

## がん幹細胞研究プログラム 腫瘍分子生物学研究分野

### 1. 研究スタッフ

#### 常勤

教授	高 橋 智 聡	2009 年 12 月～現在
助教	Shamma Awad	2010 年 4 月～現在
	木 戸 敬 治	2009 年 12 月～現在

#### 非常勤

非常勤研究員	北 嶋 俊 輔	2010 年 4 月～現在
	佐々木 信 成	2011 年 5 月～現在
	河 野 晋	2011 年 6 月～現在
研究補助員	鈴 木 美 砂	2009 年 12 月～現在
	永 谷 直 子	2011 年 4 月～現在

### 2. 研究概要

ヒトがんにおける臨床的エビデンスが豊富ながん遺伝子・がん抑制遺伝子を変異させたマウス・細胞を中心に、シンプルで、分子生物学的・遺伝学的な解析がしやすい *in vivo*・*in vitro* がんモデル系を組み立て、発がん・転移・薬剤耐性・がん幹細胞を克服する突破口になる新規パスウェイを探索する。具体的な取り組みは以下。

1) 数多くの増殖シグナルやエフェクターのアダプター分子となる RB 蛋白質(pRB)の不活性化は、多くのヒトがんの悪性進展過程において観察される。pRB は、従来知られた細胞周期や細胞分化の制御だけでなく、細胞老化、DNA 損傷応答、DNA メチル化、蛋白質イソプレニル化、脂質代謝、解糖系、ミトコンドリア機能あるいはサイトカイン分泌を制御することによっても腫瘍原性や悪性度を規定することを見出してきた。これまでに試されていないユニークなコンテキストにおいて pRB の新規機能を探索する。

2) がん細胞は、正常細胞と較べて代謝様式が劇的に異なる。それは、好氣的解糖と脂質合成の亢進であり、前者を p53 が、後者を pRB が司ると考えている。pRB は細胞の未分化性維持にかかわるミトコンドリア機能も制御する。様々ながん化シグナルによって誘導されるメタボリック・リプログラミングが、がん細胞の悪性の挙動に与える影響とその機構を探索する。

3) 悪性進展機構の深い理解に基づき、がん幹細胞が示すと想定される様々な挙動の一部を安定的に表現するインビトロがん幹細胞モデル系を組み立て、がんの幹細胞様表現型に関連する遺伝子の探索および新しいがん標的薬の開発に応用する。

### 3. 主な研究成果

#### 1) RB-ATM-DNMT1 パスウェイの発見

pRB は、LxCxE モチーフを有するクロマチン修飾因子群と直接に結合することによって、エ

ピジエネティック制御に関わると考えられてきたが、その実態は、未解明である。我々は、多重変異マウスを用い、pRBの不活性化が pRB-E2F-1-HDAC1-DNMT1 複合体の機能をどのように変化させるかを解明した。この機序には、ATM, Tip60, UHRF1 等の分子が関与し、pRB 不活性化時に、リン酸化 ATM のキナーゼドメインと DNMT1 の触媒ドメインが直接に結合することを見いだした (図 1)。また、具体的に RB がどのような遺伝子の DNA メチル化を制御するのかを特定した。pRB 経路と ATM 経路 (DNA 損傷応答経路) はヒトがんにおいてしばしば不活性化する。このことが、がんゲノムの DNA メチル化異常を説明するのではないかと提案している (投稿中)。

## 2) RB のメタボリック機能の発見

pRB が、Ras 蛋白質のイソプレニル化を制御することを見いだした。更に、pRB は、SREBP 転写因子群等と協調して、メバロン酸経路、脂肪酸生合成経路、好氣的解糖系、グルタミン酸経路等、様々な代謝制御遺伝子の制御を行うことを見いだした。一方で、p53 による代謝制御は、そのがん抑制機能にとって必須であると考えられている。p53 と pRB の同時不活性化は、がん細胞あるいはがん幹細胞の維持にとって極めて都合のよい代謝様態を誘導した (図 2)。

## 3) インビトロがん幹細胞モデルの創出

遺伝学的背景が明らかなマウス由来細胞を用いて、pRB あるいは p53 のステータスに忠実に依存しつつ、がん幹細胞様の細胞集団を誘導するモデル系を創出した。これらからがん幹細胞様活性の強い細胞を濃縮し、マイクロアレー・トランスクリプトーム解析、代謝解析、LC-MS/MS 解析等を行った。がん幹細胞様の挙動に連動かつ pRB あるいは p53 の制御を受ける遺伝子を抽出するなどして、がん幹細胞様の挙動に関わる遺伝子群を特定しつつある。また、データベースを利用し、このようなシンプルモデル系の徹底的な解析によって得られる大量のデータセットをヒトがん幹細胞の解析に適応している。さらに、治療モデルを基盤に、ハイスループットな薬剤スクリーニング系を構築、薬剤の標的とトランスクリプトームのデータを対比することによって、がん幹細胞を特異的な標的とし得る化合物を効率的かつロジカルに発見する系の開発を目指している。

## 4) RECK 機能の探索

RECK のノックダウンが、Ras パスウェイのフィードバック機構に依存した細胞老化を誘導することをヒントに、RECK の標的となる増殖因子受容体を同定した。

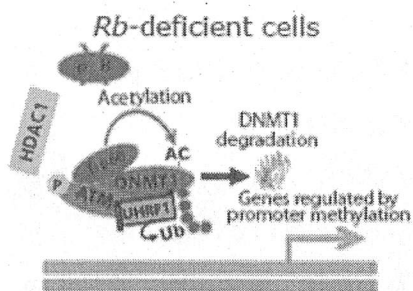


図 1

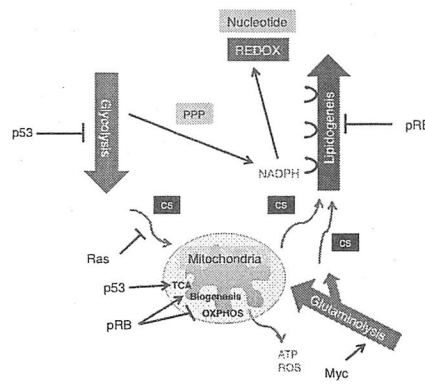


図 2

#### 4. 今後の研究目標

1) pRB のメタボリック機能の解明から、がん化シグナルと代謝制御の関わりの全容へ  
pRB のメタボリック機能がこれまで気づかれなかったのは、pRB のプライマリーな作用とされてきた細胞周期や細胞老化への影響をあらかじめ除外する系を用いなかったからであろう。様々な遺伝学的背景において RB の作用を観察したことによって、このような発見が可能になったと思う。今後は、メタボローム・トランスクリプトーム解析をはじめ更に詳細な代謝動態解析を行い、表題の達成を目指す。

#### 2) メタボリック・リプログラミングとエピジェネティック制御

がん化、がん幹細胞誘導、あるいは、iPS 細胞誘導においては、ゲノムワイドなエピジェネティック制御に先行して、様々ながん化シグナルあるいは未分化性誘導因子によるメタボリック・リプログラミングが必須なのではないかという仮説を持っている。特定のがんにおける IDH1,2 の変異とそれに続くヒストン修飾因子の機能異常は、そのストーリーが現実のものであることを示唆している。再生医学や代謝研究からもたらされる豊富な知見を十分に活用し、がん幹細胞の本態に迫る。

#### 3) がん幹細胞特異的代謝異常の解明

がん幹細胞を代謝の面から深く考察し、これを標的とした治療を考案する。

#### 4) インビトロがん幹細胞モデルから創薬へ

究極的にシンプルで、故にハイスループットな薬剤スクリーニング系に適性の高いがん幹細胞モデル系を創出する。これまでのところ、間葉系の細胞を主に用いてきたが、上皮系細胞を用いた系にも挑戦する。既存薬ライブラリーあるいは化合物ライブラリーの薬効を、トランスクリプトームのデータ等の付帯情報と関連づけながら、がん幹細胞標的薬の開発につながる知見を得ることを目指す。

#### 5. 共同利用・共同研究拠点としての役割を果たすことに関連する活動について

共同利用・共同研究拠点経費によって、以下の共同研究を行っている。

1. 岡崎俊朗博士（鳥取大医→金沢医大）「Rb 遺伝子欠損マウスでの腺癌発症機構におけるスフィンゴ脂質代謝調節を介した細胞周期制御の解明」

2. 島野仁博士（筑波大医）「がん幹細胞の脂質代謝における Rb がん抑制遺伝子と SREBP-1 遺伝子の関係」
3. 藤田恭之博士（北海道大遺制研）「がん幹細胞と非がん幹細胞間の細胞競合」
4. 田中知明博士（千葉大医）「がん幹細胞制御を目指した癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節における基盤的研究」

以上のほかに、競争的資金を用いた共同研究を多数の研究者と行っており、本研究所の提供する研究機器、スペース、研究材料を積極的に共有していただいている。

更に、2011 年 4 月に、全国共同利用・共同研究「がんの転移・薬剤耐性に関わる先導的共同研究拠点」認定記念シンポジウム（於金沢大学がん進展制御研究所）において記念講演を行い、学内外に対して、当拠点活動の宣伝を行った。

## 6. 研究業績

### 原著論文

1. Taura M, Suico MA, Koyama K, Komatsu K, Miyakita R, Matsumoto C, Kudo E, Kariya R, Goto H, Kitajima S, Takahashi C, Shuto T, Nakao M, Okada S, Kai H. Rb/E2F1 Regulates the Innate Immune Receptor Toll-Like Receptor 3 in Epithelial Cells. *Mol Cell Biol*, 32: 1581-1590, 2012.
2. Kitajima S, Miki T, Takegami Y, Kido Y, Noda M, Hara E, Shamma A, Takahashi C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. *Oncogene*, 30: 737-750, 2011.
3. Miki T, Shamma A, Kitajima S, Takegami Y, Noda M, Nakashima Y, Watanabe K, Takahashi C. The  $\beta$ 1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. *Mol Cancer Res*, 8: 665-676, 2010.
4. Chandana EP, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, Kondo S, Oh J, Takahashi R, Yoshida Y, Kawashima S, Alexander DB, Kitayama H, Takahashi C, Tabata Y, Matsuzaki T, Noda M. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. *BMC Dev Biol*, 10: 84-96, 2010.
5. Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M. Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene*, 29: 2638-2648, 2010.
6. Shamma A, Takegami Y, Miki T, Kitajima S, Noda M, Obara T, Okamoto T, and Takahashi C. Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-Ras isoprenylation. *Cancer Cell*, 15: 255-269, 2009.
7. Omura A, Matsuzaki T, Miio K, Ogura T, Yamamoto M, Fujita A, Okawa K, Kitayama H, Takahashi C, Sato C, and Noda M. RECK forms cowbell-shaped dimmers and inhibits

MMP-catalyzed cleavage of fibronectin. *J Biol Chem*, 284: 3461-3169, 2009.

#### 著書・総説

1. Takahashi C, Sasaki N, Kitajima S. Twists in views on RB functions in cellular signaling, metabolism and stem cells. *Cancer Sci*, 2012. (オンライン版公開)
2. 北嶋俊輔、高橋智聡: “インビトロがん幹細胞モデル”, 実験医学 増刊「がん幹細胞-ステムネス、ニッチ、標的治療への理解」須田年生編集, Vol.29-No.20, 203-209 頁, 羊土社, 2011.
3. 高橋智聡: “Ras シグナル制御と発癌”, 実験医学 増刊「秒進分歩する癌研究と分子標的治療」原英二、平尾敦、矢野聖二、佐谷秀行編集, Vol.29-No.2, 20-25 頁, 羊土社, 2011.
4. Noda M, Takahashi C, Matsuzaki T, Kitayama H. What we learn from transformation suppressor genes: lessons from RECK. *Future Oncol*, 6:1105-1116, 2010.
5. 北嶋俊輔、石川智夫、木戸敬治、高橋智聡: “その他腫瘍モデル”, 「完全版マウス・ラット疾患モデル活用ハンドブック」秋山徹、奥山隆平、河府和義編集, 163- 180 頁, 羊土社, 2010.
6. Takahashi C, Takegami Y, and Shamma A. The genetic and biochemical interactions of Rb and ras. *Seikagaku (in Japanese)*, 81: 873-883, 2009.
7. Takahashi C, Muraguchi T, Takegami Y, and Miki T. Regulation of Notch signaling and its polarity mediated by ectodomain shedding of DSL ligands. *Tanpakushitsu Kakusan Koso (in Japanese)*, 54: 1742-1746, 2009.

#### 主な学会発表

1. Kitajima S, Kohno S, Shamma A, Takahashi C. Undifferentiated cancer stem cell-like phenotypes induced by Rb-p53 inactivation. 研究所ネットワーク国際シンポジウム (仙台) 2012 年 6 月
2. Shamma A, Kido Y, Sasaki N, Takahashi C. ATM regulates DNMT1 protein stability and coordinates its acetylation-driven ubiquitination during Rb loss-induced carcinogenesis. Gordon Conference. (California, USA) 2012 年 3 月
3. Kitajima S, Kido Y, Muranaka H, Sasaki N, Kohno S, Takahashi C. The RB-SREBP nexus where RB meets cell signaling and lipid metabolism. Keystone Symposia (Banff, Canada) 2012 年 2 月
4. Kitajima S, Kido Y, Muranaka H, Sasaki N, Kohno S, Takahashi C. The RB-SREBP signaling axis revealed by Rb composite knockout mouse studies. 第34回日本分子生物学会年会 (横浜) 2011 年 12 月
5. Kitajima S, Muranaka H, Sasaki N, Kido Y, Takahashi C. The RB-SREBP nexus where RB meets cell signaling and lipid metabolism. Second International Rb Meeting, (Toronto, Canada) 2011 年 11 月.

6. Takahashi C, Kitajima S. The RB-SREBP nexus where RB meets cell signaling and lipid metabolism. Second International Rb Meeting, (Toronto, Canada) 2011年11月.
7. Shamma A, Takahashi C. DNMT1 links DNA damage response and cellular senescence during Rb-deficient tumorigenesis. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）2011年10月
8. 高橋智聡、北嶋俊輔、木戸敬治、Shamma A. The Rb-Ras pathway in malignant progression - non-canonical functions of pRb. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋）2011年10月
9. 高橋智聡. 複合変異マウスによるヒトがんの理解とモデル化. 第29回日本ヒト細胞学会学術集会（富山）2011年8月
10. 高橋智聡. The Rb-Ras pathway in malignant progression. 研究所ネットワーク国際シンポジウム（東京）2011年6月
11. Kitajima S, Takahashi C. Reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs (RECK) interferes with Ras signaling. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）2011年5月
12. Shamma A, Takahashi C. DNMT1 links DNA damage response and cellular senescence during Rb-deficient tumorigenesis. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）2011年5月
13. Takahashi C. The Rb-Ras pathway in malignant progression. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）2011年5月
14. 高橋智聡. レチノブラストーマ遺伝子研究から見えるがんの進展制御. 全国共同利用・共同研究「がんの転移・薬剤耐性に関わる先導的共同研究拠点」認定記念シンポジウム（金沢）2011年4月
15. Shamma A, Takahashi C. ATM mediates the Rb-loss-induced DNA damage response and cellular senescence through chromatin remodeling and p16Ink4a regulation. 第69回日本癌学会学術総会（大阪）2010年9月
16. 高橋智聡. RB-RAS 経路とがんの悪性進展. 第3回 SYMPHONY（東京）2010年9月
17. Takahashi C, Shamma A. The Rb-Ras pathway in malignant progression. International Cancer Biology Symposium at National Sun Yat-Sen University (Kaohsiung, Taiwan) 2010年6月.
18. Kitajima S, Miki T, Takahashi C. RECK regulates p53-p21-dependent cellular senescence in mouse embryonic fibroblasts. 第32回日本分子生物学会年会（横浜）2009年12月
19. Takahashi C, Takegami Y, Miki T, Kitajima S and Shamma A. The genetic interaction of Rb and ras unveiled by the study of compound knockout mice. 第82回日本生化学会大会（神戸）2009年10月
20. Shamma A and Takahashi C. Critical role of cellular senescence mediated by N-Ras isoprenylation in suppressing Rb-deficient C-cell carcinogenesis. 第68回日本癌学会学術総会（横浜）2009年10月
21. Takahashi C and Shamma A. The genetic interaction of Rb and ras in the multi-step carcinogenesis model. 第68回日本癌学会学術総会（横浜）2009年10月

22. Takahashi C and Shamma A. The function and mechanism of pRb-N-Ras pathway in metastatic conversion of neuroendocrine thyroid tumor. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB)シンポジウム (Seoul, Korea) 2009 年 5 月

## 7. 外部資金受け入れ状況

### 2012 年度

1. 高橋智聡：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）「がん幹細胞を標的とする薬剤を探索するための革新的インビトロがん幹細胞モデル系の開発」40,000 千円
2. 高橋智聡：公益財団法人 第一三共生命科学研究振興財団 研究助成金 「がん幹細胞標的薬の探索を目指した in vitro がん幹細胞モデル系の開発」1,000 千円
3. Shamma Awad：科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「がん幹細胞における Rb-Ras 経路の研究」600 千円
4. 北嶋俊輔：学術研究助成基金助成金（若手研究 (B)）「癌進展過程における癌幹細胞様細胞出現を pRb が抑制する」1,400 千円

### 2011 年度

1. 高橋智聡：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）「がん幹細胞を標的とする薬剤を探索するための革新的インビトロがん幹細胞モデル系の開発」50,000 千円
2. 高橋智聡：財団法人ノバルティス科学振興財団 研究奨励金「Retinoblastoma がん抑制遺伝子不活性化による蛋白質ファルネシル化亢進の薬理学的・臨床的意義」1,000 千円
3. 高橋智聡：公益財団法人 第一三共生命科学研究振興財団 研究助成金 「がん幹細胞標的薬の探索を目指した in vitro がん幹細胞モデル系の開発」1,000 千円
4. 高橋智聡：第 25 回北國がん基金 助成金「がん細胞特異的な脂質代謝異常の分子機構と治療標的としての可能性」1,000 千円
5. Shamma Awad：科学研究費補助金 基盤研究 (C) 「がん幹細胞における Rb-Ras 経路の研究」600 千円
6. 北嶋俊輔：学術研究助成基金助成金（若手研究 (B)）「癌進展過程における癌幹細胞様細胞出現をpRbが抑制する」2,000千円

### 2010 年度

1. 高橋智聡：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）「がん幹細胞を標的とする薬剤を探索するための革新的インビトロがん幹細胞モデル系の開発」3,000 千円
2. 高橋智聡：科学研究費補助金 基盤研究 (B) 「Rb がん抑制遺伝子欠損によって誘導される蛋白質高イソプレニル化の研究」4,800 千円
3. 高橋智聡：財団法人 武田科学振興財団 2010 年度ビジョナリーリサーチ 助成金「多重ノックアウト・ノックダウンのみで胚性幹細胞をつくる」2,000 千円

4. 高橋智聡：財団法人 内藤記念科学振興財団 奨励金「がん幹細胞標的薬の探索を目指した in vitro がん幹細胞モデル系の開発」3,000 千円
5. 高橋智聡：公益財団法人アステラス病態代謝研究会 研究助成金「がん幹細胞標的薬探索のための in vitro がん幹細胞モデル系の開発」1,000 千円
6. Shamma Awad：科学研究費補助金 基盤研究 (C)「がん幹細胞における Rb-Ras 経路の研究」2,200 千円

#### 2009 年度

1. 高橋智聡：科学研究費補助金 特定領域研究「複合変異マウスを用いたがん化・転移シグナルの研究」9,000 千円
2. 高橋智聡：科学研究費補助金 基盤研究 (B)「Rb がん抑制遺伝子欠損によって誘導される蛋白質高イソプレニル化の研究」5,300 千円
3. 高橋智聡：財団法人 武田科学振興財団 研究助成金・奨励金（継続）「複合遺伝子変異マウスを用いた発がん・転移メカニズムの解析からヒト癌の理解へ」3,000 千円

#### 8. 特記事項

##### 新聞報道等

朝日新聞、読売新聞、日経産業新聞、京都新聞、静岡新聞、四国新聞、秋田魁新報：2009年  
Research Highlights in Nature Reviews Cancer 9: 384-385, 2009.

##### 市民に対する啓蒙活動

1. 金沢大学公開講座「がん研究の最前線・第2回 - 進化するがん細胞」(金沢市/金沢大学サテライトプラザ) 2012 年 5 月
2. 金沢大学まちなかサイエンスセミナー「細胞はどうやってがん化を免れるか」(金沢市/しいのき迎賓館) 2011 年 12 月