

国際共同研究事業  
スイスとの国際共同研究プログラム  
平成28年度実施計画書

平成28年12月14日

共同研究代表者

所属機関・部局 北海道大学・遺伝子病制御研究所

職・氏名 教授・藤田 恭之

1. 研究課題名 (和文) 正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合の統合的研究—新規癌予防薬開発を目指して

(英文) Exploring cell competition between normal and transformed epithelial cells as a novel cancer preventive mechanism

2. 共同研究実施期間

平成29年3月1日 ~ 平成32年2月29日(3年0ヶ月)

(注) 本計画書は、受託機関を通して電子データにて提出してください。

## 5. 本年度実施計画の概要

※ 申請書の内容を踏まえて、日本語にて記入してください。

※ 経費との関連がわかるように具体的に記入してください。

本研究では、哺乳類における細胞競合研究のパイオニアである藤田と様々なマウスモデルを用いて世界のがん研究をリードする Huelksen が強力なタッグを組み、密接な共同研究にて細胞競合研究を統合的に推進することによって、がんの超初期段階で正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合現象を解明し、世界初のがんの予防的治療薬の開発の実現に向けて十分なシーズを得ることを目標とする。

本年度（平成28年度）は、本共同研究がスムーズに開始するために様々な準備を行っていく。具体的には、以下の3つの研究計画を推進する。

### 1) ゲノムワイド RNAi スクリーニングによる細胞競合制御分子の同定と解析

日本側は、ゲノムワイド RNAi スクリーニング施行と同定された分子の *in vitro* 機能解析を行う。全自動イメージアナライザーによる画像解析とゲノムワイド siRNA ライブラリーによる遺伝子発現抑制系を融合させることにより、約 18,000 遺伝子の中から、発現抑制により正常上皮細胞に囲まれた変異細胞の排除を促進、あるいは抑制する遺伝子を同定する。正常細胞としてはヒト臍由来上皮細胞株 HPDE 細胞を、変異細胞としては Tet-on システムによって GFP タグを付加した RasV12 などがん原性タンパク質の発現誘導する系を用いる。テトラサイクリン誘導性 GFP-RasV12 安定発現細胞株（HPDE-pTR-GFP-RasV12 変異細胞）を正常細胞と混合し、単一細胞層を形成させる。その後、テトラサイクリンを添加することで一部の變異細胞が正常細胞との細胞競合によって排除される。その際、變異細胞は GFP 陽性であり、単一細胞層から變異細胞が排除されると、蛍光強度が低下する。スクリーニングでは、384 ウェルプレートにて共培養した細胞を siRNA でトランスフェクションし、テトラサイクリン添加後 1 6-2 4 時間培養した後に、全自動イメージアナライザーにより GFP でラベルした形質転換細胞の消失を定量的に評価できる系の構築を行う。すでに、これまでの東京大学創薬イノベーションセンターとの共同研究により、スクリーニングのスキームは確立している。一次スクリーニングは 1 遺伝子に対し、4 種類の siRNA を用いることで偽陰性を減らしながら、効率よくヒット遺伝子を同定していく。二次スクリーニングでは一次スクリーニングで陽性と判定された遺伝子について、そのノックダウンが變異細胞のみを培養した時に及ぼす効果と比較検証することによって、正常上皮細胞に囲まれた變異細胞に特異的に影響を与える、すなわち細胞競合の制御分子の同定を進めていく。

### 2) ハイスループットスクリーニングによる細胞競合を促進する低分子化合物の探索

低分子化合物のスクリーニングにおいては、前述したヒト臍由来上皮細胞株 HPDE 細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を用いる。スクリーニングでは、テトラサイクリンと同時に、低分子化合物を添加し、細胞競合による變異細胞排除を促進する化合物の同定を進める。このようなガン化初期段階の變異細胞の排除をモニターできるスクリーニング用 *in vitro* モデルシステムをすでに構築している。残存した變異細胞は、PerkinElmer 社の Operetta などのイメージングアナライザで取得した蛍光顕微鏡像から測定した GFP 蛍光強度を、1 ウェルあたりの総蛍光強度として算出する。添加した化合物がどの程度、この総蛍光強度の減弱を促進するかをハイスループットに評価する。スクリーニングの精度・確度に関しては、プレート間およびウェル間において GFP 蛍光強度のバラツキを最小限に抑える条件も最適化済みであり、Z' factor > 0.85 と大規模スクリーニングにも耐える系を確立している。20万を超える低分子化合物ライブラリーに関しては現在、北海道大学創薬科学研究教育センターにおいて東京大学創薬機構と連携した化合物ライブラリー拠点が構築されている。

### 3) 細胞競合マウスモデルの開発とそれを用いた解析

正常上皮細胞と變異細胞間に生じる細胞競合現象を解析するため、少量のタモキシフェンの投与によって正常上皮細胞層に Ras 変異がモザイク様に誘導される細胞競合マウスモデルを構築する。この目的のために、Lox/Stop/Lox-kRasV12-IRES-eGFP マウスと Villin-CreERT2（または CK19-CreERT）マウスをかけ合わせる。後者のマウスについてはすでに入手済みであり、前者についてもすでに作製に取りかかっており、平成28年度中には Ras 変異を上皮層にモザイク様に誘導できるタモキシフェンの最適濃度の検討や正常細胞に囲まれた Ras 変異細胞の排除効率の定量化などに取りかかる予定である。

また、平成29年度以降の相手国との研究交流・ネットワーク計画を円滑に進めるため、頻回にディスカッションを行う。

6. 本年度経費総額\* 1,300 千円

\* 研究経費（直接経費）と間接経費の合計を記入して下さい。

（単位：千円）

研究経費（直接経費）							間接経費
設備備品費	消耗品費	旅費等		人件費・ 謝金等	その他経 費	外国旅 費・人件 費・謝金 等に係る 消費税*	
		国内旅費	外国旅費				
0	950	0	0	0	50	0	300

\* 外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税を本経費から支出しない場合は、その理由等を「外国旅費・人件費・謝金等に係る消費税」欄に記入してください。

\* 委託費の上限は申請額に基づき、研究経費（直接経費）1,000万円以内/年（かつ3,000万円/全研究期間）に対し、30%の間接経費を加えた額とします（ただし平成28年度のみ）。

翌年度所要見込額	翌々年度所要見込額	3年度後所要見込額	左の欄は該当する場合のみ記入してください。 （単位：千円）
6,698	11,000	11,000	

\* 上の欄は該当する場合のみ記入してください。（単位：千円）

\* 委託費の上限は申請額に基づき、研究経費（直接経費）1,000万円以内/年（かつ3,000万円/全研究期間）に研究経費に対し10%以内の事務委託手数料を加えた額

研究計画全体必要額	2年度目以降の場合は、前年度までの執行済額も含めて記載してください。 （単位：千円）
29,998	

\* 研究計画全体必要額の上限は申請書記載の額とします。

7. 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費

	細 目	金 額 (単位：千円)	積 算 内 訳
設 備 備 品 費	該当なし	0	
	計	0	
消 耗 品 費	一般試薬	500	抗体、Western blotting キットなど
	細胞生物学試薬	380	抗生物質、トランスフェクションキットなど
	分子生物学試薬	70	制限酵素、アガロースゲル、PCR 試薬など
	計	950	
人 件 費 ・ 謝 金 等		0	
	計	0	
そ の 他 経 費	印刷費	50	
	計	50	

備考：

- ① 細目は設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、その他経費（「通信費（切手・電話等）」「運搬費」「印刷費」等（手引 8-8 参照）の別に記入してください。
- ② 設備備品費、消耗品費、人件費・謝金等、については、「積算内訳」の欄に品名または人物名、単価および数量を明記してください。

8. 交流計画

(a) 日本側参加者（代表者を含む）の国内出張計画

出張者 (氏名)	出発地 (都市名)	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
なし					

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

(b) 日本側参加者（代表者を含む）のスイスへの渡航計画

出張者 (氏名)	出発地	用務先 (都市名)	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担**
なし					

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

(c) 日本側参加者（代表者を含む）のスイス以外の国への渡航計画\*

出張者 (氏名)	出発地	用務先 (国名・都 市名)	旅行期間**	用 務 (用務先・用務内容)	経費負担***
なし					

\* 外国出張の渡航先は原則としてスイスのみとします。ただし、当該共同研究の研究成果発表を目的とする学会等への出席や、フィールドワーク等で当該第三国へ行くことが必須である研究上の理由がある場合に限り、スイス以外の国を訪問することが可能です。

\*\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」

\*\*\* 本経費使用予定の有無を記入すること

(d) スイス側研究者の来日計画

出張者 (氏名)	用務先	旅行期間*	用 務 (用務先・用務内容)
なし			

\* 旅行期間の欄の記入例：「6月頃、10日間」