

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・
制御等の医療基盤技術」
研究課題「人工癌幹細胞を用いた分化制御異常解
析と癌創薬研究」

研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:佐谷 秀行
(慶應義塾大学医学部先端医科学研究
所遺伝子制御研究部門、教授)

§ 1. 研究実施の概要

(1) 実施概要

本プロジェクトでは、佐谷グループが最初の2年間で、癌幹細胞を遺伝子操作によってマウス正常細胞から作製（人工癌幹細胞、induced cancer stem cell: iCSC）する技術、さらには遺伝子改変マウスにおいて樹立した腫瘍から単離・維持培養する技術を確立し、同系マウスに少数の iCSC を移植することによって、ヒトの腫瘍に酷似した病態と組織像を呈する白血病³⁰⁾、骨肉腫¹⁴⁾、脳腫瘍（グリオブラストーマ）²¹⁾、卵巣癌²²⁾、乳癌⁴⁴⁾、胃癌¹⁰⁾を安定して作製することに成功した。次にこれらの細胞を用いて、癌幹細胞の特性（自己複製能、多分化能、腫瘍形成能、治療抵抗性、転移能）を決定付ける候補分子の探索を行い、種々の分子およびシグナルを明らかにした。主な分子としては、胃癌および乳癌幹細胞の活性酸素量を軽減し治療抵抗性と転移能を促進する分子として CD44v とシスチントランスポーター xCT 複合体^{17, 32)}、骨肉腫幹細胞の腫瘍形成能を決定付ける分子として PPAR γ ¹⁴⁾、Twist2⁴³⁾、Imp3³⁶⁾、脳腫瘍幹細胞の放射線耐性を制御する分子として IGF1³⁹⁾を見出した。第一三共の赤羽グループは RNAi ライブラリーや発現解析を駆使して骨肉腫分化制御分子を探索するプロジェクトを佐谷グループとともに実施し、最終的に Twist2 とその下流にある fibrillin 5 による腫瘍抑制作用を見出した。

土居グループ（21年度までは柳川グループ）は、佐谷グループと協働して、CD44v の機能解析並びにその機能を抑制する抗体・化合物の探索を行った。土居グループの成果により、CD44 が PKM2 分子と細胞内で会合することで癌細胞内の解糖系を促進する働きを持つことが見出され²⁵⁾、CD44 の活性酸素抑制作用を確定する発見となった。

本研究の申請時の目的は、iCSC を用いることにより新たな癌治療戦略を樹立し、従来の抗癌剤とは異なった創薬を行うことであったので、見出した上記の分子・シグナルに対する阻害剤の探索を行った。その結果、癌幹細胞内のグルタチオン合成を担保するため細胞外からシスチンを取り込む xCT 分子を標的とした治療が適切であると考え、既存薬で xCT の阻害効果があるスルファサラジンを用いて、マウスモデルによる前臨床試験を実施した^{32, 41)}。その結果、スルファサラジンに CD44v を発現する癌幹細胞を特異的に破壊する効果があることが明らかになったため、医師主導型第一相臨床試験を国立がん研究センターの主導で実施することになり、現在進行中である。

骨肉腫において PPAR γ の発現を上昇させることで腫瘍原性を抑制することができることが iCSC モデルとヒト骨肉腫細胞株を用いた実験から明らかになっているため、土居グループと協働して放線菌代謝物中の化合物を用いたスクリーニングを現在も実施している。最近佐谷グループでは、アクチン細胞骨格の重合を解除することで、多能性を持つ脂肪前駆細胞において PPAR γ の発現が上昇し、脂肪細胞に分化するという極めて重要な所見とその詳細な分子機構を見出した。この所見に基づき、アクチン作動性化合物が分化の方向を是正し、最終的に骨肉腫の腫瘍形成能を抑制することができるかについて現在検討を行っている。

毎年の報告会および中間評価において、当初の研究構想に加え、iCSC 研究を通して得た知識と技術を駆使して、iPS 細胞由来の腫瘍形成に対する治療戦略について研究を進めるように助言を受けた。それを踏まえて京都大学 iPS 研究室と協働し、iPS 細胞由来悪性腫瘍における癌幹細胞様の細胞の存在を確認し、それらの細胞が腫瘍を形成する時に、活性酸素に対して耐性が強くなることを見出した。この所見に基づいて、スルファサラジンの効果を前臨床モデルで解析すると同時に、iPS 細胞由来腫瘍の幹細胞を標的にして、その働きを阻害する化合物のスクリーニングを行っている。

最終年度にはいり、本研究のゴールの一つであるヒト iCSC の作製に大きな進展があった。ヒト正常神経幹細胞に神経芽細胞腫のドライバー遺伝子である変異型 ALK (ALK R1275Q) を導入し、ヌードマウス脳内に移植したところ、GBM 様の悪性腫瘍を発症した。また、ヒト神経幹細胞に ALK R1275Q を Doxycyclin で誘導発現するシステムを構築し、その細胞をマウス脳内に移植したところ、Doxycyclin を投与したマウスにのみ ALK R1275Q が発現し、GBM

様腫瘍が形成された。現在、ゲノムレベルで腫瘍の性質を観察しているところである。本モデルが確定できれば、ヒトグリオブラストーマの前臨床モデルとして用いることができるのみならず、癌の発生と進展、治療抵抗性などを経時的に詳細に観察するためのツールとして極めて有用である。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 接着分子 CD44 は癌幹細胞のマーカーとして知られ、そのスプライスバリエーション (CD44v) は慢性炎症を背景として発生する癌において、癌幹細胞の機能分子として働いていることを見出した。CD44v がシスチントランスポーター-xCT と会合し、細胞膜上での発現を安定化することによりシスチンの取り込みを上昇させ、その結果グルタチオン合成を増加させて細胞内酸化ストレスの低下に寄与していることを明らかにし、CD44v を発現するがん幹細胞が、その抗酸化能に基づいて肺転移及び、治療抵抗性に関与することを見出した。成果は Cancer Cell、Nature Communications、Cell Host & Microbe、Cancer Res などの国際誌に論文として発表した。
2. マウスの各種臓器の正常細胞に特定の遺伝子を導入することによって誘導した腫瘍の中から、癌幹細胞を同定・単離・維持することに成功した。これまで、リンパ腫、卵巣癌、乳癌、悪性黒色腫、グリオブラストーマ、骨肉腫の癌幹細胞の作製に成功し、それら人工癌幹細胞 (iCSC) を少数同系マウスに移植することで、ヒトの腫瘍と類似した組織像および性質を持つ癌組織を構築することができた。それらの特性、シグナルを詳細に解析することによって、癌幹細胞を不活化させるために標的とすべき分子の同定を行った。
3. 骨肉腫幹細胞を用いることにより、多分化能を持った骨肉腫幹細胞が脂肪への分化能を失って、骨軟骨前駆細胞様の性質を持つことで腫瘍形成能が上昇することを見出した。そして脂肪分化のマスター因子である PPAR γ の発現を誘導すると腫瘍形成能を失うことを見出した。つまり脂肪分化能を誘導することが骨肉腫の治療に重要であることが分かった。そこで PPAR γ を細胞内で誘導するシグナルと解析したところ、アクチンが F form から G form に変化することが PPAR γ を誘導し、脂肪分化を引き起こすメカニズムとして働いていることが分かった。つまり、アクチンの動態変化による形態の変化が脂肪分化の引き金を引く現象として働いていることを見出した。この発見に基づいて、アクチン動態を制御する薬剤による骨肉腫治療戦略について現在研究を引き続き行っている。これらの成果は、Oncogene, Mol Cancer Research, Nature Communications などに発表した。

<科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

1. 本研究によって、既存薬スルファサラジンが CD44v を発現する癌幹細胞を特異的に破壊できることが明らかとなり、本薬剤を用いて世界初の癌幹細胞を標的とした治療を医師主導型試験として実施することになった。この成果によって、既存薬から新たな創薬に展開する戦略 (drug repositioning と呼ばれる) とその方法論が明確に示され、アカデミアにおける創薬研究を活性化することに貢献できた。
2. iCSC に基づく各種腫瘍モデルは、従来の培養細胞株を免疫不全マウスに移植するモデルとは異なり、免疫系が正常である上、階層性構築をもつ腫瘍組織を形成し、ヒトに自然発生する腫瘍と組織像および免疫学的性質が酷似することから、理想的な薬剤効果をテストするためのモデルである。既に創薬企業から (国内 2 社、海外 2 社) 新薬の前臨床試験のためのモデルとして使用したいとの要請があり、実用に向けて技術移転を行っている。
3. 正常の組織幹細胞及び前駆細胞に Tet-ON 誘導発現システムで強力な発癌作用を持つ遺伝子を導入し、誘導型の人工癌幹細胞の作製に成功した。技術的にはマウス正常組織の幹細胞に、強力なドライバー変異を持つ遺伝子を導入することで達成でき、誘導発

現システムを用いてマウス生体内で、腫瘍化が成立していくのを経時的に観察できるシステムも樹立することができた。このモデルは癌幹細胞の存在を血液検査やイメージングで検出するためのマーカー探索に極めて有用であるうえ、ヒト癌幹細胞にを標的とした前臨床試験モデルとして理想的である。

4. アクチン動態の変化が細胞の分化を制御していることを見出し、新たな分化制御のための標的を見出すことができた。この発見に基づいて、癌幹細胞を特定の分化方向に導いて治療を行うという新たな概念を創出することができた。

§ 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「佐谷」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
佐谷 秀行	慶應義塾大学医学部	教授	H20. 6～
永野 修	同上	講師	H20. 6～
清水 孝恒	星薬科大学薬学部	准教授	H20. 6～
杉原 英志	慶應義塾大学医学部	特任助教	H20. 6～
有馬 好美	同上	助教	H20. 6～
新井 邦子	同上	研究員	H20. 8～
石本 崇胤	同上	特別研究助教	H20. 8～H23. 3
高橋 枝里	同上	臨時職員	H21. 4～H22. 3
甲斐 千晴	同上	臨時職員	H20. 8～H21. 3
八戸 敏史	同上	共同研究員	H20. 8～H24. 3
本原 剛志	同上	共同研究員	H21. 4～H24. 3
中村 佳子	同上	研究員	H20. 12～
Sampetrea Oltea	同上	特任助教	H21. 4～
石松 幾予	同上	研究員	H21. 4～
神谷 敏夫	同上	研究員	H21. 5～
福田 桂太郎	同上	D4	H23. 4～H24. 3
植木 有紗	同上	D4	H23. 4～H25. 3
吉武 桃子	同上	特任助教	H23. 4～
和田 剛幸	同上	D4	H23. 4～H25. 3
橋本 典諭	同上	D4	H23. 4～
山口 さやか	同上	D3	H23. 4～
吉田 剛	同上	D3	H23. 4～
益子 幸子	同上	M2	H23. 4～H24. 3
土橋 賢司	同上	日本学術振興会 特別研究員 (DC2)	H23. 4～
清島 亮	同上	D3	H24. 4～
岡崎 章悟	同上	D2	H24. 4～

研究項目

- ・人工癌幹細胞 (iCSC) を用いた癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・ヒト細胞を用いた iCSC の作製
- ・CD44-xCT 相互作用抑制による細胞内活性酸素誘導
- ・人工癌幹細胞のニッチの性状および機構解析
- ・ケミカルライブラリー由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発

② 「土居」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
土居 信英	慶應義塾大学理工学部	准教授	H21. 4～
柳川 弘志	同上	訪問教授	H20. 6～

堀澤 健一	同上	助教	H23. 4～
田畠 典子	同上	特任准教授	H20. 6～H24. 8 H25. 9～
舘山 誠司	同上	特別研究教員講師	H20. 6～
佐久間 (米村) 裕子	同上	研究補助員	H20. 6～
始平堂 弘和	同上	D3	H20. 6～H21. 3 H22. 4～H24. 3
梅澤 洋貴	同上	M2	H22. 4～H24. 3
鈴木 悠香	同上	M2	H24. 4～H25. 3
徳永 真由子	同上	M2	H24. 4～H25. 3
新倉 啓介	同上	D2	H25. 4～
白川 貴恵	同上	M2	H25. 4～
加藤 あゆみ	同上	M1	H25. 4～
小川 洋子	同上	研究補助員	H25. 4～

研究項目

- ・人工癌幹細胞のニッチの機構解析
- ・放線菌由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・ケミカルライブラリー由来の癌幹細胞機能抑制剤の開発
- ・癌幹細胞に対する抗ニッチ抗体医薬の開発
- ・CD44v と xCT の相互作用を阻害する抗 CD44v 一本鎖抗体の試験管内選択

③「赤羽」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
赤羽 浩一	第一三共株式会社 研究 開発本部 癌研究所	所長	H22. 3～H23. 3
高子 徹	同上	所長	H21. 10～H22. 3
青沼 正志	同上	グループ長	H21. 10～H23. 3
石川 知毅	同上	専門研究員	H22. 4～H23. 3

研究項目

- ・RNAi library screening による脂肪分化抑制因子の探索
- ・RNAi library screening による骨肉腫形成抑制分子の同定
- ・in vivo 分化プログラム制御薬の探索と評価

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・ 東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターDNA 情報解析分野 (宮野悟教授) との連携により、人工癌幹細胞における遺伝子発現変化のバイオインフォマティクス解析を実施している。
- ・ 東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野 (油谷浩幸教授)、血管生物学分野 (南敬教授) との連携により、癌幹細胞と非がん幹細胞間のエピジェティックな変化について解析を行い、共著論文を公表した (*Nature Commun* 3: 883, 2012 (DOI:10. 1038/ncomms1892))。
- ・ 国立がん研究センター東病院 早期・探索臨床研究センター (大津敦センター長、土井俊彦科長) とともにスルファサラジンをを用いた CD44v 陽性癌幹細胞に対する医師主

導型臨床研究を実施中。共同実施施設として、千葉県がんセンター、聖マリアンナ医科大学病院、公益財団法人がん研究会有明病院が参加している。トランスレーショナル研究（薬物動態、バイオマーカー解析）については、慶應義塾大学医学部先端医科学研究所（CD44v 発現解析）、同臨床薬理学講座（薬物動態解析：今村知世講師）、慶應義塾大学理工学部化学科（組織中グルタチオン測定：栄長泰明教授）、理化学研究所（SNP解析：蒔田泰誠チームリーダー）、国立がん研究センター分子細胞治療研究分野（エクソゾームによる CD44v 発現解析：落谷孝広分野長）との協働によって実施している。臨床研究の詳細は URL：

<https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&recptno=R000011927&type=summary&language=J>

- 金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野（大島正伸教授）とともに、CD44v 陽性癌幹細胞のマウス胃癌モデルにおける生育過程の解析を行い、共著論文を発表した（*Cancer Sci* 2013 [in press]; *Oncogene* 2013 [in press]）。
- 京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座（小川誠司教授）とともに、マウス脳内に移植したヒト神経幹細胞が発癌遺伝子の誘導発現により癌幹細胞に変化するモデルを用い、その過程に生じるゲノムおよびエピゲノム変化について、次世代シーケンサーとバイオインフォーマティクス技術を駆使して現在解析中である。
- 独立行政法人産業技術総合研究所創薬分子プロファイリング研究センター（夏目徹センター長）とともに、①Imp3 阻害分子の双腕型実験ロボットによるスクリーニング、②CD44v 陽性癌幹細胞特異的阻害薬の構造活性相関と標的分子探索、を現在実施中である。
- 京都大学 iPS 研究所初期化機構研究部門（山田泰広教授）と、iPS 細胞由来腫瘍形成機構に関する基礎研究と、iPS 細胞由来腫瘍に対する癌幹細胞治療薬剤の効果に関する共同研究を行っている。
- 平成 26 年度橋渡し研究加速ネットワークプログラムのシーズCに、スルファサラジンの臨床治験を九州大学拠点で実施する計画で申請し（「癌幹細胞を標的とした進行非扁平上皮非小細胞肺癌におけるシスプラチン+ペメトレキセド+スルファサラジン併用療法の第 I 相試験(医師主導治験)、研究代表者 佐谷秀行」、採択された。

§ 3. 研究実施内容及び成果

(1) 人工癌幹細胞を用いた癌幹細胞の性状解析 (慶應義塾大学医学部 佐谷グループ/第一三共株式会社 赤羽グループ)

① 研究実施内容及び成果

1) 人工癌幹細胞 (iCSC) を用いた癌幹細胞機能抑制剤の開発

本研究グループはマウスの正常細胞に限定された遺伝子操作を加え、その細胞を同系マウスに移植することにより悪性腫瘍を形成し、その腫瘍の中から高い腫瘍形成能と自己複製能と多分化能をもつ癌幹細胞 (人工癌幹細胞、iCSC と呼ぶ) を樹立する技術を確認した。これら iCSC は、少数の細胞を同系マウスに同所移植を行うことでヒトの癌に類似した致死的な腫瘍を形成する。本プロジェクトでは iCSC を用いて作製した腫瘍組織の性状を詳細に解析し、治療抵抗性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。更にそれらのメカニズムを標的にした薬剤の探索、および iCSC に基づくマウスモデルを用いて特定の薬剤による前臨床試験を実施した。本研究開始後に樹立した iCSC (表 1) およびそれらの細胞を用いて得られた成果について以下に報告する。なお、ヒトの iCSC については後述する。

iCSC	起源細胞	導入遺伝子	類似組織型
白血病	野生型マウス 造血幹細胞/前駆細胞 INK4a/Arf KO 胚中心細胞	c-myc c-myc	Pre-B LBL B cell lymphoma
骨肉腫	INK4a/Arf KOマウス 間葉系幹細胞/ 骨軟骨前駆細胞	c-myc	Osteosarcoma
脳腫瘍	INK4a/Arf KO マウス神経幹細胞/前駆細胞	RasV12 c-myc	Glioblastoma PNET
乳がん	INK4a/Arf KO マウス 乳腺幹細胞	RasV12	Basal type
卵巣がん	野生型マウス 卵巣上皮細胞	p53siRNA+RasV12+c-myc	Serous adeno- carcinoma
悪性黒色腫	INK4a/Arf KOマウス メラノサイト幹細胞/ 前駆細胞	c-myc+RasV12 c-myc+BRafV600E	Melanoma Melanoma
絨毛上皮がん	ヒトSV40不死化 トロフォブラスト細胞	RasV12	Choriocarcinoma
脳腫瘍	ヒト神経幹細胞	ALKR1275Q	Glioblastoma

表 1: 本研究において作製した iCSC

A) 白血病 iCSC の樹立と治療モデルの構築

- Myc 誘導性前駆 B 細胞性白血病・リンパ腫の起源細胞の同定

【目的】 骨髄由来の造血系未熟細胞に N-Myc 遺伝子導入によって成立した前駆 B 細胞性白血病・リンパ腫 (precursor B lymphoblastic leukemia/lymphoma: pre-B LBL) の起源細胞の同定を行った。また、分化した細胞から癌幹細胞の誘導が可能か否かについて検討を行った。

【方法、結果】 N-Myc を導入した骨髄細胞を造血幹細胞、リンパ性前駆細胞・骨髄系前駆細胞にソートし限界希釈法にてそれぞれの腫瘍形成能を調べた。その結果、造血幹細胞から非常に高頻度 (1:184) に腫瘍が形成した一方、リンパ性前駆細胞 (1:558)、骨髄性前駆細胞 (1:9286) では腫瘍形成能が低下することがわかった。つまり、N-Myc を発現した造血幹細胞が iCSC となり pre-B LBL を形成することがわかった (図 1)。更に分化にコミットした

前駆 B 細胞から直接腫瘍が形成するのかどうか検討を行ったところ、野生型の前駆 B 細胞からは全く腫瘍が形成されなかったのに対し、腫瘍抑制因子である *Ink4a* 及び *Arf* 遺伝子を欠損した前駆 B 細胞からは腫瘍が直接形成されることがわかった。これらの結果から、より分化した細胞は *Ink4a* 及び *Arf* 遺伝子が *Myc* 発現による iCSC への誘導を防御していることが示唆された。興味深いことに、*Arf* 遺伝子欠損 iCSC から生じた白血病細胞は薬剤抵抗性が高いことが分かった。更に、*Arf* 遺伝子欠損 iCSC から生じた白血病は、*p53* 遺伝子が正常であることから、*Mdm2* の阻害剤である Nutlin が著効であることを、モデルを用いて示した³⁰⁾。

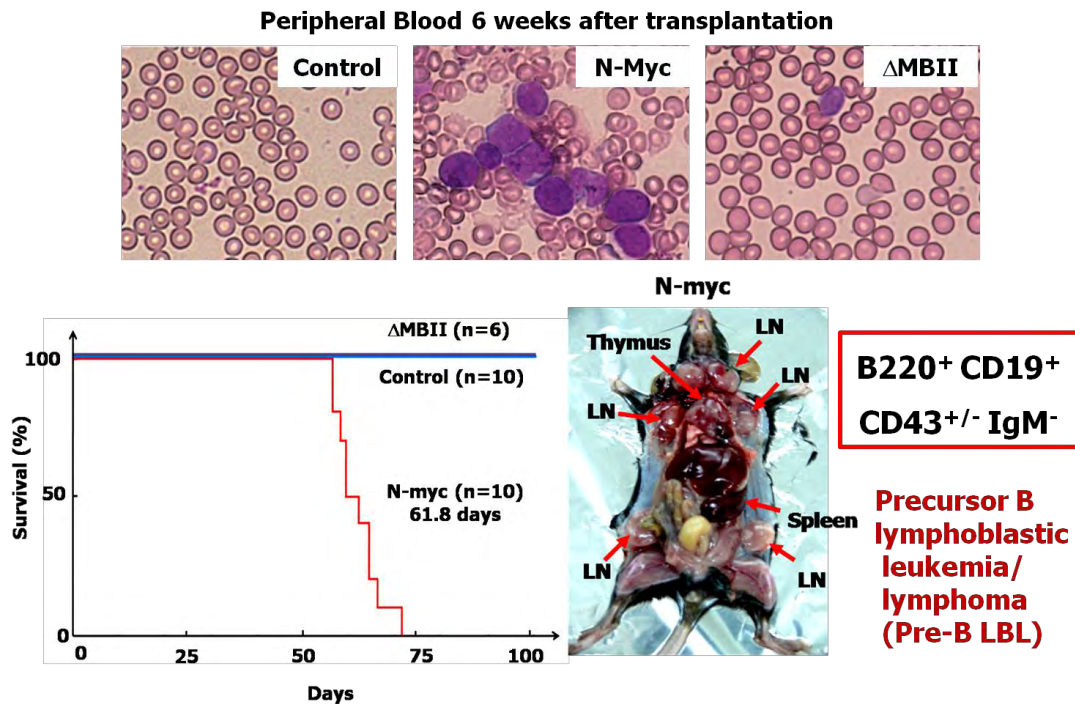


図 1 造血幹細胞を起源とした iCSC によるマウス白血病/リンパ腫モデル

B) 骨肉腫 iCSC のニッチ制御と腫瘍形成性制御機構

- 骨肉腫 iCSC の分化度による腫瘍形成性の変化

【目的】本研究グループはマウス骨髄ストローマ細胞から、*c-Myc* 過剰発現、*Ink4a/Arf*^{-/-} という条件により骨肉腫 iCSC を樹立した。その細胞をシングルセルクローニングしたところ、少なくとも 2 種類の iCSC が存在することが分かった。それら二種類の細胞はそれぞれ分化のレベルが異なり、骨・軟骨の 2 方向への分化能を持った骨軟骨前駆細胞様の iCSC (AX 細胞と命名) は、脂肪・骨・軟骨の 3 方向に分化できる間葉系幹細胞様の iCSC (A0 細胞) より、腫瘍形成能が高いことが分かった。これらの細胞の形質と、その性質を制御する分子機構について解析を行った。

【方法、結果】間葉系幹細胞様の A0 細胞は増殖が遅く、抗癌剤に抵抗性を示すが、マウスに移植すると約 4 カ月を経て脂肪への分化能を失って AX 細胞様となり、腫瘍化することが明らかになった。この研究によって、癌組織中には分化度が変化することによって癌幹細胞としての性質を獲得する、潜在的癌幹細胞 (latent CSCs) が存在することを見出した¹⁴⁾。また腫瘍形成活性の強い CSCs (active CSCs) と latent CSCs は分化を制御する転写因子である *PPAR γ* の発現によって双方向性に変わることが分かり、分化プログラムの変更が腫瘍形成能や薬剤抵抗性を制御するという新たな概念を提示した。更に shRNA ライブラリーを用いることによって (「赤羽グループ」の成果)、*Twist2* の不活化 (発現減少) が A0 から

AX への転換にスイッチとして働くことを見出した。上皮間葉転換を促進する転写因子である Twist2 が低下することでむしろ悪性度が高まるという所見は、上皮細胞における腫瘍進展の理論とは逆説的に見える。しかし、間葉系細胞では Twist2 が発現して正常の幹細胞に近くなることが、腫瘍細胞の増殖を抑える作用をもち、Twist2 が低下して前駆細胞様に変化することが腫瘍の促進に働いていること明らかになった。また Twist2 の発現によって TGF β シグナルの制御因子である fibulin-5 の発現が上昇することを見出し、幹細胞性を維持する分子機構の一つであることが示された。実際の臨床サンプルにおいても悪性度の強い骨肉腫症例では Twist2 の発現低下が全例で見られたことから、Twist2 は骨肉腫悪性化の機能的マーカーとなることが示唆された⁴³⁾。

- 骨肉腫 iCSC の未分化性維持機構

【目的】 AX 細胞を同系マウスに移植することによって形成される骨肉腫は、未分化部分、最終分化像（骨形成部、軟骨形成部）を含み、分化の階層性を示す（図 2）。腫瘍の進展に重要な、未分化で増殖能をもつ細胞は治療の標的であると考えられる。そこで我々はこの骨肉腫幹細胞の未分化性維持機構の解明を目的に実験を行った。

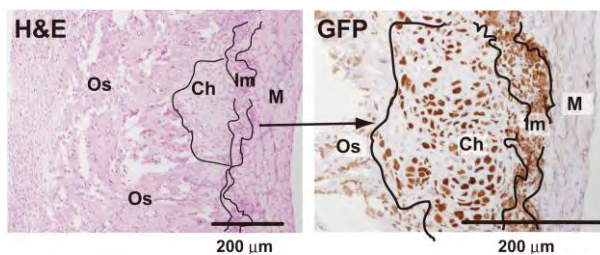


図 2 AX 細胞より形成される骨肉腫(M: 正常筋組織、im:未分化腫瘍、Ch:軟骨形成部、Os:骨形成部)

【方法、結果】我々はまず腫瘍の微小環境が癌幹細胞の未分化性を維持する可能性に注目した。腫瘍組織を、周辺正常組織を含めて採取し single cell に分画したところ、①腫瘍細胞 (AX)、②血液細胞 (マクロファージ)、③ストローマ細胞が得られた (図 3)。微小環境構成細胞であるマクロファージ、ストローマ細胞が分泌する液性因子、及び AX 細胞が発現するレセプターに注目したところ Fgf2、Lif、Igf1 などが候補として考えられた。これらはいずれも in vitro の骨分化 assay (Alizarin RedS 染色) において、分化を抑制することが明らかとなった (図 4)。

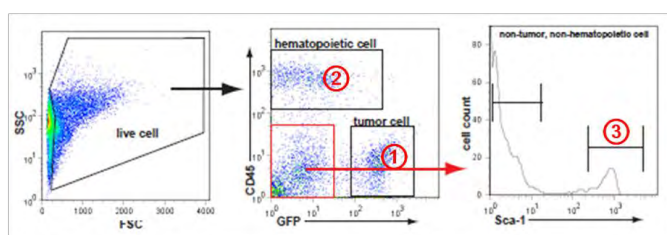


図 3 マウス骨肉腫組織の細胞分画

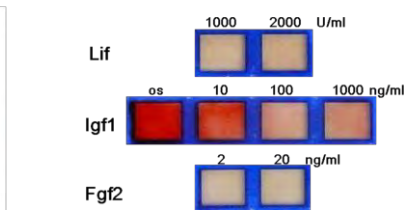


図 4 各種液性因子の骨分化への影響

このうち腫瘍に接して（あるいは腫瘍内に入り込んで）存在する間葉系細胞から分泌される Fgf2 は最も強力に骨分化を抑制し、腫瘍細胞の増殖と浸潤を亢進させることから in vivo において骨肉腫幹細胞のニッチを構成する重要な因子であることが示唆された²³⁾。

- 骨肉腫 iCSC の未分化性維持機構

【目的】 AX 細胞由来の腫瘍組織から単離した細胞 (AXT 細胞) は、AX 細胞同様に骨軟骨前駆細胞様の性質を持つ細胞だが、腫瘍形成能が AX 細胞より遥かに高く、移植したマウスを 20 日以内に死に至らしめる細胞であることがわかった (図 5)。その高い腫瘍形成能力を

規定している分子を同定することを目的として解析を行った。

【方法、結果】マイクロアレイ解析により、AX に比べて AXT において有意に高く発現している 20 の遺伝子を選択した。その中で、腫瘍形成能に機能的に関与し、ヒトの骨肉腫でも発現している遺伝子を 7 つのクライテリアを設定して選択したところ、2 つの遺伝子はそのクライテリアに合致した。そのひとつである *IGF2BP3/Imp3* (以下 *Imp3* と呼ぶ) は iCSC が生体において腫瘍を形成する過程においてその発現が漸増し、発現を抑制することによって完全にマウスにおける腫瘍化を防ぐことができることが分かった (図 6)。更に、AX 細胞に *Imp3* を強制発現することで、AXT 細胞と同様の腫瘍形成能を有する細胞を作製することができた (図 7)。また *Imp3* は RNA 結合たんぱく質であり、その標的 mRNA を同定したところ、クロマチン制御分子と細胞骨格制御分子の mRNA が多く結合していることが分かり、*in vivo* における腫瘍形成能を細胞内の多くの分子とシグナルを一斉にコントロールする分子である可能性があることが分かった³⁶⁾。現在 *Imp3* の活性を反映する cell-based assay system を構築し、その阻害剤スクリーニングを行っている。

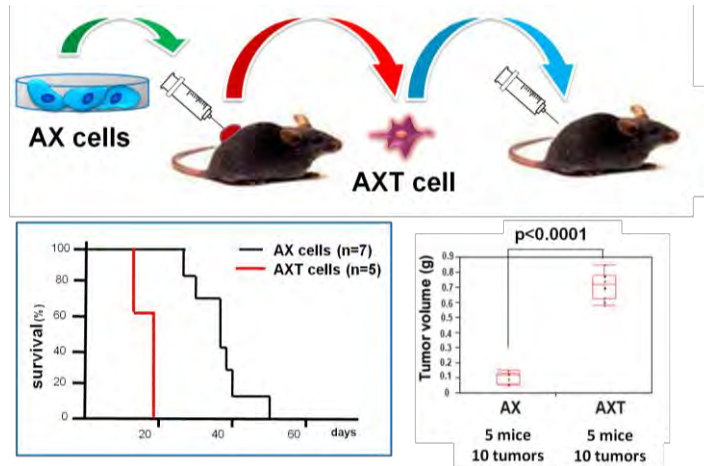


図 5 高度腫瘍形成能を持つ AXT 細胞

漸増し、発現を抑制することによって完全にマウスにおける腫瘍化を防ぐことができることが分かった (図 6)。更に、AX 細胞に *Imp3* を強制発現することで、AXT 細胞と同様の腫瘍形成能を有する細胞を作製することができた (図 7)。また *Imp3* は RNA 結合たんぱく質であり、その標的 mRNA を同定したところ、クロマチン制御分子と細胞骨格制御分子の mRNA が多く結合していることが分かり、*in vivo* における腫瘍形成能を細胞内の多くの分子とシグナルを一斉にコントロールする分子である可能性があることが分かった³⁶⁾。現在 *Imp3* の活性を反映する cell-based assay system を構築し、その阻害剤スクリーニングを行っている。

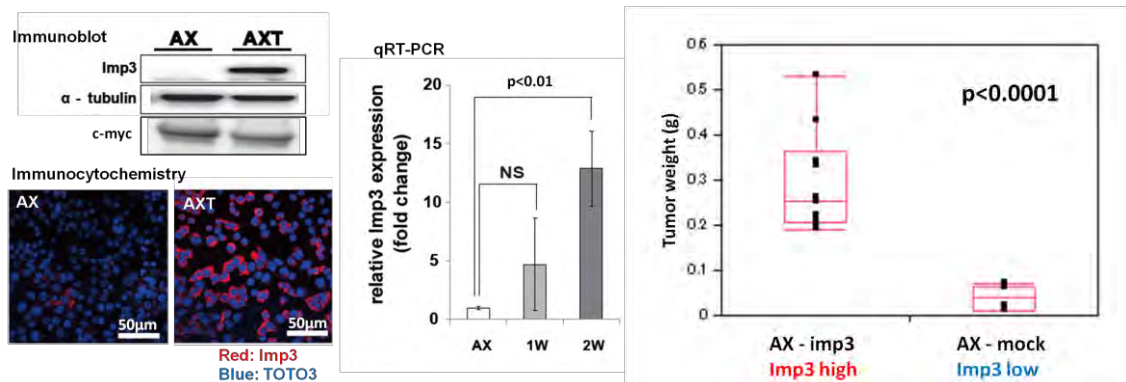


図 6 AXT 細胞特異的発現分子 *Imp3*

図 7 *Imp3* 発現による AX 細胞腫瘍形成性亢進

C) グリオブラストーマ iCSC の樹立と浸潤性、治療抵抗性の解析

- iCSC モデルを用いた浸潤性克服戦略の開発

【目的】本研究は、悪性脳腫瘍グリオブラストーマ iCSC モデルを用い、腫瘍形成及び浸潤過程を可視化することにより、浸潤がもっとも高い時期・細胞を同定し、新たな抗浸潤療法を考案することを目的として行った。

【方法、結果】私達は *INK4a/Arf* -/- マウス由来の神経幹細胞分画に H-Ras を過剰発現させ、形質転換した幹細胞をマウスの前脳に同所移植を行ったところ、全例でヒトのグリオブラストーマに近い組織像を呈する脳腫瘍を形成することに成功した²¹⁾。さらに、このモデルで H-Ras と同時に GFP が発現することを利用し、脳切片培養を用いて腫瘍細胞の追跡を行い、腫瘍形成及び浸潤の経時的な解析を行った (図 8)。腫瘍細胞の異型・増殖が移植 3 週間後より著明になったのに対し、グリオーマ細胞の正常脳への浸潤は移植翌日より始まり、終末期の 5 週目までの全段階で確認された。脳梁方向への浸潤が特に高率に認められ、

また、白質線維及び血管に沿って遊走した腫瘍細胞は複数の増殖巣をつくるのが明らかになった。さらに、運動能には分化度による明らかな差もみられず、浸潤能の低い腫瘍細胞は観察されなかった。

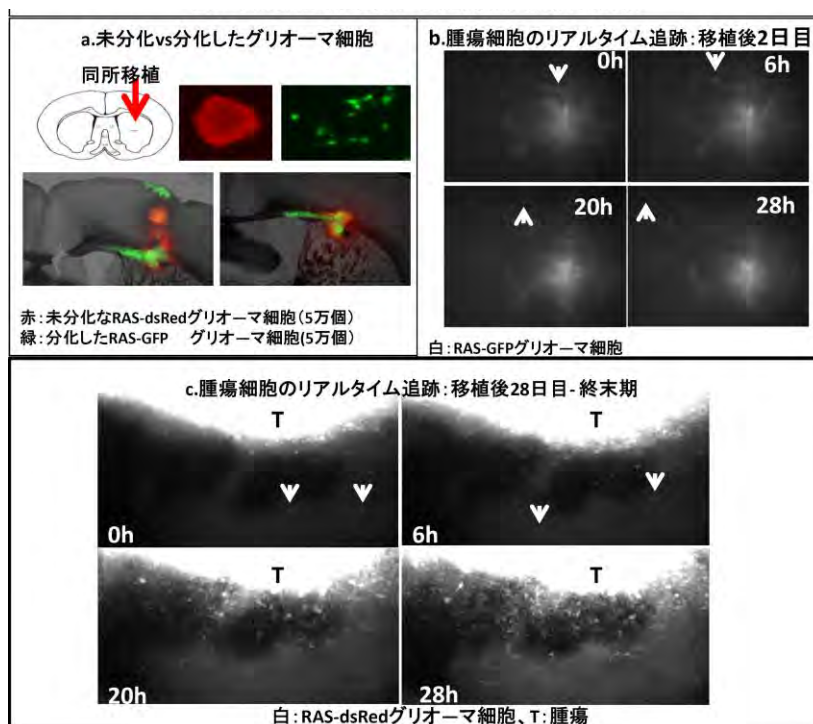


図8 脳切片培養を用いた腫瘍細胞浸潤の解析

・ iCSC モデルを用いた放射線耐性分子機構の解析

【目的】神経膠芽腫は中枢神経系に発生する難治性の悪性腫瘍であり、標準治療としては手術摘出と化学療法、放射線療法が行われている。しかし、標準治療を行なわれた患者のほとんどが短期間に腫瘍の再発をきたし、平均生存期間は1年ほどにしか満たない。そのため、この治療抵抗性を克服する新たな薬剤開発などが求められている現状があった。近年、癌組織内に存在している癌幹細胞といわれる一部の細胞群が、治療抵抗性に対して重要な働きをしていることが知られてきている。神経膠芽腫におけるがん幹細胞である脳腫瘍幹細胞 (Glioma stem cells: GSC) も化学療法や放射線療法への抵抗性に関わることが報告されている。GSCは治療抵抗性のみでなく、高い腫瘍形成能を持つことも知られてきている。そのため、初期治療後にGSCが生存して、その後の再発腫瘍形成をきたすのが、再発の契機になっていると考えられている。そこで、神経膠芽腫の再発阻止のために、このGSCの治療抵抗性に関連した分子メカニズムを解明して、それをターゲットとした治療開発が進められている。我々は標準治療で一般的に行われている放射線治療に注目して、GSCが臨床で行われているような反復放射線照射を受けた際に、誘導される抵抗性メカニズムを解明することを目標としてiCSCを用いて研究を行った。

【方法、結果】がん遺伝子H-Rasを過剰発現したInk4a/Arf-/-神経幹細胞を同系マウス脳に移植することにより神経膠芽腫様腫瘍を形成させ、その腫瘍内からGSCとしての性質をもつ細胞のみを取得し、この細胞(TS)をGSCモデル細胞として利用した。このTSに3-4日ごとに5GyのX線照射を行い、合計60Gy(5Gy×12)後に残存する細胞集団(TS-RR)を獲得した。この二つの細胞群の特徴を比較検討したところ、TS-RRはTSに比べて、強い放射線抵抗性を獲得し、さらに癌幹細胞の特徴である増殖遅延・自己複製能も高まっていた。分子シグナル解析により、TSは放射線照射を繰り返されるにつれて、徐々にIGF1分泌とIGF1受容体(IGF1R)発現の増加をきたすことが分かった。TS-RRにおいては慢性的なIGF1受容体シグナル活性化のため、ネガティブフィードバック機構によるAkt不活性化とForkhead box O3a (FoxO3a)核内貯留が起こっていた。その結果として、TS-RRにおいては定常状態ではFoxO3aを介した幹細胞特性増加が生じ、この細胞増殖静止などにより、放射線によるダメージを回避していることが分かった(図9A)³⁹⁾。

また興味深いことに、この抵抗性細胞に更なる放射線照射を行うと、その急性反応は定常状態とは大きく異なっていた。抵抗性細胞は放射線照射に伴う急激なIGF1分泌をおこし、定常状態で抑制されていたAktが再活性化し、これによってB-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2)を介したアポトーシス回避が誘導された(図9B)。このIGF1シグナルを介した放射線抵抗性機序を抑えるた

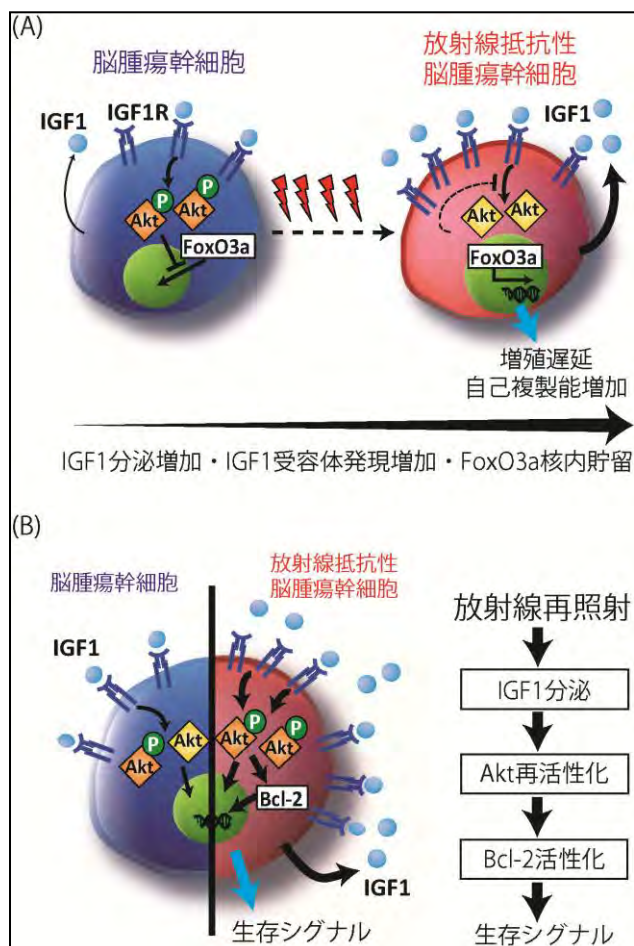


図9 グリオブラストーマ幹細胞におけるIGF1シグナルを介した放射線抵抗性獲得機構

めに、IGF1 シグナル阻害剤を放射線照射と併用すると、TS-RR の放射線抵抗性を減弱できることをマウスモデルにおいて確認した (図 10)。

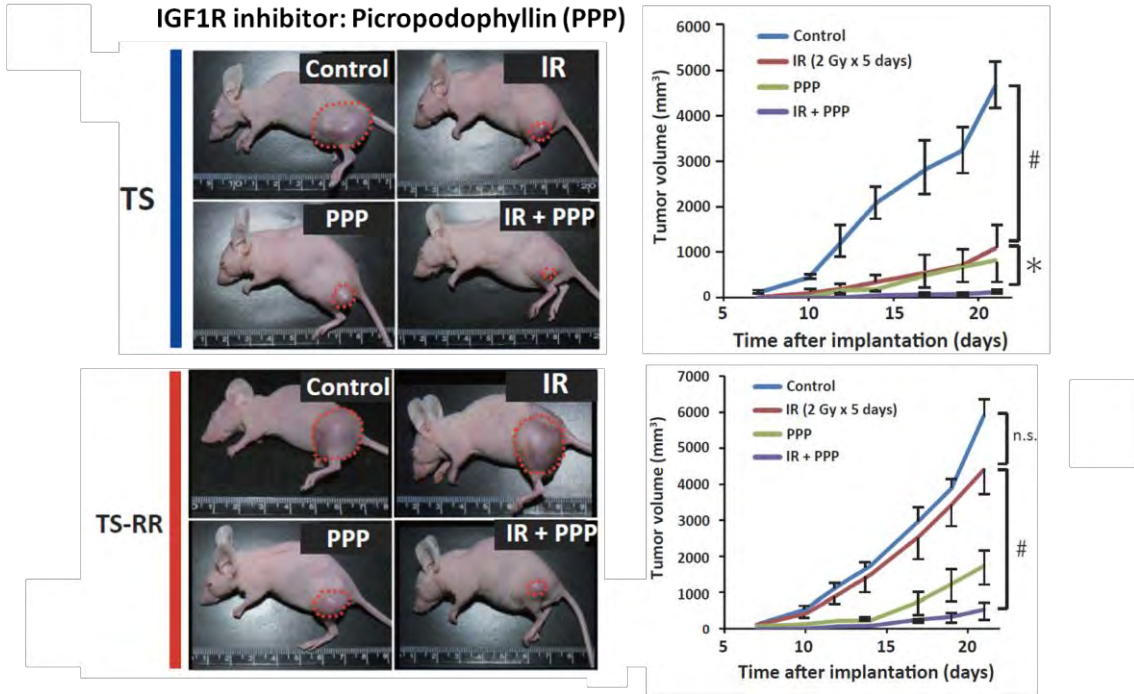


図10 IGF1R 阻害剤による iCSC 放射線耐性の克服

これらの結果より、GSC において IGF1 刺激は古典的な Akt 活性化などによる生存シグナル増強のみでなく、慢性的刺激による活性化ループ下ではネガティブフィードバック機構を介した Akt 不活性化と、FoxO3a 活性化による癌幹細胞の特性と放射線抵抗性を増加していることが判明した。このメカニズムの解明によって神経膠芽腫に対しての IGF1 阻害剤と放射線照射を併用した新規治療が有効であるということを示した。また、この巧妙な機序は、癌幹細胞が長期的な治療刺激下では、ダイナミックな形質転換を起こしていくことを示しており、今後の他臓器の癌幹細胞に対する治療戦略を考える上でも重要な成果と考えられる。

D) 卵巣癌 iCSC の樹立と悪性化形質解析

【目的】本研究は、卵巣癌の発生母地と考えられている卵巣上皮細胞に癌遺伝子を導入することでマウス卵巣癌幹細胞を樹立し、その形質について解析することを目的として行った。

【方法、結果】癌化を抑制することが知られている p53 は正常上皮細胞への癌遺伝子導入の際にも活性化され、人工癌幹細胞の作成において障害となっている。一方で p53 は細胞分化にも関係しており、これまでに報告されているマウス卵巣癌モデルでも p53 遺伝子の不可逆的な不活化によって作製した場合、ヒトの卵巣癌で見られるような分化した組織構築を取らず、未分化癌を形成することが分かっている。また、p53 が正常である細胞株では癌幹細胞を頂点とした階層性の性質をもたないことが我々の解析で明らかになっている²⁾。そこで、我々はヒトの卵巣癌に類似したマウス癌モデルの作製を目的とし、siRNA を用いて p53 の発現を一時的に抑制した後、癌遺伝子導入し、正常卵巣上皮細胞を形質転換できるかについて検討した。まず、幹細胞様性質を有する EpCAM 陽性卵巣上皮細胞を FACS にて分離し、その後 p53 特異的 siRNA をトランスフェクトし、発現を一時的に抑制させた。さらに、siRNA が奏功している間に、癌遺伝子である c-Myc および活性型 K-Ras をレトロウイルスベ

クターを用いて感染させた。その結果、正常卵巣上皮細胞を癌化させることに成功した。

この作成した癌細胞をマウスの卵巣へ移植すると、全例で致死性の卵巣癌が生じることを見出した(図 11)。さらに、このマウスに生じた卵巣癌細胞を腫瘍から分離し、別のマウスに二次移植を行うと同様の卵巣癌を新たに形成することができることから、自己複製能を有する卵巣癌幹細胞を含んでいることも明らかになった。さらに、免疫組織学的検討から、このマウス卵巣癌の組織像はヒトの卵巣癌のうち、漿液性腺癌と類似した特徴を有していることが分かった(図 12)。

以上の結果、p53 の siRNA を用いて一時的な発現抑制を行うことで、正常な卵巣上皮細胞に対して癌遺伝子の導入が可能となり、人工卵巣癌幹細胞を作製することが出来た²²⁾。このモデルでは iCSC において再度 p53 の発現を shRNA を用いて低下させることによって、腹膜浸潤性の強い悪性腫瘍を形成することが分かった。

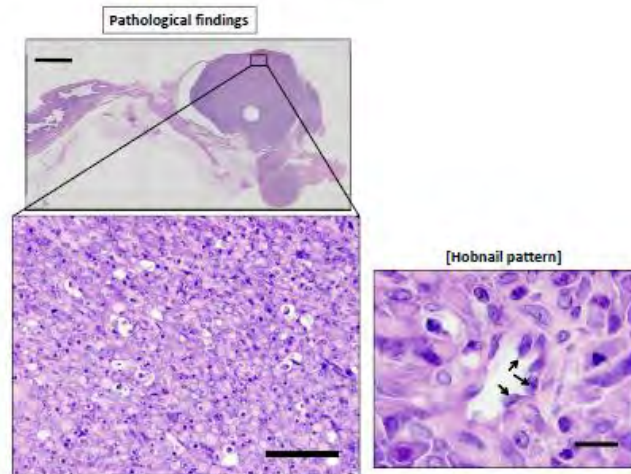


図11 作成したマウス卵巣癌組織の HE 染色

In vivo imaging of induced ovarian cancer

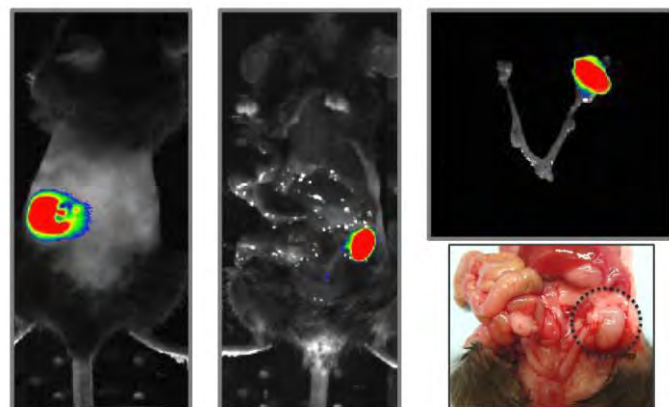


図12 マウス卵巣癌細胞より作成した卵巣癌の生体内イメージング(Integrinsense 750 使用)

2) 胃癌発生マウスを用いた CD44 発現癌幹細胞の機能解析

A) 胃癌発生マウスにおける CD44 発現の意義

【目的】本研究は、上皮性腫瘍の癌幹細胞マーカーとして知られている CD44 の機能的意義を明らかにするために、胃癌自然発症モデル *K19-Wnt1/c2mE* マウスを用いて解析を行った。

【方法、結果】①胃癌幹細胞の候補として考えられている CD44 陽性胃癌細胞について、その性質を明らかにするため、正常マウスおよび胃癌自然発症モデル *K19-Wnt1/c2mE* マウスを用いて解析した。その結果、正常なマウスの胃において、扁平上皮と腺上皮の境目の領域(squamo-columnar junction; SCJ) には、少数の CD44 陽性細胞を含む胃腺が存在していることを見出した(図 13)。また、この CD44 陽性細胞は、癌組織で高発現することが知られている CD44 バリエーションフォームを発現していることや、増殖マーカーを発現しないことが分かった(図 13)。次に、この細胞が、どのような細胞であるかについて検討した。組織幹細胞の多くは、静止期にあるかあるいは非常にゆっくりと増殖する性質を有することが知られており、5-bromo-2'-deoxyuridine

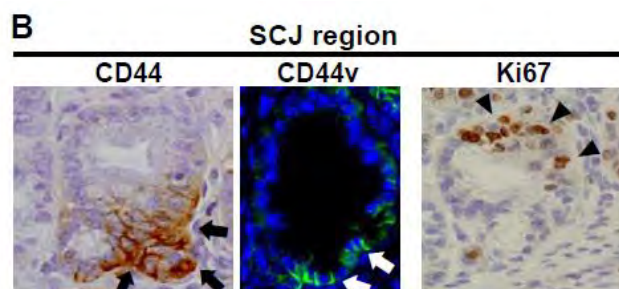


図 13 正常マウス胃 SCJ 領域に存在する CD44 陽性細胞

(BrdU)を取り込ませて標識すると、その BrdU 標識は幹細胞に長期間保持されることが知られている。そこで SCJ 領域に存在した CD44 陽性細胞においてこの幹細胞様性質の有無を調べるために、BrdU 標識を行うと、そこで次に、*K19-Wnt1/c2mE* マウスの胃腫瘍で CD44 陽性癌細胞について同様に BrdU 標識を行い検討した結果、腫瘍において認められる BrdU 長期保持細胞の大部分は CD44 陽性であることが分かった。すなわち、マウス胃癌細胞のうち CD44 陽性群に幹細胞様細胞の多くが含まれていることが分かった。以上より *K19-Wnt1/c2mE* マウスに生じる胃癌は正常マウス胃 SCJ 領域に存在する胃幹細胞あるいは前駆細胞と考えられる CD44 陽性細胞の癌化に伴う拡大によって発生すると考えられた¹⁰⁾。

B) CD44v による癌幹細胞活性酸素抑制機構の解析

【目的】胃癌自然発症モデル *K19-Wnt1/c2mE* マウスを用いた解析から CD44 は癌幹細胞様の細胞に発現していることが確認できた。そこでその機能的意義を分子レベルで明らかにすることを目的として研究を行った。

【方法、結果】これまでに、癌幹細胞では細胞内の活性酸素 (reactive oxygen species: ROS) が低く保たれていることが、癌幹細胞としての性質を維持するために重要であることが知られていた。そこで、CD44 が酸化ストレスへの抵抗性に関わるのではないかと仮定し、実験を行った。まず、CD44 高発現および低発現の消化器癌細胞株を用いて CD44 の発現ステータスと ROS の関連性を解析した。ROS の量を検出できる蛍光プローブ (DCF-DA) を用いて細胞内の ROS を定量化した結果、CD44 高発現株においては細胞内 ROS の蓄積が生じにくく、反対に CD44 低発現株では ROS の蓄積が生じやすいことが分かった。次に、この ROS 量の調節が CD44 によるものかを検証するために、CD44 高発現癌細胞において CD44 の発現を RNA 干渉法 (RNAi) を用いて抑制したところ、細胞内 ROS の蓄積が誘導できるようになることから、CD44 が ROS の蓄積を抑える何らかの機能を有していることが分かった。そこで、次に、その分子機構を解析した結果、非酵素性の抗酸化物質であるグルタチオンの細胞内含有量が CD44 発現抑制により著明に低下し、細胞内 ROS の蓄積を誘導することが分かった。グルタチオン量が CD44 発現によって制御される機構について、さらに解析を進めた結果、CD44 はグルタチオン合成の材料となる細胞外シスチンの取り込みに関わるトランスポーター xCT を細胞膜上で安定化させることで、その機能を亢進させることが判明した。しかも xCT と結合するのは CD44 のスプライズバリエーションフォーム (CD44v) であることが分かった¹⁷⁾。

細胞内 ROS の蓄積は酸化ストレスシグナルである p38MAPK や p21 など細胞死や分化に関連するシグナルの活性化を誘導し、癌の増殖および進展を抑制することが知られている。そこで自然発症型胃癌マウスモデルを解析したところ CD44v が発現している癌細胞では p38MAPK の活性が抑えられていることが分かった (図 14)

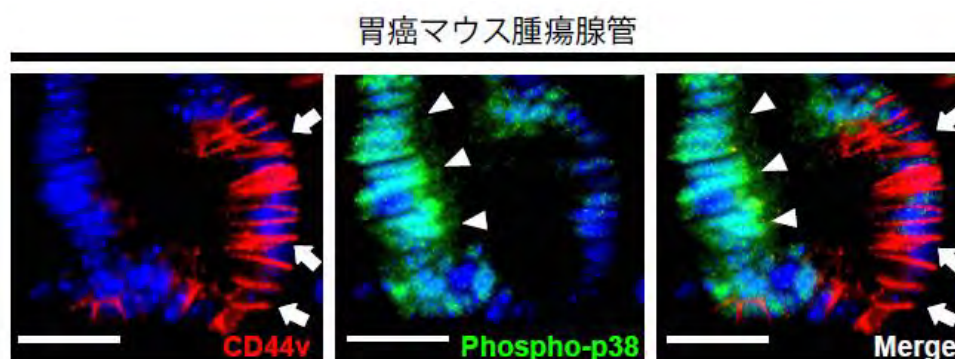


図14 胃癌マウスにおける CD44 陽性癌細胞と p38MAPK 活性化との関係:CD44v 発現細胞 (赤) では ROS によって誘導される p38MAPK の活性化 (緑) が抑えられている

CD44 の癌幹細胞における機能については、「癌幹細胞自身の機能維持」と「ニッチ形成」という両面から解析を行った。前者は佐谷グループで主に行い、後者は土居グループで行った（土居グループの成果は後述）。佐谷グループは、CD44v がシスチントランスポーターxCT と会合し、その結果グルタチオン合成を増加させて細胞内酸化ストレスの低下に寄与していることを見出したが、さらに土居グループとの共同研究で、CD44 が細胞内ドメインでM2型ピルビン酸キナーゼと会合し、その活性を抑制することによって細胞内代謝を変化させ、より還元型グルタチオンの合成を高めているという所見を得た（図 15）²⁵⁾。つまり癌幹細胞では CD44v の高

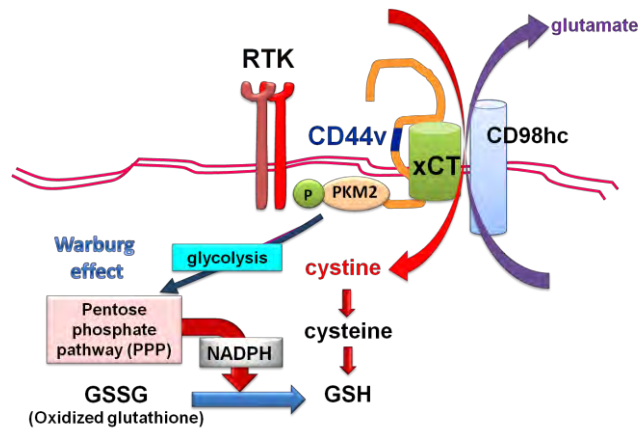


図 15 CD44 による還元型グルタチオン合成促進機構:CD44はxCT安定化を介するシステイン量の増加と、解糖系を活性化することによるNADPH産生量増加の2つの機構でGSH量を増加させる

発現によって酸化ストレスが抑えられるために、治療に対する抵抗性が高まると考えることができる。この概念に基づけば、CD44v の発現抑制や、CD44v-xCT 間の相互作用の抑制、更には xCT トランスポーターの機能阻害は、細胞内の酸化ストレス上昇を招き、治療効果を高めることができると考えられる。

関節リウマチあるいは潰瘍性大腸炎の薬剤として長く使用されてきたスルファサラジンは、xCT トランスポーターを阻害する活性を有することが分かったので、胃癌モデルマウス及び CD44v 高発現大腸癌細胞を移植したマウスにスルファサラジンの投与を行い、その腫瘍形成抑制効果を検討した^{17, 47)}。その結果、単剤投与でもこれら2つのマウスモデルにおいて、腫瘍細胞の分化が誘導され、有意な腫瘍形成抑制作用が見られた。更に低用量のシスプラチンとの併用によって顕著な腫瘍抑制効果を得ることができた。

C)CD44v による癌幹細胞転移機構とスプライス制御機構の解析

【目的】癌幹細胞が転移の起源細胞になると考えられているが、その確固たる証拠はない。本研究は、CD44v の発現によって酸化ストレスが抑制されることが癌の転移を促進するかについて、そしてその分子メカニズムを説明することを目的として行った。

【方法、結果】高転移性のマウス乳癌細胞株 4T1 細胞と、4T1 細胞と同一の遺伝子背景を有する低転移性あるいは非転移性の乳癌細胞株 (4T07 細胞、168FARN 細胞、67NR 細胞) を用いて、CD44v の発現を確認したところ、高転移性である 4T1 細胞のみ CD44v が発現していた。さらに 4T1 細胞は、CD44v 陽性細胞と、CD44v 陰性で CD44 スタンダードフォーム (CD44s) 陽性細胞の 2 種類の細胞画分に分離出来、それらをそれぞれマウス乳腺へ同所移植した後に、肺への転移の有無や転移巣の大きさについて検討したところ、両群とも原発巣の大きさについては、ほとんど変わらない

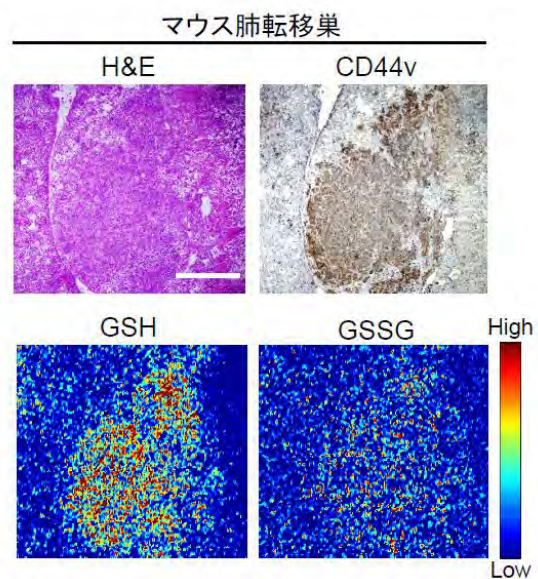
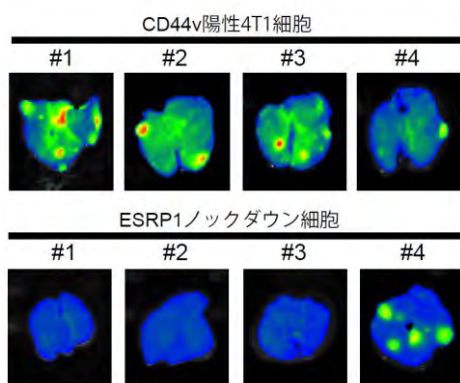


図 16 マウス肺転移巣における CD44v 発現と GSH の質量分析イメージング像

ものの、肺転移能は CD44v 陰性細胞に比べて、CD44v 陽性細胞で明らかに高いことが分かった。

グルタチオンによる抗酸化作用と肺転移との関係を明らかにする目的で、転移巣における CD44v 陽性細胞のグルタチオン (GSH) 量を質量分析イメージング法により検討したところ、CD44v を高発現する肺転移巣では明らかに GSH が多く含まれていることが分かった (図 16)。

さらに、CD44 mRNA の選択的スプライシングの制御因子である ESRP1 タンパク質の発現を、shRNAi を用いて抑制すると、xCT の細胞表面における発現および細胞内 GSH 含有量は著明に低下し、その結果、CD44v 陽性 4T1 細胞の肺転移を著明に抑制できることが分かった (図 17)。またスルファサラジンによっても同様に肺転移を抑制できることなどから、ESRP1 タンパク質によって促進される CD44v の発現は、xCT の細胞膜における発現を上昇させることで抗酸化物質 GSH の合成を促進し、乳癌細胞が転移の過程で受ける酸化ストレスに対して抵抗性を高め、転移を促進することが分かった。



次に転移性乳癌細胞における ESRP1

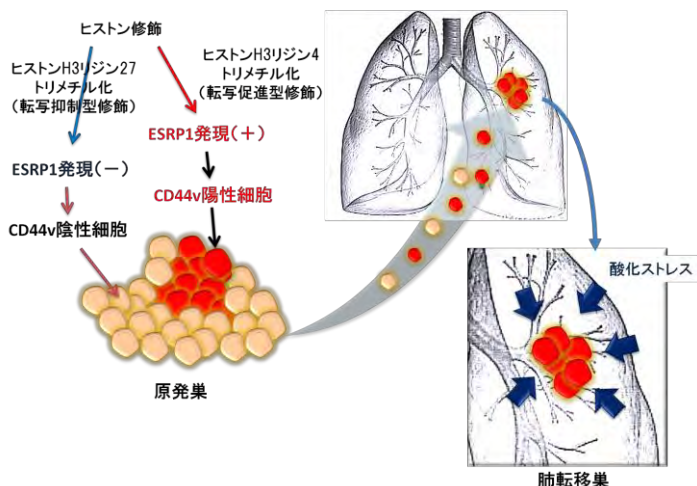


図 17 ESRP1 発現低下による肺転移の抑制

図 18 CD44v 発現制御機構と肺転移の関係

の発現制御機構について調べた。近年、エピジェネティックな制御機構、特にヒストン修飾が選択的スプライシングの制御に重要であることが見出されているので、ESRP1 のエピジェネティックな制御機構について検討を行った。その結果、CD44v 陽性 4T1 細胞と CD44v 陰性細胞の ESRP1 の発現には ESRP1 遺伝子座のヒストン修飾の変化が関連していることが分かった。これらの結果から、CD44 を介した酸化ストレス抑制機構は、腫瘍の増大や治療に対する抵抗性のみならず、癌の転移にも寄与していることが判明した (図 18)³²⁾。本研究によって、CD44v の発現が高い癌においては CD44v や xCT を標的とした治療を行うことで、癌幹細胞および転移性乳癌細胞を標的とした治療法を開発できる可能性が示された。また、ESRP1 のエピジェネティック制御という新たな CD44v 発現制御機構の解明は、転移性乳癌細胞に対する治療の新規標的分子の発見に繋がることが予想され、癌転移治療薬開発において大変重要な意義を持つと考えられる。

以上の研究成果に基づき、平成 25 年 4 月より、スルファサラジンを用いた進行胃癌患者を対象とした医師主導型臨床第一相試験をスタートした (責任者: 独立行政法人国立がん研究センター東病院消化器内科 土井俊彦)。我が国で最初の癌幹細胞を標的とした薬剤の安全性を確かめる臨床試験であり、4 つの臨床施設が参加した。11 例のエントリーがあり、既に試験を終了した。

4) ヒト細胞を用いた iCSC の作製

【目的】 マウス正常細胞から遺伝子導入によって iCSC 作製に成功したので、その技術を基盤にしてヒト正常細胞を起源とした iCSC の作製を行う。そして腫瘍化の過程で生じる形質、ゲノム、エピゲノムの変化を経時的および網羅的に解析し、発癌と治療抵抗性などのイベントを制御する分子機構について解析することを目的として本研究を行った。

【方法、結果】

①ヒト細胞から腫瘍を形成するには、不死化のステップが必要であることが知られているため、まず SV40 により不死化したヒト正常絨毛上皮細胞 HTR8/SVneo にレトロウイルスを用いて *HRASV12* 遺伝子を導入した HTR8/SVneo/*HRASV12*/EGFP 細胞は、control 細胞である HTR8/SVneo/EGFP では腫瘍形成を認めなかったのに対し、ヌードマウスへの皮下移植により全例で致命的腫瘍形成能を示した。その中から腫瘍形成能、自己複製能、多分化能を有する細胞 iC3-1 (induced choriocarcinoma cell-1) をクローニングし皮下移植したところ、致命的腫瘍形成能を示すと同時に、その腫瘍は病理学的に syncytiotrophoblasts と cytotrophoblasts による絨毛癌に特徴的な two cell pattern を示し、免疫染色では hCG 陽性、hPL 陰性であり、臨床検体を模倣する絨毛癌モデルであることが分かった²⁰⁾。

マイクロアレイ解析や定量的 RT-PCR、免疫組織化学染色などを行った結果、絨毛癌浸潤、転移機構に MMP(matrix metalloproteinase) family や EMT(epithelial-mesenchymal transition) が関与している可能性が示唆された。また iC3-1 細胞で高発現している *SOX3* 遺伝子を knock down した iC3-1/sh *SOX3* は、control 細胞と比較して有意に細胞増殖能および腫瘍形成能が抑制され、皮下移植ヌードマウスは生存期間が有意に延長した。

5) 分化制御による癌幹細胞の正常化

【目的】 骨肉腫モデルの研究を通して、骨肉腫細胞を脂肪細胞に分化させることでその腫瘍原性を抑制できることが分かった¹⁴⁾。土居グループとの共同研究で、骨肉腫細胞に脂肪分化誘導のマスターレギュレーターである *PPAR γ* 遺伝子を誘導発現できる薬剤の探索を行ったが、残念ながら目標の化合物を取得することはできていない。そこで、前駆脂肪細胞を用いて脂肪細胞分化を誘導するための新たな分子機構について基礎的な検討を行った。

【方法、結果】 細胞は分化に伴ってそれぞれの機能細胞に特徴的な形態へと変化することが知られている。細胞の形態は、主にアクチン細胞骨格によって決定される。脂肪細胞分化におけるアクチンの動態は、分化誘導前においてはアクチンファイバーが観察されるが、分化誘導後の脂肪細胞では分解され、表層アクチンへと再構築される。しかしながら、*PPAR γ* を介した脂肪細胞分化においてアクチン細胞骨格の再構築がどのような役割をもつのかについて未だ不明である。

本研究では、脂肪細胞分化におけるアクチン細胞骨格の経時的変化とその役割について検討を行った。前駆脂肪細胞は分化誘導 24 時間以内にアクチンファイバーを崩壊させ、48 時間後で脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである *PPAR γ* を発現したのち、脂肪細胞特有の表層アクチンを形成した。また、アクチンファイバーの崩壊を阻害すると、*PPAR γ* の発現および脂肪滴の蓄積が有意に減少した。次に、アクチンファイバーの形成を制御する RhoA/ROCK シグナルが脂肪細胞分化においてアクチン細胞骨格の再構築を制御し、*PPAR γ* の発現に関与するかを確かめた。内因性 RhoA の活性は、分化誘導 24 時間以内に急速に減少した。さらに、前駆脂肪細胞に活性型 RhoA を強制発現させたのち、脂肪細胞へと分化誘導すると、アクチンファイバーが維持され、*PPAR γ* の発現は抑制されたが、これに ROCK 阻害剤である Y-27632 さらにはアクチン重合阻害剤であるサイトカラシン D (CytD) を添加するとアクチンファイバー

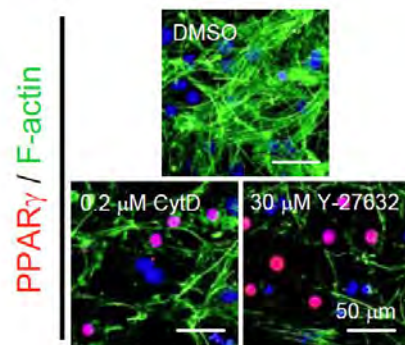


図 19 細胞骨格制御による *PPAR γ* 発現誘導

は崩壊し、その結果 PPAR γ の発現は回復した (図 19)。以上より、RhoA/ROCK シグナルの不活性化がアクチンファイバーの崩壊を促し、PPAR γ の発現および脂肪細胞分化を直接的に誘導することが強く示唆された。

アクチン結合性転写活性化因子である MKL1 は、G-アクチンが直接結合することによって核移行が阻害され、標的遺伝子のプロモーターに結合できないためにその転写活性化を阻害すること、一方、アクチン重合に伴って G-アクチン量が減少すると、MKL1 はアクチンから解離したのち、核内に移行し、標的遺伝子の転写活性を促進することが知られている (Miralles et al., Cell, 2003)。そこで、我々はアクチン動態が脂肪細胞分化を直接制

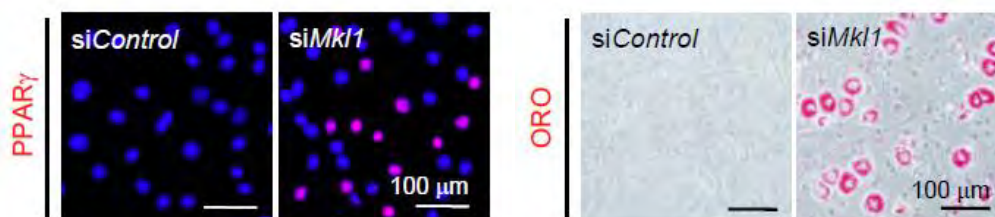


図 20 MKL1 のノックダウンによって誘導される脂肪細胞分化

御する機構を明らかにするために、脂肪細胞分化過程における G-アクチンおよび MKL1 の発現局在の変化について調べた。その結果、MKL1 は分化誘導前まではほとんどが核に局在したが、誘導 24~48 時間後にかけて細胞内の G-アクチン濃度が急激に増加し、MKL1 の核移行が阻害された。また、CytD あるいは Y-27632 によって細胞内 G-アクチン濃度を上げると、MKL1 の核移行が阻害され、分化誘導剤を添加しなくても PPAR γ の発現が誘導され、脂肪細胞へと終末分化した。次いで、我々はタモキシフェン依存的に核内移行可能な ER-MKL1 発現ベクターを導入し、脂肪細胞分化に及ぼす影響について検討した。その結果、タモキシフェンにより MKL1 の核内移行を誘導することにより、脂肪細胞分化は有意に減少した。また、G-アクチンとの結合ドメインを欠損させた MKL1-N100 を強制発現させると、脂肪細胞分化は完全に抑制された。さらに、我々は、前駆脂肪細胞および分化能を持たない線維芽細胞において MKL1 をノックダウンすると、In vitro だけでなく In vivo においても脂肪細胞への分化が誘導されることを見出した (図 20)。また、我々は、脂肪細胞分化過程において PPAR γ が MKL1 の遺伝子発現を抑制し、PPAR γ と MKL1 は相互排他的に制御し合うことを明らかにした。

以上の結果から、アクチン動態による MKL1 の制御が脂肪細胞分化をトリガーすることが明らかとなり、MKL1 は新規の脂肪細胞分化のゲートキーパーであることが示唆された (図 21)。本研究の結果は、『細胞のかたちが転写因子の制御を介して、細胞分化を直接制御する』という細胞生物学の常識を覆す新たな概念に基づくものであり、今後、細胞骨格作動薬が、幹細胞や癌の分化を制御することによって、疾患の治療薬として使用される可能性がある。現在、細胞骨格制御と骨肉腫の脂肪分化に関して研究を進めている (論文リバイス中)。

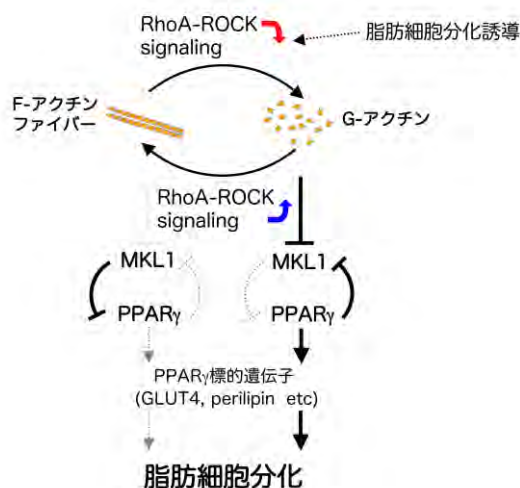


図 21 アクチン重合制御による脂肪細胞分化誘導

(2) 「土居」グループ

①研究のねらい

1) IVV 法による CD44-HMWHA のニッチ機構解析

【目的】CD44 と高分子量ヒアルロン酸 (HMWHA) の結合が癌幹細胞の未分化性維持に働いているという所見に基づき、CD44-HMWHA がどのような分子機構で癌幹細胞の分化を抑制しているかについて iCSC を用いて明らかにすることを目的とした。具体的には、当研究室で開発された *In vitro virus* (IVV)法を用いて CD44 に結合する分子のセレクションを行い、癌幹細胞における CD44 の新たなシグナルネットワークを明らかにすることで、ニッチ機構の解明につなげる。

【方法および結果】研究分担者らが独自に開発した IVV 法を用いて、ヒト・グリオーマ細胞 U251 または AX 細胞由来の cDNA ライブラリーの中から、CD44 細胞内ドメイン (CD44ICD) に結合する因子のアフィニティーセレクションを行なった。このとき、従来のアフィニティービーズを用いた方法とともに、マイクロ流体チップを用いた新たな手法も併用した。その結果、CD44ICD 結合因子として、腫瘍内糖代謝に関与する酵素ピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2)、基本転写因子 GTFIIi、および、クロマチンのリモデリングに関与する複合タンパク質 (FACT) の構成因子 SPT16 が得られた。

いくつかの PKM2 欠失変異体を用いた試験管内結合アッセイの結果、CD44ICD は PKM2 の全長および IVV 法により選択された N 末端側 61 アミノ酸に直接結合することが明らかになった (図 22)。さらに、佐谷グループとの共同研究により、CD44ICD が PKM2 と会合し、その活性を抑制することでペントースリン酸経路への流入を増加させ、その結果 NADPH の産生が促進され、還元型グルタチオンの合成が高まることが明らかになった²⁵⁾。つまり、癌幹細胞では CD44 の高発現によって酸化ストレスが抑えられるために、治療に対する抵抗性が高まると考えられる

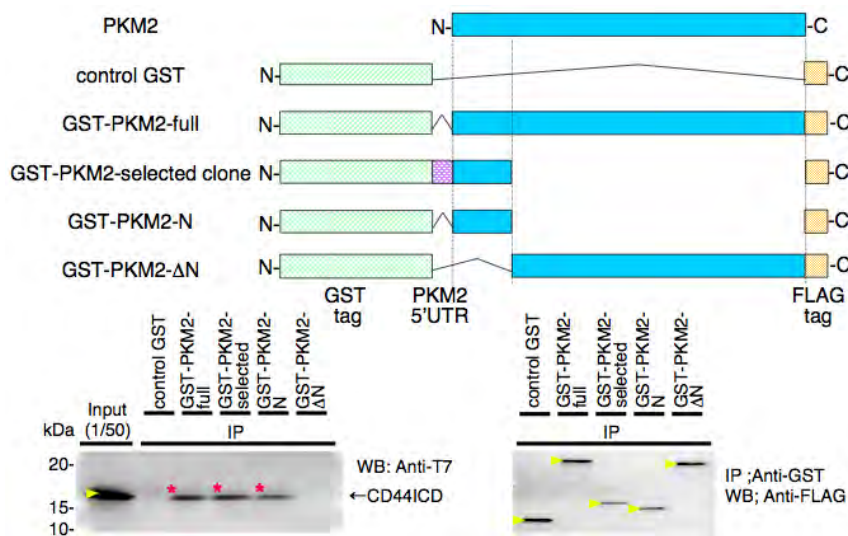


図 22 : CD44ICD と PKM2 の相互作用

GTFIIi については、U251 細胞を用いた TPA 処理により生成される CD44ICD と内在性の GTFIIi との結合実験の結果、TPA 処理により生成される CD44ICD との結合は見られなかったものの、細胞質画分において全長 CD44 および CD44 の膜貫通領域および CD44ICD を含む領域 (CD44EC1P ; Ectodomain Cleavage-like Products) との結合が、核画分においては CD44EC1P との結合が見られた。CD44ICD や CD44EC1P の transactivation の機能は GTFIIi を介している可能性が考えられる。

SPT16 については、SSRP1 とヘテロダイマーを形成し、ヒストン H2A と H2B を介してヌクレオソームに結合してヒストン・DNA 間の相互作用を弱め、クロマチンのリモデリングを促

進するという知見を踏まえ、競合阻害実験を行った。その結果、SSRP1 は濃度依存的に CD44ICD (ベイト) と SPT16 の結合を阻害し、また、SPT16 をベイトとした場合、SPT16 と SSRP1 は濃度依存的に結合し、その結合は CD44ICD によって阻害されることがわかった。この結果は、FACT のクロマチンリモデリングを伴う転写伸長促進作用を CD44ICD が制御する可能性を示唆している。株のさらなる単離精製を進め、新規化合物であるかを明らかにし、それらの作用機序の解明を進めている。

2) iCSC を用いた癌幹細胞の機能抑制剤と分化能転換剤の探索

【目的】 iCSC の腫瘍形成能を抑制し、脂肪細胞へと分化誘導できる薬剤の探索を行うことを目的とした。

【方法および結果】 佐谷らが樹立した骨肉腫 iCSC には、骨および軟骨への分化能力を有する AX クローンと、骨・軟骨・脂肪の3方向に分化能力を有する A0 クローンが存在する。AX は A0 に比べて腫瘍形成能と自己複製能が高いのに対して、A0 は転写因子 PPAR γ が有意に高く、脂肪分化能を失い PPAR γ が低下した場合に、AX 化して腫瘍形成性が上昇する。以上の所見に基づき、AX から A0 への変換を評価できる cell-based assay を確立し、種々のケミカルライブラリーを用いて、AX (実際には AX の性質がより顕著である AXT クローンを用いた) に対する選択的細胞毒性と脂肪細胞誘導活性を指標に化合物のスクリーニングを行った。その結果、フタルイミド誘導体 TC11²⁹⁾ と、アニリノキナゾリン誘導体 Q15²⁹⁾ および Q50 が人工癌幹細胞に対して顕著な選択的毒性を示すことがわかった(図 23)。しかし、これらの化合物の脂肪細胞誘導活性は低かった。Q15 の作用機序を解明する目的で、標的タンパク質の探索を IVV 法により行ったところ、MIP-2A (MBP-1 interacting protein-2A) が同定された。Q15 は MIP-2A と MBP-1 (c-Myc promoter-binding protein-1) との結合を阻害し、MBP-1 の核移行を阻害し、その結果 c-Myc の mRNA の発現を減少させることで、アポトーシスを誘導することがわかった⁴⁹⁾。

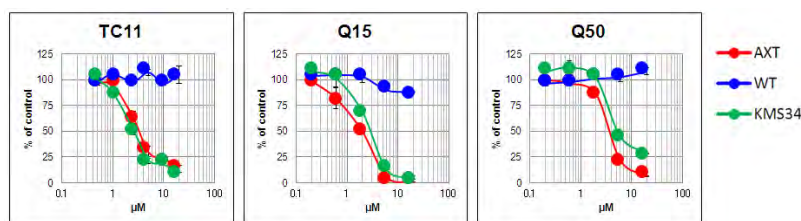


図 23 薬剤 TC11、Q15 および Q50 による細胞増殖阻害(2 days)

さらに、全部で 45 種類のアニリノキナゾリン誘導体について AXT 細胞に対する増殖阻害活性を評価した後、AXT 細胞の増殖阻害活性を示さない濃度において遊走活性を評価した。その結果、化合物 Q50 は AXT 細胞の遊走活性を顕著に阻害した。そこで、Q50 について AXT 細胞に対する増殖阻害活性と遊走活性を詳細に調べた結果、増殖を阻害しない濃度で AXT 細胞の遊走活性を顕著に阻害した(図 24A, B)。さらに、Q50 はマウス肉腫から抽出した基底膜を使った AXT 細胞の浸潤活性をも強く阻害した。以上の結果、新規アニリノキナゾリン誘導体 Q50 を抗癌幹細胞薬の候補化合物として選出することができた。マウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性の評価を実施する目的で、Q50 を計 5 ステップで合成し、動物実験用のサンプルを大量調製できた。合成標品を用いて AXT 細胞と WT 細胞に対する遊走活性を評価したところ、AXT 細胞の遊走活性だけを顕著に阻害することが分かった(図 24C, D)。

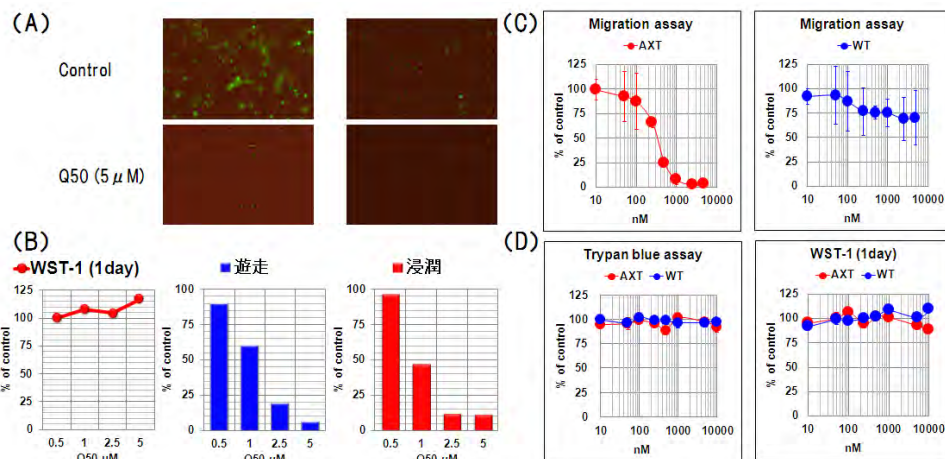


図 24 アニリノキナゾリン誘導体 Q50 の活性評価

(A) Q 50 による AXT 細胞の遊走実験(左)、浸潤実験(右)の顕微鏡画像 (B) Q50 の WST-1 による細胞増殖阻害活性(1day)(左)、各濃度での Q50 による AXT 細胞の遊走阻害活性(中央)、浸潤阻害活性(右) (C) 合成 Q50 標品の AXT 細胞(左)と WT 細胞(右)の遊走阻害活性 (D) 合成 Q50 標品のトリパンプルーアッセイによる細胞毒性試験(左)と活性 WST-1 による細胞増殖阻害活性(1day)(右)

マウスを用いた増殖や転移などの抗腫瘍活性の評価において、従来の投与方法では沈殿が生じてしまい、化合物が肝臓等に析出するなどの問題が生じたが、Q50 をポリオキシエチレンソルビタンモノオレートで溶解したところ、沈殿が生じなくなった。そこで、Q50 に加え、フタルイミド誘導体 TC11 およびアニリノキナゾリン誘導体 Q15 についても再度 AXT 細胞、WT 細胞、ヒト多発性骨髄腫細胞株 (KMS-34) に対して WST-1 アッセイによる *in vitro* での細胞増殖阻害活性を確認した上で、マウスを用いた増殖や転移などの *in vivo* 抗腫瘍活性の評価を実施した。その結果、アニリノキナゾリン誘導体 Q15 と Q50 は腫瘍重量がコントロールと比べ減少していたが、TC11 はコントロールに比べ有意差が見られなかった。特に、Q50 はコントロールに比べて半分程度まで癌の増殖を抑制した。Q50 のマウス血中動態を調べた結果、薬物動態パラメータは、30 mg/kg の投与時に $C_{max} = 5.9 \mu M$ ($2.69 \mu g/ml$), $T_{max} = 2h$, $T_{1/2} = 3.6h$ 、10 mg/kg 投与時に $C_{max} = 1.0 \mu M$ ($0.46 \mu g/ml$), $T_{max} = 1h$, $T_{1/2} = 1.8h$ となった。

さらに、5000 種の化合物からなるケミカルライブラリーから人工癌幹細胞 (AXT) に対し強い毒性を示すものを 1 次スクリーニングし、WST-1 アッセイ値が化合物無添加のコントロールと比較し 30% 未満を示した化合物 108 個を選択した。2 次スクリーニングでは AXT 細胞と WT (マウス骨髄ストローマ由来正常細胞) に対して WST-1 アッセイで細胞毒性を評価し正常細胞に障害を与えず、AXT 細胞をより強く殺傷する 3 化合物 (YTS-P34、YTS-P43、YTS-P44) が選択された。また AXT 細胞を分化誘導培地で培養し脂肪細胞への分化誘導を強く起こし oil red 染色される 5 化合物 (YTS-P34、YTS-P43、YTS-P29、YTS-P39、YTS-P76) が選択された。

また、土壌サンプルより単離した放線菌の培養液 47 株を新たに評価した。AXT 細胞に対する選択的毒性を示した 2 株のうち 2011-K15 は溶媒抽出、シリカゲルカラムクロマトグラフィ、C18 逆相 HPLC により活性ピークを同定した (図 30A, B)。また、AXT 細胞が脂肪細胞への分化誘導を示した 2 株 (2010-K4、2011-K9) はオイルレッド O 染色陽性だけでなく PPAR γ の発現を誘導した (図 30C-G)。2011-K9 から C18 逆相 HPLC により 4 成分を単離精製し NMR、MS スペクトルの解析および HPLC 分析によりイソフラボン類であるグリシテイン、カリコシン、ゲニステイン、プラテンセインを同定した (図 30H)。ゲニステインは AXT 細胞に対しオイルレッド O 染色陽性を示し、PPAR γ の発現も誘導した。ゲニステイン類は前立腺癌、子

宮頸癌、脳腫瘍、乳癌及び大腸癌の防止効果を有しており、またエストロゲン受容体に作用することが知られている。イソフラボン類は培地成分の大豆の中に配糖体として多く含まれているが、今回は放線菌の作用により糖が切断され活性成分として選択されてきたものと考えられる。また、放線菌代謝物中の脂肪酸が AXT 細胞に対する脂肪細胞への分化誘導の指標であるオイルレッド O 染色に対して陽性を示すが PPAR γ の発現誘導は示さないことが分かった。

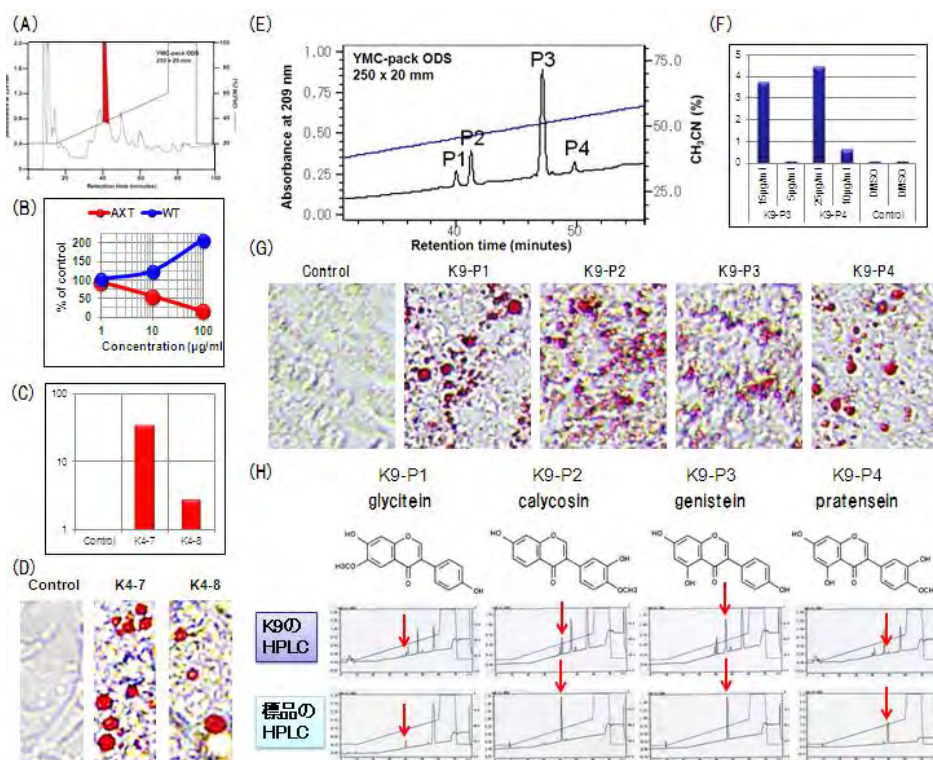


図 30 放線菌 2011-K15、2010-K4、および、2011-K9 の検討結果

(A)2011-K15 の C18 逆相 HPLC (B) 2011-K15 の WST-1 アッセイ (C) 2010-K4 の PPAR γ の発現誘導 (D) 2010-K4 のオイルレッド O 染色 (E) 2011-K9 の C18 逆相 HPLC (F) 2011-K9 の PPAR γ の発現誘導 (G) 2011-K9 のオイルレッド O 染色 (H) イソフラボン類の構造と HPLC 分析

3) CD44-HMWHA 相互作用を標的とした抗ニッチ創薬

【目的】骨肉腫 iCSC および胃癌 iCSC を用いた実験で、CD44 と HMWHA の結合が、癌幹細胞の自己複製能を維持するために必要な因子の一つであるという所見から、CD44-HMWHA がどのような機構で癌細胞の分化を抑制しているのかについて、骨肉腫 iCSC に対する一本鎖抗体を用いて解明することを目的とした。

【方法および結果】一本鎖抗体の IVV ライブラリー存在下で HMWHA コーティングプレート上に接着できない AX 細胞から IVV を回収する方法でセレクションを行った後、さらに CD44 の細胞外領域をマイクロ流体チップに結合させて抗 CD44 一本鎖抗体のセレクションを行い、免疫染色、遊走・浸潤活性等を調べた。その結果、4 種類の重複した配列を得た。この中の 1 つのクローン AXD6-12-54 が AX 細胞の HMWHA コーティングプレートへの接着を最も強く阻害した。一本鎖抗体 AXD6-12-54 は、免疫染色では AX 細胞の表面に結合し(図 31a)、AX 細胞の遊走活性を阻害し(図 31b)、マウス肉腫から抽出した基底膜を使った AX 細胞の浸潤活性も阻害した(図 31c)。また、ウェスタンブロットにより CD44 を特異的に認識した(図 31d)。さらに、CD44 の細胞外領域に対する親和性を SPR により測定した結果、解離定数(K_D)

は 1.6 nM であった。以上の結果より AXD6-12-54 は CD44 に対して高い親和性と特異性を有する一本鎖抗体であり、癌幹細胞と HMWHA との相互作用を阻害し、ニッチを制御可能な抗体であることがわかった。

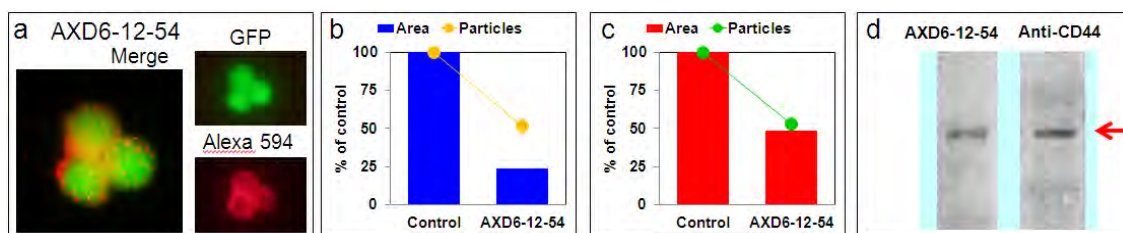


図 31 一本鎖抗体 AXD6-12-54 の活性評価
(a)免疫染色 (b)遊走活性阻害 (c)浸潤活性阻害 (d)ウェスタンブロット

さらに、一本鎖抗体の IVV が結合することで細胞プレートへ接着できない AXT 細胞を回収する方法で一本鎖抗体のセレクションを行なった。7 ラウンドのセレクション後に得られた 2 つのクローン AXT7-30 と AXT7-12 は、AXT 細胞の細胞プレートへの接着を阻害し(図 32A)、免疫染色実験では AXT 細胞に結合していることが確認された(図 32B)。さらに WST-1 アッセイによる増殖阻害実験では濃度依存的に AXT 細胞の増殖を抑えた(図 32C)。CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay により評価した結果、強い殺細胞活性を有し($IC_{50} = 3 \text{ nM}$)、AXT7-30 の方が 3 倍強い活性を有していた(図 32D)。これら 2 つの一本鎖抗体の抗原を探索する目的で、まず CD44 に対する結合を SPR により調べたところ、驚くべきことに両者とも CD44 に対して強い親和性を示した(図 32E)。CD44 に対する親和性と各種生物活性の強さは相関していた。以上のことから AXT 細胞の細胞プレートへの接着には CD44 が関与していることが示唆された。

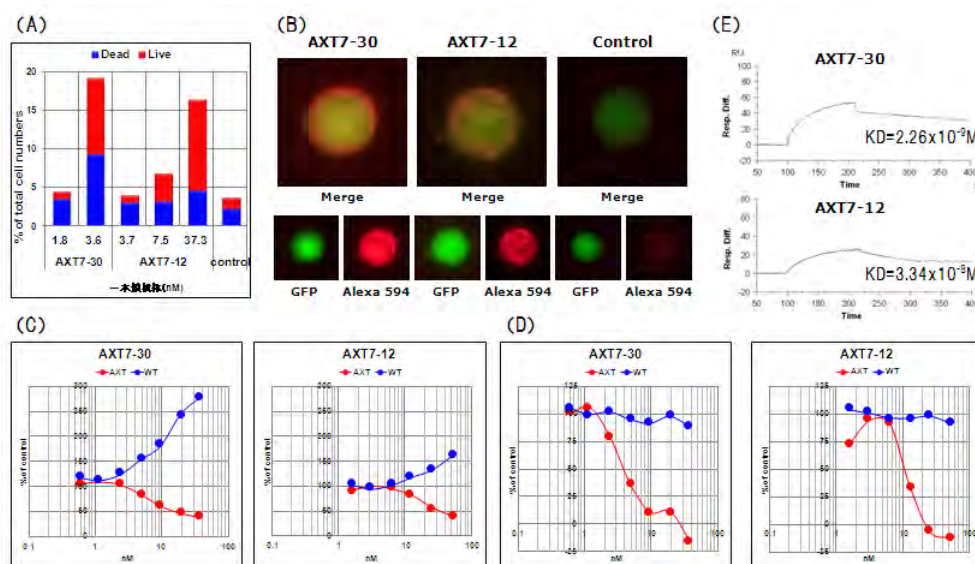


図 32 一本鎖抗体 AXT7-30 および AXT7-12 の活性評価
(A) AXT 細胞の接着阻害活性 (B) AXT 細胞の免疫染色 (C) WST-1 による細胞増殖阻害活性 (D) CytoTox-Glo Cytotoxicity Assay (E) CD44 を抗原とした SPR のセンサーグラムと K_D 値

§ 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0 件、国際 (欧文) 誌 53 件)

1. Sampetean O, Iida S, Makino S, Matsuzaki Y, Ohno K and Saya H: Reversible whole-organism cell cycle arrest in a living vertebrate. *Cell Cycle* **8**: 620-627, 2009 (DOI:10.4161/cc.8.4.7785)
2. Kosugi S, Hasebe M, Matsumura N, Takashima H, Miyamoto-Sato E, Tomita M, Yanagawa H: Six classes of nuclear localization signals specific to different binding grooves of importin α . *J. Biol. Chem.* **284**, 478-485, 2009 (DOI: 10.1074/jbc.M807017200)
3. Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M, Saya H and Suda T: M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J. Exp. Med.* **206**: 1089-1102, 2009 (DOI:10.1084/jem.20081605)
4. Kai K, Nagano O, Sugihara E, Arima Y, Sampetean O, Ishimoto T, Nakanishi M, Ueno N, Iwase H and Saya H: Maintenance of HCT116 colon cancer cell line conforms to a stochastic model but not a cancer stem cell model. *Cancer Sci.* **100**: 2275-2282, 2009 (DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01318.x)
5. Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada J and Hirao A: Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**: 17163-17168, 2009 (DOI:10.1073/pnas.0905016106)
6. Tabata N, Sakuma Y, Honda Y, Doi N, Miyamoto-Sato E and Yanagawa H.: Rapid antibody selection by mRNA display on a microfluidic chip. *Nucleic Acids Res.* **37**, e64, 2009 (DOI:10.1093/nar/gkp184)
7. Sumida T, Doi N and Yanagawa H: Bicistronic DNA display for in vitro selection of Fab fragments, *Nucleic Acids Res.* **37**, e147, 2009 (DOI:10.1093/nar/gkp776)
8. Nagahama Y, Ueno M, Miyamoto S, Morii E, Minami T, Mochizuki N, Saya H and Takakura N: PSF1, a DNA replication factor expressed widely in stem and progenitor cells, drives tumorigenic and metastatic properties. *Cancer Res.* **70**: 1215-1224, 2010 (DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3662)
9. Takahashi E, Nagano O, Ishimoto T, Yae T, Suzuki Y, Shinoda T, Nakamura S, Niwa S, Ikeda S, Koga H, Tanihara H and Saya H: TNF- α regulates TGF- β -dependent epithelial-mesenchymal transition by promoting hyaluronan-CD44-Moesin interaction. *J. Biol. Chem.* **285**: 4060-4073, 2010 (DOI:10.1074/jbc.M109.056523)
10. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H and Nagano O: CD44+ slow-cycling tumor cell expansion is triggered by the cooperative actions of Wnt and prostaglandin E2 in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci.* **101**: 673-378, 2010 (DOI:10.1111/j.1349-7006.2009.01430.x)
11. Matsumura N, Tsuji T, Sumida T, Kokubo M, Onimaru M, Doi N, Takashima H, Miyamoto-Sato E and Yanagawa H: mRNA display selection of a high-affinity, Bcl-XL-specific binding peptide. *FASEB J.* **24**: 2201-2210, 2010 (DOI:10.1096/fj.09-143008)
12. Horisawa K, Imai T, Okano H and Yanagawa H: The Musashi family RNA-binding proteins in stem cells. *Biomol. Concepts* **1**: 59-66, 2010 (DOI:10.1515/BMC.2010.005)
13. Miyamoto-Sato, E., Ishizaka, M., Fujimori, S., Hirai, N., Masuoka, K., Saito, R., Ozawa Y, Hino K, Washio T, Tomita M, Yamashita T, Oshikubo T, Akasaka H, Sugiyama J, Matsumoto Y, Yanagawa H: A comprehensive resource of interacting protein regions for refining human transcription factor networks: Domain-based interactome. *PLoS*

- ONE* **5**: e9289, 2010 (DOI:10.1371/journal.pone.0009289)
14. Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, and Saya H: c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* **29**: 5687–5699, 2010 (DOI:10.1038/onc.2010.312)
 15. Ozawa Y, Saito R, Fujimori S, Kashima H, Ishizaka M, Yanagawa H, Miyamoto-Sato E, Tomita M: Protein complex prediction via verifying and reconstructing the topology of domain-domain interactions. *BMC Bioinformatics* **11**: 350, 2010 (DOI:10.1186/1471-2105-11-350)
 16. Muraguchi T, Tanaka S, Yamada D, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu JI, Saya H, Hamada JI and Hirao A: NKX2.2 suppresses self renewal of glioma-initiating cells. *Cancer Res.* **71**:1135–45, 2011 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2304)
 17. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba H and Saya H: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc⁻ and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* **19**: 387–400, 2011 (DOI:10.1016/j.ccr.2011.01.038)
 18. Ishizawa J, Kuninaka S, Sugihara E, Naoe H, Kobayashi Y, Chiyoda T, Ueki A, Araki K, Yamamura K, Matsuzaki Y, Nakajima H, Ikeda Y, Okamoto S and Saya H: The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Sci.* **102**: 967–974, 2011 (DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.01884.x)
 19. Shiheido H, Takashima H, Doi N and Yanagawa H: mRNA display selection of an optimized MDM2-binding peptide that potently inhibits MDM2-p53 interaction. *PLoS ONE* **6**:e17898, 2011 (DOI:10.1371/journal.pone.0017898)
 20. Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D and Saya H: Establishment of a choriocarcinoma model from immortalized normal extravillous trophoblast cells transduced with HRASV12. *Am. J. Pathol.* **79**: 1471–1482, 2011 (DOI:10.1016/j.ajpath.2011.05.019)
 21. Sampetean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A and Saya H: Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. *Neoplasia* **13**: 784–791, 2011 (DOI: 10.1593/neo.11624)
 22. Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H and Nagano O: Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. *Carcinogenesis* **32**: 1597–1606, 2011 (DOI:10.1093/carcin/bgr183)
 23. Shimizu T, Ishikawa T, Iwai S, Ueki A, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyamoto T, Toyama Y, Ijiri H, Mori H, Matsuzaki Y, Yaguchi T, Nishio H, Kawakami Y, Ikeda Y and Saya H: Fibroblast growth factor-2 (Fgf2) is an important factor that maintains cellular immaturity and contributes to aggressiveness of osteosarcoma. *Mol. Cancer Res.* **10**: 454–468, 2012 (DOI:10.1158/1541-7786.MCR-11-0347)
 24. Masuko K, Okazaki S, Satoh M, Tanaka G, Ikeda T, Torii R, Ueda E, Nakano T,

- Danbayashi M, Tsuruoka T, Ohno Y, Yagi H, Yabe N, Yoshida H, Tahara T, Kataoka S, Oshino T, Shindo T, Niwa S, Ishimoto T, Baba H, Hashimoto Y, Saya H, and Masuko T: Anti-tumor effect against human cancer xenografts by a fully human monoclonal antibody to a variant 8-epitope of CD44R1 expressed on cancer stem cells. *PLoS One* **7**:e29728, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0029728)
25. Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M and Saya H: Modulation of glucose metabolism by CD44 contributes to antioxidant status and drug resistance in cancer cells. *Cancer Res.* **72**: 1438-1448, 2012 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-3024)
26. Arima Y, Hayashi H, Sasaki M, Hosonaga M, Goto TM, Chiyoda T, Kuninaka S, Shibata T, Ohata H, Nakagama H, Taya Y and Saya H: Induction of ZEB by inactivation of RB is a key determinant of the mesenchymal phenotype of breast cancer. *J. Biol. Chem.* **287**: 7896-7906, 2012 (DOI: 10.1074/jbc.M111.313759)
27. Muto J, Imai T, Ogawa D, Nishimoto Y, Okada Y, Mabuchi Y, Kawase T, Iwanami A, Mischel PS, Saya H, Yoshida K, Matsuzaki Y, and Okano H: RNA-Binding Protein Musashi1 Modulates Glioma Cell Growth through the Post-Transcriptional Regulation of Notch and PI(3) Kinase/Akt Signaling Pathways. *PLoS One* **7**: e33431, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0033431)
28. Doi N, Yamakawa N, Matsumoto N, Yamamoto Y, Nagano T, Matsumura N, Horisawa K and Yanagawa H: DNA display selection of peptide ligands for a full-length human G protein-coupled receptor on CHO-K1 cells. *PLoS One* **7**:e30084, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0030084)
29. Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H, Ogawa Y, Du W, Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y and Yanagawa H: A Phthalimide Derivative that Inhibits Centrosomal Clustering is Effective on Multiple Myeloma. *PLoS One* **7**:e38878, 2012 (DOI: 10.1371/journal.pone.0038878)
30. Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Onishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M and Saya H: Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* **31**:2849-61, 2012 (DOI:10.1038/onc.2011.462)
31. Arima Y, Hayashi N, Hayashi H, Sasaki M, Kai K, Sugihara E, Abe E, Yoshida A, Mikami S, Nakamura S and Saya H: Loss of p16 expression is associated with the stem cell characteristics of surface markers and therapeutic resistance in estrogen receptor-negative breast cancer. *Int. J. Cancer* **130**: 2568-2579, 2012 (DOI:10.1002/ijc.26271)
32. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Motohara T, Yoshikawa M, Yoshida GJ, Wada T, Masuko T, Mogushi K, Tanaka H, Osawa T, Kanki Y, Minami T, Aburatani H, Ohmura M, Kubo A, Suematsu M, Takahashi K, Saya H and Nagano O: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nat. Commun.* **3**: 883, 2012 (DOI:10.1038/ncomms1892)
33. Fierro S, Yoshikawa M, Nagano O, Yoshimi K, Saya H and Einaga Y: *In vivo* assessment of cancerous tumors using boron doped diamond microelectrode. *Scientific Reports* **2**, Article number:901, 2012 (DOI:10.1038/srep00901)
34. Shiheido H, Naito Y, Kimura H, Genma H, Takashima H, Tokunaga M, Ono T, Hirano T, Du W, Yamada T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H: An anilinoquinazoline derivative inhibits tumor growth through interaction with hCAP-G2, a subunit of condensin II. *PLoS ONE* **7**, e44889, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0044889)
35. Sumida T, Yanagawa H, Doi N: *In vitro* selection of Fab fragments by mRNA display

- and gene-linking emulsion PCR. *J. Nucleic Acids* **2012**, 371379, 2012
(DOI:10.1155/2012/371379)
36. Ueki A, Shimizu T, Masuda K, Yamaguchi SI, Ishikawa T, Sugihara E, Onishi N, Kuninaka S, Miyoshi K, Muto A, Toyama Y, Banno K, Aoki D and Saya H: Up-regulation of Imp3 confers in vivo tumorigenicity on murine osteosarcoma cells. *PLoS One* **7**: e50621, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0050621)
 37. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, Hatakeyama M, Hirayama T, Hirata K, Nagano O, Matsuzaki J and Hibi T: Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of Helicobacter pylori CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell Host & Microbe* **12**: 764-777, 2012 (DOI:10.1016/j.chom.2012.10.014)
 38. Kobayashi Y, Banno K, Shimizu T, Ueki A, Tsuji K, Masuda K, Kisu I, Nomura H, Tominaga E, Nagano O, Saya H and Aoki D: Gene expression profile of a newly established choriocarcinoma cell line, iC(3)-1, compared to existing choriocarcinoma cell lines and normal placenta. *Placenta* **34**: 110-118, 2013 (DOI:10.1016/j.placenta.2012.11.003)
 39. Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A and Saya H: IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* **31**: 627-640, 2013 (DOI:10.1002/stem.1328)
 40. Matsuzaki Y, Hosokai H, Mizuguchi Y, Fukamachi S, Shimizu A and Saya H: Establishment of *HRAS*^{G12V} transgenic medaka as a stable tumor model for *in vivo* screening of anticancer drugs. *PLoS One* **8**: e54424, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0054424)
 41. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H* and Nagano O*: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* **73**: 1855-1866, 2013 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T) (*co-corresponding authors)
 42. Shiheido H, Terada F, Tabata N, Hayakawa I, Matsumura N, Takashima H, Ogawa Y, Du W, Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H: A phthalimide derivative that inhibits centrosomal clustering is effective on multiple myeloma. *PLoS ONE* **7**, e38878, 2012 (DOI:10.1371/journal.pone.0038878)
 43. Ishikawa T, Shimizu T, Ueki A, Yamaguchi S, Onishi N, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Yamaguchi R, Miyano S and Saya H: Twist2 functions as a tumor suppressor in murine osteosarcoma cells. *Cancer Sci* **104**:880-888, 2013 (DOI: 10.1111/cas.12163)
 44. Kai K, Iwamoto T, Kobayashi T, Arima Y, Takamoto Y, Ohnishi N, Bartholomeusz C, Horii R, Akiyama F, Hortobagyi GN, Pusztai L, Saya H* and Ueno NT*: *Ink4a/Arf*^{-/-} and *HRAS(G12V)* transform mouse mammary cells into triple-negative breast cancer containing tumorigenic CD49f⁻ quiescent cells. *Oncogene* (in press) 2013 (DOI:10.1038/onc.2012.609) (*co-corresponding authors)
 45. Hirata K, Suzuki H, Imaeda H, Matsuzaki J, Tsugawa H, Nagano O, Asakura K, Saya H and Hibi T: CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. *Br. J. Cancer* **109**: 379-386, 2013 (DOI:10.1038/bjc.2013.314)
 46. Oikawa T, Nakamura A, Onishi N, Yamada T, Matsuo K and Saya H: Acquired expression of NFATc1 downregulates E-cadherin and promotes cancer cell invasion. *Cancer Res.*

- 73: 5100-5109, 2013 (DOI:10.1158/0008-5472.CAN-13-0274)
47. Wada T, Ishimoto T, Seishima R, Tsuchihashi K, Yoshikawa M, Oshima H, Oshima M, Masuko T, Wright N, Furuhashi S, Hirashima K, Baba H, Kitagawa Y, Saya H and Nagano O: Functional role of CD44v-xCT system in the development of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia. *Cancer Sci.* **104**: 1323-1329, 2013 (DOI:10.1111/cas.12236. Epub 2013 Aug 12)
 48. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H and Oshima M: TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 2013 (DOI:10.1038/onc.2013.356) (in press)
 49. Mori T, Sato Y, Miyamoto K, Kobayashi T, Shimizu T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Hao W, Tando T, Iwasaki R, Kawana H, Morioka H, Matsumoto M, Saya H, Toyama Y and Miyamoto T: TNF \cdot promotes osteosarcoma progression by maintaining tumor cells in an undifferentiated state. *Oncogene* 2013 (DOI:10.1038/onc.2013.545) (in press)
 50. Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H and Kano K: Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* **5**: 3368, 2014 (DOI:10.1038/ncomms4368)
 51. Tokunaga M, Shiheido H, Hayakawa I, Utsumi A, Takashima H, Doi N, Horisawa K, Sakuma-Yonemura Y, Tabata N, Yanagawa H: Hereditary spastic paraplegia protein spartin is an FK506-binding protein identified by mRNA display. *Chem Biol* **20**: 935-942, 2013 (DOI:10.1016/j.chembiol.2013.05.011)
 52. Yanagawa H: Exploration of the origin and evolution of globular proteins by mRNA display. *Biochemistry* **52**: 3841-3851, 2013 (DOI:10.1021/bi301704x)
 53. Tokunaga M, Shiheido H, Tabata N, Sakuma-Yonemura Y, Takashima H, Horisawa K, Doi N, Yanagawa H: MIP-2A is a novel target of an anilinoquinazoline derivative for inhibition of tumor cell proliferation. *PLoS ONE* **8**:e76774, 2013 (DOI:10.1371/journal.pone.0076774)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. 佐谷秀行、永野修：接着分子 CD44 を標的とする癌の浸潤抑制。蛋白質核酸酵素 53: 1225-1230、共立出版、東京、2008
2. 佐谷秀行：がん幹細胞の成立と維持機構。細胞工学 27: 686~689、秀潤社、東京、2003
3. 佐谷秀行、柳川弘志：人工癌幹細胞を用いた分化制御異常解析と癌創薬研究。再生医療 7: 252~254、メディカルレビュー社、東京、2008
4. 石澤丈、佐谷秀行：新規治療薬の臨床と開発動向。特集「骨髄性白血病--病因・治療研究の進歩」、日本臨床 67: 1932~1937、日本臨床社、東京、2009
5. Kai K, Arima Y, Kamiya T and Saya H: Breast cancer stem cells. *Breast Cancer* 17: 80-85, 2010
6. 柳川弘志、土居信英：生体高分子の進化学、現代生物学入門第9巻：合成生物学、pp.1-34、浅島 誠ら編集、岩波書店、2010
7. 柳川弘志(監修)：無生物から生物ができる：生命誕生の不思議、Newton(ニュートン)、11月号、22-53、Newton、2010.
8. Doi N, Kakukawa K, Oishi Y and Yanagawa H: High solubility of random-sequence proteins consisting of five kinds of primitive amino acids”, In “Chemical Synthetic Biology”, eds. P. L. Luisi and C. Chiarabell, pp. 121-138, John Wiley & Sons Ltd, England, 2011
9. Yanagawa H: Development of IVW method into drug discovery. Drug Delivery System, Vol. 26, No. 6, 571-583, 2011

10. Horisawa K and Yanagawa H: The Musashi proteins in neural stem cell/progenitor cells, In “Neural Stem Cells and Therapy”, ed. T. Sun, pp. 205-222, InTech, Rijeka, Croatia 2011
11. Tanaka J, Yanagawa H and Doi N: Evolutionary Engineering of Artificial Proteins with Limited Sets of Primitive Amino Acids. In: “Protein Engineering”, ed. P. Kaumaya, pp. 59-74, InTech, Rijeka, Croatia 2012
12. 土居信英: 無細胞提示系による低分子抗体の試験管内進化. 「次世代医薬開発に向けた抗体工学の最前線」シーエムシー出版 (2012)
13. Tamada M, Suematsu M and Saya H: Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells. *Clin Cancer Res* 18: 5554-5561, 2012 (doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0859)
14. Sugihara E and Saya H: Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* 132:1249-1259, 2013 (doi: 10.1002/ijc.27961)
15. Nagano O, Okazaki S and Saya H: Redox regulation in stem-like cancer cells by CD44 variant isoforms. *Oncogene* 2013 (doi: 10.1038/onc.2012.638)
16. Sampetean O and Saya H: Characteristics of glioma stem cells. *Brain Tumor Pathol* 2013 (in press)
17. Tateyama S and Yanagawa H: Application of mRNA display for in vitro selection of DNA-binding transcription factor complexes. IN: *Methods in Molecular Biology: Gene Regulation*, M. Bina ed., pp.95-109, Humana Press in brand of Springer, New York, 2013
18. Tabata N, Horisawa K, Yanagawa H: Application of the *in vitro* virus (IVV) method for various protein functional analyses. In “Protein Engineering - Technology and Application”, ed. T. Ogawa, pp. 85-110, InTech, Rijeka, Croatia, 2013 (DOI: 10.5772/3363)
19. 土居信英, 柳川弘志: 進化分子工学による新規タンパク質の創出とプロテオミクスへの応用. 「進化分子工学」(伏見譲編) NTS 出版, pp. 275-286, 2013

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 72 件、国際会議 24 件)

1. 佐谷秀行: 癌幹細胞モデルに基づく癌発生・維持機構の解析. 特別講演 I. 第 2 回神戸カンファレンスー先端医学研究の未来ー. 6/27/2008. 神戸大学医学部新緑会館. 神戸
2. 佐谷秀行: 癌の浸潤転移能を決定づける細胞ーマトリクス相互作用. 教育講演. 第 41 回日本整形外科学会・骨・軟部腫瘍学術学会. 7/18/2008. アクトシティ浜松. 浜松
3. 柳川弘志: 遺伝子ネットワークとタンパク質相互作用解析. 招待講演. 富山大ケミカルバイオロジーシンポジウム. 7/18/2008. 高志会館. 富山
4. 佐谷秀行: 抗がん剤治療の分子機構. 特別講演. 第 9 回乳癌最新情報カンファレンス. 7/20/2008. くらよんロイヤルホテル. 長野
5. 佐谷秀行: 癌幹細胞と EMT の概念に基づく癌治療のパラダイムシフト. 特別講演. 山梨血液研究会 第 12 回サマーセミナー. 7/23/2008. アピオタワー館. 甲府
6. 佐谷秀行: 新しい概念に基づく癌治療パラダイムの変化ー癌幹細胞と EMT を中心にー. 特別講演. 第 1 回 Symphony. 9/20/2008-9/21-2008. 都市センターホテル. 東京.
7. 柳川弘志: ウェットとドライバイオロジーの融合によって生命科学の新しい地平を切り拓く. 招待講演. 慶應義塾創立 150 年未来先導基金プログラム・慶應義塾理工学の歩む道. 10/10/2008. 協生館. 横浜
8. Saya H: Establishment of osteosarcoma cancer stem cells from mouse bone marrow stromal cells. Invited Speaker. *Cancer Genes and Cancer Stem Cells*. The 5th Nikko International Symposium 2008, 10/25/2008. Jichi Medical University (JMU)

Information and In-service Training Center, Japan

9. 佐谷秀行：癌幹細胞に基づく癌発生及び維持機構の解析。要望講演。11/14/2008。第47回日本臨床細胞学会秋期大会。グランドプリンスホテル新高輪国際館パミール。東京
10. 佐谷秀行：がん幹細胞に基づくがん発生及び維持機構の解析。招待講演。金沢大学がん研究所がん幹細胞・分子標的がん医療研究開発センター合同シンポジウム。11/26/2008。金沢大学がん研究所。金沢
11. 佐谷秀行：抗がん剤効果の分子機構とがん幹細胞理論に基づく治療戦略のパラダイムシフト。招待講演。京都乳癌セミナー。11/27/2008。ホテルグランヴィア京都。京都
12. Saya H: Molecular mechanism of cell death induced by anti-cancer drugs. Invited speaker. The 15th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience. 12/02/2008. Sheraton Miyako Hotel Tokyo, Tokyo
13. 柳川弘志：ペプチド創薬に向けて：in vitro virus (IVV)法による機能性ペプチドのスクリーニングと機能解析。招待講演。アスピオファーマ生物医学研究所講演会。12/11/2008。アスピオファーマ生物医学研究所。大阪
14. 柳川弘志：ピューロマイシン・テクノロジーが拓く新たな医療・バイオの世界。招待講演。第9回慶應科学義塾展・Keio Techno-Mall 2008。12/19/2008。東京国際フォーラム。東京
15. 佐谷秀行、永野修：癌の浸潤転移に関わる分子イベント。基調講演。第98回日本病理学会総会。5/1/2009。国立京都国際会館。京都
16. 佐谷秀行：マウス腫瘍形成モデルを用いたがん幹細胞の解析。基調講演。癌治療開発&先端医療開発を目指した最前線セミナー。5/18/2009。秋葉原UDX Gallery。東京
17. 佐谷秀行：上皮間葉転換の腫瘍における意義。教育講演。第15回日本家族性腫瘍学会学術集会。6/12/2009。秋葉原コンベンションホール。東京
18. 佐谷秀行：動物モデルを用いたがん幹細胞の解析と応用。招待講演。第31回本郷呼吸器研究会。6/23/2009。山の上ホテル。東京
19. 佐谷秀行：動物モデルを用いたがん幹細胞の解析と応用。特別講演。北海道癌談話会春期シンポジウム。6/27/2009。小樽商科大学札幌サテライト。札幌
20. 佐谷秀行：動物モデルを用いたがん幹細胞の解析と応用。教育講演。第71回大腸癌研究会。7/3/2009。大宮ソニックシティ。大宮
21. 佐谷秀行：動物モデルを用いたがん幹細胞の解析と応用。特別講演。第10回検査血液学会学術集会。7/4/2009。山梨大学甲府キャンパス。甲府
22. 佐谷秀行：癌幹細胞理論に基づく腫瘍治療戦略のパラダイムシフト。特別講演。第10回日本分子脳神経外科学会。9/20/2009。岡山コンベンションセンター。岡山
23. 柳川弘志：超高効率なタンパク質のスクリーニング技術の開発、招待講演、BioJapan 2009 World Business Forum. 10/8/009, パシフィコ横浜、横浜
24. 柳川弘志：In vitro virus (IVV)法によるタンパク質の多様な機能スクリーニング、招待講演、先端生命科学セミナー、10/13/2009, 慶應先端生命科学研究所、鶴岡
25. 佐谷秀行：動物モデルを用いたがん幹細胞の特性解析と治療戦略の考案。特別講演。第61回日本皮膚科学会西部支部学術大会。10/24/2009。B-CON PLAZA 別府国際コンベンションセンター。別府
26. Saya H: Drug Development for Cancer Cell Migration. Invited Speaker. The International Symposium of Pediatric Neuro-oncology for the 50th Anniversary of Taipei Veterans General Hospital and the Annual Scientific Meeting of Chinese Medical Association. 10/31/2009, Taipei Veterans General Hospital, Taipei, Taiwan
27. 佐谷秀行：がん浸潤転移を標的とした治療の開発戦略。平成21年度政策創薬総合研究推進事業第35回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー。11/10/2009。全国社会福祉協議会・灘尾ホール。東京
28. Saya H: Mouse cancer models using induced cancer stem cells. Special Lecture. A Victor A. Levin Lectureship. 11/18/2009. The University of Texas, M.D. Anderson

Cancer Center, Houston, Texas, USA.

29. 佐谷秀行：癌幹細胞理論に基づく治療戦略の変革。特別講演。第7回日本乳癌学会近畿地方会。12/5/2009。神戸国際会議場。神戸
30. 柳川弘志：超高効率なタンパク質のスクリーニング技術の開発：次世代タンパク質機能解析システムの構築に向けて、招待講演、先端計測分析技術・機器開発事業5周年シンポジウム、12/9/2009、日本科学未来館、東京
31. 柳川弘志：次世代タンパク質機能解析技術の開発とバイオ・医療への応用、招待講演、第32回日本分子生物学会年会ワークショップ「ゲノムネットワーク解析が拓く新たな医療・バイオの世界」、12/11/2009、パシフィコ横浜、横浜
32. 柳川弘志：In vitro virus (IVV)法によるタンパク質の多様な機能スクリーニングと次世代タンパク質機能解析システムの構築に向けて、招待講演、東北大学多元物質科学研究所セミナー、3/11/2010、東北大学、仙台
33. 佐谷秀行：動物モデルを用いた癌幹細胞の性状解析と治療戦略の考案。特別講演。第6回癌 Translational Research 研究会。千葉大学医学部附属病院第3講堂。千葉。4/13/2010
34. 佐谷秀行：がん幹細胞とは何か？第15回日本癌学会市民公開講座「がん医療の最前線」。仙台市青年文化センター。仙台。5/16/2010
35. Saya H and Nagano O: Role of CD44 hyaluronan receptor in cancer stem cells. Invited Speaker, 8th International Conference on Hyaluronan. The International Society for Hyaluronan Sciences (ISHAS). 6/9/2010. Kyoto Brighton Hotel, Kyoto
36. Saya H: Mouse Brain Tumor Models Established by Induced Cancer Cell (ICSC). Meet the Expert3: Stem Cells 7th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO). 6/11/2010. JW Marriott Hotel, Seoul, Korea.
37. Saya H: Novel Strategy for Glioma Invasion. Plenary Lecture. 7th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO). 6/11/2010. JW Marriott Hotel, Seoul, Korea.
38. 柳川弘志：In vitro virus (IVV)法を用いた次世代タンパク質機能解析システム、第10回日本蛋白質科学会年会シンポジウム「蛋白質研究法：先進計測・解析技術の新展開」招待講演、札幌コンベンションセンター、札幌。6/16/2010
39. 佐谷秀行：癌幹細胞の特性を決定づける分子機構。基調講演。第19回日本癌病態治療研究会。6/30/2010。東京ステーションコンファレンス。東京
40. 佐谷秀行：誘導型癌幹細胞(induced cancer stem cells: ICSC)を用いたマウス腫瘍モデルの構築と解析。特別講演。第25回発癌病理研究会。8/25/2010。松島一の坊。仙台
41. 佐谷秀行：癌幹細胞の特性を決定づける分子機構。特別講演。第17回八万平造血セミナー。9/11/2010。ホテルメトロポリタン森岡。岩手
42. 佐谷秀行：癌幹細胞理論に基づく治療戦略のパラダイムシフト。特別講演。第6回千葉血液フォーラム。3/18/2011、オークラ千葉ホテル、千葉
43. 佐谷秀行：がん幹細胞の性質を制御する分子機構とその治療戦略。招待講演。CBI学会第316回研究講演会「がん研究とがん治療薬の最前線」。4/18/2011、総評会館、東京
44. 佐谷秀行：がん幹細胞の性質を維持する分子機構。特別講演。第52回日本臨床細胞学会総会（春期大会）。5/21/2011、福岡国際会議場、福岡
45. 佐谷秀行：がん幹細胞理論に基づくがん転移の考え方。基調講演。第35回日本リンパ学会総会。6/4/2011、東京ステーションコンファレンス サピアタワー、東京
46. 佐谷秀行：がん幹細胞に基づく治療抵抗性の分子メカニズム。教育講演。第9回日本臨床腫瘍学会学術集会。7/21/2011、パシフィコ横浜、横浜
47. 佐谷秀行：癌幹細胞の性質を決定づける分子機構の解析。特別講演。第20回南九州腫瘍研究会。7/29/2011、鹿児島大学、鹿児島
48. 佐谷秀行：癌幹細胞の性質を規定する分子メカニズムと治療戦略。特別講演。第41回ニューロ・オンコロジーの会。8/7/2011、東京女子医科大学、東京

49. Saya H: Role of CD44 in cancer stem cells and metastasis. Plenary Lecture 5, 8th International Symposium on Minimal Residual Cancer, 9/23/2011. Osaka International Convention Center, Osaka
50. 佐谷秀行：癌幹細胞の特性を決定づける分子機構と新たな治療戦略の考案。ランチョンセミナー。第14回癌と骨病変研究会。11/18/2011、千代田放送会館、東京
51. Saya H: Regulation and therapeutic targeting of cancer stem cells. Special Lecture, 16th JFCR-ISCC, 1/26/2012. Miraikan (National Museum of Emerging Science and Innovation), Tokyo
52. Saya H: Characterization of brain tumor stem cells using induced cancer stem cell (iCSC) technology. Keynote lecture, 9th Annual Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, 4/22/2012, Taipei, Taiwan
53. 柳川弘志：タンパク質の相互作用からゲノム創薬への展開。招待講演。慶應義塾大学理工学部生命情報学科10周年記念シンポジウム。4/28/2012、協生館、横浜
54. Saya H: Cancer stem cells: metabolism, metastasis and clinical approach. Cancer & Stem Cell Biology (CSCB) Seminar, 5/8/2012, Duke-NUS, Singapore
55. 佐谷秀行：CD44の癌幹細胞における役割と新たな治療戦略。特別講演1。第21回北九州がんセミナー。5/11/2012、リーガロイヤルホテル小倉、北九州
56. Saya H: Role of CD44 in cancer stem cells and metastasis. Seminar, 5/18/2012, Heinrich-Pette-Institute, Hamburg, Germany
57. Saya H: Splicing of CD44 regulates cancer metabolism and metastasis, Special Lecture, The 10th Stem Cell Research Symposium, 6/1/2012, The Awaji Yumebutai, International Conference Center, Hyogo
58. Saya H: Current status of cancer stem cell research. Educational Lecture II, Japan Society of Gene Therapy 2012, 18th Annual Meeting, 6/29/2012, Hotel Kumamoto Terrsa, Kumamoto
59. 佐谷秀行：CD44のがん幹細胞における機能とそれに基づく治療戦略の考案。招聘講演3。第22回日本サイトメトリー学会学術集会。6/30/2012、千里ライフサイエンスセンター、大阪
60. Saya H: Role of CD44 in cancer stem cells. Plenary Keynote Lecture, The 11th Korea-Japan-Germany Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 7/6/2012, Gyeongju Hilton Hotel, Gyeongju, Korea
61. 佐谷秀行：がん幹細胞の概念に基づく治療戦略のパラダイムシフト。特別講演。第39回尿路悪性腫瘍研究会。7/21/2012、ホテルグランドパレス、東京。
62. 佐谷秀行：がん幹細胞の代謝特性。ランチョンセミナー。第44回日本医学教育学会大会。7/28/2012、慶應義塾大学日吉キャンパス、神奈川。
63. 佐谷秀行：癌転移メカニズムの新しい考え方と骨転移治療の意義。特別講演。第52回 Tokyo Expert Urology Seminar。8/6/2012、山の上ホテル、東京。
64. 佐谷秀行：人工癌幹細胞を用いた骨肉腫の性状解析。特別講演。第14回なにわ骨代謝骨腫瘍研究会。8/25/2012、リーガロイヤルホテル大阪、大阪。
65. Saya H: Role of CD44 variants in cancer stem cells and metastasis. Invited Lecture, MGH Surgical Oncology Grand Round, 9/6/2012, Massachusetts General Hospital, Boston, USA
66. Saya H: Role of CD44 variants in cancer stem cells and metastasis. Basic and clinical application. Invited Lecture, 9/7/2012, NCI Frederick, MD, USA
67. Saya H: Characterization of brain tumor stem cells using induced cancer stem cell (iCSC) technology. Invited Lecture, Korean Neuro-Oncology Meeting. 9/22/2012, National Cancer Center, Gyeonggi-do, Korea
68. Saya H: Role of CD44 in Cancer Stem Cells and Metastasis. The 43rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “Cancer Heterogeneity:

- Impact on Carcinogenesis, Cancer Stem Cell, Microenvironment, Diagnosis and Treatment”. 11/14/2012, Hotel Grand Palace, Tokyo
69. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的にした治療戦略の考案。特別講演。第9回東京呼吸器リサーチフォーラム。11/17/2012、帝人株式会社グループ東京本社、東京
 70. 佐谷秀行：がん幹細胞の概念に基づく新規治療戦略の開発。特別講演。第10回日本乳癌学会近畿地方会。11/24/2012、千里ライフサイエンスセンター、大阪
 71. 佐谷秀行：新たな治療標的：がん幹細胞。特別講演。2nd TJCR0 (Tokyo Joint Center of Radiation Oncology)、12/5/2012、東京ガーデンパレス、東京
 72. Saya H: Redox regulation of stem-like cancer cells by CD44. 3rd International Symposium on Carcinogenic Spiral and International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa. 01/25/2013, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan
 73. Saya H: Roles of CD44 in cancer stem cells. 19th International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. 02/15/2013, William Willis Hall, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan
 74. Saya H: Novel strategies for targeting cancer stem cells. Ninth AACR-Japanes Cancer Association Joint Conference: Breakthroughs in Basic and Translational Cancer Research. 02/24/2013, Hyatt Regency Maui, Maui, Hawaii, USA
 75. 佐谷秀行：がん幹細胞の代謝特性と新たな治療戦略の考案。教育講演。Cardiovascular Diabetology Conference (CDC) 第10回学術集会、03/02/2013、ホテルグランヴィア大阪、大阪
 76. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療戦略の開発。平成24年度政策創薬マッチング研究事業、第15回ヒューマンサイエンス総合研究ワークショップ。03/07/2013、国立がん研究センター、東京
 77. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療戦略の考案。特別講演。第155回日本獣医学会学術集会。03/29/2013、東京大学駒場キャンパス、東京
 78. Saya H: Roles of CD44 in cancer stem cells. Invited Speaker, Meet-the-Expert Session, The American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2013, 04/08/2013, Washington, DC, USA
 79. 佐谷秀行：がん幹細胞の性状解析に基づく治療戦略の考案。特別講演。南大阪がんフォーラム。04/20/2013、ホテルアゴーラリージェンシー堺、大阪
 80. 佐谷秀行：がん幹細胞の治療抵抗性と転移における役割。特別講演。Sendai Breast Cancer Forum 2013。05/17/2013、ホテルモントレ仙台5階「アドリア」、仙台
 81. 佐谷秀行：がん幹細胞の性状解析に基づく新たながん治療戦略。第256回川崎医学会講演会。05/21/2013、川崎医科大学内会議室、倉敷
 82. 佐谷秀行：腫瘍組織の不均一性の分子理論。第11回“彩の国さいたま”病理診断セミナー。05/25/2013、ラフレさいたま、埼玉
 83. 佐谷秀行：がん幹細胞の性状解析に基づく治療戦略。molprof 研究セミナー。06/04/2013、産業技術総合研究所、臨海副都心センター別館5F、東京
 84. Saya H: Novel therapeutic strategies for cancer stem cells. Plenary lecture, The 39th Annual Meeting of Korean Cancer Association, 06/14/2013, Lotte Hotel Seoul, Seoul, Korea
 85. 佐谷秀行：シスチントランスポーターxCT とがん幹細胞。特別講演1。第8回トランスポーター研究会年会。06/15/2013、熊本大学薬学部、熊本
 86. 佐谷秀行：脳腫瘍幹細胞の治療抵抗性、浸潤機構の解析。特別講演4。第44回慶應ニューロサイエンス研究会。06/29/2013、慶應義塾大学信濃町キャンパス、東京
 87. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療戦略の考案。特別講演 II。第25回癌ゲノムサイエンス研究会。07/04/2013、東京医科歯科大学、東京
 88. 佐谷秀行：がん幹細胞の性状解析に基づく治療戦略の考案。特別講演5。第2回三重先端がんフォーラム。07/20/2013、三重大学医学部、津

89. 佐谷秀行:がん幹細胞の性状解析とそれを標的とした治療戦略。特別企画「iPS・幹細胞」。第3回細胞再生医療研究会。07/27/2013、臨床研究情報センター、神戸
90. 佐谷秀行:がん幹細胞を標的とした治療戦略の開発。ゲスト・レクチャー。08/06/2013、京都大学大学院医学研究科メディカルイノベーションセンター、京都
91. Saya H: Novel Therapeutic Strategies for Cancer Stem Cells, Weatherall Institute of Molecular Medicine (WIMM) Seminar, 08/12/2013, MRC, Molecular Haematology Unit, University of Oxford, UK
92. 佐谷秀行:CD44 物語。特別講演。平成 25 年度がん若手研究者ワークショップ。09/05/2013、蓼科グランドホテル滝の湯、蓼科、長野
93. 佐谷秀行:がん幹細胞の性状解析に基づく治療戦略。教育講演。第 20 回日本乳腺疾患研究会。02/15/2014、熊本キャッスルホテル、熊本
94. 佐谷秀行:がん幹細胞の特性解析とその標的治療戦略。特別講演。第 6 回茨城オンコロジーセミナー。02/21/2014、ホテルグランド東雲、つくば、茨城
95. 佐谷秀行:がん幹細胞の性状解析とそれを標的とした治療戦略。特別講演。第 16 回癌免疫セミナー。03/05/2014、山口大学医学部、宇部、山口
96. 佐谷秀行:誘導型がん幹細胞 iCSC を用いたがん幹細胞の特性解析。教育講演 6、第 36 回造血細胞移植学会総会。03/08/2014、沖縄コンベンションセンター、沖縄

② 口頭発表 (国内会議 32 件、国際会議 14 件)

1. 舘山誠司、児玉達史、土居信英、柳川弘志. 無細胞翻訳系を用いた mRNA ディスプレイ法による遺伝子発現カスケード解析手法の確立とその応用 第 3 回無細胞生命科学研究会、弘前大学創立 50 周年記念会館、弘前、2009 年 3 月 17 日
2. Saya H: Analysis of cancer stem cells in induced tumor models. USA-Japan Cooperative Cancer Workshop “Stem cells in normal and malignant hematopoiesis”. 03/28/2009, Hilton Waikoloa Village, Hawaii
3. 佐谷秀行: 癌幹細胞誘導研究によって得られた細胞癌化機構の新たな知見。再生医療の実現化プロジェクト、第 2 回夏のワークショップ。7/16/2009。熱海 KKR ホテル。熱海
4. 佐谷秀行: マウス正常細胞より誘導した癌幹細胞様細胞を用いた治療抵抗性機構の解析。シンポジウム 10 「がん幹細胞の生物学的特性の理解と治療戦略」。第 68 回日本癌学会学術総会。10/3/2009。パシフィコ横浜。横浜
5. 佐谷秀行: 動物モデルを用いた癌幹細胞の性状解析。第 80 回発生工学・疾患モデル研究会。東京大学医科学研究所 2 号館 2 階大会議室。東京。3/9/2010
6. 舘山誠司、児玉達史、土居信英、柳川弘志: 無細胞翻訳系を用いた mRNA ディスプレイ法による遺伝子発現カスケード解析手法の確立とその応用、第 3 回無細胞生命科学研究会、3/17/2009、弘前大学創立 50 周年記念会館、弘前
7. 永野修、佐谷秀行: CD44 の癌幹細胞における役割。シンポジウム 12「Cancer Stem Cell」。第 9 回再生医療学会。広島国際会議場。広島。3/19/2010
8. 佐谷秀行: 誘導型がん幹細胞の解析と応用。シンポジウム 6 「がんと間質の相互作用: がん幹細胞研究の新たな展開」。第 51 回日本臨床細胞学会総会。パシフィコ横浜。横浜。5/31/2010
9. 佐谷秀行: 分子標的薬の耐性のメカニズムとその克服。ワークショップ 3 分子標的治療の有効性の検証と新しいシンポ。第 18 回日本乳癌学会学術総会。6/25/2010。ロイトン札幌。北海道
10. 佐谷秀行: 癌幹細胞の性質を決定づける分子機構の解析。シンポジウム。創薬薬理フォーラム第 18 回シンポジウム。9/16/2010。日本薬学会長井記念館。東京
11. 始平堂弘和、土居信英、柳川弘志: mRNA ディスプレイ法により選択された MDM2 結合ペプチドは MDM2-p53 相互作用を強力に阻害する、第 69 回日本癌学会学術総会、9/24/2010、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル、大阪

12. 内藤悠平、鈴木裕也、尾崎由枝、柳川弘志、杜ぶん林、山田健人、土居信英、飯島史朗、松下麻衣子、田原佳代子、服部豊：新規アニリノキナゾリン誘導体を用いた *in vivo* におけるハイリスク多発性骨髄腫の治療効果、第 69 回 日本癌学会学術総会、9/25/2010、大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル、大阪
13. 鈴木裕也、寺田菫子、内藤悠平、柳川弘志、杜ぶん林、山田健人、土居信英、飯島史朗、松下麻衣子、田原佳代子、服部豊：ハイリスク骨髄腫克服のためのスクリーニングシステムの構築。第 54 回日本薬学会関東支部大会、10/2/2010、東京
14. 佐谷秀行：分裂期崩壊のメカニズム。シンポジウム 2 放射線による細胞死を考える。日本放射線影響学会第 53 回大会。10/20/2010。京都テルサ。京都
15. 佐谷秀行：接着分子 CD44 によって制御される癌の治療抵抗性及び浸潤転移機構。名古屋大学医学系研究科 GCOE「機能分子医学への神経疾患・腫瘍の融合拠点」第 3 回国内シンポジウム神経疾患とがんの共通機能分子をめぐって。11/5/2010。名古屋大学中央診療棟 3 階講堂。名古屋
16. 佐谷秀行：がん幹細胞理論に基づく新たながん治療戦略の考案。かわさきサイエンス & テクノロジーフォーラム 2010。11/18/2010。かながわサイエンスパーク西棟 3 階 KSP ホール。川崎
17. 佐谷秀行：Role of CD44 in stem-like characteristics of cancer cells. 大会長企画シンポジウム。第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会。12/9/2010。神戸ポートアイランド。神戸
18. 佐谷秀行：CD44 の癌幹細胞における役割。平成 22 年度文科省科学研究費新学術領域、がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動公開シンポジウム。2/9/2011、学術総合センター一橋記念講堂、東京
19. Saya H: Role of CD44 in Cancer Stem Cells. The 29th Nagoya International Cancer Treatment Symposium. 2/11/2011. Aichi Cancer Center, Nagoya, Aichi
20. Noriko T, Sakuma Y, Shimizu T, Saya H, Doi N and Yanagawa H: mRNA-display selection of single chain Fv against CD44. BIT' s 3rd Annual International Congress of Antibodies-2001, China National Convention Center, Beijing, China, 3/23/2011
21. Saya H: Osteosarcoma mouse model established by using induced cancer stem cells. International Symposium "Cell-of-Origin of Sarcoma" 7/16/2011. Kyoto International Conference Center, Kyoto
22. Saya H: Osteosarcoma model using induced cancer stem cells (iCSC). 8th Meeting of Bone Biology Forum, 8/19/2011. Fuji Institute of Education and Training, Mishima, Shizuoka
23. 佐谷秀行：がん幹細胞マーカーCD44 による代謝制御。シンポジウム 4S1a「がんの代謝制御」。第 84 回日本生化学会大会。9/24/2011、京都国際会館、京都
24. 佐谷秀行：がん幹細胞の治療抵抗性メカニズム。シンポジウム S5「がん幹細胞研究の最前線」。第 70 回日本癌学会学術総会。10/3/2011、名古屋国際会議場、名古屋。
25. 佐谷秀行：癌幹細胞の治療抵抗性を制御する分子機構。パネルディスカッション 3「がん幹細胞研究の進展と治療展開」。第 49 回日本癌治療学会学術集会。10/27/2011、名古屋国際会議場、名古屋。
26. 佐谷秀行：がん幹細胞マーカーCD44 によるレドックス制御機構。第 3 回レドックスライフイノベーションシンポジウム。3/8/2012、東京大学医学部、東京
27. Saya H: Novel strategies for cancer stem cells. 8th OOTR Annual Conference, 4/20/2012, The Westin Miyako Hotel, Kyoto
28. Saya H: Molecular mechanisms of therapeutic resistance of cancer stem cells. Symposium, 9th Annual Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, 4/22/2012, Taipei, Taiwan
29. Saya H: Role of CD44v in cancer stem cells and metastasis. Workshop, Global Academic Programs, MD Anderson Cancer Center, 5/16/2012, Oslo, Norway

30. 佐谷秀行：がん幹細胞の性状解析と新規がん治療戦略。第 36 回阿蘇シンポジウム。8/4/2012、阿蘇リゾート グランヴィリオホテル、熊本。
31. 佐谷秀行：A novel therapeutic approach targeting the CD44 variant functions. シンポジウム S4 「Molecular targeting to cancer stem cell/cancer initiating cell」。第 71 回日本癌学会学術総会。9/19/2012、ホテルロイトン札幌、札幌
32. Saya H: Role of CD44 in Cancer Stem Cells and Metastasis. The 43rd International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund “Cancer Heterogeneity: Impact on Carcinogenesis, Cancer Stem Cell, Microenvironment, Diagnosis and Treatment” . 11/14/2012, Hotel Grand Palace, Tokyo
33. 佐谷秀行：がん幹細胞マーカーCD44 によるレドックス制御。講演。第 29 回臨床フリーラジカル会議、12/08/2012、けぶり河、亀岡、京都
34. 佐谷秀行：グリオーマの基礎生物学。プレナリーセッション「グリオーマ研究の最先端－基礎と臨床－」第 33 回日本脳神経外科コンgres総会。05/12/2013、大阪国際会議場、大阪
35. 佐谷秀行：HER2 signal 伝達系の解説。イブニングセミナー「個別化治療時代の今、改めて HER2 を語ろう」、第 21 回日本乳癌学会学術総会。06/27/2013、アクトシティ浜松、浜松
36. 佐谷秀行：がん幹細胞に基づくがん組織不均一性。シンポジウム I。第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会。07/11/2013、ホテルブエナビスタ、松本
37. Saya H: CD44 and gastric epithelial stem cells. 6th Annual Scientific Meeting, Singapore Gastric Cancer Consortium. 07/25/2013, NUHS Tower Block Auditorium, Singapore
38. 佐谷秀行：がん幹細胞の概念に基づく転移のメカニズムと治療戦略。第 12 回肺癌治療夏期セミナー、08/23/2013、第一ホテル東京シーフォート、東京
39. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療戦略の考案。企業シンポジウム、第 53 回日本臨床化学会年次学術集会。08/31/2013、あわぎんホール、徳島
40. Saya H: Redox regulation of cancer cells by CD44v, a marker for cancer stem cell. International Session “New insights into cancer and metabolism” , The 86th Annual Meeting of The Japanese Biochemical Society, 09/13/2013, Pacifico Yokohama, Yokohama
41. 佐谷秀行：がん幹細胞研究の現状と展望。ワークショップ、癌幹細胞 Cancer stem cell を見る。第 54 回日本組織細胞化学会総会・学術集会。09/28/2013、航空会館、東京
42. 佐谷秀行：Therapeutic strategies for targeting cancer stem cells. 特別シンポジウム「がんの基礎研究から臨床開発へ」。第 72 回日本癌学会学術総会。10/03/2013、パシフィコ横浜、横浜
43. Saya H: Cancer stem cell: characteristics and therapeutic implication. The 6th Gyeongnam Regional Cancer Center Symposium, “New Therapeutic Targets and Approaches to Fight Cancer” , 11/08/2013, Gyeongnam Regional Cancer Center, Jinju, Korea
44. Saya H: CD44v-xCT axis is a therapeutic target for cancer stem cells. 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, 11/23/2013, Toulouse, France
45. 佐谷秀行：がん幹細胞を標的とした治療薬開発の現状と課題。第3回がん新薬開発合同シンポジウム。11/29/2013、ステーションコンファレンス東京、東京
46. Saya H: Significance of CD44v expression in gastric cancer stem cells. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference, 12/18/2013, Tokyo Bay Maihama Hotel Club & Resorts, Chiba, Japan

③ ポスター発表（国内会議 32 件、国際会議 4 件）

1. 田嶋典子、佐久間裕子、山川奈津子、土居信英、柳川弘志：IVV 法による選択実験の多用性 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会(BMB2008)、

- 神戸、12/9/2008
2. 木村香緒梨、小磯崇、田島典子、土居信英、柳川弘志：抗体医薬開発に向けたヒト一本鎖抗体の IVV スクリーニング。第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、神戸、12/9/2008
 3. 舘山誠司、高嶋秀昭、宮本悦子、土居信英、柳川弘志：In vitro virus (IVV) 法を用いた DNA-転写制御因子相互作用解析と遺伝子発現カスケードの解明 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、神戸、12/12/2008
 4. 児玉達史、舘山誠司、土居信英、柳川弘志：In vitro virus 法を用いた転写制御因子の DNA 結合ドメインの解析 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008)、神戸、12/12/2008
 5. 田島典子、土居信英、松本佳宣、柳川弘志：超高効率なタンパク質のスクリーニング技術の開発、BioJapan 2009, 10/7/2009、パシフィコ横浜、横浜
 6. 田島典子、土居信英、松本佳宣、柳川弘志：超高効率なタンパク質のスクリーニング技術の開発：次世代タンパク質機能解析システムの構築に向けて、先端計測分析技術・機器開発事業 5 周年シンポジウム、12/8/2009、日本科学未来館、東京
 7. 舘山誠司、永野修、佐谷秀行、柳川弘志：In vitro virus (IVV) 法を用いた CD44 を介した細胞内シグナルカスケードの解析、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、12/12/2009、パシフィコ横浜、横浜
 8. 児玉達史、舘山誠司、土居信英、柳川弘志：In vitro virus 法による Oct3/4、Sox2 および Klf4 の分子ネットワークの解析、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、横浜、12/12/2009
 9. 柚木修、舘山誠司、土居信英、柳川弘志：In vitro virus 法を用いた Nanog 複合体の解析、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、横浜、12/12/2009
 10. 始平堂弘和、高嶋秀昭、土居信英、柳川弘志：MDM2-p53 相互作用阻害ペプチドの機能解析、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、横浜、12/12/2009
 11. 田島典子、佐久間裕子、清水孝恒、佐谷秀行、柳川弘志：In vitro virus 法を用いた人工癌幹細胞に対する一本鎖抗体の選択、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、横浜、12/12/2009
 12. 木村香緒梨、小磯崇、田島典子、土居信英、柳川弘志：mRNA ディスプレイ法による高親和性ナノ抗体の試験管内進化、第 32 回日本分子生物学会年会 (MBSJ2009)、横浜、12/12/2009
 13. 始平堂弘和、田島典子、早川いちご、土居信英、服部豊、柳川弘志：多発性骨髄腫細胞のアポトーシスを誘導するフタルイミド誘導体の標的タンパク質同定とその作用機序の解明、第 5 回日本ケミカルバイオロジー学会年会、慶應義塾大学日吉キャンパス協生館、横浜。5/18/2010
 13. 田島典子、佐久間裕子、清水孝恒、佐谷秀行、土居信英、柳川弘志：IVV 法により選択された、人工癌幹細胞と高分子量ヒアルロン酸との結合を阻害する抗 CD44 一本鎖抗体の機能評価、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/7/2010
 14. 始平堂弘和、田島典子、早川いちご、土居信英、服部豊、柳川弘志：抗腫瘍性フタルイミド誘導体の分子機構の解明、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/9/2010
 15. 舘山誠司、永野修、佐谷秀行、柳川弘志：In vitro virus (IVV) 法を用いた CD44 を介した遺伝子発現制御機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/10/2010
 16. 下門大祐、舘山誠司、土居信英、柳川弘志：In vitro virus 法による Lin28 相互作用因子の解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/10/2010
 17. Fujimori, S., Tsuji, T., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E.: Highly efficient

- detection of protein-protein interactions using the in vitro virus method combined with high-throughput sequencing, The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (BMB2010), Kobe Port Island, Kobe, 12/10/2010
18. Fujimori, S., Hino, K., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E.: IRDB: Protein Interaction Region Database, The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (BMB2010), Kobe Port Island, Kobe, 12/10/2010
 19. Saito, R., Ushiyama, S., Ozawa, Y., Fujimori, S., Matsui, M., Ishizaka, M., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M.: Prediction of domain-domain interactions and protein-protein interactions using in vitro virus, The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (BMB2010), Kobe Port Island, Kobe, 12/10/2010
 20. Ozawa, Y., Saito, R., Hino, K., Fujimori, S., Yanagawa, H., Miyamoto-Sato, E., Tomita, M.: A novel method mediated by binding domain for extracting protein complexes, The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (BMB2010), Kobe Port Island, Kobe, 12/10/2010
 21. Tsuji, T., Masuoka, K., Hirai, N., Fujimori, S., Hino, K., Yanagawa, H., Doi, N., Miyamoto-Sato, E.: p53 binding RNA suppressed ubiquitination mediated by hMdm2, The 33rd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan and 83rd Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society (BMB2010), Kobe Port Island, Kobe, 12/10/2010
 22. 日野克哉、藤森茂雄、辻融、新井友香理、斉藤輪太郎、富田勝、柳川弘志、土居信英、宮本悦子: 文献情報に基づくタンパク質-RNA 相互作用データの効率的収集システム (IMAS) の開発と応用、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/10/2010
 23. 平井直也、辻融、増岡和代、藤森茂雄、柳川弘志、土居信英、宮本悦子: In vitro virus (IVV) 法によって明らかにされた p53 タンパク質-SAR1AmRNA の 3' UTR 相互作用解析、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2010)、神戸ポートアイランド、神戸。12/10/2010
 24. Ozaki Y, Naito Y, Yanagawa H, Suzuki Y, Du W, Yamada T, Matsuo K, Doi N, Iijima S, Matsushita M, Tahara K, Hattori Y. A Novel Anilinoquinazoline Derivative Inhibits Growth of High-Risk Myeloma Cells In Vivo and Regulates Differentiation of Osteoclasts. 52nd AMERICAN SOCIETY of HEMATOLOGY Annual Meeting and Exposition, Orland, USA, 12/12/2010
 25. Tateyama S, Kodama T, Ohta K, and Yanagawa H. Molecular interaction network of KLF4 using mRNA display. The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010) Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, 12/18/2010
 26. Umezawa H, Tabata N, Sakuma Y, Takenaka Y, Matsumoto Y, Doi N, Nagano O, Saya H and Yanagawa H: In vitro selection of anti-CD44v scFv inhibiting CD44v-xCT interaction, 34th MBSJ 2011, Yokohama, Dec. 13, 2011
 27. Sato R, Doi N, Misumi S, Shoji S, Matsushima K, Yokochi S and Yanagawa H: In vitro evolution of high-affinity anti-CCR5 single chain Fv via neutral drift libraries, 34th MBSJ 2011, Yokohama, Dec. 13, 2011
 28. Tokunaga M, Shiheido H, Hayakawa I, Takashima H, Yanagawa H, Horisawa K and Doi N: FK506 Inhibits the Function of Hereditary Spastic Paraplegia Protein Spartin, 34th MBSJ 2011, Yokohama, Dec. 13, 2011

29. Tabata N, Sakuma Y, Shimizu T, Saya H, Ogawa Y, Shoji M, Sugai T, Doi N and Yanagawa H: Screening of anilinoquinazoline derivatives inhibiting migration and invasion of induced cancer stem cells and their action mechanism, 34th MBSJ 2011, Yokohama, Dec. 14, 2011
30. Tateyama S, Nagano O, Tamada M, Saya H, Doi N and Yanagawa H: In vitro virus (IVV) method revealed an interaction between CD44 and pyruvate kinase M2 (PKM2), 34th MBSJ 2011, Yokohama, Dec. 14, 2011
31. Tokunaga M, Shiheido H, Hayakawa I, Utsumi A, Takashima H, Doi N, Horisawa K and Yanagawa H: In vitro selection of a novel FK506-binding protein by using mRNA display, EMBO Molecular Medicine Conference: Molecular Insights for Innovative Therapies, Heidelberg, Germany, Dec. 1-3, 2011
32. Tabata N, Sakuma Y, Shimizu T, Saya H, Doi N, Yanagawa H: Selection of scFv inhibiting adhesion of induced cancer stem cells by *in vitro* virus (IVV) method. 35th MBSJ 2012, Fukuoka, Dec. 13, 2012
33. Shiheido H, Terada F, Naito Y, Tabata N, Kimura H, Hayakawa I, Genma H, Matsumura N, Takashima H, Tokunaga M, Ogawa Y, Ono T, Hirano T, Du W, Yamada T, Shoji M, Sugai T, Doi N, Iijima S, Hattori Y, Yanagawa H: Target identification of antitumor drugs against intractable tumors by mRNA display. 35th MBSJ 2012, Fukuoka, Dec. 13, 2012
34. Tokunaga M, Shiheido H, Tabata N, Sakuma Y, Takashima H, Horisawa K, Doi N, Yanagawa H: An anilinoquinazoline derivative Q15 induces apoptosis through interacting with MIP-2A. 35th MBSJ 2012, Fukuoka, Dec. 13, 2012
35. Suzuki H, Tabata N, Sakuma Y, Yoshimura Y, Tsuji T, Shoji M, Sugai T, Shimizu T, Saya H, Doi N, Yanagawa H: Screening of natural products against induced cancer stem cells. 35th MBSJ 2012, Fukuoka, Dec. 13, 2012
36. Nagumo Y, Mihara M, Horisawa K, Yanagawa H, Doi N: PURE mRNA display for *in vitro* selection of scFv antibodies. 8th Asian Biophysics Association (ABA) Symposium. 5/27/2013, Jeju, Korea

(4)知財出願

① 国内出願 (5 件)

1. 発明の名称:癌特異的アイソフォームに対するモノクローナル抗体
 発明者:益子高、佐谷秀行、永野修、丹羽眞一郎、進藤孝之、押野太智
 出願人:学校法人近畿大学、学校法人慶應義塾、リンク・ジェノミクス株式会社
 出願日:2009/7/14
 出願番号:特願 2009-165853
2. 発明の名称:in vitro Fibrotic Focus モデル及び、それを用いた治療薬評価システム
 発明者:佐谷秀行、永野修、丹羽眞一郎、中村賢志、岩崎良美、畑幸江
 出願人:学校法人慶應義塾、リンク・ジェノミクス株式会社
 出願日:2009/10/22
 出願番号:特願 2009-243455
3. 発明の名称:抗腫瘍剤
 発明者:佐谷秀行、永野修、益子高、丹羽眞一郎
 出願人:学校法人慶應義塾、学校法人近畿大学、リンク・ジェノミクス株式会社
 出願日:2011/1/13
 出願番号:特願 2011-005311
4. 発明の名称:ダイヤモンド微小電極を用いた還元型グルタチオンの測定装置
 発明者:Stéphane Fierro、栄長泰明、佐谷秀行
 出願人:学校法人慶應義塾
 出願日:2012/3/30

出願番号:特願 2012-080323

5. 発明の名称:ダイヤモンドマイクロ電極を用いた生体内 pH 測定装置および方法

発明者:栄長泰明、Stéphane Fierro、永野修、清島亮、佐谷秀行

出願人:学校法人慶應義塾

出願日:2013/8/22

出願番号:特願 2013-172401

(5)受賞・報道等

① 受賞

- ・2008年11月17日 佐川特別研究助成賞

② マスコミ(新聞・TV等)報道

- ・「DNA複製のたんぱく質、重要度を点数化、慶大」という見出しで、DNAの複製など細胞内の重要な反応にかかわるタンパク質を効率よく見つける技術の開発に成功したという内容の記事が、2009年6月17日付けの日経産業新聞の朝刊で報道された(柳川弘志)。
- ・「新薬候補のたんぱく質、低コストで検出、慶大」、という見出しで、IVV法と微小な流路をもつマイクロ流体チップを組み合わせた、癌の発症や免疫抑制に関する抗体やタンパク質を1回のスクリーニングで100万倍濃縮できる超高効率なスクリーニングシステムの開発に成功したという内容の記事が、2009年6月22日付けの日本経済新聞の朝刊で報道された(柳川弘志)。
- ・「既存薬の新効果見つけよう 慶大や14社「薬の図書館」」という見出しで、医薬品として既に開発され、安全性を確認済みの薬を、研究者に無料で配布する「薬の図書館(既存薬ライブラリー)」を、慶應義塾大学が製薬会社14社の協力で始めたという内容の記事が、2010年7月2日付けの朝日新聞朝刊で報道された(佐谷秀行)。
- ・「「胃がん幹細胞」増殖の仕組み解明。慶大、治療薬開発に道」という見出しで、胃癌幹細胞に対する治療法開発についての記事が2010年9月23日付け日本経済新聞朝刊で報道された(佐谷秀行)。
- ・「がん幹細胞 解明進む」という見出しで、誘導型がん幹細胞の有用性について紹介した記事が2010年12月21日付けの朝日新聞朝刊で報道された(佐谷秀行)。
- ・Cancer Cell 掲載の論文に関して、慶應義塾大学・JSTにて「癌幹細胞マーカーCD44が活性酸素を抑制することによって腫瘍の増大や治療が効かない状況を引き起こす分子メカニズムを解明—癌幹細胞を特異的に標的とした治療法を開発できる可能性を拓く—」と題して、2011年3月15日にプレス発表。本研究成果は平成23年3月18日付け科学新聞「ガン治療の新標的に期待」、平成23年4月7日付け化学工業日報「がん幹細胞マーカーCD44、治療抵抗性の機序解明」で報道された。
- ・平成23年4月7日 化学工業日報「がん幹細胞マーカーCD44、治療抵抗性の機序解明」
- ・平成23年11月1日 日本産業新聞「がんに挑む。親玉「幹細胞」究明進む。薬で転移抑制など探る」
- ・Nat Commun 掲載の論文に関して、慶應義塾大学・JSTにて「癌幹細胞マーカーCD44の発現が乳癌の肺への転移を促進するメカニズムを解明—転移性乳癌細胞を標的とした治療法確立・治療薬開発に期待—」と題して、平成24年6月7日にプレス発表。本研究成果は、平成24年6月7日付け日刊工業新聞「酸化ストレス抑制たんぱく質 がん転移を促進」、平成24年6月8日付け日経産業新聞「悪性度の高い乳がん細胞 肺転移の仕組み解明 慶大など」で報道された。
- ・癌幹細胞に対する臨床試験の計画について、平成24年9月18日 日本経済新聞「がん幹細胞叩け、臨床研究相次ぐ、慶大など胃が対象」
- ・Scientific Report 掲載の論文に関して、慶應義塾大学・JSTにて「針状ダイヤモンド電極でがんバイオマーカーを簡便に生体内測定」と題して、平成24年11月29日にプレ

ス発表。本研究成果は、平成 24 年 11 月 30 日付け日刊工業新聞「慶大、がん放射線療法
法の効き目を針状ダイヤモンド電極で測定ーマウス実験で成功」、平成 24 年 12 月 6 日付け日
経産業新聞「針状ダイヤモンドで効果判定 癌治療、慶大が新技術」で報道された。

- CD44v 発現癌幹細胞を標的とした臨床研究が開始されることが、「がん幹細胞狙い撃ち
治療。再発・転移させず根治図る」という見出しで、平成 25 年 3 月 25 日付け朝日新聞に掲載
された。
- 平成 25 年 8 月 4 日付け読売新聞に「がんの親玉「幹細胞」たたけ」という見出しで、
CD44v を標的とする臨床研究が報道された。
- 平成 25 年 9 月 15 日、NHK 番組「サイエンス ZERO」にて CD44v を標的とする癌幹
細胞に対する治療法開発について紹介された。

(6) 成果展開事例

①実用化に向けての展開

- CD44v とシスチントランスポーターxCT の結合が癌幹細胞の薬剤耐性に関与することを見出したことにより、これらの分子連携を抗体で阻害することにより、癌幹細胞の機能を抑制できる可能性がある。この考え方に基づき、JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム【本格研究開発シーズ育成タイプ】(A-STEP) (研究開発課題名:「トリプルネガティブ乳癌治療用抗体医薬の開発」、H21~23) に採択され、企業(リンクジェノミクス株式会社)とともに各種抗体の作製を行った。作製した抗体は、現在 ADC (antibody-drug conjugate) 薬剤としての可能性について企業と検討を行っている。
- 本研究で見出した CD44v 陽性がん幹細胞を標的とする薬剤スルファサラジンをもちいた臨床試験を、厚生労働省「早期・探索的臨床試験拠点整備事業 研究事業」のサポートによって実施した。臨床試験の詳細は、以下の URL を参照のこと：
 - ◇ <https://upload.umin.ac.jp/cgi-open-bin/ctr/ctr.cgi?function=brows&action=brows&recptno=R000011927&type=summary&language=J>

②社会還元的な展開活動

- 本研究成果をインターネット(URL; <http://www.genereg.jp/>)で公開し、一般に情報提供している。
- 得られた成果に基づいて以下の市民講座で講演を行った。
 - 第 15 回日本癌学会市民講座. 2010 年 5 月 16 日、仙台市青少年文化センター、仙台、「がん幹細胞とは何か？」
 - 第 18 回日本癌学会市民公開講座 ~がんと共存から克服へ、そして未来へ~ 2011 年 10 月 2 日、名古屋国際会議場、名古屋、「がん幹細胞とは何か？」

§ 5. 最後に

本研究の当初の目標は、§ 2に示すように「iCSC を用いることにより、分化プログラム及びニッチとの連携を標的とした新たな癌治療戦略を樹立し、従来の抗癌剤とは異なった創薬を行う」ことであり、その目標に関してはかなり達成できたと考えている。本研究の過程で癌幹細胞が活性酸素を減少させる作用を持ち、それが癌幹細胞マーカーである CD44 とシスチントランスポーターxCT の協働作用によるものであることを見出したことは極めて意義深いと考える。更に、本研究で構築した「既存薬ライブラリー」の概念を用いて既存の薬剤の中に xCT の阻害効果を持つものがないかを探索し、スルファサラジンを発掘したことも幸運であった。本研究が「創薬」を目指すプロジェクトであることから、この既存薬を早期に臨床応用に持ち込みたいと考え、多くの臨床医や治験関係者と会談を繰り返した。最終的には国立がん研究センター東病院という経験豊かな強力なパートナーを得て、研究期間内に臨床試験に持ち込むことができた。この研究を通して、創薬から臨床試験までの流れと必要な手続きを修得することができ、更に創薬を行うための人的ネットワーク構築を果たすことができ、今後アカデミズムが新たな薬剤を臨床に持ち込むための一つの道筋を示すことができたと考えている。このノウハウは今後多くの研究者に伝達し、アカデミズムにおける薬剤開発を励起したいと考えている。

毎年行われる評価会、中間評価では、このプロジェクトで開発した技術と考え方を用いて iPS 細胞から発生する腫瘍の予防や治療に関する研究を目指すよう助言を受け、積極的に京都大学 iPS 研究所と共同研究を行い、iPS 細胞由来腫瘍の性状解析を行った。iPS 細胞からできる腫瘍は私達が iCSC で作製した腫瘍に比べて悪性度は低く、成長も緩やかであるため、癌幹細胞的な細胞を取得することが難しく、研究の速度は必ずしも速くはなかった。しかし、最近になって、iPS 細胞由来の奇形腫の中に未分化な細胞群を見出し、分取することが可能となり、それらが癌幹細胞として性質を持つことを見出すことができた。今後、iPS 細胞が腫瘍化する時の決定的な分子イベントの解析、iPS 由来癌幹細胞の弱点を詳細に解析し、薬剤取得に向けてスクリーニングを更に進める計画である。

今回のプロジェクトでは iCSC を通して、癌幹細胞の生存を維持するための機構を多く知ることができ、その機構を細胞系のアッセイに落とし込んでスクリーニングを行う一連のシステムを構築することができた。またアッセイの正確さが薬剤開発に以下に重要なことを同時に学ぶことができた。慶應義塾大学医学部では、薬剤スクリーニングのための双腕実用ロボットを導入し、このロボットを用いて現在新しい癌幹細胞標的薬剤 (Imp3 阻害剤) のスクリーニングを開始している。

今回のプロジェクトを通して、基礎研究から臨床応用までの知識と技術と人脈を取得した多くの若手研究者が育ってくれたことが何より嬉しい。彼らが今後我が国の創薬研究の核となって活躍してくれることを心から期待している。

