流 22人/49人日				
21年度の研 究交流活動及 び成果	日本より中国広州および韓国ソウルへ研究者派遣を行い、共同研究および若手研究者に対するレクチャーを行った。癌においてエピジェネティックに不活化される microRNA 遺伝子を同定した (札幌医大)。また、乳癌幹細胞の幹細胞性維持に必要な microRNA を同定した (Sun Yat-Sen 大学)。				
日本側参加者数					
23 名		14-1 (日本側「参加研究者リスト」を参照)			
中国側参加者数					
10 名		14-2 (中国側「参加研究者リスト」を参照)			
韓国側参加者数					
12 名		14-3 (韓国側「参加研究者リスト」を参照)			

## 10-2 セミナー

—実施したセミナーごとに作成してください。—

整理番号	S-1
セミナー名	(和文) A3フォーサイト札幌癌エピジェネティクスセミナー (英文) Sapporo Cancer Epigenetics seminar of the A3 foresight program
開催時期	平成22年 3月12日 ~ 平成22年 3月13日 (2日間)
開催地(国名、都市名、会場名)	(和文) 日本、札幌市、ロイトン札幌 (英文) Japan, Sapporo, Royton Sapporo
日本側開催責任者 氏名・所属・職	(和文) 鈴木 拓・札幌医科大学医学部内科学第一講座・助教 (英文) Hiromu Suzuki・First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine・Assistant Professor
相手国側開催責任者 氏名・所属・職 (※日本以外で開催の場合)	

### 参加者数

派遣先 派遣元	セミナー開催国 ( 日本 )	
	A.	
日本 〈人/人日〉	A.	15/37
	B.	0
	C.	0
中国 〈人/人日〉	A.	2/7
	B.	0
	C.	0
韓国 〈人/人日〉	A.	5/15
	B.	0
	C.	0
合計 〈人/人日〉	A.	22/59
	B.	0
	C.	0

A. セミナー経費から負担

B. 共同研究・研究者交流から負担

C. 本事業経費から負担しない(「参加研究者リスト」に記載されていない研究者は集計しな

いでください。)

セミナー開催の目的	<p>癌幹細胞における <b>microRNA</b> の機能的意義とエピジェネティクス異常との関連についての最新の研究成果を発表する。臨床及び基礎の幅広い癌研究者たちが討論を行うことで情報交換し、今後の研究推進にむけた新たなアイデアを得ることを目的とする。</p>		
セミナーの成果	<p>A 3 フォーサイト参加研究者 22 名（日本 15 名、韓国 5 名、中国 2 名）が出席した。特に日本人若手研究者（大学院生 6 名および若手助教 3 名）にとっては、中国、韓国の研究者と討論・意見交換する機会を得ることができた。発表演題は、癌エピジェネティクスを中心に、<b>microRNA</b>、癌幹細胞、免疫、ゲノム解析など幅広い研究内容が発表され、セミナー参加者にとって有益な情報を得ることができた。特にエピゲノム解析については研究メンバー達から高い関心が寄せられ、次世代シーケンサーを活用した共同研究案が提案された。また、次回のセミナーを韓国で開催することが決定された。</p>		
セミナーの運営組織	<p>セミナー会長：豊田 実（札幌医科大学） 事務局：鈴木 拓（札幌医科大学）</p>		
開催経費 分担内容 と金額	日本側	内容	金額
		会議費	528,550 円
		国内旅費	1,014,500 円
			合計 1,543,050 円
	中国側	内容	金額
		外国旅費	400,000 円
	韓国側	内容	金額
		外国旅費	750,000 円

10-3 研究者交流（共同研究、セミナー以外の交流）

① 相手国との交流

派遣先		日本	中国	韓国	計
派遣元		<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>	<人/人日>
日本 <人/人日>	実施計画				
	実績				
中国 <人/人日>	実施計画				
	実績				
韓国 <人/人日>	実施計画				
	実績				
合計 <人/人日>	実施計画				
	実績				
② 国内での交流		人/人日			

### 1 1. 平成 2 1 年度経費使用総額

(単位 円)

	経費内訳	金額	備考
研究交流経費	国内旅費	2,544,710	
	外国旅費	1,161,840	
	謝金	0	
	備品・消耗品購入費	2,689,900	
	その他経費	528,550	
	外国旅費・謝金に係る消費税	75,000	
	計	7,000,000	
委託手数料		700,000	
合 計		7,700,000	

### 1 2. 四半期毎の経費使用額及び交流実績

	経費使用額 (円)	交流人数<人/人日>
第 1 四半期	0	0/0
第 2 四半期	0	0/0
第 3 四半期	1,389,510	20/63
第 4 四半期	5,610,490	38/125
計	7,000,000	58/188

### 13. 平成21年度相手国マッチングファンド使用額

相手国名	平成21年度使用額 [単位：現地通貨] (日本円換算額)
中国	500,000 [ R M B ] ( 7,000,000 円相当)
韓国	80,000,000 [ W o n ] ( 7,000,000 円相当)

※ 交流実施期間中に、相手国が本事業のために使用したマッチングファンドの金額について、現地通貨での金額、及び日本円換算額を記入してください。