

受賞者

大谷 直子

財団法人癌研究会 癌研究所 がん生物部

## 研究テーマ

リアルタイム・イメージングを利用した癌幹細胞の特性と生体内動態の解析

### 研究目的

申請者はこれまで、p53 の標的遺伝子である p21 遺伝子の発現を可視化するマウスを作製し、その遺伝子発現をリアルタイムにイメージングすることに成功した。そしてこれらの遺伝子発現が、実際に発癌過程において、良性腫瘍が形成される際に誘導され、発癌防御機構として機能していることを示した（文献1）。さらに申請者はポリコムタンパクのひとつで、INK4a/ARF 遺伝子座を抑制することが知られている Bmi-1 遺伝子の発現を可視化するマウスを作製した。Bmi-1 はさまざまな組織幹細胞において発現していることが知られており、また INK4a/ARF 遺伝子座を抑制することから、Bmi-1 遺伝子の発現異常が、発癌に関与していることが知られている。

近年、癌組織に幹細胞的性質をもつ癌幹細胞が存在し、治療抵抗性の原因となっていることが示唆されており、癌の根本治療のためには、癌幹細胞をターゲットとした治療法が必要であると考えられている。そのためにはまず、癌幹細胞の特性や体内動態を明らかにすることが重要である。

最近、様々な癌幹細胞において、Bmi-1 遺伝子の高発現が認められ、Bmi-1 が癌幹細胞の維持に重要であることが示唆されている。本研究においては、Bmi-1 遺伝子の生体内における発現を可視化するマウス（Bmi-1-BAC-luc mouse）を用いて、様々な方法で発癌を誘導し、発癌の過程で Bmi-1 発現細胞が生体内でどのような動態を示すかを追跡することにより、発癌過程における幹細胞性獲得機序の解明を試みると同時に、生体内における癌幹細胞の特性を明らかにし、癌治療へ応用することを目的とする。

### 方法

申請者はBmi-1遺伝子の完全な遺伝子発現ユニットを含む長大なgenomic DNAを用い、Bmi-1遺伝子コード領域の3'末端にルシフェラーゼ遺伝子を、相同組み替えの技法を用いてインフレームで挿入し、本来の遺伝子構造を保ったまま、Bmi-1-luciferaseフュージョン蛋白の発現により、Bmi-1遺伝子発現を生物発光を利用して可視化定量するトランスジェニックマウス（Bmi-1-BAC-luc mouse）を作製した。

#### 1 生体内におけるBmi-1遺伝子発現の可視化と内在性Bmi-1遺伝子発現

作製したBmi-1-BAC-luc mouseを用いて、通常生体内におけるどの組織でBmi-1遺伝子が発現しているかを生体内イメージングにて生物発光の発光強度を調べる。さらにその発光強度が内在性Bmi-1遺伝子発現量と相関性があるかどうかを確認する。

#### 2 化学発癌における Bmi-1 遺伝子発現の可視化と内在性 Bmi-1 遺伝子発現

Bmi-1-BAC-luc mouse を用いて、様々な化学発癌誘導系を用いて、生物発光を経時的にモニターすることにより、発癌過程で Bmi-1 遺伝子発現がどのように変化するか調べる。また、内在性 Bmi-1 遺伝子発現変化と相関しているかどうかを確認する。さらに癌細胞、癌幹細胞における Bmi-1 遺伝子発現を調べる。

## 結果

### 1 生体内におけるBmi-1遺伝子発現のイメージング

マウスにおいては顎下腺、精巣、小脳において特に強い発光が認められた。マウスからの発光と内在性Bmi-1遺伝子の発現が相関するかどうか確認するため、マウスの臓器からRNAを抽出し、内在性Bmi-1遺伝子の発現とマウスからの発光を比較したところ、やはり、顎下腺、精巣、小脳においては、内在性Bmi-1遺伝子の発現、および、フュージョン蛋白の発現が高く、マウスからの発光を指標に、内在性Bmi-1遺伝子の発現をモニターできることが明らかになった。

### 2 化学発癌における Bmi-1 遺伝子発現のイメージング

今回我々は、皮膚癌に着目し、DMBA-TPAによる皮膚化学発癌の系を用いて解析を行った。

我々は、p16遺伝子発現をイメージングするマウスを以前作製したが、このマウスにおいて皮膚化学発癌の系にて良性腫瘍であるパピローマを形成させると、発がん防御機構が働き、腫瘍部においてp16遺伝子の発現が上昇する (unpublished data)。Bmi-1-BAC-luc mouse においては、TPA塗布後7週ごろに発生する良性腫瘍のパピローマの部分においては、ほとんど発光しておらず、Bmi-1の発現がパピローマにおいては低くなることが確認された。さらに観察を続けると、TPA塗布後15週ごろから、悪性皮膚腫瘍に進行するものが現れ、イメージングすると、悪性腫瘍の一部においては非常に強い生物発光が認められ、Bmi-1の発現が上昇していることが示唆された。

## 考察

上記の実験結果から、我々の作製した Bmi-1-BAC-luc mouse を用いて、生体内イメージングにより内在性の Bmi-1 遺伝子発現を経時的に非侵襲性に追跡できることが明らかになった。

また、皮膚化学発癌の系において良性腫瘍のパピローマの部分においては Bmi-1 遺伝子発現は低く、悪性化すると、悪性腫瘍の一部で Bmi-1 遺伝子の発現が高くなることが示唆された。今後、悪性腫瘍における Bmi-1 遺伝子発現の高い細胞において、癌幹細胞の性質を有するのか解析し、Bmi-1 遺伝子の生体内イメージングにより生体内において癌幹細胞が追跡できるかどうか、検討していく予定である。

## 発表論文

- 1 **Ohtani N.** (corresponding author), Imamura Y., Yamakoshi K., Hirota F., Nakayama R., Kubo Y., Takahashi A., Ishimaru N., Hirao A., Mann DJ., Hayashi Y., Arase S., Matusmoto M., Nakao k. and Hara E. Visualizing the dynamics of p21<sup>Waf/Cip1</sup> cyclin-dependent kinase inhibitor expression in living animals. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 104, 15034-15039 (2007)

## 参考文献

- 2 **Ohtani N.**, Zebedee Z, Huot TJ, Stinson JA, Sugimoto M, Ohhashi Y, Sharrocks AD, Peters G and Hara E. Opposing effects of Ets and Id proteins on p16<sup>INK4a</sup> expression during cellular senescence. **Nature.** 409, 1067-70, (2001)