金沢大学
KANAZAWA UNIVERSITY

金沢大学がん進展制御研究所　年報　2018年

金沢大学
がん進展制御研究所

年報

2018年

Annual Report
Cancer Research Institute
Kanazawa University

金沢大学がん進展制御研究所年報2018年

［発行］金沢大学がん進展制御研究所
〒920-1192 石川県金沢市角間町　TEL：076-264-6700㈹　FAX：076-234-4527

URL　http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/

巻頭言

本研究所では，創立以来一貫して「がんに関する学理及びその応用研究」を進めています。2018 年も，全国の附置研の中で唯一，がんの研究に特化した本研究所の特色を生かして，優れた基礎研究とそのシーズを活用した革新的な診断・治療法の開発，また，将来のがん研究や医療を担う人材の育成を目指して活動して参りました。

まず，共同利用・共同研究拠点活動として，本年度は，61 件の課題を採択し，共同研究を進めました。また，特色あるがん研究拠点となるよう，国際共同研究に加え，新たに異分野融合共同研究枠を設け，数件が現在も進行中です。拠点活動の活性化のため，患者由来オルガノイドをはじめとした研究資源の充実（組織・細胞バンク，共通機器整備）や成果報告会の開催による情報交換などを実施しました。本研究所の拠点活動は，本年，文部科学省において行われた中間評価においては A 評価を得るなど，高く評価されています。

国際的ネットワーク形成も活動の大きな柱です。本年は，5 月にソウル大学がん微小環境研究センター（SNU-GCRC）の研究者を本学に招きシンポジウムを開催するとともに、研究室訪問による研究交流を進めました。また 9 月には，所長以下 5 名のメンバーが復旦大学上海がんセンターを訪問し，合同シンポジウムを開催しました。11 月には，本研究所のメンバーが，ナノ生命科学研究所国際シンポジウム（ロンドン）に参加し，インペリアル・カレッジ・ロンドンやオックスフォード大学など，欧州の研究者との情報交換を行いました。さらに，恒例の金沢国際がん生物シンポジウム（11 月）では，代謝・細胞老化・幹細胞をメイントピックスとして，日本，米国，ドイツから第一線の研究者を招聘し，最先端のがん研究に関する情報収集と意見交換を行いました。その他，北海道大学遺伝子病制御研究所との国際シンポジウムの共同開催，シンガポール国立大学への若手教員の短期間派遣，ロシア 3 大学（サンクトペテルブルグ医科大学，クラスノヤルツク医科大学，カザン大学）大学院生の短期研修受け入れなど，将来の国際的機関連携の強化・拡大に向けた取り組みも進めています。これらの国際的活動を基に，本年度，文部科学省より募集のあった国際共同利用・共同研究拠点の申請に挑戦いたしました。残念ながら採択に至りませんでしたが，評価コメントには「海外の研究機関との交流を進めており，共同利用・共同研究に多数の関連研究者が参加することが見込まれ，若手研究者の育成に積極的に取り組んでいると評価できる」と記載されるなど，一定の評価を受けており，今後益々この方向を発展させることで，将来の国際的研究拠点への道筋が見えてくると確信いたしました。

ここに，2018 年の各研究分野の活動状況を報告いたします。本研究所の取り組みについてご理解いただく機会となれば幸いです。

金沢大学がん進展制御研究所長　平尾敦

金沢大学がん進展制御研究所年報２０１８年

目　次

巻頭言

研究概要と研究業績

先進がんモデル共同研究センター

腫瘍遺伝学研究分野 ･････････････････････････････････････ 2

分子病態研究分野 ･････････････････････････････････････ 8

上皮幹細胞研究分野 ･････････････････････････････････････14

がん幹細胞研究プログラム

遺伝子・染色体構築研究分野 ･････････････････････････････20

腫瘍分子生物学研究分野 ･････････････････････････････････25

分子生体応答研究分野 ･････････････････････････････････････31

がん微小環境研究プログラム

免疫炎症制御研究分野 ･････････････････････････････････････38

腫瘍動態制御研究分野 ･････････････････････････････････････42

腫瘍細胞生物学御研究分野 ･････････････････････････････････46

がん分子標的探索プログラム

シグナル伝達研究分野 ･････････････････････････････････････50

腫瘍制御研究分野 ･･･53

機能ゲノミクス研究分野 ･････････････････････････････････60

がん分子標的医療開発プログラム

腫瘍内科研究分野 ･･･66

中央実験施設 ･･･78

新学術創成研究機構若手PI/卓越研究員

上皮可塑性・炎症ユニット ･････････････････････････････････82

ミトコンドリア動態ユニット ･････････････････････････････84

がん-免疫系相互作用ユニット ･････････････････････････････86

がん治療標的探索ユニット ･････････････････････････････････88

基礎統計・教育活動 ･･････････････････････････････････････90

各種シンポジウム開催状況 ･･････････････････････････････92

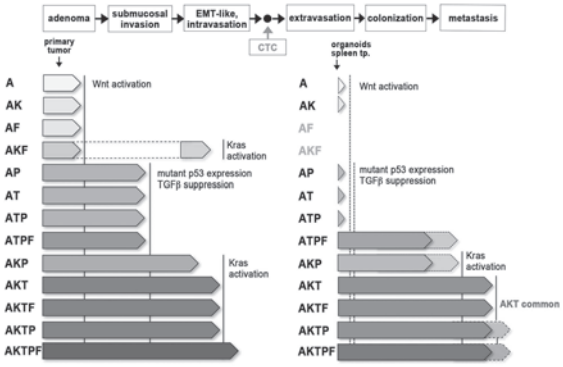
先進がんモデル共同研究センター

Division of Genetics
腫瘍遺伝学研究分野

Professor	Masanobu Oshima 大島 正伸
Associate Professor	Hiroko Oshima 大島　浩子
Assistant Professor	Mizuho Nakayama　中山　瑞穂, Dong Wang（2018.12～）
Postdoctoral Researcher	Kanae Echizen 越前 佳奈恵, Jun-Won Park
Graduate Students	Sau Yee Kok（D3）, Daisuke Yamamoto 山本 大輔, Toshikatu Tsuji 辻 敏克（D3）, Zachary Wei Ern Young（D2）
Technical Assistant	Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子

【 Abstract 】

Accumulation of genetic alterations causes development and malignant progression of colorectal cancer (CRC). Recent genome research has identified major driver genes for CRC including *APC* (A), *KRAS* (K), *TGFBR2* (T), *TP53* (P) and *FBXW7* (F). To examine the biological mechanism for each step toward malignant progression, we generated multiple mutant mouse models with possible combination of driver mutations. We also established CRC liver metastasis model by generation of tumor organoids and transplantation to the spleen. Using these models, we found that combination of AKT triple mutations is responsible for acquisition of efficient metastatic ability. Based on the comprehensive phenotype analysis of all genotype mice, we constructed detail multistep tumorigenesis model (Figure). We further identified deferentially expressed genes (DEG) in AKT mutant tumor organoids, which will be candidate targets for therapeutic strategy against CRC (Sakai et al, **Cancer Res**, 2018).



On the other hand, inflammatory microenvironment plays an important role in CRC development. It has been suggested that Stat3 is one of the candidate molecules that link inflammation and cancer. To examine the role of Stat3 in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis, we generated *villin-CreER Stat3*$^{flox/flox}$ mice and crossed with *Apc*$^{\Delta 716}$ mice. Notably, Stat3 is indispensable for regeneration of damaged intestinal mucosa. However, Stat3 is not required for tumorigenesis if Wnt signaling is activated. Mechanistically, we found that Stat3 induces Itga5/6 expression, which is required for survival of normal stem cells through FAK activation (Oshima et al, **FASEB J**, 2018)

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

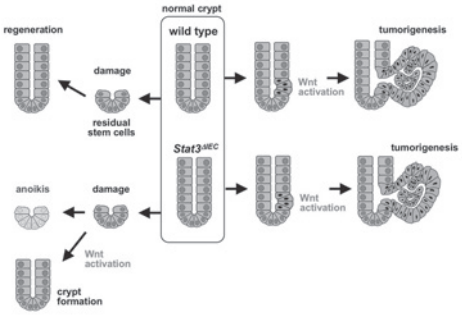
１．大腸がん悪性化機構モデル開発と多様性の研究

複数の大腸がんドライバー遺伝子に多様な組み合わせで変異を導入したマウスモデルを作製して解析した結果，*Apc*, *Kras*, *Tgfbr2* 変異の組み合わせが肝転移を誘導することを明らかにした（Sakai et al, **Cancer Res**, 2018）。これらの遺伝子変異により発現誘導される遺伝子群から，大腸がん悪性化に関与する因子の探索を目的として，in vivo の表現型を指標としたスクリーニングを開始した。

また，遺伝子型の違いに依存して悪性度の異なるオルガノイドを用いて，がん組織の多様性を再現したイメージングを取り入れた実験系を開発した。この観察システムにより，多様性に依存した大腸がん悪性化機構の研究を推進する。

２．腸管上皮恒常性および腫瘍化における Stat3 の役割

IL-6 や IL-11 により腫瘍細胞で活性化する Stat3 は，炎症依存的な発がん促進で重要な役割を果たしていると考えられる。Stat3 を欠損した腸管上皮細胞は，上皮細胞の生存能力が顕著に低下し，粘膜傷害からの再生が抑制され，オルガノイド形成も抑制される（右図下段）。一方で，*APC* 変異やリガンド刺激により Wnt シグナル亢進させると，上皮細胞の生存能力が亢進し，Stat3 が欠損してもオルガノイドは形成され，腸管腫瘍も発生することを明らかにした（Oshima et al, **FASEB J**, 2018）。今後，間質側における Stat3 の発がんへの影響について，遺伝学的な解析を進める。



３．p53 遺伝子型に依存した大腸がん悪性化機構

p53 は大腸がんの約半数で変異が認められる重要ながん抑制遺伝子である。我々はアミノ酸置換によるミスセンス（gain-of-function, GOF）型の変異 p53 が，新規に獲得した機能により腸管腫瘍の粘膜下浸潤を誘導することを明らかにした（Nakayama et al, **Oncogene**, 2017）。GOF 変異を持つヒト大腸がんのほとんどは LOH により野生型 p53 遺伝子を欠損している。オルガノイドを用いた解析により，野生型 p53 は，変異型 p53 の細胞内局在を制御することを明らかにした。今後，LOH による悪性化形質の獲得機構について，オルガノイドを用いた解析を推進する。

４．炎症反応による胃がん発生機構の研究

ヒト胃がん組織では，ピロリ菌感染による炎症反応が発がんを促進する。炎症依存的は胃がんモデル（Gan マウス）を用いた解析により，炎症で誘導される IL-1 が，胃粘膜上皮の miR-135b 発現を誘導し，FOXN3 などの標的分子の発現を抑制することで胃粘膜上皮の増殖を亢進することを明らかにした（Han et al, **Gastroenterology**, 2018）。また，炎症反応で活性化した NF-κB が Noxo1 発現を誘導して NOX1 複合体を活性化し，それに依存して産生される活性酸素（ROS）が，未分化上皮細胞の増殖を亢進して，胃がん発生に関与する可能性を示した（Echizen et al, **Oncogene**, 2019）。今後，転移再発における炎症反応の役割について解析を推進する。

【研究業績】

＜発表論文＞

原著論文

（研究室主体）

1. Sakai E, Nakayama M, Oshima H, Kouyama Y, Niida A, Fujii S, Ochiai A, Nakayama KI, Mimori K, Suzuki Y, Hong CP, Ock CY, Kim SJ, and Oshima M. Combined mutation of Apc, Kras and Tgfbr2 effectively drives metastasis of intestinal cancer. **Cancer Res**, 78: 1334-1346, 2018.
2. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, and Oshima M. Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. **FASEB J**, 2018 Aug 29 [Epub ahead of print]
3. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong WE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, and Oshima M. Interleukin 1 upregulates microRNA-135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice. **Gastroenterology**, 2018 Nov 30 [Epub ahead of print]
4. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, and Oshima M. NF-κB activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. **Oncogene**, 2019 Jan 5 [Epub ahead of print]

（共同研究）

1. Deswaerte V, Nguyen PM, West A, Browning AF, Yu L, Ruwanpura S, Balic J, Livis T, Girard C, Preaudet A, Oshima H, FunCag KY, Tye H, Najdovska M, Ernst M, Oshima M, Gabay C, Putoczki TL, and Jenkins BJ. Inflammasome adaptor ASC suppresses apoptosis of gastric cancer cells by an IL-18 mediated inflammation-independent mechanism. **Cancer Res**, 78: 1293-1307, 2018.
2. Yu L, Wu D, Gao H, Balic J, Tsykin A, Han TS, Liu YD, Kennedy C, Li JK, Mao JQ, Tan P, Oshima M, Goodall G, and Jenkins B. Clinical utility of a STAT3-regulated microRNA-200 family signature with prognostic potential in early gastric cancer. **Clin Cancer Res**, 24: 1459-1472, 2018.
3. Kang MH, Choi H, Oshima M, Cheong JH, Kim S, Lee JH, Park YS, Choi HS, Kweon MN, Pack CG, Lee JS, Mills GB, Myung SJ, and Park YY. Estrogen-related receptor γ functions as a tumor suppressor in gastric cancer. **Nat Commun**, 9: 1920, 2018.
4. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A. Spred1 safeguards hematopoietic homeostasis against diet-induced systemic stress. **Cell Stem Cell**, 22: 713-725, 2018.
5. Hill DG, Yu L, Gao H, Balic JJ, West A, Oshima H, McLeod L, Oshima M, Gallimore A, D'Costa K, Bhathal PS, Sievert W, Ferrero RL, Jenkins BJ, and Jones GW. Hyperactive

gp130/STAT3-driven gastric tumorigenesis promotes submucosal tertiary lymphoid structure development. **Int J Cancer**,143: 167-17, 2018.

6. Enjoji S, Yabe R, Tsuji S, Yoshimura K,Kawasaki H, Sakurai M, Sakai Y, Takenouchi H, Yoshino S, Hazama S, Nagano H, Oshima H, Oshima M, Vitek M, Matsuura T, Hippo Y, Usui T, Ohama T, and Sato K. SET/PP2A/E2F1 Axis Enhances Gastric Cancer Cell Stemness. **Mol Cancer Res**, 16: 554-563, 2018.
7. Ohtsuka J, Oshima H, Ezawa I, Abe R, Oshima M, and Ohki R. Functional loss of p53 cooperates with the in vivo microenvironment to promote malignant progression of gastric cancers. **Sci Rep**, 8: 2291, 2018.
8. Cao D, Wu Y, Jia Z, Zhao D, Zhang Y, Zhou T, Wu M, Zhang H, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, and Cao X. 18β-glycyrrhetinic acid inhibited mitochondrial energy metabolism and gastric carcinogenesis through methylation regulated TLR2 signaling pathway. **Carcinogenesis**, 2018 Oct 26 [Epub ahead of print]
9. Buzzelli JN, O'Connor LO, Scurr M, Catubig A, Ng G, Oshima M, Oshima H, Giraud AS, Sutton P, Judd LJ, and Menheniott TR. Overexpression of IL-11 promotes premalignant gastric epithelial hyperplasia independently of Helicobacter pylori infection or JAK-STAT driver mutations. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2018 Dec 6 [Epub ahead of print]

著書・総説

1. Nakayama M, and Oshima M. p53 mutation in colon cancer. **J Mol Cell Biol**, Eds by Verma C & Lane D. 2018 Nov 29 [Epub ahead of print]（総説）
2. Echizen K, Oshima H, Nakayama M, and Oshima M. The inflammatory microenvironment that promotes gastrointestinal cancer development and invasion. **Adv Biol Regul**, 68: 39-45, 2018. （総説）
3. Han TS, and Oshima M. Laser micro dissection of cellular compartments for expression analyses in cancer models. **Methods Mol Biol**, 1725: 143-153, 2018.（著書）

（日本語総説）

1. 大島正伸．臨床応用を目的としたヒトがんを再現するマウスモデル．実験医学（羊土社）vol. 36, 224-228, 2018
2. 越前佳奈恵，坂井絵梨，中山瑞穂，大島浩子，大島正伸．がん微小環境による発がん促進機構．細胞（ニューサイエンス社）vol. 50, 234-237, 2018.
3. 大島正伸．がん転移の動物モデル．日本臨床「がん転移学」（日本臨床社）vol. 75, 345-349, 2018.
4. 大島浩子，越前佳奈恵，中山瑞穂，大島正伸．自然免疫・慢性炎症と胃癌．日本臨床（日本臨床社）vol. 76, 520-525, 2018.

＜学会発表＞

（国際学会）

1. Oshima M. Comprehensive phenotype characterization of intestinal tumors with various driver mutations. *Annual Meeting of International Society of Precision Cancer Medicine* (ISPCM), Busan（韓国），2018 年 3 月 17 日
2. Oshima M. Comprehensive phenotype characterization of colon cancer with various combination of driver mutations. 9th General Assembly and International Conference of Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP), Jeju（韓国），2018 年 4 月 20 日
3. Oshima H. Stat3 activation is indispensable for mucosal regeneration but not for Wnt-driven tumorigenesis. 9th General Assembly and International Conference of Asian Pacific Organization for Cancer Prevention (APOCP), Jeju（韓国），2018 年 4 月 20 日
4. Oshima M. Combined driver mutations for malignant progression of intestinal tumorigenesis. *37th Sapporo International Cancer Symposium*, 札幌，2018 年 7 月 18 日
5. Oshima M. Comprehensive analysis of genotype-phenotype relations in colon cancer progression. 2nd Inter-Academy Cancer Symposium (KEIO-NCC GCSP), 東京, 2018 年 12 月 22 日

（国内学会）

1. 大島正伸．がんの発生，進展における慢性炎症の役割．CREST 公開シンポジウム「サイレントキラー・慢性炎症はどこまでわかったか」，東京，2018 年 2 月 27 日
2. 大島正伸．ドライバー変異の組み合わせが促進するがん悪性化機構．北海道大学遺伝子病制御研究所「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム，札幌，2018 年 3 月 26 日
3. 大島正伸．遺伝子変異と微小環境による消化器発がん機構．未来がん医療プロフェッショナル養成プラン FD ワークショップ，秋田，2018 年 5 月 12 日
4. 大島正伸．多重ドライバー変異による大腸がん悪性化モデル研究．第 65 回日本実験動物学会総会（実験動物学会と金沢大学がん進展制御研究所のジョイントシンポジウム），富山，2018 年 5 月 18 日
5. Oshima M, Nakayama M, Oshima H. Inflammatory microenvironment for malignant progression of colon cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会，大阪，2018 年 9 月 29 日
6. Nakayama M, Sakai E, Suzuki Y, Oshima H, Oshima M. Combination of gain-of-function mutation and lost of wild-type allele in p53 promotes colon cancer tumorigenicity. 第 77 回日本癌学会学術総会，大阪，2018 年 9 月 28 日
7. Terakado Y, Murakami K, Oshima M, Oshima H, Barker N. Analysis of gastric cancer stem cells and regulatory mechanims. 第 77 回日本癌学会学術総会，大阪，2018 年 9 月 29 日

＜外部資金＞

1. 革新的がん医療実用化研究事業（AMED）［研究代表者：大島 正伸］
「大腸がん細胞の多段階悪性化が制御する微小環境形成ネットワーク機構の解明と新規予防治療戦略の確立」　17,830 千円
2. 基盤研究（A）［研究代表者：大島 正伸］
「大腸がん自然転移・再発モデルの開発による悪性化進展機構の研究」9,500 千円
3. 新学術領域研究（公募）［研究代表者：大島 正伸］
「大腸がんの多段階発がんプロセスにおける細胞競合システムの制御機構」4,500 千円
4. 基盤研究（C）［研究代表者　大島 浩子］
「新規胃がんモデルの開発による悪性化進展機構の研究」1,200 千円
5. 基盤研究（C）［研究代表者　中山 瑞穂］
「大腸がん転移・再発における p53 遺伝子 LOH と不均一性獲得に関する個体モデル解析」1,100 千円
6. 若手研究（B）「研究代表者　越前佳奈恵」
「胃炎組織におけるクローン拡大と発がんメカニズムの解明」1,300 千円
7. 特別研究員奨励費［研究代表者　大島正伸］
「新規モデル開発による胃がん微小環境と悪性化機構の研究」1,200 千円

＜その他＞

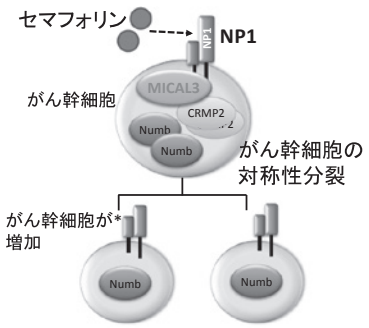
文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会開催（実行委員長：大島正伸）：平成 30 年 9 月 6〜8 日，長野県蓼科（全国から大学院生・若手研究者約 90 名参加）

Division of Cancer Cell Biology
分子病態研究分野

Professor	Noriko Gotoh　後藤　典子
Postdoctoral Researcher	Tatsunori Nishimura　西村　建徳
Research Associate	Kana Tominaga　富永　香菜
Graduate Student	Reheman Yiming (D2), Xiaoxi Chen (D2),
	Li Mengjiao (D1),
	Rojas Nichole (M1),
Research Student	Lee Jin
Assistant Staff	Kiyoko Take 武　紀代子,
	Kurumi Nishi 西　くるみ

【 Abstract 】

Cancer stem-like cells (CSCs) are expanded in the CSC niche by increased frequency of symmetric cell divisions at the expense of asymmetric cell divisions. The symmetric division of CSCs is important for the malignant properties of cancer; however, underlying molecular mechanisms remain largely elusive. Here, we show a cytokine, semaphorin 3 (Sema3), produced from the CSC niche induces symmetric divisions of CSCs to expand the CSC population. Our findings indicate that stimulation with Sema3 induced sphere formation in breast cancer cells through Neuropilin (NP)-1 receptor that was specifically expressed in breast CSCs (BCSCs). Knockdown of *MICAL3*, a cytoplasmic Sema3 signal transducer, greatly decreased tumor sphere formation and tumor-initiating activity. Mechanistically, Sema3 induced interaction among MICAL3, collapsin response mediator protein 2 (CRMP2), and Numb. It appears that activity of MICAL3 monooxygenase (MO) stimulated by Sema3 is required for tumor sphere formation, interaction between CRMP2 and Numb, and accumulation of Numb protein. We found that knockdown of *CRMP2* or *Numb* significantly decreased tumor sphere formation. Moreover, *MICAL3* knockdown significantly decreased Sema3-induced symmetric divisions in NP1/Numb-positive BCSCs and increased asymmetric division that produces NP1/Numb negative cells without stem-like properties. In addition, breast cancer patients with NP1-positive cancer tissues show poor prognosis. Therefore, the niche factor Sema3-stimulated NP1/MICAL3/CRMP2/Numb axis appears to expand CSCs at least partly through increased frequency of MICAL3-mediated symmetric division of CSCs.



乳がん幹細胞が MICAL3 を介して自己複製する仕組み
腫瘍微小環境にある通常のがん細胞が細胞外因子セマフォリンを産生する。セマフォリンが，がん幹細胞にのみ発現するその受容体ニューロピリン 1（NP1）に結合すると，細胞内に存在する分子 MICAL3 の持つモノオキシゲナーゼが活性化する。それを受けて，CRMP2 が二量体化し，Numb たんぱく質が細胞内にたまってくる。これが引き金となり，分裂した際に二つの娘細胞とも，がん幹細胞になる（対称性分裂）。

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

がんとがん幹細胞に注目し，基礎研究から臨床へと連続する研究の展開を目指し，新しい抗がん剤開発のための新たな分子標的の発見や診断マーカーの開発を試み，トランスレーショナルリサーチへの展開を目指している。乳がんに注目して新たなマウスがんモデルの作出と，患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC)のスフェロイド培養技術を工夫し，Patient-derived xenograft (PDX)モデルの構築とそのカタログ化を行っている。今後乳がん PDC と PDX モデルを拡充し，世界的なコンソーシアムの形成に貢献することを目指している。

1) 乳がん発症には，乳腺ルミナル前駆細胞が構築するサイトカイン豊富な微小環境が必須である。

乳がんなどがんの発症に，炎症が関わることが知られており，アスピリンなどの抗炎症剤ががん予防に効果があるとされる報告もあるが，その分子機構はほとんど不明である。今回，ERK の活性化を抑制する FRS2beta アダプタータンパク質が乳腺組織のルミナル前駆細胞に特異的に発現し，乳腺微小環境をがん細胞が増殖しやすい環境に変貌させることを見出した。

乳がんマウスモデル MMTV-ErbB2 mice と FRS2beta ノックアウトマウスを交配させ，乳腺腫瘍の形成を調べたところ，FRS2beta をノックアウトしたマウスの乳腺腫瘍の増殖は野生型マウスに比較し著しく遅かった。FRS2beta は乳腺組織のルミナル前駆細胞の一部に発現していた。乳腺細胞をスフェロイド培養し RNA を抽出，DNA マイクロアレイを用いて発現している転写産物を網羅的に調べた。Gene Set Enrichment analysis (GSEA)の結果，野生型の乳腺細胞では炎症シグナルや未分化シグナル関連遺伝子が濃縮していた。炎症シグナルからは CXCL12，未分化シグナルからは IGF1 が見出された。In vitro 及び in vitro の実験により，前者はがん間質細胞の移動，後者はがん幹細胞の維持増殖に重要な役割を果たすことが示された。以上より，乳腺ルミナル前駆細胞内で ERK が過剰に活性化しないよう制御する FRS2beta は，前癌ルミナル前駆細胞内ではサイトカインの産生を高めて，腫瘍が増殖しやすい微小環境を構築することがわかった。FRS2beta は，前がん微小環境の新規分子標的と考えられる。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. Tominaga K, Minato H, Murayama T, Sasahara A, Nishimura T, Kiyokawa E, Kanauchi H, Shimizu S, Sato A, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Ogawa T, Ishii H, Mori M, Akashi K, Okamoto K, Tanabe M, Tada K, Tojo A, Gotoh N.: Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. ***Proc Natl Acad Sci, USA*****,** on line publication 24 December, 2018; 116, 625-630, 2019.
2. Nishimura T, Nakata A, Chen X, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S-I, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, Gotoh N.: Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. ***Oncogene***, on line publication 7 December, 2018.

（共同研究）

1. Satoh T, Doki Y, Konno M, Mori M, Nishimura T, Koseki J, Gotoh N, Asai A, Ihii H.: Drug discovery of anticancer drugs targeting Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2. ***Heliyon***, 4, e01021, 2018.
2. Tamari K, Konno M, Asai A, Koseki J, Hayashi K, Kawamoto K, Murai N, Matsufuji S, Isohashi F, Satoh T, Goto N, Tanaka S, Doki Y, Mori M, Ogawa K, Ishii H.: Polyamine flux suppresses histone lysine demethylases and enhances ID1 gene expression in cancer stem cells. ***Cell Death Diifer***, 4, 1-9, 2018

総説

1. Gotoh N.: The path to ending relapse. A new approach to breast cancer treatment. ***Impact***, vol. 2019, No. 3, p30-32.
2. 西村建徳，Chen Xiaoxi，後藤典子. 「乳腺オルガノイド」実験医学増刊 （羊土社）, p281-289, 2018.
3. 村山貴彦，後藤典子. 「がん幹細胞を維持する細胞内シグナル伝達系」
病理と臨床：がんの幹細胞性の病理 (文光堂) vol. 36(12), p1169-1173, 2018.

＜学会発表＞

＜国際学会＞

1. Noriko Gotoh: “Analysis of regulatory mechanisms in breast cancer-stem like cells by using spheroid cultures of patient-derived cancer cells and patient-derived xenograft (PDX) models” International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa　2018 年 11 月　金沢

2. Noriko Gotoh: “Maintenance of stemness and niche environment of breast cancer cells by FRS2 β, a feedback inhibitor for HER2-ERK pathway, during mammary tumorigenesis ” 金沢大学がん進展制御研究所・復旦大学上海がんセンターとの第 8 回ジョイントシンポジウム　2018 年 9 月，上海　中国（招待講演）

3. Noriko Gotoh: “ Cancer stem-like properties and drug resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2” 2018 AACR Annual Meeting, Symposium　2018 年 4 月，シカゴ　米国

＜全国学会＞

1. 後藤典子：“Growth factor and cytokine signaling regulates breast cancer stem-like cells and their niche”第 7 回 Cancer Stem Cell Symposium　2018 年 12 月，　福岡（招待講演）
2. 後藤典子：“乳がんの三次元培養と PDX を用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ” 第 41 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「新たな技術がもたらすがん治療難治性の克服にむけた新しいアプローチ」2018 年 11 月，　東京（招待講演）
3. 後藤典子：” がん幹細胞とそのニッチの制御機構” 千里ライフサイエンス新適塾ー「難病への挑戦」第 36 回会合 2018 年 10 月，　大阪（招待講演）
4. 後藤典子 :“乳癌のアカデミア創薬” 第 77 回日本癌学会学術総会 モーニングレクチャー　2018 年 9 月，　大阪（招待講演）
5. 後藤典子：“Maintenance of stemness and niche environment of breast cancer cells by FRS2β, a feedback inhibitor for HER2-ERK pathway, during mammary tumorigenesis” The 8th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology　2018 年 9 月，中国，上海（招待講演）
6. 後藤典子：“乳がんの三次元培養と PDX を用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ” 細胞凝集研究会 2018　2018 年 7 月，　山形（招待講演）

7. 後藤典子：“乳がんの三次元培養と PDX を用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ” 講演会：新しい治療法の開発を目指す患者由来がんモデル 2018 年 6 月，東京（招待講演）
8. 後藤典子：” 乳がん幹細胞の制御機構と Patient-derived xenograft (PDX)モデル” 第 65 回日本実験動物学会総会　シンポジウム 2018 月 5 月，富山（招待講演）
9. 後藤典子：” Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division of breast cancer stem-like cells” The 1st Meeting of International Society of Precision Cancer Medicine (ISPCM) 2018 年 3 月，韓国　釜山（招待講演）
10. 後藤典子：”乳がん幹細胞の基礎と治療への応用” 第 24 回日本産婦人科乳腺医学会 2018 年 3 月，福岡（招待講演）
11. 西村建徳：“葉酸代謝経路酵素，MTHFD2 ノックダウンによる幹細胞様形質の減弱” 第 2 回がん三次元培養研究会　2018 年 11 月，東京
12. 西村建徳:“ミトコンドリア葉酸代謝酵素のがん幹細胞様形質と薬剤耐性への寄与” 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月，（口頭発表）
13. 西村建徳：“Cancer Stem-like Properties And Drug Resistance Are Dependent On The Purine Synthetic Metabolism Mediated By The Mitochondrial Enzyme” The 6th JCA-AACR Special Joint Conference　2018 年 7 月，京都（ポスター発表）
14. Reheman Yiming：“Stem-like traits sre up-regulated in beta-catenin signal-actvated and gefitinbib-resistant lung cancer cells.”第 41 回日本分子生物学会年会　2018 年 11 月，横浜（ポスター発表）
15. Chen Xiaoxi：“A mitochondorial enzyme MTHFD1L confers grpwth and cancer stem-like poperties in brest cancer cells” 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月，大阪（ポスター発表）

＜研究会開催＞

後藤典子：第 2 回がん三次元培養研究会　2018 年 11 月　東京

＜外部資金＞

1. 後藤典子，基盤研究 B（一般），2018.4.1-2019.3.31，代表，13,500 千円
2. 後藤典子, AMED 革新的がん医療実用化研究事業, 2018.4.1-2019.3.31, 代表, 33,230 千円
3. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2018.11.1-2019.3.31, 代表, 15,000 千円
4. 後藤典子，挑戦的萌芽研究，2018.4.1-2019.3.31，代表，2,954,706 円
5. 後藤典子, 高松宮妃癌研究助成金, 2018.4.1-2019.3.31, 代表, 2,000 千円

6. 後藤典子, 受託研究 エーザイ, 2018.4.1-2018.9.30, 代表, 1,295,061 円
7. 西村建徳，若手研究 B（一般），2018.4.1-2019.3.31，代表，2,318,463 円

Division of Epithelial Stem Cell Biology
上皮幹細胞研究分野

Research Professor　Nicholas Barker（シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員）
Assistant Professor　Kazuhiro Murakami　村上 和弘
Assistant　Kenji Kita 北 賢二（共同研究拠点）
Postdoctoral Researcher Yumi Terakado 寺門 侑美
Assistant Staff　Yoshie Jomen 定免 良枝，Kikue Saitou 齋藤 喜久江

【 Abstract 】

Gastric cancer is a complex disease that often arises in a setting of chronic inflammation. For gastric tumorigenesis, *Helicobacter pylori* infection is an important risk factor, and COX-2/PGE2 pathway is induced in the infection-associated chronic gastritis tissues. Despite recent extensive efforts to molecularly classify gastric cancers to try and stratify treatment regimens according to underlying mutational spectra, gastric cancer remains a relatively poorly understood disease with a poor prognosis for most patients.

Cancer stem cells are defined as the unique subpopulation in the tumors that possess the ability to initiate tumor growth and sustain self-renewal as well as metastatic potential. Those tumor-resident cells with stem cell characteristics are thought to be resistant to conventional anti-cancer therapies, allowing them to survive and drive tumor recurrence in many patients.

Recently, we have identified *Lgr5*+ chief cells in the corpus stomach, which serve as reserve stem cells to effect epithelial renewal following oxyntic atrophy. These reserve stem cells drive spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia in the stomach following conditional KRasG12D driver mutation, highlighting their likely contribution to gastric cancer initiation *in vivo* (Leushacke, M. *et al*., ***Nature Cell Biology***, 2017).

But still it is not clear whether the *Lgr5*+ chief cell serves as an origin of gastric cancer cell under the chronic inflammation and how cancer stem cell is induced from *Lgr5*+ reserve stem cells. To study the effects of chronic inflammation on stem cell-driven cancer formation and progression in the corpus stomach, we are focusing on evaluating a potential cancer stem cell function of *Lgr5*+ cells present within Wnt-driven inflammation-dependent gastric tumors. We would like to leverage on the extensive knowledge and mouse models available through my collaborator, Professor Masanobu Oshima to study the effects of chronic inflammation on stem cell driven cancer formation and progression in the corpus stomach. This is physiologically relevant because the majority of human gastric cancer is considered to arise in a setting of chronic inflammation caused by infection with *Helicobacter Pylori*.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

1．新規胃がんマウスモデルの解析

Lgr5 陽性組織幹細胞を可視化でき、薬剤の投与により選択的に除去できるマウスと、がん進展制御研究所で開発された炎症を伴い胃がんを発症する Gan マウスを交配し、胃がんにおける Lgr5 陽性幹細胞の可視化に成功した。また、これらの胃がん組織よりオルガノイドを樹立した(図 1)。生体内外の解析結果より、Lgr5 陽性細胞は Gan マウスの胃がん組織に高頻度に存在することが明らかとなった。さらに、Gan マウスに生じた胃がんで Lgr5 陽性細胞を選択的に除去することにより、胃がんが縮小することも明らかになった。このことは、Lgr5 陽性細胞が、胃がんにおけるがん幹細胞である可能性を示唆するものである。この結果は、第 77 回日本癌学会総会において発表された。

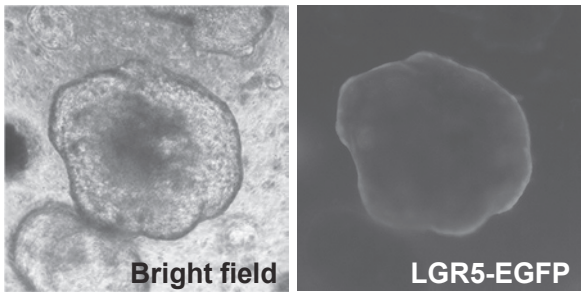


図1. 炎症を伴い発生した胃がんより樹立したオルガノイド

2．幹細胞制御因子の同定と解析

胃がん・大腸がんモデルマウスより樹立されたオルガノイドを用いて、マウス生体内外でがんの悪性化を導く因子のスクリーニングを行った。その結果、いくつかの転写因子が、がん細胞の幹細胞性を亢進すること、また、がんオルガノイドの悪性化を導くことが明らかとなった。この結果は、第 77 回日本癌学会総会において発表された。今後は、それらの転写因子が幹細胞性を制御する詳細な機構の解析を行うのと同時に、ヒト消化管がん由来のオルガノイドを用いてマウスで得られた結果を検証する。

3．　四肢形成を制御する新たなシグナル経路の発見

シンガポール国立大学、トルコ イスタンブール大学の研究グループとの共同研究により、ヒトで初めてテトラ・アメリア症候群を引き起こす劣勢の R-SPONDIN(RSPO)2 変異を突き止めるとともに、四肢の形成異常に関わる新たなシグナル経路を解明した。これらの結果は、国際誌である *Nature* に報告された。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

（共同研究）

1. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M. Interleukin 1 upregulates microRNA 135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice. Gastroenterology. 2018 Nov 30. pii: S0016-5085(18)35336-8.

2. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, Oshima M. Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. FASEB J. 2018 Aug 29:fj201801176R.

3. Szenker-Ravi E, Altunoglu U, Leushacke M, Bosso-Lefèvre C, Khatoo M, Thi Tran H, Naert T, Noelanders R, Hajamohideen A, Beneteau C, de Sousa SB, Karaman B, Latypova X, Başaran S, Yücel EB, Tan TT, Vlaminck L, Nayak SS, Shukla A, Girisha KM, Le Caignec C, Soshnikova N, Uyguner ZO, Vleminckx K, Barker N*, Kayserili H*, Reversade B*.RSPO2 inhibition of RNF43 and ZNRF3 governs limb development independently of LGR4/5/6. Nature. 2018 May;557(7706):564-569. (*Corresponding author)

4. Ikenoue T*, Terakado Y*, Zhu C, Liu X, Ohsugi T, Matsubara D, Fujii T, Kakuta S, Kubo S, Shibata T, Yamaguchi K, Iwakura Y, Furukawa Y.Establishment and analysis of a novel mouse line carrying a conditional knockin allele of a cancer-specific FBXW7 mutation. Sci Rep. 2018 Jan 31;8(1):2021. (*First author)

著書・総説

1. Ng A, & Barker N. Role of Lgr5-expressing stem cells in epithelial renewal and cancer of the reproductive tract, Book Chapter in Cell Biology of the Ovary. in press

2. Leung C, Tan SH, Barker N.Recent Advances in Lgr5+ Stem Cell Research.
Trends Cell Biol. 2018 May;28(5):380-391.

3. Tan SH, Barker N.Wnt Signaling in Adult Epithelial Stem Cells and Cancer.

Book Chapter in PMBTS WNT Signaling. 2018 Jan 153:21-79.

4. Barker N. Stem cells in 2017: Digesting recent stem cell advances in the gut.

Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2018 Feb;15(2):78-80.

＜学会発表＞

Nick Barker；

Gastronauts Symposium, DUKE-NUS, Singapore (May 2018)（招待講演）

Stem Cell Symposium, LKC, Singapore (May 2018)（招待講演）

IUBMB Symposium, Bangkok, Thailand (June 2018)（招待講演）

ISSCR 2018, Melbourne, Australia (June 2018)（座長および招待講演）

Organoids are Us Symposium, Melbourne, Australia (June 2018)（招待講演）

118th International Titisee Conference on “Cell heterogeneity & tissue architecture, Titisee, Germany (October 2018)（招待講演）

EMBO workshop on Molecular mechanisms of developmental and regenerative biology, Singapore, (November 2018)（招待講演）

村上和弘；第 77 回日本癌学会学術総会 「Analysis of a mechanism that initiates stemness in inflammation-driven gastric cancer cells」

寺門侑美；第 77 回日本癌学会学術総会 「Analysis of gastric cancer stem cells and regulatory mechanism」

＜外部資金＞

1. 基盤研究(A)［研究代表者 ： Nick Barker］

「Developing mouse models of inflammation-driven invasive gastric cancer to reveal novel therapeutic targets」 1070 万円

2. 基盤研究(C)［研究代表者 ： 村上 和弘］

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」 130 万円

3. 研究活動スタート支援［研究代表者 ： 寺門 侑美］

「胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明」 100 万円

4. 公益財団法人 第一三共生命科学研究振興財団 平成 29 年度(第 35 回)研究助成（100 万円）［研究代表者 ： 村上 和弘］

5. 公益財団法人 住友財団 2017 年度 基礎科学研究助成（100 万円）［研究代表者 ： 村上 和弘］

6. 公益財団法人 内藤記念科学振興財団 第 2 回(2017 年度) 内藤記念次世代育成支援研究助成 (200 万円) [研究代表者 : 村上 和弘]

7. 2018 年 医療分野国際科学技術共同研究開発推進事業 Interstellar Initiative, AMED (230 万円) [研究代表者 : 村上 和弘]

がん幹細胞研究プログラム

Division of Molecular Genetics
遺伝子・染色体構築研究分野

Professor	Atsushi Hirao 平尾　敦
Assistant Professor	Yuko Tadokoro 田所優子，Masahiko Kobayashi 小林昌彦，Masaya Ueno 上野将也，Si Sha 司沙（Nano-LSI）
Postdoctoral Researcher	Chiaki Ito 伊藤千秋（学振 PD），Kenta Kurayoshi 倉吉健太
Graduate Student	Vu T. Ha，Yusuke Takase 高瀬雄介，Jing Young Wei, Pharm Thi Loc
Assistant Staff	Kazue Sawa 澤和恵，　Eri Azechi 畦地絵里

【 Abstract 】

Nutrients, such as amino acid, sugar, lipid and vitamin, are critical determinants of cell survival, proliferation and differentiation processes in normal and malignant tissues. Recent studies have revealed critical roles of metabolic control in stem cell properties, so called "stemness", which contribute to malignant progression of cancers. Our group aims to elucidate molecular mechanisms underlying metabolic control of malignant stemness.

Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain hematopoietic homeostasis by both self-renewing and differentiating into mature blood cells. HSCs exhibit decreased self-renewal capacity under stress conditions such as aging and chronic inflammation, whereas dysregulation of self-renewal leads to hematopoietic malignancies. Recently we have discovered a critical molecule, Spred1, for protecting HSC homeostasis against diet-induced systemic stress. Loss of the guardian causes hematopoietic malignancy under high-fat diet. Our findings provide novel insights into the mechanisms by which stem cell homeostasis is protected against metabolic abnormality (Tadokoro Y *et al.,* ***Cell Stem Cell***, 2018).

We have also identified critical metabolic pathways controlling malignant properties such as drug-resistance of cancers. For example, autophagy plays a critical role in tumorigenesis, but how autophagy contributes to cancer cells' responses to chemotherapeutics remains controversial. We have recently found that autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas (Vu TH & Kobayashi M *et.al.* ***Cancer Sci.*** 2018). In addition, the mTOR complexes (mTORCs), which are involved in nutrient signals, function in the drug-resistance of cancers. By using mTORC2-deficient human leukemia cell line, we found that mTORC2 plays a critical role in efficacy of chemotherapeutics, such as tyrosine kinase inhibitor (TKI). To identify functional downstream molecules of mTORC2, we constructed sgRNAs library targeting 1,000 genes of mTORC2 downstream for screening of molecules responsible for drug-resistance. Our screening revealed that some metabolic pathways, including vitamin metabolisms, are critical for leukemic cell survival under chemotherapeutic condition, which contribute to development of novel cancer therapeutics. We believe that investigation of molecular functions in these pathways will lead to the development of successful therapeutics.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．高脂肪食摂取における腸内細菌由来メタボライトによる幹細胞制御と発がん機構

近年，高脂肪食など異常な全身的栄養環境の変化は，がんの発生・悪性化に深く関与していることが知られるようなになった。我々は，高脂肪食の長期摂取が，腸内細菌叢の変化を介して，造血幹細胞の異常な自己複製と発がんの起因となることを見いだした。さらに，この現象には，腸内細菌由来の代謝物が重要な鍵であることを見いだした（未発表）。現在，高脂肪食や加齢による腸内細菌由来メタボライトがいかに造血幹細胞の自己複製の異常と発がんを制御するのかを明らかにして，臓器間（腸管／骨髄），細胞間（ニッチ／幹細胞）コミュニケーションを司るメディエーターとしての役割を解明することにより，「がんステムネスを制御するメタボライト」の特定を進めている。

Tadokoro, et.al. Cell Stem Cell 2018

２．ステムネスと治療抵抗性を制御する代謝経路の特定

個体や細胞レベルでの栄養状態は，体内のアミノ酸，糖，脂質など，様々な栄養素の量や質に影響し，がん細胞の動態に影響を与える。カロリー摂取の制限は，糖を感知する AMPK の活性化，アミノ酸を感知する mTOR シグナルの抑制につながり，組織幹細胞の自己複製や白血病の未分化性制御にも影響を与える。また，低酸素領域に存在するがん細胞においても，栄養素の枯渇状態が想定されるなど，栄養微小環境はがんの動態に深く関与する。我々は，様々なアプローチでステムネスと治療抵抗性を制御する代謝経路の特定を進めている。例えば，①栄養飢餓で活性化するストレス応答因子 FOXO は，白血病幹細胞において活性化し，未分化性維持および分子標的治療抵抗性の原因となるため，FOXO 下流分子を対象とした CRISPR/CAS9 ライブラリーを作製し，白血病幹細胞の分化を司る分子の同定を進めている。同様に，②mTOR 経路の下流を探索した結果，ビタミン代謝経路が分子標的治療（チロシンキナーゼ阻害剤：TKI）の感受性に寄与することを見いだした（未発表）。さらに，③患者由来脳腫瘍細胞を用いて化合物スクリーニングを実施した結果，オートファジーが Ca 経路と協調して，未分化性を維持すること（Vu & Kobayashi et.al. Cancer Sci. 2018），さらに，特定のアミノ酸経路の制御を介して，治療感受性を制御していることを示唆する知見を得た。以上のように，代謝制御の観点から治療感受性や耐性に関与する標的分子を特定することで，新規治療法の開発に寄与すると考え研究を進めている。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas. Cancer Sci. 2018, 109:2497-2508
2. Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A. Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress. Cell Stem Cell. 2018, 22:713-725

（共同研究）

3. Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. Biochem Biophys Res Commun. 2018, 501:724-730.

著書・総説

1. 田所優子, 平尾敦: Spred1 は高脂肪食によるストレスから造血幹細胞を守る 実験医学 36: 2759-2762, 2018
2. 平尾敦: 新臨床腫瘍学ーがん薬物療法専門医のためにーがん幹細胞 南江堂 2018 年 7 月
3. 田所優子, 平尾敦: 造血幹細胞の恒常性維持における Spred1 の役割 臨床血液 59:2441-2448, 2018
4. 田所優子, 平尾敦: Spred1 による造血制御と摂食ストレス防御 血液内科 77: 657-662, 2018

＜学会発表＞

1. Hirao A: Metabolic Control of Cancer Stemness. The 2nd NanoLSI Symposium in London Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science- Nov.19, 2018, London
2. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis. International symposium on drug discovery (Joint symposium of Univ. of Tokyo and Novartis Institute) Oct.22, 2018, Tokyo

3. 平尾敦：代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発　次世代がん医療代表者会議　2018 年 7 月 24 日，東京
4. 平尾敦：幹細胞　第１１回　研修医のための血液学セミナー　2018 年 7 月 5 日
5. 田所優子, 平尾敦：栄養環境ストレスと Spred1 による造血幹細胞の恒常性維持機構　第 22 回造血器腫瘍研究会　2018 年 1 月 26 日，　横浜
6. 田所優子, 平尾敦：栄養環境ストレスと Spred1 による造血幹細胞の恒常性維持機構　新学術領域「幹細胞老化と疾患」「細胞競合」総括班主催「若手の会」　2018 年 2 月 2-3 日 熱海
7. 田所優子, 平尾敦：栄養環境ストレスと造血幹細胞の恒常性維持機構　金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所若手研究発表会　2018 年 7 月 5-6 日 和倉
8. Tadokoro Y, Hirao A：Spred1 protects hematopoietic homeostasis against high-fat diet-induced systemic stress. The 37th Sapporo International Cancer Symposium, July 17-19, 2018, Sapporo
9. 田所優子, 平尾敦：栄養環境ストレスと造血幹細胞の恒常性維持機構　北海道大学遺伝子病制御研究所・金沢大学がん進展制御研究所ジョイントシンポジウム 2018 年 7 月 17 日 札幌
10. Tadokoro Y, Hirao A：Spred1 protects hematopoietic stem cell homeostasis against high fat diet-induced systemic stress. 第 80 回日本血液学会学術集会　2018 年 10 月 13 日 大阪
11. Tadokoro Y, Hirao A：Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemogenesis by diet-induced stress. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa, Nov. 26th, 2018, Kanazawa
12. Tadokoro Y, Hirao A：Diet-induced stress and homeostasis maintenance in hematopoietic stem cells. 第 41 回日本分子生物学会　2018 年 11 月 29 日 横浜
13. Ueno M, Hirao A：mTORC2-mediated metabolic processes contributes drug resistance in leukemia 第 80 回日本血液学会学術集会，平成 30 年 10 月 12-14 日，横浜
14. Ueno M, Hirao A: mTORC2-mediated metabolic processes contributes drug resistance in leukemia 第 77 回日本癌学会学術総会，平成 30 年 9 月 27-29 日，大阪
15. Kobayashi M, Vu HT, Yamada D, Hegazy AM, Hirao A: Metabolic regulation of malignant phenotypes of glioma stem cells. The 1st NanoLSI International Symposium 2018 年 2 月 21 日，東京
16. 小林昌彦，平尾敦: オートファジー阻害はカルシウム制御異常に対する悪性膠芽腫の感受性を増加させる．第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 2 月 21 日，大阪
17. Takase Y, Ueno M, Ohta K, Fuse K, Nishida Y, Kojima K, Hirao A: Identification of critical downstream molecules of FOXO for targeting leukemia stem cells. 第 80 回日本血液学会学術集会，平成 30 年 10 月 12-14 日，大阪

＜外部資金＞

1. 平尾敦：基盤研究（A）H27～H30 年度「幹細胞性獲得・維持のためのがん微小環境」8,0 00 千円
2. 平尾敦：新学術領域「幹細胞老化と疾患」（公募）　H29～H30 年度「過栄養ストレスによる幹細胞運命決定機構とエイジング」4,300 千円
3. 平尾敦：挑戦的萌芽　H29～H30 年度「がん未分化性獲得過程におけるゲノム異常と転写調節のクロストーク」2,500 千円
4. 平尾敦：次世代がん医療創生研究事業　H28～H30 年度「代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発」18,061 千円
5. 田所優子：基盤研究（C）H28～H30 年度「アクチン重合調節を介した造血幹細胞の自己複製制御機構の解析」1,200 千円
6. 田所優子：平成 30 年度　日本血液学会 研究助成「食餌性ストレスに対する造血幹細胞の防御機構」500 千円
7. 田所優子：平成 30 年度　内藤記念科学奨励金・研究助成「骨髄増殖性腫瘍の環境因子依存的発症機構の解析」3,000 千円
8. 上野将也：基盤研究（C）H29～H31年度「mTOR複合体２による白血病の治療耐性制御機構の解明」1,200千円
9. 小林昌彦：基盤研究(C)　H29～H31 年度「エネルギー調節と未分化性制御の協調的相互関係の分子基盤」1,300 千円
10. 伊藤千秋：若手研究（B）H28～H30 年度「ニトロ cGMP のがん幹細胞制御における機能と分子機構の解明」1,300 千円
11. 伊藤千秋：特別研究員奨励費　H28～H30 年度「選択的オートファジーによる白血病幹細胞制御機構の解明」993 千円

Division of Oncology and Molecular Biology
腫瘍分子生物学研究分野

Professor	Chiaki Takahashi 高橋　智聡
Assistant Professor	Shamma Awad シャムマ　アワド, Susumu Kohno 河野　晋, Nobuhiro Okada 岡田　宣宏（～2018.3.31）
Postdoctoral Researcher	Hayato Muranaka 村中　勇人（～2018.9.30）
Graduate Student	Yuki Nishimoto 西本　裕希, Li Fengkai 李　鳳凱,Paing Linn, Kulathnga Liyana Arachchillage Nilakshi, Sheng Jindan 盛 金丹, Zhang Zhiheng 張　智恒 Misa Suzuki 鈴木　美砂（～2018.3.31）
Assistant Staff	Naoko Nagatani 永谷　直子

【 Abstract 】

We innovate *in vitro* and *in vivo* cancer model systems that can be readily analyzed by molecular biology techniques; this aims to find pathways critical for carcinogenesis, malignant progression, metastasis, drug resistance and stem cell-like behaviors in cancer cells. In recent years, we have been trying to find effective targets of cancer therapy in the retinoblastoma (RB) tumor suppressor gene inactivated signature. Our efforts highlighted pivotal roles of RB gene in tumor metabolism, tumor microenvironment, apoptosis and epigenetics. In addition, we are attempting to develop new drugs targeting cancer-specific genomic abnormalities in metabolic genes.

＜2018 年の成果，進行状況と今後の計画・展望＞

コモンタイプのがんにおける RB 不活性化は，イニシエーション時ではなくプログレッション時に起こる。悪性進展の様々なコンテクストにおいて RB 不活性化シグナチャーを決定するアプローチによって見えてきたのは，RB の多様な代謝制御機能とサイトカイン・ケモカイン発現誘導を介する微小環境への影響であった。

悪性進展モデルの構築と解析

p53$^{-/-}$; *Rb*$^{flox/flox}$ 乳腺培養系を用い，Rb 不活性化によって誘導される乳腺細胞の自己複製亢進というコンテクストにおける RNA-seq 及び lipidomics シグナチャーを決定，乳がん治療の新しい標的候補を見出した（西本，小野薬品工業との共同研究）。また，高脂肪食に暴露された *p53*$^{-/-}$; *Rb*$^{flox/flox}$ 乳腺培養系からは，MYC シグナルの亢進を示す GSEA 結果を得ることができた。このメカニズムと臨床的意義を探索している。さらに，*p53*$^{-/-}$;*Rb*$^{flox/flox}$;*p107*$^{-/-}$;*p130*$^{flox/flox}$ マウスに cre recombinase を hydrodynamic injection することによって，肝細胞がんを誘導することに成功した。このマウスモデルを用いて，肝発がんのコンテクストで p53 あるいは RB 不活性化のシグナチャーを得る。

RB-PGAM 機軸による分化・未分化性制御

解糖系酵素の中でほぼ唯一 HIF や Myc による転写制御を受けない PGAM1,2 が，RB によって転写活性化されることとその分子機序（KDM5A, C/EBP α , β , MEF2A,D）を

明らかにした。PGAM1,2 が RB による分化制御を媒介することの証拠も得た。RB 不活性化による PGAM1,2 の発現低下は，解糖系の下流への流れを途絶するとともに，上流から分岐する代謝の流れを変化させる。RB-PGAM 機軸の生理学的意義の探索によって，がん細胞の未分化性の基盤となる代謝の流れを解明する（河野，Linn，大阪大学・第一三共との共同研究，投稿準備中）。

RB-SREBPs・ELOVL6・SCD1 機軸による脂肪酸の質の制御

小野薬品工業･筑波大学との共同研究による RB-SREBP1 DKO マウスの解析の過程で，RB が，ELOVL6 と SCD1 の発現制御を介して，脂肪酸の伸長反応と不飽和化を制御する事を明らかにした(脂肪酸の質的制御)。乳がんにおける ELOVL6 の不活性化は，セラミドの顕著な蓄積とスフィンゴミエリンの低下，そして，これに符合する G1 停止を誘導した（村中，張，筑波大学島野仁教授，小野薬品工業との共同研究）。

がん細胞未分化性とコレステロール代謝

RB によるコレステロール生合成経路の広汎な制御が，AR リガンドの合成を介して，RB 不活性化によって誘導される去勢抵抗性に関わることを解明した（鈴木）。

特定のゲノム変異を持つ腫瘍において合成致死となる標的の探索

腫瘍において頻繁に欠落する遺伝子の近傍に代謝酵素遺伝子が位置する場合，「巻き込まれ」によってこれらもしばしば欠落する。RB は前立腺がんの 10%ほどで homo deletion し，これに TCA 回路の酵素である SUCLA2 遺伝子が巻き込まれる。我々は，このゲノム欠損が前立腺がんになんらかの metabolic vulnerability を賦与するものと考え，まずアイソザイムである SUCLG2 の不活性化を試みたが，有意な細胞障害性を観察できなかった。しかし，CAS9-CRISPRi スクリーニング及び薬剤スクリーニングを行ったところ，SUCLA2 欠損と特異的に合成致死性をしめす遺伝子１２個に加え，２つの化合物を得た（河野，Linn　一部第一三共との共同研究，特許出願中）。

RB パスウェイ活性化によるがん治療法の探索

RB の恒常的活性化型変異体である 7LP を肝がん細胞において発現したところ，apoptosis のシグナチャーが広汎に亢進するものの，NF-κB 系の亢進により，細胞死には至らなかった。薬剤スクリーニングにより，IKK 阻害剤が 7LP 誘導幹細胞を apoptosis に導くことが判った。CDK4/6 阻害剤と IKK 阻害剤の協調効果を調べている（盛）。

RB- CCL2 機軸による腫瘍微小環境制御

RB 不活性化軟部腫瘍悪性進展モデルから得たシグナチャーを探索し，がんの未分化性･薬剤耐性を制御する鍵分子として CCL2 等を同定した。また，RB 不活性化が CCL2 の分泌促進を介して Treg，MDSC，マクロファージ等 immunosupressive な免疫細胞をリクルートすることがわかった。RB 不活性化によって乳腺の過形成を誘導する系を CCR2 欠損背景に導入したところ，病変はほぼ完全に抑制された（李　投稿中）。

RB 不活性化と細胞競合

プログレッション時の RB 不活性化が，前立腺がん，肺がん，グリオーマの腫瘍内不均一性の獲得に貢献することが示されている。我々は，細胞競合やクローン間協調の観点から，RB 不活性化が関与する腫瘍内不均一性を考える試みを進行している（西本，岡田，北海道大との共同研究）。

乳がん腫瘍内不均一性

NFYA が上皮間葉転換（EMT）依存的にスプライシングバリアントの発現パターンを変え，乳がんのサブクローン転換を段階的に制御していることを明らかにしている。今年度，先端モデル動物プラットフォームの支援により NFYA トータルおよびバリアント特異的ノックアウトマウスを作成した（岡田）。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著論文

（共同研究）

1. Murata T, Yamaguchi Y, Kohno S, Takahashi C, Kakimoto M, Sugimura Y, Kamihara M, Hikita K and Kaneda N. Regucalcin confers resistance to amyloid-β toxicity in neuronally differentiated PC12 cells. ***FEBS openbio***, 8:349-360, 2018. doi:10.1002/2211-5463.12374
2. Sasaki S, Baba T, Muranaka H, TanabeY, Takahashi C, Matsugo S and Mukaida N. Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung. ***Mol Cancer Ther***, 17:1515-1525, 2018. doi:10.1158/1535-7163.MCT-17-0845
3. Zhao J, Okamoto Y, Asano Y, Ishimaru K, Aki S, Yoshioka K, Takuwa N, Wada T, Inagaki Y, Takahashi C, Nishiuchi T, Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. ***PLoS One***, 13(5):e0197604, 2018. doi:10.371/journal.pone.0197604
4. Kitajima S, Asahina H, Chen T, Guo S, Laura GQ, Cavanaugh JD, Merlino AA, Tange S, Terai H, Kim JW, Wang X, Zhou S, Xu N, Wang S, Zhu Z, Thai TC, Takahashi C, Wang Y, Neve R, Stinson S, Tamayo P, Watanabe H, Kirschmeier PT, K Wong KK and Barbie DA. Overcoming resistance to dual innate immune and MEK inhibition downstream of KRAS. ***Cancer Cell***, 34:439-452, 2018. doi:10.1016/j.ccell.2018.08.009
5. Nishimura T, NakataA, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S,Kita K, Horike S,Saitoh K, Kato K, Kaori I, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida M, Yano S, Soga T, Tojo A and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. ***Oncogene***, 2018 (in press).

（著書・総説）

1. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「腫瘍内微小環境では窒素源としてアンモニアが再利用される？」Vol.36 No.6 p983-984, 2018 井上尊生 編, 羊土社刊
2. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「GTP 合成経路は小細胞肺がんのアキレス腱になる」Vol.36 No.16 p2751, 2018 菅浪孝祥 編, 羊土社刊

＜学会発表＞

1. 岡田宣宏, 髙橋智聡. NFYA による癌の不均一性形成過程多段階制御機構. 細胞

競合・ステムセルエイジング合同若手の会 2018 年 2 月 2 日（熱海市/KKR ホテル熱海：2/2-3）

2. Kasahara A, Noguchi M, Kohno S, Takahashi C, Gotoh N, Kohno T, Scorrano L, Hirao A. Mitochondrial dynamics in geftinib-resistant lung adenocarcinoma cells. Keystone Symposia Conference, Mitochondrial Biology, 22-26 Apr 2018, Kyoto

3. 河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 髙橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 6 回がんと代謝研究会 2018 年 5 月 11 日（奄美市/奄美観光ホテル：5/10-11）

4. Muranaka H, Hayashi A, Minami K, Kitajima S, Kohno S, Nishimoto Y, Nagatani N, Suzuki M, Kulathunga N, Sasaki N, Okada N, Matsuzaka T, Shimano H, Tada H and Takahashi C. A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling. 第 6 回がんと代謝研究会 2018 年 5 月 11 日（奄美市/奄美観光ホテル：5/10-11）

5. Kohno S and Takahashi C. RB controls differentiation through positive regulation of phosphoglycerate mutases. Abcam Cancer and Metabolism conference 2018 2018 年 6 月 26 日（Cambridge, UK / Fitzwilliam college：6/25-27）

6. Muranaka H, Hayashi A, Minami K, Kitajima S, Kohno S, Nishimoto Y, Nagatani N, Suzuki M, Kulathunga N, Sasaki N, Okada N, Matsuzaka T, Shimano H, Tada H and Takahashi C. A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling. Abcam Cancer and Metabolism conference 2018 2018 年 6 月 26 日（Cambridge, UK / Fitzwilliam college：6/25-27）

7. 河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 髙橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 1 回 金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所若手研究発表会 2018 年 7 月 5 日（和倉町/ホテル海望：7/5-6）

8. 上原ひかる，荒木千絵，前田昂亮，岡橋伸幸，松田史生，髙橋智聡，清水浩. がん種の異なる細胞間での中心代謝における ^{13}C 代謝フラックス解析. 第 70 回日本生物工学会大会 2018 年 9 月 6 日（吹田市/関西大学：9/5-7）

9. 西村建徳, 村山貴彦, 河野晋, 髙橋智聡, 曽我朋義, 東篠有伸, 後藤典子. ミトコンドリア葉酸代謝酵素のがん幹細胞様形質と薬剤耐性への寄与. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日（大阪市/リーガロイヤルホテル大阪：9/27-29）

10. 三木貴雄, 髙橋智聡, 野田亮. Rb と概日リズムの関連. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 28 日（大阪市/リーガロイヤルホテル大阪：9/27-29）

11. Muranaka H and Takahashi C. A distinct function of the retinoblastoma protein in the control of lipid composition identified by lipidomic profiling. 第 77 回日本癌学会学術

総会 2018 年 9 月 28 日（大阪市/リーガロイヤルホテル大阪：9/27-29）

12. 河野晋, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 髙橋智聡. ヒストン脱メチル化酵素 KDM5A と RB が制御する代謝分子の探索. 第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 28 日（大阪市/リーガロイヤルホテル大阪：9/27-29）
13. Takahashi C. RB controls undifferentiated status through positive regulation of phosphoglycerate mutases. 第 13 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2018 年 10 月 18 日（福岡市/九州大学：10/17-18）
14. 岡橋伸幸, 河野晋, 髙橋智聡, 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 年 11 月 28 日（横浜市/パシフィコ横浜：11/28-30）
15. 村田富保, 河野晋, 髙橋智聡, 疋田清美, 金田典雄. PC12 細胞におけるアミロイドβ誘導性の細胞内ストレスに対する regucalcin の保護作用. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 日（横浜市/パシフィコ横浜：11/28-30）
16. 張智恒, 村中勇人, 高橋智聡. 脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 のがんにおける遺伝子発現とがん促進効果の作用機序の検討. 第 13 回スフィンゴテラピィ研究会 2018 年 12 月 14 日（砺波市/Royal Hotel 富山砺波：12/14-16）

＜外部資金＞ (2018 年度/H30 年度が含まれる課題)

高橋智聡

1. 革新的先端研究開発支援事業（AMED-CREST）H27～H32 年度「脂肪酸の鎖長を基軸とした疾患の制御機構と医療展開に向けた基盤構築」 7,500 千円
2. 科学研究費補助金 基盤研究（B）H29～H31 年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」 4,700 千円
3. 科学研究費補助金 新学術領域研究 H29～H30 年度「乳腺上皮・乳がんにおける RB モザイシズムと細胞競合」 4,500 千円
4. 学術研究助成基金助成金 挑戦的研究（萌芽）H29～H30 年度「パッセンジャー変異合成致死性による新規がん代謝治療標的探索」 2,500 千円

河野晋

1. 学術研究助成基金助成金 若手研究（B）H29～H30 年度「PGAM によるエピジェネティクスリモデリングを介したがん悪性化機構の解明」
   1,500 千円

村中勇人

1. 学術研究助成基金助成金 若手研究 H30～H31 年度「がん抑制遺伝子 RB による

脂質組成制御ががんの発生・進展に及ぼす影響の解明」1,500 千円

西本裕希

1. 科学研究費補助金　特別研究員奨励費 H29～H30 年度「乳がんにおけるがん抑制遺伝子 RB の機能とその作用機構の探索」800 千円

Division of Molecular Bioregulation

分子生体応答研究分野

Professor	Naofumi Mukaida　向田直史
Associate Professor	Tomohisa Baba　馬場智久
Assistant Professor	Soichiro Sasaki　佐々木宗一郎
Graduate Students	Yamato Tanabe　田辺和（D4）、Di Zhang　張 迪（D2）
Technical Assistance	Kuniko Minami　南邦子

【 Abstract 】

1. 5-fluorouracil (5-FU)-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung

Adjuvant chemotherapy is used for human breast cancer patients, even after curative surgery of primary tumor. Hence, we examined the effects of post-surgical 5-FU administration on murine lung metastasis model, in which lung metastasis developed after the resection of the primary tumor. The analysis revealed that 5-FU can enhance lung metastasis by inducing tumor cells to produce neutrophilic chemokines, Cxcl1 and Cxcl2, which stimulated the migration of neutrophils expressing prokineticin-2 with a capacity to enhance 4T1 cell proliferation.

2. **Pathogenic role of leukemia cell-derived extracellular vesicles (EVs) in donor cell-derived leukemia (DCL) after BM transplantation**

BM transplantation (BMT) is frequently used for hematologic malignancies including chronic myeloid leukemia (CML). However, some patients develop DCL, such as secondary leukemia or myelodysplastic syndrome (MDS), originating from malignant transformation in donor cells. We observed that donor-derived MDS-like pathology developed when CML-bearing mice were transplanted with congenic healthy BM cells following sublethal irradiation. In some recipient mice, donor-derived cells harbored recipient cell-derived *BCR-ABL* gene and expressed its protein product. Moreover, leukemia cell-derived EVs contained *BCR-ABL* gene as double-stranded DNA fragment and could in vivo transfer *BCR-ABL* gene into hematopoietic stem/progenitor cells, suggesting the involvement of EV in DCL development.

3. **BCR-ABL-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype (SASP)**

We observed the expression of senescence-associated-β-galactosidase (SA-β-gal) in cells in CML-bearing mice and CML cell lines. Moreover, enhanced SA-β-gal expression was observed in all BCR-ABL-expressing cells irrespective of their differentiation stages. Moreover, CML stem cell-derived colonies exhibited augmented SA-β-gal expression with enhanced expression of senescence-associated molecules and SASP-related molecules, compared with normal HSC-derived colonies, indicating that BCR-ABL can induce OIS and SASP in CML cells to promote autonomously CML pathologies.

4. **A G-protein-coupled receptor in breast cancer metastasis to bone**

We previously established 4T1.3 clone, which can spontaneously metastasize to bone after

its orthotopic injection into the mammary fat pad of immunocompetent BALB/c mice, from a mouse breast cancer cell line, 4T1. We revealed that a G-protein-coupled receptor was expressed abundantly in 4T1.3 in bone cavity and its deletion severely impairs the capacity of 4T1.3 to grow in bone cavity. Consistently, we also observed that 4T1.3 cells in bone cavity exhibited augmented expression of several transcription factors, with a capacity to bind to the promoter/enhancer region of this receptor gene.

＜2018年の研究成果、進捗状況及び今後の計画＞

1. 5-fluorouracil (5-FU)による乳がん肺転移の促進

乳がん術後には、アジュバント化学療法が、根治手術後でも行われることがある。乳がん原発巣切除後の5-FU投与の肺転移形成過程への影響を検討した。その結果、5-FU刺激下で腫瘍細胞が産生するケモカインCxcl1/Cxcl2が、腫瘍細胞の増殖促進作用を示すprokineticin-2を発現している好中球浸潤を誘導することで、肺転移巣形成が促進される可能性が明らかとなった。

2. ドナー由来白血病（DCL）発症過程での白血病細胞由来細胞外小胞（EV）の役割

白血病に対する骨髄移植後に、移植されたドナー細胞から、二次性白血病・骨髄異形成症候群（MDS）などの、いわゆるDCLが発症することが知られている。慢性骨髄性白血病（CML）発症マウスに、放射線照射後に正常マウス骨髄を移植すると、MDS様症状を発症することを発見した。さらに、ドナー由来細胞がBCR-ABL遺伝子ならびに遺伝子産物を発現していた。白血病細胞由来のEVが二本鎖DNA断片として保有しているBCR-ABL遺伝子が、vivoでは正常造血幹／前駆細胞に遺伝子導入されたことから、白血病細胞由来のEVがDCL発症に関与している可能性が示唆されたことから、この点についての解析を進める予定である。

3. **BCR-ABL による細胞老化と細胞老化関連分泌形質(SASP)**

細胞老化関連β-galactosidase (SA-β-gal)が CML 細胞株ならびに CML 発症マウスの細胞で検出された。分化段階にかかわらず BCR-ABL 発現細胞で、SA-β-gal 発現亢進が認められた。さらに、正常造血幹細胞由来コロニーに比べて、CML 幹細胞由来コロニーでは、SA-β-gal 発現とともに、細胞老化関連遺伝子ならびに SASP 関連遺伝子の発現が亢進していたことから、これらの現象が CML の病態形成に関与していることが示唆され、今後この点についての解析を進める予定である。

4. 乳がん骨転移過程への G タンパク会合型レセプターの関与

マウス乳がん細胞株 4T1 株から、免疫不全の認められない BALB/c マウスの乳房脂肪組織への同所接種後に、高率に骨へ転移する亜株 4T1.3 株を樹立した。骨内の 4T1.3 株では、G タンパク会合型レセプターの発現が亢進していて、このレセプター遺伝子を欠失させた 4T1.3 株は骨への高転移能が認められなかった。さらに、骨内の 4T1.3 株では、このレセプター遺伝子のプロモーター領域に結合可能な、複数の転写因子の発現が亢進していることも認めた。これらの分子の種々のがんでの骨転移過程での役割の解析を進める予定である。

【 研 究 業 績 】（所属研究者は下線で示した）

＜発表論文＞

原著論文

（研究室主体）

1. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Nishimura T, Imamura Y, Yurino H, Hashimoto S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B_4. *J Immunol* 2018 Mar 1, 200 (5): 1839-1852. doi: 10.4049/jimmunol.1700544.
2. Sasaki S, Baba T, Muranaka H, Tanabe Y, Takahashi C, Matsugo S, and Mukaida N. Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung. *Mol Cancer Ther* 2018 Jul;17(7):1515-1525. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0845.

（共同研究）

1. Rubil S, Lesch A, Mukaida N., and Thiel G. Stimulation of transient receptor potential M3 (TRPM3) channels increases interleukin-8 promoter activity involving AP-1 and extracellular signal-regulated protein kinase. *Cytokine* 2018, 103: 133-141. doi: 10.1016/j.cyto.2017.09.020.
2. Kimura A, Ishida Y, Furuta, M, Nosaka M, Kuninaka Y, Taruya A, Mukaida N, and Kondo T. Protective roles of IFN-γ in cardiac hypertrophy induced by sustained pressure overload. *J Am Heart Assoc* 2018; 7: e008145. doi: 10.1161/JAHA.117.008145.
3. Thiel G, Ulrich M, Mukaida N, and Rössler O. Resveratrol stimulation induces interleukin-8 gene transcription via NF-κB. *Pharmacol Res* 2018; 134: 238-245. doi: 10.1016/j.phrs.2018.07.003.
4. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Furuta M, Mukaida N, and Kondo T. Contribution of the TNF-α-TNF receptor p55 axis in the resolution of stasis-induced venous thrombus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2018; 38:2638-2650. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311194.
5. Mizoguchi M, Ishida Y, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Yahata T, Nanjo S, Toujima S, Minami S, Ino K, Mukaida N, and Kondo T. Prevention of lipopolysaccharide-induced preterm labor by the lack of CX3CL1-CX3CR1 interaction in mice. *PlosOne* 2018; 13 (11): e0207085. doi: 10.1371/journal.pone.0207085.
6. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Horike S, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene* (in press).

総説論文.

1. Mukaida N and Nakamoto Y. Emergence of immunotherapy as a novel way to treat hepatocellular carcinoma (Invited review). *World J Gastroenterol* 2018 May 7, 24 (17): 1839-1858. doi: 10.3748/wjg.v24.i17.1839.
2. Mukaida N, Nosaka T, Nakamoto T, and Baba T. Lung macrophages: multifunctional regulator cells for metastatic cells (Invited review). *Int J Mol Sci* 2019; 20: 116. doi: 10.3390/ijms20010116. Special issue on "Tumor microenvironment"

＜学会発表＞（筆頭発表者が分野所属の者に限る）

1. 佐々木宗一郎，向田直史。ケモカイン・レセプターCCR5 阻害剤による乳がん骨転移制御の可能性の検証。第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会。2018 年 5 月 16 日～18 日。東京。
2. 馬場智久。慢性骨髄性白血病におけるケモカイン CCL3 を介した正常・白血病性造血間でのクロストーク。 2018 年 6 月 21 日～23 日。（招待講演）第 107 回日本病理学会総会。札幌。
3. Mukaida N, Naito T, Nakamoto Y, and Baba T. Crucial roles of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells in high-dose cyclophosphamide-induced specific tumor immunity. 45th Naito Conference on Immunological and Molecular Bases for Cancer Immunotherapy. Sapporo, June 26-29, 2018.
4. 佐々木宗一郎，坂本毅治，Di Zhang，馬場智久，向田直史。 マウス乳がん細胞株による肺と骨への同時転移過程における Mint3 の役割の解明。第 27 回日本がん転移学会学術集会・総会。2017 年 7 月 19 日～20 日。横浜。
5. Nosaka T, Baba T, Tanabe Y, Sasaki S, Arita M, Nakamoto Y, and Mukaida N. Alveolar macrophages drive lung metastasis in cooperation with interstitial macrophages by generating leukotriene B_4. (English Symposium) 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
6. Baba T and Mukaida N. Pathogenic role of leukemia cell-derived extracellular vesicles in donor cell-derived leukemia after BM transplantation. 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
7. Sasaki S, Zhang D, Baba T, and Mukaida N. Identification of novel target molecules involved in spontaneous bone metastasis of mouse breast cancer. 第 77 回日本癌学会学術総会。2017 年 9 月 28 日～30 日。横浜。
8. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. BCR-ABL, an oncogene of chronic myeloid leukemia, can induce cellular senescence. 第 77 回日本癌学会学術総会。2018 年 9 月 27 日～29 日。大阪。
9. Mukaida N, Baba T, and Sasaki S. Involvement of prokineticin 2-expressing neutrophil infiltration in 5-fluorouracil-induced aggravation of breast cancer metastasis to lung. 第 47 回日本免疫学会総会・学術集会。 2018 年 12 月 10 日～12 日。福岡。

10. 向田直史。　抗がん剤によるがん微小環境の modulation。（招待講演）第 46 回和歌山悪性腫瘍研究会。2018 年 12 月 15 日。和歌山。

＜外部資金＞

向田直史

1. 科学研究費・挑戦的研究（萌芽）（代表）　「ドナー細胞由来白血病発症機構への細胞外小胞の関与の検討」（直接経費　2,500 千円，間接経費　750 千円）
2. AMED 肝炎等克服実用化研究事業(分担)　「獲得免疫反応の賦活化により核内 HBV cccDNA を排除する方法の開発」（直接経費　1,461 千円，間接経費　438 千円）

馬場智久

１．科学研究費・基盤研究（C）（代表）「慢性骨髄性白血病における炎症性ケモカイン CCL3 の病態生理学的役割の解明」（直接経費 1,300 千円, 間接経費 390 千円）

佐々木宗一郎

1. 科学研究費・基盤研究（C）（代表）「新規乳がん骨転移モデルの解析を通した，新規標的分子の探索」　（直接経費　1,200 千円，間接経費　360 千円）

田辺　和

１．日本学術振興会・特別研究員奨励費「残存慢性骨髄性白血病幹細胞の根絶戦略の開発」　（直接経費　9, 000 千円）

＜その他＞

向田直史

１．　Associate Editor, Cytokine, An official Journal of International Cytokine and Interferon Society.

２．　Guest Editor, Int J Mol Sci, Special issue on “Tumor Microenvironment”.

がん微小環境研究プログラム

Division of Immunology and Molecular Biology
免疫炎症制御研究分野

Professor	Takashi Suda　須田　貴司
Assistant Professor	Takeshi Kinoshita　木下　健,
	Kohsuke Tsuchiya　土屋　晃介
Postdoctoral Researcher	Shinsuke Nakajima　中嶋　伸介（～ 2018.7.31）
Graduate Student	Mahib, Muhammad Mamunur Rashid (D2)
Assistant Staff	Mayumi Sakurai　櫻井　真由美,
	Hiroko Kushiyama　串山　裕子,
	Shoko Hosojima　細島　祥子

【 Abstract 】

Pyroptosis was discovered as caspase-1-dependent cell death of macrophages that were infected by intracellular pathogens such as Salmonella Typhimurium. However, pyroptosis has been observed in other cell types including T cells, intestinal epithelial cells and various cancer cell lines. Morphologically, pyroptosis resembles necrosis rather than apoptosis. Since caspase-1 also induces proteolytic maturation and secretion of proinflammatory cytokines such as IL-1β and IL-18, pyroptosis is inevitably inflammatory cell death as opposed to apoptosis that is often described as non-inflammatory cell death.

Caspase-1 is activated in a large protein complex called inflammasome that consists of certain cytoplasmic pattern recognition receptor (such as NLRP3, NLRC4 or AIM2), an adaptor protein ASC and caspase-1. However, in cancer cell lines, activation of an inflammasome resulted in either apoptosis or pyroptosis depending on the cell types. We have found that ASC switches between apoptosis and pyroptosis by recruiting either caspase-1 or caspase-8.

Recent reports by other research groups revealed that in addition to caspase-1, caspase-4 and 5 in humans and caspase-11 in mice mediates pyroptosis. Furthermore, it was discovered that these caspases (caspase-1, 4, 5, 11) cleaves a common protein substrate, gasdermin D (GSDMD), and the resulted N-terminal fragments of GSDMD form pores in the plasma membrane to induce pyroptosis. Interestingly, while the caspase-4/5/11-mediated pyroptosis is highly dependent on GSDMD, we have found that activation of canonical inflammasome pathway induces caspase-1-mediated cell death in GSDMD-deficient cells. Interestingly, this caspase-1-dependent and GSDMD-independent cell death is apoptotic. Thus, there must be a novel branching point of apoptosis and pyroptosis downstream of caspase-1.

Which of Apoptosis or pyroptosis is the preferable mode of tumor cell death in therapy? To address this question, we generated a set of cancer cell lines that can be killed by either apoptosis or pyroptosis by a same stimulus. The results suggested that pyroptosis induced more potent anti-tumor immunity than apoptosis.

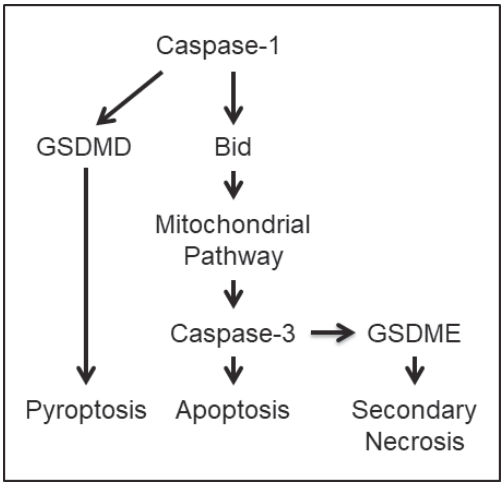
＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．パイロトーシスシグナル伝達関連因子 PYST1 の機能解析

パイロトーシスシグナル伝達関連因子として単離した PYST1（仮名）とカスパーゼ 1 との結合の分子機構を解析する過程で、PYST1 がカスパーゼ 1 のみならず上流の自然免疫センサー分子 NLRC4 とも結合する事を見いだした。さらに PYST1 は NLRC4 とは異なるリガンドを認識するセンサー分子 NOD2 ならびに NLRP3 とも結合することも見いだした。NOD2 で誘導される炎症性サイトカイン遺伝子発現、NLRP3 で誘導される IL-1β分泌およびパイロトーシスが PYST1 のインヒビターで抑制されることも確認できた。これらから PYST1 は複数の NLR パスウェイを上流で制御する、共通の制御機構を担っているという新たな可能性が考えられた。今後は NLRC4、NOD2 ならびに NLRP3 と PYST1 との結合の分子機構を結合ドメイン解析および in vitro 結合試験で明らかにする。また、NLRC4、NOD2 ならびに NLRP3 と PYST1 との内在性タンパクレベルでの結合、共局在を免疫沈降法、蛍光免疫染色と共焦点顕微鏡観察、PLA 法等によって示す。

２．カスパーゼ 1 によるアポトーシスの誘導の分子機構の解析

蛋白分解酵素カスパーゼ 1 は Gasdermin D (GSDMD)を切断することで、マクロファージをはじめとする様々な細胞種でパイロトーシスと呼ばれるネクローシス様のプログラム細胞死を誘導する。しかし、GSDMD 欠損マクロファージはカスパーゼ 1 依存性細胞死が完全には抑制されず、この時細胞膜の破綻を示す lactate dehydrogenase (LDH)の放出も認められる。我々は GSDMD 欠損細胞では，カスパーゼ-1 がアポトーシスを誘導することを見出し、これまでに, GSDMD 欠損細胞ではカスパーゼ 1 が Bid 依存性および非依存性にアポトーシスを誘導することを明らかにした。本年度はカスパーゼ 1 依存性アポトーシスの分子機構をさらに詳細に明らかにするとともに、カスパーゼ 1 依存性アポトーシスで誘発される二次的細胞膜破綻（ネクローシス）のメカニズムを解明した。また、GSDMD/Bid 二重欠損マウス由来のマクロファージは、GSDMD 欠損マウスよりもさらにパイロトーシス誘導刺激による細胞死が遅延することを明らかにした。我々は GSDMD を元々発現していない細胞においても、カスパーゼ 1 はアポトーシスを誘導しうると考えており、今後そのような細胞を同定し、カスパーゼ 1 依存性アポトーシスの生理的・病理的役割を明らかにしたいと考えている。



【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

Nakajima S, Imamura R, Yoshino M, Sakurai M, Tsuchiya K, Sugihara K, Asano M, and Suda T: Characterization of Innate and Adaptive Immune Responses in PYNOD-deficient mice. ImmunoHorizons, 2018, 2 (4):129-141

Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, Mahib MR, Yamaguchi Y, Miura M, Kinoshita T, Kushiyama H, Sakurai M, Shiroishi T, and Suda T: Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. Nat Communications, 2019, in press.

（共同研究）

Kamikawa Y, Sakai N, Miyake T, Sagara A, Shinozaki Y, Kitajima S, Toyama T, Hara A, Iwata Y, Shimizu M, Furuichi K, Imamura R, Suda T, Kaneko S, Wada T: Involvement of p38MAPK in Impaired Neutrophil Bactericidal Activity of Hemodialysis Patients. Ther Apher Dial. 2018, 22(4):345–354

＜学会発表＞

1. Suda T: Switches between apoptosis and pyroptosis in macrophages and cancer cells. Australia-Japan Meeting on Cell Death, Tokyo, May 22-23, 2018
2. Nakajima S, Tsuchiya K, Sakurai M, Suda T: Caspase-1-induced pyroptosis potentiates anti-tumor immunity. Australia-Japan Meeting on Cell Death, Tokyo, May 22-23, 2018
3. Tsuchiya K: Caspase-1 serves as an apoptosis-initiating caspase in the absence of Gasdermin D (GSDMD). Australia-Japan Meeting on Cell Death, Tokyo, May 22-23, 2018
4. Tsuchiya K, Suda T: Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. The 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Death Research, Kyoto, July 27-28, 2018
5. Tsuchiya K, Suda T: Pyroptosis enhances killing of Listeria monocytogenes by ampicillin in vivo. The 47th Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Fukuoka, December 10-12, 2018

＜外部資金＞

1. 須田貴司, 科学研究費補助金　新学術領域研究「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」(代表)：パイロトーシスの分子機構と役割.　直接経費 9,900 千円
2. 土屋晃介, 科学研究費補助金　基盤研究（C）(代表)：細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法の協調的相互作用から理解する試み. 直接経費 1,400 千円
3. 土屋晃介　琉球大学熱帯生物圏研究センター・平成 30 年度 共同利用共同研究事業

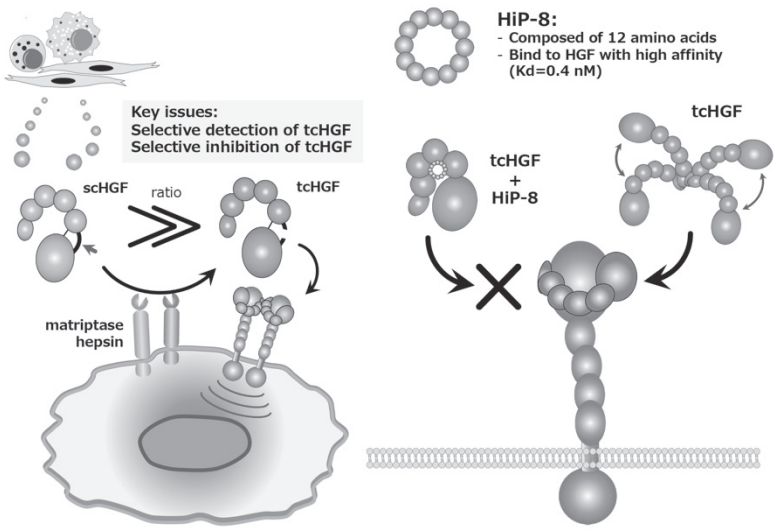
「肺胞上皮におけるインターロイキン-17F 産生の意義と分子基盤」　225 千円

Division of Tumor Dynamics and Regulation
腫瘍動態制御研究分野

Professor	Kunio Matsumoto 松本 邦夫
Assistant Professors	Katsuya Sakai 酒井 克也，Ryu Imamura 今村 龍，Hiroki Sato 佐藤 拓輝
Graduate Student	Miao Wenyu, Jangphattananont Nawaphat, Yumiko Tahira 田平 裕美子
Collaborative Research Fellow	Keisuke Kiriyama 桐山 恵介
Assistant Staff	Chikako Tambo 丹保 智佳子, Izumi Hashitani 端谷 泉

【Abstract】

HGF (Hepatocyte Growth Factor) and MET as target molecules, our research is focusing on 1) discovery of new physiological function of MET receptor, 2) elucidation of dynamic structural base for MET receptor activation, 3) discovery of cyclic peptides for HGF/MET and application to diagnosis and therapeutics. In 2018, our research progress includes followings. (1) HGF-inhibitory Peptide-8 (HiP-8), a cyclic peptide which specifically binds to active two-chain HGF (tcHGF) but not inactive single-chain HGF, could detect tcHGF and its localization was matched with active MET distribution in cancer patients' tissues and human cancer model for PET molecular imaging. tcHGF showed dynamic domain movement in high-speed atomic force microscopy (HS-AFM), whereas HiP-8 captured tcHGF and changed it to be static. These results indicate that HiP-8 may be an excellent molecular tool for cancer diagnosis. (2) HS-AFM and biochemical analysis revealed a new mechanism and dynamic MET activation structure. (3) MET receptor participated in inflammatory cytokine production and innate immune response upon RNA virus infection independent on its tyrosine kinase activity. The results indicate a heretofore unknown physiological function of MET.



Peri-cellular generation of active tcHGF (left) and outline of HiP-8 (right)

＜2018 年の研究成果，進行状況＞

1. HGF 阻害環状ペプチド（HiP-8）の活性・分子イメージング

【背景】菅裕明博士（東京大学）と連携し，環状ペプチド（HGF-inhibitory Peptide-8: HiP-8）を取得した。HGF は 1 本鎖前駆体 HGF（scHGF）として分泌され，がん細胞近傍で生物活性をもつ 2 本鎖 HGF（tcHGF）に変換される。HiP-8 は tcHGF に選択的に結合・阻害する。【成果】(1) がん患者組織で HiP-8 プローブによって検出される tcHGF の局在が活性化 MET の局在とよく一致すること，(2) ^{64}Cu で標識した HiP-8 プローブ（^{64}Cu-HiP-8）ならびにヒトがん組織での診断を模倣するヒト HGF ノックインマウスを用いた PET 解析から，HiP-8 は tcHGF ならびに活性化 MET の検出に優れた分子ツールになること，(3) HiP-8 は HGF にドッキングすることによって HGF のダイナミックな分子動態を阻害することを見出した。

2. tcHGF 生成とがん転移微小環境形成

【成果】悪性黒色腫の肺転移モデルを用いて，腫瘍細胞由来因子を介した肺組織血管平滑筋細胞での HGF 産生誘導と scHGF から tcHGF の変換促進，tcHGF の形成・局在に一致する腫瘍細胞の微小転移コロニーの局在を明らかにした。tcHGF の生成は転移性ニッチ形成に重要な役割を果たすと考えられる。

3. MET 受容体の動的活性化構造

【成果】高速原子間力顕微鏡（HS-AFM）観察ならびに分割ルシフェラーゼ法などの生化学的手法を組合せ， MET ダイマー形成機構に関与する新しい構造モデルを取得した。生理的濃度・条件での生体分子のリアルタイム観察により，増殖因子受容体の動的活性化に関わる構造解明が可能になると考えられる。

4. MET を介した自然免疫制御の研究

【成果】 (1) RNA ウイルス感染を模倣する 2 本鎖 RNA の細胞内導入により炎症性サイトカイン産生が増加する自然免疫応答が，MET 欠損細胞で著明に低下すること，(2) 自然免疫応答性は MET 細胞内ドメインが関与するものの MET 受容体チロシンキナーゼ活性に依存しないことを見出した。MET 受容体を介した 2 本鎖 RNA 自然免疫応答は，MET 依存的シグナル活性化とは独立の生理機能であり，MET の新しい生理機能である。

5. 環状ペプチドによる人工 HGF の特性

【成果】MET 受容体に結合する環状ペプチドを bivalent 提示することで取得された人工 HGF は，細胞内シグナル伝達，遺伝子発現プロフィール，生物活性において天然の HGF と同等の特性をもつことを明らかにした（Scientific Rep, 2018）。非天然化学合成リガンドとして、医薬品としての可能性をもつと考えられる。

＜今後の計画＞

1. MET 受容体活性化の構造ダイナミクスの研究
2. HiP-8 を分子ツールとするイメージング活用創薬
3. 自然免疫制御における MET の機能に関する研究
4. tcHGF 形成を介したがん転移性ニッチ形成と HiP-8 による転移阻止

【 研 究 業 績 】

＜論文発表＞

原著

（研究室主体）

1. Miao W, Sakai K, Ozawa N, Nishiuchi T, Suzuki Y, Ito K, Morioka T, Umitsu M, Takagi J, Suga H, Matsumoto K. Cellular signaling and gene expression profiles evoked by a bivalent macrocyclic peptide that serves as an artificial MET receptor agonist. ***Scientific Rep***, 8: 16492, 2018.

2. Miao W, Sakai K, Imamura R, Ito K, Suga H, Sakuma T, Yamamoto T, Matsumoto K. MET activation by a macrocyclic peptide agonist couples to biological responses differently from HGF in a context-dependent manner. ***Int J Mol Sci***,19: 3141, 2018.

（共同研究）

該当なし

＜特許出願＞

HiP-8 に関する特許を出願した。

＜学会発表＞

1. Matsumoto K. Growth factor signaling: dynamics, cancer, and drug discovery. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (National Museum of Emerging Science and Innovation, Tokyo)

2. Imamura R, Sato H, Sakai K, Matsumoto K. Novel Biological Function of HGF receptor Met in Immune Response. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (National Museum of Emerging Science and Innovation, Tokyo)

3. Sakai K, Furuhashi H, Shibata M, Matsumoto K. HS-AFM revealed unexpected mechanism of MET receptor activation. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (National Museum of Emerging Science and Innovation, Tokyo)

4. Sato H, Sakai K, Mukai H, Watanabe Y, Passioura T, Suga H, Matsumoto K. PET imaging system reflecting activation status of HGF/Met signaling with macro-cyclic peptides. The 1st NanoLSI International Symposium. Feb 21, 2018 (National Museum of Emerging Science and Innovation, Tokyo)

5. Nishita M, Nishikaku I, Yoshida E, Shibuya H, Matsumoto K, Minami Y. Rif small GTPase mediates Ror1 signaling to induce filopodia formation and invasion of lung adenocarcinoma cells. 日本細胞生物学会大会、2018 年 6 月 5 日（仙台国際センター）

6. 岩佐奈実、有森貴夫、酒井克也、松本邦夫、加藤幸成、高木淳一．X 線結晶構造解析による HGF の活性変換メカニズムの解明．第 18 回日本蛋白質科学会年会、2018 年 6 月 26 日～28 日（朱鷺メッセ、新潟市）

7. 岩佐奈実、有森貴夫、酒井克也、松本邦夫、加藤幸成、高木淳一．HGF の活性変換メカニズム解明に向けた精製と結晶化．日本生化学会、2018 年 9 月 24 日（京都）

8. Miao Wenyu, 酒井克也，伊藤健一郎，菅裕明，松本邦夫. 選択的生物活性をもつ環状ペプチドによる MET/HGF 受容体アゴニストの創成．第 91 回日本生化学会大会、2018 年 9 月 25 日（京都）

9. 佐藤拓輝，酒井克也，今村龍，松本邦夫. HGF の局所的活性化に起因する転移性ニッチ形成機構．第 77 回日本癌学会総会、2018 年 9 月 29 日（大阪）

10. 西田満，松本邦夫，南康博. Ror は SmgGDS-Rif 経路を介して肺腺がん細胞の糸状突起形成と浸潤を促進する．第 77 回日本癌学会総会、2018 年 9 月 28 日（大阪）

11. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Kato Y, Takagi J, Matsumoto K. Localization of two-chain HGF and activated MET receptor in developing stomach. 第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 28 日（パシフィコ横浜）

12. 今村龍，佐藤拓輝，酒井克也，松本邦夫．増殖因子受容体 Met が寄与する感染防御機構　第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年 11 月 30 日（パシフィコ横浜）

13. Matsumoto K. Macrocyclic peptide technology targeting HGF and METreceptor. The 2nd NanoLSI International Symposium. Nov 19, 2018 (The Cumberland Hotel, London)

14. Matsumoto K. Macrocyclic peptides targeting HGF-MET. 4th International Conference on Circular Propteins and Peptides. Kawasaki, Nov 28 - 30, 2018.

15. Nishita M, Nishikaku I, Yoshida E, Kamizaki K, Shibuya H, Matsumoto K, Minami Y. Ror1 promotes invasion of lung adenocarcinoma cells through small GTPase Rif - mediated filopodia formation. ASCB-EMBO 2018 meeting. San Diego, CA, USA, Dec 8 - 12, 2018.

＜外部資金＞

1. 松本邦夫: 次世代がん医療創生研究事業（P-CREATE）　「イメージング活用創薬の視点からの異分野技術融合によるシームレスな薬効評価システムの構築と実施」（分担課題）「抗 HGF 特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬」（分担）12,038 千円

2. 松本邦夫: 革新的バイオ医薬早出基盤技術開発事業「特殊環状ペプチドを中核とした革新的次世代バイオ医薬品開発の加速」（分担課題）「特殊ペプチドの生理活性評価」3,000 千円

3. 酒井克也: 科学研究費補助金　基盤研究（C）「リガンド受容能不全の変異ペプチドホルモン受容体に対する人工リガンド創製の基盤」（代表）　1,200 千円

4. 酒井克也: 公益財団法人三谷研究開発支援財団研究助成　「高速 AFM による増殖因子受容体のナノ構造ダイナミクス」（代表）1,000 千円

5. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金　若手研究「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」（代表）1,300 千円

Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging
腫瘍細胞生物学研究分野

Associate Professor　　Eishu Hirata　平田 英周
Technical Assistant　　Sayuri Yamagishi　山岸 小百合

【 Abstract 】

Our laboratory focuses on the interaction between cancer cells and stromal cells in the central nervous system and its involvement in brain metastasis progression, treatment resistance and reconstruction of the neuro-immune system. Brain metastasis is a very ineffective process and only limited population of cancer cells survive after arrival to the brain. Further, not all the survived cells progress to macro-metastasis but some cease cell cycle progression and enter into a dormant state. We found that non-proliferating brain metastatic melanoma cells (WM266.4) exhibit the gene expression signature of DNA demethylation, which can be caused by reduction of a DNA methyltransferase, DNMT1. The brain specific microenvironment, reactive astrocytes and mechanically soft tissue substrate, suppresses DNMT1 expression in WM266.4 cells and causes cell cycle delay. Surprisingly, DNMT1 overexpression in WM266.4 cells specifically suppressed brain metastasis and we found that *L1CAM*, *SERPINs* and *CRYAB*, the genes required for brain metastasis formation were induced by DNMT1 suppression. Gene expression analysis revealed that about 20% of the genes upregulated in cells with enhanced brain tropism (WM266.4-BrM3) can be induced by DNMT1 suppression, which includes *L1CAM*, and more than 80% of the genes induced by DNMT1 suppression were not upregulated in WM266.4-BrM3, which includes *SERPINs* and *CRYAB*. Induction of DNMT1 into WM266.4-BrM3 abolished its brain tropism, indicating that temporal epigenetic regulation is still required for these cells to form brain metastasis. Similar results were obtained with MDA-MB-231 human breast cancer cells and PC9 human lung cancer cells. Our results suggest that epigenetic reprograming triggered by DNMT1 suppression is the key step for cancer cells to survive in the brain microenvironment, which in turn can cause cancer cell dormancy in brain metastasis.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

当研究室は 2018 年 9 月 1 日に発足した。

（１）脳転移休眠がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明

がん脳転移マウスモデルを用いた１細胞レベルでの遺伝子発現解析により、脳転移

がん細胞の休眠維持と離脱に係っていると考えられる分子として DNA メチル化酵素（DNMT1）を同定し、脳特異的微小環境によるがん細胞の DNMT1 発現抑制ががん細胞の細胞周期進行を抑制すると同時に、脳転移形成に重要な役割を担う遺伝子群の発現を誘導することが明らかとなった。現在、この DNMT1 抑制をトリガーとする脳転移がん細胞のリプログラミングと細胞生存・休眠機構に関する論文を投稿準備中である。

（２）EGFR 変異を有する脳転移肺がん細胞の初期薬剤耐性機構に関する研究

EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 および PC9-BrM3 の脳転移巣は EGFR 阻害剤（ゲフィチニブ）に良好に応答するが、がん細胞は完全には消失しておらず脳組織内に散在する形で多数の細胞が Ki67 陰性の非分裂細胞として生存していることが明らかとなった。またこの初期薬剤耐性機構に活性化アストロサイトが関与している可能性が示唆されるデータを得た。またこれら生存がん細胞の 1 細胞トランスクリプトーム解析により、初期薬剤耐性に関わる分子・シグナル経路としてインターロイキンを中心とした複数のサイトカイン経路を同定した。

今後の計画として引き続き上記の研究を進めるとともに、京都大学複合原子力科学研究所・近藤夏子博士との共同研究として（３）グリオブラストーマ治療におけるホウ素中性子捕捉療法（Boron neutron capture therapy : BNCT）耐性機構に関する研究を、金沢大学ナノ生命科学研究所との共同研究として（４）FRET バイオセンサーの合理的設計手法に関する研究を、ダブリン大学・Yan Yan 博士およびシンガポール国立大学・Chwee Ming Lim 博士との国際共同研究として（５）ネオアンチゲン搭載型がんナノワクチン療法の開発に関する研究をそれぞれ推進する。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. **Hirata E***, Ichikawa T*, Horike S, Kiyokawa E. Active K-RAS induces the coherent rotation of epithelial cells: A model for collective cell invasion in vitro. Cancer Sci. 2018 Oct 3. doi: 10.1111/cas.13816. [Epub ahead of print] (*co-first author)

（共同研究）

該当なし

＜学会発表＞

（招待講演）

1.　**Hirata E**. Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis. 第 77 回日本癌学会学術総会　国際シンポジウム（大阪 2018 年 9 月 29 日）

2.　**Hirata E**. Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa Joint Symposium（金沢 2018 年 5 月 28 日）

（その他）

1.　平田　英周　脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明と新規治療法の開発 AMED 次世代がん医療創生研究事業／ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト企業向け成果発表会（東京 2018 年 3 月 9 日）

2.　平田　英周　脳転移がん細胞の謎を解く　金沢大学脳神経医学セミナー（金沢 2018 年 12 月 18 日）

＜外部資金＞

1.　基盤研究（C）［研究代表者 平田　英周］

「脳転移肺がん細胞の薬剤応答と初期耐性のキネティクス解析に基づく新規治療法の開発」1,430 千円

2.　アステラス病態代謝研究会助成金［研究代表者：平田　英周］

「脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明」 2,000 千円

＜その他＞

アステラス病態代謝研究会研究報告会 優秀発表賞・竹中奨励賞（東京 2018 年 10 月 20 日）

がん分子標的探索プログラム

Division of Molecular Cell Signaling
シグナル伝達研究分野

Professor	Katsuji Yoshioka 善岡 克次
Assistant Professor	Ryota Nakazato 中里 亮太（～ 2018.9.30）
Postdoctoral Researcher	I Ketut Gunarta
Graduate Student	Rong Li (～2018.9.30), Dewi Yuliana (D4), Jambaldoj Boldbaatar (D3), Ryusuke Suzuki 鈴木隆介 (D2), Purvee Erdenebaatar (D2), Ravdandorj Odongoo (D1)
Assistant Staff	Hisayo Inotani 猪谷 久世

【 Abstract 】

Chromosome segregation is one important step during mitosis, and errors in this process could lead to abnormal cell division and chromosomal instability, which are frequently observed in cancer cells. JSAP proteins, JSAP1 and JSAP2 (also known as JLP or SPAG9), were first identified as scaffold proteins for the MAP kinase (MAPK) signaling pathways. Subsequent studies showed that JSAPs are also able to function as adaptor proteins linking cargoes and kinesin/dynein motors. Increasing evidence suggests that the expression of JSAP proteins, particularly JSAP2 is increased in cancer. In addition, JSAP2 has been reported to interact with PLK1, a key mitotic kinase. To date, however, the role of JSAP in mitosis remains largely unknown. We investigated the functions of JSAP1 and JSAP2 by gene knockout, using a Cre-loxP system, in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). Our results (Fig. 1) suggest that JSAP1 and JSAP2 are critical and functionally redundant in mitotic chromosome segregation. We have also been studying the role of JSAP in oxidative stress-induced cell death. Tumor cells are known to maintain an increased level of reactive oxidative species (ROS), which is believed to be involved in tumor progression. However, high levels of ROS might induce oxidative stress that could lead to cell death. Several signaling pathways, including JNK MAPK, play an important role to maintain the balance of ROS generation and elimination, and therefore to protect the cell from oxidative stress-induced cell death. Although JNK is known to be activated in response to oxidative

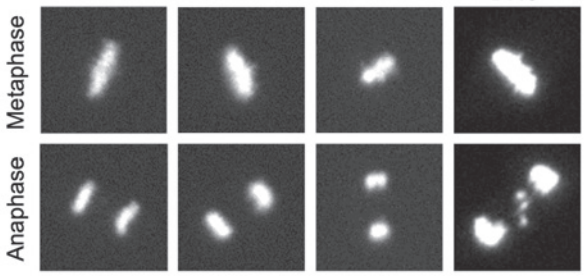


Figure 1. Chromosome segregation errors in JSAP1, 2 double KO MEFs during mitosis.

stress, the involvement of JSAP remains elusive. We showed that knockdown of JSAP2 enhanced the cell death (Fig. 2) and attenuated the JNK activation in response to H_2O_2. These responses were almost completely reversed by re-expression of a wild type JSAP2, but not its mutant lacking JNK-binding domain. Collectively our data suggest JSAP2-JNK pathway protects tumor cells from oxidative stress-induced cell death (Li and Gunarta *et al*. BBRC, 2018).

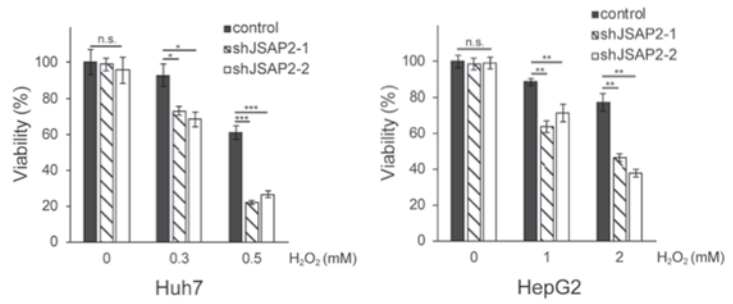


Figure 2. JSAP2 knockdown potentiates H_20_2-induced cancer cell death.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．JSAP による染色体分配制御

我々は，これまでに，*Jsap1, 2* 二重破壊が誘導可能なマウス胚性線維芽細胞（MEF）を解析し，JSAP は染色体分配制御に関わる重要な因子であり，JSAP 機能喪失は染色体不安定性を誘導することを示唆する結果を得ている。今回，γ-tubulin（中心体マーカー）に対する抗体を用いて *Jsap1, 2* ダブルノックアウト MEF を調べたところ，異常数（３つ以上）の中心体をもつ細胞が高頻度に認められた。ヒト RPE-1 細胞においても，同様の結果が得られている。今後，さらに解析を進め，JSAP による染色体分配制御の分子機構を明らかにする。

２．酸化ストレス誘導性細胞死における JSAP2 の役割とその分子メカニズム

活性酸素がもたらす細胞死については不明な点が多く，十分に理解されていない。*JSAP2* ノックダウン（KD）細胞，及び野生型あるいは変異型（JNK との結合能を欠く）JSAP2 を用いたレスキュー実験を行い，JSAP2-JNK シグナル伝達経路は H_2O_2 誘導性細胞死に対して抑制的に働くことを明らかにした（Li *et al*, BBRC, 2018）。

３．JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御

リソソームはタンパク質や脂質など、様々な生体高分子を分解する重要なオルガネラである。近年，リソソーム機能障害は従来から知られているリソソーム病に加え，神経変性疾患やがんとの関連も指摘され，注目を集めている。今年度，我々は，リソソームの細胞内局在に焦点を当てた研究に着手した。*JSAP2* KD 細胞を調べ，JSAP2 はリソソーム細胞内局在の制御因子として働くことを示唆する予備的結果を得た。今後，詳細な解析を行い，JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御機構を明らかにする。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K. JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 501(3): 724-730, 2018.

（共同研究）

1. Fukuoka M, Yoshioka K, Hohjoh H. NF-κB activation is an early event of changes in gene regulation for acquiring drug resistance in human adenocarcinoma PC-9 cells. ***PLoS One.*** 13(8): e0201796, 2018.
2. Shirasaki T, Honda M, Yamashita T, Nio K, Shimakami T, Shimizu R, Nakasyo S, Murai K, Shirasaki N, Okada H, Sakai Y, Sato T, Suzuki T, Yoshioka K, Kaneko S. The osteopontin-CD44 axis in hepatic cancer stem cells regulates IFN signaling and HCV replication. ***Sci Rep.*** 8(1): 13143, 2018.

＜学会発表＞

１．中里亮太，Jambaldorj Boldbaatar, Dewi Yuliana, 鈴木隆介，善岡克次：細胞分裂における JSAP の機能解析，第 1 回金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所　若手研究発表会，2018 年 7 月 5 日，七尾

２．Gunarta IK, Yoshioka K. Protective role of JLP-JNK pathway against oxidative stress-induced cell death. 第 77 回日本癌学会学術総会，2018 年 9 月 28 日，大阪

３．Gunarta IK, Nakazato R, Erdenebaatar P, Boldbaatar J, Suzuki R, Yoshioka K. Functional role of JSAP in mitotic chromosome segregation. 第 41 回日本分子生物学会年会，2018 年 11 月 29 日，横浜

＜外部資金＞

１．科学研究費補助金 基盤研究（C）（研究代表者：善岡 克次）「JSAP による細胞内輸送制御の破綻に起因する神経細胞死と染色体分配異常の分子機構」1,300 千円

２．科学研究費補助金 若手研究 (B)（研究代表者：中里 亮太）「JSAP による染色体分配制御とその破綻がもたらすがんの発生・悪性化の分子機構」1,100 千円

Division of Translational and Clinical Oncology
腫瘍制御研究分野

Professor	Toshinari Minamoto 源 利成
Assistant Professor	Takahiro Domoto 堂本貴寛
Postdoctoral Researcher	Ilya V. Pyko ピコ イリア
Graduate Student	Dilireba Bolidong (D3), Hiroyoshi Nakanishi 中西宏佳 (D2), Masahiro Uehara 上原将大 (D2), Ryosuke Ota 太田亮介 (D1), Kensaku Abe 阿部健作（整形外科学）, Satoshi Takenaka 竹中 哲（消化器・腫瘍・再生外科学）, Hirotaka Kitamura 北村祥貴（先進総合外科学；～2018. 3. 31）
MRT* Program Student	Shuhei Morita 守田周平, Takashi Ishida 石田 岳（2018. 12.～）
Assistant Staff	Atsuko Asaka 浅香敦子, Naoko Abe 阿部尚子（組織バンク）

*MRT: Medical research training

【 Abstract 】

The mission of our division centers on laboratory and clinical research to develop the novel strategies and modalities for diagnosis and treatment of the gastrointestinal, refractory and rare cancers including glioblastoma, osteosarcoma and soft tissue sarcomas. Research projects are based on biological characteristics of individual tumor types that are relevant to their invasive and metastatic potential, resistance to therapy, recurrence and outcome of patients. Our current efforts are focused on (1) research and development of the cancer therapy by targeting aberrant glycogen synthase kinase (GSK) 3β; (2) understanding of malignant phenotypes of cancer by investigating pathological metabolic properties (eg., aerobic glycolysis, tumor-promoting autophagy); and (3) biological basis of gastrointestinal and refractory cancers for clinical translation. We have been also establishing the tissue material resources of human stomach and colorectal cancer for our own projects described above as well as for studies collaborating with our institutional and many other research groups. In an immediate couple of years, we have obtained the preliminary results indicating the putative roles of tumor GSK3β as a molecular hub that connects the pathways responsible for tumor invasion and resistance to therapy, thus enforcing its potential as a major cancer therapeutic target. We are extending this project toward investigation of the putative roles for GSK3β in promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC; the major type of esophageal cancer in Asia and Japan) and acquiring chemoresistance in pancreatic cancer. In this year, we have planned a study for development of cellular and mouse models predisposing to ESCC by CRISPR-Cas9-based genome editing of the metabolic enzymes including glycogen synthase and GSK3β.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

1．glycogen synthase kinase (GSK) 3β 阻害によるがん治療法の研究，開発

Wnt 経路抑制因子と認識されている GSK3β が固有の分子経路を介して，がんの主要な悪性形質を推進することを系統的に示してきた。そして，GSK3β 阻害の強力で特異的ながん治療効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。また，本学脳神経外科学，整形外科学，消化器・腫瘍・再生外科学，金沢医大総医研などと連携し，膵がん，膠芽腫や骨軟部肉腫などの難治，希少がんで高活性を示す GSK3β が，高度の腫瘍浸潤性と治療（抗がん剤，放射線）不応性の悪性形質を連結することを見出した。一連の研究をもとに，GSK3β 阻害薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を開発し，再発膠芽腫（附属病院脳神経外科）と進行膵がん（金沢医科大学病院）を対象とする臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を試験してきた（UMIN000005111，000005095）。現在，GSK3β ががんの根源的特性である糖代謝改変と核分裂機構に共通の促進機能を示すかを検討している。また，GSK3β のがん促進理論の強化のため，その機能解析を患者由来膠芽腫スフェア（幹細胞），食道扁平上皮がん，ラット食道発がんモデル，抗がん剤耐性獲得膵がんや整形外科領域の軟部肉腫を対象に開始した。

2．がんの代謝特性にもとづく悪性形質の解析研究

GSK3β は糖代謝の初期段階でグリコーゲン代謝を制御するという観点から，がん固有の糖代謝改変（Warburg 効果）に関わる触媒酵素やがん促進性自食作用に対する GSK3β の機能解析を進めている。とくに，特定の中間代謝産物が解糖経路と自食作用の接点になるという最近の報告をもとに，これらの代謝経路における GSK3β の機能を統合的に明らかにすることを目的とする。これとはべつに，食道の扁平上皮発がん初期の生物学的特性は細胞内グリコーゲンの減少，消失である。この点に鑑み，患者由来の正常食道扁平上皮細胞とマウスを対象に，グリコーゲン合成酵素と GSK3β のゲノム編集による食道扁平上皮易発がん状態の誘発を試みる研究を開始した。

3．ヒト消化管がん組織バンクを中心とする大腸がんの分子病理学的研究

消化管がん研究や臨床研究の基礎資源として 2008 年から本事業を開始し，2010 年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承して現在に至っている。この組織資源の共同利用を促進するために，日本医療研究開発機構ゲノム医療支援ポータルサイト（http://www.biobank.amed.go.jp/biobank/index.html）に情報公開した。共同研究者：竹田 扇教授ら（山梨大学）が開発した大気圧イオン化法−質量分析を用いて 2014 年より，大腸がん迅速診断法開発の基礎検討を開始した。大腸組織検体の質量分析パターンをもとに特有の統計解析と機械学習を組合わせて非がん/がんの判別（診断）アルゴリズムを構築し，90%以上の感度と特異度による判別を可能にした（論文作成予定）。現在，解析症例/検体数を増やすとともに，帝京大学，島津製作所基盤技術研究所と本学消化器外科学と共同で，大腸がんの質量分析-内視鏡診断法を目指して，内視鏡デバイスの考案，開発に着手した。

【 研 究 業 績 】

[註] 下線は研究室メンバーと研究協力員

＜発表論文＞

原著

1. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZW, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M. Interleukin 1 upregulates microRNA 135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice. Gastroenterology, 2019, in press. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.059

2. Kitamura H, Takemura H, Minamoto T. Tumor p16^{INK4} gene expression and prognosis in colorectal cancer. Oncol Rep, 2019, in press. doi: 10.3892/or.2018.6884

3. Dewi FRP*, Domoto T*, Hazawa M, Kobayashi A, Douwaki T, Minamoto T**, Wong RW**. (*equal contribution; **co-corresponding authors) Colorectal cancer cells require glycogen synthase kinase-3β for sustaining mitosis via translocated promotor region (Tpr)-dynein interaction. Oncotarget 9 (17):13337-52, 2018. doi: 10.18632/oncotarget.24344

著書・総説

4. Minamoto T. Detection and characterization of oncogene mutations in preneoplastic and early neoplastic lesions. Methods Mol Biol 2019, in press.

＜学会発表＞

1. 堂本貴寛. 大腸がんの腫瘍促進的エネルギー代謝における GSK3β の病理作用. 第 5 回日本消化器癌発生学会特別推進研究　理事長直轄プロジェクト「癌代謝からみた発癌・進展メカニズム解明の新展開」, 2018 年 2 月 2 日（金）, 徳島大学病院　日亜ホールブルー, 徳島市.

2. 中西宏佳, 土山寿志, 石川秀樹, 八尾建史. 胃病変に対する NBI 併用拡大内視鏡診断能の向上を目的とした e-learning system の有用性に関する検討：多施設共同無作為割付試験. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会, 2018 年 2 月 9 日（金）, 京王プラザホテル, 東京.

3. Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiro Hayashi, Akihiko Takeuchi, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hisaki Aiba, Yoshihiro Araki, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Novel molecular therapy targeting aberrant glycogen synthase kinase-3β in soft tissue sarcoma. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting 2018, March 6 (Tue)-10 (Sat), 2018, Ernest N. Memorial Convention Center, New

Orleans, Louisiana, U.S.A.

4. 宮下知治，源　利成，太田哲生．バレット食道から発癌過程での微小環境の変化とGSK3β 阻害による抑制．第 104 回日本消化器病学会総会，ワークショップ1「バレット腺癌の基礎と臨床」，2018 年 4 月 19 日（木）～21 日（土），京王プラザホテル，東京．

5. Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiro Hayashi, Akihiko Takeuchi, Kentaro Igarashi, Yuta Taniguchi, Yoshihiro Araki, Hirotaka Yonezawa, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Novel molecular therapy targeting aberrant glycogen synthase kinase-3β in soft tissue sarcoma: A basic research. 19th European Federation of National Association of Orthopaedics and Traumatology (EFFORT) Congress, FIRA de Barcelona, May 30 (Wed)-June 01 (Fri), 2018, Barcelona, Spain.

6. Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto, Daisuke Matsui, John W Harmon, Tetsuo Ohta. Inhibitor of GSK3β impedes the development of reflux-induced esophageal cancer in a surgical rat model. Digestive Disease Week (DDW) 2018, June 2-5, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, U.S.A.

7. Takahiro Domoto, Ilya V. Pyko, Dilireba Bolidong, Masahiro Uehara, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase 3β induces protooncogenic autophagy in colon cancer. 堂本貴寛，ピコ　イリア，ボリドン　ディリレバ，上原将大，源　利成．GSK3β は大腸がんのがん原性オートファジーを促進する．第 77 回日本癌学会学術総会，2018 年 9 月 27 日（木）－29 日（土），大阪国際会議場，大阪市．

8. Takeshi Sawada, Hiroyoshi Nakanishi, Yasushi Sasaki, Eiichiro Yamamoto, Hironori Aoki, Makoto Eizuka, Naoki Takahashi, Ryosuke Ota, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Toshinari Minamoto, Tamotsu Sugai, Hiromu Suzuki. Integrative analysis of gene mutations, copy number alterations and DNA methylation in colorectal serrated lesions. 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 27 日（木）－29 日（土），大阪国際会議場，大阪市．

9. Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. Involvement of aberrant GSK3β in tumor-promoting autophagy in colorectal cancer. The Joint Symposium of the 13th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences and the 28th Hot Spring Harbor International Symposium 2018, October 18 (Thu), 19 (Fri), 2018, Kyushu University, Fukuoka, Japan.

10. Takeshi Sawada, Hiroyoshi Nakanishi, Yasuharu Kaizaki, Yasushi Sasaki, Eiichiro Yamamoto, Hironori Aoki, Makoto Eizuka, Naoki Takahashi, Kenkei Hasatani, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Ryosuke Ota, Yuko Yanase, Satoko Inagaki, Shinya Yamada, Toshinari Minamoto, Hiromu Suzuki, Tamotsu Sugai. Integrative analysis of gene mutations and DNA methylation in colorectal serrated lesions. 26th United European Gastroenterology (UEG) Week 2018, October 20-24, 2018, Vienna, Austria.

11. 中西宏佳, 澤田 武, 海崎泰治, 佐々木泰史, 山本英一郎, 青木敬則, 永塚 真, 高橋直樹, 波佐谷兼慶, 久保田英嗣, 片岡洋望, 太田亮介, 稲垣聡子, 山田真也, 源 利成, 鈴木 拓, 菅井 有. 大腸鋸歯状病変における遺伝子変異, メチル化の統合解析. Japan Digestive Disease Week (JDDW) 2018/第 26 回日本消化器関連学会週間, 2018 年 11 月 1 日(木)～4 日(日), 神戸コンベンションセンター, 神戸.

12. Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. GSK3β participates in tumor-promoting metabolism in colon cancer. 堂本貴寛, 源 利成. GSK3β は大腸がんの腫瘍促進的エネルギー代謝を推進する. 第 29 回日本消化器癌発生学会総会:理事長直轄プロジェクト, 2018 年 11 月 16 日(金), 17 日(土), 都市センターホテル, 東京.

13. Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto, Daisuke Matsui, Yoshinao Ohata, Shin-ichi Nakanuma, Isamu Makino, Hidehiro Tajima, Hiroyuki Takamura, Sachio Fushida, Tetsuo Ohta. Impact of inflammation-metaplasia-adenocarcinoma (IMA) sequence and inflammatory microenvironment in esophageal carcinogenesis and inhibition of GSK3β impedes the development of reflux-induced esophageal cancer in surgical rat model. 宮下知治, 源 利成, 松井大輔, 大畠慶直, 中沼伸一, 牧野 勇, 田島秀浩, 高村博之, 伏田幸夫, 太田哲生. バレット食道から発癌過程での微小環境の変化と GSK3β 阻害による抑制. 第 29 回日本消化器癌発生学会総会:シンポジウム4. がんメタボローム－マルチオミックスによる複雑性の統一, 11 月 16 日(金), 17 日(土), 都市センターホテル, 東京.

14. Takeo Shimasaki, Satoko Yamaoto, Toshinari Minamoto. Changes in subcellular localization and secretion of exosome in pancreatic cancer cells under exposure to sublethal (low-dose) chemotherapeutic agents. 島崎猛夫, 山本聡子, 源 利成. 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, 11 月 16 日(金), 17 日(土), 都市センターホテル, 東京.

＜知的財産＞

該当なし

＜外部資金＞ 2018 年が含まれる課題. 下線は研究室メンバーと研究協力員

1. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金（挑戦的研究 萌芽）: 課題番号 18K19577
   源 利成（代表）, 大黒多希子, ほか（分担）
   課題: 代謝酵素ゲノム編集による食道扁平上皮の易発がん状態誘発の試み
   研究経費: 6,240,000 円

2. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金（若手研究）: 課題番号 18K16553
   ピコ イリア（Ilya V. Pyko）（代表）
   課題: Investigation of putative roles for GSK3β in glioblastoma stemness phenotype and the underlying biological mechanisms
   研究経費: 4,160,000 円

3. 2018 年－2020 年度 科学研究費補助金（基盤研究C）: 課題番号 18K07983
   島崎猛夫（代表）, 源 利成（連携）, ほか
   課題: 膵がん細胞の exosome を介した浸潤性伝播の解明とその抑制剤の開発
   研究経費: 4,420,000 円

4. 2017 年－2018 年度 科学研究費補助金（若手研究B）: 課題番号 17K15022
   堂本貴寛（代表）
   課題: GSK3βが制御するがん特異的エネルギー獲得機構の解明とがん治療への応用
   研究経費: 3,300,000 円

5. 2017 年－2019 年度 科学研究費補助金（基盤研究C）: 課題番号 17K08655
   Richard Wong（代表）, 源 利成（連携）, ほか
   課題: 核膜孔タンパク質とクロマチン相互作用による大腸がんの病態解明
   研究経費: 3,700,000 円

6. 2016 年－2018 年度 科学研究費補助金（基盤研究C）: 課題番号 16K10751
   宮下勝吉（代表）, 源 利成（連携）, ほか
   課題: GSK3βを分子標的とする神経膠芽腫治療の基礎基盤の確立
   研究経費: 4,680,000 円

7. 2018 年度島津製作所共同研究
   源 利成（代表）
   課題: 疾患サブタイプ判別アルゴリズムの実用化研究
   研究経費: 500,000 円

＜その他＞　講演など

1. 源　利成. 大腸がんのしくみと医療の最前線. 金沢大学公開講座:がん医療の最前線, 2018 年 06 月 09 日(土), 金沢市西町教育研修館　サテライトプラザ, 金沢市.

2. 源　利成. GSK3β とがん生物学. 東京都健康長寿医療センター　第 4 回老年病理学研究セミナー. 2018 年 10 月 12 日(金), 東京都健康長寿医療センター, 東京.

Division of Functional Genomics
機能ゲノミクス研究分野

Professor	Takeshi Suzuki　鈴木 健之
Assistant Professor	Akihiko Ishimura　石村 昭彦,
	Minoru Terashima　寺島 農
Graduate Student	Sasithorn Wanna-Udom (D3)
Research Student	Hanbing Lyu
Assistant Staff	Atsuko Odawara　小田原 敦子

【 Abstract 】

Retroviral insertional mutagenesis in mice is considered a powerful forward genetic strategy to identify novel cancer genes. Our high-throughput screens led to frequent identification of the genes encoding histone methyl-modifying enzymes. Many of these enzymes are involved not only in tumor initiation but also in malignant progression such as drug resistance, cell invasion and epithelial-mesenchymal transition (EMT). We have shown that Polycomb repressive complex-2 (PRC2), which regulates the methylation of K27 of histone H3, is essential for gene expression program in EMT. During the investigation of molecular mechanism of PRC2 function, we discovered the involvement of *MEG3* long noncoding RNA (lncRNA) in the selection of specific target genes by PRC2. This year we investigated the function of another lncRNA, *MEG8*. The expression of *MEG8* was immediately induced during TGF-beta-mediated EMT of lung and pancreatic cancer cell lines as with *MEG3*. Overexpression of *MEG8* specifically suppressed the expression of *microRNA-34a* and *-203* genes, resulting in upregulation of SNAI1 and SNAI2 transcription factors for the repression of *E-cadherin*. Mechanistic investigations revealed that *MEG8* associated with EZH2 protein in PRC2 complex and induced its recruitment to the regulatory regions of specific target genes for H3K27 methylation and transcriptional repression. Interestingly, expression of both *MEG8* and *MEG3*, but not each individually, could induce EMT-related cell morphological changes and increased cell motility in the absence of TGF-beta by activating the gene expression program required for EMT. Knockdown of *MEG8* indicated that endogenous *MEG8* was indispensable for TGF-beta-induced EMT in cancer cells. These results demonstrate a novel functional significance of the long noncoding RNAs in the epigenetic control of cancer progression.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．がん細胞の EMT における MEG8 長鎖非コード RNA の役割

EMT の進行を司る遺伝子発現プログラムにおいて，ヒストン H3K27 メチル化酵素複合体（PRC2）の活性制御が重要である。今年度は，PRC2 の標的遺伝子選択特異性に長鎖非コード RNA（lncRNA）が中心的役割を果たすことを見い出した。TGF-beta で誘導されるがん細胞の EMT において，２種類の lncRNA, MEG3 と MEG8 は即座に一過的に発現誘導される。MEG3 と MEG8 の強制発現は，特異的な microRNA の発現抑制を介して，それぞれ ZEB ファミリー及び SNAIL ファミリー転写制御因子の発現を活性化し, E-Cadherin の発現抑制を引き起こした。これは, MEG3 と MEG8 が, PRC2 複合体の JARID2 因子及び EZH2 酵素とそれぞれ相互作用して，異なる標的遺伝子に PRC2 をリクルートし，ヒストンメチル化を誘導した結果であることが示された。さらに, MEG3 と MEG8 の共発現では，各単独発現では見られない EMT に伴う細胞形態の変化や細胞運動性の亢進が観察された。すなわち, lncRNA はがん悪性進展のエピジェネティック制御において中心的な役割を担っており，その機能を解明することは，新しいアプローチによるがん治療戦略の開発に貢献できると期待される。

２．がん悪性形質獲得に関与するエピジェネティック制御因子の探索

がん悪性進展の際のエピジェネティック制御の重要性を調べるために，ドライバー変異導入がん細胞株の悪性形質獲得に対して協調的に働くエピジェネティック制御因子を CRISPR/Cas9 スクリーニング法によって探索している。今年度は，*P53* 欠損 MCF7 細胞とヒストン脱メチル化酵素 sgRNA サブライブラリーを用いて，スフィア形成を指標にスクリーニングを行った。その結果，以前にがん抑制遺伝子候補として報告した KDM8 を含む複数のヒストン脱メチル化酵素が同定された。これらの候補因子は，TCGA 解析でもその発現低下とがん悪性度との相関性が確認され，本スクリーニングによって効率的に目的の因子が同定できることが示された。今後，数種類のドライバー変異導入がん細胞株を用いてスクリーニングを継続し，エピジェネティック制御因子とドライバー変異との新しい関係性を探索していきたい。

３．ヒストンメチル化修飾分布に基づく EMT 制御転写因子の探索

私たちはこれまでに, EMT に関与する遺伝子発現の制御に，ヒストンメチル化制御酵素によるゲノム上の H3K4me3 修飾の再構成が重要であることを示してきた。一方, H3K4me3 修飾は，それぞれの細胞の特異性を決定する重要な遺伝子座に，より広範囲にマークされることが報告されている。そこで, EMT 進行を司る新しい因子を探索するために，EMT 誘導の前後で H3K4me3 修飾の ChIP-seq 解析を行い，誘導後に H3K4me3 修飾の範囲が拡大する遺伝子をスクリーニングした。得られた候補には, SNAIL や SLUG など既知の EMT を制御する転写因子に加えて, EMT との関係性が未知の転写因子が複数含まれていた。今後，これらの転写因子の役割を解明し，がん転移過程における EMT 制御の理解に貢献したい。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. Terashima M, Ishimura A, Wanna-Udom S and Suzuki T. MEG8 long noncoding RNA contributes to the epigenetic progression of epithelial-mesenchymal transition of lung and pancreatic cancer cell lines. J Biol. Chem., 293(47):18016-18030, 2018.

＜学会発表＞

国際学会

1. Suzuki T. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. Joint Symposium of SNU-GCRC and KU-CRI on Tumor Biology. (Kanazawa 2018 年 5 月)
2. Suzuki T. Functional characterization of histone methyl-modifying enzymes during malignant progression of cancer. The 8th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology. (Shanghai 2018 年 9 月)

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Long noncoding RNAs contribute to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 第77回日本癌学会学術総会（大阪2018年9月）
2. Fukuda K, Takeuchi S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Suzuki T, Takeuchi K, Nishio M and Yano S. Epithelial to mesenchymal transition as an independent mechanism of ALK inhibitor resistance in EML4-ALK lung cancer. 第77回日本癌学会学術総会（大阪2018年9月）
3. Ishimura A, Wanna-Udom S, Tange S, Terashima M and Suzuki T. Screening of histone demethylases related to breast cancer malignancy. 第41回日本分子生物学会年会（横浜2018年11月）
4. Terashima M, Ishimura A, Nishimura T, Tange S, Murata K, Kadozaki K and Suzuki T. Screening for novel epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factors in cancer cells. 第41回日本分子生物学会年会（横浜2018年11月）
5. Suzuki T, Terashima M, Wanna-Udom S, Ishimura A and Shibata M. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by the long noncoding RNAs in cancer cells. 第41回日本分子生物学会年会（横浜2018年11月）
6. Terashima M. ヒストンメチル化を指標にした上皮間葉転換を活性化する新規転写因子の探索. 第5回北陸エピジェネティクス研究会（富山2018年12月）

＜外部資金＞

1.　文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究（C）, 研究代表者　寺島農,　1,400 千円
　研究課題名「上皮間葉転換を制御する lncRNA の探索とその機能の解明」

がん分子標的医療開発プログラム

Division of Medical Oncology
腫瘍内科研究分野

Professor	Seiji Yano 矢野 聖二
Lecturer	Koshiro Ohtsubo 大坪 公士郎，Shinji Takeuchi 竹内 伸司
Assistant Professor	Kaname Yamashita 山下 要，Azusa Tanimoto 谷本 梓
	Akihiro Nishiyama 西山 明宏，Koji Fukuda 福田 康二
	Yuta Adachi 足立 雄太，Sakiko Ohtani 大谷 咲子
Assistant	Sachiko Arai 新井 祥子
Graduate Student	Chiaki Suzuki 鈴木 千晶 Naohiro Yanagimura 柳村 尚寛
Master Researcher	Rong Wang 王 融
Assistant Staff	Junko Dohbayashi 堂林 淳子 Tomoko Kohori 小堀 朋子
	Miyuki Kino 木野 美雪

【 Abstract 】

Our researches focus on clarifying mechanism of targeted drug resistance and circumvention of the resistance in various types of cancers with driver oncogenes. In this year, we reported the mechanism of drug resistance of tumors with the neurotrophic tropomyosin receptor kinase 1 (NTRK1)-fusion gene and lung cancer cells with BRAF mutations.

The central nervous system (CNS) is a sanctuary site from targeted drugs. However, the mechanism of targeted drug resistance in CNS tumors is largely unknown. Entrectinib, an inhibitor of multiple kinases such as ALK, ROS1, and TRK, is clinically effective in the treatment of cancer patients with rearrangements in ALK, ROS1, and NTRK1. Although entrectinib has initial activity against CNS metastases, resistance usually develops. We found that the NTRK1-G667C mutation, which causes moderate resistance to entrectinib *in vitro*, could be detected in a brain metastasis model when acquired resistance to entrectinib was induced. Furthermore, we demonstrated that foretinib could inhibit the phosphorylation of tyrosine receptor kinase A (TRK-A) with the G667C mutation and overcome entrectinib resistance in the animal models for liver and brain metastases. Our findings provide a rationale for clinical trials with foretinib in cancer patients with entrectinib-resistant tumors harboring the NTRK1- G667C mutation, including patients with brain metastases.

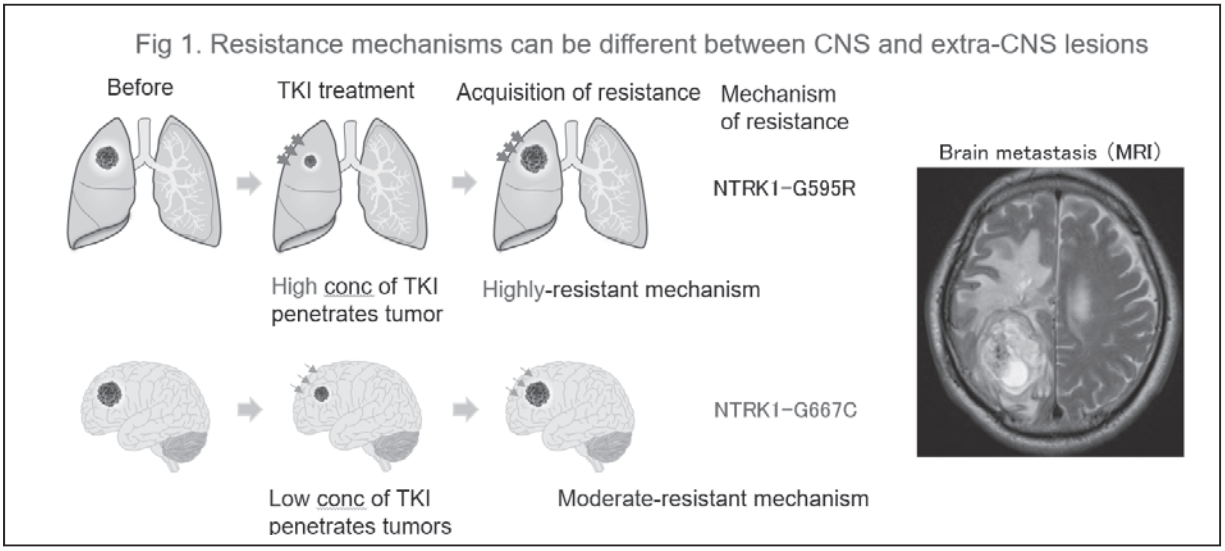
BRAF mutations, including V600E, are detectable in 1% of lung cancer. Despite the successes of treating BRAF V600E mutant lung cancer with BRAF pathway inhibitors, treatment strategies targeting tumors with non-V600E mutations are yet to be established. We found that although BRAF V600E mutant cells are sensitive to BRAF inhibition, non-V600E mutant cancer cells are reliant on receptor tyrosine kinases (RTKs), including EGFR and

FGFR, for their MAPK activation and inhibition of both MEK and RTKs is necessary for controlling these cancers. These results were recapitulated with a clinically relevant dual inhibitor of EGFR and RAF, BGB-283. Our findings provide evidence of critical survival signals in BRAF non-V600E mutant cancers, which could pave the way for effective treatment of these cancers.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．NTRK1 融合遺伝子陽性がんの脳転移における分子標的薬耐性機構と克服

NTRK1 融合遺伝子は様々ながん種で検出され, TRK 阻害薬（エントレクチニブ等）の臓器横断的治療標的として注目されている。TPM3-NTRK1 融合遺伝子陽性大腸がん細胞株のマウス脳転移モデルでエントレクチニブ耐性を誘導し，1) 高度耐性を惹起する NTRK1-G595R ではなく中等度耐性を惹起する NTRK1-G667C 変異により耐性化していること, 2) 別の分子標的薬フォレチニブが NTRK1-G667C に高い阻害活性を有し，エントレクチニブ耐性の脳転移にも有効であることを明らかにした (Fig. 1)。今後は，NTRK1-G595R と G667C の両者に有効な化合物の開発を目指す。



２．BRAF 変異肺がんの分子標的薬抵抗性機構と克服

BRAF 遺伝子変異は V600E とそれ以外の non-V600E 変異がそれぞれ肺がんの約 0.5%に存在する。V600E 変異肺がんと異なり，non-V600E 変異肺がんでは，1) MEK 阻害後にフィードバック機構により MAPK 経路が再活性化されること，2) EMT の状態から上皮型と間葉型に分類でき, MEK 阻害後に上皮型は EGFR が活性化するため，EGFR 阻害薬を併用することで増殖を阻害できることや，間葉型は FGFR1 が活性化するため，FGFR1 阻害薬を併用することで増殖を阻害できることを見出した。これらの研究成果をもとに医師主導治験が，BRAF-nonV600E 変異陽性の大腸がん患者を対象に開始され，本研究成果は治験として導出された。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（研究室主体）

1. 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 10(1) 259. doi:10.1038/s41467-018-08074-0.

2. Tanimoto A, Takeuchi S, Kotani H, Yamashita K, Yamada T, Ohtsubo K, Ebi H, Ikeda H, Yano S. Pulmonary carcinosarcoma showing an obvious response to pazopanib: a case report. **BMC Pulmonary Medicine,** 2018 Dec 12;18(1):193. doi: 10.1186/s12890-018-0757-7.

3. Nishiyama A, Yamada T, Kita K, Wang R, Arai S, Fukuda K, Tanimoto A, Takeuchi S, Tange S, Tajima A, Furuya N, Kinoshita T, Yano S. Foretinib overcomes entrectinib resistance associated with the *NTRK1* G667C mutation in *NTRK1* fusion-positive tumor cells in a brain metastasis model. **Clin Cancer Res,** 2018 24:2357-69.

4. Kotani H, Adachi Y, Kitai H, Tomida S, Bando H, Faber AC, Yoshino T, Voon DC, Yano S, Ebi H. Distinct dependencies on receptor tyrosine kinases in the regulation of MAPK signaling between BRAF V600E and non-V600E mutant lung cancers. **Oncogene,** 2018 37:1775-87.

（共同研究）

1. Arasada RR, Shilo K, Yamada T, Zhang J, Yano S, Ghanem R, Wang W, Takeuchi S, Fukuda K, Katakami N, Tomii K, Ogushi F, Nishioka Y, Talabere T, Misra S, Duan W, Fadda P, Rahman MA, Nana-Sinkam P, Evans J, Amann J, Tchekneva EE, Dikov MM, Carbone DP. Notch3-dependent β-catenin signaling mediates EGFR TKI drug persistence in EGFR mutant NSCLC. **Nat Commun,** 2018 Aug 10;9(1):3198. doi: 10.1038/s41467-018-05626-2.

2. Yamada T, Amann JM, Tanimoto A, Taniguchi H, Shukuya T, Timmers C, Yano S, Shilo K, Carbone DP. Histone deacetylase inhibition enhances the antitumor activity of a MEK inhibitor in lung cancer cells harboring RAS mutations. **Mol Cancer Ther,** 2018 17:17-25.

3. Kitade H, Ohtsubo K, Hokkoku K, Mori M, Osamura RY, Sakuma H, Nakai M, Yano S. A case of advanced pancreatic neuroendocrine tumor in which octreotide long-acting repeatable was effective after failure of everolimus and sunitinib. **Int. Cancer Conference J,** on line 2018.

4. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. **Oncogene**, 2018 Dec 7. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1. [Epub ahead of

print]

5. Nishikawa Y, Kohno A, Takahashi Y, Suzuki C, Kinoshita H, Nakayama T, Tsubokura M. Stable Iodine Distribution among Children after the 2011 Fukushima Nuclear Disaster in Japan: An Observational Study. **J Clin Endocrinol Metab**, 2018 Dec 10. doi: 10.1210/jc.2018-02136. [Epub ahead of print]

著書・総説

1. 矢野聖二. 肺がんのゲノム医療. **日本医師会雑誌** 147(7): 1385-8, 2018

2. 大坪公士郎, 蒲田敏文. 他科のエキスパートにお尋ねしますーここを教えていただけますか？膵臓編. **画像診断** 38 (2): 227-9, 2018

3. 大谷咲子, 矢野聖二. 肺癌の新規分子標的薬の開発と併用療法 **THE LUNG** 26(4): 53-6, 2018

4. 鈴木千晶, 清田尚臣. 各臓器がんに対する免疫チェックポイント阻害薬の現状について「頭頸部癌」. **がん分子標的治療** 15(4): 27-30, 2018.

＜学会発表＞

1. 第 13 回トランスレーショナルリサーチワークショップ「エピゲノム研究の飛躍的進歩がもたらすがん治療へのインパクト」 矢野聖二. HDAC 阻害薬併用による肺がん分子標的薬耐性克服の試み. 2018 年 1 月 東京

2. 第 115 回日本内科学会講演会 谷本 梓, 森 新太郎, 足立雄太, 西山明宏, 竹内伸司, 山下 要, 大坪公士郎, 板谷勇輝, 矢野聖二. 北信がんプロ・地域がんデータベースによるがん対策立案に向けた金沢大学附属病院での基礎的検討 2018 年 4 月 京都

3. 医学生･研修医の日本内科学会ことはじめ 2018 in 京都. 森 新太郎, 谷本 梓, 西山明宏, 足立雄太, 竹内伸司, 大坪公士郎, 矢野聖二. オシメルチニブ治療に対し早期に耐性化し，その分子機構を基礎的に検討しえた T790M 陽性 EGFR 変異肺がんの一例. 2018 年 4 月 京都

4. 第 104 回日本消化器病学会総会 大坪公士郎, 山下 要, 田島秀浩, 太田哲生, 池田博子, 矢野聖二. IPMN 関連膵癌における EUS の診断能に関する検討. 2018 年 4 月 東京

5. 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会　竹内伸司.　上皮間葉転換（EMT）による ALK-TKI 耐性機構.　2018 年 5 月　東京

6. 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会　西山明宏,　谷本 梓,　竹内伸司,　矢野聖二.　臓器間 heterogeneity と osimertinib 耐性.　2018 年 5 月　東京

7. 第 42 回日本頭頸部癌学会　鈴木千晶,　清田尚臣,　今村善宣,　宮脇大輔,　大月直樹,　丹生健一,　佐々木良平,　南　博信.　甲状腺癌気道浸潤例に対する放射線外照射の有効性の検討.　2018 年 6 月　東京

8. 第 49 回日本膵臓学会大会　大坪公士郎,　山下　要,　矢野聖二.　当科における EUS-FNA による述語膵炎症例に関する検討.　2018 年 6 月　和歌山

9. 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会　大坪公士郎,　山下　要,　柳村尚寛,　鈴木千晶,　大谷咲子,　足立雄太,　谷本　梓,　西山明宏,　竹内伸司,　志村裕介,　原祐輔,　寺島健志,　渡辺知志,　篁　俊成,　米谷充弘,　濱口　毅,　前田進太郎,　矢野聖二.　当院における免疫チェックポイント阻害薬副作用対策チームの取り組み.　2018 年 7 月　神戸

10. 第16回日本臨床腫瘍学会学術集会　西山明宏,　山田忠明,　北　賢二,　佐藤悠城,　足立雄太,　谷本　梓,　竹内伸司,　田嶋　敦,　木下誉富,　矢野聖二.　NTRK1 融合遺伝子陽性癌における entrectinib 耐性機構の解明と耐性克服薬開発.　2018 年 7 月　神戸

11. 第 16 回日本臨床腫瘍学会学術集会　Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Rikitake J, Sai S, Hyogo Y, Nagatani Y, Funakoshi Y, Toyoda M, Minami H. Efficacy and Safety of Nivolumab for Previously Treated Non-squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck: a Case Series in a Single Institution.　2018 年 7 月　神戸

12. 第 77 回日本癌学会学術総会　竹内伸司,　矢野聖二.　肺がんのアポトーシス抵抗性に起因する分子標的薬耐性を克服する橋渡し研究.　2018 年 9 月　大阪

13. 第 77 回日本癌学会学術総会　福田康二,　竹内伸司,　片山量平,　南條成輝,　谷本　梓,　鈴木健之,　竹内賢吾,　西尾誠人,　矢野聖二.　ALK 転座陽性肺癌において EMT は独立した耐性機構として関与する.　2018 年 9 月　大阪

14. 第 60 回日本消化器病学会大会　大坪公士郎,　毛利久継,　山下　要,　矢野聖二.　当科おける膵癌に併発した血栓塞栓症例の検討.　2018 年 11 月　神戸

15. 第 59 回日本肺癌学会学術集会　西山明宏，大谷咲子，足立雄太，谷本　梓，竹内伸司，矢野聖二．LC-SCRUM-Japan と金沢大学の取り組み．2018 年 11 月 東京

16. 第 59 回日本肺癌学会学術集会　西山明宏，新井祥子，柳村尚寛，大谷咲子，足立雄太，谷本　梓，竹内伸司，矢野聖二．中枢神経系転移における耐性．2018 年 11 月　東京

＜学会発表・国際＞

1. Fifth AACR-IASLC International Joint Conference: Lung Cancer Translational Science from the Bench to the Clinic. Yano S. Establishment of patient-derived xenograft models of lung adenocarcinoma with two different EGFR mutations, L858R and exon19 deletion. 2018 年 1 月 San Diego, USA

2. Fifth AACR-IASLC International Joint Conference: Lung Cancer Translational Science from the Bench to the Clinic. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Suzuki T, Takeuchi K, Nishio M, Yano S. Heterogeneity of epithelial-to-mesenchymal transition and resistance mutation in ALK inhibitor-resistant lung cancer and its circumvention. 2018 年 1 月 San Diego, USA

3. The 1st NanoLSI International Symposium– Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science－. Yano S. Mechanism and circumvention of targeted drug resistance in central nervous system metastasis. 2018 年 2 月 Tokyo, Japan

4. The 1st NanoLSI International Symposium– Towards Establishment of New Research Field: Nanoprobe Life Science－. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Suzuki T, Takeuchi K, Nishio M, Yano S. Heterogeneity of epithelial-to-mesenchymal transition and resistance mutation in ALK inhibitor-resistant lung cancer and its circumvention. 2018 年 2 月 Tokyo, Japan

5. Multidisciplinary Head and Neck Cancers Symposium 2018. Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Goto H, Suto H, Chayahara N, Toyoda M, Ito Y, Miya A, Miyauchi A, Otsuki N, Nibu K, Minami H. Exploratory analysis of prognostic and predictive factors of lenvatinib for radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. 2018年2月 Scottsdale, USA.

6. Pancreas 2018. 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. 2018 年 4 月 Baltimore, USA

7. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference. Yano S. Inter-Organ Heterogeneity on Mechanisms of Targeted Drug Resistance-Central Nervous System (CNS) vs Extra CNS-. 2018 年 7 月 Kyoto, Japan

8. The 6th JCA-AACR Special Joint Conference. Nishiyama A, Adachi Y, Tanimoto A, Takeuchi S, Yano S. Inter tumor Heterogeneity and Osimertinib Resistance. 2018 年 7 月 Kyoto, Japan

9. IASLC 19th World Conference on Lung Cancer. (WCLC) Yano S. Inter-Organ Heterogeneity on Mechanisms of Targeted Drug Resistance-Central Nervous System (CNS) vs Extra CNS-. 2018 年 9 月 Toront, Canada

10. European Society for Medical Oncology (ESMO) 2018 Congress. Yano S. Foretinib circumvents the NTRK1 G667C mutation-associated entrectinib-resistance in the brain and liver metastases produced by NTRK1 fusion-positive tumor cells. 2018 年 10 月 Munich, Germany

＜外部資金＞

1. 日本医療研究開発機構　革新的がん医療実用化研究事業
   矢野聖二　研究代表者
   RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析　30,250千円

2. 日本医療研究開発機構　次世代がん医療創生研究事業
   矢野聖二　研究代表者
   MAPKシグナル抑制が誘導するフィードバック機構の不均一性解明と制御に基づくKRAS/BRAF変異腫瘍に対する新規治療開発　8,193千円

3. 日本医療研究開発機構　革新的がん医療実用化研究事業
   矢野聖二　研究分担者
   遺伝子スクリーニング基盤（LC-SCRUM-Japan）を利用した，MET遺伝子異常陽性の進行非小細胞肺癌に対する治療開発を目指した研究　500千円

4. 基盤研究（B）日本学術振興会

矢野聖二　研究代表者
肺がんの髄膜がん腫症における分子標的薬耐性を克服する研究　3,800千円

5. 基盤研究（C）日本学術振興会
矢野聖二　研究分担者
悪性胸膜中皮腫に対する新規強磁性体温熱療法とmTOR阻害剤の併用療法の開発
50千円

6. 厚生労働科学研究費補助金　がん政策推進総合研究事業
矢野聖二　研究分担者
3学会合同「がんゲノムネット」を用いた，国民への「がんゲノム医療」に関する教育と正しい情報伝達に関する研究　300千円

7. 基盤研究（C）日本学術振興会
大坪公士郎　研究代表者
膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロRNA発現異常領域の同定
1,000千円

8. 日本医療研究開発機構　革新的がん医療実用化研究事業
竹内伸司　研究分担者
RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析
2,000千円

9. 基盤研究（C）日本学術振興会
竹内伸司　研究代表者
アポトーシス抵抗性に起因する変異型選択的EGFR-TKI耐性克服治療の開発
1,200千円

10. 基盤研究（C）日本学術振興会
竹内伸司　研究分担者
miR-200sを標的とした肺癌のEMTに起因するTKI耐性克服治療の開発
500千円

11. 基盤研究（C）日本学術振興会
山下　要　研究分担者

膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロRNA発現異常領域の同定
100千円

12. 基盤研究（C）日本学術振興会
福田康二　研究代表者
miR-200sを標的とした肺癌のEMTに起因するTKI耐性克服治療の開発
1,000千円

13. 若手研究（B）日本学術振興会
西山明宏　研究代表者
NTRK1融合遺伝子陽性腫瘍の分子標的薬耐性の分子機構解明と克服を目指す基礎研究　2,200千円

14. 日本医療研究開発機構　革新的がん医療実用化研究事業
西山明宏　研究分担者
RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析
250千円

15. 若手研究（B）日本学術振興会
谷本　梓　研究代表者
ALK融合遺伝子陽性肺がんにおけるアポトーシス抵抗性因子の解明と克服治療の開発　2,100千円

16. 日本医療研究開発機構　革新的がん医療実用化研究事業
谷本　梓　研究分担者
RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析
250千円

17. 金沢大学附属病院　臨床研究助成金
矢野聖二
RET 肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験　3,500 千円

18. バイエル薬品工業株式会社研究助成金
矢野聖二
甲状腺がんにおけるRET阻害感受性制御機構の解明　1,000千円

19. 大鵬薬品工業株式会社研究助成金
矢野聖二
肺がんの分子標的薬抵抗性の分子機構解明　1,000千円

20. 北國がん基金研究助成金
大坪公士郎，山下　要，足立雄太
KRAS変異陽性膵がんの新規治療法を開発する橋渡し研究　500千円

＜その他＞

１．教育プログラムの運営

1）文部科学省 平成 29 年度大学教育再生戦略推進費：多様なニーズに対応する「がん専門医療人材（がんプロフェッショナル）」養成プラン「超少子高齢化地域での先進的がん医療人養成」（北信がんプロ）を事業責任者として推進

2）石川県がん診療連携協議会研修会の開催（3 月 1 日，6 月 28 日，11 月 8 日）

２．がん教育

高校生に対するがん教育の実施：鹿西高校（10 月 26 日）

３．啓蒙活動

1）金沢大学医学展と合同の市民公開講座の実施 ：金沢大学宝町キャンパス十全講堂（10 月 28 日）

2）石川県がん診療連携協議会による県民公開講座の実施：加賀市医療センター（加賀市）3 月 20 日，フォーラム七尾（七尾市）11 月 25 日

４．ゲノム医療の提供

金沢大学附属病院でがん遺伝子外来の開設（7 月 1 日）

５．先進的医療の提供

医師主導治験「RET 融合遺伝子を有する進行非小細胞肺がんにおける RET チロシンキナーゼ阻害薬耐性の分子機構を明らかにする研究（ALL-RET：UMIN000020628）」の実施

６．外来化学療法の提供

金沢大学附属病院で外来化学療法室を運営

中央実験施設

Central Research Resource Branch
中央実験施設

Professor	Kunio Matsumoto	松本 邦夫
Associate Professor	Yoshio Endo	遠藤 良夫
Associate Professor	Kouji Kuno	久野 耕嗣

【 Abstract 】

Mechanisms and overcome of acquired resistance to photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in cancer cells (Endo Y)

5-Aminolevulinic acid (ALA), a precursor of protoporphyrin IX (PpIX), is now widely used for photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) of various cancers. We have experimentally demonstrated that the sensitivity of cancer cells to ALA-PDT is determined by the functional balance between the oligopeptide transporter PEPT1 and ATP-binding cassette transporter ABCG2. Furthermore, we have studied the molecular mechanism of acquired resistance to ALA-PDT in human gastric cancer MKN-45 cells. The resistant MKN-45 cells showed strong resistance to ALA-PDT and high expressions of iron metabolism-related genes. Recently, we investigated the stimulating activity of deferoxamine mesylate, an iron chelator, on ALA-PDT in ALA-PDT-resistant cells. Consequently, we found that deferoxamine mesylate highly enhanced the effects of ALA-PDT and effectively improved the sensitivity of the resistant cells to ALA-PDT. These findings indicated that iron metabolism and recycling system are important target molecules for overcoming ALA-PDT resistance in cancer cells.

Analysis of the functional roles of ADAMTS-1 in female genital organs (Kuno K)

ADAMTS-1 is an extracellular matrix (ECM)-anchored metalloproteinase that degrades ECM molecules such as proteoglycans and regulates ECM remodeling. Recently, we found that ADAMTS-1 null mice on a BALB/c background exhibit impaired parturition. Both contractile responses to uterotonins and spontaneous contractile activity were reduced in ADAMTS-1null uterine strips. Uterine expression of genes encoding contraction-associated proteins was also reduced in ADAMTS-1 null mice, suggesting that ADAMTS-1 is required for the uterine activation process prior to parturition. A histological analysis revealed that the morphology of the decidual layer, including the uterine gland structure, of ADAMTS-1 null mice on gestation day 19 sometimes differed from that of wild-type mice. Our data suggest the possibility that ADAMTS-1 is also involved in morphogenesis and the maintenance of decidual tissue from late pregnancy to labor.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

５-アミノレブリン酸を用いる光線力学的療法の新たな応用（遠藤）

我々は５-アミノレブリン酸（ALA）を用いるがん光線力学的療法（ALA-PDT）に対するヒト胃がん細胞の獲得耐性株を樹立し，それらの遺伝子発現プロファイルを解析した結果，耐性獲得に関与する因子群として鉄代謝系酵素を同定した。そこで本年度は，鉄キレート剤であるデフェロキサミンの ALA-PDT に対する効果増強作用と耐性克服効果について検討を行った結果，親株では ALA-PDT 感受性が亢進し，耐性株では感受性が回復することが明らかとなった。さらに，いずれの細胞株においてもデフェロキサミン処理により細胞内 PpIX 量が増加した。鉄代謝系酵素は ALA-PDT の重要な感受性規定因子であるとともに，効果増強の有用な標的になることが明らかになり，今後，さらに鉄をターゲットとする効果増強剤およびその機序を検討するともに，シッフ塩基をベースとしたプロドラッグ型効果増強剤の開発も継続して行う。

ADAMTS-1 の雌生殖機能における役割の解析（久野）

ADAMTS-1$^{-/-}$マウス（129/B6 遺伝子背景）は，排卵、卵胞生育過程に異常を示す。一方 BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1$^{-/-}$マウスは分娩異常を示すが、同マウスの子宮平滑筋では uterotonin に対する収縮応答性が低下し，また収縮調節関連遺伝子群の発現が低下していることを見出して、ADAMTS-1 が分娩前の子宮活性化に必要であることを明らかにしてきた。ADAMTS-1$^{-/-}$マウスの分娩前の子宮では、脱落膜層の減少が認められることから、今回、脱落膜組織の形態変化について調べた。その結果、妊娠 19 日目分娩前の ADAMTS-1$^{-/-}$マウスの脱落膜組織では、子宮腺の形態をはじめとして野生型マウスとは異なる形態が観察され、また一部では隣接する子宮腺間の細い組織での切断が観察された。この結果から、子宮腺の拡張など、分娩に向けての脱落膜組織の形態変化と維持に ADAMTS-1 が関与している可能性が示唆された。今後，ADAMTS-1$^{-/-}$マウスの子宮組織のさらに詳しい組織学的解析を行って分娩時の子宮機能における ADAMTS-1 の役割を調べるとともに、子宮頚管熟化過程についても解析を行い，ADAMTS-1 の分娩過程全般における役割を明らかにする。また ADAMTS-1 によるがん微小環境の制御について解析を行う。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞（共同研究）

1. Azadul K. S., Aki S., Yoshioka K., Okamoto Y., Kuno K., Ishimaru K., Takuwa N., Takuwa Y.; Class II PI3K α and β are required for Rho-dependent uterine smooth muscle contraction and parturition in mice. Endocrinology in press.

＜学会発表＞

1. 篠原侑成, 芝一休, 山田久嗣, 遠藤良夫, 石塚昌宏, 田中徹, 宇都義浩: 5-アミノレブリン酸を用いた光線力学治療 ALA-PDT に対する増感剤 TX-816 の創製 日本化学会第 98 春季年会 2018 年 03 月 20 日(火)～23 日(金) 日本大学理工学部　船橋キャンパス (船橋)
2. 遠藤良夫, 宇都義浩,　芝一休, 篠原侑成,　安部千秋, 小幡徹,　小倉俊一郎, 米村豊: アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対するシッフ塩基誘導体の感受性増強作用 日本薬学会第 138 年会　2018 年 3 月 25 日（日）-28 日（水）（金沢）
3. Yoshio Endo, Yoshihiro Uto, Yusei Shinohara, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura: Overcoming acquired resistance to photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid in gastric cancer cells 5-アミノレブリン酸を用いる光線力学的療法に対して耐性化した胃がん細胞における感受性回復に関する研究　第 77 回日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 27 日（木）-29 日（土）　（大阪，大阪府立国際会議場，大阪府立国際会議場）
4. 生水真紀夫，多久和陽，岡本安雄，松島綱治，°久野耕嗣 (°発表者)「分娩時の子宮機能と組織構築における ADAMTS-1 の役割の解析」第４１回日本分子生物学会年会（2018 年 11 月，横浜）

＜知的財産＞

平成 30 年 5 月 17 日特許出願 1 件: 遠藤良夫

＜外部資金＞

科学研究費補助金（基盤研究Ｃ）分担：遠藤良夫　直接経費：300千円

新学術創成研究機構若手 PI
卓越研究員

Inflammation and Epithelial Plasticity
上皮可塑性・炎症ユニット

Associate Professor Dominic Chih-Cheng VOON
Graduate Student Zachary YONG (D2) (Co-supervisor: Prof. Masanobu Oshima)

【 Abstract 】

Despite great advances in the past several decades in understanding the etiology of gastric cancer, it is still the third most lethal cancer globally, taking more than 700,000 lives annually. Atrophic gastritis caused by the chronic infection of *Helicobacter pylori* is considered the single greatest causal factor. We are interested in two aspects of gastric epithelial cell biology that play important roles during gastric carcinogenesis: 1) altered immune signaling during *H. pylori* infection; and 2) increased cellular plasticity during gastric inflammation and repair.

＜2018 research achievement and future plan＞

We have been studying the regulation and production of the cytokine IL23A in epithelial cells. In a previous study, we observed the induction of IL23A expression in gastric epithelial cells following infection with *Helicobacter pylori*, an important gastric pathogen and a major risk factor to human gastric cancer. This was enhanced by inflammatory signals associated with gastric carcinogenesis, including IL-1α/β, TNF-α and NOD-1. We have now extended our investigation to intestinal epithelial cells. In the past year, we have established the strong contribution of mitogenic and inflammatory signals on the regulation of *IL23A* and observed a strong crosstalk between MAPK and NF-κB pathways. This is significant because 1) inflammatory signals are important for the regeneration of intestinal epithelium after injury; 2) aberrant activation of MAPK due to mutations, such as *Kras* and *BRAF*, is frequently observed in human intestinal cancers. Accordingly, we observed that certain MAPK mutant CRC lines have constitutively high *IL23A* expression and this could be targeted by MEK1/2 and/or NF-κB pathway inhibitors. We further established that IL23A is secreted by intestinal epithelial cells but in a non-canonical form that is independent of IL12B. Our current work is centered on the function of this novel epithelial form of IL23A.

【 Achievements 】

＜Publications (Primary)＞

1. Han TS, **Voon DC***, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M*. (2018)

MicroRNA-135b acts downstream of Interleukin-1 signaling during inflammation-associated gastric carcinogenesis. Gastroenterology. Nov 30. pii: S0016-5085(18)35336-8. *Joint Corresponding Author.

＜Publications (Collaboration)＞

1. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, **Voon DC**, Masanobu Oshima (2018). *Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis.* FASEB J. doi: 10.1096/fj.201801176R.
2. Park JW, Kim MS, **Voon DC**, Kim SJ, Bae JG, Mun DG, Ko SI, Kim HK, Lee SS, Kim DY. (2017) *Multi-omics analysis identifies pathways and genes involved in diffuse-type gastric carcinogenesis induced by the loss of E-cadherin, p53, and Smad4 in mice*. Mol Carcinog. **57**(7):947-954.

＜Symposiums (Oral Presentations)＞

1. **Voon DC.** *Inflammatory and mitogenic signals drive IL23A secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells*. 77th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. 27-29th Sep 2018. Osaka, **Japan**.

2. **Voon DC.** *Inflammatory and mitogenic signals drive IL23A secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells*. TYAN-YSN International Thematic Workshop. 30th Oct- 1st Nov 2018. Kuala Lumpur, **Malaysia**.

＜2018 research funds＞

1. 科学研究費補助金（基盤研究 C)：課題番号：18K07228. Dominic Voon （代表）
   Title：Functional study of a novel homodimeric IL23A produced by epithelial cells
   2018-2020; Total direct fund: 3,300 千円

＜Others Contribution＞

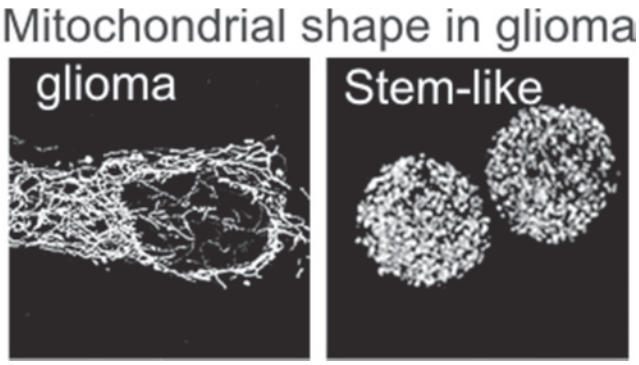
2017-2018	The Curiosity Seminar Series, KU-CRI.	Organizer
2018	8th FUSCC-CRIKU Joint Symposium	Coordinator

Mitochondrial Dynamics in Stem Cells
ミトコンドリア動態ユニット

Assistant Professor Atsuko KASAHARA 笠原敦子

【Abstract】

Mitochondria play pleiotropic roles in metabolic pathways, calcium and redox homeostasis, and apoptosis. These diverse mitochondrial functions are reflected by their extremely dynamic morphology, and distribution in the cells. Mitochondrial quality, distribution, size, and motility are excellently tuned by their continuous fusion and fission. Equilibrium of fusion and fission shapes the specific mitochondrial network depending on physiological conditions, and cell types. In general, mitochondria appear immature structure with poorly developed cristae in stem cells, while a complex network with developed cristae in differentiated cells. Stem cells are special cell population with self-renewal and differentiation potentials. Healthy stem cells contribute to tissue maintenance and repair, whereas tumour stem-like cells commit tumour malignancy, such as recurrence, drug resistance, and metastasis.
Mitochondrial intracellular localisation in the cell impacts on calcium homeostasis, and Notch1 signalling in embryonic stem cells (Kasahara A. *et al.* Science 2013). Therefore, mitochondria would direct their host cell fate, through controlling signalling cascades by changing their shape and distribution also in cancer cells. We are trying to understand the details molecular mechanism of how “mitochondrial dynamics” could control the maintenance and acquisition of stemness in tumour cells.



3D-reconstructed mitochondrial shape in glioma differentiated and stem-like cells (Bossoy E. Y., Kasahara A., *et al*. *EMBO J* 2017)

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

ミトコンドリアの形態が伸長し，ミトコンドリア呼吸が上昇していた gefitinib 耐性肺がん細胞は，ミトコンドリア呼吸やグルコース代謝阻害剤，さらに抗生物質 doxycycline に感受性になっていることを見出した。また，特異的なミトコンドリアの局在が，ストア作動性カルシウム流入に前立腺がん細胞でも関与し，がん細胞表現型に影響を与えるかについての共同研究（リール大学，フランス）を開始した。今後は，どのようにミトコンドリアが特異的な局在となっているのか，その詳細を明らかにする。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, **Kasahara A**, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A. Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas ***Cancer Sci.*** 2018 109: 2497-2508

＜学会発表＞

"*Mitochondrial dynamics in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cells*"
Kasahara A., Noguchi N., Shibata K., Kohno S., Takahashi C., Gotoh N., Kohno T., Scorrano L., Hirao A. Keystone Symposia Conference, Mitochondrial Biology, 22-26 Apr 2018, Kyoto, Japan, Poster presentation

＜外部資金＞

公益財団法人アステラス病態代謝研究会　研究助成金
「 分子標的薬による悪性肺がん細胞出現メカニズム」
2,000千円
2018年12月から1年間

Cancer–Immune System Interactions
がん–免疫系相互作用ユニット

Assistant Professor　　Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

【 Abstract 】

Caspase-1 is activated in response to various inflammatory stimuli, including microbial pathogens, endogenous danger signals, and irritants. Once activated, caspase-1 induces pyroptosis, a form of regulated necrosis, characterized by cell membrane disruption and release of cellular contents, leading to inflammation. Gasdermin D (GSDMD), a caspase-1 substrate, mediates pyroptosis: after being cleaved by caspase-1, the N-terminal fragment of GSDMD forms pores on the plasma membrane, resulting in water influx and cell swelling. Recently, we found that apoptosis is induced after caspase-1 activation in GSDMD-deficient cells, suggesting that caspase-1 can initiate both pyroptosis and apoptosis, depending on the expression of GSDMD. Here, we examined the mechanism and physiological significance of caspase-1-initiated apoptosis. Our results suggest that caspase-1 processes Bid into its mature form, tBid, which in turn induces mitochondrial outer membrane permeabilization and cytochrome c release. Consequently, caspase-9 was activated following the formation of the apoptosome composed of pro-caspase-9 and Apaf-1. Caspase-9 was critical for the induction of caspase-3 activation and apoptosis observed after caspase-1 activation. Hence, this study clearly suggests that caspase-1 induces apoptosis via the mitochondrial pathway by processing Bid into tBid. Cortical neurons did not express GSDMD, and the cells underwent apoptosis in a manner dependent on caspase-1 and Bid after oxygen/glucose deprivation. We therefore assume that caspase-1-induced apoptosis may occur in neuronal cells under pathological conditions. In addition, it appeared that caspase-1-induced apoptosis can contribute to host defense against intracellular pathogens. Collectively, our data provide insights into the function and significance of caspase-1-mediated biological processes.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

Caspase-1 によるアポトーシス誘導機序およびその意義について詳細な検討を行った。Caspase-1 が Bid を切断することでミトコンドリア経路を介したアポトーシスを誘導することを見出した。また、このような細胞死が神経変性や宿主防御に関わる可能性が示唆された。今後、caspase-1 誘導性細胞死の生理的意義についてさらに検討を進め、神経変性疾患、感染治療、がん微小環境などにおける役割を明らかにする。

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

1. Nakajima S, Imamura R, Yoshino M, Sakurai M, Tsuchiya K, Sugihara K, Asano M, and Suda T. Characterization of innate and adaptive immune responses in PYNOD-deficient mice. *ImmunoHorizons*. **2**(4) 129-141. 2018. doi: https://doi.org/10.4049/immunohorizons.1700074

＜学会発表＞

1. Kohsuke Tsuchiya（筆頭演者）“Caspase-1 serves as an apoptosis-initiating caspase in the absence of Gasdermin D (GSDMD)” Australia-Japan Meeting on Cell Death, 2018 年 5 月 22 日, 東京都文京区

2. 土屋晃介（筆頭演者）“Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D” 第 27 回日本 Cell Death 学会学術集会, 2018 年 7 月 27 日, 京都市

3. 土屋晃介（筆頭演者）“Pyroptosis enhances killing of *Listeria monocytogenes* by ampicillin *in vivo*” 第 47 回日本免疫学会学術集会, 2018 年 12 月 12 日, 福岡市

＜外部資金＞

1. 土屋晃介（研究代表者）平成 30 年度　科研費　基盤研究（C）「細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法の協調的相互作用から理解する試み」 1,820 千円 (直接経費 : 1,400 千円、間接経費 : 420 千円)

2. 土屋晃介　琉球大学熱帯生物圏研究センター・平成30年度 共同利用共同研究事業 「肺胞上皮におけるインターロイキン-17F 産生の意義と分子基盤」 225 千円

Cancer Genes and Genomes
がん治療標的探索ユニット

Assistant Professor Haruna Takeda　武田はるな
Assistant Researcher　Shiho Kataoka　片岡志帆，Aimi Makino　槙野愛実

【Abstract】

Colorectal cancer (CRC) is the third leading cause of cancer-related deaths. Genome sequencing studies have provided comprehensive CRC genomic datasets, however, functional validation for most candidate CRC driver genes has not been performed. In this year, we established a platform for functionally validating CRC driver genes that utilizes CRISPR-Cas9 in mouse intestinal tumor organoids carrying *Apc* and *Kras* mutations and human CRC-derived organoids. These studies showed that *Acvr1b*, *Acvr2a* and *Arid2* could function as tumor suppressor genes in CRC and uncovered a role for *Trp53* in tumor metastasis. We also found that co-occurrent mutations in receptors for activin and TGF-β synergistically promoted tumorigenesis, and shed light on the role of activin receptors in CRC. This experimental system can also be applied to mouse intestinal organoids carrying other sensitizing mutations as well as organoids derived from other organs, which could further contribute to identification of novel cancer driver genes and new drug targets.

＜2018 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

(1) Sleeping Beauty(SB)トランスポゾン挿入変異誘発法を用いて同定された消化器がんドライバー候補遺伝子に関し，マウスやヒト由来の大腸腫瘍オルガノイドとCRISPR-Cas9 システムを用い，がん化能検証を行う実験系を確立した。更に，この検証実験系を用いて I 型と II 型のアクチビン受容体が大腸がん抑制遺伝子として機能することを証明した。大腸のがん化においては，TGF-β受容体の欠損と，TGF-βスーパーファミリーに属するアクチビン受容体の欠損が協調的に作用しがん化を促進することを新たに見出した。今後は，この実験系を用いて新たな候補遺伝子に関して機能検証を行い，新規ドライバー遺伝子を同定する。

(2) がん組織の遺伝学的不均一性は，腫瘍の悪性化の過程で最も適応度が高いクローンが選択される適者生存のプロセスに寄与すると考えられている。SB 挿入変異誘発法を用いると，多様な遺伝子変異を有する遺伝学的に不均一な細胞集団を人為的に作り出し，マウス生体内で競合させることで腫瘍形成に寄与した遺伝子の同定が可能となる。本年は，SB 挿入変異誘発システムが導入されたマウスより腫瘍オルガノイドを樹立し，免疫不全マウスの盲腸へと同所移植することで肝臓やリンパ節への転移モデルを作成することに成功した。今後は，腫瘍ゲノム解析を行うことで，大腸がんの転移に関与する遺伝子の同定を行う。

【 研 究 業 績 】

＜学会発表&招待講演＞

1. 武田はるな「Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」2018 年 5 月 18 日　第 65 回日本実験動物学会総会 招待講演
2. Haruna Takeda, “Sleeping Beauty transposon mutagenesis identifies genes involved in colorectal cancer progression”　American association of cancer research meeting (Chicago, USA), 18 Apr, 2018　Poster presentation
3. Haruna Takeda, “*Sleeping Beauty* transposon mutagenesis identified genes involved in colorectal cancer progression” 国立遺伝学研究所国際シンポジウム (三島), 3-4th Jul, 2018, Genome Editing and Functional Genomics, 招待講演
4. Haruna Takeda, The 37th Sapporo International Cancer Symposium (Sapporo), 18-19 Jul 2017　Poster presentation
5. 武田はるな, “Identification of colorectal cancer driver genes” 北海道大学遺伝子制御研究所ジョイントシンポジウム、7 月 17 日、口頭発表
6. 武田はるな　「CRISPR-Cas9 を用いた新規大腸がん抑制遺伝子の同定」第 77 回日本癌学会学術総会（大阪）、2018 年 9 月 27-29 日　招待講演
7. Haruna Takeda, “Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた大腸がん形成に関与する遺伝子の同定”, 国立がんセンター (築地), 2018 年 10 月 26 日　招待講演

＜外部資金＞　代表のみ

1. 卓越研究員事業　H30 年度
2. 科学研究費補助金　基盤研究(B) 「大腸がんの形成及び治療薬抵抗性獲得に関わるドライバー遺伝子の同定」平成 29-32 年度（H30: 5,200 千円）
3. 内藤記念次世代育成支援研究助成金「マウスモデルを用いた消化器がん形成に関わる遺伝子の機能評価」平成 28-30 年度 6,000 千円(H30:2,000 千円)
4. MSD 生命科学財団　「大腸がんの転移に関与する遺伝子の同定」　平成 29-30 年度　3,000 千円　（H30:1,500 千円）
5. AMED 次世代がん医療創生研究事業「トランスポゾンを用いたがん悪性化に関与するドライバー遺伝子の同定と機能検証」平成 30-31 年度 12,000 千円（H30:6,000 千円）
6. 北國がん基金　「Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた大腸がん転移に関与する遺伝子の同定」平成 30 年度　1,000 千円

基 礎 統 計

決算額（運営費交付金）

（単位：千円）

区　　分		平成 26 年度	平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度
運営費交付金		589, 380	603, 234	584, 800	539, 525	498, 004
内　訳	人件費	464, 514	433, 247	451, 496	404, 750	369, 283
	物件費等	124, 866	169, 987	133, 304	134, 775	128, 721

科学研究費補助金（間接経費を含む）

（単位：千円）

年度 / 研究種目	平成 26 年度		平成 27 年度		平成 28 年度		平成 29 年度		平成 30 年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
特定領域研究	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
新学術領域研究	5	87, 710	3	33, 670	4	34, 450	5	35, 100	4	30, 680
基盤研究（A）	1	14, 560	2	23, 140	2	20, 800	3	36, 270	3	36, 660
基盤研究（B）	5	28, 560	3	19, 110	4	22, 620	5	21, 450	4	25, 480
基盤研究（C）	13	21, 450	12	20, 410	12	19, 370	13	21, 060	15	23, 660
挑戦的萌芽研究	6	11, 650	6	12, 090	3	4, 810	1	910	0	0
挑戦的研究（萌芽）							4	13, 650	5	15, 600
若手研究（S）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
若手研究（A）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
若手研究（B）	8	15, 080	8	15, 340	12	24, 959	10	18, 590	7	12, 480
若手研究									5	11, 700
研究活動スタート支援	2	2, 860	3	4, 290	2	2, 730	2	2, 730	1	1, 300
特別研究員奨励費	0	0	0	0	1	1, 170	3	2, 940	4	3, 894
国際共同研究加速基金	0	0	1	14, 300	0	0	0	0	0	0
最先端・次世代研究開発支援プログラム	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合　計	40	181, 870	38	142, 350	40	130, 909	46	152, 700	48	161, 454

外部資金（間接経費を含む）

（単位：千円）

年度 / 研究種目	平成 26 年度		平成 27 年度		平成 28 年度		平成 29 年度		平成 30 年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
受託研究	10	181, 827	10	367, 280	11	355, 400	10	408, 031	9	208, 623
受託事業経費	2	2, 965	1	2, 500	1	2, 600	1	2, 400	2	2, 510
補助金	2	22, 240	1	19, 070	1	9, 000	1	9, 000	1	2, 000
民間等との共同研究	12	36, 256	8	10, 240	2	4, 360	2	17, 000	4	3, 489
寄附金	14	18, 774	18	17, 752	29	36, 753	28	29, 080	24	22, 935
合　計	40	262, 062	38	416, 842	44	408, 113	42	465, 511	40	239, 557

土地・建物

区　　分		研究所
建築面積		894 ㎡
建物延床面積	鉄骨コンクリート造	（6F）5,072 ㎡

教 育 活 動

大学院生・研究生数

令和元年 5 月 1 日現在

				先進がんモデル共同研究センター	がん幹細胞研究プログラム	がん微小環境研究プログラム	がん分子標的探索プログラム	がん分子標的医療開発プログラム	合計（人）
大学院生	医薬保健学総合研究科	修士課程	Ⅰ	1	1				34
			Ⅱ	1					
		博士課程	Ⅰ	2			2		
			Ⅱ	1	2		2		
			Ⅲ	3	2	2	4		
			Ⅳ	1	3		1		
	医学系研究科	博士課程	Ⅰ						
			Ⅱ						
			Ⅲ						
			Ⅳ		1	1	4		
	先進予防医学研究科	博士課程	Ⅰ						
			Ⅱ						
			Ⅲ						
			Ⅳ						
	自然科学研究科	前期課程	Ⅰ						1
			Ⅱ						
		後期課程	Ⅰ						
			Ⅱ						
			Ⅲ				1		
研究生（特別研究学生含む）					1		2	2	5

※平成 24 年度に医学系研究科から医薬保健学総合研究科へ改組

交流協定校

令和元年 5 月 1 日現在

交流協定校	協定大学・部局等名	国（都市名）
大学間交流協定	蘇州大学	中国（蘇州）
	四川大学	中国（成都）
	ハルビン医科大学	中国（ハルビン）
	釜山国立大学校	韓国（釜山）
	バルナ医科大学	ブルガリア（バルナ）
	モンゴル国立大学	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル科学アカデミー	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル国立医科大学	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル国立がんセンター	モンゴル（ウランバートル）
	ナレースワン大学	タイ（ピサヌローク）
	台北医学大学	台湾（タイペイ）
	シャルジャ大学	アラブ首長国連邦（シャルジャ）
部局間交流協定	韓国科学技術研究院遺伝工学研究所	韓国（大田）
	復旦大学上海がん病院	中国（上海）
	ソウル大学校がん研究所	韓国（ソウル）
	ソウル大学がん微小環境研究センター	韓国（ソウル）

各種シンポジウム開催状況

1. 金沢大学がん進展制御研究所・韓国ソウル大学がん微小環境研究センタージョイントシンポジウム

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa Joint Symposium

目　　的：金沢大学のみならず北陸におけるがんの基礎的ならびに臨床的研究の一層の発展を図ることを目的とし，韓国ソウル国立大学がん微小環境研究センター（SNU-GCRC）から，世界でもトップレベルにあるがん研究者をシンポジストして迎え開催。

日　　時：平成30年5月28日（月）
9:00～17:00

場　　所：金沢大学医学部記念館

来場者数：約160名

プログラム：

①セッション1：

「The effect of estradiol on the azoxymethane/dextran sulfate sodium-treated mice model of colorectal cancer: implication for sex difference in colorectal cancer development」

Dong-Ho Lee（韓国ソウル国立大学）

「Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer cells」

鈴木　健之（金沢大学がん進展制御研究所）

「Curcumin inactivates STAT3 through covalent modification at the cysteine 259residue in H-Ras- transformed human mammary epithelial cells」

Young-Joon Surh（韓国ソウル国立大学）

②セッション2：

「Theranostic Approaches using Sodium/iodide Symporter in the Management of Thyroid Carcinoma」

June-Key Chung（韓国ソウル国立大学）

「Nanoscale imaging of biomolecules by high-speed atomic force microscopy」

柴田　幹大（金沢大学新学術創成研究機構）

「TM4SF5-mediated metabolic regulation for liver diseases」

Jung Weon Lee（韓国ソウル国立大学）

③セッション3：

「A-kinase anchoring protein 12（AKAP12）promotes fibrosis resolution and suppresses tumorigenesis of the liver via regulation of hepatic microenvironment」

Kyu-Won Kim（韓国ソウル国立大学）

「Tumor Microenvironment Revealed by HGF-MET Targeting Molecular Tools」

松本　邦夫（金沢大学がん進展制御研究所）

「Adenine Nucleotide Translocase 2 is a key molecule for [18F]FDG accumulation in cancer by forming a complex with voltage-dependent anion channel 1 protein to recruit Hexokinase 2」

Hyewon Yun（韓国ソウル国立大学）

④セッション4：

「Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis」

平田　英周（金沢医科大学）

「Cooperativity of E-cadherin, Smad4, and p53 loss to promote the development and progression of diffuse-type gastric adenocarcinoma」

Jun-Won Park（金沢大学がん進展制御研究所）

「Novel Structural Insights of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ in Cancer」
Byung Woo Han（金沢大学がん進展制御研究所）

⑤セッション5：

「About canonical and less canonical cell death induction by natural compounds with pharmacological potential」
Mark Diederich（韓国ソウル国立大学）

「Astatine labeled peptides for targeted alpha therapy and theranostics.」
小川　数馬（金沢大学新学術創成研究機構）

2.　金沢国際がん生物学シンポジウム

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2018

目　　的：世界で著名な研究者との交流と最新のがん研究の動向についてディスカッションすることを目的とする。
日　　時：平成30年11月26日（月）
10:30～17:00
場　　所：金沢大学医学部記念館
来場者数：約150名

プログラム：

①セッション1：

「Regulation of hematopoietic stem cell self-renewal and leukemogenesis by diet-induced stress」
田所　優子（金沢大学がん進展制御研究所）

「Metabolic regulation of cancer cell fate in myeloid leukemia」

伊藤　貴浩（アメリカジョージア大学）

②セッション2：

「Analysis of regulatory mechanisms in breast cancer-stem like cells by using spheroid cultures of patient-derived cancer cells and patient-derived xenograft (PDX) models」

後藤　典子（金沢大学がん進展制御研究所）

「Revisiting glucose metabolism in cancer by a Pkm knock-in model」

田沼　延公（宮城県立がんセンター研究所）

「Diet, Metabolism and Cancer」

Jing　Chen（アメリカエモリー大学）

③セッション3：

「Obesity and cellular senescence: a gut microbial connection」

原　英二（大阪大学微生物病研究所）

「The senescence-stemness alliance: tissue regeneration, cancer-hijacked」

Clemens　Schmitt（ドイツマックス・デルブリュック分子医学センター）

3.　がん進展制御研究所　共同利用・共同研究拠点成果報告会

Joint Usage/Research Center Research results report meeting

目　　的：共同利用・共同研究拠点としての機能強化および共同研究活動活性化のため，当該年度に採択された共同研究課題の研究代表者数名を招聘し，研究成果報告会を開催するもの。

日　　時：平成31年2月27日(水)
10:30～17:00

場　　所：金沢大学自然科学系図書館棟大会議室

来場者数：約100名

プログラム：

①共同研究成果報告１：

「代謝フラックス解析を用いたがん特異的代謝の解明」

松田 史生（大阪大学大学院）

「肺がんプレシジョンメディシンに向けた新たな治療感受性・抵抗性遺伝子の探索」

中奥 敬史（国立がん研究センター研究所）

「正常造血に必須となる新規の転写ネットワーク制御機構の解明」

木戸屋 浩康（大阪大学微生物病研究所）

②特別講演：

「動的な分子レベルの生命現象を直視する高速AFM」

安藤　敏夫（金沢大学ナノ生命科学研究所）

③共同研究成果報告２：

「炎症性がん微小環境のNK細胞による制御機構の解明」

早川 芳弘（富山大学和漢医薬学総合研究所）

「EGFR変異肺がんのオシメルチニブ治療抵抗性細胞の解明とその治療法開発」

山田 忠明（京都府立医科大学大学院）