

先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム) 実績報告書

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名	遺伝子改変マウスを用いた間葉系細胞の腫瘍化メカニズムの解明
研究機関・ 部局・職名	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
氏名	伊藤 公成

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平26年3月31日

2. 収支の状況

(単位:円)

	交付決定額	交付を受けた額	利息等収入額	収入額合計	執行額	未執行額	既返還額
直接経費	97,000,000	97,000,000	0	97,000,000	96,996,772	3,228	0
間接経費	29,100,000	29,100,000	0	29,100,000	29,100,000	0	0
合計	126,100,000	126,100,000	0	126,100,000	126,096,772	3,228	0

3. 執行額内訳

(単位:円)

費目	平成22年度	平成23年度	平成24年度	平成25年度	合計
物品費	390,000	28,728,459	17,054,537	7,833,474	54,006,470
旅費		121,000	107,560	75,180	303,740
謝金・人件費等		906,578	1,486,120	1,587,631	3,980,329
その他		12,406,050	9,223,866	17,076,317	38,706,233
直接経費計	390,000	42,162,087	27,872,083	26,572,602	96,996,772
間接経費計	58,500	6,340,500	4,225,500	18,475,500	29,100,000
合計	448,500	48,502,587	32,097,583	45,048,102	126,096,772

4. 主な購入物品(1品又は1組若しくは1式の価格が50万円以上のもの)

物品名	仕様・型・性能等	数量	単価 (単位:円)	金額 (単位:円)	納入 年月日	設置研究機関名
ゲル撮影装置	BioDoc-It Plus System	1	991,200	991,200	2011/4/25	長崎大学
遠心分離機	エッペンドルフ・5430/95217	1	682,500	682,500	2011/5/10	長崎大学
リサーチ用高性能マイクローム	ライカ・CM3050S	1	7,103,250	7,103,250	2011/9/29	長崎大学
生物学用正立顕微鏡	カールツァイス・Axio Imager M2	1	9,343,950	9,343,950	2012/1/18	長崎大学
フローサイトメーターシステム	Guava Easy Cyte 5HT	1	6,699,000	6,699,000	2012/6/19	長崎大学
微量核酸定量機器	Nano Vue Plus with Printer	1	1,127,700	1,127,700	2012/6/19	長崎大学
倒立顕微鏡	Axio Vert A1, Axio CamMRc	1	3,627,750	3,627,750	2013/2/18	長崎大学
バイオクリーンベンチ	アステック・AH-130	1	876,000	876,000	2013/2/20	長崎大学
微量ホモジナイザー	フナコン・FastPrep24	1	806,400	806,400	2013/7/2	長崎大学
マルチガス・インキュベーター	アステック・APM-30D	1	659,600	659,600	2014/1/17	長崎大学

様式20

5. 研究成果の概要

代表的なヒト「希少がん」である骨肉腫は、その発症メカニズムの解明が著しく遅れている悪性腫瘍である。本研究では、広くヒトがんにおいて「がん抑制遺伝子」として機能することが知られている転写因子RUNX3が、骨肉腫発症において「がん遺伝子」として機能することを見出した。ヒト臨床献体および作出した種々の遺伝子改変マウスモデルを用いた解析から、「がん遺伝子」RUNX3は、ドミナントに骨肉腫の発症と進展に関与することが明らかとなった。この遺伝子をターゲットにした創薬等の治療戦略が、骨肉腫の克服にきわめて有効であると考えられる。

課題番号

LS097

**先端研究助成基金助成金(最先端・次世代研究開発支援プログラム)
研究成果報告書**

本様式の内容は一般に公表されます

研究課題名 (下段英語表記)	遺伝子改変マウスを用いた間葉系細胞の腫瘍化メカニズムの解明
	Mesenchymal tumorigenesis using mouse models
研究機関・部局・ 職名 (下段英語表記)	長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
	Nagasaki University, Graduate School of Biomedical Sciences, Professor
氏名 (下段英語表記)	伊藤 公成
	Kosei ITO

研究成果の概要

(和文):

希少がんのひとつ、ヒト骨肉腫における新規がん遺伝子を見出した。この遺伝子は、ほとんどすべてのヒト臨床献体において発現が亢進し、ヒト骨肉腫細胞株のヌードマウス皮下における造腫瘍能は、この遺伝子の発現亢進に依存した。間葉系細胞特異的 p53 コンディショナル・ノックアウトマウスは、ヒト骨肉腫の動物モデルであるが、そのモデルマウスにおける骨肉腫の発症が、この新規がん遺伝子の欠損により顕著に抑制された。本研究により、ヒト骨肉腫治療戦略における新たなターゲット遺伝子が明らかになった。

(英文):

A novel oncogene involved in human osteosarcoma development was found. The oncogene was upregulated in most clinical cases of human osteosarcoma, and tumorigenicities of human osteosarcoma cell lines in nude mice depended on upregulation of the gene. Disruption of the oncogene abolished osteosarcoma formation in the mesenchymal specific p53-conditional knockout mouse line, which is well-established as an animal model of human osteosarcoma. This novel oncogene may contribute to better understanding of therapeutics for osteosarcoma patients.

1. 執行金額 126,096,772 円
(うち、直接経費 96,996,772円、 間接経費 29,100,000 円)

2. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成26年3月31日

3. 研究目的

国内外を問わず、上皮細胞由来のいわゆるメジャーな「がん」に比べて、間葉系細胞由来の腫瘍は著しく解析が遅れている。特に希少がんのひとつ、ヒト骨肉腫に関しては、これまで新規原因遺伝子が挙げられることがなく、解析に必須な動物病態モデルもほとんど樹立・報告されてこなかった。骨肉腫は小児をはじめ若年層に多く、生存できても四肢の切除手術など、若くして失うものの影響は大きい。そして残念なことに、いまだ手術以外に有効な治療法が確立されているとは言えない状況である。この現状の克服は現代医科学の大きな責務のひとつである。

一般に骨肉腫発症の主要因と考えられているのが、p53 遺伝子の異常である。p53 はほとんどすべてのヒトがんに関与する普遍的ながん抑制遺伝子として知られているが、骨肉腫においてはその頻度がきわめて高く、p53 遺伝子欠損マウスは骨肉腫を高率に発症する。また、唯一ヒト骨肉腫の動物モデルとして利用されているのが p53 の間葉系細胞特異的なノックアウトマウスで、その腫瘍の病理学的性状はヒト骨肉腫に酷似している。そこで、ヒト骨肉腫発症の分子機序の理解には、この p53 遺伝子との機能相関を検討することが必須であり、そこから手がかりが得られるものと考えた。

本研究は、独自に遺伝子改変マウスモデルを作製しそれを解析することを柱に据えて、大きく分けて以下の2点について検討を行った。

- ① p53 遺伝子の細胞周期関連因子との関連について。
- ② がん抑制遺伝子 p53 に拮抗する新規がん遺伝子の作用機序について。

本研究では、より正確でより生理的条件に近い解析を行う目的で、マウスモデルの作出とそれを使用した解析を精力的に遂行することにした。特に上述の②の解析、すなわち骨肉腫発症にかかわる新規がん遺伝子の機能解析においては、オリジナルなマウスラインをいくつも作出し、それらが今後、がん研究を含め多分野で活用されることも意図した。

4. 研究計画・方法

本研究は、解析が遅れている「希少がん」のひとつ、骨肉腫を解析対象とした。まずは p53 遺伝子のもつがん抑制機能に着目し、それとの機能相関から新規原因因子を同定した。そして p53 遺伝子と新規因子を中心とした分子機序を、遺伝子改変マウスモデルを作出し解析することによって明らかにしようとした。そこで、大きくわけて以下の2つの解析を計画し、実行した。

- ① 間葉系細胞の腫瘍化における細胞周期調節因子の役割はいまだ不明な点が多い。そこで Cdk-Cyclin の遺伝子改変マウスを解析し、未分化軟骨細胞の腫瘍化における細胞周期調

節因子の役割をマウス生体レベルで詳細に検討することにした。細胞周期調節機構の破たんが腫瘍化のひとつの引き金になると考えられるが、そこに、がん抑制遺伝子 p53 の機能がどのように関連するのか、Cdk-Cyclin のトランスジェニックマウスと p53 遺伝子欠損マウスを用いて、肉腫発症における p53 のがん抑制機能を浮き彫りにした。

- ② p53 の間葉系細胞特異的なノックアウトマウスに発症した骨肉腫の解析と、さらに 12 種類のヒト骨肉腫細胞株と約 40 検体のヒト骨肉腫臨床検体を用いた検証から、骨肉腫発症に關与する新規原因因子を同定した。さらにその遺伝子改変マウス(主にその間葉系細胞特異的ノックアウトマウスおよび間葉系細胞特異的トランスジェニックマウス)を用いて、骨肉腫発症の分子メカニズムの解明をめざした。

5. 研究成果・波及効果

- ① 間葉系細胞の腫瘍化における細胞周期制御因子の役割を検討する目的で、軟骨組織で Cdk6 と cyclin D1 を同時に強発現したダブルトランスジェニック(double TG)マウスを作製した。Cdk6 と cyclin D の double TG は、コントロールと比較して明らかに体が小さく、四肢が顕著に短縮し、軟骨細胞にアポトーシスが強く誘導された。その表現型は、p53 ノックアウトマウスと交配させると消失した。この現象の詳細な分子メカニズムを解析した結果、Cdk6/cyclin D1 の機能亢進により、異常な細胞周期関連因子の活性化が引き起こされるが、p53 のチェックポイントコントロール機能によりアポトーシスが誘導されるため、腫瘍化には至らないことが判明した。この解析結果により、あらためて間葉系細胞の腫瘍化における p53 のがん抑制機能の大きさを認識させられた。この研究成果をまとめた論文は、24 年度に受理され 25 年度に公表された。
- ② p53 の間葉系細胞特異的なノックアウトマウスに発症した骨肉腫を解析した結果、正常間葉系幹細胞に比して顕著に骨肉腫細胞において発現が亢進している転写因子を同定した。さらに、12 種類のヒト骨肉腫細胞株および約 40 検体のヒト骨肉腫臨床検体を用いた検証から、その新規因子ががん遺伝子として機能していることが強く示唆された。そこで、その因子の間葉系細胞特異的ノックアウトマウスを作成し、p53 の間葉系細胞特異的なノックアウトマウスと交配した。p53 の間葉系細胞特異的なノックアウトマウス(*p53^{f/f}-Prx1Cre* および *p53^{f/f}-OsxCre*)は、骨肉腫を高頻度で発症し、その性状がヒト腫瘍に酷似していることから、ヒト骨肉腫のモデルマウスとして利用されている。興味深いことにそのがん遺伝子をノックアウトすると、*p53^{f/f}-Prx1Cre* マウスの造腫瘍能が完全に抑えられた。これは新規がん遺伝子が p53 欠損による骨肉腫発症過程における責任因子であることを意味している。ならば、そのがん遺伝子を強発現するマウスは、骨肉腫を発症するのだろうか。この問いに答えるために、組織特異的に強発現できるコンディショナル・トランスジェニックマウスを、強力な外来 Chiken β -actin プロモーターおよび内在 Rosa26 プロモーターを使用して作製した。これらに *Prx1-Cre* および *Osx-Cre* マウスを用いて、間葉系幹細胞特異的に新規がん遺伝子を強発現させた。現在それらのマウスの解析を遂行している。

以上、これまでの解析結果から、ヒト骨肉腫発症における p53 のもつがん抑制機能の大きさと、それに拮抗する新規がん遺伝子の機能相関がいかに重要であるかが明確になった。本研究で作出された新規がん遺伝子にかかわる遺伝子改変マウスモデルは、すべてオリジナルなもので世界で唯一のものである。これまでに得られた成果はすべて骨肉腫という「希少がん」における知見であるが、おもしろいことに、その他のヒトがんにおいても、本研究で見出された分子機構が発がんの根本を制御する分子基盤である可能性が高い。そのすべての検討において、これらのマウスモデルが使用でき、信憑性の高い知見を与えてくれるであろう。そして何よりマウスモデルの使用することで、抗がん剤の開発や薬効試験に直結して、臨床応用への発展が期待できる。

本研究で作製されたマウスモデルは腫瘍研究にとどまらず、再生医学等における試験応用も可能である。日本の腫瘍学・再生医学の進展の一助となることを期待している。

6. 研究発表等

雑誌論文	(掲載済み一査読有り) 計 15 件
計 19 件	<ol style="list-style-type: none"> 1. Chuang LSH, Kosei Ito, Ito Y. RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. <i>International Journal of Cancer</i> 132, 1260-1271 (2013) 2. Tsang YHN, Wu XW, Lim JS, Ong CW, Salto-Tellez M, Kosei Ito, Ito Y, Chen LF. Prolyl isomerase Pin1 down-regulates tumor suppressor RUNX3 in breast cancer. <i>Oncogene</i> 32, 1488-1496 (2013) 3. Omar MF, Kosei Ito, Nga ME, Soo R, Peh BK, Ismail TM, Thakkar B, Soong R, Ito Y, Salto-Tellez M. RUNX3 Downregulation in Human Lung Adenocarcinoma is Independent of p53, EGFR or KRAS Status. <i>Pathology & Oncology Research</i> 18, 783-792 (2012) 4. Voon DC, Wang H, Koo JK, Nguyen TA, Hor YT, Chu YS, Kosei Ito, Fukamachi H, Chan SL, Thiery JP, Ito Y. Runx3 protects gastric epithelial cells against epithelial-mesenchymal transition-induced cellular plasticity and tumorigenicity. <i>Stem Cells</i> 30, 2088-2099 (2012) 5. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Kosei Ito, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann A, Yoshiura K, Ogi T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase Ilo processing in transcription-coupled nucleotide excision repair. <i>Nature Genetics</i> 44, 586-592 (2012) 6. Ohyama K, Shiokawa A, Kosei Ito, Masuyama R, Ichibangase T, Kishikawa N, Imai K, Kuroda N. Toxicoproteomic analysis of a mouse model of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric ulcers. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 420, 210-215 (2012) 7. Nakazawa Y, Sasaki K, Mitsutake N, Matsuse M, Shimada M, Nardo T, Takahashi Y, Ohyama K, Kosei Ito, Mishima H, Nomura M, Kinoshita A, Ono S, Takenaka K, Masuyama R, Kudo T, Slor H, Utani A, Tateishi S, Yamashita S, Stefanini M, Lehmann A, Yoshiura K, Ogi T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase Ilo processing in transcription-coupled nucleotide excision repair. <i>Nature Genetics</i> 44,586-592 (2012)

<p>8. Satoshi Fujii, Katsumi Fukamachi, Hiroyuki Tsuda, <u>Kosei Ito</u>, Yoshiaki Ito, Atsushi Ochiai. RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer. <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 417, 1074-1079 (2012)</p> <p>9. Huang B, Qu Z, Ong CW, Tsang YHN, Xiao G, Shapiro D, Salto-Tellez M, <u>Kosei Ito</u>*, Ito Y, Chen LF*. RUNX3 acts as a tumor suppressor in breast cancer by targeting estrogen receptor α. <i>Oncogene</i> 31, 527-534 (2012) *corresponding author</p> <p>10. Mikasa M, Rokutanda S, Komori H, <u>Kosei Ito</u>, Tsang YS, Date Y, Yoshida CA, Komori T. Regulation of Tcf7 by Runx2 in chondrocyte maturation and proliferation. <i>Journal of Bone and Mineral Metabolism</i> 29, 291-299 (2011)</p> <p>11. <u>Kosei Ito</u>, Chuang LSH, Ito T, Chang TL, Fukamachi H, Salto-Tellez M, Ito Y. Loss of Runx3 is a key event in inducing precancerous state of the stomach. <i>Gastroenterology</i> 140, 1536-1546 (2011)</p> <p>12. <u>Kosei Ito</u>. RUNX3 in oncogenic and anti-oncogenic signaling in gastrointestinal cancers. <i>Journal of Cellular Biochemistry</i> 112, 1243-1249 (2011)</p> <p>13. Fujii S, Tokita K, Wada N, <u>Kosei Ito</u>, Yamauchi C, Ito Y, Ochiai A. MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes. <i>Oncogene</i> 30, 4118-4128 (2011)</p> <p>14. Fukamachi H, Shimada S, <u>Kosei Ito</u>, Ito Y, Yuasa Y. CD133 is a marker of gland-forming cells in gastric tumors and Sox17 is involved in its regulation. <i>Cancer Science</i> 102, 1313-1321 (2011)</p> <p>15. Sugai M, Aoki K, Osato M, Nambu Y, <u>Kosei Ito</u>, Taketo MM, Shimizu A. Runx3 is required for full activation of regulatory T cells to prevent colitis-associated tumor formation. <i>Journal of immunology</i> 186, 6515-6520 (2011)</p> <p>(掲載済みー査読無し) 計 2 件</p> <p>1. 伊藤公成 「新たな胃発がんモデル: Runx3の機能解析」 分子消化器病 9(4): 350-355, 2012</p> <p>2. 伊藤公成 「胃がん発がんにおけるがん抑制遺伝子RUNX3の働き」 生化学 84(4): 278-282, 2012</p> <p>(未掲載) 計 2 件</p> <p>1. Ju X, Ishikawa T, Naka K, <u>Kosei Ito</u>, Ito Y, Oshima M. Context-dependent activation of Wnt signaling by tumor suppressor RUNX3 in gastric cancer cells. <i>Cancer Science</i> (in press)</p> <p>2. <u>Kosei Ito</u>, Maruyama Z, Sakai A, Izumi S, Moriishi T, Yoshida CA, Miyazaki T, Komori H, Takada K, Kawaguchi H, Komori T. Overexpression of <i>Cdk6</i> and <i>Ccnd1</i> in chondrocytes inhibited chondrocyte maturation and caused p53-dependent apoptosis without enhancing proliferation. <i>Oncogene</i> 33, 1862-1871 (2014).</p>
--

<p>会議発表 計7件</p>	<p>専門家向け 計6件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 伊藤公成: 「転写因子 RUNX3 の「がん遺伝子」「がん抑制遺伝子」としての機能」、第13回 原研研究集会, 長崎, 平成26年1月22日 2. 伊藤公成: 「転写因子 RUNX3 を通して見た「がん生物学」」, 平成24年度愛知県がんセンター研究所・特別招聘講演, 愛知, 平成25年3月1日 3. 伊藤公成 (口演)「骨肉腫における RUNX の機能」、第14回癌と骨病変研究会、東京、平成23年11月18日、癌と骨病変研究会 4. 梶川修平, 河野通明, 小守壽文, 伊藤公成(口演)「骨肉腫細胞における RUNX3 の「がん遺伝子」としての機能」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、平成23年10月3-5日、日本癌学会 5. 伊藤嘉明, 伊藤公成, 深町博史(シンポジウム)「Runx3 protects gastric epithelial cells against EMT and Lgr5-expressing tumorigenic subpopulation」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、平成23年10月3-5日、日本癌学会 6. 伊藤公成, 伊藤嘉明(シンポジウム)「胃がん発がん過程における RUNX3 の役割」、第70回日本癌学会学術総会、名古屋、平成23年10月3-5日、日本癌学会 <p>一般向け 計1件 伊藤公成: 「転写因子 RUNX3 を通して見た「がん生物学」」, 平成24年度長崎大学坂本技術区技術職員研修会, 長崎, 平成24年8月28日~29日</p>
<p>図書 計0件</p>	
<p>産業財産権 出願・取得 状況 計0件</p>	<p>(取得済み) 計0件 (出願中) 計0件</p>
<p>Webページ (URL)</p>	<p>長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 分子硬組織生物学ホームページ http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/dokuji/mbb/index.html</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 長崎県壱岐市立郷ノ浦中学校にて、サイエンスカーラボ・出前授業を催した。2年生約80名を対象に、「がんの生物学」について2時間の授業を行った。(平成25年12月13日) 2. 長崎県立佐世保北高等学校にて、クラスラボ・出張講座を催した。医歯薬学系進学希望の2年生約30名を対象に、「がんの生物学」について2時間の授業を行った。(平成24年7月26日) 3. 長崎大学主催「未来の科学者発掘プロジェクト“サイエンス塾”」(平成23年8月18日)長崎大学にて長崎県内の数学コンテストにおいて成績が優秀であった小学生約50名が参加。「新しいがん治療に挑戦」というテーマで授業
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計1件</p>	<p>西日本新聞(平成23年5月22日) 「現在のがん生物学の空白地帯-骨肉腫の発症メカニズムに挑む」と題した記事(1頁) 「最先端・次世代研究開発支援プログラム」採択課題の内容が紹介される。</p>
<p>その他</p>	

7. その他特記事項