

平成 27 年度
金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2016. 4

金沢大学がん進展制御研究所

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がん病体モデルの作製と解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・希少がん研究分野 主任研究員・大木理恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授：大島 正伸
【研究目的】	本研究により、悪性胃がんの良いモデルマウスを作製するとともに、胃がんの悪性化メカニズムを解明し、胃がん患者と死亡者を減らす事につながる新しい胃がん治療薬／診断薬の開発につながる研究成果を得たいと考えている。 大島正伸教授が作製した胃がんモデルマウスである Gan マウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(intestinal adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、悪性度が低く、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究では Gan マウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、ヒト悪性化胃がんを分子機序から再現する新規悪性胃がん病体モデルを作製する。さらに、このマウスで発症したがんを解析する事により、胃がんの悪性化に関わる p53 標的遺伝子群を同定する。このようにして選出されたがん悪性化を抑制する p53 標的遺伝子は、細胞レベル、遺伝子欠損マウスを使った個体レベルでの機能解析を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに p53 遺伝子欠損 Gan マウスの作製に成功している。 1. 消化器がんモデルマウス (K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse) と p53 欠損マウスを掛け合わせる。p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取した。p53 欠損 Gan マウスの胃癌組織では、通常の Gan マウスには見られない浸潤が認められ、p53 欠損が実際にがんの悪性化を引き起こす事が示された。 2. 得られた癌組織より、mRNA を精製した。p53 を野生型で持つ Gan マウスの胃癌では p53 が活性化しており、p53 標的遺伝子が転写誘導されていた。今後、マイクロアレイ発現解析により、p53 依存性に発現する遺伝子群を同定する。 3. 申請者は、ゲノムワイドな p53 結合部位を CHIP-chip 解析により同定している。そこで、p53 依存性に発現する遺伝子の中から、p53 結合が認められる遺伝子、すなわち p53 の直接の標的遺伝子を同定する。 4. 同定した遺伝子が、胃がんの発生及び悪性化とどのように関わるか解析する。 今後、さらに詳細に p53 欠損 Gan マウスで発症した癌を解析することにより、胃癌の悪性化をいかにして p53 が抑制しているか明らかにしたいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Issei Ezawa, Yuichiro Sawai, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Yuka Kobayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and <u>Rieko Ohki</u>. (corresponding author) A novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. Cancer Science, in press.	

2. Yoshinori Asano, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Satoko Tatebe, Issay Kitabayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and Rieko Ohki, (corresponding author).

IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis.

Scientific Reports, 6, 19174; doi: 10.1038/srep19174 (2016).

3. Xiaoqi Wang, Guangyuan Li, Sanjay Koul, Rieko Ohki, Matthew Maurer, Alain Borczuk, Balazs Halmos.

PHLDA2 is a key oncogene-induced negative feedback inhibitor of EGFR/ErbB2 signaling via interference with AKT signaling.

Oncotarget, DOI: 10.18632/oncotarget.3674.

4. Toshitsugu Fujita, Miyuki Yuno, Daisuke Okuzaki, Rieko Ohki, and Hodaka Fujii.

Identification of non-coding RNAs associated with telomeres by enChIP-RNA-Seq.

PLoS One, 10, e0123387, 2015.

総説

1. 陳 ヨ, 斉藤 梢, 山口 陽子, 大木 理恵子.

膵神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の発見.

胆と膵, Vol.36 No.6、2015 年 6 月: 515-523.

【学会発表】

口頭発表(国内 5、海外 1)

1. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 2015 SNUCRI Cancer Symposium 2015 年 4 月 2 日. 於:韓国広州 国外

2. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors -towards development of tailor-made therapies for neuroendocrine tumors- 口頭発表 大木理恵子 シンポジウム『最先端医用画像処理と次世代がん治療装置(BNCT)』2015 年 5 月 16 日. 於:OIST 国内

3. Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である 口頭発表 大木理恵子 お茶の水産学アカデミア集会 2015 年 5 月 27 日. 於:順天堂大学 国内

4. 新規がん関連遺伝子のクローニングと機能解析～膵神経内分泌腫瘍における新規がん抑制遺伝子の同定～ 口頭発表 大木理恵子 東北大学病院 消化器外科学・講演会 2015 年 5 月 13 日. 於:東北大学 国内

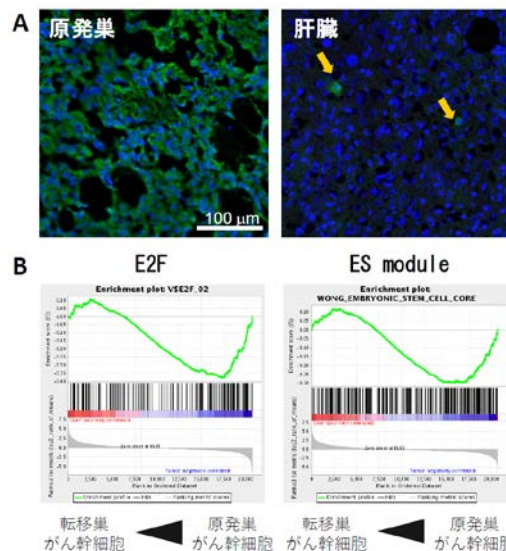
	5. Akt の新規抑制因子をコードする PHLDA3 遺伝子は 神経内分泌腫瘍のがん抑制遺伝子である 口頭発表 大木理恵子 日本分子生物学会 ワークショップ 2015 年 12 月 4 日. 於:神戸 国内 6. PHLDA3 遺伝子と MEN1 遺伝子による膵内分泌腫瘍抑制機構の解明。 チン ヨ、齊藤 梢、會田 雪絵、並木 秀男、仙波 憲太郎、大木 理恵子 2016 年 2 月 3 日、2015「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ ポスター発表 (国内 4) 1. Establishment and analysis of a novel malignant gastric cancer mouse model harboring loss of tumor suppressor gene p53. Junko Ohtsuka, Issei Ezawa, Hideo Namiki, Ryo Abe, Masanobu Oshima, Rieko Ohki 日本癌学会年会 2015 年 10 月 10 日、於:名古屋 国内 2. PHLDA3 遺伝子は下垂体神経内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子である。 峯岸舞子、齋藤 梢、チンヨ、會田雪絵、川瀬竜也、山田正三、並木秀男、仙波憲太郎、大木理恵子 2015 年 12 月、日本分子生物学会 3. PHLDA3 遺伝子と MEN1 遺伝子による膵内分泌腫瘍抑制機構の解明。 チン ヨ、齊藤 梢、會田 雪絵、並木 秀男、仙波 憲太郎、大木 理恵子 2015 年 12 月、日本分子生物学会 4. PHLDA3 遺伝子と MEN1 遺伝子による膵内分泌腫瘍抑制機構の解明。 チン ヨ、齊藤 梢、會田 雪絵、並木 秀男、仙波 憲太郎、大木 理恵子 2015 年 12 月、日韓がんワークショップ 【その他特筆事項】 該当せず
--	--

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・教授・清水浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・准教授・松田史生
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士後期課程・岡橋伸幸
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士前期課程・前田昴亮
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	診断・治療技術が格段に進歩した今日においてもがん死が減少しないのは、がんの再発・転移や薬剤抵抗性の制御が十分に実現されていないためである。最近、このようながん悪性形質の獲得機序とがん細胞が獲得し得る「未分化性」、すなわち、がん幹細胞の関連が注目されている。本研究では、培養細胞に適用可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法を開発し、がん細胞において、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸(PPP)経路、グルタミン経路などの中心炭素代謝の動態を明らかにし、がん細胞の代謝経路の流れが様々なコンテキストにおいてどのように変化するかを解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究においては、培養細胞の解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸(PPP)経路、グルタミン経路等の中間体中の ^{13}C 標識パターンから細胞内代謝フラックス分布を測定する代謝モデル構築し、培養条件、分析条件設定など、炭素中心代謝経路においてフラックスを決定するシステムを開発した。 [1-^{13}C]グルコース含有培地で <i>p53</i> 欠損マウス軟部腫瘍由来細胞株を培養し、継時的に細胞を回収、抽出した代謝中間体を誘導体化し、^{13}C 標識割合を GC-MS で観測した。観測されたマススペクトルから天然同位体の影響を除去したところ、解糖系下流の代謝物 3-ホスホグリセリン酸、ホスホエノールピルビン酸では、1 つ ^{13}C 標識された分子と非標識の分子がほぼ同じ割合で観測された。 これらのことからグルコースがペントースリン酸経路での 1 位の脱炭酸を経ずに、主に解糖系を経て代謝されていることが示唆された。同じ方法を用いて[1-^{13}C]グルタミン含有培地による標識実験を行った。1 つ ^{13}C 標識されたクエン酸が 10.2%存在することが確認され、取り込まれたグルタミンの一部はクエン酸へと還元的に代謝されていることが示唆された。これらの実験から得られた ^{13}C 標識データを用い、我々が独自に開発した解析プラットフォーム OpenMebius (Kajihata ら、2014)により、代謝フラックスを決定した。その結果、取り込んだグルコースの解糖系とペントースリン酸経路の代謝フラックス比が決定された。また、取り込まれたグルタミンのイソクエン酸デヒドロゲナーゼの逆反応をクエン酸へと変換される還元的グルタミン代謝フラックスが存在していることが示唆された(Okahashi ら、2015)。今後、これらのシステムをインビトロがん幹細胞モデルの代謝様態の解析に展開して行くことにより、がん幹細胞特異的な代謝フラックスが解明へと展開することが期待される。	

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Nobuyuki Okahashi, Susumu Kohno, Shunsuke Kitajima, Fumio Matsuda, Chiaki Takahashi, Hiroshi Shimizu, Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations, <i>Journal of Bioscience Bioengineering</i>, 120(6):725-31 (2015)
	【学会発表】 1. 岡橋伸幸、河野晋、松田史生、高橋智聡、清水浩、動物培養細胞中枢代謝経路における ^{13}C 代謝フラックス解析法の構築日本質量分析学会 第 63 回質量分析総合討論会 2015、つくば国際会議場エポカルつくば、2015 年 6 月 17-19 日 2. 岡橋伸幸、河野晋、松田史生、高橋智聡、清水浩、p53 欠損マウス軟部腫瘍由来細胞株の ^{13}C 代謝フラックス解析、第 3 回がんと代謝研究会、石川県立音楽堂交流ホール 2015 年 7 月 16-17 日 3. 清水浩、高橋智聡、がん幹細胞特異的代謝フラックス解明、平成 27 年度金沢大学がん進展制御研究所、共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、金沢大学自然科学系図書館 AV ホール、2015 年 12 月 17 日
	【その他特筆事項】

研究区分		特定共同研究
研究課題		転移乳がん幹細胞の幹細胞性制御機構のパスウェイ解析
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・准教授・下野洋平
研究分担者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・大学院生・向山順子
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士研究員・西村建徳
	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南博信
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	乳がん幹細胞は、がん組織の形成と維持、さらにはがんの転移にも関わることが示されてきた。乳がんの転移は、時として治療による寛解後 10 年以上経過してから出現するが、転移巣の形成に中心的な役割をもつ「転移乳がん幹細胞」を特徴づける分子機構は明らかではない。本研究では、乳がん手術検体を移植したヒト乳がん異種移植マウスの原発巣とがん転移巣からがん幹細胞を分離し、遺伝子発現解析およびパスウェイ解析により原発巣と転移巣のがん幹細胞を比較検討する。本研究を通じて、転移がん幹細胞の幹細胞性の制御に関わる分子機構を解明する。	
【研究内容・成果】	ヒト乳がんの手術検体を免疫不全マウスに移植したヒト乳がん異種移植マウスの原発巣および臓器転移巣よりがん幹細胞を分離した。私たちが作製したヒト乳がん異種移植マウスの転移巣は単細胞またはごく少数の細胞からなる集塊からなり（図A）、細胞周期の進行が著明に抑制された潜在状態にあった。原発巣および転移巣のがん幹細胞より抽出した RNA を逆転写して増幅したのちに、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析およびパスウェイ解析を行った（図B）。解析結果より、転移がん幹細胞を特徴づける下記の性質が明らかになった。 （1） 転写因子活性の減弱化 MYC や E2F に代表される転写因子のパスウェイのシグナル強度は、転移がん幹細胞では原発巣のがん幹細胞に比べ弱かった（図B）。 （2） 上皮間葉転換の減弱 転移がん幹細胞では、上皮間葉転換にかかわるパスウェイのシグナル強度が弱く、より上皮様の性質をもつことが示唆された。 （3） 幹細胞の維持に関わるシグナル伝達系の変化 転移がん幹細胞では、ES 細胞モジュールや NOTCH シグナルのパスウェイのシグナル強度は減弱していることが示唆された（図B）。一方、WNT シグナルのパスウェイのシグナル強度は原発巣のがん幹細胞と同様であった。 これらの結果より、転移がん幹細胞は、原発巣のがん幹細胞とは明らかに異なる機構で維持されていることが示唆された。現在、転移がん幹細胞を特徴づけるマイクロ RNA の発現解析結果も踏まえて、転移がん幹細胞の維持と休眠化に関わる分子機構を解析中である。	



ヒト乳がん異種移植マウスの原発巣と転移巣（A）よりがん幹細胞を分離し、パスウェイ解析を行った。転移巣のがん幹細胞では、原発巣のがん幹細胞と比べ、E2Fなどの各種転写因子のパスウェイやES細胞モジュールの減弱化（B）を認めた。

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Nobutani K, <u>Shimono Y</u>, Mizutani K, Ueda Y, Suzuki T, Kitayama M, Minami A, Momose K, Miyawaki K, Akashi K, Azuma T, Takai Y. Downregulation of CXCR4 in metastasized breast cancer cells and implication in their dormancy. PLoS One, 10: e0130032, 2015. 2. <u>Shimono Y</u>, Mukohyama J, Nakamura S, Minami H. MicroRNA regulation of human breast cancer stem cells. Journal of Clinical Medicine (Review), 5:1, 2016.
	【学会発表】 1. <u>Shimono Y</u>, Isobe T, Hisamori S, Clarke MF. miR-142 upregulates miR-150 and confers an aberrant proliferative ability to human breast cancer stem cells. 第 13 回 幹細胞シンポジウム, 東京, 2015. 5. 2. <u>Shimono Y</u>. Cancer stem cells and drug resistance in human breast cancers. Joint Symposium of University of Liege & Kobe University, 神戸, 2015. 5. 3. Ueda Y, Nobutani K, <u>Shimono Y</u>, Mizutani K, Suzuki T, Kitayama M, Minami A, Momose K, Miyawaki K, Akashi K, Azuma T, Takai Y. Downregulation of CXCR4 in metastasized breast cancer cells and implication in their dormancy. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015. 10.
	【その他特筆事項】 特になし。

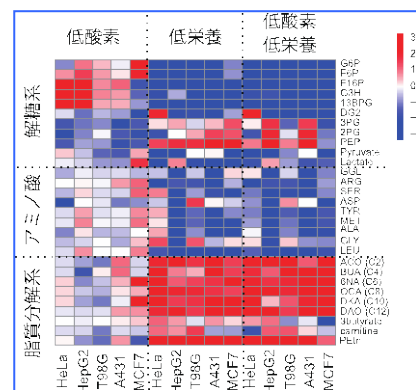
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		抗ガン免疫応答におけるケモカイン受容体XCR1発現樹状細胞およびXCR1の機能的意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学生体調節機構研究部・教授・改正恒康
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学生体調節機構研究部・准教授・邊見弘明
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学生体調節機構研究部・学内助教・大田友和
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	樹状細胞 (DC) は、抗原提示細胞として機能し、抗がん免疫に重要な役割を果たすが、最近、機能的特性の異なるいくつかのサブセットに分けられることがわかってきた。本研究では、細胞傷害性 (CD8) T 細胞への分化を誘導する能力の高い樹状細胞サブセット (ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞、XCR1+DC) に焦点を当て、その樹状細胞サブセットが、恒常性維持あるいは抗がん免疫応答にどのように関与しているのかを解明し、XCR1+DC を標的とした抗がん免疫療法の確立を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1. 遺伝子改変マウスを用いた、XCR1+DC の動態、機能的意義の解明 XCR1 遺伝子座に cre レコンビナーゼをノックインしたマウス(XCR1-cre マウス)を作成し、ROSA26-STOP-DTA マウスと交配させることにより、XCR1+DC だけでジフテリアトキシン A サブユニットが発現し、XCR1+DC を構成的に欠失しているマウス (XCR1-DTA マウス) を樹立した。XCR1-DTA マウスにおいては、期待通り、XCR1+DC が欠失していた。また、このマウスでは、腸管内の T 細胞が著明に減少しており、さらに、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の投与により誘導される腸炎の症状が悪化していた。この結果から、XCR1+DC は、腸管 T 細胞集団を維持することにより、腸管免疫の恒常性維持に関与していることが明らかになった。今後、この XCR1-DTA マウスを用いて、DSS により誘導される腸炎を基盤としたがんモデル、7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA)、12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA)を塗布することによる皮膚がんモデルの解析を進める予定である。 2. 抗原と XCL1 の融合タンパクによる抗がん免疫応答の誘導 卵白アルブミン (OVA) 由来の抗原ペプチド (OT-I) とマウス XCL1 の融合タンパク (mXCL1-OVA) を作成した。mXCL1-OVA を免疫アジュバント (二本鎖 RNApoly(I:C)) と共に投与することにより、OT-I 特異的な CD8T 細胞応答および OVA を発現するメラノーマ細胞株 (B16-OVA) に対する抗がん免疫応答が誘導できた。これらの効果、その機序についてさらなる解析を進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 S. Eickhoff, A. Brewitz, M. Y. Gerner, F. Klauschen, K. Komander, H. Hemmi, N. Garbi, T. Kaisho, R. N. Germain, W. Kastenmüller. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct t cell-dendritic cell interactions. Cell 162:1322-1337, 2015. R. Ono, T. Kaisho, T. Tanaka. PDLIM1 inhibits NF-κB-mediated inflammatory signaling by sequestering the p65 subunit of NF-κB in the cytoplasm. Sci. Rep. 5:18327, 2015. N. J. Daniels, E. Hyde, S. Ghosh, K. Seo, K. M. Price, K. Hoshino, T. Kaisho, T. Okada, F. Ronchese. Antigen-specific cytotoxic T lymphocytes target airway CD103+ and CD11b+ dendritic cells to suppress allergic inflammation. Mucosal Immunol. 9:229-239, 2016. M. Kitano, C. Yamazaki, A. Takumi, T. Ikeno, H. Hemmi, N. Takahashi, K. Shimizu, Scott E. Fraser, K. Hoshino, T. Kaisho, T. Okada. Imaging of the cross-presenting dendritic cell subsets in the skin-draining lymph node. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 113:1044-1049, 2016. T. Ohta, M. Sugiyama, H. Hemmi, C. Yamazaki, S. Okura, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Orimo, K. J. Ishii, K. Hoshino, F. Ginhoux, T. Kaisho. Crucial roles of XCR1-expressing dendritic cells and the XCR1-XCL1 chemokine axis in intestinal immune homeostasis. Sci Rep 6:23505, 2016. 【学会発表】 Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, T.Ohta, Y. Fukuda, H. Yamaue, T. Kaisho. Nov. 18-20, 2015. Effective anti-tumor immunity provoked by chemokine-directed delivering to a DC subset with high CTL-inducing ability. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Sapporo, Japan. T. Ohta, H. Hemmi, T. Kaisho. Nov. 5-6, 2015. Intestinal immune homeostasis is regulated by XCR1-expressing dendritic cells through XCL1-XCR1 axis. LC2015 14th International Workshop on Langerhans Cells. Kyoto, Japan. 【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		TET2 変異による骨髄異形成症候群幹細胞の制御機構
研究代表者	所属・職名・氏名	熊本大学国際先端医学研究機構・特別招聘准教授・指田 吾郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	骨髄異形成症候群(MDS)は血球分化異常と機能障害による造血不全を来とし、一部が急性骨髄性白血病(AML)へ移行する治療困難な疾患群である。その病源は単クローン性 MDS 幹細胞であるが、発症過程における分子基盤の理解は適切なモデルマウスがないこともあり進んでいなかった。近年のゲノムワイドな遺伝子解析によって、<i>EZH2</i>、<i>TET2</i> などエピジェネティック制御遺伝子の機能喪失型変異が MDS で同定された。申請者は <i>Tet2</i> 欠損または <i>Ezh2</i> 欠損マウスによる MDS/AML 疾患モデルを用いて病態解析を行ってきた。本研究課題では、<i>TET2</i> 変異などエピゲノム変異による MDS 幹細胞の発生過程の分子基盤を理解することを目指した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	一般的に、ヒト MDS細胞の増殖活性は、急性白血病細胞と異なって亢進していないが、造血幹細胞から起こり野生型細胞を駆逐して MDS 発症に至る。このヒトで詳細不明な病態基盤の理解のために、申請者の作製確立した <i>Tet2/Ezh2</i> ダブルノックアウト(DKO)-MDS マウスからアプローチした。<i>Tet2/Ezh2</i> DKO 細胞は <i>Tet2</i> KO 細胞に比較して <i>in vitro</i> 細胞増殖能が有意に低いにも関わらず、<i>Tet2/Ezh2</i> DKO 細胞は <i>Tet2</i> KO 細胞に比較して早期に MDS を発症する(Muto T, Sashida G, et al. J Exp Med 2013)。DNA 脱メチル化酵素である <i>Tet2</i> 欠損がどのように MDS 幹細胞の発生と病態の進展に貢献するのかを解明するために、DNA メチル化を一塩基単位で定量できる高精度な解析手法である RRBS 法によって解析を進めた。 現在までの <i>Tet2/Ezh2</i>-DKO マウス幹/前駆細胞の解析では、野生型に比較して有意に遺伝子領域を含んだ CpG アイランド領域またエンハンサー領域における DNA 高メチル化を生じていた。これら高メチル化領域を有した遺伝子群は、Gene Ontology (GO)解析によって転写因子や細胞増殖・分化制御遺伝子に有意であった(未発表データ)。また、このメチル化領域は既存のデータにみられるヒト MDS 造血幹/前駆細胞の DNA 高メチル化群とも有意に重複しており、申請者の MDS マウスモデルの有用性を強く支持していた。今後、MDS 幹細胞機能や幹細胞ニッチ制御に関連する因子を最優先候補として、その機能解析を実施していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Sashida G</u>, Wang C, Tomioka T, Oshima M, Aoyama K, Kanai A, Mochizuki-Kashio M, Harada H, Shimoda K, Iwama A. The loss of Ezh2 drives the pathogenesis of myelofibrosis and sensitizes tumor-initiating cells to bromodomain inhibition. J Exp Med 2016, in press. 2. Mochizuki-Kashio M, Aoyama K, <u>Sashida G</u>, Oshima M, Tomioka T, Muto T, Wang C, Iwama A. Ezh2 loss in hematopoietic stem cells predisposes mice to develop heterogeneous malignancies in an Ezh1-dependent manner. Blood. 2015; 126(10): 1172-83. 3. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, Hidaka T, Kubuki Y, Shimoda H, Marutsuka K, <u>Sashida G</u>, Aoyama K, Yoshimitsu M, Harada T, Abe H, Miike T, Iwakiri H, Tahara Y, Sueta M, Yamamoto S, Hasuie S, Nagata K, Iwama A, Kitanaka A, Shimoda K. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. Blood. 2015; 125(2): 304-15.	
	【学会発表】 1. Sashida G, Wang C, Sato D, Oshima M, Iwama A. Ezh2 loss promotes the transformation of early T cell precursor ALL via suppressing critical genes for T-cell commitment. アメリカ血液学会総会 2015 年 12 月 5 日-8 日 オーランド	
	【その他特筆事項】 特になし。	

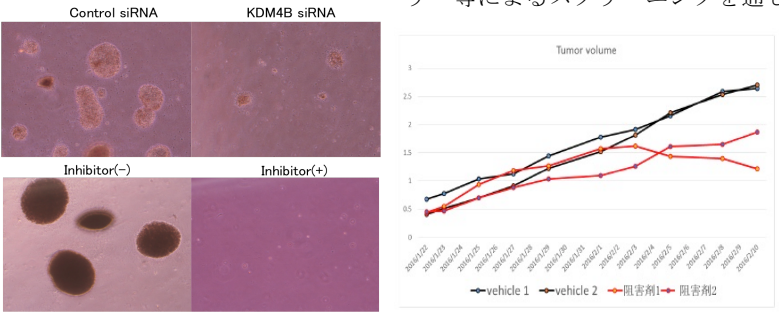
研究区分	一般共同研究	
研究課題	癌代謝を基軸とする癌幹細胞制御機構の解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・特任助教・大澤 毅
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	癌の増殖と転移には腫瘍微小環境や血管新生が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを見だし報告してきた。本研究は低酸素・低栄養の腫瘍微小環境における癌幹細胞の維持機構を“癌代謝と栄養シグナル”の観点から理解し、癌の悪性化・治療抵抗性の分子機構の解明を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境における“癌代謝と栄養シグナル伝達機構の解明”を目的とし、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス統合解析から“代謝”と“栄養シグナル”という分野横断的な共同研究を目的とした。 具体的には、以下の2項目について研究を行った。 (1) <u>低酸素・低栄養における癌幹細胞維持に関与する代謝経路の解明</u> 申請者は低酸素・低栄養が癌幹細胞を介して悪性化に関与することを報告しているが、低酸素・低栄養でどの代謝経路を介して悪性化に寄与するかは不明である。我々は、メタボローム解析から低酸素で蓄積する2-ヒドロキシグルタル酸の他に、低酸素・低栄養で蓄積する癌代謝物(PX, NX など)を発見した(右図)。さらに、PX の代謝経路のリン酸化酵素(PXK)と律速酵素(PXC)の発現制御が PX の蓄積に寄与することをトランスクリプトームとメタボロームの統合解析から同定した。また、これらの酵素の阻害は、<i>in vitro</i> 細胞増殖、及び、<i>in vivo</i> 腫瘍増殖を抑制した。 (2) <u>低酸素・低栄養における癌代謝と栄養シグナルの関与</u> 癌代謝物 PX と“栄養シグナル”の関与を検討するために PX をマウスに投与(1000mg/kg/2days)した結果、肝臓のグリコーゲン蓄積が著しく減少した。PX 投与群の肝臓では、グリコーゲン合成酵素と分解酵素がリン酸化されグリコーゲン分解が促進することを見出した。このことから低酸素・低栄養の癌細胞で蓄積する PX はグリコーゲン代謝を制御することが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Osawa <i>et al.</i>, 投稿中、2. Kondo & Osawa <i>et al.</i>, 投稿中 【学会発表】 1. <u>大澤毅</u> 他、メタボロミクスによる新規オンコメタボライト PEtn の発見、第一回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会：2016 年 2 月 27 日：東京 2. <u>大澤毅</u>、癌代謝物エタノールアミンリンは低栄養のがんの生存に寄与する、第2回血管生物医学会若手研究会：2016 年 3 月 4 日-5 日、仙台 3. <u>大澤毅</u> 他、マルチオミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境、第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日-4 日、神戸 4. <u>Osawa T.</u>, Tumor microenvironment and cancer metabolism, 第 46 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム、2015 年 11 月 16 日-20 日東京 5. <u>大澤毅</u> 他、低酸素・低栄養で脂肪酸代謝を介して蓄積するオンコメタボライトの解析、第 74 回日本癌学会学術集会、2015 年 10 月 8 日-10 日、名古屋 6. <u>Osawa T et al.</u>, Cancer cells utilize lipid metabolism under hypoxia and nutrient starvation, 18th European Cancer Congress-40th ESMO 2015, 2015 年 9 月 25 日-29 日, Vienna, Austria. 7. <u>大澤毅</u> 他、メタボロミクスによる新しいオンコメタボライト EAP の発見、第 27 回高遠シンポジウム、2015 年 8 月 26 日-26 日、京都 8. <u>大澤毅</u> 他、オミクス統合解析から捉えた腫瘍微小環境とがん代謝、第 3 回がんと代謝研究会、2015 年 7 月 16-17 日、金沢 【その他特筆事項】 大澤毅：第一回生活習慣病とがんの代謝栄養メカニズム研究会、最優秀ポスター賞	



平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		神経幹細胞を用いた脳腫瘍発がんモデルにおける mTORC1/2 の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・特任助教・大西 伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	正常細胞でがん遺伝子が活性化すると発がんストレスに応答してがん抑制遺伝子が活性化し、細胞老化やアポトーシス誘導を介して腫瘍化が抑制される。申請者はこれまでに野生型マウス正常神経幹細胞への単一がん遺伝子導入によりがん抑制シグナルを回避する発がんモデルの構築に成功している。本研究ではこのユニークなシステムを用いて、従来のがん遺伝子活性化による発がんストレスの誘導メカニズム、誘導された発がんストレスがどのようにがん抑制シグナルを活性化するのか、について詳細な解析を行うことで発がん過程の責任分子とその連携について明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに申請者らは、悪性脳腫瘍であるグリオブラストーマ(glioblastoma: GBM)の性状を理解し新たな治療戦略を考案することを目的に、がん抑制遺伝子 <i>Ink4a/Arf</i> の欠損(KO)マウス神経幹細胞(neural stem cells: NSCs)にレトロウイルスを用いて活性型 H-RAS(H-RAS V12)を導入し同系マウス脳内に移植するマウス脳腫瘍モデルを構築している(Neoplasia. 13:784-91. 2011)。さらに、anaplastic lymphoma kinase(ALK)の活性型変異体 2 種(ALK F1174L, ALK R1275Q)を同モデルに導入することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、ヒト GBM に酷似した特徴を有する脳腫瘍を形成することに成功している(論文準備中)。申請者は、H-RAS V12 ならびに ALK F1174L, ALK R1275Q の発がんシグナルの共通点ならびに相違点、特に発がんストレスについて解析することを目的に、それぞれの遺伝子を野生型マウス(WT) NSCs に導入し、腫瘍形成能について解析したところ、H-RAS V12 ならびに ALK F1174L を導入した WTNSCs(HV12 cells, FL cells)では腫瘍形成が認められなかったのに対し、ALK R1275Q を導入した WTNSCs(RQ cells)は全例で脳腫瘍を形成することができた。これらの細胞における <i>Ink4a/Arf</i> 発現量を解析したところ、HV12 cells と同様に FL cells で <i>Ink4a/Arf</i> 発現誘導が認められたのに対し、RQ cells では発現の変化は見られなかった。また、H-RAS の下流分子である Mek の阻害剤をそれぞれの細胞に添加したところ、HV12 cells, FL cells では増殖が抑制されたのに対し、RQ cells では増殖に変化が見られなかった。さらに、Mek 阻害剤を添加した RQ cells ではリン酸化 Akt の増強が immunoblot 解析により観察された。これらの結果から、ALK R1275Q は従来のがん遺伝子とは異なった発がんシグナルによって発がんストレスを回避して WTNSC を腫瘍化できること、Mek 阻害時にリン酸化 Akt が増強されるフィードバック機構を制御することが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. The EGF receptor promotes the malignant potential of glioma by regulating amino acid transport system xc(-). Tsuchihashi K et al. <i>Cancer Res.</i> 76:2954-63. 2016 2. ALKR1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN. Ueda T et al. <i>Oncogene.</i> doi: 10.1038/onc.2015.519. [Epub ahead of print]. 2016 【学会発表】 1. Oncogenic stress is bypassed in neural stem cells transformed by activated-ALK. Onishi N et al. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日, 名古屋 2. 発がんストレスをバイパスする ALK シグナルの解析 大西 伸幸 et al. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸 【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		トリプルネガティブ乳がん治療耐性獲得機序に関する知的基盤の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	近畿大学・教授・岡田 斉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	近畿大学・助教・古室顕義
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	乳がんサブタイプの中で、Basal-like と Claudin-low を合わせたトリプロネガティブ (TN) 乳がんは予後不良であり、有効な治療法は確立していない。従って、TN 乳がんの治療予後向上のためには、新規治療戦略の策定が急務である。興味深いことに、TN 乳がんはがん幹細胞 (CSCs) 機能と強い関わりがあること示唆する報告がなされている。CSCs は EMT の特徴を示し、また、EMT 誘導因子の強発現により CSC 能が誘導される。本研究では、TN 乳がん細胞を薬剤存在下で培養した際の CSC 能の反応性に着目し、TN 乳がんの新規治療薬を探索する。TN 乳がんに対する新規治療法の開発につながることを期待される。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	TN 乳がんでは、受容体陽性乳がんと比較して、MYC 発現量が有意に高いことが知られている。我々はヒストン脱メチル化酵素 KDM4B が MYC 信号伝達系において重要な役割を果たすことを見出報告した。そこで KDM4B 及び阻害剤候補を中心に、乳がん増殖と CSCs に与える影響を調べた。 CSC のマーカーとして CD44v, CD24, ITGA5, ITGA6, CD133, ALDH1A1, ALDH1A3 を使い、KDM4B 経路の阻害の有無が CSCs マーカの発現に及ぼす影響を qRT-PCR により解析した。また、CSCs 機能のリードアウトとして sphere 形成能を用いて、KDM4B 経路阻害の有無が sphere の数と大きさにどのような影響を与えるか継続的に調べた。また、<i>Xenograft</i> モデルを使用して、抗腫瘍効果を観察した。 細胞株による反応性の違いはあるものの、KDM4B 及び阻害剤候補により、乳がん細胞増殖と sphere 形成を阻害することが可能であった。細胞の中には sphere 形成能に対する阻害効果が顕著である細胞株も存在する。<i>Xenograft</i> モデルの実験結果を考え合わせ、KDM4B 経路が CSCs 機能維持に重要な役割を果たす可能性を示唆している。 上記申請研究を通して、1) 将来的な大規模な系統的スクリーニングに使用可能なプラットフォーム構築のための基礎データ、2) TN 乳がんの CSCs の生物学的特性に関する情報、さらに、3) TN 乳がん患者予後判定あるいは CSCs に対する新規治療標的の候補因子を得た。今後、本共同研究から得られた研究結果をさらに発展させ、Claudin-low 乳がんマウスモデル、<i>Xenograft</i> モデル、Crisper/Cas9 ライブラリー等によるスクリーニングを通し、新規 TN 乳がん治療標的と治療薬の探索したい。また、本研究結果を踏まえ、synthetic lethal を引き起こすような薬剤の組み合わせを試みることを考慮する。  The figure consists of four panels. The top-left panel shows micrographs of sphere formation for Control siRNA and KDM4B siRNA. The top-right panel is a line graph titled 'Tumor volume' showing tumor volume over time (from 2014/1/22 to 2015/2/20) for four groups: vehicle 1 (black circles), vehicle 2 (black squares), inhibitor 1 (red triangles), and inhibitor 2 (red diamonds). The bottom-left panel shows micrographs of sphere formation for Inhibitor(-) and Inhibitor(+). The bottom-right panel is a line graph showing tumor volume over time for the same four groups as the top-right panel.	
【成果等】	【主な論文発表】 J Natl Cancer Inst. 107 (6) (2015)	
	【学会発表】 第 74 回日本癌学会年会コアシンポジウム 10/8/2015 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会合同大会 12/1-4/2015	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		膠芽腫の分子標的治療薬耐性機構の解明と治療薬の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科 講師 津田 真寿美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科 教授 田中 伸哉
	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科 特任助教 王 磊
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	グリオブラストーマ(膠芽腫)は脳腫瘍の中で最も悪性度の高い腫瘍である。近年、膠芽腫の患者組織におけるヘテロジェニティ(組織多様性)が明らかになっており、患者個々のがん特性に適応した分子標的治療薬の有効性が検討されているが、しばしば耐性細胞が出現し、その分子メカニズムの解明が急務となっている。申請者らは従前研究により、膠芽腫細胞株 KMG4 を用いて分子標的治療薬(EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤)に対する耐性細胞を樹立し、各細胞株に共通して、耐性初期には glial-mesenchymal transition が、その後幹細胞様性質が獲得されることを発見した。本研究では、分子標的治療薬耐性細胞において幹細胞性獲得メカニズムの解明とその解除薬の同定を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	当該研究では、耐性細胞の幹細胞性獲得とヒストンのメチル化を含んだエピジェネティクスとの関連性について解明した。EGFR、c-Met、PDGFR 阻害剤耐性 KMG4 を用いた幹細胞関連 PCR アレイ解析より、EGFR、PDGFR 阻害剤耐性細胞において転写抑制因子 Msh homeobox 1 (MSX1) の発現亢進を認めた。MSX1 はアポトーシス誘導遺伝子 p53 と相関して発現し、本来は腫瘍抑制遺伝子として報告されている (Park et al., 2005, Cancer Res)。MSX1 特異的 siRNA を用いて MSX1 の発現を抑制すると、全ての薬剤耐性細胞株において幹細胞性遺伝子 Sox2 の発現が低下した。一方、アポトーシス誘導能は有意に亢進し、チロシンキナーゼ阻害剤に対する感受性が回復した。また MSX1 の発現抑制により、ヒストン H3K27 トリメチル化 (H3K27me3) が抑制された。H3K27 トリメチル化酵素 Enhancer of zeste homolog (EZH2) を特異的阻害剤 GSK343 により抑制すると、H3K27me3 の低下に伴いアポトーシス関連遺伝子 Bcl-2、p53、薬剤耐性に関与する ALDH1A1 の発現が亢進した。 当該研究により、分子標的治療薬に対する耐性細胞では MSX1 の発現が亢進しており、EZH2 を介して H3K27me3 を制御することにより薬剤耐性に関する遺伝子の発現を変化させていることが明らかとなった。MSX1 および MSX1 と協調して作用する EZH2 は、膠芽腫の分子標的治療の展開に大きく貢献するものと期待される。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. †Furukawa J, †Tsuda M, Okada K, Kimura T, Piao J, Tanaka S, Shinohara Y. Comprehensive glycomics of a multistep human brain tumor model reveals specific glycosylation patterns related to malignancy. <i>PLoS One</i>, 10, e0128300. 2015. [†, These authors contributed equally to this work] 2. Yuzawa S, Nishihara H, Wang L, Tsuda M, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. Analysis of NAB2-STAT6 gene fusion in 17 cases of meningeal solitary fibrous tumor/hemangiopericytoma: review of the literature. <i>Am J Surg Pathol</i>, in press, 2016 3. Yuzawa S, Nishihara H, Yamaguchi S, Mohri H, Wang L, Kimura T, Tsuda M, Tanino M, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K, Sato N, Tanaka S. Clinical impact of targeted amplicon sequence for meningioma as a practical clinical sequence system. <i>Mod Pathol</i>, 2016	
	【学会発表】 1. 津田真寿美、王磊、谷野美智枝、木村太一、西原広史、田中伸哉：膠芽腫における分子標的阻害薬耐性獲得責任分子としての IGFBP2 の同定 第 33 回日本脳腫瘍病理学会 2015.5.29-30 JR ホテルクレメント高松 (高松市) 2. 津田真寿美、高阪真路、王磊、木村太一、谷野美智枝、西原広史、Marc Ladanyi、田中伸哉：NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 第 74 回日本癌学会総会、2015.10.8-10 名古屋国際会議場 (名古屋市) 3. Tsuda M, Kohsaka S, Wang L, Kimura T, Tanino M, Nishihara H, Ladanyi M, Tanaka S: NGS-based MSK-IMPACT analysis reveals specific genetic alterations in recurrent glioblastoma. 20th Annual Society for Neuro-Oncology Annual Scientific Meeting, November 19-22, 2015, Marriott Rivercenter, San Antonio, Texas, USA	
	【その他特筆事項】	

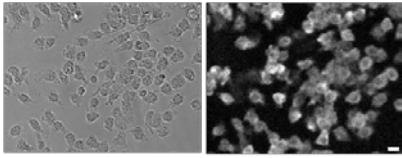
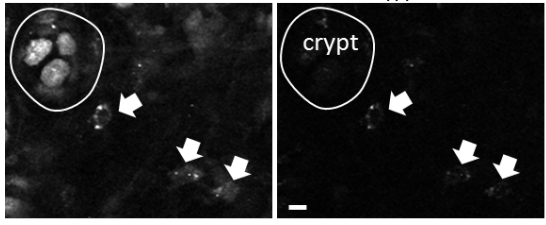
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		PP2A 阻害因子 SET による胃癌悪性化の分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・准教授・大浜剛
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・学振特別研究員・矢部滝太郎
	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・博士過程・円城寺秀平
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	Protein Phosphatase 2A (PP2A) は重要ながん抑制因子であり、多くのがんで PP2A 活性の低下が観察される。がんにおける PP2A 活性の低下には、SET をはじめとした PP2A 阻害タンパク質の発現上昇が関与しており、近年これら PP2A 阻害タンパク質を標的として PP2A 活性を回復させることが、新たな抗がん戦略として注目されつつある。申請者らは、ヒト胃癌細胞株を用いて、SET 発現が胃癌の悪性度を高めること、SET 標的薬が胃癌細胞株に細胞死を引き起こすこと等を明らかにしている。これらの知見から、申請者は SET を標的とした PP2A 活性化剤が、新規胃癌治療薬となりうるのではないかと考えるに至った。そこで本研究は、胃癌悪性化の分子機構と SET を標的とした抗がん戦略の可能性を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、項目 A) SET 発現上昇によるがん悪性化の分子機構の解明 (培養細胞)、項目 B) SET を標的とした PP2A 活性化剤の胃癌モデルに対する効果の検討 (マウスモデル)、項目 C) ヒト胃癌病変における SET 発現変化の解析 (ヒトがん組織バンク) の 3 つの項目を行う予定であった。項目 A は矢部 (学振特別研究員)、項目 B は大浜 (申請者)、項目 C は円城寺 (博士課程) が主に担当した。 項目 A については、ヒト胃癌細胞株において SET 発現を抑制した細胞を作製し、DNA マイクロアレイを行うことで、SET により制御されるシグナル伝達系を解析した。また、SET が特定の PP2A 複合体と結合することを観察した。得られた情報を元に、SET 発現上昇が胃癌の悪性化に寄与する分子機構の一端として幹細胞性の上昇が関与することを明らかにした。また、ヒト胃癌細胞株に対する SET 標的薬の処置が SET 発現と同様のシグナルを抑制することで、細胞死を引き起こすことを確認した。 項目 B については、当初胃癌自然発症モデル Gan マウスへの SET 標的薬の投与を予定していたが、これが困難であったため、ヒト胃癌細胞株を免疫不全マウスに移植した担がんモデルを用いた検討を行った。SET 標的薬は、生体への投与においてもヒト胃癌細胞株の成長を抑制することが確認された。この際、摘出した癌細胞の PP2A 活性を測定したところ、SET 標的薬を投与した群では PP2A 活性が上昇していることが確認された。Gan マウスについては、癌部における SET 発現の上昇を組織免疫染色および Real Time RT-PCR で確認した。 項目 C については、金沢大学ヒトがん組織バンクのサンプルを用いる予定であったが、申請者が所属する山口大学に保存されている胃癌組織サンプルが利用可能であったためこれを用いて解析した。99 症例の SET 発現と臨床スコアを解析したところ、SET 発現の高さは胃癌の予後マーカーになることが明らかになった。 以上の結果から、ヒトの胃癌において、SET 発現が上昇すると悪性度が高まり、SET を標的とした薬剤が PP2A を活性化することで抗がん効果を発揮することが示された。SET はヒト胃癌に対する有効な創薬標的となりうると思える。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1) <u>大浜剛</u> 消化管の炎症・癌におけるタンパク質脱リン酸化酵素の役割 第 89 回日本薬理学会 2016 年 3 月 9 日 (シンポジウム) 2) <u>大浜剛</u> 胃がんにおける PP2A 阻害タンパク質 SET の役割 第 7 回日本プロテインホスファターゼ研究会 2016 年 1 月 30 日 (口頭発表)	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

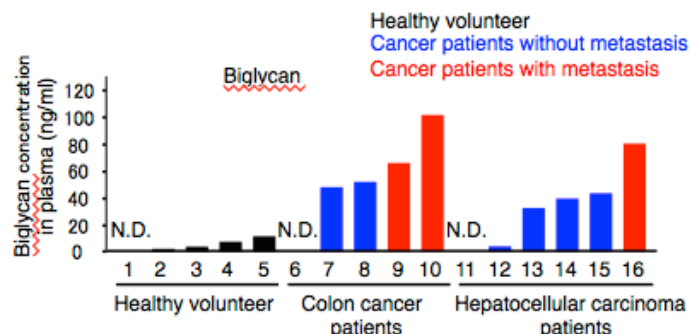
研究区分		一般共同研究
研究課題		Toll 様受容体内因性リガンドによるがん微小環境の増悪化
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学・助教・出口 敦子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京女子医科大学・教授・講座主任・丸 義朗
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・教授・大島 正伸
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・助教・大島 浩子
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	我々は、がん周辺部に存在するがん微小環境に加えて、癌細胞が転移先臓器に生着する前の段階に転移先遠隔臓器に微小環境（転移前微小環境）が存在し、肺転移前微小環境形成には Toll 様受容体 4 (TLR4) 内因性リガンドが寄与することを見いだしている。 大島正伸教授らが作出した胃がんモデルマウスである <i>Gan</i> マウス (<i>K19-Wnt1/C2mE</i> マウス) を用いて、遠隔臓器由来の TLR 内因性リガンドが、がん周辺部に存在する炎症様がん微小環境をフィードバック的に増悪化させ、がんの進展を促進するかを検証する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	胃がん上皮にも発現している TLR2 や TLR4 は大腸菌由来エンドトキシンのレセプターとして知られており、リコンビナントタンパク質をマウスや培養細胞系に添加する場合には、エンドトキシンフリーのグレードが必要となる。我々は、TLR2 内因性リガンドや TLR4 内因性リガンドを培養細胞系や大腸菌培養系から大量培養にて高純度精製しており、マウスに投与可能なエンドトキシンフリーグレードの TLR 内因性リガンドや、TLR 内因性リガンドに対する中和抗体を保有している。 まず、<i>Gan</i> マウスの胃がん発症時における TLR 内因性リガンドの血中濃度を測定し、投与に適切な TLR 内因性リガンド濃度を概算した。次に、様々な週齢の <i>Gan</i> マウスに TLR 内因性リガンドを腹腔投与し、8 週間後マウス腫瘍を採材し、病理像や免疫組織学染色等、解析を行った。がん微小環境を構成する細胞集団は骨髄由来抑制細胞 (MDSC) や腫瘍随伴マクロファージ等が含まれるが、腫瘍内に存在する骨髄由来抑制細胞も同時に TLR2 や TLR4 等を発現していることから、腫瘍に含まれる単球系 MDSC と好中球系 MDSC、腫瘍随伴マクロファージなどの集簇を免疫組織学染色等により解析した。 胃がん発症後期 <i>Gan</i> マウスにおいて、TLR 内因性リガンドの血中濃度が亢進していることから、<i>Gan</i> マウスの胃がん進展の過程に、TLR 内因性リガンドが関与している可能性が示唆された。この結果により、胃がん発症前期にて TLR 内因性リガンドを投与する必要性が示唆された。 以上の結果をもとに、次年度は、週齢をそろえた <i>Gan</i> マウスを用い、TLR 内因性リガンドが腫瘍環境を増悪化に関与するかを検証する。さらに、内因性リガンド遺伝子欠失マウスとの交配や中和抗体投与により、腫瘍進展が遅延するかも検証する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	1. <u>Deguchi A</u>, Tomita T, Ohto U, Takemura K, Kitao A, Akashi-Takamura, S, Miyake K, and <u>Maru Y</u>. Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. <i>Oncogene</i> 35:1445-1456. 2016. 2. Imai Y, Ohta E, Takeda, S, Sunamura S, Ishibashi M, Tamura H, Wang Y, <u>Deguchi A</u>, Tanaka J, <u>Maru Y</u>, and Motoji T. Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces calcineurin degradation in multiple myeloma. <i>JCI Insight</i> 1:e85061. 2016.	
	【学会発表】	
	次年度本研究を継続し、発表を予定している。	
	【その他特筆事項】	
	なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		2 光子顕微鏡を用いた大腸癌におけるマクロファージの可視化
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・教授・清川 悦子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学・助教・武田はるな
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 大島正伸
【研究目的】	慢性炎症に関わる細胞の中でも特にマクロファージは、腫瘍浸潤部に集積しケモカインを分泌することで腫瘍細胞の浸潤を促進する微小環境を作っていることが報告されている。本研究では、2 光子励起顕微鏡を用いた生体イメージングの手法を用いて腫瘍組織内でのマクロファージの時空間的細胞動態を観察し、さらに Erk の活性化状態をモニターするバイオセンサーを用いてマクロファージの細胞動態と Erk 経路の活性化の相関を解析する。これらの解析により、マクロファージと腫瘍細胞の生体内における相互作用を明らかにし、慢性炎症がどのように腫瘍形成を促進しているかを解明する手掛かりになる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	PH F4/80染色  図1 骨髄由来細胞はM-CSF存在下でF4/80陽性マクロファージへと分化した。スケールバー:12um 昨年度は、GFP を発現する骨髄細胞を大腸がんモデルマウスに移植することで、腫瘍組織内の GFP 発現細胞の動態を生体イメージングで解析した。本年度は、骨髄細胞の中でもマクロファージの細胞動態を観察するために、移植前にマクロファージを単離・分化することとした。まず、リン酸化酵素 Erk の活性を検出する FRET バイオセンサーを発現するマウスより骨髄細胞を単離し、M-CSF 存在下で 7 日間培養したところ、ほぼ 100%の細胞が F4/80 陽性のマクロファージに分化した (図 1)。次に、1×10^6 のマクロファージを Keima 蛍光たんぱく質を全身で発現するマウスに静注にて移植し観察した。この方法では、マクロファージは YFP、レシピエントは Keima 用のフィルターでそれぞれ検出し分けることが可能となる。移植前に内在性のマクロファージを Clodronate Liposomes 投与により除去し、移植後マウスに Dextran Sodium Sulfate を 5 日間飲水投与することで腸炎を誘導した。その後 2 光子励起顕微鏡で腸の生体イメージングを行ったところ、腸管の漿膜側筋層部にバイオセンサーを発現するマクロファージが散見された。しかしながら、粘膜では両チャンネルで細胞質内に顆粒状にみえる蛍光が間質細胞に検出されるのみで、細胞質に均一にバイオセンサーを発現するマクロファージの存在を確認することが出来なかった (図 2)。この非特異的蛍光の由来を明らかにするため、Keima を発現しない C57/BL6 マウスをレシピエントとして移植を行ったところ、同様の像が観察された。この間質細胞が移植マクロファージであるか、内在性の間質細胞であるかの判別は困難であるが、移植マクロファージ由来とすると、おそらく試験管内分化の過程で細胞死に至った蛍光細胞を貪食し、蛍光が細胞内に蓄積していると考えられ、生体内での Erk の活性測定が困難となる。近年の、血中単球が炎症粘膜に侵入し腸組織固有のマクロファージへと分化する (Bain et al., Cellular Immunology 291 (2014) 41-48) との報告も踏まえると、腸においてマクロファージを観察するには、骨髄から単離した細胞から特異的抗体で FACS にて単球系細胞を単離しすぐに移植する方法や、単球系特異的 Cre マウスと Flox-FRET バイオセンサーマウスと交配し試験管内での分化を行わずに生体内で単球・マクロファージ特異的にバイオセンサーを発現させる方法などを、適用する必要があることがわかった。 Keima YFP  図2 消化管粘膜ではKeimaとYFP検出用フィルターの両方で陽性となる間質細胞が観察された。2光子励起顕微鏡で撮像。スケールバー:12um	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

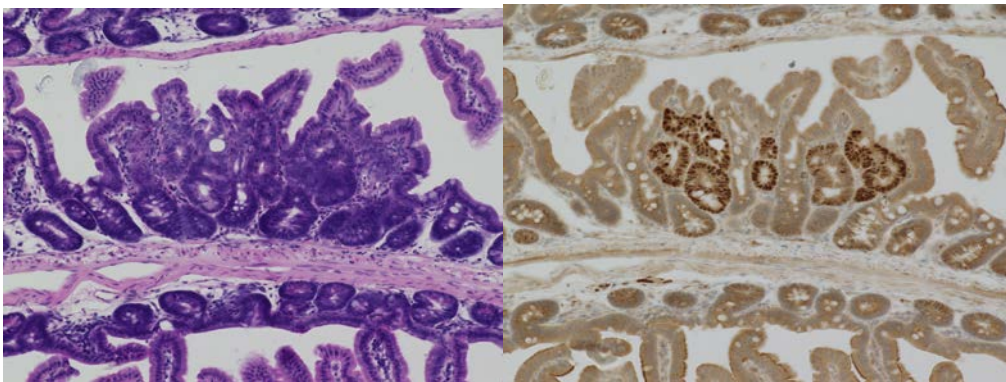
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		消化器がん発生・悪性化における腫瘍血管内皮マーカー発現の時空間的解析
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所 特任准教授 樋田京子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所 助教 間石奈湖
	所属・職名・氏名	北海道大学病院循環器外科・呼吸器外科 准教授 樋田泰浩
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 大島正伸
【研究目的】	現在血管新生阻害療法には有効なコンパニオン診断薬が存在しないが、病期によって、また治療経過とともに腫瘍血管の性質や血管新生の程度が異なることが知られてきた。個別化血管新生阻害療法の確立のために治療薬の選択や治療の時期・効果などを診断するためのマーカーの必要性は高い。本研究では、腫瘍血管内皮マーカーのコンパニオン診断薬への応用の可能性を探るために、大島正伸教授が作成されたマウス消化器癌発生モデルを用いて発がんならびに癌の進展に伴う腫瘍血管内皮マーカーの時空間的な発現解析を行うことを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	消化器癌を自然発生するマウスモデルを用いて、これまで申請者らが同定してきた TEC マーカーがこれらの癌の発生と悪性化における役割を解析する前に、マウス腫瘍ゼノグラフトモデルを用いて、転移能を獲得する前とした後の腫瘍、さらには抗がん剤治療前後における腫瘍血管内皮マーカーの発現の変化の有無について解析を行った。 興味深いことにこれまで腫瘍血管内皮マーカーとして報告してきたプロテオグリカンの 1 つ、biglycan はがんの進展後期に発現が上がる腫瘍と初期から上がる腫瘍が存在した。がんの性質の違いが腫瘍血管新生スイッチのはいる時期が異なる可能性が示唆された。さらに高転移性腫瘍と低転移性腫瘍に比べ、これまでわれわれが腫瘍血管内皮において発現が亢進していると報告している分子のなかで、Biglycan, CXCR7, LOX, Ptgir, Ptgfr や、さらには血管内皮の幹細胞性に関連する ALDH, MDR1 分子の発現がより高いことが示された。 さらに、ヒト血液検体を用いた解析において、がん患者血漿中には健常者よりも高いレベルの biglycan が検出され、転移症例においてはより高い傾向が見られた (右図)。 このようなことから、マウス自然発症モデルにおいて経時的な発現ダイナミクスを解析するための分子を絞り込むことができた。 今後自然発症モデルにおいてこれら分子の発現変動を解析し、発癌とがんの悪性化におけるこれら分子の役割解明を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>*Hida K.</u>, Maishi N., Torii C., Hida Y. : Tumor Angiogenesis—Characteristics of Tumor Endothelial Cells, Int J Clin Oncol, in press 2. <u>*Hida K.</u>, Maishi N., Sakurai Y., Hida Y., Harashima H. : Heterogeneity of tumor endothelial cells and drug delivery, Adv Drug Deliv Rev, in press 3. Shahrabi-Farahani S, Gallottini M, Martins F, Li E, Mudge DR, Nakayama H, Hida K, Panigrahy D, D'Amore PA, Bielenberg DR : The Neuropilin 1 Receptor is Upregulated in Dysplastic Epithelium and Oral Squamous Cell Carcinoma, Am J Pathol, in press 4. Habiba U., <u>*Hida K.</u>, Kitamura T., Yanagawa Matsuda A., Higashino F., Ito M Y., Ohiro Y., Totsuka Y., Shindoh M., : Expression patterns of ALDH1 and podoplanin predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia, Oncol Lett, in press 5. Yamada K., Maishi N., Akiyama K., Alam Mohammad Towfik, Ohga N., Kawamoto T., Shindoh M. Takahashi N., Kamiyama T., Hida Y., Taketomi A. and <u>*Hida K.</u> : CXCL 12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property, Int J Cancer, 137(12), 2825-2836 2015	

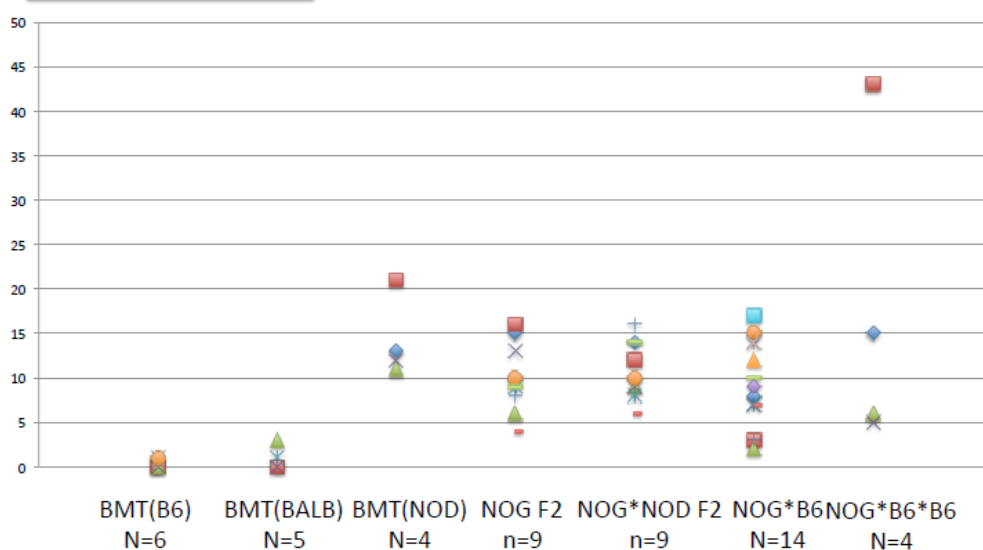


	6. Matsumoto R., Tsuda M., Wang Lei.; Maishi N., Abe T., Kimura T., Tanino M., Nishihara H., <u>Hida K.</u>, Ohba Y., Shinohara N., Nonomura K., Tanaka S., : Adaptor protein CRK induces epithelial–mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer cells through HGF/c-Met CRK feedback loop, Cancer Sci, 106(6), 709-717 2015 7. Akiyama K., Maishi N., Ohga N., Hida Y., Ohba Y., Alam Mohammad Towfik, Kawamoto T., Ohmura H., Yamada K., Torii C., Shindoh M. and <u>*Hida K.</u> : Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel, Am J Pathol, 185(2), 572-580, 2015
	【学会発表】 1. <u>Hida K.</u> : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2016, 2016.4.1, Breckenridge, Colorado. (シンポジスト) 2. 樋田京子、間石奈湖、樋田泰浩：平成27年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ，“腫瘍血管内皮細胞の特性とがんの悪性化” 2016.2.3（大津） 3. 樋田京子：第 34 回日本口腔腫瘍学会総会ワークショップ「口腔がんの次世代治療を目指した先端的研究」“腫瘍血管の異常とがんの悪性化” 2016. 1. 21（横浜） 4. 樋田京子：第 38 回日本分子生物学会年会「血管・代謝異常の動的変化を探るエピゲノミクス」，“腫瘍血管の遺伝子発現異常とエピゲノム” 2015. 12. 3（神戸） 5. <u>Hida K.</u> : Tumor Endothelial Cells as Key Players in Tumor Metastasis, 2015 Asian-Australian Vascular Biology Meeting (AAVBM), 2015.10.15 (Busan, Korea) (シンポジスト) 6. <u>Hida K.</u> : Tumor Endothelial Cells as Key Players in Tumor Metastasis, KAIST Vascular Biology Mini-Symposium 2015, 2015.10.14 (Daejeon, Korea) (シンポジスト) 7. <u>Hida K.</u> : Tumor endothelial cells and cancer progression, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.10（名古屋）(International session 講演) 8. 樋田京子：第67回日本細胞生物学会シンポジウム「遺伝子発現制御の異常が導く恒常性破綻と疾患」，“腫瘍血管の遺伝子発現異常とがんの悪性化”，2015.6.30（東京）（シンポジスト） 9. Maishi N., <u>Hida K.</u> : Spring Special Symposium of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization, “Tumor endothelial cells instigate metastasis of indolent tumors”, 2015.5.13（Osaka, Japan）（シンポジスト） 10. 樋田京子：第 104 回日本病理学会総会シンポジウム「明日の病理学を拓く 2 新技術・新概念が拓く次世代病理学」，“がん微小環境における血管の特異性” 2015.5.1（名古屋）（シンポジスト） 11. Maishi N. : Tumor Endothelial Cells Promote Metastasis via Biglycan, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2016, 2016.3.30, Breckenridge, Colorado. 12. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., <u>Hida K.</u> : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, Tenth AACR-JCA Joint Conference “Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics”, 2015.2.17 (Maui, Hawaii) 13. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Mohammad Towfik Alam, Shindoh M., Hida Y., <u>Hida K.</u> : Tumor endothelial cells promote metastasis via biglycan secretion, The European Cancer Congress 2015, 2015.9.27 (Vienna, Austria)
	【その他特筆事項】

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		NOG マウスをプラットフォームとした消化器がん発生・悪性化研究のための新規モデルマウスの開発
研究代表者	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター長 高橋 利一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター 資源開発室 研究員 伊田 幸
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター 資源開発室 研究員 香川 貴洋
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター 資源開発室長 後藤 元人
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	発がんの特に初期過程において、免疫反応が発がんにどのように作用するのかは、spontaneous cancer model を用いた解析はあまりなされていない。金沢大学がん進展制御研究所 大島正伸教授が開発された APCΔ716 ノックアウトマウスに対して、実中研で開発した NOG マウスの重度免疫不全形質の導入により、APC 遺伝子変異による Wnt 活性化による大腸がん発生過程において宿主免疫反応の役割を解明できる。本研究では昨年度作製したゲノム編集技術で作製した APC 遺伝子に変異を持った NOG マウス (APC-NOG) を系統化するとともに APCΔ716 ノックアウトマウスと同様の表現型を示すか解析することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1) APC-NOG マウスの系統化 APC-NOG マウスの系統化のために、ファウンダーマウス #7♀、#16♂、#28♂ 個体と NOG マウスを交配した結果、3 ラインとも F1 マウスが作出でき、Δ723, Δ733, Δ734 変異が生殖系列に伝達した。F1 雄マウスで精子凍結保存を行ない系統保存もできた。 2) APC-NOG マウス系統のシーケンシングに寄らない PCR genotyping 検査系を確立 APC-NOG #7(13bp del, Δ719), #16(1bp del, Δ723), #28(2bp del, Δ734) とともに各プライマーを設定し、PCR、泳動像による genotyping 検定法を確立した。 3) 腸管腫瘍の組織染色(下表) HE 染色の組織標本の観察では、未分化な上皮細胞が増殖しながら、腺管を構成している。SOX17 が核に蓄積していないので、Wnt シグナルは活性化していないと判断された。 APC 組織染色写真(左: #7 HE, 右: #7 Sox17)  4) 腸管腫瘍の表現型解析(下表) 1、骨髓細胞移入実験 腸管腫瘍形成におけるリンパ球の影響を調べるため、ドナー系統 (C57BL/6, BALB/cA, APC-NOD) の骨髓細胞を APC-NOG マウスへ骨髓移入し、移植 15 週後に採材し、腸管のポリープ数を解析した。結果、骨髓由来系統によるポリープ数変動はなかった。 2、C57BL/6 への戻し交配 腸管腫瘍の表現型解析の結果、NOG-Apc のポリープ数は 5~20 個程度であり、B6 背景の APCΔ716 ノックアウトマウスよりは少ない傾向が見られた。そこで NOG-Apc を B6 に戻し交配するとポリープ数は増加すると想定され、B6 系統へ 1 世代、2 世代と戻し交配をおこなった。1 世代の戻し交配ではポリープ数は変わらず、2 世代の戻し交配で 1 匹ポリープ数の多い個体がみられた。 以上の結果より APC-NOG マウスの低い腫瘍形成能は NOD の遺伝的背景によるものと考えられた。	

Total polyp number in SI



5) 今後の展望

解析を継続し NOG-Apc マウスの有用性を探るとともに、B6 へ戻し交配をかけて、APC Δ 716 ノックアウトマウスと同様な腸管腫瘍が発生するかを検証する。NOG-Apc マウスの基礎データを構築し、論文化を目指す。

【成 果 等】

【主な論文発表】

なし

【学会発表】

「APC 遺伝子変異導入 NOG マウスの作製」伊田幸、後藤元人、香川貴洋、山本真史、大島浩子、大島正伸、高橋利一：第 62 回日本実験動物学会総会

【その他特筆事項】

なし

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		抗炎症・抗腫瘍化合物の実験動物モデルにおける検証
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所がん遺伝創薬研究室・所長・永瀬浩喜
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所がん遺伝創薬研究室・研究員・高取敦志
	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所がん遺伝創薬研究室・研究員・渡部隆義
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	本課題では、炎症細胞の浸潤抑制をすることが示唆されるマトリックスメタロプロテアーゼ 9 (MMP9) のプロモータ領域の NF-κB や AP1 転写因子結合配列を認識する二本鎖 DNA 副溝結合化合物 (マイナーグループバインダー) であるピロールイミダゾールポリアミド (PIP) 化合物を金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野が研究を進める消化器炎症性発がんモデルにおいて、がん微小環境における炎症細胞の遊走およびがん化の抑制効果を確認し、炎症シグナルを抑制することで癌化を抑制できる薬剤候補化合物を開発することができるかを検討することとした。したがって、本課題は、この薬剤候補の抗炎症・抗がん効果を証明する基礎的知見を収集することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がんの微小環境が癌化に影響することが明らかになっている。消化器がんを考えると癌化を誘導する因子によってその発生機序が異なると考えられる。すなわち食道がんなどでは、発がん物質などによる遺伝子変化がその主因であると考えられるが、胃がんなどでは、ヘリコバクターピロリなどにより引き起こされる炎症が腫瘍周囲環境を変化させ癌化を引き起こすエピジェネティックな変化がその発生主因と考えられ始めている。このため炎症シグナルを抑制することが癌化抑制に働く可能性が強く示唆されている。一方癌細胞では、癌細胞および炎症細胞の細胞浸潤を促すためと考えられる細胞外マトリックス蛋白を分解するゼラチナーゼである MMP2 や MMP9 の発現が上昇している。ここで MMP9 は、炎症シグナルにより NF-κB や AP1 転写因子がプロモータ領域の結合配列に結合し発現上昇がみられるが、MMP2 のプロモータには結合配列がない。また MMP9 のこの配列はヒトからマウスでよく保存され、炎症シグナルの下流で分泌型細胞外マトリックス分解酵素を腫瘍および腫瘍周囲環境で誘導し、炎症性細胞の遊走にも関与すると考えられる。MMP9 の AP1 サイトを標的に合成された化合物は、ヒト乳がん転移性腫瘍細胞での細胞遊走と浸潤抑制を示し、大腸がん転移細胞モデルで転移抑制が認められた (Cancer Science 2010)。この化合物は、角膜外傷モデル (Mol Ther 2010) においても炎症細胞の遊走抑制が期待されるデータが得られた (unpublished data)。また、PIP 化合物が核内の DNA に結合し、比較的長期に作用しうると考えられるため、抗炎症効果を持続的に維持することが可能となるかもしれない。そこで本課題では FMOC 固相合成法を用いて AP1 認識 PIP 化合物の再合成を行い、HPLC で精製、質量解析で確認し、金沢大学でその効果の検討を行った。残念ながら明らかな効果が認められなかったため、より炎症性シグナルを反映すると考えられる MMP9 プロモータの NF-κB 結合領域を標的にした PIP をデザインす	

	ることした。設計した化合物を Fmoc 合成法にて同様に合成し、質量解析で確認後金沢大学に郵送した。また、MMP9 の AP1 サイトを標的に合成された化合物については、βアラニンの導入位置を変更した化合物を合成し、標的配列を持つオリゴ DNA との結合能を BiaCore アッセイにより解析 (KD 値 5.49×10^{-8})、結合能が同様に得られることを確認し、さらに乳がん細胞で MMP9 の発現抑制が同等に見られることを確認した。このことから βアラニンの位置変更による PIP の認識配列の選択制の拡張が可能であることが示唆され GC リッチな配列に対する PIP の合成が可能となることを報告した。(Advanced Techniques in Biology & Medicine. 2016) この MMP9 の AP1 認識化合物についても今後検討を予定している。今回の研究期間では、NF κ B を標的とした化合物の評価はまだできていないが、AP1 及び NF κ B の転写因子結合阻害により、MMP9 を抑制することで炎症シグナルによる炎症細胞の細胞外マトリックス蛋白分解が阻害され遊走能が抑制せれることが期待される。この炎症反応抑制によりがん化、特に炎症を伴うがん周囲微小環境ががん化に影響する胃がんなどでの発がん抑制につながるかの検討を進められればと考える。胃の炎症性疾患では長期にわたる炎症が生じるものやピロリ菌感染の除菌後も正常粘膜に DNA メチル化などのリスクマーカーが陽性の症例があり、発がんのリスクを高めている。本研究期間には期待した結果は得られていないが、今後化合物による炎症シグナルの抑制が可能となり、何らかの治療、予防につながることを期待している。
【成 果 等】	【主な論文発表】 Watanabe T, Shinohara K, Shinozaki Y, Uekusa S, Wang X, Koshikawa N, Hiraoka K, Inoue T, Lin J, Bando T, Sugiyama H and Nagase H. Double β-alanine substitutions incorporated in 12-ring pyrrole-Imidazole Polyamides for lengthened DNA minor groove recognition. Advanced Techniques in Biology & Medicine. 2016, 4:175 doi:10.4172/2379-1764.1000175. 他の論文 Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Hiroyuki Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. Nature Communications. 6:6706 doi: 10.1038/ncomms7706 (2015). 永瀬浩喜 「臨床ゲノム解析: Clinical Genomes」特集ゲノム・エピゲノム解析とがん Medical Science Digest Vol 41 (5), 2015 (2015 年 5 月 25 日) 下里 修、永瀬浩喜、尾崎俊文「CD133 シグナルにおけるチロシンリン酸化の意義」「生化学」ミニレビュー Journal of Japanese Biochemical Society 87(3): 389-392 (2015) doi:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870389 Yoshizawa S, Fujiwara K, Sugito K, Uekusa S, Kawashima H, Hoshi R, Watanabe Y, Hirano T, Furuya T, Masuko T, Ueno T, Fukuda N, Soma M, Ozaki T, Koshinaga T, Nagase H. Pyrrole-Imidazole (PI) polyamide-mediated silencing of KCNQ10T1 expression induces cell death in Wilms tumor cells. International Journal of Oncology Jul;47(1):115-21. doi: 10.3892/ijo.2015.3018. Epub 2015 May 22. 2015. Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T Sugiyama H Itoh T Soma M. Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF-β1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. PlosOne 2015 May 4;10(5):e0125295. doi: 10.1371/journal.pone.0125295. eCollection 2015 Ozaki T, Sugimoto H, Nakamura M, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Sang M, Fujiwara K, Shimozato O and Nagase H. Silencing of RUNX2 enhances gemcitabine sensitivity of p53-deficient human pancreatic cancer AsPC-1 cells through the stimulation of TAp63-mediated cell death. Cell Death

and Disease Oct 15;6:e1914. doi: 10.1038/cddis.2015.242. 2015.

Ozaki Y, Fujiwara K, Ikeda M, Ozaki T, Terui T, Soma M, Inazawa J, Nagase H. The oncogenic role of GASC1 in chemically induced mouse skin cancer. Mammalian Genome published online 07 Aug 2015 DOI 10.1007/s00335-015-9592-9

Taylor RD, Chandran A, Kashiwazaki G, Hashiya K, Bando T, Nagase H and Sugiyama H. Selective Targeting of the KRAS Codon 12 Mutation Sequence by Pyrrole-Imidazole Polyamide seco-CBI Conjugates. Chemistry – A European Journal online: 26 AUG 2015 DOI: 10.1002/chem.201501870

Noguchi R, Yamaguchi K, Ikenoue T, Terakado Y, Ohta Y, Yamashita N, Kainuma O, Yokoi S, Maru Y, Nagase H, Furukawa Y. Genetic alterations in Japanese extrahepatic biliary tract cancer. Oncology Letters in press

Inoue S, Obinata D, Takayama K, Urano T, Suzuki T, Takahashi S, Fujimura T, Homma Y, Fujiwara K, Fukuda N, Nagase H, Aburatani H, and Tsutsumi S. Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth” Oncogene in press 2016

【学会発表】

本研究成果を直接発表したものではありませんが、下記 関係学会発表です

- Takahiro Inoue, Kiriko Hiraoka, Yusei Suzuki, Hiroyuki Yoda, Takayoshi Watanabe, Atsushi Takatori, Nobuko Koshikawa, Toshinori Ozaki, Hiroki Nagase.”Tumor accumulation of a novel alkylating pyrrole-imidazole polyamide (KR12) targeting KRAS codon 12 mutations in murine xenograft models of human colon cancer” AACR American Association for Cancer Research ANUAL MEETING 2015 ミニシンポジウム“Exploiting the MAPK pathway in cancer” 2015 年 4 月 18～22 日. フィラデルフィア 米国
- Kiriko Hiraoka, Takahiro Inoue, Hiroyuki Yoda, Atsushi Takatori, Takayoshi Watanabe, Nobuko Koshikawa, Toshinori Ozaki, Hiroki Nagase. “A novel alkylating pyrrole-imidazole polyamide, KR12, specifically recognizes mutant KRAS genes and potently induces cell death” AACR American Association for Cancer Research ANUAL MEETING 2015 ミニシンポジウム“Exploiting the MAPK pathway in cancer” 2015 年 4 月 18～22 日. フィラデルフィア 米国
- 永瀬浩喜 「KRAS コドン 12 変異を標的とした DNA アルキル化」日本がん分子標的治療学会第 19 回学術集会 2015 年 6 月 11 日 松山
- 井上貴博、平岡桐子、鈴木有性、養田裕行、渡部隆義、高取敦志、越川信子、尾崎俊文、永瀬浩喜「変異型 KRAS を標的としたピロールイミダゾールポリアミドのヒト大腸癌異種移植モデルでの効果」第 24 回日本癌病態治療研究会 2015 年 6 月 25 日 日光
- 平岡桐子、井上貴博、養田裕行、Krishnamurthy Sakthisri、高取敦志、篠原憲一、渡部隆義、越川信子、尾崎俊文、永瀬浩喜. 変異型 KRAS 遺伝子を標的とした塩基配列特異的アルキル化剤の大腸癌細胞における抗腫瘍効果. 第 24 回癌病態治療研究会、演題番号：WS 2-3、日光、2015 年 6 月 11 日
- 永瀬浩喜 化学物質によるゲノムへの介入 ―疾患（がん）治療への試み― 第 29 回 モロシヌス研究会 7/4/2015 神戸・有馬温泉
- 永瀬浩喜. 平岡桐子、井上貴博、養田裕行、Krishnamurthy Sakthisri、高取敦志、篠原憲

- 一、渡部隆義、越川信子、尾崎俊文、KRAS 遺伝子 G12D および G12V 変異 DNA 配列を標的にした大腸がん治療薬の開発 第 74 回 日本癌学会 腫瘍別シンポジウム 1 『大腸がんにおける標的分子と治療開発』 2015 年 10 月 8 日 名古屋
- ・高取敦志、平岡桐子、Sakthisri Krishnamurthy、養田裕行、渡部隆義、越川信子、永瀬浩喜「KRAS 遺伝子変異大腸がん細胞において KR12 は合成致死性遺伝子を標的とし殺細胞効果を示す」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・Sakthisri Krishnamurthy,高取敦志,養田裕行,平岡桐子,井上貴博,渡辺隆義,越川信子,永瀬浩喜「Development of novel anticancer drugs targeting PIK3CA gene mutation for cervical cancer」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・Afzal Sheikh,高取敦志,Md. Shamim Hossain, Md. Kamrul Hasan, 尾崎俊文,永瀬浩喜,田川雅敏,中川原章 「NLRR2 is involved in neuronal survival and differentiation through JNK pathway in neuroblastoma」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・井上 貴博,平岡桐子,養田裕行,渡辺隆義,高取敦志,越川信子,坂東俊和,杉山弘,尾崎俊文,永瀬浩喜「KR12, KRAS mutation specific alkylating agent inhibits tumor growth by showing accumulation in KRAS mutant xenografts」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・平岡 桐子,井上貴博,養田裕行, Sakthisri Krishnamurthy, Lin Jason, 渡辺隆義,越川信子,高取敦志,尾崎俊文,永瀬浩喜「新規アルキル化剤: ピロールイミダゾールポリアミド複合体による変異型 KRAS の発現抑制」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・高木恵子,高山忠利,吉田直樹,藤原恭子,相馬正義,永瀬浩喜「HCV 陽性肝細胞癌における Dgcr2 遺伝子発現の検討」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日 名古屋
 - ・末永雄介,新行内雅斗,加藤護,黒坂功,大平美紀,飯笹俊彦,永瀬浩喜,横井左奈「小細胞肺癌様に形質転換した肺腺癌では神経内分泌分化に関連する細胞内経路が高頻度に体細胞突然変異をおこす」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋
 - ・Jason Lin, 平岡桐子,井上貴博,養田裕行, Sakthisri Krishnamurthy, 渡辺隆義,高取敦志,越川信子, 井元清哉,宮野悟,永瀬浩喜「Bioinformatics Finding Computational Insights into Gene Regulation by Pyrrole-Imidazole Polyamide」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋
 - ・渡部隆義,高取敦志,越川信子,平岡桐子,井上貴博,養田裕行, Sakthisri Krishnamurthy, 杉山弘,坂東俊和,永瀬浩喜「癌ドライバー遺伝子を標的としたアルキル化ピロールイミダゾールポリアミドの合成」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋
 - ・藤原恭子,永瀬浩喜,相馬正義「皮膚有棘細胞癌の進展における EphB2 の役割」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 9 日 名古屋
 - ・中村瑞代,杉本博一,小形武広,下里修,永瀬浩喜,尾崎俊文「RUNX2 の発現抑制を介した TAp63 の活性化による膵臓がん細胞のゲムシタビン感受性の向上」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋
 - ・養田裕行,高取敦志,井上貴博,渡部隆義,越川信子,尾崎俊文,永瀬浩喜「進行神経芽腫に対する MYCN 遺伝子標的ピロールイミダゾールポリアミド DNA アルキル化剤複合体の開発」 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋

- ・ 中村洋子,丸喜明,巽康年,横井左奈,大平美紀,中村友紀,高山喜美子,稲田潤子,片山稔,永瀬浩喜,三上春夫「コンピリヘンシブがんパネルとイオントレントプロトン次世代シーケンサーによる千葉県ゲノムコホート解析」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋
- ・ 巽康年,岩田慎太郎,米本司,鴨田博人,石井猛,永瀬浩喜,大平美紀「Whole evome sequencing による小児骨肉腫肺転移関連体細胞変異の検索」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋
- ・ 安藤清宏,中村洋子,槇島誠,永瀬浩喜,中川原章「MDM2 は神経芽腫において CHK1 阻害剤感受性に関わる生物学的因子である」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋
- ・ 大平美紀,中村洋子,辰野健二,堤修一,山本尚吾,永江玄太,巽康年,永瀬浩喜,上條岳彦、油谷浩幸、中川原章「11q 欠失を伴った難治性中間リスク型神経芽腫のゲノム・エピゲノム解析」第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 10 日 名古屋
- ・ 中村洋子,丸喜明,巽康年,横井左奈,大平美紀,中村友紀,高山喜美子,稲田潤子,田中尚武,山本尚人,鍋谷圭宏,滝口伸浩,植田健,片山稔,永瀬浩喜,三上春夫「半導体次世代シーケンサーによるリスク集団特異的がん関連遺伝子多型解析」日本人類遺伝学会第 60 回大会 2015 年 10 月 14 日 東京
- ・ 養田裕行,高取敦志,井上貴博,渡部隆義,越川信子,尾崎俊文,永瀬浩喜「神経芽腫に対する PI ポリアミド DNA アルキル化剤複合体を用いた治療戦略」日本小児血液・がん学会 2015 年 11 月 27 日 甲府
- ・ 大平美紀,中村洋子,辰野健二,堤修一,山本尚吾,永江玄太,巽康年,永瀬浩喜,上條岳彦、油谷浩幸、中川原章「Neuroblastoma Genomic profiling of intermediate risk type of neuroblastoma without MYCN amplification」日本小児血液・がん学会 2015 年 11 月 27 日 甲府
- ・ 岩田慎太郎,巽康年,米本司,鴨田博人,石井猛,永瀬浩喜,大平美紀「全エクソーム解析を用いた小児骨肉腫肺転移に関連する体僧坊変異の検索」日本小児血液・がん学会 2015 年 11 月 27 日 甲府
- ・ 養田裕行、高取敦志、井上貴博、渡部隆義、越川信子、尾崎俊文、永瀬浩喜「PI ポリアミド薬物複合体の MYCN 遺伝子増幅難治性神経芽腫に対する革新的治療戦略への応用」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸
- ・ 平岡桐子、井上貴博、養田裕行、Sakthisri Krishnamurthy、Jason Lin、渡部隆義、坂東俊和、杉山弘、尾崎敏文、永瀬浩喜「Anticancer activities of DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole pylyamide conjugate targeting mutant KRAS」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸
- ・ 井上 貴博,平岡桐子,養田裕行,渡辺隆義,高取敦志,越川信子,若菜茂晴,坂東俊和,杉山弘,尾崎俊文,永瀬浩喜「Anti-tumor efficacy and preferential localization of KR12,KRAS mutation specific alkylating agent in KRAS mutant xenografts with little to no adverse effects」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 3 日 神戸

	・ 養田裕行、高取敦志、井上貴博、渡部隆義、越川信子、尾崎俊文、永瀬浩喜「PI ポリアミド薬物複合体の MYCN 遺伝子増幅難治性神経芽腫に対する革新的治療戦略への応用」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 4 日 神戸 ・ 平岡桐子、井上貴博、養田裕行、Sakthisri Krishnamurthy、Jason Lin、渡部隆義、坂東俊和、杉山弘、尾崎敏文、永瀬浩喜「Anticancer activities of DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole pylyamide conjugate targeting mutant KRAS」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会合同大会 2015 年 12 月 4 日 神戸 ・ 永瀬浩喜 癌ドライバー遺伝子を標的としたアルキル化剤 東京大学公衆衛生学セミナー 2015 年 10 月 26 日 東京大学 ・ Hiroki Nagase, Kiriko Hiraoka, Takahiro Inoue, Takayoshi Watanabe, Ken-Ichi Shinohara, Nobuko Koshikawa, Ozaki Toshinori. Inhibition of KRAS mutant colon cancer using a novel DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole polyamide conjugate targeting KRAS Codon12 Mutant DNA 3rd International Conference of Federation of Asian Clinical Oncology (FACO) 2015 年 10 月 29 日 Kyoto ・ Hiroki Nagase Chemical genomics approaches to modify biological processes and pathological state IMPC 国際シンポジウム in 横浜 11 月 12 日(木) 横浜港湾記念会館 ・ 永瀬浩喜 がんドライバー遺伝子変異を標的にした抗がん剤の開発 ライブセルイメージング 2015 2015 年 11 月 26 日 (木) アルカディア市ヶ谷
	【その他特筆事項】

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		C2mE マウス由来の炎症組織の器官培養と細胞系譜の追跡
研究代表者	所属・職名・氏名	秋田大学医学部分子生化学講座・准教授・栗山 正
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	秋田大学医学部分子生化学講座・教授・田中 正光
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	所長・大島 正伸
【研究目的】	ピロリ菌の感染が遠因となる慢性的炎症が胃がんの発がんの温床となることは広く知られるところとなってきた。本研究では慢性炎症を模した恒常的炎症物質の発現マウスである C2mE マウスにおける前癌病変様細胞・SPEM に注目し、それに付随して増加する遺伝子 Cancrin (aka. PLEKHN1/CLPABP1) の免疫染色を行い、その病変と Cancrin 遺伝子の関係を調べる。共同研究として Gan/C2mE マウスからのスフェロイド培養系を習得し、遺伝子導入・改変などを行うと共に Cancrin ノックアウトマウスと C2mE マウス又は Gan マウスとの交配を用いて炎症に関わる発がんにおける Cancrin の機能を調べることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<u>1. スフェロイド培養系の習得</u> 2015 年 7 月 15 日にがん進展制御研究所を訪問し、大島研において Gan マウスの胃の腫瘍部からスフェロイドを作る手技のレクチャーを受けた。その後ラボに戻り数回再現実験を行ったがいずれも再現性よくスフェロイドを形成した。 <u>2. スフェロイドの免疫染色</u> 1 で作成したスフェロイドの免疫染色を行った。SPEM 変異が再構成したスフェロイドで形成されるかどうかを検討した。SPEM のマーカーである TFF2 抗体で染色したスフェロイドは TFF2 の発現を維持していた。このことからスフェロイドは幹細胞から完全にリニューアルされる細胞ではなく、SPEM 変異を含むクリプトの一部が脱分化して増殖するものではないかと考えられた。 <u>3. ノックアウトマウスの免疫染色</u> 広島県立大・小西先生より CLPABP1 ノックアウトマウスの供与を受けた。当方で作成した human Cancrin (PLEKHN1) 抗体がマウスの組織を正しく染色できるかどうかを調べるためノックアウトマウスとヘテロマウスを比較した。その結果、ノックアウトマウスにおいても同じ部位が染色された。我々の抗体は C 末付近のペプチドを認識するものであったため、ノックアウトマウスの設計を再度見直した。すると、スプライシングにより途中の PH ドメインを失った短い正常な C 末を持つタンパク質が正常なタンパクと同じ制御を受けて発現しうることが明らかになった。そこでその短い転写産物が存在するかどうかを RT-PCR から cDNA を作成し、配列を確認した。予想通り欠損型の転写産物が存在することが分かった。この欠損フォームが機能を持つかどうかは確認できていない。スフェロイドの Cancrin 抗体染色により、発現が認められたがマウスにおける染色パターンが正しいかどうかの裏付けが取れなかった。 <u>4. スフェロイドから癌細胞を作成する試み</u> KO マウスに不備が見つかったため、他のアプローチとして Gan マウスの腫瘍を経代できる胃がん細胞株にし、その遺伝子をゲノム改変することで機能を調べようと考えた。loxP で挟まれたヒトパピローマウィルス由来 E6 タンパクをコードするレトロウィルスを作成し、スフェロイドに感染させようとした。しかし期待された p53 の減弱は起こらず経代できる細胞株も得られなかった。今後感染効率や発現量を向上させ株を作った上でゲノム編集を行い、炎症細胞と PLEKHN1 分子の機能の関係について調べたい。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		Rb1 の関与する発ガンにおける p107 と IRSp53 の役割
研究代表者	所属・職名・氏名	奈良先端科学技術大学院大学・教授・末次志郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	I-BAR ドメイン含有タンパク質である IRSp53 は細胞突起を形成するタンパク質であり、がん細胞、その中でも特に網膜繊維芽種 (retinoblastoma) において高発現することが認められるがその意義は明らかではない。IRSp53 による突起形成は、病原性細菌の細胞間戦時に見られる足場となる突起形成にも関わり、その際には、I-BAR ドメインは、脂質膜に結合する NPY 配列を持つタンパク質に結合することが知られている。NPY 配列を持つタンパク質には、がん抑制遺伝子 (Rb1) のファミリーメンバーである p107 が含まれる。従って、IRSp53 は Rb ファミリータンパク質と結合することで細胞周期の調節を行っている可能性も考えられる。本研究では、IRSp53 のがん細胞における突起形成における役割、p107 との結合とその細胞周期調節への寄与及び突起形成への寄与を検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	従来から進めてきた IRSp53 欠損マウスと Rb1 ヘテロ欠損マウスの生存曲線解析は、さらに症例数を増やし有意差検定を行ったところ、Rb1 ヘテロ接合型 (+/-) に比べて IRSp53 と Rb1 の両方の遺伝子をヘテロ接合型 (+/-) に持つマウスの生存期間に変化はないが、IRSp53 欠損 (-/-) かつ Rb1 ヘテロ (+/-) マウスは、Rb1 ヘテロ接合型 (+/-) マウスと比べ短い生存期間を持つことがわかった。この効果はオスマウスには有意であったが、メスマウスでは有意ではなかった。3 例ずつ症例を調べたが、脳腫瘍および甲状腺腫瘍における細胞増殖 (MIB 抗体陽性率) には顕著な違いが見られなかった。 Rb1 を欠損しているが、p107 の発現は見られる網膜繊維芽腫細胞株においても、細胞増殖の解析を行った。IRSp53 の発現を siRNA により抑制した結果、細胞増殖に低下が見られたことから、IRSp53 が網膜繊維芽腫細胞株の細胞増殖を正に制御していることを見出した。また、p107 との結合が推定される NPY 配列に変異を導入した IRSp53 の発現も網膜繊維芽腫細胞の増殖を抑制した。このことは、Rb1 欠損条件では、p107 と IRSp53 の直接結合し、細胞周期を制御していることを示唆している。 次に、Rb1 ヘテロ接合型では甲状腺腫瘍や脳腫瘍がよく見られるため、グリオーマ由来の U251-MG 細胞 (Rb1 に変異はない) を用いて IRSp53 の機能解析を行った。CRISPR/Cas9 を用いて U251 の IRSp53 欠損ラインを複数作成した結果、U251 においては、IRSp53 の有無によって細胞増殖に顕著なちがいは見いだせていない。 これらの知見は、IRSp53 は Rb1 欠損条件下で p107 と共同で細胞周期を進行させていることを示唆している。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】 平成 27 年 9 月 15 日 (火) 17 時～18 時 腫瘍分子生物学セミナー 脂質結合ドメインと細胞形態制御およびタンパク質の機能制御	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		Rb ファミリー遺伝子を欠損した神経細胞におけるがん特異的代謝異常経路の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・准教授・味岡逸樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	癌抑制遺伝子 Rb とそのファミリー遺伝子 (p107, p130) は細胞周期制御の中心的な役割を担い、細胞増殖のブレーキとして機能する。Rb ファミリーを急性的に欠損させた細胞は細胞周期を進めるが、その後、細胞分裂する場合と細胞死を起こす場合があり、その運命は「文脈特異的」(context-specific)である。最近我々は、神経前駆細胞で Rb ファミリーを欠損させるとニューロンが増殖し、一度分化を開始したニューロンで Rb ファミリーを欠損させると細胞死を起こすことを見いだした。本研究では、「文脈特異性」とがん特異的代謝異常経路の関連を明らかにすることを最終的なゴールとして設定し、「文脈特異性」と N-Ras 活性化との関連を明らかにすることを主な目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	昨年度までの研究で、高橋教授より恒常的活性化型 N-Ras (N-RasV12) の cDNA を入手し、ニューロン特異的に N-Ras を活性化するためのプラスミドを作製した。また、この作製したプラスミドを用いて、マウス胎生 14 日目の大脳組織に、ニューロン特異的に Cre を発現するプラスミド pMAP2-Cre と Cre 存在下で N-RasV12 を発現するプラスミド pCALNL-NRasV12 をエレクトロポレーション法で遺伝子導入し、4 日間組織培養して免疫組織染色を行った。その解析の結果、N-RasV12 発現ニューロンは S 期へと進行していることが明らかとなった。また、S 期へと細胞周期を進めたニューロンは分裂せず、細胞死を起こすことも明らかとなった。本年度は、Rb ファミリーと p53 との関係を明らかにするために、Rb-TKO マウス (<i>Rb^{Lox/Lox}; p107^{-/-}; p130^{Lox/Lox}</i>) 及び p53-Rb-QKO マウス (<i>p53^{-/-}; Rb^{Lox/Lox}; p107^{-/-}; p130^{Lox/Lox}</i>) を用いて検討した。その解析の結果、以下のことが明らかとなった。1) Rb ファミリー欠損の有無に関わらず、N-RasV12 発現でニューロンが S 期へと進行し、細胞死を起こした。2) Rb ファミリー欠損及び N-RasV12 欠損で誘導されるニューロン細胞死に p53 は必須であった。3) S 期進行後の細胞死を免れた p53-Rb-QKO 欠損ニューロンは細胞分裂せず、DNA 量が 8n となっているニューロンも認められた。以上の結果から、当初予想していた文脈特異性と N-Ras 活性化との関連は認められなかったものの、ニューロンの S 期進行という状況下では、N-Ras の活性化は Rb の上流にあることが示唆された。また、p53 は S 期進行を伴うニューロン細胞死の実行に必須だと判明し、今後は、細胞死を免れたニューロンの腫瘍形成能を明らかにしたい。ところで、脳梗塞や神経変性疾患の一部の神経細胞死は、細胞周期を S 期へと進めた後に起こることが知られており、これまで、CyclinD1 の活性化や Rb リン酸化の関与が報告されてきた。しかしながら、G1 サイクリンを活性化するメカニズムについては謎が多い。本研究では、S 期進行を伴うニューロン細胞死において、N-Ras の活性化が Rb の上流にあることが示唆されたことから、今後は脳梗塞や神経変性疾患における N-Ras の活性化の関与を明らかにしたい。	
【成果等】	【主な論文発表】 Ajioka I, Biomaterial-engineering and neurobiological approaches for regenerating the injured cerebral cortex, <i>Regenerative Therapy</i> 3, 63-67 (2016) (review)	
	【学会発表】 Ajioka I (invited), Understanding self-repairing potential by biological and biomaterial engineering approaches for brain regeneration, 25th Biennial Meeting of the ISN (International Society for Neurochemistry), August 25, 2016	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん抑制遺伝子と概日リズムの関連に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・特定助教・三木貴雄
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学・教授・野田 亮
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	概日リズムは、日々の生体の代謝制御を含む、一日約 24 時間のリズムを制御している生物の基本的な機構である。長期的なリズムの欠失は、がん、糖尿病等の疾患と関連することが疫学研究において報告されている。一方、がん患者では、睡眠リズム障害が見られることや、糖尿病患者では、インスリン代謝リズム障害等が見られ、がんの罹患率も高いことが報告されている。上記の知見は、がんと概日リズムには、緊密な関連性があることを示唆している。しかし、その分子機構は未だ不明である。我々は、この問題に、がん抑制遺伝子 pRb による概日リズムの制御という新規の視点から分子メカニズムを解明することによりアプローチする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	A. pRb による概日リズム制御の分子機構の解析 申請者らは、pRb が概日リズム遺伝子 Per2 を介して概日リズム遺伝子 Cry1 の発現を抑制する結果を得ている。また、pRb による制御には、PER2 のリガンドである heme 結合ドメインである PAS ドメインが必須であることを同定した。そこで、PER2 と Heme の相互作用が、pRb 存在依存的に変化するかを以下のように解析した。 1. pRb に対する shRNA を細胞に感染させ（高橋教授より供与）、PER2 蛋白質を免疫沈降法により精製し、そこに含まれる heme の量を定量した。その結果、PER2 のヘム結合量が pRB の量に比例して変動が見られた。 2. Per2 プロモーター制御下のルシフェラーゼを発現する細胞を使用すると、リアルタイムに細胞の概日リズムをモニターすることが出来る。このシステムと、pRb に対する shRNA を用いて（高橋教授より供与）、pRb の発現量を変化させた場合の Per2 発現リズムをリアルタイムに測定した。その結果、pRB 減少により、概日リズムの延長が見られた。 B. Rb のヘテロ欠損マウスを用いた概日行動リズムの解析 pRb 欠損マウスは胎生致死のため、Rb ヘテロマウス（高橋教授より供与）を用いて、wheel running 法を用いた概日リズム行動解析を行い、マウス個体レベルでの pRb の概日リズムへの影響を検討した。その結果、Rb ヘテロ欠損マウスの概日リズムは野生型に比べ有意に延長された。この結果は、in vitro の培養細胞の結果と一致していた。 上記の結果は、pRb による概日リズムの制御を強く示唆するものである。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. 三木貴雄 「Tumor suppressors and the circadian rhythm」 The 2nd IFOM-KU joint Symposium at Kyoto University 2015 年 10 月 6-7 日（京都） 2. 三木貴雄 「がん抑制遺伝子と概日リズムの関連」 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会 ワークショップ 2015 年 12 月 4 日（神戸） 3. 三木貴雄 「がんと概日リズム」 奈良先端科学技術大学院大学異分野融合ワークショップ 2015 年 12 月 11 日（奈良先端大学）	
	【その他特筆事項】	

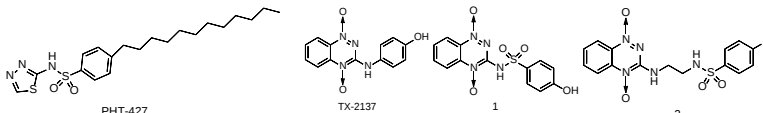
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		グルタミン代謝から捉えた癌/癌幹細胞性機能制御の基盤的研究
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・准教授・田中知明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・助教・鈴木佐和子
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士大学院生・吉田晶代
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士研究員・河野晋
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	p53 と Rb のクロストークによる代謝制御の基盤的研究については、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たし、幹細胞性/がん幹細胞性制御と密接に関わる事がわかってきた。加えて、p53KO マウス由来の腫瘍において、Rb 経路のサイレンシングで、がん幹細胞様の形質獲得だけでなく、ES/iPS と同様の代謝変化が生じ、中でもグルタミン代謝が重要であることを突き止めてきた。このように、p53 と Rb の二大癌抑制経路は、グルタミン代謝制御をハブ拠点とし、細胞内脂質合成系・アミノ酸代謝経路・種々の onco-metabolite 産生調節に密接にかかわっている。しかし、癌特異的代謝異常の分子基盤として重要な役割を果たしながら、その詳細な分子機序や in vivo での働きは十分に明らかにされていない。そこで、これまでの p53-Rb ネットワークの共同研究体制を有機的/機能的に発展させ、がん組織や動物モデルの発現解析と密接に結び付けることで、p53-Rb 癌抑制遺伝子システムとグルタミン代謝の視点から捉えた、癌特異的代謝異常の分子基盤を明らかにすることを目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がん抑制遺伝子 p53 は多くの癌で変異や欠失がみられ、中でも変異 p53 は、“gain of function” により、癌の増殖および悪性化に関与する。一方、癌とコレステロール合成経路との関わりについては、コレステロールが腫瘍形成促進や癌の死亡率上昇に関与するなど、その関連性が報告されている。しかし、変異 p53 とこれらの関わりについては十分に明らかになっていない。そこで、変異 p53 による“gain of function”とコレステロール生合成経路、特にメバロン酸合成経路(MVA 経路)に着目し、3 次元培養を用いて変異 p53 が乳癌悪性形質に与える影響、及び変異 p53 とメバロン酸合成経路との関連について検討を行った。Sphere Assay を用いた三次元培養により悪性形質変化を検討したところ、p53/RB 両経路の抑制や変異 p53 の gain of function が乳がんにおける悪性形質転換に重要であることが示された。次に、MVA 経路の阻害と中間代謝物による形質変化を検討し、更に MVA 経路を司る SREBP2 の悪性形質転換における局在変化と SREBP2 サイレncシングによる形質変化の検討を行った。MVA 経路阻害実験により、MVA 経路が悪性形質転換に重要な役割を果たしていることが示され、3 次元培養条件下において SREBP2 の核内移行が形質変化と悪性形質の増加に重要であることが示された。また、SREBP2 を介した乳がん悪性化機構には、変異 p53 の関与が示唆された。そこで、変異 p53 と SREBP2 の関係性を確認する目的で IP/western による変異 p53 と SREBP2 の結合を確認した。その結果、変異 p53 と SREBP2 の結合が確認され、共焦点顕微鏡を用いた局在確認では、悪性形態において変異 p53 と SREBP2 が核内で共局在していることが明らかとなった。更に、コレステロール合成に重要な酵素である DHCR7 のプロモーター領域への結合を ChIP Assay により検討した。その結果、変異 p53 と SREBP2 はプロモーター領域に共結合していることが確認された。これらの結果より、変異 p53 の MVA 経路調節機構として MVA 経路遺伝子のプロモーター領域に SREBP2 と共結合し、SREBP2 の転写調節を制御していることが示唆された。現在、変異 p53 がグルタミン代謝制御とどのように関わっているか、更には変異 p53 による SREBP2 制御機構、グルタミン代謝制御機構を明らかにする目的で LC-MS/MS による変異 p53 結合分子の同定を行っている。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Hosokawa H, Tanaka T, Endo Y, Kato M, Shinoda K, Suzuki A, Motohashi S, Matsumoto M, Nakayama KI, Nakayama T.: Akt1-mediated Gata3 phosphorylation controls the repression of IFNγ in memory-type Th2 cells. Nat Commun. 2016 Apr 7;7:11289. (査読有) - Sakuma I, Higuchi S, Fujimoto M, Takiguchi T, Nakayama A, Tamura A, Kohno T, Komai E, Shiga A, Nagano H, Hashimoto N, Suzuki S, Mayama T, Koide H, Sasano H, Tatsuno I, Yokote K, Tanaka T.: Cushing Syndrome Due to ACTH-Secreting Pheochromocytoma, Aggravated by Glucocorticoid-Driven Positive-Feedback Loop. Clin Endocrinol Metab. 2016 Mar;101(3):841-6.(査読有)	
	【学会発表】 - 中山哲俊、鈴木佐和子、橋本直子、樋口誠一郎、永野秀和、小田瑞穂、松本雅記、横手幸太郎、田中知明 (2015) 乳癌幹細胞制御における p53-Rb-GATA3 転写因子群の役割 第 74 回日本癌学会学術総会、10 月 9 日、名古屋 - 河野晋、北嶋俊輔、鈴木佐和子、田中知明、佐々木信成、村中勇人、高橋智聡 (2015) RB 不活性化に伴うメタボリックリワイヤリング機構の解明第 74 回日本癌学会学術総会、10 月 10 日、名古屋	
	【その他特筆事項】 特になし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん組織における MT1-MMP の新規機能の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学医科学研究所・助教・坂本 毅治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	我々はこれまでに膜型プロテアーゼである MT1-MMP の新規機能として、プロテアーゼ活性に依存しない MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化機構の解析を行ってきたが、これらのメカニズムが生体、特にがん組織においてどのように機能しているかは不明である。また、その制御機構も不明な点が多い。そこで本研究では、マウスを用いた in vivo の表現型解析や細胞機能・生化学的解析により、がん組織における MT1-MMP の新規機能の役割と制御機構の解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化機構の解明 MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 の活性化には mTOR シグナルが重要な役割を果たしていることを報告しているが(Sakamoto et al., MCB, 2014)、他にどのような分子、シグナルにより制御されるかについては不明である。本研究では MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 の活性化の新たな制御機構を明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法を用いて Mint3 の新規結合分子の探索を行った。その結果、新規 Mint3 結合分子として NECAB3 を同定した。NECAB3 はヒト線維肉腫 HT1080 細胞において Mint3, MT1-MMP とゴルジ体で共局在を示した。NECAB3 ノックダウンにより、HT1080 細胞で、Mint3 依存的な HIF-1 標的遺伝子の発現・解糖系機能・造腫瘍能の低下が観察された。また、NECAB3 をノックダウンすることで Mint3 と FIH-1 との結合が低下することから、NECAB3 は Mint3-FIH-1 複合体形成に関わることが明らかとなった。NECAB3 変異体を用いた解析の結果、NECAB3 による Mint3 機能の活性化には Mint3 との結合領域およびモノオキシゲナーゼドメインが必要であり、モノオキシゲナーゼドメインの変異体は内因性の NECAB3 に対してドミナントネガティブ効果を示した。TCGA データベースを用いたヒト臨床検体における各遺伝子の発現を解析した結果、MT1-MMP は多くのがんで発現上昇しており、Mint3 も多くのがんで発現上昇が見られたのに対し、NECAB3 の発現上昇は腎がん、前立腺がんなど一部のがんに限られていた。このことから、特定のがんにおいて NECAB3 は MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 の活性化を促進している可能性があり、またがんの発生臓器により MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 の活性化機構の異なる制御分子が存在する可能性が示唆された。これらの成果について論文発表を行った(Nakaoka HJ et al., Sci. Rep., 2016)。	
【成果等】	【主な論文発表】 Nakaoka HJ, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Shimamura T, <u>Sato H</u>, Murakami Y, Seiki M, <u>Sakamoto T*</u>. NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumourigenicity of Cancer Cells. Sci Rep. 2016 Mar 7;6:22784. doi: 10.1038/srep22784.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ヒトがん細胞を用いた低酸素選択的 Akt/MMP 阻害性抗転移剤の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・山田久嗣
	所属・職名・氏名	徳島大学・D1・芝 一休
	所属・職名・氏名	徳島大学・M2・國安翔太
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博, 准教授・遠藤良夫, 准教授・滝野隆久
【研究目的】	がんはがん細胞だけでなく、血管や結合組織、免疫担当細胞といったがん周囲組織との相互作用の上で成り立っており、治療戦略としてがんの縮小ではなく再発期間の延長という観点から、がん転移を抑制できる血管新生阻害剤は最適な制癌剤であると思われる。平成 23-26 年度の共同研究において、低酸素サイトトキシン誘導体 TX-2137 は Akt および MMP-9 産生の抑制を介して抗転移活性を示すことを明らかにした。また、TX-2137 をリード分子として新たに分子設計・合成した TX-2282 は TX-2137 よりも強い抗転移活性を有することを示した。そこで平成 27 年度は、既知の Akt 阻害剤をリードとして、低酸素選択的ファルマコフォアであるベンゾトリアジン-1, 4-ジオキソド骨格を導入した新規 Akt/MMP 阻害性抗転移剤の開発を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	今年度は、低酸素サイトトキシンである tirapazamine 及び市販の種々の Akt 阻害剤をリードとして新規抗転移剤の分子設計・合成を試みた。まず、Akt 阻害剤である PHT-427(下図)を選択した。この化合物はスルホンアミド基を有しており、Akt の PH ドメインに結合して Akt のリン酸化を阻害する薬剤である。このスルホンアミドが阻害作用に重要な役割を果たしているため、TX-2137 のアミド部位にスルホン基を導入した化合物 1 (下図)を設計し、その合成を試みた。まず、3-amino-1,2,4-benzotriazine-1-oxide のアミノ基をクロロ基に置換した 3-chloro-1,2,4-benzotriazine-1-oxide を合成し、4-hydroxybenzenesulfonamide と塩基性条件下で反応を行った。NMR にて構造確認を行ったところ、フェノール性ヒドロキシル基がエーテル結合した化合物であることが分かった。そのため、4-hydroxybenzenesulfonamide のフェノール性ヒドロキシル基を TBDMSCl で保護し、3-chloro-1,2,4-benzotriazine-1-oxide と炭酸カリウムを用いて反応を行い、生成物を NMR で確認したところ前述した化合物と同じ構造であることが示唆された。この原因として、反応中で脱保護したことによりフェノール性ヒドロキシル基と反応したことが考えられた。そこで、炭酸カリウムの代わりに Et₃N 及び MeCN を用いて反応したところ、目的物である化合物 1 を得ることができたが、その収率はかなり低く活性評価できる量は確保できなかった。そこで、3-amino-1,2,4-benzotriazine-1-oxide 及び <i>p</i>-toluenesulfonylchloride を塩基性条件下でカップリング反応させたが、ベンゾトリアジン環のアミノ基の求核性が低く反応が進行しなかった。一方、スルホンアミドにアルキル側鎖が結合した PHT-427 誘導体 (H-8, H-89 ,NL- 71-101) を参考に、3-amino-1,2,4-benzotriazine-1-oxide のアミノ基からアルキル側鎖を伸ばした化合物 2 (下図)を設計した。現在は、3-chloro-1,2,4-benzotriazine-1-oxide 及びエタンジアミンを反応させた tirapazamine アミノエチル誘導体の合成に成功しており、あと 1 段階で化合物 2 の合成が完了する予定である。 今後は、化合物 2 の常酸素及び低酸素下での <i>in vitro</i> 殺細胞活性、Akt リン酸化阻害活性、MMP-9 阻害活性及び発育鶏卵を用いた <i>in vivo</i> 抗転移活性を評価する予定である。  PHT-427 TX-2137 1 2	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	・芝一休, 多田竜, 山田久嗣, 遠藤良夫, 佐藤博, 宇都義浩: 低酸素指向性を有する新規抗転移剤 TX-2137 及び TX-2282 の創製, 創薬懇話会 2015, 徳島市, 2015 年 7 月 2-3 日。
	【その他特筆事項】	上記の創薬懇話会 2015 において芝一休君が優秀ポスター賞を受賞しました。

研究区分		一般共同研究
研究課題		口腔癌細胞における microRNA の MT1-MMP 制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学・講師・長谷川正午
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	筑波大学・医員・内田文彦
	所属・職名・氏名	筑波大学・大学院生・馬場 脩
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・川尻秀一
	所属・職名・氏名	金沢大学・講師・加藤広禄
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	MT1-MMP の癌細胞での発現と micro RNA の発現の意義を明らかにし、口腔癌の浸潤・転移のメカニズム解明の新たな知見が得られ、さらに micro RNA を核酸治療薬として臨床応用へと展開するための基礎的な研究基盤を確立させることができると考える。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	microRNA-205 の mimic, inhibitor を用いた口腔癌細胞の形質転換における MT1-MMP の発現解析を行い、EMT に関わる可能性を明らかにした。 1) 口腔がん細胞株の形質転換 口腔癌の転移に関与している miR-155, miR-205 の mimic, inhibitor を口腔扁平上皮癌転移性細胞株 (HSC3)・非転移性細胞株 (SAT) に導入し形質転換を行い、それぞれの micro RNA 過剰発現・発現抑制細胞株を作製した。 2) 遺伝子の発現解析 microRNA-205 を過剰発現させた HSC3 細胞株にて、膜型 metalloproteinase の MT1-MMP の発現状態の評価を行った。導入 3 日後に mRNA, タンパク質いずれにおいても control と比較し、有意な発現低下を認めた。 miR205 mimic 添加細胞の浸潤能 CultreCoat BME Cell Invasion Assay Kit (TRENDS) 使用 miR205 mimic 添加細胞の MT1-MMP (タンパク) 発現 Day3 Day6 Day3 Day6 mimic NC MT1MMP α-tubulin 3) 細胞浸潤実験 先の発現解析にて MT1-MMP の発現低下を認めた microRNA-205 過剰発現細胞株にて、CultreCoat BME Cell Invasion Assay Kit を用いて、増殖能、細胞浸潤能の評価を行った。control と比較し、増殖能に差は認めず、浸潤能において明らかな低下を認めた。 miR205 mimic 添加細胞の増殖曲線 miR205 mimic 添加細胞の浸潤能 CultreCoat BME Cell Invasion Assay Kit (TRENDS) 使用	
【成果等】	【主な論文発表】 J Oral Pathol Med. 2015 Aug 26. doi: 10.1111/jop.12351. MicroRNA-155-5p is associated with oral squamous cell carcinoma metastasis and poor prognosis. Baba O, Hasegawa S, Nagai H, Uchida F, Yamatoji M, Kanno NI, Yamagata K, Sakai S, Yanagawa T, Bukawa H.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		高特異性 MMP インヒビターの創出とがん悪性進展抑制法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	横浜市立大学・教授・東 昌市
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	悪性がんの組織内で高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、がん細胞の浸潤性増殖および転移を支えることから、がん治療の有望な標的分子である。しかし、従来型 MMP 阻害剤は特異性が低く、臨床試験の過程で様々な副作用を示したため、それらを抗がん剤として開発することに成功していない。そこで本研究は、がんの悪性進展に関わる個々の MMP を特異的に阻害するインヒビターを創出することにより、副作用の極めて少ないがん治療薬の開発へ繋げることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、MMP-2 に対し、高い選択性を持つ β-アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 由来 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) のアミノ酸配列を改変し、MMP-7、MMP-9、MMP-14 に対する高選択性インヒビターの創出を試みた。 APP-IP の改変方法としては、選択性に関与するアミノ酸残基を一つずつ 20 種のアミノ酸を網羅するようにランダム変異を導入し、標的 MMP との特異性獲得を指標に選別を行った。選別方法は、APP-IP 改変体を GST 融合タンパク質として菌体内に発現させ、各クローンの溶解物について標的 MMP および MMP-2 をリガンドとしたリガンドブロッティング法により親和性を調べる方法を用いた。この方法により、MMP-7、MMP-9、MMP-14 のそれぞれに対する選択性を高めた APP-IP 改変体を得た。さらに、それぞれの MMP の非触媒領域と相互作用するタンパク質と APP-IP 改変体を融合することにより、阻害活性および酵素特異性を向上させることを試みたが、MMP-14 に関しては親和性を持つことが報告されている MT1-AF7p というペプチドや CD44 のコアタンパク質と MMP-14 との親和性が確認できず、融合タンパク質の作製に至らなかった。一方、MMP-7 に関してはこの酵素の二量体形成を利用したインヒビターの作製に成功した。また、MMP-9 に対する阻害選択性を高めたペプチドは MMP-9 結合性タンパク質である TIMP-1 と融合することにより、その阻害活性を飛躍的に高めることに成功したが、TIMP-1 が MMP-2 の非触媒領域とも結合することが判明し、MMP-9 と MMP-2 の両方を阻害するインヒビターとなることが判明した。現在、この融合タンパク質の TIMP-1 部分を改変することにより、MMP-9 選択性を高めたインヒビターの分子設計を試みている。 一方、昨年度の研究成果から、がん細胞表層のコレステロール硫酸に MMP-7 が結合すると、この酵素が I 型膜タンパク質である HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) を切断し、がん細胞の細胞凝集を誘導するとともに、それらの転移能を顕著に増強することを見出した。本年度は細胞凝集に関わる HAI-1 分子内領域を同定することに成功した。本成果は HAI-1 を分子標的としたがん転移抑制剤開発に繋がるものと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Yusuke Kakei, Chiaki Yamazaki, Masashi Suzuki M, Ayako Nakamura, Akiko Sato, Yosuke Ishida, Rie Kikuchi, <u>Shouichi Higashi</u>, Yumiko Kokudo, Takahiro Ishii, Kazuo Soeno, and Yukihisa Shimada (2015) Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. <i>Plant J.</i> 84, 827-837 2. Hiroki Sato, <u>Shouichi Higashi</u>, and Kaoru Miyazaki (2015) Amino-terminal fragments of laminin γ2 chain stimulate migration of metastatic breast cancer cells by interacting with CD44. <i>Clin. Exp. Metastasis</i> 32, 405-415	

	【学会発表】 1. 近藤 優希、<u>東 昌市</u>：癌転移を支えるMMP-7に対し、高い阻害選択性を持つインヒビターペプチドの開発。BMB2015（第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会）（神戸）、2P1075、2015年12月1-4日 2. 佐々木 祐太、<u>東 昌市</u>：MMP-14に対し高い選択性を持つペプチドインヒビターの分子設計。BMB2015（第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会）（神戸）、4T18L-12、3P1089、2015年12月1-4日 3. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、<u>東 昌市</u>：MMP-7による切断を受けた後、細胞間接着の誘導に関与するHAI-1分子内領域の同定。BMB2015（第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会）（神戸）、3T18p-12、3P1059、2015年12月1-4日 4. 佐々木 祐太、<u>東 昌市</u>：MT1-MMPに対して高い阻害活性・選択性を併せ持つペプチドインヒビターの開発。第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（名古屋）、演題番号25、2015年8月21-22日 5. 近藤 優希、<u>東 昌市</u>：癌の浸潤、転移を支えるMMP-7に対し、高い選択性を持つインヒビターペプチドの開発。第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（名古屋）、演題番号11、2015年8月21-22日 6. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、<u>東 昌市</u>：可溶性 HAI-1 の細胞間接着活性部位の同定。第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（名古屋）、演題番号 10、2015 年 8 月 21-22 日
	【その他特筆事項】 研究室学生の受賞があり、横浜市立大学 HP で紹介して頂きました 1. 佐々木 祐太、第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 Young Investigators Award http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/151106.html 2. 近藤 優希、第 20 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 Young Investigators Award http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/151106.html

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ADAM28 分子標的治療薬開発に向けた細胞膜上活性調節と組織発現解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・専任講師・望月 早月
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・教授・岡田 保典
	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・研究員・宮前 結加
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	本研究では、正常組織における ADAM28 の組織発現と分子作用機構を解明することにより、ADAM28 を標的とした治療薬開発に基礎的データを供与し、将来的に完全ヒト型抗体を用いた臨床治験へ進めるために必要な情報を与えることが期待される。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ADAM28 は、ヒト乳癌や肺癌組織においては癌細胞特異的に高発現し、癌細胞の増殖・進展促進作用を有し、血中 ADAM28 レベルは肺癌患者の臨床病期や転移と正の相関を示すことから、ヒト型抗 ADAM28 抗体を用いた肺癌に対する新規分子標的治療薬開発研究が進行中である。 本研究では、ヒト正常組織における ADAM28 の発現を調べるとともに細胞に対する ADAM28 の生物学的機能を解析した。剖検で得られたヒト正常組織における ADAM28 の発現を 2 種類の特異抗体を用いて免疫組織化学染色により検討した。その結果、ADAM28 は精巣上体、気管支、胃などの各組織において上皮細胞で発現しており、脾臓やリンパ節においては一部の血管内皮細胞が陽性を示すもののリンパ球は陰性であった。これら組織における ADAM28 の発現レベルは肺癌組織より 6 倍以下の低レベルであることが ELISA 法で示された。ADAM28 の細胞に対する機能を調べるために、酵母 two-hybrid 法によりヒト肺組織 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ADAM28 結合候補分子として C1q を同定した。ADAM28 と C1q の各タンパク質を用いて binding assay と免疫沈降を行い、両分子の特異的結合が示された。一方、C1q は ADAM28 では分解されなかった。次いで、正常気管支上皮細胞 (BEAS-2B と NHBE) を用いて C1q の作用を検討したところ、BEAS-2B 細胞では p38 と caspase-3 の活性化を通してアポトーシスが誘導され、NHBE 細胞では LC3-II の蓄積とオートファゴソームの増加によりオートファジーを伴った細胞死が出現した。C1q 誘導性細胞死やそれに関わる細胞内シグナル分子の活性化は、C1q レセプターに対する抗体の前処理で抑制され、C1q の細胞障害作用は C1q レセプターを介することが明らかとなった。また、細胞への添加前に C1q を ADAM28 と複合体にした場合には C1q 誘導性細胞死は阻害され、ADAM28 を siRNA でノックダウンすると C1q 誘導性細胞死の亢進が認められた。 以上の結果から、ADAM28 は精巣上体や気管支などの正常組織において上皮細胞で発現されることが実証され、ADAM28 は C1q との結合で気管支上皮細胞における C1q 誘導性細胞死の回避を介して、気管支上皮細胞の生存維持に関与している可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1.Miyamae Y, <u>Mochizuki S</u>, Shimoda M, Ohara K, Abe H, Yamashita S, Kazuno S, Ohtsuka T, Ochiai H, Kitagawa Y and Okada Y.: ADAM28 is expressed by epithelial cells in human normal tissues and protects from C1q-induced cell death. FEBS J. 283:1574-1594, 2016.	
	【学会発表】 1.<u>Satsuki Mochizuki</u>, Yuka Miyamae, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe and Yasunori Okada: ADAM28 is expressed by epithelial cells in human normal tissues and protects from C1q-induced cell death. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases. Invited Speaker. Newry, U.S.A. 2015 年 8 月 4 日 2. <u>Satsuki Mochizuki</u>, Yuka Miyamae, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada: Development of human anti-ADAM28 neutralizing antibodies and functional analysis of ADAM28 in the human normal tissues. 9th International Conference on Proteoglycans and 10th Pan-Pacific Connective Tissue Societies Symposium. Seoul, Korea 2015 年 8 月 26 日	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がんの肺転移におけるマクロファージの役割とケモカインの解析
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学・教授・中本 安成
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	福井大学・大学院生・野阪 拓人
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	種々のがんの発症・進展過程には、がん微小環境内での炎症反応が密接に関与していると考えられている。また、炎症反応において重要な役割を果たしている白血球の病巣への浸潤過程は、ケモカインに代表される白血球走化因子によって協調的に制御されていることも知られている。がん細胞の肺転移過程において、間質マクロファージがケモカインシグナルを介してがん細胞の生着や増殖の過程に重要な役割を果たすことは報告されているが、一方で肺泡マクロファージの役割や機能は知られていない。本研究を通して、転移過程における肺内マクロファージの役割を解明することによって、新たな視点からの転移制御法の開発に繋がる基盤的な知見が得ることを目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	マウス由来肝がん細胞株 BNL 細胞株を野生型 BALB/c マウスの尾静脈に投与し、肺転移巣を形成させる肺転移モデルを用いて、研究分担者の野阪らは以下の点を昨年度明らかにした。 ① 肺内での腫瘍増殖過程で、間質マクロファージに加えて、肺泡マクロファージ数が肺内で増加した。 ② 蛍光色素で標識されたラテックスビーズをマウスの気管から肺胞腔に注入し、肺泡マクロファージを選択的にマーキングする手法を用いて解析した結果、定常状態では肺胞腔内に存在する肺泡マクロファージの一部が、BNL の肺内での増殖過程で、肺転移巣実質内へ移動した。 ③ ケモカイン・レセプターの発現パターンを検討したところ、複数のケモカイン・レセプターを発現している間質マクロファージとは異なり、肺泡マクロファージは CCR1 のみを選択的に発現していた。 ④ BNL 細胞株を CCR1 遺伝子欠損マウスの尾静脈に接種した場合、野生型マウスと比較して、肺転移巣の増殖ならびに肺泡マクロファージ細胞数の増加が減弱していた。 ⑤ クロドロン酸リポソームをマウスの気管内から肺胞腔に注入し、肺泡マクロファージのみを選択的に枯渇させた後に、BNL 細胞株を尾静脈に接種すると、腫瘍径が 2mm 未満の小さな転移巣の数はコントロール群と比較して差は認められなかったが、2mm 以上の大きな転移巣の数はクロドロン酸リポソーム投与群で有意に減少した。 以上の結果から、肺泡マクロファージは肺転移過程において、肺に生着したがん細胞の増殖を促進する機能をもつことが示唆された。 平成 28 年度の共同研究計画としては、転移過程における肺泡マクロファージの CCR1 シグナルの役割を解明し、腫瘍増殖の段階で肺泡マクロファージが増殖・移動する機序、さらには肺泡マクロファージによるがん細胞増殖が促進される詳細な機序を明らかにしていくことを計画している。	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Nosaka T</u>, Hiramatsu K, Nemoto T, Saito Y, Ozaki Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, <u>Ohtani M</u>, Suto H, Imamura Y, <u>Nakamoto Y</u>: Ruptured hepatic metastases of cutaneous melanoma during treatment with vemurafenib: an autopsy case report. BMC Clin. Pathol. 15: 15, 2015	
	【学会発表】 研究分担者の野阪は、本研究の結果を平成 28 年度日本癌学会学術総会における一般演題として登録申請しており、発表を予定している	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ナチュラルキラー細胞によるがん細胞増殖促進に関わる炎症制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・和漢医薬学総合研究所・早川 芳弘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	ナチュラルキラー (Natural Killer, NK) 細胞は自然免疫系に属する免疫担当細胞で、これまでに NK 細胞が腫瘍免疫監視機構において非常に重要な役割を担っていることを申請者は報告してきた。その機構としては免疫応答の初期においてインターフェロン (IFN) や Tumor necrosis factor (TNF) といった炎症性サイトカインを産生することに加え、癌細胞に対して細胞傷害性顆粒 (perforin/granzyme) や細胞傷害性リガンド (Fas ligand, TRAIL) 等の分子を介して、ターゲットとなるがん細胞に対して細胞傷害活性を示すことで腫瘍の発生／増殖において抑制的に働くと考えられている。このような NK 細胞を含む様々なエフェクター細胞によりがん細胞を異物として認識し、排除しようとする抗腫瘍免疫応答が存在する一方で、腫瘍微小環境における炎症性免疫応答が、サイトカインやケモカイン、様々な成長因子の産生を介して細胞の増殖浸潤さらには転移といった悪性化進展を促進する可能性が指摘されている。そこで本研究では、このようながん細胞の悪性化に寄与するような炎症性免疫応答における NK 細胞の関与について in vivo イメージングを用いた微小がんモニタリング系を活用し、以下の 2 点について明らかとすることを目的とする。 ○ NK 細胞による炎症制御に関わる好中球の役割を明らかにする。 ○ NK 細胞による炎症制御におけるケモカイン／ケモカイン受容体相互作用の役割を明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【方法】 C57BL/6(B6)マウス由来 MCA 誘発 fibrosarcoma 細胞株 MCA205 のルシフェラーゼ恒常的発現細胞株 MCA205Luc2 細胞を皮下移植し、インビボイメージングシステムを用いて発光活性の変化を経時的に測定しがん細胞増殖をモニタリングした。移植後の微小腫瘍内でのがん細胞に対する宿主免疫応答の役割を解析するため、抗体投与による各免疫担当細胞を depletion したマウス、IFN-γ または IL-17 欠損マウスにおけるがん細胞増殖を野生型 B6 マウスと比較して免疫担当細胞やサイトカインの役割を検討した。 【結果】 NK 細胞除去マウスならびに IFN-γ 欠損マウスの結果から、腫瘍移植後早期では主に NK 細胞が IFN-γ を介したメカニズムでがん細胞増殖を抑制している事が確認出来た。また興味深い事に、がん促進に働く炎症性免疫応答に重要である事が知られている IL-17 の欠損マウスでは、NK 細胞除去によるがん細胞増殖の促進が認められなかった。IL-17 は好中球性炎症の誘導に重要なサイトカインである事が知られているが、NK 細胞除去マウスにおいて観察されるがん細胞増殖の促進も好中球の Ly6G 抗体による depletion により認められなくなった。フローサイトメトリーによる腫瘍浸潤細胞の解析結果から、NK 細胞除去マウスにおける好中球の浸潤割合に変化は認められなかったが、一方で NK 細胞除去マウスの腫瘍内 TGF-β レベルの上昇、ならびに腫瘍内好中球での VEGF-A 発現上昇、さらには NK 細胞除去マウスで好中球依存的に血管新生亢進が認められた。これらの結果は、がん細胞を直接傷害するエフェクター細胞としての役割とは異なる新たな NK 細胞の機能として、腫瘍促進的に働く好中球性炎症の抑制によるがん細胞の増殖制御に関わる可能性を示唆すると考えられる。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 投稿準備中	
	【学会発表】 小倉圭介、松下まりも、田原秀晃、済木育夫、早川芳弘、Novel function of NK cell to regulate cancer-associated inflammation、第 74 回日本癌学会総会、2015 年 10 月、名古屋	
	【その他特筆事項】	

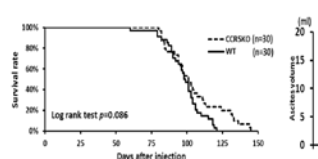
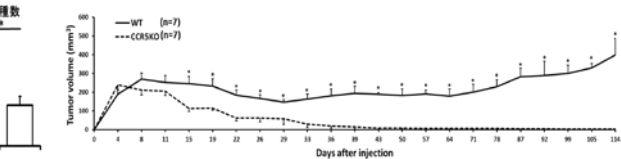
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		足場依存性多細胞凝集塊によるがん幹細胞様細胞の出現に関与するケモカイン分子の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・宮武由甲子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学・教授・笠原正典
	所属・職名・氏名	北海道大学・DC・池下 隼司
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	我々は、癌細胞を上皮系フィーダー細胞と直接共培養すると、癌細胞が足場依存性多細胞凝集塊を形成し、その一部が癌幹細胞様の特性を獲得することを見出した。本研究課題では、この現象の分子メカニズムの詳細を明らかにし、癌幹細胞様細胞の出現に関与するケモカイン分子を同定、その臨床病理学的意義を検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	膵癌細胞が上皮様フィーダー細胞によって癌幹細胞様特性を獲得し得るかどうかについて、当教室で樹立された膵癌細胞株と正常上皮組織由来細胞株 HEK293T を使用して直接共培養し、膵癌細胞の Ad-MCA 形成能を検討した。また、マイクロアレイ法による網羅的解析を行い、癌幹細胞様特性の獲得に関与する分子群の探索を行った。当研究室で樹立された 7 種類の膵癌細胞株における CD44 バリエーションパターンの解析を行ったところ、CD44v3-10high、CD44v8-10high、CD44shigh の 3 つのタイプが観察され、CD44v3-10high 膵癌細胞株はゲムシタビン感受性であることが確認された。また上皮系フィーダー細胞に対する膵癌細胞の接着パターンについて解析したところ、CD44vhigh 細胞はフィーダー細胞に接着し、足場依存性多細胞凝集塊を形成した。これらのトランスクリプトーム解析の結果、Ad-MCA 形成に関わるケモカイン関連遺伝子は約 40 種存在し、膵癌細胞の Ad-MCA 形成には、多数のケモカインが複雑に関与していることが示唆された。現在、個々の遺伝子について詳細に解析を行っている。本結果の詳細については平成 28 年度の論文投稿を予定している。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) Miyatake, Y., Sheefy, N., Ikeshita, S., Hall, W. W. and Kasahara, M. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATL cells in an NF-κB- and vimentin-dependent manner. <i>Cancer Lett.</i>, 357, 355-363 (2015) 2) Miyatake, Y. and Kasahara, M. Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like phenotypes in adult T cell leukemia/lymphoma cells. In: Seya, T., Matsumoto, M., Udaka, K. and Sato, N. (eds.): "Inflammation and Immunity in Cancer", pp. 75-84, Springer, Tokyo, (2015) 3) Ikeshita, S., Kiuchi, S., Miyatake, Y. and Kasahara, M. Pancreatic cancer cells express CD44 variant 9 and multidrug resistance protein 1 during mitosis. <i>Exp. Mol. Pathol.</i> 98, 41-46 (2015)	
	【学会発表】 1) 宮武由甲子, Noreen Sheefy, 池下隼司, William W.Hall, 笠原正典：成人 T 細胞白血病細胞は多細胞凝集塊の形成によって CD44high が幹細胞様細胞が出現する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋, 2015 2) 池下隼司, 宮武由甲子, 朴鐘建, 大塚紀幸, 笠原正典：上皮系ニッチにおいて多細胞凝集塊(MCA)を形成した膵癌細胞は治療抵抗性を獲得する. 第 104 回日本病理学会総会, 名古屋, 2015 3) 池下隼司, 宮武由甲子, 笠原正典：上皮系フェノタイプを持つ膵癌細胞では細胞分裂時に CD44v9 と MDR1 の発現が亢進する. 第 74 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2015	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		慢性骨髄性白血病におけるケモカイン産生制御機構解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・医学研究科・助教・平位秀世
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学・医学研究科・研究員・横田明日美
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	金沢大学の向田教授のグループは、炎症性ケモカインである MIP-1α/CCL3 が慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) 細胞から分泌され、骨髄中の正常造血細胞上の受容体に直接作用し、骨髄外へ動員することによって CML 細胞の骨髄での増殖をサポートしていることを報告された (Baba T et al. J Exp Med, 2013)。一方、我々は、CML 細胞中で転写因子 C/EBPβ が活性化されていることを明らかにしている (Hayashi Y et al. Leukemia, 2013)。今回の研究の目的は CML 細胞中の C/EBPβ とケモカイン CCL3 の関連を明らかにして、骨髄内での CML 細胞の優位性の獲得メカニズムを解明することである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1) C/EBPβ の過剰発現は、CCL3 の発現を亢進させる。 CML 細胞中では BCR-ABL 融合蛋白質の活性によって C/EBPβ の発現が亢進している。そこで、C/EBPβ が造血細胞中で CCL3 の発現を制御しうるか否かについて検討した。 マウスの造血幹細胞株である EML 細胞に Estrogen 受容体 (ER) 単独、または C/EBPβ と ER との融合蛋白質 (C/EBPβER) を過剰発現させる亜株を作製した。本細胞株では培養液中に tamoxifen を添加することによって、ER 部分のホモダイマー化と分子の核内移行促進によって、C/EBPβ の活性化を誘導することが可能である。 この細胞株での CCL3 の mRNA 発現の変化を定量的 RT-PCR 法を用いて検討したところ、C/EBPβER の核内移行により有意に CCL3 mRNA の発現が亢進した。CCL3 の近位プロモーター部分には C/EBPβ の結合部位が存在しており、C/EBPβ が CCL3 発現増強を直接制御している可能性が示唆された。 2) マウス白血病モデルにおける CCL3 発現変化は C/EBPβ に依存している CML モデルにおける CCL3 発現の増強が C/EBPβ に依存しているか否かを検討した。5-FU 処理した骨髄細胞に、レトロウイルスを用いて BCR-ABL を遺伝子導入し、この細胞を放射線照射したマウスに骨髄移植するという CML モデルを、野生型 (WT) マウスおよび C/EBPβ ノックアウト (KO) マウス骨髄を用いて作製した。白血病を発症したマウスから細胞を分離し、CCL3 の発現を検討した。造血幹細胞、前駆細胞のレベルでは CCL3 の発現は WT と KO 間で有意差を認めなかったが、分化した顆粒球分画における CCL3 の発現亢進が KO では消失していた。このことから BCR-ABL による CCL3 の発現亢進は C/EBPβ に依存していることが明らかとなった。この傾向は、炎症性サイトカインである IL-6 でも同様であった。 本研究の結果から、BCR-ABL の下流で活性化された C/EBPβ は、CCL3 をはじめとするケモカインやサイトカインの分泌を増強して正常造血細胞に作用し骨髄外へ動員することによって、CML 細胞の骨髄内での優位性獲得に寄与していることが明らかとなった。	
【成果等】	【主な論文発表】 Hirai H, Yokota A, Tamura A, Sato A and Maekawa T: Non-steady-state hematopoiesis regulated by the C/EBPbeta transcription factor. Cancer Science, 2015, 2015 Jul;106(7):797-802. doi: 10.1111/cas.12690.	
	【学会発表】 Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Tamura A, Sato A, Iwasa M, Fujishiro A, Shoji T, Miura Y, Maekawa T: IFNα promotes differentiation of BCR-ABL⁺ leukemic cells through upregulating C/EBPβ. International Society for Experimental Hematology, 44th Annual Scientific Meeting, Kyoto, Japan, September 17, 2015.	
	【その他特筆事項】 該当事項なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がんの微小環境におけるケモカインシグナルの分子病態学的役割解析
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・教授・近藤稔和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・講師・石田裕子
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・准教授・木村章彦
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・学内講師・谷崎優子
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	ケモカインシステムは、白血球遊走能を有するサイトカインシステムとして同定されたが、その生物活性は多義に亘っており、血管新生や線維化に対して直接的に作用することも知られている。このようなケモカインの白血球遊走、血管新生や線維化といった生物活性は、がんの発症や進展のためにはその微小環境内において必要不可欠である。すなわち、がん微小環境におけるケモカインの分子病態学的役割を解析することは、がんの発症や転移の分子メカニズム解明の一助となることは言うまでもない。 そこで、本研究では、ケモカイン・ケモカインレセプター遺伝子欠損マウスを用いてがんの微小環境内細胞とケモカインシステムの役割に着目し、がんの発症・進展メカニズムを解析する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	卵巣癌腹膜播種における CCR5 シグナルの病態生理学的解析 方法：8 週齢の C57BL/6 マウス (WT) 及び遺伝子背景とする CC ケモカインレセプター-5 (CCR5) 遺伝子欠損マウス (CCR5^{-/-}) を用いて、マウス卵巣癌細胞株 ID8 (5x10⁶) を腹腔内注射または皮下注射して腫瘍の進展を比較検討した。 (1) 腫瘍細胞移植後生存率について腹膜播種モデルで検討したところ、WT マウスでは 60 日目以降、CCR5^{-/-} マウスでは 75 日目以降から死亡例は観察し始めた、前者では 120 日目で全例死亡したが、後者では 145 日目で全例死亡したが、WT マウスに比べて、生存期間の延長を認めたが有意差は認められなかった(図 1)。しかしながら、腫瘍細胞移植後 86 日目に回復したところ、腹膜播種数および腹水量は WT マウスと比べて CCR5^{-/-} マウスでは有意に減少していた(図 1)。さらに、皮下注射モデルでは投与後 4 日目まではほぼ同程度に腫瘍細胞は増殖した。その後、WT マウスでは緩やかに腫瘍塊は大きくなったが、CCR5^{-/-} マウスでは腫瘍塊が縮小し始め、15 日以降は有意に小さくなり、36 日以降では腫瘍塊はほとんど確認できなかった(図 2)。以上のことから、マウス卵巣癌の増殖および腹膜播種に CCR5 を介したシグナルが重要であることが明らかとなった。 (2) 皮下腫瘍組織を採取して、腫瘍内マクロファージ、腫瘍内新生血管および腫瘍内間質の線維化について検討した。WT マウスでは腫瘍内に多数のマクロファージを認めたが、CCR5^{-/-} マウスでは腫瘍内マクロファージ浸潤が有意に減少していた。 (3) 腫瘍内血管新生についても、WT マウスでは腫瘍内に多数の新生血管を認めたが、CCR5^{-/-} マウスでは腫瘍内血管新生が有意に減弱していた。さらに、VEGF 遺伝子の発現については、CCR5^{-/-} マウスで有意に低下していた。 (4) 腫瘍内間質の線維化も WT マウスと比較して CCR5^{-/-} マウスで有意に減弱していた。筋線維芽細胞の数も CCR5^{-/-} マウスで有意に減少していた。 (5) 腫瘍内の CCR5 発現細胞については、マクロファージおよび筋線維芽細胞に CCR5 の発現を認めた。 (6) まとめ：卵巣がんの増殖において、微小環境における CCR5 陽性マクロファージおよび筋線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。   図 1 図 2	
【成果等】	【主な論文発表】 特になし	
	【学会発表】 Ishida Y, Kobayashi A, Sasaki S, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Mukaida N, Kondo T. Pivotal roles of CCR5 for the tumor progression in a mouse ovarian cancer. 第 44 回日本免疫学会学術集会, 札幌, 2015.12 谷崎優子, 近藤稔和: Fractalkine system が腫瘍随伴マクロファージの動員を介して卵巣癌腹膜播種を促進する. 第 53 回日本癌治療学会学術集会, 2015 年, 10 月, 京都	
	【その他特筆事項】 第 53 回日本癌治療学会学術集会にて最優秀演題に選出	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		死細胞が誘導する免疫賦活反応の分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・生体防御医学研究所・教授・山崎 晶
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	近年、死細胞より放出される因子が積極的に周囲に情報を発信し、生体の恒常性維持に寄与するという新しい概念が提唱されてきている。申請者らは、C型レクチン受容体である Mincle (Macrophage inducible C-type lectin) が死細胞を認識する活性化受容体であることを見出した。一方申請者は、Mincle及びそのファミリーのリガンドとして、病原体由来のアジュバント脂質を同定してきている。これらの発見は、死細胞より放出される因子として類似の脂質が存在し、損傷・異常自己に対する免疫応答に寄与している可能性を示唆する。本研究ではこの独自の仮説に基づき、死細胞由来の内因性アジュバントとしての新たなリガンドを同定することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	まず、死細胞上清中に内因性 Mincle リガンドが存在するか否かを検討した。死細胞上清成分からクロロホルム／メタノール溶液によって脂質成分を抽出し、High-performance liquid chromatography (HPLC) によって各成分の分離、精製を行った。各成分に対し、レポーター細胞を用いて Mincle リガンド活性を検討したところ、1つのフラクションが強い Mincle リガンド活性を示した。この活性成分は生細胞そのものから脂質成分を抽出した際にも得られたことから、通常は細胞内に局在しているが、細胞死に伴い細胞外に放出された脂質成分であると考えられる。さらにこれらの成分に対し、Thin-layer chromatography (TLC) plate での染色解析を行ったところ、脂質成分を染色する酢酸銅染色、糖成分を染色するオルシノール染色の2種類で検出されたことから、この成分は内因性糖脂質である可能性が強く示唆された。この画分を Mass spectrometry (MS)、Nuclear magnetic resonance (NMR)によって構造解析を行ったところ、この成分が糖セラミドであることが判明した。この活性は合成糖セラミドにおいても再現された。そこで、糖セラミドが炎症惹起を誘導するか否かを検討した。In vitroにおいて、骨髄由来樹状細胞を糖セラミドで刺激したところ、炎症性サイトカインの産生が認められた。しかし、これらの産生は Mincle を欠損させることで有意に低下した。さらに糖セラミドは樹状細胞上の共刺激分子 (CD80、CD86、CD40) や MHC class II 分子の発現を Mincle 依存的に増強した。この結果は樹状細胞の活性化を介した、獲得免疫の誘導に糖セラミドがアジュバントとして機能する可能性を示唆した。実際に、糖セラミドは、遅延型過敏反応における獲得免疫応答を促進することが判明し、腫瘍や病原体に対する宿主免疫応答を増強させる内因性アジュバントとして機能し得ることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		肺がん細胞の悪性進展における Ror1 の新規機能の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・准教授・西田 満
研究分担者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南 康博
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本 邦夫
【研究目的】	Ror ファミリー受容体型チロシンキナーゼ Ror1、Ror2 は、Wnt5a 受容体として non-canonical Wnt シグナルを活性化し、発生過程の組織・器官形成に重要な役割を担っている。また、Wnt5a と Ror2 は骨肉腫や黒色腫などで過剰発現し、マトリックスメタプロテアーゼなどの発現誘導を介してそれらの浸潤・転移の促進に関与している。一方、Ror1 は肺腺がんや乳がんなどで過剰発現し、それらの増殖や生存を促進することが示されている。しかし、Ror1 による細胞増殖・生存の制御機構については不明な点が多く残されている。本研究では、肺腺がん細胞の増殖における Ror1 の機能を解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	Ror1 は培養細胞に過剰発現させると糸状突起形成を誘導するが、その糸状突起形成は優性不活性型 Rif (Rho in filopodia) の共発現によって阻害されることから、Rif は Ror1 と共役し糸状突起形成に関与していることが示唆されている。本研究では、まず、各種肺がん細胞株における Ror1 と Rif の発現を解析した。その結果、用いた全ての肺腺がん細胞株(PC-9、HCC827、NCI-H1993、NCI-H1975)および肺扁平上皮がん細胞株 (NCI-H1703) において、Ror1 と Rif の両方が発現していることが確認された。NCI-H1703 細胞において Ror1 または Rif の発現を抑制した結果、それぞれ細胞増殖を顕著に抑制した。次に、Rif の活性制御分子やエフェクター分子を同定するため、Rif に会合するタンパク質を免疫沈降と質量分析を用いて探索した。その結果、Rho ファミリータンパク質の活性化に関与することが知られている SmgGDS を同定した。SmgGDS と Rho ファミリータンパク質との結合の特異性について検討するため、Rif、RhoA、Rac1、Cdc42 それぞれの活性型および不活性型と SmgGDS との結合について検討した。その結果、SmgGDS は Rif の不活性型と最も強く結合することが明らかになった。また、Rif の活性型および RhoA の活性型と不活性型にもそれぞれ弱く結合することが示された。一方、Rac1 と Cdc42 との結合は確認できなかった。次に上記の肺がん細胞株における SmgGDS の発現を解析した結果、SmgGDS の発現は Ror1 と Rif が発現している肺がん細胞株の全てにおいて認められた。そこで、NCI-H1703 細胞において SmgGDS の発現を抑制し、細胞増殖に与える影響を解析した結果、Rif や Ror1 の発現を抑制した場合と同様に、細胞増殖を顕著に阻害した。これらの結果から、Ror1 は SmgGDS を介して Rif を活性化し、肺がん細胞の増殖を制御している可能性が考えられた。現在、SmgGDS による Rif の活性化機構と、その Ror1 による制御機構について解析を行っている。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・教授・青木 俊介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究では、HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。階層的結合シミュレーションによる <i>in silico</i> スクリーニング手法ならびに類縁化合物探索手法、π 結合やスタッキング相互作用の予測法 (PLIF/LI 法) 等を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、とりわけ HGF サイドのポケット (窪み部分) に結合する低分子化合物を探索するための計算科学的な創薬基盤を確立する。最終的には、大規模化合物立体構造ライブラリから HGF-Met のタンパク質間相互作用を阻害する高親和性の新規低分子化合物を複数種類同定することを目的とし、それらリード化合物の類縁体設計ならびに有機合成展開も視野に入れた創薬研究を展開する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究の標的タンパク質の 1 つである HGF の立体構造に着目し、c-Met との分子間結合同時に存在する潜在的な化合物結合部位となるポケット構造を探索し <i>in silico</i> スクリーニング手法によって HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害し、HGF による Met のリン酸化も阻害しうる新規低化合物候補を複数同定していた。同定された化合物群から 1 種類の化合物が <i>in vitro</i> の実験においても HGF-Met 間の相互作用を阻害し、かつ Met の活性化を抑制する事が確認された。そこで、同様な抑制効果を有する化合物を探索するために、類縁化合物探索を行った。ウェブ上 (Hit2LEAD.com) の類似化合物探索ツール (2D and 3D similarly screening) を用いて約 100 万化合物ライブラリの中から類縁化合物を探索した。2D and 3D similarly screening では daylight fingerprint 法により bit 化された元化合物の構造情報とライブラリ内の化合物の構造情報を比較し、Tanimoto 係数を求めた。Tanimoto 係数 0.85 以上の化合物を類縁化合物と判断した。Daylight fingerprint 法は化合物の結合パスに基づく分子パターン情報を bit 化することで、特定の構造に依存せず、分子全体の構造情報を反映し、僅かな構造の差異にも敏感であるという特徴を有する。以上のような探索方法により、元化合物の類縁化合物を 14 種選定した。これら化合物に関して以下の 2 種の方法での阻害活性の検証実験を松本研究室で行っていただいた。(1) 細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイ、(2) FITC ラベル HGF を用いた Met の直接結合系での阻害アッセイ。最終的に HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害し、HGF による Met のリン酸化も阻害しうる新たな低分子化合物を同定することが出来た。阻害活性を有する類縁体とそのような活性を有しない化合物の構造を比較することで、今後の類縁体設計ならびに有機合成展開に有益な以下の知見が得られた。(1) 化合物の必須構造。(2) 活性を有する化合物の置換可能部位 (3) 置換基の違いによる抑制活性の相違。今後、これらの構造情報を元により大きな化合物ライブラリを 2D and 3D similarly screening することで、より強力な阻害効果を有する新規類縁体を同定できる可能性が考えられた。また、複数の結合化合物の構造を用いることが可能になれば化合物-タンパク質結合モデル構造の構築に役立てる事ができ、<i>in silico</i> スクリーニングの精度向上に役立てることができる。さらに、有機合成展開も視野に入れた化合物設計の可能性が考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sakai K., Aoki S., Matsumoto K., Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. J. Biochem., 157(5), 271-284, 2015.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌における ALK 阻害薬の耐性機序解明
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学病院 呼吸器アレルギー内科・教授・木浦勝行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学病院 呼吸器アレルギー内科・助教・大橋圭明
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・大学院生・磯崎英子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	EML4-ALK 融合遺伝子を有する進行・再発非小細胞肺癌患者においては、ALK チロシンキナーゼ阻害剤が著効する。しかしながら、投与開始数ヶ月後には多くの症例で再燃をきたす（耐性化する）ことが知られている。本研究は、ALK 阻害剤の耐性のメカニズムを解明し、克服する手段を探索することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申請者は、多剤化学療法不応性 ALK 阻害薬未使用 ALK 融合遺伝子陽性肺腺癌患者胸水より肺腺癌細胞株 ABC-11 (Isozaki et al. Jpn J Clin Oncol, 2014) を樹立に成功した。この ABC-11 (3b) および米国で樹立された ALK 融合遺伝子陽性肺腺癌細胞株 H2228 (3a/b) を用いて、本研究を行った。 まず、H2228 および ABC-11 に対して、培養フラスコ内で 50%阻害濃度（以下 IC50）を下回るごく低濃度のアレクチニブ（30 nM）を持続曝露した。継代の度に濃度を段階的に上げ約 5 か月かけて高濃度曝露下で安定増殖するアレクチニブ耐性細胞株（H2228/CHR および ABC-11/CHR）を樹立することに成功した。感受性検査は MTT アッセイで行い、各親株に対する耐性度を決定した。各耐性株については single-cell cloning を行い、得られたクローンを用いてウェスタンブロッディング、PCR、FISH、免疫染色、ELISA、ゼノグラフトモデル等により、親株と耐性株を比較し、耐性機構を分析した。各耐性株（H2228/CHR および ABC-11/CHR）は、それぞれ異なる機序によりアレクチニブに耐性をきたしていた。H2228/CHR では Driver Oncogene である EML4-ALK 融合遺伝子が消失し、ALK 阻害剤は無効となっていた。また、代替の生存経路として IGF1R および HER3 経路の活性化が認められた。IGF1R チロシンキナーゼ阻害薬（OSI-906）および EGFR チロシンキナーゼ阻害剤（エルロチニブ）の併用により、H2228/CHR の増殖を抑制することができた。一方、ABC-11/CHR においては、肝細胞増殖因子（HGF）を自己分泌することによって、MET 経路が活性化することでアレクチニブに耐性をきたしていた。本耐性機構には、ALK および MET を阻害するクリゾチニブが有効であることが in vitro および in vivo にて証明された。 今回の結果をもとに申請者は、アレクチニブ耐性後のクリゾチニブの有効性を検討する多施設共同の第二相試験を計画し、現在進行中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Mechanisms of Acquired Resistance to ALK Inhibitors and the Rationale for Treating ALK-positive Lung Cancer. Isozaki H, Takigawa N, Kiura K, Cancers (Basel). 2015;7(2):763-83. A New Human Lung Adenocarcinoma Cell Line Harboring the EML4-ALK Fusion Gene. Isozaki H, Yasugi M, Takigawa N, Hotta K, Ichihara E, Taniguchi A, Toyooka S, Hashida S, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Jpn J Clin Oncol. 2014;44(10):963-8. 【学会発表】 平成 27 年 4 月 第 55 回 日本呼吸器学会学術集会 10 月 第 74 回 日本癌学会学術集会 10 月 第 53 回 日本癌治療学会学術集会 11 月 第 56 回 日本肺癌学会学術集会 12 月 European Society for Medical Oncology Asia 2015 Congress 平成 28 年 2 月 Tenth AACR-JCA Joint Conference 【その他特筆事項】 平成 27 年 10 月 第 53 回日本癌治療学会学術集会優秀演題賞 平成 27 年 12 月 Travel Grant at European Society for Medical Oncology (ESMO) Asia 2015 平成 28 年 2 月 Tenth AACR-JCA Joint Conference Scholar-in-Training Award	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん幹細胞形質を増強する肺がん遺伝子異常の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所ゲノム生物学的研究分野・分野長・河野隆志
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所ゲノム生物学的研究分野・特任研究員・中奥敬史
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所分子病態研究分野・教授・後藤典子
【研究目的】	肺がんでは、RET, ALK, ROS, NRG1 等の受容体型チロシンキナーゼ遺伝子や関連遺伝子の融合が生じ、融合遺伝子はマウス線維芽細胞の形質転換能を持つことを明らかにしている。中でも、NRG1 は融合のみならず高発現によるがん化への寄与も散見され、その対象は肺がんに限られないことが最近明らかとなってきた。しかし、NRG1 を標的とした治療を実現するためには、NRG1 ががん幹細胞形質・薬剤抵抗性に与える影響や、それに関連する下流シグナル伝達経路の解明が必須である。そこで、本共同研究では、NRG1 融合遺伝子 cDNA を強制発現させたヒトがん細胞株における、がん幹細胞形質の獲得と薬剤によるその形質の阻害作用を検討した。本研究の成果は、NRG1 融合遺伝子を標的としたがん治療法開発に大きな意義を持つ。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申請者は、悪性度の高い肺腺がんである浸潤性粘液腺がんにおいて、5-15%に NRG1 遺伝子の融合が存在することを見出した。NRG1 遺伝子にコードされる neuregulin 1/herregulin タンパク質は、HER2/HER3 受容体のリガンドとして機能する。 ヒト肺がん培養細胞 NCI-H322、ヒト乳がん培養細胞 BT20、正常肺上皮細胞 SAECs を用いて、CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立した。CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現するがん細胞株では、スフェア形成能の有意な上昇が確認でき、幹細胞マーカーの発現も認められた。融合タンパク質を発現する H322 を限界希釈法にてヌード・マウス皮下に移植し、腫瘍形成能を調べたところ、低い細胞数であっても NRG1 融合遺伝子を発現させた細胞において有意に腫瘍形成が認められた。 そうした幹細胞形質を誘導する NRG1 融合遺伝子産物による細胞内のシグナル経路の変化はこれまで NRG1 によるがん幹細胞形質の研究を行ってきた後藤典子教授の知見より明らかとなった。すなわち、NRG1 が HER2/HER3 を活性化させ、PI3K/ALK/NF-κB シグナルを介して IGF2 の産生を亢進させ、活性化された受容体 IGF1R は更なる NF-κB 経路の活性につながり、シグナル回路を形成することによりもたらされる。実際に、ERBB2、PI3K、NF-κB、IGF2 の阻害剤を用いることで、その幹細胞様形質は抑制される。こうした NRG1 の恒常的なシグナルが、がん細胞の幹細胞様形質を増強することを明らかにし、共同研究論文として報告した（発表論文 1）。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Takahiko Murayama</u> †, Takashi Nakaoku †, ..., <u>Takashi Kohno</u>, Noriko Gotoh. Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, Cancer Research. 2016 Feb 15;76(4):974-83. † equal contribution	
	【学会発表】 1. 中奥 敬史、...、村山 貴彦、...、後藤 典子、河野 隆志：HER2/HER3 シグナル阻害による NRG1 遺伝子融合陽性肺がんの治療、名古屋、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 9 月 2. Takashi Nakaoku, ..., <u>Takashi Kohno</u>; Druggable oncogene fusions in invasive mucinous lung adenocarcinoma. AACR annual meeting “Precision Medicine in the Clinic”, Philadelphia, april, 20, P4669 in Proceedings of AACR	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		悪性乳癌幹細胞維持における転写因子 NF- κ B の役割解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・教授・井上純一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	乳癌は遺伝子発現パターンや治療標的分子が異なるサブタイプに分類されることが知られている。研究代表者はこれまでに乳癌細胞株を用いて難治性の Basal-like サブタイプ乳癌特異的に NF- κ B-JAG1-NOTCH 経路ががん幹細胞の維持に関与していることを見出している。本研究では、この経路によるがん幹細胞の制御の臨床検体に由来する乳癌細胞における意義をサブタイプ特異性に着目して解析を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	腫瘍約 0.1 グラムの検体をメスで細断し、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNase で処理後、酵素で消化されなかった線維組織等をフィルターによって取り除き、弱遠心によって癌細胞をスフェロイドのまま回収する。このスフェロイドをコラーゲンコートされた培養ディッシュに播種し HuMEC 培地で培養し上皮様に伸展した癌細胞として以下の実験に用いた（この方法が前年度確立した）。次に癌細胞から RNA を抽出、BIRC5, FOXC1, ESR, FOXA1, ERBB2, GRB7 遺伝子の発現を RT-PCR により定量しその発現パターンからサブタイプを決定した。NF-κB-JAG1-NOTCH 経路のがん幹細胞維持における関与については、癌細胞を TNFαで刺激して NF-κB を活性化した後に JAG1 の発現量を RT-PCR により定量し、癌幹細胞の増減は FACS で CD44^{high}/CD24^{low} 分画の割合定量することで算出した。 現在までに 62 例の手術摘出腫瘍検体を扱い、15 例に培養に成功した。RT-PCR によるサブタイプ解析から 15 例のうち Basal-like サブタイプが 9 例、Luminal-like サブタイプが 2 例、ERBB2-enriched サブタイプが 1 例、未解析が 3 例である。Basal-like サブタイプ 9 例のうち 3 例で TNFα刺激により癌幹細胞分画が増大したが、Luminal-like サブタイプ 2 例、ERBB2-enriched サブタイプ 1 例では増大しなかった。この TNFα刺激依存的な癌幹細胞増大が Basal-like サブタイプ特異的であることを結論するには例数を 5 倍程度増やす必要があるが、現時点では期待できる結果と言える。一方で Basal-like サブタイプ 9 例のうち 6 例で TNFα刺激により JAG1 の発現が上昇したが、Luminal-like サブタイプ 2 例、ERBB2-enriched サブタイプ 1 例の中でも 2 例で TNFα刺激により JAG1 の発現が上昇した。従って JAG1 の発現誘導については Basal-like サブタイプ特異的ではないと考えられる。また、Basal-like サブタイプで JAG1 発現誘導が認められた 3 例のうち、癌幹細胞が増えたのが 1 例であった。今後も解析を継続し Basal-like サブタイプ乳癌特異的な NF-κB-JAG1-NOTCH 経路のがん幹細胞維持における関与を in vivo 腫瘍において検証する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	乳癌における細胞間相互作用における上皮間葉転換の制御 山本瑞生、井上純一郎 日本癌学会 10/8/2015 名古屋
	【その他特筆事項】	なし

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		固形がんのがん幹細胞培養系を用いたがん悪性化の分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学医科学研究所・教授・東條有伸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	本研究では、乳がんの新鮮臨床検体の培養を行い、革新的ながん根治療法につながる分子標的を見いだすことを大きな目的とする。次世代シーケンサーを用いた解析を行い、ドライバ変異や、癌幹細胞のアキレス腱やハブとなる鍵分子を同定する。また、乳がん臨床検体を細分化して、免疫不全マウス(NOG マウス)の乳腺皮下部に移植し、patient derived xenograft(PDX)モデルを構築する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	乳がん手術検体の培養を行い、がん細胞のスフィア培養と接着培養を行い、核酸を抽出した。3 検体についてエクソームシーケンスにより、知られているがん遺伝子、がん抑制遺伝子の変異がみつかった。 同時に、これまでに知られていない遺伝子も多くみつかった。Prognoscan を用いて遺伝子発現と予後との相関、Oncomine を用いてがんと正常組織での遺伝子発現を解析し、新たな分子標的候補を絞り込んだ。 新規分子標的候補については、よい抗体が市販されているものをさらに絞り込み、まず乳がん細胞株や肺がん細胞株をもちいてまずウエスタンブロットを行って蛋白質レベルの発現を確認した。その後 siRNA や shRNA によりノックダウンを行い、細胞増殖における効果を解析した。さらに、スフィア培養を行い、がん幹細胞性の評価を行った。また正常に近い細胞として MCF10A 細胞や HEK293 細胞を用いてノックダウンを行い、細胞増殖抑制効果が少ない事を確認した。 乳がん手術検体の供与を受け、培養、PDX 可能ながん細胞をカタログ化した。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Murayama T, Nakaoku T, Enari T, Nishimura T, Tominaga K, Nakata A, <u>Tojo A</u>, Sugano S, Kohno T, Gotoh N.: Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, <i>Cancer Res</i>, 76, 974-983, 2016. 2. Nakata A, Yoshida R, Yamaguchi R, Yamauchi M, Tamada Y, Fujita A, Shimamura T, Imoto S, Higuchi T, Nomura M, Kimura T, Nokihara H, Higashiyama K, Kondoh K, Nishihara H, <u>Tojo A</u>, Yano S, Miyano S, Gotoh N.: Elevated beta-catenin pathway as a novel target for patients with resistance to EGF receptor targeting drugs. <i>Sci Rep</i>, 5, 13076, 2015.	
	【学会発表】 とくになし。	
	【その他特筆事項】 特許出願 出願日：2015 年 6 月 30 日 特願 2015-132122 発明者：後藤典子、富永香菜、<u>東條有伸</u> 名称：癌の新規分子標的 MICAL3 出願者：金沢大学法人	

研究区分		一般共同研究
研究課題		ヒト乳がん細胞変異株におけるがん幹細胞の解析及び臨床サンプルとの関連性の評価
研究代表者	所属・職名・氏名	星薬科大学先端生命科学研究センター・准教授・加藤良規
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	乳がんは非常に転移しやすいがんであり、女性のがん罹患率及び死亡率とも上位を占めている。慢性的な抗腫瘍薬処置による薬物耐性も大きな問題となっており、そのことががんの増悪・転移を誘発するという報告もある。一方、転移は抗腫瘍薬の処置とは関係なく起こるため、転移という事象が乳がん細胞に薬物耐性を引き起こす可能性も考えられる。本研究では、ヒト由来高浸潤性 triple negative 乳がん細胞株である MDA-MB-231 とその骨および脳転移株を使用し、抗腫瘍薬の前処置なしでの抗腫瘍薬に対する感受性を調べ、さらにその薬物耐性機構を検証した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々は、ヒト乳がん細胞脳転移株である MDA-MB-231BR が 5-フルオロウラシル (5-FU) に対して耐性を持つことを明らかにした (図 1)。興味深いことに、同じく MDA-MB-231 を親株とする MDA-MB-231SCP2 (骨転移株) では 5-FU に対する耐性は見られなかった。この MDA-MB-231BR の 5-FU 耐性機構は、RNA シークエンシングによる遺伝子発現の比較から、抗アポトーシスタンパクである BCL2A1 の上昇が関わっていることが示唆された (図 2)。そのため、COX-2、NF-κB 及び BCL2 ファミリーの各阻害薬と 5-FU の併用や MDA-MB-231BR の BCL2A1 ノックダウン及び親株 (MDA-MB-231) の BCL2A1 強制過発現等を行い、MDA-MB-231BR の 5-FU 耐性が BCL2A1 の過発現によることを確認した。以上、MDA-MB-231BR は、ヒト乳がん細胞の脳転移モデルとして最も多く使用されている細胞株であることから、本研究で得られた知見は、今後の乳がん細胞の転移と薬物耐性獲得との関係解明、さらには脳転移性乳がんの治療法開発への大きな一歩になるだろう。 図 1. MDA-MB-231 系細胞株の 5-FU に対する感受性。MDA-MB-231BR は、親株 (Parent) 及び骨転移株 (SCP2) と比較して、5-FU に対する感受性が低いことが明らかとなった。 図 2. MDA-MB-231 系細胞株の遺伝子発現の相違。5-FU の代謝及び薬物排出タンパクに関係する遺伝子の相違はほとんど見られなかったが、COX-2 ならびに BCL2A1 は MDA-MB-231BR では親株 (Parent) 及び骨転移株 (SCP2) と比較して有意に上昇していた。	
【成果等】	【主な論文発表】	Atsunobu Sagara, Katsuhide Igarashi, Maky Otsuka, Takeshi Karasawa, Noriko Gotoh, Michiko Narita, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita, Yoshinori Kato. "Intrinsic resistance to 5-fluorouracil in a brain metastatic variant of human breast cancer cell line, MDA-MB-231BR." Under review as of May 2 nd , 2016.
	【学会発表】	Atsunobu Sagara, Katsuhide Igarashi, Maky Otsuka, Michiko Narita, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita, Yoshinori Kato. "Molecular mechanisms of spontaneous resistance to 5-fluorouracil in breast cancer-derived brain metastasis." Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, February 16-20, 2016 (Maui, HI).
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究																																						
研究課題		Hedgehog シグナルを介した癌転移制御機構に関する研究																																						
研究代表者	所属・職名・氏名		広島大学 原爆放射線医科学研究所・助教・上田健																																					
受入担当教員	職名・氏名		教授・善岡克次																																					
【研究目的】	近年 Hedgehog (Hh)シグナル経路活性化とヒト腫瘍(神経膠芽種、基底細胞癌、悪性黒色腫など)の病態との関連が示唆されている。Hh リガンドがその受容体 Patched に結合すると、転写因子 GLI ファミリー(glioma-associated oncogene family zinc finger 1-3)の細胞質から核内へ移行が促進され、標的遺伝子の発現が誘導される。GLI ファミリーには、活性型 (GLI-1, 2)、抑制型 (GLI-3) が存在し、各々の GLI ファミリー遺伝子の機能ならびに標的遺伝子群を明らかにすることは、Hh シグナルを介した癌進展機構の解明及びこの経路を標的とする治療法の開発に有用であると考えられる。平成 26 年度共同研究において、低転移株であるマウスメラノーマ B16 F0 細胞株に、活性型 GLI である GLI-1 を安定的に発現させた B16 F0 高転移能株を樹立し遺伝子解析を行なった結果、GLI-1 高発現株では、低酸素応答遺伝子群の発現が有意に上昇していることを見出した。本年度は、さらに転移能への GLI-1 の寄与を明らかにする目的で、高転移株である B16 F10 細胞株において GLI-1 ノックダウンし、遺伝子発現を中心とした解析を行った。																																							
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	高転移能を有するマウスメラノーマ細胞株 B16 F10 において、GLI-1 遺伝子の発現をノックダウンした細胞を善岡研究室において樹立し解析をおこなった結果、ノックダウン細胞株では転移能が抑制されるという知見が得られた。そこで、GLI-1 ノックダウンによる転移能抑制の分子基盤を明らかにすることを目的として、コントロール細胞と GLI-1 ノックダウン細胞において次世代シーケンスによる網羅的遺伝子発現解析を行なった。得られた遺伝子発現データを基に Gene set enrichment analysis (GSEA)解析を用いて、発現データ中で特定の機能をもつ遺伝子群の発現がどのように変動したかを両者で比較検討した。その結果、生体機能の特徴づける遺伝子群からなる 50 の Hallmark gene set のうち、GLI-1 発現抑制株において、Enrichment score 1.5 倍以上の発現低下を認めた遺伝子セットが 6 つ同定された (表参照)。同じ条件で発現の上昇を認めたものは検出されなかった。これら発現低下遺伝子群には、昨年度の GLI-1 高発現株で発現が亢進していた低酸素応答遺伝子群からなる Gene set が含まれていた。GLI-1 は発現量依存的に低酸素応答遺伝子を制御し、転移能に促進的に機能している可能性が考えられた。今後、これらの遺伝子発現変化の機構および細胞生物学的な影響、GLI-1 が分子治療標的となる可能性などについて検討をすすめたい。 <table><tr><th>Gene set</th><th>Size</th><th>Normalized enrichment score</th><th>p-value</th><th>False discovery rate</th></tr><tr><td>HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING</td><td>61</td><td>-1.70</td><td>0.0017</td><td>0.030</td></tr><tr><td>HALLMARK_COAGULATION</td><td>83</td><td>-1.64</td><td>0.0049</td><td>0.038</td></tr><tr><td>HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE</td><td>115</td><td>-1.56</td><td>0.0016</td><td>0.057</td></tr><tr><td>HALLMARK_HYPOXIA</td><td>165</td><td>-1.53</td><td>0.0016</td><td>0.057</td></tr><tr><td>HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE</td><td>80</td><td>-1.51</td><td>0.0101</td><td>0.053</td></tr><tr><td>HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION</td><td>149</td><td>-1.51</td><td>0.0016</td><td>0.044</td></tr></table> (表) GLI-1 ノックダウン細胞で1.5倍以上のNormalized enrichment scoreの低下が認められた Hallmark Gene Setの一覧					Gene set	Size	Normalized enrichment score	p-value	False discovery rate	HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	61	-1.70	0.0017	0.030	HALLMARK_COAGULATION	83	-1.64	0.0049	0.038	HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	115	-1.56	0.0016	0.057	HALLMARK_HYPOXIA	165	-1.53	0.0016	0.057	HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	80	-1.51	0.0101	0.053	HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	149	-1.51	0.0016	0.044
Gene set	Size	Normalized enrichment score	p-value	False discovery rate																																				
HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	61	-1.70	0.0017	0.030																																				
HALLMARK_COAGULATION	83	-1.64	0.0049	0.038																																				
HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE	115	-1.56	0.0016	0.057																																				
HALLMARK_HYPOXIA	165	-1.53	0.0016	0.057																																				
HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	80	-1.51	0.0101	0.053																																				
HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	149	-1.51	0.0016	0.044																																				
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Ueda T</u>, Nakata Y, Yamasaki N, Oda H, Sentani K, Kanai A, Onishi N, Ikeda K, Sera Y, Honda Z, Tanaka K, Sata M, Ogawa S, Yasui W, Saya H, Takita J, Honda H. “ALK R1275Q perturbs extracellular matrix, enhances cell invasion, and leads to the development of neuroblastoma in cooperation with MYCN” Oncogene. In press <u>Ueda T</u>, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. “Fbx10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2.” Blood. 2015;125(22):3437-46. 【学会発表】 上田 健, 長町安希子, 中田雄一郎, 山崎憲政, 稲葉俊哉, 本田浩章 Role of Fbx10, a histone demethylase, in leukemia development 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学大会 合同大会 (ポスター) 【その他特筆事項】 なし																																							

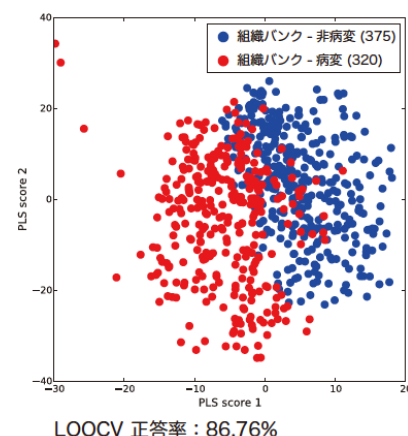
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・教授・福永 理己郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・講師・藤井 忍
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	翻訳開始を制御する細胞内シグナル伝達系である mTOR 経路と Mnk 経路の相互作用における JSAP1/JLP の機能を明らかにすることを目的として本研究を計画した。近年、mTOR などの翻訳促進分子を標的とするラパマイシン類縁体 (Everolimus など) による治療が開始され、がんの進展における翻訳制御経路の解明が重要な課題となっている。本研究では、がん治療において mTOR 経路と Mnk 経路の両者に対する阻害剤を併用する試みの分子的基盤を解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	増殖因子や過バナジン酸刺激による Mnk 活性化動態を検討するために野生型および各種の Mnk-KO マウス繊維芽細胞を用いて解析した結果、Mnk1 が増殖刺激によって速やかに活性化されるのに対し、Mnk2 は逆に不活性化されることが示唆された。これまで、Mnk2 は基底レベルで構成的な活性を示すと考えられており、Mnk1 と全く逆の活性化動態を示すことは意外であった。そこで、このシグナル伝達機構を明らかにする目的で、TOR シグナル系からのクロストークとの関連について解析を行っている。また、Mnk1 と Mnk2 では 2 種類の Mnk 阻害剤 (CGP57380 及び Cercosporamide) への感受性が異なることも示唆された。 次に、Mnk1 と Mnk2 の活性制御機構の違いを解析する目的で、Mnk1 と Mnk2 のキメラ分子発現プラスミドを 6 種類構築した。これらを Mnk1/2 ダブル KO 細胞で発現させて増殖刺激による Mnk 活性化動態を検討した結果、Mnk1 型 (誘導的活性化)、Mnk2 型 (誘導的不活性化)、及び中間型 (活性不変) に分類でき、活性化動態を決定するのは主に 2 か所のリン酸化部位 (ヒト Mnk1 の Thr209 及び Thr214 残基) であることが示唆された。 また、Mnk-DKO 細胞と、これに Mnk1 を発現させた細胞の 2D-DIGE プロテオーム解析を行い、Mnk1 発現によって細胞内発現レベルが変化するタンパク質の同定を試みた。複数の変動スポットについて MALDI-TOF 質量分析を行った結果、発現レベルが Mnk1 によって負に制御されるタンパク質の一つが KRIT1 (Krev interaction trapped 1) である可能性が示された。 他方、miR30 模倣 RNA 発現系を利用して各種のヒト由来細胞で Mnk1 を誘導的に発現抑制する系の樹立を試み、Mnk1 に対する複数の miR30 模倣 RNA を共発現させることで抑制効率が高まることを見出した。しかし、このノックダウン系では、eIF4E リン酸化レベルの低下は観察されるものの、生理的機能を解析する上で十分な抑制が得られなかったことから、新たに CRISPR/Cas9 システムによってヒト各種培養細胞の Mnk1 遺伝子破壊を行うことにした。現在、HeLa 細胞を用いて Mnk1 遺伝子破壊を行うために CRISPR/Cas9 発現プラスミドの構築を進行中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Cendrowski, J., Sánchez-Arévalo Lobo, V. J., Sendler, M., Salas, A., Kuhn, J.-P., Molero, X., <u>Fukunaga, R.</u>, Mayerle, J., Lerch, M. M., and Real, F. X.: Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. <i>Gut</i> 64, 937-947 (2015)	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		GSK3 β を標的とする新規核酸医薬品の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎 猛夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・助手・山本 聡子
	所属・職名・氏名	東京工業大学・生命理工学研究科・准教授・清尾 康志
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	これまでの共同研究により我々は、glycogen synthase kinase (GSK) 3βが消化器癌に共通する治療標的であることを提唱してきている。GSK3β制御性 micro-RNA の配列をもとに GSK3βを標的とするアンチセンスオリゴ(ASO)を設計、合成し、膵がんに対する治療効果とそのメカニズムを検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	核酸医薬とは DNA や RNA などの核酸をその骨格にもつ医薬品で、アンチセンスやリボザイム、デコイ核酸など様々な手法が試みられている。いずれも特定の塩基配列やそれに結合するタンパク質を標的としているため、非常に特異性が高いという利点がある。そのうちアンチセンスオリゴヌクレオチド(ASO)は、分解されやすく細胞に取り込まれにくいという特徴を持っているが、リボースのホスホジエステル結合をホスホロチオエート化し、さらに ASO 両端の 5 ヌクレオチドのリボース 2 位炭素をメトキシエチル化することで RNase に対する安定性を向上させることが可能となっている。今回、ホスホロチオエート化した ASO にさらに糖鎖を付加した ASO を作成し、各種膵癌細胞への ASO の取り込みが増加するか否かについての検討を行い、新しい核酸医薬としての基盤技術の検討を行った。ASO のターゲットは、これまでに我々が膵癌の標的として同定し、各種解析を行っている GSK3βとした。GSK3βの発現をコントロールしていると報告のある microRNA の結合サイトに対する糖鎖付加核酸(GASO)と糖付加を行っていない核酸を作成し、さらに細胞内への取り込みや、細胞内での代謝状態を確認するために、GASO、ASO に対して蛍光色素 (FAM) を付加した。 各種膵癌細胞株 (PANC-1, MIA-PACA, BxPC3, Capan-1) 及び正常膵癌細胞株 (PE) に対して、細胞増殖能試験 (MTT アッセイ等) を行い、抗腫瘍効果を確認した上で、タイムラプス顕微鏡を用いた細胞内への取り込み能及び代謝活性について光学定量的に評価を行った。これらの解析の結果、糖付加をしていない ASO と比較して糖付加した ASO は、各種膵癌細胞への細胞内取り込みが増加し、膵管由来の正常細胞である PE に対しては、細胞内への取り込みが低下した。糖の取り込み経路による細胞内への取り込みであることを確認するために 2-DeoxyGlucose を前処置した細胞では、GASO の取り込みが低下したことから、我々が作成した GASO は、細胞の糖の取り込み経路を介して細胞内に取り込まれている可能性が示唆された。一般に、癌細胞では、糖代謝が亢進しており、細胞への糖の取り込みが増加している。そのため、我々が作成した GASO は、特に癌細胞優位に細胞内へ取り込みがされ、正常細胞では取り込みが低下するなど、がん治療にとって理想的な細胞内動態を示した。今後はこれらの解析をさらに進めていく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 島崎猛夫、山本聡子、源利成、他。抗癌剤により膵癌細胞に誘導される EMT 促進因子の同定と機能解析	
	【学会発表】 なし (2016 年度に予定)	
	【その他特筆事項】 なし	

研究区分		一般共同研究																					
研究課題		大気圧イオン化法-質量分析を用いた大腸がん診断システムの確立および病態解明																					
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学・助教・吉村 健太郎																					
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山梨大学・教授・竹田 扇																					
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・太田 哲生																					
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・中村 慶史																					
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本 貴寛																					
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成																					
【研究目的】	本研究では前処理不要の質量分析装置を応用した、大腸がんの新規診断システムの構築と、病態の分子メカニズムを解明することを目的とする。本研究目的を達成するには複数年を要するが 27 年度においては、① 多数の正常大腸粘膜および、大腸がん検体からマスペクトルを収集しデータベースを構築する、② 統計解析や機械学習を用いて非がん部、がん部いずれのマスペクトルであるかを判別するアルゴリズムを確立する、③ マスペクトルデータベースを利用して、がん部で特異的に変化する分子を同定することを目指した。																						
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	得られた成果																						
	① マスペクトルデータベースの構築 がん組織バンクに保管されていた検体及び、新たに手術で摘出された検体に対して計 475 回の質量分析を行い、最終的に 2375 マスペクトルからなるデータベースを構築することができた (右表)。これを用いて判別アルゴリズムの構築及び、分子メカニズム解明に向けた解析を行う。																						
	表、症例数及びマスペクトル数 <table><thead><tr><th></th><th>症例数</th><th>分析回数</th><th>Mass spectra</th></tr></thead><tbody><tr><td rowspan="3">組織バンク</td><td rowspan="3">79</td><td>145</td><td>725 Non-cancerous</td></tr><tr><td>126</td><td>630 Cancerous</td></tr><tr><td>271</td><td>1355 Total</td></tr><tr><td rowspan="3">新たに摘出</td><td rowspan="3">22</td><td>103</td><td>515 Non-cancerous</td></tr><tr><td>101</td><td>505 Cancerous</td></tr><tr><td>204</td><td>1020 Total</td></tr></tbody></table>				症例数	分析回数	Mass spectra	組織バンク	79	145	725 Non-cancerous	126	630 Cancerous	271	1355 Total	新たに摘出	22	103	515 Non-cancerous	101	505 Cancerous	204	1020 Total
	症例数	分析回数	Mass spectra																				
組織バンク	79	145	725 Non-cancerous																				
		126	630 Cancerous																				
		271	1355 Total																				
新たに摘出	22	103	515 Non-cancerous																				
		101	505 Cancerous																				
		204	1020 Total																				
	② 判別アルゴリズムの構築 データベースに構築されたマスペクトルを部分最小二乗法で解析した結果、非がん部とがん部のマスペクトルパターンには差があることが明らかとなった (右図)。 データベースのマスペクトルを用いて機械学習 (ロジスティック回帰) を行い、Leave-one-out cross validation により判別能を評価した結果、盲検マスペクトルを非がん部あるいは、がん部いずれの由来であるかを正答する確率は 86.8% であった。同学習データを用いて新たに摘出された検体から得られたマスペクトルを判定したところ、こちらも 83.2% の正答率が得られた。今後はデータベースの拡充及び、判別手法の検討を行い、さらなる正答率の向上を目指す。																						
	③ 分子メカニズムの解明 本システムで得られるマスペクトルには 1990 本のピークが存在するが、その全てに対して有意差検定を行なった。その結果約 80 のピークにおいてがん部で特異的にイオン強度が変化することが明らかとなった。これらのピークは主に脂質に由来するが、現在これらの詳細な脂質種の同定を進めている。																						
	以上 27 年度までの結果を論文にまとめ、国際誌に投稿予定である。																						
【成果等】	【主な論文発表】 なし																						
	【学会発表】 なし																						
	【その他特筆事項】 なし																						



平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		大腸がんにおける β -カテニン/Tcf の転写標的 CRD-BP の分子病理学的特性と病態の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般消化器外科学・教授・小坂健夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般消化器外科学・准教授・木南伸一
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般消化器外科学・講師・藤田秀人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般消化器外科学・大学院・大西敏雄
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般消化器外科学・大学院・富田泰斗
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	大腸がんの発生と進行過程に Wnt/β-カテニン経路活性化は重要であり、がん病態における役割は研究途上である。本研究では、2011 年来の共同研究で集積してきたがん組織バンクを利用して、がん組織におけるβ-カテニン/Tcf 複合体の転写標的分子 CRD-BP (coding region determinant-binding protein) の発現をもとに、CRD-BP により mRNA が安定化されるがん関連分子の発現異常や臨床病理学的因子を統合解析する。これにより、CRD-BP が大腸がんの病態、進行度や予後の分子指標となるかを検討し、大腸がんにおける Wnt 経路の病理作用を新たな視点から明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	大腸がんにおいて CRD-BP が複数の細胞増殖経路 (Wnt, NF-κB, c-myc, IGF-II) を誘導することで、発がん・予後の関連因子となり得るかを明らかにするために、大腸がん症例を対象に CRD-BP 発現と各遺伝子発現の関連及び、臨床病理学的因子や予後との関連を検討した。 金沢大学がん進展制御研究所のヒト消化管がん組織バンクに登録されている、十分な臨床病理学的因子と予後データが解析可能であった 42 症例を対象にした。同一症例の大腸がん腫瘍組織 (T) と正常粘膜 (N) の検体を用いて、CRD-BP と上記の関連分子の発現を定量的 (q)RT-PCR と免疫組織化学染色 (IHC) により比較解析した。これらの分子の発現と大腸がん症例の臨床病理学的因子の相関を統計学的に検討した。その結果； ① CRD-BP は同一症例の正常組織に比べて腫瘍で有意に高発現していた ($p=0.002$)。CRD-BP 高発現を示す症例は 22 例(52%)であり、一部の症例で IHC により結果を検証した。免疫組織化学的には、腫瘍先進部の腫瘍細胞核における発現が特徴的であった。 ② 免疫組織化学的にβ-catenin が腫瘍先進部において核内集積する症例では、CRD-BP が腫瘍で有意に高発現していた ($p=0.04$)。 ③ CRD-BP 発現と CRD-BP による mRNA 安定化が報告されている遺伝子発現を比較したところ、腫瘍における CRD-BP の高発現はβ-TrCP ($p=0.00$)、c-myc ($p=0.002$)、IGF-II の発現亢進と正の相関を示した。 ④ CRD-BP mRNA 発現と臨床病理学的因子の単変量解析では、リンパ節転移陽性例 ($p=0.01$)と、病期が進行した症例 (病期 I/II vs. III/IV ; $p=0.01$) において CRD-BP の高発現症例が多く認められた。 ⑤ CRD-BP mRNA 発現と術後生存期間の関連を検討すると、有意差は認められないものの ($p=0.27$)、CRD-BP 高発現を示す症例は全生存率が低い傾向であった。 これらの結果から、大腸がんにおいて CRD-BP はβ-catenin の腫瘍先進部での核内集積と活性化を誘導していることが示唆された。また、CRD-BP は E3 ユビキチン連結酵素β-TrCP や c-myc がん遺伝子の mRNA 安定化を介して大腸がんの進行に寄与すると考えられた。臨床病理学的な観点からは、がん悪性度やリンパ節転移に作用するものと考えられた。今回の検討では CRD-BP 発現と予後との明確な関連性は示されなかったことから、さらに症例を集積して検討を進める。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Z-11 trial and rethinking axillary reverse mapping, M.Noguchi, Breast Cancer, 22:99-100, 2015 2. A case of empyema and a posterior mediastinal abscess after an iliopsoas abscess secondary to crohn's disease, N Motosono, M Tanaka, Y Machida, S Maeda, K Usuda, Y Tomita, T Kosaka, M Sagawa, Int J Colorectal Dis, 2015 3. New Treatment Strategy For Submucosa-Infiltrating Gastric Cancer Without Sentinel Node Metastasis: A Pilot Study Of Laparoscopy-Assisted Endoscopic Full-Thickness Resection In An IN VIVO Porcine Model., T.Itoh, H.Kitakata, S.Kinami, K.Kawaura. K.Hamada, S.Azukisawa, R.Itoh, K.Omote, T.Kosaka, M.A.Hujino, ENDOSCOPIC FORUM for digestive disease, 31:17-26, 2015	

	4. Is axillary reverse mapping feasible in breast cancer patients?, M. Noguchi, S. Miura, E. Morioka, Y. Ohno, M. Yokoi-Noguchi, Y. Nakano, T. Kosaka, EJSO, 41:442-449, 2015 5. Tangential frozen section analysis for the surgical margins in breast-conserving surgery, Y. Ohno, M. Noguchi, M. Yokoi-Noguchi, Y. Nakano, T. Kosaka, N. Kurose, H. Minato, American Journal of Breast Cancer Research American Journal of Breast Cancer Research American Journal of Breast Cancer Research, 41:442-449, 2015 6. Characteristics and clinical relevance of postgastrectomy syndrome assessment scale (PGSAS)-45: newly developed integrated questionnaires for assessment of living status and quality of life in postgastrectomy patients, K. Nakada, M. Ikeda, M. Takahashi, S. Kinami, M. Yoshida, Y. Uenosono, Y. Kawashima, .Oshio, Y. Suzukamo, M. Terashima, Y. Kodera, Gastric Cancer, 18:147-158, 2015 7. A single-arm phase II validation study of preventing oxaliplatin-induced hypersensitivity reactions by dexamethasone: the AVOID trial, Y. Yoshida, K. Hirata, H. Matsuoka, S. Iwamoto, M. Kotaka, H. Fujita, N. Aisu, S. Hoshino, T. Kosaka, K. Maeda, F. Kiyomi, Y. Yamashita, Drug Design, Development and Therapy, 9:6067-6073, 2015 8. A new stage of sentinel node navigation surgery in early gastric cancer, T. Fujimura, S. Fushida, T. Tsukada, J. Kinoshita, K. Oyama, T. Miyashita, H. Takamura, S. Kinami, T. Ohta, Gastric Cancer, 18:210-217, 2015 9. Factors that minimize postgastrectomy symptoms following pylorus-preserving gastrectomy: assessment using a newly developed scale (PGSAS-45), T. Namikawa, N. Hiki, S. Kinami, H. Oabe, T. Urushihara, H. Kawahira, N. Fukushima, Y. Kodera, T. Yumiba, A. Oshio, K. Nakada, Gastric Cancer, 18:397-406, 2015 1. 胃切除後患者の QOL 向上のために一均てん化された胃切除後評価法の必要性和 PGSAS 質問票の紹介 - , 中田浩二, 池田正視, 高橋正純, 木南伸一, 吉田 昌, 上之園芳一, 小寺泰弘, 胃がん perspective, 7:255-261, 2015 11. 【腹腔鏡・内視鏡合同手術 (LECS) の最新手技】 早期胃癌に対するセンチネルノードナビゲーション sealed EFTR, 北方秀一, 伊藤 透, 木南伸一, 川浦 健, 濱田 和, 小坂健夫, 手術, 69:1465-1471, 2015 12. 経時的な画像変化を観察できた黄色肉芽腫性胆嚢炎の 1 例, 大西敏雄, 上田順彦, 甲斐田大資, 藤田秀人, 木南伸一, 小坂健夫, 胆道, 29:815-823, 2015 年 11 月 13. 切除不能進行食道癌に対する栄養評価からみた食道バイパス術の検討, 舟木 洋, 藤井頼孝, 藤田純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 富田泰斗, 野口美樹, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫, 癌と化学療法, 42:1543-1546, 2015 14. 4 型胃癌結腸転位再発に集学的治療が奏効した 1 例, 富田泰斗, 藤井頼孝, 三浦聖子, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木 洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫, 坂田則昭, 癌と化学療法, 42:1591-1593, 2015 15. 根治性と機能性を考慮し工夫した胃・膵体部重複癌の 1 切除例, 上田順彦, 三浦聖子, 森岡絵美, 甲斐田大資, 富田泰斗, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木 洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 小坂健夫, 坂田則昭, 癌と化学療法, 42:2343-2345, 2015 16. 中心壊死を伴った肝原発腺扁平上皮癌の 1 例, 上田順彦, 大西敏雄, 甲斐田大資, 藤田秀人, 木南伸一, 小坂健夫, 木下英里子, 黒瀬 望, 胆道, 29:905-912, 2015 17. 第三の乳癌手術: 乳房温存再建手術, 野口昌邦, 中野泰治, 野口美樹, 大野由夏子, 森岡絵美, 三浦聖子, 金沢医科大学雑誌, 40:37-43, 2015 18. 胃癌に対する胃局所切除術は復権するか?, 木南伸一, 小坂健夫, 金沢医科大学雑誌, 40:145-148, 2015
	【学会発表】 1. 11th Asian Clinical Oncology Society, Taiwan, The expression and the clinical role of the CRD-BP, the transcriptional target of the β-catenin in the wnt signaling pathway, in the colorectal cancer. ポスター 第 24 回日本消化器癌発生学会, 福岡, Wnt/β catenin signal における CRD-BP の役割について。ワークショップ
	【その他特筆事項】

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		膵幹細胞の加齢と発癌機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター病理診断科・医長・松田陽子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター病理診断科・部長・新井富生
	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター老年病理学研究チーム・部長・田久保海蒼
	所属・職名・氏名	日本医科大学統御機構診断病理学・准教授・石渡俊行
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学・がん進展制御研究所腫瘍制御分野・源利成
【研究目的】	組織幹細胞の老化は個体老化の中心的役割を担うと考えられるが、ヒトにおける幹細胞の老化や加齢性変化は不明な点が多い。膵臓では、老化に伴って内分泌細胞の減少や膵管上皮の化生性変化を来し、これらの変化が糖尿病や膵癌の発症原因と考えられるため、老化の疾病に与える影響の解明は重要である。しかし、ヒトの膵組織幹細胞については、その同定方法や特徴を含めて、解明されていない。本研究では、テロメア長が長い細胞を組織幹細胞として同定し、その加齢に伴う変化を明らかにする。これにより、組織幹細胞を標的とした修復機能改善による健康保持を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、quantitative fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) 法を用い、病理解剖検体の膵臓の組織学的に正常な腺房、腺房中心細胞におけるテロメア長を測定した。膵癌を有する症例は対象から除外した。腺房中心細胞は cytokeratin (CK) 19 (+)/CK7 (+)/trypsin (-)/CD133 (focal +)を示し、腺房細胞は CK19 (-)/CK7 (-)/ trypsin (+)/ CD133 (-)を示した。腺房中心細胞は腺房よりも長いテロメアを有していた。腺房と腺房中心細胞のテロメア長は、加齢とともにいずれも短縮した。テロメアの短縮速度は腺房よりも腺房中心細胞の方が速かった。しかし、60 歳以上では腺房中心細胞のテロメア長が保持されるのに対し、腺房細胞ではテロメア長の短縮を認めた。対照群 (非癌症例) と比べ、膵癌症例の腺房中心細胞と腺房では、テロメア長の短縮を認めた。以上より、腺房中心細胞は、CD133 陽性、テロメア長が長いという性質を示し組織幹細胞としての性質を有する細胞から成ると考えられる。組織幹細胞では、急速なテロメアの短縮あるいは細胞の消失が生じることが示唆される。組織学的変化を生じる前から加齢とともに進行するテロメア機能不全は、組織幹細胞にも生じ、このような変化が膵臓の発癌過程において重要な役割を担う可能性がある。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Matsuda Y</u>, Ishiwata T, Yachida S, Suzuki A, Hamashima Y, Hamayasu H, Yoshimura H, Honma N, Aida J, Takubo K, Arai T. Clinicopathological features of 15 occult and 178 clinical pancreatic ductal adenocarcinomas in 8339 autopsied elderly patients. <i>Pancreas</i>. 2016 45:234-40 2. <u>Matsuda Y</u>, Yoshimura H, Ishiwata T, Sumiyoshi H, Matsushita A, Nakamura Y, Aida J, Uchida E, Takubo K, Arai T. Mitotic index and multipolar mitosis in routine histologic sections as prognostic markers of pancreatic cancers: A clinicopathological study. <i>Pancreatology</i>. 2016 16:127-32. 3. <u>Matsuda Y</u>, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamashita S, Ushijima T, Arai T. Systemic	

	Administration of Small Interfering RNA Targeting Human Nestin Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Metastasis. <i>Pancreas</i>. 2016 45:93-100. 【学会発表】 1. <u>Matsuda Y.</u> Telomere shortening in the pancreas: relationships with aging, cancers and tissue stem cells. 2015; The American association for cancer research annual Meeting 2015. 2. <u>Matsuda Y.</u> Association of aging and ARHGAP17 variation with pancreatic intraepithelial neoplasia. 2015; Joint meeting of the International Association of Pancreatology and Pancreatic Cancer Committee of Chinese Anti-Cancer Association. 【その他特筆事項】
--	---

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ATL 発症モデルマウスにおけるエピゲノム変化の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学・教授・藤澤順一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 HTLV-1 は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因ウイルスである。私たちは、NOG-SCID (NOD-SCID / IL2Rγ-chain knock-out) マウスに、ヒト造血幹細胞を骨髓移植することによってヒト化マウスを作製し、このマウスに HTLV-1 を感染させることで、ATL モデルマウスを確立するという技術開発を行ってきた。現在、このマウスを利用して ATL の病態を詳細に解析する課題に着手している。本共同研究では、私たちと受け入れ研究室の双方の研究資源を生かして、HTLV-1 感染ヒト化マウスで再現された ATL 様病態の発現過程をエピゲノム変化の側面から解析することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	私たちは、ヒト臍帯血由来造血幹細胞を NOG-SCID マウスの骨髓内に移植することにより、ヒト造血系を個体内に再現したヒト化マウスを作製し、同マウス腹腔内に HTLV-1 感染ヒト T 細胞株 MT-2 を投与することによって、マウス体内のヒト T 細胞に HTLV-1 を感染させることに成功した。この感染マウスにおいては、感染 T 細胞の異常増殖、肝脾腫および花弁様分核を持ったリンパ球の出現等、ATL に特有の病態が再現された。本共同研究では、ゲノム・エピゲノムの両面から、ATL 様病態の発現過程における遺伝子発現および遺伝子機能の変化を解析することを計画している。 まず、ATL 様病態の発現過程において観察された、Tax 発現 CD25 陰性感染 CD4 陽性 T 細胞クローンから、Tax 陰性 CD25 陽性腫瘍増殖性細胞への転換のメカニズムを解明するために、この転換にどのようなエピゲノム変化を伴うのか解析している。具体的には、両細胞において、DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾の変化をゲノムワイドに調べ、エピゲノムの異常を解析したうえで、遺伝子発現プロファイル解析から得られた情報を結合して、包括的な遺伝子機能の解析につなげる計画である。また、エピジェネティック制御に関与する数十種類の酵素群の発現や動態の変化を、定量 PCR や特異的抗体による免疫染色、ChIP 法などで調べることによって、ATL 様病態の発現過程をエピジェネティック制御機構の破綻という視点からも解析している。さらに、感染 T 細胞に DNA メチル化阻害剤やヒストン翻訳後修飾阻害剤 (5-azaC, trichostatin A, SAHA, DZNep など) を処理することによって、薬剤への感受性を体系的に調べ、エピジェネティック治療薬の適用可能性を検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Sung-il Lee, Jinchun Yao, Yihua Ren and Masakazu Tanaka: Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. Retrovirology 2015, 12(Suppl1): O43 DOI: 10.1186/1742-4690-12-S1-O43 2. Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Yihua Ren, Norihiro Takenouchi and <u>Jun-ichi Fujisawa</u>. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of ATL model mouse. Retrovirology201512(Suppl 1):P11 DOI: 10.1186/1742-4690-12-S1-P11 【学会発表】 1. <u>Jun-ichi Fujisawa</u>, Sung-il Lee, Jinchun Yao, Yihua Ren and Masakazu Tanaka: Tax peptide vaccine suppressed the leukemia in humanized mouse. 17th Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, Trois Ilets, Martinique 18-21 June 2015 2. Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Yihua Ren, Norihiro Takenouchi and <u>Jun-ichi Fujisawa</u>. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of ATL model mouse. 17th Conference on Human Retroviruses: HTLV and Related Viruses, Trois Ilets, Martinique 18-21 June 2015 3. 田中正和、姚錦春、李成一、任翊華、竹之内徳博、藤澤順一. HTLV-1 感染ヒト化マウスにおけるシチジンデアミナーゼ APOBEC3B 遺伝子の活性化. 第 2 回日本 HTLV-1 学会学術集会、東京、2015 年 8 月 21 日～23 日 4. Masakazu Tanaka, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Yihua Ren, Norihiro Takenouchi and <u>Jun-ichi Fujisawa</u>. Induction of APOBEC3B cytidine deaminase gene in HTLV-1 infected T-cells of ATL model mouse. 第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月 8 日～10 日 【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん細胞の上皮・間葉転換におけるヒストンメチル化修飾の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京工業大学・教授・木村宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	エピゲノム異常によって誘導されるがんの発症と悪性化の分子メカニズムを解明するために、がんへの関与が示唆されているヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析する。私たちが開発したヒストンの翻訳後修飾特異的、修飾部位特異的なモノクローナル抗体を用いて、ChIP seq 法などによるエピゲノム解析と、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン翻訳後修飾の動態解析を行う。特に、がんの悪性進展に重要な上皮・間葉転換 (EMT) における新しいエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	遺伝子の発現調節に重要なヒストン H3 のメチル化修飾部位 (4 番目の Lys 残基(K4), および K9, K27, K36, K79) について、メチル化修飾を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を遂行した。また、アセチル化、リン酸化など他の翻訳後修飾とメチル化修飾が共存する状態を認識する抗体の開発も進行した。作製した抗体を用いて、正常細胞とがん細胞、あるいは悪性度の異なるがん細胞を比較しながら、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン修飾の動態を解析した。特に、がんの悪性進展に重要な上皮・間葉転換 (EMT) のプロセスにおいて、ヒストンのメチル化修飾の変化を調べ、その分子機構を解析することを試みた。 A549 肺がん細胞株の TGF-β誘導 EMT をモデル実験系として、EMT 誘導前後の個々の細胞レベルでのヒストン H3 の翻訳後修飾の変化を調べた。その結果、H3K27 のトリメチル化(me3)レベルの著しい上昇を検出することができた。次に、H3K27 メチル化修飾を担う酵素群である PRC2 複合体の細胞内動態 (複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など) の解析に着手した。これまでに、PRC2 複合体の構成要素で K27me3 修飾を認識する EED と、複合体のアクセサリ因子である JARID2 が、EMT 誘導プロセスにおける PRC2 の標的遺伝子へのリクルートとヒストンメチル化の制御に、重要な役割を果たしていることを見いだした。しかし、細胞内で EED や JARID2 を強制発現させただけでは、PRC2 の標的遺伝子へのリクルートや EMT の誘導が起こらないことから、TGF-β刺激によって誘導・活性化される何らかの因子が PRC2 の機能に必要であることが示唆された。今後も、こうした酵素複合体の解析を通じて、EMT におけるエピジェネティック制御の分子基盤を解明していきたい。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Visualizing posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo. Kimura H, Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Sato Y. Histochem Cell Biol. 2015, 144(2):101-9. 2. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Chromosome Res. 2015, 23(4):753-66. 3. Methylation of RNA polymerase II non-consensus Lysine residues marks early transcription in mammalian cells. Dias JD, Rito T, Torlai Triglia E, Kukalev A, Ferrai C, Chotalia M, Brookes E, Kimura H, Pombo A. eLIFE. 2015, 4. pii: e11215. 4. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Sci Rep. 2016, 6:24318 【学会発表】 Tracking posttranslational and epigenetic modifications of endogenous proteins in vivo, Hiroshi Kimura, 24th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus and 57th Symposium of the Society for Histochemistry, Schloss Wilhelminenberg, Vienna, Austria, 2015/8/20 (招待講演) 【その他特筆事項】	

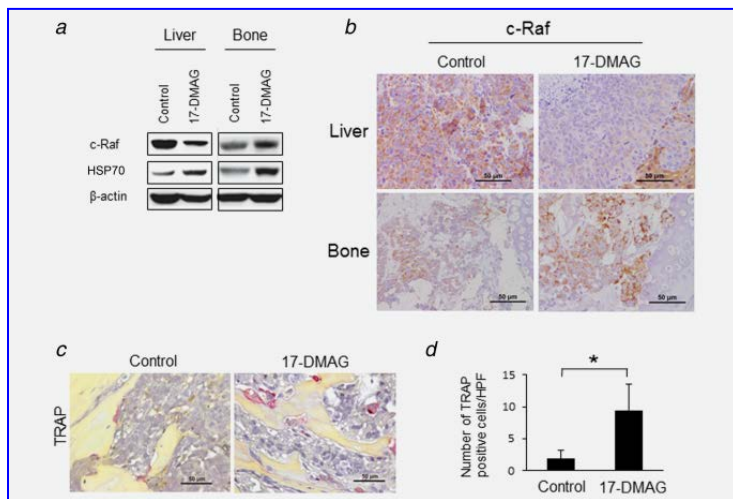
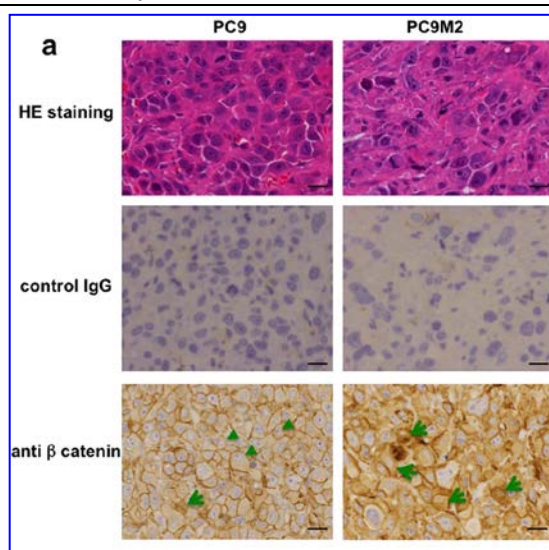
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		乳癌の発症と悪性化に伴うエピゲノム変化の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	早稲田大学・教授・仙波憲太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	遺伝子増幅は、乳癌において特徴的なゲノム変化である。複数の遺伝子が増幅するため、塩基配列情報や変異検出頻度だけから、原因遺伝子を特定することは難しい。私たちは、乳癌組織の遺伝子増幅領域（アンプリコン）からドライバー遺伝子とサポーター遺伝子を体系的に同定する新しいシステムを構築し、様々な遺伝子機能評価系を細胞レベルで確立してきた。本共同研究では、アンプリコン候補遺伝子の過剰発現を特徴とする <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 遺伝子評価系を利用し、遺伝子増幅による乳癌の発症および悪性化の過程をエピゲノム変化の側面から解析することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	私たちは、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 遺伝子評価系を用いて、乳癌組織のアンプリコンから、複数のがん遺伝子候補（<i>ADORA2B</i>, <i>TBX2</i>, <i>RARA</i> など）を同定することに成功した。本共同研究では、これらの遺伝子が発癌を誘発する過程で、どのようなエピゲノム変化を誘導するのかを解析する計画である。具体的には、がん遺伝子を導入する前後の細胞において、DNA メチル化アレイやヒストン修飾抗体による ChIP seq 法などを用いて、DNA メチル化とヒストン翻訳後修飾の変化をゲノムワイドに調べ、エピゲノムの異常を解析する。また、がん遺伝子を導入した乳癌モデルマウスから生じた乳癌についてもエピゲノム変化の情報を収集して、比較解析を行う。さらに、エピジェネティック制御に関与する数十種類の酵素群（DNA メチル化・脱メチル化酵素、ヒストンメチル化・脱メチル化酵素など）の発現や動態の変化を、定量 PCR や特異的抗体による免疫染色、ChIP 法で解析することで、乳癌の発症と悪性進展をエピジェネティック制御機構の破綻という視点から明らかにしたいと考えた。 これまでの実験から、エピジェネティック制御に関与する数十種類の酵素群のうち、悪性度の高い乳癌として知られるトリプルネガティブ型乳癌で顕著に発現が変化する酵素や、低酸素刺激後の乳癌細胞株において発現変化が誘導される酵素を複数同定することに成功した。これらの酵素のうち、DOT1L ヒストンメチル化酵素は、乳癌細胞株において、強制発現やノックダウンによって発現を変化させると、癌幹細胞様の性質を有するスフィアの形成能と癌細胞の運動能に影響を与えることを見いだした。こうした結果をふまえて、乳癌の悪性進展過程におけるエピジェネティック制御酵素の役割と分子レベルでの作用機序について、さらに詳細な解析を進行している。	
【成果等】	【主な論文発表】*: corresponding author Matsui, A., Fujimoto, J., Ishikawa, K., Ito, E., Goshima, N., Watanabe, S., and Semba, K*. (2016). Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition. FEBS Lett., in press. Ezawa, I., Sawai, Y., Kawase, T., Okabe, A., Tsutsumi, S., Ichikawa, H., Kobayashi, Y., Tashiro, F., Namiki, H., Kondo, T., Semba, K., Aburatani, H., Taya, Y., Nakagama, H., and Ohki, R. (2016). A novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. Cancer Sci., in press. Asano, Y., Kawase, T., Okabe, A., Tsutsumi, S., Ichikawa, H., Tatebe, S., Kitabayashi, I., Tashiro, F., Namiki, H., Kondo, T., Semba, K., Aburatani, H., Taya, Y., Nakagama, H., and Ohki, R. (2016). IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis. Scientific reports 6, 19174. Yamauchi, H., Matsumaru, T., Morita, T., Ishikawa, S., Maenaka, K., Takigawa, I., Semba, K., Kon, S., and Fujita, Y. (2015). The cell competition-based high-throughput screening identifies small compounds that promote the elimination of RasV12-transformed cells from epithelia. Scientific reports 5, 15336. Ito-Kureha, T., Koshikawa, N., Yamamoto, M., Semba, K., Yamaguchi, N., Yamamoto, T., Seiki, M.,	

	and Inoue, J. (2015). Tropomodulin 1 expression driven by NF-kappaB enhances breast cancer growth. <i>Cancer Res</i> 75, 62-72. Doi, A., Ishikawa, K., Shibata, N., Ito, E., Fujimoto, J., Yamamoto, M., Shiga, H., Mochizuki, H., Kawamura, Y., Goshima, N., Semba, K*, and Watanabe, S. (2015). Enhanced expression of retinoic acid receptor alpha (RARA) induces epithelial-to-mesenchymal transition and disruption of mammary acinar structures. <i>Molecular oncology</i> 9, 355-364.
	【学会発表】 1. Matsui, A., Fujimoto, J., Ito, E., Watanabe, S., Semba, K. Identification and Functional Analysis of HNF1B as a Novel Oncogene by systematic screening using epithelial cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(Nagoya, Nagoya Congress Center), 10. 10. 2015 2. Fujimoto, J., Ito, E., Watanabe, S., Semba, K. Identification of TMPRSS4 transmembrane protease gene as an ERBB2-dependent oncogene. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(Nagoya, Nagoya Congress Center), 10. 8. 2015 3. 公地将大, 藤元次郎, 仙波憲太郎 : 「17q23 アンプリコンにおける新規トランスフォーミング遺伝子 TBX2 の機能解析」 第 19 回日本がん分子標的治療学会(松山、松山全日空ホテル)、2015 年 6 月 11 日
	【その他特筆事項】

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		分子標的薬耐性を克服する治療の安全性に関する遺伝子プロファイリング
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科探索病理・特任教授・西原広史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科探索病理・特任助教・王磊
	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理・研究員・毛利普美
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍内科研究分野・矢野聖二
【研究目的】	がん治療の現場において、分子標的治療薬の薬剤耐性並びに副作用の克服は重要かつ喫緊の課題となっている。我々はこれまでに樹立した Afatinib, Gefitinib 及び Crizotinib 併用による副作用出現を検証するマウスモデルを用いて、副作用の出現予測及びその予防に関する遺伝子レベルの変化の探索を行うことで、治療抵抗性の腫瘍に対する革新的治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	① EGFR 阻害剤に対する薬剤耐性機序は既にいくつか報告されており、特に AKT を介した機序が重要であると考えられている。今回この共同研究を通して我々は、その AKT を介した薬剤耐性機序には、β カテニンが関与していることを見出した。具体的には右上図にあるように、EGFR-TKI 薬剤耐性を獲得した PC9M2 細胞と、感受性細胞の PC9 を用いた皮下 Xenograft を比較した結果、PC9M2 の方が β カテニンの核/細胞質内への移行が高度に認められ、β カテニン経路が活性化されていることが認められた。実際、β カテニンのノックダウンあるいは阻害剤投与によって、EGFR-TKI の感受性が回復することも証明された。(発表論文①) ② 小細胞肺癌は肺癌全体の 15% を占め、化学療法に対して感受性が高い腫瘍であるが、一方でその再発や遠隔転移のコントロールが困難な腫瘍である。そこで我々は、この共同研究の方法論を用いて、化学療法感受性に関与する因子の同定を行った。その結果、右下図に示すように、HSP90 阻害剤である 17-DMAG によって骨転移を有効に抑制することができ、またこの現象には c-Raf が関与していることを見出した。 ③ 考察： 以上、本共同研究によって肺癌の薬剤耐性・化学療法感受性に関与する遺伝子の候補を同定することができ、革新的治療法探索に向けて重要な結果を得ることができた。	
【成果等】	【主な論文発表】 ① Elevated β-catenin pathway as a novel target for patients with resistance to EGF receptor targeting drugs. Sci Rep. 2015 Aug 13;5:13076. ② Organ-specific efficacy of HSP90 inhibitor in multiple-organ metastasis model of chemorefractory small cell lung cancer. Int J Cancer. 2016 Mar 1;138(5):1281-9. 【学会発表】 【その他特筆事項】 現在、これらの結果を元に、網羅的遺伝子プロファイリング研究の準備中である。	



研究区分		一般共同研究
研究課題		肺がん細胞の EGFR 阻害剤に対する耐性機構における RSK-EphA2 シグナルの果たす役割
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井宏明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	腫瘍内でのチロシンキナーゼ型受容体 EphA2 のリガンド非依存的な活性化は、肺がん患者などの予後と関連することが示されている。我々はすでに、EphA2 の Ser-897 が、ERK の下流に位置するプロテインキナーゼ RSK により直接リン酸化されることを明らかにしており、EphA2 リン酸化と RSK 活性化の両方が起こっている肺がん患者の予後が極めて悪いことも明らかにしている。そこで、本研究では、EGFR 活性化変異の持つ肺がん組織における RSK-EphA2 シグナルの活性化を調べるとともに、EGFR 阻害剤耐性細胞における同シグナルの果たす役割を解析した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1. EGFR 活性化変異を持つ非小細胞肺がんにおける RSK-EphA2 経路の活性化 EGFR、ALK および KRAS に活性化変異を持つ肺がん細胞株 (PC-9、HCC827、HCC4006、NCI-H1650、H2228、A549) における EphA2 の活性化について検討した。その結果、すべての細胞で恒常的な RSK のリン酸化と EphA2 の Ser-897 のリン酸化が認められた。また、EGFR 活性化変異を持つ細胞では、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 gefitinib が、また ALK 変異細胞では ALK チロシンキナーゼ阻害剤 crizotinib が RSK および EphA2 のリン酸化を顕著に抑制した。さらに、KRAS 変異を持つ細胞も含めて、すべての肺がん細胞における EphA2 リン酸化が RSK 阻害剤 BI-D1870 によって抑制された。したがって、肺がん細胞において各オンコジーンシグナルが RSK-EphA2 経路を活性化していることがわかった。次に、EGFR 活性化変異を持つ肺がん患者の腫瘍組織を免疫組織化学染色したところ、リン酸化 RSK とリン酸化 EphA2 の局在がほぼ完全に一致したことから、腫瘍内でも RSK-EphA2 シグナルが活性化していると考えられた (図 1 参照)。	
	2. EGFR 阻害剤耐性肺がん細胞における RSK-EphA2 経路の活性化 PC-9 細胞に EGFR 阻害剤 afatinib を処理して樹立した獲得耐性細胞を用いて検討を行った (Azuma et al. Oncotarget, 2014)。この細胞は、EGFR の代わりに FGFR1 によるバイパス経路が活性化されていることがわかっている。そこで、親株と耐性株を用いて、RSK-EphA2 経路の活性化について比較検討した。その結果、耐性株では EphA2 の発現が顕著に更新していることがわかった。また、親株および耐性株ともに RSK-EphA2 経路の恒常的な活性化が起こっていることが確認されたが、それぞれ EGFR および FGFR からのシグナルがこの経路の活性化を誘導していることがわかった。さらに、耐性株は遊走能が亢進しているが、これは FGFR 阻害剤および RSK 阻害剤によって抑制された。したがって、EGFR 阻害剤耐性細胞においては、FGFR1 からのバイパスシグナルが EphA2 の発現および RSK によるリン酸化を制御していることがわかった。 以上の検討より、RSK-EphA2 経路は肺がん治療の新たな分子標的となる可能性が考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】 Zhou Y., Yamada N., Tanaka T., Hori T., Yokoyama S., Hayakawa Y., <u>Yano S.</u>, Fukuoka J., Koizumi K., Saiki I., and <u>Sakurai H.</u>: Crucial roles of RSK in cell motility by catalysing serine phosphorylation of EphA2. Nat. Commun. 6: 7679, 2015.	
	【学会発表】 櫻井宏明. チロシンキナーゼ型受容体の非定型的活性化: がん病態制御の次なる標的. シンポジウム「がん分子標的治療の発展に貢献する薬学基礎研究～より有効な分子標的治療戦略のために～. 日本薬学会第 136 年会; 2016 Mar 26-29; 横浜.	
	【その他特筆事項】 本共同研究の成果として発表した上記論文が、北日本新聞などに掲載された。	

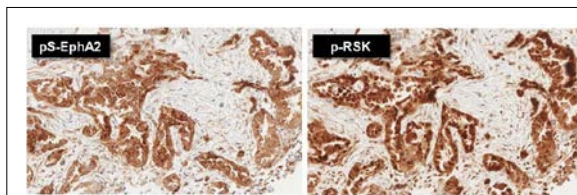


図 1. ヒト肺がん組織における RSK と EphA2 のリン酸化

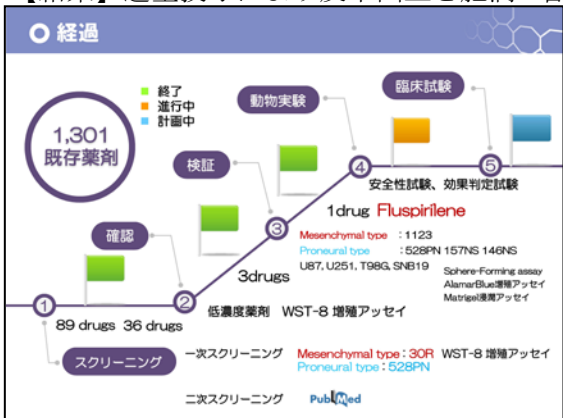
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		融合遺伝子陽性肺がんにおける Bim 多型と分子標的薬感受性の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会 がん化学療法センター 基礎研究部・主任研究員・片山 量平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	本研究では、肺腺がんのなかで特に ALK, ROS1, RET といった融合遺伝子陽性肺がんを中心に、分子標的治療薬の感受性とアポトーシス促進因子 Bim 機能喪失型遺伝子多型の関係を明らかにし、分子標的薬による細胞死誘導の分子基盤の解明、更にはより効果的な治療法の発見へとつながる成果を得ることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	近年、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) をはじめとする分子標的薬の登場により、肺がんの薬物療法は大きな変化を遂げている。EGFR 活性型変異を有する患者には EGFR-TKI が、ALK 融合遺伝子を有する肺がんには、ALK-TKI が著明な腫瘍縮小効果を示すが、いずれにおいても約 1 年～数年以内に不応となり耐性化すること (獲得耐性) が臨床上問題となっている。また一方で、ごく一部の患者においては初めからそれほど十分な治療効果が見られない初期耐性があることが知られている。近年、EGFR 変異陽性肺がんにおける初期耐性のメカニズムの 1 つとして、Bim と呼ばれるアポトーシス促進因子に、アジア人特有の機能喪失型遺伝子多型 (人口の約 13% に存在) が発見されており、Bim 多型があると EGFR-TKI による細胞死誘導が抑制されるのに対し、HDAC 阻害薬の併用により EGFR-TKI の阻害効果が改善することが、矢野教授らのグループにより報告されている (Nakagawa et al, Cancer Res.)。機能喪失型の Bim 多型ではイントロン部位の大きな欠失により Bim の機能ドメインをコードするエクソンがスキップされる割合が上昇し、アポトーシス実行に必須な Bim の量が低下することで TKI による細胞死誘導が阻害されると考えられている。現在のところ、矢野教授を中心としたグループにより Bim 多型を有する EGFR 変異陽性肺がん患者に対する HDAC 阻害剤併用療法の臨床試験が進められており大きな期待が寄せられている。我々は、本研究において、ALK や ROS1, RET などの融合遺伝子陽性肺がんにおいても、Bim 多型が分子標的治療薬の効果に影響するかどうかを明らかにするために、これまで我々が収集、解析してきた肺がん臨床検体由来の材料の中でも特に融合遺伝子陽性症例を用いて、分子標的薬感受性と Bim 多型の関係を明らかにしようとした。(公財) がん研究会の倫理審査委員会で承認されたプロトコールに基づき、同意を得られた患者由来の胸水等の残余検体から凍結組織の保存ならびに培養細胞株を樹立するとともに Bim の遺伝子多型を検索した。その結果、一部の症例で Bim の遺伝子多型を有する症例を見出し、樹立できた細胞株を用いて薬剤感受性の解析を行ったが、Bim 多型を有しない細胞に比べて TKI に感受性が悪いといったことは見られなかった。さらに、HDAC 阻害剤との併用も行ったが、併用による感受性化は確認されなかった。融合遺伝子陽性肺がん症例は頻度が非常に稀であるため、複数の Bim 多型 (ヘテロ欠失型) を有する細胞株は 1 つしか樹立できなかった。また、Bim 多型を有する症例が少なく、臨床上の奏功期間等に関しても、PFS の長さといったことを統計的に評価することはできなかった。本研究において非常に貴重な Bim 多型を有する培養株の樹立と解析に成功したが、Bim 多型と分子標的薬感受性の関係を明らかににはできなかった。Bim のカウンターパートである Mcl-1 等の量も勘案した解析が今後必要と考えられる。また、Bim 多型を有する検体の耐性細胞 (Crizotinib 耐性時の胸水から樹立) の耐性機構については種々解析を行ったがまだはっきりとしたメカニズム同定に至らなかった。	
【成果等】	【主な論文発表】	該当ありません
	【学会発表】	該当ありません
	【その他特筆事項】	本共同研究に採択頂き、非常に有意義な研究を進めることができました。この場をお借りして感謝申し上げます。

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		肺がん・中皮腫における血管新生阻害薬耐性機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・西岡安彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・埴淵昌毅
	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・後東久嗣
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	申請者は、胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma: MPM)の分子病態に基づく新規治療法の開発を目的に臨床を反映するヒト MPM の同所移植モデルを確立し、腫瘍血管新生に中心的な役割を担う VEGF に焦点を当て、分子標的治療の基礎検討を進めてきた。これまでの検討から本モデルにおける抗 VEGF 抗体 (ベバシズマブ) 耐性現象を確認し、その耐性には線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) 2 が重要であること、また FGF2 は宿主側の骨髄由来である線維細胞 (fibrocyte) から産生されることを見出している。本研究では、ベバシズマブ耐性腫瘍内の fibrocyte の特徴をコントロール腫瘍と比較検討し、さらにベバシズマブ以外の VEGF 阻害剤でも同様の現象が認められるか否かについて検討した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでのベバシズマブ耐性腫瘍 (Y-MESO-14) における免疫組織染色法による検討から、ベバシズマブ耐性腫瘍内には宿主側 FGF2 が代替因子として増加しており、FGF2 産生細胞として collagen type I⁺/CXCR4⁺細胞 (fibrocyte) が同定され、ベバシズマブ耐性腫瘍ではコントロール腫瘍と比較して有意に fibrocyte 数が増加していた。また、これらの細胞が fibrocyte であることは、fibrocyte の分離培養方法やフローサイトメトリー法でも確認し、同様の結果を得た。さらに、腫瘍内に集積した fibrocyte が骨髄由来であることを確認するため、GFP 陽性骨髄細胞を移植した GFP キメラマウスを作成し、これまで同様に Y-MESO-14 細胞をキメラマウスに同所移植後、ベバシズマブ治療実験を行った。結果、ベバシズマブ耐性腫瘍ではコントロール腫瘍と比較して腫瘍組織内の GFP 陽性細胞数が有意に増加しており、さらにこれらの細胞が FGF2 を発現していることも確認した。これらの結果から、腫瘍のベバシズマブ耐性化には宿主から産生される FGF2 が重要であり、その産生細胞としての fibrocyte の重要性が確認された。 腫瘍内に浸潤した fibrocyte の特徴をマーカー発現の観点からベバシズマブ耐性腫瘍とコントロール腫瘍を比較したところ、CXCR4 や collagen type I などの fibrocyte マーカー発現レベルは両群間で同等であったため、ベバシズマブ耐性には腫瘍内に浸潤する fibrocyte の数が重要であることが判明した。 また、上記の現象がベバシズマブ以外の VEGF 阻害剤でも共通に認められる現象であることを確認するため、小分子化合物である SU5416 を用いて同様の実験を行った。C57BL/6 マウスとマウス B16 メラノーマ細胞を用いた皮下腫瘍モデルにおいても同様の結果が得られた。また、本モデルは syngeneic model であるため、腫瘍内のリンパ球についても検討したが、CD3⁺あるいは CD19⁺細胞の SU5416 耐性への関与は認められなかった。 さらにこれらの現象が実際のヒト悪性腫瘍で生じていることを確認するため、ベバシズマブ投与後に切除されたヒト肺がん組織検体を用いて、腫瘍内 fibrocyte を免疫組織学的に検出した。比較対象として、ベバシズマブを含まない化学療法施行後に摘出された検体と、手術のみが施行された検体も同時に検討した。結果、ベバシズマブを含む化学療法後に切除された検体では、他の群と比較して有意に fibrocyte 数および FGF2 産生細胞数が増加していた。さらに興味深いことに、腫瘍内 fibrocyte 数と術前ベバシズマブ投与サイクル数および腫瘍内血管長に正の相関を認めた。以上の結果より、fibrocyte は抗 VEGF 治療耐性のバイオマーカーとして有用であることが示唆され、下記のごとく誌上発表した。 現在、fibrocyte がより実用的なバイオマーカーになり得るか否かを検討するため、肺がん患者のベバシズマブ投与前後の末梢血より fibrocyte を分離培養し、その数を比較検討中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Mitsuhashi A, Goto H, Saijo A, Trung VT, Aono Y, Ogino H, Kuramoto T, Tabata S, Uehara H, Izumi K, Yoshida M, Kobayashi H, Takahashi H, Gotoh M, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Yano S, Yokomise H, Sakiyama S, Nishioka Y. Fibrocyte-like cells mediate acquired resistance to anti-angiogenic therapy with bevacizumab. <i>Nat Commun</i>. 2015 Dec 4;6:8792. doi: 10.1038/ncomms9792. 【学会発表】 Nishioka Y. What is a Role of Fibrocytes in Lung Fibrosis and Cancer? ATS 2015 International Conference (Invited lecture). Denver, CO. 2015 年 5 月 19 日. Goto H, Nishioka Y. The role of fibrocytes in the resistance to anti-angiogenic therapy in malignant pleural mesothelioma and lung cancer. International Conference of Cancer Immunotherapy and Macrophages 2015. 東京. 2015 年 7 月 9 日. 【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究	
研究課題	既存薬剤を使用したグリオーマ幹細胞制御の試み	
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・教授・中田光俊
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・董 宇
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・北林朋宏
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	悪性グリオーマは脳原発悪性腫瘍である。ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の特質を踏まえた時、手術で全部摘出することは不可能である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法の確立が急務である。 本研究は悪性グリオーマ発生の根幹をなすグリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する薬剤をドラッグリポジショニングの手法によりがん進展制御研究所が所有する約 1,300 種類の既存医薬品の中から探索し悪性グリオーマに対する安全で効果的な化学療法を確立することを目的とする。 申請者らは平成 25 年より本プロジェクトに着手し、これまでの研究から複数の候補薬剤の抽出に成功している。これを受けて本年度は候補薬剤のマウス膠芽腫モデルにおける治療効果を判定する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【研究内容のまとめ】研究プロジェクト全体の概要は、グリオーマ幹細胞に対する効果的な既存薬剤の同定から、独自の動物モデルを使用した簡便な前臨床試験を行った後の特許出願およびヒトへの応用(第Ⅰ相臨床試験)の立案・遂行である。初期の薬剤スクリーニングにより 3 種類の候補薬剤を同定し、そのうち有望な一剤を使用しマウス悪性グリオーマモデルに対する治療実験を行った。また、新規性の高い薬剤については金沢大学 TLO のサポートにより特許出願を果たした(特願 2015-095019)。 【方法】マウスを使用した候補薬剤の安全性試験を行い、過量投与となる閾値と副作用を確認した。グリオーマ幹細胞株のマウス脳内移植による悪性グリオーマモデルに対して候補薬剤の経口投与を行った。 【結果】過量投与により皮下出血と肥満の副作用を認めた。グリオーマ幹細胞株(3×10⁴個)の脳内移植 3 日後に候補薬剤の内服投与を開始した。許容投与量である 20μg/mouse を投与した。45 日目に脳を摘出し腫瘍を観察した。薬剤の溶媒のみを投与したコントロール群では反対側脳に及ぶ大きな浸潤性腫瘍が形成されていたが、薬剤投与群では限局性の腫瘍を見出すのみであった。 【成果】既存医薬品の中から有望な抗グリオーマ幹細胞薬を抽出し、動物実験での有効性を確認した。早期に臨床試験を計画し、膠芽腫に対する新規化学療法を確立したいと考えている。 	
【成果等】	【主な論文発表】なし 【学会発表】 - 中田光俊 脳腫瘍学におけるドラッグリポジショニング(特別講演) 第 10 回脳腫瘍の基礎シンポジウム, 平成 27 年 4 月 25 日, 東京 - 中田光俊 既存薬剤を使用した悪性グリオーマの新たな治療戦略(特別講演) 脳腫瘍治療セミナー, 平成 27 年 6 月 5 日, 東京 - 董宇, 北林朋宏, 古田拓也, 平尾敦, 中田光俊 Existing approved drug with anti-glioma effect and drug safety test in vivo 第 16 回日本分子脳神経外科学会, 平成 27 年 8 月 28 日-29 日, アクトシティ浜松、浜松 - 中田光俊, 董宇, 北林朋宏, 淑瑠へムラサビト, 古田拓也, 平尾敦 グリオーマ幹細胞を標的とした新規化学療法の開発(シンポジウム) 第 74 回日本脳神経外科学会総会, 平成 27 年 10 月 14 日-16 日, 札幌 【その他特筆事項】 特許 平成 27 年 5 月 7 日出願 特願 2015-095019 中田光俊、平尾敦：脳腫瘍治療組成物	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ERCC1 高発現・シスプラチン耐性がんに対する治療戦略
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授・松永 司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教・若杉光生
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	DNA 傷害性抗がん剤による治療において、がん細胞の DNA 修復反応を特異的に抑制できれば奏功性の向上が期待できる。最近我々は、ヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 反応を阻害する低分子化合物 A6 を化合物ライブラリーから見つけ、NER 必須因子の一つである ERCC1 の分解誘導が原因であること、シスプラチンとの併用によりがん細胞の致死効果を増強することを見出した。本研究では、昨年度に引き続き、この NER 阻害化合物の ERCC1 分解誘導メカニズムを詳細に明らかにし、ERCC1 の高発現を起因とするシスプラチン耐性がんの治療へ応用するための基礎データを得ることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	① ERCC1 の分解誘導メカニズムの解明 昨年度の共同研究において、がん進展研究所のキナーゼ阻害剤ライブラリーから、A6 の NER 阻害活性を抑制する可能性のある化合物を 1 種類見出した。今年度は、まずスクリーニングで使用したセルベースドアッセイ (M-CINUP) より精度の高い ELISA でこの現象を確認後、この化合物は複数のキナーゼを阻害するため、特異性の異なる類縁阻害剤を利用して絞り込みを行った。一方、この化合物は A6 による ERCC1 分解を抑制するか調べたところ、顕著な抑制は観察されず、別のメカニズムで NER 反応をモジュレートする可能性も考えられた。 ② シスプラチンと ERCC1 分解誘導剤との併用効果の検討 LDH アッセイを用いて、シスプラチン以外の抗がん剤と A6 との併用効果を検討し、DNA 傷害性の抗がん剤のほか、PARP1 阻害剤・オラパリブとも顕著な併用効果が認められた。一方、マウスがん移植系を用いて、A6 がシスプラチンの抗腫瘍作用を有意に増強することを再現的に示した。 ③ 幹細胞への影響を検討するための関連技術の習得 骨髓から造血幹細胞および造血前駆細胞を分離する技術を習得し、紫外線照射後の DNA 損傷応答反応を比較解析する実験系を確立した。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 ・Nishinaga, M., Miyazaki, K., Takamori, C., Ohzawa, T., Wakasugi, M., Saito, T., Osada, H. and Matsunaga, T. A small molecule inhibitor of nucleotide excision repair from chemical library screening using a newly developed cell-based immunoassay, The 15th International Congress of Radiation Research, 2015.5.25-29, Kyoto, Japan. ・松永 司、長田裕之、遠藤良夫：ヌクレオチド除去修復を阻害する低分子化合物のがん化学療法増強剤としての可能性、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成 27 年 6 月 10 - 12 日、松山。 ・福島直紀、上田将信、高森千枝、大澤琢郎、若杉光生、松永 司：最近同定された 2 種類のヌクレオチド除去修復阻害物質の比較検討、日本薬学会北陸支部第 127 回例会、平成 27 年 11 月 15 日、富山。 ・中家裕美子、和田奈巳、西村陽平、若杉光生、猪部 学、遠藤良夫、松永 司：ヌクレオチド除去修復因子 ERCC1 を分解誘導する新規化合物の抗がん剤作用増強効果、日本薬学会北陸支部第 127 回例会、平成 27 年 11 月 15 日、富山。	
	【その他特筆事項】 特許取得： 第 5817054 号（登録日：2015 年 10 月 9 日、発行日 2015 年 11 月 18 日） 名称：DNA 損傷修復能力の簡便・迅速な検査方法 発明者：松永 司、西山千晶 出願者：国立大学法人金沢大学	

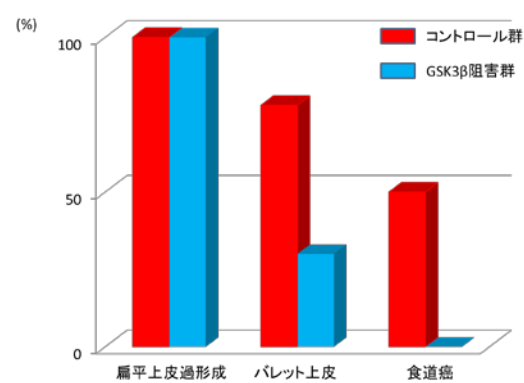
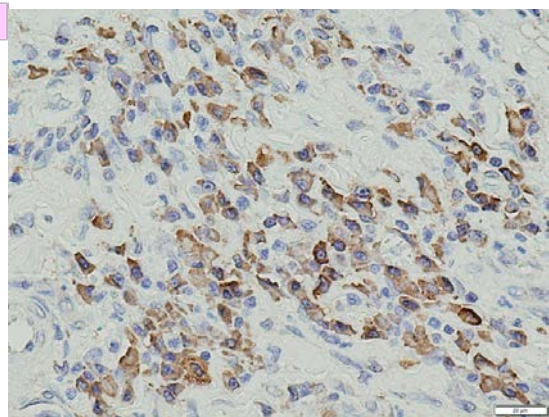
平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		炎症性ケモカイン発現を誘導する腸内細菌叢の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・飯田宗穂
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・北村和哉
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	本研究では、炎症性腸疾患患者に存在する腸内細菌叢が、炎症性サイトカイン・ケモカインを介して腸管炎症を増悪させるメカニズムを解明することを目的とする。そして、炎症性サイトカイン・ケモカイン発現を増強する特定の腸内細菌を同定するステップとなる研究と位置付ける。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	炎症性腸疾患患者 17 例（潰瘍性大腸炎 15 例、クローン病 2 例）、健常者 11 例の便を C57BL/6 背景の IL10 欠損マウスに移植し、体重と腸炎の発症を観察した。4 週目で炎症性腸疾患群では健常者群に比して有意に体重減少がみられた ($P < 0.05$)。大腸の炎症病理スコアでは炎症性腸疾患群で有意に高く、健常者群で低かった ($P < 0.05$)。直腸の粘膜から RNA を抽出し、mRNA 発現をリアルタイム PCR にて検討した。TMF、CCL2 には 2 群間の差を認めなかったが、IL-1 β において炎症性腸疾患群で有意に発現が高かった ($P < 0.05$)。炎症性腸疾患群においてもマウスに体重減少を起こさない患者便も存在し、患者の含む腸内細菌叢によって炎症惹起性が異なると考えられた。現在それぞれの便から DNA 抽出を終え、シーケンシングを行う準備段階である。	
【成果等】	【主な論文発表】 該当なし	
	【学会発表】 飯田 宗穂 炎症性腸疾患における炎症制御細菌の探索 第 9 回日本ゲノム微生物学会 2015 年（ポスター）	
	【その他特筆事項】	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		大腸癌進行に関与する核膜孔複合体蛋白の同定および機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学新学術創成研究機構・教授・Richard Wong
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学新学術創成研究機構・助教・羽澤 勝治
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・助教・堂本 貴寛
	所属・職名・氏名	金沢大学自然システム学系・博士研究員・小林 亜紀子
	所属・職名・氏名	金沢大学自然システム学系・大学院生・Firli Dewi
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	Colon cancer (CC) is the third most common cancer worldwide, resulting in over 600,000 deaths per year. In the US alone, CC is predicted to exceed 17 billion US dollars in medical care costs by the year 2020. Captivatingly, a recent report in <i>Cell</i> reproduced our nuclear pore complex (NPC)-Nup358/RanBP2 mitotic cell death data. They also proposed the undistinguishable Nup358/RanBP2 mitotic cell death model from BRAF mutation CC patient's data (Hashizume et al. 2013 <i>CDD</i> ; Vecchione et al. 2016 <i>Cell</i>). The objective of this collaborative research project is to determine how NPC regulating oncogenes trafficking in CC and their roles in CC cell cycle. We will further elucidate our unique NPC mitotic cell death model in colorectal cancer patient's samples from the support by Prof. Minamoto's group in Cancer Research Institute.	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1) Nucleoporins (Nups) gene expression profiles in colorectal cancer patients Nups has been validated by qRT-PCR of colorectal cancer patient's normal and tumor tissues. We also performed qRT-PCR on selected target genes, or further characterized the impaired cellular pathways. In addition, the functional relevance of these candidates has been characterized by assessing the effect of their RNAi-based depletion or overexpression in several CC cell lines (HCT116, SW480, SW620). 2) Expression and localization of the nuclear pore proteins in colorectal tumors have been investigated immunohistochemically. We performed immunostaining for 20 CRC patient's paraffin specimens. Each of their colorectal carcinoma, adenoma, polyp, and their normal counterpart mucosal tissues has been stained with specific Nups antibodies to compare the expression and localization of them between normal and tumor tissues from the same patients. 3) Investigate Nups gene and co-expression profiles in multiple cohorts We are surrogating the public data base to examine Nups and genes associated with GSK-3beta pathway in colorectal cancers before submission.	
【成果等】	【主な論文発表】 1 Dewi F, Domoto T, Hazawa M, Kobayashi A, Minamoto T, Wong RW (2016) 投稿準備中。 2 Wong RW & D' Angelo (2016) Nucleoporins, Mitosis, and Colon Cancer (2016) <i>Cell Chem. Biol.</i> in press 3 Wong RW (2015) Nuclear Pore Complex: From structural view to chemical tools. <i>Cell Chem. Biol.</i> 22(10):1285-1287. 4 Kobayashi A, Hashizume C, Dowaki T and Wong RW (2015) Therapeutic potential of mitotic interaction between the nucleoporin Tpr and Aurora kinase A. <i>Cell Cycle</i> 14(9):1447-58.	
	【学会発表】 なし。	
	【その他特筆事項】 なし。	

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究												
研究課題		GSK3 β 阻害による食道発癌の予防とその機序の解明												
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・肝胆膵移植外科・助教・宮下知治												
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・がん局所制御学・教授・太田哲生												
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬学総合研究科・がん局所制御学・大学院生・松井大輔												
	所属・職名・氏名													
	所属・職名・氏名													
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成												
【研究目的】	近年、食生活の欧米化に伴い本邦でも大腸癌や乳癌とともにバレット食道（前癌病変）や食道（バレット）腺癌の発生が増加している。当教室が開発したラット食道発癌モデルは発癌剤を投与せずに十二指腸液あるいは胃液との混合液を食道に逆流させる手術を行うと、約 40 週後に食道腺癌が発生する画期的なモデルである。また、このモデルで発生する腫瘍はヒトの食道腺癌と非常に類似した遺伝子変化が認められることも報告されている。一方、GSK3β の発現や活性の亢進が大腸癌の増殖に関与していることが注目されていることから、食道の扁平上皮癌よりはむしろ食道腺癌の発生過程に関与していることがおおいに予想される。そこで本研究では、この食道発癌に対する GSK3β 阻害による化学予防の可能性を基礎と臨床の両面から解析、評価するために共同実験を行うこととした。													
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	最終年度である本年度の研究では、逆流手術を行い術後 40 週を経過した全てのラットを屠殺し、対照群 (DMSO のみ投与) と治療群 (GSK3β 阻害剤の AR-A014418 (2mg/kg 体重) を投与) の両群での食道標本を作製した。40 週まで耐術した動物数は対照群 14 匹、治療群 10 匹であった。屠殺した固体の観察により、対照群では 7/14 (50%) に食道癌が認められたが、治療群では発癌は認められず、治療群では有意に発癌を抑制していた。バレット上皮も対照群では 11/14 (78%) に対し、治療群では 3/10 (30%) と治療群では有意に低率であった。一方、扁平上皮過形成は両群とも全例に認められた (図 1)。以上の結果より、GSK3β 阻害は食道の慢性炎症に伴う食道腺がん発生を抑制する可能性が示唆される。 病理組織学的所見 (GSK3β 阻害群 vs. コントロール群)  <table border="1"> <caption>図 1: 食道病変の発現率 (%)</caption> <thead> <tr> <th>病変</th> <th>コントロール群 (%)</th> <th>GSK3β 阻害群 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>扁平上皮過形成</td> <td>100</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>バレット上皮</td> <td>78</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>食道癌</td> <td>50</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>  図 1 またこの発癌を抑制できた機序に関し、我々は腫瘍微小環境の改変に注目している。対照群では CD163 陽性 M2 様マクロファージが浸潤しており、微小環境が免疫抑制性に傾き、発癌しやすい環境となっていることが考えられる (図 2)。GSK3β 阻害群における免疫抑制性細胞群の浸潤程度およびその分布などを検証し、発癌に対する GSK3β 阻害の作用機序についても今後検討する予定である。 図 2		病変	コントロール群 (%)	GSK3 β 阻害群 (%)	扁平上皮過形成	100	100	バレット上皮	78	30	食道癌	50	0
病変	コントロール群 (%)	GSK3 β 阻害群 (%)												
扁平上皮過形成	100	100												
バレット上皮	78	30												
食道癌	50	0												
【成果等】	【主な論文発表】 Miyashita T, et al. Impact of inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence and inflammatory microenvironment in esophageal carcinogenesis using surgical rat models. Ann Surg Oncol 21: 2012-2019, 2014. 【学会発表】 Miyashita T, et al. Impact of inflammation-metaplasia-adenocarcinoma sequence and inflammatory microenvironment in esophageal carcinogenesis using surgical rat models. Society of Surgical Oncology Cancer Symposium, 67th Annual 2014. 2014.03.12~03.15. Phoenix, Arizona, (USA). 【その他特筆事項】													

平成 27 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		軟部肉腫の GSK-3 β を標的とする新規治療法の開発と分子メカニズム
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健学総合研究科・特任教授・山本憲男
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	がん医科学専攻 機能再建学 大学院生 阿部健作
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	源利成 教授
【研究目的】	近年、他のがん種では分子標的治療の開発が進み、臨床でも治療効果を発揮している。<u>整形外科領域では、軟部肉腫に対して血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)、幹細胞因子受容体(c-kit)を標的とするパゾパニブ(製品名：ヴォトリエント)が保険承認、市販されたが、高血圧や皮膚障害などの副作用が比較的多く出現し、投薬継続を困難にしている。</u>このように、<u>軟部肉腫に対する分子標的治療として、他のメカニズムについても考察する必要があるが、希少疾患であるがゆえに製薬企業を始めとする治療薬開発からも遅れをとっている。</u> このような背景から我々は、これまで軟部肉腫では未発達である分子標的治療に着目し、臨床応用へ向けて研究を行っている。本治療法は各種の消化器がんや膠芽腫と同様に、骨軟部肉腫に対する治療効果はもとより、有害作用が少ないことが予想される。同研究分野の成果に基づく膠芽腫や膀胱癌治療の医師主導型臨床研究(UMIN 000005111; 000005095)で使用されている GSK3β 阻害薬は、リチウムやシメチジンといった双極性障害や胃潰瘍など、他の疾患で使用されその安全性が十分に確立されている治療薬であり、この適用は drug repositioning の範疇に属する。このように、<u>すでに保険診療で処方されている薬剤であれば、厳格な安全性試験は必要とされず、早期臨床応用が可能であると考えられる。</u> 本研究は、現在の化学療法に変わる新しい治療法となる可能性を秘めており、一刻も早い確立を目指していく。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	使用する細胞株は、ヒト滑膜肉腫細胞株(SY0-1, HS-SY-2, SW982)、ヒト線維肉腫細胞株(HT-1080, SW684)とし、さらにコントロール群には軟部組織の正常細胞の代表として、ヒト線維芽細胞(NHDF-c)とした。これらの細胞における GSK3β の発現と、その活性を制御するリン酸化レベルを比較解析する。細胞や腫瘍における GSK3β の機能解析には、2 種類の特異的小分子阻害剤 (AR-A014418, SB-216763) や小分子干渉 RNA (small interfering RNA, si RNA) を作用させ、腫瘍細胞に生じる分子、形態や機能の変化を観察する。さらに <i>in vivo</i> においても抗腫瘍効果の検討を行う。実際に行う課題は以下の通りであり、これらを順次解析する。	

	① <i>In vitro</i> i) 免疫染色による各軟部肉腫細胞株における活性型 GSK3β 発現の検討 ii) western blot による各軟部肉腫細胞株と線維芽細胞株の活性型 GSK3β 発現の差を検討 iii) 特異的 siRNA を用いた RNA 干渉による GSK3β の発現抑制と抗腫瘍効果の関連性を検討 iv) MMT assay による GSK3β 阻害薬の軟部肉腫細胞増殖への効果の検討 v) BrdU ELISA, TUNEL imaging assay による GSK3β 阻害薬の軟部肉腫細胞増殖に対する効果およびアポトーシス誘導能の検討 vi) NF-κB をターゲットに, 新たに GSK3β 阻害薬の作用機序になりうる経路がないか, Real-time PCR などにより検討する ② <i>In vivo</i> i) 活性型 GSK3β 阻害によるマウス生体内での腫瘍増殖の比較 ii) 軟部肉腫細胞移植マウスに対する GSK3β 阻害薬投与による抗腫瘍効果の検討 なお, これまでに①- ii), iv) および②- i), ii) は終了している. ①- ii) western blot による各軟部肉腫細胞株と線維芽細胞株の活性型 GSK3β 発現の差を検討 すべての軟部肉腫細胞株が線維芽細胞株に比して有意に活性型 GSK-3β が発現していた. ①- iv) MMT assay による GSK3β 阻害薬の軟部肉腫細胞増殖への効果の検討 すべての軟部肉腫細胞株に対して, GSK3β 阻害薬は濃度依存性・時間依存性に細胞増殖を抑制した. ②- i) 活性型 GSK3β 阻害によるマウス生体内での腫瘍増殖の比較 ②- ii) 軟部肉腫細胞移植マウスに対する GSK3β 阻害薬投与による抗腫瘍効果の検討 GSK3β 阻害薬投与により, 腫瘍増殖スピードは落ち, 大きさ・重さで投与群はコントロール群よりも有意に小さく, 軽量であった. また組織学的評価においても, 投与群では腫瘍細胞の壊死を認めた.
【成 果 等】	【主な論文発表】 特になし
	【学会発表】 当教室の先行研究として行った, GSK-3β 阻害薬の <u>骨肉腫</u> に対する効果の検討では, 以下の結論が得られている. ① GSK-3β 阻害薬投与や RNA 干渉による, 骨肉腫細胞の増殖抑制効果とアポトーシス誘導を認めた. ② その作用経路は, Wnt/β-catenin 経路であることが示唆された.

- ③ *In vivo*においても抗腫瘍効果を確認した.
- ④ GSK-3 β 阻害薬は, すでに臨床で使用されている薬剤であり早期の臨床応用が期待できる.

これまでに上記成果を以下の国内外の学会で発表してきた.

第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会 (名古屋)

第 120 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (和歌山)

第 86 回日本整形外科学会学術集会 (広島) 一般演題

第 46 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学会学術集会 (東京)

International Society of Limb Salvage 17th General Meeting (ボローニャ, 伊国)

第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会 (千葉)

第 51 回日本癌治療学会学術集会 (京都)

第 41 回日本生体電気・物理刺激研究会 (横浜)

American Society of Clinical Oncology 50th Annual Meeting (シカゴ, 米国)

第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (大阪)

第 123 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (名古屋)

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (鹿児島)

The Connective Tissue Oncology Society (ベルリン, 独国)

第 53 回日本癌治療学会学術集会 (京都)

この成果は現在英語論文投稿中である.

【その他特筆事項】

研究区分		一般共同研究
研究課題		既存薬転用による膠芽腫に対する GSK3 β 標的療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	脳・脊髄機能制御学・医員・古田拓也
研究分担者 (適宜, 行を追加してください.)	所属・職名・氏名	脳・脊髄機能制御学・教授・中田光俊
	所属・職名・氏名	脳・脊髄機能制御学・助教・宮下勝吉
	所属・職名・氏名	脳・脊髄機能制御学・博士研究員・淑瑠へムラサビット
	所属・職名・氏名	脳・脊髄機能制御学・博士課程学生・董宇
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	本研究の目的は膠芽腫に対する安全で効果的な Glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β) 標的療法の可及的すみやかな確立である。我々が報告した GSK3 β の膠芽腫における増殖, 浸潤への関与を基盤に, 実臨床で用いられている GSK3 β 阻害医薬品 (既存薬転用) の, 膠芽腫に対する有効性・安全性を明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です.)	1. <i>In vitro</i> での GSK3β阻害医薬品の効果 4 種類の GSK3β阻害作用を有する薬剤 (シメチジン, 炭酸リチウム, オランザピン, バルプロ酸) を 4 種類の膠芽腫細胞株に投与したところ, それぞれの薬剤によって GSK3β の基質である glycogen synthase のリン酸化 (phospho-GS^{S641}) が抑制された。また, 4 剤の併用 (CLOVA cocktail: <u>c</u>imetidine, <u>l</u>ithium, <u>o</u>lanzapine, <u>v</u>alproate) により腫瘍細胞の増殖および浸潤が有意に抑制された。 2. 候補薬剤により阻害されるシグナル GSK3β阻害医薬品を膠芽腫マウスモデルに投与したところ, <i>in vitro</i> と同様, phospho-GS^{S641}の発現低下が認められた。薬剤投与群においては, 腫瘍本体から正常脳へ浸潤するサテライト病変の数が有意に減少した。浸潤に関わる分子としてリン酸化 FAK (phospho-FAK^{Y397}, phospho-FAK^{Y861}) の発現低下が見られた (図)。MIB-1 index の有意な低下も認められ, 4 剤による GSK3β阻害療法は <i>in vivo</i> でも有効であることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 古田拓也, 淑瑠へムラサビット, 董宇, 宮下勝吉, 木下雅史, 内山尚之, 林泰彦, 林裕, 源利成, 中田光俊; 既存薬転用を応用した膠芽腫に対する GSK3 β 標的治療。第 16 回日本分子脳神経外科学会, 2015 年 8 月 28-29 日, 浜松。	
	【その他特筆事項】	

