

金沢大学がん研究所

年報 2009 年

金沢大学がん研究所

はじめに

金沢大学がん研究所は、文部科学省唯一のがん研究所として、昭和42年に臨床研究部門を含む8研究部門制で設立され、その後順次整備を行い、10部門制となりました。平成9年度に3大部門制に拡大改組するとともに、新規抗がん治療法などの開発を目指す“分子標的薬剤開発センター”を設置しました。この間、がん研究所では、がん転移に関わるタンパク分解酵素の発見、がんの病態成立に密接に関与しているケモカイン・アポトーシス・血管新生因子の機能解明を始めとした基礎研究に大きな成果を挙げるとともに、新規の抗がん剤の開発にも力を注いできました。

我が国のがん基本対策法に謳われているように、がん研究においては基礎研究の成果を診断・治療法の開発に結びつける努力が、近年強く求められています。がん研究所におきましては、このような社会的要請に応えるべく、がん診療において今日なお未解決な点が多い、「転移」「薬剤耐性」の克服を目指し、平成17年度から5年間文部科学省の特別教育研究経費（課題名：がん幹細胞医学の創出事業）の補助を受け、「転移」「薬剤耐性」に密接に関与している「がん幹細胞」の研究に取り組んできました。これらの取り組みの一環として、平成18年度に3大部門1センターから2大部門2センターへと改組し、「がん幹細胞研究センター」においては、「がん幹細胞」の実態解明を目指すとともに、「分子標的がん医療研究開発センター」においては「がん幹細胞研究センター」ならびに基盤研究部門と連携しつつ、先進的ながんの診断・治療法の開発を目指す体制を構築いたしました。

本年度に行いました、学外の有識者を含む将来構想委員会において、「転移」「薬剤耐性」の克服を目指す研究体制をさらに強固にすることが提言されました。この提言を踏まえ、さらには平成22年度より5年間の予定で文部科学省・特別経費（課題名：がんの細胞社会学の創出事業）の補助が内定していることも鑑み、がん研究所内の各研究分野の有機的な連携を保ちつつ、がん研究の進展に応じた機動的な組織再編を可能にするため、「がん幹細胞研究プログラム」「がん微小環境研究プログラム」「がん分子標的探索プログラム」「がん分子標的医療開発プログラム」の4つのプログラムからなる体制へと来年度初頭に改組することといたしました。

さらに、「転移」「薬剤耐性」の克服を目指した、学内ならびに学外の多くの研究グループとの共同研究を従来以上に推進するために、共同研究資源ならびに共同利用設備として、ヒトがん組織バンク・マウス発がんモデル組織バンク・ヒトがん細胞株バンク・前臨床実験施設・臨床治験施設を拡充・整備しているところです。

平成21年度の金沢大学がん研究所年報から、がん研究所が現在行っている、これらの取り組みの一端をご理解いただければ幸いに存じます。

金沢大学がん研究所長 向田直史

金沢大学がん研究所年報 2009年

目 次

ゲノム分子病態研究分野	1
シグナル伝達研究分野	4
細胞機能統御研究分野	7
分子生体応答研究分野	11
免疫炎症制御研究分野	16
遺伝子・染色体構築研究分野	19
腫瘍遺伝学研究分野	24
腫瘍分子生物学研究分野	28
腫瘍制御研究分野	32
機能ゲノミクス研究分野	38
腫瘍動態制御研究分野	41
腫瘍内科および腫瘍外科研究分野	46
細胞情報調節研究分野	55

ゲノム分子病態研究分野

<研究スタッフ>

教授	山本健一	大学院（修士）	赤池聰
助教	清水弘子		早部絢子
	林直之		望月めぐみ
	小林昌彦		森村容子
技能補佐員	武紀代子	学部4年	塩谷裕司

<研究室としての方向性>

高等動物のDNA損傷・複製異常ストレス応答の制御に中心的な役割を果たしているATM/ATRキナーゼファミリーの、発がんメカニズムに関係する、酵母では見られない高等動物特有の活性化の機序を明らかにすると共に、そのがん抑制における役割を細胞レベルで明らかにする。さらに、その成果をがん分子標的薬剤開発への応用を図る。

<一年間の進捗状況>

- 1) ATM異常による酸化ストレスに対する細胞応答の異常は、ATM異常による小脳神経細胞死、造血幹細胞の分化異常、早老、あるいは発がんと関連していると考えられているが、その機序は明らかではない。我々は、酸化ストレスやアルキル化剤によるATMの活性化がDNA塩基の修飾を介さず、そのATM蛋白に対する直接作用であり、このようなDNA損傷を介さないATMの活性化は、p53の活性化を引き起しが、Chk1やChk2などの活性化は起こさないことを明らかにしたが、さらに、プロスタグランディンの一種の15-D-PDJ2以外に、4-oxo-2-noneal(ONE)などの過酸化脂質や、一酸化窒素(NO)により生体内に生成し、シグナル伝達のセコンドメッセンジャーとして機能している8-Nitro-cGMP、等の細胞内代謝ストレスにより、ATM依存性にp53の活性化を引き起すことを明らかにした。
- 2) 我々は、高等動物ではDNA損傷を伴う様々なDNA複製異常によるChk1活性化とFancD2ユビキチン化には、Rad17-RFC複合体、Rad9-Rad1-Hus1複合体、ATR-ATRIP複合体以外に、DNA修復因子Msh2/Msh6およびNbs1が関与していることを明らかにした。特に、Nbs1の関与については、パートナーのMre11の関与を必要としない独自の機能であり、Nbs1がATRと相互作用し、TopBP1とは独立にATRを直接活性化することを明らかにした。さらに、ATRタンパク質中のNBS1相互作用領域をHEATモチーフ繰り返し配列中の160アミノ酸配列に限定した。
- 3) TopBP1は、Rad9末端のリン酸化部位に、そのN末端のBRCTドメインを介して結合することにより、DNA複製停止部位に動員され、ATR-ATRIP複合体と相互作用して、その活性化を起こす。最近、TopBP1蛋白がユビキチン系の制御を受けていることが明らかになり、我々は、そのプロセスにRad9と、それと相互作用するTPRモチーフを持つコシャペロンTPR2が関与している、予備的研究結果を得ており、現在、

その作用機序および機能部位の同定を行っている。

- 4) 我々は最近、NBS1 と相互作用する新たな因子として、PCNA と相互作用して複製複合体に局在し、主要な CpG メチル化酵素である DNA(cytosine-5-) -methyltransferase 1(DNMT1)を同定し、DNMT1 内の NBS1 結合領域を、1398 aa から C 末端領域に限定した。また、NBS1 に関しては FHA ドメインを含む N 末端側の領域が重要であることを示した。細胞レベルでの両因子の相互作用を解析した結果、DNMT1 は NBS1 とヒドロキシ尿素 (HU) による複製阻害条件下で共局在することが観察されたが、NBS1 変異細胞中では局在性の変化が認められなかった。

<将来の展望>

様々なかん遺伝子の活性化によって起こる ATM/ATR キナーゼの活性化は、発がんの最も重要バリアーである細胞老化を誘導する。従って、上に述べたような、我々が行っている ATM/ATR の活性化機構の研究は、発がん初期の細胞内でのプロセスを理解する上で重要である。さらに、その作用機序および機能部位を同定することは、細胞老化をターゲットとした、がんの治療戦略の開発にも重要であると考えられる。また DNMT1 は、がん遺伝子の活性化によって起こる細胞老化の誘導に、ATM/ATR と共に重要な INK4a/ARF 遺伝子のプロモーターの主要な CpG メチル化酵素であると考えられており、我々が注目している DNA 損傷応答とリンクする新たな DNMT1 の活性制御機構を明らかにすることは、発がんとの関連、さらにはがん治療戦略の、新たな視点からの展開が可能になると期待される。

<研究業績>

原著論文

1. Shimizu, H., Popova, M., Fleury, F., Kobayashi, M., Hayashi, N., Sakane, I., Venkitaraman, A.R., Kurumisaka, H., Takahashi, M., and Yamamoto, K. c-Abl tyrosine kinase stabilizes Rad51 chromatin association. Biochem. Biophys. Res. Comm., 382: 286-291, 2009 (研究室主体)
2. Jacob, M., Todd, L.A., Majumdar, R. S., Li, Y., Yamamoto, K., and Pure, E. Endogenous cAbl regulates receptor endocytosis. Cell. Signal., 21: 1308-1316, 2009 (共同研究)
3. Popova, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Lebechec, M., K, Takahashi, M., and Fabrice Fleury, F. Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Tyr54 phosphorylation is dependent on that of Tyr315. FEBS Letters, 583: 1867-1872, 2009 (共同研究)

学会発表

- 1) 山本健一、小林昌彦、塩谷文章、若林敬二:NBS1 is directly involved in ATR activation、
第68回日本癌学会（横浜）、平成21年10月1-3日
- 2) 林直之、森村容子、小林昌彦、山本健一：チェックポイントを制御するNBS1と相
互作用する因子の探索と解析、第82回日本生化学会（神戸）、平成21年10月
21-24日
- 3) 小林昌彦、林直之、塩谷文章、若林敬二、山本健一:A role for NBS1 in ATR activation、
第2回日本分子生物学会（横浜）、平成21年12月9-12日

シグナル伝達研究分野

<研究スタッフ>

教授： 善岡 克次

大学院生（博士課程）：Anir Enkhbat

助教： 佐藤 時春

Tuvshintugs Baljinnyam

事務補佐員：大橋 智江

(修士課程)：末木 茜

沢田 加南子

学部生（4年）：日比 勇祐、宮田 大史、谷口 優子

研究生：Radnaa Enkhtuya(H22.4～、大学院生)

<研究の概要>

哺乳類 MAP キナーゼ (MAPK) 経路は、細胞の増殖・分化・死など細胞の様々な局面において重要な役割を担う細胞内シグナル伝達経路である。このシグナル伝達経路の異常は細胞のがん化と密接に関係しており、多くの MAPK シグナル伝達系分子が原がん遺伝子産物として報告されている。MAPK 経路に関する研究は世界中で精力的に行われているが、シグナル伝達経路間の相互作用を含む MAPK シグナル伝達系全体の制御機構や各シグナル伝達モジュールの *in vivo* における機能については不明な点が多い。本研究分野では、我々が同定した哺乳類 MAPK 経路の足場タンパク質 JSAP1、及び JLP (JSAP1 ファミリーメンバー) を切り口として、シグナル伝達の特異性維持機構の解明、MAPK 経路の時間的・空間的制御機構の解明を目指して研究を行っている。哺乳類 MAPK 経路の足場タンパク質に関する研究は、JIP1, JSAP1 の同定を契機として 1998-1999 年に始まった。*in vitro* での実験から、これまでに 10 種類以上のタンパク質が足場タンパク質として機能するのではないかと考えられており、その中で最もよく解析されている足場タンパク質の 1 つが JSAP1 である。しかし、*in vivo* における JSAP1 の機能はほとんど不明であり、生理的条件下で JSAP1-JNK 系を活性化する刺激についても知見が得られていないのが現状である。そこで、*Jsap1*, *Jlp* 遺伝子改変マウスの解析を当面の最重要課題として研究に取り組んでいる。また最近、ROCK1-JSAP1, JLP シグナル伝達系に注目して、紫外線と皮膚がんに関する研究に着手した。

<今年度の研究成果、進行状況と今後の計画>

- 1) 小脳初代培養系を用いた解析を行い、bFGF/FGF-2 (小脳顆粒前駆細胞の分化誘導因子)に応答して JSAP1 タンパク質がプラズマメンブレンに局在することを見出した。また、bFGF/FGF-2-JSAP1 シグナル系は JNK の活性制御に関わることも見出した。今後、JSAP1 の細胞内局在と小脳顆粒前駆細胞の分化制御について、詳細に調べる予定である。

- 2) 小脳顆粒前駆細胞特異的に JSAP1 を欠失させた遺伝子改変マウスを作出した。今後、免疫組織学的解析や分子細胞生物学的解析などを行う予定である。また、小脳顆粒前駆細胞特異的 JSAP1, JLP ダブルノックアウト(KO)マウスの作出・解析についても計画している。
- 3) *Jsap1* KO および *Jlp* KO マウス由来の MEF を調製し、JNK 活性化を指標として紫外線に対する応答性について検討した。その結果、*Jsap1*, *Jlp* KO MEF の応答性は、野生型とは異なることを示唆する結果を得た。今後、それぞれの KO MEF について詳細に検討するとともに、*Jsap1*, *Jlp* ダブル KO MEF の作出・解析も行う予定である。
- 4) 皮膚表皮細胞特異的 *Jsap1*, *Jlp* KO マウスの作出に着手した。今後、当該マウス用いて紫外線と皮膚がんに関する研究を行う予定である。
- 5) 脳の広い領域で JSAP1 を欠失させた遺伝子改変マウスを作出・解析し、JSAP1 は軸索輸送の制御に関わることを強く示唆する結果を得た。
- 6) *Jlp* KO マウスの行動解析を行い、足場タンパク質 JLP の欠失は情動障害を引き起こすことを見出した。また *Jlp* KO マウスでは、セロトニン産生に関わる特定の神経核においてセロトニン陽性細胞数が有意に減少していることも見出した。

<発表論文>

原著（当研究分野主体）

1. Tanahashi, H., Kito, K., Ito, T., Yoshioka, K. (2010) MafB protein stability is regulated by the JNK and ubiquitin-proteasome pathways. *Arch. Biochem. Biophys.*, 494: 94-100.

原著（共同研究）

2. Uchida, S., Yoshioka, K., Kizu, R., Nakagama, H., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Poon, R.Y., Yamashita, K. (2009) Stress-activated mitogen kinase c-Jun NH₂-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.*, 69: 6438-6444.
3. Morfini, G.A., You, Y.M., Pollema, S.L., Kaminska, A., Liu, K., Yoshioka, K., Björkblom, B., Coffey, E.T., Bagnato, C., Han, D., Huang, C.F., Banker, G., Pigino, G., Brady, S.T. (2009) Pathogenic huntingtin inhibits fast axonal transport by activating JNK3 and phosphorylating kinesin. *Nat. Neurosci.*, 12: 864-871.
4. Yamaguchi, T., Miyashita, C., Koyano, S., Kanda, H., Yoshioka, K., Shiba, T., Takamatsu, N., Ito, M. (2009) JNK-binding protein 1 regulates NF-kappaB activation through TRAF2 and TAK1. *Cell Biol. Int.*, 33: 364-368.

総説

なし

<学会発表>

全国学会

1. 佐藤 時春、Anir Enkhbat、善岡 克次

Positive feedback regulation of the scaffold protein *Jsap1* gene expression during the differentiation of cerebellar granule cell precursors

第 32 回 日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、横浜

2. 内田 早苗、渡辺 信元、工藤 保誠、善岡 克次、松永 司、中釜 斎、山下 克美

JNK 誘発 SCF^{beta-TrCP} 依存的 Cdc25B ユビキチン化の分子機構

第 68 回 日本癌学会学術総会、2009 年 10 月、横浜

国際学会

なし

<特許出願>

1. 特願 2009-220591 「情動障害の治療薬のスクリーニング方法」

発明者：善岡克次、吉原 亨、佐藤時春、浅野雅秀

出願日：2009 年 9 月 25 日

出願人：国立大学法人金沢大学

腫瘍分子科学研究部門細胞機能統御研究分野

<研究スタッフ>

教 授 佐藤 博

准教授 滝野 隆久、遠藤 良夫、久野 耕嗣

技能補佐員 山岸 小百合

大学院（博士） SAKR MOUSTAFA ABDEL-SAMED

堂本 貴寛、郭 魯決

（修士） 清水 聰史、藤村 浩司、長尾 亮太

<研究の概要>

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MT1-MMP)は MMP-2 の活性化因子として同定され、その後 MMP-2 活性化以外にも細胞外マトリックス成分であるコラーゲン、ファイブロネクチンの分解、シンデカンなどの膜タンパクのシェディング、KiSS-1 などの低分子リガンドの切断など様々な機能を有し、総合的にがんの悪性化形質に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。MT1-MMP による MMP-2 活性化はほとんど全てのがん組織で確認されるが、活性化の意義・メカニズム・他基質切断との関連などについては不明の点が多くあった。我々は人工的な MMP-2 レセプターを開発することにより (Cancer Res., 2008)、MT1-MMP による MMP-2 活性化 vs 他基質切断の調節機構について新規の提案を行った (Cancer Science 総説, 2010)。MMP の中で MT1-MMP の特徴的な活性として、膜タンパクのシェディングが挙げられる。発現クローニング法を用いた MT1-MMP の基質探索により新規膜タンパクを MT1-MMP の基質として同定し、それらのシェディングのがんの増殖・浸潤・転移に果たす役割を検討している。遠藤、久野准教授は独自のプロジェクトを推進中である。

<今年度の研究成果>

1. 発現クローニング法により MT1-MMP の新規基質として機能未知の膜タンパク x x を同定した。x x は肝がん、扁平上皮がんに発現する。x x の発現は発現細胞のファイブロネクチンへの接着を促進し、コラーゲンゲル内での増殖を負に制御すること、MT1-MMP による同分子のシェディングはコラーゲンゲル内での増殖を回復することを見出した。他にも複数の膜タンパクを MT1-MMP の新規基質として同定し、切断部位の決定ならびにがんの浸潤・増殖における意義を検討中である。（佐藤）
2. 上皮系細胞のコラーゲンゲル培養では、増殖抑制とともに FAK と ERK の活性化抑制が認められた。MT1-MMP 発現がん細胞では、コラーゲンゲル培養中でも FAK

と ERK の活性化が維持されており、MT1-MMP のノックダウンにより FAK と ERK の活性化が抑制された。また、MT1-MMP 発現細胞ではコラーゲンゲル培養においてファイプロネクチン (FN) の産生が亢進しており、MT1-MMP の阻害や FN のノックダウンは細胞死を誘導した。以上の結果から、MT1-MMP は 3 次元 ECM 中で細胞外微小環境の改編に重要な役割を果たし、FAK や ERK 経路を介して細胞増殖、運動、死を制御していると考えられた。(滝野)

3. 5-アミノレブリン酸 (5-ALA) は生体内に存在するアミノ酸類であり、腫瘍組織選択的に細胞内でヘム生合成経路によりプロトポルフィリン IX (PpIX) に代謝され、光感受性物質として活性化される。本年度は、胃がん培養細胞の中でも 5-ALA-PDT に高感受性を示す MKN-45 細胞を用い、親株に比較して、1,000 倍以上の耐性度を示す 5-ALA-PDT 高度獲得耐性株の樹立をした。この高度耐性細胞におけるヘム生合成経路の因子群の mRNA 発現を親株と比較したところ、PpIX 濃度を規定すると考えられるタンパクの発現に著明な変化があることを見出した。(遠藤)
4. ADAMTS-1-/-マウスの分娩異常の原因を明らかにするため、同マウスの子宮平滑筋の収縮能に異常があるか調べた。その結果分娩直前の ADAMTS-1-/-マウスから調製した子宮平滑筋 strip では、60mM KCl 刺激および hypotonic shock によって生じる収縮力が 30-40% 低下しており、子宮の機能的平滑筋量の低下が示唆された。またオキシトシンによる収縮力を調べた結果、ADAMTS-1-/-マウスでは機能的な平滑筋あたりのオキシトシンへの反応性も有意に低下していることが明らかとなった。(久野)

<今後の研究課題・計画>

1. MT1-MMP による膜タンパクのシェディングの浸潤・転移ならびに増殖における意義を明らかにし、このステップを標的とした制御方法の開発を試みる(佐藤)。
2. 次元コラーゲンゲル細胞培養法を用いて、がん細胞の細胞増殖と浸潤能獲得における MT1-MMP の役割とその作用機序を解析するとともに、細胞運動・浸潤の極性形成とその連続性維持における MT1-MMP の役割とその機構を検討する(滝野)。
3. PpIX 濃度を規定する因子を標的にした 5-ALA-PDT 感受性増強剤の探索とリード化合物候補の探索を継続する。(遠藤)
4. 今後さらに分娩時の生理的な収縮誘導物質である PGE₂, PGF₂・に対する応答性を調べて、ADAMTS-1-/-マウスの分娩前の子宮平滑筋についてその収縮機能を評価するとともに、子宮平滑筋の組織学的变化や ECM 成分の変化について解析を行う。また ADAMTS-1-/-マウスで子宮頸管の熟化に異常があるかについても解析を行い、ADAMTS-1 の分娩過程における役割を明らかにする。(久野)

<原著・研究室主体>

Sato H, Takino T. Coordinate action of membrane-type matrix metalloproteinase-1(MT1-MMP) and MMP-2 enhances pericellular proteolysis and invasion. Cancer Science (in press).

<原著・共同研究>

Itatsu K, Sasaki M, Yamaguchi J, Ohira S, Ishikawa A, Ikeda H, Sato Y, Harada K, Zen Y, Sato H, Ohta T, Nagino M, Nimura Y, Nakanuma Y: Cyclooxygenase-2 is involved in the up-regulation of matrix metalloproteinase-9 in cholangiocarcinoma induced by tumor necrosis factor-alpha. Am. J. Pathol., 174, 829-841, 2009.

Onodera M, Zen Y, Harada K, Sato Y, Ikeda H, Itatsu K, Sato H, Ohta T, Asaka M, Nakanuma Y. Fascin is involved in tumor necrosis factor (TNF)- α -dependent production of MMP9 in cholangiocarcinoma. Lab. Inv., (in press)

<学会発表>

第18回日本がん転移学会総会 堂本 貴寛、滝野隆久、佐藤博「膜型セリンプロテアーゼによる膜型 MMP 活性化機構の解析」(優秀演題賞)平成21年7月(旭川)

第82回 日本生化学会大会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」、平成 21 年 10 月 (神戸)

第68回 日本癌学会学術総会 滝野 隆久、佐藤 博 「MT1-MMP による浸潤性増殖誘導」、平成 21 年 10 月 (横浜)

遠藤 准教授

発表論文

Yonemura Y, Endou Y, Shinbo M, Sasaki T, Hirano M, Mizumoto A, Matsuda T, Takao N, Ichinose M, Mizuno M, Miura M, Ikeda M, Ikeda S, Nakajima G, Yonemura J, Yuuba T, Masuda S, Kimura H, Matsuki N. Safety and efficacy of bidirectional chemotherapy for treatment of patients with peritoneal dissemination from gastric cancer: Selection for cytoreductive surgery. J Surg Oncol. 100(4):311-316, 2009.

安部千秋, 宇都義浩, 遠藤良夫, 新元優也, 中島宏一郎, 佐野圭一郎, 佐々木有紀, 皆巳和賢, 前澤 博, 増永慎一郎, 中田栄司, 堀 均:次世代動物実験系としての腫瘍移植鶏卵の構築と放射線照射による腫瘍成長阻害活性. 放射線生物研究 44(2):233-241, 2009.

学会発表

1. 宇都義浩, 遠藤良夫, 他 11 名: 腫瘍移植鶏卵を用いた *in ovo* 放射線増感活性評価系の確立 第 11 回増感シンポジウム(奈良) 2009 年 2 月
2. 新元優也, 遠藤良夫, 他 10 名: 腫瘍移植鶏卵を用いた *in ovo* 放射線増感活性評価系の確立 日本薬学会第 129 年会(京都)2009 年 3 月
3. 中江 崇, 遠藤良夫, 他 10 名:腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド低酸素細胞放射線増感剤 TX-2244 の腫瘍移行性 日本薬学会第 129 年会(京都)2009 年 3 月
4. 宇都義浩, 遠藤良夫, 他 8 名: 腫瘍移植鶏卵モデルによる糖ハイブリッド放射線増感剤の薬物動態解析 第 15 回癌治療増感研究会 2009 年 6 月(京都)
5. Uto Y, Endo Y, 他 4 名: Pharmacokinetic drug design of sugar-hybrid radiosensitizers using the tumor implant chick embryo model 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
6. Yoshida T, Endo Y, 他 2 名: Increased secretion of cytidine deaminase protein in cancer cells resistant to antitumor 2'-deoxycytidine analogues 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
7. Kano S, Endo Y, 他 3 名: Effect of experimental photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on hu man gastric cancer cells 第 68 回日本癌学会学術総会, 2009 年 10 月(横浜)
8. 小倉俊一郎、遠藤良夫、他 4 名:アミノレブリン酸(ALA)による腹膜播種の診断ならびに治療の基礎検討 第 1 回播種性転移研究会(草津) 2009 年 10 月

久野 深教授

＜学会発表＞ Kuno K., Matsushima K., Shozu M.

「妊娠マウス子宮組織における ADAMTS-1 タンパク発現部位の解析」第 32 回日本分子生物学会年会(2009 年 12 月、横浜)

分子生体応答研究分野

<研究スタッフ>

教授：向田直史

助教：馬場智久 外国人客員教員：陸培栄（2009年7月～12月）

学術振興会外国人特別研究員：Boryana Popivanova（2009年7月まで）

協力研究員：李影奕

大学院生：Feodora Kostadinova、王瑩瑩、Shamekh Mohamed Mohamed、飯田宗穂（医・旧第1内科）、藤井博（医・旧第2内科）、Gadelhaqbadr Mohamed Elsherif（医・修士）
研究支援推進員：南邦子

<研究の概要>

- ① 炎症性サイトカイン・ケモカインの発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。
- ② 前がん～がん病変で発現が亢進しているセリン／スレオニン・キナーゼ Pim-3 の発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。

<今年度の主な成果と進行中の研究課題>

1) Azoxymethane をマウスの腹腔内に投与5日後から、デキストラン硫酸塩(DSS)を飲料水に加えて5日間飲用させることを3回間歇的に反復させる、大腸がんモデルにおいて、腫瘍壞死因子ならびにマクロファージに作用するケモカインであるCCL2が発症過程のみならず進展過程に密接に関与していることを報告した。本年度は、他のケモカインの関与についても検討を加えた。その結果、CCL2とは異なるが、同じくマクロファージに働くことが報告されているCCL3の発現も大腸がん発がん過程において大腸組織で亢進していることを見出した (Popivanova・Kostadinova・Shamekh)。

2) DSSを飲料水に加えて5日間飲用させて生じる急性腸炎モデルにおいて、大腸局所で、ケモカインCX3CL1の発現が亢進しているとともに、CX3CL1の特異的レセプターであるCX3CR1陽性マクロファージの浸潤も増強していた。CX3CR1欠損マウスでは、DSS投与後の炎症性細胞浸潤・組織破壊が、野生型マウスに比べて減弱していた。DSSによる急性腸炎は、NO阻害剤によって減弱することが知られているが、CX3CR1欠損マウスは野生型マウスに比べると、DSS投与後のiNOS陽性マクロファージの浸潤が減弱していて、これが炎症反応・組織破壊の減弱につながったと考えられた (Kostadinova)。

3) マウス腎がん細胞株Rencaの尾静脈内投与によって起きる肺転移モデルの解析から、Renca接種直後からケモカインCCL2の肺内での発現が亢進していて、CCR2陽性の血球系細胞の肺内への集積も認められることを確認した (Gadelhaqbadr・馬場)。

4) ケモカイン・レセプターであるCCR2欠損マウスにおいて、胸腺ならびに末梢血において、Spiral陽性の樹状細胞亜群が減少していることを見出した。さらにこの亜群は血中由来の抗原の胸腺での取り込みとそれに引き続くNegative selectionとT抑制性T細胞の誘導にも関与している可能性があることを明らかにした (馬場・

Gadelhaqbadr)。

5) IL-1 receptor antagonist (IL-1ra)遺伝子欠損マウスは、BALB/c 遺伝背景の下では、関節内へのマクロファージ・好中球の浸潤を伴う多発性の関節炎を発症することが知られている。この関節炎自然発症モデル・マウスでの、CCL2 の役割を検討するために、CCL2 の特異的レセプターである CCR2 遺伝子と IL-1ra 遺伝子とを重複欠損させたマウスを作出した。IL-1ra 単独欠損マウスに比較して、この重複欠損マウスでは、関節内へのマクロファージ浸潤は変化が無いのに対して、好中球浸潤が顕著に増強しており、関節炎も増悪した。重複欠損マウスでは、関節内ならびに関節に近接した骨髄内での破骨細胞の数が、IL-1ra 単独欠損マウスに比較して増加していく、骨破壊も亢進していた。以上の結果は、CCL2-CCR2 系が破骨細胞の動態の制御にも密接に関与していることを示唆していると考えられた (藤井・馬場)。

6) 薬学部の石橋弘行教授との共同研究で、Pim-3 活性を阻害する低分子化合物のスクリーニングを本年度も行い、試験管内で Pim-3 キナーゼ活性とヒト膵臓がん細胞株の増殖を抑制する、新たな低分子化合物を発見した (李・王)。

7) アルブミン・プロモーターによって Pim-3 を肝臓内にのみ選択的に恒常発現するトランスジェニックマウスを作出した。このマウスの肝細胞は、野生型マウスの肝細胞に比較して、細胞周期の進行が亢進していた。このマウスは、生後 1 年までは肝臓がんを自然発症しないが、ディエチルニトロサミンを生後 3 週目で投与すると、野生型マウスに比べて、肝臓がん細胞株の発症頻度ならびに発生する腫瘍の和・大きさが顕著に増大したことから、Pim-3 は肝臓がん発症において、initiator ではなく、promoter として働くことが示唆された (王・馬場)。

<今後の計画>

1) AOM/DSS によって生じる大腸がん発症ならびに進展過程における、CCL2-CCR2 以外の種々のマクロファージに作用することが報告されているケモカイン、特に CCL3 ならびに CX3CL1 の役割を検討する。炎症反応を基盤として発生すると考えられているウレタン投与による肺がん発がんモデルを確立し、幾つかのケモカイン関連遺伝子・炎症性サイトカイン関連遺伝子欠損マウスにおいて、発がんが減弱しているという予備的な結果を得たので、この点についても検討を加える。

2) 肺転移モデルでの、肺胞マクロファージなどの種々の血球系細胞の動態を検討するとともに、これらの血球系細胞の役割を解明する。さらに、これらの血球系細胞の動態を制御しているケモカインなどの走化因子の役割も明らかにする。

3) 担がん時における抑制性 T 細胞の動態を検討し、抑制性 T 細胞を標的とした新たながん免疫療法の開発を目指す。

4) 骨転移モデルを樹立して、骨転移モデルでの破骨細胞の集積・活性化に、関節炎と同様に CCL2-CCR2 系が関与しているかどうかを、検証する。

5) これまでに得られた Pim-3 活性を阻害する低分子化合物をリード化合物として、Pim-3 活性さらには膵臓がん細胞株などの増殖に対する作用を指標にして、化合物の修飾を石橋教授のグループと共同で行う予定である。

研究業績

(所属していた研究者を下線で示した)

発表論文：

分野主体の研究による論文

1. Li Y-Y, Wu Y, Tsuneyama K, Baba T, and Mukaida N. Essential contribution of Ets-1 to constitutive Pim-3 expression in human pancreatic cancer cells. *Cancer Sci* 100 (3): 396-404, 2009.
2. Baba T, Nakamoto Y, and Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirpa⁺ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens in a CCR2-dependent manner. *J Immunol* 183 (5): 3053-3063, 2009.
3. Popivanova BK, Kostadinova FI, Furuichi K, Shamekh MM, Kondo T, Wada T, Egashira K, and Mukaida N. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis associated carcinogenesis in mice. *Cancer Res* 69 (19) 7884-7892, 2009.
4. Li Y-Y, Wang Y-Y, Taniguchi T, Kawakami T, Baba T, Ishibashi H, and Mukaida N. Identification of stemonamide synthetic intermediates as a novel potent anti-cancer drug with an apoptosis-inducing ability. *Int J Cancer* (in press).
5. Wu Y, Wang Y-Y, Nakamoto Y, Li Y-Y, Baba T, Kaneko S, Fujii C, and Mukaida N. Accelerated hepatocellular carcinoma development in mice expressing the Pim-3 transgene selectively in liver. *Oncogene* (in press).

他の研究室との共同研究による論文

6. Ishibe T, Kimura A, Ishida Y, Takayasu T, Hayashi T, Tsuneyama K, Matsushima K, Sakata I, Mukaida N, and Kondo T. Reduced acetaminophen-induced liver injury in mice by genetic disruption of IL-1 receptor antagonist. *Lab Invest* 68 (1): 68-79, 2009.
7. Lu P, Li L, Lin G, van Rooijen N, Mukaida N, and Zhang X. Opposite roles of CCR2 and CX3CR1 macrophages in alkali-induced corneal neovascularization. *Cornea* 28 (5): 562-569, 2009.
8. Lu P, Li L, Liu G, Zhang X, and Mukaida N. Absence of IL-1 receptor antagonist enhanced corneal neovascularization along with aberrant angiogenic factor expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50 (10): 4761-4768, 2009.
9. Oka M, Sakaguchi M, Okada T, Ozaki M, Yoshioka T, Inoue H, Mukaida N, Kikkawa U, and Nishigori C. Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) upregulates interleukin-8 expression at the level of transcription in human melanoma cells. *Exp Dermatol* (in press).
10. Kimura A, Ishida Y, Wada T, Hisaoka T, Morikawa Y, Sugaya T, Mukaida N, and Kondo T. The absence of IL-6 enhanced arsenite-induced renal injury by promoting autophagy of tubular epithelial cells with aberrant ERK activation. *Am J Pathol* (in press).
11. Mizukoshi E, Nakamoto Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Enhancement of tumor-specific T cell responses by transcatheter arterial embolization with dendritic cell infusion for hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* (in press).

12. Takamatsu R, Teruya H, Takeshima E, Ishikawa C, Matsumoto K, Mukaida N, Li J-D, Heuner K, Higa F, Fujita J, and Mori N. Molecular characterization of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in T cells. *BMC Microbiology* (in press).

学会発表（筆頭発表者が研究室所属に限る）

1. Wu Y, Li Y-Y, Baba T, and Mukaida N. CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts, and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process. Tri-Society Annual Conference 2009 of SLB, ICS, and ISICR. October 2009, Lisbon, Portugal.
2. Popivanova BK, Kostadinova FI, and Mukaida N. Blockade of a chemokine, CCL2, reduces chronic colitis-associated carcinogenesis in mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa (Invited Speaker).
3. Fujii H, Baba T, Hamano R, Kawano M, Yamagishi M, and Mukaida N. The role of chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1, in arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa.
4. Kostadinova FI, Shamekh MM, and Mukaida N. Pathogenic roles of the CX3CL1-CX3CR1 interactions in macrophage recruitment and function in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa.
5. Baba T and Mukaida N. Crucial contribution of thymic Sirpa⁺ conventional dendritic cells to central tolerance against blood-borne antigens. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2009. July 2009, Kanazawa (Selected as the first poster prize).
6. Fujii H, Baba T, Hamano R, Kawano M, Yamagishi M, and Mukaida N. The role of chemokine receptors, CCR2 and CX3CR1, in arthritis in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. 9th World Congress on Inflammation, July 2009, Tokyo.
7. Popivanova BK, Kostadinova FI, and Mukaida N. Crucial involvement of the CCR2/CCL2 interactions in azoxymethane/dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. 9th World Congress on Inflammation, July 2009, Tokyo (Young Investigator Award).
8. 向田直史。Pim-3の膵臓がん細胞での発現亢進機構とPim-3阻害剤による膵臓がん細胞株増殖の抑制。第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、2009年6月、徳島。
9. 向田直史、呉俣。マウス肺転移モデルにおける、ケモカインCCL3とそのレセプター-CCR5の役割。第18回日本がん転移学会学術集会・総会、2009年7月、旭川。
10. 王瑩瑩、向田直史。ヒト膵臓がん細胞株の試験管内増殖抑制作用を示す新規低分子化合物の同定。第68回日本癌学会学術集会、2009年10月、横浜。
11. 向田直史。ケモカインCCL2の作用抑制による炎症関連大腸がんの抑制。第68回日本癌学会学術集会、2009年10月、横浜。

12. 藤井博、馬場智久、濱野良子、川野充弘、向田直史。Ablation of CCR2 exaggerates arthritis and enhances bone destruction in IL-1ra^{-/-} mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。
13. 馬場智久、向田直史。Thymic Sirpα+ conventional dendritic cell is a major generator of central tolerance against blood-borne antigens. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。
14. Kostadinova FI, Popivanova BK, and Mukaida N. Role of fractalkine in recruitment and function of macrophages in dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice. 第39回日本免疫学会総会・学術集会、2009年12月、大阪。

その他

特願 2009-162000 平成 21 年 7 月 8 日出願。

発明者：向田直史、石橋弘行、谷口剛史。

発明の名称：置換フェナントレン化合物を有効成分とするがんを予防および／治療するための医薬組成物に関する。

免疫炎症制御研究分野

<研究スタッフ>

教授	須田 貴司	
助教	今村 龍	木下 健
大学院生	茂谷 康 (D3)	王 強 (D2)
研究補助員	串山 裕子	

<研究の概要>

本研究室では、免疫・炎症と細胞死の誘導および制御に関する分子機構に着目し、それらの生理的機能とがんの発生、進展、退縮における役割の解明を目指している。現在は、免疫・炎症と細胞死の誘導・制御に働く NLR 蛋白群とそのシグナル伝達分子 ASC に着目して研究を行っている。

<今年度の研究成果及び進行中の研究課題と今後の研究計画>

1) ASC 活性化による細胞死の様態決定機構の解析：我々は、ASC の活性化で様々ながん細胞にアポトーシスが誘導され、腫瘍の退縮を誘導しうることを示してきた。また、昨年は COLO205 大腸腺癌細胞株では、ASC の活性化でアポトーシスではなく、ネクローシスが誘導されることを見出した。本年度は、COLO205 由来細胞株から ASC の活性化でアポトーシスが誘導される細胞株を単離し、親細胞株との遺伝子発現プロファイルの違いをマイクロアレーで比較し、細胞死の様態と相關する遺伝子を多数発見した。また、複数のメラノーマ、膵がん細胞、白血病細胞株についても ASC 依存性細胞死の様態を解析し、1 例を除きアポトーシスタイプとネクローシスタイプに分類できることを見出した。今後はこれらの細胞株を用い、細胞死の様態を決定する因子の同定を目指す。

2) ASC を活性化する天然物、化合物の探索：上述のように、我々は ASC ががん治療の標的分子となりうることを示した。そこで、本年度は ASC の活性化を誘導しうる化合物、天然物の探索を行った。先ず、がん特定領域研究の支援班が提供する 300 種類の化合物を用い、ASC 発現細胞株に選択的に細胞死を誘導する物質のスクリーニングを行った。その結果、2 種類の関連物質が ASC 発現細胞株に比較的選択的な毒性を示すことを見出した。現在、東京理科大学の椎名勇教授との共同研究で、これらの物質の類縁化合物について、ASC 発現細胞をより選択的に殺傷するものが無いか検討を行っている。また、金沢大学の太田富久教授との共同研究で海洋微生物の抽出液中に ASC 発現細胞株に比較的選択的な毒性を示すものを見出した。今後は、これらの共同研究を発展させ、ASC 依存性に細胞死を誘導する物質の同定・開発を試みる。また、ASC 遺伝子の発現をモニターできるインジケータープラスミドを構築し、メラノーマの細胞を用いてインジケーター細胞を樹立した。今後は、この細胞を用いて ASC の発現を変化させる物質の探索も行う。

3) PYNOD トランスジェニック(tg)マウスの機能解析: PYNOD トランスジェニックマウス(PYNOD-Tg)を用いて PYNOD の抑制効果を解析した。PYNOD-Tg では IL-1 β の産生に必須な酵素であるカスパーゼ 1 のプロセシングは正常におこるが、カスパーゼ 1 の活性は低下していた。PYNOD-Tg は LPS ショックに耐性であるが、LPS 投与後血清中の IL-1 β や TNF- α が野生型マウスに比べ低いレベルであった。また、PYNOD ノックアウトマウスの作製を行い PYNOD+/-マウスを樹立した。今後は PYNOD-/-マウスを樹立し、このマウスや PYNOD-Tg および ASC-/-マウスを用いて、感染や炎症刺激に対する反応性および発癌に対する影響を個体レベルおよび細胞レベルで検討する。

4) *Staphylococcus aureus* 感染 THP-1 細胞における TNF- α 産生メカニズムの解析: NLRP3 は HEK293 細胞を用いた過剰発現系ではアダプター分子 ASC 依存的にカスパーゼ 1、NF- κ B を活性化する。一方、NLRP3 欠損マウスのマクロファージを用いた解析では NLRP3 による NF- κ B の活性化は証明されていない。本年度は NF- κ B の活性化に NLRP3 が関与することを証明するため、ヒトマクロファージ培養細胞株(THP-1)の NLRP3 および ASC の発現をノックダウンし、NLRP3 活性化刺激に応じたサイトカイン産生誘導を調べた。その結果、1) この細胞株では *Staphylococcus aureus* 感染に伴う TNF- α と IL-1 β の mRNA 発現誘導が低下していた。2) この mRNA 発現誘導は cycloheximide の影響を受けなかった。3) ノックダウン細胞株では細菌感染に伴う NF- κ B 核移行が減弱していた。以上より、NLRP3 が細菌感染に伴う NF- κ B の活性化、サイトカイン mRNA 発現誘導に関与していることが示唆された。今後は種々のがん細胞株の NLRP3 がサイトカイン産生に関与する可能性を検証する。NLRP3 発現がん細胞について NLRP3 発現ノックダウン細胞株を樹立し、その形質の変化を解析する。

<論文発表>

原著

当研究室主体の発表論文

1. Hasegawa, M., Imamura, R., Motani, K., Nishiuchi, T., Matsumoto, N., Kinoshita, T., and Suda, T.: Mechanism and repertoire of ASC-mediated gene expression. J. Immunol. 2009, 182:7655-7662

<学会発表>

1. Motani, K., Imamura, R., Kawase, K., and Suda, T.: ASC mediates apoptosis or necrosis depending on the cell type. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Cell Death (Cold Spring Harbor) Oct. 2009
2. 今村龍、茂谷康、串山裕子、木下健、須田貴司:ASC;細胞死と炎症シグナル伝達の接

- 点. 第 82 回日本生化学会大会、シンポジウム（神戸）2009 年 10 月
3. Motani, K., and Suda, T.: Role of NALP3 and ASC in necrotic cell death of macrophages infected with *Staphylococcus aureus*. 2009 日本免疫学会総会・学術集会, (大阪) 2009 年 12 月
 4. 木下健、今村龍、須田貴司 : The role for NLRP3 in the TNF- α production by macrophages. 第 32 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2009 年 12 月

遺伝子・染色体構築研究分野

<研究スタッフ>

教授：平尾 敦 助教：仲 一仁、田所優子

博士研究員：村口輝行、星居孝之、大塩貴子

大学院生（博士課程）：玉瀬玲、守護晴彦、上間徳之、田中慎吾

（修士課程）：畠山朋樹、小澤宝正

技能補佐員：竹上美也子、田村恭子

<研究概要>

当研究分野では、組織幹細胞の自己複製および分化制御メカニズムを理解すること、幹細胞とがんの共通性を知ることによって、がんの発生や動態制御メカニズムを理解すること、さらに、上記の知見に基づいて新規がん治療法の開発を目指し研究を進めている。主な研究テーマは、1. 造血、神経を中心とした組織幹細胞自己複製および分化制御機構の解明、2. がん幹細胞の特定と制御機構の解明、3. がんの発生における細胞分化制御の役割の解明である。

<今年度の成果、進行状況と今後の計画>

我々の研究において基盤となるテーマ “幹細胞とがん” に沿って、以下の視点から研究を進めた。

1) PI3 キナーゼ - AKT シグナル制御と造血幹細胞・白血病幹細胞

従来進めてきた JST/CREST 研究により、栄養飢餓状態で活性化する転写因子 FOXO が G0 期造血幹細胞で活性化しており、幹細胞制御に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。FOXO は、PI3 キナーゼ - AKT シグナルの下流分子であるが、本年度は、この一連のカスケードが、白血病幹細胞維持に重要な役割を果たしていることを明らかにした。まず、マウス慢性骨髄性白血病モデルにおいて、白血病幹細胞集団を特定した。この白血病幹細胞において、FOXO が活性化していること、FOXO 機能を欠損させることによって白血病幹細胞の維持能低下が起こることを見出した。慢性骨髄性白血病の原因は、造血幹細胞における BCR-ABL 融合遺伝子によるチロシンキナーゼ異常活性亢進であり、特効薬としてチロシンキナーゼ阻害剤イマチニブが開発され、患者の治療に使用されている。ところが、薬剤中止後の再発が問題となり、その原因としてイマチニブ耐性白血病幹細胞の存在が示唆されていた。本研究において、白血病幹細胞における FOXO の活性化がイマチニブ抵抗性の原因のひとつであることを明らかにした。次に、白血病幹細胞の FOXO の局在を指標に、複数の

上流の標的分子の阻害剤を探索したところ、TGF-beta シグナルが、FOXO の上流分子として重要な役割を果たしていることを見出し、その阻害剤が白血病治療に有効であることを確認した。以上のように、PI3 キナーゼ - Akt - FOXO カスケードを調節する化合物を探索することによって、慢性骨髄性白血病のイマチニブ耐性を克服できる可能性を示した(*Nature*, in press)。

また、FOXO とならび、PI3 キナーゼ - Akt シグナルによって制御を受ける mTOR の活性化制御が、造血幹細胞の制御に重要な役割を果たしていることを見出した。mTOR 複合体 1 の活性に影響を与えるいくつかの分子の変異マウスを解析した結果、本複合体が造血幹細胞の機能および数、さらに造血環境因子に極めて重要な役割を果たしていることが判明した。今後、さらに PI3 キナーゼ - AKT シグナルカスケードの造血幹細胞および白血病幹細胞動態に関する詳細な検討を進める。

2) 固形腫瘍におけるがん幹細胞解析

固体腫瘍モデルにおけるがん幹細胞 (tumor-initiating cell) の特定法を確立するため、核小体分子 Nucleostemin の発現に着目した。Nucleostemin は、その発現が各種幹細胞で高く細胞の未分化状態との相関が示唆されていた。そこで、Nucleostemin promoter 活性を用いた GFP レポーター マウス (NS-GFP Tg) を用い、tumor-initiating cell の特定を試みた。NS-GFP Tg マウスをベースに脳腫瘍モデルを作製し、形成された脳腫瘍細胞を解析したところ、GFP 陽性細胞に腫瘍形成能を有する tumor-initiating cell が濃縮されていることが判明した。この細胞は、未分化マーカーを発現しており、GFP 隆性細胞は、未分化抗原が消失していることから、GFP 陽性細胞が幹細胞的性質を有していることが明らかとなつた。さらに、腫瘍細胞が活発に正常脳組織に浸潤している部位に tumor-initiating cell が存在していることが判明し、治療後の脳腫瘍再発の原因となっていることも示唆された(*PNAS*, 2009)。同時に、免疫不全マウスを用いたヒト脳腫瘍動態解析法の確立を試みており、脳腫瘍根治を目指した治療法の開発を目指している。

一方、脳腫瘍の発生の原因として知られる Ras の活性化シグナルの正常な神経幹細胞に対する影響を検討した。その結果、細胞分化と腫瘍発生メカニズムの深い連関を示唆する知見を得た。今後、さらに分子レベルでの解析を進め、脳腫瘍発生・動態制御の詳細なメカニズムの解明を目指す。

研究業績

発表論文

<原著論文>

研究室が主体となったもの:

Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Tadokoro Y, Ooshio T, Kondo Y, Nakao S, Motoyama N, Hirao A. TGF β -FOXO signalling maintains leukaemia-initiating cells in chronic myeloid leukaemia. *Nature*, 2010, in press (DOI 10.1038/nature08734)

Tamase A, Muraguchi T, Naka K, Tanaka S, Kinoshita M, Hoshii T, Ohmura M, Shugo H, Ooshio T, Nakada M, Sawamoto K, Onodera M, Matsumoto K, Oshima M, Asano M, Saya H, Okano H, Suda T, Hamada JI, Hirao A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106:17163-8, 2009

共同研究:

Yamakoshi K, Takahashi A, Hirota F, Nakayama R, Ishimaru N, Kubo Y, Mann DJ, Ohmura M, Hirao A, Saya H, Arase S, Hayashi Y, Nakao K, Matsumoto M, Ohtani N, Hara E. Real-time in vivo imaging of p16Ink4a reveals cross talk with p53. *J Cell Biol.* 186:393-407, 2009.

<総説>

平尾敦:再生医療の将来と産婦人科 6. がんと幹細胞 産科と婦人科 76: 1203-1207,2009

平尾敦:癌幹細胞研究の動向 がんの起源細胞と階層性、Biotherapy (Tokyo) 23:359-363, 2009

平尾敦:幹細胞ホメオスタシスと酸化ストレス 実験医学 27:2401-2404, 2009

平尾敦:寿命制御シグナルと幹細胞、日本老年医学会雑誌 46:29, 2009

平尾敦:がん幹細胞研究の最前線 日本外科学会雑誌 110:144-147, 2009

学会発表

<国際学会>

Hirao A: Roles of FoxO3a in normal hematopoiesis and leukemia. The 8th Japan-China Joint Conference for Cancer Research, Osaka, Oct 5, 2009

Hirao A: Roles of FoxO3a in normal hematopoiesis and leukemia. The 4th International workshop on Cell Regulations in Division and Arrest, Okinawa, Nov.30, 2009

Naka K, Hoshii T, Muraguchi T, Ooshio T, Motoyama N, Hirao A: Foxo3a is essential for survival of chronic myeloid leukemia-initiating cells. 7th International Society of

Stem Cell Research, Barcelona, Spain, July 8-11, 2009

Muraguchi T, Hoshii T, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Hirao A: Roles of Ras-induced growth suppression of neural stem cell in malignant glioma progression. American Association for Cancer Research (AACR) Special Conference on Genetics and Biology of Brain Cancers, U.S.A. San Diego, Dec. 14, 2009

<国内学会>

平尾敦:幹細胞可視化システムを用いたがん組織不均一性の解析、第98回日本病理学会総会、京都、平成21年5月1日

平尾敦:寿命制御シグナルと幹細胞、第51回日本老年医学会、横浜、平成21年6月19日

平尾敦:老化・寿命制御シグナルと幹細胞、第5回加齢皮膚医学研究会、徳島、平成21年7月11日

平尾敦:Regulation of stem cell homeostasis and tumorigenesis by microenvironmental factors、第68回日本癌学会学術総会、横浜、平成21年10月1日

平尾敦:フォークヘッド転写因子 FoxO による造血幹細胞および白血病幹細胞制御、第82回日本生化学大会、神戸、平成21年10月21日

仲一仁、星居孝之、村口輝行、田所優子、大塩貴子、本山昇、平尾敦: Foxo3a is essential for maintenance of chronic myelogenous leukemia-initiating cells. 第68回日本癌学会、横浜、平成21年10月1-3日

村口輝行、星居孝之、大塩貴子、田所優子、仲一仁、平尾敦: Roles of oncogenic Ras-induced differentiation of neural stem cell in malignant glioma progression, Oncogenic Ras signaling による神経幹細胞分化制御機構のグリオーマ悪性化進展における役割 第68回日本癌学会学術総会、横浜、平成21年10月2日

仲一仁、星居孝之、村口輝行、田所優子、大塩貴子、本山昇、平尾敦: Foxo3a is essential for maintenance of chronic myelogenous leukemia-initiating cells. 第71回日本血液学会総会、京都、平成21年10月23-25日

星居孝之、村口輝之、大塩貴子、仲一仁、平尾敦: TSC-mTOR シグナルによる造血幹細胞制御機構の解明 第71回日本血液学会学術集会、優PS-3-13、京都、平成21年10月25日

仲一仁、星居孝之、村口輝行、田所優子、大塩貴子、本山昇、平尾敦: Foxo3a is essential for maintenance of chronic myelogenous leukemia-initiating cells. 第7回幹細胞シンポジウム、東京、平成21年5月16-17日

村口輝行、星居孝之、大塩貴子、田所優子、仲一仁、平尾敦: p53- and Ink4a/Arf-independent growth arrest of neural stem/progenitor cells induced by oncogenic Ras signal in vivo. 第7回幹細胞シンポジウム、東京、平成21年5月15日

星居孝之、村口輝之、大塩貴子、仲一仁、平尾敦: TSC-mTOR signaling controls the hematopoietic stem cell pool through both intrinsic and extrinsic regulation. 第7回 幹細胞シンポジウム、P-19、東京、平成21年5月15日

村口輝行、星居孝之、大塩貴子、田所優子、仲一仁、平尾敦: Oncogenic Ras signaling による神経幹細胞分化制御機構のグリオーマ悪性化進展における役割 第10回 文部科学省特定領域「がん」5領域 若手研究者ワークショップ、長野、平成21年9月2日

腫瘍遺伝学研究分野

[研究スタッフ]

教授	大島 正伸		
助教	大島 浩子	大学院生(D4)	杜 宇深(~Sep 2009)
研究員	小熊 圭祐(学振 PD) Boryana Popivanova	(D3) (M1 医学)	孔 丹 野村 歩未
技能補佐員	渡邊 真奈美	(M1 薬学)	西尾 千尋

[研究概要]

胃がん・大腸がんの発生には、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異とともに感染や慢性炎症などの宿主生体反応が重要な役割を果たしている。当研究分野では腫瘍発生モデルマウスを作製し、それを用いた解析により発がんにおける生体反応の作用を解明することを目的として研究を進めている。

[2009年度の成果、進行状況と今後の計画]

(1) 「若年性ポリープ症」モデルマウス (*K19-Nog/C2mE*) の作製と解析

これまでに作製した *K19-Wnt1/C2mE* (*Gan*) マウスは、胃粘膜上皮での Wnt シグナル活性化と PGE₂ 経路の亢進により腺管型胃がんを自然発生する。一方で、「若年性ポリープ症」は BMP typeIA 受容体遺伝子変異に起因して消化管に過誤腫(hamartoma)を発生することが知られている。そこで、BMP シグナルの内在性阻害因子である Noggin を胃粘膜で発現する *K19-Nog* マウスを作製したが、BMP シグナルの抑制だけでは胃粘膜上皮に形態的変化は認めなかった。そこで、*K19-Nog* と胃粘膜で PGE₂ 経路を亢進させた *K19-C2mE* マウスの交配実験を行なった結果、*K19-Nog/C2mE* マウスの胃では BMP 抑制と PGE₂ 経路誘導の相互作用により過誤腫が発生した。以上の結果は、Wnt や BMP などの腫瘍発生原因の種類に関係なく、PGE₂ 経路の誘導が腫瘍発生に必要であることを示している。(Oshima H *et al*, *Cancer Res*, 69: 2729, 2009)

以上のマウスモデルに発生した胃腫瘍組織を用いてマイクロアレイ解析を共同研究で実施し、*Gan* マウスと *K19-Nog/C2mE* マウスの双方で発現誘導される因子を複数同定した。これらは、PGE₂ 経路活性化に依存的に誘導される因子と考えられ、今後、これらの遺伝子産物による腫瘍発生への影響について研究を進める。

(2) 消化管腫瘍発生過程における Sox17 遺伝子発現

Sox17 は SRY ファミリーに属する転写因子であり、大腸がん細胞ではプロモーター領域のメチル化により発現抑制されている。また、Sox17 には Wnt シグナル阻害作用があり、

がん細胞で強制発現させると腫瘍原性が低下することから、*Sox17* は癌抑制遺伝子と考えられている。しかし、*Gan* マウスの胃腫瘍組織や *Apc^{Δ716}* マウスに発生する腸管ポリープ組織では、予想に反して *Sox17* の強い発現誘導が認められた。さらに、Wntシグナルの活性化に依存して *Sox17* 発現が誘導されることも明らかにした。すなわち、Wnt シグナル亢進は、消化管腫瘍発生原因であると同時に、*Sox17* の発現誘導により Wnt 活性を抑制し、腫瘍発生に対して抑制性に作用している可能性が考えられた。そこで、胃粘膜で *Sox17* を発現するトランスジェニックマウス *K19-Sox17* を作製し、*Gan* マウスとの交配実験を行なった結果、腫瘍組織での Wnt シグナル活性低下と腫瘍サイズ縮小が認められた。これにより、腫瘍発生初期過程では、*Sox17* の発現誘導により腫瘍形成が抑制し得ることが確認された。(Du YC *et al*, *Gastroenterology*, 137: 1346, 2009)

今後、*Sox17* 発現が腫瘍の悪性化に予防的に作用している可能性を解析するため、胃および腸粘膜でコンディショナルに *Sox17* 遺伝子を欠損するマウスマルクと *Gan* マウスおよび *Apc^{Δ716}* マウスとの交配実験を行なう予定。

(3) 細菌感染による胃腫瘍発生への影響

胃粘膜に生存する細菌数は約 10^3 ~ 10^4 程度と少ないが、無菌の野生型マウスを作製すると、胃粘膜のサイトカイン・ケモカインの発現レベルが有意に低下することから、細菌感染刺激が胃粘膜上皮を恒常的に刺激している可能性が考えられた。そこで、無菌の *Gan* マウスを作製して解析すると胃腫瘍発生が顕著に抑制されており、感染刺激が腫瘍発生に重要である事が明らかとなった。さらに、30 週齢まで無菌環境で飼育した *Gan* マウスの胃内に *Helicobacter* を強制的に感染させると、再び腫瘍が発生することを確認した。腫瘍組織マクロファージ(tumor-associated macrophage)は腫瘍発生に重要であることが知られているが、無菌環境では胃腫瘍組織へのマクロファージ浸潤が著しくて以下し、それが腫瘍発生を抑制している可能性が考えられた。今後、感染刺激によるマクロファージ浸潤や活性化メカニズムを *in vitro*、*in vivo* の解析を組み合わせて明らかにしたい。

(4) Wnt 活性プロモーション機序の解析

活性化マクロファージが産生する TNF- α が、上皮細胞の Wnt 活性を亢進させて腫瘍発生に関与している可能性を昨年度に報告した(Oguma K *et al*, *EMBO J*, 2008)。今年度は、Wnt シグナル活性化の原因となる遺伝子変異のパターンによって、TNF- α 依存的な Wnt プロモーションの感受性が異なる可能性を示唆する研究成果が得られた。今後、*APC* 遺伝子の変異形式と TNF- α による Wnt 活性化との相関について、新たな細胞株を作製して詳細な解析を進める。

[発表論文・総説]

1. Oshima H, Itadani H, Kotani H, Taketo MM, and Oshima M. Induction of prostaglandin E₂ pathway promotes gastric hamartoma development with suppression of bone morphogenetic protein signaling. *Cancer Res* 69: 2729-2733, 2009.
2. Du Y-C, Oshima H, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Taketo, MM, and Oshima M. Induction and downregulation of *Sox17* and its roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 137: 1346-1357, 2009.
3. Oshima H, Oguma K, Du Y-C, and Oshima M. Prostaglandin E₂, Wnt and BMP in gastric tumor mouse models. *Cancer Sci* 100: 1779-1785, 2009 [Review].

[発表論文(共同研究)]

1. Ishimoto T, Oshima H, Oshima M, Kai K, Torii R, Masuko T, Baba H, Saya H, Nagano O. CD44(+) slow-cycling tumor cell expansion is triggered by cooperative actions of Wnt and PGE₂ in gastric tumorigenesis. *Cancer Sci* 2009 Dec 18 [Epub ahead of print].
2. Itadani H, Oshima H, Oshima M, Kotani H. Mouse gastric tumor models with PGE₂ pathway activation show similar gene expression profiles to intestinal-type human gastric cancer. *BMC Genomics* 10: 615, 2009.
3. Akaboshi S, Watanabe S, Hino Y, Sekita Y, Xi Y, Araki K, Yamamura K, Oshima M, Ito T, Baba H, and Nakao M. HMGA1 is induced by Wnt/β-catenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer. *Am J Pathol* 175: 1675-1685, 2009.
4. Miyoshi H, Deguchi A, Nakao M, Kojima Y, Mori A, Oshima M, Aoki M, and Taketo MM. Hepatocellular carcinoma development induced by conditional Wnt signal activation in Lkb+/- mice. *Cancer Sci* 100: 2046-2053, 2009.

[日本語総説]

1. 小熊 圭祐, 大島 正伸:分子細胞治療, 2009
2. 大島 正伸:COX-2/プロスタグランジンと消化器がん, The Lipid, 2009

[国際学会・国際シンポジウム] (*発表者)

1. Oguma K, Oshima H, Aoki M, Taketo MM, and *Oshima M: Activated macrophages promote Wnt/β-catenin signaling activity in gastric epithelial cells through TNF-α. *100th Annual Meeting of American Association for Cancer Research (AACR)*, (Denver) April 18-22, 2009.

2. *Oshima M. Gastric tumorigenesis caused by cooperation of inflammation and oncogenic activation: *17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*, (Kanazawa) July 3-4, 2009.
3. *Oguma K, Oshima H, Taketo MM, and Oshima M: Activation of Wnt signaling in gastric cancer cells by inflammatory macrophages. *17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages*, (Kanazawa) July 3-4, 2009.
4. *Oshima M: Prostaglandin E₂ signaling and inflammation in gastric tumorigenesis. *29th International Symposium on Cancer*, (Sapporo) July 13-14, 2009.
5. *Du Y-C, Oshima H, Oguma K, Kitamura T and Oshima M: Expression of Wnt antagonist Sox17 during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *29th International Symposium on Cancer*, (Sapporo) July 13-14, 2009.
6. *Oshima M: Gastric tumorigenesis through cooperation of oncogenic activation and COX-2/PGE₂ pathway. *International Symposium on TGF-β, Inflammation, and Cancer Prevention*, (Incheon, Korea), Nov 20, 2009.
7. *Oshima M, Oguma K, and Oshima H: Tumor macrophages and inflammatory pathway on gastric tumorigenesis. *14th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Kanazawa) Dec 19-20, 2009.
8. *Popivanova BK, Oshima M, and Mukaida N: Crucial involvement of the CCL2/CCR2 signaling in azoxymethane/dextran sulfate sodium-induced colon carcinogenesis in mice. *14th Korea-Japan Cancer Research Workshop*, (Kanazawa) Dec 19-20, 2009.

[国内学会] (*発表者)

1. *Oshima H, Oguma K, and Oshima M: Inflammation and gastric tumor mouse model [Symposium]. *68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
2. Oshima H, and *Oshima M: Gastric tumorigenesis through suppression of BMP signaling [International Session]. *68th Annual Meeting for Japanese Cancer Association*, (Yokohama) Oct 1-3, 2009. [日本癌学会学術総会]
3. *大島 正伸: 胃がん発生における COX-2/PGE₂経路の役割. 第 51 回日本消化器病学会大会(京都), Oct 16, 2009.
4. *小熊 圭祐, 大島 浩子, 大島 正伸: Promotion of Wnt/β-catenin signaling by TNF-α in gastrointestinal tumor cells. 第 32 回日本分子生物学会年会(横浜), Dec 9-12, 2009.

腫瘍分子生物学研究分野（旧幹細胞医学研究分野、2009年12月1日新研究分野発足）

高橋智聰教授
木戸敬治助教
鈴木美砂技能補佐員

I. 研究概要

2009年度の成果、進行状況と今後の計画

1. Rb-Ras 経路の解明から *in vivo*・*in vitro* がん幹細胞モデル系の開発へ

Rb がん抑制遺伝子不活性化による腫瘍の悪性化が細胞老化と DNA 損傷応答によって拮抗されること、さらに、N-Ras の追加不活性化がこれらの生体防御機構を破綻させ、がん悪性化を促進することを解明した。東京女子医大内分泌外科（岡本・小原博士）との共同研究によって、散発性の甲状腺臓様がんにおいて、Rb と N-Ras の同時不活性化が起こる例があることを見いだした。そして、Rb が E2F あるいは SREBP 転写因子を介して Ras タンパク質をはじめとする様々な低分子 GTPase タンパク質群の成熟（イソプレニル化）を制御する機構を解明した(Shamma ら Cancer Cell)。さらに、Rb 不活性化に拮抗する DNA 損傷応答の意義および分子機構を Rb-ATM や Ink4a-ATM ダブルノックアウトマウスを用いて解析した(Shamma ら投稿準備中)。一方、Rb-Ras 経路がマウス初期纖維芽細胞あるいは甲状腺カルシトニン産生細胞からの胚幹細胞様・がん幹細胞様細胞集団の誘導において重要な役割を果たすことを見いだした。このことをを利用して、がん幹細胞を *in vivo* で可視化するマウス、そして、ケミカルライブラリーを用いた high-throughput な薬剤探索（がん幹細胞標的薬）および種々の発現・発現抑制ライブラリーやマイクロアレー解析（microRNA を含む）による網羅的遺伝子探索に適した *in vitro* がん幹細胞モデル系の樹立を目指している。これまでに、shRNA 発現ライブラリーを用い、Rb と協調して細胞不死化あるいはがん幹細胞化に貢献すると思われる数個の遺伝子を同定し、解析中である。

2. RECK のがん抑制作用

我々が **Ras** シグナルへの拮抗作用をもとに同定した II 型がん抑制遺伝子 **RECK** によって制御される細胞内シグナルを同定した。**β1-Integrin/FAK** シグナル(三木ら論文受理)、**EGFR/ERK** シグナルと **PI3K/AKT** シグナル(北嶋ら投稿中)である。両者の制御様式とともに、**RECK** の **MMP** 制御因子としての機能に依存するものと思われた。後者の研究では、**RECK** が **Ras** シグナル経路に拮抗する機序の一端を明らかにすることができた。**Ras** をはじめとする様々な **RNA・DNA** ウィルスがん遺伝子やいわゆる '*oncomir*' (*oncogenic microRNA*) のひとつである **miR-21**(Loayza-Puch ら **Oncogene**)などが **RECK** を転写的標的とすること、また、**RECK** は **ADAM** ファミリーとの相互関係を介して **Notch** シグナルに干渉することなどが明らかになりつつあり、細胞外シグナルの変換装置としての **RECK** の機能に注目している。また、野田らによって分泌型 **RECK** タンパク質のおおざっぱな三次構造が解かれ(大村ら **JBC**)、我々も、マススペクトル法を用いて(京都大学・キリンビール大川博士との共同研究)、**RECK** と **MT1-MMP** およびいくつかの分泌型 **MMP** との作用点をアミノ酸レベルで同定した。これらの部位は **MMP** 群の基質に類似した構造を持っていた(竹上ら投稿準備中)。これらの成果に基づき **RECK** 作用の分子機構をさらに明らかにする。

II. 研究業績

発表論文

原著

1. A. Omura, T. Matsuzaki, K. Mio, T. Ogura, M. Yamamoto, A. Fujita, K. Okawa, H. Kitayama, C. Takahashi, C. Sato, and M. Noda. RECK forms cowbell-shaped dimmers and inhibits MMP-catalyzed cleavage of fibronectin. *J. Biol. Chem.* 284: 3461-3169, 2009.
2. A. Shamma, Y. Takegami, T. Miki, S. Kitajima, M. Noda, T. Obara, T. Okamoto, and C. Takahashi. Rb regulates DNA damage response and cellular senescence through E2F-dependent suppression of N-Ras Isoprenylation. *Cancer Cell* 15: 255-269, 2009.
3. F. Loayza-Puch, Y. Yoshida, T. Matsuzaki, C. Takahashi, H. Kitayama, and M. Noda. Hypoxia and RAS signaling pathways converge on, and cooperatively down-regulate, the RECK tumor suppressor protein via microRNAs. *Oncogene* (in press), 2010.

総説

1. C. Takahashi, T. Muraguchi, Y. Takegami, and T. Miki. Regulation of Notch signaling and its polarity mediated by ectodomain shedding of DSL ligands. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* (in Japanese) Oct; 54(13): 1742-1746, 2009.
2. C. Takahashi, Y. Takegami, and A. Shamma. The genetic and biochemical interactions of Rb and ras. *Seikagaku* (in Japanese) Oct; 81(10): 873-883, 2009.

学会発表

1. C. Takahashi and A. Shamma

The function and mechanism of pRb-N-Ras pathway in metastatic conversion of

neuroendocrine thyroid tumor. Korean Society for Biochemistry and Molecular Biology (KSBMB)シンポジウム (2009) 5月 13日 Seoul, Korea (招待講演であったが、新型インフルエンザ流行のため渡航自粛要請あり、講演を辞退)

2. C. Takahashi and A. Shamma

The genetic interaction of Rb and ras in the multi-step carcinogenesis model.

癌学会総会シンポジウム (2009) 10月 1日横浜

3. A. Shamma and C. Takahashi

Critical role of cellular senescence mediated by N-Ras isoprenylation in suppressing Rb-deficient C-cell carcinogenesis.

癌学会総会口頭発表 (2009) 10月 2日横浜

4. C. Takahashi, Yujiro Takegami, Takao Miki, Shunsuke Kitajima and A. Shamma

The genetic interaction of Rb and ras unveiled by the study of compound knockout mice.

日本生化学会大会シンポジウム (2009) 10月 22日神戸

5. S. Kitajima, T. Miki, C. Takahashi

RECK regulates p53-p21-dependent cellular senescence in mouse embryonic fibroblasts.

日本分子生物学会年会ポスター発表 (2009) 12月 12日横浜

腫瘍制御（旧 遺伝子診断）研究分野

【研究スタッフ】(2009年現在)

教授 源 利成； 准教授 川上和之

ポスドク研究員 金 明姫

大学院 [博士課程] 宮下勝吉 (脳神経外科, 3月まで), 斎藤健一郎 (心肺総合外科), 麦 威 (3月まで), 松之木愛香 (心肺総合外科; 米国留学), 王 利明 (国費)

[修士課程] 北野綾子 (薬学系), 近野祐里 (薬学系)

研究支援推進員: 浅香敦子

技能補佐員: 枚井亜希子 (11月から), 麦 威 (14条特例; 3月まで)

共同研究員: 山下 要 (腫瘍外科), 小竹優範 (石川県立中央病院消化器外科)

【研究分野の概要と研究成果】

消化器がんと呼吸器がんを中心に, がんの多様な分子細胞病態と腫瘍外科的特性の解明を目指して, 基礎・臨床橋渡し研究を実施している。今年度は神経膠芽腫 (本学脳神経外科) と肺がん治療 (金沢医科大学腫瘍内科) の臨床研究を共同でそれぞれ開始, 立案した。

1. がん化シグナル誘導の分子細胞機構とがん制御への応用 (源, 川上)

(1) Wnt シグナル制御破綻に関わる新しい分子細胞機構

Wnt 経路の制御破綻が固有のがん化シグナルを誘発する仕組みと, それを修飾する分子細胞機構を解明するために β -cateninを中心とするがん化シグナルネットワークの概念を創出し, これを具現化する。大腸がんの腫瘍一宿主境界の微小環境における β -catenin 活性化の重要性, β -catenin と I κ B α に共通のユビキチン連結酵素 β -TrCP の同定, β -TrCP を転写後に制御する Wnt 経路の新規転写標的 coding region determinant-binding protein (CRD-BP) の同定と, これらの分子の制御異常と病的作用を見出した。CRD-BP は c-myc や IGF-II の RNA トランス因子であり, 大腸がんで複数の細胞増殖経路 (Wnt, NF- κ B, c-Myc, IGF-II) を機能的に結びつけると仮定し, 臨床がんの解析を進めている。今年度は, CRD-BP が Gli-1 mRNA の安定化により, 大腸がんの Wnt と Hedgehog 経路の交差応答を形成することを明らかにした (Cancer Res 2009)。また, CRD-BP の hTERT mRNA 安定性に対する作用や, 腸上皮細胞の極性輸送の制御異常にともなう E-cadherin の発現変化と β -catenin 活性化の関連などについて共同研究を開始した。

(2) 慢性進行性疾患の創薬標的 GSK3 β の消化器がんにおける発現, 活性, 機能解析

正常細胞の Wnt 経路制御作用からがん抑制的に働く機能分子と認識されている glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)の大腸がんへの関与に着目した。そして, GSK3 β の過剰発現やそのリン酸化による酵素活性調節の破綻が腫瘍細胞の生存や増殖を維持・推進するという, Wnt 経路抑制機能とは異なる病的作用を発見した。その後, GSK3 β 阻害の制がん効果を消化器がん細胞と担がん動物で実証し, 本酵素が新しいがん治療標的であると提唱した (国際出願)。今年度は, その制がん効果の分子メカニズムは細胞周期やがん抑制分子経路によるものであることを明らかにした (Clin Cancer Res 2009, 2報)。本研究成果を基にして, GSK3 β 阻害効果を示す医薬品による再発神経膠芽腫治療の臨床研究を本学附属病院脳神経外科で開始した。同様に, 切除不能・再発肺がん治療の臨床研究を金沢医科大学腫瘍内科と共同で立案中である。今後は, GSK3 β が制御するがん細胞の形態特性と運動性, 代謝動態や蛋白質リン酸化特性と, 本酵素阻害のがん化学予防効果を検討する。

2. 遺伝薬理学的解析によるオーダーメイドがん化学療法 (川上, 源)

遺伝子の発現量や遺伝子型を抗がん剤の感受性・有害事象予測に利用し, オーダーメイド化学療法を実現させることを目的に研究を進めている。5-FU のターゲット酵素であるチミジル酸合成酵素 (TS) の遺伝子発現, 遺伝子型, LOH の存在に加え, 複数の核酸・葉酸代謝酵素遺伝子発現・遺伝子型と抗がん剤感受性の関連を消化器がん, 肺がんを対象に解析している。

本年度は、肺がんを対象として葉酸代謝酵素の遺伝子発現量と組織内葉酸量の関連を解析したところ、腺癌では扁平上皮癌に比較して細胞内への葉酸取り込みをより促進させる遺伝子発現変化を認めた。この結果は、肺がんにおいて組織型別に葉酸拮抗剤の使用を個別化できる可能性を示唆する。

3. エピジェネティクスを標的にするがん診断・治療法の開発（川上、源）

がん細胞におけるエピジェネティックな変化とその背景にある代謝変動の理解を進め、これをがん予防・診断・治療の新たな戦略構築に応用することをめざしている。エピジェネティックな変化のうち、とくにDNAメチル化を解析対象として、がん表現型である CpG island methylator phenotype (CIMP), MSI, chromosomal instability 相互の関連を観察し、大腸がんをモデルに発がん経路をジェネティック・エピジェネティックな変化により説明することを試みている。CIMP(+)がんでは組織の葉酸代謝が亢進し、葉酸の細胞外排出に関与する酵素 (GGH) の発現低下を認めることを昨年度報告した。本年度は、CIMP(+)細胞を使用して GGH 強制発現細胞を作成し DNA メチル化の変動を解析した。GGH 強制発現細胞ではその親株に比較して DNA メチル化は低下し、葉酸代謝の変動ががんにおける異常な DNA メチル化の一因になることを実証した。現在 GGH 強制発現細胞を用いて代謝拮抗剤への反応性などを解析している。また、昨年度特許出願したメチル化マーカーである LINE-1 の臨床的意義を肺がんにて検討した。379 例の非小細胞肺がん患者のがん組織における LINE-1 メチル化を測定し、その予後因子としての意義を検討したところ、stage IA の患者群で LINE-1 の低メチル化は独立した予後不良因子となることを観察した。さらに、LINE-1 のメチル化が 5-FU 感受性と相關する機構を解析し、5-FU による LINE-1 の発現亢進とそれに伴う DNA 2 重鎖切断が背景にあることを発見した。現在、この機構を利用した新規治療法の開発を行っている。

4. ヒト消化管がん組織検体資源化：プロジェクト K（源、川上）

がんの分子・細胞レベルの変化、代謝変動や遺伝子改変動物の解析から得られる結果を実際のがん病巣で具現化してはじめて、がんの臨床に導入することができる。医科学研究に共通する時代の要請である。そのためには、ヒトのがん検体は必須である。この目的で、当研究所腫瘍外科研究分野と協力して、200 例以上の胃がん・大腸がん手術症例の臨床検体を集積してきた。がん組織と非がん粘膜からゲノム DNA, 全 RNA, cDNA, 多目的（蛋白質解析）用凍結組織、凍結切片ブロック、パラフィンブロックを作成し、臨床病理情報を含めて資源化した。2007 年秋から、当研究所腫瘍外科診療科で手術を実施できることになった。このため、消化管がん治療の臨床研究を兼ねて、2008 年末から本学附属病院胃腸外科と市中の基幹病院（金沢赤十字病院、石川県立中央病院、金沢医科大学病院）外科と連携して、本事業を継続することとした。今後の 5 年間で大腸がん 1,000 例、胃がん 500 例の集積を当面の目標としている。本プロジェクトの活動は関連学会で発表し、次年度以降も発表を継続する。

[註]アンダーラインは研究スタッフ、研究協力員および共同研究員

論文発表

原著

1. Mai W, Kawakami K, Shakoori A, Kyo S, Miyashita K, Yokoi K, Jin MJ, Shimasaki T, Motoo Y, Minamoto T. Deregulated glycogen synthase kinase 3 β sustains gastrointestinal cancer cells survival by modulating human telomerase reverse transcriptase and telomerase. *Clin Cancer Res* 15 (22): 6810-9, 2009, Published online first on Nov 10, 2009.
2. Jin MJ, Kawakami K, Fukui Y, Tsukioka S, Oda M, Watanabe G, Takechi T, Oka T, Minamoto T. Different histological types of non-small cell lung cancer have distinct folate and DNA methylation levels. *Cancer Sci* 100 (12): 2325-30, 2009, Epub ahead of print Aug 25, 2009.
3. Noubissi FK, Sanek NA, Kawakami K, Minamoto T, Moser A, Grinblat Y, Spiegelman VS. Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA. *Cancer Res* 69 (22): 8572-8, 2009; Epub ahead of print Nov 3, 2009.
4. Du YC, Oshima H, Oguma K, Kitamura T, Itadani H, Fujimura T, Piao YS, Yoshimoto T, Minamoto T, Kotani H, Taketo MM, Oshima M. Induction and downregulation of Sox17 and its possible roles during the course of gastrointestinal tumorigenesis. *Gastroenterology* 137 (4): 1346-57, 2009 [Epub ahead of print, Jun 20, 2009].
5. Howlett M, Giraud AS, Lescesen H, Jackson CB, Kalantzis A, van Driel IR, Robb L, Van der Hoek M, Ernst M, Minamoto T, Boussioutas A, Oshima H, Oshima M, Judd LM. The IL-6 family cytokine IL-11 regulates homeostatic epithelial cell turnover and promotes gastric tumor development. *Gastroenterology* 136 (3): 967-77, 2009. Epub ahead of print, Dec 3, 2008.
6. Miyashita K, Kawakami K, Mai W, Shakoori A, Fujisawa H, Nakada M, Hayashi Y, Hamada J, Minamoto T. Potential therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3 β inhibition against human glioblastoma. *Clin Cancer Res* 15 (3): 887-897, 2009.

著書・総説

7. Nakada M, Kita D, Hayashi Y, Kawakami K, Hamada J, Minamoto T. RNAi in malignant brain tumors: relevance to molecular and translational research. In; Erdmann VA, Barciszewski J, eds., *RNA Technologies and Their Applications*, Springer Verlag, in press.
8. Miyashita K, Nakada M, Shakoori A, Ishigaki Y, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. An emerging strategy for cancer treatment targeting aberrant glycogen synthase kinase 3 β . *Anti-Cancer Agents Med Chem* 9 (10): 1114-22, 2009.

学会発表

国際学会

1. Kazuyuki Kawakami, MingJi Jin, Kenichiro Saito, Aika Matsunoki, Wei Mai, Go Watanabe, Toshinari Minamoto. Allele-specific inhibition of thymidylate synthase expression by small interfering RNA. Annual Meeting 2009 of the American Association

for Cancer Research, April 18-22, 2009, Denver, CO.

2. Minamoto T, Kawakami K. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 β inhibition for cancer treatment. 第 14 回日韓がん研究ワークショップ, 2009 年 12 月 18—19 日, 金沢.

国内学会

3. 島崎猛夫, 石垣靖人, 夏 啓勝, 中谷直喜, 友杉直久, 田中卓二, 川上和之, 源利成, 元雄良治. GSK3 β 阻害剤と塩酸ゲムシタビンの併用による膵癌の新規治療戦略と分子基盤. 第 40 回日本膵臓病学会大会, シンポジウム 2 : 膵癌に対するトランスレーショナルリサーチの展望—bench to bed, bed to bench—, 2009 年 7 月 30—31 日, 東京.
4. 中田光俊, 林 裕, 喜多大輔, 宮下勝吉, 玉瀬 玲, 上出智也, 田中慎吾, 林 康彦, 内山尚之, 源 利成, 濱田潤一郎. GSK3 β を分子標的とした再発 GBM に対する第 I/II 相臨床試験. 第 10 回日本分子脳神経外科学会, 2009 年 9 月 19—20 日, 岡山.
5. Iacopetta B, Kawakami K. The CpG island methylator phenotype as a predictor of response to 5FU-based chemotherapy in colon cancer. 第 68 回日本癌学会総会学術集会 International Session 1, 2009 年 10 月 1 日—3 日, 横浜.
6. Kazuyuki Kawakami, Aika Matsunoki, MingJi Jin, Kenichiro Saito, Go Watanabe, Toshinari Minamoto (川上和之, 松之木愛香, 金 明姫, 斎藤健一郎, 渡邊 剛, 源 利成). Augmentation of LINE-1 expression is a possible mechanism underlying cytotoxic effect of 5-FU in colorectal cancer (LINE-1 の発現増強は大腸がんにおける 5-FU の抗腫瘍効果発現メカニズムに関与する). 第 68 回日本癌学会総会学術集会, 2009 年 10 月 1—3 日, 横浜.
7. Takeo Shimasaki, Yasuhito Ishigaki, Qisheng Xia, Takanobu Takata, Ayako Kitano, Hideo Nakajima, Naohisa Tomosugi, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto, Yoshiharu Motoo (島崎猛夫, 石垣靖人, 夏 啓勝, 高田尊信, 北野綾子, 中島日出夫, 友杉直久, 川上和之, 源 利成, 元雄良治). Chemotherapy-induced changes in morphology and invasion ability of pancreatic cancer cells (化学療法剤により誘導される膵癌細胞の形態と浸潤性の変化). 第 68 回日本癌学会総会学術集会, 2009 年 10 月 1—3 日, 横浜.
8. Ayako Kitano, Takeo Shimasaki, Yasuhito Ishigaki, Yuri Chikano, Mingji Jin, Ken-ichi Miyamoto, Yoshiharu Motoo, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto (北野綾子, 島崎猛夫, 石垣靖人, 近野祐里, 金 明姫, 宮本謙一, 元雄良治, 川上和之, 源 利成). Pathological roles for glycogen synthase kinase (GSK) 3 β in proliferation and motility of pancreatic cancer cells (膵がん細胞の増殖と細胞運動における glycogen synthase kinase (GSK) 3 β の病的作用). 第 68 回日本癌学会総会学術集会, 2009 年 10 月 1—3 日, 横浜.
9. MingJi Jin, Kazuyuki Kawakami, Yasuhito Ishigaki, Abbas Shakoori, Ayako Kitano, Yuri Chikano, Takeo Shimasaki, Yoshiharu Motoo, Toshinari Minamoto (金 明姫, 川上和之, 石垣靖人, シャクーリ アッバス, 北野綾子, 近野祐里, 島崎猛夫, 元雄良治, 源 利成). Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β sustains colon cancer cells survival by modulating JNK-mediated pathway. 第 68 回日本癌学会総会学術集会, 2009 年 10 月 1—3 日, 横浜.
10. 川上和之, 源 利成. DNA メチル化マーカーによる大腸がんの予後・抗癌剤感

受性診断. 第 17 回日本消化器関連学会週間 (JDDW 2009) ／第 51 回日本消化器病学会大会 : シンポジウム 6. 消化器癌におけるエピジェネティクス, 2009 年 10 月 14—17 日, 京都.

11. 中田光俊, 林 裕, 喜多大輔, 宮下勝吉, 玉瀬 玲, 上出智也, 田中慎吾, 林 康彦, 内山尚之, 源 利成, 濱田潤一郎. 再発神経膠芽腫に対する GSK3 β を分子標的とした Phase I/II 臨床試験. 第 68 回日本脳神経外科学会総会: シンポジウム, 2009 年 10 月 14—16 日, 東京.
12. 山下 要 (優秀賞), 藤田秀人, 伴登宏行, 川上和之, 西村元一, 源 利成. ヒト消化管がん組織検体資源化の試み: がん研究とがんの個別化医療への応用. 第 47 回日本がん治療学会総会学術集会: 優秀演題, 2009 年 10 月 22—24 日, 横浜.
13. 川上和之, 源 利成. LINE-1メチル化解析による大腸がんの予後・抗癌剤感受性診断. 第 20 回消化器癌発生学会総会: シンポジウム (3) 消化器癌診断の新展開, 2009 年 11 月 26—27 日, 広島.
14. 島崎猛夫 (最優秀賞), 石垣靖人, 高田尊信, 北野綾子, 夏 啓勝, 友杉直久, 川上和之, 源 利成, 元雄良治. GSK3 β 阻害による抗がん剤誘導性上皮一間葉移行の制御に基づく新規肺癌治療ストラテジー. 第 20 回消化器癌発生学会総会: シンポジウム (2) 消化器癌治療の新展開, 2009 年 11 月 26—27 日, 広島.
15. 北野綾子, 島崎猛夫, 東 朋美, 近野祐里, 石垣靖人, 元雄良治, 宮本謙一, 川上和之, 源 利成. GSK3 β による肺がん細胞の増殖と浸潤の制御. 第 20 回消化器癌発生学会総会: ミニシンポジウム (5) – 3 消化器癌の分子基盤: 浸潤・転移 – 3, 2009 年 11 月 26—27 日, 広島.

座 長

16. 源 利成. 一般演題 (口演) : がん転移抑制. 第 68 回日本癌学会総会学術集会, 2009 年 10 月 1—3 日, 横浜.

O-055 Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya (竹下文隆, 落谷孝広). Studies on RNA interference- mediated inhibition of cancer metastasis (RNA interference を応用したがん転移抑制効果の検討).

O-056 Masa-aki Shibata, Junji Morimoto, Yoshinori Ohtsuki (柴田雅朗, 森本純司, 大槻勝紀). Suppression of metastasis by combination therapy with siRNA vectors against VEGF-C and -A in mouse mammary cancer model (VEGF-C ないしは VEGF-A を標的とする siRNA ベクター複合投与によるマウス乳癌モデルでのリンパ節・肺転移の抑制).

O-057 Yu Ohkubo, Mayumi Iwama, Ken-ichiro Seino, Takashi Imai (大久保 悠, 岩川 真由美, 清野研一郎, 今井高志). Combined therapy of Carbon-ion irradiation and immunotherapy inhibit lung metastases in an in vivo murine model (マウス腫瘍モデルにおける炭素イオン線と免疫療法併用による肺転移抑制効果).

O-058 Ikumi Sugiyama, Yasuyuki Sadzuka (杉山育美, 佐塚泰之). Inhibition of hepatic metastasis by DOX contained DDA-PEG modified liposome in murine sarcoma model (マウス卵巣肉腫細胞肝転移に対する DDA-PEG 修飾リポソームの抑制効果).

17. 源 利成. 第 22 回教育講演会. 第 109 回日本消化器病学会北陸支部例会, 2009 年 11 月 15 日, 石川県能美市.

西村元一. 大腸癌の標準的化学療法

18. 源 利成. ミニシンポジウム (5)-3 消化器癌の分子基盤：浸潤・転移－3. 第 20 回消化器癌発生学会総会, 2009 年 11 月 26—27 日, 広島.

MS (5)-3-1. 羅 奕, 藤井 澄, 梶原義典, 佐藤真吾, 國安広基. 脂肪酸の大腸癌転移に及ぼす影響.

MS (5)-3-2. 大森 斎, 大家理伸, 森若優希子, 笹平智則, 立本直邦, 國安広基. 大腸癌のアングオテンシン活性化能は肝転移と相關する.

MS (5)-3-3. 小林 力, 鈴木秀樹, 久保憲生, 新木健一郎, 矢島俊樹, 和田 渉, 堤 荘一, 志村龍男, 桑野博行. 膵癌細胞株における galectin-3 の役割.

MS (5)-3-4. 北野綾子, 島崎猛夫, 東 朋美, 近野祐里, 石垣靖人, 元雄良治, 宮本謙一, 川上和之, 源 利成. GSK3βによる膵がん細胞の増殖と浸潤の制御.

MS (5)-3-5. 新木健一郎, 鈴木秀樹, 久保憲生, 小林 力, 矢島俊樹, 和田 渉, 堤 荘一, 末廣剛敏, 志村龍男, 浅尾高行, 桑野博行. 胆管癌における E/N-cadherin functional switch を介した腫瘍進展の検討.

その他

19. 源 利成 (依頼). 発がん学, がん医科学とがん医療—消化器がんを中心に—. がんにおける質の高い看護師育成研修会, 2009 年 1 月 20 日, 金沢大学附属病院, 金沢.

20. 源 利成 (依頼). がんの医学と研究. 石川県立金沢泉丘高等学校 SSH (Super Science High School) 模擬講義, 2009 年 1 月 30 日, 金沢大学医学部, 金沢.

21. 源 利成 (招請). 糖尿病, 精神神経疾患とがんを繋ぐ疾患マーカーの同定. 第 34 回北陸臨床病理集談会第 17 回セミナー, 2009 年 9 月 26 日, 金沢.

22. 源 利成 (招請). Wnt 関連経路の制御破綻と消化器がんの病態, 治療. 第 7 回福岡外科セミナー, 2009 年 10 月 16 日, 福岡.

機能ゲノミクス研究分野

<研究スタッフ>

教授： 鈴木健之

助教： 石村昭彦

博士研究員： 寺島農

事務補佐員： 小田原敦子

<研究の概要>

本研究分野では、マウス白血病ウイルスに感染した発がんモデルマウスを用いて、ウイルス挿入変異の標的となるがん関連遺伝子を網羅的に同定し、その機能や遺伝子間の相互作用を解析することで、がんの発症や悪性化の分子メカニズムを解明することを目指している。ヒストンのメチル化・脱メチル化に関与する酵素群の多くが、これまでに同定されており、新しいがん分子標的の候補として、特に注目して解析を進めている。

<今年度の成果、進行状況と今後の計画>

1) ヒストンのメチル化を制御する酵素群のがんにおける重要性

ウイルス挿入変異の大規模な解析から、高頻度に単離される標的として、ヒストンのメチル化酵素 17 種(Ezh2, Setd7, Smyd2 など)と脱メチル化酵素 11 種(Fbxl10, Jmjd3, Jmjd2c など)を同定した。メチル化、アセチル化、リン酸化などヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA 複製、X 染色体不活性化をはじめとする様々な生物学的現象に関与している(ヒストンコード仮説)。ヒトのがんでは、ヒストンのアセチル化酵素の変異や脱アセチル化酵素の発現異常が検出され、脱アセチル化酵素の阻害剤が既に抗がん剤として開発されている。これに対し、ヒストンのメチル化と発がんの関係は、脱メチル化酵素の発見が比較的最近のため、まだ十分に解析が進んでいない。私たちは、候補となるメチル化を制御する酵素群について、本研究所のヒトがん組織バンク(腫瘍内科・矢野教授、腫瘍制御・源教授との共同研究)を利用し、ヒトのがんにおける発現様式を解析している。肺がん組織では、一部のメチル化酵素(Setd3, Suv39h1 など)と脱メチル化酵素(Plu1, Jmjd2b など)の発現異常がこれまでに検出された。酵素を高発現する肺がん細胞株で、siRNA によって酵素の発現をノックダウンすると、細胞増殖の著しい抑制が観察されており、メチル化の脱制御によるクロマチン機能の異常が、ヒトのがんで重要な役割を果たしていることが示されつつある。

2) ヒストンのメチル化制御酵素による遺伝子発現の調節

メチル化制御酵素の発現異常が細胞内の遺伝子発現に与える影響を調べるために、

がん遺伝子候補 (Jmjd2c, Plu1 など) や、がん抑制遺伝子候補 (Utx, Jmjd3 など) の酵素の発現を ON/OFF できる細胞株を樹立し、cDNA の大規模シークエンシングによる発現プロファイリングを行っている（東大新領域・菅野教授との共同研究）。本年度は、食道がんで高発現が見られる Jmjd2c 脱メチル化酵素が、Mdm2 がん遺伝子の発現上昇を誘導し、細胞内の p53 がん抑制遺伝子産物の減少を引き起こすことを明らかにした。その際、Mdm2 遺伝子発現制御領域に Jmjd2c がリクルートされ、その領域に存在するヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) の脱メチル化を介して、クロマチン構造を転写抑制状態から転写活性化状態に変換することを見いたしました。このように、標的遺伝子の発現とともに、その発現制御領域でのヒストンの翻訳後修飾の変化を調べることで、がん細胞における遺伝情報発現異常の本質を理解していきたい。

3) メチル化制御酵素のヒストン以外の標的の探索

ルシフェラーゼレポーターを用いた転写制御活性の解析から、メチル化制御酵素のなかに、ヒストンだけでなく、p53, NFkB, AP1 などの転写制御因子や、Wnt シグナル経路の因子に直接的に影響を与える酵素 (Lsd1, Jmjd2a, Jmjd3, Smyd5, Whsc1l1 など) が存在することがわかった。いくつかのケース (Fos/Lsd1, Jun/Jmjd3 など) では、酵素と転写制御因子との相互作用を発見しており、現在、転写制御因子のメチル化の有無やその状態変化を調べている。こうした酵素の新しい作用メカニズムを解明するとともに、ヒストン以外の新規基質の探索をさらに進めることで、タンパク質の機能制御におけるメチル化修飾の普遍的な重要性を明らかにしたいと考えている。

4) がん関連遺伝子候補 Jmjd5 の機能解析

同定した候補のうち、Jmjd5 遺伝子産物は、ヒストン脱メチル化酵素のモチーフ JmjC ドメインを持つものの、それ単独での酵素活性が検出されていないユニークなタンパク質である。私たちは、Jmjd5 の生理機能や発がんにおける役割を解明するために、Jmjd5 conditional KO マウスを作製した。これまでに、Jmjd5 遺伝子の欠損により、胚性致死が引き起こされること、その際、細胞周期の制御因子 p21 の発現の亢進が見られることがわかった。また、p53 遺伝子や p21 遺伝子の KO マウスとの交配実験から、Jmjd5 と p53・p21 シグナル経路との間の遺伝学的な相互作用を示唆する結果が得られている。さらに、いくつかの組織で特異的な機能を担っていることが示唆されるため、conditional KO マウスを用いて、血液・血管細胞、神経細胞、破骨細胞での機能を調べる共同研究も進行している。

<発表論文>

原著

1. Ishimura A, Terashima M, Kimura H, Akagi K, Suzuki Y, Sugano S and Suzuki T. Jmjd2c histone demethylase enhances the expression of Mdm2 oncogene. Biochem. Biophys. Res. Commun. 389(2), 366-371, 2009.

<学会発表>

国際学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Involvement of histone methyltransferases and demethylases in mouse retrovirus-induced leukemia/lymphoma. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity, September 2009, Awaji, Japan.

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M, Ishimura A, Sugano S and Yoshida M. Involvement of protein methyltransferases and demethylases in oncogenesis identified by viral insertional mutagenesis. 第68回日本癌学会学術総会（横浜2009年10月）
2. Ishimura A and Suzuki T. Functional analysis of Jmjd5, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第68回日本癌学会学術総会（横浜2009年10月）
3. Terashima M, Ishimura A, Kimura H, Suzuki Y, Sugano S and Suzuki T. Transcriptional regulation by the JmjC-domain-containing proteins involved in cancer. 第32回分子生物学会年会（横浜2009年12月）
4. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T and Suzuki T. Functional analysis of Jmjd5, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第32回分子生物学会年会（横浜2009年12月）

腫瘍動態制御研究分野

<研究スタッフ>

教授:	松本邦夫	助教:	中村隆弘
研究員:	中山瑞穂	研究員:	鈴木芳典
大学院生:	徐慶	大学院生:	小松義継
大学院生:	藤川雅崇	技術補佐員:	丹保智佳子
事務補佐員:	端谷 泉		

<研究概要>

HGF(hepatocyte growth factor)はMetチロシンキナーゼを受容体として生理活性を発揮する。HGFは上皮-間葉相互作用を介した形態形成、肝臓や腎臓をはじめとする組織の再生を担う一方、癌の浸潤・転移に深く関与する。私達は癌-間質相互作用を介した癌悪性化におけるHGF-Met系の意義とNK4(HGFアンタゴニスト・血管新生阻害分子)による制癌研究、バーチャル技術を用いたHGF-Met系阻害剤の創薬研究、HGF-Met系を介した組織再生(肝再生など)の制御と治療の研究などを行っている。

<今年度の主な成果と今後の計画>

1. NK4の血管新生阻害機構の研究

癌の浸潤・転移阻止を目指して、HGF-Met系阻害分子としてNK4を初めて見出した。その後、NK4は血管新生阻害作用を有することを明らかにしたが、そのメカニズムが不明であった。そこで、NK4の血管新生阻害機構を明らかにするための研究を進めた。NK4は血管内皮細胞におけるfibronectinのcell-associated assemblyを阻害し、これによりインテグリン-Rac系シグナルを阻害することによって増殖を抑制した。一方、siRNAによってMet受容体をノックダウンした内皮細胞においても依然としてNK4による血管新生阻害作用が認められ、血管新生阻害にはMet受容体とは異なるNK4結合分子の関与が考えられた。NK4固相化カラムによる部分精製、SDS-PAGE、質量分析を用いて血管内皮細胞膜のNK4結合分子を複数同定した。共局在の解析、siRNAによるノックダウンによるNK4活性の阻害などによってNK4の血管新生阻害を担う分子がperlecanであることをつきとめた。Perlecanは複数の細胞外マトリックスと結合し血管新生に必須の基底膜の構築に関与する。したがって、NK4はperlecanへの結合を介してfibronectinなどの構築を阻害し、これによってインテグリン-Rac系シグナルを阻害することによってbFGFやVEGFなど、HGF以外の血管新生因子によって誘導される血管新生をも阻害することが明らかになった。NK4の血管新生阻害機構が明らかになったことで2機能性制癌分子としてのNK4の特徴と意義がいっそう明確になった。

2. NK4による制癌研究:悪性中皮腫の浸潤性成長阻害と悪性黒色腫の肺転移阻害

悪性胸膜中皮腫の発症にはアスベスト暴露が関与し、胸膜などへの極めて活発な浸潤性成長を特徴としている。ヒト悪性中皮腫の浸潤性成長におけるHGF-Met系の意義、移植モデルでの悪性中皮腫に対するNK4の制癌作用について解析した。その結果、ヒト悪性中皮腫に対してHGFが細胞の遊走やコラーゲンゲル内での3次元浸潤を促す一方、NK4はMet活性化、細胞遊走、コラーゲンゲル内浸潤を阻害した。さらに、ヒト悪性中皮腫をの皮下移植モデルでNK4遺伝子治療の制癌作用を調べた結果、主に血管新生阻害を介して腫瘍の成長を阻害することを明らかにした。悪性胸膜中皮腫に対する制癌剤としてのNK4の有用性

が明らかになった。また、肺癌ならびに悪性黒色腫に対して NK4 遺伝子治療が高効率に肺転移を阻害することを明らかにした。臨床試験に向けて、NK4 遺伝子治療臨床研究への協力、組換え NK4 タンパク質の製造・血中安定化・徐放性製剤の研究を進めている。上記に加え、同研究所の矢野教授の研究で NK4 が gefitinib 耐性を克服すること、平尾教授の研究で脳腫瘍の癌幹細胞の活発な浸潤性に HGF-Met 系活性化が重要な役割を担うことなども明らかにされた。

2. HGF-Met 受容体系を標的とするインシリコ分子創薬研究

タンパク質-化合物ドッキング計算などのバーチャル技術やタンパク質結晶解析の研究者と協力し、HGF-Met 阻害作用をもつ低分子化合物による創薬研究を進めている。約 3,000,000 化合物を出発として HGF-Met 系に対する阻害活性をもつリード化合物を数個見出すとともに、リード化合物と標的タンパク質との共結晶構造の解析に成功した。今後、リード化合物-標的タンパク質複合体の結晶構造解析に基づく最適化と *in vitro/in vivo* 薬効評価を進める予定である。

3. Kremen の生理機能の研究

Kremen (Krm) は中村助教によって新規受容体様分子として見出され、その後 Wnt シグナル制御に関与することが明らかにされたが、生理機能は不明である。そこで、Wnt シグナルや癌細胞形質の制御における Krm の生理機能の解析を進めている。

4. HGF による疾患治療の基礎研究

医学系研究科機能再建学の富田教授・土屋准教授と共同で、HGF が骨延長促進作用、靭帯の損傷・断裂などに対する再生・治癒促進作用をもつことが明らかになった。

<論文>

1. Kishi, Y., Kuba, K., Nakamura, T., Wen, J., Suzuki, Y., Mizuno, S, Nukiwa, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Systemic NK4 gene therapy inhibits tumor growth and metastasis of melanoma and lung carcinoma in syngeneic mouse tumor models. *Cancer Sci.*, 100: 1351-1358, 2009.
2. Sakai, K., Nakamura, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Angioinhibitory Action of NK4 involves impaired extracellular assembly of fibronectin mediated by perlecan-NK4 association. *J. Biol. Chem.*, 284: 22491-22499, 2009.
3. Nakamura, T., Sakai, K., Nakamura, T., and Matsumoto, K.. Anti-cancer approach with NK4: Bivalent action and mechanisms. *Anti-Cancer Agent Med. Chem.*, 10: 36-46, 2010.
4. Suzuki, Y., Sakai, K., Ueki, J., Xu, Q., Nakamura, T., Shimada, H., Nakamura, T., and Matsumoto, K.. Inhibition of Met/HGF receptor and angiogenesis by NK4 leads to suppression of tumor growth and migration in malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer*, in press.

<共同研究による論文>

1. Fukuta, K., Adachi, E., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Different reactivities of enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor. *Clinica Chimica Acta*, 402: 42-46, 2009.
2. Liu, K.X., Kato, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kaku, T., Sugiyama, Y. Characterization of the enhancing effect of protamine on the proliferative activity of hepatocyte growth factor in rat hepatocytes. *Pharm. Res.*, 26: 1012-1021, 2009.
3. Kamimoto, M., Mizuno, S., Matsumoto, K., Nakamura, T. Hepatocyte growth factor prevents multiple organ injuries in endotoxemic mice through a heme oxygenase-1-dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 380: 333-337, 2009.
4. Egami, T., Ohuchida, K., Miyoshi, K., Mizumoto, K., Onimaru, M., Toma, H., Sato, N., Matsumoto, K., Tanaka, M. Chemotherapeutic agents potentiate adenoviral gene therapy for pancreatic cancer. *Cancer Sci.*, 100: 722-729, 2009.
5. Kubota, T., Fujiwara H., Matsumura A., Taiyoh, H., Ichikawa I., Okamoto K., Matsumoto, M., Nakamura T., and Otsuji. E. NK4, an HGF antagonist, prevents hematogenous pulmonary metastasis by inhibiting adhesion of CT26 cells to endothelial cells. *Clin. Exp. Metastasis*, 26: 447-456, 2009.
6. Kanai, M., Funakoshi, H., Takahashi, H., Hayakawa. T., Mizuno, S., Matsumoto, K., and Nakamura, T. Tryptophan 2,3-dioxygenase is a key modulator of physiological neurogenesis and anxiety-related behavior in mice. *Mol. Brain*, 2: 8, 2009.

7. Kadoyama, K., Funakoshi, H., Ohya-Shimada, W., Nakamura, T., Matsumoto, K., Matsuyama, S., Nakamura, T. Disease-dependent reciprocal phosphorylation of serine and tyrosine residues of c-Met/HGF receptor contributes disease retardation of a transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Res.*, 65: 194-200, 2009.
8. Kubota, T., Taiyoh, H., Matsumura, A., Murayama, Y., Ichikawa, D., Okamoto, O., Fujiwara, H., Ikoma, H., Nakanishi, N., Kikuchi, S., Ochiai, T., Sakakura, C., Kokuba, Y., Suzuki, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., and Otsuji, E. Gene transfer of NK4, an angiogenesis inhibitor, induces CT26 tumor regression via tumor-specific T-lymphocyte activation. *Int. J. Cancer.*, 125: 2879-2886, 2009.
9. Tamase, A., Muraguchi, T., Naka, K., Tanaka, S., Kinoshita, M., Hoshii, T., Ohmura, M., Ooshio, T., Nakada, M., Sawamoto, K., Matsumoto, K., Oshima, M., Asano, M., Saya, H., Okano, H., Suda, T., Hamada, J., and Hirao, A. Identification of tumor-initiating cells in a highly aggressive brain tumor using promoter activity of nucleostemin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106(40): 17163-17168, 2009.
10. Wang, W., Li, Q., Matsumoto, K., Kayano, Y., Matsumoto, I., Oda, M., Watanabe, G., Nishioka, Y., Sone, S., and Yano, S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Clin. Cancer Res.*, 15(21): 6630-6638, 2009.
11. Nakase, J., Kitaoka, K., Matsumoto, K., and Tomita, K. Facilitated tendon-bone healing by local delivery of recombinant hepatocyte growth factor in rabbits. *Arthroscopy*, 26: 84-90, 2009.
12. Yamada, T., Matsumoto, K., Wang, W., Li, Q., Nishioka, Y., Sekido, Y., Sone, S., and Yano, S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to an irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 16: 174-183, 2010.

<和文著書・総説>

1. 福田一弘、松本邦夫、中村敏一：“新規がん分子標的薬—NK4(HGF アンタゴニスト/血管新生阻害分子)の開発—”、「バイオ医薬開発技術とシーズ」山本重夫監修・(株)、pp. 66-78、シーエムシー出版、2009.
2. 中村隆弘、松本邦夫：“HGF”、「炎症・再生医学事典」、松島剛治・西脇徹編、pp. 518-521、朝倉書店、2009.
3. 中山瑞穂、松本邦夫：“細胞増殖因子”、遺伝子医学 MOOK 別冊「ますます重要な細胞周辺環境の科学技術」田畠泰彦編、pp. 231-237、メディカルドウ、2009.
4. 中村隆弘、櫻間晴子、中村敏一、松本邦夫:“HGF 研究の進展と制癌剤開発”、がん分子標的治療、Vol. 7、pp. 92-101、メディカルレビュー社、2009.
5. 鈴木芳典、松本邦夫:“癌の発生、浸潤、転移における腫瘍関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblast)の役割”、Surgery Frontier, 16: 68-72 (466-470) 、2009.

<招待講演>

1. 松本邦夫: “HGF-Met 系を介した組織再生の制御と創薬”, 第 24 回岡山 Vascular Biology 研究会、2009 年 3 月 18 日 (岡山)
2. 松本邦夫: “HGF-Met 受容体系を標的とする分子標的薬の開発”, 技術情報協会セミナー (No. 910137) 「がん分子標的薬における製薬企業との開発事例と各癌種別に見る臨床現場で求められる新薬」、2010 年 10 月 29 日 (東京)

<国内学会発表>

1. 鈴木芳典、酒井克也、中村敏一、松本邦夫 : HGF-Met 系を介したヒト悪性中皮腫細胞の遊走制御と Met 細胞外領域遺伝子変異. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
2. 酒井克也、岡清正、中村隆弘、松本邦夫、中村敏一 : NK4 によるプロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
3. 大場宏明、窪田健、藤原斎、松村篤、村山康利、岡本和真、市川大輔、菊池正二郎、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾 : CT26 細胞に対する NK4 遺伝子導入による 5-FU のアポトーシス増強作用の検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
4. 窪田健、大場宏明、松村篤、村山康利、岡本和真、藤原斎、菊池正二郎、市川大輔、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾 : 血管新生阻害剤、NK4 遺伝子導入による CT26 腫瘍拒絶と腫瘍特異的免疫誘導のメカニズムの検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
5. 松村篤、窪田健、藤原斎、大場宏明、村山康利、岡本和真、市川大輔、菊池正二郎、落合登志哉、阪倉長平、松本邦夫、中村敏一、大辻英吾 : HGF/c-Met シグナルを介した VEGF 発現調節のメカニズムの検討. 第 68 回日本癌学会総会、2009 年 10 月 3 日 (横浜)
6. 鈴木芳典、酒井克也、中村隆弘、中村敏一、松本邦夫 : ヒト悪性中皮腫細胞のコラーゲンゲル内浸潤性増殖における HGF-Met 系の役割と NK4 による阻害. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日 (神戸)
7. 酒井克也、岡清正、中村隆弘、松本邦夫、中村敏一 : NK4 による血管新生阻害作用の解析 - プロテオグリカン結合を介したフィブロネクチン構築阻害. 第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 24 日 (神戸)

がん研究所・分子標的がん医療研究開発センター 腫瘍内科・腫瘍外科研究分野

<研究スタッフ>

教 授	矢野 聖二	講 師	大坪 公士郎
講 師	安本 和生	助 教	毛利 久継
助 教	山下 要	助 教	竹内 伸司
助 教	山田 忠明	研究員	Qi Li
研究員	Wei Wang	研究員	Ivan S. Donev
大学院生	Ivan S. Donev	大学院生	坂東 英明

<研究の概要>

がん治療の最大の障壁は、転移と薬剤耐性である。当研究室では、肺癌、胸膜中皮腫、膵癌について、転移や浸潤の分子機構解明とそれに基づいた分子標的治療開発および薬剤耐性（自然耐性および獲得耐性）の克服に向けたトランスレーショナルリサーチを行っている。特にわが国の癌死亡原因第1位の肺癌において、肝細胞増殖因子(HGF)による EGFR チロシンキナーゼ阻害薬耐性の診断および治療法確立を目指し総力を挙げて研究を進めている。

また、診療部門であるがん高度先進治療センターとしては、外来および入院患者の診療に加え、石川県がん診療連携拠点病院である金沢大学附属病院のがん対策の中核として、化学療法、がん相談、がん登録、がん研修会などの推進のための活動を担っている。

<今年度の研究成果>

- 1、肝細胞増殖因子(HGF)が、受容体である MET をリン酸化し下流の PI3K/Akt 経路を活性化することにより EGFR 活性型変異を有する肺腺癌株のゲフィチニブ耐性を誘導する新たな耐性機構を見出した。さらに、肺癌症例において腫瘍内の線維芽細胞が種々の程度の HGF を発現すること、HGF を高発現する線維芽細胞は肺癌細胞の EGFR-TKI 耐性を誘導すること、マウスモデルにおいて HGF 活性を阻害する抗 HGF 抗体や NK4 がゲフィチニブ耐性を克服することを明らかにし、線維芽細胞の產生する HGF が肺癌におけるゲフィチニブ耐性の治療標的となることを示した。(矢野、Wang、Li、Donev、山田)
- 2、EGFR 遺伝子の二次的変異(T790M)によるゲフィチニブ耐性の克服薬として不可逆型 EGFR 阻害薬が開発されているが、臨床試験においては期待されたほどの効果が得られていない。その原因として HGF が不可逆型 EGFR 阻害薬の耐性を誘導することを明らかにし、さらに抗 HGF 抗体や NK4 が耐性を解除することを示した。（山田、竹内、坂東、Wang、Li、矢野）
- 3、血管新生因子発現プロファイルや同所移植モデルにおける進展様式が異なる3つの胸膜中皮腫株を用い、マルチキナーゼ阻害薬 E7080 がすべての中皮腫株に対し腫瘍進展を抑制し延命効果を示すことを明らかにした。（山田、Wang、Li、矢野）

<今後の計画>

- 1、HGF による活性型 EGFR 遺伝子変異を有する肺腺癌のゲフィチニブ耐性の機序解析をさらに推進し、HGF による耐性症例の臨床的な頻度を明らかにする。さらに、HGF による耐性の臨床的診断法および新たな耐性克服薬を開発する。
- 2、金沢大学附属病院呼吸器外科と協力し、200 例を超える肺癌手術組織を凍結保存したが、さらに症例を追加し組織バンクの構築を推進する。また、脳神経外科や整形外科と協力し、脳転移や骨転移の手術組織も集積する。
- 3、すでに確立している肺癌の脳転移および骨転移モデルを用いて分子機構解析を推進する。さらに、臨床検体における解析も実施する。
- 4、胸膜中皮腫に対する血管新生因子や新規癌抑制遺伝子を標的とした分子標的治療法確立を目指し、中皮腫細胞と宿主細胞の相互反応や新規遺伝子に着目した解析を進める。
- 5、膵癌や胃癌の腹膜播種に対する分子標的治療法の開発に向けた基礎的検討を展開する。

研究業績 (2009年1月～)

<発表論文>

原著論文

(主体となったもの)

1. Yamada T, Matsumoto K, Wang W, Li Q, Nishioka Y, Sekido Y, Sone S, Yano S. Hepatocyte growth factor reduces susceptibility to irreversible epidermal growth factor receptor inhibitor in EGFR-T790M mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** 16:174-183, 2010.
2. Wang W, Li Q, Yamada T, Matsumoto K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Kayano Y, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Crosstalk to stromal fibroblasts induces resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. **Clinical Cancer Res** 15:6630-6638, 2009.
3. Yamada T, Ohtsubo K, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Izumi K, Zen Y, Watanabe H, Yano S. Combined chemotherapy with carboplatin plus irinotecan showed favorable efficacy in a patient with relapsed small cell carcinoma of the prostate complicated with meningeal carcinomatosis. **Int J Clin Oncol** 14:468-472, 2009.
4. Ohtsubo K, Watanabe H, Tsuchiyama T, Mouri H, Yamaguchi Y, Motoo Y, Okai T, Sanada J, Matsui O, Kitamura T, Fujiki R, Tokuyue K, Sawabu N. A case of advanced hepatocellular carcinoma treated effectively with irinotecan via hepatic arterial infusion followed by proton beam therapy. **J Infect Chemother** 15:316-321, 2009.
5. Ohtsubo K, Watanabe H, Yamada T, Tsuchiyama T, Mouri H, Yamashita K, Yasumoto K, Ikeda H, Nakanuma Y, Yano S. Cancer of unknown primary site in which tumor marker-oriented chemotherapy was effective and pancreatic cancer was finally confirmed at autopsy. **Intern Med** 48:1651-1656, 2009.

(共同研究)

6. Ikuta K, Yano S, Trung TV, Hanibuchi M, Goto H, Li Q, Wang W, Yamada T, Ogino H, Kakiuchi S, Uehara H, Sekido Y, Uenaka T, Nishioka Y, Sone S. E7080, a multi-tyrosine kinase inhibitor, suppresses the progression of malignant pleural

mesothelioma with different proangiogenic cytokine production profiles. **Clin Cancer Res** 15:7229-7237, 2009.

7. Yamada T, Muguruma H, Yano S, Ikuta K, Ogino H, Kakiuchi S, Hanibuchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S. Intensification therapy with anti-parathyroid hormone-related protein antibody plus zoledronic acid for bone metastases of small cell lung cancer cells in SCID mice. **Mol Cancer Ther** 8:119-126, 2009.
8. Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, Jalili A, Verma VK, Hanibuchi M, Abe S, Minakuchi K, Matsumoto T, Sone S. HM1.24 (CD317) is a novel target against lung cancer for immunotherapy using anti-HM1.24 antibody chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells. **Lung Cancer** 63:23-31, 2009.

総説

1. Yasumoto K, Yano S. The molecular mechanisms of gastric cancer metastasis: Role of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCL12 in peritoneal carcinomatosis. **Transworld Research Network** 2010. (in press)
2. 安本和生. 転移性胃癌の頻度. 日本医事新報社 (in press).
3. 毛利久継、矢野聖二. 分子標的薬の副作用マネジメント 倦怠感、タンパク尿. **消化器外科ナーシング** 2010:(増) 212-221, 2010.
4. 安本和生、矢野聖二 血管新生抑制剤による抗腫瘍効果と今後の展望. **血管医学** 10; 67-67, 2009.
5. 大坪公士郎、矢野聖二. がんにかかわる主要症候. **入門腫瘍内科学** 49-52, 2009.
6. 山下要、山田忠明、笠原寿郎、矢野聖二. 外来化学療法の実際. **臨床と研究** 86 : 76-80, 2009.
7. 山田忠明、矢野聖二. 肺線維症と癌. **炎症・再生医学事典** : 389-391, 2009.
8. 山田忠明、矢野聖二. 呼吸器系の生物学 PDGF と呼吸器疾患. **Annual Review 呼吸器**: 254-265, 2009.

9. 山田忠明、矢野聖二. 【HGF/c-Met】 HGF と EGFR-TKI, がん分子標的治療 7 : 24-32, 2009.
10. 山田忠明、矢野聖二. 分子標的治療. まんがで読み解く呼吸器症例 100 肺癌 245-246, 2009.
11. 山田忠明、矢野聖二. 手術前に抗癌剤? まんがで読み解く呼吸器症例 100 肺癌 260-261, 2009 .
12. 矢野聖二. 転移性肺肺癌 今日の治療指針 2010 52: 254-255, 2010.
13. 矢野聖二. 浸潤と転移. 新臨床肺癌学 改訂第 2 版 38-41, 2009
14. 矢野聖二. 増殖因子、受容体、増殖シグナル. がん化学療法・分子標的治療 update 14-18, 2009
15. 矢野聖二、曾根三郎. 胸部リンパ系疾患. 改訂第 7 版 内科学書 401-404, 2009.
16. 矢野聖二. 消化器癌化学療法の副作用対策:腎毒性. 消化器癌化学療法 328-330, 2009.
17. 矢野聖二. HGF/c-MET を介した EGFR-TKI 耐性と MET 阻害薬開発の状況 Cancer Frontier 2009. 11, 205-213, 2009.
18. 矢野聖二. 癌細胞の転移・浸潤機構. 日本臨床 67(増 1) : 95-99, 2009.
19. 矢野聖二. 分子標的薬の開発と臨床 開発段階の分子標的薬 VEGFR-TKI と EGFR-TKI 日本国内科学会雑誌 98:51-57, 2009.
20. 矢野聖二. EGFR 阻害薬に対する非小細胞肺癌の耐性化機構とその克服. 分子呼吸病 14:56-58, 2010.
21. 曽根三郎、矢野聖二. 胸膜肺癌. 新臨床内科学 第 9 版 149, 2009.

<学会発表・国内>

1. The Joint Symposium of the 4th International Symposium of institutes Network and Osaka University Global COE (Frontier Biomedical Science Underlying Organelle Network Biology) Symposium. Wang W, Yano S. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma cells with EGF receptor mutations. 2009年1月 大阪
2. 第59回日本肺癌学会北陸支部会 山田忠明、泉浩二、毛利久継、大坪公士郎、山下要、安本和生、北村星子、矢野聖二. 多発肺転移をきたした皮膚原発腺様囊胞癌の1症例. 2009年2月 金沢
3. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会 安本和生、山田忠明、毛利久継、山下要、大坪公士郎、矢野聖二. TS-1/Docetaxel/CDDP併用化学療法が著効した進行胸部食道癌の1例. 2009年3月 名古屋
4. 第7回日本臨床腫瘍学会学術集会 毛利久継、泉浩二、山田忠明、土山智也、大坪公士郎、山下要、安本和生、矢野聖二. Octreotide投与下に5-FU少量持続静注を行い、著明なQOLの改善をみたperformance status不良の膵癌癌性腹膜炎の1剖検例. 2009年3月 名古屋
5. 第95回日本消化器病学会総会 大坪公士郎、渡邊弘之、山田忠明、土山智也、毛利久継、山下要、安本和生、矢野聖二. 膵癌に合併した上部消化管病変に関する検討. 2009年5月 札幌
6. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 山田忠明、泉浩二、毛利久継、大坪公士郎、山下要、安本和生、矢野聖二. 転移性腎細胞癌に対するスチント治療中に発症した肺胞出血の1症例. 2009年6月 東京
7. 第49回日本呼吸器学会学術講演会 山田忠明、矢野聖二. EGFR活性型変異を有する肺腺癌における肝細胞増殖因子(HGF)によるゲフィチニブ耐性. 2009年6月 東京
8. 第208回日本内科学会北陸地方会 山田忠明、泉浩二、毛利久継、大坪公士郎、山下要、安本和生、矢野聖二. 転移性腎細胞癌に対するスニチニブ治療中に繰り返し発症した1部検例. 2009年6月 富山
9. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会 安本和生、山田忠明、矢野聖

三．癌性腹水中増殖因子の検討からみた胃癌腹膜播種治療標的分子の同定とその生物学的意義. 2009年6月 徳島

10. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会 山田忠明、松本邦夫、矢野聖二. 肝細胞増殖因子（HGF）はEGFR遺伝子変異T790Mを有する肺線癌のirreversible EGFR阻害剤の耐性を誘導する. 2009年6月 徳島
11. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会 (シンポジウム) 矢野聖二. 肺がんの分子標的薬耐性と微小環境. 2009年6月 徳島
12. 第13回日本がん分子標的治療学会学術集会 王偉、李埼、山田忠明、矢野聖二. 宿主由来HGFによる変異型EGFR陽性肺癌のゲフィチニブ耐性機構解析とその克服. 2009年6月 徳島
13. 第64回日本消化器外科学会総会 安本和生、山下要、川島篤弘. 胃癌腹膜播種成立へのCXCL12/CXCR4axisとEGFRリガンドの関与. 2009年7月 大阪
14. 第18回日本がん転移学会学術集会・総会 王偉、李埼、山田忠明、矢野聖二. Stromal fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 2009年7月 旭川
15. 第209回日本内科学会北陸地方会 山田忠明、竹内伸司、毛利久継、大坪公士郎、山下要、安本和生、北村星子、矢野聖二 多発肺転移を来たした皮膚原発腺様囊胞癌に対し、CDDPおよびVNB併用化学療法が奏功を示した1症例. 2009年9月 金沢
16. 第4回肺癌分子病態研究会 山田忠明、矢野聖二. EGFR-TKIの耐性メカニズム. 2009年9月 東京
17. 第68回日本癌学会学術総会 安本和生、川島篤弘、山田忠明、源利成、矢野聖二 癌性腹水中増殖因子の検討から見た胃癌性腹膜炎治療標的分子の同定. 2009年10月 横浜
18. 第68回日本癌学会学術総会 (International Sessions) 矢野聖二 Hepatocyte growth factor as an inducer of EGFR-TKI resistance in lung cancer harboring EGFR activating mutations. 2009年10月 横浜
19. 第68回日本癌学会学術総会 (シンポジウム) 山田忠明、矢野聖二 EGFR

変異と EGFR-TKI:耐性克服の治療戦略. 2009 年 10 月 横浜

20. 第 68 回日本癌学会学術総会 竹内伸司、高橋暁子、元井紀子、山越貴水、石川雄一、曾根三郎、原 英二、大谷直子. マウス皮膚発癌防御における p16INK4a と p21Waf1/Cip1 の協調的役割. 2009 年 10 月 横浜
21. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 山下 要 ヒト消化管がん組織検体資源化の試み：がん研究とがん個別化医療への応用. 2009 年 10 月 横浜
22. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 (特別企画シンポジウム) 矢野聖二 がんプロネットによるがん専門医療人養成. 2009 年 10 月 横浜
23. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 山田忠明、竹内伸司、毛利久継、大坪公士郎、山下 要、安本和生、全 陽、矢野聖二 CBDCA/CPT-11 併用療法が髓膜癌腫症の奏効した再発前立線小細胞癌の 1 症例. 2009 年 10 月 横浜
24. 第 47 回日本癌治療学会学術集会 毛利久継、山田忠明、竹内伸司、大坪公士郎、山下 要、安本和生、矢野聖二. 当科における局所進行膵癌に対する化学放射線療法の研究. 2009 年 10 月 横浜
25. 第 50 回日本肺癌学会総会 (特別セッション) 矢野聖二 HGF-MET 経路による EGFR-TKI 耐性誘導の分子機構とその克服に向けた戦略. 2009 年 11 月 東京
26. 第 50 回日本肺癌学会総会 山田忠明、丹保裕一、笠原寿郎、小野里良一、光富徹哉、埴淵昌毅、西岡安彦、曾根三郎、矢野聖二. EGFR 阻害剤投与におけるバイオマーカーとしての血清中の肝細胞増殖因子 (HGF) の有用性の検討. 2009 年 11 月 東京
27. 第 50 回日本肺癌学会総会 山田忠明、竹内伸司、西岡安彦、曾根三郎、関戸好孝、矢野聖二. 肝細胞増殖因子 (HGF) は EGFR 遺伝子変異 T790M を有する肺腺癌の irreversible EGFR 阻害剤の耐性を誘導する. 2009 年 11 月 東京
28. 第 50 回日本肺癌学会総会 竹内伸司、山田忠明、北國憲剛、佐川元保、矢野聖二. EGFR-TKI による薬剤性肝障害のメカニズム解明のため SNP 解析による検討を行った肺腺癌の一症例. 2009 年 11 月 東京

<学会発表・国際>

1. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2009 Yano S. Novel gefitinib resistance mechanism and its therapeutic strategy for lung adenocarcinoma with EGF receptor activating mutations. 2009 年 2 月 金沢.
2. 2009 Asia-Pacific Conference of Tumor Biology and Medicine Wang W. Stromal Fibroblasts induce resistance of lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 2009 年 10 月 Xian China
3. The 14th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology Yano S. HGF induces resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer with EGFR activating mutations. 2009 年 11 月 Seoul Korea.

細胞情報調節研究分野

<研究スタッフ>

准教授 黒木 和之

助教 天野 重豊

木戸 敬治 (平成 21 年 12 月 1 日～、腫瘍分子生物学研究分野)

<研究概要>

真核生物では、遺伝子は先ず前駆体 RNA として転写され、その後各種のプロセシングを受けて成熟 RNA となり、細胞内の各所に移行してそれぞれの機能を発現する。RNA の成熟機構には種々の低分子 RNA やそのタンパク質複合体が関与していることが明らかになって来たが、未だ解明されていない点が多く残されており、今後の発展が望まれている分野の一つである。当研究分野では、遺伝子発現に関する新規低分子 RNA およびタンパク質を探索、同定し、その生成機構及び細胞内での機能を明らかにすることを目的として黒木は B 型肝炎ウイルス及び miRNA、木戸は snoRNA を対象に研究を進めている。また、黒木は B 型肝炎ウイルス感染の分子メカニズムの解明、天野はホヤの生体防御に関わる血球の機能をテーマに研究を進めている。

<2009 年度の成果、進行状況と今後の計画>

B 型肝炎ウイルスの増殖と概日時計 (黒木)

時計制御遺伝子の強制発現は調べたすべてのヒトおよびダック B 型肝炎ウイルス (HBV および DHBV) 遺伝子の発現に影響を与えることがわかり、B 型肝炎ウイルスの増殖は概日時計に制御されている可能性が示唆された。時計制御遺伝子のひとつ、正の制御因子である Retinoid-related orphan receptor α (ROR α) は、逆にこれらウイルス遺伝子の発現をひじょうに強く抑制し、増殖を阻害する。この抑制は (1) ROR α の DNA への結合を必要としない、(2) DHBVcore promoter 上に関与する部位が少なくとも 3 力所存在することが示された。今後、この ROR α による遺伝子発現抑制の分子機構を解明とともに、概日時計に依存した B 型肝炎ウイルスの増殖様式について明らかにしていく。

B 型肝炎ウイルス感染の分子機構 (黒木)

B 型肝炎ウイルス core 遺伝子の promoter 直下にある epsilon 構造 (ϵ) は、DNA 合成の起点として知られているが、DHBV では core 遺伝子の効果的な転写に必要な構造でもあることを示した。 ϵ 構造は、splicing や promoter-proximal termination の抑制に機能することを明らかにした。

B 型肝炎ウイルスレセプター探索。

rRNA 修飾における U13 snoRNA の構造・機能相関（木戸）

18S rRNA のアセチル化シチジンの合成に必須なノンコーディング RNA である U13 snoRNA が、どのようなメカニズムでアセチル化に関わるのかを生化学的に明らかにする目的で、U13 snoRNA と複合体を形成するタンパク質の同定を進めている。MS2 コートタンパクと親和性の高い MS2 RNA タグを挿入した U13 RNA を U13 ノックアウト DT40 細胞で発現させ、その核 extract からリコンビナント MS2 コート-GST タンパク質を用いてアフィニティー精製できるとの期待のもと、様々な条件で精製を試みたが成功には至らなかった。そこで、U13 RNA に相補的なビオチン標識オリゴ RNA を用いて精製する方法に切り替えて精製を行っている。2008 年に、RNA を標的とするアセチル基転移酵素としては最初の報告となる大腸菌 tRNA のアセチル化触媒酵素が同定されたが、このタンパク質と最も高い類似性を示す分子は、高等動物では核小体に局在する NAT10 であり、出芽酵母では rRNA 生合成に必要なタンパクやリボソームタンパクとの相互作用が示されている KRE33 であったため、NAT10 は U13 RNA と協調して機能するアセチル基転移酵素の有力な候補になると考えており、現在、DT40 細胞においてこの遺伝子のノックアウトを進めている。

血球による生体防御と進化について（天野）

免疫系の主要な担い手である血球は immune surveillance を行い、がんの発生を未然に防いでいる。哺乳類の血球系は極めて複雑で精巧なシステムであり、それは長い進化の結果得られたものである。従って血球系の全体像を理解するためには、現生の哺乳類の血球を調べるだけではなく、その進化の過程を知ることが不可欠である。無脊椎動物において血球による生体防御機構を明らかにすることにより、哺乳類の血球系の進化を理解する上で重要な知見が得られると考えられる。ヒトと同様に脊索動物門に属するホヤ類は、その分類上の近縁さから血球系の進化を調べる上で興味深い動物群である。ホヤの血球は 10 種類程度に分類されるが、それぞれの血球の機能を調べてきた。Hemoblast は血球幹細胞と想定されているが、未だ確証は得られていない。そこでまず幼若体において、この血球が他のタイプの血球に分化していく過程を明らかにした。成体の血流中に存在する hemoblast も幹細胞であるかどうか、現在調べている。ホヤの生体防御においては、血球による phagocytosis は極めて重要な役割を果たしている。そこでどの血球が phagocytosis 能を持っているかについて調べてきた。今年は、phagocytosis する対象 (yeast cells 又は polystyrene beads) によって、phagocytosis する血球が異なることを明らかにした。また phagocytosis 能は多くの場合 *in vitro* で調べているが、*in vivo* でも調べてみると、実際に行う血球が異なっていた。今後も生体防御における各血球の役割を明らかにしていきたい。

＜発表論文＞

＜主な学会発表＞

第 80 回日本動物学会大会（平成 21 年 9 月 静岡）

天野重豊

「ホヤ血球の ”Green cell” について」

第 32 回日本分子生物学会年会（平成 21 年 12 月 横浜）

黒木和之、石川隆

「Retinoid-related orphan receptor α (ROR α) inhibits the activities of the promoters of hepatitis B viruses」