

令和 3 年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2022. 4

金沢大学がん進展制御研究所

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腸内細菌叢を活用した新規膵がん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・教授・園下 将大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・助教・大塩 貴子
	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・博士研究員・山村 凌大
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	<p>膵がんは最も予後不良のがん種の一つである。最近、膵がん患者が健常人と異なる腸内細菌叢を保有することが報告されたが、この差異の影響は不明である。</p> <p>そこで本研究では、申請者らが最近作出した膵がん遺伝子型モデルショウジョウバエを使用し、病態と関連する腸内細菌種を同定するとともに、その成果に立脚して新規治療法の開発を実施する。本研究により、今後患者数の一層の増加が見込まれている膵がんに対して有効な治療戦略を確立し、もって福祉向上への貢献を図る。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者は、膵がん患者の中でも最も予後が悪い患者群で観察される4遺伝子変異 (<i>KRAS</i> 活性化、<i>TP53</i>・<i>CDKN2A</i>・<i>SMAD4</i> 不活性化) を模倣したモデルハエを研究に使用している。この4-hit ハエは、細胞の増殖能や遊走能の顕著な亢進、そしてこれらに伴う致死表現型を示す。これまでに、膵がんの発生に影響する細菌叢やその機序、また細菌叢が膵がんの薬物治療に与える影響は完全に解明されていないことから、申請者は大島教授と共同でこれらの解明を目指す研究に取り組んでいる。これまでに、この4-hit ハエと対照の非遺伝子組換えハエの腸内細菌叢を網羅的に比較し、細菌種Aの存在割合が4-hit ハエで有意に低いことを見出した。一方申請者らはこれまでに、MEK 阻害薬 trametinib が膵がん形質を弱く抑制することを見出している。</p> <p>そこで本年度は、A が産生する代謝産物が trametinib の効果に与える影響を検討した。すなわち、この代謝産物と trametinib を同時に4-hit ハエに投与し、致死表現型の救済を指標に効果を解析した。その結果、この組み合わせが各々の単独の処置よりも高い致死表現型の抑制効果を示すことがわかった。</p> <p>以上の結果から申請者は、膵がんの遺伝子変異がAの減少を引き起こし、この減少がAの代謝産物の低下を招来して MEK 阻害薬に対する膵がんの抵抗性を上昇させたと推察した。今後は、この代謝産物が 腸内細菌叢が変化する機序や、酢酸が形質転換細胞の性質に与える影響を解明し、それらの知見に立脚して新規膵がん治療法の開発を推進する予定である。最後に、本研究に対し多大なご指導とご支援を賜りました大島教授と金沢大学がん進展制御研究所に深く感謝申し上げます。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 なし</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 園下将大 個体表現型スクリーニングが加速する新規がん治療薬開発 第25回日本がん分子標的治療学会 2021年5月 Masahiro Sonoshita A whole-animal platform to advance drug discovery Imperial College London Life Sciences Seminar 園下将大 個体表現型スクリーニングによる新規がん治療薬開発の加速 第30回日本がん転移学会学術集会 園下将大 文部科学省科学研究費補助金新学術領域「細胞ダイバース」第6回領域会議 ショウジョウバエを活用したがん治療薬の探索 Masahiro Sonoshita Determining therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer using a whole-animal platform 第80回日本癌学会学術総会 Masahiro Sonoshita <i>Drosophila</i> approaches to develop novel cancer drugs The TARA International Symposium <p>【その他特筆事項】 特許申請：園下将大、関谷翔、平野聡 抗がん剤をスクリーニングする方法及び膵がんの治療のためのキナーゼ阻害剤の組み合わせ 特願 2022-503384、17/635,820、10-2022-7004728、21761537.6、202247009656、11202201724Y、2021226119、2021800048738</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		シグナリング代謝物を介したがん代謝適応システムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学 先端科学技術研究センター・特任准教授・大澤 毅
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>癌の増殖と転移には腫瘍微小環境や血管新生が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを見だし報告してきた。低酸素・低栄養で生存する癌細胞は、癌幹細胞の維持を促進し悪性化に寄与することが示唆されるが、その詳細な“代謝システム機構”は不明である。本研究は、がん悪性化における“代謝と栄養シグナル”がどのようにがん幹細胞維持に関与するかを解明し、現存する化学療法との併用に相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用のための基盤となる研究を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>癌の悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者らはこれまで低酸素・低栄養・低 pH という腫瘍微小環境が癌の悪性化を促進することを報告してきた。本研究では、がん微小環境における“癌代謝と栄養シグナル伝達機構の解明”を種々の癌細胞株や <i>in vivo</i> マウスを駆使して研究を行った。</p> <p>具体的には、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス統合解析から“代謝と栄養シグナル”の解明という分野横断的な共同研究を展開することを目的とした。</p> <p>研究項目としては、以下の2項目について研究を行った。</p> <p>【1】 低酸素・低栄養におけるがん幹細胞維持に必須な代謝経路の解明</p> <p>申請者は低酸素・低栄養が癌の悪性化に関与することを報告しているが、腫瘍微小環境で亢進する癌代謝物がどのように代謝さらには悪性化に関与するかは不明である。既に我々は、低酸素・低栄養において種々の癌細胞に共通して幾つかの代謝産物や脂質代謝経路が亢進することを発見しており、これらが癌の悪性化にどう関わるか検討した結果、グルタミン飢餓によって誘導される新規オンコメタボライト候補を同定し、TCA サイクルなど中心代謝経路で代謝されることはなく、寧ろそれ自身がシグナル伝達物質として働き、がん細胞内のグルコース代謝の促進や、肝臓のグリコーゲンの導引する可能性を見出し報告してきた ()。</p> <p>【2】 低酸素・低栄養の癌幹細胞における栄養シグナルの関与</p> <p>我々はがん細胞株に共通して低酸素・低栄養で特異的に発現誘導される特徴的な遺伝子群をマイクロアレイ解析、オントロジー解析、パスウェイ解析から発見している。また、PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達系や FOX 転写因子の関与の解析と共にこれら標的候補の機能解析を行い、グルタミン異存的な Ets ファミリー分子である FOXA1 転写因子を見出した。また、FOXA1 は、解糖系の代謝酵素やアルデヒド代謝酵素を制御する可能性を見出している。今後、グルタミン異存的な FOXA1 転写因子のがん幹細胞における役割について si/shRNA やゲノム編集等による抗腫瘍効果をマウス腫瘍移植実験において検討する予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Pan M, Zorbas C, Sugaya M, Ishiguro K, Kato M, Nishida M, Zhang H, Candeias MM, Okamoto A, Soga T, Aburatani H, Sakai J, Matsumura Y, Suzuki T, Proud CG, Lafontaine DLJ, Osawa T, Glutamine deficiency in solid tumors confers resistance to ribosomal RNA synthesis inhibitors. <i>Nature Commun.</i> Accept in principle. など8報</p> <p>【学会発表】</p> <p>大澤毅、「ニュートリオミクスから迫るがん悪性化機構」、シンポジウム、第94回日本生化学会：2021年11月3日—5日、横浜など、招待講演9件</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>安藝翔特任助教、優秀研究賞 第一回システム生物医学研究会、東京</p> <p>安藝翔特任助教、入澤宏・彩記念若手研究奨励賞、第99回日本生理学会大会、仙台</p> <p>博士課程 前田啓介、ポスター賞、第80回日本癌学会学術総会、横浜</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		日本人の前立腺がんにおける SUCLA2 遺伝子欠失
研究代表者	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 助教 田代康次郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 教授 颯川晋
	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 准教授 木村高弘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 ・高橋智聡
【研究目的】	<p>貴学の高橋智聡教授、河野晋博士らは、進行性前立腺癌において RB1 遺伝子と SUCLA2 遺伝子の共欠失が高頻度に生じていることを論文発表されている。また、SUCLA2 欠失を標的とした創薬開発も進行しており、チモキノンという化合物を得ている。</p> <p>我々、東京慈恵会医科大学では、前立腺癌の臨床検体を用いて RB1-SUCLA2 の共欠失についての臨床的特徴を確認するとともに、SUCLA2 欠失症例のバイオマーカー探索を患者採血から ctDNA を抽出し解析を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々、東京慈恵会医科大学泌尿器科で前立腺癌と診断され、前立腺全摘により得られた検体の Tissue Micro Array (約 200 例) と、慈恵医大で保有しているヒト皮膚転移巣をマウスへ移植して樹立された PDX マウス (JD-CaP) の腫瘍組織を用いて RB1 および SUCLA2 の抗体で免疫染色を行った。各遺伝子 (タンパク質) の欠失を染色評価するため、染色されない部位を評価することになる。</p> <p>RB1 抗体の染色については、もともと確実な抗体が存在しないことから十分な染色が得られる抗体を検索中である。また、RB1 遺伝子座内の P2RY5 遺伝子や NUDT15 遺伝子についても同様に染色自体が十分に得られなかった。</p> <p>SUCLA2 抗体は悪性度 (グリソンスコア) に準じて染色が減弱する傾向は認められたが、① SUCLA2 遺伝子の欠失はヘテロ、ホモと混在していること、②必ずしも欠失が生じないことから、免疫染色が RB1-SUCLA2 の共欠失の評価として不確実性が高いことから、次年度は PCR 法へ変更する。同時に適切な抗体の検索は継続する。確実な抗体が同定できれば慈恵医大における剖検検体 (転移巣) を用いて染色を行う。</p> <p>また、高橋教授らと共に SUCLA2 欠失症例のバイオマーカー探索についての研究準備をすすめている。東京慈恵医科大学病院および同葛飾医療センターにおける一時治療の終了した転移を伴う去勢抵抗性前立腺癌症例から採血を行い、ctDNA を抽出し、金沢大学で RCBTB2、P2RY5、RB1、IT2M2B、MED4、NUDT15、SUCLA2 遺伝子の欠失状況を eProbe 法によって定量する。以上の研究について貴学倫理委員会に申請中であり、貴学承認しだい、当学での倫理委員会の承認を得て、臨床検体採取を開始する予定である。(2022年6月ごろを予定、全50症例)</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; width: 30%;"> <p>東京慈恵会医科大学泌尿器科 及び関連病院</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 進行前立腺がん患者からの採血 ● 患者情報との相関解析 <p>血液 ↓ ↑ 情報</p> <p>金沢大学がん進展制御研究所</p> <ul style="list-style-type: none"> ● cfDNA抽出 ● eProbe法解析 ● 解析結果フィードバック </div> <div style="text-align: center;"> <p>図3 RB1とSUCLA2近傍の遺伝子群。</p> </div> </div>	
【成果等】	【主な論文発表】	特になし
	【学会発表】	特になし
	【その他特筆事項】	上記、倫理委員会承認待ち

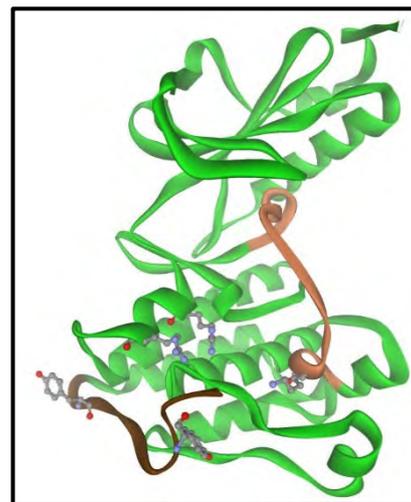
令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとする新規抗転移剤の創薬研究
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・山田久嗣
	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・浅田元子
	所属・職名・氏名	徳島大学・D2・山花 啓梨
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・准教授・遠藤良夫
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究は、代表的非ステロイド性抗炎症薬であり、最近、様々な制がん作用を有することが示されている COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとして、ドラッグデザイン的手法を用いて強い抗転移剤を有する新規セレコキシブ誘導体の創製を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>癌の浸潤・転移は細胞外マトリックス (ECM)、中でも基底膜の分解により誘導されることが知られており、癌細胞が基底膜を破壊する能力は転移能の指標の 1 つと考えられている。この基底膜は非常に強固な層であるが、中でも注目すべきは、骨格となる網目状の構造がIV型コラーゲンで構成されているという点である。IV型コラーゲンは基底膜特異的に存在しており、結合組織など ECM 中の他の組織に存在するのは主に I ~ III 型コラーゲンである。つまり、癌細胞の浸潤・転移が基底膜の破壊により誘導されるということは、IV型コラーゲンの分解が浸潤・転移の引き金となるということの意味している。</p> <p>このIV型コラーゲンの分解において重要な役割を果たしているのがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) である。MMPs は ECM 構成成分を分解するタンパク質分解酵素として知られるが、その中でも注目しているのが MMP-2、MMP-9、MT1-MMP である。MMP-2/9 はIV型コラーゲンを特異的に分解するIV型コラーゲナーゼ、MT1-MMP は MMP-2 の活性化因子であり、これらの MMPs の阻害は薬剤の抗腫瘍・抗転移効果の向上に有効である。そこで、MMPs 阻害能を有する抗癌剤・抗転移剤の開発を行うにあたり、シクロオキシゲナーゼ (COX)-2 選択的阻害剤として知られる celecoxib に着目した。近年、この celecoxib が COX-2 非依存的な経路による抗腫瘍・抗転移効果を示すことが報告されており、抗転移剤としても有望な候補薬剤である。以上の点を踏まえ、celecoxib を抗癌剤・抗転移剤のヒット化合物とし、高い MMPs 阻害能を有する新たな薬剤の開発を目指した。</p> <p>まず、celecoxib のスルホンアミド基をメチルエステルに変換した UTX-121 を設計・合成し、種々の活性を評価した。その結果、UTX-121 が MT1-MMP を介した MMP-2 の活性化と MMP-9 の産生を抑制することが明らかとなった。さらに、UTX-121 は、癌細胞の遊走・浸潤も阻害しており、UTX-121 が効果的な抗癌剤・抗転移剤の開発において有用なリード化合物となりうることを見出した。上記の結果を踏まえ、UTX-121 に対して構造活性相関的手法を適用することにより、より高い MMPs 阻害活性を有する化合物の探索を行った。UTX-121 のメチルエステルにおける水素結合の必要性や最適なアルキル鎖長を検討したところ、抗腫瘍効果・MMPs 阻害効果を発揮するためにはメチルエステルが重要であることが示唆された。そこで次に、UTX-121 の p-トリル基に着目し、種々の UTX-121 誘導体の設計・合成を行った。その中で、UTX-121 の p-トリル基のメチル基を F あるいは Cl で置換した化合物 9c および 10c が UTX-121 よりも高い抗腫瘍活性を有し、MMP-2/9 の発現および pro MMP-2 の活性化を大きく抑制することが明らかとなった。以上の結果から、効果的な抗癌剤・抗転移剤となりうる化合物 9c および 10c の創出に成功した。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1) Yamahana H, Komiya Y, Takino T, Endo Y, Yamada H, Asada C, Uto Y., Structure-Activity Relationships of UTX-121 Derivatives for the Development of Novel Matrix Metalloproteinase-2/9 Inhibitors, Chem Pharm Bull (Tokyo), 69(10), 1017-1028, 2021.</p> <p>2) Yamahana H, Terashima M, Takatsuka R, Asada C, Suzuki T, Uto Y, Takino T, TGF-β1 facilitates MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells, Biochem Biophys Rep, 27, 101072, 2021.</p> <p>【学会発表】</p> <p>なし</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞生存維持にかかわるエクソソームとシグナル伝達系の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・室長・北條浩彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・リサーチフェロー・清水英雄
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	<p>抗がん治療は、外科的治療と同様に主要ながん治療法である。その効果を十分発揮させ根治に至るためには、その妨げとなる薬剤耐性をいかに防ぐかが重要である。そのためには、抗がん剤暴露下のがん細胞生存維持メカニズムを理解することが大切である。近年、がん細胞の転移・維持に関わる新しい因子として細胞外小胞（エクソソーム）そしてその中に含まれる機能性 RNA、細胞外マイクロ RNA が注目されている。これらエクソソームに関わるがん細胞の転移を含めた生存維持機構は、薬剤耐性獲得過程そしてその維持においても重要な役割を果たしていると考えられる。そこで我々は、新しい視点からエクソソームとその関連分子を薬剤耐性獲得過程の重要な因子と考え、薬剤耐性獲得そして維持におけるエクソソームと細胞外マイクロ RNA の役割について、検討する研究をスタートした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト非小胞肺癌細胞株 PC-9 細胞は、ユニークな特徴を有するがん細胞である。ナイーブな PC-9 細胞は抗がん剤ゲフィチニブに対して強い感受性を示すが、ゲフィチニブの長期暴露によって耐性細胞へと変化する。抗がん剤感受性から耐性への変化が同一の細胞で観察できることから、PC-9 細胞は薬剤耐性獲得の良いモデル細胞として研究されている。我々は、この細胞株を用いてゲフィチニブ耐性細胞株を樹立し、感受性株との比較を行った。本年度は、条件検討を兼ねた基礎的データの取得に注力し、まずは細胞培養液中にエクソソームに包まれて放出される細胞外マイクロ RNA の元となる細胞内マイクロ RNA について検討した。薬剤耐性を獲得することによってどのようなマイクロ RNA の発現プロファイル変化が起こっているのか調べた。その結果、感受性細胞と耐性細胞との間に発現プロファイルの明らかな変化が観察された。特筆すべき結果は、薬剤耐性細胞内で発現が亢進するマイクロ RNA の中に、miR-X が見つかった。このマイクロ RNA (miR-X) は、複数の論文で薬剤耐性に関わるマイクロ RNA として報告されている。さらに、我々の以前の解析から、miR-X は細胞外に放出されるマイクロ RNA であることが確認されている (未発表データ)。したがって、薬剤耐性獲得によって発現が亢進したマイクロ RNA は、それに伴ってエクソソームを介した細胞外への放出も亢進していると予想される。そして、それがオートクラインによって自己の薬剤耐性維持に関わっている可能性がある。この点について、今後検討していきたいと考えている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Manu M.S., <u>Hohjoh H.</u>, Yamamura T. (2021) Extracellular Vesicles as Pro- and Anti-inflammatory Mediators, Biomarkers and Potential Therapeutic Agents in Multiple Sclerosis. <i>Aging Dis</i>, 12:1451-1461.</p> <p>【学会発表】 なし。</p> <p>【その他特筆事項】 特になし。</p>	

研究課題		HGF 受容体 Met の juxtamembrane 領域による活性制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪府立大学大学院理学系研究科・教授・木下誉富
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>受容体型チロシンキナーゼ Met の活性化は強力な再生作用を示すことから、肝硬変などの疾患の治癒・改善につながる。逆に、Met の過剰活性化は様々なガンに対して浸潤・転移を強力に促すことから、その阻害はガンの浸潤・転移を阻止する。Met はリガンド結合による 2 量体化をきっかけに、細胞内キナーゼドメイン (KD) 内の自己リン酸化を介して活性化する。本研究では、このような典型的な活性制御機構と共同あるいは独立してはたらく、アロステリック活性制御機構に注目する。これまでの知見及び事前検討から、KD の両端領域 (Juxtamembrane (JM) 領域、C-terminal (CT) 領域) に Met 特異的なアロステリック作動性のリン酸化及び非リン酸化分子スイッチが存在することが明白である。各スイッチを含むペプチドについて、活性制御能の評価、KD 及び JM-KD-CT との複合体の X 線結晶構造解析、in vivo 評価などを行うことで、各スイッチの分子作動メカニズムを解明するとともに、低コストかつ高選択性の低分子量 Met 活性亢進薬あるいは阻害薬の創出に向けた創薬基盤を構築する。今回、CT のリン酸化スイッチについて得られた知見を報告する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでの検討から CT にある 2 か所のリン酸化スイッチは単独ではそれぞれ数百 μM で有効化することが判っている。これら 2 か所の位置は配列上近いことから、これらが共同して機能する可能性を考えた。そこで、2 か所両方のスイッチを含むペプチド (2SW) を合成して、阻害活性を評価した。2SW の KD 及び JM-KD-CT に対する阻害活性はそれぞれ $\text{IC}_{50} = 9.1\mu\text{M}$, $3.5\mu\text{M}$ と、単独スイッチのみを含むペプチドの 100 倍以上強い作用を示すことがわかった。以上のことから、生体内では CT の 2 か所のスイッチが相乗的に機能するものと推察される。</p> <p>一方、右図に示した KD-CT の X 線結晶構造を観察すると、片方のリン酸化スイッチは分子表面に突出している。この構造を経由して阻害活性を示すと仮定した場合、2SW ペプチドが高い阻害活性を示すことと矛盾する。したがって、2SW は結晶構造に見られる箇所とは別のところで作用すると推察される。今後、ATP 濃度あるいはペプチド基質濃度を変化させて 2SW ペプチドの阻害活性を調べる、さらには 2SW ペプチドと KD 複合体並びに JM-KD-CT 単体の X 線結晶構造解析を行い、2SW の作用機序を明らかにしたい。これにより、新規メカニズムで作用する阻害剤の創出が促進される。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	(1) M. Yoshida, H. Nagao, H. Sugiyama, M. Sawa, T. Kinoshita, Identification of a novel target site for ATP-independent ERK2 inhibitors, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 593 , (2022), 73-78.	
	【学会発表】	
(1) 田中友輝、松本邦夫、木下誉富、Evaluation of the peptide derived from the N- and C-terminal regions of kinase domain for allosteric control of receptor tyrosine kinase cMet、第 58 回ペプチド討論会 (2021 年)		
(2) 木下誉富、構造生物学を基盤としたキナーゼ創薬研究、日本農薬学会第 35 回農薬デザイン研究会 (2021 年)		
【その他特筆事項】		

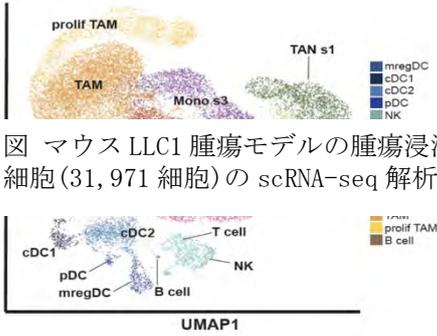


令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Met-CDCP1 複合体の構造解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学 微生物病研究所・助教・梶原健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学 微生物病研究所・特任研究員・赤松香奈子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>がん細胞は微小環境において周囲の細胞から様々な因子の供給を受けることで、がん形質を獲得している。その因子のひとつ HGF は受容体 Met に結合することで細胞内シグナルを活性化させ、がん進展に寄与している。我々は細胞膜上の Met 制御メカニズムの理解を目指して解析を進めてきた。これまでに CDCP1 は Met と細胞外領域を介して結合しており、その活性化を制御していることを明らかにしてきた。さらに、この制御には CDCP1 の細胞外領域の構造変化(切断)が重要であることを明らかにした。しかし、CDCP1 の構造変化が Met との相互作用に与えるインパクトの構造的な理解には至っていない。本研究では、CDCP1 と Met の結合を構造レベルで明らかにして、Met の精密な制御、さらにはがん進展の抑制を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1) CDCP1 大量発現システムからの回収と精製 CDCP1 の細胞外領域の C 末端側に精製用の His6 タグと TEV プロテアーゼ切断配列を付加したコンストラクトを哺乳動物細胞にトランスフェクションした。使用する細胞は本年度から変更して、Expi293F とした(結晶化および構造解析時にノイズの原因となる糖鎖の付加を担う GnT1 の遺伝子変異株を使用した)。大量培養を実施して、得られた培養上清(数百 mL)を回収して、そこから Ni-NTA レジンで粗回収を行った。ゲルろ過クロマトグラフィ後、TEV プロテアーゼ処理とエンドグリコシダーゼ処理を実施して、再度ゲルろ過クロマトグラフィに供した。この精製条件では糖鎖付加の違いによる複数のタンパク質が混入しているため、疎水性相互作用クロマトグラフィに供した。得られた複数のピークを分取して、再度イオン交換クロマトグラフィを行った。得られたピークはすべて SDS-PAGE および CBB 染色に供して、目的タンパク質の精製と純度の確認を行った。これまでに、(1) CDCP1 細胞外領域の大量発現システムを構築することができ、さらに (2) 高純度のサンプルを得ることに成功した。</p> <p>2) CDCP1 結晶化条件の検討 (大阪大学蛋白質研究所中川敦史教授との共同研究) 精製した CDCP1 細胞外領域サンプルの DLS 解析および結晶化条件のスクリーニングを実施した。複数の結晶化スクリーニングキットとスクリーニング機器 Mosquito を使用したシッティングドロップ蒸気拡散法を採用して、網羅的な探索を実施した。さらにハンギングドロップ法も採用しながら、結晶化条件を展開した。これまでに、結晶化の最適条件を見いだすことができた。</p> <p>3) CDCP1 構造解析の検討 (大阪大学蛋白質研究所との共同研究) これまでの研究結果から、CDCP1 の細胞外領域の構造的な理解は、従来の結晶構造解析では不十分である可能性も考えられた。現在、電子顕微鏡を使用した構造解析も実施しており、解析条件の検討を行っている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1) Src activation in lipid rafts confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell competition Kajiwara K, Chen PK, Kon S, Fujita Y, and Okada M. <i>bioRxiv</i> (2021)</p> <p>2) SRC kinase activator CDCP1 promotes hepatocyte growth factor-induced cell migration/invasion of a subset of breast cancer cells Kawase N, Sugihara A, Kajiwara K, Hiroshima M, Akamatsu K, Nada S, Matsumoto K, Ueda M, and Okada M. <i>Journal of Biological Chemistry</i>, 298, 101630 (2022)</p>	

	<p>【学会発表】</p> <p>1) 腎臓の代償性肥大における Src シグナルの時空間的制御 梶原健太郎、山野荘太郎、青木一洋、奥崎大介、松本邦夫、岡田雅人 第73回日本細胞生物学会大会 (Web) 2021年7月</p> <p>2) がん悪性化に関わる増殖因子シグナルの制御機構 梶原健太郎 第19回横断的腫瘍フォーラム 2021年7月</p> <p>3) がん細胞における CDCP1 介在シグナル伝達経路の役割 池田由利子、梶原健太郎、岡田雅人 第94回日本生化学会大会 (Web) 2021年11月</p>
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>アウトリーチ活動 一般財団法人ナレッジキャピタル SpringX 超学校 高校生のためのミチシルベ「がんを知り、がんと戦う」 2021年7月</p>

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		シングルセル RNA-seq による RB1 欠損 MCF7 細胞株の不均一性及び遺伝子発現特徴の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・特定准教授・Thumkeo Dean
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	Rb は多くのがんで loss of function(LOF)変異が見つかっており、代表的ながん抑制遺伝子とされている。これまで、多くの研究により細胞周期における Rb の古典的機能の詳細が明らかになったが、近年、細胞周期以外の様々な細胞機能についても Rb の関与が少しずつ明らかになってきた。しかし、現在でもはまだ不明な部分が多く、さらなる解明が必要である。このような背景から、本研究では Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いて、scRNA-seq による解析を行い、Rb 不活性化がん細胞の不均一性と遺伝子発現の特徴を明らかにし、未知のがん細胞における Rb の非古典的機能を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究は、COVID-19 の蔓延下を実施された。そのため、移動や共同研究者との接触に関する厳密なガイドラインが施行され、研究の開始が 2021 年度後半までずれ込み、その後も様々な制限のために、現在は scRNA-seq 解析を行うための準備にとどまり、目標の Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いた scRNA-seq 解析までには届かなかった。</p> <p>このように、研究目標はまだ未達成ではあるが、一方で、申請者はこの一年間の間、モデルとして、申請者が手元に持つヒト表皮細胞を用いて、scRNA-seq 実験 platform 及び scRNA-seq のデータ解析 pipeline などを立ち上げ、今後の Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞の scRNA-seq 解析に応用できる体制を確立できた (Siriwach, その他 6 名, Thumkeo, <i>iScience</i> 25, 104130, 2022)。また、申請者は <i>in vitro</i> 培養細胞を用いた scRNA-seq に加え、マウス腫瘍モデルの腫瘍標本の scRNA-seq 実験系・解析系も立ち上げました。これまで、マウス LLC1 (Lewis Lung Carcinoma) の腫瘍内浸潤 CD45+免疫細胞の scRNA-seq による profiling に成功している (図, Thumkeo et al., <i>Cell Reports</i>, in revision)。今後、この技術を本研究に応用すれば、Rb 欠損腫瘍細胞の腫瘍モデルの腫瘍内微小環境(TME)を明らかにすることができ、control と比較することにより、実際の腫瘍内で Rb が腫瘍微小環境にどのような影響を及ぼし、<i>in vivo</i> レベルの Rb の非古典的機能解明につながる可能性があり、本研究の成果の一つとして挙げられるのではないかと考えている。</p>  <p>図 マウス LLC1 腫瘍モデルの腫瘍浸潤免疫細胞 (31,971 細胞) の scRNA-seq 解析結果</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	1) Siriwach R, Ngo AQ, Higuchi M, Arima K, Sakamoto S, Watanabe A, Narumiya S, <u>Thumkeo D</u> . Single-cell RNA sequencing identifies a migratory keratinocyte subpopulation expressing THBS1 in epidermal wound healing. <i>iScience</i> 25, 104130, 2022.
	【学会発表】	-
	【その他特筆事項】	-

研究課題		染色体安定性における JSAP の役割とその分子基盤の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・教授・橋本真一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・助教・岩渕禎弘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	染色体不安定性は、がん発生・悪性化の要因の1つである事が知られている。これまでの多くの研究から、染色体の均等分配機構は分子レベルで明らかにされつつある。しかし、染色体分配に関わる鍵分子の「ダイナミックな局在変化」や染色体を安定に保持するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、染色体分配における新規制御因子としての JSAP に焦点を当て、JSAP 制御の破綻が染色体不安定性を誘導するかを検証するとともに、その分子基盤の解明を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度、JSAP2 タンパク質の発現誘導が可能な RPE-1 細胞システムの構築・解析を行い、JSAP2 の発現亢進は異数性を誘導することを明らかにした。また、これまでの研究により、siRNA による JSAP2 の発現抑制は RPE-1 細胞の増殖阻害を引き起こすことが分かっている。そこで、本年度は JSAP2 ノックダウン (<i>JSAP2</i> KD) RPE-1 細胞の RNA-seq 解析を行った。得られた網羅的遺伝子発現データを用いて GSEA 解析を行ったところ、JSAP2 は RB-E2F 経路や G2/M・M 期チェックポイントに関与することが示唆された (図1)。実際、<i>JSAP2</i> KD RPE-1 細胞では、RB タンパク質のリン酸化状態が変化すること、および前中期動原体において MAD2 タンパク質レベルが低下することなどを確認した。</p> <div data-bbox="400 1055 1522 1496" data-label="Figure"> <p>図1. JSAP2 ノックダウン RPE-1 細胞の RNA-seq 解析</p> <p>今後、さらに解析を進め、JSAP がどのように細胞周期や染色体安定性の制御に関与しているのかをより詳細に調べる予定である。</p> </div>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	Gunarta IK, Odongoo R, Iwabuchi S, Hashimoto S, Yoshioka K. Role of JSAP2 in cell cycle regulation. 第44回日本分子生物学会年会, 2021年12月1日
	【その他特筆事項】	なし

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞と正常線維芽細胞との相互作用
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学・講師・昆 俊亮
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京理科大学・PD・田頭 香澄美
	所属・職名・氏名	東京理科大学・博士2年・中井 一貴
	所属・職名・氏名	東京理科大学・博士1年・Lin Hancheng
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>腫瘍微小環境では、がん細胞によって教育されたがん関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍関連マクロファージ (TAM) などの間質細胞が腫瘍進展に有利に作用する。しかしながら、がん細胞が間質組織に初めて出現したとき、がん細胞と正常間質細胞との間でどのような細胞間相互作用が生じるのか、その実態はよく分かっていない。これまでの予備実験の結果から、正常間質組織は本来抗腫瘍的な場であり、Ras 単独変異など比較的悪性度の低い変異細胞は排除されるのに対し、APC/Ras 二重変異など悪性度の高い細胞は腫瘍進展に有利な間質環境を構築することを示唆する結果を得ている。そこで本研究では、培養細胞を用いて、悪性度の異なるがん細胞と正常間質細胞、具体的には正常線維芽細胞との細胞間相互作用の様子を解析した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々の研究グループで作出したマウスモデルを用いたこれまでの予備的実験結果より、正常間質組織は、Ras 単独変異など比較的悪性度の低いがん細胞に対しては抗腫瘍的に機能するのに対し、APC/Ras 二重変異など悪性度の高いがん細胞は「がん細胞核」として、正常間質からがん間質への臨界現象を誘導することを示唆する結果が得られていた。そこで、上記モデルで観察された事象を培養細胞にて再現するため、ドキシサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を発現する細胞株 (RasV12 細胞) と APC 欠損と同様に Wnt シグナルを活性化する β-catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現し、かつドキシサイクリン依存的に Ras 変異を発現する細胞株を樹立した (β-cat Δ N/RasV12 細胞)。これらの変異細胞と正常線維芽細胞を共培養し、各々の細胞の挙動を観察した結果、β-cat Δ N/RasV12 細胞は単独培養時と同程度に線維芽細胞共在で増殖した。一方、RasV12 細胞を線維芽細胞と共培養すると、線維芽細胞に接した RasV12 細胞内で液泡が顕著に蓄積し、細胞の肥大化が認められ、一部の細胞は細胞死した(図)。これらの結果より、正常線維芽細胞は Ras 単独変異細胞の増生を抑制する機能を有することが示唆され、RasV12 変異に β-catenin の活性化変異を負荷すると、この抑制効果が干渉されることが分かった。そこで、正常線維芽細胞と物理的に接したがん変異細胞で生じる性状変化を解析するため、diffusible genetically encoded fluorescent indicator (dGFAPHIC)を用いて、正常線維芽細胞と隣接した変異細胞のみを標識する方法論の開発に成功し、現在、がん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用の実態をより詳細に解析中である。さらには、マウス生体内にて腫瘍発生領域におけるがん細胞ならびに周辺間質細胞の遺伝子発現情報を得るため、空間的遺伝子発現解析法である Visium 解析を行った結果、腫瘍部では endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) のマーカー分子が多数発現増加することを見出した。実際に、腸管の whole mount 染色により EndMT マーカーを免疫染色した結果、がん細胞に近接したリンパ管内皮細胞で EndMT が惹起されていることが示唆された。これらの結果より、APC/Ras 変異がん細胞はリンパ管内皮細胞に EndMT を誘導することにより、リンパ管構造を脆弱化し、リンパ管侵襲することが示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<p>昆 俊亮：がん細胞が誕生したときの生体内反応、第53回 フォーラム富山「創薬」、2021年5月11日</p>
	【その他特筆事項】	なし

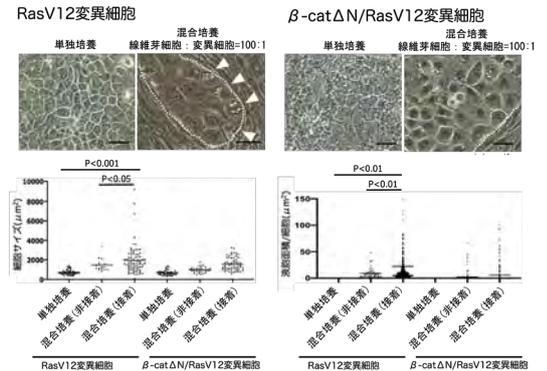
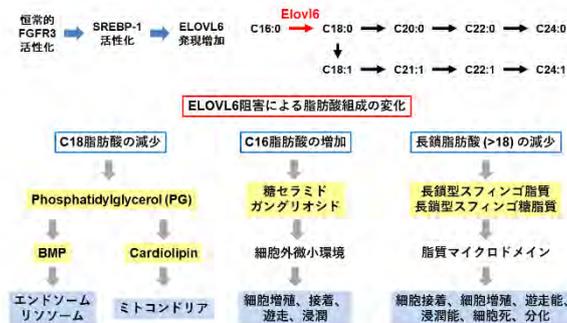


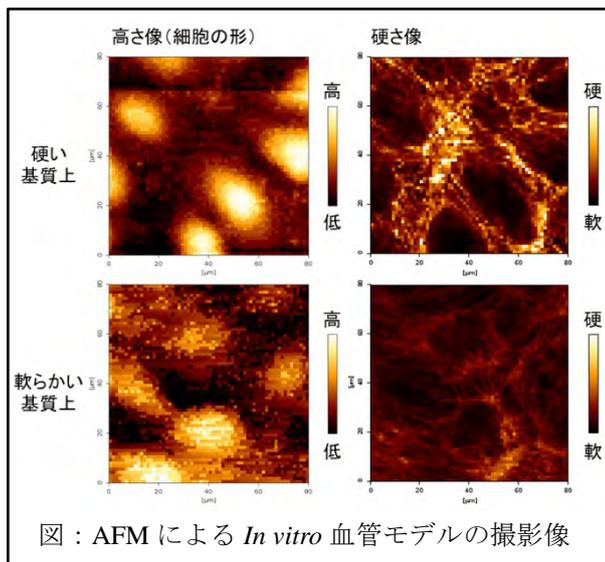
図. 正常線維芽細胞とがん変異細胞との共培養実験

RasV12 細胞と β -cat Δ N/RasV12 を単独培養、もしくは正常線維芽細胞と共培養したときの細胞サイズと細胞における液胞が占める面積を示す。正常線維芽細胞と共培養した RasV12 細胞は細胞のサイズが大きくなり、かつ細胞内で液胞が蓄積する(矢頭)。

研究課題		脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 の膀胱がんにおける役割
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・教授・松坂 賢
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・助教・大野 博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	膀胱がんは尿路上皮がんの中で最も死亡率が高く、日本でも近年、泌尿器系のがんでは前立腺がんに次いで膀胱がんが増加している。膀胱がんは有効なスクリーニングマーカーが無く、その発がん機序はほとんどわかっていない。また、再発率の高いがんである。したがって、膀胱がんの有効な診断、治療および予防法の確立が求められている。我々は、脂肪酸の鎖長を制御する酵 ELOVL6 を同定し、さらに本酵素が膀胱がんで上昇することを見出した。そこで、本研究では、ヒト膀胱がん細胞株を用いて膀胱がんにおける ELOVL6 発現誘導機序および ELOVL6 が制御する脂質多様性が膀胱がんの代謝やシグナル伝達におよぼす影響を明らかにし、膀胱がんの新規治療戦略の開発につなげることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト筋層非浸潤膀胱癌細胞株 RT112 を用いて、膀胱癌における ELOVL6 発現制御機構を解析した。また、RT112 およびヒト筋層浸潤性膀胱癌細胞株 J82、253J、T24 において ELOVL6 をノックダウンし、細胞増殖への影響とその分子メカニズムを解析した。膀胱癌手術検体において、非癌部に比べて癌部では ELOVL6 の発現が 5.8 倍増加した。筋層非浸潤膀胱癌では変異や融合による FGFR3 の恒常的活性化が知られているが、RT112 において FGFR3 をノックダウンすると、転写因子 SREBP-1 の活性化の抑制 (核型 SREBP-1 の減少) と ELOVL6 発現の減少が認められた。ELOVL6 のノックダウンは、FGFR3 遺伝子変異を有さない T24 および 253J では細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する RT112 および J82 では細胞増殖を抑制した。Xenograft モデルによる造腫瘍能の検討では、<i>in vivo</i> においても ELOVL6 ノックダウンによる RT112 の腫瘍形成の抑制が認められた。また、ELOVL6 をノックダウンした RT112 細胞の RNA-seq 解析から、ELOVL6 の阻害は matrisome と呼ばれる細胞外微小環境に関わる遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。さらに、ELOVL6 をノックダウンした RT112 細胞の脂質メタボローム解析から、ELOVL6 の阻害は特にリン脂質やスフィンゴ脂質の脂肪酸プロファイルに大きな影響を及ぼし、細胞膜の物性や機能を変化させる可能性が示唆された。本研究により、膀胱癌では ELOVL6 の発現が亢進し、特に活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する膀胱癌において細胞増殖能や腫瘍形成能に重要な役割を果たすこと、その分子機序として細胞外微小環境の変化が関与している可能性が示された。今後、膀胱癌の増殖や悪性進展を促進する脂質分子種およびその作用機序を解明する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>Tanaka K, Kandori S, Sakka S, Nitta S, Tanuma K, Shiga M, Nagumo Y, Negoro H, Kojima T, Mathis BJ, Shimazui T, Watanabe M, Sato TA, Miyamoto T, Matsuzaka T, Shimano H, Nishiyama H. ELOVL2 promotes cancer progression by inhibiting cell apoptosis in renal cell carcinoma. <i>Oncol Rep.</i> 2022 Feb;47(2):23. doi: 10.3892/or.2021.8234.</p>
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



研究課題		メカノバイオロジーから迫るがん転移機構
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・石原 誠一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>がんの死因の90%以上は転移によるものといわれている。興味深いことに、由来の異なるがんであっても共通した特定の臓器（高転移性臓器）に転移することが知られている。しかしながら、なぜ由来の異なるがんが高転移性臓器に転移するのかは不明である。申請者は高転移性臓器には未知の共通した性質が存在すると考え、高転移性臓器では血管周囲の組織の硬さが共通していると仮定した。そしてその硬さに応答した血管内皮細胞が特異的な分子を発現させ、がん細胞の転移を促進させると考えた。本研究ではこれらの仮説を証明し、転移に寄与する分子を同定し、それをターゲットとした新規治療法を提案することを目指した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでにコラーゲンとマトリゲルを混合した基質上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を播種しコンフルエント状態から9日以上培養することによって、細胞運動が抑えられたHUVECのシート (<i>In vitro</i> 血管モデル) を作成することに成功している (未発表)。そこで <i>In vitro</i> 血管モデルが基質の硬さを感知して物性や遺伝子発現を変化させるかどうかを調べた。</p> <p>まず硬さの異なる基質上で <i>In vitro</i> 血管モデルを作成した。コラーゲンとマトリゲルをコートしたプラスチックディッシュを硬い基質として、コラーゲンとマトリゲルを含んだゲルを軟らかい基質として用意した。その上にHUVECを播種し10日間培養した。原子間力顕微鏡 (AFM) で <i>In vitro</i> 血管モデルの高さ像 (細胞の形) と硬さ像を取得した結果、硬い基質上の <i>In vitro</i> 血管モデルでは細胞-細胞間に他の個所よりも硬い繊維状の構造を形成することがわかった (図、未発表)。一方、軟らかい基質上の <i>In vitro</i> 血管モデルでも細胞-細胞間に繊維状の構造がみられたが、硬い基質上の同一箇所に比べて軟らかかった (図、未発表)。このことから、<i>In vitro</i> 血管モデルは基質の硬さに応答して物性を変化させていることがわかった。加えて、マイクロアレイにより基質の硬さによって発現変化する遺伝子群を調べたところ、細胞-細胞間接着に関わる遺伝子群の発現が軟らかい基質上に比べて硬い基質上の <i>In vitro</i> 血管モデルで高発現していることがわかった。</p> <p>さらに、上記の通り確立した実験系を用いて硬さの異なる基質上で <i>In vitro</i> 血管モデルを作成し、その上にがん細胞を播種してがん細胞が <i>In vitro</i> 血管モデルに潜り込む様子の観察を進めている。これまでに赤色蛍光タンパク質で標識したHUVECと、緑色蛍光タンパク質で標識した肺がん細胞株 H1299 細胞を樹立することに成功している。今後は上記の実験系とこれらの細胞を用いることで、基質の硬さが転移に与える影響を検証するとともに、上記で同定した分子が転移に寄与するかどうかを調べる予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	S. Ishihara and H. Haga: Matrix stiffness contributes to cancer progression by regulating transcription factors, <i>Cancers</i> , 14(4):1049 (2022).
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	



令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		転移性大腸がん幹細胞の未分化性制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・分野長・青木 正博
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・主任研究員・藤下 晃章
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>がん幹細胞の存在とその可塑性が、転移や再発そして治療抵抗性に深く関与すると考えられている。我々は、新規に作出した転移性大腸がんマウスモデル、および同マウスモデル由来の大腸がん細胞株の解析から、転移性大腸がんが発現上昇している幹細胞マーカーが転移促進作用を持つこと、さらにエネルギー代謝に関わる酵素が大腸がん細胞の未分化性や転移能に寄与することを見出した。本研究課題では、この酵素が関与する代謝経路の下流分子を同定すること、および幹細胞マーカーの発現や代謝酵素の活性を抑制する化合物を同定することを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々は、4つの大腸がん関連遺伝子 (<i>Ctnnb1</i>, <i>Kras</i>, <i>p53</i>, <i>Smad4</i>) の変異を有する転移性大腸がんマウスモデルにおいて、大腸がんが肝臓へ転移する際に幹細胞マーカーである ALCAM や PROM1 の発現が上昇することを見出した。このマウスモデルに由来する大腸がん細胞株 (CKPS細胞) の ALCAM をノックアウト (KO) したところ、移植モデルにおける肝転移効率が低下した。一方、エネルギー代謝に関与する酵素 X を KO した CKPS 細胞も肝転移効率が著しく低下し、かろうじて生じた肝転移巣のがん細胞は粘液産生細胞である goblet (杯) 細胞様に分化していた。これらの子備的成果は、酵素 X や ALCAM が転移性大腸がんの治療標的となる可能性を示唆する。本研究課題では以下の検討を行なった。</p> <p><u>計画1：酵素 X 経路関連遺伝子のノックアウト細胞を用いた未分化性制御因子の同定</u> 酵素 X 経路関連分子 A、B、C について、CKPS 細胞で CRISPR-Cas9 による KO を行い、転移巣形成数と goblet 細胞様の分化 (アルシアンブルー陽性細胞数) について検討した。分子 A を KO した細胞は、酵素 X の KO 細胞と同様に転移能が低下し、転移巣には goblet 様の分化細胞が認められた。一方、分子 B を KO した細胞は、転移能の低下も分化形質も示さず、分子 C を KO した細胞は、転移能は低下したが、分化形質は示さなかった。今後の研究により、大腸がん幹細胞の転移能および未分化性維持において酵素 X やその関連分子が果たす役割を解明したい。</p> <p><u>計画2：薬剤ライブラリーを利用した分化制御誘導機構の解明と分化誘導化合物の探索</u> 本共同研究により提供を受けた、Autophagy Library (94 種)、Kinase inhibitor library (80 種)、ICCB known bioactives library (480 種) を用いて、CKPS 細胞における幹細胞マーカーの発現、および酵素 X 経路を阻害する化合物の探索を行なった。各化合物を CKPS 細胞に処置し、ALCAM の発現と酵素 X 経路の活性化状態に及ぼす影響を、ウェスタンブロットによって評価した。その結果、ALCAM の発現を低下させる化合物、酵素 X 経路を不活化する化合物の候補がいくつか同定された。これら候補化合物の選択性・特異性について解析を行っている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	該当なし。
	【学会発表】	該当なし。
	【その他特筆事項】	該当なし。

研究課題		大腸癌の浸潤先進部形態学的分類による新規治療標的分子の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・学内講師・望月早月
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・永田健
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・博士研究員・Ines Nearchou
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・教授・上野秀樹
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>癌細胞が浸潤する際に線維芽細胞等が増生して間質が形成される状態を線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) と称するが、当教室では、原発巣の DR を Immature、Intermediate、Mature の3群に分類する「DR 分類」を提唱し、これが大腸癌の予後予測指標として有用であることを見出している。最近、DR 分類の分子生物学的背景として、Immature 症例組織検体から培養したがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) では ADAM9s の発現が増強し、共培養した大腸癌細胞の細胞増殖能と遊走能が促進することを報告した (Int J Cancer. 2022 15;150(10):1706-1721)。本研究では、プロテオミクス法を用いて immature 由来 CAFs の培養上清やエクソソームで高発現する ADAM9s 以外のタンパク質を中心に網羅的・包括的な新規治療標的分子を探索する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでの実験結果から DR 分類の分子生物学的背景として、Immature 症例由来の CAFs では ADAM9s の発現が増強し、shRNA でその発現を抑制すると大腸癌細胞の細胞増殖能が抑制されることが明らかとなった (図 1, A) (Int J Cancer 15;150(10):1706-1721,2022)。また、ADAM9 には分泌型の ADAM9s の他にスプライシングバリエーションである膜結合型 ADAM9m が存在することから、CAFs における ADAM9s の発現を抑制後、発現ベクターを用いて ADAM9m を過剰発現させ、大腸 HCT-116 細胞と共培養後、細胞増殖アッセイを行ったところコントロール群 (Mock) と比較して細胞増殖の程度に差は認められなかった。これらのことから CAFs から分泌される ADAM9s は大腸癌細胞の増殖を促進するが、ADAM9m は大腸癌細胞増殖能に影響を与えないと考えられた (図 1, B) (Int J Cancer 15;150(10):1706-1721,2022)。</p> <p>さらに、DR 分類別 Immature 症例由来 CAFs と mature 症例由来 CAFs の培養上清とエクソソームを回収し、質量分析法を用いて Immature 症例由来 CAFs と mature 症例由来 CAFs のタンパク質発現の解析を開始した。これまでに immature CAFs のエクソソームで ADAM9s を含むいくつかの治療標的候補分子を同定できている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Tadakazu Ao, *Satsuki Mochizuki, Yoshiki Kajiwara, Keisuke Yonemura, Takehiro Shiraishi, Ken Nagata, Eiji Shinto, Koichi Okamoto, Ines P Nearchou, Hideyuki Shimazaki, Yoji Kishi, Yasunori Okada, Hideki Ueno: Cancer-associated fibroblasts at the unfavorable desmoplastic stroma promote colorectal cancer aggressiveness: potential role of ADAM9. Int J Cancer 15;150(10):1706-1721,2022 (*Corresponding author)</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. 望月早月. 大腸癌線維性癌間質反応におけるメタロプロテアーゼ ADAM9 の役割. 第 26 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会シンポジウム「がん領域におけるプロテアーゼ研究の最新トピックス」2021 年 8 月 27 日リアルタイム講演</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>上記論文(Int J Cancer 15;150(10):1706-1721,2022)が評価され、筆頭著者の阿尾理一博士が令和 4 年度日本結合組織学会大高賞を受賞した。</p>	

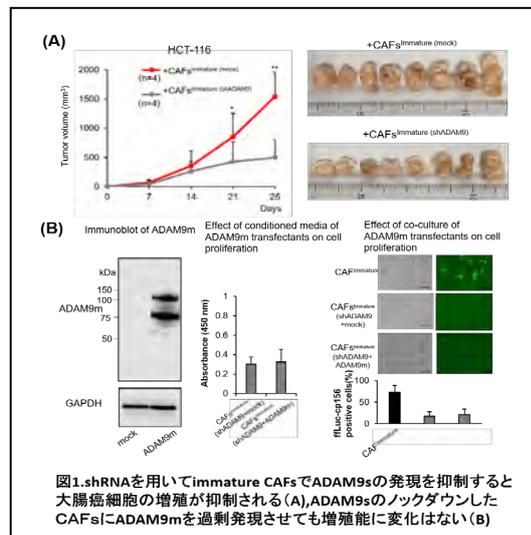


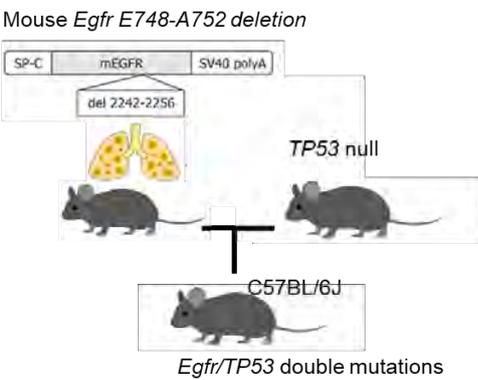
図1.shRNAを用いてimmature CAFsでADAM9sの発現を抑制すると大腸癌細胞の増殖が抑制される(A),ADAM9sのノックダウンしたCAFsにADAM9mを過剰発現させても増殖能に変化はない(B)

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		GC-rich sequence DNA-binding factor 2 の阻害剤の探索とその機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学薬学部薬学科・講師・東 恭平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司 先生
【研究目的】	<p>ヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG)は血管の基底膜に豊富に存在する。癌細胞が分泌するヘパラン硫酸分解酵素ヘパラーゼ (HPSE)は、基底膜の HS を分解し癌の転移に重要な役割を果たしている。そのため、HPSE の基質である HS やヘパリンの糖鎖構造を軸にした HPSE 活性阻害剤が合成されてきた。しかしながら、糖鎖は親水性が高いためバイオアベイラビリティが低いことや血中半減期が短いことが原因で、有用な阻害剤は見出されていない。私達は最近、HPSE の転写因子として GC-rich sequence DNA-binding factor 2 (GCFC2)を同定した。本研究では、GCFC2 の機能を調べることで、および HPSE の転写を特異的に阻害する医薬品の探索を目的に検討を行った。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1. HPSE 遺伝子の発現を抑制する既存薬の探索</p> <p>2021 年度は HCT116 細胞に HPSE 遺伝子のプロモーター領域とホタルルシフェラーゼ遺伝子を融合させたプラスミド (pHPSE-Luc)を形質導入した後、貴研究所の2つの既存薬ライブラリ (FDA approved drug library Japan version, ICCB Known Bioactives Library)を添加した。最終濃度 0.1 μM で HPSE 遺伝子のプロモーター活性を 10%以下に阻害し、細胞毒性を示さなかった薬剤として Auranofin を同定した。また1回のみの検討であるが、亜ヒ酸、Calyculin A、Diphenyleiodonium、Gliotoxin、Valinomycin、Staurosporine、MG132、ikarugamycin の8種も候補として見出した。Auranofin の治療標的である atypical protein kinase C (aPKC)に着目し、乳癌患者ゲノムクスデータ解析を行ったところ、HPSE1 と aPKCλ およびζ の発現量に正の相関性があり、および両方の遺伝子発現が高いほど予後不良になることが示唆された。また、乳癌細胞株3種 (MDA-MB157、231 および 468)の aPKCλ 又はζ を siRNA でノックダウンしたところ、MDA-MB 231 および 468 において aPKCζ の発現を siRNA で抑制した時に HPSE mRNA の発現が有意に低下した。また HPSE mRNA の発現は 468=231>>157 であった。以上の結果より、Auranofin の発見により aPKC を介した新たな HPSE 発現制御機構が明らかとなった。</p> <p>2. ポリアミンによる GCFC2 合成促進機構 (遺伝子組換え実験有)</p> <p>私達はこれまでに、転写因子 GCFC2 は HCT116 細胞において HPSE 遺伝子の発現を亢進すること、および GCFC2 はポリアミンにより翻訳レベルで発現制御を受けることを見出している。GCFC2 遺伝子 (5'-UTR: 130bp+N-terminal coding sequence (NCS): 98 bp)と EGFP 遺伝子を融合させたプラスミド (pGCFC2-EGFP)を HCT116 細胞に形質導入した結果、ポリアミンは GCFC2-EGFP 融合タンパク質の合成を翻訳開始段階で促進することを明らかにした。更に 5'-UTR を欠損 (又は変異)させた変異体を作製した結果、どの変異体においてもポリアミンによる促進が認められた。以上の結果より、NCS 領域にポリアミンに感受性を示す配列があることが示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>正林国際特許商標事務所に「オーラノフィン」に関する先行技術調査を依頼した結果、脳梗塞の治療用途に関しては、開示は見いだせなかったとのことでした。そこで、脳梗塞研究で特許申請すべく内皮細胞を用いて上記の研究を至急行いたいと思います。内皮細胞による結果に関わらず、今年度は学会発表を行い、論文投稿を目指したいと思います。</p>	

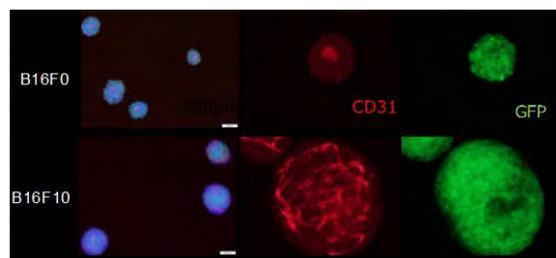
研究課題		代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明																									
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・准教授・岡橋伸幸																									
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・教授・清水浩																									
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・准教授・松田史生																									
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・博士前期課程学生・谷口赳夫																									
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・博士前期課程学生・西本和生																									
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡																									
【研究目的】	がん細胞は活発な細胞増殖を支える活発な代謝を行うことが知られている。しかし、そのような特異的な代謝を実現するメカニズムや未分化性を維持したがん幹細胞の代謝は明らかとなっていない。そこで、本研究では細胞内代謝の流れを定量的に計測できる ^{13}C 代謝フラックス解析法を使って種々のがん細胞株の代謝解析を実施し、がん特異的代謝の一般性を検証した。さらに実測された代謝状態をとるために必要な代謝制約を <i>in silico</i> 代謝シミュレーションを使って予測することで、がん特異的代謝の背後にある代謝原理の抽出を試みた。																										
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>由来臓器の異なる計 12 株のヒトがん細胞株の ^{13}C 代謝フラックス解析を実施した。その結果、どの細胞株でも共通して取り込んだグルコースのほとんどを乳酸として排出するワールブルク効果が観測された(図 A)。この結果から各細胞の ATP 総再生速度を算出し、表現型との相関を調べた。意外なことに細胞の比増殖速度と ATP 総再生速度の間に相関関係は見えず、がん特異的な代謝の形成には増殖以外の要素が影響することが示唆された。そこで、実測された代謝状態を再現するために必要な代謝制約を <i>in silico</i> 代謝シミュレーションを用いて探索した。ATP 消費速度が最大となる条件下でのシミュレーションでは、グルコースを TCA サイクルで完全酸化する代謝状態が予測され、実測されたワールブルク効果中心の代謝状態を再現できなかった(図 B)。そこで、TCA サイクルでの代謝を制約する要素として我々は代謝熱と電子伝達鎖に注目し、実測された代謝状態で発生する代謝熱量や電子伝達速度を用いて再度シミュレーションを行ったところ、実測値に極めて近い代謝状態を再現できることが明らかとなった(図 C, D)。これは、がん細胞が過剰な熱産生や電子伝達を回避しつつ ATP 獲得を最大化できる代謝状態をとっていることを示唆しており、熱産生や電子伝達が治療の標的となる可能性を示唆している。今後はこの知見をがん幹細胞でも同様に検証することで、がん幹細胞の代謝基盤の解明を進める。</p>																										
	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Case</th> <th>ATP consumption (nmol 10^6 cells$^{-1}$ h$^{-1}$)</th> <th>Heat (kJ 10^6 cells$^{-1}$ h$^{-1}$)</th> <th>ETC level (complex IV)</th> <th>Correlation to MCF-7 data (r)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Measured (MCF-7)</td> <td>1,674</td> <td>n.d.</td> <td>Predicted</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>Simulated case 1</td> <td>100,000</td> <td>10,463</td> <td>Predicted</td> <td>0.61</td> </tr> <tr> <td>Simulated case 2</td> <td>1,674</td> <td>78.4</td> <td>Fixed at 78.4</td> <td>0.85</td> </tr> <tr> <td>Simulated case 3</td> <td>1,674</td> <td>105.2</td> <td>Fixed at 105.2</td> <td>0.94</td> </tr> </tbody> </table>		Case	ATP consumption (nmol 10^6 cells $^{-1}$ h $^{-1}$)	Heat (kJ 10^6 cells $^{-1}$ h $^{-1}$)	ETC level (complex IV)	Correlation to MCF-7 data (r)	Measured (MCF-7)	1,674	n.d.	Predicted	-	Simulated case 1	100,000	10,463	Predicted	0.61	Simulated case 2	1,674	78.4	Fixed at 78.4	0.85	Simulated case 3	1,674	105.2	Fixed at 105.2	0.94
Case	ATP consumption (nmol 10^6 cells $^{-1}$ h $^{-1}$)	Heat (kJ 10^6 cells $^{-1}$ h $^{-1}$)	ETC level (complex IV)	Correlation to MCF-7 data (r)																							
Measured (MCF-7)	1,674	n.d.	Predicted	-																							
Simulated case 1	100,000	10,463	Predicted	0.61																							
Simulated case 2	1,674	78.4	Fixed at 78.4	0.85																							
Simulated case 3	1,674	105.2	Fixed at 105.2	0.94																							
	<p>図 実測代謝フラックス分布と <i>In silico</i> 代謝シミュレーション結果の比較 (https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.16.468557v1)</p>																										
【成果等】	【主な論文発表】 投稿中																										
	【学会発表】 近藤佑哉 岡橋伸幸 松田史生 ^{13}C 代謝フラックス解析を用いた乳がん細胞株の中心炭素代謝比較 第 44 回日本分子生物学会(横浜) 2021/12/2																										
	【その他特筆事項】 なし																										

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		TP53 変異が EGFR 変異肺癌における腫瘍免疫応答に及ぼす影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学病院・呼吸器アレルギー内科研究准教授 大橋 圭明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 中須賀 崇匡
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 平生 敦子
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 大川 祥
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野 聖二
【研究目的】	<p>日本人の非喫煙者肺腺癌の約半数を占める上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異を有する肺癌 (EGFR 肺癌) は非常に重要な疾患であるが、根治的な薬物療法は確立していない。分子標的治療薬、腫瘍免疫応答から肺癌がいかに逃避するのか? を深く理解することは、革新的な新規治療開発の基盤となることが期待される。</p> <p><i>TP53</i> 変異は代表的ながん抑制遺伝子であるが、<i>EGFR</i> 変異と併存し、EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の効果、免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の効果に影響する可能性が報告されている。</p> <p>本研究において、岡山大学で樹立されたマウス型およびヒト型 EGFR 変異遺伝子を導入した遺伝子改変肺癌マウスモデル (Ohashi Cancer Sci 2008, Ohashi Cancer Res 2009 国内特許第 5255216 号) と金沢大学で管理している <i>TP53</i> 変異マウスモデルを交配し、EGFR 肺癌のより深い病態の解明を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>Mouse <i>Egfr</i> E748-A752 deletion</p>  <p>R3 年度に岡山大学より EGFR 変異肺癌マウスモデルを金沢大学へ送り、金沢大学で TP53 変異マウスモデルと交配を行った。交配は順調に進み、新規モデルの樹立に成功した。今後、EGFR-TKI の感受性、腫瘍免疫応答など <i>TP53</i> 変異が EGFR 肺癌に及ぼす影響につき評価を行っていく。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	特記なし。
	【学会発表】	特記なし。
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		生体外人工がん転移モデルを用いた生体内転移能再現性の追求
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学先端生命医科学研究所・助教・関谷佐智子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>がん細胞の転移能は治療後の予後を左右する重要な性質であり、がん転移の臨床的特性を反映したモデル、かつ分子・細胞～個体、様々なレベルでの研究系が求められている。ヒトのがん転移を予測するためのモデルとしては、ヒトがん細胞の免疫不全動物への Xenograft モデル、またマウスなど同種での移植モデルなどが挙げられる。また、がん血管新生の生体外解析技術としては CAM assay やマトリゲルに埋め込む方法などが行われており、各々のメリットはあるものの、臨床の薬効を評価するという点で、異種組織での微小環境での挙動を解析するため、ヒト組織での挙動との隔たりが課題である。本研究は、組織工学/tissue engineering 技術を基盤に <i>in vitro</i> 転移系を確立することを目的としている。より具体的には、リアルタイムでの転移確認のために GFP 導入がん細胞の高転移株、低転移株を用い、かん流培養液への浸潤と転移の確認を行うことで、転移能の評価系への発展を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>方法 転移能の異なるマウスメラノーマ細胞 (Stephane Gobeil et al. Genes Dev. 2008) に GFP 遺伝子が導入されている GFP-B16F0 細胞, および GFP-B16F10 細胞は金沢大学がん進展制御研究所 松本研究室の佐藤博士によって樹立されており、分与頂いた。これらの細胞は分泌する因子が類似しているものの、発現量が異なることが分かっている。 細胞シート工学を用い、ヒト皮膚線維芽細胞とヒト血管内皮細胞を用い、真皮模倣3次元組織を構築した。メラノーマ細胞は各々真皮模倣3次元組織へ共培養を行い、原発巣組織とした。ヒト肺線維芽細胞および血管内皮細胞を用いて転移先の肺間質模倣組織を作成した。 2つの培養チャンバーが一つの流路で連結されるシリコン製の培養デバイスを用い、原発巣と転移先組織をセルカルチャーインサート底部に設置、流路内上部壁面への装着を行い、4日間 200μL/min にてかん流培養を行った。</p> <p>成果 GFP-B16F0 細胞, および GFP-B16F10 細胞は肺線維芽細胞と血管内皮細胞を用いたオルガノイド構築により、血管新生能や細胞塊形成能も異なることが分かった。 4日間のかん流に伴い、流路内に侵入する細胞を観察したところ数個で形成する細胞塊として流路に侵入するがん細胞が観察された。GFP-B16F0 細胞, および GFP-B16F10 細胞を共培養した原発巣に対する各々の転移先組織を比較したところ、GFP-B16F10 細胞の方で多くの GFP 陽性細胞が観察された。しかしながら、多くの細胞が定着を生じたのか、定着した細胞が増殖した結果であるのかは未だ明らかではない。今後、リアルタイムにて組織定着を解析することで明らかにしていく。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	関谷佐智子、佐藤拓輝、松本邦夫、清水達也「組織工学によるかん流培養を用いた人工がん転移モデル構築の検討」第21回日本再生医療学会総会 2022 3月オンライン開催
	【その他特筆事項】	



令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		RET 融合遺伝子陽性がんの初期治療抵抗性機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学 研修員 谷村 恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学 准教授 山田 忠明
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学 教授 高山 浩一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野 聖二
【研究目的】	RET 融合遺伝子陽性肺がんに対し、RET 阻害薬は高い治療効果を示すが、他のがん分子標的治療薬と同様に、耐性克服は重要な課題である。治療の初期段階で生存した治療抵抗性細胞が、長期間の薬剤曝露によって不可逆的な耐性機構を獲得することが知られており、治療抵抗性細胞に対する治療介入を行うことで腫瘍の耐性化・再発を抑制出来る可能性がある。今回我々は RET 融合遺伝子陽性肺がんに対する選択的 RET 阻害薬によって誘導される治療抵抗性のメカニズムの解明と、克服治療法の開発を目的として本研究を立案した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>RET 遺伝子異常を有するがん細胞株 (LC2/ad, TPC-1) を用いて実験を行った。RET-TKI : selpercatinib、pralsetinib に曝露させた RET がん細胞内におけるシグナル伝達の変化を、蛋白レベルで解析した。その結果、EGFR、HER3 を初めとする HER ファミリーのリン酸化レベルが亢進していることが示された。siRNA 法によって EGFR、HER3 の遺伝子抑制を行うと、RET-TKI への感受性が増強することが示された。また、第一世代の EGFR-TKI である erlotinib を RET-TKI に併用することで、RET-TKI 単剤と比較し MEK/ERK 経路が抑制され、アポトーシスがより強力に誘導された。さらに、14 日間にわたる長期間の培養において、RET-TKI 単剤での治療では細胞の生存・再増殖が見られたのに対し、RET-TKI と erlotinib の併用では細胞の生存・再増殖が抑えられた。</p> <p>これらの結果から、RET がんに対し RET-TKI による治療を行うと、EGFR/HER3 の活性化によって下流シグナルの活性が保たれることで RET-TKI への感受性が低下することが明らかになった。EGFR-TKI である erlotinib を初期段階から併用することで、治療抵抗性細胞の生存を抑制し、後の耐性獲得を防ぐことが出来る、新規治療法としての可能性が示唆される結果が得られた (右図)。</p> <div data-bbox="933 985 1508 1433" data-label="Diagram"> <p>The diagram illustrates the signaling pathways in RET fusion gene positive lung cancer. In Monotherapy, RET-TKI inhibits the RET receptor, but HER3 and EGFR remain active, leading to MEK and ERK activation, resulting in Cell survival and Proliferation. In Combination therapy, RET-TKI inhibits RET, and Erlotinib inhibits EGFR, leading to reduced MEK and ERK activation, resulting in Cell apoptosis.</p> </div> <p>今後は、より詳細なメカニズムの解析や、マウスモデルを用いて併用治療の治療効果や安全性の検討、またバイオマーカーについての検討へと進めて行く予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

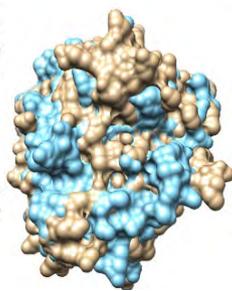
研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用を制御する高活性低分子化合物の同定を目指した機械学習を活用した創薬基盤の確立																																		
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・教授・青木 俊介																																		
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名																																			
	所属・職名・氏名																																			
	所属・職名・氏名																																			
	所属・職名・氏名																																			
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫																																		
【研究目的】	本研究では HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。種々の <i>in silico</i> スクリーニング手法を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、HGF α 鎖と β 鎖の Met への結合に関与するポケットに嵌まり込む低分子化合物を探索する。また計算科学的な創薬基盤を機械学習を活用したデータ駆動型創薬技術によって確立する事も目指した。最終的には、HGF-Met のタンパク質間相互作用を阻害する新規低分子化合物を高精度で予測できる創薬のための新規な技術基盤を確立することを目的とし、創薬リード化合物の類縁体設計、複合体構造解析ならびに有機合成展開も視野に入れた創薬研究を展開した。																																			
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまで本研究の標的タンパク質である HGF の立体構造に着目し <i>in silico</i> スクリーニング手法によって、HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害しうる新規低分子化合物候補を複数同定していた。機械学習等を活用した化合物の同定には活性化化合物の多様な構造情報が必要となる。そこで、多くの新規骨格を有する化合物を探索するために HGF β 鎖の結合ポケットを用い、フレキシブルドッキング手法を 2 種類利用する新規スクリーニング経路を検討した。HGF β 鎖への結合が予想された化合物に関して HGF に対する阻害活性の検証実験を松本研究室で行っていただいた。細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイの結果、これまでとは異なる新規骨格を有する化合物を 3 種類発見する事に成功した。IC₅₀ 値はそれぞれ 35.5 μM、68.1 μM、105.2 μM であった。今後、これら化合物の構造データと活性データは機械学習等を用いた新規スクリーニング経路確立の為の学習データとしては活用できると考えられた。一方、機械学習による化合物スクリーニング系の確立も試みた。HGF β 鎖はセリンプロテアーゼと相同性を有していることからセリンプロテアーゼの既知阻害剤データセットをランダムフォレスト (RF) 法とハイパーパラメータ調整のために作られたベイズ最適化パッケージである Optuna を使用してドッキングシミュレーション結果の機械学習を行い、新たなドラッグスクリーニング系を構築する事が出来た。DUD-E データベースを用いた検証では Accuracy_{DOCK} = 0.81, Accuracy_{GOLD} = 0.85 となり、良好な結果が得られた (図 1)。今後、大規模化合物ライブラリを探索することで、強力な阻害効果を有する化合物を同定できる可能性が考えられた。また、有機合成展開も視野に入れた化合物設計の必要である。</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">DOCK</th> <th colspan="2">推定されたクラス</th> <th rowspan="4">Accuracy : 0.81 Precision : 0.83 Recall : 0.78 F1 : 0.80 MCC : 0.62</th> </tr> <tr> <th></th> <th>active</th> <th>decoy</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>active</td> <td>119</td> <td>33</td> <td></td> </tr> <tr> <td>decoy</td> <td>25</td> <td>127</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">GOLD</th> <th colspan="2">推定されたクラス</th> <th rowspan="4">Accuracy : 0.85 Precision : 0.87 Recall : 0.82 F1 : 0.84 MCC : 0.69</th> </tr> <tr> <th></th> <th>active</th> <th>decoy</th> <th></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>active</td> <td>125</td> <td>27</td> <td></td> </tr> <tr> <td>decoy</td> <td>19</td> <td>132</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> 		DOCK		推定されたクラス		Accuracy : 0.81 Precision : 0.83 Recall : 0.78 F1 : 0.80 MCC : 0.62		active	decoy		active	119	33		decoy	25	127		GOLD		推定されたクラス		Accuracy : 0.85 Precision : 0.87 Recall : 0.82 F1 : 0.84 MCC : 0.69		active	decoy		active	125	27		decoy	19	132	
DOCK		推定されたクラス		Accuracy : 0.81 Precision : 0.83 Recall : 0.78 F1 : 0.80 MCC : 0.62																																
	active	decoy																																		
active	119	33																																		
decoy	25	127																																		
GOLD		推定されたクラス		Accuracy : 0.85 Precision : 0.87 Recall : 0.82 F1 : 0.84 MCC : 0.69																																
	active	decoy																																		
active	125	27																																		
decoy	19	132																																		
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>(1) Kuriki K, Taira J, Kuroki M, Sakamoto H, Aoki S. Computer-assisted screening of mycobacterial growth inhibitors: Exclusion of frequent hitters with the assistance of the multiple target screening method. <i>Int J Mycobacteriol.</i> 10:307-311, 2021.</p> <p>【学会発表】</p> <p>(1) Kahori Murakami, Shunsuke Aoki and Rina Takeda, <i>in silico</i> ドッキングシミュレーション手法を用いた結核菌 polyketide synthase 13 に対する新規抗菌薬の探索, 日本バイオインフォマティクス学会年会, 2021, 9/27, Online.</p> <p>(2) 栗木滉平、松本凌、伊地知 千織、青木 俊介, Identification of bitter-related compounds against hT2R14 by structure-based virtual screening. CBI 学会, 2021, 10/26, Online.</p> <p>【その他特筆事項】</p>																																			

図 1 RF 法を用いた機械学習活性化化合物の判別モデル

研究課題		GSK3β/STAT3 経路を基軸とする膵神経内分泌腫瘍の病態解明と治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・准教授・宮下知治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学病院肝胆膵・移植外科・講師・田島秀浩
	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎猛夫
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・教授・高村博之
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>2017年のWHO分類にて膵神経内分泌腫瘍は pancreatic neuroendocrine tumor (PanNET) と pancreatic neuroendocrine carcinoma (PanNEC) に区別され、PanNETは病理組織学的にG1～G3の3段階に悪性度分類が統一された。しかしG1と診断された症例でも決して再発率は低くないことが報告されている。また現段階で有効な補助化学療法や切除不能・再発症例に対する治療法は確立されていない。Pan-NETsの発生・増殖などのメカニズムについても未だ明らかになってはいないが、近年、IL-6/Stat3経路の発現が浸潤などに関与する可能性が報告されている。本研究では切除標本を用いてpStat3の発現とPan-NETsの悪性度との関係を臨床病理学的に検討するとともに、Stat3リン酸化作用を有するGSK3βの腫瘍における発現・活性の状況と、GSK3βの阻害によりPan-NETsに対する抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>研究最終年度となる本年度はPan-NET細胞株であるQCP-1とBON-1を使用してStat3およびpStat3の発現をWestern Blottingで解析し、またGSK3βの阻害剤であるARを用いてその抑制効果を検討した。</p> <p>BON-1、QCP-1いずれの細胞株でもStat3の発現は認められたが、pStat3の発現はBON-1では認められなかった。またQCP-1ではpStat3の発現は認められたが、ARによる明らかな抑制効果は認められなかった。</p> <p>以上より左図の如くPan-NETにおいてIL-6/Stat3経路におけるGSK3β阻害剤によるstat3のリン酸化の抑制効果はないと考えられた。これらのことから、Pan-NETの悪性形質獲得には別の経路が関与している可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	<p>IL-6/STAT3によるP-NETの悪性形質獲得とGSK3βの関与</p>

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		高特異性 MMP-9 阻害タンパク質によるがん悪性進展阻害効果の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科・教授・東 昌市
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 ナノ生命科学研究所・特任助教・佐藤 拓輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本 邦夫
【研究目的】	<p>私達はβ-アミロイド前駆体蛋白質 (APP) の細胞外領域に、がん治療における標的 MMPs の一つとされる MMP-2 を選択的に阻害するアミノ酸配列を見出し、APP-IP と命名した。また、APP-IP を構成するアミノ酸を改変することで、酵素選択性を変換し、MMP-9 に対する選択性を向上させたペプチドインヒビターを創出した。さらにこのペプチドを MMP-9 の非触媒部位と親和性を持つタンパク質と融合することで、極めて特異性が高く、かつ強力な MMP-9 阻害タンパク質の分子設計に成功した。本研究ではこの高特異性 MMP-9 阻害タンパク質のがん悪性進展阻害効果を動物実験で検証することを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>まず、動物実験に必要な量の高特異性 MMP-9 阻害タンパク質を得るため、このリコンビナントタンパク質を大量調製する方法の確立を試み、これに成功した。具体的には浮遊培養した HEK293 細胞にリコンビナントタンパク質を一過性発現させることにより、培養液 1L 当たり約 300 mg のタンパク質を得ることができた。次に得られた高特異性 MMP-9 阻害タンパク質を用いた動物実験により、本タンパク質によるがん転移抑制効果の検証を計画していたが、薬効試験に先んじて実施した薬物動態試験の結果、本タンパク質の血中半減期が極めて短いことが判明した。加えて、動物種間の特異性の違いから本タンパク質はヒト MMP-9 の活性は強く阻害するものの、マウス MMP-9 に対する阻害活性は低いことが判明し、短い血中半減期を考慮すると動物実験により、薬効を調べることは困難であると判断した。そこで、本タンパク質の分子デザインを再考し、血中半減期の延長を試みた。具体的には本タンパク質とイムノグロブリンの Fc 領域との融合タンパク質を作製し、この融合タンパク質が MMP-9 阻害活性を持つことを確認した。一方、化学修飾法を用いたポリエチレングリコール (PEG) の付加による本タンパク質の薬物動態の改善も試みたが、こちらは化学修飾に伴い MMP-9 阻害活性が失われてしまうことが判明した。そこで、化学修飾を受けるリジン残基のうちのいくつかを他のアミノ酸残基に置換したところ、PEG を付加しても MMP-9 阻害活性が保持されることを見出した。今後これら融合タンパク質および PEG 付加タンパク質について、薬物動態を調べる予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	<ol style="list-style-type: none"> 富永 明里、常住 淳、東 昌市: MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるマトリプターゼ活性の寄与。第94回日本生化学会大会(横浜、Web開催)、演題番号 1T14e-08 (P-756) 2021年11月3-5日 杵野 弘樹、常住 淳、東 昌市: 化合物スラミンはMMP-7が誘導するがん細胞の細胞凝集を阻害する。第94回日本生化学会大会(横浜、Web開催)、演題番号 P-759 2021年11月3-5日 	
【その他特筆事項】		

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳がん細胞系譜転換における脂質代謝制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・助教・岡田宣宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・院生・伊藤凜
	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・院生・植木ちひろ
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	乳がんは、ホルモン受容体陽性細胞 (Luminal) からホルモン受容体陰性細胞 (Basal) への細胞系譜転換により、内分泌療法抵抗性を獲得することが示唆されている。しかし、乳がんが悪性化進展過程で細胞系譜転換を起こすメカニズムは明らかになっていない。申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞間で2種のスプライシングバリエーションの発現をスイッチさせている遺伝子 <i>NFYA</i> を同定している。また、 <i>NFYA</i> は脂肪酸合成酵素 (FASN) の転写を制御していることが報告されている。これらのことから、本研究では、 <i>NFYA</i> による脂質代謝制御と乳がん細胞系譜転換機構の関連を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><u>NFYA による脂質代謝関連遺伝子発現制御</u></p> <p>これまでに我々は、トリプルネガティブ乳がん細胞 (SUM159 細胞) において、<i>NFYA</i> を欠損させると、細胞増殖・スフィア形成能・腫瘍形成能が低下することを明らかにしてきた。さらに、その制御メカニズムとして、脂質代謝制御が関与していると考えてきた。今回我々は、<i>NFYA</i> による脂質代謝制御の詳細な機構を解明した。</p> <p><i>NFYA</i> 欠損により、脂肪酸合成系酵素 (ACACA および FASN) の発現が低下し、それに伴い、脂肪酸合成および脂肪酸β酸化の低下が起これらと考えられる。ChIP アッセイにより、<i>NFYA</i> が FASN および ACACA のプロモーター領域に直接結合し、それらの発現を制御していることも明らかにした。さらに、<i>NFYA</i> の欠損により脂肪酸β酸化が低下していることを、脂肪酸β酸化の律速酵素として機能する CPT1A の発現やフラックスアナライザーによる脂肪酸β酸化測定により明らかにしている。また、<i>NFYA</i> 欠損細胞培養液中に脂質を添加することで、脂肪酸β酸化が回復することも明らかにした。これらの結果から、<i>NFYA</i> 欠損は、ACACA および FASN の発現低下により引き起こされる脂肪酸β酸化の低下により、細胞内エネルギー枯渇が起これら、細胞増殖・スフィア形成能・腫瘍形成能が低下すると考えられる。</p> <p><u>NFYAv1 ノックアウトマウスを用いた <i>in vivo</i> 解析</u></p> <p>トリプルネガティブ乳がん細胞を用いた研究から、<i>NFYA</i> が脂肪酸合成制御を介し、乳がん悪性化に寄与していることを明らかにした。しかし、これらの制御機構が生体内においても同様に機能するのかわ不明であった。そこで、我々は、<i>NFYAv1</i> ノックアウトマウスと乳がんモデルマウス MMTV-PyMT マウスを交配させ、解析を行った。その結果、<i>NFYAv1</i> 欠損は、乳がんの発症を優位に遅らせることが明らかとなった。さらに、発症した乳がん組織および乳がん組織由来初代培養細胞を用いた研究により、<i>NFYAv1</i> 欠損が優位に FASN および ACACA の発現を抑制していることも明らかにした。さらに、これらの結果は、ヒト由来乳がん組織においても同様の結果を得ている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	1. Chihiro Ueki, Goki Tsujimoto, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada. Impact of fatty acid metabolism regulated by NFYA on malignant progression of TNBCs. 2021年12月. 第44回日本分子生物学会年会
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		スフェア形成法を用いた膵癌幹細胞に有効な薬剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長・石渡俊行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・係長級研究員・佐々木紀彦
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌は高齢者を中心に増加している難治性癌で、5年生存率も10%程度に留まっている。膵癌細胞には多様性があり、自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞が注目されている。膵癌培養細胞株を低接着プレートで培養し形成されたスフェア（浮遊細胞塊）には癌幹細胞マーカー陽性細胞が多く含まれている。このスフェアに幹細胞関連低分子化合物Xを投与すると、著明に癌幹細胞が増加することを発見した。FDA 認証薬剤ライブラリーの中から、スフェアの形成を阻害し癌幹細胞を死滅させる可能性のある7種類の薬剤を同定した。これらの薬剤のなかで、低分子化合物Xと相乗的に癌幹細胞抑制効果のある薬剤を探索し、その作用機序を解明する。(296/300字)	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒト膵癌培養細胞株のPANC-1細胞を低接着プレートで培養すると、接着状態での培養に比べ癌幹細胞マーカーのOct4, Sox2, ALDH1などが高値を示した。さらに、スフェアに幹細胞関連低分子化合物Xを作用させることで、これらの癌幹細胞マーカーの発現が増加し、形態的にも疎な結合の粒状の大型のスフェアから小型の球形のスフェアへと変化した。幹細胞関連低分子化合物Xを添加した膵癌培養細胞株のスフェアに対しては、抗癌剤のGemcitabineとnab-Paclitaxelの殺細胞効果が増強することが明らかとなった。次に、低接着プレートで培養したヒト膵癌培養細胞株のスフェアに、710種類のFDA認証薬剤ライブラリーの薬剤を添加し、スフェア形成の抑制効果のある薬剤を網羅的に検討した。膵癌培養細胞株に幹細胞関連低分子化合物を添加して7日間培養し、形成されたスフェアに100μMまたは20μg/mlの薬剤を投与してさらに4日間培養した。Cell3imager duos（スクリーンホールディング株式会社）にて全てのスフェアの面積を測定し、薬剤によるスフェア形成抑制効果を検討した。その結果、57種類の薬剤でスフェアの面積が減少していた。薬剤濃度を1/10に減少させて2ndスクリーニングを行ないATPアッセイで検討したところ、7種類の薬剤で著明に増殖抑制が確認された。7種類の薬剤のなかで2種類は、幹細胞関連低分子化合物Xとの相乗的な増殖抑制効果が濃度依存的に認められた。この2種類の薬剤の効果には、活性酸素や細胞内Ca ²⁺ の増加、ミトコンドリア膜電位の低下などが関与していることが示唆された。今後は、さらにこれらの薬剤の作用機序を検討するとともに、動物実験も加えて膵癌の癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発を目指す計画である。(763/1000字)	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		消化器・難治がんのリボソーム生合成の新規メカニズム解明と診断, 治療法への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・北村浩一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・検査部部长・松下一之
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・田中信子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	PUF60 (poly (U)-binding splicing factor 60)のスプライシング変異体である FIR (FBP interacting repressor) は <i>c-myc</i> 遺伝子転写抑制因子として働く一方、FIR の転写抑制部位である exon2 を欠失した変異体 FIR Δexon2 は様々な癌で過剰に発現し FIR を拮抗阻害している。がん細胞では FIR は SF3B1 とタンパク質相互作用することで、FIR のスプライシング変異 (FIR Δexon2 の産生) が誘導されて c-Myc 発現増大が惹起され、細胞増殖、アポトーシスやリボソーム合成など様々なパスウェイに影響を与える。本研究は FIR や FIR Δexon2 の増減で変化する遺伝子やリボソーム RNA の変化を調べ、細胞の分化や癌化における新規機能や新規ターゲット遺伝子を探索し、治療法の開発につなげる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>FIR や FIRΔexon2 のターゲット遺伝子の探索。</p> <p>PUF60 のスプライシング変異体である FIR や FIRΔexon2 は癌細胞で過剰に発現している。前年度の報告では、HeLa 細胞株に FIR または FIRΔexon2 を FLAG や siRNA を用いてトランスフェクションし、発現を増減させ、RNA シークエンスを行い、網羅的な解析を行った結果、発現変動していた遺伝子は 10 遺伝子あった。</p> <p>今回は HeLa 細胞ではなく、HCT116 細胞株に FIR または FIRΔexon2 を FLAG や siRNA を用いてトランスフェクションし、発現を増減させ、HeLa 細胞で発現変動した遺伝子 (プライマー設計が可能であった 7 遺伝子) について qPCR を行った。</p> <p>結果は FIR siRNA で 5 遺伝子が有意に減少、また FIRΔexon2 siRNA で 4 遺伝子が有意に減少、2 遺伝子が有意に増加した。FIR または FIRΔexon2 の発現を増加させた場合は、7 遺伝子について変化が見られなかった。HeLa 細胞や HCT116 細胞で変化した 7 遺伝子は FIR や FIRΔexon2 の新規ターゲット遺伝子となる可能性を示唆した。(論文投稿中のため、遺伝子名は明記なし。)</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 論文投稿準備中 (再投稿)。	
	【学会発表】 なし (令和4年度は検査系学会や癌学会等で発表を予定)	
	【その他特筆事項】	

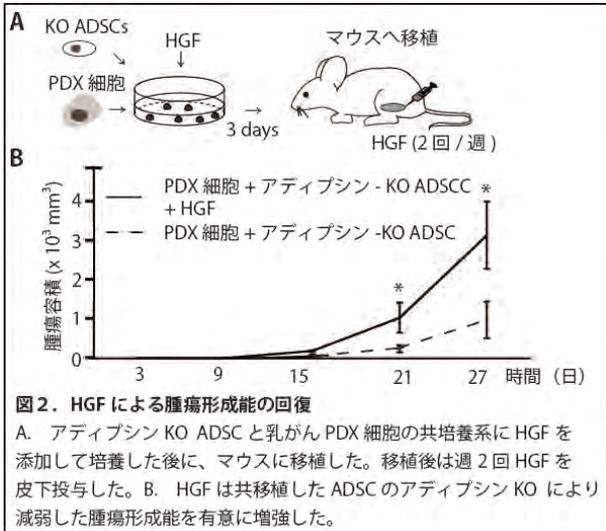
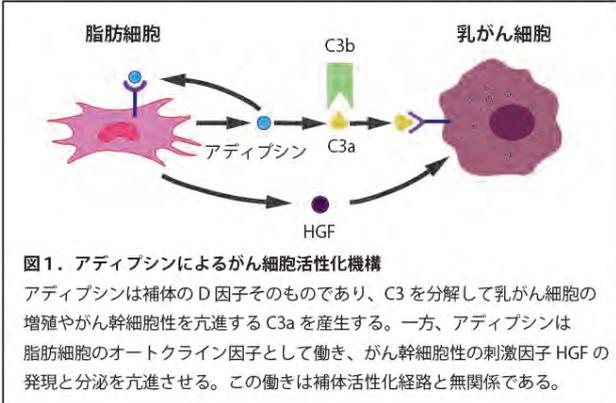
令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞性制御に働くヘキソサミン代謝シグナルの解明と創薬
研究代表者	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学部・教授・板野 直樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学研究科・大学院生・岩本 俊吾
	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学研究科・大学院生・寺西 由紀子
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・北川 未唯
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・岩本 明歩
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	<p>がん幹細胞は、抗がん剤や放射線治療に耐性を示し、治療後も残存してがん細胞を生み続けて再発を引き起こすとされ、がんの根治的治療を阻む最大の要因と考えられている。従って、今日の対がん戦略は、がん幹細胞をいかに制圧するか、という点にあることは言を俟たない。我々は、がん幹細胞性の制御機構として、ヒアルロン酸の過剰産生と“ヘキソサミン合成経路”を中心とした糖代謝のリプログラミングが深く関わっていることを明らかにしてきた。そこで本研究では、ヘキソサミン合成経路の下流で働くヘキソサミン代謝シグナルががん幹細胞性の制御に働く機構の解明とその成果に基づく創薬を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヘキソサミン合成経路の最終産物である UDP-N-アセチルグルコサミン(UDP-GlcNAc)は、タンパク質の糖鎖修飾反応において糖供与体として利用され、シグナル伝達や転写の制御に働く。そこで、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞を用いて、ヘキソサミン代謝流束の加速と連動して変化する糖鎖修飾や遺伝子発現について解析した。HPLC 分析の結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、ヘキソサミン代謝流束の加速に伴って、UDP-GlcNAc 以外の糖供与体の細胞内プールも変化していることが明らかとなった。また、その変化に伴って、タンパク質の糖鎖修飾が変化していることも明らかとなった。以上より、ヒアルロン酸産生が、ヘキソサミン代謝流束を加速する結果として、糖代謝や糖鎖修飾に影響を及ぼしていることが明らかとなった。</p> <p>糖鎖修飾は、受容体やリガンドなどの機能調節に重要であり、その異常はシグナル伝達に多大な影響を及ぼす。そこで次に、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞とヒアルロン酸低産生細胞における遺伝子発現を RNA-seq により網羅的に解析した。両乳がん細胞由来の mRNA を用いた RNA-seq 解析の結果、Notch3 の発現、さらには Notch シグナルの下流で発現制御される遺伝子群の発現上昇を確認した。Notch シグナルは幹細胞性の制御に働くシグナル伝達経路として知られていることから、ヒアルロン酸過剰産生により、この経路が活性化してがん幹細胞性の制御に働く可能性が示唆された。そこで、γセクレターゼ阻害剤を用いて Notch シグナルを阻害し、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞におけるがん幹細胞性への影響を解析した。がん幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能や抗がん剤耐性は、γセクレターゼ阻害剤の処理により有意に減少した。</p> <p>以上より、ヘキソサミン代謝によって制御される糖鎖修飾の変化と Notch シグナルの活性化が、ヒアルロン酸過剰産生によるがん幹細胞性の促進に重要であることが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Takeuchi Y, et.al. The membrane-linked adaptor FRS2β fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 118(43):e2103658118 (2021)</p> <p>【学会発表】</p> <p>坂本 智彦, 伊東 剛, 板野 直樹 ヘキソサミン合成経路の数理的解析 日本応用数理学会 第 18 回研究部会連合発表会 (オンライン) 2022.3.8</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		CDK4・CDK6 阻害によるがん抑制の代謝的基盤の研究
研究代表者	所属・職名・氏名	奈良先端科学技術大学院大学・教授・加藤順也
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	奈良県立医科大学・教授・庄雅之
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>哺乳類細胞周期のG1チェックポイント調節であるRb経路(p16INK4a — サイクリンD/CDK4,6 — Rb)からなる反応経路は、ヒトがん細胞で高頻度で変異し、異常増殖の原因となっている。近年開発されたDK4,6阻害薬(パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブ)は、Rb経路を活性化することで増殖阻害を誘導する薬剤であるが、作用機序には不明な点が多い。本研究では、CDK4,6阻害により引き起こされる代謝異常を検討し、CDK4,6阻害薬により誘導される細胞老化やがん抑制の分子機構を明らかにする。これにより、CDK4,6阻害剤に対する耐性細胞出現の仕組みを解明し、がん抑制の効果を上昇させる方法を考案する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>パルボシクリブ(分子標的薬PD0332991)はEstrogen Receptor(ER)陽性Human Epidermal Growth Factor Receptor 2(HER2)陰性の乳がんに対しレトロゾールとの併用で臨床使用が承認されている。現在の未解明の課題は、(1)パルボシクリブの有用性の判断の基準となるバイオマーカーの同定、(2)パルボシクリブ耐性細胞の出現の分子機構、(3)ER陽性HER2陰性乳がん以外のがんへの拡張の条件、(4)パルボシクリブが細胞老化を誘導する分子機構などがある。パルボシクリブはRetinoblastoma(Rb)の上流で作用するので、Rb遺伝子に変異があるがん細胞では細胞増殖抑制効果は期待できない。しかし、Rb遺伝子が野生型であるにもかかわらずパルボシクリブに耐性を示すがん細胞が報告されている。本実験では、先行研究で報告のあるHCC1569ヒト乳がん細胞株(Rbが野生型でパルボシクリブに耐性)に着目し、パルボシクリブに耐性を示す原因を突き止め、それに対するバイオマーカーとなる遺伝子を同定することを目的とする。最近の研究では、パルボシクリブは乳がん以外にも大腸がん、神経膠芽腫、膵がんなどの細胞でも増殖抑制効果を示す結果が報告されているので、同定したマーカーについては、乳がん以外のがん種についても検討を行う予定である。</p> <p>in silico解析にて遺伝子の絞り込みを行うために、Gene Expression Omnibus(GEO)より取得したマイクロアレイデータよりmRNA量での遺伝子発現の変化を調べた。Rb陽性かつパルボシクリブに感受性を示す細胞株6種に対してHCC1569細胞株では2069個の遺伝子において2倍以上の発現上昇を認めた。これらをパルボシクリブ耐性に寄与する遺伝子候補とし、PANTHERにてオントロジー解析を行った結果、アミノ酸代謝に関連する遺伝子群が抽出された。これらをKyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)を用いて代謝経路を調べた結果、アミノ酸を出発とする生合成経路が増強されている可能性を見出した。このことから、HCC1569細胞はアミノ酸代謝を活性化することで、パルボシクリブ耐性に利用しているのではないかと考えた。今後は、培養細胞を用いてこの仮説を検証する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

研究課題		がん幹細胞性を制御する脂肪細胞分泌因子の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・下野 洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・林 孝典
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・渡邊 崇
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・前田 真男
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・助教・ベフヌーシュ ハレディアン
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	世界的な肥満者の増加とともに、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど各種のがんの悪性化因子としての脂肪細胞の役割が注目されている。がんの間質組織はがんの発生や維持に必須であり、脂肪細胞もがん間質の一員である。私たちは脂肪細胞の分泌因子（アディポカイン）が、がん細胞の増殖および幹細胞性を増強することを明らかにしてきた。本研究では、アディプシンをはじめとしたアディポカインに着目して、脂肪細胞が乳がんや卵巣がんなどのがん幹細胞性を制御する機構の解明を目指す。がん間質の一種である脂肪細胞を標的とすることで乳がんや卵巣がんの発生や転移を抑制する新規治療法の開発につながることを期待される。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>乳がんおよび卵巣がん患者の手術検体より樹立したがん患者由来異種移植腫瘍（PDX）と脂肪組織由来幹細胞（ADSC）の共培養実験により、脂肪細胞の分泌因子アディプシンが、がん細胞の増殖および幹細胞性を増強することが明らかになった（Goto H, Shimono Y et al. Oncogene, 2019）。本研究では、脂肪細胞のオートクライン制御因子としてのアディプシンの働きに特に着目して、脂肪細胞ががん幹細胞性を制御する分子機構のさらなる解明を目指す。</p> <p>1. アディプシンによる脂肪細胞のオートクライン制御機構</p> <p>アディプシンは脂肪細胞から特異的に分泌される補体経路活性化因子である。しかし、アディプシンの脂肪細胞自身に対する働きは不明である。アディプシンのノックアウト（KO）マウスの乳腺組織より樹立したADSCは野生型のADSCとは異なるサイトカイン発現プロファイルを示した。培養液へのアディプシン添加により、アディプシン KO ADSC で発現低下していた肝細胞増殖因子（HGF）の発現や、アディプシン KO ADSC の増殖能が回復した。これらの知見から、アディプシンは脂肪細胞に対するオートクライン制御因子として働くことが示唆された（図1）。</p> <p>2. HGF によるアディプシン依存性がん幹細胞性制御機構の解析</p> <p>アディプシン KO により発現が減弱するアディポカイン（HGF や上皮成長因子（EGF）など）ががん幹細胞性に及ぼす影響を解析した。ADSC でアディプシンを KO したことに伴う共培養乳がん PDX 細胞のスフェロイド形成能の減弱は、培養液へのアディプシンあるいは HGF の添加により回復した。一方、EGF には同様の作用を認めなかった。さらに、アディプシン KO ADSC と乳がん PDX 細胞との共培養系に HGF を添加することにより、乳がん PDX 細胞による腫瘍形成能は有意に回復した（図2）。したがって、HGF はアディプシンの下流因子としてがん幹細胞性の増強に関わることが示唆された。</p>	



<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <p>Mizuno M, <u>Khaledian B</u>, <u>Maeda M</u>, <u>Hayashi T</u>, Mizuno S, <u>Munetsuna E</u>, <u>Watanabe T</u>, Kono S, Okada S, Suzuki M, Takao S, Minami H, Asai N, Sugiyama F, Takahashi S, <u>Shimono Y</u>. Adipsin-Dependent Secretion of Hepatocyte Growth Factor Regulates the Adipocyte-Cancer Stem Cell Interaction. Cancers. 2021;13(16): e4238.</p>
	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Shimono Y</u>, Yanagi H, <u>Watanabe T</u>, Nishimura T, <u>Hayashi T</u>, Okada S, Suzuki M, Kawada K, Minami H, <u>Gotoh N</u>. Role of S100A10 in the metastatic colonization of breast cancer stem cells. AACR Virtual Annual Meeting 2021、2021年. 2. <u>Shimono Y</u>, Shibuya N, Nishimura T, <u>Gotoh N</u>, Kakeji Y. miR-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in human breast cancer stem cells. 第18回 幹細胞シンポジウム、2021年. 3. <u>Khaledian B</u>, Mizuno M, <u>Maeda M</u>, Takusagawa S, Yano M, Asai N, <u>Shimono Y</u>. Autocrine regulation of adipocytes promotes cancer stem cell properties in breast cancers. 第80回日本癌学会学術総会、2021年. 4. <u>Hayashi T</u>, <u>Maeda M</u>, Suzuki M, Asai N, <u>Shimono Y</u>. Roles of gamma-glutamylcyclotransferase in the regulation of cancer stem cell properties and metastatic abilities in breast cancers. 第80回日本癌学会学術総会、2021年. 5. Mizuno M, <u>Khaledian B</u>, <u>Maeda M</u>, Takusagawa S, Yano M, Asai N, <u>Shimono Y</u>. Adipsin-dependent HGF secretion from adipocytes promotes cancer stem cell properties in breast cancer cells. 第80回日本癌学会学術総会、2021年. 6. <u>Shimono Y</u>, Nishimura T, Kono S, Shibuya N, Yanagi H, <u>Hayashi T</u>, <u>Watanabe T</u>, <u>Maeda M</u>, Kakeji Y, Kawada K, Asai N, Takao S, Minami H, Kijima Y, Suzuki M, <u>Gotoh N</u>. Application of organoids to breast cancer research. 第80回日本癌学会学術総会 (コアシンポジウム)、2021年. 7. Takusagawa S, <u>Maeda M</u>, Yano M, Nishio E, Okada S, Suzuki M, Asai N, Fujii T, Saya H, <u>Shimono Y</u>. Adipocytes secrete DPP4 and enhance ovarian cancer stem cell-like properties in ovarian cancer. 第80回日本癌学会学術総会、2021年. 8. <u>Watanabe T</u>, Yanagi H, Enomoto A, Sampetean O, Saya H, <u>Shimono Y</u>. Metabolically distinct glioma stem cells differentially require Girdin for stem cell behavior and tumor development. 第80回日本癌学会学術総会、2021年. 9. Yano M, <u>Maeda M</u>, Nishio E, Takusagawa S, Suzuki M, Asai N, Fujii T, Saya H, <u>Shimono Y</u>. Adipocytes enhance cancer stem cell-like properties in ovarian cancers through MCP1. 第80回日本癌学会学術総会、2021年.
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>特になし。</p>

研究課題		miRNA 初期転写産物の m ⁶ A 修飾を介したがん抑制 miRNA の新規産生調節機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	高知大学・助教・樋口琢磨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	高知大学・教授・坂本修士
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>RNA 修飾の一つであるアデニンのメチル化(N6-Methyladenosin, m⁶A)は、修飾された RNA の立体構造を変化させるとともに当該 RNA と RNA 結合タンパク質との結合性を制御する。近年、m⁶A 修飾は機能性小分子 RNA である microRNA(miRNA)の生合成経路の促進に寄与することが報告されている。一方で我々はこれまで、二本鎖 RNA 結合タンパク質 Nuclear Factor 90(NF90)とその結合パートナーである NF45 の複合体(NF90-NF45)が let-7a を始めとするがん抑制作用を有する miRNA の初期転写産物(pri-miRNA)に結合することで、当該 miRNA の生合成経路を負に制御することを明らかにしてきた。興味深いことに、let-7a の内部のアデニンは m⁶A 修飾を受けることが報告されている。しかしながら、NF90-NF45 による let-7a 産生阻害機構と m⁶A 修飾の関連性については不明である。本研究では、RNA 結合タンパク質による let-7a の生合成抑制機構と m⁶A 修飾の関連性について解明を試みた。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>前述の通り、NF90-NF45 は let-7a の初期転写産物 (pri-let-7a-1) に結合することで、let-7a の生合成経路を負に制御する。これまでの解析結果から、NF90-NF45 は非メチル化 pri-let-7a-1 と比較し m⁶A 修飾塩基を導入した pri-let-7a-1 (m⁶A-pri-let-7a-1) に対する結合性が著しく低下することを見出している。そこで今回は、NF90-NF45 による miRNA 生合成阻害効果が m⁶A 修飾の有無により軽減されるかを検討するため、NF90-NF45 過剰発現細胞の抽出液と非メチル化 pri-let-7a-1 および m⁶A-pri-let-7a-1 プローブを用いた <i>in vitro</i> pri-miRNA processing assay を実施した。その結果、非メチル化 pri-let-7a-1 プローブと比較し m⁶A-pri-let-7a-1 では NF90-NF45 によるプロセッシング抑制効果が軽減されることを見出した(図 1)。</p> <p>上記の解析で得られた <i>in vitro</i> レベルでの結果を細胞レベルで検証するため、培養細胞 HEK293T において NF90-NF45 および m⁶A 修飾酵素である METTL3、METTL14 を過剰発現した際の pri-let-7a-1 及び成熟型 let-7a の産生量を測定した。qRT-PCR 解析の結果、NF90-NF45 の過剰発現により成熟型 let-7a 量は半減するが、NF90-NF45 と METTL3/14 の共発現により低下した let-7a の産生量は約 27%回復した(図 2A)。一方で、pri-let-7a-1 量は NF90-NF45 の過剰発現により蓄積し、コントロール (Mock) と比べ約 10 倍に増加するが、METTL3/14 との共発現により pri-let-7a-1 の蓄積量は約 24%減少した(図 2B)。本結果は NF90-NF45 の過剰発現によって引き起こされる pri-let-7a 量の蓄積および成熟型 let-7a 量の低下が METTL3/14 の過剰発現により解除されることを示している。</p> <p>本研究結果から、NF90-NF45 による let-7a 生合成阻害機構において、pri-miRNA の m⁶A 修飾は当該阻害機構を解除することが示唆された。今後は RNA の立体構造に着目し、m⁶A 修飾の導入が NF90-NF45 による miRNA 生合成阻害機構を解除する詳細な機序を解明する予定である。</p>	

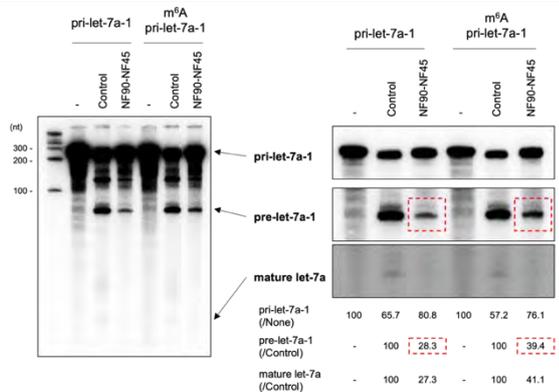


図1 m⁶A修飾導入pri-let-7aのプロセッシング機構に対するNF90-NF45の影響の解明

NF90-NF45を過剰発現させた HEK293T 細胞の全細胞抽出液と標識プローブを用いた *in vitro* pri-miRNA processing assay の結果。左図は全体像、右図は pri-let-7a-1、pre-let-7a-1(前駆体let-7a)、mature let-7a のバンドを拡大した図。

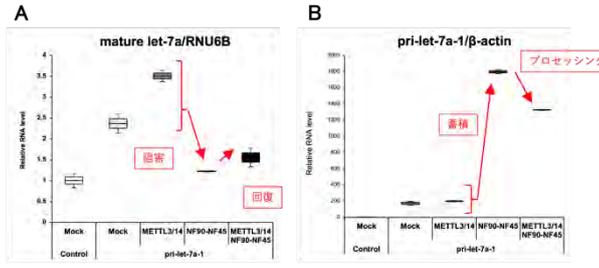


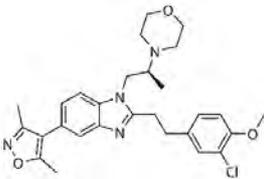
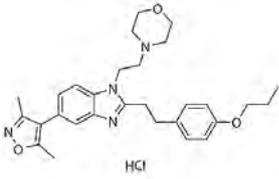
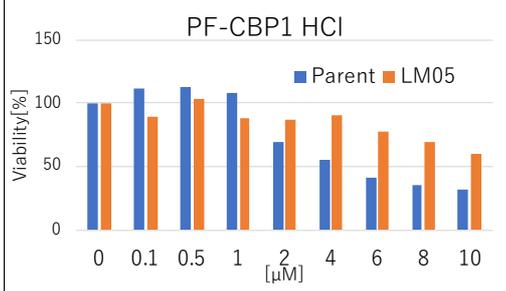
図2 NF90-NF45の過剰発現によるlet-7a-1 生合成抑制機構に対するMETTL3/14の影響の解明

HEK293T細胞に対してNF90-NF45およびMETTL3/14を過剰発現させた際の成熟型let-7a量(A)およびpri-let-7a-1量(B)をqRT-PCRにより測定した。本系では、pri-let-7a-1の過剰発現プラスミドを共導入している。

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 Kazu Kawamura, <u>Takuma Higuchi</u> , Shigeki Fujiwara YAF2-mediated YY1-Sirtuin6 interactions responsible for mitochondrial down-regulation in aging tunicates Molecular and Cellular Biology, 41(7), 2021
	【学会発表】 坂本修士、 <u>樋口琢磨</u> 、古株彰一郎、藤田浩志、池恩燮、森澤啓子、戸高寛、松川和嗣、津田雅之 二本鎖RNA結合タンパク質(RBP)による筋分化制御因子MyoDの転写活性化 第44回 日本分子生物学会年会、2021年12月1-3日
	【その他特筆事項】 該当なし

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		転移性乳がん細胞増殖におけるヒストンアセチル化修飾の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・学振 PD 研究員・中山淳
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	早稲田大学大学院先進理工学研究科・大学院生・林祐介
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>原発腫瘍から自然発生的な転移を模倣する同所性移植手法を用いて樹立した乳がん肺高転移株 MDA-MB-231-LM05 細胞は、顕著な造腫瘍能と肺転移能を示すとともに、5-fluorouracil や Carboplatin などの殺細胞性抗がん剤にも耐性を有する。</p> <p>この LM05 細胞に対して標準阻害剤ライブラリーを用いた増殖能の評価を行った結果、親株 (MDA-MB-231-luc2-Parent 細胞) と比較して、マルチキナーゼ阻害剤や HAT (Histone Acetyl Transferase) 阻害剤などに対する感受性が変化していることを見出した。本研究は、これら阻害剤に対する高転移性がん細胞の応答と増殖機構を明らかにすることで、転移先臓器特徴的ながん細胞増殖機構を標的とする治療戦略確立を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【結果】</p> <p>標準阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングの結果から、候補化合物を抽出し、さらにスケールアップして再検討を行った結果、SCG-CBP30 (CBP/p300・BRD4 阻害剤) を同定した。SCG-CBP30 を MDA-MB-231-LM05 細胞に処理することで、LM05 細胞の viability 低下および死細胞率の増大が確認された。また、SCG-CBP30 と構造的に類似する化合物 PF-CBP1 HCl を投与した結果、CBP30 とは真逆に LM05 細胞が耐性をもつ結果となった。標的分子は同じであり、僅かな構造の違いから真逆の表現型が得られたことは大変興味深い結果である。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>SGC-CBP30</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>PF-CBP1-HCl</p> </div> </div> <div style="text-align: right; margin-top: 10px;">  </div> <p>また、CPI-637 や A-485 などの他の HAT 阻害剤を処理した場合、親株と LM05 細胞間に大きな差は得られなかった。このことから、LM05 細胞における応答の変化は CBP30 および CBP1 の構造に特徴的な表現型であり、このわずかな構造の差異が親株と高転移株において差を生み出すことがわかった。</p> <p>一方で、LM05 細胞が親株と比較して耐性を獲得した化合物を 1st スクリーニングから 10 種類同定した。さらにそれら 10 種の化合物について再度評価を行った結果、ODQ (NO-sensitive guanylyl cyclase inhibitor) に対して耐性を持つ、すなわち親株と比較して高い viability を示すことが明らかになった。すなわち、cGMP の合成経路における増殖・細胞死の機構に変化が起きている可能性が見いだされた。</p> <p>【今後の方針】</p> <p>同定した化合物によってどの下流遺伝子が制御されているのか、WB などを用いた明らかにする。また、この薬剤応答性の差異がどのようなエピジェネティック制御に依存しているか明らかにすることで、LM05 細胞における増殖機構を明らかにする。</p> <p>研究協力者：早稲田大学・理工学術院・仙波憲太郎 教授 早稲田大学先進理工学研究科・大学院生・渡辺幸輔</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【論文】</p> <p>【1】 Han Y, Azuma K, Watanabe S, Semba K, and Nakayama J*. Metastatic profiling of HER2-positive breast cancer cell lines in xenograft models, <i>Clinical & Experimental Metastasis</i>, 2022 <i>in press</i>. (査読あり) (最終著者, *責任著者)</p> <p>【2】 Yoshida K, Yokoi A, Yamamoto T, Hayashi Y, Nakayama J, Yokoi T, Yoshida H, Kato T, Kajiyama H, and Yamamoto Y. Aberrant activation of cell cycle-related kinases and the potential</p>	

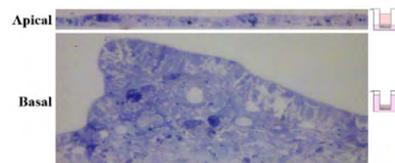
	<p>therapeutic impact of PLK1 or CHEK1 inhibition in uterine leiomyosarcoma, <i>Clinical Cancer Research</i>, 2022 <i>in press</i>. (査読あり)</p> <p>【3】 Yamamoto T, Nakayama J, Yamamoto Y, Kuroda M, Hattori Y, and Ochiya T. SORT1/LAMP2-mediated Extracellular Vesicle Secretion and Cell Adhesion Are Linked to Lenalidomide Resistance in Multiple Myeloma, <i>Blood Advances</i>, 6(8):2480-2495, 2022. (査読あり)</p> <p>【4】 Ayukawa S, Kamoshita N†, Nakayama J†, Teramoto R, Pishesha N, Ohba K, Sato N, Kozawa K, Abe H, Semba K, Goda N, Fujita Y, and Maruyama T. Epithelial cells remove precancerous cells by cell competition via MHC class I-LILRB3 interaction, <i>Nature Immunology</i>, 22,1391-1402, 2021. (査読あり) (†Contributed equally)</p> <p>【Pre-print】</p> <p>【1】 Havashi Y, Nakayama J*, Yamamoto M, Maekawa M, Watanabe S, Higashiyama S, Inoue J, Yamamoto Y, and Semba K. Aberrant accumulation of NIK promotes tumorigenicity by dysregulating post-translational modifications in breast cancer, <i>bioRxiv</i>, 2021. doi: https://doi.org/10.1101/2021.08.27.457878 (*責任著者)</p> <p>【学会発表】</p> <p>【1】 林祐介, 中山淳, 山本瑞生, 井上純一郎, 山本雄介, 仙波憲太郎, 同所性乳がん肺転移株におけるシグナル解析, 第44回日本分子生物学会年会, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜, 2021年12月1日-3日, ポスター発表: 2P-0558</p> <p>【2】 中山淳, 山本雄介, Cigarette Smoking Lung Atlasの1細胞メタ解析, 第80回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜, 2021年9月30日-10月2日, Internatioanl Session11 がん研究における1細胞解析</p> <p>【3】 林祐介, 中山淳, 山本瑞生, 井上純一郎, 山本雄介, 仙波憲太郎, 同所性乳がん高転移株における NIK の機能解析, 第80回日本癌学会学術総会, 神奈川県横浜市 パシフィコ横浜, 2021年9月30日-10月2日, 口頭発表: J10-2-2</p> <p>【4】 中山淳, 仙波憲太郎, 山本雄介, 乳がん同所性移植モデルにおける腫瘍内微小不均一性の解析, 第30回日本がん転移学会学術集会・総会, WEB開催, 2021年7月29-30日, ワークショップ3: 転移と微小環境, WS3-4</p> <p>【その他特筆事項】</p>
--	--

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題	Bcl11a-コリプレッサー複合体によるエピジェネティック変化を介した AML 発症、悪性化機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名 公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・特任研究員・角南 義孝
研究分担者	所属・職名・氏名 公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・部長・中村 卓郎
受入担当教員	職名・氏名 教授・鈴木健之
【研究目的】	転写調節機構の破綻はがんの発症に関わり、特に白血病では転写因子の機能破綻が発症原因となる。zinc-finger 蛋白質をコードする転写抑制因子 Bcl11a は、コリプレッサー複合体をリクルートし、顆粒球分化に必須の転写因子である PU.1 の機能を阻害することで pseudokinase Trib1 と協調して AML を発症・増悪させる。本共同研究では、Bcl11a がリクルートする LSD1/HDAC コリプレッサー複合体に着目し、LSD1/HDAC 阻害剤を Bcl11a 高発現 AML 細胞へ投与した時に起こる変化を足がかりに、Bcl11a 標的遺伝子を同定し、Bcl11a が AML を発症・悪性化させる分子基盤の解明を目的とする。
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>Trib1 高発現 AML 細胞株 (Tr1) および Trib1/Bcl11a 高発現 AML 細胞株 (TB-13) に対して、LSD1 阻害剤と HDAC 阻害剤を併用投与し、その効果を検討した。まず <i>in vitro</i> で、LSD1/HDAC 阻害剤が相乗的に抗腫瘍効果をもたらすこと、Bcl11a/PU.1 下流遺伝子の発現を回復させることを明らかにした。さらに TB-13 細胞を移植したマウスに LSD1/HDAC 阻害剤を投与し、AML 発症が阻害されることを示し、LSD1/HDAC 阻害剤が <i>in vivo</i> でも有用であることを証明した。</p> <p>次に、遺伝子発現解析で Bcl11a により発現が低下した遺伝子、Bcl11a/PU.1 結合ピークの近傍にある遺伝子、LSD1/HDAC 阻害剤により発現が回復した遺伝子を重ね合わせることで、Bcl11a の標的遺伝子を探索した、最終的に E3 ユビキチンリガーゼである Asb2 を同定し、Asb2 の AML 発症における役割を解明する目的で、TB-13 細胞に Asb2 を過剰発現させた細胞株を作成した。この細胞は、<i>in vitro</i> で細胞増殖能・自己複製能が低下し、細胞遊走能や接着能が低下した。また、この細胞株をマウスに移植すると、骨髄生着が阻害され、最終的には AML 発症が阻害された。さらに Bcl11a の Asb2 制御が重要であることを示す目的で、Asb2 のエンハンサー領域で、Bcl11a/PU.1 が結合している領域を CRISPR/Cas9 システムを用いて削除した変異体を作成し、これを TB-13 細胞へ導入した。この変異体発現 TB-13 細胞は、Asb2 発現が亢進し、Asb2 過剰発現 TB-13 細胞と同様のフェノタイプを示した。</p> <p>以上から、Bcl11a の Asb2 を標的とした AML 発症・増悪の分子機構を明らかにし、LSD1/HDAC 阻害剤の併用療法が Bcl11a 高発現 AML に対して有用な治療法となりうる可能性を示すことができた (図)。</p> <div data-bbox="853 1115 1501 1377" style="text-align: center;"> <p>図:本研究のまとめ</p> </div>
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Sunami Y, Nakamura T, et al. BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by repressing PU.1 target genes. Blood Adv. 6: 1827-43, 2022</p> <p>Yoshino S, Sunami Y, Nakamura T, et al. Trib1 promotes the development of acute myeloid leukemia in a Ts1Cje mouse model of Down syndrome. Leukemia. 36: 558-561, 2022</p> <p>【学会発表】</p> <p>角南義孝, 芳野聖子, 中村卓郎. AMLの発症と悪性化におけるE3ユビキチンリガーゼCop1の役割. 第26回 造血器腫瘍研究会, 宮城 (web), 日本, 2022年1月</p> <p>Sunami Y, Yoshino S, Nakamura T. The role of Cop1 in AML development and progression. 第80回日本癌学会学術総会, 横浜, 日本, 2021年9月</p> <p>Sunami Y, Nakamura T. BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1 FASEB Meeting, 2021年7月</p> <p>Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T. BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1. 39th Sapporo International Cancer Symposium, 2021年7月</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>FASEB Hematologic Malignancies Conference-Abstract Awards 2021 年 7 月 日本がん学会若手研究者ポスター賞 2021 年 9 月</p>

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		間質圧上昇が肺癌促進に果たす役割の解明と新たな治療法の開拓
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・助教・徳田 深作
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・准教授・山田 忠明
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・教授・高山 浩一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	慢性炎症は癌のリスク因子であるとともに間質圧の上昇を引き起こすことが知られており、ほとんどの癌組織においても間質圧の上昇が報告されている。しかし間質側からの物理的な圧力が癌の病態に果たす役割について調べた報告はほとんどない。肺癌はその病態に関与するドライバー遺伝子やシグナル経路の解明と新規抗癌剤の開発が進んでいるが、遠隔転移を有する肺癌を根治することは未だに難しくその予後は依然として厳しい状況である。 本研究では肺癌細胞に基底側からの圧力が及ぼす影響を検討し、間質圧の上昇が肺癌の病態に果たす役割を明らかにすることによって新たな治療戦略を開拓することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究では EGFR 変異陽性肺癌の培養細胞株を用いて実験を行った。間質圧の上昇が肺癌細胞に及ぼす影響を調べるために培養細胞がフィルター上でコンフルエントになった状態で水面の差をつけて静水圧を加え、水面の差が維持でき実験的に圧の影響を調べることが可能であった HCC4011、HCC827、H1975 細胞を用いて解析を行った。</p> <p>HCC827 細胞に基底側から静水圧を加えて走査型電子顕微鏡で細胞表面を観察したところ、基底側から圧を加えた条件では上皮の表面はところどころで隆起して凹凸不整な構造を示した。垂直切片を作成して光学顕微鏡で観察したところ、管腔側から圧を加えた条件では上皮は単層構造を示したが、基底側から圧を加えた条件では上皮の重層化が確認された(図)。同様の重層化は HCC4011、H1975 細胞でも認められた。さらに透過型電子顕微鏡では重層化した上皮の内部に微絨毛を有する腔が観察され、基底側からの圧によって上皮の重層化や極性異常が引き起こされることが示唆された。BrdU 法では基底側から圧を加えたときに BrdU 陽性細胞が増加しており、基底側から圧を加えた条件では培養上清に出現するアポトーシスした細胞の debris の量が減少していた。これらの結果から、基底側からの圧によって細胞増殖の亢進やアポトーシスの抑制が引き起こされると考えられた。さらに基底側からの圧がシグナル伝達に及ぼす影響を検討したところ、EGFR の下流に存在するリン酸化 ERK やリン酸化 Akt は基底側から圧を加えた条件ではむしろ減少していた。一方、PKA 活性化剤のフォルスコリンを投与すると基底側からの圧によって引き起こされる上皮の重層化が抑制され、これらの反応に PKA シグナル経路が関与することが示唆された。さらに肺癌の手術検体を透過型電子顕微鏡で観察したところ、重層化した腫瘍の内部に微絨毛を有する腔が認められ、ヒトの肺癌組織においても同様の極性異常が生じていることが確認された。</p> <p>本研究により間質圧の上昇が肺癌細胞の増殖亢進、アポトーシスの抑制、極性異常を引き起こし PKA シグナルがそのメカニズムに関与することが示唆された。今後は間質圧の上昇による癌促進メカニズムの解明をさらに進め、新たな方向からアプローチする癌の治療戦略の開拓につなげたいと考えている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Katayama Y, Yamada T, Tokuda S, Okura N, Nishioka N, Morimoto K, Tanimura K, Morimoto Y, Iwasaku M, Horinaka M, Sakai T, Kita K, Yano S, Takayama K. ‘Heterogeneity among tumors with acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors harboring EGFR-T790M mutation in non-small cell lung cancer cells’ Cancer Med. 11: 944-955. 2022.
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

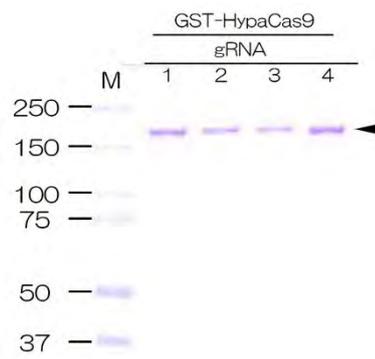


図：静水圧による上皮の重層化
垂直断面のトルイジンブルー染色図。基底側から圧を加えると上皮の重層化が引き起こされた。

研究課題		膠芽腫マウスモデルによる抗グリオーマ幹細胞薬ペンタミジンの効果検証
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・教授・中田光俊
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・特任助教・玉井 翔 金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・一ノ瀬 惇也
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	本研究は、膠芽腫発生の起源となる脳腫瘍幹細胞を治療標的として、ドラッグリポジショニングの手法により増殖抑制効果を有する既存薬剤を探索し、これを使用した悪性脳腫瘍の新規化学療法の基礎基盤を構築するものである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>背景: これまでの研究から、一般的なグリオーマ細胞株および当科で確立した複数のグリオーマ幹細胞株を使用した<i>in vitro</i>の実験にて、ペンタミジンの普遍的な濃度依存性の増殖抑制効果を確認している。また、シグナル分子の変化を検討し、STAT3の活性が抑制されることを見出し、併せて腫瘍浸潤能の低下、アポトーシスの誘導が生じることが明らかとなっている。今回、申請者が所属する研究室で確立したヒト膠芽腫具現化マウス脳腫瘍モデルを用いて、ペンタミジンの抗膠芽腫作用を<i>in vivo</i>で検証した。</p> <p>方法: 用意したヌードマウスをランダムに治療群および対照群の2群に分け、全身麻酔を行いマウス脳内へ直接的にグリオーマ幹細胞を注入した。DMSOを対照群、ペンタミジンを治療群マウスモデルにそれぞれ2日毎に大腿筋へ筋肉注射により投与した。移植後8週目の時点で脳を摘出した。薄切切片を作成し、腫瘍体積、腫瘍形態、アポトーシスおよび腫瘍浸潤の評価、シグナル分子の活性変化について検証を行った。</p> <p>結果: HE染色およびNestin染色により腫瘍塊を描出し、腫瘍体積の計測を行ったところ、治療群において有意差に腫瘍体積の低下を認め ($p=0.02$)、腫瘍細胞の増殖能評価に汎用されるKi-67 labeling indexも治療群において有意に低下していた。また、治療群においては非浸潤性の境界明瞭な腫瘍を形成し、腫瘍塊から逸脱した細胞数は対照群において有意に多かった。腫瘍細胞のアポトーシスの評価のためTUNEL染色を施行したところ、治療群においてアポトーシス誘導細胞が有意に増加していた。<i>In vitro</i>実験段階から検討しているSTAT3の活性化を腫瘍切片において検証した。免疫組織染色の結果、活性化型STAT3は腫瘍の浸潤部位に斑状に存在し、その数が治療群において有意に減少していることを見出した。</p> <p>結論: <i>In vitro</i>の実験で見出したペンタミジンの抗腫瘍効果を <i>in vivo</i> 実験系にて検証した。本薬剤は、膠芽腫症例に対して、抗がん作用ではない別の作用を目的に使用する場合がある薬剤である。このため、早期に臨床応用へつなげることができる可能性が高いと考えている。ペンタミジンを用いたヒトに対する臨床試験の立案を行うため、先進医療開発センターの支援を得てプロトコル含めた検討を行っている。最終的に臨床研究を踏まえ、世界に先駆けた日本発の脳腫瘍幹細胞を標的とした安全確実な化学療法の確立を試みる。</p>	
	<p>The figure consists of four brain section images and a bar graph. The top row shows 'HE染色' (H&E staining) for the '対照群' (control group) and 'Nestin染色' (Nestin staining) for the '対照群'. The bottom row shows 'HE染色' and 'Nestin染色' for the '治療群' (treatment group). The bar graph on the right shows '腫瘍体積 (mm²)' (tumor volume in mm²) for the '対照群' (control group) and '治療群' (treatment group). The control group has a significantly higher tumor volume (approx. 6 mm²) compared to the treatment group (approx. 3 mm²), with an asterisk (*) indicating statistical significance.</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 該当なし</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Tamai S</u>; Drug repositioning for translational research targeting glioma cells Japan-Russia International Symposium on Medical Science 2021. 9. 30. Kanazawa (WEB) 2. <u>玉井翔</u>、<u>淑瑠へムラサビット</u>、<u>サビエルジャンジャパル</u>、<u>一ノ瀬惇也</u>、<u>王一</u>、<u>平井希</u>、<u>平尾敦</u>、<u>中田光俊</u>；抗グリオーマ作用を有する抗真菌薬 pentamidine の臨床応用に向けた基礎研究 第80回日本脳神経外科学会総会 令和3年10月27-30日、横浜 <p>【その他特筆事項】 特になし</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		<i>In vivo</i> エレクトロポレーションを用いた簡便な発がんモデル作製法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・訪問研究員・大西 伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、申請者は piggyBac システムと <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法を組み合わせることでマウス脳に直接がん遺伝子を導入し、正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルの構築を行ってきた。また、同法を用いてマウスの睪臓や卵管などへの直接遺伝子導入にも成功している。本研究では、これまでに申請者が構築してきた piggyBac/<i>in vivo</i> エレクトロポレーション法によるマウス組織への遺伝子発現システムを発展させ、安定発現細胞株を樹立する感覚で迅速かつ簡便に多様な発がんモデルを構築・解析することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでに申請者は <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法でガラスキャピラリーを用いて piggyBac 発現ベクターをマウス新生児脳に直接導入することでウイルス感染を伴わずにマウス脳内の細胞に活性型 K-RAS (K-RAS V12) と <i>Cdkn2a</i> shRNA を発現させることで正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルを構築済みである。これまでの <i>in vivo</i> 発がんモデルではがん遺伝子 piggyBac 発現ベクターと目的配列をゲノム内トランスポゾンに挿入するための Transposase 発現ベクターの 2 種類のベクターをインジェクションしてきたが、本研究では、目的配列の挿入効率を上げることを目的に Transposase をタンパク質でインジェクションするために、大腸菌タンパク質発現系を用いたリコンビナントタンパク質を構築中である。また、高精度型 Cas9 である HypaCas9 タンパク質を gRNA と同時に大腸菌で発現させ、リボヌクレオプロテイン (Ribonucleoprotein (RNP)) として精製するシステムを構築中であり、簡便な遺伝子改変動物作製法である GONAD 法と組み合わせることで、自前でいつでも遺伝子改変マウスを作製できる準備を行っている。</p> <p>一般的な大腸菌の破碎方法である超音波ではなく、凍結融解法やリゾチーム、遠心法を組み合わせることでマイルドな条件でタンパク質を抽出することで、シングルバンドでの HypaCas9 タンパク質の精製に成功している (右図)。</p> <p>現在は、得られた HypaCas9/gRNA を用いてゲノム編集効率を評価中であり、今後、細胞やマウスへの遺伝子ノックアウト/インの実験条件最適化を行う予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	1. Isolation and characterization of neural stem/progenitor cells in the subventricular zone of the naked mole-rat brain. Yamamura Y, Kawamura Y, Oiwa Y, Oka K, <u>Onishi N</u> , Saya H, Miura K. <i>Inflamm Regen</i> . 41(1):31. 2021
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	



令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトの乳がんモデルの代替であるイヌの乳がん幹細胞培養系を用いたがん悪性化の分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・講師・町田雪乃
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・准教授・道下正貴
	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・学部生・石川里奈
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>雌イヌで最も発生が多い乳腺腫瘍は、悪性腫瘍が約50%で、組織学的に①乳腺上皮様腫瘍細胞のみが増殖する腫瘍、②乳腺上皮様腫瘍細胞と筋上皮様腫瘍細胞が両方増殖する腫瘍、③②に加えて軟骨と骨の増殖がみられる腫瘍に分類される。乳腺上皮細胞のみが増殖する腫瘍と比較し、筋上皮細胞が増殖している腫瘍では予後良好の傾向がみられる。</p> <p>ミトコンドリア内葉酸代謝酵素の一つであるMTHFD2は、様々ながんで発現しており、がんの代謝に重要な役割を果たしている。本研究では、MTHFD2がイヌの乳腺腫瘍の治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>イヌの乳腺腫瘍におけるMTHFD2の発現について、パラフィン切片を用いた免疫染色にて評価した。MTHFD2発現は良性腫瘍では陽性(2/2)、①乳腺癌では弱陽性(4/6)、陰性(2/6)、②複合腺癌では弱陽性(1/3)、陽性(2/3)であった。MTHFD2陽性細胞は、腫瘍性腺上皮細胞、筋上皮細胞および軟骨細胞であり、細胞質ないし核に発現がみられた。また腫瘍間質の線維芽細胞においても陽性を示した。このことから、イヌの乳腺腫瘍においてMTHFD2が発現し、がん細胞の代謝に関与している可能性が示唆された。</p> <p>さらに、イヌ乳がん細胞株CTBp、CHMp、CNMp、CIPpを用いて、ウェスタンブロットにてMTHFD2の発現を解析した。接着培養とがん幹細胞を濃縮するスフェア培養で発現を比較した。MTHFD2は全てのイヌ乳がん細胞株で発現し、CTBp、CHMp、CNMpはスフェア培養と比較して接着培養で発現が高かった。MTHFD2はヌクレオチドの代謝に関与するため、増殖が早い接着培養細胞では発現が高かったと推察される。また、MTHFD2阻害薬の<i>in vitro</i>投与によって、イヌの乳がん細胞の増殖が抑制される傾向がみられた。以上より、MTHFD2はイヌの乳がんの標的になりうる可能性が示唆された。今後は、MTHFD2による腫瘍増殖抑制効果の解析のために、shRNAによるノックダウンの影響について研究する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

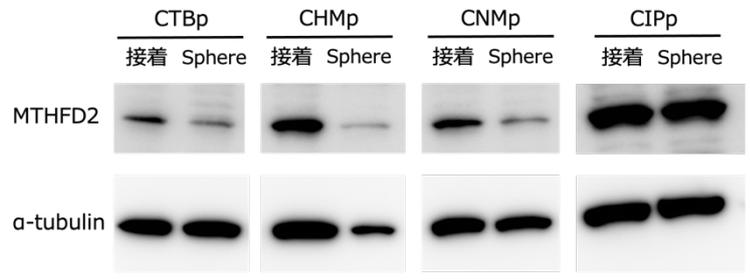
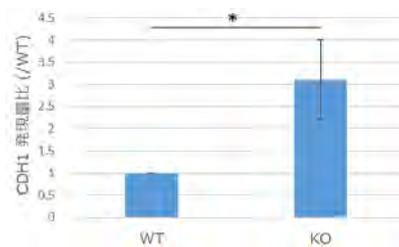
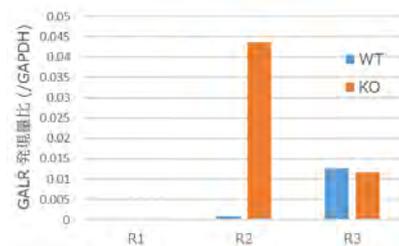


図1 イヌ乳がん細胞株におけるMTHFD2の発現

研究課題		ガラニンによる大腸がん細胞浸潤促進のシグナル伝達機構
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・田代康介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	我々は、術後再発した患者腫瘍と予後良好な患者腫瘍の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、神経ペプチド galanin (GAL)が再発群において高発現していることを見出し、さらに、大腸がん由来細胞株 HCT116 を用いた浸潤アッセイにおいて、GAL は浸潤に関与することを明らかにしている。本研究では、ヒト大腸がん由来細胞の浸潤・転移における浸潤促進シグナル経路の解明及び GAL によって制御される下流遺伝子の特定も含めた浸潤の詳細な経路を明らかにすることを目的としている	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1) galanin 受容体の機能 galanin ペプチドの受容体として同定されている3つのGタンパク質共役型受容体 (GALR1, GALR2, GALR3)について、浸潤への関与を解析した。まず、大腸がん由来細胞株 HCT116 細胞において発現量を解析したところ、GALR3 のみが顕著に高発現していることが判明したが、(Fig. 17a)、遊走能が大幅に抑制された GAL ノックアウト細胞におけるレセプター群の発現を解析したところ、GALR2 の大幅な発現上昇が確認され、GALR2 が遊走抑制因子として機能している可能性が示唆された。これは、GalR2 の過剰発現が、がん細胞の浸潤を抑制する結果と一致している。</p> <p>2) galanin は、EMT を誘導する 次に、galanin ペプチド刺激が誘導する分子の候補として、上皮間葉転換 (EMT) への関与に関して、解析した。HCT116 WT および GAL KO 細胞において EMT マーカーの発現を評価した。その結果、GAL KO 細胞では、WT 細胞と比較して、Vimentin の発現低下と E-cadherin の発現上昇が観察された。これらの結果は、GAL が EMT の特性獲得に重要であり、CRC 細胞における EMT 誘発性の浸潤促進に寄与している可能性を示唆している。</p> <p>以上の結果より、galanin によるがん細胞浸潤制御において、その受容体 GalR2 は浸潤抑制に機能する分子であること、また、galanin の作用には、EMT の誘導経路が関わっていることが明らかとなった。今後、R1 や R3 の機能解明、galanin のシグナルの詳細を明らかにすることが重要である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	ヒト大腸がん由来細胞の浸潤における Galanin の機能 第44回日本分子生物学会 2021年12月 岡本愛華、田代康介
	【その他特筆事項】	なし



研究課題		染色体転座陽性肉腫における PI3K 阻害剤のクロマチンリモデリング作用の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・特任研究員・礒山 翔
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・部長・旦 慎吾
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	骨や脂肪、筋肉などに発生する悪性腫瘍である肉腫は発生頻度が稀であることなどの理由から治療薬の開発が遅れており、新たな治療薬の開発が求められている。当研究室で見出された PI3K 阻害剤 ZSTK474 は、固形がんを対象にした第 I 相臨床試験の結果から、肉腫に対する有効性が示唆されている。われわれはこれまでに、肉腫組織型 19 種計 34 細胞株に対する ZSTK474 の抗腫瘍活性を検討し本剤がユースング肉腫や滑膜肉腫などの染色体転座陽性肉腫 (TRS) 組織型由来細胞株に選択的にアポトーシスを誘導することを示してきた。そこで本研究では、PI3K 阻害剤が染色体転座陽性肉腫に選択的にアポトーシスを誘導する分子メカニズムを明らかにすることを目的として以下の研究を進めた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>染色体転座陽性肉腫 (TRS) で認められる融合遺伝子は、クロマチンリモデリングによる幅広い遺伝子のエピジェネティックな発現制御によって細胞のがん化や生存を促進することが知られている。そこで、TRS では PI3K 阻害剤が融合遺伝子によるエピジェネティックな遺伝子発現機構に影響を与え、それに起因してアポトーシスが誘導されると仮説を立てた。それを実証するために、本研究では ZSTK474 で処理した滑膜肉腫細胞株でゲノムワイドなヒストンの修飾状態および遺伝子発現の変化を ChIP-seq および RNA-seq により解析・比較した。</p> <p>まず、RNA-seq のデータから ZSTK474 がどのような遺伝子の発現を変化させているかを GO 解析および GSEA 解析にて検討したところ、PI3K シグナルの抑制とアポトーシス関連遺伝子、細胞周期関連遺伝子の発現変動が検出された。また、令和2年度に PI3K 阻害剤により発現誘導されアポトーシスに寄与することを報告した PUMA および BIM も RNA-seq データにおいて PI3K 阻害剤による発現上昇が確認された。</p> <p>次に ZSTK474 によるエピジェネティックな発現制御作用を解析するため、転写を正に制御するヒストンの H3K4me3、H3K27ac に対する抗体で ChIP-seq を行った。その結果、H3K27ac のポジコンとして行った HDAC 阻害剤 quisinostat を処理した際の H3K27ac のゲノム上の分布の変化に対して、ZSTK474 処理では H3K27ac、H3K4me3 どちらもゲノムワイドの顕著な変化は認められなかった。一方、個々の遺伝子を見ていくと、ZSTK474 処理で発現があがった PUMA、BIM のプロモーター領域の H3K4me3、H3K27ac の分布が ZSTK474 処理によって増加し、それに伴って mRNA の発現も上がっていることが確認でき、ZSTK474 はプロモーター領域のヒストン修飾の制御を介して PUMA、BIM の発現を制御していることが示唆された (図)。今後、TRS における PI3K シグナルが PUMA、BIM などアポトーシスに関わる遺伝子のエピジェネティックな発現制御にどのように関連しているのかについて検討を進める予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾 PI3K 阻害剤の染色体転座陽性肉腫細胞に対するアポトーシス誘導作用の解析 第 25 回日本がん分子標的治療学会学術集会 オンライン 2021 礒山翔、玉城尚美、旦慎吾 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の染色体転座陽性肉腫に対する細胞死誘導メカニズムの解析 第 80 回日本癌学会学術総会 横浜市 2021
	【その他特筆事項】	なし

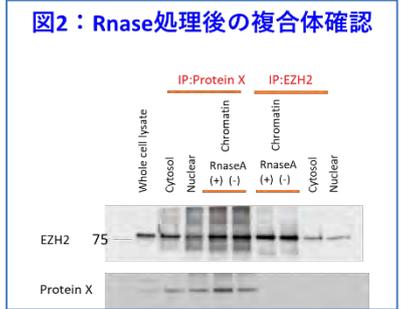
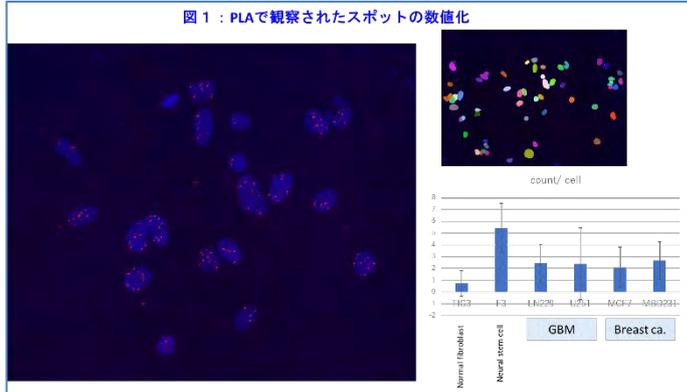
令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍血管のダイナミクスを誘導する血管制御ミエロイドの解析
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学医学系部門・助教・林 弓美子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	福井大学医学系部門・教授・木戸屋 浩康
	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・助教・村松 史隆
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>腫瘍血管を標的とした癌治療法は、腫瘍組織中でおきる血管新生(angiogenesis)の阻害による酸素・栄養分の供給路の遮断というコンセプトに基づき、開発が進められてきた。しかしながら、大きな期待を受けて登場した腫瘍血管阻害剤(VEGF阻害剤)は単独使用では抗腫瘍効果が少なく、想定されていたような劇的な治療効果を示すことはなかった。本研究では、腫瘍血管阻害剤に対する治療抵抗性の獲得機構を明らかにするため、腫瘍血管の動態変化に着目した研究を進めている。さらに血管の動態変化に関して新規ミエロイド系細胞の存在も明らかとなりつつあり、この細胞群の細胞動態も含めた解析を進める。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者らによるこれまでの研究から、血管発生期において血管束移動という血管リモデリング現象が生じ、その過程に特殊なミエロイド系細胞群が関与することが明らかになっている(Kidoya H, et al. <i>Dev Cell</i> 2015)。</p> <p>さらにこれまでの検討から、腫瘍組織において新規の血管制御ミエロイド系細胞が存在することを見出し、この細胞群は血管関連因子を高発現することが分かっている。これらの血管関連因子の中からいくつかの候補遺伝子(X1, X2とする。遺伝子名に関しては現在論文投稿準備中のため、非公開)に着目し、腫瘍組織における各因子の機能解析および治療標的としての可能性について解析を進めた。</p> <p>まず腫瘍組織における各因子の発現を検討するために免疫染色を行ったところ、X1はミエロイド系細胞でのみ発現が認められた。さらにこのミエロイド系細胞の多くは血管内皮細胞の近傍に存在していた。一方、X2の局在を検討するとミエロイド系細胞に加えて血管内皮細胞での発現も認められた。</p> <p>さらに、血管内皮細胞への各因子の機能解析を行うために血管内皮細胞へのリコンビナントタンパク質の添加実験を行った。コントロール群と比較して、X2を添加した群では有意な変化は認められなかったが、X1を添加した群では血管内皮細胞の管腔構造形成に顕著な変化が認められた。</p> <p>そこで、生体内においてX1が血管構造へ与える影響を検討するために、CRISPR-Cas9システムを用いて、X1遺伝子欠損マウスを作製した。この遺伝子欠損マウスから骨髓細胞を採取し、骨髓移植を行い、骨髓系細胞特異的にX1を欠損しているマウスを得た。このマウスを用いて腫瘍移植実験を行ったところ、有意な抗腫瘍効果が認められた。</p> <p>以上の検討から、腫瘍組織において出現する新規ミエロイド系細胞は遺伝子X1を高発現し、腫瘍血管の構造に変化を生じさせ、腫瘍増大に関与している可能性が示唆された。</p> <p>これらの新規ミエロイド系細胞群に関して腫瘍組織中への動員方法等の検討も行ったが、現在までに明確な実験結果が得られておらず、今後も検討を続けていく。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Jia W, Kong L, Kidoya H, Naito H, Muramatsu F, Hayashi Y, Hsieh HY, Yamakawa D, Hsu DK, Liu FT, Takakura N. Indispensable role of Galectin-3 in promoting quiescence of hematopoietic stem cells. <i>Nature Communications</i> 12, 2118, 2021 Apr.</p> <p>2. Hu L, Hayashi Y, Kidoya H, Takakura N. Endothelial cell-derived Apelin inhibits tumor growth by altering immune cell localization. <i>Scientific Reports</i> 11, 14047, 2021 Jul.</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		難治性乳がんのがん幹細胞を標的とした新規治療標的に関する研究開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・講師・栗本遼太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・教授・浅原弘嗣
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・助教・千葉朋希
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・研究員・内田雄太郎
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	分子病態研究分野 教授・後藤典子
【研究目的】	<p>本邦の女性で最も罹患数の多い乳がんの中でもトリプルネガティブ乳がん (TNC) は、有効な薬物治療の選択肢が少なく、その再発率、生存率も不良であることが知られている。未だに他の乳がんと比較して治療法が十分に確立していない。これらの治療抵抗性を説明する上で重要な要素に乳がん幹細胞の存在が挙げられ、TNBC ではとりわけ乳がん幹細胞の構成率が高いことが知られている。近年では、膵臓がんや脳腫瘍において Musashi2 や LIN28 などといった RNA 結合タンパク質 (RBP) がその制御を担うことが報告されている。乳がんにおいて重要な RBP は未だ同定されておらず、TNBC における病態を制御する新規 RBP の同定とその機能を明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>初めに、乳がんのトランスクリプトーム情報の中から、癌幹細胞に特異的な遺伝子を探索するために、トリプルネガティブ乳がん 5 例に対する scRNAseq の解析データの再解析を行った (EMBO J. 2020)。その結果、CD44 陽性、NRP1 陽性、CD24 陰性を示す乳がん幹細胞集団において特異的に発現する RBP として RBPU を同定した。</p> <p>ヒト TNBC 検体を RBPU で免疫組織学的に評価すると、周囲の正常細胞や支持組織には発現が見られない一方で、乳がん細胞に広く発現が認められた。</p> <p>この RBPU を MDAMB231 細胞株において siRNA を用いてノックダウンし、トランスクリプトーム解析を行なったところ、NRP1、ZEB1、CD44 などといったがん幹細胞性を制御する遺伝子群を特異的に抑制することが明らかになった。また ActD を用いて mRNA の安定性を検証したところ、RBPU のノックダウンによってこれらの mRNA の安定性が減少した。このことから、RBPU がこれら重要な遺伝子群の mRNA を安定化させ、その発現を維持する可能性が示唆された。また、PAR-CLIP を用いて RBPU の標的を網羅的に解析したところ、CD44、NRP1 といった遺伝子の mRNA の 3' UTR に特異的に RBPU が結合することが明らかとなった。</p> <p>さらに、RBPU をノックダウンした細胞株では、sphere 形成能の低下と Xenograft model による定着性の低下が認められた。これらのことから、RBPU ががん幹細胞性の維持に重要であると考え、TNBC PDX モデルにおいて RBPU をノックダウンしたところ、ITGB1 や TGFBR1 などの遺伝子が抑制され、Xenograft model では腫瘍定着能が低下していることが明らかとなった。さらに、この RBPU の 3' 末端に nanoluciferase を構築する HiBIT タグを導入した細胞株を樹立し、RBPU を制御する化合物のスクリーニングを実施し、1280 種の化合物の中から複数の制御化合物の候補を同定、現在治療効果を検証中である。</p> <p>これらの結果から、RBPU が乳がん幹細胞性を特徴づける遺伝子群の mRNA の安定性を亢進させることによって、乳がん幹細胞性、腫瘍形成能を亢進させている機能があり、これが乳がん幹細胞特異的に起こっている機構である可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	

研究課題		ヒストンメチル化酵素 EZH2 と新規複合体を形成するタンパク質の同定と機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学大学院医学系研究科・講師・新城恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	ヒストンメチル化酵素 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコム複合体 2) の構成タンパク質であり、多くのがんで発現が高い EZH2 はがんにおいて PRC2 以外のタンパク質と複合体を形成することも知られている。我々は EZH2 が過剰発現している複数の腫瘍細胞において、EZH2 はヒストン修飾酵素 X (protein X) と複合体を形成していることを見出した。この新規 EZH2 複合体は通常の複合体とは異なる新たな機能を獲得し、悪性化に寄与している可能性がある。本共同研究では、新規複合体の機能解明を目指して実験を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでに脳腫瘍 (GBM)、乳がん (Breast ca.)、前立腺がん、肺がんなど複数のがん種の細胞株を用いて、この異常複合体が存在することを確認した。EZH2 は核内に多く局在するが、EZH2-protein X 異常複合体も核内で認めることが分かった。複合体の存在は Proximity ligation assay (PLA) でも確認を試みた。複合体を示す PLA のスポットはがん細胞で多い傾向があった (図 1)。長鎖非翻訳 RNA はヒストン修飾タンパクをクロマチン上にリクルートすることが知られており、EZH2 も複数の lncRNA に結合することが報告されている。EZH2-protein X 異常複合体形成に長鎖非翻訳 RNA が関与しているかを検討するため、細胞から得られたタンパク質を、RNaseA で処理したのち、免疫沈降を行った。RNaseA 処理の有無で複合体の存在量は変わらず、タンパク質が直接結合している可能性が考えられた。EZH2 と protein X とに別の蛍光タンパク質をつけ、同一ベクター内で発現させる系を作成した。今後、細胞株に導入して FRET 実験ができるように安定発現細胞の作製を行う予定である。EZH2 と protein X とを強制発現させた細胞でクロマチン免疫沈降を行い、この複合体による標的遺伝子部位を同定することも目指している。現在、クロマチン免疫沈降の条件検討中である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	



令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		結合蛋白質に基づいた新規パイロトーシス阻害剤の設計と合成
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・専任研究員・闔闔孝介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	<p>パイロトーシスは細菌が感染したマクロファージで誘導される炎症誘導性のプログラム細胞死の一つであり、近年がんをはじめとして様々な疾患と関連することが報告されるようになってきている。特に皮膚がんなどのある種のがん組織でパイロトーシスは、がん微小環境の形成に関与することで、がんの悪性化に寄与する可能性が報告されている。そこで、本研究では新たなパイロトーシス阻害剤を開発し、これを動物モデルへと適用することでパイロトーシス阻害剤の抗がん剤リードとしての可能性を検証することを目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでの検討で我々は、新規パイロトーシス阻害剤として acyloxymethyl ketone (AOMK) という官能基を持つ KH 化合物を見出している。本化合物はもともとリソソームに存在するプロテアーゼの一種であるカテプシンBの阻害剤として開発したものであり、当初カテプシンBの阻害がパイロトーシス阻害につながると推定していた。しかしながら、昨年度の検討でカテプシンBはパイロトーシスとは関与せず、KH 化合物が持つカテプシン B 阻害活性はパイロトーシス阻害には関係しないことが推定された。</p> <p>そこで本年度は KH 化合物が持つカテプシン B 阻害活性を分離し、パイロトーシスを選択的に阻害できる化合物の開発を目指し研究を開始した。新たな化合物の設計のために、まず KH 化合物の類縁体がカテプシン B と結合部位する部位を化学的手法で同定し（論文投稿準備中）、これを元にしてその結合モデルを構築した。その上で、結合モデルに基づいてカテプシン B に結合できない誘導体の設計・合成を行った。その結果カテプシン B と結合しない誘導体を開発することに成功した。さらに本化合物のパイロトーシス阻害活性を検証したところ、元の KH 化合物と同程度の阻害活性を有することも明らかとなった。このことは、推定通りカテプシン B 阻害活性とパイロトーシス阻害活性が関係しないことを証明する結果である。現在本化合物を元に動物実験に適用可能な誘導体の開発を進めている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<p>アルキンタグの直接検出法を用いたタンパク質修飾部位の解析 第48回日本毒性学会学術年会、神戸、2021年7月8日</p> <p>アルキンタグの直接検出法を用いた蛋白質アダクトの解析 第94回日本生化学会大会、横浜（オンライン）、2021年11月3日</p>
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

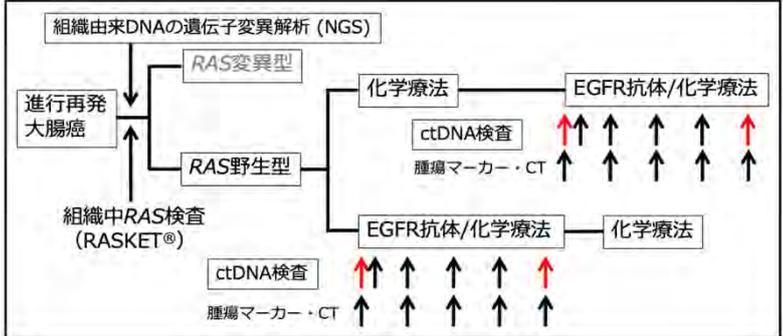
研究課題		腫瘍微小環境がもたらす悪性グリオーマ幹細胞のBNCT抵抗性の機序解明										
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・助教・近藤夏子										
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名											
	所属・職名・氏名											
	所属・職名・氏名											
	所属・職名・氏名											
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周										
【研究目的】	<p>悪性Gliomaは予後不良であり、特にGrade IVのGlioblastoma (GBM)は手術、放射線化学療法を行っても生存期間が約14か月で、免疫治療も効果を認めない。我々は、これまでにホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を悪性グリオーマに適用し、予後延長を確認した (Miyatake S, et al., Neurol Med Chir (Tokyo) 2016, Kawabata S, et al., Neurooncol Adv. 2021)。しかし、BNCT後の再発は避けられず、原因解明が求められている。本研究ではBNCT後の残存腫瘍からBNCT抵抗性分子プロファイルを明らかにする。また残存腫瘍とGlioma nicheや腫瘍辺縁の間質細胞との相互作用を明らかにし、再発の原因となる経路・介在シグナルを同定する。</p>											
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>今年度は腫瘍微小環境 Glioma niche のひとつであるミクログリアが Glioma の BNCT 感受性に及ぼす影響を間接的共培養を用いて調べた。 [方法]U87MG <i>delta</i> EGFR細胞にホウ素化合物 <i>p</i>-Boronophenylalanine (BPA)をDMEM培地中に添加し(最終濃度20ppm)30分培養後、トリプシン処理し、エッペンチューブに回収し(培地中にBPAを20ppm含有)原子炉重水設備照射場(1MW)で熱中性子線照射を20分行った。照射後、U87MG <i>delta</i> EGFR細胞を6ウェルプレートに10E5個播種した。単培養群とミクログリア共培養群を設定した。共培養群はヒトミクログリア細胞株HMC3細胞10E5個を6ウェル用インサートに播種し共培養を行った。照射5日後のU87MG <i>delta</i> EGFR細胞数をカウントした。 [結果]非照射コントロール群では、細胞数が単培養(control mono)では7.2E5個、共培養(control co)で4.2E5個であった。BNCT群では細胞数が単培養(BNCT mono)では2.1E5個、共培養(BNCT co)で1.0E5個であった。</p> <div style="display: flex; align-items: flex-start;"> <div style="flex: 1;"> <table border="1"> <caption>Cell Number Data</caption> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>Cell Number</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>control mono</td> <td>7250</td> </tr> <tr> <td>control co</td> <td>4283</td> </tr> <tr> <td>BNCT mono</td> <td>2133</td> </tr> <tr> <td>BNCT co</td> <td>1066</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div style="flex: 2; padding-left: 10px;"> <p>[考察]非照射コントロール群・BNCT群の両群でミクログリアと共培養することによってグリオーマ細胞の増殖が抑制された。これはミクログリアのM1タイプに相応する腫瘍抑制効果と評価できる。一方、組織修復型M2タイプのミクログリアは腫瘍増殖に有利に働くと知られている (Dello Russo et al. J. Neuroinflammation, 2018)。BNCT群の細胞数は非照射群と比べて単培養で25.3%、共培養で27.4%に減少した。BNCTによる腫瘍増殖抑制効果に対して、ミクログリアとの共培養は影響を及ぼさないと考えられる。この結果は、BNCT後、DNA損傷を受けたグリオーマ細胞と共培養することによって、ミクログリアがM2タイプに誘導され、グリオーマの細胞数の減少を単培養よりも抑えるという予想に反していた。この結果はsecretome主体の間接的共培養によるものなのかもしれない。直接ミクログリアと接する3D共培養の場合は異なる結果になるかもしれない。R4年度に3D共培養・空間的遺伝子発現解析などを行ってさらに考察を進める予定である。</p> </div> </div>		Condition	Cell Number	control mono	7250	control co	4283	BNCT mono	2133	BNCT co	1066
Condition	Cell Number											
control mono	7250											
control co	4283											
BNCT mono	2133											
BNCT co	1066											
【成果等】	【主な論文発表】	未発表										
	【学会発表】	未発表										
	【その他特筆事項】											

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

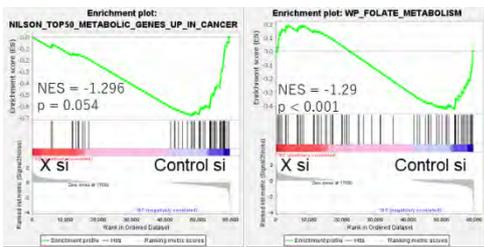
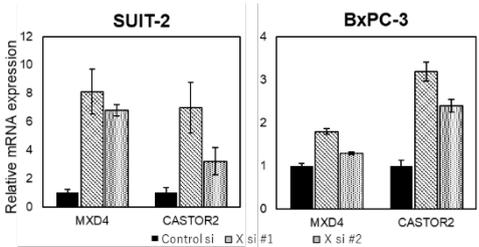
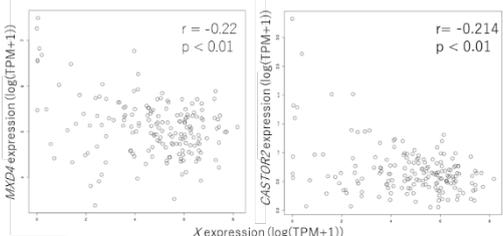
研究課題		タンパク質カプセルによる MET を標的としたドラッグデリバリーシステムの構築
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・特任助教・寺坂尚紘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・博士課程学生・小松大和
	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・修士課程学生・柏勇希
	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・博士課程学生・河上直也
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>ドラッグデリバリーは、特定の細胞に選択的に薬剤を運搬することで薬剤の効果を最大限にしつつ副作用を最小限に抑える技術である。昨年までの研究で、Lasso-graft 法によって MET 結合環状ペプチド aMD4 を 60 量体カプシド構造形成タンパク質である細菌のルマジン合成酵素 (AaLS) の表面に提示することで、MET のダイマー化を促進し、MET ダイマー化依存的なエンドサイトーシスによってカプシドが細胞内に取り込まれることが分かった。しかし、小分子薬剤を内包したペプチドアダプター修飾カプシドを用いたところ、MET 発現依存的な細胞死は観察されなかった。そこで本研究では、aMD4 を Lasso-graft するタンパク質を検討し、MET 過剰発現がん細胞選択的に薬剤運搬可能なタンパク質の開発を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年までの研究において、MET 結合環状ペプチドである aMD4 のファーマコフォアを AaLS 表面に移植 (Lasso-graft) することで、細胞表面の MET に選択的に結合するタンパク質カプセルを創成した。この AaLS-aMD4 は細胞表面の MET を二量化し、エンドサイトーシスを誘起したが、その効率天然の HGF よりも 100 倍程度低かった。</p> <p>そこで本年度では、AaLS-aMD4 ファーマコフォアの構造を安定化して MET との結合力を向上させるため、aMD4 と AaLS の間のリンカーに、二つのシステインを導入してジスルフィド結合を形成する AaLS-aMD4ds を作成した。その結果、AaLS-aMD4ds は AaLS-aMD4 より MET 二量化活性が 5 倍程度向上した。この結果は、Lasso-graft において、ファーマコフォアと足場タンパク質の間のリンカー配列が活性に重要であることを示している。しかし AaLS-aMD4ds は依然として MET 二量化活性が低かったため、他の足場タンパク質を検討することとした。</p> <p>AaLS 以外の複数の足場タンパク質のループに aMD4 を Lasso-graft することを検討し、大腸菌での発現・精製が可能なタンパク質を同定した。複数種類のタンパク質の MET に対する結合能を測定したところ、その結合力は合成ペプチドの数十から数百倍低かった。これは、AaLS と同様に aMD4 ファーマコフォアと足場タンパク質の間のリンカーデザインが不適切だからと考えられる。現在、適切なリンカー配列をスクリーニングしている。結合力の強いタンパク質-aMD4 を同定した後は、切断可能なリンカーを介して小分子薬剤をタンパク質-aMD4 に修飾し、MET 過剰発現細胞選択的に薬剤を運搬できるか実験する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Y. Komatsu [†] , N. Terasaka[†]1 , K. Sakai, E. Mihara, W. R., K. Matsumoto, D. Hilvert, J. Takagi & H. Suga [†] . De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist. <i>iScience</i> , 24 , 103302 (2021).
	【学会発表】	タンパク質カプセルへの環状ペプチド移植による肝細胞増殖因子受容体アゴニストの創成 寺坂尚紘, 小松大和, 酒井克也, 三原恵美子, 若林里咲, 松本邦夫, Hilvert Donald, 高木淳一, 菅裕明 第 15 回バイオ関連化学シンポジウム 2021 年 9 月 9 日
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題	大腸癌における循環腫瘍 DNA を用いた抗 EGFR 抗体薬耐性の検出と病状モニタリングの確立	
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋市立大学消化器・代謝内科学・准教授・久保田 英嗣
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院胃腸外科・講師・中村 慶史
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田 武
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究の目的は、 <i>RAS</i> 野生型切除不能大腸癌患者において、治療前に循環腫瘍 DNA (ctDNA) における EGFR (epidermal growth factor receptor) 経路関連遺伝子の変異や増幅を検出することにより、ctDNA による抗 EGFR 抗体薬の効果予測の可能性を検討することである。さらに、抗 EGFR 抗体療法中に採取した血液由来の ctDNA において EGFR シグナル経路関連遺伝子の変異・増幅を経時的に検索することにより、ctDNA による病状モニタリングの可能性を検討することである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>研究関連施設の倫理審査委員会の承認を受け、組織由来 DNA で <i>RAS</i> 野生型と確認され、抗 EGFR 抗体薬の投与を行なった切除不能進行再発大腸癌 50 例の症例登録、検体採取を終了した。</p> <p>化学療法前と、抗 EGFR 抗体薬の開始 4 週後、その後病状進行まで 10 週間隔で、腫瘍マーカー測定や画像診断にあわせて血液採取を行った (図)。うち 45 例において血漿から ctDNA を抽出し、デジタル PCR 法で抗 EGFR 抗体耐性の原因となるホットスポット変異 (<i>KRAS</i>, <i>NRAS</i>, <i>BRAF</i>, <i>PIK3CA</i>) と遺伝子増幅 (<i>HER2</i>, <i>MET</i>) の解析を行った。今後、残り 5 例について、同様の解析を行う予定である。合わせて、対象症例の原発腫瘍組織由来 DNA を用いて、次世代シーケンス法で 50 種類の癌関連遺伝子のホットスポット変異の解析を行った。</p> <p>解析結果を待って、組織と ctDNA における抗 EGFR 抗体耐性関連変異の異同を比較し、ctDNA 検査がより腫瘍全体の遺伝子変異状態を反映しているかどうかを検討する。それらの結果と病状進行までの期間を比較し、ctDNA による抗 EGFR 抗体薬の効果予測の可能性を検討する。</p> <p>さらに、(1) 抗 EGFR 抗体薬投与後のどの時点で耐性の原因となる遺伝子異常が出現するのか、(2) 抗 EGFR 抗体耐性変異・増幅のそれぞれの頻度はどのくらいか、また複数の変異・増幅が同時に出現することがあるか、(3) 遺伝子変異・増幅によって、画像診断による病状進行の診断までの期間に差があるかどうかなども合わせて検討する。最終的に、抗 EGFR 抗体療法中の獲得耐性の検出による治療効果のモニタリングの可能性につき検討する予定である。</p> <p>令和3年度は予備的なデータを用い、<i>RAS</i>野生型転移性大腸癌における ctDNA 中の <i>RAS</i>, <i>BRAF</i>, <i>PIK3CA</i> 変異の同定と腫瘍組織 (原発巣、転移巣) における変異とを比較した解析を行った。結果は日本癌学会学術総会で発表し、現在論文投稿中である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 澤田 武, 久保田英嗣, 中村慶史, 高橋直樹, 太田亮介, 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野隆至, 源 利成, 片岡洋望. <i>RAS</i> 野生型転移性大腸癌患者における循環腫瘍 DNA 中の <i>RAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PIK3CA</i> 変異の同定と腫瘍組織の変異との比較. 第 80 回日本癌学会学術総会.	
	【その他特筆事項】 なし	



研究課題		非乳頭部十二指腸腫瘍における ERBB 受容体ファミリーの解析と治療標的の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学・医療人育成センター・生物学・教授・佐々木泰史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田 武
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・大学院生・太田亮介
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>非乳頭部十二指腸腺癌を含む小腸癌は大腸癌と比較して予後が悪いが、標準的な治療は確立されていない。一方、小腸進行癌の遺伝子解析では <i>ERBB2</i> (<i>HER2</i>) の変異・コピー数異常が小腸癌・十二指腸癌の 10-23%に報告されており、治療標的として注目されている。</p> <p>本研究の目的は、非乳頭部十二指腸腺腫・進行癌において、ERBB 受容体ファミリーの遺伝子異常を次世代シーケンスで、蛋白発現を免疫組織化学で評価することにより、発癌への関与を明らかにすることである。それにより、十二指腸癌診療における ERBB 受容体ファミリーの治療標的としての可能性を検討する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<div style="border: 1px solid black; padding: 10px;"> <p>図. 研究概要</p> <p style="text-align: center;">免疫組織化学・DISH (EGFR, HER2, ERBB3, ERBB4) 対比 病理所見 (胃型 or 小腸型, 腺腫 or 癌) (CD10, MUC2, MUC5AC, MUC6) 対比 変異・コピー数解析 (EGFR, HER2, ERBB3, ERBB4)</p> </div> <p>非乳頭部十二指腸腺腫・粘膜内癌と進行癌の検体の合計 72 検体を対象とする。病理診断は各研究協力施設で終了しているが、今後、消化管病理専門医による再評価と、粘液形質の免疫組織化学による亜分類を行う (図)。</p> <p>既にホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 切片からの DNA 抽出とクオリティチェックは終了している。現在は <i>ERBB2-4</i> を含む 75 癌関連遺伝子のパネルを用いて、次世代シーケンス法で変異・コピー数解析を行っている。</p> <p>また、EGFR, ERBB2, ERBB3, ERBB4 に関して、免疫組織化学と染色の評価を行った (図)。ERBB2 に関しては、日本病理学会の HER2 タンパク病理組織標本の判定基準を用い、判定が境界域 (2+) のものは Dual color <i>in situ</i> hybridization (DISH) 法で追加検査を行った。今後、病理所見と遺伝子異常、免疫組織化学・DISH の解析結果を待って、それらの分子病理学的変化を相互に比較し、以下を検討する予定である。</p> <ol style="list-style-type: none"> ERBB 受容体ファミリーの遺伝子異常・発現異常は十二指腸発癌のどの段階で生じるのか。 異なる発癌経路に属すると考えられる小腸型腫瘍、胃型腫瘍で ERBB 受容体ファミリーの遺伝子異常、発現異常の頻度は異なるのか。また、他の臨床病理学的因子と関連はあるのか。 遺伝子変異・遺伝子増幅は、免疫組織化学に反映されるのか。また、どの解析法が治療標的の探索として最適か。 	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	本年度は研究補助員の雇用がうまくいかず、研究室の移転もあり、計画どおりに研究を進められなかった。

研究課題		予後不良な膵臓癌における新規予後マーカー遺伝子の機能解明
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学・助教・丹下正一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	<p>申請者は、悪性度の高いサブタイプの膵臓癌の識別が可能な遺伝子を特定することにより、治療方針の策定に資する情報の迅速な提供が可能になると考え、予後不良膵臓癌特異的なマーカーの探索研究を開始した。これにあたり、米国の公共データベースに収録されているRNA-Seq情報を用いた網羅解析を行った。この結果、機能未知な遺伝子Xの高発現が患者の疾患特異的生存期間の短縮と有意に関連していることを見出した。このため申請者は、腫瘍形成の過程においてこの遺伝子が貢献する可能性を検討することを目的に研究を開始した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>膵臓癌細胞株を用いた実験系、及びTCGAデータを用いたX遺伝子の発現は正常の膵臓組織では殆ど確認できず、腫瘍においてのみ過剰発現していることが示された。X遺伝子をノックダウンした膵臓癌細胞株SUIT-2と対象実験を行った細胞からそれぞれRNAを抽出してRNA-Seqを行い、更に遺伝子セットエンリッチメント(GSEA)解析によって群間で発現レベルが異なる遺伝子を探索した。この解析により、MYC、mTORC1のような腫瘍の進展に寄与する遺伝子の標的遺伝子群の発現がXのノックダウンによって著明に低下することを見出した。また、腫瘍に関する代謝遺伝子群および葉酸代謝経路の遺伝子群の発現低下も認められた(図1)。また、MYCの活性化を抑制するMXD4、ならびにmTORC1の活性化を抑制するCASTOR2遺伝子の発現レベルはXのノックダウンによって共に上昇することが明らかとなった(図2)。これらの遺伝子の発現は、膵臓癌検体では遺伝子Xと逆相関の関係にあることが明らかとなった。これらの結果から、Xは予後不良な膵臓がんのマーカーとしてのみならず、主に活性を抑制する遺伝子の発現を調節することによってMYCやmTORC1の活性化にも寄与していることが示唆された。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">  </div> <p>図1：遺伝子XをsiRNAによりノックダウンした膵臓癌細胞株SUIT-2における癌関連代謝遺伝子群、および葉酸代謝関連遺伝子群の発現状態をGSEA解析により検討した。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">  </div> <p>図2：2種類の膵臓癌細胞株を用いて、Xをノックダウンした際のMXD4及びCASTOR2との発現レベルを比較した。両遺伝子共に、遺伝子Xノックダウン時に発現が上昇した</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">  </div> <p>図3：TCGAの膵臓癌データベースを用いて、遺伝子XとMXD4及びCASTOR2との発現レベルを比較した。両遺伝子共に、遺伝子Xとは逆相関の関係にあることが示された</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	投稿準備中
	【学会発表】	Tange S et al. Identification of novel prognosticator in malignant pancreatic cancer 第80回日本癌学会学術総会 2021年9月30日～10月2日、横浜
	【その他特筆事項】	

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞のストレス耐性を制御する miRNA の機構解明
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学・統合生命科学研究科・助教・高橋 治子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	広島大学・統合生命科学研究科・教授・菊池 裕
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	<p>本研究では、転写後調節因子の1つであり、腫瘍形成において大きな役割を果たすことが知られている microRNA(miRNA)に着目し、がん幹細胞(cancer stem-like cells: CSCs)の幹細胞性や治療抵抗性の獲得・維持に関わる miRNA の探索とその機構解明、及び新規治療戦略への応用を最終目的とする。特に、人工がん幹細胞株から同定した CSCs で特異的な発現の変化が見られる miRNA のうち、機能未知である4つの miRNA について、CSCs における機能を解明するため、人工がん幹細胞株・患者由来の乳がん幹細胞様細胞(BCSC)を用いて解析を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでの検討で、梁らにより乳腺上皮細胞株 MCF-10A ヘリプログラミング因子(OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc)を導入して樹立された人工がん幹細胞株 iCSCL-10A[<i>Oncogene</i>, 33, 643 (2014); <i>Oncotarget</i>, 5, 8665 (2014)]で、MCF-10A 細胞に比べて有意に変動している miRNA を探索したところ、CSCs における詳細な機能が明らかとなっていない4つの miRNA を含む、計21の変動 miRNA を同定した。機能未知の4つの miRNA について、公開データベース(miRDB, TargetScanHuman, miRTarBase, miRmap)を用いて標的遺伝子予測解析を行った結果、各々の miRNA について、約30~300個の遺伝子がターゲット候補として予測された。</p> <p>予測されたターゲット候補遺伝子のうち、CSCs の幹細胞性や治療抵抗性の獲得・維持に関わる機能を持つ遺伝子を探索したところ、CSCs で特異的に発現量が低い miRNA のターゲット候補遺伝子として、脱ユビキチン化酵素 USP45(Ubiquitin Specific Peptidase 45)を見出した。この USP45 は、DNA 除去修復タンパク質 ERCC-1 (excision repair cross-complementing 1)を脱ユビキチン化する。USP45 を介した ERCC-1 による DNA 修復機構(ヌクレオチド除去修復: NER)は、シスプラチンなどの抗がん薬による DNA 損傷を修復することが知られていることから、CSCs における薬剤抵抗性に寄与している可能性が示唆された。</p> <p>RT-qPCR 法で USP45 の発現量を検討したところ、iCSCL-10A では MCF-10A に比べ有意に発現が高かった(図1A)。さらに、ウェスタンブロッティング法により USP45 がユビキチンレベルを調節する ERCC-1 のタンパク質発現量も有意に高いことを確認した(図1B)。iCSCL-10A はシスプラチンなどの抗がん剤に対して、乳がん細胞株に比べて耐性が高く、本研究で見出した機構は、がん幹細胞における抗がん薬や放射線治療による DNA 損傷に対して高い修復能を獲得・維持するシステムの一部であることが考えられる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

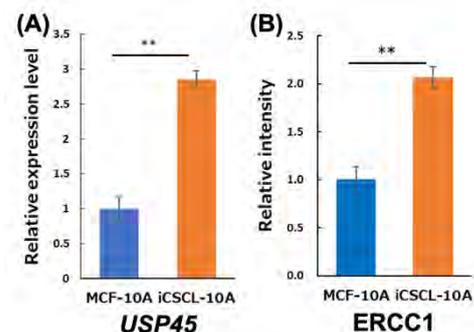


図1. iCSCL-10A 細胞, MCF-10A 細胞における USP45 および ERCC1 の発現量, ** $p < 0.01$

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		頭頸部癌における浸潤・転移の分子機構の解明と克服
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 特定病院助教 河合良隆
研究分担者 (適宜、行を追加 してください。)	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授 大森孝一
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院 がんセンター 医員 鈴木千晶
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科 教授 矢野聖二
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野聖二
【研究目的】 .300字内	<p>再発・転移性頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は根治的治療が困難で予後不良である。HNSCCの多くにEGFRの遺伝子増幅と高発現がみられ、予後に関連すること示されているが、EGFRを標的とした治療に反応をするのは約10%程度と非常に少ない。また、現在まで有効なドライバー経路は同定されておらず、更なる治療成績向上のために新規治療を開発する必要がある。本研究は、局所浸潤や転移を形成しないマウス口腔癌扁平上皮癌細胞株から樹立した高率にリンパ節転移・肺転移を生じる細胞株における変化を比較検討することで、頭頸部癌における浸潤・転移の分子機構を検討し、新規治療方法の開発を行うことを目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。) 1000字以内	<p>頭頸部癌における転移現象を再現した頭頸部癌自然転移モデルを作成し、頭頸部癌の転移メカニズムを検討した。まず、マウス頭頸部扁平上皮癌細胞 Sq-1979 の皮下移植モデルから高転移能をもつ細胞株 SS2 を樹立した。SS2 は親株である Sq-1979 よりも高い生着・増殖能があり、高率にリンパ節転移・肺転移を生じることを確認した。</p> <p>二次元培養下で細胞運動を撮影し、トラッキング解析を行ったところ SS2 は Sq-1979 よりも有意に高い運動能を獲得していた。また、三次元培養環境下で SS2 は Sq-1979 では認めない非足場依存性の増殖能を獲得していることを確認した。EGFR リガンドである EGF、AREG 刺激下では Sq-1979 でも非足場依存性増殖能を獲得することを確認した。EGFR 阻害薬存在下では SS2 は二次元培養・三次元培養ともに増殖抑制を認めたが、特に三次元培養下においてより低濃度から増殖抑制を示した。また、EGFR 阻害剤エルロチニブ存在下での二次元培養では SS2 の運動能低下が認められた。以上のことから転移能に関与すると判断される足場非依存性増殖には EGFR 刺激が重要であると判明した。</p> <p>マイクロアレイ解析ではシグナル変化を示すパスウェイ変化は認めなかったが、SS2 において Sq-1979 よりもサイトカインを含む細胞外因子に関与する遺伝子発現を多く認めた。サイトカイン抗体アレイにて SS2 では Sq-1979 よりも AREG、可溶性 AXL の発現が上昇していた。また、vivo における腫瘍から抽出したタンパクにおいて、SS2 は Sq-1979 に比べて EGFR の発現亢進を示した。以上から SS2 はオートクリン作用で EGFR を活性化し、運動能・足場非依存的増殖能を獲得している可能性があると考えた。続いて、二次元培養下で EGFR 阻害薬である Erlotinib 添加後のシグナル変化を確認すると、Sq-1979・SS2 ともに経時的に EGFR・MET・Her3 の再活性化が認められた。そこで、SS2 において EGFR/Her3 の阻害作用を有する Afatinib に MET 阻害薬を併用すると著明な増殖抑制が生じることが判明し、今後の有望な治療につながるかと判断した。</p> <p>上記結果から、今後は、ヒト細胞においても同様の結果が生じるか検討予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肺がんの患者由来腫瘍オルガノイドおよびPDXの作成
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・准教授・松本 勲
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・助教・吉田 周平
	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・助教・齋藤 大輔
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・助教・小谷 浩
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>近年、患者由来腫瘍を免疫不全マウスに直接移植する patient derived xenograft (PDX)モデルやマトリゲル内で増殖させ樹立するオルガノイドなどのヒトがん組織を忠実に再現する実験モデルが注目されており、個々の患者のがん組織を in vitro や実験動物レベルで再現するモデルとして、がん研究に必要不可欠となってきた。</p> <p>金沢大学附属病院呼吸器外科では、がん進展制御研究所腫瘍内科の矢野教授との共同研究として、呼吸器外科が肺がん患者の切除組織を提供し腫瘍内科が PDX を作成するプロジェクトをがん進展制御研究所の共同研究課題として平成 29 年度から令和元年度に実施し、論文発表を行った。本課題は、さらにオルガノイドモデルの確立も行い、オルガノイドや PDX モデルで増大した腫瘍の凍結保存と臨床情報のデータベース化を強化し、将来の共同研究基盤を強固にすることを目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>術後病理診断に影響を及ぼさずかつ術前治療歴のない比較的大きい肺がん原発巣に対して外科的切除された肺がん 3 例の腫瘍組織を用いてオルガノイドの作成を試みた結果、3 例ともオルガノイドの作成に成功した (100%)。少数例ながら、腺癌、多型癌、小細胞癌と組織型によらず効率的かつ簡便なオルガノイド作成手順が確立された (手順図)。</p> <p>今後は、オルガノイドの凍結を経た融解後の再増大率の評価、実験用に簡便な 2 次元培養細胞株化への試み、免疫不全マウスへの移植生着率の評価、遺伝子異常の評価、臨床情報と照合したデータベース化などを行い、外部施設との共同研究に供与可能な肺がんのオルガノイドおよび PDX モデルとして確立する。引き続き適宜症例を蓄積し、計 20 例を目標とする。</p> <p>また、本研究手法から着想を得て、肺がん患者 1 例に対する CT ガイド下肺生検による微小検体由来の肺がんオルガノイド作成にも成功している。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	<ol style="list-style-type: none"> Sato S, Tanimoto A, Yanagimura N, Suzuki C, Takumi Y, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Ohtsubo K, Makino T, Yoshida Y, Hirono Y, Hayashi R, Koizumi T, Nakazawa Y, Ito K, Motoo Y, Uramoto H, Nakada M, Nishino Y, Yano S. Multi-institutional survey of cancer disparities in disabled patients in the region of northwestern Japan. Int J Clin Oncol, 2021;26:1009-14. Uramoto H, Nishino Y, Koizumi T, Tanimoto A, Hayashi R, Nakazawa Y, Ito K, Mitsutoshi Nakada M, Shiozawa T, Yoshio Y, Yano S. Multi-institutional survey of thymic carcinoma patients in Hokushin region. J Cancer Res Clin Oncol, 2021 May 8. doi: 10.1007/s00432-021- 	

03620-8.

3. Uramoto H, Takiguchi T, Koizumi T, Tanimoto A, Hayashi R, Nakazawa Y, Ito K, Nakada M, Hirono Y, Nishino Y, **Yano S**. Multi-institutional survey of malignant pleural mesothelioma patients in the Hokushin region. **J Cancer Res Clin Oncol**. 2021 Jun 29. doi: 10.1007/s00432-021-03699-z. Online ahead of prints.

【学会発表】

【その他特筆事項】

R3年度は、コロナ禍による手術制限や研究実施用計画書・同意説明文書の改訂があったため、次年度以降も本研究課題の継続が必要である。

研究課題		2光子励起顕微鏡を用いた膵癌細胞の血行性肝転移と加齢との関連の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	香川大学・助教・武藤麻理子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	香川大学・教授・松田 陽子
	所属・職名・氏名	香川大学・技術職員・山川 けいこ
	所属・職名・氏名	香川大学・研究生・葉 娟娟
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>Protease-activated receptor 1 (PAR1) は、血小板のトロンビン受容体として同定され、Gタンパク質と共役した膜タンパク質である。血小板の止血、血栓形成、及び血管内皮の透過性、緊張や接着に関与している。近年、PAR1 が癌の血行性転移において重要であることが報告され、PAR1 を標的とした転移抑制の可能性に期待が集まっている。しかし、PAR1 阻害による転移制御の機序や、血管の加齢性変化との関連は明らかでない。そこで本研究では、若年と高齢の PAR1 ノックアウトマウスにおける転移巣の血管新生を評価した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>方法：PAR1 ノックアウトマウス、オス、10 週齢と 80 週齢 (N=3-4) に 1x10⁶ cells/mouse のマウス膵癌培養細胞株 (KPC cells, GFP 遺伝子導入) を脾臓内移植した。2 週後に肝臓の転移巣、及び非腫瘍部について、二光子励起顕微鏡 (Olympus, FV1000MPE) で観察した。観察時に Dextran をマウスに静脈注射し、血管を標識し、血管構築について三次元タイムラプス画像を取得した。得られた画像について、Metamorph を使い、血管の長さ、面積、分岐、結節形成数について評価した。</p> <p>結果：非腫瘍部の血管の長さは、若年マウスに比べ、高齢マウスで短縮し、PAR1 ノックアウトマウスにおいて有意であった (P<0.0001, 図 1)。腫瘍部の血管の長さは、非腫瘍部と比べるといずれの群でも短かったが、群間における差異は認めなかった。血管の面積や分岐の評価でも、同様の結果が得られた。</p> <p>血管が形成する結節を評価したところ、若年マウスでは非腫瘍部と腫瘍部に有意差を認めなかった。しかし、高齢マウスでは、非腫瘍部で結節数の著明な減</p>	

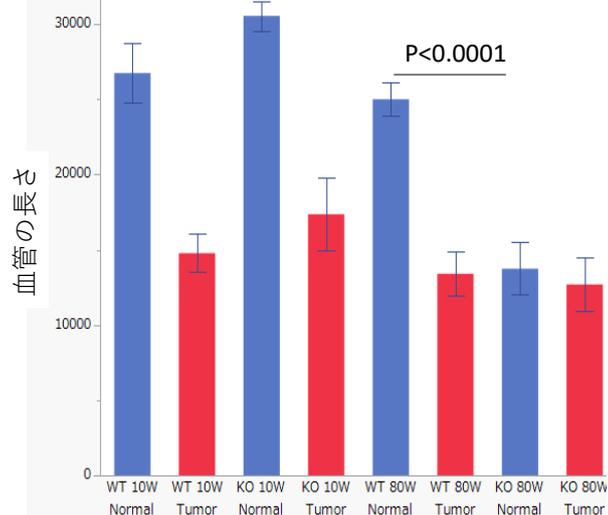


図1. 若年、高齢PAR1ノックアウトマウスにおける肝臓の非腫瘍部、腫瘍部の血管の長さ

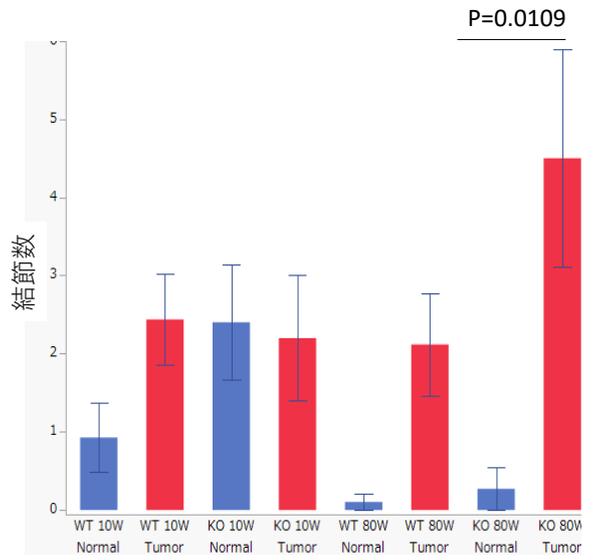


図2. 若年、高齢PAR1ノックアウトマウスにおける肝臓の非腫瘍部、腫瘍部の血管結節数

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>少を認めた (図2)。腫瘍部の血管結節数は高齢の PAR1 ノックアウトマウスにおいてのみ、著明に増加した (P=0.0109)。</p> <p>考察：PAR1 ノックアウトマウスにおける肝転移巣の新生血管形成には加齢性変化の影響が極めて大きいことが明らかとなった。今後、病理切片を用いた血管の形態の違いの解析、二光子励起顕微鏡画像における腫瘍細胞の動態の違いを明らかにし、その機序の解明を目指す。</p>
【成 果 等】	<p>【主な論文発表】 なし</p>
	<p>【学会発表】 なし</p>
	<p>【その他特筆事項】 なし</p>

研究課題		がん細胞における受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・助教・周 越
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井 宏明
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>受容体型チロシンキナーゼ EphA2 は様々な腫瘍にて高発現し、がんの転移に関わる。当研究室では、これまでに炎症性サイトカインによって活性化した ERK の下流キナーゼ RSK が EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導し、がん細胞の遊走能を亢進させることを報告した。一方、がん微小環境では、炎症性サイトカインなどにより、ストレス応答キナーゼ p38 や MK2 が恒常的に活性化し、がんの遊走能を制御する。このように RSK-EphA2 経路もストレス応答キナーゼも細胞遊走に関わるが、その相互作用については解析されていない。そこで本研究では、ストレス応答キナーゼ p38 および MK2 による RSK-EphA2 の制御機構を解明し、細胞遊走への寄与を検討した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対し、p38-MK2 経路の活性化を誘導するタンパク質合成阻害剤アニソマインや白金製剤シスプラチンを作用させたところ、EphA2 のリン酸化が誘導された。このリン酸化は p38 阻害剤および MK2 阻害剤によって抑制された。様々な ALK 陽性肺癌細胞株において、恒常的な EphA2 のリン酸化が認められている。興味深いことに、MK2 阻害剤は、恒常的な EphA2 のリン酸化をも抑制した。以上の結果により、p38-MK2 経路は EphA2 のリン酸化を制御することがわかった。次に、EphA2 のリン酸化を制御する RSK について着目した。アニソマインによって誘導される RSK のリン酸化は p38 阻害剤および MK2 阻害剤によって抑制された。また、インビトロキナーゼアッセイにより、MK2 は RSK のリン酸化を直接触媒することがわかった。RSK は分子内に2つのキナーゼドメインを有する。ERK は RSK の C 末端に結合し、2つのキナーゼドメインを制御する。驚くべきことに、MK2 は ERK とは異なり、1つのキナーゼドメインのみを制御することがわかった。最後に、p38-MK2-RSK2-EphA2 経路の機能を解析するために、ヒト神経膠芽腫細胞 U87-MG を用いて、その細胞遊走能を検討した。当研究室では、以前に U87-MG 細胞に対してアルキル化剤テモゾロミドを作用させると、p38 を介して細胞遊走能が亢進することを報告している。EphA2 に対する siRNA や MK2 阻害剤により、テモゾロミド依存的な細胞遊走は抑制された。このことから、p38-MK2-RSK2-EphA2 経路は、細胞遊走を制御することがわかった。今後は、MK2 を介した恒常的な EphA2 のリン酸化制御機能の解明を行う予定である。</p>	
	<p>図. EphA2 Ser-897リン酸化の制御機構</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 周越、大木良太、田中章裕、横山悟、櫻井宏明. MK2 を介した非定型的 RSK-EphA2 経路の制御機構. 日本薬学会. 第 142 年会 (2022 年 3 月 25-28 日、オンライン) 周越、大木良太、田中章裕、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明. ストレス応答キナーゼ p38 と MK2 は RSK-EphA2 経路の活性化を誘導することで細胞遊走を促進する. 第 30 回日本がん転移学会学術集会・総会 (2021 年 7 月 29, 30 日、オンライン) 周越、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明. RSK-EphA2 経路の活性化におけるストレスキナーゼ p38 と MK2 の役割. 第 25 回日本がん分子標的治療学会 (2021 年 5 月 26-28 日、オンライン)
	【その他特筆事項】	なし

令和3年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持機構に関する新規因子の探索研究
研究代表者	所属・職名・氏名	岐阜薬科大学・教授・檜井栄一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	悪性脳腫瘍の膠芽腫 (GBM) は、あらゆるがんの中でも最も予後不良の難治性がんである。近年、グリオーマ幹細胞 (GSC) などの微量の治療抵抗性細胞群が GBM の悪性化進展に関与することが報告されている。私たちは、E3 ユビキチンリガーゼ SMURF2 のリン酸化修飾 (SMURF2 ^{Thr249}) が間葉系幹細胞の幹細胞性維持に重要であることを見出ししている。本研究では、がん幹細胞の SMURF2 のリン酸化修飾 (SMURF2 ^{Thr249}) が、グリオーマに対する新規創薬標的となる可能性を検討するため、細胞・モデル動物を用いて SMURF2 リン酸化修飾による GSC の幹細胞性制御機構の解明を試みた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	まず最初に、GSC 幹細胞性における SMURF2 ^{Thr249} リン酸化修飾の影響を <i>in vitro</i> で検討した。249 番目の Thr を Ala に置換したリン酸化不活性化体 (SMURF2 ^{T249A}) を作製し、GBM 患者由来 GSC に導入した。その結果、SMURF2 ^{T249A} 導入群では、スフィア形成能と自己複製能が有意に増強した一方で、野生型 SMURF2 (SMURF2 ^{WT}) 導入群では有意に減弱した。さらに、幹細胞マーカーである SOX2 と SOX4 の発現量は SMURF2 ^{T249A} 導入群で有意に上昇し、SMURF2 ^{WT} 導入群では有意に減少した。次に、GSC の腫瘍形成能における SMURF2 ^{Thr249} リン酸化修飾の影響を <i>in vivo</i> で検討した。GBM モデルマウスの生存期間は、SMURF2 ^{T249A} 導入群で著明に短縮した一方で、SMURF2 ^{WT} 導入群では著明に延長した。さらに、SMURF2 ^{T249A} 導入群では、コントロール群に比べて腫瘍体積の増大が確認され、SMURF2 ^{WT} 導入群では減少が確認された。すなわち SMURF2 ^{Thr249} のリン酸化修飾は、GSC の自己複製能と腫瘍形成能の制御に重要な役割を果たす可能性が示唆された。TGF-β/SMAD 経路は、GSC の幹細胞性と腫瘍形成能の制御に重要なシグナル経路であることが報告されていることから、次に GSC における SMURF2 ^{Thr249} のリン酸化修飾が、同経路を調節するか検討した。TGFBR1 と TGFBR2 のタンパク質発現量と SMAD2/3 のリン酸化は SMURF2 ^{T249A} 導入群で有意に増加し、SMURF2 ^{WT} 導入群では減少した。以上の結果から、SMURF2 ^{Thr249} のリン酸化修飾が、TGF-β/SMAD 経路の調節を介して、GSC の幹細胞性と腫瘍形成能を制御することが示唆された。本研究成果は、がん幹細胞の幹細胞性・腫瘍形成能の制御機構に対する包括的な理解を促し、GBM だけでなく TGF-β シグナル異常を伴う様々ながん種においても SMURF2 ^{Thr249} のリン酸化修飾が新規創薬標的となる可能性を示唆するものである。本共同研究成果は、2022 年 1 月に <i>Communications Biology</i> 誌に発表した。	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Hiraiwa M., Fukasawa K., Iezaki T., Sabit H., Horie T., Tokumura K., Iwahashi S., Murata M., Kobayashi M., Suzuki A., Park G., Kaneda K., Todo T., <u>Hirao A.</u>, Nakada M., <u>Hinoi E.</u>: SMURF2 phosphorylation at Thr249 modifies glioma stemness and tumorigenicity by regulating TGF-β receptor stability. <i>Commun. Biol.</i> 5(1)22. 2022.</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		インターロイキン11産生癌関連間質細胞による大腸癌形成促進機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東邦大学・助教・仁科隆史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東邦大学・教授・中野裕康
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>代表者は、新規に樹立したレポーターマウスを用いた予備的研究から、大腸癌増悪に働くサイトカインインターロイキン(IL)-11が癌細胞ではなく、その周囲に存在する間質線維芽細胞で特異的に産生されていることを見出した(Nishina et al, <i>Nat commun</i>, 2021)。本研究では、いまだ不明な癌関連間質細胞の腫瘍形成促進機構を明らかにするために、IL-11産生癌関連間質細胞の特性を明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的としている。</p> <p>特に本共同研究においては、腫瘍オルガノイドを用いて腫瘍転移時に認められる癌関連間質細胞の特性を明らかにすることを研究目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究は、IL-11を産生する癌関連間質細胞(IL-11 producing cancer-associated fibroblasts; 11CAFs)の特性を見出し、それをもとに新たな治療標的の同定を目指し、以下の項目に着目し研究を遂行した。</p> <p>① IL-11産生癌関連線維芽細胞の特徴の解明</p> <p>大腸癌マウスモデルを用いて、腫瘍形成に関わるIL-11産生細胞の同定を試みた。具体的には、IL-11遺伝子プロモーター下流で蛍光タンパク質EGFPを発現するように遺伝子組換えを行ったマウスを用いて、大腸癌モデルマウスを作製した。</p> <p>大腸癌モデルマウスとして、癌オルガノイドを用いた、癌移植モデルマウスを作製し解析を行った。前年度までに直腸への同所移植によるモデルマウスを用いた解析からIL-11産生細胞がVimentin陽性の線維芽細胞であることを見出していた。本年度はさらに、ヒトで多く認められる肝転移モデルを作製し解析を行った。その結果、肝臓に転移が認められたマウスにおいては、腫瘍周辺に一部EGFP陽性細胞が出現することがわかった(図1)。現在、この細胞の特徴づけを進めている。</p> <p>② IL-11産生癌関連線維芽細胞の特性の解明</p> <p>11CAFsはIL-11を介して腫瘍形成促進に寄与していることが考えられるが、11CAFsで特異的に発現する遺伝子を解析した結果、11CAFsは細胞増殖や管腔形成を制御に関わる多くの特徴的な分子を産生していることが明らかとなった。そこで、レポーターマウスを用いて同定した11CAFsで特異的に産生される分子を再解析し、大腸がん患者の予後の悪さと相関を示す分子を抽出した。現在、この抽出した分子の癌形成への役割を明らかにするために、癌オルガノイドを用いたin vitroおよびin vivoでスクリーニング系の確立を試みている。これらの解析を発展させることで、大腸癌治療における新たな治療標的分子の同定を目指す。</p>	

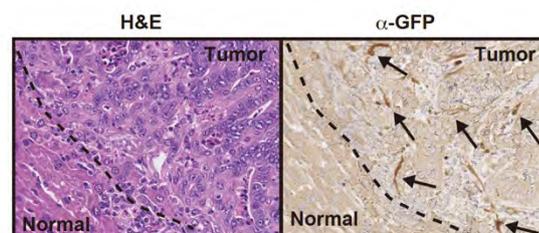
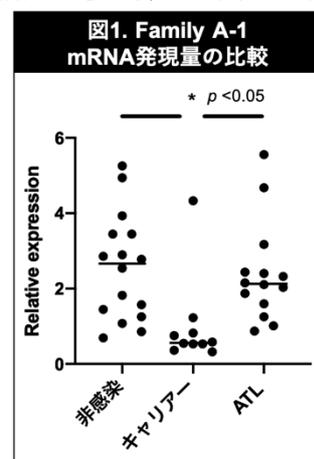


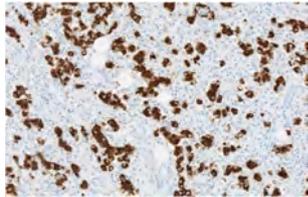
図1 癌オルガノイドを用いた肝転移モデルマウスにおいて転移腫瘍間質にIL-11産生細胞が認められた。矢印先端は、IL-11産生細胞(EGFP陽性細胞)を示す。

<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <p>(英文原著論文) 特になし。 現在、代表者が筆頭、責任著者の論文が一つ、共著の論文が一つ、under revision である。</p> <p>(総説) 1. <u>仁科 隆史</u> 「大腸の恒常性ならびに癌形成を制御する繊維芽細胞」『臨床免疫・アレルギー科』科学評論社、第77巻2号、pp121-pp130、2022</p>
	<p>【学会発表】</p> <p>(招待口演) 1. <u>仁科 隆史</u>、間質線維芽細胞を介した大腸恒常性維持機構の解明、横浜市立大学 発生制御科学特論I、2022年3月 2. <u>仁科 隆史</u>、Interleukin-11 産生間質細胞を介した大腸がん形成機構の解明、お茶の水がん学アカデミア第170回集会、2021年9月 3. <u>仁科 隆史</u>、いつもいるけど、君は誰？-間質細胞を介した腸管恒常性維持機構-、The 65th Scienc-ome、2021年9月</p> <p>(学会発表) 1. <u>仁科 隆史</u>、Interleukin-11 産生間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明、令和3年度がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、2022年2月 2. <u>Takashi Nishina</u>, <u>Hiroyasu Nakano</u>、Interleukin-11-producing fibroblasts promotes the development of colorectal cancer、Cytokine 2021、2021年10月 3. <u>Takashi Nishina</u>, Deguchi Yutaka, Wakami Takeda, Satoshi Ueha, Yuko Kojima, Mizuho Nakayama, <u>Masanobu Oshima</u>, Hideo Yagita, Tetsuo Mikami, Kouji Matsushima, <u>Hiroyasu Nakano</u>、Interleukin-11-expressing fibroblasts control a feed-forward loop in the tumor microenvironment、The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association、2021年10月 4. <u>仁科 隆史</u>、インターロイキン11産生癌関連間質細胞による大腸癌関連間質細胞による大腸癌形成促進機構の解明、2021年度若手支援技術講習会、2021年9月 5. <u>仁科 隆史</u>、Interleukin-11 産生がん関連間質細胞は、大腸がん形成を制御し、大腸がん予後に関与する、令和3年度AMED-CREST/PRIME 適応・修復領域 若手主体の会、2021年8月</p>
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>(受賞) 1. <u>Takashi Nishina</u>、International Cytokine and Interferon Society Milstein Travel Award、Cytokine 2021 2. <u>Takashi Nishina</u>、Best iPoster、Cytokine 2021</p>

研究課題		HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍化に寄与するエピゲノム変異の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	川崎医科大学・助教・和田雄治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	川崎医科大学・教授・齊藤峰輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	成人 T 細胞白血病 (adult T cell leukemia: ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) の感染により惹起される予後不良の T 細胞性白血病・リンパ腫であり、その発病機序や病態進行速度を規定する要因は未だ完全には解明されていない。近年のエピゲノム研究の発展により、がん関連遺伝子のエピジェネティックな制御異常が発がんの要因となる等、発がんのエピゲノム修飾異常の関連性が指摘されている。本研究では ATL の病態解明を志し、HTLV-1 感染により引き起こされる特徴的なエピゲノム修飾の変化を探索した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究では、ATL モデルマウスとして確立されている HTLV-1 bZIP factor (HBZ) トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) を活用し、HBZ-Tg 由来 Foxp3 陽性 T 細胞の遺伝子発現動態の解析を計画した。2021 年度迄に実施した研究活動において、様々な週齢の HBZ-Tg 由来脾臓細胞の採取・保存が完了しており、解析に向けた検体の準備は順調に進行している。しかしながら、当初の研究計画では細胞内染色法及びフローサイトメトリー法により Foxp3 陽性 T 細胞を分離する予定であったが、申請者のこれまでの研究活動より、細胞内染色法を実施する際の膜透過処理により細胞内 RNA が質的及び量的影響を受け、遺伝子発現動態の解析が困難となる可能性が示唆された。以上の事から、「ATL の病態形成に寄与するエピゲノム修飾を明らかにする」という研究目的を維持したまま、採材した HBZ-Tg 検体を活用できる新たな研究方針を模索した。</p> <p>本研究室のこれまでの研究活動及び令和 2 年度金沢大学がん進展制御研究所共同研究課題:【ATL 発症に関与し新規治療標的となるエピゲノム異常関連長鎖 非コード RNA の同定と解析】より、ATL 患者で一連のタンパク質群 (Family A) の遺伝子発現量が特徴的に制御される事が見出された。上記知見を本研究に活用できないか検討する為に、より詳細な解析を実施した。その結果、Family A の遺伝子発現はプロモーター領域 CpG 配列のメチル化動態により制御される事が示唆された。また、ある種の Family A タンパク質 (Family A-1) では遺伝子発現動態が ATL の病態進行と関連してダイナミックに制御される事が明らかとなった (図 1)。</p> <p>以上の研究成果より、エピジェネティックな機序により遺伝子発現が制御され、且つ ATL の病態形成に寄与する可能性がある新たな解析候補因子として Family A を見出すことに成功した。本研究活動により採材した HBZ-Tg 検体を活用し Family A の発現動態及び発がんに果たす役割を探索する事により、エピゲノムと発がんの関連性を示す新たな知見を獲得し、ATL の病態解明に大きく貢献する事が期待される。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	1) HTLV-1 感染細胞株における ALKBH3 発現動態の解析 (口頭発表) 発表者: 和田雄治、第 7 回日本 HTLV-1 学会、2021 年 11 月、熊本 2) HTLV-1 感染特異的に発現制御される長鎖ノンコーディング RNA の解析 (ポスター発表) 発表者: 和田雄治、第 68 回日本ウイルス学会学術集会、2021 年 11 月、神戸
	【その他特筆事項】	



	研究課題	抗がん剤耐性胃癌オルガノイドを用いた新規治療標的の探索																																
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 先端医療開発センター 臨床腫瘍病理分野・ユニット長・坂本直也																																
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 先端医療開発センター・センター長・落合淳志																																
	所属・職名・氏名																																	
	所属・職名・氏名																																	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦																																
【研究目的】	<p>消化管がんは日本の癌死亡者数の上位を占めており、その克服は急務である。治療抵抗性の獲得に重要な役割を果たす癌幹細胞の制御機構を理解することが、その克服を目指す上で重要である。近年オルガノイドと呼ばれる幹細胞を中心とした <i>in vitro</i> での三次元培養法が確立され、癌研究領域で積極的に利用されている。</p> <p>申請者はこれまでに胃癌、大腸癌患者由来の組織から癌オルガノイドを樹立し、<i>in vitro</i> で 5-FU、オキサリプラチン耐性を獲得させることに成功し、3株ずつの親株と耐性株の癌オルガノイドを材料とした遺伝子発現プロファイルを取得し、解析を完了している。本研究では、5-FU およびオキサリプラチン耐性胃癌および大腸癌オルガノイドに特異的に発現する分子を同定し、新規治療標的としての妥当性を検証するとともに、同定された分子の癌幹細胞における分子生物学的な機能を明らかにすることを目的とした。</p>																																	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1)抗がん剤耐性消化管がんオルガノイドの発現 profile の検討、解析対象の抽出</p> <p>申請者はこれまでに3株の患者由来胃癌および大腸癌オルガノイドから、5-FU、オキサリプラチン耐性株の樹立に成功しており、3株の親株、耐性株および正常部粘膜由来オルガノイドを材料に RNA シークエンス、microarray 解析を行った。プロファイルの解析を行い、耐性獲得消化管癌オルガノイドで有意に発現亢進している遺伝子群を抽出した。中でもいずれの解析でも発現の有意な亢進が見られた Peptidase Inhibitor 3 (PI3) に注目した。胃癌オルガノイド3例の親株、5-FU/オキサリプラチン(L-OHP)耐性株間での発現を比較したところ、3株いずれも抗がん剤耐性株では PI3 の有意な発現亢進が認められた。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="391 1702 726 2060"> <p>Microarray Upregulated Genes in Resistant GCOs</p> <p>5-FU: 628, L-OHP: 366 Overlap: 23</p> <p>Protein Coding Genes</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>Gene</th> <th>Fold Change (5-FU)</th> <th>Fold Change (L-OHP)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>PI3</td><td>3.17</td><td>3.75</td></tr> <tr><td>2</td><td>SERPINB8</td><td>2.05</td><td>1.91</td></tr> <tr><td>3</td><td>PRR16</td><td>1.63</td><td>1.72</td></tr> <tr><td>4</td><td>LAMC2</td><td>1.69</td><td>1.51</td></tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="742 1702 997 2060"> <p>RNA-seq Upregulated Genes in 5-FU-R GCOs</p> <p>5-FU: 18</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Rank</th> <th>Gene</th> <th>q-value (5-FU)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td>ROBO1</td><td>7.05E-10</td></tr> <tr><td>14</td><td>TEX19</td><td>0.032</td></tr> <tr><td>15</td><td>PI3</td><td>0.032</td></tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="1013 1702 1268 2060"> <p>Microarray 5-FU, L-OHP</p> <p>5-FU RNA-seq</p> <p>PI3</p> </div> <div data-bbox="1284 1702 1524 2060"> <p>PI3 : qRT-PCR validation</p> <p>5-FU-Resistant GCOs</p> <p>L-OHP-Resistant GCOs</p> </div> </div>		Rank	Gene	Fold Change (5-FU)	Fold Change (L-OHP)	1	PI3	3.17	3.75	2	SERPINB8	2.05	1.91	3	PRR16	1.63	1.72	4	LAMC2	1.69	1.51	Rank	Gene	q-value (5-FU)	1	ROBO1	7.05E-10	14	TEX19	0.032	15	PI3	0.032
Rank	Gene	Fold Change (5-FU)	Fold Change (L-OHP)																															
1	PI3	3.17	3.75																															
2	SERPINB8	2.05	1.91																															
3	PRR16	1.63	1.72																															
4	LAMC2	1.69	1.51																															
Rank	Gene	q-value (5-FU)																																
1	ROBO1	7.05E-10																																
14	TEX19	0.032																																
15	PI3	0.032																																

	<p>2)解析対象分子のマーカーとしての治療標的としての有用性、細胞生物学的な検討</p> <p>現在PI3の免疫染色を胃がん症例で検討している。PI3はserine proteaseに阻害作用を有しており、文献的には細胞質に局在しているとされている。報告の通り、細胞質への染色性を確認できており、現在200例の胃がん症例における染色を行っている。今後は臨床病理学的因子や予後、抗癌化学療法の効果等との相関に関して、検討を行う予定である。</p> 
<p>【成果等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Harada K, Sakamoto N, Ukai S, Yamamoto Y, Pham QT, Taniyama D, Honma R, Maruyama R, Takashima T, Ota H, Takemoto Y, Tanabe K, Ohdan H, Yasui W. Establishment of oxaliplatin-resistant gastric cancer organoids: importance of myoferlin in the acquisition of oxaliplatin resistance. <i>Gastric Cancer</i>. 2021;24(6):1264-1277. 2. Takashima T, Taniyama D, Sakamoto N, Yasumoto M, Asai R, Hattori T, Honma R, Thang PQ, Ukai S, Maruyama R, Harada K, Kuraoka K, Tanabe K, Sasaki AT, Ohdan H, Morii E, Murai J, Yasui W. Schlafen 11 predicts response to platinum-based chemotherapy in gastric cancers. <i>Br J Cancer</i>. 2021 125(1):65-77. <p>【学会発表】</p> <p>国際学会発表（全て査読あり）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kenji Harada, Naoya Sakamoto, Shoichi Ukai, Daiki Taniyama, Ryota Maruyama, Tsuyoshi Takashima, Kazuaki Tanabe, Hideki Ohdan, Wataru Yasui: The key function of Myoferlin in L-OHP-resistant gastric cancer organoid. The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, Gifu (Japan), Nov 26-27, 2021 2. Kenji Harada, Naoya Sakamoto, Shoichi Ukai, Tsuyoshi Takashima, Ryota Maruyama, Daiki Taniyama, Kazuaki Tanabe, Hideki Ohdan, Wataru Yasui: Identification of MYOF as a novel biomarker by using oxaliplatin-resistant gastric cancer organoid model. Annual meeting of American Association for Cancer Research 2022. New Orleans (USA), April 8-13, 2022 <p>国内学会発表（全て査読あり）</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 原田健司、坂本直也、鶴飼翔一、高島剛志、丸山諒太、谷山大樹、田邊和昭、仙谷和弘、大上直秀、安井 弥：オキサリプラチン耐性胃がんオルガノイドにおけるMYOFの機能解析。第110回日本病理学会総会、東京+WEB配信、2021年4月22-24日 2. Kenji Harada, Naoya Sakamoto, Shoichi Ukai, Daiki Taniyama, Ryota Maruyama, Tsuyoshi Takashima, Kazuaki Tanabe, Hideki Ohdan, Wataru Yasui: Identification of novel biomarker Myoferlin, by dissecting oxaliplatin-resistant gastric cancer organoid. The 93rd Annual Meeting of Japanese Tissue Culture Association, 広島, 2021年9月2-3日 3. 原田健司、坂本直也、鶴飼翔一、Quoc Thang Pham、谷山大樹、本間りりの、丸山諒太、高島剛志、田邊和照、大段秀樹、安井 弥：L-OHP耐性胃癌オルガノイドにおけるmyoferlinの重要性。第80回日本癌学会学術総会、横浜+WEB配信、2021年9月30日-10月2日 4. 原田健司、坂本直也、鶴飼翔一、Quoc Thang Pham、谷山大樹、本間りりの、丸山諒太、高島剛志、田邊和照、大段秀樹、安井 弥：Investigation on the role of MYOF in oxaliplatin-resistant gastric cancer organoids. 第94回胃癌学会総会、横浜+WEB開催、2022年3月2-4日 <p>【その他特筆事項】</p>