

平成30年度
金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2019.4

金沢大学がん進展制御研究所

研究課題		遺伝子編集技術を応用した薬物誘発性肝毒性の新規バイオマーカー探索
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教・荒川 大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授・加藤 将夫
	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】	薬物誘発性肝毒性は、医薬品の開発中止や上市後の撤退の主要な要因である一方で、現在、ヒトでの発症を高い精度で予測可能な評価系が存在しない。その主な理由として、薬物（または候補化合物）の肝毒性発症の原因タンパク質の多くが、特定されていないことが挙げられる。そのため、薬物の肝毒性発症に関わる原因分子を特定し、肝毒性のバイオマーカーを見出すことで、薬物の臨床試験や上市後の安全性を大きく向上させることが期待される。本申請研究は、薬物による肝毒性を誘発する遺伝子の網羅的なスクリーニングにより原因遺伝子を同定し、さらにそのバイオマーカーを設定することで、肝毒性発症のリスクをより定量的かつ高感度に把握できる薬物誘発性肝毒性の新規評価系の構築を目的とする。	
【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。)	種々のヒト肝がん細胞を用いて、臨床で肝毒性を示す分子標的薬 lenvatinib の取り込み試験を行った。37 度及び 4 度における取り込み活性を比較したところ、検討した 3 つの細胞 (huh-1 細胞、Hep3B 細胞、及び HLF 細胞) の lenvatinib 取り込みに温度依存性が観察された。また、種々の化合物を用いて取り込み阻害試験を行ったところ、verapamil や quinidine など取り込みが低下し、肝がん細胞において lenvatinib 取り込みにカチオン系トランスポーターが介在することが示唆された。このトランスポーターを同定するため、薬物取り込みに関与する可能性のある 214 種のトランスポーターに対する siRNA を用い、取り込み試験によりスクリーニングを行なった。その結果、27 種の siRNA により 25% 以上の取り込みが低下した。さらにこれら 27 種の siRNA を用いて再現性試験を行ったところ、MATE1 (SLC47A1) など 7 種のトランスポーターのノックダウンにより有意に lenvatinib 取り込みが低下した。現在、薬物治療抵抗性や肝臓への蓄積に及ぼすトランスポーターの関与を検討するとともに、CRISPR-Cas9 を用いた網羅的解析による肝毒性誘発因子の探索についても進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	四方宏卓、荒川大、加藤将夫. siRNA スクリーニングによる肝がん細胞株への lenvatinib 取り込み機構の探索. 第 34 回薬剤学会 (富山). 2019 年 5 月 16-19 日. ポスター発表予定.
	【その他特筆事項】	

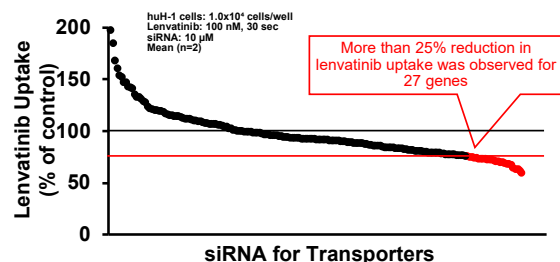
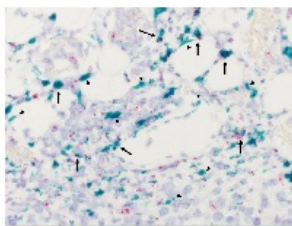
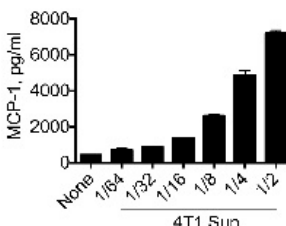
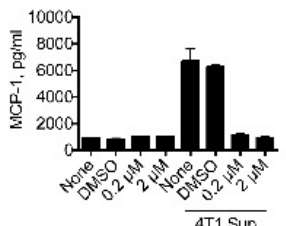
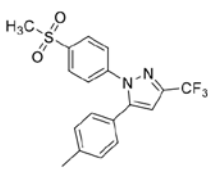
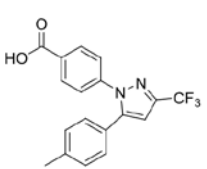
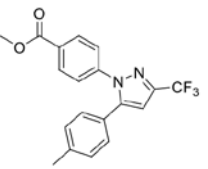
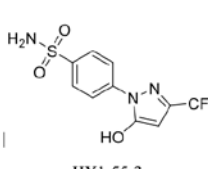
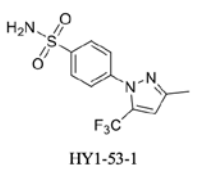
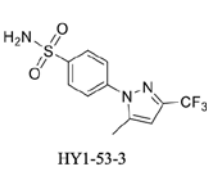
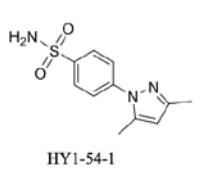
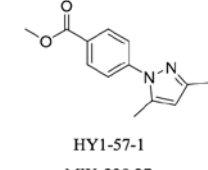
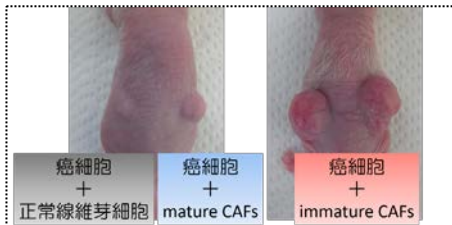


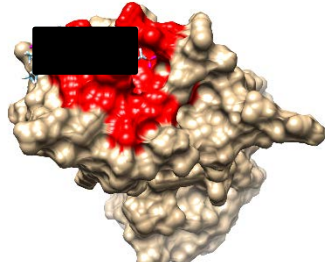
Fig. 1. Effect of siRNA for 214 Kinds of Transporters on Lenvatinib Uptake

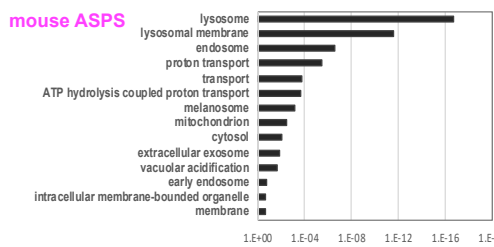
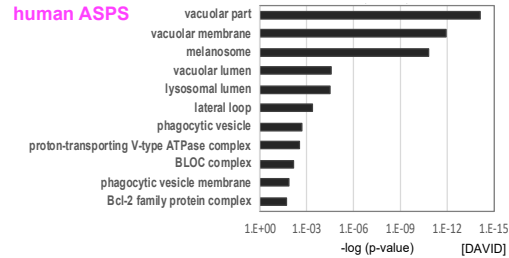
研究課題		4T1 マウス乳癌モデルにおけるケモカイン MCP-1/CCL2 の産生機序の解析																																	
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学・免疫病理・准教授・吉村禎造																																	
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学・免疫病理・教授・松川昭博																																	
	所属・職名・氏名	岡山大学・免疫病理・助教・藤澤真義																																	
	所属・職名・氏名	岡山大学・免疫病理・技術職員・佐藤美和																																	
	所属・職名・氏名	岡山大学医学科・学生・今村真悠																																	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史																																	
【研究目的】	腫瘍組織には腫瘍細胞と非腫瘍細胞が存在する。最近、これらの細胞間のクロストークによりケモカイン MCP-1 をはじめとする種々の腫瘍促進因子が産生されることが明らかとなり、この腫瘍環境を変えることが治療に大切であることが明確となった。本研究の目的は、腫瘍内での MCP-1 産生細胞を In situ hybridization あるいは免疫染色を用いて明確にし、非腫瘍細胞により産生される MCP-1 の産生機序を解析することである。4T1 乳癌モデルはヒトの乳癌の進展機序を解析する上で有用なモデルであり、この共同研究から得られる結果はがん治療の新しい標的を明らかにする上で重要な情報になると考えられる。																																		
【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。)	1. 4T1 腫瘍における MCP-1 産生細胞の In situ hybridization による同定： 以前、4T1 腫瘍内での MCP-1 産生細胞を免疫染色で数種の抗体を用いて同定しようと試みたが、MCP-1 の染色は出来なかった。そこで、今回 In situ hybridization を行なった。図 A に示すように、腫瘍細胞での MCP-1 mRNA (緑色) の発現はほぼ陰性であったが、F4/80 (赤色) 陽性のマクロファージ (Arrows) に加えて F4/80 陰性の細胞 (Arrow heads) に強い MCP-1 mRNA の発現を認め、この腫瘍内では 4T1 細胞とマクロファージ以外の細胞、例えば線維芽細胞、との間でのクロストークが存在することが強く示唆された。																																		
	A B<table><caption>Figure B: MCP-1 production in 4T1 Sup</caption><thead><tr><th>4T1 Sup</th><th>MCP-1, pg/ml</th></tr></thead><tbody><tr><td>None</td><td>~500</td></tr><tr><td>1/64</td><td>~1000</td></tr><tr><td>1/32</td><td>~1500</td></tr><tr><td>1/16</td><td>~2500</td></tr><tr><td>1/8</td><td>~3500</td></tr><tr><td>1/4</td><td>~5500</td></tr><tr><td>1/2</td><td>~7500</td></tr></tbody></table> C<table><caption>Figure C: MCP-1 production in NIH 3T3 cells</caption><thead><tr><th>Treatment</th><th>MCP-1, pg/ml</th></tr></thead><tbody><tr><td>None</td><td>~1000</td></tr><tr><td>DMSO</td><td>~1000</td></tr><tr><td>0.2 μM</td><td>~1000</td></tr><tr><td>2 μM</td><td>~1000</td></tr><tr><td>4T1 Sup</td><td>~6500</td></tr><tr><td>4T1 Sup + DMSO</td><td>~6000</td></tr><tr><td>4T1 Sup + 0.2 μM</td><td>~1500</td></tr><tr><td>4T1 Sup + 2 μM</td><td>~1000</td></tr></tbody></table> 2. 4T1 細胞より産生される PDGF による線維芽細胞の刺激と MCP-1 産生： 4T1 細胞と線維芽細胞間でのクロストークを調べるために 4T1 細胞と NIH 3T3 細胞を共培養したところ MCP-1 の産生を認めた。その後、4T1 細胞上清中に NIH 3T3 細胞またはマウスの正常線維芽細胞を刺激して MCP-1 の産生を促進する物質の存在を明らかにした (図 B)。そこで、我々は 4T1 細胞が Platelet-derived growth factor (PDGF) を産生するのではないかと推測し、RT-PCR を行なったところ、PDGF-a、b、c の強い発現を認めた。更に、4T1 細胞上清で刺激された NIH 3T3 細胞による MCP-1 産生は PDGF レセプター阻害剤で約 80%減少した (図 C)。このように 4T1 細胞は PDGF を産生することにより線維芽細胞を刺激するという新しいクロストークが存在することを明らかにした。しかし、マウス乳腺に移植した 4T1 細胞の増殖は PDGF レセプター阻害剤の腹腔内投与では影響が無く、乳癌の進展を阻害するためには複数のクロストークを阻害する必要があることがありとされる。		4T1 Sup	MCP-1, pg/ml	None	~500	1/64	~1000	1/32	~1500	1/16	~2500	1/8	~3500	1/4	~5500	1/2	~7500	Treatment	MCP-1, pg/ml	None	~1000	DMSO	~1000	0.2 μM	~1000	2 μM	~1000	4T1 Sup	~6500	4T1 Sup + DMSO	~6000	4T1 Sup + 0.2 μM	~1500	4T1 Sup + 2 μM
4T1 Sup	MCP-1, pg/ml																																		
None	~500																																		
1/64	~1000																																		
1/32	~1500																																		
1/16	~2500																																		
1/8	~3500																																		
1/4	~5500																																		
1/2	~7500																																		
Treatment	MCP-1, pg/ml																																		
None	~1000																																		
DMSO	~1000																																		
0.2 μM	~1000																																		
2 μM	~1000																																		
4T1 Sup	~6500																																		
4T1 Sup + DMSO	~6000																																		
4T1 Sup + 0.2 μM	~1500																																		
4T1 Sup + 2 μM	~1000																																		
【成果等】	【主な論文発表】 なし。																																		
	【学会発表】 吉村禎造、他：4T1 マウス乳癌の進展における腫瘍細胞由来 GM-CSF の役割。第 108 回日本病理学会。札幌、2018。																																		
	【その他特筆事項】 なし。																																		

平成 30 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		HGF-MET 系の下流遺伝子である AKT を標的とする新規抗転移剤の創薬研究
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・D1・篠原侑成
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 23-29 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。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。本年度は、非ステロイド性抗炎症薬である COX-2 阻害剤セレコキシブの新規誘導体の分子設計と合成を行い、新規抗転移剤の創薬シーズとしての有用性を検討した。	
【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。)	AKT シグナル伝達経路では、まず増殖因子がチロシンキナーゼレセプターに結合することで PI3K が活性化し、PIP2 が PIP3 へとリン酸化される。AKT は PIP3 へ結合し、PDK1 及び PDK2 によってリン酸化されることで活性化する。これにより、生存、増殖に関わる様々なシグナルが誘導され、がんの重篤化につながるということが知られている。これに対して、AKT 阻害剤は AKT のキナーゼドメインにおいて ATP を競合阻害することで、がんの浸潤・転移を抑制することが期待されている。そこで、AKT 阻害剤として非ステロイド性消炎・鎮痛剤である Celecoxib に注目した。Celecoxib は COX-2 選択的阻害剤として用いられているが、弱い AKT 阻害活性を有していることも報告されている。 Celecoxib の AKT 阻害活性を向上させるためにスルホンアミドをスルホンメチル (HY1-30-2) あるいはメチルエステル (HY1-37-1) に変換した誘導体を合成し、その AKT 阻害活性及び細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、HY1-37-1 は高い AKT 阻害活性を示し、HY1-37-1 からメチルフェニルを除去した HY1-57-1 には AKT 阻害活性は見られなかった。しかしながら、HY1-37-1 は生体内での安定性が低く、腫瘍移植鶏卵を用いた動物実験では有効性を示さないことが判明した。その一方で、HY1-37-1 は高い uPA、MMP-2、MMP-9 の発現抑制効果を示し、さらに活性型 MMP-2 の抑制効果も確認された。今後、生物学的等価体を分子設計することで有用な新規誘導体を開発できる可能性が示唆された。  HY1-30-2 MW. 380.39  HY1-35-1 MW. 346.31  HY1-37-1 MW. 360.34  HY1-55-3 MW. 307.25  HY1-53-1 MW. 305.28  HY1-53-3 MW. 305.28  HY1-54-1 MW. 251.30  HY1-57-1 MW. 230.27	
【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

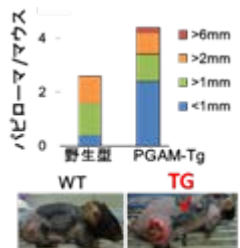
研究課題		ADAM 分子による大腸癌腫瘍先進部での線維性間質反応と低分化胞巣の形成機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・学内講師・望月 早月
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・米村 圭介
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・阿尾 理一
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・教授・上野 秀樹
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	本研究は、ヒト大腸癌組織においてCAF(Cancer-associated fibroblasts)で発現するADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子に着目し、ADAM分子を介した線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) における役割を明らかにする目的で研究を行った。	
【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。)	当研究室では、大腸癌腫瘍浸潤先進部での線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) が組織学的予後予測因子として有望であることを見出しており (Ann. Surg. Oncol 22:1504-12, 2015; Am. J. Surg. Pathol. 41:1506-1512, 2017)、DR を形態学的に immature、intermediate、mature に分類し、immature>intermediate>mature の順で予後不良となることを報告している (Gut 53:581-6, 2004)。本間質反応は、従来の臨床病理学的因子を凌ぐ優れた予後予測指標ではあるが (Ann. Surg. Oncol 22:1504-12, 2015)、本病変の分子機構については不明である。このような DR の形態学的変化には、細胞外マトリックスの産生と分解が深く関与しており、CAF から産生される ADAM 分子などのタンパク質分解酵素の関与が推定される。そこで本研究では、CAF で発現する ADAM 分子の発現と DR への関与について検討を行った。 大腸癌手術切除検体から DR の分類別に CAF を培養した。RT-PCR 法により主な ADAM 分子のうち ADAM9, ADAM10, ADAM17 が CAF で発現陽性であった。イムノブロット法により ADAM9 は mature な症例に比べて immature な症例の CAF において有意に活性型で高発現していた。また、レーザーマイクロダイセクションを用いて癌浸潤先進部組織を DR の分類別に採取し ADAM 分子について real-time qPCR 法で定量したところ、ADAM9 分子の発現は immature>intermediate>mature の順で発現が陽性であった。大腸癌細胞株と CAF を混合してヌードマウス皮下に移植したところ mature 症例から採取した CAF に比較し、immature 症例から採取した CAF との混合移植したマウスでは移植片の増殖が有意に促進された (図 1) これらのことから CAFs で発現する ADAM9 の発現は DR の形態学的変化に関連しており、大腸癌の増殖や転移に影響を及ぼしている可能性が示唆された。現在、大腸癌オルガノイドを用いてヒト大腸癌由来 CAF とマウスへ混合移植を行い DR の形成機構や治療耐性の検討を行っている。	
	 図1. 大腸癌細胞とDR別CAFとの混合移植の結果	
【成果等】	【主な論文発表】	
	1. <u>Satsuki Mochizuki</u>, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Yuka Miyamae, Junko Kuramoto, Noriko Aramaki-Hattori, Ken Ishii, Hideki Ueno, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada: Selective inhibition of ADAM28 suppresses lung carcinoma cell growth and metastasis. Mol. Cancer Ther. 17:2427-2438 2018. 2. Tadakazu Ao, Yoshiki Kajiwar, Kentaro Yamada, Eiji Shinto, <u>Satsuki Mochizuki</u>, Koichi Okamoto, Masato Yamadera, Keisuke Yonemura, Hideki Ueno: Cancer-induced spiculation on computed tomography: a significant preoperative prognostic factor for colorectal cancer. Surg. Today 2019 doi: 10.1007/s00595-019-01780-2.	
	【学会発表】	
	1. <u>Satsuki Mochizuki</u>, Masayuki Shimoda, Hideki Ueno and Yasunori Okada: Development of human antibody against ADAM28, a key modulator of tumor microenvironmental factors in non-small cell lung carcinomas. Matrix Biology Europe 2018, Manchester, 2018 年 7 月 22 日 2. 望月 早月、阿尾 理一、梶原由規、米村 圭介、岡本 耕一、神藤 英二、下田 将之、長谷 和生、上野 秀樹：がん関連線維芽細胞で発現する ADAM 分子による線維性癌間質反応への関与。第 15 回日本消化管学会総会学術集会、佐賀、2019 年 2 月 2 日	
	【その他特筆事項】 なし	

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 π 結合やスタッキング相互作用の予測法、Tanimoto 係数による類縁体探索手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分子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新規構造の化合物を探索するために、これまでに同定された HGF α 鎖と β 鎖の結合化合物の構造情報を元にスクリーニング系を再構築した。HGF α 鎖 NK1 部分の結晶構造を用いて、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を用い、これら結合シミュレーションを多段階的に行った。その結果、HGF α 鎖に結合し阻害効果を有する新規候補化合物を 10 種類選定し入手した。さらに、昨年同定していた HGF β 鎖に結合する化合物の類縁体を 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からそれぞれ 5 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、HGF α 鎖に対し、これまで同定していた既存化合物より高活性の IC50 値=50 μ M の新規阻害化合物を 1 種類 (図)、HGF β 鎖に対するチアゾール骨格を有する新規化合物を 1 種類発見する事に成功した。特に前者の化合物に関してはこれまでに同定してきた HGF α 鎖-Met 結合阻害剤の中では最も活性が高い化合物であった。この化合物は 3 つの六員環と 1 つの五員環からなる化合物であり、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ったことにより、さらに精緻な化合物-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。今後は、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。	
		
		図. HGF α 鎖構造と新規同定化合物との結合モデル構造
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 (1) 中島淳平、井上敬太郎、大津諒河、脇山佳也、青木俊介 “2 種類のドッキングツールを用いたパラレル化合物スクリーニング系” 分子病理研究会, 佐賀, 7 月 8 日, 20118. (2) 大津諒河、井上敬太郎 青木俊介 “AutoDock Vina と Hex を組み合わせた新規ドラッグスクリーニング法の確立” 分子病理研究会, 佐賀, 7 月 8 日, 20118.	
	【その他特筆事項】	

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	
	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】	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、肉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。前年度までに 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てマスペクトロメトリーで同定する方法と rapid immunoprecipitation mass spec of endogenous proteins (RIME)法の両者を用いて TFE3 に特異的に結合する分子群を同定した。ASPS 誘導能を有する TFE3 と TFEB の C 端側には SH3 結合モチーフが存在し、ASPS 誘導能を有さない MITF には存在しないが、同定した蛋白質中に 3 種の SH3 蛋白を認め現在解析を進めている。 2. ASPS と滑膜肉腫におけるヒストン修飾異常の解析 前年度に続いて、ヒト及びマウス ASPS において ChIP-seq を用いて ASPL-TFE3 の結合とともに H3K27 Ac、H3K27me3 や H3K4me3 のグローバルな変化や重要な標的遺伝子座における変化を解析した。この結果を基に ASPL-TFE3 に発現を正に制御される遺伝子経路を明らかにしたが、マウス・ヒトともに小胞輸送やライソソーム経路がハイライトされた (下図)。現在、他の MiT/TFE ファミリー転写因子との機能的異同についてさらに検討している。  	
【成果等】	【主な論文発表】 - Shimizu R, Tanaka M, Tsutsumi S, Aburatani H, Yamazaki Y, Homme M, Kitagawa Y, <u>Nakamura T</u>. EWS-FLI1 regulates a transcriptional program in cooperation with Foxq1 in mouse Ewing sarcoma. Cancer Sci, 109:2907-2918, 2018. - Namatame N, Tamaki N, Yoshizawa Y, Okamura M, Nishimura Y, Yamazaki K, Tanaka M,	

	<u>Nakamura T</u>, Semba K, Yamori T, Yaguchi S, Dan S. Antitumor profile of the PI3K inhibitor ZSTK474 in human sarcoma cell lines. Oncotarget, 9:35141-35161, 2018.
	【学会発表】 1. 中村卓郎 融合遺伝子発現による骨軟部肉腫のモデル化 第 65 回日本実験動物学会 富山、2018 2. 中村卓郎 マウス骨軟部肉腫モデルを用いた融合遺伝子・エピゲノム関連の解析 第 77 回日本癌学会学術総会 大阪、2018 3. 中村卓郎 白血病と骨軟部肉腫の発生機序を理解するための ex vivo マウスモデル 第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会 京都、2018 4. 中村卓郎 融合遺伝子依存的な肉腫発生病機構の新たな展開 第 2 回日本サルコーマ治療研究学会 東京、2019 5. 中村卓郎 Developmental mechanisms of fusion gene-associated sarcoma Asia-Pacific Scientific Workshop, Singapore, 2019
	【その他特筆事項】

平成 30 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		新規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た。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 PGAM-TG マウスが化学発癌プロトコルでの易発癌性を見出した(図 1)。同様の代謝効果をいくつかの癌細胞株でも確認した。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。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）。よってその分子メカニズムの解明を目指した。当初、PGAM そのもののプロテインホスホターゼ活性の可能性を疑い、検証した。様々な条件（PH、塩濃度、蛋白量）でも、PGAM のプロテインホスホターゼ活性は見出されなかった。次に PGAM 活性を消失した TG マウスを作成し、検証した。意外なことに、この変異マウスでも、PGAM とキナーゼ X の代謝協調作用が観察された。よって、PGAM とキナーゼ X の相互作用は、「非酵素」機能と結論付けた。今後さらにその分子機能解明を目指す。	
		
	図 1 PGAM-TG と発癌	
【成果等】	【主な論文発表】	
	Takayuki Teruya, Romanas Chaleckis, Junko Takada, Mitsuhiro Yanagida and Hiroshi Kondoh. Diverse metabolic reactions activated during 58-hr fasting are revealed by non-targeted metabolomic analysis of human blood. Scientific Reports 2019 Jan 29;9(1):854.	
	【学会発表】	
	2018 年 6 月 14 日 老化・癌化におけるメタボライトと解糖系代謝研究 第 60 回日本老年医学会 京都 2018 年 2 月 8 日 老化に伴う多角的治療戦略～老化と代謝研究の視点から見えてきたもの～ 第 7 回広島腎疾患研究会 広島 2018 年 1 月 25 日 解糖系代謝新規制御機構の解明 先端モデル動物支援プラットフォーム成果発表会 大津	
	【その他特筆事項】	

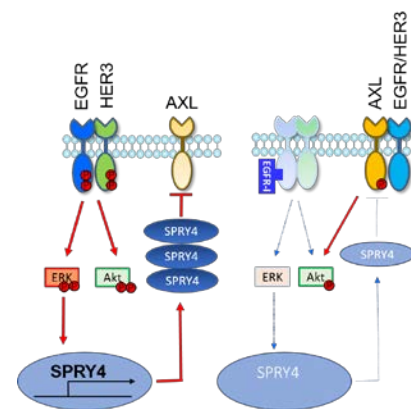
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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・准教授・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】	膵癌は、全てのガンの中で最も予後不良と考えられており、予後を改善するには、早期診断法と有効な治療法の確立が不可欠である。近年、大腸がん、胃がん、肝臓がんなど様々ながんで特異的なマイクロ RNA(miRNA)の発現異常が報告されている。膵癌の進行期においていくつかの miRNA の発現異常が報告されているが、早期診断のマーカーとなる miRNA は見つかっていない。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、血液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 には癌遺伝子型 miRNA と癌抑制型 miRNA があり、癌抑制型 miRNA はメチル化などのエピジェネティックな遺伝子発現制御によりサイレンシングされることが報告されているが、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) あるいは経皮経肝胆道ドレナージ (PTBD) 時に胆汁を採取した膵癌 53 例、胆道癌 25 例、良性膵胆道疾患 20 例、計 98 例を対象とし、胆汁から DNA を抽出、sodium bisulfite 処理後、癌抑制型 miRNA である (miR-26a1, 29c, 30d, 31, 34bc, 96, 126, 130b, 145, 192, 200a, 200b, 345, 615-5p, 1247, 1254-1) において PCR を施行し、ライブラリー調整後次世代シーケンサーを用いてメチル化の頻度を定量的に解析した。 16 の miRNA のうち、miR-1247, miR-200a では良性膵胆道疾患と比較して膵癌、胆道癌において、miR-200b では良性膵胆道疾患と比較して膵癌においてメチル化が有意に高くなる部位を認めた。一方、miR-126 では膵癌、胆道癌と比較して良性膵胆道疾患においてメチル化が有意に高くなる部位を認めた。これらの結果から miR-1247, 200a, 200b は膵胆道疾患における良悪性の鑑別に有用なマーカーになる可能性が示唆された。 今後は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 メチル化状態の比較検討することにより、診断マーカーとしての妥当性を検証する必要がある。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】	
	【学会発表】 Ohtsubo K, Yamashita K, Miyake K, Yano S. Analyses of aberrant methylation of tumor suppressive miRNAs in the patients with pancreaticobiliary diseases in bile juice. Pancreas 2018, Baltimore, USA, 2018 年 4 月	
	【その他特筆事項】 特許 “悪性の膵胆道系疾患を有するか否かを判定するためのデータ収集方法及びキット” 出願番号：特願 2019-037912、出願日：平成 30 年 3 月 1 日	

平成 30 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		癌抑制分子 Fam107B による、新たな GSK3 β 機能調節経路の探求
研究代表者	所属・職名・氏名	埼玉医科大学・特別協力研究員・小泉恵太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	埼玉医科大学／上尾中央総合病院・客員准教授・中島日出夫
	所属・職名・氏名	埼玉医科大学・特別協力研究員・中尾啓子
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本貴寛
	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】	Fam107B (HITS: heat inducible tumor suppressor) は、熱ショックによって誘導される熱ショックタンパクの一種で、がん進展に抑制的に働き、がん温熱療法 (hyperthermia) の一端を担うことが期待されている。これまでの源教授との共同研究から、Fam107B は GSK3 β や、その上流の AKT、SGK1 のリン酸化に関与する可能性が示唆された。 そこで、本研究では、Fam107B の強制発現や RNAi により、AKT/SGK1-GSK3 β のリン酸化、及び、その下流因子がどのように変化するかを解明し、この結果から、Fam107B によるがん進展抑制機構の解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	大腸がん由来の HCT-116、RKO、SW480 細胞への Fam107B の強制発現を行ったところ、すべての細胞株において GSK3 β の Ser9 のリン酸化が上昇していることが明らかとなった。一方で、Tyr216 に関しては変化が見られなかった。また、GSK3 β 上流のリン酸化酵素である、AKT、SGK1 については、HCT-116 細胞ではリン酸化(それぞれ Ser473/Ser422)が上昇していることがわかった (これ以降の解析は、全て HCT-116 細胞にて行った)。このことから、Fam107B は AKT、SGK1 のリン酸化を介して GSK3 β を制御していることが示唆された。一方、Fam107B の RNAi については、GSK3 β のリン酸化の減少傾向が見られたが、現状では有意差が得られていない (実験継続中である)。 次に、Fam107B の下流因子候補として複数の MMP (matrix metalloproteinase) 分子群が見つかり (未発表データ)、一方で GSK3 β の下流因子にも MMP が報告されていることから (Chikano et al, Mol Cancer Ther 14, 2015)、MMP2、MMP3、MMP13 の発現への Fam107B 強制発現の影響を検討した。この結果、MMP13 では mRNA の発現量の減少が確認された。他の分子については実験継続中である。 これらの結果から、Fam107B の強制発現は GSK3 β、MMP を介して、大腸がんの細胞接着性を減少させることが示唆されたため、Scratch アッセイ、Transwell アッセイを用いて、HCT-116 細胞の遊走性を解析したところ、どちらの解析でも細胞遊走性を有意に減少させていることが明らかとなった。 以上の解析から、Fam107B の強制発現は、GSK3 β を介してがん細胞の進展に抑制的に働くことが強く示唆された。hsp70 など多くの熱ショックタンパクが、がん進展を促進させることが報告されており (J Cell Physiol 232:1845-1861, 2017 など)、Fam107B は、これらの分子とは逆方向の機能を持つユニークな分子であると考えられる。また、がん温熱療法におけるがん抑制分子機構の一端を担うことが期待される。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 第 41 回日本分子生物学会 (11/28～30、横浜)	
	【その他特筆事項】	

研究課題		肺癌における分子標的治療薬の治療抵抗性細胞の解明とその克服治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・講師・山田忠明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・教授・高山浩一
	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】	肺癌治療における薬剤耐性は治療の最大の障害であり、その早期診断と対策は極めて重要である。変異 EGFR に特異的な阻害活性を有するオシメルチニブは EGFR 変異陽性肺癌に対し良好な治療成績を示し、臨床における治療効果が期待されている。その一方で一部の症例ではオシメルチニブの治療効果が乏しく、治療抵抗性腫瘍の分子機構の解明とその克服法の開発は临床上、大きな課題である。本研究では、オシメルチニブ治療に抵抗性を示す EGFR 変異陽性肺癌症例を治療前に予測し、その耐性克服法を新たに開発することを目的に検討を行った。	
【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。)	複数の EGFR 変異陽性肺癌細胞株および患者腫瘍を用いて、オシメルチニブ治療により誘導される治療抵抗性に関する分子機構について in vitro および in vivo 実験にて検討した。EGFR 変異陽性肺癌腫瘍の AXL 発現量を免疫染色法にて評価し、EGFR-TKI 治療との関連性について検討した。 EGFR 肺癌細胞に対するオシメルチニブ治療は、SPRY4/AXL シグナルを介した negative feedback 機構を誘導することで、オシメルチニブ治療介入後も生存シグナルは維持することを見出した (図)。 AXL 高発現 EGFR 肺癌細胞に対する AXL 阻害はオシメルチニブの治療効果を増強し、治療抵抗性細胞の生存を抑制した。治療前の EGFR 肺癌細胞株の AXL 発現の有無は、EGFR-TKI の感受性に有意な差を示した。細胞株および患者腫瘍 (PDX) を用いたマウスモデルでの検討では、AXL 阻害薬とオシメルチニブの併用治療は抗腫瘍効果を増強させ、再増大までの期間を延長した。臨床検体を用いた後方視的観察研究において、AXL 高発現を有する EGFR 変異を有する肺癌症例は、EGFR-TKI の治療効果 (無増悪生存期間、最良総合効果) が不良である傾向を示した。 以上より、本共同研究の成果として、EGFR 変異陽性肺癌の AXL 活性化はオシメルチニブ初期治療抵抗性に関与し、AXL 阻害薬の併用治療により治療抵抗性細胞の出現を抑制しうる可能性を示した。	
【成果等】	【主な論文発表】	Taniguchi H, <u>Yamada T</u>, Wang R, Tanimura K, Adachi Y, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Araujo LH, Boroni M, Yoshimura A, Shiotsu S, Matsumoto I, Watanabe S, Kikuchi T, Miura S, Tanaka H, Kitazaki T, Yamaguchi H, Mukae H, Uchino J, Uehara H, Takayama K, <u>Yano S</u>. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. <i>Nat Commun.</i> 2019 Jan 16;10(1):259.
	【学会発表】	<u>山田忠明</u>、谷口寛和、高山浩一、<u>矢野聖二</u>、EGFR 変異陽性肺癌におけるオシメルチニブ初期治療抵抗性の機構解明と新規耐性克服治療法の開発。第 59 回日本肺癌学会総会 2018/11/29 東京
	【その他特筆事項】	なし



平成 30 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		大腸がん発症・悪性化における腸内細菌による代謝脂質の役割解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪市立大学・講師・蒲池史卓
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	肥満は慢性炎症や発がんのリスクファクターであり、脂質の過剰摂取は肥満の原因の一つである。リノール酸は、必須脂肪酸であり食物から摂取する必要があるが、ヒトが持つ酵素によりプロスタグランジンなどの脂質メディエーターに変換され、炎症反応を誘導する可能性がある。一方、腸内細菌もリノール酸を代謝することが明らかにされたが、腸内細菌により生成されるリノール酸代謝物の生理的、病理的役割は十分に解明されていない。本研究では、腸内細菌により生成されるリノール酸代謝物が大腸がんの発症や進展に与える影響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。)	まず、リノール酸を過剰摂取した場合にどのリノール酸代謝物が多く生成されるのか明らかにするため、脂質含有量やリノール酸含有量の異なる 3 種類の餌（下記参照）をマウスに与え、大腸におけるリノール酸代謝脂質量を調べた。 Diet A：低リノール酸（2%）、普通食 (10 kcal%脂質, 20 kcal%タンパク質, 70 kcal%糖質) Diet B：低リノール酸（2%）、高脂肪食 (60 kcal%脂質, 20 kcal%タンパク質, 20 kcal% 糖質) Diet C：高リノール酸（12%）、高脂肪食 (60 kcal%脂質, 20 kcal%タンパク質, 20 kcal% 糖質) その結果、今回調べた 10 種類のリノール酸関連腸内細菌代謝脂質の内、4 種類は Diet C（高リノール酸－高脂肪食）摂取群のみで増加、2 種類は Diet B（低リノール酸－高脂肪食）群で低下し Diet C（高リノール酸－高脂肪食）群で回復、1 種類は Diet C（高リノール酸－高脂肪食）摂取群で低下、3 種類はいずれの群間においても有意な差は認められないことがわかった。次に、これらのリノール酸代謝脂質の活性を評価するため、脾臓細胞によるサイトカイン産生に対する効果を調べた。その結果、一部のリノール酸代謝脂質（HYA, KetoA, KetoC 等）は免疫細胞によるサイトカイン産生を抑制する機能を持つことがわかった。そこで、単独で強い抑制作用を持ち、高リノール酸食摂取後に大腸組織中で増加した KetoA と KetoC に着目し、免疫細胞のサイトカイン産生に対する効果を改めて検討した。その結果、各代謝物は単独でも免疫細胞によるサイトカイン産生を抑制したが、併用することでより強い抑制作用が認められた。以上の結果から、生体内で複数のリノール酸代謝物が生成され協調して働いた場合、より強い作用を発揮すると考えられる。大腸がん発症・悪性化における腸内細菌代謝脂質の役割を解明すべく、現在、大島研究室で樹立されたドライバー遺伝子変異蓄積による大腸がんマウスモデル（Sakai, et al, Cancer Res, 2018）での評価の準備を進めており、今後、生体内における詳細な役割が解明されることを期待したい。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 蒲池史卓、中村大、山崎翔太、中島将博、渡辺喜洋、新井達也、羅智文、吉本真、安藤達也、原田陽介、久保允人、田口速男、中江進、原英二、大谷直子、肝星細胞が産生する IL-33 の肝がん微小環境における活性化機構と役割、第 83 回日本インターフェロン・サイトカイン学会、2018 年 7 月 26-27 日 蒲池史卓、大谷直子、肥満関連肝がんの微小環境における IL-33 の活性化機構と役割、第 6 回がん代謝研究会、2018 年 5 月 10-11 日	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		白血病を増悪化させる異常血管ニッチの分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・助教・木戸屋浩康
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・研究員・村松史隆
	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・大学院生・林弓美子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	白血病には抗がん剤が有効であることから、併用化学療法を行うことによって寛解および治癒が期待できる。しかしながら、治療後の患者の多数が5年以内に再発するとされており、その場合は抗がん剤の効果が減弱して治療が困難となる。そのため、白血病の治療においては寛解後の再発をいかに抑制するか、さらには再発後の治療法をいかに開発するかが課題となっている。このような白血病の再発の原因の一つとされているのが、白血病幹細胞である。がん幹細胞は治療抵抗性を有することが知られており、治療後に残存した白血病幹細胞が再発の原因であると考えられている。本研究では、新たな白血病の再発抑制法の開発を目指し、白血病幹細胞の制御に働く血管ニッチの解析に取り組んだ。	
【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。)	骨髄組織の血管は、ニッチと呼ばれる特殊な微小環境を形成することで、造血幹細胞の維持や分化に働く。その分子メカニズムの解明のため、骨髄血管ニッチに存在する造血幹細胞において、発生ステージに応じて発現が変動する遺伝子をバイオインフォマティクス解析から探索し Regnase1 を同定した。Regnase1 は標的 mRNA の 3' UTR に結合して分解を促進することで発現制御に働く、新規のリボヌクレアーゼである。造血幹細胞における Regnase1 の機能を解析するため、血球細胞特異的に遺伝子欠損するマウス (Vav1-Cre:Regnase1^{fllox/fllox}) を作成した。このマウスは外見上には目立った異常が無く出生してきたが、生後8週頃からリンパ節腫脹と脾腫を始めとする AML 様の症状を呈して14週齢には大半が死亡した。造血幹細胞の解析を進めたところ、長期造血幹細胞が著しく増加しており、造血幹細胞の自己複製と分化のバランスが失われていることが示唆された。次に、AML 発症に至るメカニズムについて解析するためにトランスクリプトーム解析を行ったところ、ヒトの AML に関連する遺伝子の多くに異常が認められた。さらに、Regnase1 のリボヌクレアーゼ活性による直接の標的 mRNA を探索したところ、転写因子である Gata2 と Tal1 を同定した。これらの結果から、Regnase1 は造血幹細胞の転写ネットワークを制御することで恒常性維持に働いており、その破綻は白血病の発症に繋がることが明らかとなった (図4)。Regnase1 はこれまで想定されていなかった新しいタイプのがん関連分子であり、AML の治療戦略において重要な標的分子となる可能性を持っている (Kidoya H, et al. Nature Commun. 2019)。さらに、白血病を発症した Regnase1 欠損マウスの骨髄血管にどのような変化が起きているかを、骨髄組織切片を作成して形態的な解析を行った。その結果、白血病骨髄では血管数の著しい増加と、歪な血管形態への変化など、固形腫瘍において認められるような腫瘍血管が確認された。この骨髄血管の異常化が白血病の進展にどのように関連するかについて、引き続き検討を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】 Kidoya H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Hayashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S, Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis. Nat Commun. 2019 Mar 6;10(1):1072. Eino D, Tsukada Y, Naito H, Kanemura Y, Iba T, Wakabayashi T, Muramatsu F, Kidoya H, Arita H, Kagawa N, Fujimoto Y, Takara K, Kishima H, Takakura N. LPA4-Mediated Vascular Network Formation Increases the Efficacy of Anti-PD-1 Therapy against Brain Tumors. Cancer Res. 2018 Dec 1;78(23):6607-6620.	
	【学会発表】 Hiroyasu Kidoya. Regnase-1 decides the fate of hematopoietic stem cells by regulating the balance between differentiation and proliferation. The 16th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology 木戸屋 浩康、Reg1 による造血幹細胞の恒常性維持機構の解析、CVMW2018 心血管代謝週間 (第26回 日本血管生物医学会学術集会)	
	【その他特筆事項】 新聞掲載 2019/3/13 朝日新聞「白血病の新たな仕組みを発見 大阪大などチーム」 2019/3/13 日本経済新聞「白血病、酵素の異常関与 阪大「治療薬開発に道」	

研究課題		代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・教授・松田史生
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・清水 浩
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・助教・岡橋伸幸
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士前期課程学生・上原ひかる
	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・丸山正晴
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	がん幹細胞仮説を代謝工学的あるいはシステム生物学的な観点からとらえ直すことによって、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試みる。細胞内の代謝様態を把握するには、がん細胞の代謝経路の流れが様々なコンテキストにおいて、どのように変化するかを網羅的、定量的かつ動的に観察する必要がある。そこで、中心炭素代謝フラックスを定量可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法の確立とがん細胞系への適用を行う。とくにこれまでに構築した代謝フラックス解析法をもちいて、ヒトがん幹細胞への適用と応用をすすめる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がん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た。中心代謝のフラックス解析システムを構築してがん細胞の中核代謝の代謝フラックス解析を行った。 MCF7 (ヒト乳がん由来細胞株) を $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを含む培地中で培養し、細胞内代謝中間体を経時的に回収し、GC-MS を用いて ^{13}C 標識濃縮度を測定した。^{13}C 標識濃縮度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【図 1】。また抗がん剤であるパクリタキセル投与 24 時間後の MCF7 細胞でも同様に代謝フラックス分布を推定した。 その結果、パクリタキセルを投与区では、TCA 回路の代謝フラックスが 60%以上増加していた、一方、ワールブルグ効果といわれるがん特異的代謝 (好氣的解糖) の代謝フラックスは 30%程度減少していた。また、代謝系全体の ATP 供給量を試算したところ、20%程度増加していた。これらの結果から、パクリタキセルを投与区では ATP の供給を不効率な基質レベルのリン酸化から、高効率な酸化的リン酸化に切り替え ATP の再生効率を向上させることで、パクリタキセル投与に対する抵抗性を獲得するためのエネルギーを供給していると考えられた。また、この現象を同定に解析するための動的代謝モデル作成を行った。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Chie Araki, Nobuyuki Okahashi, Kousuke Maeda, Hiroshi Shimizu, and Fumio Matsuda (2018) Mass spectrometry-based method to study inhibitor-induced metabolic redirection in the central metabolism of cancer cells, Mass Spectrometry, 7(1), A0067. 【学会発表】 - 岡橋 伸幸, 河野 晋, 高橋 智聡, 清水 浩, 松田 史生. ^{13}C 代謝フラックス解析による p53 代謝リワイアリングの定量的解析. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018/11/28 - Fumio Matsuda, ^{13}C-Metabolic flux analysis of cancer cell metabolism, International BMS Symposium in Kyoto 2018 2018/10/27 - 丸山 正晴, 荒木 千絵, 岡橋 伸幸, 松田 史生, パクリタキセル処理に対するヒト乳がん由来細胞株の代謝応答の解析, 第 12 回メタボロームシンポジウム 2018/10/28 【その他特筆事項】 特になし	

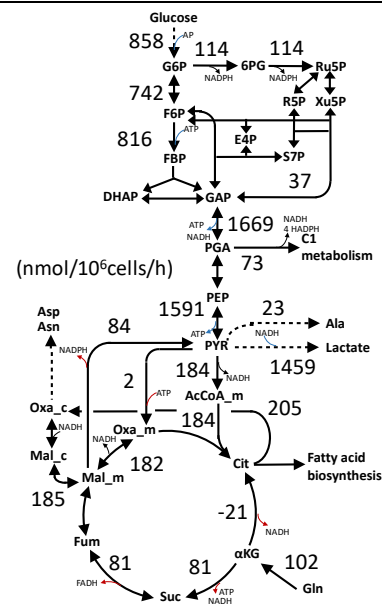
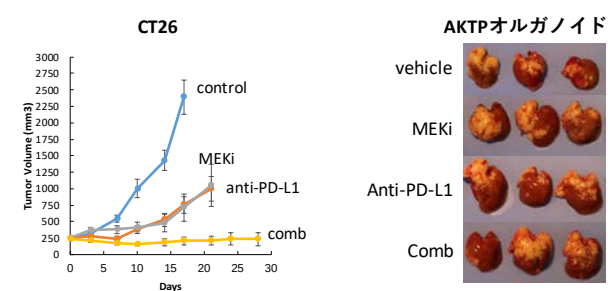


図1MCF7 の中心代謝フラックス分布

平成 30 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		マウスモデルを用いた免疫チェックポイント阻害薬と分子標的治療薬の併用療法の評価
研究代表者	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・分野長・衣斐寛倫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・ユニット長・細野祥之
	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・大島正伸
【研究目的】	免疫チェックポイント阻害薬は、固形がんの薬物療法として近年急速に臨床導入されている。しかしながら、大腸がんの大部分を占めるマイクロサテライト安定性腫瘍における奏効率は数%であり、新たな治療開発が急務となっている。マウス syngeneic モデルを用いた検討から、免疫チェックポイント阻害薬と MEK 阻害薬の併用が有効である可能性が示され (Ebert PJR et al. Immunity 2016)、第 III 相試験が進行中である。本共同研究では大島教授が樹立した大腸がん関連遺伝子変異導入による発がんモデルマウスを用い、併用療法の有効性の検証と新たな治療標的の同定を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本共同研究の開始後、MEK 阻害薬と抗 PD-L1 抗体の併用第 III 相試験の結果が 2018 年 6 月に行われた米国臨床腫瘍学会で発表された。しかしながら、期待された早期臨床試験の結果とは異なり、奏効率はわずか数%であった。マウス xenograft とヒトで効果の違いをもたらした原因は複数存在すると考えられるが、CT26 細胞株の tumor mutation burden (TMB) はマイクロサテライト安定性大腸がんの 10 倍以上であることから、ネオアンチゲンの多寡が結果に影響を与えた可能性が考えられた。このため、大島教授らのグループが樹立した、マウスに Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53 の遺伝子変異を同時に導入することにより大腸がんを発症するモデル (AKTP マウスモデル) において、抗 PD-L1 抗体と MEK 阻害薬の併用療法の効果を検討した。その結果、抗 PD-L1 抗体と MEK 阻害薬の併用療法は、CT26 syngeneic mouse model では腫瘍の縮小を誘導する一方、AKTP オルガノイドより作成した肝転移に対しては無効であることが確認された (図 1)。一方、愛知県がんセンターでは免疫関連シグナルを負に調節するパスウェイの解析を行い、大腸がんの免疫シグナルを負に制御する主要なパスウェイを同定した。これをもとに AKTP オルガノイドモデルにおいて、パスウェイを構成する分子を knock out した細胞の作成を開始した。AKTP マウスモデルで発症する大腸がんは、限られたドライバー遺伝子異常により引き起こされることから、その TMB は CT26 よりも少ないことが予想される。2019 年度は AKTP オルガノイドモデルにおける TMB を評価するとともに、同定したパスウェイおよびその下流に存在する標的分子の抑制により、AKTP オルガノイドモデルにおいて、免疫チェックポイント阻害薬の効果増強が得られるか評価を行う予定である。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

図1. KRAS変異大腸がんCT26 syngenic modelとAKTPオルガノイドモデルにおける抗PD-L1抗体+MEK阻害薬の効果の違い



平成 30 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		炎症性がん微小環境の NK 細胞による制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学 和漢医薬学総合研究所・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】	本共同研究計画では、これらサイトカイン・ケモカインの産生に認められる炎症性腫瘍微小環境の NK 細胞による免疫調節メカニズムを明らかにすることを目的とする。特に IL-6 の産生亢進に IL-17A が必須であったことから、これらのサイトカインの炎症シグナルに関わる STAT3/NF-κB 経路に着目して研究を進める。本研究を通してがん連炎症に関わるサイトカイン・ケモカインの発現制御における NK 細胞の役割とその重要性について理解する事は、NK 細胞による炎症制御をターゲットとした新たながん治療戦略や創薬アプローチへとつながる事が期待できるため大きな意義がある。	
【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。)	がん悪性化進展プロセスにおいて、血管新生やリンパ管新生をはじめ、腫瘍関連繊維芽細胞や骨髄由来細胞など、がん細胞を取り巻く周辺間質細胞との相互作用によって成立する、腫瘍特異的な微小環境の重要性が示唆されている。なかでも腫瘍局所における宿主炎症性免疫細胞と、がん細胞や間質細胞の細胞間相互作用、または炎症性細胞から産生されるサイトカイン／ケモカインをはじめとする炎症性メディエーターとの相互作用が、がん細胞の遠隔臓器への転移を促進する微小環境の形成に重要な役割を担うと考えられる。NK 細胞は、抗腫瘍エフェクター細胞として重要な自然リンパ球として広く認められているが、一方これまで腫瘍局所における炎症性微小環境の成立過程、または維持機構における NK 細胞の役割については全く知られていない。我々は最近 NK 細胞の新たな機能としてがん細胞を直接攻撃するのみならず、がんの悪性化進展に関わる血管新生を、炎症性細胞の好中球の機能制御を介して調節していることを明らかにした。加えて NK 細胞により制御される炎症性腫瘍微小環境について炎症性サイトカイン・ケモカインの産生についてマルチプレックスアッセイによって網羅的に解析した結果、NK 細胞を除去したマウスの腫瘍組織では IL-6、IL-23, IP-10, KC, MCP-1, RANTES といった炎症メディエーターの産生が亢進しており、特に IL-6 の産生増幅が顕著に認められた。IL-6 は抗腫瘍免疫に対して抑制的に働く MDSC の腫瘍内への浸潤や活性化に重要な役割を担っていることが知られているため、NK 細胞除去マウスでの腫瘍内 MDSC についてさらに解析を行った。MDSC は Granulocytic-MDSC (G-MDSC) と Monocytic-MDSCs (M-MDSC) の二つのポピュレーションに大別されるが、NK 細胞除去マウスでは腫瘍内に浸潤する G-MDSC の占める割合に顕著な増加が認められた。以上の結果から、NK 細胞除去マウスの腫瘍微小環境では IL-6 の産生増加と G-MDSC の誘導に見られる慢性炎症が亢進している可能性が示唆された。IL-6-STAT3 を介したシグナル経路は MDSC の誘導に代表される炎症整備小環境を形成し、さらにがん細胞においては転移・浸潤過程に重要な EMT の誘導や MMPs の産生亢進などを介して転移促進に寄与すると考えられる。現在 NK 細胞除去マウスで形成される IL-6 の産生増加をはじめとする炎症性腫瘍微小環境が、がん細胞の転移形質獲得に与える影響を解析中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Yamamoto Y, Miyazato K, Takahashi K, Yoshimura N, Tahara H, Hayakawa Y, Lung-resident natural killer cells control pulmonary tumor growth in mice. Cancer Sci. 2018;109(9):2670-2676. 【学会発表】 1. 藤原俊幸、高橋恵生、江幡正悟、早川芳弘. リンパ腫全身性播種モデルにおける NK 細胞による免疫監視の重要性. 第 27 回日本がん転移学術集会・総会；2018 Jul 19-20；横浜 2. Kiho Miyazato, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa. Anti-metastatic effect of thalidomide through the regulation of NK cell homeostasis. 第 77 回日本癌学会学術総会；2018 Sep 27-29；大阪. 3. Yoshihiro Hayakawa, Hideaki Tahara. NK cell control tumor-promoting function of neutrophils. 第 77 回日本癌学会学術総会；2018 Sep 27-29；大阪 4. Kiho Miyazato, Hideaki Tahara, Yoshihiro Hayakawa. Anti-metastatic effect of thalidomide through the regulation of NK cell homeostasis. 第 47 回日本免疫学会学術集会；2018 Dec 10-12；福岡 5. Yoshihiro Hayakawa. Targeting natural killer cells to regulate cancer-associated inflammation. 1st	

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	International Seminar on Pharmaceutical 2018 ; 2018 Sep 27-28 ; Manado, Indonesia
	【その他特筆事項】 特になし

平成 30 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/EBPβ 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・輸血細胞治療部・助教・平位秀世
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療部・院生・神尾尚馨
	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、好塩基球由来のケモカイン 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が優位になることを明らかにしている。一方、我々は CML の病態形成に重要な役割を担うロイシンジッパー型の転写因子 C/EBPβ が CML 細胞からの CCL3 分泌を制御している可能性を示唆するデータを得ている(未発表データ)。本研究計画では、1) CML での好塩基球の分化・増殖制御における C/EBPβ の機能、2) C/EBPβ による CCL3 の発現制御が、好塩基球分化を介したのか、あるいは直接に制御し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/EBPβ が BCR-ABL 存在下で好塩基球の分化制御にどのように関わっているかを <i>in vivo</i> で明らかにするために、5-FU 処理した野生型(WT)マウスまたは C/EBPβ ノックアウト (KO) マウス由来の骨髄細胞に BCR-ABL をレトロウイルスによって遺伝子導入し、放射線照射したマウスに移植した。移植後 14 日前後で末梢血及び骨髄を採取し、フローサイトメトリーで解析したところ、末梢血及び骨髄のいずれにおいても、KO マウス由来細胞を移植したレシピエントでは WT マウス由来細胞を移植したものに比べて絶対数・頻度のいずれでも好塩基球が有意に少ないという結果が得られた。 上記の結果から、KO マウス由来細胞を移植されたレシピエントで好塩基球が少ないことが CCL3 低値の一つの原因であることは判明したが、さらに好塩基球内で CCL3 の発現制御にも C/EBPβ が関与している可能性がある。そこで、前述の WT マウス由来細胞レシピエントと KO マウス由来レシピエントのそれぞれから好塩基球を純化し、CCL3 mRNA を定量した。その結果、KO マウス由来好塩基球において、野生型と比較して大幅に CCL3 mRNA の発現量が少ないという結果が得られた。 以上の結果から C/EBPβ は、BCR-ABL の存在下で好塩基球分化および CCL3 mRNA の転写調節の両方を介して白血病の進展に関与することが明らかとなった。今後、C/EBPβ の標的遺伝子の解明など詳細な分子機構の解明に努め、治療への応用を目指したい。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) 平位秀世:緊急時好中球造血に必須の転写因子 C/EBPβ による造血幹細胞の分化増殖制御. 臨床血液. 臨床血液. 59(8): 798-804 2018. 2) 平位秀世: TOPICS:非古典的単球の生存を制御する転写因子 C/EBPβ. 医学のあゆみ 268 (2): 145-146, 2019 3) Yokota A, Hirai H, Sato R, Adachi H, Sato F, Hayashi Y, Sato A, Kamio N, Miura Y, Nakano M, Tenen DG, Kimura S, Tashiro K, Maekawa T: C/EBPβ is a critical mediator of IFNα-induced exhaustion of chronic myeloid leukemia stem cells. Blood Advances, 3(3):476-488, 2019 4) Ogawa R, Yamamoto T, Hirai H, Hanada K, Kiyasu Y, Nishikawa G, Mizuno R, Inamoto S, Itatani Y, Sakai Y, Kawada K: Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via CXCL1/8-CXCR2 axis. Clinical Cancer Research, in press	

【学会発表】

Atsushi Sato, Asumi Yokota, Yoshihiro Hayashi, Akihiro Tamura, Yasuo Miura, Taira Maekawa and Hideyo Hirai: C/EBP β isoforms sequentially regulate proliferation and differentiation of regenerating hematopoietic stem/progenitor cells.

Twelfth International Workshop On Molecular Aspects Of Myeloid Stem Cell Development And Leukemia. (2018 Myeloid Stem Cell Development & Leukemia Conference)

平成 30 年 5 月 7 日

Hideyo Hirai: C/EBP β critically mediated IFN α -induced exhaustion of chronic myeloid leukemia stem cells.

The 9th JSH International symposium

平成 30 年 7 月 27 日

Torikoshi Y, Shime N, Yokota A, Kamio N, Sato A, Shoji T, Kashiwagi T, Miura Y, Maekawa T, Hirai H: Impact of Hypothermia on Differentiation and Maturation of Neutrophils.

American Society of Hematology, 60th Annual Meeting and Exposition

平成 30 年 12 月 2 日

神尾尚馨、田村彰広、鳥越勇佑、平位秀世：転写因子 C/EBP β による非古典的単球の生存制御
第 27 回日本 Cell Death 学会学術集会

平成 30 年 7 月 27 日

藤井紀恵、三浦康生、藤城 綾、進藤岳郎、島津 裕、平位秀世、高折晃史、一戸辰夫、前川平：ヒト骨髓間葉系幹細胞由来細胞外小胞はナイーブ制御性 T 細胞を保持し、急性移植片対宿病を緩和する。 BM-MS- derived extracellular vesicles preserve naïve regulatory T cells and ameliorate acute GVHD.

第 40 回日本造血細胞移植学会総会

平成 30 年 2 月 2 日

庄司 月美、横田 明日美、佐藤 淳至、神尾 尚馨、柏木 隆宏、鳥越 勇佑、三浦 康生、足立壮一、前川 平、平位秀世：CRISPR/Cas9 を用いた(9;22)転座モデルによる BCR-ABL 形成の生物学的意義の解明.

第 77 回日本癌学会学術総会

平成 30 年 9 月 27 日

田村彰広、平位秀世、横田明日美、神尾尚馨、佐藤淳至、庄司月美、柏木隆宏、鳥越勇佑、三浦康生、Tenen DG、前川 平：C/EBP β は Ly6C-単球の生存に必須である.

第 14 回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾)

平成 30 年 6 月 30 日

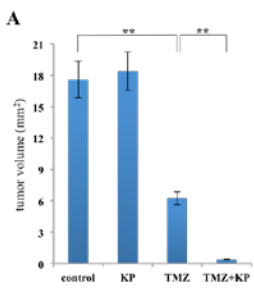
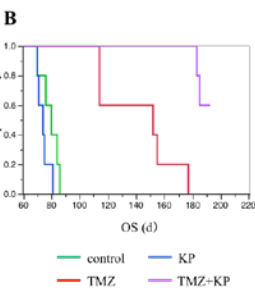
平位秀世：C/EBP 転写因子による好中球造血の制御機構と疾患.

第 4 回 NIIGATA Hematology Seminar

平成 30 年 10 月 26 日

【その他特筆事項】

該当無し

研究課題		抗悪性グリオーマ剤の効果を増強する既存薬剤の同定
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・沙比尔 江 加帕尔
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・玉井 翔
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	本研究は、ドラッグリポジショニングの手法により、薬剤抵抗性を示す脳腫瘍幹細胞を治療標的として悪性脳腫瘍の標準治療薬である抗がん剤：テモゾロミド(TMZ)の効果を増強させる既存薬剤を探索し、これを使用した悪性脳腫瘍の新規化学療法の基礎基盤を構築するものである。	
【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。)	膠芽腫手術摘出検体から独自に膠芽腫幹細胞株(KGS01, KGS03)を確立した。これを用いて、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行った。結果、2種類の薬剤Kenpauillone(KP)と2-Fluoropalmitic acid (2FPA)を抽出した。この2剤についてKGS01, KGS03 を用いてスフェア形成アッセイを行い、TMZとの併用療法で幹細胞性を強く阻害することを確認した。次に、5種類の膠芽腫細胞株を用いて増殖アッセイを行い、抗増殖効果を検討した結果、KPと2FPAはTMZ の抗増殖効果を濃度依存性に増強することが確認できたため、動物実験へと進めた。KPを使用した動物実験では、一定期間治療後の腫瘍体積 (下図A)および生存期間を比較した (下図B)。TMZ 単独で腫瘍の増殖抑制ならびに生存期間の延長が得られたが、KP と併用することでTMZ の効果が増強することが示された。メカニズム解析では KP の TMZ 効果増強作用は glycogen synthase kinase 3β (GSK3β)阻害作用によると考えられた。KP については現在論文投稿中 (in revision)であり、2FPA については論文作成中である。  	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Jiapaer S, Furuta T, Tanaka S, Kitabayashi T, Nakada M. Potential strategies overcoming the temozolomide resistance for glioblastoma. <i>Neurol Med Chir (Tokyo)</i> 58: 405-421, 2018 2. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Hayashi Y, Kobayashi M, Domoto T, Minamoto T, Hirao A, Nakada M. Identification of GSK3β inhibitor kenpauillone as a temozolomide enhancer against glioblastoma. <i>Sci. Rep.</i> in revision 【学会発表】 1. Jiapaer S, Sabit H, Kitabayashi T, Hirao A, Nakada M. Analysis of antitumor effect of 2-fluoro palmitic acid against glioblastoma. 第 19 回日本分子脳神経外科学会, 平成 30 年 8 月 24 日-25 日, 大阪 2. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Nakada M. Identification of GSK3β inhibitor kenpauillone as a temozolomide enhancer against glioblastoma Society for Neuro-Oncology 23rd Annual Meeting 2018, November 15-18, 2018, New Orleans, Louisiana, USA 【その他特筆事項】 なし	

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

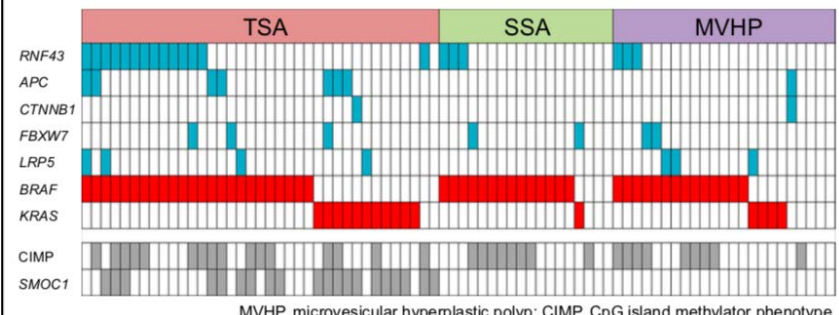
研究課題		固形がんの抗がん剤抵抗性に関わる新たな分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・准教授・坂本毅治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	がん治療において、分子標的薬の持つ特異性と抗がん剤の持つ汎用性という一見矛盾する特性を持つ治療法の開発が望まれる。我々は MT1-MMP/Mint3 ががん組織特異的に HIF を活性化することを明らかとしてきた。HIF は抗がん剤耐性や幹細胞性に関わる遺伝子の発現を制御することから、MT1-MMP/Mint3 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。)	・乳がん細胞の in vivo での抗がん剤抵抗性に関わる分子 X の解析 H29 年度に同定した、Mint3 依存的な乳がん細胞の in vivo での抗がん剤抵抗性に関わる分子 X について、ノックダウン細胞の作製を試みた。現在 5 種類の shRNA 配列を作製したが、いずれもノックダウン効率が悪く、その後の解析に用いることが出来なかった。さらに別の shRNA 配列を試すとともに、in vitro の条件下でも分子 X による乳がんの抗がん剤抵抗性が再現できないか実験条件の検討を行う。 ・Mint3 ノックダウン膀胱がん細胞の作製 H29 年度から解析を進めている乳がんと並行して、膀胱がん細胞における 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、AsPC1、BxPC3 細胞 Mint3 ノックダウン細胞を作製した。 ・Mint3 ノックダウン膀胱がん細胞を用いた in vitro での抗がん剤抵抗性の解析 AsPC1、BxPC3 細胞の in vitro でのゲムシタビン・パクリタキセルへの感受性を検討した結果、Mint3 ノックダウンにより膀胱がん細胞の増殖が抑制されること、また抗がん剤の効果を増強することが明らかとなった。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 ノックダウン膀胱がん細胞を用いた幹細胞性の解析 Mint3 ノックダウンの膀胱がん細胞の幹細胞性への影響について、スフェロイドアッセイを行った。その結果、Mint3 ノックダウンにより有意にスフェロイド形成能が低下することが明らかとなった。さらに、幹細胞マーカー遺伝子の発現を調べたところ、全てではないが、一部の幹細胞マーカー遺伝子の発現が低下していることが明らかとなった。今後はどのようなメカニズムで Mint3 が膀胱がんの抗がん剤抵抗性や幹細胞性の制御に関わるかについて、メカニズムの解明を行う。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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、私達は 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。)	私達は近年、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、放出された HAI-1 断片(soluble HAI-1, sHAI-1)に細胞凝集を誘導する活性があることを明らかにし、sHAI-1 のドメイン構造のうち、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、昨年度に引続き、sHAI-1 による細胞凝集誘導メカニズムの詳細な解明を目標に研究を行なった。昨年度の成果から、HAI-1 (141-249) 領域内の数アミノ酸残基が細胞凝集に重要であることが判明していたため、まず、そのアミノ酸配列部分を GST と融合した結果、生じた GST 融合タンパク質が細胞凝集誘導活性を持つことを見出した。ここで、GST が二量体を形成することを考慮すると、HAI-1 由来のアミノ酸配列が二価的に細胞表層受容体と相互作用し、これを架橋しつつ、細胞凝集を誘導することが予想された。次に同じアミノ酸配列を持つオリゴペプチドを合成したところ、このペプチドは細胞凝集誘導活性を持たず、反対に MMP-7 が惹起するがん細胞の凝集を抑制したことから、sHAI-1 受容体に対するアンタゴニストとして作用することが示唆された。さらに、HAI-1 (141-249) 領域内には上記の細胞凝集活性に重要なアミノ酸配列と類似した配列が 3 箇所存在することから、これらのアミノ酸配列を持つオリゴペプチドを合成した結果、いずれのペプチドもアンタゴニストとして作用することが判明し、HAI-1 (141-249)あるいは sHAI-1 が三価で細胞表層受容体と相互作用し得ることが示唆された。また、これら細胞凝集抑制活性を持つペプチドの発見はがん転移抑制剤開発に繋がる可能性がある。 一方、昨年度より sHAI-1 に対する細胞表層の受容体タンパク質の同定を試みているが、未だ同定には至っていない。しかし、候補タンパク質の精製法開発は進み、MMP-7 処理したがん細胞を低張液で処理して得られる細胞ゴースト(細胞膜)を出発材料とすることが有効であることが判明した。今後は HAI-1 (141-249)やアンタゴニストとして作用する上記オリゴペプチドとの親和性を指標にしつつ、各種クロマトグラフィーを用いて細胞ゴースト由来タンパク質を分離・精製し、受容体タンパク質の同定に繋げる予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. 石川 智弘、伊藤 咲、木村 弥生、平野 久、東 昌市：可溶性HAI-1による細胞凝集誘導メカニズムの解析および細胞凝集阻害剤の開発。第 27 回日本がん転移学会（大阪）、演題番号 W7-1、2018年7月19-20日 2. 滝澤 康、東 昌市：MMP-9選択的インヒビターの腫瘍細胞浸潤抑制効果の検証。第 23 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（甲府）、演題番号 1、2018年8月3-4日 3. 伊藤 咲、東 昌市：HAI-1分子の部分アミノ酸配列を利用した細胞凝集抑制剤の開発。第 23 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（甲府）、演題番号 3、2018年8月3-4日 4. 滝澤 康、東 昌市：MMP-9選択的インヒビターの分子設計とその腫瘍細胞浸潤抑制効果。第91回日本生化学会大会（京都）、演題番号 1T114a-01(1P-266) 2018年9月24-26日	

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	5. 伊藤 咲、東 昌市：MMP-7による細胞凝集誘導の機序に基づくがん転移抑制剤の開発。 第91回日本生化学会大会（京都）、演題番号 1T114a-02 (1P-270) 2018年9月24-26日
	【その他特筆事項】

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 教養教育研究部門 生物学・教授・佐々木 泰史
	所属・職名・氏名	札幌医科大学 分子生物学講座・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】	従来、大腸発癌経路として、管状腺腫を前癌病変とする腺腫癌連関が提唱されてきた。近年、無茎性鋸歯状腺腫 (SSA) を前癌病変として、 <i>BRAF</i> 遺伝子変異やゲノムワイドなメチル化である CpG island methylator phenotype (CIMP) を伴う第 2 の発癌経路 (serrated-neoplasia pathway) が確立された。さらに、大腸鋸歯状腺腫 (TSA) を前癌病変とする第 3 の発癌経路が存在すると考えられているが、詳細は明らかではない。そのため、SSA、TSA を含む大腸鋸歯状病変を対象として、主として Wnt シグナル経路に属する遺伝子変異とメチル化の解析を行うことにより、発癌の分子機構を解明することを研究目的とした。	
【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。)	金沢大学と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、保有している大腸鋸歯状病変のパラフィン包埋ホルマリン固定 (FFPE) 標本、計 78 検体を対象とした。従来、鋸歯状病変で変異が報告されている遺伝子である <i>APC</i>, <i>TP53</i>, <i>KRAS</i>, <i>BRAF</i>, <i>RNF43</i> などに加えて、大腸進行癌で変異が報告されている Wnt シグナル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> などを含む変異解析パネルを作成し、DNA 抽出後、次世代シーケンサーを用いて変異解析を行った。また、CIMP マーカー (<i>MINT1</i>, <i>MINT2</i>, <i>MINT12</i>, <i>MINT31</i>, <i>MLH1</i>, <i>CDKN2A</i>) や他の癌関連遺伝子 (<i>SFRP1</i>, <i>SFRP2</i>, <i>IGFBP7</i>, <i>SOX5</i>, <i>GALNT14</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った。さらに、一部の検体において、源教授の指導のもと、Wnt シグナル経路の亢進を反映するとされる β カテニンの免疫組織化学を行った。 その結果、SSA と比較し、TSA では Wnt シグナル関連分子の遺伝子変異と <i>SMOC1</i> 遺伝子メチル化が高頻度にみられ、SSA とは異なる TSA 独自の発癌経路が存在すると考えられた。また、TSA には <i>BRAF</i> 変異陽性のものと <i>KRAS</i> 変異陽性のものとが存在するが、<i>RNF43</i> 変異は <i>BRAF</i> 変異陽性 TSA に、<i>SMOC1</i> 遺伝子メチル化は <i>KRAS</i> 変異陽性 TSA に多く、TSA においても複数の発癌機構が存在することが示唆された (図)。 結果は 2018 年の日本癌学会学術総会、日本消化器関連学会 週間 (JDDW2018)、欧州消化器病週間 (UEGW2018) で発表し、現在論文作成中である。	
	 図. 同定された鋸歯状病変の変異、メチル化プロファイル	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 <u>Sawada T</u>, Nakanishi H, Kaizaki Y, Sasaki Y, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Takahashi N, Hasatani K, Kubota E, Kataoka H, Ota R, Yanase Y, Inagaki S, Yamada S, Minamoto T, Suzuki H, Sugai T. Integrative analysis of gene mutations and DNA methylation in colorectal serrated lesions. United European Gastroenterology Week (UEGW2018) 2018 年 10 月 23 日 澤田 武、中西宏佳、佐々木泰史、山本英一郎、青木敬則、永塚 真、高橋直樹、太田亮介、久保田英嗣、片岡洋望、源 利成、菅井 有、鈴木 拓。大腸鋸歯状病変における遺伝子変異、コピー数変化、DNA メチル化の統合解析。第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 29 日	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 30 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		チンパンジーの腫瘍耐性機構から探るヒト特有の神経発生/腫瘍化の分子メカニズム
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・助教・今村公紀
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・大学院生・岡田佐和子
	所属・職名・氏名	京都大学・大学院生・仲井理沙子
	所属・職名・氏名	京都大学・大学院生・井藤晴香
	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】	ヒトと最も近縁な現生動物であるチンパンジーはガンに罹患することが極めて稀であり、腫瘍化に抵抗する何らかの素因を有することが推測さる。そこで、ヒト/チンパンジー間で組織種特異性が顕著であると予測される脳神経発生に注目し、神経幹細胞動態のヒト/チンパンジー種間比較解析を行う。これにより、ヒトという種に特異的な神経幹細胞の特性とグリオーマリスクの分子基盤について、進化医学的な解明を試みる。	
【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。)	本共同研究に先立ち、クオリティの高いチンパンジーiPS細胞株の選別とダイレクトニューロスフェア (dNS) 形成法による神経幹細胞およびニューロンへの分化誘導系の確立を達成していた。これを踏まえ、iPS細胞から神経幹細胞へと至る分化過程に注目し、初期神経発生の分子基盤の解明を試みた。申請者が開発したdNS形成法では、培養1週間でiPS細胞から神経幹細胞へと分化誘導することが可能である。そこで、dNS形成培養1、3、5、7日目の細胞を継時的に回収し、分化誘導過程における遺伝子発現動態についてRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を実施した。まず、階層的クラスター分析を行ったところ、各細胞は①iPS細胞とdNS (Day 1) の区分と②dNS (Day 3、5、7) の区分の2つに分岐し (1st shift)、続いて③dNS (Day 3) の区分と④dNS (Day 5、7) の区分に分岐する (2nd shift) ことが判明した。また、PCA解析の結果から、iPS細胞とdNS (Day 1) がグループ1、dNS (Day 5) とdNS (Day 7) がグループ3としてそれぞれ比較的近い関係にあり、dNS (Day 3) は両者のグループの中間状態 (グループ2) に位置付けられることが判明した。そこで、1st shiftと2nd shiftにおける細胞の運命転換を理解するために遺伝子発現を精査したところ、1st shiftでは多能性関連遺伝子の発現消失と神経発生関連遺伝子の発現開始が認められ、多能性から神経発生へのコミットメントが誘発されていることが示された。一方、2nd shiftにおける遺伝子発現プロファイルのGO解析を行ったところ、「ニューロン分化」が最上位に分類された。実際、各dNSを用いてニューロン分化誘導を行ったところ、dNS (Day 3) まではニューロン分化が乏しいものの、dNS (Day 5) 以降は高効率でのニューロン分化が観察され、2nd shiftではニューロン分化能が獲得されることが明らかとなった。以上より、dNS形成ではiPS細胞から後期前方エピブラスト (Day 1)、初期神経上皮細胞 (Day 3)、脳ラジアルグリア (Day 5、7) へと段階的に発生が進行することが示唆された。 dNS形成において発現変化量の大きいDEGには、神経発生では知見のないシグナル伝達関連遺伝子が含まれていた。興味深いことに、これらの遺伝子はチンパンジーとヒトのdNS形成で発現パターンが異なり、なかでもJAK/STATおよびEGF経路に関わるある因子は、チンパンジーでは対称分裂期の神経上皮細胞で一過的に発現するのに対し、ヒトでは発現時期が延長されていることを特定した。この因子がヒトの神経幹細胞の対称分裂を亢進し、ヒトの脳進化とグリオーマリスクに寄与している可能性が推測されることから、今後は強制発現やシグナル経路操作による機能解析や、ヒトグリオーマにおける発現解析に着手する予定である。 また、ヒト特異性の解明を試みるに際し、チンパンジー/ヒトのみの比較では種特異的な現象がヒト進化とチンパンジー進化のどちらに起因するのか判断することができない。従って、外群となる他の霊長類を組み込むことが必要であり、その対象として我が国の脳神経科学研究に重用されているニホンザルの iPS 細胞を作製し、dNS 形成を行った (Nakai et al. 2018)。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Risako Nakai, Mari Ohnuki, Kota Kuroki, Haruka Ito, Hirohisa Hirai, Ryunosuke Kitajima, Toko Fujimoto, Masato Nakagawa, Wolfgang Enard, Masanori Imamura. Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (<i>Macaca fuscata</i>). <i>Scientific Reports</i> 8(1): 12187, 2018 2. 今村公紀, 仲井理沙子. 研究コラム『ニホンザルの iPS 細胞の製作に成功! -「霊長類学」の新たな可能性-』 . <i>academist journal</i>, 2018 年	

【学会発表】

1. Masanori Imamura. Evolutional Developmental Biology and Medicine with Primate Stem Cells. The 73rd Annual Conference of the Korean Association of Biological Science, Pyeongchang Alpensia Resort, Pyeongchang, Korea (2018/8/23)
2. 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. Cryopreservation Conference 2018, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知 (2018/10/26)
3. 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 岡野栄之, 今村公紀. ヒト/チンパンジー/ニホンザル iPS 細胞を用いた神経発生動態の比較解析. 第 34 回日本霊長類学会大会, 武蔵大学, 東京 (2018/7/14)
4. 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀. チンパンジー iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解明. 日本進化学会第 20 回大会, 東京大学, 東京 (2018/8/22)
5. 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉莉, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザルの iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 日本進化学会第 20 回大会, 東京大学, 東京 (2018/8/23)
6. Risako Nakai, Ryunosuke Kitajima, Hirohisa Hirai, Hiroo Imai, Masanori Imamura. Recapitulation of Epiblast-Neuroectoderm-Neural Stem Cell Differentiation from Chimpanzee iPSCs in vitro. 2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, Korea (2018/9/17)
7. Haruka Ito, Risako Nakai, Mari Ohnuki, Kota Kuroki, Hirohisa Hirai, Ryunosuke Kitajima, Toko Fujimoto, Masato Nakagawa, Wolfgang Enard, Masanori Imamura. Derivation of induced pluripotent stem cells in Japanese macaque (Macaca fuscata). 2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, Korea (2018/9/18)
8. 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉莉, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. Cryopreservation Conference 2018, 岡崎コンファレンスセンター, 愛知 (2018/10/26)
9. 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉莉, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2018/11/28)
10. 仲井理沙子, 北島龍之介, 平井啓久, 今井啓雄, 今村公紀. チンパンジー/ヒト iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解析. 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2018/11/29)
11. 仲井理沙子, 北島龍之介, 亀田朋典, 平井啓久, 今井啓雄, 今村拓也, 今村公紀. チンパンジー/ヒト iPS 細胞を用いた初期神経発生動態の解析. 第 63 回プリマーテス研究会, 日本モンキーセンター, 愛知 (2019/1/26)
12. 井藤晴香, 仲井理沙子, 大貫茉莉, 黒木康太, 平井啓久, 北島龍之介, 藤本童子, 中川誠人, Wolfgang Enard, 今村公紀. ニホンザル iPS 細胞の作製と神経幹細胞への分化誘導. 第 63 回プリマーテス研究会, 日本モンキーセンター, 愛知 (2019/1/26)

【その他特筆事項】

1. 仲井理沙子. 2018 International Conference: Korean Society for Molecular and Cellular Biology Travel Award 受賞. Seoul, Korea (2018/9/19)
2. ニホンザル iPS 細胞の研究成果についてのメディア報道: ABC ニュース、KBS 京都放送、読売新聞 (8 月 31 日夕刊 12 面)、毎日新聞 (8 月 31 日 29 面)、日本経済新聞 (8 月 31 日 42 面)、産経新聞 (8 月 31 日夕刊 11 面)、京都新聞 (8 月 31 日 28 面)、日刊工業新聞 (8 月 31 日 3 面)、共同通信など
3. 第 34 回日本霊長類学会大会にて自由集会「細胞からみた霊長類: 「ヒト生物学」に向けて細胞研究は何ができるのか?」を主催. 武蔵大学, 東京 (2018/7/13)
4. 講演: 今村公紀. 霊長類の幹細胞を用いたヒトの進化生物学/進化医学. 藤田保健衛生大学総医研セミナー. 藤田保健衛生大学, 愛知 (2018/6/26)
5. 講演: 今村公紀. 生物学 B: 霊長類の進化と適応 授業特別講義. 中京大学, 愛知 (2018/12/19)
6. 講演: 今村公紀. 「iPS 細胞×霊長類学」で、ヒト進化の謎を解く. 出前講義. 帝塚山高等学校, 奈良 (2019/2/20)
7. パネルディスカッション: 今村公紀. 知識の源流を探る ～分野の壁を超えることは価値ある着想を生み出しうるのか～. 第 8 回超異分野学会本大会. ベルサール新宿グランドコンファレンスセンター, 東京 (2019/3/9)
8. 学会審査員: 今村公紀. 第 41 回日本分子生物学会年会 ポスターディスカッサー. パシフィコ横浜, 神奈川 (2018/11/29)
9. 学会審査員: 今村公紀. 中高生のための学会「サイエンスキャスル 2018」関西大会 ポスター発表審査員. 大阪明星学園明星中学校・明星高等学校, 大阪 (2018/12/23)

	10. YouTube : 京大先生シアター「iPS 細胞×霊長類学」で、ヒト進化の謎を解く」(2019/3/27)
--	--

平成 30 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關与する 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 微生物病研究所・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・再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過程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、形態変化に關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。)	Rsp1 ノックアウトマウスの解析 Rsp1 ノックアウトマウスを作製して、生理的条件における Rsp1 の機能解析を行った。通常の生育条件では目立った表現型は認められなかった。そこで、発現が認められた腎臓に注目して解析したところ、Rsp1 ノックアウトマウスでは腎臓尿細管の再生過程に遅延が生じていた。さらに、その原因として Met シグナル伝達の不調の可能性が見いだされた。今後は、この原因を明らかにすべく、先行して解析している尿細管由来の MDCK 細胞を用いた in vitro の結果を活用した解析を実施する。 Rsp1 ノックダウンがん細胞の作製 前年度までに高浸潤性の乳がん細胞 MDA-MB-231 において、Rsp1 の siRNA ノックダウンによって HGF 刺激後の形態変化、ラメリポディアの形成、運動能および浸潤能の亢進が抑制されることを報告した。本年度は、マウス個体を使ったがん細胞の浸潤の in vivo イメージング解析を目的として、MDA-MB-231(Luc⁺)細胞の shRNA ノックダウン細胞の構築を行った。Rsp1 の安定的なノックダウンと細胞のクローン化を確認した。今後は、この細胞をもちいた解析に取り組む。 Rsp1 過剰発現がん細胞の作製と解析 低浸潤性の乳がん細胞 MCF-7 および T-47D では Rsp1 と Met の発現が認められていない。そこで、両タンパク質を過剰発現させた細胞を作製した。解析の結果、Rsp1 の過剰発現によって、Met の細胞内局在が変化すること、HGF 刺激後の細胞内シグナル伝達がより活性化することを明らかにした。さらに HGF 刺激後に、浸潤性が亢進することを確認した。以上の結果からも、Rsp1 は Met 下流のシグナル伝達を制御することで、がん進展に寄与していることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 1) Rsp1 は腎臓の再生とがん進展のふたつの顔をもつ 梶原 健太郎、松本 邦夫、岡田 雅人 第 2 回がん代謝研究会 若手の会 大阪大学最先端医療イノベーションセンター（2019 年 1 月 23 日-24 日） 2) 膜貫通タンパク質 Rsp1 は HGF 依存性のがん細胞の浸潤を制御する 河瀬 直之、梶原 健太郎、松本 邦夫、岡田 雅人 第 12 回若手研究フォーラム 大阪大学銀杏会館（2019 年 2 月 12 日） 3) がん進展制御における Src および mTOR シグナルの役割 岡田 雅人 がん進展制御研究所セミナー	

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

金沢大学がん進展制御研究所 (2019 年 3 月 1 日)

【その他特筆事項】

アウトリーチ活動

はんだいラボ@EXPOCITY Lab「がん細胞ってどんなかたちをしているの？」

EXPOCITY (大阪府吹田市) (2019 年 3 月 25 日)

平成 30 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		乳癌の発症・悪性化におけるエピジェネティック制御因子の役割
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】	乳癌の発症と悪性進展の分子メカニズムを理解するためには、in vivo での腫瘍形成に関与する遺伝子ネットワークを解析する必要がある。そのために、マウスの乳腺組織を完全に再生することが可能な幹細胞 (MaSC) に遺伝子を導入する遺伝子操作が重要となる。従来のウイルス (レンチウイルスやレトロウイルス) を用いる遺伝子導入法は、導入する DNA の長さや配列に対する制限が多く、これらの問題を克服した、より簡便で迅速な遺伝子導入法が望まれる。本研究では、piggyBac トランスポゾンとエレクトロポレーション法を用いた MaSC への遺伝子導入法を開発して、in vivo での腫瘍形成に重要なドライバー遺伝子を同定し、それが誘導する遺伝子発現やエピゲノムの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。)	遺伝子導入システムとして次の 2 つの工夫を加えた。まず、piggyBac トランスポゾンを利用した遺伝子発現ベクターに Luciferase 発現カセットを導入し、再生した乳腺での in vivo イメージングを可能にした。さらに、doxycycline (Dox) 誘導システムも導入して、実際のがん発症機構にあわせて、導入遺伝子発現のタイミングを制御できるようにした。 この方法により、200kb を超えるサイズの DNA や、プロモーターや転写終結配列をもつ DNA を安定的に幹細胞 (MaSC) に導入し、そこから再生した乳腺を作製することに成功した。この乳腺組織は、形態的にも機能的にも正常であり、自己再生能や分化能にも異常は見られなかった。ポリオーマ middle T (PyMT) 抗原を Dox 誘導的に発現させる実験では、MMTV-PyMT トランスジェニックマウスに発症する腫瘍と組織学的に同様の腫瘍の形成が確認された。この方法は、簡便で迅速な遺伝子導入法であり、Dox 依存的な遺伝子発現の誘導が可能なことから、今後、in vivo での乳癌形成に重要な遺伝子発現やエピゲノム変化を包括的に解析するための極めて有効な手法になると期待される。	
【成果等】	【主な論文発表】 ・Hiroaki Tagaya; Kosuke Ishikawa; Yoshito Hosokawa; Shun Kobayashi; Yukino Ueoka; Mayuna Shimada; Yasuko Ohashi; Hirofumi Mikami; Mizuki Yamamoto; Tatsuya Ihara; Kentaro Kumazawa; Kosuke Sugihara; Naoki Goshima; Shinya Watanabe; Kentaro Semba, “A method of producing genetically manipulated mouse mammary gland”, <i>Breast Cancer Research</i> 21, 1, 5 January 2019 ・Kosuke Ishikawa; Yuta Kobayashi; Yutaro Wakabayashi; Shinya Watanabe; Kentaro Semba, “A highly sensitive trap vector system for isolating reporter cells and identification of responsive genes”, <i>Biology Methods & Protocols</i> 3, 1, 18 April 2018 【学会発表】 ・中山淳, 仙波憲太郎, 空間トランスクリプトーム解析を用いた腫瘍内微小不均一性の解明, 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」平成 30 年度成果発表会, 滋賀県大津市 琵琶湖ホテル, 2019 年 1 月 30-31 日, ポスター発表: P-47 ・若林 佑太郎, 寺内 由希, 小林 雄太, 石川 公輔, 渡辺 慎哉, 仙波 憲太郎, “小胞体ストレスに誘導される lncESIT に関する発現解析”, 第 41 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 2018 年 11 月 28-30 日, ポスター発表: 1LBA-029 ・坪川 涼, 多ヶ谷 紘壮, 小林 舜, 石川 公輔, 渡辺 慎哉, 仙波 憲太郎, “乳がん原因遺伝子の in vivo 機能解析に用いる乳腺幹細胞の in vitro 培養法”, 第 41 回日本分子生物学会年会,	

パシフィコ横浜、2018 年 11 月 28-30 日、ポスター発表：1LBA-086

・中山淳, 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、In vivo イメージングフォーラム 2018、2018 年 10 月 19 日、品川、ポスター発表

・坪川 涼、多ヶ谷 紘壮、小林 舜、石川 公輔、渡辺 慎哉、仙波 憲太郎、乳腺再構築を用いた乳がん原因遺伝子の機能解析方法の開発、In vivo イメージングフォーラム 2018、2018 年 10 月 19 日、品川、ポスター発表

・藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎、“Establishment of the high-throughput screening system for identification of novel oncogenes”、第 77 回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪、2018 年 9 月 27-29 日、ポスター発表

・中山淳, 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 77 回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪、2018 年 9 月 27-29 日、ポスター発表

・石川公輔、多ヶ谷 紘壮、渡辺慎哉、仙波憲太郎、“乳がん遺伝子解析のための遺伝子改変マウス乳腺の構築法”、第 77 回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場 リーガロイヤルホテル大阪、2018 年 9 月 27-29 日、ポスター発表

・Jun Nakayama, Jiro Fujimoto, Kentaro Semba, Establishment and Characterization of highly metastatic breast cancer cell line by orthotopic transplantation, Metastasis Research Society 17th Biennial Congress, Princeton university NJ USA, 31 Jul- 5 Aug 2018, Poster presentation: Y73

・中山淳, 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 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、神奈川県横浜市 ホテルメルパルク横浜、2018 年 7 月 19-20 日、ワークショップ 3：転移研究の新技术 W3-3

・Yuxuan Han, 中山淳, 二口充, 仙波憲太郎, 尾動脈注射手法を用いた Luminal 乳がん骨好転以下部とその遺伝子発現解析、第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会、神奈川県横浜市 ホテルメルパルク横浜、2018 年 7 月 19-20 日、ポスター発表：P9-3

・中山淳, 藤元次郎, 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、第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京都千代田区 都市センターホテル、2018 年 5 月 16-18 日、ワークショップ 14：転移・浸潤 I W14-5

・石川公輔、仙波憲太郎、“乳がん遺伝子解析のための遺伝子改変マウス乳腺の構築法”、第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京都千代田区 都市センターホテル、2018 年 5 月 16-18 日、ポスター発表

【その他特筆事項】

研究課題		PRC2 構成蛋白質 JARID2 を介したエピジェネティック制御ネットワークの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学大学院医歯薬学研究部・助教・丹下正一郎
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・鈴木健之
【研究目的】	申請者らのこれまでの研究によって、上皮観葉転換(EMT)において発現が上昇する <i>JARID2</i> 遺伝子が、上皮マーカーである <i>CDH1</i> 遺伝子の転写抑制に貢献することを明らかにしている。<i>JARID2</i> 蛋白質はポリコム蛋白質複合体(PRC2)を構成するサブユニットであり、<i>EZH2</i> 蛋白質の持つメチル化活性を通じて遺伝子の転写抑制に貢献する。<i>EZH2</i> は複数種の悪性腫瘍組織内で発現亢進が認められるほか、一部の腫瘍では予後悪化のマーカーとしても扱われる一方で、<i>EZH2</i> のクロマチン上への位置決めを行うとされる PRC2 非酵素蛋白質については、悪性腫瘍との関連性という視点からの研究は進んでいない。このため申請者は、腫瘍における <i>JARID2</i> の機能に関してさらなる詳細な解明が必要であると考えた。	
【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。)	米国の臨床検体データベースである TCGA を用いた解析では、肺癌、低グレードグリオーマ、膀胱等複数の腫瘍において <i>JARID2</i> の過剰発現が確認された。これらの <i>JARID2</i> 高発現は、TP53 変異をもつ検体において著明に確認された。その一方で、ドライバーとなりうるがん遺伝子の変異との関連は確認されなかった。肺癌においては、<i>JARID2</i> 高発現を示す患者群は、それ以外の患者群と比較して全生存期間の短縮が認められた(図 1)。 <i>JARID2</i> の高発現は、<i>EZH2</i> を始め他の PRC2 構成蛋白質をコードする遺伝子群との発現の相関は見られないことから、<i>JARID2</i> の PRC2 非依存的な機能の存在が示唆された。この可能性を検討するため、<i>JARID2</i> の高発現が確認されたがん細胞株・HSC-2 に対しコントロール、<i>EZH2</i>、<i>JARID2</i> の各種 siRNA を導入して RNA を抽出し、金沢大学がん進展制御研究所・機能ゲノミクス分野・鈴木健之教授、金沢大学学際科学実験センター・遺伝子研究施設・ゲノム機能解析分野・堀家慎一准教授の協力を得てマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。 この結果、<i>JARID2</i> のノックダウンによって著明な癌抑制遺伝子 X の転写が上昇することが示された。この結果は、定量 PCR ならびにウェスタンブロッティングによっても再現された(図 2)。今後は、遺伝子 X の転写抑制機序について精査していきたい。 A 頻度 TCGA肺癌患者群 図1 A, TCGAの肺癌検体データにおけるPRC2遺伝子の発現・コピー数の情報を示す。10%の患者で、JARID2の増幅または発現上昇が起きている。 B, TCGA肺癌検体のうち、JARID2発現レベルの高い上位10%とそれ以外との検体で全生存期間を比較した。JARID2高発現群には全生存期間の有意な短縮が確認された。 B TCGA 肺癌患者群 A 図2 A, 口腔癌細胞株HSC-2にJARID2またはEZH2のsiRNAをトランスフェクトし、48時間後に細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成してリアルタイムPCRを行った。B, Aと同様の処理をしたHSC-2細胞株から蛋白質を抽出し、ウェスタンブロットを行った。いずれもXを標的とした検出を行い、内源性遺伝子のコントロールにはGAPDHを用いた。 B	
【成果等】	【主な論文発表】	該当なし
	【学会発表】	該当なし
	【その他特筆事項】	

平成 30 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】	研究代表者らは近年、ユビキチンリガーゼ Smad specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (Smurf2) の新しいリン酸化サイト (Smurf2 ^{Thr249}) 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 (Iezaki et al., <i>Development</i> 2018)。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。)	ヒトグリオーマ幹細胞株 (TGS-01 細胞) に各種サイトカインを暴露して、Smurf2 のリン酸化 (Smurf2 ^{Thr249}) をウエスタンブロッティングにより検討した。その結果、幹細胞性制御への関与が報告されている各種サイトカインの中で、transforming growth factor beta (TGF- β) 刺激により Smurf2 ^{Thr249} のリン酸化が著明に抑制された。また、Smurf2 ^{Thr249} の周辺配列の in silico 解析から、Smurf2 ^{Thr249} のリン酸化を担うキナーゼタンパク質候補「X」を同定した。そこで TGS-01 細胞に X (野生型とドミナントネガティブ型) を過剰発現させ、Smurf2 のリン酸化 (Smurf2 ^{Thr249}) を確認した。その結果、野生型 X の導入により Smurf2 ^{Thr249} のリン酸化が著明に亢進したのに対して、X のドミナントネガティブ体導入では、そのリン酸化は著明に抑制された。また、免疫沈降法により Smurf2 と X の相互作用が確認された。さらに、in vitro kinase assay により X の導入により野生型 Smurf2 (WT) のリン酸化は検出されたのに対して、アラニン変異型 Smurf2 (T249A) では、Smurf2 のリン酸化 (Smurf2 ^{Thr249}) は検出できなかった。以上の結果より、ヒトグリオーマ幹細胞において、Smurf2 は TGF- β シグナル下流でリン酸化酵素 X によりそのリン酸化 (Smurf2 ^{T249}) が調整されている可能性が示唆された。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. TGF- β シグナル調節を介した Smurf2 のリン酸化修飾によるグリオーマ進展制御、平岩茉奈美、家崎高志、深澤和也、北口裕香、山田孝紀、金田勝幸、中田光俊、平尾敦、檜井栄一、日本薬学会第 139 年会 (千葉) 2019 年 3 月 21 日 2. E3 ユビキチンリガーゼ Smurf2 のリン酸化修飾によるグリオーマ幹細胞の幹細胞性制御、平岩茉奈美、家崎高志、深澤和也、北口裕香、山田孝紀、金田勝幸、中田光俊、平尾敦、檜井栄一、第 92 回日本薬理学会年会 (大阪) 2019 年 3 月 14 日 3. グリオーマ幹細胞性およびグリオーマ進展における E3 ユビキチンリガーゼ Smurf2 の役割、平岩茉奈美、家崎高志、深澤和也、山田孝紀、金田勝幸、中田光俊、平尾敦、檜井栄一、日本薬学会北陸支部第 130 回例会 (富山) 2018 年 11 月 18 日	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		早期薬剤耐性の獲得に関わる遺伝子とシグナル伝達経路の解析
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、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。これまでの研究から、薬剤耐性に関わる多くの遺伝子変異が発見されてきた。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るのか？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がん細胞株、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」であると考ええる。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発見した。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。	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Fukuoka M., Yoshioka K., and *Hohjoh H.</u> (2018) NF-κB activation is an early event of changes in gene regulation for acquiring drug resistance in human adenocarcinoma PC-9 cells. <i>PLoS ONE</i>, 13(8): e0201796.	
	【学会発表】 特になし。	
	【その他特筆事項】 特になし。	

研究課題		質量分析内視鏡診断システムの開発および大腸がん組織検体を用いた性能の検証
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】	生体成分の組成を質量分析することで、がんを診断する技法の研究開発が世界的に進められており、この技法は内視鏡検査にも適用が可能である。本研究では内視鏡検査時に行われる生検にかわり、検査対象部位をリアルタイムで診断可能な「質量分析型内視鏡がん診断支援システム」を構築することを目的とする。当該システムには糸状の素材(ライン)によって検体を採取、輸送、質量分析するための機械部分と、得られたデータから疾患を診断するためのアルゴリズムの構築が必須であり、後者には機械学習を用いることを特徴とする。最終的には各要素を一体化し、臨床試験を経て実用化を目指す。	
【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。)	MS 内視鏡システムの構築 1. 内視鏡鉗子孔から質量分析装置にかけたラインの移動路および駆動、制御機構であるライン式検体採取・輸送装置を構築した(右図 1 および 2)。内視鏡に装着した場合の動作や、本来の内視鏡操作への影響について検討する必要がある。 2. 検体を採取する部分である検体採取プローブを構築した(右図 2)。今後ライン素材の別による検体の採取具合、侵襲性、深達度の調節域などを明らかにする。 3. 検体採取プローブ部で内視鏡外へと出たラインによって採取された検体を、質量分析装置の導入孔前面に移動した後にイオン化する抽出イオン化部を構築した。生きたマウスの肝臓を対象に採取、分析のテストを行ったところ、マススペクトルを取得可能であることが確認できた(右図 3)。 診断アルゴリズムの構築 4. 得られたマススペクトルの判別を行うために、機械学習であるロジスティック回帰およびサポートベクターマシンを用いた判別アルゴリズムを構築した。摘出されたヒト大腸がん組織より得られたマススペクトルを検証用データにして性能を確認したところ、病理診断結果との一致率 80%以上が得られた。 5. 機械学習による判別の代替策としてマーカー分子の探索を並行して進めた。正常大腸粘膜とがん部において発現量が有意に異なる脂質成分を 20 種以上同定することに成功した。 今後の方針 構築された機械部および判別アルゴリズムを一体化した統合システムを構築し、摘出されたヒト検体を用いた性能検証と、実使用に向けた改良を進める。実使用における性能と安全性が動物実験で確認された時点で、ヒト生体を対象とした臨床試験実施の準備を開始する。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	第 124 回 日本解剖学会全国学術集会 (2018.03.27~29)、新潟・朱鷺メッセ・新潟コンベンションセンター ポスター発表タイトル: 質量分析と AI を用いた消化器がんの診断法開発
	【その他特筆事項】	なし

平成 30 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見いだした。これまでに、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亢進させることを見出した。平成 30 年度には、この遺伝子の欠損マウスの血中において補体などの炎症に関わる成分の違いを見出し、また、移植がんの周囲に IRSp53 依存的な小胞の検出を行った。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】 塙 京子, 大山 拓也, 末次 志郎, “I-BAR タンパク質による小胞形成,” 第 91 回日本生化学会大会, 2018.9.26 末次 志郎, “細胞膜の陥入構造と突起構造の共通性について,” 第 91 回日本生化学会大会, 2018.9.25	
	【その他特筆事項】	

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】	前年度までの取り組みにより、がん細胞に特異的な創薬標的として One carbon 代謝中の MTHFD2 が有望であることを報告してきた。そこで、本研究はコンピュータによる <i>in silico</i> シミュレーションと実験によるバリデーションを組み合わせることで、MTHFD2 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 <i>In silico</i> スクリーニング： 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 Born 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。 ② 細胞内代謝物の測定： MTHFD2 を高発現している大腸がん細胞株 DLD-1 に対して、<i>in silico</i> スクリーニングで抽出した阻害候補化合物を添加し、細胞内の MTHFD2 の代謝物を LC/MS で測定した。
	【成果】	① <i>In silico</i> スクリーニング： MTHFD2 の結晶構造中の 2 つの活性ポケットに対して、500 万の化合物の <i>in silico</i> スクリーニングを実施し、それぞれの活性ポケットに対して親和性の高い候補化合物を抽出するとともに、それぞれの活性ポケットへの結合に重要な相互作用を同定した（図 1）。 ② 細胞内代謝物の測定： <i>In silico</i> スクリーニングにより、同定した阻害候補化合物を DLD-1 細胞に曝露したところ、MTHFD2 の代謝物であるメチレンテトラヒドロ葉酸の量が有意に減少した（図 2）。今回同定した化合物は細胞内においても効果を発揮した。
【成果等】	【主な論文発表】	Asai A, Koseki J, Konno M, Nishimura T, Gotoh N, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. Drug discovery of anticancer drugs targeting methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2. Heliyon. (2018) 4(12):e01021.
	【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】	なし

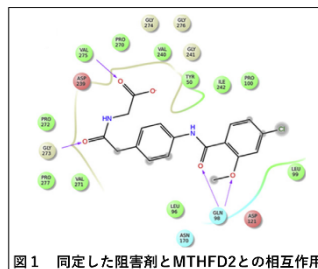


図 1 同定した阻害剤と MTHFD2 との相互作用

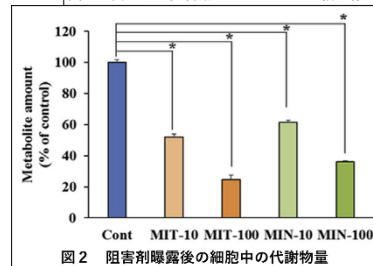


図 2 阻害剤曝露後の細胞中の代謝物量

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

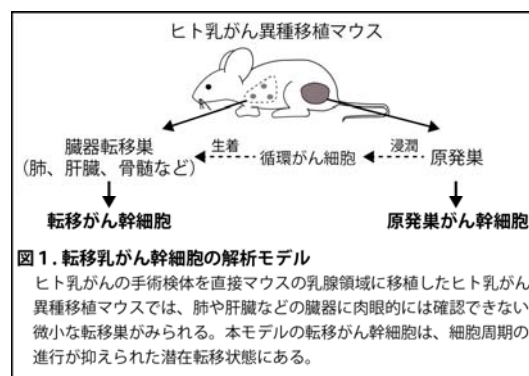
研究課題		イメージング質量分析によるがん転移部位の可視化と診断への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	福島大学農学群食農学類・教授・平修
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・教授・矢野聖二
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	イメージング質量分析を用いてこれまで局在解析が困難であった薬剤のような低分子を抗体を用いずにダイレクトにその局在を視覚的に示す。これは、生体内でどのような動態を示すのか、疾患部位でどのような構造で作用するのか、また、その疾患部位周囲の正常組織へ与える影響（副作用）までを網羅的に解析できるため、基礎科学、実学ともに重要な意義を持つ。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	未分化甲状腺癌（ATC）に対する、2 つの抗がん剤（マルチキナーゼ阻害剤のレンバチニブとソラフェニブ）の効果をイメージング質量分析で評価した。 皮下および脳腫瘍転移モデルマウスを用いて、皮下と脳におけるレンバチニブとソラフェニブの局在を可視化した。 ソラフェニブは、皮下と脳を比べると脳の腫瘍部位へあまり分布していなかった。これとは逆に、レンバチニブは皮下および脳の腫瘍部位へ有意な差（$p<0.05$）を持って局在していた。これは、レンバチニブが ATC 脳転移に対して有用であることを示唆する。 H&E Optical image MS2 image Merged image Lenvatinib Brain sc Sorafenib Brain sc Lenvatinib Normalized intensity (arb. unit) Non-Tumor Tumor 8 6 4 2 0 1 3.5 4.5 7.5 100 April 1, 2019 ©2019 American Association for Cancer Research Sorafenib Normalized intensity (arb. unit) Non-Tumor Tumor 4 3 2 1 0 1 0.8 1.2 1.6 図 皮下および脳腫瘍転移モデルマウスのイメージング質量分析像	
【成果等】	【主な論文発表】	・R. Wang, T. Yamada, S. Arai, K. Fukuda, H. Taniguchi, A. Tanimoto, A. Nishiyama, S. Takeuchi, K. Yamashita, K. Ohtsubo, J. M., N. Onoda, E. Hirata, S. Taira, and S. Yano ‘Distribution and activity of lenvatinib in brain tumor models of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune deficient mice’ <i>Molecular Cancer Therapeutics</i> (Accepted)
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

図 皮下および脳腫瘍転移モデルマウスのイメージング質量分析像

平成 30 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、¹³C 安定同位体標識をした新規オンコメタボライト候補代謝物は、TCA サイクルなど中心代謝経路で代謝されることはなく、寧ろそれ自身がシグナル伝達部質として働く可能性を見出した。現在そのメカニズムについて引き続き検討している。 【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 FOX 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 Ets ファミリー分子である FOX 転写遺伝子の候補を見出した。今後も本共同研究を継続し、アミノ酸欠乏によるリン脂質合成経路、および、オートファージ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】 - Kidova H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Havashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S., Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis, <i>Nature Commun</i>, 10:1072, 2019. - 大澤毅, 血管のバイオロジ オミクスが加速させる血管研究, <i>細胞</i>, 50(13), 562-565, 2018. - 近藤彩乃, 大澤毅, 酸性環境における腫瘍の悪性化機構, <i>生化学</i>, 90(4) 502 - 506, 2018. 【学会発表】 大澤毅、第 2 回がんと代謝若手研究会 優秀賞：2019 年 1 月 23 日-24 日、大阪など、招待講演 7 件 【その他特筆事項】	

研究課題		乳がん幹細胞の潜在転移成立の鍵となる分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・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・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、がん転移に中心的な役割をもつ「転移乳がん幹細胞」を特徴づける分子機構は明らかではない。本研究では、転移乳がん幹細胞で特に発現上昇している S100 タンパク質が、がん幹細胞の潜在転移を促進する分子機構を解析する。転移乳がん幹細胞における S100 高発現の意義の解析を通じて、治療が困難である乳がん再発転移を克服するための基礎データを得る。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	乳がん手術検体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)を用いた検討から、潜在転移乳がん幹細胞は、原発巣の乳がん幹細胞と比べ、S100 タンパク質を顕著に高発現していることが明らかになった。今年度は、S100 による転移乳がん幹細胞制御機構に特に着目して、以下の検討を行った。 1. S100 によるオルガノイド形成促進能の解析 S100 は乳がん PDX 由来乳がん幹細胞のオルガノイド形成能を増強した。一方、S100 タンパク質のノックダウンにより乳がん PDX 由来乳がん幹細胞のオルガノイド形成能は顕著に減弱した。したがって S100 は新規の乳がん幹細胞性制御因子であると考えられた。 2. S100 タンパク質による幹細胞性制御機構の解析 S100 タンパク質が PDX 細胞のオルガノイド形成能を高めることを踏まえ、S100 タンパク質を強制発現した細胞を用いてマイクロアレイ解析およびパスウェイ解析を行った。S100 発現により WNT、NOTCH などのシグナル伝達が活性化する傾向が見られたため、さらに検討を進めている。 3. 乳がん幹細胞の潜在転移における S100 タンパク質の働きの <i>in vivo</i> 解析 S100 を恒常的に強制発現させた細胞をコントロール乳がん細胞と 1:1 で混合したのちにマウスに移植して、転移臓器の潜在転移巣を解析した。S100 発現により乳がん細胞の遠隔転移能は顕著に増強した。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Goto H, Shimono Y, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Kono S, Takao S, Mukohara T, Minami H. Adipose-derived stem cells enhance human breast cancer growth and cancer stem cell-like properties through adipisin. <i>Oncogene</i>, 38(6):767-779, 2019. doi: 10.1038/s41388-018-0477-8. - Maimaitili Y, Inase A, Miyata Y, Kitao A, Mizutani Y, Kakiuchi S, Shimono Y, Saito Y, Sonoki T, Minami H, Matsuoka H. An mTORC1/2 kinase inhibitor enhances the cytotoxicity of gemtuzumab ozogamicin by activation of lysosomal function. <i>Leukemia Research</i>, 74:68-74, 2018. doi: 10.1016/j.leukres.2018.09.017. - Tatara T, Mukohara T, Tanaka R, Shimono Y, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Hirai M, Kakeji Y, Minami H. 3D Culture Represents Apoptosis Induced by Trastuzumab Better than 2D Monolayer Culture. <i>Anticancer Research</i>, 38(5):2831-2839, 2018.	



4. Tatara T, Mukohara T, Shimono Y, 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. **J Surgical Oncology**, 117(6):1131-1136, 2018. doi: 10.1002/jso.24937.

【学会発表】

1. Mukohyama J, Shimono Y, Isobe T, Hu Q, Sahoo D, Minami H, Mimori K, Dalerba P, Kakeji Y, Suzuki A. miR-221 oncomir enhances functional behaviors of cancer stem cells in human colorectal cancers. 11th AACR-JCA Joint Conference, 2019.
2. Goto H, Shimono Y, Mukohara T, Funakoshi Y, Imamura Y, Kono S, Takao S, Suzuki A, Minami H. Adipsin enhanced clonogenicity and proliferation of human breast cancer patient-derived xenograft cells. Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, 2018.
3. Shimono Y, Goto H, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Kono S, Takao S, Mukohara T, Minami H. Adipsin is an adipokine that functions as a regulator of cancer stem cell-like properties in human breast cancer. 第 16 回 幹細胞シンポジウム、2018 年.
4. Goto H, Shimono Y, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Kono S, Takao S, Mukohara T, Minami H. Adipose-derived stem cells promote human breast cancer growth through adipsin. 第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会、2018 年.
5. Shimono Y, Goto H, Funakoshi Y, Toyoda M, Shibuya N, Mukohara T, Takao S, Minami H. Adipocytes enhance tumor growth and cancer stem cell-like properties through the complement activation pathway. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年.
6. Shibuya N, Shimono Y, Takao S, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. Analyses of miR-25 that was downregulated in micrometastatic cancer stem cells in a human breast cancer xenograft model. 第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年.

【その他特筆事項】

特になし。

平成 30 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細胞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】	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、iPS 細胞か ら誘導した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、さらに癌細胞移植後の移動を観察可 能なツール開発を目的とし、メカニズム解明や治療法開発への応用を目指す。	
【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。)	iPS 細胞からの腎オルガノイド誘導とかん流試験: 前年度より hiPS 細胞 (201B7) より分化誘導した腎臓オルガノイドを用いてかん流培養を試 験しており、かん流培地の 3 次元オルガノイド内分布を蛍光標識デキストランの分布を用い て解析した。その結果、直接的なかん流を受けないものの、かん流を行った組織においてオル ガノイド全体への蛍光標識デキストランの分布を認め、かん流により組織全体への培地の浸 透が向上したことが明らかになった。 課題検討: 前年度までに続き、かん流系の確立の課題洗い出しを本年度は重点的に行った。 ・がん細胞移植の課題: 前年度までゲル包埋したがん細胞を腎オルガノイドへ移植し、移動の 観察を試みたが、ゲル溶解などのファクターがあるため、腎オルガノイドへの直接添加実験に よって移植を試みた。DiI-CM にて予め染色したがん細胞 100 個/0.5μL をオルガノイド上方中 央に滴下し、その様子を観察したところ、3 日目のオルガノイドの組織切片にて内部浸潤が確 認された。また、腎オルガノイド内尿管芽管様組織の周辺にリン酸化 Met/HGF 受容体が観察 されるが、がん細胞の移植によりこの状態が影響をうける可能性が考えられ、今後検討する予 定である。 ・かん流装置の課題: 流路内シリコンチューブにかん流液由来の蛋白の付着が生じ、流れに入 った細胞のチューブ付着が懸念された。そこで、生体適合接着防止ポリマーを予めコートす ることでこれらの予防することを試み、蛋白付着の低減が可能になった。今後、循環液中落下細 胞の性質を検討する予定である。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Sekiya S, Morikawa S, Ezaki T, Shimizu T. "Pathological Process of Prompt Connection between Host and Donor Tissue Vasculature Causing Rapid Perfusion of the Engineered Donor Tissue after Transplantation. "Int J Mol Sci. 2018 Dec 18;19(12). 2. Oka M, Sekiya S, Sakiyama R, Shimizu T, Nitta K. "Hepatocyte Growth Factor- Secreting Mesothelial Cell Sheets Suppress Progressive Fibrosis in a Rat Model of CKD." J Am Soc Nephrol. 2019 Feb;30(2):261-276.	
	【学会発表】 1. Sekiya S., Kikuchi T., Shimizu T. TERMIS-WC 2018 9月 京都 2. 関谷佐智子、菊地鉄太郎、清水達也 第 18 回日本再生医療学会総会 3月 神戸	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		HGF-Met 系シグナル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・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 は再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGF を投与・補充して Met 受容体を活性化することが、肝硬変などの疾患の治癒・改善につながる。一方、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。本研究では、①HGF と Met の結合を阻害する物質の探索、さらに② Met の KD 両端領域 (JM 及び CT) が担うアロステリック活性制御機構を構造生物学の視点から解き明かし、細胞内外で作用する低分子アゴニスト及びアンタゴニストの創出に向けた論理基盤を構築する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	①HGF 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。これまでにリード化合物と 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 線結晶構造解析を進めており、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を得ている。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。そこで、国際宇宙ステーション「きぼう」において良質結晶を調製し、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ことを計画した。残念ながら、今回の実験では温度管理に問題があり、高分解能解析に至らなかった。今後、さらなる結晶化条件の最適化及び宇宙実験を継続する。 ②X 線結晶構造解析及び生化学実験を行い、KD の両端領域（膜近傍領域 (JM) 及び C 末端領域 (CT)）の 4 ヲ所のリン酸化分子スイッチが関与する、Met のアロステリック活性制御機構を解明する。この機構を効果的かつ選択的に制御する方法を見出し、低コストかつ高選択性 Met 亢進薬及び阻害薬の創出を目指す。Met 細胞内全長 (JM-KD-CT) 及びキナーゼドメイン (KD) について、大腸菌系の大量調製及び高純度精製プロトコルを構築した。ペプチド基質を用いた ELISA 法により、両サンプルのチロシンリン酸化活性を調べたところ、JM-KD-CT の活性が KD の約 2 倍であることがわかった。このことから、KD 両端のどちらかの領域が活性を制御していることが示唆された。この分子メカニズムを明らかにするため、JM-KD-CT 及び KD について X 線結晶構造解析を目指した結晶化条件の探索を実施した。その結果、KD について微結晶を得た。KD については結晶化条件の最適化を行う。JM-KD-CT は精製収量の向上を図りながら、引き続き結晶化条件の探索を行う。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. A. Nishiyama, T. Kinoshita, S. Yano, et al., Foretinib overcomes entrectinib resistance associated with the NTRK1 G667C mutation in NTRK1 fusion-positive tumor cells in a brain metastasis model, <i>Clinical Cancer Res.</i> 24 (2018), 2357-2369. 4. A. Shraga, E., T. Kinoshita, N. London, et al., Covalent docking identifies a potent and selective MKK7 inhibitor, <i>Cell Chem. Biol.</i> 26 , (2019), 98-108.	
	【学会発表】 1. 木下誉富、キナーゼの構造生物薬学と FMO 研究への期待、FMO 研究会 (2018 年) 2. 木下誉富、キナーゼの活性制御機構と高選択性阻害剤の創出戦略、(独) 日本学術振興会回折構造生物第 169 委員会 第 58 回研究会 (2019 年)	
	【その他特筆事項】	

研究課題		皮膚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	和歌山県立医科大学・特別研究員・國中由美
	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】	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 な貪食単核細胞集団であり、その性質により M1・M2 タイプに分類され、マクロファージの極性と種々の疾患の発症・増悪が密接に関連することが知られている。そこで、皮膚がん部におけるマクロファージの極性に着目し、マクロファージの M1・M2 極性とケモカインレセプター発現との関連性に着目したところ、 M2 マクロファージでは CX3CR1 が強発現していることを明らかにした。そこで、マクロファージに発現するケモカインレセプターと M1・M2 タイプの関連性をさらに検討し、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. 材料と方法 1) マウス C57BL/6 および 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 週目では約 80% のマウスに認められたが、KO 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。 2) 野生型マウスでは 4/80 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、KO マウスでは、マクロファージ浸潤が有意に減弱していた (図 1A)。 3) 皮膚局所における M2 型マクロファージ関連分子である Mrc1/Cd206, Cd163, Il10, Ccl17, および arginase1 の遺伝発現を検討したところ、野生型マウスに比較して KO マウスで有意に減弱していた (図 1B から F)。 4) M2 型マクロファージの浸潤について検討したところ、KO マウスでは野生型マウスに比べて CD206 陽性 M2 型マクロファージの浸潤が明らかに少なかった (図 2 A, B)。 5) CD206 陽性 M2 型マクロファージと CX3CR1 の関連性について検討したところ、CD206 陽性 M2 型マクロファージの約 70% に CX3CR1 発現が認められた (図 2 C)。 以上のことから、CX3CR1 発現マクロファージは M2 型マクロファージに属し、皮膚腫瘍の形成に関与していることが明らかにされた。	

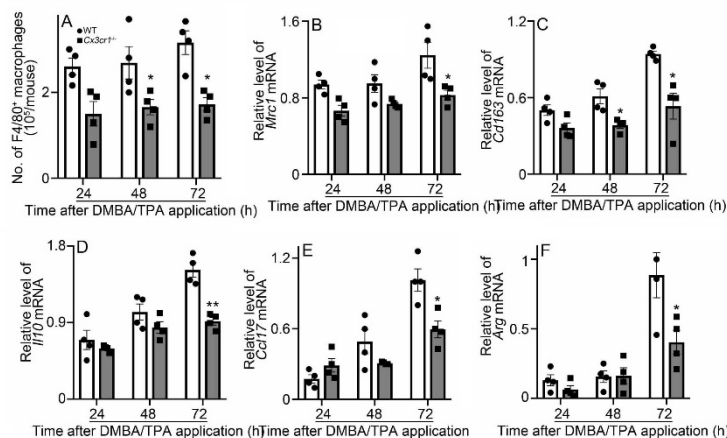


図 1

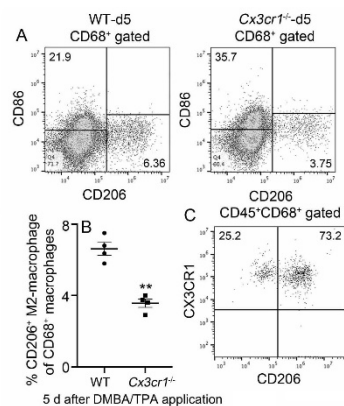


図 2

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Mizoguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yahata T, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K, Mukaida N, Kondo T. Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice. PLoS One. 2018 Nov 6;13(11):e0207085. doi: 10.1371/journal.pone.0207085. 2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Furuta M, Mukaida N, Kondo T. Contribution of the TNF-α (Tumor Necrosis Factor-α)-TNF-Rp55 (Tumor Necrosis Factor Receptor p55) Axis in the Resolution of Venous Thrombus. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Nov;38(11):2638-2650. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311194.
	【学会発表】 1. 石田裕子, 國中由美, 野坂みずほ, 木村章彦, 向田直史, 近藤稔和. 皮膚発がんにおける CX3CL1-CX3CR1 ケモカインシステムの関与.第 45 回和歌山悪性腫瘍研究会. 平成 30 年 12 月, 和歌山
	【その他特筆事項】 平成 30 年度は特にありません

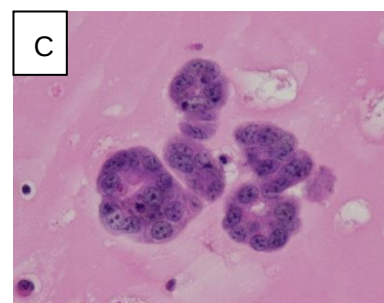
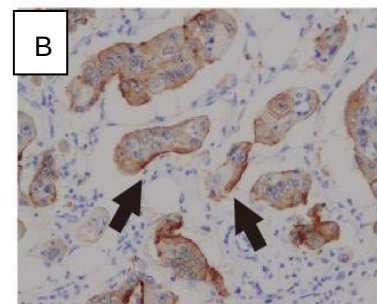
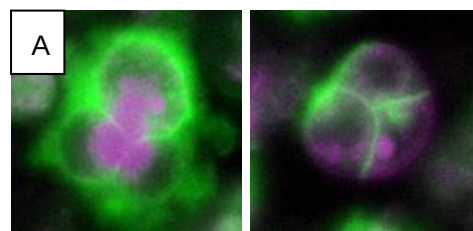
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Rb が制御する肝実質細胞の代謝経路解析
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、逆遺伝学的手法で 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。例えば、非増殖細胞の代表例としてよく知られている神経細胞は、S 期進行後に細胞死を起こし、増殖細胞の代表例としてよく知られている肝実質細胞は、S 期進行後に細胞分裂すると考えられている。研究代表者はこれまで神経細胞における Rb とそのファミリー遺伝子の役割と、急性不活化後の表現型について詳細に解明してきたが、肝実質細胞での急性不活化後の表現型はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、初代培養肝細胞を用いて、Rb ファミリー急性不活化後の表現型を明らかにし、代謝経路との関連性も明らかにする。	
【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。)	7-9 週齢 Rb-TKO (<i>RbLox/Lox; p107^{-/-}; p130Lox/Lox</i>) マウスからコラゲナーゼ灌流法により肝実質細胞を単離して培養した。なお、対照群にはヘテロマウス (<i>RbLox/+; p107^{+/-}; p130Lox/+</i>) を用いた。培養 24 時間後に、市販の遺伝子導入試薬 TransIT-LT1 を用いて Cre 発現プラスミドと Cre レポーター-GFP 発現プラスミドを遺伝子導入し、遺伝子導入 72, 96, 120 時間後に固定して免疫染色を行った。なお、固定 24 時間前から、チミジンアナログの EdU を培養液に添加し、S 期進行の指標として EdU 染色、M 期進行の指標として抗リン酸化ヒストン (pH3) 抗体染色、細胞死の指標として抗活性化型 caspase 3 (AC3) 抗体染色のデータを用いた。遺伝子導入 72 および 96 時間後において、Rb ファミリー欠損で EdU および pH3 陽性細胞の割合が顕著に増加していたが、同時に AC3 陽性細胞の割合も顕著に増加していた。さらに遺伝子導入 120 時間後には、Rb ファミリー欠損で細胞数そのものが対照群に比べて減少した。これらの結果から、Rb ファミリーの急性不活化により、成熟肝実質細胞は細胞周期を進め、S 期および M 期に進行したものの、細胞分裂をせずに細胞死を起こしたことが示唆された。増殖細胞の代表例として知られている肝実質細胞が、Rb ファミリー欠損後に増殖しないという結果は予想に反するものであり、肝実質細胞の増殖を防ぐ何らかの機構が存在することが示唆された。肝実質細胞は部分肝切除後に増殖することが知られており、今後は部分肝切除後の肝実質細胞とコントロール肝実質細胞の Rb ファミリー欠損に対する表現型の違いを検討することで、肝実質細胞の増殖を防ぐ機構の解明を進めていく。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	<u>Itsuki Ajioka</u>, Biomaterial engineering for angiogenesis after ischemic stroke. 第 61 回日本神経化学会大会・第 40 回日本生物学的精神医学会・合同年会 2018. 09. 08 <u>Itsuki Ajioka</u>, Biomaterial Engineering for Injured Brain Regeneration. 15th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry 2018. 08. 27 <u>味岡逸樹</u>, 押川未央. Angiogenic Scaffold Engineering for Injured Brain Regeneration. 第 41 回日本神経科学大会 2018. 07. 26 神戸	
	【その他特筆事項】	

平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

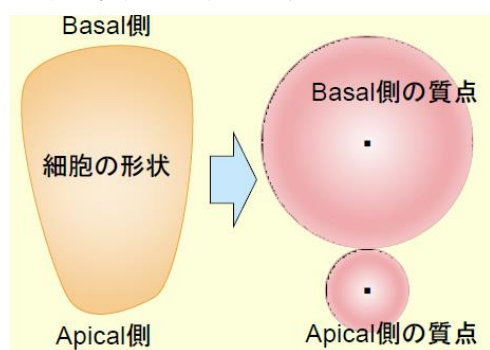
研究課題		To11 様受容体内因性リガンドによる胃がん増悪化と転移モデルの樹立
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学薬理学教室・助教・出口 敦子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京女子医科大学薬理学教室・教授・講座主任・丸 義朗
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・教授・大島 正伸
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・准教授・大島 浩子
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	To11 様受容体(TLR)を介したシグナルは生体における感染防御における重要な役割を果たすが、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、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が形成され、転移を促進することを見いだしてきた。その分子機序として、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)。したがって、TLR4 は転移前ニッチ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。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ことから、がん微小環境だけでなく、がん細胞自身にも TLR4 内因性リガンドが作用する可能性がある。これまでの大島正伸教授らとの共同研究として、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。本研究では、大島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がん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こと、さらに胃がん転移モデルの構築を目指す。	
【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。)	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、S100A8 を発現する細胞は腫瘍周辺部に集簇する好中球や骨髄由来抑制性細胞であることを見いだした。さらに、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着目し、 <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での TLR4/MD-2 の発現を検証したところ、TLR4 を発現していること、幹細胞マーカー陽性の集団で TLR4 が強発現していることをみいだした。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、エンドトキシンフリーグレード S100A8 刺激により幹細胞関連因子や Wnt, Snail の発現が上昇することを見いだした。また、胃がんオルガノイドにレンチウイルスによる種々遺伝子導入により、胃がん転移モデルの構築を進めている。今後、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。TLR リガンドトランスジェニックマウスに胃がんオルガノイドを移植し、組織特異的転移に与える影響を検証する。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Tomita T, Ieguchi K, <u>Deguchi A</u> , Takita M, Tsukahara F, Hiratsuka S, Maru Y. Lung Tumor Cell Recruitment Assay. <i>J Vis Exp</i> ;144, 2019. 2. <u>出口 敦子</u> , 丸 義朗. 自然免疫の最前線 がん転移と自然免疫, 医学のあゆみ 265: 1271-1275, 2018 (部分執筆)	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

研究課題		マウス消化管腫瘍の細胞塊形成機構の解明
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 (適宜、行を追加してください。)	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
	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】	申請者らは近年、イヌ腎尿細管由来の MDCK 細胞をマトリゲル内にて 3 次元培養をすると細胞塊を形成しつつ回転することを見出した。またこの回転は癌で変異が報告されている活性化型 K-RAS の発現で速度が上昇することも見出した。試験管内の細胞塊は、大腸癌臨床検体の病理組織像における、低分化胞巣 (PDC; Poorly differentiated Cluster) や微小乳頭構造 (MP; Micro-papillary component) と細胞塊の大きさは類似である。PDC や MP は、リンパ節・肝臓転移や予後不良と相関があると報告されており、試験管内の細胞塊の動態解析は実臨床における浸潤・転移モデルとして有用であると考えている。MDCK 細胞で得た知見を、MDCK 細胞よりも実際の大腸癌に近い、遺伝子改変モデルマウスの消化管由来のオルガノイド培養に応用し、大腸癌の浸潤・転移の形式を考察する。加えて細胞塊の形成機構を数理モデルを用いて解明する。	
【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) 試験管内の小細胞塊の再現 昨年度までの共同研究では、遺伝子変異を持つマウス消化管由来のオルガノイドを数日ライブイメージングすることで、小細胞塊が類器官から逸脱する像が観察されたものの頻度が 5% 以下と低いのが問題であった。そこで細胞塊を効率よく形成し観察できる系を模索することとした。 イヌ腎尿細管由来の培養細胞株 (MDCK) 細胞では、浮遊状態で培養しても細胞塊を形成することが可能で、その場合は細胞極性が逆転することが報告されており (Yonemura PLoS ONE, 2014)、我々も振盪させながら 48 時間培養することで、極性の逆転が再現できた [上図 A: apical マーカー; GPI-mCherry (マゼンダ) と basolateral マーカー (GFP-Syntaxin4 (緑)). A 左は通常の極性分布を示すが、A 右は apical 側が細胞塊外側に局在しており、極性が反転していると判定できる]。この極性逆転は大腸癌臨床検体の MP の特徴と同じである (右図 B は、ヒト大腸癌検体における apical マーカー Villin の免疫染色像。矢印の細胞塊では間質に接する側に Villin が局在しており、極性が逆転している)。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) を同じ方法で培養したが、浮遊状態で細胞塊を形成することはなかった。 単細胞にした AKTP 細胞をヌードマウスの脾臓に移植しても肝臓への転移は見られなかったことから、試験管内の浮遊状態やマウスの血中では、AKTP 細胞が単細胞で存在する場合には増殖能あるいは細胞間結合能が保たれていないと考えられた。脾臓にオルガノイドとして打ち込んだ場合は肝臓へ転移するので、脾臓から肝臓に向かう際には細胞塊あるいはオルガノイドであると推察されるが、脾臓でオルガノイドとして定着して短時間のうちに単細胞・あるいは細胞塊として肝臓に到達する可能性もあると考えられる。 単細胞にした AKTP 細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植すると、1 か月で細胞塊を形成するものの (右図 C)、肝臓や肺へは転移は認めなかった。その原因として、細胞塊の周囲にはマトリゲルが大量にあり、周囲に脈管がないことが考えられる。この細胞塊での極性の逆転は調べていない。	

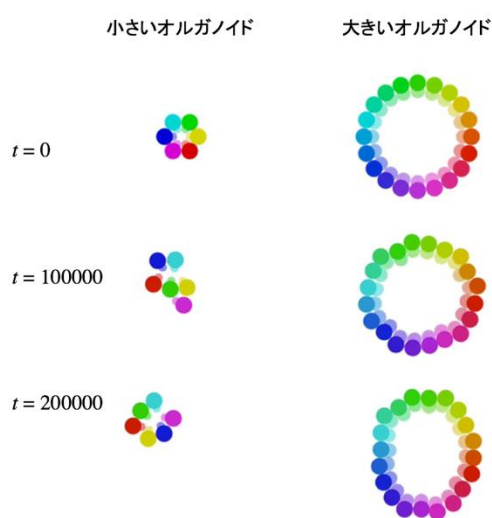


2) 数理モデルによる解析

2-1) 3 次元での極性逆転モデル



1 細胞の apical と basal を表現するために、apical 側と basal 側の質点を各々設定し、オルガノイドでは apical 面が通常小さい形状を示すことを再現するため、apical 側の影響半径は小さく設定した。細胞間接着を表現するため、apical 側の質点同士と basal 側の質点同士のみが接着できると仮定した（次頁図）。このように細胞形状を単純化した 3 次元の数理モデルを用いて、細胞が寄り集まって形成するオルガノイドを表現することができる。ここで、少数細胞から成る細胞塊で apico-basal 極性の逆転が起きる現象を検討するため、数理モデルにおいて、1 細胞内で basal 点と apical 点がランダムに入れ替わるという仮定を取り込んだ。その結果、6 細胞のオルガノイドでは盛んに細胞のミキシングが起きることが観察された。一方で、この 3 次元のモデルでは、多細胞から成るオルガノイドでみられる内腔構造を表現する調整が成功しなかった。



2-2) 2 次元での極性逆転モデル

より調整が容易な 2 次元のモデルについて検討した。3 次元モデルと同様に、apical 点を設定し、apical 点の影響半径はオルガノイドの大きさにより決まるとした。細胞極性について、オルガノイドの重心に対して、外側に basal 点が、内側に apical 点が向く傾向を持たせた。細胞間接着について、細胞が大きな曲率を取る状態（細胞数が少なく apical 面が極めて小さい場合）では細胞間接着が弱くなるものと推察し、2 つの細胞の極性軸が成す角度に応じて細胞間接着力が変化するという仮定を加えた。このようなモデルを用いてオルガノイドを表現し、細胞のランダムな運動の計算機シミュレーションを行った。その結果、細胞数が少ないオルガノイドではオルガノイド内で細胞のミキシングが起き、細胞数が多いオルガノイドではミキシングが起きずに内腔構造が維持されることが再現できた。本モデルにおいては、細胞数が少ないオルガノイドでは細胞間接着が弱くなり、ランダムな運動によって構造が不安定化する結果、細胞極性の逆転と類似の挙動が現れた。細胞数が多いオルガノイドでは隣り合う細胞同士が平行に近い極性軸にあるため、細胞間接着が強く働き、オルガノイド構造が安定化する。数理モデルから得られたこの結果は、オルガノイドの大きさ（細胞数）の違いによる集団的挙動の違いが、細胞間接着の曲率依存性によって生じる可能性を示唆している。MDCK 細胞塊はミキシングではなく同じ方向に細胞が移動する回転がみられることから、極性と細胞間接着が保たれていれば細胞塊は回転する可能性も示唆された。単細胞を皮下移植して形成された細胞塊がどのような極性・動態をとるのかを観察を進めることで数理モデルで示された原理を検証することが出来ると考えている。

【成 果 等】

【主な論文発表】

なし

【学会発表】

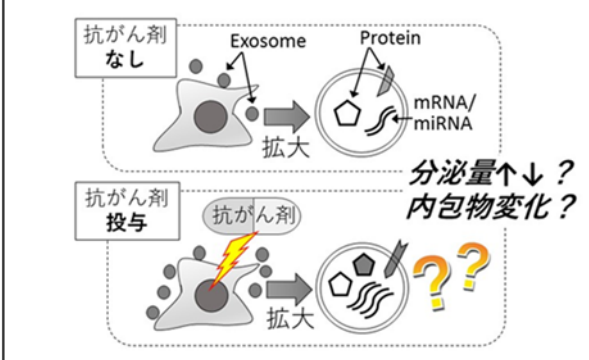
なし

【その他特筆事項】

なし

平成 30 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・医学部附属病院・検査部長・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・大学院薬学研究院・准教授・星野忠次
	所属・職名・氏名	千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師・北村浩一
	所属・職名・氏名	千葉大学・医学部附属病院・臨床検査技師・小林崇平
	所属・職名・氏名	千葉大学・医学部附属病院・技術補佐員・田中信子
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん研究所・教授・源 利成
【研究目的】	FIR は <i>c-myc</i> 遺伝子のプロモーター上流の FUSE に結合する 1 本鎖核酸結合タンパク質である。FIR は FBP やスプライシング因子 SAP155 と相互作用して <i>c-myc</i> の転写や転写後調節 (pre-mRNA のスプライシング) の双方に関与している。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。)	FIR ヘテロ KO マウスに発生するリンパ腫では癌代謝における pyruvate kinase(PK)M2 の発現が確認された。このことは、FIR の発現の多寡が癌代謝 (解糖系) にも関与していることが示唆された(Kimura et al., 論文 1)。本研究から、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 の機能阻害をすることを報告した(Ogura et al., 論文 2)。本研究プロジェクト「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)」(源利成先生ら) は大腸癌を中心に GSK3β や癌代謝などの優れた研究を行っており、論文作成などを通して、数度の緊密なメール等によるディスカッションなどを行うことにより癌の悪性化や <i>c-myc</i> の転写・転写後調節、DNA 損傷修復、癌代謝に関わる研究をより発展させた。 我々は FIR ヘテロ欠損マウス (FIR^{-/-}) と p53 ホモ欠損マウス (p53^{-/-}) を掛け合わせると血液がん (悪性リンパ腫・白血病) が発生することを確認しているが、消化管には癌の発生は認められていない。癌の進展には癌細胞だけでなく、間質細胞などの微小環境も重要である。癌の微小環境の研究で本邦をリードする大島教授との共同研究により、本モデルマウスを使ってスキルス胃癌の発生についての FIR Δ exon2 による FBW7 の相互作用 (機能阻害) の新知見を得た。現在は、本研究の成果をもとに、ヒト胃癌の浸潤や EMT (epithelial mesenchymal transition) に重要な E-cadherin の発現制御と FIR との関係を調べて論文準備中である。本研究では、我々の研究グループに源研究室の新しい視点を加えることにより、癌の悪性化や <i>c-myc</i> の調節、DNA 損傷修復、癌代謝に関わる研究をより発展させることができた。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Kimura A, Kitamura K, Ailiken G, Satoh M, Minamoto T, Tanaka N, Nomura F, and <u>Matsushita K</u>. FIR haplo deficiency promotes splicing to pyruvate kinase M2 in mice thymic lymphoma tissues revealed by six-plex tandem mass tag quantitative proteomic analysis. <i>Oncotarget</i>. 2017 Jul 7;8(40):67955-67965. doi: 10.18632/oncotarget.19061. - 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 <u>Matsushita K</u>. Disturbed alternative splicing of FIR (PUF60) directed cyclin E overexpression in esophageal cancers. <i>Oncotarget</i> 2018, May 1;9(33):22929-22944 【学会発表】 <u>Kazuyuki Matsushita</u> and Sohei Kobayashi. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies were detected in the sera of early-stage colon cancer patients. -Identification of specific and common diagnostic antibody markers for gastrointestinal cancers by SEREX screening using testis cDNA phage library- 3rd International Cancer Study & Therapy Conference. May 2-4, 2018 Rome, Italy. Collaborated with WAMS, The World Academy of Medical Sciences. 【その他特筆事項】	

研究課題		癌細胞エクソソームの分子病態解明による新規がん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎 猛夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・助手・山本 聡子
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御・助教・堂本 貴寛
	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】	がん細胞が分泌するエクソソームは、タンパク質、脂質、および核酸を含んでおり、がん細胞の状況が反映されていることから、そのエクソソームを取りこんだ細胞に影響を与えることができる。エクソソームに関する様々な研究が行われているが、正常細胞、がん細胞、抗がん剤耐性細胞では、エクソソーム動態にどのような違いがあるか、抗がん剤に対するエクソソームの反応の違いなど、基本的なことは明らかにされていない。本研究では、抗がん剤によるがん細胞のエクソソーム分子機構への影響について解析を行うことにより、新たながん治療法への一助とする。	
【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。)	◆抗がん剤の投与によってExosomeにどのような変化が生じるか？  我々は、難治性がんの代表である膵がん培養細胞と正常膵管上皮細胞のエクソソームに関して、抗がん剤の影響を比較検討した。 方法：ヒト膵がん培養細胞と正常膵管上皮細胞を対象に、抗がん剤 (Gemcitabine (GEM) or 5FU) によるエクソソーム分泌量変化やエクソソーム表面マーカーの発現変化を検討した。本研究では、通常用量の抗がん剤では、細胞死に伴うアポトーシス小胞とエクソソーム分泌を識別できないため、IC80 の濃度で検討した。エクソソーム数を、微粒子数測定装置 NanoSight を用いて、エクソソーム表面マーカーについては、ELISA アッセイとウエスタンブロット法を用いて検討した。 結果：膵がん細胞では GEM 投与により、細胞内とメディウム中のエクソソームマーカータンパク質 (CD63/CD9) の発現は増加し、メディウム中のエクソソーム数も増加した。その一方正常膵管上皮細胞では、細胞内に CD63/CD9 の発現を認めず、抗がん剤による変化も認めなかった。GEM により、1 エクソソームあたりの CD63 発現量は減少したが、1 細胞あたりの CD63 は増加していた。 考察と結論：がん細胞種や抗がん剤の種類により、薬剤によるエクソソーム動態変化は異なることが明らかとなった。また、1 エクソソームあたりの表面マーカー発現量は減少していても、1 細胞あたりの表面マーカー発現量が増えていたことは、重要な示唆を与える結果であった。これら薬剤によるエクソソームの動態変化は、抗がん剤抵抗性と関係する可能性があり、膵がん治療に際し、エクソソームの反応を考慮した治療戦略が必要である。	
【成果等】	【主な論文発表】なし	
	【学会発表】 1. 島崎猛夫、源利成ら. 抗がん剤による膵癌細胞のエクソソーム動態への影響、第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪、2018. 9. 27-29) 2. 島崎猛夫、源利成ら. 低用量抗がん剤暴露による膵がん細胞エクソソームの細胞内局在と分泌の変動 第 29 回日本消化器癌発生学会総会 (東京、2018. 11. 16-17)	
	【その他特筆事項】 本研究は、継続的な研究が必要です。引き続きご支援の程お願いします。	

平成 30 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		Establishment of a skin cancer model using hiPSCs-derived keratinocytes from Xeroderma pigmentosum patients
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員・Fabian Ocegueda-Yanez
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 iPS 細胞研究所・准教授・Knut Woltjen
	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】	Xeroderma pigmentosum (XP) is caused by mutations in genes involved in DNA repair. Patients lacking XP gene components develop skin cancer due to increased sensitivity to sunlight. I aim to model skin carcinogenesis using keratinocytes differentiated from XPA patient-derived iPS cells to identify driver genes involved in cancer progression.	
【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。)	XP-associated skin cancer is caused by somatic mutations in epidermal stem cells. In order to recapitulate skin cancer progression, I will differentiate XPA-patient iPSCs into skin keratinocytes. UV-induced mutagenesis aided by CRISPR/Cas9 will be applied to induce cell transformation. XPA iPSCs derived from XP patients harbor a mutation located in the splice acceptor of intron 3 of <i>XPA</i> (IVS3AS, G-C / IVS3AS, G-C) (Satokata <i>et al.</i>, <i>P.N.A.S. USA</i>. 1990). I applied CRISPR/Cas9 and ssODN to repair the mutation and generated isogenic genetically-corrected cells. The control cell lines will provide with a genomic mutational reference background. I engineered genetically the aforementioned cells to express Cas9 nuclease from the <i>AAVS1</i> locus following the methodology described previously (Ocegueda-Yanez <i>et al.</i>, <i>Methods</i>. 2016). Transfection of sgRNA into Cas9-expressing cells will be performed to knock out tumor suppressor genes. My preliminary results suggest that DNA adducts are generated in XPA iPSCs treated with 1 J m⁻² UVC. Differentiated cells subjected to UV light-induced mutagenesis will be characterized by soft agar and spheroid growth analyses.	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 第4回 京都皮膚基礎研究会: Development and application of genome editing and iPSC differentiation to model skin damage and disease	
	【その他特筆事項】	

研究課題		膵組織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・源利成
【研究目的】	組織前駆細胞は多分化能、自己複製能を有する細胞であり、テロメラーゼ活性を有し、細胞分裂を繰り返してもテロメア長が維持されるという特徴を有する。テロメアは染色体末端に存在する染色体保護装置であり、細胞老化制御の中心的役割を担う。新生児の膵臓では、膵管上皮細胞、腺房中心細胞、pancreatic duct gland に、長いテロメアを有する細胞（＝組織幹/前駆細胞）が存在し、長いテロメア長を有する細胞数が加齢とともに減少することが明らかになった（平成 28-30 年度金沢大学がん進展制御研究所共同研究）。そこで、今年度は膵臓の組織幹細胞におけるテロメア・テロメラーゼ制御機構の解明を目指し、SOX9, CDK1 の発現を検討した。本研究のゴールは膵組織中の組織前駆細胞について、(1) 加齢に伴う生体内での局在や数の変化、(2) 機能の変化、(3) テロメア長の制御機構、(4) 膵発癌との関連を明らかにし、老化と発癌における組織前駆細胞のヒト生体内での役割を解明し、膵臓の発癌予防を目指す。	
【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。)	正常膵組織の膵管上皮、腺房、腺房中心細胞、pancreatic duct gland における SOX9、テロメラーゼ陽性細胞数は、加齢とともに減少し、テロメア長の減少と関連を示した。テロメア長の短縮速度は腺房中心細胞、pancreatic duct gland が最も速かったことから、これらの部位に組織前駆細胞が存在することが示唆された。前がん病変の pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) では、SOX9、テロメラーゼ陽性細胞数は増加傾向を示した一方、テロメア長は短縮を示した。膵癌では、SOX9、テロメラーゼ陽性細胞数が増加していた。また、再発した膵癌症例では、SOX9、テロメラーゼ陽性細胞数が増加し、テロメア長は維持されていた。 以上の結果より、図のようなテロメア調節機構と発がんとの関連を想定している。 Pancreatic tissue progenitor cells SOX9(+), hTERT(+), long telomeres • Centroacinar • PDG (Elderly) • Duct	

【成果等】	【主な論文発表】 Telomere length determined by the fluorescence in situ hybridisation distinguishes malignant and benign cells in cytological specimens. <u>Matsuda Y</u>, Suzuki A, Esaka S, Hamashima Y, Imaizumi M, Kinoshita M, Shirahata H, Kiso Y, Kojima H, Matsukawa M, Fujii Y, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Ishiwata T, Nishimura M, Arai T. Cytopathology. 29(3):262-266, 2018
	【学会発表】 松田 陽子、膵臓の加齢性変化が発癌に及ぼす影響の病理組織学的解析、第 64 回日本病理学会 秋期特別総会、A 演説 2018 年 11 月 23 日
	【その他特筆事項】

研究課題	B 型肝炎ウイルス慢性感染に対する、ケモカインを利用した新たな免疫制御法の開発	
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・助教・野阪 拓人
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	B 型肝炎ウイルス (HBV) の慢性感染は、肝がんの発生母地となる肝硬変を引き起こすことで、肝がん発症に繋がることが知られている。慢性感染状態にある HBV を肝臓から排除することは、肝がん発症そのものの予防に繋がると考えられる。 感染肝細胞での HBV のライフサイクルにおいて、細胞核内に存在する covalently closed circular DNA (cccDNA) がウイルス複製の鋳型であるため、HBV の完全排除には cccDNA を肝臓内から排除する必要があるが、現治療法では cccDNA を排除は困難である。一方で、ウイルス抗原エпитープによって刺激された T リンパ球由来液性因子が、cccDNA を制御できる可能性が報告されている。中本らは、独自に開発した HBV マウス (J Exp Med 196: 1105, 2002; Cancer Res 64 : 3326, 2004) を用いた解析から、T リンパ球の体内動態に関与しているケモカイン CCL5 とそのレセプター CCR5 が、肝組織内でのウイルス産生と逆相関していることを見出した。したがって、CCL5-CCR5 系が、HBV 抗原特異的 T リンパ球の肝臓内への動員に密接に関与し、この系の低下が cccDNA の排除が十分行われない原因である可能性が示唆される。本研究では、ウイルス抗原エピトープと、T リンパ球に対して作用を示すケモカイン CCL5・CCL3 とを併用することによって、HBV cccDNA の排除に繋がる新たな知見が得られることを目指す。	
【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。)	HBV 抗原由来ペプチドとケモカイン CCL3 または CCL5 を同時発現するベクター (Fig. 1) を作製し、HBV 抗原特異的 T リンパ球を誘導することで、HBV に対する影響を検討するため、以下の点を昨年度明らかにした。 - hCCL5 (NM_002985)、hCCL3 (NM_002983) をそれぞれインサートしたケモカイン発現ベクター (pCR2.1®-TOPO® TA Vector) を pIRES Bicistronic Expression Vector に組み込み、乳がん細胞株 4T1 cell に遺伝子導入し、ケモカインが産生されることを確認した (Fig. 2)。 - HBV 抗原由来マルチエピトープ連結ペプチド (金沢大学・水腰准教授、梶医師提供) を上記 hCCL3 発現 pIRES Bicistronic Expression Vector に組み込み、同時発現ベクターを作製し、4T1 cell に遺伝子導入し、CCL3 発現を確認した。 また、本 CCL3・CCL5 発現ベクターを国立感染研究所鈴木氏に提供しており、HBV 遺伝子における、ヒト肝細胞認識部位で、感染に重要な HBs 抗原 Pre-S1 領域を組み込むことで、抗体誘導能や感染に対する影響の検討も予定している。 Fig. 1 HBV 由来ペプチドとケモカイン同時発現ベクター Fig. 2 4T1 cell にベクター導入後の上清中 CCL3、CCL5 の発現量	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Mukaida N</u>, <u>Nosaka T</u>, <u>Nakamoto Y</u>, Baba T. Lung Macrophages: Multifunctional Regulator Cells for Metastatic Cells. 2018 年 12 月 Int J Mol Sci. (2018 Dec 29;20(1):E166). 【学会発表】 <u>Takuto Nosaka</u>, Tomohisa Baba, Tatsushi Naito, Masahiro Ohtani, Katsushi Hiramatsu, Tomoyuki Nemoto, Makoto Arita, <u>Naofumi Mukaida</u>, and <u>Yasunari Nakamoto</u>. Leukotriene B4 Secreted by Alveolar Macrophages Promotes Hepatocellular Carcinoma Lung Metastasis. 2018 年 5 月. The Asian Pacific Association for the Study of the Liver.	

	2. <u>野阪拓人</u>, <u>向田直史</u>, <u>中本安成</u>. 肝細胞癌肺転移における肺胞マクロファージ由来ロイコトリエン B4 を標的とする新規治療の可能性. 2018 年 6 月. 第 54 回日本肝臓学会総会. 3. <u>Takuto Nosaka</u>, Tomohisa Baba, Yamato Tanabe, Soichiro Sasaki, Makoto Arita, <u>Yasunari Nakamoto</u>, and <u>Naofumi Mukaida</u>. Alveolar macrophages drive lung metastasis in cooperation with interstitial macrophages by generating leukotriene B4. 2018 年 9 月. 第 77 回日本癌学会学術総会.
	【その他特筆事項】 AMED・B 型肝炎創薬実用化等研究事業 「獲得免疫反応の賦活化により核内 HBV cccDNA を排除する手法の開発」平成 29 年度～31 年度（代表者 中本安成、直接経費総額 23、077 千円）

平成 30 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		腫瘍細胞死誘導時の腫瘍浸潤樹状細胞のダイナミクス増強に関わる DAMPs 分子の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・助教・守屋大樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・教授・戸村道夫
	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	免疫炎症制御分野・教授・須田貴司
【研究目的】	申請者の研究から、腫瘍細胞死誘導により腫瘍浸潤樹状細胞 (Ti-DCs) の所属リンパ節 (dLN) への移行促進、そして抗腫瘍応答増強がみられることが明らかとなっている。腫瘍細胞死誘導時の Ti-DCs の dLN への移行促進のメカニズムが明らかとなれば、抗がん剤による細胞死誘導時に応用することで抗腫瘍免疫を増強できる可能性がある。ダメージ関連分子パターン (DAMPs) 分子は腫瘍死細胞から放出され Ti-DCs を活性化することが知られている。そこで、申請者のモデルで見られた抗腫瘍免疫増強にも DAMPs 分子を介した Ti-DCs 増強が関与するという仮説を検証することを本研究の目的とした。	
【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。)	モデル抗原として卵白アルブミン (OVA) と腫瘍細胞死誘導のためジフテリア毒素 (DT) 受容体 (DTR) を発現させた大腸ガン細胞株 MC38 (MC38-OVA/DTR) を、光変換タンパク質、Kikume Green-Red (KikGR) を全身の細胞に発現する KikGR マウスに接種した。MC38-OVA/DTR 接種一定期間後、形成した腫瘍組織に紫色光照射を行い、腫瘍に浸潤した緑色 (KikGR-Green) の細胞を赤色 (KikGR-Red) にマーキング、同時に DT を接種し腫瘍細胞死を誘導した。24 時間後、腫瘍細胞死誘導マウスにおいて dLN 内 KikGR-Red Ti-DCs 細胞数は対照群と比較して倍増していた。 死した腫瘍細胞から放出される DAMPs 分子として知られる ATP, high mobility group box (HMGB) 1 はそれぞれ P2X7 受容体、toll-like receptor (TLR) 4 に結合し DCs を活性化することが知られている。そこで DT による腫瘍細胞死誘導、腫瘍への紫光照射と同時に P2X7 受容体阻害薬である oxidized ATP、および TLR4 阻害薬である glycyrrhizin をマウスに投与すると腫瘍細胞死誘導によりみられた dLN への Ti-DCs の移行促進作用は阻害剤投与マウスで有意に減弱した。このため、腫瘍細胞死誘導による Ti-DCs の dLN への移行促進には ATP-P2X7 受容体および HMGB1-TLR4 シグナルが関与することが示唆された。 Ti-DCs の dLN への移行に CCR7 等の Gi 共役型受容体が関与することが知られている。DT 投与に加えて Gi シグナル阻害薬である百日咳毒素 (PTX) を投与すると、腫瘍細胞死誘導により見られた Ti-DCs の移行促進作用はほぼ完全に消失した。そこで PTX を用い、腫瘍細胞死誘導のタイミングでの Ti-DCs の移行促進が抗腫瘍応答増強へ関与するかについて検討した。抗原特異的な抗腫瘍応答を評価するため、MC38-OVA/DTR および OVA 発現メラノーマ細胞株である B16-OVA を同じマウスに接種した。DT 投与により MC38-OVA/DTR に細胞死誘導を行ったマウスでは、対照マウスと比較して B16-OVA の成長は抑制された。腫瘍細胞死誘導と同時に PTX を接種し、腫瘍細胞死誘導時での Ti-DCs の移行促進作用を阻害すると腫瘍細胞死誘導単独でみられた腫瘍の成長抑制効果は消失した。以上より腫瘍細胞死誘導による抗腫瘍応答増強には細胞死誘導のタイミングでの Ti-DCs の dLN への移行促進が重要であり、この移行促進には死した腫瘍細胞から放出された ATP, HMGB1 等の DAMPs 分子による Ti-DCs の活性化が関与することが本研究から示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	MORIYA Taiki, UEDA Mizuki, YASUDA Ippei, Ikebuchi Ryoyo, KUSUMOTO Yutaka, TOMURA Michio, Immunogenic tumor cell death accelerates tumor infiltrating dendritic cell migration and leads to tumor regression, 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018/12 守屋 大樹、早川 侑希、池渕 良洋、植田 都月、安田 一平、楠本 豊、戸村 道夫, 腫瘍細胞死誘導時の腫瘍浸潤樹状細胞のリンパ節移行促進における DAMPs 分子の関与, 第 161 回日本獣医学会学術集会, 2018/09	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		ケモカイン誘導を介したヒトサイトメガロウイルスによる神経膠芽腫悪性化の解析
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	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) の感染に伴う宿主ケモカイン・ケモカイン受容体の発現上昇が、神経膠芽腫 (glioblastoma multiforme; GBM) の悪性化に関与する可能性を、これまでの共同研究を通じて示してきた。しかしながら先行研究では、HCMV が GBM 組織から検出されない報告も多く、地理的要素以外にヒト側の遺伝的要素、さらにウイルス側の遺伝的要素の関与が疑われている。そこで本研究では、ケモカイン産生誘導能に差のある 2 種類の HCMV 株間で、immediate-early (IE) 遺伝子を中心にウイルスの遺伝的要素を比較し、ケモカイン産生の差異の要因を特定することを試みた。	
【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。)	HCMV IE1 遺伝子ならびに IE2 遺伝子のケモカイン産生誘導能を、ウイルス株ごとに検討するために、実験室継代株 Towne ならびに臨床分離株 91S の cDNA を pEF-BOSEX プラスミドにクローニングした。発現プラスミドを GBM 細胞株 (A172 および T98G) および神経膠腫細胞株 (U-373MG) にトランスフェクションし、EF1-αプロモーター下で各遺伝子を発現させた際の、株間でのケモカイン産生誘導の差異を比較検討した。ウイルス感染によって上昇するケモカイン (IL-8、IP-10、Eotaxin、MIG、GROα、I-TAC) に着目し、real-time RT-PCR 法により定量を行ったところ、いずれのケモカイン遺伝子も、IE1 よりも IE2、さらに Towne よりも 91S の IE 遺伝子導入により、強く発現上昇することが明らかとなった。しかしながらウイルス感染実験では、Towne と 91S の間のケモカイン遺伝子発現量の差は、約 2~3 倍 91S が高いという結果であったにもかかわらず、IE 遺伝子導入実験では、その差は約 1.2~1.5 倍に留まった。すなわち IE 遺伝子以外の要素の違いも、ケモカイン遺伝子発現に重要である可能性が示唆されたため、IE 遺伝子自体の発現に重要であるとされている、ウイルス粒子因子・テグメントの違いを次に検討した。紫外線照射により、テグメントの影響のみを観察できる状態にした不活化ウイルス粒子を、IE 遺伝子導入細胞に添加し、株間のテグメントの違いによる IE 遺伝子発現量ならびにケモカイン遺伝子発現量の差を比較した。しかしながら、IE 遺伝子とケモカイン遺伝子のいずれも、不活化ウイルス粒子の添加によるさらなる発現上昇はみられなかった。テグメント以外に IE 遺伝子の発現量を制御する因子としては、シスエレメントとして、エンハンサー・プロモーターに加えて、IE 領域のイントロンの存在が知られている。そこでエンハンサー・プロモーターからイントロンも含めた HCMV ゲノムの IE 領域を pUC18 プラスミドにクローニングし、IE1 と IE2 を発現し分けるために、各々 IE2 の主要エキソンと IE1 の主要エキソンを制限酵素により除去した発現ベクターを構築した。遺伝子導入の結果、pEF-BOSEX を骨格とした発現ベクターよりも高い遺伝子発現量が、IE 遺伝子とケモカイン遺伝子の両方で得られたことから、EF1-αプロモーターよりも HCMV のエンハンサー・プロモーター・イントロンの組合せの方が、遺伝子発現誘導能が高いことが明らかとなった。一方で、Towne と 91S の差異という点では、イントロンの有無によるケモカイン遺伝子発現誘導の差異は、ウイルス感染時の差異には及ばなかったことから、IE 遺伝子以外のウイルス遺伝子の関与を今後検討していく必要がある。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. Proinflammatory responses to VZV infection in human retinal cell lines. Masaya Takemoto et al. 第 66 回日本ウイルス学会. 2018 年 10 月. 京都	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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	関西医科大学・講師・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	
	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。)	<i>Rb</i> がヘム結合の制御を介して概日リズムの制御を行う詳細なメカニズムを解析した。概日リズム遺伝子 <i>Cry1</i> 発現制御には、ヘムタンパク質である <i>PER2</i> を介した経路と、<i>Rev-Erba/β</i> を介した経路が報告されている。興味深いことに最近、<i>Rev-Erba/β</i> の活性化化合物が、がん抑制効果があることが報告された (Sulli ら、Nature 2018)。そこで本申請では、<i>Rb</i> による <i>Rev-Erba/β</i> を介した概日リズムの制御機構を以下のように解析した。 1. <u><i>Rb</i> による <i>Cry1</i> 発現制御における <i>Rev-Erba/β</i> 結合配列の重要性の検討</u> <i>Rev-Erba/β</i> の結合領域は RRE 配列と呼ばれ、<i>Cry1</i> の 1st イントロンに存在することが報告されている (Ukai-Tadenura ら CELL 2011)。そこで RRE 配列近傍の 336bp と RRE 配列に変異を導入した配列にルシフェラーゼを結合させたレポーターシステムを用い、<i>Rb</i> による <i>Cry1</i> 発現制御機構に <i>Rev-Erb α/β</i> が関係する可能性を検討した。その結果、RB の存在に依存してレポーター活性に変化は見られなかった。 2. <u><i>Rb</i> による <i>Rev-Erb α/β</i> へのヘム結合制御の有無の検討</u> 培養細胞に <i>Rev-Erba/β</i> と <i>Rb</i> を発現させ、<i>Rev-Erba/β</i> を免疫沈降法により精製した後、<i>Rev-Erba/β</i> へのヘム結合量を化学発光法を用いて定量することにより、RB によるヘム結合制御の可能性を検討した。その結果、RB の存在に依存するヘム結合量の変化は見られなかった。 本年度の結果は予想していたものと異なる結果であったので、今後は異なるアプローチからの研究を進める。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 第 77 回 日本癌学会ポスター発表 大阪 2018 年 9 月	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		グリオブラストーマに観察される細胞死を誘導する分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・教授・近藤 亨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	代表的な脳腫瘍である神経膠芽腫 (GBM) は、発生臓器の重要性から外科的切除が困難である上に抗癌剤・放射線療法に耐性である。これは GBM に存在する GBM 幹細胞 (GIC) とその周辺細胞 (ニッチ細胞) が治療抵抗性に関与していると考えられている。申請者らはこれまでにヒト GBM を模倣するマウス GIC 株の樹立と性状解析、新規腫瘍抑制分泌因子 Ecr4 の同定とその抗腫瘍メカニズムを明らかにしてきた。これらの研究過程で、Ecr4 欠損 GIC が野生型マウス脳に広範な壊死と血管新生を伴うヒト GBM に酷似した腫瘍を形成することを発見した。本研究課題では、GBM の特徴の 1 つ細胞死における Ecr4 の機能を解析し、Ecr4 を介した GBM 組織内ネットワークの一端の解明を目的として遂行する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申請者らは、ヌードマウスに脳腫瘍を形成する Ecr4 野生型 GIC と Ecr4 欠損 GIC を樹立し、Ecr4 欠損 GIC が野生型 GIC に比べて高効率で野生型マウスにヒト GBM に酷似した脳腫瘍を形成することを発見した。Ecr4 はミクログリア／マクロファージに働き、獲得免疫系の活性化を介して抗腫瘍効果を発揮することから、Ecr4 がミクログリア／マクロファージに働くメカニズムは腫瘍抑制の起点となっていると考えられる。そこで、野生型及び Ecr4 欠損 GIC (共に 1×10^5 細胞) を移植した野生型マウス脳に浸潤しているミクログリア／マクロファージ (CD45+, CD11b+, F4/80+) を経時的に FACS にて検討した。 その結果、移植 2 週間まで両 GIC を移植した脳内に未処理マウス脳に比べて優位にミクログリア／マクロファージ数の増加を確認した。その後、野生型 GIC を移植した脳内のミクログリア／マクロファージ数は減少したが、Ecr4 欠損 GIC 移植脳では腫瘍の大きさに比例してミクログリア／マクロファージ数が増加した。これらの結果から、野生型と Ecr4 欠損 GIC を移植した 12-14 日後に脳内ミクログリア／マクロファージを精製することに決定し、1×10^4 以上／脳 (各 GIC 移植脳から総数 3×10^4 以上) のミクログリア／マクロファージを回収した。次に、これら細胞から調整した RNA を用いて cDNA を作製し、定量 RT-PCR により主なミクログリア／マクロファージ遺伝子群 (Iba1, CD68, CD45, IL-6) の発現を検討したが、マイクロアレイを含む遺伝子発現解析に必要な RNA 量を回収できていない。野生型 GIC の腫瘍形成が野生型マウス脳で抑制されていることが十分量のミクログリア／マクロファージの回収の障害になっていることから、NK 細胞やマクロファージが保持されているヌードマウスに脳腫瘍を形成させ、そこに浸潤するミクログリア／マクロファージの精製と遺伝子発現解析を行う実験手法が本研究を遂行するために必要であると結論した。	
【成果等】	【主な論文発表】	該当ありません
	【学会発表】	該当ありません
	【その他特筆事項】	該当ありません

平成 30 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(NSCs)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)。また、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。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。これまでに、野生型マウス NSCs に K-RAS V12 を強制発現させることで <i>Cdkn2a</i> 遺伝子同様、 <i>Mtap</i> 遺伝子についても発現誘導が見られた。これらの結果ならびにヒト GBM で <i>CDKN2A</i> 、 <i>CDKN2B</i> 、 <i>MTAP</i> 遺伝子の共欠損が特徴的であることから、 <i>Mtap</i> 遺伝子が発がん過程において <i>Cdkn2a</i> 遺伝子と同様にがん抑制効果を持つことが示唆された。次に、野生型マウス NSCs ならびにそれらに K-RAS V12 強制発現させた K-RAS V12-NSCs に MTAP 遺伝子をさらに強制発現させて細胞増殖への影響を調べたところ、両細胞において増殖抑制は見られなかった。また、両細胞に <i>shMtap</i> を導入し、 <i>Mtap</i> 遺伝子の発現抑制を行ったが、増殖活性に変化は見られなかった。今後はこれら細胞を野生型マウス脳内に移植し、腫瘍形成能への影響を評価したいと考えている。また、同時に進めている <i>in vivo</i> マウス脳腫瘍モデルを用いて、野生型マウス脳に直接 <i>MTAP</i> 遺伝子や <i>shMtap</i> をがん遺伝子と同時に導入す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】	
	【学会発表】 ・大西 伸幸、大塚 正人、佐藤 正宏、佐谷 秀行「 <i>In vivo</i> エレクトロポレーションを用いたマウス発がんモデルならびに簡便な遺伝子改変マウス作製法の開発」第 6 回 がん代謝研究会 5/11 奄美大島 ・大西 伸幸、佐谷 秀行「 <i>In vivo</i> エレクトロポレーションを用いたマウス発がんモデルならびに簡便な遺伝子改変マウス作製法の開発」第 77 回 日本癌学会学術総会 9/28 大阪	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		ALK 融合遺伝子肺がん及び ROS 1 融合遺伝子肺がんの新規 ALK/ROS1 阻害薬 Lorlatinib に対する耐性機序の解明とその克服
研究代表者	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・助教・谷口寛和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・助教・山口博之
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・助教・池田喬哉
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・大学院生・嶋田緑
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・教授・迎寛
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	肺がんは我が国を含む先進国で最も死亡者数が多いがんの一つであり、有効な治療法の開発と進展が必要である。Anaplastic lymphoma kinase (ALK)融合遺伝子陽性肺がん(以下、ALK 肺がん)は肺腺がんの約 3～5%、ROS proto-oncogene 1 (ROS1)融合遺伝子陽性肺がん(以下、ROS1 肺がん)は約 1～2%を占め、どちらも若年者、非喫煙者に多いことが報告されている。これらに対しては近年、ALK 阻害薬、ROS 1 阻害薬といった分子標的治療薬が有効であることが報告され実地臨床でも使用されている。最も新しい承認薬である Lorlatinib も他剤で耐性を来した症例に対しても有効であることが報告された一方で、薬剤耐性を獲得することも同時に知られている。この耐性機序を解明し克服法を発見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。)	まず我々は、ALK 陽性肺がん細胞株、ROS1 陽性肺がん細胞株に対して Lorlatinib を一定濃度で慢性的に曝露していくことで Lorlatinib に対する薬剤耐性を獲得した細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株と他の ALK 阻害薬、ROS1 阻害薬に対する感受性を検討したところ、他の阻害薬に対しても耐性を示すことも示された。 この薬剤耐性の機序を解明するため各種の解析を行っている。これまでの解析の中で、他の分子標的薬に対する薬剤耐性の薬剤耐性の機序として報告がある、各種キナーゼ活性の上昇に伴うバイパスシグナルによる細胞生存シグナルの残存によるものの可能性も考えられたため、検討した。 感受性株と耐性株で各種キナーゼにおける蛋白のリン酸化に関する比較を行ったところ、耐性株でとある蛋白質のリン酸化が上昇していることが判明し、薬剤耐性の原因となっている可能性が示唆された。このキナーゼの活性化がバイパスシグナルによる細胞生存シグナルに関与しているかどうかを検討するため、このキナーゼ阻害薬や RNA 干渉法による遺伝子レベルでの抑制を行うことで細胞増殖を抑えることが可能であることを検討したところ、薬剤耐性株において Lorlatinib への相加効果を示すことができた。 今後は、耐性株において ALK、ROS1 遺伝子変異による Lorlatinib の耐性機構が存在しないか検討すると共に、耐性株における細胞生存シグナルの更なる解析を進めていく予定である。また Lorlatinib と前述のキナーゼ阻害薬の併用効果が in vivo でも確認できるか、検証を進めていくことを検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		胃癌の悪性化における Protein Phosphatase 6 の役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・准教授・大浜剛
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・学振特別研究員・辻竣也
	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】	Protein phosphatase 6 (PP6) は、Type 2A タンパク質脱リン酸化酵素ファミリーに属する酵母から哺乳類まで進化的に保存されたセリン・スレオニン タンパク質脱リン酸化酵素である。代表者は、これまでに PP6 が炎症シグナルの抑制に寄与すること (Stefansson B et al. JBC 2006)、上皮細胞の接着結合の維持に重要な役割を果たすこと (Ohama T et al, BMC Cell Biol. 2013) などを報告してきた。近年、メラノーマ患者の腫瘍組織において高頻度に PP6 の変異が認められることが報告され、腫瘍における PP6 の役割が注目を集めている。そこで本研究では、胃癌における PP6 の役割について解析することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	オートファジーは、細胞内の異常なタンパク質やミトコンドリアなどの細胞内小器官を分解する機構であり、その破綻はがんや神経変性疾患の原因になることが知られている。オートファジー制御の分子機構については世界的に盛んに研究が行われており、様々なリン酸化酵素キナーゼの関与が報告されている。一方で、脱リン酸化酵素による制御についてはほとんど報告がないが、代表者は、PP6 同様 Type 2A タンパク質脱リン酸化酵素ファミリーに属する PP2A がオートファジー活性を抑制する分子機構を報告した (Fujiwara N et al. J. Biol. Chem. 2016)。その中で、PP6 にもオートファジー活性を制御する作用があることが明らかになってきた。そこで本研究では、A) PP6-autophagy axis による胃癌悪性化の分子機構の解明、B) ヒト胃癌病変における PP6 発現変化の解析、C) 胃癌自然発症モデルマウスの腫瘍部におけるオートファジー活性の変化の解析の 3 つの項目を行った。 項目 A に関しては、PP6 がオートファジー誘導に必須の VPS34-Beclin 1 複合体を解離させることでオートファジー活性を抑制していること、この作用に PP6 のホスファターゼ活性は不要であることが明らかになった。また反対に、哺乳類細胞では、PP6 タンパク質は選択的なオートファジーによって分解されるが、この機構は酵母には存在しないことが明らかになった。 項目 B に関しては、ヒト胃癌組織切片が計画通りに集まらなかったため、US Bio 社よりヒト消化器がん組織マイクロアレイを購入し、PP6 およびオートファジー活性マーカーである p62 のタンパク質発現を解析した。その結果、PP6 タンパク質レベルと p62 タンパク質の蓄積 (オートファジー活性の低下) に正の相関関係が存在することが明らかになった。 項目 C に関しては、大島教授から提供を受けた <i>Gan</i> マウスの組織サンプルにおいて PP6 タンパク質発現上昇と p62 の蓄積 (オートファジー活性の低下) を確認した。また、電子顕微鏡を用いて <i>Gan</i> マウスの腫瘍におけるオートファジー活性の低下を解析しようと試みたが、オートファジー活性がより高い野生型マウスの正常胃組織や <i>Gan</i> マウスの非腫瘍部組織においてもほとんどオートファゴソームは認められず、電子顕微鏡を用いた解析は困難であるという結論に至った。	
【成果等】	【主な論文発表】 本研究課題に関連するデータは現在論文投稿中である。	
	【学会発表】 1) 藤原伸行、恒富亮一、裕彰一、友近忍、鈴木伸明、武田茂、大浜剛、佐藤晃一、吉野茂文、上野富雄、永野浩昭 Protein Phosphatase 6 は大腸癌の悪性化に関与する 第 77 回日本癌学会学術総会 2) Fujiwara N, Shibutani S, Sakai Y, Shima H, Watanabe T, Ohshima H, Ohshima M, Saito T, Akira S, Nagano H, Usui T, Ohama T, Sato K Elucidation of control mechanism of type 2A protein phosphatase by autophagy Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (ICCP13)	
	【その他特筆事項】	

平成 30 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		細胞外に分泌される micro particle を介した慢性骨髄性白血病の再発メカニズム
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学・教授・小松 則夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	順天堂大学・助教・森下 総司
	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】	慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) の再発は, TKI に治療抵抗性の, 骨髄中に残存する白血病を再構築可能な細胞集団 (leukemia initiating cells: LICs) が, 投薬治療の中止に伴い再び増殖することによって引き起こされる。本研究では, CML の責任遺伝子である <i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子をもつ LICs 由来のエクソソームが, CML の再発時に周辺環境や正常な造血前駆細胞に何かしらの影響を与えているか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。)	CML 患者体内に腫瘍細胞由来エクソソームが循環しているかを確認するため, 順天堂大学医学部血液内科にて新規に CML と診断された患者末梢血より, 超遠心法を用いて, エクソソームを含む細胞外小胞分画を得た。得られた画分にエクソソームが含まれていることを, nano tracking analysis (NTA), および, ウェスタンブロッティング法にて確認したのち, エクソソーム中に含まれる核酸を抽出した。 抽出した核酸を鋳型に, <i>BCR/ABL1</i> を標的として PCR を行ったところ, 投薬治療前後のいずれにおいても <i>BCR/ABL1</i> が見出される症例 (図 1 Pt1), 治療に伴い <i>BCR/ABL1</i> が消失した症例 (図 1 Pt2), 治療前後に関わらず <i>BCR/ABL1</i> が見出されない症例 (図 1 Pt3) がいることがわかった。このことから, 患者末梢血中に腫瘍細胞由来のエクソソームを含む細胞外小胞が放出されており, それが体内を巡っていること, また, 腫瘍細胞由来のエクソソームは治療によって消失, あるいは減少する例があることが推察された。 腫瘍細胞由来のエクソソームを検出することで予後を予測できれば, 臨床的には極めて大きな意義をもつため, それぞれのタイプによって予後に違いが出るかについて, 今後のフォローアップで明らかにする予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

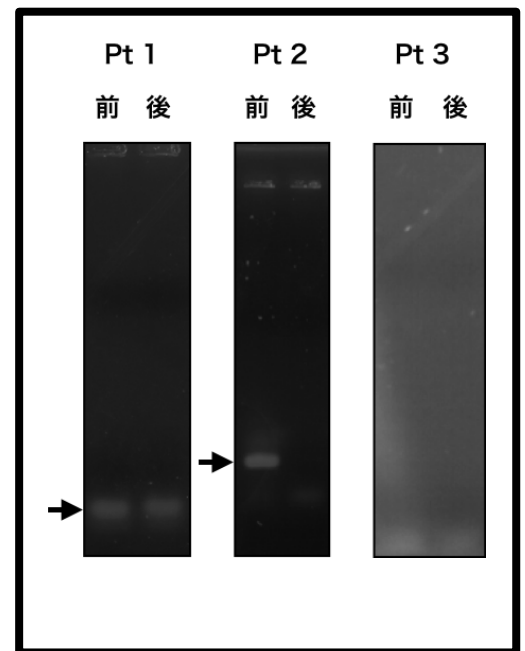


図 1 患者ごとの *BCR/ABL1* 融合点検出

研究課題		Rb/p53 経路の機能欠損を伴った新規 NET 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・基礎腫瘍学ユニット 特任研究員・青木清乃
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・チン ヨ
	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	腫瘍分子生物学研究分野・教授・高橋 智聡
【研究目的】	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。 神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor; 以下 NET) は、神経内分泌細胞に由来するとされる腫瘍である。神経内分泌細胞は近年、<u>内分泌臓器のみでなく全身に分布することが確認され</u>、diffuse neuroendocrine system (DNES)として <u>NET も全身諸臓器に発生することが知られてきている</u>。NET は、膵臓のほか下垂体、上皮小体、副腎、甲状腺、消化管、胸腺、肺などに生じることが知られている。しかし、<u>腫瘍発生機序は十分に解明されておらず、分子標的治療薬の開発も遅れているのが現状である</u>。その理由の一端にマウスモデルの開発が遅れていることが挙げられる。 研究代表者は、国立がん研究センター研究所の大木理恵子と共同研究を行い、p53 標的遺伝子である PHLDA3 の研究を行っている。これまでに、<u>PHLDA3 が Akt の活性化阻害を介して肺 NET のがん抑制遺伝子として働く事</u>を世界で初めて明らかにした (Cell, 2009)。さらに、<u>ヒト膵 NET においても PHLDA3 は約 70%と非常に高頻度に LOH を呈し、予後不良に重要な因子であること、PHLDA3 欠損マウスで膵島過形成を高度に呈することを明らかにしてきた</u> (PNAS, 2014)。加えて、<u>ヒト下垂体 NET 及びヒト甲状腺腫瘍においても PHLDA3 の LOH が高頻度に観察されたこと</u> (未発表データ)、<u>PHLDA3 欠損マウスにおいて雌で下垂体 NET が高頻度に発生すること</u> (未発表データ) を明らかとしている。 以上のデータより、PHLDA3 遺伝子の欠損は多臓器に生じるヒト NET において重要な癌抑制遺伝子であることが示唆された。現在、PHLDA3 欠損マウスでその他の臓器における NET 発生に関しては検討中であるが、これまでの知見より、PHLDA3 欠損マウスが新規ヒト NET 発症モデルとして期待出来るポテンシャルを持つ事が示された。 本研究では、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野高橋智聡との共同研究より、PHLDA3 欠損マウスと Rb ヘテロ欠損マウス (共同研究である必要性を参照) をかけ合わせ事により、<u>新規多臓器 NET 発がんマウスの樹立</u>を目指す。本モデル樹立により、<u>PHLDA3 欠損マウスで観察できなかった NET の転移を視野にいれた高度悪性化の phenotype 観察</u>が見込まれ、NET 治療薬や NET 患者の予後予測バイオマーカー開発、治療薬選定マーカー開発に資する研究成果が生まれることが期待される。さらに、PHLDA3 欠損による Akt 経路、Rb 欠損による細胞周期のみならずエピジェネティック調節機構、がん特異的代謝など細胞内シグナルのクロストークと代謝を視野にいれた NET 発症機序の詳細に迫りたい。	

【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 (図参照) 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 (下図)、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して詳細に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った。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した。 新規多臓器NET発がんマウスモデルの樹立 PHLDA3欠損マウス  <table border="1" style="margin: 0 auto;"> <thead> <tr> <th>臓器</th> <th>病変</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>膵島</td> <td>過形成</td> </tr> <tr> <td>下垂体</td> <td>腫瘍</td> </tr> </tbody> </table> × Rbヘテロ欠損マウス  <table border="1" style="margin: 0 auto;"> <thead> <tr> <th>臓器</th> <th>病変</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>下垂体</td> <td>腫瘍</td> </tr> <tr> <td>甲状腺</td> <td>腫瘍</td> </tr> </tbody> </table> Mating PHLDA3/Rb 2重欠損マウス  ✓ 検索臓器 膵臓ランゲルハンス島、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、各種消化管、胸腺、肺、さらに転移を想定して肝臓、各種リンパ節、その他異常の認められた臓器 ✓ 病理組織学的解析対象 ・増殖性病変(過形成) ・腫瘍性病変(良性腫瘍及び悪性腫瘍) ✓ 各種染色 ・クロモグラニンA ・シナプトフィジン ・CD56 ・SSTR2 ・インスリン/グルカゴン ・Ki-67	臓器	病変	膵島	過形成	下垂体	腫瘍	臓器	病変	下垂体	腫瘍	甲状腺	腫瘍
臓器	病変												
膵島	過形成												
下垂体	腫瘍												
臓器	病変												
下垂体	腫瘍												
甲状腺	腫瘍												
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Motohiro Kojima, <u>Yu Chen</u>, Koji Ikeda, Yuichiro Tsukada, Daigoro Takahashi, Shingo Kawano, Kota Amemiya, Masaaki Ito, Rieko Ohki, Atsushi Ochiai. Recommendation of long-term and systemic management according to the risk factors in rectal NETs patients. Scientific Reports 9(1): 2404, 2019. 2. <u>Yu Chen</u>, Masahiro Takikawa, Shuichi Tsutsumi, Yoko Yamaguchi, Atsushi Okabe, Mayuna Shibata, Tatsuya Kawase, Akane Sada, Issei Ezawa, Yuhei Takano, Kisaburo Nagata, Yutaka Suzuki, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Rieko Ohki. PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt. Cancer Science :109:3532-3542, 2018. 3. 富永 航平, <u>チン ヨ</u>、大木 理恵子. 膵神経内分泌腫瘍のがん遺伝子研究—PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の運命を決定する. 臨床消化器内科 (8 月号: 特集 膵神経内分泌腫瘍 update) , Vol. 33 No. 9, pp.1099-1109, 2018. 【学会発表】 該当せず 【その他特筆事項】 特になし												

平成 30 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・外来研究員 西尾美香
	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	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】 1. Motohiro Kojima, Yu Chen, Koji Ikeda, Yuichiro Tsukada, Daigoro Takahashi, Shingo Kawano, Kota Amemiya, Masaaki Ito, Rieko Ohki, Atsushi Ochiai. Recommendation of long-term and systemic management according to the risk factors in rectal NETs patients. <i>Scientific Reports</i> 9(1): 2404, 2019.	

2. Yu Chen, Masahiro Takikawa, Shuichi Tsutsumi, Yoko Yamaguchi, Atsushi Okabe, Mayuna Shibata, Tatsuya Kawase, Akane Sada, Issei Ezawa, Yuhei Takano, Kisaburo Nagata, Yutaka Suzuki, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Rieko Ohki. PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt. Cancer Science :109:3532-3542, 2018.

3. Junko Ohtsuka, Hiroko Oshima, Issei Ezawa, Ryo Abe, Masanobu Oshima and Rieko Ohki. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. Scientific Reports 8: 2291, 2018.

4. 富永 航平, チン ヨ、大木 理恵子.

膵神経内分泌腫瘍のがん遺伝子研究－PHLDA3 は膵神経内分泌腫瘍の運命を決定する.

臨床消化器内科 (8 月号: 特集 膵神経内分泌腫瘍 update) , Vol. 33 No. 9, pp.1099-1109, 2018.

【学会発表】

口頭発表

1. 2018 年 10 月 18 日 大木理恵子 東京理科大学 (2018 年度 腫瘍生物学)

「知られざる p53 の肖像～古くても、まだまだ新しい、最も有名ながん抑制遺伝子 p53～」

2. 2018 年 9 月 28 日 大木理恵子 第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪)

「がん抑制遺伝子 p53 機能喪失とがん微小環境は協調的に胃がん悪性化を促進する」

3. 2018 年 9 月 12 日 大木理恵子金沢医科大学で開催された 第 33 回 腫瘍病理セミナー 金沢女性研究者フォーラム (北信がんプロ FD 講演会)

「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～」

4. 2018 年 9 月 7 日 大木理恵子 弘前大学 第 11 回脳研×高度先進×COI 合同セミナ

「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～」

5. 2018 年 7 月 12 日 大木理恵 学習院大学「現代科学」

「がん研究の最前線～がん抑制遺伝子 p53 はどのようにがんを抑制するのか?～」

6. 2018 年 5 月 22 日 大木理恵子 名古屋大学大学院医学系研究科【Cancer Science Course】
"Portrait of p53 unknown ~Novel function of the most famous tumor suppressor gene p53~"

ポスター発表

1. 2018 年 11 月 30 日 富永 航平、山口 陽子、永田 喜三郎、大木 理恵子 第 41 回日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜)

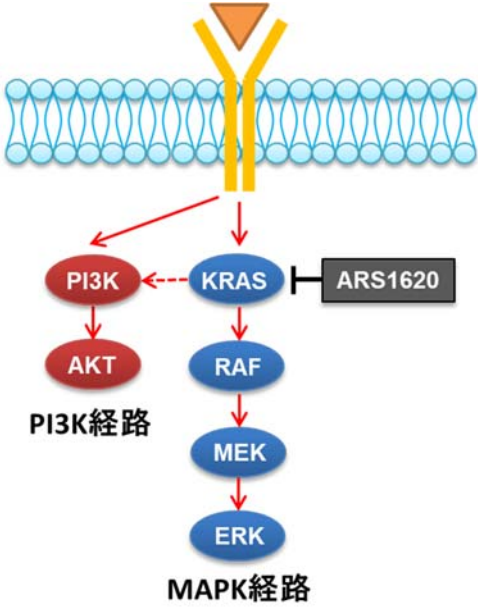
「下垂体神経内分泌腫瘍で同定されたがん抑制遺伝子 PHLDA3 変異の機能解析」

2. 2018 年 9 月 28 日 滝川 雅大、石川 冬木、大木 理恵子 第 77 回日本癌学会学術総会 (大阪)

「分泌性 p53 標的遺伝子 p53PAD7 の新規受容体の同定と細胞増殖停止機能の解明」

【その他特筆事項】

特になし

研究課題		KRAS 変異肺癌に対する KRASG12C 特異的阻害薬の耐性機構解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学病院内科 I 医員 北井秀典
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】	・本研究の目的は KRAS 変異肺癌に対する KRAS G12C 変異選択的阻害薬の耐性機構を解明し、より有効性の高い分子標的治療の確立を目指すことである。 KRAS 変異肺癌は海外では最も多く肺腺癌の 20~30%を占めるとされているが、未だ有効な分子標的治療は確立されていない。肺癌に生じる KRAS 遺伝子変異の約半数は G12C 変異である。近年、KRAS G12C 変異に対する特異的阻害薬が登場したが、初期耐性を示す細胞株が存在し、そのメカニズムについては明らかではない。本薬剤の耐性機構の解明は KRAS 変異肺癌に対して有効性の高い分子標的治療の確立に寄与するものと考えられる。	
【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。)	 はじめに、KRAS G12C 変異を有する KRAS 変異肺癌細胞株 12 種類を用いて、ARS1620 の細胞増殖抑制効果を検証した。その結果、5 種類の細胞株では細胞増殖は著明に抑制されたが、7 種類の細胞株では細胞増殖効果に乏しく、同薬剤に対し初期耐性を示すことが判明した。 次に Western blot で KRAS の下流シグナル (MAPK 経路、PI3K 経路) の変化を検証したところ、ARS1620 に感受性を示す細胞株では ERK のリン酸化が低濃度から抑制され、PI3K の下流シグナルである AKT のリン酸化についても濃度依存性に抑制された。一方、初期耐性を示す細胞株では感受性株と比較して ERK のリン酸化抑制により高い薬剤濃度が必要であった。また AKT のリン酸化に関しては同薬剤を高濃度加えても抑制されなかった。しかし、KRAS-GTP 活性については感受性株、初期耐性株ともに同薬剤により抑制されたことから、MAPK、PI3K 経路の KRAS への依存性が細胞株により異なる可能性が示唆された。次に ARS1620 に感受性が強い細胞株と初期耐性を示す細胞株の細胞のフェノタイプの違いについて検討したところ、感受性株では上皮系マーカーの発現が高く、初期耐性株では反対に間葉系マーカーの発現が高いことが判明した。今後は感受性が強い細胞株と初期耐性を示す細胞株について遺伝子発現の変化をマイクロアレイにより網羅的に解析し、ARS1620 の薬剤耐性に影響する遺伝子を検討していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	未発表
	【学会発表】	未発表
	【その他特筆事項】	なし

平成 30 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・准教授・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	東京慈恵会医科大学・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、線維芽細胞で高発現する新規糖鎖分解関連因子 HYBID に着目し、<i>Hybid</i> 遺伝子欠損マウスを用いて腫瘍形成における線維芽細胞由来 HYBID の役割を明らかにするとともに、HYBID-HA 代謝を介したがん幹細胞維持への関与を検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒアルロン酸 (Hyaluronic acid=HA) は、グリコサミノグリカンからなる ECM の一種で、組織や体液中に存在し、組織形成や恒常性維持に深く関わっている。近年 ECM の分解産物が腫瘍進展などに関わる分子として注目されており、低分子 HA はその代表的分子として知られている。ハダカデバネズミにおいて高分子 HA は発がん抑制に関与する一方で、低分子化した HA は種々のシグナルカスケードを惹起して血管新生や炎症を促進することが知られており、生体内における HA 産生・分解は組織内微小環境を理解する上で非常に重要と考えられる。近年研究代表者所属の研究室では HA 分解に中心的役割を果たす新規糖鎖分解酵素として HYaluronan-Binding protein Involved in hyaluronan Depolymerization (HYBID; KIAA1199) を同定し <i>Proc Natl Acad Sci USA</i> 110:5612, 2013、研究代表者が中心となって <i>Hybid</i> 遺伝子欠損マウスの作製に成功した。<i>Hybid</i> 遺伝子欠損マウスは外見上の大きな異常は示さないものの、生後 1~4 週時に限定した長管骨の骨端板肥大軟骨層延長がみられ、X 線解析では生後 8 週時において長管骨の軽度短縮を認めた。HYBID は、<i>in situ</i> hybridization 法により軟骨肥大層-骨境界部の肥大軟骨細胞で高発現しており、肥大軟骨層に蓄積した高分子 HA を分解することにより、内軟骨性骨形成時にみられる血管新生や破骨細胞誘導を制御していると考えられた。さらに、マウスがん細胞株を野生型あるいは <i>Hybid</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。<i>Hybid</i> 遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスと比較し、移植した腫瘍の増大傾向が見られるとともに、組織学的には腫瘍細胞周囲の HA 沈着増加が認められた。また、<i>Hybid</i> 遺伝子欠損線維芽細胞の培養上清中には、野生型線維芽細胞と比べて、より高分子化した HA の貯留が見られることが明らかとなった。以上の結果から、線維芽細胞由来 HYBID は HA 分解を介して腫瘍形成に関与している可能性が示唆される。今後腫瘍間質における HA 代謝とがん幹細胞維持との関連についてさらに解析を進めていく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Shimoda M.</u> Extracellular vesicle-associated MMPs: A modulator of the tissue microenvironment. <i>Adv Clin Chem</i> 88:35-66, 2019.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

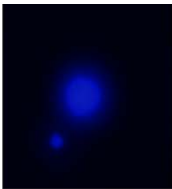
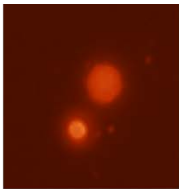
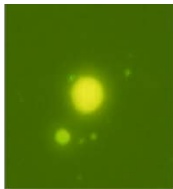
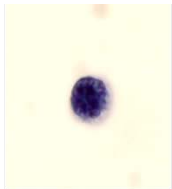
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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 研究員・中奥敬史
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 分野長・河野隆志
	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、浸潤性粘液肺腺がんの 5-15%において NRG1 融合遺伝子が認められることを見出し (Nakaoku T, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2014)、NRG1 融合遺伝子産物が HER2/HER3 受容体のリガンドとして機能し、NK- κ B 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、肺腺がんの 1~2%に認められる RET 融合遺伝子は、RET チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) への感受性が認めれるが、数ヶ月程度で薬剤耐性出現する。そうした中、報告者は 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 (Nakaoku T, et al, <i>Nat Commun.</i> 2018)。しかしながら、治療耐性例で 2 次変異を認めない症例もあり、その他の機序による耐性機構獲得の可能性も示唆される。本研究では、RET 融合遺伝子陽性肺がんの耐性に係るシグナル変化を明らかにし、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。)	RET 融合遺伝子陽性ヒト肺がん細胞株 LC-2/ad を用いて、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ケンスを行ったが、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- κ B を含む複数の転写因子の活性型認められた。これらのシグナル活性化を惹起するリガンド加えることで、親株における薬剤感受性が低下した。また、活性化の認められたタンパク質を抑制する阻害剤を RET 阻害剤と併用することで、より高い腫瘍抑制効果が認められ、がん細胞の生存に影響が認められ、RET タンパク質とのクロストークが示唆された。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おり、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, <u>Nakaoku T</u> (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. <u>Nakaoku T</u> , 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. <u>Takashi Nakaoku</u> , ..., Takashi Kohno; A Secondary RET Mutation in the Activation Loop Conferring Resistance to Vandetanib Through Allosteric Effects. Cambridge Healthtech Institute's 2018 Drug Discovery Chemistry conference, San Diego, California, USA, April 3 2018. Poster 2. <u>Takashi Nakaoku</u> , Takashi Kohno, ..., Koichi Goto, A secondary RET mutation allosterically conferring resistance to vandetanib; AACR annual meeting 2018, Chicago, Illinois, USA, April 14 2018. Poster 3. <u>Takashi Nakaoku</u> , ..., Takashi Kohno; Druggable oncogene fusions and resistance mechanisms in lung cancer. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference, Kyoto, Japan, July 11 2018, Oral 4. <u>Takashi Nakaoku</u> , Takashi Kohno; Molecular targeted therapy for lung cancer based on driver oncogenes such as RET and NRG1 fusions. 第 77 回日本癌学会学術総会 シンポジウム “Molecular target therapy under precision medicine”. 大阪、日本. 2018 年 9 月. 口頭 5. 中奥 敬史、…、河野 隆志; RET S904F 変異によるアロステリック効果を介したバンデタニブ耐性機構. 第 59 回日本肺癌学会学術集会. 2018 年 11 月. 東京、日本. 口頭	
	【その他特筆事項】 第 77 回 (2018 年) 日本癌学会学術総会 日本癌学会奨励賞	

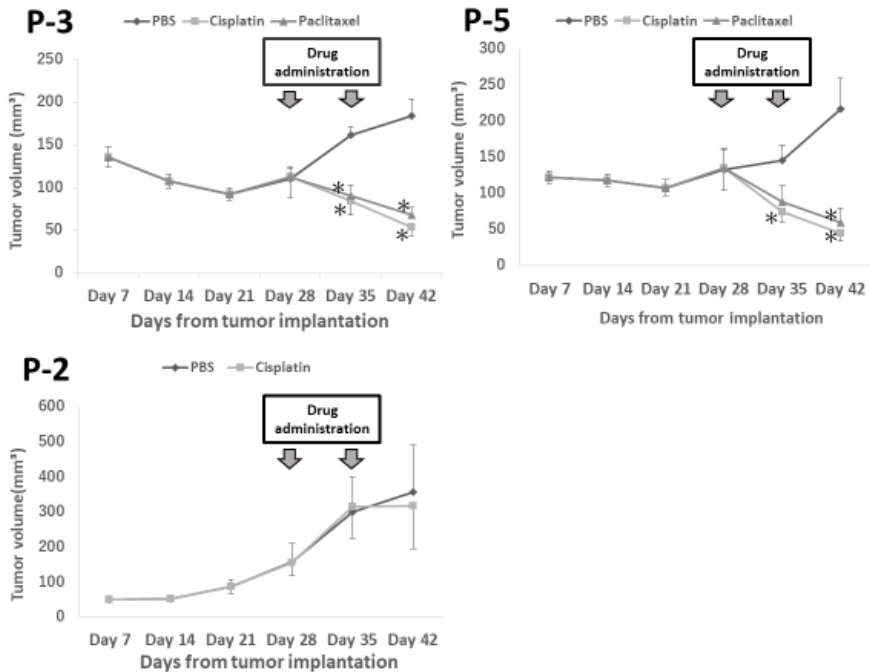
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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	
	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】	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。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、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。)	外科的切除を受けた非小細胞肺がん 30 症例から PDX 作成を試みた。30 例の内訳は、病理組織学的には腺癌 18 例、扁平上皮癌 10 例、大細胞癌 2 例であった。生着し継代できたのは腺癌 3/18 (16.7%)、扁平上皮癌 6/10 (60%)、大細胞癌 1/2、全体で 10/30 (33.3%) と、扁平上皮癌で生着率が高かった。 EGFR 変異陽性の腺がんの PDX は 2 例において樹立に成功した。これらの患者 2 例は術後再発しており、EGFR 阻害薬の治療を受け臨床的に奏効が得られていた。PDX においても、EGFR 阻害薬により著明な腫瘍縮小効果が得られ、臨床効果と一致した結果が得られた。さらに、これらのうち 1 つの PDX モデルにおいて EGFR 阻害薬を長期投与することにより獲得耐性を誘導し得た。今後は、耐性のメカニズムを解析する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Taniguchi H*, Yamada T*, Wang R, Tanimura K, Adachi Y, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, AL, Boroni M, Yoshimura A, Shiotsu S, Matsumoto I, Watanabe S, Kikuchi T, Miura S, Tanaka H, Kitazaki T, Yamaguchi H, Mukae H, Uchino J, Uehara H, Takayama K, Yano S. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. Nat Commun 2019 Jan 16;10(1):259. doi: 10.1038/s41467-018-08074-0.	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】	

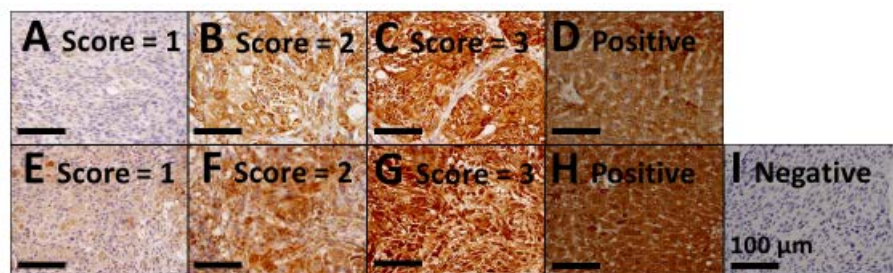
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		頭頸部癌における血中循環腫瘍細胞の検出と有用性の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・助教・上野貴雄
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・講師・近藤悟
	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	金沢大学・教授・矢野聖二
【研究目的】	本研究の最終目的は、 頭頸部癌における血中循環腫瘍細胞 (Circulating Tumor Cells:CTCs) の検出分離について最適化すること、そして、分離された CTC 細胞ごとの遺伝子発現を解析法すること である。本年度はまず、ClearCellFx にて頭頸部癌の血中循環腫瘍細胞の検出が可能であるかどうか、可能な場合、最適な検出方法について検討することが目的であった。	
【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。)	当初、ClearCellFX での CTC 検出に難渋した。ClearCellFX は、サイズソーティングにて CTC 分離する機器であり、この分離した液体にはかなりの数の白血球が混入する。このため、免疫染色にて白血球を除外し、カウントする必要がある。世界的には CD45 陰性、CK 陽性、DAPI 陽性が CTC と認められているため、まずはこの抗体にて検討した。かなり微妙な染色を判定することとなるため、免疫染色の抗体濃度や、ブロッッキング液などの違いを様々に検討した。その他、PD-1、CD44v (頭頸部癌幹細胞マーカーとされる)、VimentinCSV も検討したが、いずれも最適なマーカーとは言えず、現状では CD45 陰性、CK 陽性、DAPI 陽性が最も妥当と考えられた。       位相差 DAPI CD45 CK メイギムザ パパニコロウ これまで遠隔転移を有する頭頸部癌 5 症例の全例で上記の CTC が検出可能であった。リンパ節転移のみの 1 症例では検出されなかった。末梢血 7.5ml あたり 2-76 個 (中央値 6 個) の CTC を認めた。引き続き、CTC 数と臨床的経過、特に化学放射線の感受性と遠隔転移の出現に関する前向きな基礎データを構築する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 口腔咽頭学会 2018.9.13	
	【その他特筆事項】	

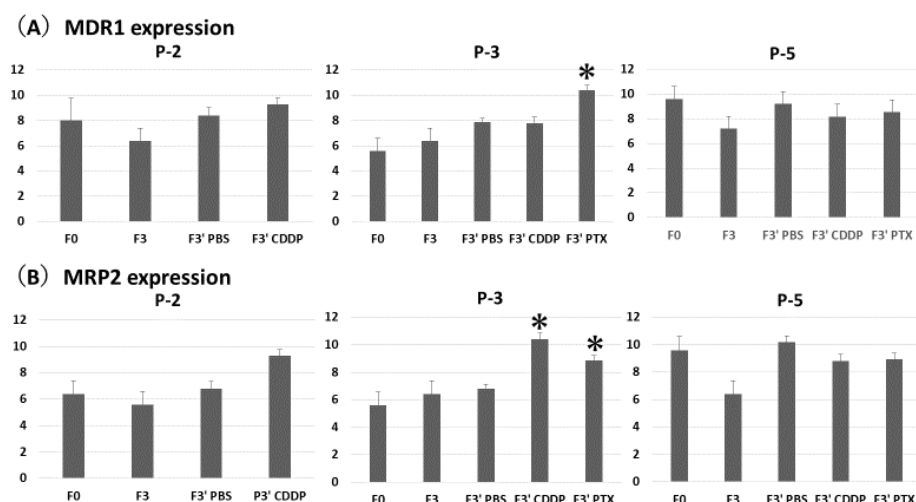
平成 30 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

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・牧田 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、5 例の頭頸部癌 PDX モデル (下咽頭癌 2 例、舌癌 1 例、喉頭癌 1 例、副鼻腔癌 1 例) を確立した。これら 5 例のうち術後シスプラチン併用放射線化学療法のうち、①6 か月以降に再発または CR 維持の症例を Cisplatin responder 群、②6 か月以内に再発した症例を Cisplatin non-responder 群にわけて、①から下咽頭癌 PDX モデル 1 例 (P-3)、副鼻腔癌 1 例 (P-5)、②から下咽頭癌 PDX モデル 1 例 (P-2) に対して薬剤感受性試験を行った。また今回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 adenosine triphosphate-binding cassette (ABC) -transporter に着目し、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した。 ②結果 1) 薬剤感受性試験の結果 in vivo  ↑ 図 1 図 1 上段 P-3 (下咽頭癌 PDX)、P-5 (副鼻腔癌 PDX) が①Cisplatin responder 群、下段 P-2 (下咽頭癌 PDX) が②Cisplatin non-responder 群である。PDX モデルは 3 代継代したものを使用した。Cisplatin responder 群では Cisplatin, Paclitaxel とともに PBS (コントロール) と比較して有意に腫瘍縮小効果を認めた一方、Cisplatin non-responder 群では Cisplatin と PBS に有意な腫瘍サイズ変化は認めなかった。	

2) ABC-transporter 発現変化について



↑ 図 2



↑ 図 3

今回は ABC-transporter のうち、Paclitaxel を基質とする MDR-1 と Cisplatin を基質とする MRP-2 に着目した。図 2 は MDR-1 と MRP-2 の免疫組織学的染色像である。図 2 に示すように MDR-1 強度スコア (A~C) とポジティブコントロール (D)、MRP-2 強度スコア (E~G) とポジティブコントロール (H)、ネガティブコントロールは (I) とし、範囲スコアを 0 (0~10%)、1 (11~25%)、2 (26~50%)、3 (51~75%)、4 (76~100%) とした。発現スコアを強度スコアと範囲スコアの積として、その平均値を図 3 に示す。F0 が患者腫瘍、F3 が 3 代継代した PDX、F3' が薬剤投与後 (PBS, Cisplatin (CDDP), Paclitaxel (PTX)) の PDX の発現スコアである。いずれの症例も患者腫瘍と比較して、継代腫瘍およびコントロールでは有意な発現スコアの変化はなかったが、P-3 でのみ患者腫瘍と比較して Paclitaxel 投与後の MDR-1 発現スコア上昇および Paclitaxel 投与後および Cisplatin 投与後の MRP-2 発現スコア上昇を認めた。

③ 考察

Izumuchenko (Annals of Oncology, 2017) らが種々の固形癌 (1 例頭頸部扁平上皮癌含む) の PDX が実際の患者の薬剤感受性によく相関することを示したが、本研究でも PDX と実際の頭頸部癌患者 3 例の Cisplatin の効果は相関していた。また ABC-transporter 発現については少なくとも患者腫瘍の性質を継代腫瘍が受け継いでいることが示唆され、ABC-transporter の研究モデルとしても有用である可能性がある。しかしながら今回の研究では薬剤耐性と ABC-transporter 発現変化との関連を見出すことはできなかったため、さらに検討する症例を増やし PDX モデルを確立していく必要がある。

④ 今後の展望

- ・頭頸部の希少癌 (唾液腺癌、上咽頭癌など) の PDX モデル確立
- ・PDX を利用した新薬開発

【成 果 等】

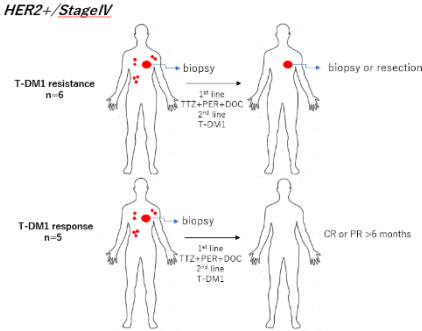
【主な論文発表】

投稿中

平成 30 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】 2018 年 5 月 日本耳鼻咽喉科学会総会・学術講演会 2019 年 2 月 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 30 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 HER2 治療抵抗性腫瘍の耐性機序と癌幹細胞特性減弱の意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院乳腺科・助教・石川聡子
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・後藤典子
【研究目的】	HER2 陽性乳癌は乳癌の約 20%を占め、Trastuzumab や Pertuzumab、T-DM1 など抗 HER2 療法による予後改善効果が期待されている。一方 HER2 発現症例の 25%が抗 HER2 療法抵抗性を示すことが報告され、これまで多くの抗 HER2 療法耐性機構が報告されている。我々は治療による幹細胞様特性が抗 HER2 治療抵抗性と関連するという予備実験結果から、抗 HER2 療法抵抗性を示した検体を集積し、抗 HER2 療法に感受性を示した腫瘍細胞との遺伝子発現を網羅的に解析し stem-cell related gene の発現を評価し、抗 HER2 療法耐性機序に対する新たな治療戦略を構築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。)	2012 年～2019 年に当院で薬物療法を施行した HER2 陽性転移・再発乳癌 19 症例 (median age 59、いずれも StageIV) の治療経過において、7 症例 (Luminal HER2 type 2 例/HER2 type 5 例) で治療開始前および抗 HER2 療法 (Trastuzumab/Pertuzumab/Docetaxel, T-DM1, Trastuzumab/Eribulin) 治療中に PD となった時点の原発巣生検組織および手術による局所切除標本が得られた。現在までに抗 HER2 療法抵抗性の検体として手術検体 5、生検組織 11 検体：計 16 検体が蓄積された。臨床経過では T-DM1 治療中に原発巣のみが増悪した検体が最も多く、16 検体中 6 検体 (37.5%) であった。  今後 T-DM1 著効例 (6 ヶ月以上奏功症例) の治療前組織検体を対照とし、T-DM1 治療抵抗性に関わる stem-cell related gene の解析を開始する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

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 palisading 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。)	膠芽腫微小環境では、腫瘍細胞は血管周囲で増殖する一方で、低酸素／低グルコース状態にある palisading necrosis 周辺では EMT を起こし遊走を開始すると考えられている (go or grow 仮説)。我々が行った膠芽腫 52 例の免疫組織学的検討では、GLUT1 が血管周囲で高発現を示し、palisading necrosis 周辺、腫瘍浸潤部の順で発現が低下していたことから、膠芽腫細胞の EMT にグルコース利用の変化が関連していることが推察された。 3 種類の膠芽腫細胞株 (T98, U87, U251) を通常の high glucose 培地と low glucose 培地でそれぞれ培養したところ、low glucose 群では GLUT1 の発現が低下し (Western blot)、細胞活性の有意な低下がみられた (図 1)。その一方で low glucose 群は細胞活性の低下を受けながらも、細胞の遊走および浸潤が亢進していた (図 2)。GLUT1 の特異的阻害薬である WZB-117 の投与実験でも同様の結果が得られた。 Palisading necrosis は膠芽腫の病理組織学的特徴のひとつであり、膠芽腫細胞が産生する血液凝固因子によって血管が閉塞することによって惹起される。今回の in vitro/in vivo 両面からの解析により、腫瘍細胞自身が作り出す低グルコース状態が EMT を誘導し、細胞増殖から浸潤へと表現型を変化させていることが示唆された。 今後は関連する分子経路について解析するとともに、研究者グループが独自に樹立した膠芽腫幹細胞株およびそれを脳内に移植した動物モデルを用いて詳細に検討する予定である。	
	図 1. 低グルコース下における膠芽腫細胞の増殖低下 (WST-1 assay)	図 2. 低グルコースは細胞の浸潤を亢進させる (Matrigel invasion assay)
【成果等】	【主な論文発表】 Komaki S, Sugita Y, <u>Furuta T</u>, et al. Expression of GLUT1 in pseudopalisade and perivascular tumor cells is an independent prognostic factor for patients with glioblastoma. <i>J Neuropathol Exp Neurol</i> 2019, in press.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	