

平成29年度
金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2018.4

金沢大学がん進展制御研究所

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。 <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、HGF α 鎖と β 鎖の Met への結合に関与するポケット (窪み部分)、に嵌まり込む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、複合体構造解析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 <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 のリン酸化を阻害しうる新規低化合物候補を複数同定していた。そこで、さらに高い生理活性を有する化合物を新たに探索するために、HGF α 鎖と β 鎖の化合物結合ポケット部位の選択と計算の初期設定値を再検討した。HGF α 鎖 NK1 部分と β 鎖の結晶構造 (PDB コード ; 5CT10 と 4K3J) とを用いて、先行研究の情報等も活用しつつ剛体ドッキングとフレキシブルドッキングからなる複数の化合物結合シミュレーション系、さらに全方位結合シミュレーションを導入した新規のスクリーニング系を構築した。約 15 万化合物ライブラリの中から、これら結合シミュレーションと、さらに MACCS key を利用したクラスタリング手法によるスクリーニングを多段階的に行った。さらに HGF と Met、化合物の 3 分子間の結合シミュレーションも行ない化合物による HGF と Met の結合阻害も確認した。最終的に候補化合物を α 鎖と β 鎖のスクリーニングからそれぞれ 10 種類選定し入手した。これらの候補化合物に関して HGF に対する阻害活性の検証実験を松本研究室で行っていただいた。細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイの結果、α 鎖でのスクリーニングからは IC₅₀ 値が 100 μM 前後の新規化合物を 3 種類、β 鎖でのスクリーニングからは IC₅₀ 値が 10-20 μM の新規化合物を 2 種類発見する事に成功した。特にこれら 2 種類の化合物に関してはこれまでに同定してきた HGF-Met 結合阻害剤の中では最も活性が高い化合物であった。この 2 種の化合物は 3 つの六員環からなる共通母核構造を有する化合物であることが明らかになり (図)、より強い活性を有する類縁体を既存化合物ライブラリから探索するための大きな手がかりとなると考えられた。今後、これらの構造情報を元に、大規模化合物ライブラリを 2D ならびに 3D similarly screening することで、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より精緻な化合物-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が見込める。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】 (1) Identification of a novel class of small compounds with anti-tuberculosis activity by <i>in silico</i> structure-based drug screening. Taira J, Morita K, Kawashima S, Umei T, Baba H, Maruoka T, Komatsu H, Sakamoto H, Sacchettini JC, Aoki S. J Antibiot (Tokyo). 2017;70:1057-1064.. (2) <i>In silico</i> structure-based drug screening of novel antimycobacterial pharmacophores by DOCK-GOLD tandem screening. Taira J, Ito T, Nakatani H, Umei T, Baba H, Kawashima S, Maruoka T, Komatsu H, Sakamoto H, Aoki S. Int J Mycobacteriol. 2017; 6: 142-148. (3) 2,3-Butandione 2-monoxime inhibits skeletal myosin II by accelerating ATP cleavage. Komatsu H, Koseki Y, Kanno T, Aoki S, Kodama T. Biochem Biophys Res Commun. 2017 Aug 26;490(3):849-854.	

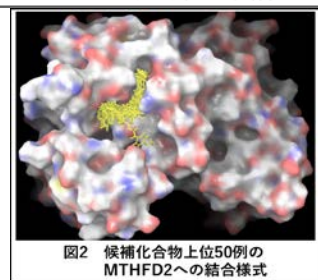
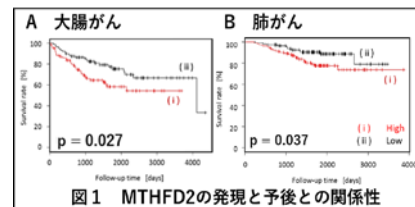


図. HGF β 鎖構造と新規同定化合物との結合モデル構造

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	(4) Tetrahydro-2-furanyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione derivatives as novel antibacterial compounds against Mycobacterium. Koseki Y, Kanetaka H, Tsunosaki J, Munier-Lehmann H, <u>Aoki S</u> . Int J Mycobacteriol. 2017;6:61-69.
	【学会発表】 (1) <u>青木俊介</u>、馬場弘樹、安恒英、酒井克也、松本邦夫、増殖因子受容体をターゲットとした抗癌剤候補化合物の探索、金沢大学がん進展制御研究所、共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2017 年 10 月 26 日、金沢市
	【その他特筆事項】 (1) HGF (Hepatocyte Growth Factor). Sato H, <u>Aoki S</u>, Kato T, Matsumoto K. Encyclopedia of Signaling Molecules, Second Edition, Springer, p2352-2364, 2017.

研究課題		がん特有の代謝特性を利用した新規抗がん標的探索システムの構築と抗がん剤開発
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・博士研究員・浅井歩
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・特任教授・石井秀始
	所属・職名・氏名	大阪大学・寄附講座講師・今野雅允
	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】	副作用の少ない抗がん剤を開発するためには、がん細胞に特異的な特徴を標的とすることが重要である。近年、がん細胞において One carbon 代謝が顕著に亢進しており、そのような細胞は高増殖能・高転移能を有することが多数報告されている。そこで、本研究は臨床データ解析とコンピュータによる <i>in silico</i> シミュレーションを組み合わせることで、One carbon 代謝における創薬標的の同定とその標的を阻害する抗がん剤の開発を試みた。	
【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。)	【研究内容】	① 臨床データ解析：患者の予後に影響を及ぼす有望な創薬標的を探索するために、NCBI に登録されている大腸がんと肺腺がんの患者の予後付マイクロアレイデータベースを用いて、One Carbon 代謝関連酵素の遺伝子発現と患者の生存率の相関関係を解析した。 ② <i>In silico</i> スクリーニング：臨床データ解析により見出された MTHFD2 に対して創薬を行うために、Namiki ライブラリ（約 500 万化合物）を用いて、コンピュータによる <i>in silico</i> スクリーニングを行った。また、生体内のタンパク質の構造変化を考慮する分子動力学計算や水分子の影響を考慮する Molecular Mechanics/Generalized Bron Surface Area (MM/GBSA)法を組み合わせ <i>in silico</i> シミュレーションを行った。
	【成果】	① 臨床データ解析：いずれのがん患者においても予後と相関がみられたのは MTHFD2 のみであり、MTHFD2 が高発現している患者は予後不良だった（図 1）。よって、MTHFD2 を有望な創薬標的として同定した。 ② <i>In silico</i> スクリーニング：臨床データ解析によって同定された MTHFD2 に対して、500 万の化合物の <i>in silico</i> スクリーニングを実施し、親和性の高い候補化合物を抽出した（図 2）。 現在、<i>in silico</i> スクリーニングによって抽出された候補化合物を <i>in vitro</i> アッセイによって評価を開始している。
【成果等】	【主な論文発表】	Asai A, Koseki J, Konno M, Kawamoto K, Gotoh N, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. Drug Discovery of Antitumor Agents Targeting Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2 (MTHFD2). (submitted).
	【学会発表】	● One Carbon 代謝を標的とするがん幹細胞創薬の加速化：第 5 回がん代謝研究会。 ● がん細胞の転移に関与する One Carbon 代謝を標的とする創薬の新しい展開：第 26 回がん転移学会。 ● One Carbon 代謝を標的とする新規抗がん剤創薬：第 76 回日本癌学会学術総会。
	【その他特筆事項】	



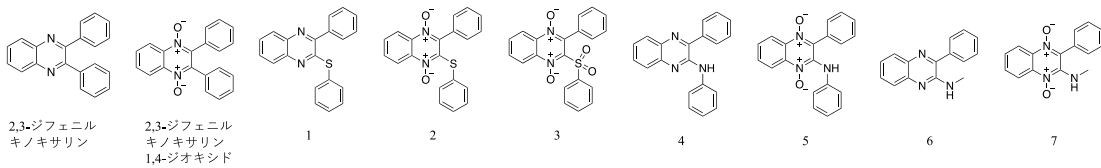
平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Rb が制御するニューロン代謝経路の解析
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、G1-S 期移行のブレーキとして主に機能する。そのブレーキは、細胞外増殖シグナルによる Rb のリン酸化で解除されるが、逆遺伝学の手法で Rb ファミリーを急性的に欠損させても同様に解除される。これらの方法でブレーキ解除された細胞は細胞周期を S 期まで進めるが、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。本研究では、Rb ファミリーを欠損し、S 期を通過した後に増殖するニューロンと細胞死を起こすニューロンで作動している代謝経路と、その役割を明らかにするための基盤データを得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。)	昨年度までの研究により、細胞周期のチェックポイントに関わるタンパク質 Chk1 の活性化が、S 期に進行した幼若ニューロンの細胞分裂の実行及び細胞死の抑制に必要十分であることが明らかとなった。そこで本年度は、Chk1 の活性化を制御する因子の解明を目指した。具体的には、Rb-TKO (Rb Lox/Lox; p107 -/-; p130 Lox/Lox) 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 あるいは神経前駆細胞で Cre を発現する pCAG-Cre プラスミドをエレクトロポレーション法で遺伝子導入し、4 日間組織培養した。これまでの研究により、MAP2-Rb-TKO 細胞では Chk1 が活性化されず細胞死を起こし、CAG-Rb-TKO 細胞では Chk1 が活性化され、細胞分裂を起こすことが明らかとなっていた。そこで、MAP2-Rb-TKO 細胞でのみ活性化している因子を遺伝子発現プロファイル解析や阻害剤の添加実験で検討し、以下のことが明らかとなった。1) DNA メチル化酵素 Dnmt1 の阻害剤 5-azacytidine を添加すると、MAP2-Rb-TKO 細胞で Chk1 が活性化し、分裂期に侵入した。2) Dnmt1 の shRNA を MAP2-Rb-TKO 細胞で発現させると、MAP2-Rb-TKO 細胞で Chk1 が活性化し、分裂期に侵入した。3) Dnmt1 抑制による MAP2-Rb-TKO 細胞の分裂期侵入は、Chk1 の shRNA 発現で阻害された。以上の結果から、S 期へと進行したニューロンの細胞死シグナルは、Dnmt1 を介した Chk1 活性抑制が重要だと考えられた。今後は、ニューロン分化の際に生じるエピジェネティックな変化を捉えるとともに、そのエピジェネティックな変化と Dnmt1 との関係を明らかにしたい。また、Dnmt1 と Chk1 に関連した代謝経路の差異に着目し、ニューロン細胞死を抑制する新しいタイプの薬剤を同定することを目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) Jinnou H, et al., Radial Glial Fibers Promote Neuronal Migration and Functional Recovery after Neonatal Brain Injury. Cell Stem Cell. 2018 Jan 4;22(1):128-137. 2) Oshikawa M, et al., Dnmt1-dependent Chk1 pathway suppression is protective against neuron division. Development. 2017 Sep 15;144(18):3303-3314. 3) Oshikawa M, et al., Affinity-Immobilization of VEGF on Laminin Porous Sponge Enhances Angiogenesis in the Ischemic Brain. Adv Healthc Mater. 2017 Jun;6(11). 00183. 【学会発表】 1) 味岡逸樹「人工足場創製による in vivo 脳組織工学」第 17 回日本再生医療学会総会 2018.3.21 横浜 2) 味岡逸樹「低酸素状態で構造変換するタンパク質を用いる脳再生デバイスの創製」第 7 回 CSJ 化学フェスタ 2017.10.18 船堀 【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		トリプルネガティブ乳癌幹細胞維持における転写因子 NF-κB 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-κB-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。)	TNBC の大半を占める Basal-like 乳癌は正常乳腺の 2 層の管腔を形成する上皮細胞のうち外側に存在する Basal 上皮細胞と似た性質を持つことが知られているが、近年の乳癌モデルマウスの解析から管腔の内側に位置する Luminal 上皮細胞の比較的未分化な前駆細胞画分から発生することが明らかとなってきた。p53 欠損マウスや T 抗原を乳腺特異的に発現するモデルマウス、BRCA1 欠損マウスなどの乳癌がこの Luminal 前駆細胞を起源としてヒト Basal-like 乳癌とよく似た性質を示すことが知られているが、これらのマウスモデルではゲノム修復機構の破綻による様々な遺伝子異常が起こることが知られており、原因因子や新規治療法の開発へと繋がるような異常シグナル伝達の特定には至っていない。 我々は以前より臨床検体を用いた研究を補完するため Basal-like 乳癌モデルマウスである C3-TAg マウスを用いて解析を行っており、Luminal 前駆細胞で強い SV40T 抗原発現が誘導されることを見出している。このマウスではラットの C3 ペプチドプロモーター下で SV40T 抗原が制御されるため、T 抗原による p53 や Rb の不活化によるゲノム不安定化に誘導される 2 次的な遺伝子異常が発癌のドライバーとなることが示唆される。 今回我々はこの C3-TAg マウスを用い、乳管内へレンチウイルスを導入する Intraductal infection 法を用いて乳管内側の Luminal 細胞層へ直接遺伝子を導入することで Basal-like 乳癌の発癌への影響を検討した。CRISPR/Cas9 と gRNA を導入し、gRNA の配列特異的な癌抑制遺伝子の欠損を in vivo で引き起こして発癌を誘導することを目指し、標的の癌抑制遺伝子としては PI3K/Akt シグナルの抑制因子である Pten を選択した。3 種類の Pten を標的とした gRNA 配列と Cas9 を共発現するレンチウイルスベクターを導入したところ、発生した 7 つの乳癌で実際にレンチウイルスの感染および Pten 遺伝子の変異が観察され、Pten の機能抑制によって発癌が誘導された可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 Shibata, Y., Tokunaga, F., Goto, E., Komatsu, G., Gohda, J., Saeki, Y., Tanaka, K., Takahashi, H., Sawasaki, T., Inoue, S., Oshiumi, H., Seya, T., Nakano, H., Tanaka, Y., Iwai, K. and Inoue, J. HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. <i>PLoS Pathogens</i> 13(1):e1006162 (2017). doi: 10.1371/journal.ppat.1006162. Yamamoto, M., Sakane, K., Tominaga, K., Gotoh, N., Niwa, T., Kikuchi, Y., Tada, K., Goshima, N., Semba, K. and Inoue, J.* Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. <i>Cancer Sci.</i> 108, 1210-1222 (2017). doi: 10.1111/cas.13246.	
	【学会発表】 山本瑞生、井上純一郎 Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月、横浜	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肝がん細胞を用いた低酸素選択的抗転移剤の開発
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・講師・浅田元子
	所属・職名・氏名	徳島大学・D3・芝 一休
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫, 准教授・遠藤良夫, 准教授・滝野隆久
【研究目的】	平成 23-28 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 MMP9 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(論文 1)。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。そこで本年度は、AKT 阻害剤(AKT1/2 inhibitor, MK-2206, AKT1/2 inhibitor read)に共通する骨格である 2,3-ジフェニルキノキサリン骨格に着目し、2,3-ジフェニルキノキサリンをリードとする抗転移剤の創製を試みた。	
【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。)	平成 29 年度は、AKT 阻害剤(AKT1/2 inhibitor, MK-2206, AKT1/2 inhibitor read)に共通する骨格である 2,3-ジフェニルキノキサリン骨格に着目し、誘導体の合成を行った。まず、2,3-ジフェニルキノキサリンが抗転移剤として有用であるかの評価を行った(下図)。o-フェニレンジアミン及びベンジルを出発原料とし 2,3-ジフェニルキノキサリンを合成し、最後に酸化反応を行い 2,3-ジフェニルキノキサリン-1,4-ジオキシドを得た。2,3-ジフェニルキノキサリンは種々のがん細胞に対して有意な細胞増殖阻害活性を示したが、2,3-ジフェニルキノキサリン-1,4-ジオキシドは有意な活性を示さなかった。次いで、両化合物の MMP9 産生抑制効果を評価した所 2,3-ジフェニルキノキサリンは濃度依存的に MMP9 産生を抑制したが、2,3-ジフェニルキノキサリン-1,4-ジオキシドは MMP9 産生を抑制しなかった。次に、2,3-ジフェニルキノキサリンについて発育鶏卵を用いた <i>in vivo</i> 抗転移活性を評価したが溶解性が低く有意な活性を示さなかった。最後に、2,3-ジフェニルキノキサリン-1,4-ジオキシドの低酸素細胞毒性を評価したが低酸素細胞毒性を示さなかった。そこで、細胞内で還元されているかを評価した所、細胞内において還元を受けていないことが示された。以上の結果より、2,3-ジフェニルキノキサリンは抗転移剤として有用であるが抗転移活性を示すには細胞内において一電子還元を受ける必要があるため、フェニル基の一部を変えた化合物を新たに設計し合成を行った(下図)。まず、Benzoylformic acid 及び o-phenyldiamine を出発原料とし、3-phenylquinoxalin-2(1<i>H</i>)-one を合成し POCl₃ を用いてクロロ化を行い 2-chloro-3-phenylquinoxaline を合成した。次に、過酸化水素を用いて酸化させることで 2-chloro-3-phenylquinoxaline 1,4-dioxide を合成した。最後に、チオフェノール、アニリン及びメチルアミンを用いて非酸化体及び酸化体の化合物 1-7 を合成した。まず、酸化体の低酸素細胞毒性を評価した。その結果化合物 2 及び 3 が低酸素選択性は低いが常酸素と比較して低酸素で有意な毒性を示した。最後に、各化合物の AKT 阻害活性を評価したところ、化合物 2 及び 3 が有意に AKT2 タンパク質発現及び AKT のリン酸化を有意に阻害した。結論として、AKT 阻害活性を有する低酸素サイトトキシンの合成に成功した。  2,3-ジフェニルキノキサリン 2,3-ジフェニルキノキサリン 1,4-ジオキシド 1 2 3 4 5 6 7 各化合物の化学構造	
【成果等】	【主な論文発表】	
	1) Shiba I, Kouzaki R, Yamada H, Endo Y, Takino T, Sato H, Kitazato K, Kageji T, Nagahiro S, Uto Y, Design and Synthesis of Novel Anti-metastatic Hypoxic Cytotoxin TX-2137 Targeting AKT Kinase, Anticancer Research. 37(7), 3877-3883, 2017.	
	【学会発表】 ・平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム	
【その他特筆事項】		

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		PDX モデルを用いた頭頸部癌化学療法のための新規バイオマーカーの確立と治療効果予測への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・遠藤 一平
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・大学院生・上野 春菜
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・吉崎 智一
	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】	従来はヒト頭頸部癌から樹立された細胞株 (Cell line) を移植した Cell line-derived xenograft (CDX) モデルを用いて、新規バイオマーカー探索や新薬開発における薬剤感受性試験などの研究が広く行われてきた。しかし頭頸部癌 CDX モデルは癌の heterogeneity が失われており実際の頭頸部癌患者の臨床モデルとしては不完全であるという欠点を抱えていた。このような欠点を克服しうるモデルとして実際の癌患者の腫瘍組織を免疫不全マウスに移植した Patient-derived xenograft (PDX) モデルを用いた研究が近年国内外で行われるようになりつつある。本研究は頭頸部癌 PDX モデルの preclinical model としての有用性を検証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。)	①対象と方法 2015 年 12 月～2017 年 9 月に本研究参加同意のえられた 25 名の頭頸部がん患者の腫瘍組織を NOD-SCID マウスへ移植した。移植した腫瘍が 1000mm³ 程度に増大えられた場合、犠牲死の上腫瘍を摘出した。摘出腫瘍は HE 染色像で組織型・分化度について患者腫瘍との相同性を確認できた場合、「生着」とした。摘出腫瘍は、5 代目まで別のマウスへ継代した。患者腫瘍と PDX の組織型・分化度について HE 染色で評価した。また患者腫瘍と PDX の EGFR・p53 発現について免疫組織学的に評価した。 ②結果 1) 生着率について 全症例で 5/25 (20%)、手術症例で 5/18 (28%)、生着症例で 0/7 (0%) であった。 2) 手術症例患者背景について 生着症例は下咽頭癌 2 例、舌癌 1 例、喉頭癌 1 例、副鼻腔癌 1 例の 5 例であった。手術検体断端陽性、術後 CCRT が実施された症例に有意に生着がえられた (P<0.05)。平均年齢、性別、喫煙習慣、検体の部位 (原発 or 転移リンパ節)、組織型 (SCC or SCC 以外)、TNM、ステージでは患者背景と生着の有無に有意差を認めなかった。 3) HE 染色像 患者腫瘍と PDX において 5 例全例で組織型・分化度が一致した。 4) IHC 像 (EGFR・p53 発現) 患者腫瘍と PDX において 5 例全例で EGFR 発現が相似し、4 例で p53 発現が相似した。舌癌 PDX において患者腫瘍と比較して p53 発現の増強を認めた。 ③考察 頭頸部癌 PDX の生着率は nude mouse で 17% (Peng et al. 2013) 54% (Keysar et al. 2013)、NSG mouse で 45% (Klinghammer et al. 2015) 85% (Kimple et al. 2013) と報告によりばらつきはあるが、諸家の報告と比較して当科における頭頸部癌の NOD-SCID マウスへの生着率は低いといえる。移植手技の見直しや NSG mouse への変更について今後検討したい。当科の頭頸部癌 PDX は手術検体断端陽性で術後 CCRT が実施された症例で有意に生着した。生着例で無病生存率と全生存率が低い (Stewart et al. 2013)、転移のリスクが高い (Garrido-Laguna et al. 2011) という報告があり、より悪性度の高い腫瘍で生着率が高いと考えられる。 ④今後の展望 実際の患者と PDX モデルのシスプラチンの奏功性の相関について検討し、頭頸部癌 PDX の臨床モデルとしての有用性を検証する予定である。また抗癌剤等の薬剤を細胞の中から外へ排出する膜タンパクである ABC-transporter 発現 PDX モデルを作成して、抗癌剤投与によるタンパク発現変化や薬剤耐性への影響を評価する。	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 執筆中
	【学会発表】 当科における頭頸部癌 PDX モデル 5 例の検討 (2018/2/22~24 第 36 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会)
	【その他特筆事項】

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん抑制遺伝子 p53 機能喪失による胃がん悪性化機構の本態解明
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学ユニット 独立ユニット長・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	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学ユニット・研修生 大塚 旬子
	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学ユニット・研修生 江沢 一星
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍遺伝学研究分野 教授・大島 正伸
【研究目的】	毎年、全世界で胃がんによる死亡者は約 1 0 0 万人に達しており、全世界のがん死亡者数の第 2 位を占めている。その中でも日本は特に胃がん多発国であり、毎年約 5 万人が胃がんで死亡している。死因となるような悪性の胃がんの効果的な治療と診断法の開発は、特に日本において、喫緊の研究課題である。 本研究により、悪性胃がんモデルマウスを作製するとともに、胃がん悪性化機構の本態を解明し、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。具体的には、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し詳細な解析を行う。	
【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。)	本共同研究は平成 2 2 年度から続いており、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。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る。さらに、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。これまでの双方向の共同研究の成果を基盤にした研究により、共同利用・共同研究拠点発の成果として、胃がん悪性化進展機構の解明に貢献する論文を発表した (Scientific Reports, 8, 2291, 2018.)。 p53 遺伝子欠損 Gan マウスを用い、以下の解析を進めた。 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】 ＜外国語論文＞ 1. Ohtsuka J, Oshima H, Ezawa I, Abe R, Oshima M, <u>Ohki R</u>. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. Scientific Reports, 8, 2291, 2018.	

- doi: 10.1038/s41598-018-20572-1.
2. Magi S, Iwamoto K, Yumoto N, Hiroshima M, Nagashima T, Ohki R, Garcia-Munoz A, Volinsky N, Kriegsheim AV, Sako Y, Takahashi K, Kimura S, Kholodenko BN, Okada-Hatakeyama M. Transcriptionally inducible Pleckstrin homology-like domain family A member 1 attenuates ErbB receptor activity by inhibiting receptor oligomerization. **J Biol Chem**, jbc.M117.778399, 2017.
doi:10.1074/jbc.M117.778399.
3. Sakata N, Yamaguchi Y, Chen Y, Shimoda M, Yoshimatsu G, Unno M, Sumi S, Ohki R. Pleckstrin homology-like domain family A, member 3 (PHLDA3) deficiency improves islets engraftment through the suppression of hypoxic damage. **PLoS One**, 12:e0187927, 2017.
doi: 10.1371/journal.pone.0187927.
4. Yamamoto Y, Nagasato M, Rin Y, Henmi M, Ino Y, Yachida S, Ohki R, Hiraoka N, Tagawa M, Aoki K.
Strong antitumor efficacy of a pancreatic tumor-targeting oncolytic adenovirus for neuroendocrine tumors.
Cancer Med, 6(10):2385-2397, 2017.
doi: 10.1002/cam4.1185.
5. Takikawa M, Ohki R.
A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors.
Cancer Science, 108(6):1101-1108.
doi:10.1111/cas.13235, 2017.
- <日本語論文>
6. 友杉充宏、川瀬竜也、富永航平、大木理恵子。新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍攻略における最も重要な分子の1つである 胆と膵, 38, pp. 1345-1355, 2017.
7. 大木理恵子。概論-古くても、まだまだ新しい、最も有名ながん抑制遺伝子 p53
実験医学, 35, pp. 2322-2328, 2017.
8. 川瀬竜也, 大木理恵子。p53 の新たな細胞保護、がん化促進経路。
実験医学, 35, pp. 2335-2339, 2017.
9. 滝川雅大, 大木理恵子。野生型・変位型 p53 を標的とした抗がん剤の現状。
実験医学, 35, pp. 2367-2368, 2017.

【学会発表】

- 口頭発表（国内 7 国外 1）
1. Identification of a novel p53 downstream pathway important in neuroendocrine tumor development.
Rieko Ohki. p53 international workshop 2017 年 7 月. 於：シンガポール 国外
2. 知られざる p53 の肖像画～最も有名ながん抑制遺伝子 p53 の新機能～
大木理恵子 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月. 於：横浜 国内
3. Identification of a novel p53 downstream tumor promotion pathway, p53-IER5-HSF1 pathway, that contributes to tumor progression. Rieko Ohki. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 11 月、於：神戸 国内
4. がんの生物学・分子生物学 大木理恵子 日本がん治療認定医機構 JBCT 教育セミナー 2017 年 11 月. 於：幕張メッセ 国内
5. 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-
Rieko Ohki, The 22nd Korea-Japan Cancer Research Workshop 2017 年 12 月. 於：東京 国内
6. がんの分子生物学 大木理恵子 日本臨床腫瘍学会 第 31 回教育セミナー 2018 年 3 月、於：東京 国内
7. IER5 is a p53-regulated activator of HSF1 that contributes to promotion of cancer.
Rieko Ohki, OIST セミナー 2018 年 3 月. 於：OIST 国内
6. がんの分子生物学 大木理恵子 日本臨床腫瘍学会 がんゲノム医療講習会 2018 年 3 月、於：東京 国内
- ポスター発表（国内 4 国外 2）
1. A p53 target gene IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumor progression. Shotaro Yamano, Yoshinori Asano, Tatsuya Kawase, Rieko Ohki. p53 international workshop 2017 年 7 月. 於：シンガポール 国外

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	2. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pituitary neuroendocrine tumors. Yu Chen, Maiko Minegishi, Kozue Saito, Benjamin Tycko, Syouzou Yamada, Hideo Namiki, Kentaro Semba, Rieko Ohki. p53 international workshop 2017 年 7 月. 於：シンガポール 国外 3. がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った胃がんモデルを用いた胃がんの悪性化機構の解明 大塚 旬子、江澤一星、安部良、大島正伸、大木 理恵子 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月. 於：横浜 国内 4. がん抑制遺伝子 PHLDA3 の下垂体腺腫における機能喪失性変異の同定と機能解析 富永 航平、西川 雷羅、山口 陽子、永田 喜三郎、大木 理恵子 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 11 月、於：神戸 国内 5. Akt 抑制因子 PHLDA3 の新規結合分子 PH3IP1, PH3IP2 は Akt 活性を制御する 山口 陽子、西川 雷羅、陳 好、斎藤 梢、広川 貴次、八田 知久、夏目 徹、近藤 格、永田 喜三郎、大木 理恵子 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 11 月、於：神戸 国内 6. がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った胃がんモデルを用いた胃がんの悪性化機構の解明 大塚 旬子、江澤一星、安部良、大島正伸、大木 理恵子 平成 29 年度金沢大学がん進展制御研究共同利用・共同研究拠点シンポジウム・成果発表会 2017 年 10 月. 於：金沢東急ホテル 国内
	【その他特筆事項】 ・実験医学 2017 年 9 月号 Vol. 35 No. 14 知られざる p53 の肖像～がん抑制／促進の二面性からアイソフォームの機能、標的遺伝子の選択機構まで～ を企画した。知られざる p53 の肖像画 ・2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) にて、下記のワークショップを主催。 知られざる p53 の肖像画 ～ “ゲノムの守護神” にとどまらない p53 の新機能～

研究課題		転写因子 RUNX1 エンハンサー eR1 を用いた癌幹細胞の純化：異なる組織の癌幹細胞に共通する発癌分子基盤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	熊本大学・教授・大里元美
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】		癌幹細胞研究をすすめるためには癌細胞集団より極少数しか存在しない癌幹細胞を同定・分離（純化）する必要がある。この目的のために細胞表面マーカーを用いた方法が広く用いられているが造血系以外の組織においてはまだ不十分な点が多い。別の純化法として、幹細胞に特異的な遺伝子の発現制御領域下にレポーター遺伝子を発現させる方法もある。申請者は転写因子 <i>Runx1</i> の造血幹細胞特異的エンハンサー eR1 を同定し報告した。また eR1 は造血系以外の比較的広範囲な組織に共通した新たな正常および癌幹細胞のマーカーとなりうることを示唆されたので、本研究ではその可能性を検証し、さらに異なる組織の癌幹細胞に共通する発癌分子基盤の探索を行う。
【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。)		1. 白血病及び他組織における癌幹細胞の同定・純化 a) 白血病幹細胞の純化 変異 <i>Kras</i> 導入により惹起されるマウス白血病モデルに eR1 レポーター (eR1-EGFP Tg) マウスを交配させたうえで、白血病細胞を eR1 活性 (GFP 陽性) 群と eR1 非活性 (GFP 陰性) 群に分画採取し、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の実験を行い増殖能など白血病原性につながる細胞の性質を比較した。<i>in vivo</i> 実験としては野生型マウスへ白血病細胞を移植して白血病を引き起こすことができるかを検討した。GFP 陽性群からは白血病が起こるが、GFP 陰性群からは殆ど起こらないという結果を得た (図 1)。また GFP だけによる純化では癌幹細胞の頻度が十分に高くないという結果も見られたので、GFP に加え c-Kit など幹細胞マーカーも組み合わせることで白血病幹細胞の濃縮を可能な限り高めることを図り、最終的に白血病幹細胞を 200 細胞に 1 個というレベルまで濃縮することに成功した。これらの結果は eR1 が白血病幹細胞のマーカーになりうることを示していると考えられる。 b) 造血系以外の組織幹細胞における eR1 活性 eR1-EGFP Tg マウスの GFP シグナルは造血系に限らず 比較的多くの組織において見られ、eR1 は広範な組織に共通した新たな正常および癌幹細胞のマーカーとなりうることを示唆されたのでその可能性を検証した。昨年度の胃についての報告 (Matsuo et al., Gastroenterology 2017) に引き続き本年度は乳腺および乳癌に於ける解析結果を国際学会や日本癌学会・分子生物学会などにおいて発表した。これ以外にも中枢神経 (脳) における解析を行い脈絡叢における幹細胞活性など興味深い知見を得た。悪性脳腫瘍において eR1 活性を指標に neurosphere 形成能の高い細胞を純化濃縮できるかの検討も行っている。

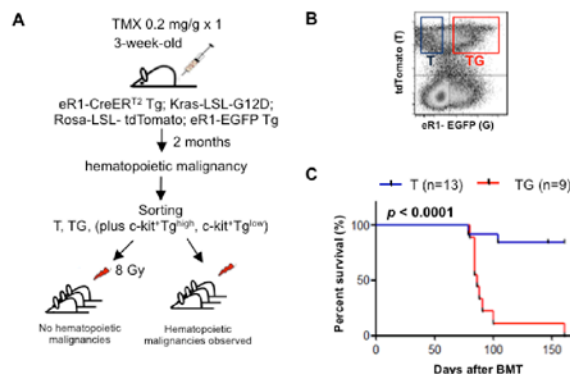


図1、Runx1エンハンサーeR1は白血病幹細胞マーカーである。変異*Kras*で惹起された白血病細胞をtdTomatoで、eR1活性を持つ細胞をEGFPでマーク、Tomato(+) GFP(-) T分画とTomato(+) GFP(+) TG分画に分けて採取移植し白血病原性を比較したところ (A, B) TG分画からは全例で白血病が起ったがT分画からは殆ど起こらなかった (C)。

	2. 白血病と他組織の癌幹細胞に共通する分子基盤の探索 純化濃縮された白血病癌幹細胞および対照となる細胞の間で発現に差のある遺伝子を同定するための発現マイクロアレイ解析、また eR1 オリゴ DNA に結合する複合体構成分子に差があるかを SILAC プロテオミクス法を用いて検討した。差の見られた分子リストの中より幾つかの分子を選び今後さらに詳細な解析を行ってゆく予定である。
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Marsman J, Thomas A, <u>Osato M</u>, O'Sullivan JM, Horsfield JA. A DNA contact map for the mouse Runx1 gene identifies novel hematopoietic enhancers. Scientific Reports 17:13347, 2017 2. Tsukada M, Ota Y, Wilkinson A, <u>Osato M</u>, Nakauchi H, Yamazaki S. In vivo generation of engraftable murine hematopoietic stem cells by Gfi1b, c-Fos and Gata2 overexpression within teratomas. Stem Cell Reports 9:1024-1033, 2017 3. Selvarajan V, <u>Osato M</u>, Nah SG, Yan J, Tae-Hoon C, Voon DC, Ito Y, Ham ME, Salto-Tellez M, Shimizu N, Choo SN, Fan S, Chng WJ, Ng SB. RUNX3 is oncogenic in natural killer/T-cell lymphoma and is transcriptionally regulated by MYC. Leukemia 31:2219-2227, 2017 4. Liao WS, Tan SH, Lawton LN, Wang CQ, Feng H, Tergaonkar V, Gong Z, <u>Osato M</u>, Young RA, Look AT, Sanda T. Aberrant Activation of the <i>GIMAP</i> Enhancer by the Oncogenic TAL1 Complex Contributes to T-cell Leukemogenesis. Leukemia 31: 1798-1807, 2017 5. Zhou J, Chan ZL, Bi C, Lu X, Chong P, Chooi JY, Cheong LL, Liu SC, Ching YQ, ZhouY, <u>Osato M</u>, Tan TZ, Ng CH, Ng SB, Zeng Q, Chng WJ LIN28B Activation by PRL-3 Promotes Leukemogenesis and a Stem Cell-like Transcriptional Program in AML. Molecular Cancer Research 482: 994-1000, 2017 【学会発表】 2018 年 1 月 24-25 日 滋賀県大津市 平成 29 年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、(演題) Enhancer for Runx1, eR1: a powerful tool in stem cell and cancer biology (口演) 大里元美 2017 年 12 月 6-9 日 神戸 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (演題 1) Runx1 enhancer element marks stem cells in multiple organs (演者)山村明寛、大里元美、伊藤嘉明ほか、(演題 2) Identification of eR1 that marks luminal stem/progenitor cells in mammary gland (演者) 松尾純一、大里元美、伊藤嘉明ほか 2017 年 11 月 12-15 日 Philadelphia, USA 21st International RUNX Conference (演題) Enhancer for Runx1, eR1: a powerful tool in stem cell and cancer biology (口演) 大里元美 【その他特筆事項】

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞制御における代謝システムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学 先端科学技術研究センター・特任准教授・大澤 毅
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】	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。低酸素・低栄養で生存する癌細胞は、癌幹細胞の維持を促進し悪性化に寄与することが示唆されるが、その詳細な“代謝システム機構”は不明である。本研究は、がん悪性化における“代謝と栄養シグナル”がどのようにがん幹細胞維持に関与するかを解明し、現存する化学療法との併用に相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用のための基盤となる研究を目的とした。	
【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。)	癌の悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者らはこれまで低酸素・低栄養・低 pH という腫瘍微小環境が癌の悪性化を促進することを報告してきた。本研究では、がん微小環境における“癌代謝と栄養シグナル伝達機構の解明”を種々の癌細胞株や <i>in vivo</i> マウスを駆使して研究を行った。 具体的には、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”の解明という分野横断的な共同研究を展開することを目的とした。 研究項目としては、以下の 2 項目について研究を行った。 【1】 <u>低酸素・低栄養におけるがん幹細胞維持に必須な代謝経路の解明</u> 申請者は低酸素・低栄養が癌の悪性化に関与することを報告しているが、腫瘍微小環境で亢進する癌代謝物がどのように代謝さらには悪性化に関与するかは不明である。既に我々は、低酸素・低栄養において種々の癌細胞に共通して幾つかの代謝産物質や脂質代謝経路が亢進することを発見しており、これらが癌の悪性化にどう関わるか検討した結果、TCA サイクルと脂質分解経路について ^{13}C 安定同位体標識をしたグルタミン網羅的なトレース実験から低酸素条件下ではグルタミンから還元型の TCA サイクルが回ることを見出した、一方、低酸素・低栄養では順方向に TCA サイクルが回ることを発見した。 【2】 <u>低酸素・低栄養の癌幹細胞における栄養シグナルの関与</u> 我々はがん細胞株に共通して低酸素・低栄養で特異的に発現誘導される特徴的な遺伝子群をマイクロアレイ解析、オントロジー解析、パスウェイ解析から発見している。また、PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達系や FOXO 転写因子の関与の解析と共にこれら標的候補の機能解析を行い、グルタミン異存的な FOX 転写遺伝子群の候補を見出した。今後も本共同研究を継続し、①リン脂質合成経路の律速酵素の発現誘導のメカニズムの解明と②アミノ酸欠乏によるリン脂質合成経路の制御機構の解明を新規に試みる。また、グルタミン異存的な FOX 転写因子群を含めた転写遺伝子群のがん幹細胞における役割について si/shRNA やゲノム編集等による抗腫瘍効果をマウス腫瘍移植実験において検討する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Yamamoto R, Osawa T <i>et al.</i>. Overexpression of p54nrb/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth. Oncotarget, 2018, 9(12), 10510-10524. 2. Kondo A & Osawa T. Establishment of an extracellular acidic pH culture system. JoVE, 2017, 129, e56660. 3. Kondo A <i>et al.</i> and Osawa T. Long non-coding RNA JHDM1D-AS1 promotes tumor growth by regulating angiogenesis in response to nutrient starvation. Molecular and Cellular Biology, 2017, 37(18). pii: e00125-17. など 【その他特筆事項】 大澤毅、血管生物医学若手最優秀賞(2018 年)：(第一回血管生物医学学会若手研究会)：2018 年 3 月 2 日-3 日、熊本 大澤毅、優秀口演賞：平成 29 年先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会、2018 年 1 月 24 日～25 日、大津	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		マウス神経幹細胞ならびに脳腫瘍におけるがん抑制遺伝子産物 MTAP の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・訪問研究員・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】	グリオブラストーマ(glioblastoma multiforme: GBM)に特徴的な染色体異常である 9 番染色体の欠損、中でも <i>CDKN2A</i>、<i>CDKN2B</i>、<i>MTAP</i> 遺伝子の共欠損は GBM の発症や悪性化のプロセスに関与していると考えられているが詳細については分かっていない。特に、MTAP はポリアミン合成で産生される MTA (methylthioadenosine) を分解し、methionine と ATP の合成に関わる酵素であるが、MTAP 欠損によるポリアミン組成やエネルギー産生の変化が GBM の発症や悪性化にどのように影響するかについては不明である。本研究では、マウス神経幹細胞や <i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルを用いて正常細胞や腫瘍形成過程における MTAP の機能について解析し、GBM の発がんおよび悪性化過程における MTAP の役割を明らかにしたいと考えている。	
【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。)	これまでに申請者らは、悪性脳腫瘍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、ヒト GBM において高頻度に異常がみられるがん抑制遺伝子 <i>Cdkn2a</i> の欠損(KO)マウス 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マウス GBM モデルを構築している(Neoplasia. 13:784-91. 2011)。さらに、申請者は piggyBac systemを用いてウイルス感染を伴わずに <i>Cdkn2a</i> KO マウス NSCs のトランスポゾン配列にがん遺伝子を挿入後マウス脳内への移植により上記同様に脳腫瘍を形成することに成功している。さらに、申請者は piggyBac system と <i>in vivo</i> エレクトロポレーションを組み合わせることで <i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルの構築も進めている。具体的には、2 種類の piggyBac system 用 plasmid (Transposase 発現ベクターならびに K-RAS V12 と sh<i>Cdkn2a</i> を同時に発現するベクター)をガラスキャピラリーで野生型マウス新生児脳室に直接インジェクションし、NSCs が存在する側脳室に遺伝子導入するために電極を当てて <i>in vivo</i> エレクトロポレーションを行い、脳腫瘍の形成に成功している。形成された脳腫瘍は病理学的所見より、移植モデル同様にヒト GBM と似た特徴を示し、免疫組織化学的所見から Nestin(未分化マーカー)陽性部位と Gfap(アストロサイト)陽性部位が混在する不均一な腫瘍であった。本研究ではこれらの実験系を用いて、正常細胞や腫瘍形成過程における MTAP の機能解析を行った。マウス神経幹細胞に K-RAS V12 を強制発現させると、活性酸素の増強に伴い <i>Cdkn2a</i> 遺伝子の発現が誘導される。同時に <i>Mtap</i> 遺伝子発現も解析したところ、<i>Cdkn2a</i> 遺伝子に比べると穏やかではあるが <i>Mtap</i> 遺伝子についても発現誘導が見られた。現在はこの発現誘導機序について解析を進めながら、<i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルで <i>Mtap</i> 遺伝子を強制発現/発現抑制させることで腫瘍形成能への影響を詳細に解析したいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Development of a functional thyroid model based on an organoid culture system. Saito Y et al. <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> 497(2):783-789. 2018 2. Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rhomboid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells. Ishimoto T et al. <i>Gastroenterology.</i> 153:191-204.e16. 2017	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

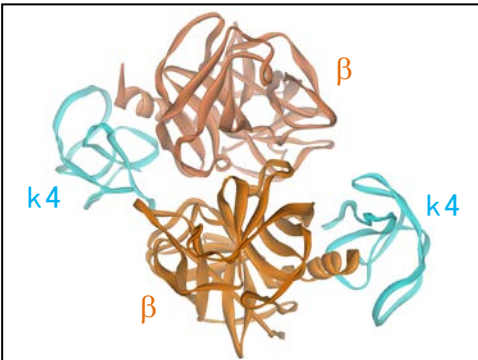
研究課題		抗がん免疫応答におけるケモカイン受容体 XCR1 発現樹状細胞および XCR1 の機能的意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・教授・改正 恒康
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・准教授・邊見 弘明
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	樹状細胞 (DC) は、抗原提示細胞として機能し、抗がん免疫に重要な役割を果たすが、機能的特性の異なるいくつかのサブセットに分けられる。本研究では、細胞傷害性 (CD8) 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 がん自然発症モデルの実験系を確立し、XCR1+DC を選択的かつ構成的に欠失するマウス (XCR1-DTA マウス) を用いて、がん発症における XCR1+DC の機能的意義の解明を進めている。まず、Azoxymethane を腹腔内注射後、DSS を経口投与し、大腸がんを誘発させるモデルで解析したが、XCR1-DTA マウス、コントロールマウスいずれにおいても大腸がんが発生し、その数や大きさは有意差は見られなかった。次に、APC 遺伝子のヘテロ変異 (APCΔ716) による腸管ポリープ、腺腫モデル (Oshima et al. PNAS 1995) にて解析するために、APCΔ716 マウスと XCR1-DTA マウスの交配を進めている。文献的には 20-30 週令で腫瘍が発生するが、当施設では 35 週を過ぎてはじめて腫瘍が発生することが分かってきた。さらに、DMBA+TPA の塗布による皮膚がんモデルの実験系の確立を進めている。 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 XCR1 のリガンド (マウス XCL1、mXCL1) の融合タンパク (mXCL1-OVA) は、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、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が、この抗がん効果は XCR1 欠損マウスで消失した。また、mXCL1-OVA を前投与した場合に、免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体) の効果の増強が認められた。これらの結果から、mXCL1-OVA の抗がん効果は XCR1 を介した作用であること、そして mXCL1-OVA は免疫チェックポイント阻害剤と併用できることが示された。	
【成果等】	【主な論文発表】 Brewitz, S. Eickhoff, S. Dähling, T. Quast, S. Bedoui, R. A. Kroczeck, C. Kurts, N. Garbi, W. Barchet, M. Iannaccone, F. Klauschen, W. Kolanus, T. Kaisho, M. Colonna, R. N. Germain, W. Kastanmüller. 2017. CD8+ T cells orchestrate pDC-XCR1+ dendritic cell spatial and functional cooperativity to optimize priming. Immunity 46:205-219.	
	【学会発表】 K. Negoro, M. Tane, M. Morinaka, Y. Fukuda, I. Sasaki, T. Kaisho. An Ets family member, Ets2 is required for Cholera toxin-induced arginase-1 gene expression. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017.12.12-14. Sendai, Japan. I. Sasaki, T. Orimo1, H. Hemmi, T. Ozasa, Y. Fukuda, S. Fukuda, T. Kaisho. Roles of arginine and methionine metabolism in cholera toxin-induced adjuvant effects. The 46th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology 2017.12.12-14. Sendai, Japan.	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

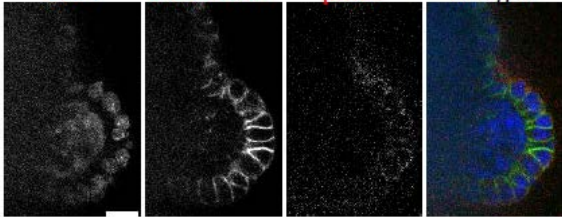
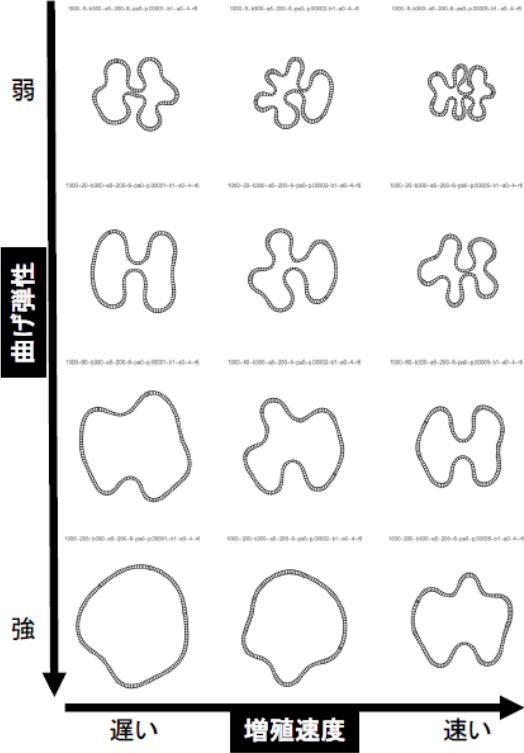
研究課題		上皮管腔形成とがん進展に関与する Src 制御タンパク質の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・助教・梶原健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	がんは発生過程で利用されていたシステムを悪用して浸潤していると考えられている。そこで、正常細胞の三次元組織形成（上皮管腔形成）の分子メカニズムを明らかにして、そこからがん細胞の浸潤にアプローチすることを目指した。申請者が見いだした Rsp1 は肝細胞増殖因子（HGF）による上皮管腔形成の初期過程に重要なタンパク質である。Rsp1 は HGF レセプターの Met と協調してシグナル伝達経路を制御することで、形態変化に関与していることが明らかになっている。一方、腎細胞がんにおいて Rsp1 と Met がともに高発現の場合、単独高発現と比較して予後が極めて悪かった。しかし、その原因は不明である。本研究では、がん進展における Rsp1 の機能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。)	<u>Rsp1 の発現の確認</u> はじめに、がん細胞における Rsp1 の発現を解析した結果、多種類の高浸潤性のがん細胞で高発現であることが明らかになった。特に、トリプルネガティブ乳がん細胞では高発現が多く、MDA-MB-231 細胞では Rsp1 と Met がともに高発現であった。これに対して、比較的低浸潤性の乳がん細胞 MCF-7 や T-47D では両タンパク質とも低発現であった。これらの結果から、Rsp1 はがんの浸潤に重要である可能性が示唆された。 <u>Rsp1 ノックダウンがん細胞の解析</u> Rsp1 を siRNA でノックダウンした MDA-MB-231 細胞を作製した。コントロール細胞は HGF 処理によって形態がさらにスピンドル化し、ラメリポディアを多数形成するが、Rsp1 ノックダウン細胞ではそのような形態変化が抑制されていた。さらに HGF による浸潤能の亢進も、ノックダウンによって抑制されていた。これらの結果から、Rsp1 のノックダウンによって、HGF-Met システムの機能不全が生じている可能性が考えられた。 そこで、Rsp1 ノックダウン細胞の Met の発現量を解析したところ、その減少が確認された。次に、Met の局在を観察したところ、細胞膜から初期エンドソームに移行している様子が認められた。以上の結果から、Rsp1 は Met の細胞膜上での安定的局在に重要なタンパク質であり、Rsp1 が減少した場合には Met は分解系オルガネラに誤移行する可能性が示唆された。 <u>本研究成果のまとめと考察</u> Rsp1 は Met の細胞膜上での安定的局在に重要なタンパク質であり、HGF-Met システムの機能維持に重要である。がん細胞では、両タンパク質が高発現状態にあり、HGF 刺激をより高効率に授受する状態になっていると考えられる。これによって HGF によるがん細胞の浸潤の亢進が起こると推測される。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし 【学会発表】 口頭発表 1) 梶原健太郎. 上皮細胞の形態形成における活性化 Src の時空間的制御. 第 69 回日本細胞生物学会大会. 仙台国際センター. 2017 年 6 月 13 日 2) 梶原健太郎, 松本邦夫, 岡田雅人. 上皮形態形成における活性化 Src の時空間的制御. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム. 金沢東急ホテル. 2017 年 10 月 26 日 3) 梶原健太郎, 松本邦夫, 岡田雅人. 上皮形態形成における活性化 Src の時空間的制御. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸ポートアイランド. 2017 年 12 月 9 日 ポスター発表 4) 梶原健太郎. 上皮細胞の形態形成における活性化 Src の時空間的制御. 第 69 回日本細胞生物学会大会. 仙台国際センター. 2017 年 6 月 13 日 5) 梶原健太郎. 上皮形態形成における活性化 Src の時空間的制御. 第 9 回若手研究フォーラム. 大阪大学銀杏会館. 2017 年 9 月 20 日 6) 梶原健太郎, 松本邦夫, 岡田雅人. 上皮形態形成における活性化 Src の時空間的制御.	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸ポートアイランド. 2017 年 12 月 8 日 7) 杉原充哉, 梶原健太郎, 松本邦夫, 岡田雅人. がん進展における Src 局在化タンパク質と c-Met の機能解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会. 神戸ポートアイランド. 2017 年 12 月 6 日 8) 杉原充哉, 梶原健太郎, 松本邦夫, 岡田雅人. がん進展における Src 局在化タンパク質と c-Met の機能解析. 第 10 回若手研究フォーラム. 大阪大学銀杏会館. 2018 年 3 月 14 日
	【その他特筆事項】 アウトリーチ活動 ひらめき☆ときめきサイエンス（日本学術振興会）顕微鏡で見るがん細胞：がんの謎を探る. 大阪大学微生物病研究所. 2017 年 8 月 18 日

研究課題		HGF-Met 蛋白質間相互作用を制御するための構造基盤の構築と阻害剤設計
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授・木下誉富
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】	HGF (肝細胞増殖因子) は Met 受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGF は肝臓など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質である。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが、がん細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGF は様々ながんに対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met 受容体系はがんの浸潤・転移阻止につながる分子標的になる。したがって、HGF-Met 系を阻害する分子は、がんの浸潤・転移・成長阻害につながる新規がん分子になる。本研究はインシリコ創薬技術の中核として HGF と Met の相互作用面を標的とする低分子阻害剤の創成を目的としている。	
【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。)	HGF の β 鎖にある、Met 受容体の結合に関与する分子内ポケットの構造に着目したインシリコスクリーニングを行い、HGF-Met 結合阻害アッセイやバイオアッセイによってリード化合物を選択した。リード化合物の最適化のための主たる方法として、標的ポケット構造への化合物のフィッティング状態を分子レベルで明らかにし、Structure-Based Drug Design (SBDD) により標的分子への親和性や特異性を向上させる分子設計法を用いる。本研究ではリード化合物と HGF-β 鎖の結合様式の詳細を知るために、HGF/k4-β 鎖と阻害剤との複合体 X 線結晶構造解析を試みた。 九州工業大学・青木俊介准教授がインシリコ技術を駆使して見出した、HGF-Met 相互作用を阻害する注目化合物と HGF/β-k4 との複合体について結晶を調製した。高エネルギー研究所 BL17A において 3.55 Å 分解能までの X 線回折データを収集し、分子置換法による結晶構造解析を行った。低分解能解析にもかかわらず、β 鎖及び k4 ドメインの主鎖構造を決定することができた (図 1)。結晶中では β 鎖の Met 結合部位が向かい合った、擬似的ダイマー構造を形成していることがわかった。しかしながら、アミノ酸側鎖の大部分と化合物に相当する電子密度は観測されず、全構造解析には至っていない。今後は結晶化条件の最適化あるいは宇宙実験などを行いながら良質結晶を調製し、高分解能構造解析を進めて、化合物の結合様式を明らかにする。	
	 図 1 HGF-k4 複合体の構造	
【成果等】	【主な論文発表】 1. A. Nishiyama, T. Yamada, K. Kita, R. Wang, S. Arai, K. Fukada, A. Tanimoto, S. Takeuchi, S. Tange, A. Tajima, N. Furuya, T. Kinoshita, S. Yano, Foretinib overcomes entrectinib resistance associated with the <i>NTRK1</i> G667C mutation in <i>NTRK1</i> fusion-positive tumor cells in a brain metastasis model, <i>Clin. Cancer Res.</i>, in press. 2. T. Kinoshita, T. Hashimoto, Y. Sogabe, H. Fukada, T. Matsumoto, M. Sawa, High-resolution structure discloses the potential for allosteric regulation of mitogen-activated protein kinase kinase 7, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 493, (2017) 313-317. 【学会発表】 1. 木下誉富、宇宙実験による MAP2K7 キナーゼの結晶高品質化及び高分解能 X 線構造解析、AIST/JAXA 研究交流会～産学それぞれの立場から見たタンパク質結晶構造解析への期待～、東京 【その他特筆事項】 3. 木下誉富、キナーゼを標的とした構造生物学および創薬の現状、<i>日本結晶学会誌</i> 59, (2017) 174-181.	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		マウス消化管腫瘍の形態の複雑さを制御する分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学 病理学 I・教授・清川悦子
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学 病理学 I・助教・市川壮彦
	所属・職名・氏名	九州大学大学院医学研究院 系統解剖学分野・助教・今村（滝川）寿子
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	転移能を有する腫瘍は、マウスの原発巣においても、培養した類器官においても腺管構造が複雑になる傾向がある。これまでの共同研究において確立した、腺腫形成マウスからの類器官の数日間のライブイメージングによって、悪性度の低い類器官では細胞増殖に伴ってほぼ球形の類器官の径が大きくなった後、内腔が保持されないために縮んで腺管が陥入するのに対し、複数の遺伝子変異を導入した悪性度の高い類器官では、小さい管腔構造を基底側に複数形成し、複雑な腺管を形成する傾向があることを明らかにしてきた。本申請課題では、この複雑な形態・動態を呈する機構を数理モデルを用いて明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】	DAPI E-Cadherin pMLC Merged  今村は、胎仔肺胞の形成過程の複雑な肺胞嚢の成り立ちを説明する数理モデルを構築した (Fumoto, Imamura, Development 2017)。肺胞嚢の形態が、悪性度の高い消化管腫瘍の類器官が呈する複雑な腺管と形態的に類似していることに着目し、肺形成の実験データおよび数理モデルでも重要なパラメータであったアピカル側のアクチン収縮が消化管類器官でも観察されるかをまず検討した。大島研究室で樹立されたマウス消化管腫瘍細胞株 AKTP (ApcD716/-, KrasG12D/+, Tgfβr2-/-, Trp53R270H/-; Sakai, Can Res., 2018) から類器官を作製しアクチン収縮のマーカーとして、リン酸化 Myosin Light Chain (pMLC) に対する抗体で染色したが、基底側あるいはラテラル側に染色されることがほとんどであり、アピカル側で染色されることはなかった (左上図)。 そこで、アピカル側での収縮を介さないモデルとして、曲げ弾性 (細胞形状制御の程度) と増殖速度をパラメータに組み込んだ数理モデルを構築した (左図)。曲げ弾性が弱く、細胞増殖が速いと複雑な腺管を形成することがわかった。曲げ弾性とは「類器官外周の硬さ/柔らかさ」を表現するものであるが、「細胞が揃った形を保つ制御の強さ」とも解釈できる。つまり曲げ弾性が弱い条件では、細胞形状が比較的自由に変わるといえる。データは載せていないが、曲げ弾性が強い場合、内腔の面積 (類器官では体積に相当) を一定に保持することが変形するために必要であることがわかった。この数理モデルを検証するためには、曲げ弾性の指標として計測すべきパラメータを決めることが必要であるが、現時点では候補が絞れておらず、今後継続して進めていく予定である。 	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 市川 壮彦、中山 瑞穂、坂井絵梨、今村（滝川）寿子、大島 正伸、清川 悦子 「腸管オルガノイドを用いた腫瘍形成過程の観察」 平成 29 年度 共同利用・共同研究拠点シンポジウム・成果発表会 平成 29 年 10 月 金沢	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		APC (adenomatous polyposis coli)変異マウスの腫瘍形成における遺伝子型-表現型相関の分子機構の解析 (継続)
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・ユニットリーダー・清末優子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	理化学研究所・テクニカルスタッフ・野木泰作
	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	教授・大島正伸
【研究目的】	我々は、腫瘍形成／発がんにつながる APC 変異を有する培養非がん細胞モデルを用いて、APC 変異に起因する染色体分配エラーの原因となる分子機構を明らかにしてきた。この現象が、腫瘍進展や発がんの過程にどのように関与しているのかを調べるため、大島研究室より <i>Apc^{Δ716}</i> マウス試料の提供を受け、腸管切片の蛍光免疫染色による分子機能／活性測定や、組織から抽出したゲノム DNA の解析を行う。	
【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。)	今年度も前年度に引き続き、<i>Apc^{Δ716}</i> マウスを用いて、遺伝的不安定と細胞の悪性化に関わる分子メカニズムの研究を行った。 腫瘍における染色体再編成の存在やパターンを調べるため、<i>Apc^{Δ716}</i> マウスの小腸ポリープから抽出したゲノムのアレイ CGH (array-based comparative genomic hybridization) 解析を行ったところ、増幅または欠失しやすい領域が認められ (図 1)、そのような領域に腫瘍の増大や悪性化に関連する遺伝子が存在する可能性が考えられた。<i>Apc^{Δ716}</i> マウスから採取した初代培養細胞の表現型解析を行うと (図 2)、細胞機能と染色体の増減との間の関連性を見出すことができた。 がん細胞の多くは、細胞種や系列に依存して特異的な染色体再編パターンをとりやすいことが報告されてきたが (Beroukhi et al., Nature 463, 899–905, 2010)、その原因となるメカニズムと腫瘍の悪性化との関係はほとんど不明なままであった。今回 <i>Apc^{Δ716}</i> マウスを用いて得られた知見から、がん細胞が生存に有利な遺伝子型を獲得する新規なメカニズムの発見につながった。 今回の知見に基づき、<i>Apc^{Δ716}</i> マウスを用いて今後さらに、染色体異常を容認して細胞の悪性化を促進する、細胞がん化において最も根源的であり、しかし未解明のまま残されている機構の解明を目指していく所存である。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	- 金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム／ポスター発表“APC 変異腫瘍における反復性遺伝子コピー数変異の 2 段階メカニズム” 清末 優子, 2017/10/25-26 (金沢) - 第 4 回理研/カロリンスカ研究所/SciLifeLab 合同シンポジウム／ポスター発表 “A two-step mechanism for recurrent somatic copy number alteration in APC mutant tumours” Yoshihiro Kawasaki, Tomoko Hamaji, Koji Owada, Taisaku Nogi, Yuping Wu, Miwa Okada, Yuta Kouyama, Atsushi Niida, Koshi Mimori, Toshihiko Kuroda, Takao Senda, Miho Ohsugi, Katsumi Fumoto, Akira Kikuchi, Per O. Widlund, Kazuyuki Kiyosue, Norio Yamashita, Masahiko Morita, Hideo Yokota, Satya N. V. Arjunan, Wei-Xiang Chew, Koichi Takahashi, Wesley R. Legant, Bi-Chang Chen, Eric Betzig, Ron Smits, Riccardo Fodde, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima,

図1)
aCGH 解析事例

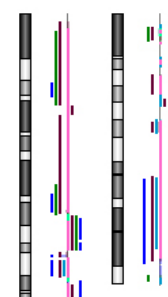
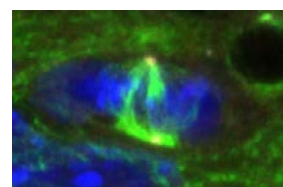


図2)
腫瘍細胞の分裂像
染色体 微小管 中心体



	M. Mark Taketo, Tetsu Akiyama, Yuko Mimori-Kiyosue, 2017/11/16-17 (神戸) 3. 2017 年度生命科学学会合同年会／ポスター・口頭発表 “格子光シート顕微鏡により取得した細胞分裂装置 3 次元動態の時空間情報解析” 山下 典理男, 森田 正彦, Wesley R. Legant, Bi-Chang Chen, Eric Betzig, 横田 秀夫, 清末 優子, 2017/12/6-8 (神戸) 4. 日台ナノメディシンシンポジウム／口頭発表 “Identification of a Key Molecular Pathway that Contributes to Recurrent Somatic Copy Number Alterations Using Lattice Light-sheet Microscopy” Yuko Mimori-Kiyosue, 2018/1/25-26 (神戸) 5. 第 5 回バイオナノフォトニクス研究会 “格子光シート顕微鏡による超解像 3D ライブイメージングー 次世代ライブイメージングの今後の展望 ー” 清末優子, 2018/3/16 (大阪) 【その他特筆事項】 1. 本共同研究による主要な論文は現在投稿中である。 2. 本共同研究により化合物ライブラリーの提供を受けているが、今年度報告書の作成時点では実験が完了していないため、今回は報告することができなかった。 3. プレス発表：産経新聞連載エッセイ“細胞の秘密を探す旅” 清末 優子, 2017/11/9 朝刊 24 面
--	--

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞形質を指標とした薬剤耐性にかかわるシグナル制御機構の解明
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研究分野・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	教授・後藤典子
【研究目的】	報告者らは、悪性度の高い肺腺がんである浸潤性粘液腺がんの 5-15%において NRG1 融合遺伝子が認められることを見出した(Nakaoku T, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2014)。さらに、NRG1 遺伝子にコードされる neuregulin 1/heregulin タンパク質は、HER2/HER3 受容体のリガンドとして機能し、NRG1 融合遺伝子産物は NK-κB シグナルを介し IGF2 の発現を亢進させることにより、がん細胞の幹細胞様形質を増強することを明らかにした (Maruyama T, Nakaoku T, et al, <i>Cancer Res.</i> 2016)。一方で、RET 融合遺伝子は肺腺がんの 1~2%に認められる遺伝子異常であり、RET チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) へ有効性を示す。しかしながら、RET-TKI に対して抗腫瘍効果が認められた症例でも、数ヶ月程度で薬剤耐性が出現する。<u>最近、我々は RET 融合治療後の耐性獲得症例の資料を解析する中で新たに同定した 2 次変異 S904F が薬剤耐性に寄与することを報告した (論文 2)。</u>しかしながら、治療耐性例で 2 次変異を認めない場合もあり、その他の機序による耐性機構獲得の可能性も示唆されており、引き続き、シグナル変化に係る薬剤耐性機構の解明も求められている。本研究では、RET 融合遺伝子陽性肺がんの薬剤耐性を対象に、耐性に係るシグナルの変化を明らかにし、その制御に向けた知見を得ることを目標にしている。	
【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。)	現在市販されている唯一の RET 融合遺伝子陽性ヒト肺がん細胞である LC-2/ad を用いて、バンデタニブおよびカボザンチニブ等の複数の RET 阻害剤に対する薬剤耐性株を樹立した。臨床応用の期待される RET 阻害剤に対する耐性株をすでに樹立した。これらの LC2/ad 耐性細胞株に対して、癌関連遺伝子 50 個のホットスポットを調べるターゲットシークエンスを行ったが、遺伝子変化は認めなかった。バイパス経路の探索のため、抗体アレイを行い、耐性細胞では複数のキナーゼタンパク質の活性化が認められた。また、シグナル変化をもたらす細胞内の発現機構を見るために、アレイ型のマルチレポーターアッセイを行い、NF-κB を含む複数の転写因子の活性型認められた。 また、LC2/ad 親株に対して、活性化の認められた受容体に作用するリガンド加えることで、薬剤感受性は実際に低下していた。現在、RET 阻害剤に対する耐性機構を、主に増殖因子や細胞内シグナルによるサーキット形成に関わる候補を探索している。同定している候補因子には、がん幹細胞様形質の獲得に寄与することが報告されているものもあり、今後はその関与について機能的な機構について研究を続ける。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Murayama T, Nakaoku T (co-first author), ... Kohno T*, Gotoh N*(co-corresponding author). Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, <i>Cancer Res.</i> 2016, 15;76(4):974-83.(本共同研究支援による発表)。 2. Nakaoku T, Kohno T*, et al. A Secondary RET Mutation in the Activation Loop Conferring Resistance to Vandetanib. <i>Nature Communications.</i> 2018, 9, 625 【学会発表】 1. RET 融合遺伝子陽性肺がんにおける薬剤耐性メカニズムの解明, ポスター、中奥 敬史、大塚 綾香、河野 隆志、第 76 回日本癌学会学術総会、2017/09/29、国内 2. Identification of mechanisms of drug resistance in RET-rearranged lung cancer. ポスター、中奥 敬史、河野 隆志、18th World Conference on Lung Cancer、2017/10/10、国内 3. RET 融合遺伝子陽性肺がんにおける薬剤耐性メカニズムの解明, ポスター、中奥 敬史、河野 隆志、第 58 回日本肺癌学会学術総会、2017/10/14、国内 【その他特筆事項】 なし	

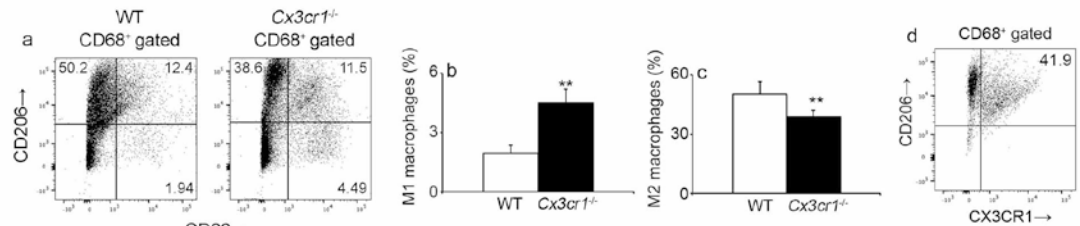
平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍幹細胞を標的とした造血器腫瘍の治療戦略の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	佐賀大学・准教授・小島研介
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・平尾 敦
【研究目的】	BMI-1 (Nature 2003;423:255) は FOXO (Nature 2010;463:676) と並び、がん幹細胞の維持に必須とされる。FOXO と BMI-1 は、いずれもミトコンドリア膜電位安定にかかわる MCL-1 の発現制御に関係するが、MCL-1 は急性白血病、一部の悪性リンパ腫のがん幹細胞で高発現が認められ (Blood 2009;114:5034)、造血器腫瘍の治療標的として期待される分子である。本研究では、BMI-1 阻害治療による造血器腫瘍の治療戦略の可能性について検証をおこなった。	
【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。)	【急性骨髄性白血病について】 急性骨髄性白血病については BMI-1 タンパク発現量が予後を規定することを明らかにし、その阻害により腫瘍細胞のミトコンドリア細胞死を p53 非依存性に誘導することを示した。患者白血病細胞において、より幼弱な CD34+C38low/- の幹細胞分画が BMI-1 阻害に対して感受性が高いこと、さらに細胞死は PI3K-AKT 阻害による MCL-1 発現抑制によって誘導されることを明らかにした。本研究成果は、Blood Cancer J. 2017;7(2):e527 に論文報告した。 【悪性リンパ腫について】 悪性リンパ腫については、予後不良でかつ腫瘍発生メカニズムが比較的均一なマンツル細胞リンパ腫 (MCL) を対象に検討をおこなった。MCL は t(11;14) と Cyclin D 過剰発現を特徴とする難治性腫瘍で、再発例に BTK 阻害剤 ibrutinib (IBR) が保険適用となったが、単剤での効果は持続せず、有効な治療戦略の確立と耐性克服が求められる。BMI-1 はがん幹細胞 (CSC) の生存・維持に重要である。MCL では CSC が side-population (SP) 分画に含まれ、この分画、特に再発時に BMI-1 発現が増加する。PTC596 は新規に合成された BMI-1 阻害剤である。PTC596 は固形癌を対象にした第一相試験で安全性が確認され、推奨第 2 相投与量 (RP2D) も決定されているから、臨床応用を念頭に抗腫瘍効果を検証した。PTC596 は MCL 細胞に対する増殖抑制効果と細胞死誘導効果を示し、BMI-1 の基礎発現量が多いほど、PTC596 感受性が増加した。PTC596 感受性は p53 の変異ステータス、基礎タンパク量の影響を受けなかった。IBR に比較して PTC596 は SP 分画を高率に減少させ、これらの併用はミトコンドリア細胞死経路を増強した。本研究成果は、Oncotarget に修正投稿中である。 【今後の展開】CSC を標的とした分子標的治療は既存治療の限界を打破する、もしくはその治療効果を増強する可能性があり、今後の臨床応用が期待される。	
【成果等】	【主な論文発表】 ・Nishida Y, Maeda A, Kim MJ, Cao L, Kubota Y, Ishizawa J, AlRawi A, Kato Y, Iwama A, Fujisawa M, Matsue K, Weetall M, Dumble M, Andreeff M, Davis TW, Branstrom A, Kimura S, <u>Kojima K</u>. The novel BMI-1 inhibitor PTC596 downregulates MCL-1 and induces p53-independent mitochondrial apoptosis in acute myeloid leukemia progenitor cells. Blood Cancer J. 2017;7(2):e527. 【学会発表】 ・<u>Kojima K</u>, Maeda A, Okamoto S, Nishida Y, Cao L, Weetall M, Branstrom A, Kimura S. Downregulation of BMI-1 by the small molecule PTC596 induces mitochondrial apoptosis in mantle cell lymphoma. 59th ASH Annual Meeting and Exposition (2017 年 12 月 9 日、アトランタ) ・前田綾、木村晋也、<u>小島研介</u>. Targeting of BMI-1 in mantle cell lymphoma. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年 9 月 30 日、横浜) ・<u>小島研介</u>. 造血器腫瘍に対する BMI-1 標的治療戦略の可能性について。第 22 回造血器腫瘍研究会 (2018 年 1 月 26 日、横浜)。 【その他特筆事項】 Maeda A, Nishida Y, Kimura S, <u>Kojima K</u>. Targeting of BMI-1 by the novel small molecule PTC596 in mantle cell lymphoma. Oncotarget 修正投稿中。	

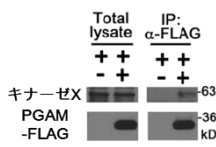
平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		EB ウィルス関連上咽頭癌におけるミトコンドリア変異と細胞競合現象に着目した新規治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院耳鼻咽喉科頭頸部外科・講師・近藤 悟
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医学系耳鼻咽喉科頭頸部外科・教授・吉崎 智一
	所属・職名・氏名	金沢大学医学系耳鼻咽喉科頭頸部外科・大学院生・井本 智子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	内因性免疫因子 APOBEC による mtDNA 変異導入と EBV 遺伝子の相乗作用により癌幹細胞が産生され、そこから遺伝子変異が蓄積され、腫瘍内癌細胞の多様性が形成されることを解明する。近年、癌細胞増殖は周囲の正常細胞との相互作用「細胞競合」によって規定されるという報告がなされた。2 種類の適応能力が異なる細胞が隣接して存在すると適応能力で勝る細胞(winner)が劣る細胞(loser)にアポトーシスを誘導し積極的に排除し、その空きスペースを winner が占拠して広がる。我々は上咽頭癌組織において癌周囲の正常細胞が loser となりつつもアポトーシス抵抗性因子 Sparc を発現していること、即ち正常細胞は癌細胞相手にもただ負けていない事を明らかにした。浸潤増殖能に乏しい癌幹細胞は正常細胞との細胞競合で winner となり周辺領域を前癌細胞へと置換してゆく。mtDNA 変異が蓄積された腫瘍細胞はどの段階で、正常細胞から自分と異種であると認識して細胞競合現象を起こし出すのであろうか。これらの機構を解明し新規上咽頭癌の治療開発の礎をつく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。)	本年行ったこととしては、大きく二つに分けられる。 1) 上咽頭癌生検組織を用いた検討： 上咽頭癌生検組織における Sparc の発現と EBV 感染の指標である EBER の in situ hybridization を更に多数のサンプルで行い、腫瘍細胞には EBER が発現し、周囲の細胞には Sparc が強く発現することを確認した。また EBV 陰性上咽頭癌症例では、腫瘍周囲の細胞には Sparc の発現は弱く有意差を認めず、EBV 陽性の場合と EBV 陰性の場合では明らかに統計学的に差異を認めた。 2) EBV 遺伝子発現細胞の樹立： EBV 遺伝子発現細胞の作成を行った。当初の目的としては、EBV 遺伝子導入上咽頭癌細胞と EBV 遺伝子導入胃癌細胞の樹立を目的とした。EBV 陽性胃癌のウィルス感染様式は I 型である。I 型とは違い上咽頭癌の EBV 感染様式は II 型であり、I 型 II 型の EBV 感染様式の EBV 遺伝子発現の最大の違いは上咽頭癌の発癌ドライバー遺伝子である LMP 1 の発現にある。 一方、EBV 陽性の悪性腫瘍では EBV のノンコーディング RNA である EBERs が全ての感染様式で発現している。EBERs は EBV 関連悪性腫瘍では広く発がん性に関わっていると考えられる。EBV 遺伝子のターゲットとしてこの LMP1 と EBERs に着目した。 この 2 つの遺伝子を、北海道大学藤田教授より供与いただいたテトラサイクリンにより目的の遺伝子を発現させる pcDNA/TO/GFP ベクターに組み込み、上咽頭上皮細胞の AdAH, NP69T, MDCK 細胞に導入し、テトラサイクリン添加によってこれらの遺伝子を可逆的に発現する細胞株を樹立し、正常細胞のモデルには pc/DNA/TO ベクターに DsRed を組み込んだ細胞株を樹立した。 これらの樹立した細胞を用いて今後、タイムラプス顕微鏡下での観察を予定している。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		皮膚発がんにおけるケモカインシステムとマクロファージ極性に関する分子病理学的研究																									
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・助教・野坂みずほ																									
	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】	がん微小環境では、慢性炎症により組織の恒常性が失われ、腫瘍細胞と間質細胞とのクロストークが、がんの発症・進展に関与することが知られている。特に皮膚発がんにおけるマクロファージの役割は未だ不明な点が多い。マクロファージは単一の細胞集団ではなく、異なる性質を有する heterogeneity な食食単核細胞集団で、近年はM1・M2とマクロファージの極性が種々の疾患に関与することが知られている。そこで、皮膚発がん部におけるマクロファージの極性に着目し、M1・M2マクロファージ極性とケモカインレセプター発現との関連性について検討することにより、皮膚がんの発症の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。																										
【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) 遺伝子欠損マウス C57BL/6 マウスを遺伝子背景とする CX3C ケモカインレセプター-1(CX3CR1) 遺伝子欠損マウスを用いた。 2) 腫瘍形成 DMBA (100 μg/200 μl acetone)をマウス背部に塗布後、TPA (30 μg/200 μl)を 20 週連続塗布して腫瘍形成を誘導し、各マウスで腫瘍形成の状況を比較・検討した。 2. 研究成果 1) 野生型マウスにおいて TPA 塗布 2 および 10 週後において、皮膚組織における CCR5 の遺伝子発現が、未処理の皮膚組織と比較して有意に上昇していたことから、化学物質誘発皮膚発がんモデルにおいて 2)) 野生型マウスでは、肉眼的に乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から急激に顕著となり、20 週目では薬 80%のマウスに認められたが、K0 マウスでは乳頭腫形成が有意に少なく、約半数のマウスでしか乳頭腫がみられなかった 3) WT マウスでは F4/80 陽性マクロファージ浸潤が顕著に観察された。しかしながら、K0 マウスでは、マクロファージ浸潤が有意に減弱していた。 4) 皮膚組織に浸潤してきたマクロファージの極性について検討したところ、WT マウスでは M2 型マクロファージの浸潤が優位であった。一方、K0 マウスでは M1 型マクロファージの浸潤が優位であった(図 1)。また CX3CR1 発現が M2 型マクロファージの約 40%に認められた。  Figure 1 data summary: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Panel</th> <th>Condition</th> <th>Value</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">a (Flow Cytometry)</td> <td>WT CD68⁺ gated</td> <td>CD206⁺CD86⁻: 50.2%</td> </tr> <tr> <td>WT CD68⁺ gated</td> <td>CD206⁻CD86⁺: 1.94%</td> </tr> <tr> <td>Cx3cr1^{-/-} CD68⁺ gated</td> <td>CD206⁺CD86⁻: 38.6%</td> </tr> <tr> <td>Cx3cr1^{-/-} CD68⁺ gated</td> <td>CD206⁻CD86⁺: 4.49%</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">b (M1 macrophages %)</td> <td>WT</td> <td>~1.5%</td> </tr> <tr> <td>Cx3cr1^{-/-}</td> <td>~4.5% (**)</td> </tr> <tr> <td rowspan="2">c (M2 macrophages %)</td> <td>WT</td> <td>~50%</td> </tr> <tr> <td>Cx3cr1^{-/-}</td> <td>~35% (**)</td> </tr> <tr> <td>d (Flow Cytometry)</td> <td>CD68⁺ gated</td> <td>CD206⁺CX3CR1⁺: 41.9%</td> </tr> </tbody> </table>		Panel	Condition	Value	a (Flow Cytometry)	WT CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CD86 ⁻ : 50.2%	WT CD68 ⁺ gated	CD206 ⁻ CD86 ⁺ : 1.94%	Cx3cr1 ^{-/-} CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CD86 ⁻ : 38.6%	Cx3cr1 ^{-/-} CD68 ⁺ gated	CD206 ⁻ CD86 ⁺ : 4.49%	b (M1 macrophages %)	WT	~1.5%	Cx3cr1 ^{-/-}	~4.5% (**)	c (M2 macrophages %)	WT	~50%	Cx3cr1 ^{-/-}	~35% (**)	d (Flow Cytometry)	CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CX3CR1 ⁺ : 41.9%
Panel	Condition	Value																									
a (Flow Cytometry)	WT CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CD86 ⁻ : 50.2%																									
	WT CD68 ⁺ gated	CD206 ⁻ CD86 ⁺ : 1.94%																									
	Cx3cr1 ^{-/-} CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CD86 ⁻ : 38.6%																									
	Cx3cr1 ^{-/-} CD68 ⁺ gated	CD206 ⁻ CD86 ⁺ : 4.49%																									
b (M1 macrophages %)	WT	~1.5%																									
	Cx3cr1 ^{-/-}	~4.5% (**)																									
c (M2 macrophages %)	WT	~50%																									
	Cx3cr1 ^{-/-}	~35% (**)																									
d (Flow Cytometry)	CD68 ⁺ gated	CD206 ⁺ CX3CR1 ⁺ : 41.9%																									
【成果等】	【主な論文発表】 Ishida Y, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, Hemmi H, Sasaki I, Kaisho T, Mukaida N, Kondo T. Essential involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis via regulation of fibrocyte and M2 macrophage migration. Sci Rep. 2017 Dec 4;7(1):16833. doi: 10.1038/s41598-017-17007-8.																										
	【学会発表】 平成 29 年度はなし。																										
	【その他特筆事項】 平成 29 年度はなし。																										

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		PGAM による協調的解糖系制御解明と癌抑制の探求
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学医学部准教授 近藤祥司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学医学部ポスドク 三河拓己
	所属・職名・氏名	京都大学医学部実験補助 柴田瑛莉
	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】	ワールブルグ効果（解糖系亢進）は多くの癌で観察されるが、解糖系阻害剤の治療応用は道半ばである。解糖系を標的とする癌治療では重篤な副作用の危険性がある。この問題の克服には、癌特異的な解糖系代謝制御の深い理解が必要である。我々は、解糖系酵素 PGAM そのもののワールブルグ効果への関与に注目している。PGAM の病態に基づく制御機構を解明すれば、正常細胞での PGAM 活性を温存しつつ、PGAM を標的とした治療開発が可能となる。近年我々は、PGAM の新規結合タンパク(キナーゼ X)との協調作用による解糖系代謝調節という生命現象を見出した。これら基盤データを確立し、新規アプローチ（これら結合阻害）による癌抑制という新たな臨床応用を目指す。	
【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。)	PGAM は、解糖系酵素の 10 個の一つでしかない。しかし我々や他グループにより、PGAM の多面的生物学的効果（老化抑制、抗酸化力亢進、ミトコンドリア代謝抑制、解糖系代謝亢進、ペントースホスフェート経路活性化）が報告されている。我々も in vitro で PGAM 強発現による解糖系亢進・ミトコンドリア抑制効果(近藤他 Can Res 2005)を世界初報告したが、我々の心臓特異的 PGAM トランスジェニックマウスでは、ミトコンドリア代謝異常はあるが解糖系代謝は正常(奥田他 PlosONE 2013)で、in vitro データと乖離が見られた。 これらの知見より、PGAM による in vivo 生物学的効果の解明には、全身の網羅的解析が必要と考えられ、新たに PGAM-cKO マウスや全身発現型 PGAM-Tg マウスを作成し解析を進めている。現時点で意外だが、これら PGAM モデルマウスで in vivo 全身糖代謝（インスリン抵抗性、高脂肪負荷、経口糖負荷、ストレプトゾシン負荷など糖尿病や肥満検証など）は正常であった（未発表）。しかし我々は臓器・組織特異性の可能性を考慮し、最近 in vivo 皮膚での PGAM による劇的な代謝効果を見出した（未発表）。さらに、ある培養細胞でも in vivo 同様の PGAM による代謝効果の再現に成功した。これら in vivo と in vitro の条件を指標に、網羅的な分子探索を行い、新規 PGAM 結合因子としてキナーゼ X 同定に成功した。 実際、PGAM とキナーゼ X は免疫沈降法により、その結合が証明された(図 1、未発表)。さらに PGAM とキナーゼ X の共発現や、キナーゼ X 阻害剤による、協調的代謝制御効果も確認された（未発表）。よって今後はその分子メカニズムの解明が急務となる。  図 1 PGAM とキナーゼ X 結合	
【成果等】	【主な論文発表】 Lorente J, Velandia C, Leal JA, Garcia-Mayea Y, Lyakhovich A, Kondoh H, LLeonart ME. The interplay between autophagy and tumorigenesis: exploiting autophagy as a means of anticancer therapy. Biol Rev Camb Philos Soc. 2018 93, 1, P152-165 doi: 10.1111/brv.12337.	
	【学会発表】 2017 年 9 月 28 日 Novel regulation for glycolysis 日本癌学会 横浜 2017 年 7 月 14 日 細胞老化における解糖系代謝とメタボライト がん代謝研究会 札幌 2017 年 3 月 3 日 Metabolites in organismal ageing & Glycolysis in cellular senescence Asian Society of Aging Research 札幌	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		固形がんの抗がん剤抵抗性に関わる新たな分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・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・後藤典子
【研究目的】	がん治療において、分子標的薬の持つ特異性と抗がん剤の持つ汎用性という一見矛盾する特性を持つ治療法の開発が望まれる。我々は MT1-MMP/Mint3 ががん組織特異的に HIF を活性化することを明らかとしてきた。HIF は抗がん剤耐性や幹細胞性に関わる遺伝子の発現を制御することから、MT1-MMP/Mint3 阻害と抗がん剤併用はがん組織特異的な細胞障害が期待される。そこで本研究では、MT1-MMP/Mint3 による HIF 活性化が固形がんの抗がん剤抵抗性にどのように関わるかを明らかにすることで、がん組織標的薬によるターゲティングと抗がん剤による細胞傷害作用を組み合わせた新たな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。)	・Mint3 ノックダウン細胞の樹立 がん細胞における MT1-MMP/Mint3 による HIF 活性化機構と抗がん剤抵抗性について解析を行うため、レンチウイルスベクターを用いて、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231、MDA-MB-468、ヒト上皮様細胞がん A431 細胞の Mint3 安定ノックダウン細胞を作製した。 ・Mint3 ノックダウン細胞を用いた in vitro での抗がん剤抵抗性の解析 まず、MDA-MB-231 細胞の in vitro でのドキソルビシン感受性について MTT アッセイを行った。Mint3 のノックダウンは MDA-MB-231 細胞の in vitro でのドキソルビシン感受性に影響を与えなかった。 ・Mint3 ノックダウン細胞を用いた in vivo での抗がん剤抵抗性の解析 次に、コントロールおよび Mint3 ノックダウン MDA-MB-231 細胞をヌードマウス皮下に移植し、マウスにドキソルビシンを投与した。その結果、コントロールに比べ Mint3 ノックダウン細胞ではドキソルビシン投与により腫瘍退縮がより顕著に起こったことから、Mint3 が in vivo でのドキソルビシン感受性に関わっていることが示唆された。そこで、コントロールおよび Mint3 ノックダウン MDA-MB-231 細胞の腫瘍の遺伝子発現についてアレイ解析を行った。その結果、抗がん剤耐性との関連が報告されている遺伝子 X の発現が Mint3 ノックダウン腫瘍で有意に低下していた。一方、in vitro での培養下では遺伝子 X の発現は腫瘍に比べて低く、Mint3 ノックダウンによる発現の影響を受けなかった。以上のことから、遺伝子 X が in vivo の環境特異的に Mint3 により発現誘導される可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸鋸歯状腺腫を前癌病変とする大腸発癌機構の分子学的解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学大学院循環器病態内科学・医員・澤田 武
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・大学院生・中西宏佳
	所属・職名・氏名	札幌医科大学・教授・佐々木泰史
	所属・職名・氏名	札幌医科大学・講師・山本英一郎
	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】	大腸鋸歯状ポリープの一つである、鋸歯状腺腫 (traditional serrated adenoma, TSA) の分子学的発癌機構を明らかにすること。臨床検体を用いて、従来 TSA の発癌への関与が示唆されている Wnt 経路関連分子を対象として、遺伝子変異、遺伝子メチル化の解析を行う。また、拡大内視鏡、narrow band imaging (NBI) を含む内視鏡所見、免疫組織化学を含む病理組織学的所見との統合解析により、発癌可能性の高い TSA の内視鏡所見を同定し、早期治療の対象と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。)	研究協力施設の倫理審査委員会の承認を得て既に採取され、保有している鋸歯状病変 78 病変のパラフィン包埋、ホルマリン固定 (FFPE) 標本を対象とした。病変の内訳は、TSA 36 病変、無茎性鋸歯状腺腫 (SSA) 18 病変、microvesicular type の過形成性ポリープ 22 病変、腺腫成分を伴った鋸歯状病変 2 病変であった。 FFPE 薄切標本から DNA を抽出した。従来、大腸進行癌で変異が報告されている <i>APC</i>, <i>TP53</i>, <i>KRAS</i>, <i>BRAF</i>, <i>RNF43</i> などに加えて、鋸歯状病変で発癌への関連が示唆されている Wnt 経路関連遺伝子である <i>CTNNB1</i>, <i>AXIN2</i>, <i>DKK1-4</i>, <i>FAM123B</i>, <i>ARID1A</i>, <i>TCF7L2</i>, <i>SOX9</i> など、計 39 遺伝子のパネルを作成し、次世代シーケンサーで変異解析を行った。 <i>BRAF</i> 遺伝子変異は TSA の 64%、SSA の 78% にみられた。一方、<i>KRAS</i> 遺伝子変異は TSA の 31%、SSA の 6% にみられた。Wnt 経路関連遺伝子の変異は TSA の 58%、SSA の 28% に認められ、鋸歯状病変でも、より TSA の発癌への関連が示された。今後、各遺伝子の遺伝子座のコピー数変化の解析も加えて詳細な検討を行う。 また、申請者らが従来から鋸歯状病変において解析してきた、癌関連遺伝子 (<i>SFRP1</i>, <i>SFRP2</i>, <i>IGFBP7</i>, <i>miR-34b/c</i>, <i>LRP1B</i>, <i>GALNT14</i>) と、ゲノムワイドなメチル化の指標となる CpG island methylator phenotype (CIMP) のマーカー遺伝子 (<i>MINT1</i>, <i>MINT2</i>, <i>MINT12</i>, <i>MINT31</i>, <i>MLH1</i>, <i>CDKN2A</i>) のメチル化の定量的解析をパイロシーケンス法によって行う予定である。 さらに、鋸歯状病変において特異的に発現すると報告されている annexin A10 (ANXA10)、TSA 特異的なメチル化が報告されている <i>SMOC1</i> の免疫組織化学を行う。そして、遺伝子変化、メチル化、免疫組織化学の結果を統合的に解析し、TSA の発癌メカニズムの解明を行う。最終的には、遺伝子変化と内視鏡所見、免疫組織化学を含む病理組織所見とを比較することによって、より発癌可能性が高い TSA を拡大内視鏡、NBI 観察を含む内視鏡所見から予測することが可能かどうかを検討する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 平成 30 年度の日本消化器病週間 (消化器病学会総会)、日本癌学会、欧州消化器病週間で発表する予定である。	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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・教授・松田史生
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士前期課程学生・荒木千絵
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士前期課程学生・上原ひかる
	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。昨年度までに、中枢代謝物質中の ^{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、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。本年度では、これまで確立した手法を用いて、p53 欠損マウス軟部腫瘍由来細胞株と p53 変異体のフラックス比較解析、および、異なるがん種の細胞に対して代謝フラックス解析を実施した。また、標的代謝酵素の阻害を予測することを目的として代謝シミュレーション解析法を基盤構築を行った。	
【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。)	がん幹細胞仮説をシステム生物学的に解析し、がん悪性進展制御法の新たなブレークスルーに繋げることを目指し、中心代謝のフラックス解析システムを構築し、これを用いてがん細胞の中枢代謝の代謝フラックス解析を行った。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を行った。[1-^{13}C]グルコースを投与した p53 ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株(p53KO) から、細胞内代謝中間体を経時的に回収し、GC-MS を用いて ^{13}C 標識濃度を測定した。経時変化データから解析プラットフォーム(OpenMebius)を用いて代謝フラックス分布を推定した。続いて、この細胞に正常な p53 の機能を一部保持した p53 変異体を再構成し、^{13}C 代謝フラックス解析を行った。その結果、変異型 p53 再構成株ではコントロール株に対して、ペントースリン酸経路のフラックスには変化がないのに対し、解糖系のフラックスは 83%に減少していた。また、グルタミンの取り込みは 80%に減少しており、TCA サイクルやリンゴ酸酵素のフラックスも 70%程度に減少していた。 次に、異なるがん種の細胞の代謝を解析することを目的としてヒトがん細胞 3 株の代謝フラックス分布を推定することを試みた。MCF7 (ヒト乳がん由来細胞株)、HeLa (ヒト子宮頸がん細胞株)、HepG2 (ヒト肝がん由来細胞株) を培養した。[1-^{13}C] グルコースを含む培地で培養し、代謝フラックス分布を推定に成功した。解糖系とペントースリン酸経路の分岐比はおよそ 9:1 と 3 株間で大きな差はなかったが、TCA サイクルに流入する代謝フラックスに株間で変化が見られた。3 株ともにリンゴ酸 NADP⁺オキシダーゼが触媒する反応が NADPH の主な供給源であることが推測された。 これらの代謝フラックスをシミュレーションで予測することが可能となれば、予測結果を用いて様々ながんの代謝のステート遷移、環境の違いや遺伝子に変異が入った際の代謝の変化を議論することが可能となり、引いては、がんの悪性進展メカニズムの理解や新しい創薬のアプローチにつながることを期待される。本研究では、これらの目的に対してがん細胞の代謝を予測することにつながるゲノムワイドな代謝反応を計算機上で統一的に取り扱うことが可能な代謝プラットフォームを構築した。異なるがん種の代謝フラックスを説明することが可能となる動作原理について議論可能なプラットフォームが構築できた。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Fumio Matsuda, Yoshihiro Toya, Hiroshi Shimizu, Learning from quantitative data to understand central carbon metabolism, <i>Biotechnology Advances</i>, 35, 971-980 (2017) 【学会発表】 1. 上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、高橋智聡、清水浩、^{13}C 代謝フラックス解析によるがん細胞中心代謝株間比較、第 65 回質量分析総合討論会 2017 つくば、つくば国際会議場エポカルつくば、5 月 17-19 日 2017 年 2. 前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、清水浩、代謝阻害剤投与直後のがん細胞中心代謝変動の ^{13}C-代謝フラックスシフト解析、第 65 回質量分析総合討論会 2017 つくば、つくば国際会議場エポカルつくば、5 月 17-19 日 2017 年	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	3. 荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、清水浩、抗がん剤処理によるがん細胞代謝フラックス変動の解析、第 5 回がん代謝研究会、北海道大学、7 月 13 日、14 日 2017 年 4. 上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、高橋智聡、清水浩、¹³C 代謝フラックス解析を用いた中央代謝のがん細胞株間比較、第 5 回がん代謝研究会、北海道大学、7 月 13 日、14 日 2017 年 5. 岡橋伸幸、河野晋、松田史生、高橋 智聡、清水 浩、<i>In vitro</i> 腫瘍細胞における中心代謝経路の ¹³C 代謝フラックス解析法の構築、第 42 回日本医用マスペクトル学会年会、一橋講堂、9 月 14 日、15 日 2017 年 6. 上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、河野晋、松田史生、高橋智聡、清水浩、がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明、金沢大学がん進展制御研究所国際シンポジウム、金沢市、10 月 25 日、 2017 年 7. 荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、清水浩、パクリタキセル処理に対するヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 の代謝アダプテーション、第 11 回メタボロームシンポジウム、ホテル阪急エキスポパーク、11 月 13-14 日、 2017 年 8. 上原 ひかる、荒木 千絵、前田 昂亮、岡橋 伸幸、松田 史生、清水 浩、がん細胞株間の中央代謝フラックス比較、第 11 回メタボロームシンポジウム、ホテル阪急エキスポパーク、11 月 13-14 日、 2017 年
	【その他特筆事項】

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		線維芽細胞による ECM 代謝を介した腫瘍形成・がん幹細胞維持機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・講師・下田将之
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・准教授・大塚崇
	所属・職名・氏名	順天堂大学・客員教授・岡田保典
	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】	がん組織はがん細胞と間質成分から構成され、間質成分としては線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞などの多種の細胞、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックスが含まれる。その中でも、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) は腫瘍間質の主要な構成成分であり、がんの進展に関わることが知られている。本研究では、マイクロアレイデータに基づきマウスおよびヒト由来 CAF において高発現するメタロプロテアーゼを同定・検証を行うとともに、がん (幹) 細胞 - 間質相互作用における CAF 特異的メタロプロテアーゼの役割とその分子機構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。)	CAF はがん間質の主要な構成成分であり、種々のがん組織において、CAF の存在が悪性度と相関していることが報告されている。我々は、これまで内因性のメタロプロテアーゼ阻害因子である Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) 分子を欠損した <i>Timp</i> 欠損線維芽細胞の解析を行い、 <i>Timp</i> 欠損線維芽細胞がメタロプロテアーゼ活性依存的にヒト CAF に類似した活性化線維芽細胞形質を呈することを報告してきた。CAF 形質維持にはメタロプロテアーゼ活性が重要と考えられるが、本活性を制御する CAF 由来メタロプロテアーゼについては明らかとなっていない。本研究では、マイクロアレイデータに基づきマウス由来 CAF において発現が変動するメタロプロテアーゼおよび TIMP 分子の探索を行い、数種のメタロプロテアーゼがマウス由来 CAF において高発現していることを見出した。マウス由来 CAF において高発現するメタロプロテアーゼのうち matrix metalloproteinase-13 (MMP-13) はヒト肺がん由来初代培養 CAF においても発現上昇が見られるとともに、その発現レベルは CAF マーカーの一つである alpha-smooth muscle actin (α -SMA) の発現レベルと正の相関が認められた。さらに、腫瘍形成における間質細胞由来 MMP-13 の役割を解析するため、マウスがん細胞株を野生型あるいは <i>Mmp13</i> 遺伝子欠損マウスの皮下に移植し、それぞれのマウスにおける腫瘍発育や組織学的な変化を観察・比較した。野生型マウスでは明瞭な腫瘍が形成されるのに比べて、 <i>Mmp13</i> 遺伝子欠損マウスでは腫瘍の有意な縮小が認められるとともに、組織学的に α -SMA 陽性間質細胞の減少が見られた。以上の結果から、MMP-13 は CAF 形質維持や腫瘍形成において重要な役割を果たしている可能性があることと示唆される。現在野生型および <i>Mmp13</i> 遺伝子欠損線維芽細胞を用いて、腫瘍形成およびがん (幹) 細胞 - 間質相互作用における CAF で発現する MMP-13 の意義について解析を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】 Shimoda M. Khokha R. Metalloproteinases in extracellular vesicles. <i>Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.</i> 2017;1864:1989-2000.	
	【学会発表】 下田将之 、依田昌樹、大塚崇、岡田保典 線維芽細胞による ECM 代謝を介した腫瘍形成・がん幹細胞維持機構の解明。金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム。2017 年 10 月 26 日	
	【その他特筆事項】	

研究課題		潜在転移乳がん細胞の幹細胞性を特徴づける MEF 2 シグナルの解析
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・下野洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・特任助教・西村建徳
	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	神戸大学大学院医学研究科・教授・南博信
	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・鈴木 聡
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	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、再発転移に中心的な役割をもつ「潜在転移乳がん幹細胞」を特徴づける分子機構は明らかではない。本研究では、原発巣と転移巣よりそれぞれ分離した乳がん幹細胞の遺伝子およびマイクロ RNA 発現の比較検討結果をもとに、低酸素応答、マイクロ RNA と MEF2 シグナルに特に着目して、潜在転移乳がん幹細胞に特有の幹細胞性の維持機構を解析する。原発巣と比べ治療が極めて困難である転移巣のがん幹細胞の性質を解明する研究を通じて、乳がん患者の予後改善に大きく貢献できる知見を得ることを目指す。	
【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。)	乳がん手術検体を用いて樹立した潜在転移乳がん幹細胞の解析モデル(図 1)を用いて、潜在転移した乳がん幹細胞で特徴的に発現する一連の遺伝子およびマイクロ RNA を解明してきた。これらの検討から、潜在転移乳がん幹細胞は、1. 細胞増殖シグナル活性の低下、2. 低酸素応答の低下 3. 転写因子 MEF2 シグナルの亢進、4. 上皮間葉転換の抑制、の点で原発巣のがん幹細胞とは大きく異なることが明らかになった。今年度は、低酸素応答、マイクロ RNA と MEF2 シグナルに特に着目して、以下の検討を行った。 1. 低酸素応答誘導性 miR-210 による幹細胞性制御因子 MEF2A の発現抑制 低酸素応答や、それにより誘導される転写因子 HIF1 は、がんの進展に重要である。ヒト乳がん異種移植マウス由来の乳がん細胞では、マイクロ RNA miR-210 の発現が低酸素応答により約 60 倍に発現上昇した。つぎにルシフェラーゼアッセイにて、MEF2A の miR-210 標的候補配列をもつルシフェラーゼプラスミドの活性が、miR-210 により約 60%抑制されることを確認した。同様の解析にて、さらに複数の miR-210 標的候補遺伝子を同定した。MEF2A は幹細胞性制御遺伝子 KLF の発現上昇を誘導すると考えられることから、今後さらに検討を進める。 2. 潜在転移乳がん幹細胞で発現低下しているマイクロ RNA による転移抑制作用 潜在転移乳がん幹細胞で発現が低下している一連のマイクロ RNA を対象として、免疫不全マウスを用いた肝転移モデルによる検討を行った。潜在転移乳がん幹細胞で発現低下しているマイクロ RNA の強制発現により、乳がん細胞の潜在転移が顕著に抑制された(図 2)。 図 1. 転移乳がん幹細胞の解析モデル ヒト乳がんの手術検体を直接マウスの乳腺領域に移植したヒト乳がん異種移植マウスでは、肺や肝臓などの臓器に肉眼的には確認できない微小な転移巣がみられる。本モデルの転移乳がん幹細胞は、細胞周期の進行が抑えられた潜在転移状態にある。 図 2. 乳がんの潜在転移能を顕著に抑制するマイクロ RNA の同定 転移乳がん幹細胞で発現低下しているマイクロ RNA を強制発現した乳がん細胞とコントロール乳がん細胞を 1:1 に混合し、マウスに経静脈的に移植した。肝臓に生着したがん細胞の大部分はコントロール乳がん細胞であった。したがって、このマイクロ RNA は転移巣の成立を阻害することが示唆される。	

	したがって、同定されたマイクロ RNA は、がん幹細胞の潜在転移の成立に必須であることが示唆される。
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Kondo H, <u>Shimono Y</u>, Mukohyama J, Tanaka Y, Shibuya N, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. Discordance of <i>MCM7</i> mRNA and its intronic microRNA levels under hypoxia. <i>Anticancer Research</i>, 37(7): 3885-3890, 2017. 2. Kunimasa K, Nagano T, <u>Shimono Y</u>, Dokuni R, Kiri T, Tokunaga S, Tamura D, Yamamoto M, Tachihara M, Kobayashi K, Satouchi M, Nishimura Y. Glucose metabolism targeting therapy and withaferin A are effective for EGFR-TKI induced drug tolerant persisters. <i>Cancer Science</i>, 108(7): 1368-1377, 2017. 3. Tatara T, Mukohara T, <u>Shimono Y</u>, Yamasaki T, Imamura Y, Funakoshi Y, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Kakeji Y, Minami H. Expression of programmed death-1 in sentinel lymph nodes of breast cancer. <i>Journal of Surgical Oncology</i>, in press, 2017. 4. Mukohyama J, <u>Shimono Y</u>, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. Roles of microRNAs and RNA-Binding Proteins in the Regulation of Colorectal Cancer Stem Cells. <i>Cancers</i>, 9(10): e143, 2017.
	【学会発表】 1. <u>Shimono Y</u>, Isobe T, Turtoi A, Mukohyama J, Mukohara T, Suzuki A, Castronovo V, Minami H. MicroRNA-mediated upregulation of the WNT signaling activities in human breast cancer stem cells. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2017. 2. Mukohyama J, Iwakiri D, Zen Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y, <u>Shimono Y</u>. Detection of EBV BamHI W region in surgical cancer specimens is a useful method to evaluate the risk of lymphomagenesis inpatient derived-tumor xenograft. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2017. 3. <u>下野 洋平</u>、西村 建徳、向山 順子、渋谷 尚樹、鈴木 聡、後藤 典子. 乳がん幹細胞の潜在転移に伴う独自の幹細胞性制御機構の獲得. 金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2017 年. 4. <u>下野 洋平</u>、久森 重夫、Piero Dalerba, 向山 順子、磯部 大地、南 博信、鈴木 聡. Coordinated action of miRNAs for the regulation of normal and colon cancer stem cells. 第 15 回 幹細胞シンポジウム、2017 年. 5. <u>下野 洋平</u>、久森 重夫、磯部 大地、向山 順子、渋谷 尚樹、掛地 吉弘、南 博信、鈴木 聡. Identification of cancer-stem-cell-suppressor microRNAs through the analyses of human epithelial differentiation program. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年. 6. 向山 順子、<u>下野 洋平</u>、磯部 大地、Qingjiang Hu、渋谷 尚樹、山下 公大、三森 功士、南 博信、掛地 吉弘、鈴木 聡. miR-221-QKI5 axis regulates tumorigenicity of human colorectal cancer stem cells. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年. 7. <u>下野 洋平</u>、久森 重夫、Piero Dalerba、磯部 大地、向山 順子、渋谷 尚樹、掛地 吉弘、南 博信、鈴木 聡. Coordinated up-regulation of multiple microRNAs with tumor suppressive properties during human colon epithelial differentiation. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年. 8. <u>下野 洋平</u>、西村 建徳、鈴木 聡、後藤 典子. オルガノイド培養を用いた転移乳がん幹細胞の幹細胞性制御機構の解析. 第 1 回がん三次元培養研究会、2017 年.
	【その他特筆事項】 特になし。

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		IRSp53 のがん形成におけるシグナル伝達および代謝における役割
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は細胞突起を形成するタンパク質であり、がん細胞に多く見られる細胞突起との関連が示唆されるがその役割は明らかではない。私たちは、がん形成のモデルとなるがん抑制遺伝子 TP53 の欠損マウスの発がんにおける IRSp53 の影響を調べた。その結果、IRSp53 のタンパク質量の減少は、TP53 欠損マウスの寿命を延ばすことを見いだした。本研究では、これらの知見を踏まえ、IRSp53 のがん形成における役割をマウスの病理解析と細胞生物学的解析を中心に検討する。	
【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。)	細胞突起(フィロポディア)形成を誘導するタンパク質をコードする遺伝子のノックアウトマウスと、高頻度のがん発症により短命化するがん抑制遺伝子欠損ノックアウトマウスを掛け合わせる事により、フィロポディア形成タンパク質のがん形成における影響を調べた。生存曲線解析の結果、フィロポディア形成タンパク質の欠損は、がん抑制遺伝子欠損マウスの平均寿命を延ばすことをみいだした。平成 29 年度には、フィロポディア形成が、がん細胞そのものに重要であるか、あるいは、がん細胞と周囲の組織との相互作用に重要であるか、がん組織における血管の形成の様子を検討することなどによって調べた。血管新生については、顕著な違いは見られなかった。次に、がん細胞を正常マウスに移植することを試みた。移植実験のために、CRISPR/Cas9 系を用いて 3 種のがん細胞のフィロポディア形成タンパク質ノックアウト細胞を作成した。これらの細胞はいずれも増殖に低下が見られた。また、フィロポディア形成タンパク質には、脂質膜を切断する活性があることも見出し、このタンパク質が、分泌小胞の形成を通じて、がん形成を制御している可能性を見出した。実際に、フィロポディア依存的な小胞は、頭頸部癌由来細胞株の細胞増殖シグナルを更新させることを見出した。現在、この遺伝子の欠損マウスの血中における分泌小胞の測定を行っており、この結果をもって成果発表する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 BAR ドメインとリポカオリティによる細胞膜の形態制御、第 69 回日本細胞生物学会大会、末次 志郎 2017.06.13	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

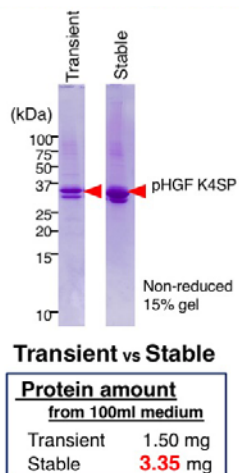
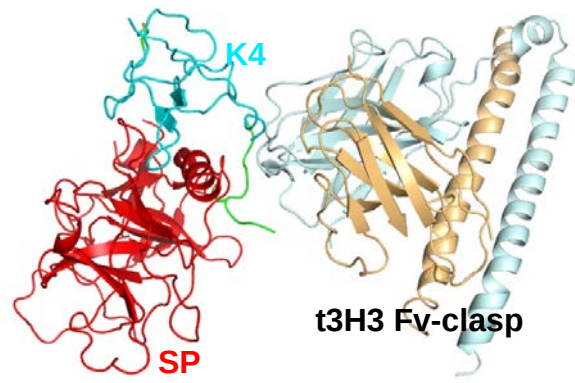
研究課題		hiPS 細胞誘導 3 次元腎組織の血管内皮網状構造を応用した in vitro 灌流培養系および Wilms 腫瘍転移モデル構築研究
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学・先端生命医科学研究所 助教 関谷佐智子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 松本 邦夫
【研究目的】	およそ十万人に一人の割合で発症する後腎芽組織から発生する小児癌である Wilms 腫瘍の 10～20%程度は癌抑制遺伝子 WT の変異伴うが、他の遺伝子やエピジェネティックな変化による発症も含まれる。Wilms 腫瘍は転移しやすく、転移抑制治療法の開発はより治療効果を高めることから、多くの患者の救済に繋がる。本研究では、血管構築の前段階である血管内皮細胞の網状構造を持つ iPS 細胞由来胎児腎細胞の 3 次元組織に対し、灌流培養系技術を応用、胎児腎組織灌流培養系、さらに小児癌である Wilms 腫瘍の転移モデル構築を目的とし、転移メカニズムの解明と治療法開発に有用なツール開発を目的としている。	
【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。)	iPS 細胞からの腎オルガノイド誘導と灌流試験：本研究では、iPS 細胞誘導腎臓細胞によるオルガノイドを用いて灌流培養を行うことが基盤になるため、まず iPS 細胞からの腎オルガノイド誘導を安定的に行えるような系を確立した。Takasato らによって報告されている手法を参考に器官培養にて腎オルガノイド誘導を安定的に行える条件を設定した。iPS 細胞への Wnt アゴニスト処理開始からおおよそ 19 日以降よりネフロン構造と蛍光標識 LTL レクチンに特異的認識される近位尿細管が確認される。誘導因子の添加時期を変化させるとネフロン誘導率低下が確認され、厳密な調整が必要であることが明らかになった。また、ネフロンだけでなく血管内皮細胞と思われる CD31 陽性細胞の誘導も同時に行われていることが確認された。そこで、誘導 19 日前後で灌流刺激を 3 日間行い、遺伝子変化や形態的に尿細管構造の変化を確認したところ、遺伝子レベルでは大きくないが形態的に変化が見られたため、今後刷子縁の発達や各種トランスポーターの遺伝子レベルの発現確認をする予定である。 多連結用チャンバーの作製と灌流試験：本研究では転移先と原発癌の関係を明らかにするために各々の独立チャンバーを試作、試運転をし、チャンバーと培養液供給タンク、および排出口の高低差が流速に影響を与えるため全体の設置設定から厳密に行う必要があることが分かった。 癌細胞との共培養：JCRB より分与を受けた luciferase 遺伝子導入 Wilms 腫瘍由来細胞の検出感度を確認したところ、2 次元培養よりもコラーゲンゲル内にて 3 次元構造を構築した際の方が、同一細胞数での検出感度は高いが、1～2 個程度では検出が不可能なため、蛍光標識等の検出法を検討する必要があると考えられた。また、コラーゲンゲルにて 3 次元構造とした癌細胞を腎オルガノイドと共培養し、腎オルガノイド形態の変化を解析中である。セルインサート上の 3 次元組織内癌細胞が下部 well へ遊走脱落頻度する日数と頻度を解析したところ、おおよそ 5 日後から数個の細胞が脱落、増殖することが明らかになり、従って腎オルガノイドを厚さ方向に貫通し、別チャンバーへの転移には少なくとも 5 日以上灌流期間を要することが明らかになった。	
【成果等】	【主な論文発表】 Introduction of vasculature in engineered three-dimensional tissue. Sekiya S., Shimizu T., Inflamm Regen. 2017 37:25.	
	【学会発表】 関谷佐智子、菊地鉄太郎、松本邦夫、清水達也 “hiPS 細胞誘導 3 次元腎組織を応用した in vitro 灌流培養系および Wilms 腫瘍転移モデル構築研究 金沢大学 がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2017 Oct. 金沢市	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん関連遺伝子による乳癌の発症・悪性化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	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】	従来のがん転移研究においては、高転移がん細胞株を樹立し、その遺伝子発現解析から転移制御遺伝子の同定が行われてきた。しかし、使用された高転移株は血中移植手法を用いて作製されたものがほとんどであり、転移後期過程の一部を反映させたものでしかなかった。がん悪性進展機構の解明には、発症から転移までの過程を体系的に制御する遺伝子ネットワークの解析が重要である。そこで、本研究では、多段階的に進行する遠隔転移のすべてのステップを模倣できる同所性移植手法を用いて、乳がん肺高転移株の作製を行い、転移プロセスにおける遺伝子発現変化およびエピゲノム変化を包括的に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。)	まず、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を免疫不全マウスへ同所性移植し、肺転移した細胞から転移株を樹立した。さらに、移植を繰り返すことによって同所性肺高転移株を作製した。次に、尾静脈注射手法を用いて作製した肺転移株と比較する形で、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行った。結果として、同所性肺高転移株で発現変動する Metastasis signature genes (MSGs) は、尾静脈肺高転移株のそれらとは大きく異なり、同所性移植に特徴的な MSGs が存在することが明らかとなった。このことから、同所性高転移株では原発巣からの遠隔転移を模倣することによって、より早期の転移現象を反映した MSGs を抽出できたと考えられた。さらに、遺伝子発現の相関性に着目したネットワーク解析を行うことで、遺伝子発現相関の中心となる hub 遺伝子の抽出に成功した。興味深いことに MSGs に含まれていた既知転移制御遺伝子のほとんどが、この hub 遺伝子や hub 近傍遺伝子として抽出されることがわかった。現在、これらの遺伝子が転移プロセスで果たす役割を解析するとともに、これらの遺伝子の発現活性化にどのようなエピゲノム変化が関与しているのか調べている。同所性高転移株において、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、転移に伴うエピゲノムの異常を解析する計画である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) J Nakayama, E Ito, J Fujimoto, S Watanabe, K Semba "Comparative analysis of gene regulatory networks of highly metastatic breast cancer cells established by orthotopic transplantation and intra-circulation injection." International journal of oncology, 50, 497-504, 2017 2) T Ihara, Y Hosokawa, K Kumazawa, K Ishikawa, J Fujimoto, M Yamamoto, T Muramkami, N Goshima, E Ito, S Watanabe and K Semba "An in vivo screening system to identify tumorigenic genes." Oncogene 36, 2023-2029, 2017 3) T Matsudaira, K Mukai, T Noguchi, J Hasegawa, T Hatta, S Iemura, T Natsume, N Miyamura, H Nishina, J Nakayama, K Semba, T Tomita, S Murata, H Arai, T Taguchi, "Endosomal phosphatidylserine is critical for the YAP signaling pathway in proliferating cells", Nature Communications 8, 1246, 2017 4) K Ishikawa, Y Kobayashi, Y Wakabayashi, S Watanabe, K Semba, "A highly sensitive trap vector system for isolating reporter cells and identification of responsive genes", Biology Methods & Protocols. (in press) 【学会発表】 1) 藤元次郎、仙波憲太郎、新規 HER2 切断酵素 TMPRSS4 の同定と活性化機構の解析、日本がん分子標的治療学会、九州大学、2017 年 6 月 15 日 P13-1 2) 石川公輔、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた遺伝子発現応答細胞の単離、日本がん分子標的治療学会、九州大学、2017 年 6 月 15 日、P4-6 3) 中山淳、藤元次郎、仙波憲太郎、Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析、日本がん分子標的治療学会、九州大学、2017 年 6 月 15 日、P10-5 4) 若林佑太朗、石川公輔、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた薬剤刺激応答細胞単離技術の開発、日本がん分子標的治療学会、九州大学、2017 年 6 月 15 日、P4-8	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	5) 中山淳、伊藤恵美、藤元次郎、渡辺慎哉、仙波憲太郎、同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析、日本がん転移学会、大阪、2017 年 7 月 27 日、P05-3 6) ジョンソンムン、中山淳、二口充、仙波憲太郎、尾動脈注射手法を用いた Luminal 乳がん骨高転移株の作製、日本がん転移学会、大阪、2017 年 7 月 27 日、P08-3 7) 藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、岡島梓、仙波憲太郎、膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS4 による ErbB 受容体チロシンキナーゼの切断機構、日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 30 日、P-3031 8) 石川公輔、仙波憲太郎、高感度トラップベクターを用いたレポーター細胞の作製、日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 30 日、P-3020 9) 岡島梓、藤元次郎、仙波憲太郎、受容体型チロシンキナーゼに対する II 型膜貫通セリンプロテアーゼの切断活性の解析、日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 29 日、E2059 10) 多ヶ谷紘壮、石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、乳がん遺伝子解析のためのマウス in vivo 発現系の開発、日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28 日、P1027 11) 中山淳、松井貴香、藤元次郎、二口充、仙波憲太郎、Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析、第 76 回日本癌学会学術総会、横浜、2017 年 9 月 28-30 日、口頭発表:J-3104 12) Jun Nakayama, Jiro Fujimoto, Kentaro Semba, Establishment and Characterization of highly metastatic breast cancer cell line by orthotopic transplantation, EACR-MRS Conference Seed and Soil: In Vivo Models of Metastasis, Harnack House Berlin Germany, 27-29 November 2017, poster presentation:No. 70 13) 中山淳、有川浩司、丸山徹、松永浩子、依田卓也、細川正人、神原秀記、竹山春子、仙波憲太郎、腫瘍内微小不均一性解明のための空間トランスクリプトミクス解析技術の確立、第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 6 日-9 日、口頭発表:4AT-27-12, ポスター発表:3P-1362 14) 岡島梓、藤元次郎、仙波憲太郎、II 型膜貫通セリンプロテアーゼの新規基質としての受容体型チロシンキナーゼの同定、第 40 回日本分子生物学会年会、神戸、2017 年 12 月 6 日-9 日、口頭発表:4P1T25-05, ポスター発表:3P-0154
	【その他特筆事項】 1) 中山淳、松井貴香、藤元次郎、二口充、仙波憲太郎、” Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”，文部科学省新学術領域研究学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手技術講習会 2017、長野、2017 年 9 月 7-9 日、口頭発表:OS-6, ベストトーク賞 2) 中山淳、藤元次郎、仙波憲太郎、Multi-organ metastasis 誘導遺伝子 HNF1B の同定と機能解析、日本がん分子標的治療学会、九州大学、2017 年 6 月 15 日、P10-5, ポスター賞

研究課題		プロテアーゼ切断による HGF 活性化の構造的基盤						
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学蛋白質研究所・教授・高木淳一						
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	大阪大学蛋白質研究所・助教・有森貴夫						
	所属・職名・氏名	大阪大学蛋白質研究所・大学院生・岩佐奈実						
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫						
【研究目的】	HGF（肝細胞増殖因子）はチロシンキナーゼ型受容体である Met（または c-Met ともいう）に結合して増殖シグナルを ON にする。このシグナリング経路の異常な活性化はがんの進展や薬剤耐性の獲得に寄与しており、それゆえ、HGF-Met シグナリング経路の活性状態をコントロールするための阻害剤の開発が精力的に行われている。しかし、細胞外領域において HGF がどのように Met レセプターに結合し、細胞膜部分を経て、細胞内へとそのシグナルを伝えるかという疑問に答えるに十分な構造的情報はまだ得られていない。本研究では、共同研究による構造生物学的な解析と生化学的、細胞生物学的解析の融合を通して、これらの機構の解明をめざす。							
【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。)	HGF は、1 つの N 末端ドメイン (N)、4 つの Kringle ドメイン (K1~K4)、1 つの Serine Protease 様ドメイン (SP) という 6 つのモジュールが数珠つなぎになったマルチドメイン蛋白質であり（図 1）、モジュール間の可動性のために溶液中で一定の構造を取らず、その全体の立体構造の決定は未だに達成されていない。昨年度の本研究で、人工的な Factor Xa 切断部位を導入することで同一のコンストラクトから切断型（活性型）と未切断型（不活性型）両方の HGF 蛋白質を調製し、6 種類のモノクローナル抗体を樹立したが、このうち、活性型の HGF のみに結合する t8E4 抗体を得ることに成功し、その Fab と活性型 HGF フラグメントの複合体結晶構造を 2.9Å で決定し、昨年度の成果として報告した。今年度はとくに活性化に重要な切断部位を含む断片 (K4SP) の様々な条件での結晶化のため、同フラグメントを安定発現する細胞株の樹立を行った。Expi203F 細胞を用いて樹立したこの細胞株の培養上清から、コンスタントに結晶化品質の K4SP を精製でき、その終了は一過性発現に比べて二倍以上であった（図 1）。これとは別に、結晶化のための複合体化に用いる抗体を、通常の Fab ではなく、当研究室で開発した新規フラグメント抗体である Fv-clasp フォーマットに変換して利用したところ、新たな抗体 t3H3 の Fv-clasp と K4SP との複合体の結晶化に成功し、その結晶構造を 2.8Å 分解能で決定することができた（図 2）。  Transient vs Stable <table><tr><th colspan="2">Protein amount from 100ml medium</th></tr><tr><td>Transient</td><td>1.50 mg</td></tr><tr><td>Stable</td><td>3.35 mg</td></tr></table>  図 2		Protein amount from 100ml medium		Transient	1.50 mg	Stable	3.35 mg
Protein amount from 100ml medium								
Transient	1.50 mg							
Stable	3.35 mg							
【成果等】	【主な論文発表】 Arimori, T, Kitago, Y, Umitsu, M, Fujii, Y, Asaki, R, Tamura-Kawakami, K, and Takagi, J. (2017) Fv-clasp: An artificially designed small antibody fragment with improved production compatibility, stability, and crystallizability. <i>Structure</i> , 25, 1611-1622. doi. 10.1016/j.str.2017.08.011							
	【学会発表】 岩佐奈実、有森貴夫、酒井克也、松本邦夫、加藤幸成、高木淳一、X 線結晶構造解析による HGF の活性変換メカニズムの解明、第 18 回日本蛋白質科学学会（新潟）（予定）							
	【その他特筆事項】							

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		神経膠芽腫およびその幹細胞におけるヒトサイトメガロウイルス感染と CCR2 シグナルの役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北陸大学・講師・武本眞清
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北陸大学・研究員・村山次哉
	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】	ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) 感染による、神経膠芽腫 (GBM) の悪性化やがん幹細胞形質獲得の分子メカニズムが明らかになりつつある。しかし GBM の悪性化に様々な形で寄与するケモカイン類の産生が、HCMV 感染に伴ってどのように変化するかについては明らかでない。そこで我々は、HCMV を感染させた GBM 細胞で発現上昇するケモカイン類の同定と、ケモカイン遺伝子の発現制御を担うウイルス因子を明らかにすることを目的として研究を行った。	
【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。)	ヒト GBM 細胞株 (T98G、A172) およびヒト星状膠細胞腫株 (U373MG) に、HCMV 実験室継代株 Towne および臨床分離株 91S を感染させ、LEGENDplex Human Proinflammatory Chemokine Panel (BioLegend) を用いて、培養上清中の 13 種類のケモカイン量を測定したところ、いずれの細胞でも IL-8、IP-10、Eotaxin、MIG、GRO α 、I-TAC の産生が増強されていた。次に、ケモカインの産生を促進するウイルス遺伝子を明らかにするために、HCMV 感染後最も早期に発現し、強い転写活性化能を持つ前初期遺伝子 IE1 および IE2 に着目し、遺伝子導入を行った。その結果、上記のケモカインに加えて RANTES、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α が、主に IE2 遺伝子導入によって強く広汎に発現誘導されることが明らかとなった。IE1 遺伝子導入によっても、同種類のケモカインの発現上昇が認められたが、上昇幅は IE2 遺伝子よりも小さかった。IE2 遺伝子は、ヒト胎児肺線維芽 (HEL) 細胞への HCMV 感染時には、感染刺激によって上昇するケモカイン (RANTES、MIG、MCP-2、MIP-1 α 、IL-8) の発現を逆に抑制するとの報告があるため、上記の結果は予想外であった。さらに、A172 と T98G から誘導したがん幹細胞では、上記ケモカインとは異なる MCP-1、MCP-2、MCP-3 などに加え、これらの受容体である CCR2A ならびに CCR2B の発現も、HCMV、特に臨床分離株である 91S 株によって上昇することが明らかとなった。リガンドとそのレセプターが同時に発現上昇していることから、HCMV が感染したがん幹細胞では、CCR2 を介したオートクリンなシグナル伝達が亢進している可能性が考えられる。今回発現上昇が確認されたケモカインのうち、IL-8、IP-10、GRO α 、MIP-3 α 、MCP-1、MCP-3 は、GBM の悪性化を亢進させるとの報告がある。本研究により、HCMV およびその前初期遺伝子 IE2 は、がん幹細胞を含む GBM 組織において多くの種類のケモカイン類の産生を誘導し、悪性化の亢進に寄与している可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) Akai Y, Sadanari H, Takemoto M , Uchide N, Daikoku T, Mukaida N, Murayama T. Inhibition of human cytomegalovirus replication by tricin is associated with depressed CCL2 expression. <i>Antiviral Res.</i> 2017 Dec;148:15-19.	
	【学会発表】 1) Takemoto M , Sango J, Sadanari H, Mukaida N, Murayama T. Induction of chemokines and chemokine receptors of glioblastoma infected with human cytomegalovirus. 16th International CMV/betaherpesvirus workshop. 2017	
	【その他特筆事項】	

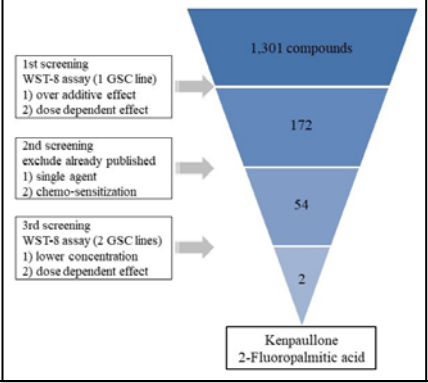
平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

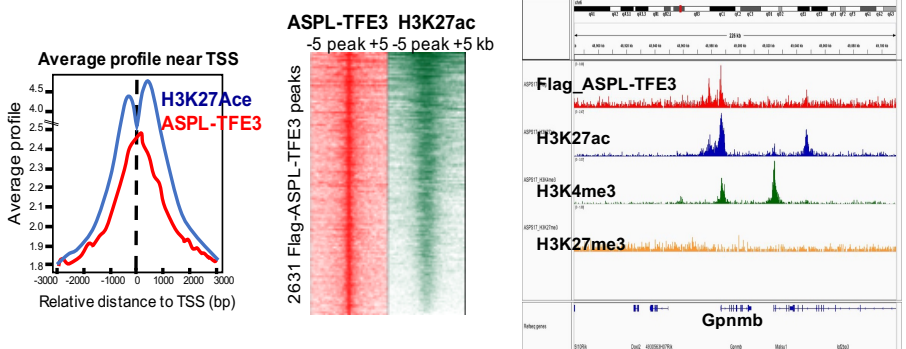
研究課題		メタボローム解析による肺がん上皮間葉転換を標的とした治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学政策メディア研究科・特任講師・田畑 祥
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	慶應義塾大学環境情報学部・学生 (M2)・中宿 文絵
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	本研究では、キャピラリー電気泳動/質量分析 (CE-MS) を用いたメタボローム解析、およびマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を組み合わせ、肺がん細胞の EMT における代謝機構を包括的に解析し、EMT の代謝に着目した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。)	上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) は、がん転移において重要なプロセスの一つで、上皮細胞 (細胞接着能の高い) が間葉系細胞 (細胞接着能が低く、運動能が高い) に変化する現象である。EMT を獲得したがん細胞は極性の喪失、移動・浸潤能が亢進し、がんの転移に大きく貢献する。また、EMT は様々な抗がん剤に対して耐性を付与することから、がん治療の側面からも問題となっている。最近、EMT による代謝変化が、間葉系形質の維持に重要であることが報告されており、ピリミジン代謝に関与するジヒドロピリミジン脱水素酵素、中心代謝を制御するグルタミンナーゼやピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4 などの酵素が、EMT の代謝変化を制御することが明らかになっている (Shaul YD. et al., Cell, 2014; Sun Y. et al., Cancer Metab., 2014; Ulanet DB. et al., PLoS One, 2014)。しかしながら、EMT の代謝機構は部分的な経路しか解析されておらず、十分に理解されていない。 我々は、(慶應義塾大学の曾我朋義教授が開発した) キャピラリー電気泳動—質量分析 (CE-MS) 法による網羅的な代謝解析 (メタボローム解析) 技術を有しており、数千種類のイオン性代謝物質の測定が可能である (Soga T. et al., J. Proteome Res., 2003)。そこで本課題では、CE-MS を用いてがん EMT におけるメタボローム解析を行い、EMT による代謝制御の全容を明らかにすることを目的とした。また、このメタボローム解析にマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現 (トランスクリプトーム) 解析を組み合わせ、EMT 特異的代謝の Key 遺伝子を探索し、がん転移・抗がん剤耐性の治療標的になるか検討を行った。 本年度は、前年度に明らかになった新規 EMT 関連代謝遺伝子 (EMT-MGs) の機能解析、および EMT とアミノ酸代謝の関係性についての検討を行い、以下の結果が得られた。 1. 間葉系形質の肺がん細胞 (A549、H460、SW1573) で、EMT-MGs の発現を siRNA で抑制したところ、上皮系細胞マーカー (<i>CDH1</i>) の発現上昇、細胞移動能の減少が認められた。 2. (前年度のメタボローム解析で) TGF-β で EMT を誘導した肺がん細胞において (細胞内の) アミノ酸バランスが顕著に変化することが判明していることから、アミノ酸が EMT に及ぼす影響を調べた。(RPMI 培地をベースとして) 1 種類ずつアミノ酸を除去した培地で A549 および SW1573 細胞を培養し、EMT マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、13 種のアミノ酸 (Arg, Cys, Gln, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, Val) それぞれを培地から除去した場合に、間葉系細胞マーカー遺伝子 (<i>CDH2</i>・<i>ZEB1</i>) の発現増加および、上皮細胞マーカー遺伝子 (<i>CDH1</i>) の発現減少が誘導され、EMT 様の遺伝子発現変化が観察された。 今後、本課題で得られた結果は国内外の学会で発表し、国際的な英文雑誌で報告する。	
【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 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		To11 様受容体内因性リガンドによるがん微小環境形成に伴う胃がん増悪化
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学薬理学教室・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	東京女子医科大学薬理学教室・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・准教授・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】	To11 様受容体を介したシグナルは生体における感染防御における重要な働きをもつが、我々はこれまでに、がんが原発巣にとどまっている段階において、To11 様受容体 4(TLR4)内因性リガンド S100A8 や血清アミロイド A3 (SAA3) を介した転移前ニッチ形成が転移を促進することを見いだしてきた。転移前ニッチ形成とは、がん周辺部に存在するがん微小環境に類似した炎症に惹起された、がんを呼び寄せる環境である。さらに我々は、TLR4 阻害薬の肺転移に対する効果を担がんマウスにおいて検証したところ、TLR4 内因性リガンド S100A8 阻害は骨髄由来免疫抑制細胞や腫瘍随伴マクロファージの機能を抑制し、転移前肺ニッチ形成と腫瘍内における腫瘍血管新生を抑制することから抗腫瘍作用を発揮していることを見いだした (Deguchi <i>et al.</i> , Oncogene, 2016)。よって、TLR4 は転移前ニッチ形成だけでなくがん微小環境にも関与することが示唆された。現在までの大島先生との共同研究において、胃がん自然発症モデル <i>Gan</i> マウスの病変において、S100A8 の発現が上昇していることを見いだしてきたが、発現細胞や S100A8 の役割については不明である。近年、がん細胞自身が TLR4 を高発現すること、予後不良であることが報告されている。本研究では、大島正伸教授らが作出した胃がん自然発症マウスモデルから樹立した胃癌オルガノイドを用いて、TLR4 内因性リガンド S100A8 の胃がん進展における役割を検証する。	
【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。)	前年度までに、胃がん自然発症マウスモデル <i>Gan</i> マウス (<i>K19-Wnt1/C2mE</i> マウス) の進展の過程の胃がん病変において、TLR4 リガンドの一つである S100A8 の発現ががんの進展とともに上昇していること、エンドトキシンフリーグレード S100A8 リコンビナントタンパク質刺激は骨髄由来マクロファージや微小血管内皮初代培養細胞において炎症性サイトカインを誘導することを見いだした。がん周辺部に存在する免疫担当細胞に加えて、多くのがん細胞が TLR4 を発現していることに注目し、今年度、<i>Gan</i> マウス由来胃がんオルガノイド培養下での S100A8 の効果を検討した。その結果、<i>Gan</i> マウス胃がん病変から樹立した胃がんオルガノイドは TLR4/MD-2 を細胞表面に強発現していること、エンドトキシンフリーグレード S100A8 刺激により幹細胞様の表現型を示す因子の発現が変化することを見いだした。また、<i>Gan</i> マウス胃癌病変において、S100A8 を強発現している細胞集団は CD11b 陽性細胞であった。 来年度、引き続き TLR 内因性リガンド S100A8 による胃がん増悪化の詳細な分子機序の解析と胃がん転移マウスモデルの構築を行う。転移前肝微小環境形成因子遺伝子改変マウスに胃がんオルガノイドを移植し、肝指向性転移に与える影響を検証する。	
【成果等】	【主な論文発表】 論文準備中	
	【学会発表】 1. 出口敦子, 大島浩子, 大島正伸, 丸義朗. 胃がん進展における To11 様受容体内因性リガンドの作用. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 石川県金沢市, 2017 年 10 月 2. 出口敦子, 丸義朗. 転移前ニッチ形成を標的とした新規がん治療への展開. 東京女子医科大学学会, 東京都新宿区, 2018 年 2 月	
	【その他特筆事項】 なし	

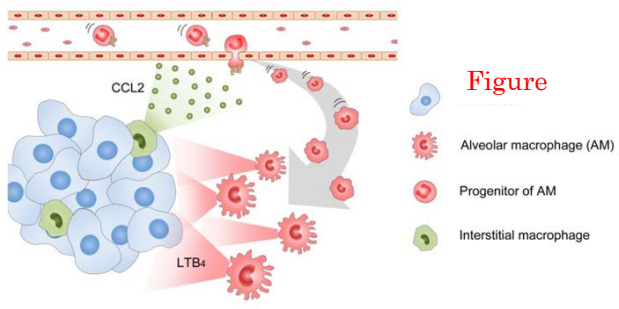
平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		抗グリオーマ薬剤の作用を増強する既存薬剤の探索
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・北林朋宏
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・沙比尔 ^{さびる} 江 ^{じゃん} 加 ^{じゃ} 帕 ^ぱ 尔 ^る
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	膠芽腫の治療抵抗性・再発の原因は膠芽腫幹細胞と考えられており、膠芽腫幹細胞を標的とした治療の開発が注目されている。今回我々はドラッグリポジショニングを指向し、膠芽腫幹細胞に対し temozolomide (TMZ) 増強効果を有する薬剤を探索した。	
【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。)	薬剤スクリーニングに先立ち、膠芽腫手術摘出検体から独自に膠芽腫幹細胞株を複数確立した。このうち、2 種類を細胞株 KGS (Kanazawa glioma stem cell)01, KGS03 を用いて、がん進展制御研究所が保有する薬剤ライブラリーから候補薬剤の抽出を試みた。 スクリーニングの第一段階として、細胞生存アッセイ (WST-8 assay) にて既存の化合物 1,301 種類をスクリーニングした。TMZ の細胞増殖抑制効果を濃度依存性に増強する薬剤 172 種類を抽出した。第二段階ではそれらの薬剤について、PubMed で検索を行い既に神経膠腫に対する有効性が報告されている薬剤を除外し 52 種類に絞った。次に候補薬剤について第一段階より低濃度で設定した細胞生存アッセイを再検し、効果の優れた 2 種類の薬剤 (Kenpaullone, 2-Fluoropalmitic acid) を抽出した。後者は新規性が高特許申請を行った。Kenpaullone は glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) ・ cyclin-dependent kinase (CDK) 阻剤で、2-Fluoropalmitic acid は長鎖アシル CoA 合成酵の阻害物質で、スフィンゴシン合成阻害剤として開発された薬物であった。今後、これらの薬物の膠芽腫幹細胞に対する幹細胞性阻害効果をスフェア形成アッセで評価し、さらに 5 種類の膠芽腫細胞株を用いて抗増殖・抗浸潤効果を解析する。 	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Dong Y, Furuta T, Sabit H, <u>Kitabayashi T</u> , <u>Jiapaer S</u> , Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, <u>Hirao A</u> , Zhao SG, <u>Nakada M</u> . Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug. <i>Oncotarget</i> 8: 111728-111741, 2017	
	【学会発表】 1. <u>Nakada M</u> , Dong Y, Furuta T, Sabit H, <u>Kitabayashi Y</u> , <u>Jiapaer S</u> , <u>Hirao A</u> . Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma drug. The 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, Societies (WFNOS), May 4-7, 2017, Zurich, Switzerland 2. 北林朋宏, 董 宇, 淑瑠 ヘムラサビット, サビエルジャン ジャパル, 平尾 敦, 中田光俊: 膠芽腫幹細胞に対する Kenpaullone の Temozolomide 増強効果 第 76 回日本脳神経外科学会総会 平成 29 年 10 月 12 日-14 日、名古屋 3. <u>Jiapaer S</u> , Dong Y, Sabit H, <u>Kitabayashi T</u> , Furuta T, <u>Hirao A</u> , <u>Nakada M</u> . The novel drug for GBM targeting GSCs by enhancing the effect of TMZ 第 18 回日本分子脳神経外科学会, 平成 29 年 8 月 25-26 日, 山梨	
	【その他特筆事項】 特許 中田光俊、平尾敦、北林朋宏、サビエルジャンジャパル: 平成 29 年 8 月 1 日出願 特願 2017-149468 抗がん剤増強剤による新規悪性脳腫瘍治療	

研究課題		骨軟部肉腫の悪性化における融合型転写因子とクロマチンリモデリングの役割
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部 部長・中村卓郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部 研究員・田中美和
	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】	骨軟部肉腫や白血病においては、融合遺伝子がコードする融合型転写因子が、ドライバーオンコジーンとして、がんの発生と悪性化にしばしば大きく関与している。胞巣状軟部肉腫 (ASPS) 原因遺伝子 ASPSCR1-TFE3 もその一つであり、クロマチンリモデリング機構を介して腫瘍発生と転移促進の要因となっていることが予想された。本共同研究では、ASPSCR1-TFE3 による SWI/SNF 複合体の修飾機構を明らかにし、野生型 TFE3 との機能的差異とそこに関与する責任分子を同定する。さらに、クロマチンリモデリングとの平衡が重要とされるヒストン修飾の異常を ASPS において解析し、両肉腫の悪性化や転移・浸潤における役割を解明する。	
【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. TFE3 に特異的に結合する核蛋白質の同定 ASPS 誘導能を有する ASPSCR1-TFE3 と有さない ASPSCR1-MITF の機能的差異を説明する TFE3 特異的結合分子を同定する目的で、TFE3 と MITF の C 端側領域の His tag 融合蛋白を作製し、ヒト ASPS 細胞の核抽出物と反応させ、マスマスプロトメトリーを用いて TFE3 または MITF それぞれに特異的に結合する分子群を探索した。その結果、TFE3 特異的結合蛋白質 67、MITF 特異的結合蛋白質 15 を同定した。これらの中には、SWI/SNF 複合体構成分子や、RNA プロセシング分子、モーター蛋白が含まれ、ASPSCR1-TFE3 のクロマチンリモデリングや RNA 合成修飾における重要性が改めて示唆された。 2. ASPSCR1-TFE3 による転写制御機構の解析 マウス ASPS 細胞において ChIP-seq 解析により ASPSCR1-TFE3 のグローバルな DNA 結合領域を明らかにした。ASPSCR1-TFE3 結合ピーク 2,631 の 85% がヒストン H3K27Ac 集積部位に一致し、H3K4me3 との相関も示された (下図)。これらの結果とマイクロアレイ解析を合わせて、Gpnm、Angptl2、Syng1 を初めとする ASPSCR1-TFE3 の標的遺伝子群を明らかにした。また、ASPSCR1-TFE3 がオートファジーやライソソームの遺伝子経路の異常な亢進を直接誘導していることも明らかとなった。さらに、Gpnm や Syng1 のプロモーター領域と ASPSCR1-TFE3 変異体を用いたレポーターアッセイにより、TFE3 における転写制御に重要な領域を明らかにした。	
		
【成果等】	【主な論文発表】 1. Tanaka M, Homme M, Yamazaki Y, Shimizu R, Takazawa Y, Nakamura T. Modeling alveolar soft part sarcoma unveils novel mechanisms of metastasis. Cancer Res, 77:897-904, 2017. 2. Yoshimoto T, Tanaka M, Homme M, Yamazaki Y, Takazawa Y, Antonescu CR, Nakamura T. CIC-DUX4 induces small round cell sarcomas distinct from Ewing sarcoma. Cancer Res, 77:2927-2937, 2017. 3. Tanaka M, Yoshimoto T, Nakamura T. A double-edged sword: the world according to Capicua in cancer. Cancer Sci, 108:2319-2325, 2017.	
	【学会発表】 1. Tanaka M, Nakamura T. The molecular function of ASPSCR1-TFE3 in alveolar soft part sarcoma. AACR Special Conference on Advances in Sarcomas: From basic science to clinical translation, Philadelphia, 2017	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	2. 中村卓郎 骨軟部肉腫の GDA モデル：がんの生物学と治療法評価系としての重要性 第 76 回日本癌学会学術総会 横浜、2017
	【その他特筆事項】

研究課題		肝臓がんの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	所属・職名・氏名	福井大学・大学院生・野阪 拓人
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。肺内には 2 種類のマクロファージが存在している。肺間質に存在する間質マクロファージ：Interstitial macrophages(IMs)と肺泡マクロファージ：Alveolar macrophages(AMs)である。がん細胞の肺転移過程において、IMs 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 AMs 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. Leukotrienes(LTs)、Prostaglandins(PGs)、そして Hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE) など、多くのアラキドン酸代謝産物量が転移肺で増加した。 2. 5-lipoxygenase(LOX)阻害薬投与により、2mm 以上の、サイズの大きい肺転移巣の数が減少した。一方で cyclooxygenase 阻害薬投与では肺転移巣に影響はみられなかった。 3. 5-LOX の代謝産物である LTB₄ が <i>in vitro</i> で直接的にマウス、ヒト肝がん細胞株の増殖を促進した。 4. 転移巣には顕著にマクロファージ浸潤がみられ、その内、AMs が 5-LOX を発現していた。 5. 肝がん患者の転移肺においても、転移のない肝がん患者の肺と比較して、5-LOX を発現した AMs が増加していた。 6. 選択的に AMs を枯渇することで、転移肺の LTB₄ 産生量が減少し、サイズの大きい肺転移巣の数が減少した。 7. 転移肺で産生された CCL2 が CCR2 を発現した血中由来の AMs を肺にリクルートした。 8. 転移肺における CCL2 の産生源は骨髄細胞由来の細胞、IMs が産生していた。 以上の結果から、本来、生理的条件下で異なる作用をもつ AMs と IMs が、がん細胞の肺転移を契機に、協調的に肺転移の進行を支持する機能を有することを野阪らは示した（右記 Figure）。CCL2-CCR2 軸を介した、がん細胞肺転移の微小環境における新たなマクロファージサブセット間の作用と、AMs の肺転移における新たな腫瘍支持的役割を明らかにした。  Figure - Alveolar macrophage (AM) - Progenitor of AM - Interstitial macrophage	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Takuto Nosaka</u>, Tomohisa Baba, Yamato Tanabe, Soichiro Sasaki, Tatsunori Nishimura, Yoshiaki Imamura, Hideaki Yurino, Shinichi Hashimoto, Makoto Arita, <u>Yasunari Nakamoto</u>, and <u>Naofumi Mukaida</u>. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B₄. J Immunol (2018 Mar 1;200(5):1839-1852).. 【学会発表】 1. <u>野阪拓人</u>, <u>中本安成</u>. 肝細胞癌肺転移の増大に関与する肺泡マクロファージ由来ロイコトリエン B₄ に関する検討. 2017 年 6 月. 第 53 回日本肝臓学会. 2. <u>野阪拓人</u>, 西村建徳, <u>向田直史</u>. 肺泡マクロファージ由来ロイコトリエン B₄ の、マウス肝がん細胞による肺転移過程への関与. 2017 年 7 月. 第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会.	

	3. <u>野阪拓人</u>, 馬場智久, 佐々木宗一郎, 有田誠, <u>中本安成</u>, <u>向田直史</u>. 肺泡マクロファージは LTB₄ を産生することで肝細胞癌肺転移を促進させる. 2017 年 9 月. 第 76 回日本癌学会学術総会 4. <u>Takuto Nosaka</u>, Tomohisa Baba, Tatsushi Naito, Masahiro Ohtani, Katsushi Hiramatsu, Tomoyuki Nemoto, Makoto Arita, <u>Naofumi Mukaida</u>, <u>Yasunari Nakamoto</u>. Leukotriene B₄ Generated by Alveolar Macrophages Drive Hepatocellular Carcinoma Lung Metastasis. 2017 年 10 月. The American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) The Liver Meeting 2017. 5. <u>Takuto Nosaka</u>, Tomohisa Baba, Yamato Tanabe, Soichiro Sasaki, Makoto Arita, <u>Yasunari Nakamoto</u>, <u>Naofumi Mukaida</u>. The recruited CCR2-expressing alveolar macrophages under the guidance of interstitial macrophage-derived CCL2 drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B₄. 2017 年 10 月. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society. 6. <u>野阪拓人</u>, 馬場智久, 佐々木宗一郎, <u>中本安成</u>, <u>向田直史</u>. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis in collaboration with interstitial macrophages. 2017 年 12 月. 第 46 回日本免疫学会学術集会.
	【その他特筆事項】 2017 年 10 月 AASLD Basic Science Young Investigator Travel Award 受賞

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		生物発光イメージングを用いた乳がん骨転移過程における NK 細胞の役割解明
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・教授・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】	NK 細胞を含む様々な抗腫瘍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。昨年度の共同研究課題の成果として樹立したマウス乳がん骨転移モデルの生物発光イメージングによるモニタリング系を用いて、今年度の共同研究はがん細胞の悪性化に寄与するような宿主応答における NK 細胞の関与について明らかと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。)	BALB/c マウス由来乳がん細胞株である 4T1 細胞から in vivo selection 法にて高骨転移株 4T1.3 を樹立した。またこの高転移株が骨へと転移する niche の形成過程にはがん細胞由来の CCL4、さらには宿主細胞由来の connective tissue growth factor (CTGF/CCN2)の産生が関与している。4T1.3 乳がん細胞の骨転移過程における NK 細胞の役割を明らかにするため、ルシフェラーゼ遺伝子の安定発現 4T1.3-Luc2 細胞株を用いた生物発光イメージングを行った。作製した 4T1.3-Luc2 細胞株は immuno-competent な Balb/c マウスでは Luciferase の遺伝子導入により免疫原性が変化したことによると思われる移植後の拒絶が見られた。実際に Balb/c-nude マウスを用いて同様の実験をしたところ、同所移植した 4T1.3-Luc2 細胞の増殖が認められた。しかしながら、この 4T1.3-Luc2 細胞を移植した Balb/c-nude マウスにおいても、6 個体中 2 個体のみ大腿骨への転移とみられる発光が観察されたものの、安定した骨転移病態が認められなかった。一方、NK 細胞が腫瘍増殖促進に働く好中球性炎症を抑制している可能性を新たに示す実験結果を得た。NK 細胞除去マウスでは好中球依存性の腫瘍血管新生が増加する事、ならびに腫瘍内での好中球からの VEGF-A 産生量が増大する結果を得た。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	Ogura K, Sato-Matsushita M, Yamamoto S, Hori T, Sasahara M, Iwakura Y, Saiki I, Tahara H, Hayakawa Y. NK cells control tumor-promoting function of neutrophils in mice. Cancer Immunol Res. 2018;6(3):348-357	
	【学会発表】	
	Hayakawa Y. Targeting innate lymphocytes to regulate cancer-associated inflammation, The 1st International Conference on Natural Medicine: From Local Wisdom to International Research; 2017 Aug 5-6; Bangkok, Thailand. Ogura K, Sato-Matsushita M, Hori T, Iwakura Y, Tahara H, Saiki I, Hayakawa Y. NK cells control tumor-promoting function of neutrophils. The 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society (ICIS2017); 2017 Oct. 29-Nov. 2; Kanazawa. 早川芳弘, 小倉圭介, 田原秀晃, NK cells control tumor-promoting function of neutrophils. 第 21 回日本がん免疫学会総会; 2017. 06. 28- 30; 千葉.	
【その他特筆事項】	なし	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		HAI-1 および MMP-7 の機能制御によるがん転移抑制法の開発
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・松本 邦夫
【研究目的】	MMP-7 は大腸がんの肝臓への転移に深く関与することが示唆されていたが、申請者らは MMP-7 がコレステロール硫酸を介して大腸がん細胞に結合すると、細胞表層タンパク質であり、HGF の活性制御に関わる HGF activator inhibitor type 1 (HAI-1) の切断を介してがん細胞の細胞凝集を誘導しつつ、その転移能を顕著に増強するという一連の作用機序を明らかにした。本研究では HAI-1 切断がどのような機序でがん細胞の細胞凝集を誘導するのかを解明し、その機序を応用したがんの抗転移薬開発に結びつけ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。)	ここ数年の研究において、MMP-7 とコレステロール硫酸との相互作用に伴い、がん細胞表層の I 型膜タンパク質である HAI-1 が MMP-7 によって切断され、その細胞外領域が放出されることを見出した。また、HAI-1 細胞外領域に細胞凝集を誘導する活性があることを明らかにした。さらに、HAI-1 細胞外領域のうち、PKD (Polycystic kidney disease) ドメインを含むアミノ酸配列 141-249 に相当する部分に細胞凝集誘導活性が存在することを見出した。 本年度は HAI-1 細胞外領域の 141-249 部分を含む断片、HAI-1 (141-249) の種々のバリエーション分子を作製し、細胞凝集誘導に関わる機能部位を最小単位まで詰めることを試みた。その結果、HAI-1 (141-249) 内の数アミノ酸残基をアラニンに置換すると、がん細胞への結合性は保持されているものの、細胞凝集誘導活性を失うことを見出した。また、この断片を培養がん細胞に添加すると、MMP-7 が誘導する細胞凝集が有意に抑制されることが判明し、HAI-1 (141-249) のバリエーションがアンタゴニストとして機能することが示唆された。さらに、細胞凝集誘導活性に重要なアミノ酸残基の周辺配列を含むオリゴペプチドが、同様に MMP-7 が誘導する細胞凝集に対して抑制効果を持つことが判明した。これらの結果は HAI-1 (141-249) の中に 2 つの機能部位が存在し、その両方が揃ってはじめて細胞凝集誘導活性を持つことを示唆している。その機序としてそれぞれの機能部位が細胞表層分子と相互作用し、細胞間を架橋することで細胞凝集を誘導すること等が考えられるが、その詳細を解明するには更なる解析が必要である。 一方、HAI-1 断片に対する細胞表層の受容体タンパク質の同定を試みたが、界面活性剤を用いて細胞膜タンパク質抽出すると HAI-1 断片との親和性が消失することが判明し、未だその同定に至っていない。しかし、HAI-1 断片とがん細胞との相互作用を解析する過程で、その相互作用に二価金属イオンが必要であること、HAI-1 以外の細胞表層タンパク質が MMP-7 により切断を受けることが必須であり、その切断にはコレステロール硫酸を必要としないこと等が明らかになった。これらの情報を足掛かりに今後受容体の同定を進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Ishikawa T, Kimura Y, Hirano H, Higashi S.: Matrix metalloproteinase-7 induces homotypic tumor cell aggregation via proteolytic cleavage of the membrane-bound Kunitz-type inhibitor HAI-1. <i>J Biol Chem</i>. 2017 Dec 15; 292(50): 20769-20784. DOI: 10.1074/jbc.M117.796789. 【学会発表】 1. 石川 智弘, 木村 弥生, 平野 久, 東 昌市: HAI-1 の切断修飾を介した MMP-7 によるがん転移能増強機構の解析. 第 26 回日本がん転移学会 (大阪), 演題番号 P05-1, 2017 年 7 月 27-28 日 2. 石川 智弘, 木村 弥生, 平野 久, 東 昌市: MMP-7 により切断・放出された可溶性 HAI-1 のがん細胞表層との相互作用の解析. 第 22 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 (大阪), 演題番号 1, 2017 年 8 月 11-12 日 3. 石川 智弘, 木村 弥生, 平野 久, 東 昌市: 細胞接着因子としての可溶性 HAI-1 の機能解析. 第 90 回日本生化学会大会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会, ConBio2017) (神戸), 演題番号 4LT26-03 (3P-0917), 2017 年 12 月 6-9 日 【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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・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・助教・間石 奈湖
	所属・職名・氏名	北海道大学・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】	現在の血管新生阻害剤は、多くのがん治療で用いられているが、正常血管にも必須の VEGF シグナルを遮断することから生じる副作用の問題や、コンパニオン診断薬がないことによる適応患者の選択、長期薬剤投与後のがんの悪性化・薬剤耐性などが問題視されている。一方、これまでわれわれは腫瘍血管に特異的なマーカー（腫瘍血管内皮マーカー）をいくつか報告してきており、その発現にもがんの悪性度の違いなどにより多様性があることから、治療標的ならびに腫瘍血管新生モニタリングのマーカーとして有用ではないかと考えた。本研究では貴研究所の大島正伸教授が樹立された、ヒトと同じ分子機序で発生するマウス消化器癌モデルを用いて、発がんならびにがんの悪性化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。)	これまでの共同研究では、正常血管内皮に比べ腫瘍血管内皮で特異的に発現が高くみられる Biglycan に着目してきた。平成 27 年度はヒト大腸癌、肝癌患者の血液中で Biglycan が多く検出されること、特に転移症例で高い傾向にあることを見出した。平成 28 年度には肺癌患者血液中でも Biglycan が多く検出されること、また腫瘍組織の血管ならびに周囲間質にも Biglycan が発現していることを組織免疫染色で観察した。さらに Biglycan 発現が T 因子や血管内浸潤とも相関があり、悪性度との関連が示唆された。これまでの検討で、正常血管内皮細胞では Biglycan のプロモーター領域がメチル化されているのに対して、腫瘍血管内皮細胞では脱メチル化されており、高い発現が維持されていることを見出し、Biglycan 発現がエピジェネティクスにも制御されうることを見出した (Maishi et al Sci Rep 2016)。以上のことから、腫瘍血管の Biglycan 発現が発癌ならびにがん悪性化に伴い変動すると考え、平成 29 年度は大島教授がもつ多重変異による消化器癌モデルでの検討を進めた。 はじめに、Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53 の 4 つの遺伝子変異を持ったオルガノイド (3D 培養細胞) を脾臓に移植後 1 ヶ月後、2 ヶ月後に微小肝転移した腫瘍の解析を行った。血管を CD31 免疫染色で可視化し、連続切片で Biglycan を染色した。これらの腫瘍の血管では Biglycan 発現は認められなかった。次に、同じく 4 重変異のオルガノイド脾臓移植後に肝臓にマクロ転移した腫瘍の凍結切片で、CD31 および Biglycan の蛍光二重免疫染色を行った。肝転移巣では Biglycan 陽性血管は認められなかった。最後に、Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53, Fbxw7 の 5 重変異の大腸癌発癌モデルで検討した。腫瘍内に血管はみられるものの、Biglycan 発現が認められなかった。これらの遺伝子変異の蓄積による消化器癌発癌モデルでは、今回着目した Biglycan 発現は認められなかったものの、これまでヒト大腸癌の腫瘍血管では Biglycan 発現が認められていることから、発現が亢進するような微小環境やエピジェネティクスのスイッチが入るような環境を検討していきたい。また今後は他の腫瘍血管内皮マーカーの発現変動についても本発癌モデルを用いて検討していきたい。	
【成果等】	【主な論文発表】 *Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M.: Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1, <i>J Oral Biosci</i>, 59 (2017), 50-54, 2017. - Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma, <i>Anticancer Res</i>, 37 (3), 1219-1225, 2017. - Hojo T. §, Maishi N. §, Towfik AM, Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Hida Y., Minowa K., Fujisawa T., *Hida K.: ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells, <i>Oncotarget</i>, 8(28):45484-45495, 2017. §equally contributed *Hida K. §, Kawamoto T. §, Maishi N., Morimoto M., Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Shinohara N., Hida Y.: miR-145 Promoted Anoikis Resistance in Tumor Endothelial	

	Cells, <i>J Biochem</i>, 162(2), 81-84, 2017. 5. *Hida K[§], Maishi N.[§], Akiyama K., Ohmura-Kakutani H., Torii C., Ohga N., Osawa T., Kikuchi H., Morimoto H., Morimoto M., Shindoh M., Shinohara N. and Hida Y.: Tumor Endothelial Cells with High Aldehyde Dehydrogenase Activity Show drug resistance, <i>Cancer Sci</i>, 108(11), 2195-2203, 2017. 6. Maishi N., *Hida K.: Tumor endothelial cells accelerate tumor metastasis, <i>Cancer Sci</i>, 108(10), 1921-1926, 2017. 7. *Hida K., Kikuchi H., Maishi N., Hida Y.: ATP-binding cassette transporters in tumor endothelial cells and resistance to metronomic chemotherapy, <i>Cancer Lett</i>, 400, 305-310, 2017. 8. *Hida K., Maishi N.: Abnormalities of tumor endothelial cells and cancer progression, <i>Oral Sci Int</i>, 15(1), 1-6, 2018.
	【学会発表】 1. 樋田京子：第 25 回血管生物医学会学術集会 AAVBM2017 シンポジウム “Tumor Angiogenesis and Lymphangiogenesis”, “Chemotherapy-induced drug resistance in tumor endothelial cells”, 2017.12.10 (大阪) 2. 樋田京子：第40回日本分子生物学会年会ワークショップ「生老病死における血管・リンパ管の生命科学的意義」, “腫瘍血管内皮細胞の形質変化とがんの悪性化”, 2017.12.7 (神戸) 3. 間石奈湖：第40回日本分子生物学会年会ワークショップ「細胞外小胞顆粒は我々に何を語るか?～細胞間コミュニケーションが織りなす生命現象の解明へ～」, “高転移性腫瘍 miRによる血管内皮における薬剤耐性誘導”, 2017.12.7 (神戸) 4. 樋田京子：第62回日本口腔外科学会総会・学術大会特別プログラム「日台姉妹締結10周年記念シンポジウム Translational Research」, “腫瘍血管に関する基礎研究から新たながん治療戦略の構築を目指して”, 2017.10.21 (京都) 5. 間石奈湖：第116回北海道癌談話会奨励賞受賞記念講演, “Tumor endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan”, 2017.10.21 (札幌) 6. 樋田京子：第76回日本癌学会学術総会International Sessions「がん転移におけるエクソソーム研究の最前線」, “高転移性腫瘍エクソソームによる血管内皮における薬剤耐性誘導”, 2017.9.28 (横浜) 7. 樋田京子：第26回日本がん転移学会学術集会・総会シンポジウム2「がん幹細胞に対する新たな知見」, “腫瘍血管内皮細胞のがん幹細胞への関与”, 2017.7.28 (大阪)
	【その他特筆事項】 2017.10.21 間石奈湖 第6回北海道癌談話会奨励賞 (基礎系) 受賞 2017.5.28 樋田京子 日本女性科学者の会奨励賞 受賞

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		TGF- β シグナルを介したグリオーマ幹細胞の未分化性
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・准教授・檜井 栄一
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・平尾 敦
【研究目的】	近年がんの病態制御とがん幹細胞特性の連関が注目されている。我々は、ユビキチンリガーゼ Smurf2 タンパク質の新しいリン酸化部位 (Smurf2^{T249}) を発見し、そのリン酸化状態が、間葉系幹細胞の幹細胞性維持に重要な役割を持つことを見出した。神経膠芽腫 (GBM) は、中枢神経系における最も予後の悪いがんの一つである。近年 GBM の発症・進展において、グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持機構の重要性が示されている。本研究ではグリオーマ幹細胞における Smurf2 のリン酸化制御機構の解明と、Smurf2 の GBM の悪性・進展度における影響を検討した。	
【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。)	【方法】ヒトグリオーマ幹細胞株 (TGS-01) に Smurf2 (T249A) 変異体 (脱リン酸化状態模倣体) および Smurf2 (T249E) 変異体 (リン酸化状態模倣体) をレンチウイルスベクターによって導入し、Smurf2 のリン酸化状態 (Smurf2^{T249}) の腫瘍形成能に対する影響を Sphere formation assay による in vitro 解析と、免疫不全マウスに移植することによる in vivo 解析で検討した。また、遺伝子導入した細胞のタンパク質を Western blotting 法により解析し、Smurf2 下流のタンパク質や、幹細胞性を維持する因子の発現を検討した。 【結果】TGS-01 に Smurf2 (T249A) 変異体を導入した群では、コントロールベクター導入群と比較して Sphere formation assay におけるスフィア形成能の上昇が確認された。さらに同細胞を免疫不全マウスの脳に移植すると、移植後のマウス生存期間がコントロール群と比較して短縮し、腫瘍体積の増加が認められた。一方、Smurf2 (T249E) 変異体を導入した群では、スフィア形成能の低下とともに、移植後のマウス生存期間の延長と腫瘍体積の減少が認められた。次に、遺伝子導入した各群の細胞のタンパク質発現を検討したところ、癌幹細胞性を維持する因子である Sox2 の発現が Smurf2 (T249A) 導入群では上昇していたのに対して、Smurf2 (T249E) 導入群では減少していた。また、Sox2 の発現を正に制御する転写因子である Sox4 や Smad2 の発現も同様の傾向が観察された。 【考察】以上の結果より、ヒトグリオーマ幹細胞において Smurf2 リン酸化 (Smurf2^{T249}) は、下流のタンパク質のユビキチン化を介した発現調節により GBM の悪性・進展度と関連性がある可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		白血病の進展における C/EBP β の機能解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学医学部附属病院・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	
	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、慢性骨髄性白血病(CML)の進展の過程では、ケモカイン CCL3 が正常造血細胞を骨髄外へ動員することによって骨髄中で白血病細胞優位になること、CCL3 の主たる分泌細胞は CML 由来の好塩基球であることを明らかにした。一方、我々はロイシンジッパー型の転写因子 C/EBP β が CML の病態形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。本研究では、CML の原因である BCR-ABL 融合遺伝子によって活性化された C/EBP β が、好塩基球の分化制御および CCL3 の分泌制御において、どのような機能的意義をもっているかを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。)	C/EBP β が、どの細胞分画で <i>Cc13</i> の発現制御に関わるかを明らかにするために、原因遺伝子である BCR-ABL 遺伝子をレトロウイルスで、野生型(WT)マウスまたは C/EBP β ノックアウト(KO)マウス由来の骨髄細胞に導入し、放射線照射したマウスに骨髄移植した。白血病発症後に BCR-ABL を発現している GFP 陽性分画の造血幹細胞、前駆細胞、成熟顆粒球(CD11b/Gr-1 共陽性、好塩基球を含む)を骨髄より分取したのちに、<i>Cc13</i> mRNA の発現を定量化した。その結果、WT マウス由来の成熟顆粒球分画において <i>Cc13</i> mRNA の高い発現が認められたのに対して、KO マウス由来の成熟顆粒球分画では <i>Cc13</i> mRNA の発現は有意に低いことが判明した。 C/EBP β が直接 <i>Cc13</i> の発現制御に関わるかどうかを検討するために、マウス造血幹細胞株である EML 細胞に、C/EBP β と estrogen 受容体の融合タンパク質を過剰発現させた。この細胞を 4-hydroxytamoxifen で処理すると、融合タンパク質の核内移行によって、C/EBP β の機能を誘導できる。C/EBP β を核内移行させると、コントロールの estrogen 受容体のみを発現している EML 細胞と比較して有意に高い <i>Cc13</i> の発現が認められた。したがって、C/EBP β が直接 <i>Cc13</i> の発現を制御している可能性が示唆された。 ついで C/EBP β が、BCR-ABL 存在下で好塩基球分化に関わるかどうかを明らかにするために、BCR-ABL 遺伝子を導入された WT マウスまたは KO マウス由来の骨髄細胞を、試験管内で IL-3、または SCF を添加して培養し、出現した Fc ϵ RI 陽性細胞の中の c-kit 陽性細胞(肥満細胞)と CD11b 陽性細胞(好塩基球)の出現頻度・数について検討した。その結果、WT マウス由来細胞に比して、KO マウス由来の細胞からは、肥満細胞の出現頻度および数が多く、好塩基球は逆に低くなった。これらの傾向は、IL-3 でも SCF でも同様であった。 以上の検討結果から、C/EBP β は BCR-ABL のシグナル存在下で、好塩基球分化を促進すること、CCL3 分泌に直接関わっていることが示唆された。今後、これらの結果を検証し、CML の病態解明を目ざして in vivo のデータの確認と、さらに詳細な分子メカニズムの解明に努める。	
【成果等】	【主な論文発表】 投稿中 【学会発表】 Hirai H Regulation of hematopoietic stem cells by C/EBP β, a transcription factor required for emergency granulopoiesis. Symposium 6: “New world of innate immunity: Unexpected ontogeny and surprising functions” 第 79 回日本血液学会学術総会 (東京) 平成 29 年 10 月 21 日 (2017) Yokota A, Hirai H, Sato A, Hayashi Y, Miura Y, Kimura S, Maekawa T Exhaustion of CD34+ CML-CP stem cells is induced by IFNα through upregulation of C/EBPβ. The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association 第 76 回日本癌学会学術総会 (横浜) 平成 29 年 9 月 29 日 (2017)	

	Yokota A, Hirai H, Sato A, Kamio N, Shoji T, Kashiwagi T, Torikoshi Y, Miura Y, Hayashi Y, Kimura S, Maekawa T: IFNα upregulates C/EBPβ in CD34+ CML stem cells and induces their exhaustion. [Abstract OS2-10C-1] The 79th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 第 79 回日本血液学会学術総会（東京） 平成 29 年 10 月 21 日（2017） Yokota A, Hirai H, Sato A, Kamio N, Hayashi Y, Miura Y, Kimura S, Maekawa T IFN-α Upregulates the Expression of C/EBPβ and Induces Myeloid Differentiation and Exhaustion of CD34+ CML Stem Cells. American Society of Hematology, 59th Annual Meeting and Exposition, Atlanta, GA, USA, December 9, 2017 Sato A, Hirai H, Yokota A, Tamura A, Shoji T, Kashiwagi T, Kamio N, Torikoshi Y, Miura Y, Maekawa T C/EBP β endows hematopoietic stem cells with myeloid-bias in stress conditions 第 79 回日本血液学会学術総会(東京) 平成 29 年 10 月 20 日(2017) 平位秀世 C/EBP β 転写因子による” 定常状態” と” 非定常状態” の造血制御. 第 12 回スフィンゴセラピー研究会 (石川県河北郡) 平成 29 年 7 月 16 日(2017) 平位秀世 骨髓球系転写因子 C/EBP β によるストレス造血制御 第 5 回北海道感染免疫アカデミー(札幌市) 平成 29 年 9 月 8 日(2017) 平位秀世 : Chronic myeloid leukemia: emergency granulopoiesis hijacked by BCR-ABL fusion protein. 京都薬科大学・病態生理学分野セミナー(京都市) 平成 29 年 11 月 24 日(2017) 【その他特筆事項】 該当なし
--	---

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脳転移肺がん細胞の薬剤応答と耐性のキネティクス解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・講師・平田英周
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】	肺がんは脳転移を来しやすく、転移性脳腫瘍の原発巣として全体の約半数を占めている。またがん全体の予後改善に伴い、脳転移症例は増加の一途をたどっている。肺がん脳転移は生命予後・機能予後共に極めて不良であり、その克服は現代のがん研究が取り組むべき喫緊の課題である。平成 28 年度共同研究に引き続き、本研究では EGFR 変異を有する肺がん細胞の脳転移を対象とし、EGFR 阻害剤に対する薬剤応答と耐性のキネティクスを腫瘍微小環境の再編集機構と共に明らかにすることを目標とする。	
【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。)	先行研究において EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 をヌードマウス心腔内に接種して脳転移を誘導し、EGFR 阻害剤ゲフィチニブに対する応答を定量的に評価した。興味深いことに、脳組織内に散在する生存がん細胞の多くは Ki67 陰性の休眠様状態を呈していることが明らかとなった。 1. 経頭蓋骨 FRET イメージングによる初期応答の生体内可視化 MAPK/ERK 活性をモニタリングする FRET バイオセンサーEKAREV-NLS を用いることで、ゲフィチニブ投与から約 40 分後にがん細胞の ERK 活性が低下する様子を生体内にて捉える事に成功した。しかしながら PC9 はゲフィチニブに対して極めて良好に応答するため、経時的なイメージング（～2 週間）では同部位を追跡することが困難であった。そこで脳転移指向性を持たせた亜細胞株 PC9-BrM3 を樹立して同様の実験を行ったが、この BrM3 細胞株もゲフィチニブに極めて良好に応答するため、初期薬剤耐性を示す細胞を長期間に渡って追跡することはやはり困難であった。現在、脳スライス培養法（ex vivo 法）およびアストロサイトとの 3 次元共培養法を用いた薬剤応答の経時的解析手法を立案中である。 2. トランスクリプトーム解析による初期耐性シグナルの網羅的描出 脳転移がん細胞（ゲフィチニブ 0 mg/kg/day にて 2 週間治療）と脳転移生存がん細胞（ゲフィチニブ 20 mg/kg/day にて 2 週間治療）を脳組織から抽出し、初期薬剤耐性に関わるシグナル経路の網羅的描出を目的としたトランスクリプトーム解析を行った。結果、初期薬剤耐性に関わる分子・シグナル経路としてインターロイキンを中心とした複数のサイトカイン経路を同定した。病理学的解析では活性化アストロサイトによる脳転移肺がん細胞の捕捉が認められているため、これらのサイトカインがアストロサイト由来である可能性を考えた。そこで肺がん細胞とアストロサイトの in vitro 共培養系を確立し、その培養上清を用いてサイトカインアレイ解析を行った。結果、初期薬剤耐性に関わる正・負の介在因子としてそれぞれ IL-1RA および CXCL10 を同定した。現在、その詳細な機能解析とマウスモデルを用いた検証を行っている。	
【成果等】	【主な論文発表】 Hirata E*, and Sahai E. Tumor Microenvironment and Differential Responses to Therapy. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine 5:7(7) 2017. (*corresponding author)	
	【学会発表】 - Hirata E. Tumour microenvironment: Safe havens and drug resistance. ESMO Asia 2017 Special Symposium (Invited Lecture) Singapore (Nov 2017) - 平田英周、矢野聖二 「脳転移肺がん細胞の薬剤応答と耐性のキネティクス解析」 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム（ポスター発表）金沢（2017 年 10 月） - 平田英周 「腫瘍微小環境を標的としたがん治療戦略」 文部科学省がんプロフェッショナル養成基盤推進プランセミナー（招待講演）京都（2017 年 2 月）	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		成人 T 細胞白血病（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】	成人 T 細胞白血病（ATL）は、ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）の感染によって引き起こされる。HTLV-1 感染から ATL 発症に至るには数十年に及ぶ長い潜伏期を要するが、その発症機構及び有効な治療法は確立されていない。私たちは、NOG-SCID（NOD-SCID / IL2R γ -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 を感染させることによって ATL 様病態モデルマウスを確立することに成功した。現在、このモデルマウスを用いて生体環境内でのがんの発症過程を解析している。本共同研究では、HTLV-1 感染ヒト化マウスで再現された ATL 様病態の発現プロセスを、エピゲノム変化に伴う遺伝子発現変化に注目して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。)	HTLV-1 感染ヒト化モデルマウスの経時的解析から、腫瘍化の進展に伴い、感染 CD25(-)CD4 T 細胞クローンから CD25(+)への形質転換が示された。一方、ATL 発症に重要な役割を果たすと考えられる HTLV-1 Tax 遺伝子の発現は逆に抑制されることがわかった。そこで、CD25(-) 感染細胞における Tax の機能と関連した宿主細胞遺伝子の発現及びエピゲノムの変化と、その結果としての感染細胞の CD25(+)への形質転換や異常増殖の可能性を検討するため、CD25(-)および CD25(+)感染細胞の cDNA マイクロアレイ解析とゲノムメチル化の網羅的解析を行った。その結果、CD25(-)から CD25(+)への転換に伴って DNA メチル化が減少し、かつ発現が上昇している遺伝子が多く検出されたが、逆に DNA メチル化が増大する遺伝子は少なかった。これら変化の検出された遺伝子には、IL2RA, ATF3, CEBPA, EZH2 など重要性を報告されている遺伝子を含む 100 種類ほどの候補遺伝子が含まれていた。Tax にはヒストン翻訳後修飾を介した転写調節機能が報告されていることから、これが DNA メチル化レベルでの遺伝子発現調節に繋がる可能性が示唆されるため、候補遺伝子のうち癌化・幹細胞関連の遺伝子に注目して、ヒストンのメチル化制御を中心とした解析を進める計画である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Rie Furuta, Jun-ichirou Yasunaga, Michi Miura, Kenji Sugata, Akatsuki Saito, Hirofumi Akari, Takaharu Ueno, Norihiro Takenouchi, <u>Jun-ichi Fujisawa</u> , Masakazu Shimizu, Fumihiko Matsuda, Anat Melamed, Charles R Bangham, Masao Matsuoka. Human T-cell leukemia virus type 1 infects multiple lineage hematopoietic cells in vivo. <i>PLOS Pathogens</i> 13(11), e1006722, 2017	
	【学会発表】 1. 西川瑞希、大村裕樹、上野孝治、田中勇悦、 <u>藤澤順一</u> : 抗HTLV-1抗体によるHTLV-1感染の活性化, 第4回日本HTLV-1学会学術集会, 2017. 8. 18-20, 枚方 2. 大村裕樹、西川瑞希、Ancy Joseph、上野孝治、 <u>藤澤順一</u> : 標的細胞との細胞接着による感染細胞プロウイルスの活性化, 第4回日本HTLV-1学会学術集会, 2017. 8. 18-20, 枚方 3. 田中正和、福原貴太郎、竹之内徳博、任翊华、姚錦春、李成一、植田祥啓、木梨達雄、 <u>藤澤順一</u> : ヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染予防ワクチンにおけるアジュバント効果の組織病理学的検討, 第4回日本HTLV-1学会学術集会, 2017. 8. 18-20, 枚方 4. Masakazu Tanaka, Takataro Fukuhara, Sung-il Lee, Yihua Ren, Jinchun Yao, Norihiro Takenouchi, Yoshihiro Ueda, Tatsuo Kinashi, Jun-ichi Fujisawa: Effects of Tax vaccine adjuvants in HTLV-1 humanized mice, 第76回日本癌学会学術集会 2017. 9. 28-30, 横浜 5. Takaharu Ueno, Ancy Joseph, Yuihua Ren, Jinchun Yao, Sung-Il Lee, Masakazu Tanaka, Jun-ichi Fujisawa: Analysis of HBZ gene product function in HTLV-1 infected mouse model, 第65回日本ウイルス学会学術集会 2017. 9. 28-30, 大阪	
	【その他特筆事項】	

研究課題		膠芽腫の上皮間葉転換における GLUT1 の役割
研究代表者	所属・職名・氏名	久留米大学医学部病理学講座・助教・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	久留米大学医学部病理学講座・教授・杉田 保雄
	所属・職名・氏名	久留米大学医学部脳神経外科学講座・助教・小牧 哲
	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】	グリオーマは腫瘍内に異なる表現型の腫瘍細胞を複雑に入れ替えて治療抵抗性を獲得している。膠芽腫の特徴的な組織像 pseudopalisading necrosis は腫瘍細胞が上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) により遊走している状態を反映している。本研究では、糖代謝に関わる GLUT1 に焦点をあて膠芽腫の EMT のメカニズムを解明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。)	久留米大学病院で治療された 52 例の膠芽腫組織標本に GLUT1 の免疫染色を施行したところ、染色強度および染色細胞の割合から 4 段階に分類された (グレード 1-4)。グレード 1、2 を低発現群、3、4 を高発現群として生存解析を行うと、GLUT1 高発現群は予後が不良であった (図 1; $p=0.001$)。膠芽腫の確立した予後因子を含めた多変量解析では GLUT1 高発現は独立した予後不良因子であった ($p=0.003$)。膠芽腫組織における GLUT1 発現は局在による差がみられた。特に腫瘍血管近傍の細胞で GLUT1 発現が強く、pseudopalisading necrosis 周辺、浸潤領域と続いた (図 2)。MIB-1 に陽性となる細胞および endoglin 陽性となる血管の割合は GLUT1 高発現群で有意に大きく、GLUT1 が腫瘍増殖と血管新生に強く関与していることが示された。 以上より膠芽腫微小環境では pseudopalisading necrosis 周辺で低酸素/低グルコース状態にさらされた腫瘍細胞が EMT を起こし移動する際に、GLUT1 発現を低下させて遊走を開始し、血管周囲に到達したものが再度 GLUT1 発現により増殖・血管新生スイッチを入れると考えられた (go or grow 仮説)。一方で、正常脳との境界領域に到達した細胞は、間葉系の性質を保持している可能性がある。あるいは近年報告されたように解糖系のみならずミトコンドリアを利用した糖代謝機能を獲得しているとも考えられるが、さらなる検討が必要である。今後は細胞株を用いた基礎実験を行い、膠芽腫微小環境における糖代謝変化と EMT の関連を検討する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 小牧哲、古田拓也、三好淳子、中島慎司、宮城尚久、杉田保雄、森岡基浩 膠芽腫における GLUT1 の発現と予後との相関について 第 76 回日本脳神経外科学会学術総会、平成 29 年 10 月 10-12 日、名古屋	
	【その他特筆事項】	

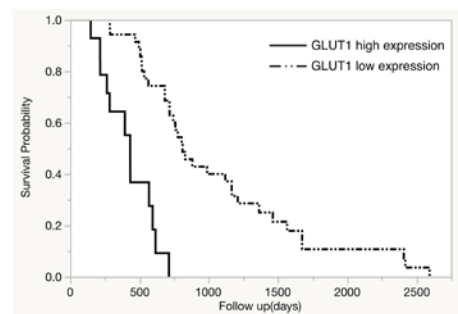


図 1. GLUT1 高発現群は予後不良

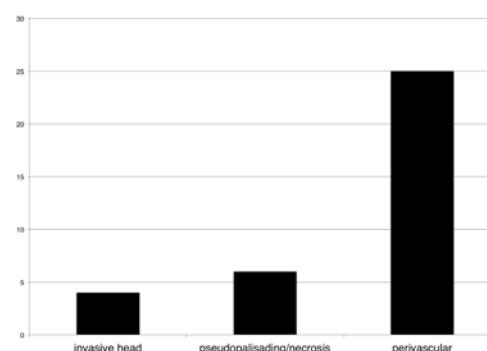


図 2. GLUT1 発現の局在性

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		早期薬剤耐性獲得に関わるシグナル伝達経路と遺伝子発現の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・室長・北條浩彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・科研費研究員・福岡聖之
	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】	薬剤耐性は、抗がん剤治療や感染症治療において治療を減速させ、そして制限させる大きな問題の一つである。効果的かつ持続的な投薬治療を行うためには、薬剤耐性の発生を回避し抑制することが重要である。そのためには、薬剤耐性のメカニズムを理解することが必要である。今までの研究から薬剤耐性に関わる多くの遺伝子変異が明らかにされてきた。しかしながら、それらの遺伝子変異が、薬剤の暴露を初めて受けた（ナイーブな）細胞で 早急に成立したとは考えられない。突然変異率に基づいて考えると、むしろ時間をかけてそのような遺伝子変化が成立し、ゲノム上に固定化したと考える方が自然である。では、初めて薬剤に暴露したがん細胞は、どのようにして生き延びたのか？この最もシンプルな問いに答える明確な答えは、無い。そこで我々は、その問いに答えるために「初期の細胞サバイバル戦略」に焦点を当て研究を行った。	
【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。)	我々はヒト非小細胞肺癌細胞株、PC-9 細胞を用いて研究を行った。この PC-9 細胞はユニークな特徴を有する細胞である。ナイーブな PC-9 細胞は抗がん剤ゲフィチニブに対して強い感受性を示すが、ゲフィチニブの長期暴露によって耐性細胞へと変化する。抗がん剤感受性から耐性への変化が同一の細胞で観察できることから、PC-9 細胞は薬剤耐性獲得の良いモデル細胞として研究されてきた。我々は先ず、この細胞株を用いてゲフィチニブ感受性・耐性細胞での遺伝子の発現変化を解析した。その結果、ゲフィチニブ処理によって線維芽細胞増殖因子 (FGF2) とその受容体 (FGFR1) 遺伝子の発現が顕著に増加することを見出した。そして、FGFR1 阻害剤や FGF2 を用いた細胞生物学的解析から、最初のゲフィチニブ暴露によって殺された細胞から漏れ出る FGF2 が、まだ生残っている細胞の生存を助けていることを発見した。これは、最初のゲフィチニブ暴露から細胞が生き延びるための「利他的なサバイバル戦略」として考える。しかしながら、このサバイバル戦略は一過性であり、恒久的な薬剤耐性獲得のためには遺伝子の発現変化が不可欠となる。そこで今回、その初期の遺伝子発現制御の変化を捉えるために研究を行った。解析の結果、ゲフィチニブ暴露によって NF-κB の活性化が起こることを見出した。そして、阻害剤等を用いた解析から、この初期の遺伝子発現変化がゲフィチニブ存在下の細胞生存にも関与していることを見出した。現在、これらの結果をまとめた論文を投稿中である。尚、この研究成果は、H29 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウムでも報告した（ポスター発表）。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 現在、論文投稿中。	
	【学会発表】 H29 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム（ポスター発表）	
	【その他特筆事項】 特になし。	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		c-Myc 制御、DNA 損傷修復、癌代謝に関わる FIR に着目した消化器・難治がんの診断法および包括的がん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学・検査部長（診療教授）・松下 一之
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・准教授・星野忠次
	所属・職名・氏名	千葉大学・講師・西村 基
	所属・職名・氏名	千葉大学・大学院生・北村 浩一
	所属・職名・氏名	千葉大学・大学院生・小林崇平
	所属・職名・氏名	千葉大学・大学院生・グザヌル・アリキン
	所属・職名・氏名	千葉大学・技術補佐員・田中 信子
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究は消化器・難治がんの分子病態と代謝特性にもとづく診断、治療法の開発研究（腫瘍制御研究分野）の一テーマである。FIR は相互作用する相手により c-myc の転写・転写後調節、DNA 損傷修復、癌化・白血病化、癌代謝に関わる多機能分子であり癌診断・治療の良い標的である。具体的には、本研究は Gan マウスと FIR (FBP interacting repressor) FIR-SAP155 の相互作用に着目した新規の癌診断法・治療法の開発を提案する。本研究では、FIR ヘテロ KO マウスと Gan マウスの交配を行い、Gan マウスに発生する胃腫瘍の浸潤を促進する因子を探して、胃癌の浸潤・転移に関わるメカニズムを解明することを目的にした。	
【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. Gan マウス (K19-Wnt1/C2mE) と FBW7 や E-cadherin の発現が減少されたマウスモデル (K19-Wnt1/C2mE×FBW7^{+/+}, K19-Wnt1/C2mE×E-cadherin^{+/+}マウス) を交配させて低悪性度胃腫瘍の浸潤・転移が誘導されないか、胃腫瘍に発現するタンパクレベルで発現変化を調べた。 2. 今年度は、千葉大学医学部附属病院において手術された胃癌患者の E-cadherin および FBW7 の発現レベルと臨床症状（組織型、治療効果、病期、リンパ節転移の有無、予後など）を検討する。 3. FIR は相互作用する相手により c-myc の転写・転写後調節、DNA 損傷修復、癌化・白血病化、癌代謝に関わる多機能分子であり癌診断・治療の良い標的である。これまでの研究から、FIR/FIR Δ exon2 のスプライシングには SAP155 が必要であり、FIR/FIR Δ exon2 が FBW7 の Degron pocket の WD-like domain と相互作用して FBW7 の機能阻害すること仮説を考えている。 4. 本研究の内容は、現在論文を Oncogene 誌に投稿予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Kobayashi S, Matsushita K et al. Identification of specific and common diagnostic antibody markers for gastrointestinal cancers by SEREX screening using testis cDNA phage library. Oncotarget 2018, In press. 2. Ogura Y, Hoshino T, Tanaka N, Ailiken G, Kobayashi S, Kitamura K, Rahmutulla B, Kano M, Murakami K, Akutsu Y, Nomura F, Itoga S, Matsubara H and Matsushita K. Disturbed alternative splicing of FIR (PUF60) directed cyclin E overexpression in esophageal cancers. Oncotarget 2018, In press. 3. Kimura A, Kitamura K, Ailiken G, Satoh M, Minamoto T, Tanaka N, Nomura F, and Matsushita K. FIR haploinsufficiency promotes splicing to pyruvate kinase M2 in mice thymic lymphoma tissues revealed by six-plex tandem mass tag quantitative proteomic analysis. Oncotarget. 2017 Jul 7;8(40):67955-67965. 4. 小林 崇平, 松下 一之, 日和佐 隆樹 新規腫瘍マーカーと術後モニタリングマーカー候補としての消化器癌患者血清における抗FIRs自己抗体の検出 日本分子腫瘍マーカー研究会誌 32(0), 39, 2017 【学会発表】 Kazuyuki Matsushita. Establishment of screening network for hereditary cancers by genetic testing and counselling in Chiba Prefecture. 日本癌学会（横浜）2017.9.28-30. 3. Kazuyuki Matsushita and Sohei Kobayashi Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. Biomarker Research in Clinical Medicine. February 19-21, 2018. Paris. 【その他特筆事項】 特になし。	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膵組織幹細胞/前駆細胞の老化機序解明による疾患発症機序の解明
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・研究部長・石渡俊行
	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腫瘍制御分野・教授・源利成
【研究目的】	組織前駆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。テロメアは染色体末端に存在する保護装置であり、組織前駆細胞ではテロメア長が長く保持されるという特徴を有すると報告されている。本研究では、膵臓の組織前駆細胞におけるテロメアの変化とその制御機構を明らかにする。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。)	定量的 fluorescence in situ hybridization (Q-FISH) 法を用い、膵臓のテロメア長を測定したところ、膵癌および膵臓の前癌病変では、テロメア長が短縮していた。また、担癌者では非担癌者に比べ、背景の膵組織の非腫瘍性の腺上皮においてもテロメア長の短縮が見られた。テロメア長の短縮は加齢とともに生じ、長いテロメアを有する組織前駆細胞様の細胞の割合も加齢とともに減少した。 また、膵癌や膵前癌病変を有する症例では、これまでに報告されていない一塩基多型を認め、高齢者では他の年齢層と異なる分子病理学的発癌機序が示唆された。一塩基多型の変化は、膵癌と膵前癌病変でそれぞれ異なっており、多くの前癌病変は膵癌と関連がなく、非連続性の病変であることが示唆された。 以上より、加齢とともに膵管上皮のテロメア長の短縮を生じ、それによって惹起される染色体不安定性が高齢者の膵発癌に大きな影響を及ぼすこと、また高齢者の膵癌は中年年齢層の膵癌とは異なる特徴を有することが明らかとなった。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Matsuda Y</u>, Tanaka M, Sawabe M, Mori S, Muramatsu M, Mieno MN, Furukawa T, Arai T. Relationship between pancreatic intraepithelial neoplasias, pancreatic ductal adenocarcinomas, and single nucleotide polymorphisms in autopsied elderly patients. Genes Chromosomes Cancer. 2017 Epub ahead of print. 2. <u>Matsuda Y</u>, Furukawa T, Yachida S, Nishimura M, Seki A, Nonaka K, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Kimura W, Arai T, Mino-Kenudson M. The Prevalence and Clinicopathological Characteristics of High-Grade Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Autopsy Study Evaluating the Entire Pancreatic Parenchyma. Pancreas. 2017 46:658-664.	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	3. <u>Matsuda Y</u> , Ishiwata T, Yoshimura H, Yamahatsu K, Minamoto T, Arai T. Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. Cancer Sci. 2017 108:354-361.
	【学会発表】
	【その他特筆事項】

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肺がんの患者由来腫瘍ゼノグラフト (PDX) モデルの作成
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・准教授・松本 勲
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・講師・田村昌也
	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】	近年、患者由来腫瘍を免疫不全マウスに直接移植する patient derived xenograft (PDX) モデルが注目されている。通常のがん細胞株を免疫不全マウスに移植した場合には、形成される腫瘍は間質成分が少ない低分化型の組織型を示す。一方 PDX モデルで形成される腫瘍は、ヒトがん組織を忠実に再現することが知られており、個々の患者のがん組織を実験動物レベルで再現するモデルとして、がん研究に必要不可欠となってきた。 金沢大学附属病院呼吸器外科では、がん進展制御研究所研究所腫瘍内科の矢野教授との共同研究として、呼吸器外科が肺がん患者の切除組織を提供し腫瘍内科が免疫不全マウスに移植するプロジェクトを平成 28 年 6 月から開始している。研究計画の概要に示すように、すでに複数の症例において PDX モデルとして腫瘍の生着を確認しており、そのうちのいくつかは次のマウスへの移植にも成功している。本申請課題においては、さらに症例において PDX モデルの確立を行うとともに、PDX モデルで増大した腫瘍の凍結保存と臨床情報のデータベース化を強化し、将来の共同研究基盤を強固にすることを目的としている。 本申請課題において、十分な臨床情報を付帯する多くの肺がん PDX モデルが確立されかつ腫瘍の凍結保存が可能となれば、金沢大学がん進展制御研究所の共同研究を通じて全国の研究者に広く供与することが可能となる。また、ヒト肺がん組織を忠実に再現する動物モデルによる基礎研究やトランスレーショナルリサーチにより、肺がんの進展機構の解明や新規治療法開発が促進され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。)	IA-III A 期の非小細胞肺がん(NSCLC)患者の手術切除組織を用い免疫不全マウスに皮下移植した際の腫瘍(PDX)形成能を検討した。30 例中 9 例 (30%) で PDX が形成された。組織型別 PDX 成功率は、扁平上皮がん 6/10 (60%)、腺がん 4/19 (21%)、その他 0/1(0%)であった。PDX 成功例では 6 ヶ月以内に腫瘍を形成する傾向にあった。また、高齢者では PDX の成功頻度が低い傾向にあり、むしろリンパ腫が多かった。 腫瘍が生着した 9 例について HE で手術検体と PDX 腫瘍(2 代継代:P2)を比較検討したが、PDX の腫瘍は組織型を概ね保っていた。さらに、9 例中 6 例について免疫染色による解析を行った。PD-L1 や MHC class I 発現はほぼ保たれていたが、一部の症例では原発腫瘍内に heterogeneity があり、PDX 腫瘍で均一に減弱あるいは増強しているものがあつた。これらから、原発腫瘍の一部の成分が PDX の腫瘍を形成していることが示唆された。P2 の PDX では間質はマウスに置換していた。また、腫瘍の遺伝子変異や mRNA 発現は概ね患者腫瘍のそれを保持していた。EGFR 変異陽性の 2 例において PDX 腫瘍が形成された。EGFR 変異陽性 PDX は EGFR チロシンキナーゼ阻害薬に高い感受性を示した。 以上より、NSCLC の約 3 割で PDX が形成され、PDX は腫瘍細胞の特徴をよく保持しており、抗悪性腫瘍薬の感受性予測に有用であることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】現在、論文執筆中	
	【学会発表】Yano S, Kita K, Fukuda K, Nishiyama A, Tamura M, Matsumoto I, Takeuchi S. Establishment of patient-derived xenograft models of lung adenocarcinoma with two different EGFR mutations, L858R and exon19 deletion. Fifth AACR-IASLC International Joint Conference, 2018 年 1 月 San Diego	
	【その他特筆事項】なし	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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、日々の睡眠サイクルを含む一日約 24 時間の生体の恒常性を制御している生物の基本的な機構である。近年の大規模疫学研究によると、シフトワーク従事者（看護師、パイロット）は、がん罹患率が有意に上昇することが報告された。また、正常な概日リズムが保てない <i>Period2</i> 欠損マウスは癌になりやすいことが報告されている。このことは、がんと概日リズムの密接な関連性を示唆しているが、その分子機構は不明な点が多い。本研究課題では、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> が概日リズム遺伝子を制御する機構を解明し、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> と概日リズムの新たな関連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。)	昨年度までの共同研究により、以下のような結果を得ている。 1. <i>pRb</i> の強制発現により、<i>PER2</i> の PAS ドメインへのヘム結合制御依存的に <i>Cry1</i> プロモーターの転写活性を抑制した。 2. <i>pRb</i> ヘテロマウスの概日リズム行動解析及びにより肝臓特異的 <i>Rb</i> 欠損マウスの解析により、<i>pRb</i> はマウス個体レベルで概日リズムに影響を与えることを明らかにした。 そこで本年度は以上の結果から、がんにおいて多く見られる <i>Rb</i> 欠損の表現型である細胞周期異常、分化異常、代謝異常をヘム制御の欠損が担っている可能性を検討した。<i>Rb</i> 欠損では、<i>PER2</i> のヘムの結合が過剰となることから、ヘム合成阻害剤を用いてヘムのヘム蛋白質への結合量を減少させた場合に <i>Rb</i> の表現型をどれだけレスキューできるのかどうかを検討した。 <u>ヘム合成阻害剤の <i>Rb</i> 表現型レスキューを <i>PER2</i> の経路で確認した。</u> 正常 MEF 細胞にコントロールもしくは <i>Rb</i> に対する shRNA を処理した細胞を用意し、<i>Cry1</i> の発現増加を qRT-PCR 法により確認した。その後ヘム合成阻害剤である N-methylprotoporphyrin IX (NMP, sigma) で細胞を処理し、<i>Rb</i> 減少による <i>PER2</i> のヘム結合量増加を薬の作用で減少させた場合に、転写標的である <i>Cry1</i> の発現がレスキューされるかどうかを qRT-PCR 法により確認することが出来た。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> による概日リズムの制御 日本時間生物学会 2017 年 11 月 京都	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒト陥凹型大腸がんにおける浸潤能と悪性度の獲得機構の解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝子・教授・大島 正伸	
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	九州大学病院別府病院・教授・三森 功士	
	所属・職名・氏名	九州大学病院別府病院・研究生・神山 勇太	
	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】	陥凹型大腸がんの原発巣組織について同様に進化を解明する。典型的なヒト大腸がん臨床検体を用いたゲノム解析と比較することにより、陥凹型がん特有の進化の選択圧は何か？明らかにする。また、大島正伸先生等はドライバー遺伝子を組み合わせさせて変異を導入したマウスモデルを有しており、特に「浸潤傾向」を示す特定の遺伝子変異の組み合わせを明らかにした。本研究では次世代シーケンサーを用いた統合的遺伝子解析により、陥凹型大腸癌に高い悪性度を呈する機序についての分子生物学的特徴を明らかにする		
【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。)	【対象と方法】当院及び関連施設で切除された陥凹型粘膜下層浸潤(T1)癌 8 例および隆起型 T1 癌 8 例の原発巣から DNA および RNA を抽出、whole exome sequence および RNA sequence を施行し、統合的遺伝子解析を行った。		
	【結果】APC 変異は陥凹型 100%隆起型 62. 5%、TP53 変異は陥凹型 75%隆起型 62. 5%に認めた。一方で KRAS 変異は陥凹型 12. 5%隆起型 62. 5%と陥凹型に少なかった。染色体 copy 数解析では、20q、7p、q、8q の増幅は共通して認めていたが、20p は陥凹型 87. 5%隆起型 0%と陥凹型に有意に多かった。また、13p、q の増幅は陥凹型 37. 5%隆起型 0%に認めた。RNA 発現を Gene Set Enrichment Analysis により比較すると、陥凹型大腸癌において隆起型大腸癌に比べ Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT)と血管新生 gene set の発現上昇を認めていた。 また TCGA database にて APC、TP53、KRAS 変異の有無でコピー数を比較したところ、本陥凹型がんと同様に APC mutation、KRAS wild 症例では、KRAS mutation 症例に比べ 7p、13pq、20pq において、amplification が多いことを明らかにした。 【結論】陥凹型は腫瘍径の小さいうちに進行しやすいという臨床的特徴を有しているが、その原因として、早期癌のうちから APC および TP53 変異、20p および 13p、q 染色体増幅を認め、EMT および血管新生に関わる RNA 発現が上昇しているという、分子生物学的特徴が考えられた。		
	Morphological type	Depressed	Protruded
	Mutation	APC、TP53 ほか	APC、TP53 KRAS、ほか
	Copy number gain	7p、7q、8q、20q 20p、13p、13q	7p、7q、8q、20q
	Copy number loss		8p、10q、17p Tumor suppressor
	RNA expression	IGF2ほか	
	RNA pathway	EMT Angiogenesis	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Kiyozumi Y, Iwatsuki M, Kurashige J, Ogata Y, Yamashita K, Koga Y, Toihata T, Hiyoshi Y, Ishimoto T, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Yanagihara K, Mimori K , Baba H. PLOD2 as a potential regulator of peritoneal dissemination in gastric cancer. Int J Cancer. 2018. 2. Tanikawa C, Kamatani Y, Takahashi A, Momozawa Y, Leveque K, Nagayama S, Mimori K , Mori M, Ishii H, Inazawa J, Yasuda J, Tsuboi A, Shimizu A, Sasaki M, Yamaji T, Sawada N, Iwasaki M, Tsugane S, Naito M, Wakai K, Koyama T, Takezaki T, Yuji K, Murakami Y, Nakamura Y, Kubo M, Matsuda K. GWAS Identifies Two Novel Colorectal Cancer Loci at 16q24.1 and 20q13.12. Carcinogenesis. 2018. 3. Clinicopathological characteristics of disseminated carcinomatosis of the bone marrow in breast cancer patients. Shinden Y, Sugimachi K, Tanaka F, Fujiyoshi K, Kijima Y, Natsugoe S, Mimori K . Mol Clin Oncol. 8(1):93-98. 2018. 4. Niida A, Nagayama S, Miyano S, Mimori K . Understanding intratumor heterogeneity by combining genome analysis and mathematical modeling. Cancer Sci. 2018. 5. Maeda T, Mimori K , Suzuki S, Horiuchi T, Makino N. Preventive and promotive effects of habitual hot spa-bathing on the elderly in Japan. Sci Rep. 8(1):133. 2018. 6. Nambara S, Masuda T, Nishio M, Kuramitsu S, Tobo T, Ogawa Y, Hu Q, Iguchi T, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Suzuki A, Mimori K . Antitumor		

	effects of the antiparasitic agent ivermectin via inhibition of Yes-associated protein 1 expression in gastric cancer. <i>Oncotarget</i> . 8(64):107666-107677. 2017.
7.	Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, Ochiai A, Nakayama KI, Mimori K , Suzuki Y, Hong CP, Ock CY, Kim SJ, Oshima M. Combined mutation of Apc, Kras and Tgfr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer. <i>Cancer Res</i> . pii: canres.3303.2017. 2017.
8.	Hu Q, Masuda T, Sato K, Tobo T, Nambara S, Kidogami S, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Mimori K . Identification of ARL4C as a Peritoneal Dissemination-Associated Gene and Its Clinical Significance in Gastric Cancer. <i>Ann Surg Oncol</i> . 25(3):745-753. 2018.
9.	Takano Y, Masuda T, Iinuma H, Yamaguchi R, Sato K, Tobo T, Hirata H, Kuroda Y, Nambara S, Hayashi N, Iguchi T, Ito S, Eguchi H, Ochiya T, Yanaga K, Miyano S, Mimori K . Circulating exosomal microRNA-203 is associated with metastasis possibly via inducing tumor-associated macrophages in colorectal cancer. <i>Oncotarget</i> . 8(45):78598-78613.2017.
10.	Masuda T, Hayashi N, Kuroda Y, Ito S, Eguchi H, Mimori K . MicroRNAs as Biomarkers in Colorectal Cancer. <i>Cancers (Basel)</i> . 9(9). pii: E124. 2017.
11.	Takahashi Y, Sugimachi K, Yamamoto K, Niida A, Shimamura T, Sato T, Watanabe M, Tanaka J, Kudo S, Sugihara K, Hase K, Kusunoki M, Yamada K, Shimada Y, Moriya Y, Suzuki Y, Miyano S, Mori M, Mimori K . Japanese genome-wide association study identifies a significant colorectal cancer susceptibility locus at chromosome 10p14. <i>Cancer Sci</i> . 108(11):2239-2247. 2017.
12.	Ito S, Masuda T, Harada N, Matsuyama A, Hamatake M, Maeda T, Tsutsui S, Matsuda H, Mimori K , Ishida T. Diagnostic laparoscopy for pneumatosis intestinalis in a very elderly patient: A case report. <i>Ann Med Surg (Lond)</i> . 21:109-113. 2017.
13.	Nambara S, Masuda T, Tobo T, Kidogami S, Komatsu H, Sugimachi K, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Mimori K . Clinical significance of <i>ZNF750</i> gene expression, a novel tumor suppressor gene, in esophageal squamous cell carcinoma. <i>Oncol Lett</i> . 14(2):1795-1801. 2017.
14.	Sudo T, Takahashi Y, Sawada G, Uchi R, Mimori K , Akagi Y. Significance of CD47 expression in gastric cancer. <i>Oncol Lett</i> . 14(1):801-809. 2017.
15.	Ito S, Kai Y, Masuda T, Tanaka F, Matsumoto T, Kamohara Y, Hayakawa H, Ueo H, Iwaguro H, Hedrick MH, Mimori K , Mori M. Long-term outcome of adipose-derived regenerative cell-enriched autologous fat transplantation for reconstruction after breast-conserving surgery for Japanese women with breast cancer. <i>Surg Today</i> . 47(12):1500-1511. 2017.
16.	Sasaki S, Ueda M, Iguchi T, Kaneko M, Nakayama H, Watanabe T, Sakamoto A, Mimori K . DDR2 Expression Is Associated with a High Frequency of Peritoneal Dissemination and Poor Prognosis in Colorectal Cancer. <i>Anticancer Res</i> . 37(5):2587-2591. 2017.
17.	Sato K, Masuda T, Hu Q, Tobo T, Kidogami S, Ogawa Y, Saito T, Nambara S, Komatsu H, Hirata H, Sakimura S, Uchi R, Hayashi N, Iguchi T, Eguchi H, Ito S, Nakagawa T, Mimori K . Phosphoserine Phosphatase Is a Novel Prognostic Biomarker on Chromosome 7 in Colorectal Cancer. <i>Anticancer Res</i> . 37(5):2365-2371. 2017.
18.	Ueda M, Iguchi T, Masuda T, Komatsu H, Nambara S, Sakimura S, Hirata H, Uchi R, Eguchi H, Ito S, Sugimachi K, Mizushima T, Doki Y, Mori M, Mimori K . Up-regulation of <i>SLC9A9</i> Promotes Cancer Progression and Is Involved in Poor Prognosis in Colorectal Cancer. <i>Anticancer Res</i> . 37(5):2255-2263. 2017.
19.	Matsui Y, Niida A, Uchi R, Mimori K , Miyano S, Shimamura T. phyC: Clustering cancer evolutionary trees. <i>PLoS Comput Biol</i> . 13(5):e1005509. 2017.
20.	Tsukao Y, Yamasaki M, Miyazaki Y, Makino T, Takahashi T, Kurokawa Y, Miyata H, Nakajima K, Takiguchi S, Mimori K , Mori M, Doki Y. Overexpression of heat-shock factor 1 is associated with a poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. <i>Oncol Lett</i> . 13(3):1819-1825. 2017.
21.	Shibamoto M, Hirata H, Eguchi H, Sawada G, Sakai N, Kajiyama Y, Mimori K . The loss of <i>CASP4</i> expression is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell

- carcinoma. *Oncol Lett.* 13(3):1761-1766. 2017.
22. Sugimachi K, Nishio M, Aishima S, Kuroda Y, Iguchi T, Komatsu H, Hirata H, Sakimura S, Eguchi H, Bekki Y, Takenaka K, Maehara Y, Suzuki A, **Mimori K**. Altered Expression of Hippo Signaling Pathway Molecules in Intrahepatic Cholangiocarcinoma. *Oncology.* 93(1):67-74. 2017.
 23. Takano S, Hu Q, Amamoto T, Refinetti P, **Mimori K**, Funatsu T, Kato M. Extraction of cell-free DNA from urine, using polylysine-coated silica particles. *Anal Bioanal Chem.* 409(16):4021-4025. 2017.
 24. Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, **Mimori K**, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene.* 36(29):4201-4211. 2017.
 25. Komatsu H, Masuda T, Iguchi T, Nambara S, Sato K, Hu Q, Hirata H, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, **Mimori K**. Clinical Significance of *FANCD2* Gene Expression and its Association with Tumor Progression in Hepatocellular Carcinoma. *Anticancer Res.* 37(3):1083-1090. 2017.
 26. Sudo T, Nishida R, Kawahara A, Saisho K, **Mimori K**, Yamada A, Mizoguchi A, Kadoya K, Matono S, Mori N, Tanaka T, Akagi Y. Clinical Impact of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 24(12):3763-3770. 2017.
 27. Iwaya T, Sawada G, Amano S, Kume K, Ito C, Endo F, Konosu M, Shioi Y, Akiyama Y, Takahara T, Otsuka K, Nitta H, Koeda K, Mizuno M, Nishizuka S, Sasaki A, **Mimori K**. Downregulation of ST6GALNAC1 is associated with esophageal squamous cell carcinoma development. *Int J Oncol.* 50(2):441-447. 2017.
 28. Nambara S, Iguchi T, Oki E, Tan P, Maehara Y, **Mimori K**. Overexpression of CXCR7 Is a Novel Prognostic Indicator in Gastric Cancer. *Dig Surg.* 34(4):312-318. 2017.
 29. Kasagi Y, Oki E, Ando K, Ito S, Iguchi T, Sugiyama M, Nakashima Y, Ohgaki K, Saeki H, **Mimori K**, Maehara Y. The Expression of CCAT2, a Novel Long Noncoding RNA Transcript, and rs6983267 Single-Nucleotide Polymorphism Genotypes in Colorectal Cancers. *Oncology.* 92(1):48-54. 2017.
 30. Komatsu H, Iguchi T, Masuda T, Hirata H, Ueda M, Kidogami S, Ogawa Y, Sato K, Hu Q, Nambara S, Saito T, Sakimura S, Uchi R, Ito S, Eguchi H, Sugimachi K, Eguchi H, Doki Y, Mori M, **Mimori K**. Attenuated RND1 Expression Confers Malignant Phenotype and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 24(3):850-859. 2017.

【学会発表】

1. がん治療における革新的変化を踏まえた最先端技術，新たな開発戦略の現状と今後の方向性，講演，**三森功士**．第 23 回抗悪性腫瘍薬開発フォーラム，2017.6.24 東京．
2. 大腸がんの進化と転移再発を決める選択圧について，招待講演，**三森功士**．昭和大学横浜北部病院 2017 年消化器センター軽井沢セミナー，2017.6.30，軽井沢．
3. 消化器癌における ctDNA 検出の臨床的意義と臨床応用にむけての提言，特別企画 5，**三森功士**．第 72 回日本消化器外科学会，2017.7.21，金沢．
4. 消化器がん症例の様々な臨床的局面における血中 ctDNA 突然変異検出の意義，シンポジウム，**三森功士**．第 26 回日本がん転移学会，2017.7.27 大阪．
5. ctDNA において突然変異の検出が可能な原発巣の特徴，コアシンポジウム，**三森功士**．第 76 回日本癌学会学術総会．2017.9.29 横浜．
6. 大腸発がんから進行がんに至る過程のゲノムレベル進化について，講演，**三森功士**．第 3 回がんゲノム・エピゲノムセミナー 2017.10.7 札幌．
7. 食道がんゲノム情報に基づく診断と治療戦略の構築，ワークショップ，**三森功士**．JDDW2017.2017.10.14 福岡．
8. 消化器がん転移再発診断と治療評価法に関する ctDNA 解析の臨床的有用性と今後の課題，シンポジウム，**三森功士**．第 55 回日本癌治療学会学術集会，2017.10.20，横浜．
9. 薬物動態から見直す大腸がん化学療法，モーニングセミナー招待，**三森功士**．第 28 回日本消化器癌発生学会，2017.11.8，熊本．

	10. がん転移再発の早期診断における ctDNA の臨床的有用性について, 講演, <u>三森功土</u>. JBIC バイオ関連基盤技術研究会, 2017.11.29, 東京. 11. 大腸がんにおける新たな進化と多様性創出機構について, 講演, <u>三森功土</u>. Translation Research Seminar, 2017.12.5, 奈良. 12. 大腸がんにおける新たな進化と選択圧について, 講演招待, <u>三森功土</u>. 第 2 回消化器外科臨床応用をめざす研究交流会, 2018.1.26, 名古屋. 13. 大腸がんにおける進化機構のシフトによる腫瘍内多様性の創出, コアシンポジウム, <u>三森功土</u>. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会, 2018.2.9, 東京. 14. Evolution of CRC via Genetic Alteration Hampering Immune Response. The 33rd Nagoya International Cancer Treatment Symposium Mimori K 2018.2.11 Aichi Cancer Center 名古屋. 15. 大腸発がんからがん進展における新たな進化機構について北信がんプロ 第 2 回オンコロジーセミナー 特別講演 三森功土 2018.3.26 各大学・各医療施設がんプロ会議室. 富山 【その他特筆事項】
--	---

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膵癌の早期診断を目指したマイクロ RNA 発現・エピゲノム異常領域の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学大学院総合研究部社会医学講座・講師・三宅邦夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・講師・大坪公士郎
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・助教・山下 要
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・助教・福田康二
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・教授・矢野聖二
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	がんの発生や進展過程においてエピジェネティクス異常が大きく関与していることが報告されている。近年、マイクロ RNA (miRNA) の発現異常がさまざまながんでは報告され、その発現調節に DNA メチル化が関与していると考えられている。しかしながら、膵癌の早期診断のマーカーとなる miRNA の発現及び DNA メチル化異常、抗がん薬への感受性や抵抗性に関連する miRNA の検討はほとんどなされていない。 本研究は、膵癌及び膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 症例から内視鏡的に採取した膵癌組織、膵液、胆汁などの各種臨床サンプルを用いて、膵癌あるいは悪性 IPMN 症例において特異的に DNA メチル化異常を呈する miRNA を同定することで、膵癌早期診断マーカーを確立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。)	悪性腫瘍に特異的に発現する miRNA は“癌遺伝子型 miRNA”と“癌抑制型 miRNA”に大別され、エピジェネティックな遺伝子発現制御 (DNA のメチル化やヒストン修飾) によって悪性腫瘍では「癌抑制型 miRNA」がサイレンシングされることが報告されてきたが、膵癌においては miRNA の異常発現の基盤となるエピジェネティックな変化についての報告は少ない。 そこで本研究では、癌抑制型 miRNA と報告されている 16 種の miRNA について次世代シーケンサーを用いたバイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化解析を行った。膵癌組織から抽出した DNA の質・量が不十分であったことから、まずは胆汁から抽出した DNA, cell-free DNA を用いて解析を行った。内視鏡的逆行性胆管膵管造影 (ERCP) 時に胆汁を採取した膵癌 (PC) 26 例、胆道癌 (BTC) 10 例、良性膵胆道疾患 (BD) 9 例を対象としメチル化率を解析した結果、8 つの miRNA (miR-30a3p, 34a, 34bc, 96, 126, 141, 200a, 200bc) でメチル化率に差がみられた。miR-34a, 34bc において、PC, BD と比較して BTC で有意にメチル化率が高かった。また miR-126 において、PC, BTC と比較して BD で有意にメチル化率が高かった。しかしながら PC において有意にメチル化が高い miRNA は見いだせなかった。そこで現在、27 種の miRNA (39 領域) に対象を増やし、解析を進めている。 今後はさらにサンプル数を増やし、PC において統計学的有意に DNA メチル化異常を呈する miRNA の同定を行う。さらに金沢大学がん進展制御研究所で多数保存されている膵癌及び膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) 症例から内視鏡的に採取した膵癌組織、膵液及び血液などの各種臨床サンプルを用いて、胆汁以外の組織におけるメチル化率の解析、各種組織間の DNA メチル化状態について比較検討することが必要である。さらには DNA メチル化変化に伴う miRNA 発現についても検討する必要がある。膵癌の早期診断法の確立を目指して今後も継続して共同研究を推進していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 特になし	
	【学会発表】 大坪公士郎, 山下 要, 三宅邦夫, 矢野聖二. 胆汁を用いた膵胆道疾患における癌抑制型 miRNA のメチル化異常に関する検討. 第 48 回日本膵臓学会大会 (京都) 2017 年 7 月	
	【その他特筆事項】 平成 29-31 年度・科学研究費基盤 C 分担 “膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロ RNA 発現異常領域の同定” (代表: 金沢大学・大坪公士郎)	

研究課題		膵がん治療耐性に伴う幹細胞性獲得機構における GSK3 β /STAT3 経路の機能解析
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	金沢大学医薬保健研究域医学系・消化器・腫瘍・再生外科学大学院生・竹中 哲
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所・腫瘍制御・堂本貴寛
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所・腫瘍制御・上原将大
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌（浸潤性膵管癌）は予後が極めて不良な疾患であり、本邦においても罹患者数および死亡率ともに増加傾向にある。その予後を不良にしている主な要因の一つは化学療法や放射線療法への耐性であるが、この化学放射線療法への高い抵抗性に癌幹細胞の存在が深く関与している可能性が示唆されている。そのため膵癌治療成績の更なる向上の為には、癌幹細胞形質のメカニズムの解明とそれに対する戦略が不可欠と考えられる。 Signal transducer and activator of transcription (STAT)3 は炎症のメディエーターとして働く転写因子であるが、膵癌の発生・進展過程においても STAT3 が深く関与していることが報告されている。 本研究では、膵癌の化学療法において第一選択薬となっている gemcitabine (GEM) に段階的な耐性を示すように樹立されたヒト膵癌細胞株を用いて、膵癌の治療標的として同定された glycogen synthase kinase (GSK)3β を指標にして、膵癌幹細胞形質の維持に作用する STAT3 経路の機能解析を行った。	
【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。)	教室では、北里大学北里研究所病院バイオメディカルリサーチセンター竹内教授らがヒト膵癌細胞 BxPC-3 をもとに樹立した GEM 耐性細胞株 (Anti-cancer Drugs 2015;26:90-100) を供与頂いている。 Figure 1 shows three bar charts for SOX2, OCT3/4, and Nanog relative mRNA expression. The x-axis for all charts shows four cell lines: Parent, G30-3, G30-3-140, and G30-3-400. The y-axis is 'Relative mRNA expression'. For each cell line, two bars are shown: DMSO (black) and AR-A014418 (grey). In the SOX2 chart, expression is highest in G30-3-400 (~4.2) and lowest in Parent (~1.0). In the OCT3/4 chart, expression is highest in Parent (~1.2) and lowest in G30-3-400 (~0.5). In the Nanog chart, expression is highest in Parent (~1.5) and lowest in G30-3-400 (~0.2). Figure 2 is a Western blot showing protein levels of p-STAT3^{Y705}, Total STAT3, GSK3 α/β, and β-actin. The lanes are grouped by cell line (Parent, G30-3, G30-3-140, G30-3-400) and treatment (N: non-specific siRNA, S: GSK3β-specific siRNA). p-STAT3^{Y705} and Total STAT3 levels are higher in the S lanes compared to the N lanes. GSK3 α/β levels are also higher in the S lanes. β-actin is used as a loading control and shows consistent levels across all lanes. 図 1 図 2 研究 2 年目である本年度の研究では、癌幹細胞性のマーカーである SOX2、Nanog、Oct3/4 の発現を検討した。さらに GSK3β 阻害剤である AR-A014418 を用いて癌幹細胞性の減少をこれらのマーカーを用いて検証した。結果は SOX2 は獲得耐性強度に応じて発現が亢進していたが、Oct3/4 と Nanog は親株と比較して耐性株では発現が亢進していた。GSK3β 阻害剤により SOX2、Oct3/4、Nanog の発現が抑制された (図 1)。また同様に pSTAT3^{Y705} は耐性に応じて増加するが GSK3β 阻害により pSTAT3^{Y705} の発現も減少した (図 2)。 以上より、GEM 耐性株では GSK3β 阻害により GSK3β/STAT3 経路を介して、癌幹細胞性が抑制される可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		スキルス胃癌の間質増生機序特定と癌性腹膜炎発症機構の本態解明に基づく新規胃癌標的治療法の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・教授・安本 和生
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医療センター・科長・川島 篤弘
	所属・職名・氏名	金沢医科大学・助教・葛西 傑
	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】	胃癌の発症と死亡は今なお非常に高率で、その対策は喫緊の重要課題である。中でも、スキルス胃癌に代表される高度な癌間質増生を伴うびまん浸潤性胃癌（以下、スキルス胃癌）は、進行・再発胃癌死亡の半数以上を占め、悪性腹水を伴う癌性腹膜炎を高頻度に発症する極めて予後不良な胃癌である。本病態特異的な発育進展、とくにびまん性癌細胞浸潤と高度な癌間質増生ならびに癌性腹膜炎高頻度発症の成因は不明であり今なお効果的な治療法がない。本研究では、癌微小環境の新たな視点に基づく解析、すなわちスキルス胃癌特異的癌間質細胞の真の成り立ちとその役割について、今後の癌間質を標的とした治療のパラダイムシフトをも視野に、スキルス胃癌特異的な癌間質の性状・活性化因子の同定・癌細胞との相互作用から解明を図り、新規胃癌標的治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。)	【背景】本研究では、スキルス胃癌特異的癌間質の成り立ちと増生、その真の役割について、今後の癌間質を標的とした治療のパラダイムシフトをも視野にスキルス胃癌特異的な癌間質の性状・活性化因子の同定（HGF / HB-EGF の役割を中心に解析）・癌細胞との相互作用から、スキルス胃癌特異的癌間質の成り立ちと増生、その真の役割について解明を図った。癌間質の形質特性と biology の詳細な検討から、治療のパラダイムシフトを視野に新たなバイオマーカーの開発から新規標的治療法を開発を目指すことを目的に研究活動を行っている。 【方法】癌間質の形質特性を明らかにするためにスキルス胃癌原発巣 24 例を対象に、α-SMA、Galectin-1 (α-SMA 陽性 myofibroblast 産生増強作用が報告)、線維芽細胞活性化因子の一つである Fibroblast activation protein (FAP) ならびに、間質線維芽細胞より産生誘導されがん細胞の増殖遊走活性化に深く関与する HGF の発現を免疫組織学的に検討した。FAP では、その産生制御および生物活性を胃がん細胞株ならびに初代培養線維芽細胞を用い、臨床サンプルのがん性腹水中の濃度も検討した。 【成績】免疫組織染色結果から (10%以上を陽性)、α-SMA、Galectin-1、FAP、HGF の発現陽性率は、それぞれ 87.5% (21/24)、29.1% (7/24)、91% (22/24)、83.3% (20/24) であった。FAP は胃癌細胞に対して著明な遊走活性増強作用を認め、がん性腹水中には、非癌性に比して約 10 倍高濃度の FAP が存在することが判明した。スキルス胃癌原発巣における免疫組織染色の検討を追加し癌間質マクロファージからの豊富な HB-EGF 産生を確認した。HB-EGF には、スキルス胃癌細胞ならびに線維芽細胞の強力な増殖作用とも有していた。 【結論】スキルス胃癌の癌間質は、増殖・浸潤性亢進に深く関わる α-SMA、FAP 高度陽性および HGF 高産生性の線維芽細胞で構成されていることが初めて明らかとなった。また、線維芽細胞の増殖ならびに HGF/FAP 産生能亢進を引き起こす HB-EGF は、癌間質に浸潤する M2 タイプのマクロファージが重要な役割を持つことが今回の検討で明らかとなった。HB-EGF は、細胞表面の HER1/4 のレセプターを介して活性化を起こすことが報告されていることから、動物実験を通じて、治療のパラダイムシフトを視野に新たなバイオマーカーの開発から新規標的治療法を開発を目指すため今後 <i>in vivo</i>での治療実験を計画している。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 葛西 傑、安本 和生 et al. “The characteristic features of cancer stroma in the development of scirrhus gastric cancer.” 第 76 回日本癌学会 2017 年 9 月 パシフィコ横浜	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Rb/Akt 経路を基軸とした新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの開発
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・特任研究員・山野 荘太郎
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	金沢大学がん進展制御研究所・教授・高橋 智聡
【研究目的】	文部科学大臣、厚生労働大臣、経済産業大臣は、「がん対策推進基本計画」に基づき、平成 26 年度からの「がん研究 10 か年戦略」を定め、3 省が一体となり日本における癌研究戦略を推進しているが、新規対策課題として、希少がんに関する研究戦略を重要視している。毎年の病気の発生率が人口 10 万人あたり 6 人未満と規定される希少がんは、適応外薬や未承認薬の実用化研究を含む、民間主導の研究開発が進みにくく、治療薬開発のみならず治療薬開発のためのモデル動物開発も 5 大がんと比較し、大きな遅れを取っている。本研究の目的は、現在治療薬開発が遅れている希少がんの治療薬開発に資する新規マウスモデルの開発及びその発がん臓器の決定である。	
【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。)	新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの樹立 PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスを交配し、PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスを樹立する。PHLDA3 欠損マウスでは膵島及び下垂体に、Rb ヘテロ欠損マウスでは下垂体及び甲状腺に神経内分泌細胞の増殖性病変が形成されることがすでにわかっているが、その他の臓器における神経内分泌細胞の増殖性病変に関する詳細は、明らかにされていない。そのため、本研究では樹立した PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスと PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスについて、一般状態の悪化をエンドポイントとして最大 52 週で剖検を行い、検索臓器に対して肉眼的及び病理組織学的解析を行う。加えて、神経内分泌マーカー各種の免疫組織学的染色を行い、軽度の増殖性病変や転移巣に対しても精査する。 本年度では、各種マウスの交配を行った。現在継続して動物の飼育を行ない、一般状態の経過観察を行っている。	
【成果等】	【主な論文発表】 特になし。	
	【学会発表】 特になし。	
	【その他特筆事項】	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

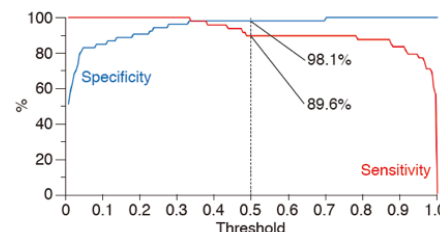
研究課題		軟部肉腫の GSK3 β を標的とする新規治療法の開発と分子メカニズム
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学地域医療救急 整形外科科学講座・特任教授・山本憲男
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 整形外科・教授・土屋弘行
	所属・職名・氏名	金沢大学 整形外科・医員・阿部健作
	所属・職名・氏名	金沢大学 がん研究所腫瘍制御・助教・堂本貴寛
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学 がん研究所腫瘍制御・教授・源利成
【研究目的】	当診療科での軟部肉腫の基本的な治療方針は、アドリマイシンやイホスファミドなどを中心とする抗がん剤治療と手術療法である。しかし、抗がん剤に抵抗性の症例や、骨髄抑制や多臓器不全など抗がん剤の強い副作用により投与中止を余儀なくされる症例も少なくない。そのため、これまでの抗がん剤とは違うメカニズムで作用する新しい治療薬の開発が望まれている。 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。本研究の目的は、GSK3β を標的とする軟部肉腫（滑膜肉腫、線維肉腫など）の新しい治療法開発のための基礎的研究を行い、早期臨床応用へむけて研究開発を行うことである。	
【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 <i>In vitro</i> i) 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 →軟部肉腫細胞株において、強く活性型 GSK3β の発現を認めた。 ii) 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 →軟部肉腫細胞株において、特異的 siRNA を用いると、GSK3β の発現が抑制された。MMT assay にて、抗腫瘍効果も認められた。 iii) 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 →時間・濃度依存性に抗腫瘍効果が認められた。 iv) フローサイトメトリーおよび cyclin D1, CDK4/6 のタンパク発現の検討 →GSK3β 阻害により、各種タンパクの発現が抑制され、G1 アレストを起こしている可能性を見出した。 ② <i>In vivo</i> 滑膜肉腫および線維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 阻害薬投与群において有意に大きさ・質量が縮小していた。また病理像においても腫瘍細胞の減少・壊死を認めた。	
【成果等】	【主な論文発表】 論文発表はまだです。	

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

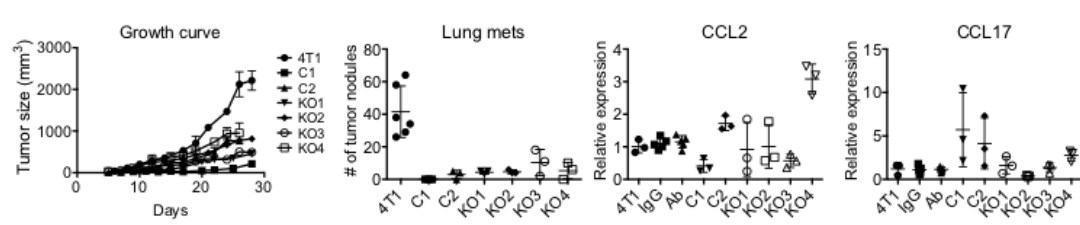
	【学会発表】 第 19 回 骨軟部サマーセミナー（金沢） 8 月 19 日（土） 第 55 回 日本癌治療学会学術集会（横浜） 10 月 19-21 日 第 36 回 日本整形外科学会基礎学術集会（沖縄） 10 月 26-27 日 American Academy of Orthopaedic Surgeons 2018 Annual Meeting (AAOS) (ニューオーリンズ，米国) 3 月 14-18 日
	【その他特筆事項】

平成 29 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		質量分析と機械学習を用いた大腸がんの判別アルゴリズム構築および分子病態解明
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】	本研究では簡易な前処理のみで大気圧下での使用が可能なアンビエント質量分析装置と、ヒト大腸組織のマススペクトルデータベース並びに、機械学習(AI)を用いた診断アルゴリズムを組み合わせ、大腸がんの迅速診断が可能な統合システムを研究開発することを目的とする。さらに構築されたマススペクトルデータベースを応用してメタボローム解析を行い、がん特異的に発現量が変化する生体分子を探索し、大腸がんの新規病態解明に向けた分子基盤やマーカー分子として利用することを目指す。	
【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。)	マススペクトルデータベースと診断アルゴリズムの構築 これまでに 243 切片(56 症例)より 1, 215 マススペクトルを収集し、患者情報と共に関係データベースを構築した。内訳は正常組織が 128 切片、癌組織はそれぞれ低分化 9 切片、中分化 86 切片、高分化 20 切片である。分化度の判別も可能とするためにデータ拡充を進めているが、現段階では低分化、高分化のデータ量が不足しているため、中分化に絞り、判別能の向上と分子機序解明に向けた解析を進めた。 AI を用いた非がん-がん判別 診断アルゴリズムでは機械学習であるロジスティック回帰を用いて、マススペクトル全体の変化から非がん-がんを判別する。学習用データベースを対象に一個抜き交差検証した結果、非がん-がんの判別正答率は 94. 1%であった。閾値に対する感度、特異度の変化を右図に示す。判別能の再検証のために、独立した 70 切片より取得したデータを判別したところ、正答率 94. 3%という同等の結果が得られた。これらの結果は当該診断アルゴリズムが中分化大腸がんの判別において、実用レベルであることを示唆している。	
	大腸がん特異的な挙動を示す分子の探索 マススペクトルに含まれるピークは全てが生体分子に由来するものである。そこで非がんおよびがん検体に由来するピークを個別に有意差検定し、<i>p</i> 値が高かったものについて分子同定を行った(右表)。ほとんどが脂質に由来する分子であり、特にホスファチジルコリン(PC)が多く認められた。現在がんにおいて特定の脂肪酸を持つ PC が増加する機序について、合成や代謝に関わる各種転写因子や酵素の発現量を解析し、解明することを試みている。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 第 123 回日本解剖学会全国学術集会 (2018.03.28~30), 東京, 日本医科大 リポミクスを基盤とした大腸がん診断システムの開発と病態解明 (ポスター)	
	【その他特筆事項】 なし	



m/z	Normalized intensity		p value (-log10)	Lipid identification
	Non-cancerous	Cancerous		
772.6214	5.4	9.5	11.04	PC (o-36:2) or PC (p-36:1)
773.5281	3.1	4.9	9.89	PG (18:0/16:0)
744.5897	2.3	3.9	9.81	PC (o-34:2) or PC (p-34:1)
771.5123	2.8	4.7	9.50	PG (34:1)
770.5090	3.9	7.5	9.42	PC (32:1)
743.4861	2.6	3.8	7.42	PG (34:4)
742.5733	3.5	5.1	7.25	PC (o-34:3) or PC (p-34:2)
745.4968	1.7	2.3	6.95	PG (32:0)
826.5726	5.7	9.5	6.94	PC (36:1)
712.5259	1.0	1.2	6.93	PC (o-30:1) or PC (p-30:0)
781.6213	10.9	7.4	6.64	SM (d18:1/22:3)
741.5309	5.0	7.7	6.58	SM (d18:1/16:0)
780.5509	17.5	11.6	6.19	PC (34:2)
798.5404	20.9	33.4	6.00	PC (34:1)
799.5437	10.3	16.1	5.94	PG (36:1)
848.5561	3.6	5.4	5.51	PC (36:2)
824.5561	10.1	15.6	5.50	PC (36:2)
561.4494	2.1	1.4	5.30	DG (32:4)
801.6843	2.8	3.6	5.26	SM (d18:1/23:0)
807.4553	6.3	4.7	5.11	PG (36:5)
426.1595	1.1	1.4	5.10	Hyaluronic acid

研究課題		乳癌細胞由来の内在性 GM-CSF が癌微小環境に与える影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学・准教授・吉村禎造
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・教授・松川昭博
	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】	我々は以前、1)腫瘍内の非腫瘍細胞により産生されるケモカイン MCP-1/CCL2 が乳癌細胞の肺転移を促進すること、2)腫瘍細胞により産生されるサイトカイン GM-CSF が浸潤マクロファージを強く活性化し、MCP-1 のみならず他のケモカインやサイトカインの産生を促す働きがあることをマウス 4T1 モデルを用いて明らかにした。本研究の目的は、腫瘍細胞により産生される GM-CSF が 4T1 腫瘍の進展にどのような働きをしているのかを遺伝子改変により作成した GM-CSF 非産生 4T1 細胞株を用いて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. GM-CSF 欠損細胞の作成：CRISPR-Cas9 法を用いて 4T1 細胞に遺伝子編集を行なった結果、47 個のクローンを分離した。その後、GM-CSF の産生を ELISA を用いて検討した結果、21 個のクローンが GM-CSF を産生していない事がわかった。その中から形態の異なる 4 つのクローン (KO1-4) を選択した。同様な方法でコントロールベクターを用いて、コントロールクローンを分離し、GM-CSF を産生する 2 つのクローン (C1, C2) を選択した。 2. GM-CSF 欠損細胞の in vivo での増殖あるいは肺転移：遺伝子編集前の 4T1 細胞、上記のコントロール、または GM-CSF 欠損細胞を各々 Balb/c マウスの乳腺脂肪組織内に移植し、局所での増殖、移植後 4 週間での肺転移巣の数を調べた。下記の図に示すように、クローン化された細胞は GM-CSF 産生の有無に関わらず、局所での増殖が 4T1 細胞に比較して遅く、肺転移巣の数も減少していた。 また、細胞移植後 2 週間で腫瘍を切除し、CCL2、CCL17 の発現を qRT-PCR で検討した。CCL2 の発現は GM-CSF の産生とは無関係であった。CCL17 に関しては、コントロールに比較して GM-CSF 欠損群で発現の減少傾向が見られた。  3. 抗 GM-CSF 抗体による GM-CSF 活性中和の及ぼす影響：2 週間の抗 GM-CSF 抗体処理後、4T1 腫瘍を切除し CCL2 と CCL17 の腫瘍内での発現を検討したが、上記の図に示したように全く影響はなかった。 4. 結論：以上の結果より、4T1 細胞をクローン化した場合、クローン化した細胞は GM-CSF の産生の有無に関係なく移植局所での増殖が減少すると共に肺転移も減少する。また、局所での炎症性のサイトカイン・ケモカインの発現に関しては CCL17 など限られた物質の発現が GM-CSF 欠損により低下したが、各細胞のもつ他の要因の関与も否定出来ない。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし。
	【学会発表】	吉村禎造、他：The role of tumor cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the progression of 4T1 murine breast cancer. Cytokines 2017、金沢、2017.
	【その他特筆事項】	なし。