

**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	組織幹細胞の次世代イメージングを通じた治療標的膜蛋白質の同定と新しいがん治療法の開発
研究機関・部局・職名	関西医科大学・医学部・教授
氏名	上野博夫

1. 研究実施期間 平成23年2月10日～平成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	132,000,000	132,000,000	0	132,000,000	132,000,000	0	0
間接経費	39,600,000	39,600,000	0	39,600,000	39,600,000	0	0
合計	171,600,000	171,600,000	0	171,600,000	171,600,000	0	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	420,683	34,648,647	25,447,352	14,429,891	74,946,573
旅費	0	0	0	0	0
謝金・人件費等	516,425	9,285,541	7,935,240	15,797,631	33,534,837
その他	63,362	4,922,210	4,186,678	14,346,340	23,518,590
直接経費計	1,000,470	48,856,398	37,569,270	44,573,862	132,000,000
間接経費計	2,986,441	8,168,569	8,817,017	19,627,973	39,600,000
合計	3,986,911	57,024,967	46,386,287	64,201,835	171,600,000

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
マルチガスインキュベーター	アステック製	1	1,544,025	1,544,025	2011/5/10	関西医科大学
サーマルサイクラー	アステック製	1	618,450	618,450	2011/5/10	関西医科大学
UVサンプル撮影装置	日本ジェネティクス社製	1	997,500	997,500	2011/5/16	関西医科大学
パイオハザードセフティーキャビネット	ESCO製	1	1,131,900	1,131,900	2011/5/16	関西医科大学
冷結切片作製装置クリオスター	サーモフィッシャー社製	1	6,876,450	6,876,450	2011/5/18	関西医科大学
滑走式マイクローム	ライカ製	1	1,086,750	1,086,750	2011/5/26	関西医科大学
共焦点レーザー顕微鏡	ニコン製	1	12,600,000	12,600,000	2012/3/14	関西医科大学
超低温フリーザー	パナソニック製 KM-DU73Y1J	1	1,554,000	1,554,000	2012/11/22	関西医科大学
密閉式自動固定包埋装置	サクラ製 ティシュー・テック VIP6	1	4,982,145	4,982,145	2012/11/7	関西医科大学
パラフィン包埋ブロック作製装置	サクラ製 ティシュー・テック TECブ ラス TEC-P-S-J0	1	1,585,500	1,585,500	2012/11/7	関西医科大学
マイクロマニピレーションシステムー式	オリンパス製 ON3-99D-2他	1	8,998,500	8,998,500	2013/3/28	関西医科大学
ユニバーサル遠心機	久保田製 5911	1	676,200	676,200	2014/1/23	関西医科大学
リニアスライサー	堂阪イーエム製 PRO10	1	2,205,000	676,200	2014/2/21	関西医科大学

5. 研究成果の概要

- ① これまで未同定であった成体幹細胞を2種類同定し(舌上皮幹細胞、食道上皮幹細胞)、その他の臓器由来の成体幹細胞(副腎皮質幹細胞など)についても有望な結果を得ている。
- ② ①で同定した成体幹細胞の3Dマトリゲル培養法を開発して2件の特許申請をしている。
- ③ 小腸および大腸の3種類の発がんモデルマウス(それぞれ腺腫モデル、2nd hitモデル、自然発症がんモデル)についてがん幹細胞の存在を確認した(投稿準備中)
- ④ ③の3種類のモデルマウスに対する治療標的分子の候補を選定した。特にLgr5に対する可溶性阻害蛋白質を、アデノウイルスを用いてin vivoにて大量発現させると腫瘍に対するアポトーシス誘導効果が確認された。この結果はこれまでと全く異なった新たな大腸がん治療法の開発の可能性を示しており、極めて重要な成果であると考えている。この結果は投稿準備中であり、また特許申請予定である。
- ⑤ ①についても4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO)を用いた発がん系にてがん幹細胞の存在について解析中である。
- ⑥ 舌上皮幹細胞、食道上皮幹細胞を同定したのと同じ方法論にて他臓器の成体幹細胞の同定を進めている。その内の一つ精巢生殖幹細胞のマーカーを同定し論文投稿後改訂中である。このマーカーはこれまで同定されている精巢生殖幹細胞のマーカーと比べても非常に未分化な段階の生殖幹細胞にて強く発現しており、また精巢周期特異的な発現が認められるなど特徴的な発現パターンを示した。

課題番号	LS119
------	-------

**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)	組織幹細胞の次世代イメージングを通じた治療標的膜蛋白質の同定と新しいがん治療法の開発
	Identification of target molecules for cancer therapy through development of a new method for stem cell imaging
研究機関・部局・職名 (下段英語表記)	関西医科大学 ・ 医学部 ・ 教授
	Professor, Department of Stem Cell Pathology, Kansai Medical University
氏名 (下段英語表記)	上野博夫
	Hiroo Ueno

研究成果の概要

(和文): 多色細胞系譜追跡法を用いて幹細胞の性質に基づいた成体幹細胞のスクリーニングを行い、これまで未同定であった舌上皮幹細胞、食道上皮幹細胞などを同定した。

また見つかった成体幹細胞の3次元マトリゲル培養法を確立した。舌上皮、食道上皮ともに球状のオルガノイドを形成、最外層に幹細胞が存在し中心に向かってケラチン化上皮層を形成しているという新しい性質を有したオルガノイド培養法を確立した。

さらに化学発がんの系を用いて舌、および食道上皮に悪性腫瘍を発生させ、これらの組織においてがん幹細胞活性を有した細胞が存在することを証明した。またいくつかの候補分子に対して可溶化阻害膜蛋白質を設計し、アデノウィルスを用いて in vivo にて高発現させ腸上皮腫瘍に対する抗腫瘍効果を証明している。現在舌上皮、食道上皮組織由来悪性腫瘍に対する効果を解析中である。

(英文): By using multicolor lineage tracing method, we identified lingual stem cells and esophageal stem cells. We also have identified candidate adult stem cells from several tissues, which are under investigation.

We next developed three dimensional organoid culture methods for lingual and esophageal stem cells. Both organoids are spheroid, and have keratinized, epithelial layers inside. Stem cells exist at the outermost layer of the organoid, and stem cell-derived clones grow inward.

By using chemical-induced carcinogen, we have succeeded in generating tumors in ephophageal and lingual epithelial tissues. We showed by multicolor lineage tracing method that cancer stem cells exist in the lingual and esophageal tumors. For several candidate surface stem cells markers, we have found one promising target molecule for cancer therapy. The soluble Fc protein of the molecule can induce apoptosis of some of the intestinal tumors, for which we are preparing patent application. Effects of other candidate proteins for esophageal and lingual tumors are under investigation.

1. 執行金額 171,600,000 円
 (うち、直接経費 132,000,000 円、 間接経費 39,600,000 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

本研究提案では研究代表者が開発して来た誘導型マルチカラーモザイクマウス(レインボーマウス)による多色細胞系譜追跡を用い、幹細胞共通マーカーを足がかりに幹細胞のそのものの性質から成体幹細胞の同定を行う。同定した幹細胞の遺伝子発現解析および多色細胞系譜追跡を通して同定した正常成体幹細胞を解析、またそのマーカーをもとにがん幹細胞の存在の有無を解析する。正常およびがん幹細胞の遺伝子発現解析にて治療標的遺伝子候補を選定し、それを元に設計した可溶性阻害蛋白質の候補分子を用いてその抗腫瘍効果について検討する。

候補となる幹細胞共通マーカーとしては Bmi1 や Tert を用いた。

これらを用いてスクリーニングして成体幹細胞を含む細胞集団をしぼることができたら、遺伝子発現解析を使ってさらに候補となる幹細胞マーカーを同定する。遺伝子発現解析の手段として、免疫染色、qPCR、Westertn 解析の他、少数細胞マイクロアレイ、単細胞 RNA シーケンスなどの手法を用いる。最終的にはそれらの遺伝子を元に改変マウスを作製しさらに多色細胞系譜追跡法を用いてそれらの幹細胞特異的発現を確認する。

最後のステップとしてその標的分子候補に対する可溶性阻害蛋白質を作製、成体幹細胞・がん幹細胞の機能を阻害、あるいは幹細胞 niche から除去する方法を探索する。それらの正常マウスおよびその組織のがんモデルマウス(場合によってはヒト癌細胞を免疫不全マウスに移植したモデルマウス)に対する効果を調べてゆく。これらの一連のステップを複数の臓器について行い、有用性のある可溶性阻害蛋白質を絞り、新たな分子標的療法の開発を目指していく。

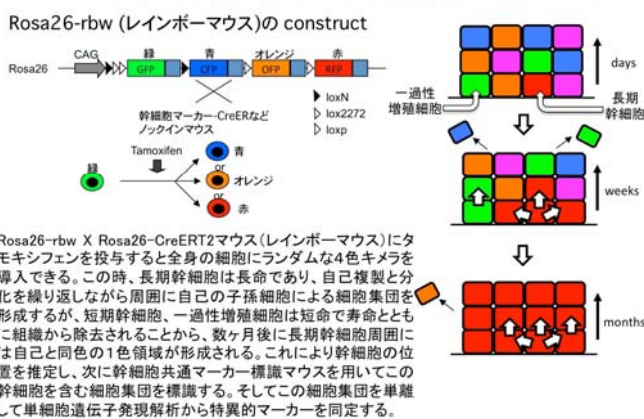
4. 研究計画・方法

まず、私たちのマルチカラー細胞系譜追跡法と幹細胞共通マーカーを用い、成体幹細胞そのものの性質を用いた幹細胞スクリーニングを進めて行く(図1)。既に解析が進み研究代表者による予備的データのある腸幹細胞をポジティブコントロールとして上記の解析を並行して進め、幹細胞細胞系譜追跡法が機能しているかを確認する。一方で未同定の幹細胞の同定と解析へと進めて行き、もし未同定の成体幹細胞が初期の段階で同定されれば、それらの解析を上記に優先して行う。

さらにそれら臓器にがん遺伝子変異マウス、発がん物質などのがんモデルマウスにて悪性腫瘍を発生させ、正常幹細胞の遺伝子発現解析を通じて選定したがん幹細胞の発現遺伝子を足がかりにがん幹

図1

マルチカラー細胞系譜追跡法による成体幹細胞スクリーニング



細胞の同定を進める。がん幹細胞の存在の証明には私たちのマルチカラー細胞系譜追跡法を用いる。

最終段階では成体幹細胞の発現遺伝子を参考に当該組織由来の悪性腫瘍内に存在するがん幹細胞発現膜蛋白質の中から治療標的分子候補を選定し、それらをもとに設計した可溶化阻害蛋白質による悪性腫瘍の治療効果について検討する。

(1) 成体幹細胞標識マウスによる成体幹細胞のスクリーニング

- ① 成体幹細胞は臓器によってその turnover の速度に差異はあるが、長期に(基本的にはその個体の寿命と等しい期間)かつ単一細胞レベルにて自己複製能と分化能を有した細胞である。そのため、この細胞を成体のある時期に genetic に蛍光遺伝子標識すれば(細胞系譜追跡法)、その子孫細胞集団は終生その個体に存在し続ける。しかし幹細胞を標識するためにはあらかじめその特異的マーカーが分かっていると不可能であるため未同定の幹細胞を標識する事はできない。そこで、まず、全ての細胞に CreERT2 を発現するマウスとレインボーマウスをかけ合わせて成体のある時期に全身の細胞をランダムカラーにて標識して、その後長期間(数ヶ月から1年)観察する。すると分化細胞や一過性増殖細胞由来の細胞は寿命とともに組織から駆逐され、長期幹細胞由来の子孫細胞にて置換されていく。それにより幹細胞周囲には幹細胞由来の単色領域が出現する。この単色領域の経時的推移を観察することでこの幹細胞の存在部位が推定される(図1)。
- ② 次に成体幹細胞に広く発現している幹細胞汎マーカーを用いて幹細胞を含む集団を絞りこんでいく。これらの遺伝子は成体幹細胞の機能そのものに重要であるものが多く含まれている。本研究にて用いる幹細胞共通マーカーとして第一に Bmi1 陽性細胞に注目する。Bmi1 は臓器によってその特異性に差は認められるものの、多くの臓器の成体幹細胞に発現している。研究代表者の前所属グループでは Bmi1-GFP ノックインマウスを作製し報告している。
telomerase 陽性細胞もまた成体幹細胞の有力な候補である。幹細胞は場合によってはその個体と同一の寿命を有し生涯自己複製を続けるために一般的に telomerase 活性を有している。Telomerase のプロモータ支配下に蛍光マーカー遺伝子をノックインすることで、telomerase 陽性細胞を簡便に検出できる。
- ③ また成体幹細胞のスクリーニングのもう1つの戦略として、Label retaining cells を用いる。これまでの研究にて特に休止期にある長期幹細胞の特徴として DNA 標識を長期に保持するという性質が報告されている。Label retaining cells を検出する代表的な方法として BrdU 標識、EdU 標識、誘導発現 histon-GFP 標識などの戦略が用いられている。BrdU、EdU は DNA 合成期に取り込まれ、その後、長期に細胞分裂をしない事により標識が細胞に残る。後者はある時期に薬剤誘導性に細胞を標識して、その後の細胞分裂によって希釈されるが、やはり細胞分裂のない休止期にある細胞に標識が残る。
造血組織、毛包など多くの組織で真の長期幹細胞は細胞周期停止しており(G0 期)、主にそれより分化した短期幹細胞がさかんに分裂して組織細胞を供給しているという2重構造が報告されている。
- ④ 上記につき、解析の容易で既に予備的結果のある腸幹細胞のシステムをモデル系として解析し、また、すでに解析が進んでいるいくつかの臓器(肝臓、膵臓、乳腺、副腎皮質)の成体幹細胞についても解析を進めて行く。上記スクリーニングの結果新規の成体幹細胞が同定されれば、それらを中心として解析を進めて行く。

(2) 同定された成体幹細胞の in vitro 3次元培養

(1)にて同定された成体幹細胞の細胞生物学的性質を詳細に検討する目的にて、成体幹細胞の in vitro 培養を試みる。小腸上皮幹細胞の培養系が確立されて以来、同様の方法論にて複数の成体幹細胞のオルガノイド培養法の報告があり、これらの方法を参考にして培養条件(添加する増殖因子の組み合わせや量など)を検討する。in vitro 3次元培養では幹細胞を付着ディッシュの底面に貼付けて飼うのではなく、マトリゲル内にて立体的に培養をおこなう事で、幹細胞だけでなく、分化細胞も含み in vivo における組織構築を一部反映した細胞塊ごと培養するために幹細胞のより正確な解析が可能となる。

また、in vitro 3次元培養が可能となれば、幹細胞を in vitro にて多色標識し、その動態について time lapse イメージングにより詳細な解析をすることが可能となる。

(3) 同定された成体幹細胞の遺伝子発現解析と治療標的候補分子の選定

- ① 正常幹細胞の遺伝子プロファイリング。同定された幹細胞のフローサイトメトリーによる単離と遺伝子のプロファイリングを行う。同時に同一組織内の分化細胞との遺伝子プロファイリングとの比較から特異的発現遺伝子を同定する。
- ② がん幹細胞の遺伝子プロファイリング。正常幹細胞の発現遺伝子を参考に癌モデルマウスにて発症させた悪性腫瘍の多色細胞系譜解析にてがん幹細胞の存在を検証し、長期に自己複製し分化がん細胞を供給する細胞の存在が確認できれば、それらの遺伝子発現解析(免疫染色、qPCR、Westertn 解析の他、少数細胞マイクロアレイ、単細胞 RNA シーケンスなどの手

法)にてがん幹細胞マーカー候補分子を選定する。特に治療票的分子として、膜蛋白質を中心に選定する。

(4) 可溶化阻害蛋白質の設計と in vivo 大量発現、その効果の検定

- ① (3)で選定された幹細胞ないしがん幹細胞特異的細胞膜蛋白質に対して、膜貫通領域を欠損させた可溶化型阻害分子が幹細胞の機能に及ぼす効果について検定する(図2)。幹細胞特異的膜蛋白質に対する膜貫通領域を欠損させた可溶化型阻害分子をアデノウィルスベクターなどに組み込んでマウスに投与してその蛋白質を発現する幹細胞に対する効果を調べる。最初に腸幹細胞など既に同定されている膜蛋白質に対する可溶化阻害蛋白質を設計して効果を試す。
- ② がん幹細胞に対する可溶化阻害蛋白質の効果を検討する。

5. 研究成果・波及効果

研究成果

(1) 新規成体幹細胞の同定と解析

本研究プロジェクトの最初の鍵はこれまで当該組織由来の悪性腫瘍に対する分子標的治療等の先端治療法の開発が遅れている臓器をメインの標的として、それら組織に存在が想定される成体幹細胞の同定をすすめる事にある。私たちの多色細胞系譜追跡法にてこれまで未報告の、あるいは性格付けの不十分な以下の様な成体幹細胞が見つかった。

① 舌上皮幹細胞

従来舌がんの本邦における頻度は多くなかったが、近年その頻度が増加しており、また未だ新世代治療法の開発も進んでおらず、基本的には早期発見による腫瘍切除、リンパ節廓清、進行すれば抗がん剤治療と放射線治療がその治療の中心となっているのが現状である。しかし、現時点では他の主要な悪性腫瘍と比較してもその予後は必ずしも良くないという状況がある。よって新世代治療法開発の標的として重要性の高い疾患の1つである。しかしこれまで研究が進んでいなかった理由として舌上皮組織に存在が想定される成体幹細胞はこれまで同定されていなかった事があげられるが、今回私たちの研究によって初めてその存在が明らかとなった(図3)。

マウスの舌幹細胞は Bmi1 陽性サイトケラチン 14 陽性サイトケラチン 5 陽性であり、糸状乳頭のあいだのくぼみの最低層に存在する Ki67 陽性細胞層(基底細胞層)から 2 段目ないし 3 段目の位置にもっとも高頻度に存在した。そのほとんどは休止期ないしゆっくりとした増殖を示し、多色細胞系譜追跡法での観察により、1 年以上の長期にわたり生存するのは 1 つのくぼみにつき 1 個の Bmi1 陽性幹細胞であった。それらは角化上皮細胞を供給するが味蕾細胞は供給しない単能性の幹細胞であった。また、放射線による傷害においてこれら幹細胞は抵抗性を認め、すみやかに増殖して上皮組織を再生した。さらに、その再生時期に Bmi1 をノックアウトすることにより上皮組織の再生は抑制された。以上の結果から、Bmi1 陽性幹細胞は舌の上皮組織の維持および再生にきわめて重要であると考えられた(Tanaka T, Ueno Hら 2014 Nat Cell Biol) (図3)。

② 食道上皮幹細胞

食道がんは我が国においても頻度が増加傾向にあるとともに、胃がん、大腸がんと比べても予後不良の消化管上皮由来悪性腫瘍である。しかし分子標的療法の開発については遅れていた。食道上皮組織は消化管の一部であるので、消化管の他部位と同様に成体幹細胞が存在していることが想定されていたが、他グループからの論文にて食道上皮については特異的な成体幹細胞が存在しないとする研究結果が報告されていた。私たちは舌上皮幹細胞と同様の手法により食道上皮幹細胞も同定した。現在論文投稿後改訂中である。

③ 精巣生殖幹細胞

精巣精細管に存在する生殖幹細胞については過去多くの報告があるが、その最も未分化な分画である Asingle 細胞の詳細な性質についてはまだ多くの事が分かっていない状況であった。これまでの他グループの解析において Asingle 細胞の最も良いマーカーは GFRa1 であるとされていた。今回私たちは Asingle 細胞のより特異的なマーカーとして Bmi1 を同定した。Bmi1 は GFRa1 と異なり Asingle 細胞の存在する精細管周期に依存した発現パターンを示すことが判明した。

図2

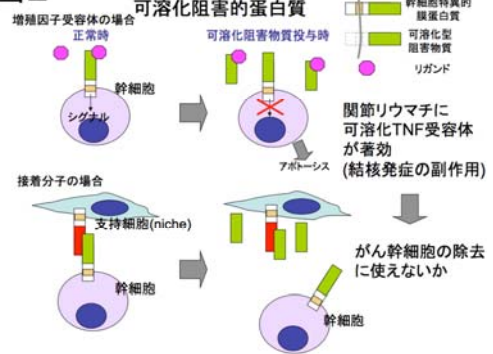
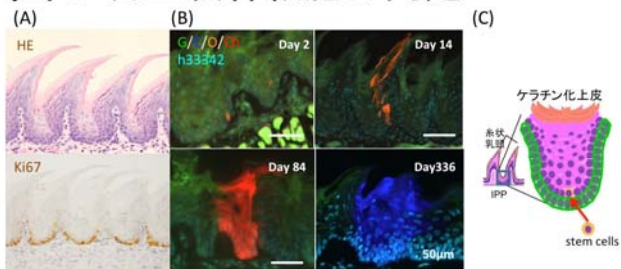


図3 舌上皮幹細胞の同定



(A)舌糸状乳頭と乳頭間窩(Interpapillary pit; IPP)の構造(HE染色とKi67陽性増殖細胞の位置)
 (B)舌上皮幹細胞の同定。図1の方法で幹細胞を蛍光標識し、その子孫細胞の運命を追跡した。
 (C)IPP内舌上皮幹細胞(Stem Cells)の位置を示す模式図。

(Tanaka T, Ueno Hら2014 Nat Cell Biol)

④ その他の幹細胞

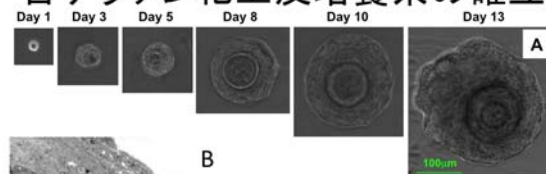
上記以外にもいくつかの臓器にて Bmi1 が成体幹細胞のマーカーとなっていることを見いだしている。それらについては論文投稿準備中である。

(2) 同定された成体幹細胞の in vitro 3次元培養

① 舌上皮幹細胞

上述の様に舌がんの治療法開発には大きなニーズがある一方舌上皮幹細胞が未同定であったことからこれらの研究の進展は他臓器由来悪性腫瘍に比べて遅れていた。私たちが舌上皮幹細胞を同定したことから今後の研究の進展が期待されている状況であった。しかし、舌上皮幹細胞の移植技術は開発されておらず、その細胞レベルの動態を直接観察するためにも、その in vitro 培養系の開発は急務であった。今回私たちは単離した舌上皮幹細胞の in vitro 3次元培養法を確立した(Hisha H, Ueno Hら 2014 Sci Rep)得られたオルガノイド培養は球形であり、最外層に幹細胞を有して分化した細胞が中心に向かって成長する形態を取っていた。また電子顕微鏡解析にてケラチン角化上皮層を形成していた(図4)。

図4 舌ケラチン化上皮培養系の確立



(A)舌由来同一-Sphere cultureの経時的成長過程。
(B)電子顕微鏡解析によるSphere culture内のケラチン角化層。矢印は幹細胞と思われる未分化細胞。
(Hisha H, Ueno Hら2014 Sci Rep)

また同様の方法にて発がん物質 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)をマウスに投与して形成した舌上皮がん由来細胞のオルガノイド培養にも成功し、こちらでは正常幹細胞の場合とはかなり異型性の強い大小不同のオルガノイドが形成された。

② 食道上皮幹細胞

食道成体幹細胞が同定されていないのと同様に、これまで食道上皮組織由来オルガノイド培養についても未だ開発されていなかった。私たちは①の舌上皮組織のオルガノイド培養の条件とほぼ同じ条件にて食道上皮オルガノイド培養についても成功した。食道オルガノイドも球体の培養系であり、最外層に幹細胞が存在して中心に向かって分化細胞が成長する形態を取っていた。また電子顕微鏡解析にてケラチン角化上皮層を形成している事を確認した。また、同様の方法にて発がん物質 4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)をマウスに投与して形成した舌上皮がん由来細胞のオルガノイド培養にも成功し、こちらでは正常幹細胞の場合とはかなり異型性の強い大小不同のオルガノイドが形成された。

③ 膵管上皮幹細胞

膵臓の膵管上皮細胞由来と思われる細胞由来のオルガノイド培養にも成功した。こちら舌上皮細胞、食道上皮細胞に比べて in vitro における増殖速度は遅く、また電子顕微鏡解析にて実際の膵臓の構築を余り反映していないために、現在解析中である。

④ その他の幹細胞

その他の成体幹細胞の培養系の確立も進行中である。

(3) 同定された成体幹細胞の遺伝子発現解析

一方で同定された幹細胞のフローサイトメトリーによる単離と単一細胞レベルでの遺伝子のプロファイリングを行う。同時に同一組織内の分化細胞との遺伝子プロファイリングとの比較から特異的発現遺伝子を同定する。

これまで分子標的療法として膜蛋白質を元に設計した可溶性分子が細胞のシグナルや支持細胞(niche)との接着を阻害する事で細胞の機能を阻害するという現象が実験レベルで数多く報告されている。悪性腫瘍ではないが、関節リウマチの場合、正確な機序は不明ながら可溶性 TNF 受容体、可溶性 IL6 受容体を用いた分子標的療法が既に実用化されて従来の治療法に比べて劇的な治療成績を上げている事は既に広く知られている。同様に幹細胞の膜蛋白質に対する可溶性阻害蛋白質を設計することで、それによる正常幹細胞、がん幹細胞の阻害効果、除去効果が期待でき、がん治療の創薬につながる可能性がある。

① 舌上皮幹細胞 ② 食道上皮幹細胞

免疫染色法、in situ hybridization 法による遺伝子発現解析の他、および single cells RNA seq 法、qPCR 法による網羅的遺伝子発現解析を試みた。これまでのところ①②の幹細胞に形態的、発現遺伝子の観点から非常に酷似していることが分かっている。食道上皮幹細胞に発現する Bmi1 以外の遺伝子として Sox2, Lrig1, Hopx などの遺伝子が見つかった。

(4) 治療標的候補分子の選定、可溶性阻害蛋白質の設計と in vivo 大量発現、その効果の検定

- ① 小腸および大腸上皮幹細胞、およびそれら組織に由来するがん幹細胞に特異的に発現する膜蛋白質の中から抗腫瘍効果を期待する可溶化阻害分子(図2)の候補として2分子を選定した。可溶化阻害分子の効果の汎用性を確認する目的にて小腸および大腸上皮組織由来の発がんモデルとして3種類を検討した。(a)Apc^{min} マウス(腺腫モデルに相当する)。(b)Apc^{min} マウスに DCC 投与し腺腫に悪性を誘導したもの(2段階発がんモデルに相当する)。(c)発がん物質アゾキシメタン単独による悪性腫瘍(自然発症がん)に相当する)。2種類の候補分子の内の1つ、遺伝子 X の可溶化阻害物質をアデノウィルスベクターに組み込み Fc 蛋白質の形にて上記3種類のモデルマウスに腫瘍形成後に投与したところ、3種類すべてにおいて遺伝子 X を高発現した腫瘍にアポトーシス誘導効果を認めた。この成果について投稿準備中であり、また特許出願予定である。
- ② 食道および舌がんについて、現在治療標的候補膜蛋白質を1種類選定して可溶化阻害蛋白質を作製している。発がんモデルマウスとしては、発がん物質 4NQO 投与モデルマウスを用いている。これについても効果を今後検討しているところである。

波及効果

(1) 成体幹細胞同定法の確立と成体幹細胞の同定

上述の様に悪性腫瘍の発症頻度と予後からその生物学的解析が重要であることは認識されておりながら、実際には解析が進んでおらず分子標的療法等の先端医療開発が遅れている臓器を対象に成体幹細胞の同定を行い、実際に舌上皮幹細胞、食道上皮幹細胞の同定に成功した。

舌上皮幹細胞が存在する舌上皮組織に由来する舌扁平上皮がんについてはこれまで他臓器の悪性腫瘍に比べてほとんど研究が進んでいなかった。今回の研究プロジェクトを機に当該組織の研究が大きく進展する事が期待できる。

また、食道上皮組織由来の食道扁平上皮がんは特に男性において我が国における悪性腫瘍の発症頻度、死因ともに増加傾向にあり、私たちが今回食道上皮幹細胞を発見したことで、今後食道上皮組織の維持メカニズム、がん化幹細胞と正常幹細胞の発現遺伝子の差異、幹細胞の in vitro 増幅法、それを用いた食道粘膜の再生医療などの開発など派生する研究テーマは無数に創出される。

(2) 成体幹細胞培養法の確立

次に見つけた成体幹細胞の3次元マトリゲル培養法を開発した。私たちの培養系の確立によって、扁平上皮組織の維持機構の解析、またそれら組織由来の扁平上皮がんの生物学的性質を解析するのに約立つ事が期待できる。また、また多色細胞系譜追跡法によるオルガノイド培養の解析の結果、幹細胞が in vitro にて増幅されていることが判明している。今後効率を高め、私たちが同定した成体幹細胞の in vitro 増幅法の開発、またそれを利用した再生医療への応用などへの発展が期待される。

(3) がん幹細胞の生物学的解析

今回の私たちは多色細胞系譜追跡法にて少なくとも食道上皮、舌上皮由来の悪性腫瘍においてがん幹細胞の存在を証明しつつある(少なくともいくつかの幹細胞マーカーを用いた多色細胞系譜解析にて長期に標識される細胞群が悪性腫瘍の内部に存在することを確認している)。また下記のようにそれを標的とした治療法の開発を行い有望な結果を得て、現在論文投稿準備中である。これらについても今後知的所有権の申請を行う予定である。

(4) 可溶化阻害蛋白質を用いたがん治療法の確立

モデルケースとして腸管上皮腫瘍化マウスを3種類使い、それに対してある1種類の候補可溶化阻害蛋白質はいずれの腫瘍に対しても効果を認めており、現在論文投稿準備中であり、また知的財産権申請予定である。また発がん物質 4-NQO を投与して誘導した舌がん、および食道がんモデルマウスに対する可溶化阻害蛋白質候補分子を選定して現在その治療効果について検討している。

6. 研究発表等

<p>雑誌論文 計 12 件</p>	<p>(掲載済み一査読有り) 計 5 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Rinkevich Y., Lindau P., Ueno H., Longaker, M., Weissman IL. Germ layer and lineage restricted stem/progenitors regenerate the mouse digit tip. (2011) Nature 476:409-413 2. Zhang H., Zheng W., Shen Y., Adhikari D., Ueno H.(co-corresponding author), Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. (2012) Proc Natl Acad Sci USA 109:12580-12585 3. Yanai H., Tanaka T., Ueno H. Multicolor lineage tracing methods and intestinal tumors. (2013) JG 4:423-433 4. Tanaka T., Komai Y., Tokuyama Y., Yanai H., Ohe H., Okazaki K. and Ueno H. Identification of stem cells that maintain and regenerate lingual keratinized epithelial cells. (2013) Nature Cell Biology;15:511-518 5. Hisha H, Tanaka T, Kanno S, Tokuyama Y, Komai Y, Ohe S, Yanai H, Omachi T, and Ueno H. Establishment of a Novel Lingual Organoid Culture System: Generation of Organoids Having Mature Keratinized Epithelium from Adult Epithelial Stem Cells. (2013) Scientific Reports 3, Article number: 3224 doi:10.1038/srep03224 <p>(掲載済み一査読無し) 計 2 件</p> <p>2011 実験医学 正常腸上皮細胞の発生およびがん化過程における clonality 解析 29 (20) :3262-3268 上野博夫</p> <p>2011 医薬ジャーナル 正常と癌の幹細胞 47(11) :2693-2697 上野博夫 (未掲載) 計5件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Toshihiro Tanaka, Hiroko Hisha, Yoko Tokuyama, Shohei Kanno, Yoshihiro Komai, Hirotsugu Yanai, Taichi Ohmachi, Shuichi Ohe, Kazuichi Okazaki and Hiroo Ueno. Identification and characterization of esophageal stem cells. (Nature Cell Biology 投稿中) 2. Yoshihiro Komai, Toshihiro Tanaka, Yoko Tokuyama, Hirotsugu Yanai, Shuichi Ohe, Taichi Omachi, Naho Atsumi, Naoko Yoshida, Keiki, Kumano, Hiroko Hisha, Tadashi Matsuda and Hiroo Ueno. Bmi1 expression in long-term germ stem cells (Scientific Reports 投稿中) 3. Shuichi Ohe, Toshihiro Tanaka, Yoko Tokuyama, Hirotsugu Yanai, Yoshihiro Komai, Taichi Omachi, Hiroko Hisha, Fumikazu Yamazaki, Hiroyuki Okamoto and Hiroo Ueno. Identification of stem cells for the acral epithelium of the skin. (Nature Communications 投稿中) 4. Hirotsugu Yanai, Toshihiro Tanaka, Yoko Tokuyama, Shuichi Ohe, Yoshihiro Komai, Taichi Omachi, Hiroko Hisha, Masanori Kwon, and Hiroo Ueno. Food intake is not required for development of neonatal intestine. (Development 投稿中) 5. Hirotsugu Yanai, Toshihiro Tanaka, Yoko Tokuyama, Shuichi Ohe, Yoshihiro Komai, Taichi Omachi, Hiroko Hisha, Masanori Kwon, and Hiroo Ueno. Monoclonal origin of intestinal tumors and identification of cancer stem cells, (Nature Medicine 投稿中)
<p>会議発表 計 21 件</p>	<p>専門家向け 計 20 件</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 2011年2月15日 大阪大学医学部セミナー 講演(大阪)演題「マルチカラー細胞系譜追跡法を使った幹細胞研究の現状と循環器研究への応用の可能性について」発表者 上野博夫 2. 2011年4月29日 日本病理学会 シンポジウム(横浜)演題「マルチカラー細胞系譜追跡法を用いた幹細胞・発生研究の現状」発表者 上野博夫 3. 2011年6月25日 サイトメトリー学会 シンポジウム(京都)演題「マルチカラー細胞系譜追跡法を用いた幹細胞・発生研究の現状」発表者 上野博夫 4. 2011年6月16日 京都大学医学部 セミナー(京都)演題「Multicolor Clonal Analysis of Mouse Intestinal Stem Cells and Adenoma Formation」 5. 2011年11月15日 東京大学医科研 大学院講義(疾患モデル論講義)「マルチカラーキメラ法を用いた幹細胞・発生研究」 6. 2012年4月19日 日本消化器病学会 セミナー(東京)演題「マルチカラーキメラ法による小腸幹細胞の維持機構とがん化過程におけるその破綻の解析」発表者 上野博夫 7. 2012年5月25日 内閣府生命倫理専門調査会発表(東京)演題「再生医療研究の将来像とクローン臓器の可能性について」発表者 上野博夫 8. 2012年8月21日 千葉大学 GCOE セミナー(千葉)演題「マルチカラーモザイクマウス (レインボーマウス)による成体幹細胞研究について」発表者 上野博夫 9. 2012年9月15日 no side GI 講演会(大阪)講演 演題「マルチカラー細胞系譜追跡法における消化管上皮幹細胞の解析」発表者 上野博夫

	<p>10.2012年11月1日 金沢医科大学セミナー(金沢)演題「マルチカラーキメラ法を用いた幹細胞・発生研究について」発表者 上野博夫</p> <p>11.2013年1月23日 千里ライフサイエンスセミナー(大阪)演題「マルチカラー細胞系譜追跡法を用いた成体組織幹細胞の同定と解析」発表者 上野博夫</p> <p>12.2013年6月6日 日本病理学会 口演(札幌)演題「舌糸状乳頭角化上皮細胞の維持・再生を担う舌上皮幹細胞の同定」発表者 田中敏宏、上野博夫他</p> <p>13.2013年6月28日 GI research(京都)演題「Identification of stem cells that maintain and regenerate lingual keratinized epithelial cells」講演 発表者 田中敏宏、上野博夫他</p> <p>14.2013年9月20日 東京大学先端科学技術研究センターシステム生物医学ラボラトリー(東京)演題「多色細胞系譜追跡法による成体幹細胞の発生・維持機構の視覚化」セミナー発表者 上野博夫</p> <p>15.2013年10月3日 日本癌学会 口演(横浜)演題「糸状乳頭を構成する舌上皮幹細胞の同定と機能解析」発表者 上野博夫</p> <p>16.2013年11月14日 東京大学 第64回幹細胞治療フォーラム セミナー(東京)演題「多色細胞系譜追跡法による新規成体組織幹細胞の同定と機能解析」発表者 上野博夫</p> <p>17.2013年12月4日 日本分子生物学会 ポスター(兵庫)演題「舌糸状乳頭角化上皮の維持・再生を担う舌上皮幹細胞の同定」発表者 田中敏宏、上野博夫他</p> <p>18.2013年12月11日 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学講座主催 医学研究セミナー 講演(大阪)演題「多色細胞系譜追跡法による新規成体幹細胞の同定と機能解析」発表者 上野博夫</p> <p>19.2014年3月3日 国立循環器病研究センター セミナー(大阪)演題「マルチカラー細胞系譜法を使った成体幹細胞の維持と発生研究」発表者 上野博夫</p> <p>20.2014年3月4日 第13回日本再生医療学会 シンポジウム(京都)演題「幹細胞ニッチの最前線と再生医療への応用」シンポジウム 発表者 田中敏宏、上野博夫</p> <p>一般向け 計1件</p> <p>2012年5月9日 守口市医師会講演会(大阪)演題「腸幹細胞研究の最前線～モデルマウスを用いた大腸がん発症過程の多色細胞系譜解析」講演 発表者 上野博夫</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>ホームページ http://www3.kmu.ac.jp/pathol1/</p>
<p>国民との科学・技術対話の実施状況</p>	<p>2011年7月30日(土曜日)、関西医科大学附属枚方病院におけるオープンキャンパスにてパネル展示および研究内容のスライド公開を実施(参加者204名 内受験生94名・保護者110名)。また、ホームページにて成果を一般に公表している。</p> <p>2012年8月18日(土曜日)、関西医科大学附属枚方病院におけるオープンキャンパスにてパネル展示および研究内容のスライド公開を実施(参加者392名 内受験生137名・保護者255名)。また、ホームページにて成果を一般に公表している。</p> <p>2013年8月3日(土曜日)、関西医科大学枚方学舎におけるオープンキャンパスにてパネル展示および研究内容のスライド公開を実施(参加者383名 内受験生218名・保護者165名)。また、ホームページにて成果を一般に公表している。</p>
<p>新聞・一般雑誌等掲載 計10件</p>	<p>2012年7月 雑誌論文4に関する記事が時事ドットコムおよびYahoo!ニュースに掲載。</p> <p>2013年1月 金沢医科大学報に上野のセミナーに関する記事が掲載。</p> <p>2013年2月 臓器再生に関する上野のコメントが掲載(産経新聞、時事ニュース、南日本新聞等)</p> <p>2013年6月 朝日新聞6月6日 朝刊科学面 舌幹細胞の論文について</p> <p>2013年6月 市立札幌病院広報誌創刊号(6月) 2頁 マルチカラー細胞系譜追跡法と舌</p> <p>2013年10月 関西医科大学広報誌 vol.23(10月) 14頁 雑誌論文2について</p> <p>2013年10月 BIO GARAGE vol.18(10月) 研究紹介</p> <p>2013年12月細胞工学 2014Vol.33No.1(2013年12月22日発行)7頁マルチカラー細胞系譜追跡法と舌</p> <p>2013年 オリンパス広告媒体各種 研究紹介</p>

様式21

その他	平成 25 年度日本医師会医学研究奨励賞受賞 平成 25 年度持田助成財団30周年特別研究助成金 平成 26 年度日本病理学会学術研究賞(A 演説)
-----	--

7. その他特記事項

特になし。