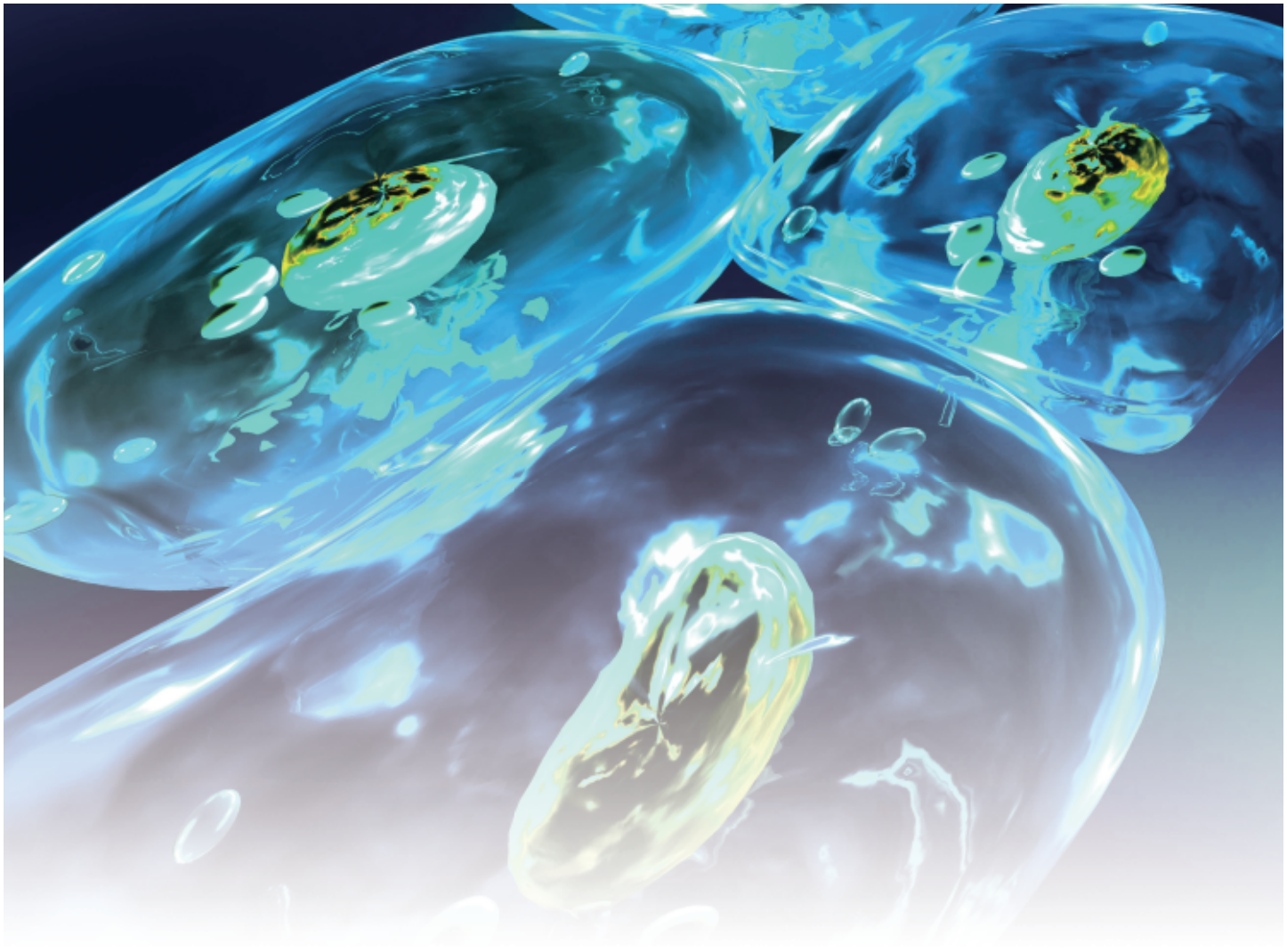

金沢大学がん進展制御研究所

Annual report of the Cancer Research Institute of Kanazawa University

年報 2011年

金沢大学
KANAZAWA UNIVERSITY

巻頭言

本研究所の前身である金沢大学がん研究所は、昭和 47 年に設立されました。設立以来今日までに、がん転移に関わるタンパク分解酵素の発見、がんの転移・浸潤に密接に関与している種々の生理活性物質の機能解明、がん幹細胞の分子基盤の解明、分子標的薬の耐性機構の解明など、基礎研究のみならず臨床研究においても、本研究所は大きな成果を挙げてきています。

これらの成果を踏まえるとともに、がん研究の成果を診断・治療法の開発に結びつける努力を一層強く求めている社会的要請に応えるため、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」の克服を目指すことを、研究所全体の使命と位置づけています。この使命の遂行のために、「転移」「薬剤耐性」の成立過程に密接に関与している「がん幹細胞」「がん微小環境」の実態解明が必要であると考え、「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平成 22 年度改組いたしました。さらに、21 年度末の基礎部門の研究棟の新築移転を契機に、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･整備いたしました。以上の取り組みを評価され、「がんの転移・薬剤耐性に関する先導的共同研究拠点」として全国共同利用・共同研究拠点として認定され、平成 23 年度より拠点としての活動を開始しています。さらに、この認定を契機に、研究所全体としての使命を一層明確にするために、研究所の名称を「がん進展制御研究所」へと 23 年度変更いたしました。

研究機関のネットワーク形成の一環として、全国 9 つの医系の国立大学附置研究所による「研究所ネットワークシンポジウム」を平成 17 年度から行っています。23 年度には新たに富山大学和漢医薬学総合研究所とのジョイントセミナーの定期的開催を開始し、さらに 24 年度には中国復旦大学上海がんセンターおよび北海道大学遺伝子病制御研究所とのジョイントシンポジウムの定期的開催を開始する予定です。

個々の研究者の研究レベルの向上を図ることは勿論のこと、国内外の優れた研究機関とのネットワーク形成を推進することで、「がん幹細胞」と「がん微小環境」を切り口にした「転移」「薬剤耐性」研究の国際的レベルの研究拠点となるべく、教職員一丸となって鋭意努力しているところです。このような取り組みの一端を、本年度の金沢大学がん進展制御研究所年報からご理解いただければ幸いに存じます。

金沢大学がん進展制御研究所長　向田直史

金沢大学がん進展制御研究所年報２０１１年

目　次

巻頭言

研究概要と研究業績

がん幹細胞研究プログラム

遺伝子・染色体構築研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 2

腫瘍遺伝学研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 8

腫瘍分子生物学研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 14

がん幹細胞探索プロジェクト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 19

がん微小環境研究プログラム

細胞機能統御研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24

分子生体応答研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 28

免疫炎症制御研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 32

腫瘍動態制御研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 36

がん分子標的探索プログラム

ゲノム分子病態研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 44

シグナル伝達研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47

腫瘍制御研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51

機能ゲノミクス研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 59

がん分子標的医療開発プログラム

腫瘍内科研究分野・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 64

中央実験施設・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 76

基礎統計・教育活動・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 81

各種シンポジウム開催状況・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 83

がん幹細胞研究プログラム

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：田所優子、星居孝之
日本学術振興会特別研究員：大塩貴子
大学院生（博士課程）：守護晴彦、上間徳之、田中慎吾、Mohamed Ali、
山田大祐、笠田篤郎
技術補佐員：田村恭子、澤和恵
技能補佐員：竹上美也子

＜研究概要＞
当研究分野では、①幹細胞自己複製および分化制御メカニズムを理解すること、②幹細胞制御という観点から、がんの発生や動態制御メカニズムを理解することを目標に研究を進めている。これらの知見に基づいて③新規がん治療法の開発を模索している。具体的な研究対象は以下の通りである。

＜2011 年度の主な研究成果、進行状況と今後の計画＞
１）mTOR を中心とした栄養シグナルと幹細胞制御
我々は、「幹細胞システムを取り巻く栄養環境が新たなニッチシグナルとなり得るのではないか」と考え、栄養エネルギーセンサーとして知られている **mTOR 複合体 1** の機能解析に取り組んできた。その結果、mTOR 複合体 1 を中心としたシグナルが、造血幹細胞の細胞周期（静止状態）および幹細胞機能を大きく変動させる因子として機能していることを見出した。さらに、本複合体活性制御は、正常および悪性組織でその役割が異なるものの、どちらにおいても、幹細胞特性を理解する上で、重要な鍵となることを見出した（論文投稿中）。さらに、白血病サンプルを用いて網羅的リン酸化蛋白解析（慶應義塾大学先端生命科学研究所との共同研究）を行い、白血病細胞における mTOR 複合体 1 欠損状態でのリン酸化変動蛋白の解析を通して、白血病の生存に必須分子を見出した。また、栄養環境シグナルとして mTOR 複合体 1 の活性制御に関わる **AMPK**、**LKB**, **Rheb**, **オートファジー**などの解析を進めた。これら一連の研究から mTOR を中心としたシグナルが、がんと幹細胞の接点を支える重要な因子であると考えられ、「幹細胞と栄養環境」という新たな研究領域を開拓し、白血病治療戦略の新たな方向性を模索したいと考えている。

２）FOXO と治療耐性
フォークヘッド転写因子 FOXO3a は、正常造血幹細胞とともに慢性骨髄性白血病幹細胞の維持に必須であり、治療抵抗性解除の鍵分子となることを見出し、研究を進め

てきた。最近、他の複数のグループより、FOXO 経路が急性骨髄性白血病幹細胞未分化性維持や急性リンパ性白血病治療耐性で重要な役割を果たしていることが示された。さらに、大規模な白血病患者検体解析から、その活性亢進が予後不良因子となることも報告された。これらの知見より、FOXO3a 活性あるいは FOXO3a の活性調節因子を阻害することにより、白血病幹細胞を標的とした新たな治療薬の開発の可能性が考えられた。そこで、急性骨髄性白血病を対象に、プロテオミクス解析を中心とした手法で、白血病幹細胞における FOXO3a 活性調節因子の特定に取り組んでいる。また、これらの標的分子を用いて、ハイスループットスクリーニング、インシリコ、ペプチド、蛋白結晶構造解析などのアプローチから、治療抵抗性解除を目指した新規治療薬の開発に取り組んでいる（文部科学省次世代がん研究戦略推進プロジェクト研究）。

３）脳腫瘍の発生メカニズムと抗がん剤耐性機構

グリオブラストーマは、PI3K-AKT 活性化、Ras 活性化、p53/INK4a/ARF 機能欠損などが原因で発生する予後不良悪性腫瘍である。本腫瘍病態を理解するため、様々なマウスモデルを用いて**グリオブラストーマモデル**（EGFR, Ras, Ink4a/Arf 欠損、Pten 欠損）を構築した（Cancer Res. 2011）。また、数種類のタイプに分類される患者由来グリオブラストーマ細胞（東京大学、オハイオ州立大学との共同研究）を用いてヒト脳腫瘍における解析も同時に進めている。主な研究対象分子は、造血系と同様に、AKT, mTOR シグナルであり、加えて Notch などを解析している。一方で、**TGFβ** などの環境因子が神経幹細胞分化と発がんに関連することも判明し、動物モデルで検証を進めている。

４）核小体分子 Nucleostemin の腫瘍動態における役割

本年度は、障害時肝臓再生における役割について解析を進めた。その結果、肝切除時の肝細胞再生に加え、薬剤による重度肝障害時に見られる肝細胞および胆管系の双方向へ分化能をもつ oval cell における発現を認め、肝再生での多様な役割を見出した（投稿中）。本分子は、発がんや悪性進展に重要な機能を持つ可能性があり、ヒト腫瘍病理組織、マウスがんモデルで検証中である。

＜発表論文＞

原著論文

（研究室主体）

1. Muraguchi T, Tanaka S, Yamada D, Tamase A, Nakada M, Nakamura H, Hoshii H, Ooshio T, Tadokoro Y, Naka K, Ino Y, Todo T, Kuratsu J, Saya H, Hamada J, Hirao A. NKX2.2 suppresses self-renewal of glioma-initiating cells. ***Cancer Res.*** 71:1135-45, 2011.

（共同研究）

2. Kurebayashi Y, Nagai S, Ikejiri A, Ohtani M, Ichiyama K, Baba Y, Yamada T, Egami S, Hoshii T, Hirao A, Matsuda S, Koyasu S. PI3K-Akt-mTORC1-S6K1/2 axis controls Th17 differentiation by regulating Gfi-1 expression and nuclear translocation of RORγ. ***Cell Reports***, in press

3. Su Y, Hao Z, Hirao A, Yamamoto K, Lin W, Young A, Duncan GS, Wakeham A, Philipp LA, Murakami K, Ohashi PS, Mak TW. 14-3-3sigma regulates B-cell homeostasis through stabilization of FOXO1. ***Proc Natl Acad Sci U S A***. 108:1555-60, 2011

4. El Ghamrasni S, Pamidi A, Halaby MJ, Bohgaki M, Cardoso R, Li L, Venkatesan S, Sethu S, Hirao A, Mak TW, Hande MP, Hakem A, Hakem R. Inactivation of chk2 and mus81 leads to impaired lymphocytes development, reduced genomic instability, and suppression of cancer. ***PLoS Genet.*** 7:e1001385, 2011

5. Sampetrean O, Saga I, Nakanishi M, Sugihara E, Fukaya R, Onishi N, Osuka S, Akahata M, Kai K, Sugimoto H, Hirao A, Saya H. Invasion precedes tumor mass formation in a malignant brain tumor model of genetically modified neural stem cells. ***Neoplasia***. 13:784-91, 2011.

6. Motohara T, Masuko S, Ishimoto T, Yae T, Onishi N, Muraguchi T, Hirao A, Matsuzaki Y, Tashiro H, Katabuchi H, Saya H, Nagano O. Transient depletion of p53 followed by transduction of c-Myc and K-Ras converts ovarian stem-like cells into tumor-initiating cells. ***Carcinogenesis.*** 32:1597-606, 2011

総説

1. Naka K, Hirao A. Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. ***Int J Hematol.*** 93:434-9, 2011.

2. Naka K, Hoshii T, Tadokoro Y, Hirao A. Molecular pathology of tumor-initiating cells: lessons from Philadelphia chromosome-positive leukemia. ***Pathol Int.*** 61:501-8, 2011.
3. 平尾　敦：発がんシグナルパラドックス　細胞工学　31:42-47, 2012
4. 平尾　敦:幹細胞標的治療と腫瘍マーカー:慢性骨髄性白血病幹細胞と BCR-ABL1 遺伝子　カレントセラピー　29:31-35, 2011
5. 平尾　敦：チロシンキナーゼ阻害剤は CML 幹細胞を根絶できるか？血液内科 63:248-253, 2011
6. 田所 優子, 平尾 敦：“組織幹細胞システムにおける幹細胞ニッチ” 再生医療, Vol.10, No.4, pp58-59, 2011.
7. 平尾　敦：癌研究フロンティア―癌幹細胞、臨床検査　55:433-439, 2011
8. 平尾　敦：白血病幹細胞を標的とした新たな治療法の開発　臨床血液 52:484-9,2011
9. 平尾　敦:がん分子標的療法時代のがん幹細胞研究、実験医学増刊号29:3385, 2011
10. 平尾　敦：白血病幹細胞の治療抵抗性メカニズムとその克服に向けた取り組み 医薬ジャーナル　47:98, 2011
11. 仲一仁、平尾　敦：CML幹細胞の制御メカニズム、Annual Review 血液　8, 2011
12. 平尾　敦：“幹細胞らしさ”を支える代謝システム　細胞工学、30:47-51, 2011
13. 仲一仁、平尾　敦：がんの“幹細胞らしさ”と治療抵抗性のメカニズム、実験医学増刊号　29:276, 2011

＜学会発表＞

1. Hirao A: Molecular mechanisms of the maintenance of normal and leukemia stem cells mediated by PI3K-AKT pathway. USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, February 24-27, 2011, Hayama.
2. Hirao A: Roles of PI3K-AKT signaling in the maintenance of stem cell properties in normal hematopoiesis and leukemia, G0 symposium, Oct.24, 2011, Okinawa
3. 平尾　敦：PI3K-AKT シグナルによる白血病幹細胞動態制御メカニズム 第 15 回造血器腫瘍研究会平成 23 年 2 月 22 日、奈良
4. 平尾　敦：PI3K-AKT シグナルによるがん幹細胞制御機構の解明と治療戦略、日本がん分子標的治療学会　平成 23 年 6 月 25 日、東京
5. 平尾　敦：mTOR シグナルと白血病幹細胞、新学術領域「癌幹細胞」班会議、平成 23 年 9 月 10 日、福岡
6. Hirao A: Role of PI3K-AKT signals in the maintenance of stem cells in normal hematopoiesis and leukemia 第 84 回日本生化学会，平成 23 年 9 月 24 日、京都
7. Hirao A: Molecular mechanisms regulating maintenance of leukemia stem cells by PI3K-AKT pathway 第 70 回日本癌学会　平成 23 年 10 月 3 日、名古屋
8. 平尾　敦：白血病治療抵抗性と幹細胞制御　第 16 回分生研シンポジウム　平成 23 年 10 月 12 日、東京

9. 平尾　敦：白血病治療的抵抗性メカニズムと幹細胞、第 31 回日本炎症・再生医学会、北海道大学遺伝子病制御研究所 共同研究集会　平成 23 年 9 月 7 日、札幌
10. Hoshii T：Roles of mTORC1 signaling in normal hematopoiesis and leukemogenesis、USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, February 24-27, 2011, Hayama.
11. 星居孝之、畠山朋樹、田所優子、仲一仁、大塩貴子、村口輝之、平尾敦：Rapamycin inhibits initiation of T-ALL induced by activation of oncogenic K-ras、日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム、平成 23 年 5 月 25-26 日、金沢
12. 星居孝之：mTOR 複合体 1（mTORC1）を介した骨髄系細胞分化制御機構の解明、新学術領域「細胞運命制御」班会議、平成 23 年 5 月 31 日 - 6 月 1 日、軽井沢
13. 星居孝之：急性骨髄性白血病細胞の増殖と幹細胞維持における mTOR 複合体 1（mTORC1）の機能解析、新学術領域「細胞運命制御」若手の会、平成 23 年 9 月 23-25 日、軽井沢
14. Tadokoro Y, Hirao A, Hoshii T, Naka K, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Kato R, Yoshimura A, Nakauchi H: “Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1” USA-Japan Cooperative Cancer Research Workshop, February 24-27, 2011, Hayama.
15. Tadokoro Y, Hirao A, Hoshii T, Naka K, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Kato R, Yoshimura A, Nakauchi H: “Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1” The 9th Stem Cell Research Symposium, May 13-14, 2011, Tokyo.
16. Tadokoro Y, Hirao A, Hoshii T, Naka K, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Kato R, Yoshimura A, Nakauchi H: “Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1” The 6th International Symposium of Institute Network, June 9-10, 2011, Tokyo.
17. Tadokoro Y, Hirao A, Hoshii T, Naka K, Eto K, Ema H, Yamazaki S, Kato R, Yoshimura A, Nakauchi H: “Enhanced competitive repopulation ability of hematopoietic stem cells by inhibition of Spred-1” 日本分子生物学会　第11回春季シンポジウム, 平成23年5月25-26日, 金沢.

＜外部資金＞

公的資金

1. 平尾敦：基盤研究（B）「細胞老化・寿命制御シグナルによる白血病幹細胞の発生・維持・分化」　4,300千円
2. 平尾敦：新学術領域研究癌幹細胞「がん幹細胞性獲得・維持機構とニッチシグナルのクロストーク」7,000千円
3. 平尾敦：挑戦的萌芽研究　「マルチオミクス解析システムによる白血病幹細胞分化制御機構の解明」　3,100千円
4. 平尾敦：次世代がん研究戦略推進プロジェクト「幹細胞ストレス応答シグナル制御によるがん根治療法の開発」35,000千円
5. 星居孝之：若手研究（B）「mTOR 複合体 1 による正常造血幹細胞・白血病幹細

胞制御機構の解明」1,500 千円
6. 星居孝之：新学術領域「細胞運命制御」「mTOR 複合体 1 を介した細胞分化制御機構の解明」1,700 千円
7. 田所 優子 : 若手研究(B)「細胞内ATP調節による造血幹細胞制御機構の解明」1,600 千円
8. 大塩貴子：特別研究員奨励費「プリンヌクレオチド合成経路によるがん幹細胞の未分化維持機構の解明」1,000 千円

民間資金

1. 平尾　敦：平成22年度三菱財団自然科学研究助成「栄養代謝制御シグナルによる造血幹細胞制御機構の解明」8,000 千円
2. 田所 優子 : 第３回北陸銀行若手研究者助成金「造血幹細胞の運命決定を支配する微小環境（ニッチ）制御メカニズムの解明」550 千円

＜共同研究＞

学内

1. 脳腫瘍幹細胞解析：医学系研究科　脳神経外科　中田光俊、浜田潤一郎

学外

2. 白血病幹細胞おけるFOXOの役割解析：国立長寿医療センター　本山昇
3. 脳腫瘍幹細胞解析：東京大学大学院医学系研究科脳神経外科　藤堂具紀
4. 脳腫瘍幹細胞解析：慶應義塾大学医学部　佐谷秀行
5. 脳腫瘍幹細胞解析：オハイオ州立大学　中野伊知郎
6. マルチオミクス解析：慶應義塾大学先端生命科学研究所　曽我朋義、杉山直之
7. 細胞老化とがん幹細胞：癌研究会癌研究所　原英二
8. インシリコ創薬：九州工業大学　青木 俊介
9. 蛋白結晶構造解析：大阪府立大学　木下誉富

腫瘍遺伝学研究分野

＜研究スタッフ＞

教授	大島　正伸	大学院生（博士）	孔　丹
助教	石川　智夫		鞠　小麗
助教	大島　浩子	大学院生（修士）	柴野　好美
特任助手	直井　国子（マウス組織バンク）	学部生（5 年）	杉森　慎
技能補佐員	渡邊　真奈美		
技術補佐員	津田　理子		

＜研究概要＞

消化管がんの発生・悪性化過程では、慢性炎症あるいは自然免疫反応により炎症性微小環境が形成され、腫瘍細胞の増殖に関与していると考えられている。Wnt活性化、および PGE_2 依存的炎症反応の相互作用により胃がんを発生するマウスモデル（*Gan* マウス）は、分子発生機序と腫瘍組織の遺伝子発現変化から、ヒト胃がんを外挿したモデルである。当分野では、*Gan* マウスを用いた実験を中心に、腫瘍組織における炎症性微小環境の形成機序および発がんにおける役割の解明を目指して研究を進めている。

＜2011 年度の成果・進捗状況＞

（1）炎症性微小環境形成における細菌感染およびサイトカインの役割

Gan マウスを完全無菌環境で飼育すると胃がん発生が顕著に抑制され、無菌飼育した *Gan* マウスに常在菌を再感染させると、胃がん発生が誘導された。無菌化状態では、腫瘍組織内へのマクロファージ浸潤が顕著に抑制され、*in vitro* の実験においても LPS 刺激と PGE_2 受容体シグナルの相互作用により CCL2 および CCL8 の発現がマクロファージで誘導されることを明らかにした。さらに CCL2 が胃がん組織へのマクロファージ浸潤に関与していることを、*Gan* マウスへの中和抗体投与実験によって証明した。したがって、PGE_2 経路が腫瘍組織での炎症反応を誘導していると考えられていたが、PGE_2 と細菌感染刺激の相互作用が炎症性微小環境を形成することを明らかにした（***Gastroenterology***, 2011 ）。

Gan マウス胃がん組織の炎症性微小環境では、TN-αや IL-6 の発現が誘導され、それぞれ下流で活性化する転写因子、NF-κB や Stat3 が活性化している。これらの経路による発がんへの影響を解明する目的で、*Gan* マウスと TNF-α遺伝子ノックアウトマウスの交配により複合マウスを作製し、胃がん発生への影響を解析した。これまでの結果、TNF-α遺伝子の欠損により腫瘍形成の抑制を観察している。来年度に解析を継続する。

(2) 炎症により発現抑制される「がん抑制 microRNA」の解析

microRNA（miRNA）は約 20 塩基の単鎖 RNA からなる小分子であり、特定の mRNA の 3'UTR 配列に結合して翻訳阻害により遺伝子発現を制御する。がん遺伝子やがん抑制遺伝子を標的とするmiRNAは、それぞれがん抑制またはがん促進に作用する。そこで、当研究室のモデルシステムを用いて、炎症反応により発現変化するがん関連 microRNA の探索を行なった。その結果、*Gan* マウス胃がんでは炎症反応依存的に oncogenic microRNA（miR-21、miR-155 など）の発現が上昇し、逆に tumor suppressor microRNA（miR-7、miR-145 など）の発現は低下した。詳細な解析により、ヒト胃がん組織でもサイトカイン発現量と逆相関して miR-7 の発現が抑制されていることを明らかにし、炎症が miR-7 発現を低下させることを明らかにした。さらに miR-7 発現は胃がん細胞の腫瘍原性を抑制することを示した。miR-7 発現は胎仔期の組織で誘導されており、成熟にともなって低下することから、分化誘導に関与する遺伝子を標的としている可能性が示唆された。以上の結果から、炎症性微小環境では分化誘導・がん抑制作用のあるmiR-7 発現が低下し、それが発がん促進に関与していると考えられた（***Oncogene***, 2012 *in press*）。

(3) 上皮細胞の腫瘍化（異形性）を誘導する Wnt 標的因子の解析

Wnt 活性化は消化管上皮細胞の腫瘍化に関与する。病理組織学的には Wnt 活性化は、上皮細胞を形態的に未分化な特徴を有する異形性変化を誘導する。これまでに約 80 個の Wnt 標的遺伝子が報告されているが、異形性変化を誘導する遺伝子は特定されていない。そこで、炎症反応に依存せずに *Gan* マウスで発現誘導する遺伝子群について、培養細胞を用いたスクリーニングを実施した結果、Wnt 依存的に発現誘導する複数個の転写因子を特定した。一方で、SV40 T 抗原遺伝子トランスジェニックマウスから、不死化した正常胃上皮細胞株の樹立に成功した。今後、樹立した正常胃上皮細胞を用いて、候補となった Wnt 標的遺伝子による未分化性維持機構についての解析を行なう。

＜今後の計画＞

『発がんにおける炎症反応の役割の解明』を、研究の重要な柱として推進する。そのために、*Gan* マウスとサイトカイン、自然免疫関連分子等の遺伝子変異マウスとの交配実験、骨髄移植実験を昨年度から実施しており、来年度はそれらのマウスの解析を中心に研究を遂行する。また、Wnt に依存しない胃がんモデルの開発のため、異なるがん抑制遺伝子欠損マウスと胃炎モデルマウスの交配実験を進めており、来年度以降に解析を行なう。また、これまで胃がんを研究の中心として来たが、昨年度から *Apc* 遺伝子変異および AOM/DSS モデルマウスを用いた腸管腫瘍発生における炎症性微小環境解明を目指した研究を平行して進めており、来年度はこれらのマウスを用いて胃腸双方の腫瘍組織解析を行なう実施する。

＜**発表論文**＞

（腫瘍遺伝学研究分野主体）

1. Kong D, Piao YS, Yamashita S, Oshima H, Oguma K, Fushida S, Fujimura T, Minamoto T, Seno H, Yamada Y, Satou K, Ushijima T, Ishikawa T, and Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric tumor cells. ***Oncogene***, 2012, in press.
2. Oshima H, Hioki K, Popivanova BK, Oguma K, van Rooijen N, Ishikawa T, and Oshima M. Prostaglandin E_2 signaling and bacterial infection recruit tumor-promoting macrophages to mouse gastric tumors. ***Gastroenterology*** 140: 596-607, 2011.
3. Oshima H, Popivanova BK, Oguma K, Kong D, Ishikawa T, and Oshima M. Activation of epidermal growth factor receptor signaling by the prostaglandin E_2 receptor EP4 pathway during gastric tumorigenesis. ***Cancer Sci*** 102: 713-719, 2011.
4. Oshima H, and Oshima M. The inflammatory network in the gastrointestinal tumor microenvironment: Lessons from mouse models. ***J Gastroenterol*** 2012, in press. [Review]

（共同研究）

1. Sonoshita M, Aoki M, Fuwa H, Aoki K, Hosogi H, Sakai Y, Hashida H, Takabayashi A, Sasaki M, Robine S, Itoh K, Yoshioka K, Kakizaki F, Kitamura T, Oshima M, and Taketo MM. Suppression of colon cancer metaplasia by Aes through inhibition of Notch signaling. ***Cancer Cell***, 19: 125-137, 2011.
2. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, Tamada M, Motohara T, Oshima H, Oshima M, Ikeda T, Asaba R, Yagi H, Masuko T, Shimizu T, Ishikawa T, Kai K, Takahashi E, Imamura Y, Baba Y, Ohmura M, Suematsu M, Baba E, and Saya H. CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of xc^- and therby promotes tumor growth. ***Cancer Cell***, 19: 387-400, 2011.
3. Kaneda A, Fujita T, Anai M, Yamamoto S, Nagae G, Morikawa M, Tsuji S, Oshima M, Miyazono K, and Aburatani H. Activation of Bmp2-Smad1 signal and its regulation by coordinated alteration of H3K27 trimethylation in Ras-induced senescence. ***PLos Genetics***, 7: e1002359, 2011.

＜**日本語総説・著書**＞

1. 大島　正伸：炎症反応による発癌促進のメカニズム. **実験医学**, 29: 242-248, 2011.
2. 大島　正伸：COX-2/PGE_2経路と発がん. **実験医学**, 29: 1599-1604, 2011.
3. 大島　正伸：消化器がん発生における慢性炎症の役割. **医学のあゆみ**, 236: 267-270,

2011.

4. 大島　正伸：癌と炎症. **血管医学**, 12: 67-72, 2011.
5. 大島　正伸：炎症とがん―最新の知見・総論―. **侵襲と免疫**, 20: 128-134, 2011.
6. 大島　正伸：消化管（胃・腸管）. **疾患モデルマウス表現型解析指南**（中山書店）, 175-180, 2011.

＜国際学会・シンポジウム＞（*発表者）

1. *Oshima M: Prostaglandin E_2-associated inflammation and bacterial infection in gastric tumorigenesis. ***1st Internal Symposium on Carcinogenic Spiral***, (Tokyo) Feb 1-3, 2011.
2. *Oshima H, Kong D, Ishikawa T, and Oshima M: Downregulation of tumor suppressor microRNA in inflammatory microenvironment. ***1st Internal Symposium on Carcinogenic Spiral***, (Tokyo) Feb 1-3, 2011.
3. Oshima H, and *Oshima M: COX-2/PGE_2 signaling and infectious stimulation in mouse gastric tumorigenesis. ***9th International Gastric Cancer Congress (IGCC)***, (Seoul, Korea) Apr 21-23, 2011.
4. *Oshima M: Mouse models of gastric cancer by Wnt activation and PGE_2 induction. ***4th Annual Scientific Meeting of Singapore Gastric Cancer Consortium***, (Singapore) July 4-5, 2011.
5. *Oshima M: TNF-α and inflammatory responses in mouse gastric tumorigenesis. ***23th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology***, (Seoul, Korea) Oct 6-7, 2011.
6. *Oshima M: TNF-α and infectious stimulation in gastric tumorigenesis. ***1st International Scientific Coordination Network (ISCN) <France-Japan>***, (Montpellier, France) Nov 22-25, 2011
7. *Ishikawa T, and Oshima M: Effects of inflammatin on the epithelial differentiation and tumorigenesis. ***16th Japan-Korea Cancer Research Workshop***, (Sapporo) Dec 9-10, 2011
8. *Oshima M: Inflammatory-associated promotion of gastric tumorigenesis. ***9th Japan-China Cancer Research Workshop***, (Shanghai, China) Dec 22-23, 2011

＜国内学会・シンポジウム＞（*発表者）

1. *Oshima H, Kong D, Ju XiaoLi, and Oshima M: Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE_2 and bacterial infection in mouse gastric tumors. **日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム/金沢国際がん生物学シンポジウム**（金沢）May 25-26, 2011.
2. *Kong D, Ju XiaoLi, Oshima H, Ishikawa T, and Oshima M: Inflammatory

microenvironment by cooperation of PGE_2 and bacterial infection in mouse gastric tumors. **同上**（金沢） May 25-26, 2011.

3. *Ju XiaoLi, Kong D, Ishikawa T, Ito K, Ito Y, and Oshima M: Analysis of the role of RUNX3 in mouse models for gastric tumorigenesis and gastric cancer cell lines. **同上**（金沢） May 25-26, 2011.
4. *Kong D, Ju XiaoLi, Oshima H, Ishikawa T, and Oshima M: Inflammatory microenvironment by cooperation of PGE_2 and bacterial infection in mouse gastric tumors. **同上**（金沢） May 25-26, 2011.
5. *大島 正伸：炎症性微小環境と消化管発がん. **第 1 回「がん微小環境」公開ワークショップ**（東京） June 17, 2011.（特別講演）
6. *Oshima M: Inflammatory responses in gastric cancer development. ***70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association***, (Nagoya) Oct 3-5, 2011.［日本癌学会学術総会］
7. *Ishikawa T, and Oshima M: Cox-2 deletion in myeloid and endothelial cells, but not in epithelial cells, exacerbates murine colitis. ***70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association***, (Nagoya) Oct 3-5, 2011.［日本癌学会学術総会］
8. *Oshima H, and Oshima M: Inflammatory responses and TNF-α in mouse gastric tumorigenesis. ***70th Annual Meeting for Japanese Cancer Association***, (Nagoya) Oct 3-5, 2011.［日本癌学会学術総会］

＜**外部資金**＞

科学研究費補助金

新学術領域研究：（研究代表者：大島正伸, 研究分担者：大島浩子、石川智夫）
「上皮細胞腫瘍化と炎症反応の相互作用による消化管発がん機序」 24,300,000 円
基盤研究（B）：（研究代表者：大島 正伸）
「$COX\text{-}2/PGE_2$ 経路と炎症による胃癌発生促進機序の研究」 4,100,000 円
基盤研究（C）：（研究代表者 大島 浩子）
「SOX17 の発現変化による Wnt 活性制御が消化管腫瘍悪性化に及ぼす影響」 1,000,000 円
研究活動スタート支援：（研究代表者：石川 智夫）
「マウス消化器がんモデルを用いた悪性化・転移機構の探索」 1,160,000 円
第３次対がん総合戦略研究事業［厚生労働省］（研究分担者：大島 正伸）
「疾患モデル動物を用いた環境発がん初期過程の分子機構および感受性要因の解明とその臨床応用に関する研究（研究代表者：筆宝 義隆）」 5,000,000 円
重点戦略経費［中核的教育研究拠点形成］（研究代表者：大島 正伸）750,000 円
「新規がんモデルシステムと次世代バイオインフォマティクスの連携による発がん制御機構」
武田科学振興財団 医学系研究奨励継続助成（研究代表者：大島 浩子）

「胃がん発生に関与する PGE_2 受容体シグナル作用の研究」 3,000,000 円

＜共同研究＞

（腫瘍遺伝学研究分野主体で実施する共同研究）

金沢大学がん進展制御研究所： 源　利成（学内）

「胃がん組織における microRNA 発現変化の解析」

シンガポール国立大学： 伊藤　嘉明　/　長崎大学　伊藤　公成

「胃がん発生における Runx3 と炎症反応との相互作用」

国立がん研究センター研究所： 牛島　俊和

「慢性炎症反応を起こしたマウス胃粘膜におけるエピジェネティック解析」

東京大学医学研究科： 畠山　正則

「PGE_2 依存的炎症とピロリ菌由来因子による胃がん発生促進機構の研究」

東京大学医学研究科： 谷口　維継

「炎症発がんにおける自然免疫シグナルの役割」

（相手先研究室主体で実施する共同研究）

金沢大学がん進展制御研究所： 須田　貴司 / 今村　龍（学内）

「胃がん組織炎症性微小環境における自然免疫の関与」

慶応義塾大学先端医科学研究所： 佐谷　秀行

「消化器がんにおける CD44 の発現意義および治療抵抗性の分子機構」

国立がん研究センター研究所： 大木　理恵子

「消化器がんの悪性化におけるがん抑制遺伝子 p53 の役割」

東京大学医科学研究所： 清木　元治

「胃がん発生における MT1-MMP、MT1-MMP 関連因子の研究」

大阪大学生命機能研究科： 月田　早智子

「クローディンと胃癌・胃炎」

北海道大学遺伝子病制御研究所： 地主　将久

「感染、炎症発癌に寄与する自然免疫と感染因子とのクロストークの分子免疫学的研究」

東北大学加齢医学研究所： 佐藤　靖史

「胃がん組織における血管新生因子の発現制御と役割」

Monash Institute of Medical Research, Australia： Brendan Jenkins

“Infection and inflammation-associated regulation of gastric epithelial differentiation and proliferation”

腫瘍分子生物学研究分野

＜研究スタッフ＞
教授：高橋智聡、　助教：木戸敬治　Shamma Awad
博士研究員：北嶋俊輔　佐々木信成　河野晋、　博士課程大学院生：村中勇人
技能補佐員：鈴木美砂 永谷直子、　JICA 研修員（7/19 - 9/24）Raquel B. Haga

＜研究概要＞
臨床的レリバンスが豊富ながん遺伝子・がん抑制遺伝子を変異させた細胞やマウスを中心に、シンプルで分子生物学的・遺伝学的な解析がしやすい in vivo ・in vitro がんモデル系を組み立て、発がんや転移、がん幹細胞等の悪性形質を克服するための標的になる新規パスウェイを探索する。本年度は特に、様々ながん腫のプログレッションにおいて高頻度に観察される RB 蛋白質不活性化の未知の作用に焦点をあてた。

＜2011 年度の成果、進行状況と今後の計画・展望＞
1. Rb による epigenetic 制御
細胞によるが、Rb 不活性化による腫瘍悪性進展は DNA 損傷応答とそれに続く細胞老化によって拮抗される。Rb 単独欠損細胞では、しばしば $p16^{Ink4a}$ 蛋白質のレベルが高い。この機構は、がん進展における Rb の重要な作用を示唆するかもしれない。Rb-ATM 二重欠損マウスに生じるＣ細胞腫は細胞老化を回避し高度に悪性化することを昨年報告した。Rb 不活性化により様々な経路(Mad2, BRCA1, cohesin, hyper-replication, Ras, ROS 等)を介してリン酸化された ATM が DNMT1(維持的 DNA メチル基転移酵素)と複合体を形成、TIP60 による DNMT1 へのアセチル基転移とこれに続いて UHRF1(E3 ligase)によって開始されるユビキチン化を促進することがわかった。これによって DNMT1 蛋白質が減る為に、Ink4a のプロモーター領域の DNA メチル化が細胞分裂ごとに漸次減少し、$p16^{Ink4a}$ の発現が上昇する。最後の問題は、pRb-HDAC 複合体がその脱アセチル基活性によって積極的に DNMT1 の翻訳後修飾に関わるか、そして、Ink4a 以外に Rb のステータスに依存して epigenetic に変動する遺伝子座があるかである。pRb は DNMT1 を始め様々なクロマチン修飾因子と結合することが知られるが、それが具体的にどのような遺伝子群を支配するのか不明であった。この経路を解くことによって、Rb による epigenetic 制御機構の一端が垣間見えると考える。
2. Rb による細胞内シグナル・代謝制御
Rb 不活性化が AKT^{Ser473} およびその標的群のリン酸化を Rictor 依存的に亢進した。Rb 不活性化はまた、多様な PKC ファミリーの活性を亢進する。この現象の機序を探索している。ひとつの考えは、Rb による脂質代謝の制御である。Rb 発現によっても細胞周期に影響のない系を用いて Rb 標的をマイクロアレー-KEGG 解析したところ、コレステロールと脂肪酸生合成経路に集中的に落ちた。以前これを E2F-1,3 による SREBP 転写制御という図式で説明したが、機序はさらに複雑のようである。形質膜に供給される脂質の量的・質的変化は、これらのシグナルに影響しておかしくない。まずは、Rb のステータスによって、細胞

内の代謝(脂肪酸、コレステロール、グルタミン酸依存性、酪酸排泄、いわゆるメタボローム、等々)がどのように変化するのかを慎重に検討している。また、Rb-Srebp-1 DKO マウスを作製し、遺伝学的な解析も開始した。一方、腫瘍特異的な代謝異常、すなわち、好気的解糖系と脂肪酸合成亢進における p53 と Rb の協調作用に注目している。前者を p53 が制御することが近年大きな注目を浴びている。我々は後者を Rb が制御すると考えている。脂肪酸合成に必要な炭素源は解糖系である。従来 ARF を介する apoptosis 制御によって結びつけられてきた二つの重要ながん抑制遺伝子が、がん特異的な代謝制御においても協調しているかもしれない。近年、E2F が、酸化的リン酸化に関わる多くの遺伝子の発現制御に関わることも報告され（E2F-1 欠損マウスは太らない)、治療標的としてのがん特異的代謝経路に大きな魅力を感じている。代謝経路を阻害する薬剤がすでに多数存在することも大事である。

3. インビトロがん幹細胞モデル

Rb ヘテロ型マウスに生じる C 細胞腺腫は、N-ras, Ink4a, Arf, Suv39h1, ATM, p53 のいずれを欠くバックグラウンドでも高度に悪性化する。中でも、p53 ホモ型欠損腫瘍は神経内分泌系統からの脱分化が著明で、in vitro 培養において非常に効率よく幹細胞様スフィアを形成する。ところが、p53 ヘテロ型欠損腫瘍は、中程度の分化度を示し、スフィア形成能はない。さらに、Rb-p53 両欠損 MEF は、スフィアを形成する上に、褐色脂肪細胞(BAT)への分化能が付加されることを見出した。昨年度は、Rb-N-ras 欠損 p53 変異 MEF が、スフィア形成能や ES 特異的遺伝子の発現誘導を示し、ヌードマウス精巣ニッチ中で奇胎腫様の腫瘍を形成することも示した。Rb の再構成は、この振る舞いに特異的に拮抗する。Rb 欠損も、p53 欠損も、それぞれ、iPS 細胞誘導効率を上昇させる。我々の作製した細胞由来のスフィアでは、Rb-p53 依存的な ES 細胞特異的遺伝子群の発現誘導が検出される。Rb と p53 による Nanog 遺伝子の epigenetic 制御がこの現象のキーのひとつになるのではないかと考えている。さて、ヒトがんのがん幹細胞は、単離が困難なうえに、不安定で、患者ごとに異なる。このことが、unbiased な解析あるいは high-throughput な標的薬開発を遅らせている。臨床癌との距離が遠いのは承知しているが、ヒト癌と似通ったデフェクトを持ち、幹細胞らしい振る舞いをするこの細胞系をがん幹細胞のシンプルモデルとして扱ってみることにした。まずは、FDA-approved drug library や標準阻害剤キット等を利用し、スフィア形成に拮抗する、あるいは、スフィア形成細胞由来の二次クローンに特異的に細胞傷害性を示す化合物をスクリーニングしてみる。すぐに応用できる薬剤が見つかるとは期待していないが、遺伝学的背景と薬効の相関をきわめてとりやすいこのような系ならば、Rb あるいは p53 不活性というコンテクストで「特別な意味を持つ」分子標的に出会うこともあり得るであろう。一方、前項の代謝制御の見地から、様々な脂質生合成拮抗薬のスフィア形成に与える影響をテストしたところ、血中コレステロールを下げる薬剤である statin 類が、ユニークな活性を示した。近年、「NAD ワールド」等の新語によって象徴されるように、細胞内の代謝産物の量的変動が、様々なクロマチン修飾因子の活性に影響することが知られつつある。がん抑制遺伝子-代謝-epigenetics-がんの幹細胞様振る舞いという見地からさらなる探索を進める。

＜研究業績＞

(発表論文)

研究室主体

Kitajima S, Miki T, Takegami Y, Kido Y, Noda M, Hara E, Shamma A, Takahashi C. Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. Oncogene 30(6): 737-750, 2011.

(総説)

高橋智聡「Ras シグナル制御と発癌」実験医学　増刊　「秒進分歩する癌研究と分子標的治療」Vol.29-No.2, p20-25, 2011　原英二、平尾敦、矢野聖二、佐谷秀行編　羊土社刊

北嶋俊輔、高橋智聡「インビトロがん幹細胞モデル」実験医学　増刊　「がん幹細胞-ステムネス、ニッチ、標的治療への理解」Vol.29-No.20, p203-209, 2011　須田年生編　羊土社刊

(学会発表)

高橋智聡　レチノブラストーマ遺伝子研究から見えるがんの進展制御
全国共同利用・共同研究「がんの転移・薬剤耐性に関わる先導的共同研究拠点」認定記念シンポジウム　平成 23 年 4 月 21 日　(がん進展制御研究所)

Takahashi C　The Rb-Ras pathway in malignant progression.　日本分子生物学会第１１回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム 平成 23 年 5 月 25 日 (金沢)

Shamma A, Takahashi C.　DNMT1 links DNA damage response and cellular senescence during Rb-deficient tumorigenesis.日本分子生物学会第１１回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム　平成 23 年 5 月 26 日(金沢)

Kitajima S, Takahashi C.　Reversion-inducing cystein-rich protein with Kazal motifs (RECK) interferes with Ras signaling.　日本分子生物学会第１１回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム　平成23年5月26日 (金沢)

高橋智聡　The Rb-Ras pathway in malignant progression.　研究所ネットワーク国際シンポジウム 平成 23 年 6 月 10 日 (東京)

高橋智聡 複合変異マウスによるヒトがんの理解とモデル化　第29回日本ヒト細胞学会学術集会 平成23年8月21日 (富山)

高橋智聡、北嶋俊輔、木戸敬治、Shamma A.　The Rb-Ras pathway in malignant progression - non-canonical functions of pRb.　第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 3 日 (名古屋)

Shamma A, Takahashi C. DNMT1 links DNA damage response and cellular senescence during Rb-deficient tumorigenesis. 第 70 回日本癌学会学術総会 平成 23 年 10 月 5 日 (名古屋)

高橋智聡　がん幹細胞標的薬探索のための in vitro がん幹細胞モデル系の開発 アステラス病態代謝研究会研究報告会　　平成 23 年 10 月 15 日 (東京)

Takahashi C, Kitajima S. The RB-SREBP nexus where RB meets cell signaling and lipid metabolism.　Second International Rb Meeting　平成23年11月17日 (Toronto, Canada)

Kitajima S, Muranaka H, Sasaki N, Kido Y, Takahashi C.　The RB-SREBP nexus where RB meets cell signaling and lipid metabolism.　Second International Rb Meeting　平成23年11月18日 (Toronto, Canada)

Kitajima S , Kido Y, Muranaka H, Sasaki N, Kohono S , Takahashi C.　The RB-SREBP signaling axis revealed by Rb composite knockout mouse studies. 第34回日本分子生物学会年会　平成23年12月14日 (横浜)

＜**外部資金**＞

高橋智聡：
最先端・次世代研究開発支援プログラム　助成金　5,300 万円
ノバルティス　研究奨励金　　100 万円
第一三共生命科学研究振興財団　研究助成金 100 万円
北國がん基金　助成金　100 万円

Shamma Awad：
科学研究費補助金　基盤 C　　60 万円

北嶋俊輔：
科学研究費補助金　若手 B　　200 万円

＜**共同研究**＞

金沢医科大学　岡崎俊朗博士　「SMS 抑制による細胞死誘導ｾﾗﾐﾄﾞ・ｼｸﾞﾅﾙ増強を介した Rb 遺伝子欠損マウスにおけるリンパ腫発症機構の制御」

筑波大学人間総合科学研究科　島野仁博士「がん幹細胞の脂質代謝における Rb がん抑制遺伝子と SREBP-1 遺伝子」

サンパウロ大学薬学部 Silvya Stuchi Maria-Engler 博士「Function of RECK in cell migration」

小野薬品工業株式会社筑波研究所　多田秀明博士、林昭夫博士「Rb がん抑制遺伝子による脂質代謝制御機構とその臨床的意義の解明」

スタンフォード大学　Julien Sage 博士「Shh signal in neuroendocrine tumors」

Pontificia Universidad Católica de Chile　Jaime Gutiérrez 博士「Function of RECK in muscle dystrophy」

がん進展制御研究所　山本健一博士「DNMT1 の翻訳後修飾」

がん進展制御研究所　松本邦夫博士「細胞老化とがん浸潤」

がん幹細胞探索プロジェクト

＜研究スタッフ＞

准教授：　仲　一仁
助教：　大田　久美子
博士研究員：　松田　崇志
技能補佐員：　定免　由枝

＜研究概要＞

これまで，プロジェクト主催者　仲は，遺伝子染色体構築研究分野　平尾敦教授の指導の下，TGF-β-FOXO シグナルが慢性骨髄性白血病（CML）幹細胞の治療抵抗性に必須な役割を担うことを報告した (Naka *et al.*, Nature 2010).

当研究プロジェクトは，2011 年 2 月，内閣府　最先端・次世代研究開発支援プログラムの採択に伴い，設置された．現在，1) TGF-β-FOXO シグナルによる CML 幹細胞の治療抵抗性メカニズムの解明，2) 本メカニズムを標的とする治療薬の開発，3) 固形がんのがん幹細胞治療への応用を目的とした研究を進めている．

＜2011 年度の主な研究成果と，今後の方向性＞

1) TGF-β-FOXO シグナルによる CML 幹細胞の制御機構（担当：大田，仲）

① FOXO の上流の制御メカニズム

【目的】CML 幹細胞の治療抵抗性メカニズムを解明するため，TGF-βシグナルによる FOXO の活性化メカニズムを解明する．

【本年度成果】CML 幹細胞において，FOXO の上流の制御に関わるシグナル伝達機構の解析を行った．その結果，CML 幹細胞では, PI3K p85, PDK1 のリン酸化状態が低下していることが明らかとなった．

【今後の方向性】最近，FOXO の活性化が急性骨髄性白血病 (AML) 幹細胞でも報告され (Sykes *et al.*, Cell 2011), がん幹細胞における共通の制御メカニズムの存在が示唆される．今後，上記の CML 幹細胞における FOXO 活性化メカニズム，並びにこのメカニズムの制御における TGF-βシグナルの関与について検討する．また，これらの制御メカニズムを標的とする治療薬の開発を試みる．

② TGF-β-FOXO の下流の転写標的遺伝子の検討

【目的】CML 幹細胞の治療抵抗性の制御に関わる TGF-β-FOXO の転写標的遺伝子を特定する．

【本年度成果】cDNA マイクロアレイ解析により明らかになった TGF-β-FOXO 標的

候補遺伝子について，CML 幹細胞における発現，レポーター解析，ChIP 解析を開始した．

【今後の方向性】引き続き，候補遺伝子の解析を行う．TGF-β-FOXO 標的遺伝子が明らかになった場合，shRNA によるノックダウンやノックアウトマウスを用いて CML 幹細胞の治療抵抗性における役割を明らかにする．

2) TGF-β-FOXO シグナルを標的とする治療薬の検討（担当：定免，仲）

【目的】 TGF-β-FOXO シグナルを標的とする CML 幹細胞の治療薬を開発する．

【本年度成果】マウス CML 幹細胞を用いて，TGF-β-FOXO シグナルを標的とする治療薬の検討を行った．その結果，*in vitro* でマウス CML 幹細胞のコロニー形成能を抑制できる新規候補化合物を見いだした．

【今後の方向性】ヒト CML 幹細胞に対する候補化合物の抑制効果を検証する．

3) 固形がんのがん幹細胞の治療への応用（担当：松田，仲）

【目的】CML 幹細胞の解析により明らかになった TGF-β-FOXO シグナルによる治療抵抗性メカニズム，並びにこのメカニズムをターゲットとする治療薬が固形がんのがん幹細胞治療にも応用可能か検討する。

【本年度成果】マウス乳がんモデル MMTV-PyMT マウスから乳がん幹細胞の純化を試みた．この乳がん幹細胞 ($CD24^{+}Lin^{-}$細胞)をレシピエントマウスの乳腺脂肪組織へ移植し，二次腫瘍の発症に成功した．次に，この乳がん幹細胞への GFP 遺伝子導入を試みた．その結果，低酸素環境下で乳がん幹細胞を培養し，遺伝子導入を行うことで，GFP 遺伝子導入乳がん幹細胞の移植に成功した．

【今後の方向性】マウス乳がん幹細胞への FOXO ドミナントネガティブ変異体の導入を行い，乳がん幹細胞の自己複製能の維持，EMT，転移における FOXO の役割を解析する．

＜発表論文＞

原著論文

(研究室主体)

なし

(共同研究)

Muraguchi T., Tanaka S., Yamada D., Tamase A., Nakada M., Nakamura H., Hoshii T., Ooshio T., Tadokoro Y., Naka K., Ino Y., Todo T., Kuratsu J., Saya H., Hamada J., and Hirao A. (2011) Suppression of glioma-initiating cell self-renewal by NKX2.2. **Cancer Res.**

71(3):1135-1145. PMID: 21169405

総説

1. Naka K., Hoshii T., Tadokoro Y., and Hirao A. (2011) Molecular Pathology of Tumor-initiating Cells: Lessons from Philadelphia-positive leukemia **Pathology International.** 61(9) 501-508. PMID: 21884299
2. Naka K., and Hirao A. (2011) Maintenance of genomic integrity in hematopoietic stem cells. **International Journal Hematology.** 93 (4): 434-439. PMID: 21384097
3. 仲　一仁, 癌幹細胞のバイオマーカー, **Frontiers in Gastroenterology**, 17(1),70-76, 2012.
4. 仲　一仁, 平尾　敦, 慢性骨髄性白血病のCSC, **バイオクリニカ**, 26(6): 44- 48, 2011.
5. 仲　一仁, 平尾　敦, CML 幹細胞の制御メカニズム, **Annual Review 血液　2011**, 中外医学社，8-13，2011.
6. 仲　一仁, 平尾　敦, がんの“幹細胞らしさ”と治療抵抗性のメカニズム，秒進分歩する癌研究と分子標的治療，**実験医学増刊**，羊土社, 29(2), 132-139，2011.

＜学会発表＞

1. 仲　一仁,「がん幹細胞の治療抵抗性メカニズム」，神戸大学第35回膜生物学GCOE学術講演会，平成23年11月11日, 神戸市

一般対象

1. 仲　一仁, 市民公開講座「幹細胞とがん」，平成23年5月17日，金沢市
2. 仲　一仁,「金沢大学　まちなか　サイエンスセミナー」, 平成23年12月23日, 金沢市

＜外部資金＞

公的資金

仲　一仁：内閣府　最先端・次世代研究開発支援プログラム
「抗がん剤抵抗性がん幹細胞をターゲットとする革新的がん治療戦略」
平成 22-25 年度総額 直接経費 118,000 千円，間接経費 35,400 千円

仲　一仁：　新学術領域　「がん微小環境ネットワークの統合的研究」
総括班員　（直接経費　なし）

民間資金

1. 仲　一仁: 第 43 回 (2011 年度)内藤記念科学奨励金研究助成
「CML 幹細胞の治療抵抗性を制御する TGFβ-FOXO 標的遺伝子の解明」
3,000 千円
2. 仲　一仁: 公益信託　日本白血病研究基金研究助成事業・荻村孝特別研究賞
「チロシンキナーゼ阻害薬抵抗性の CML 幹細胞を標的とした治療薬の開発」
1,500 千円
3. 仲　一仁: 財団法人　安田記念医学財団　癌研究助成
「TGFβシグナルによる CML 幹細胞の治療抵抗性機構の解明」2,000 千円

＜共同研究＞

学内

1. CML 幹細胞の治療抵抗性メカニズム：遺伝子染色体構築　平尾敦
2. CML 幹細胞の自己複製機構：分子生体応答　馬場智久，向田直史
3. CML 幹細胞の自己複製機構：　医学系研究科　小児科　西村良成

学外

1. CML 幹細胞の維持機構: 東京医科歯科大学　佐藤卓　樗木俊聡
2. CML 幹細胞の維持機構: 秋田大学　伊藤貢　田川博之
3. 乳がん幹細胞の維持機構:　慶応義塾大学　甲斐千晴　佐谷秀行
4. 乳がん幹細胞の維持機構:　神戸大学　下野洋平　高井義美
5. Foxo3a シグナルの役割: 国立長寿医療センター研究所　本山昇
6. TGF-βシグナルの役割: CHA Cancer Institute, CHA University (Korea)
大島章　Seong-Jin Kim
7. TGF-βシグナルの役割: 理化学研究所 阿部高也　相沢慎一

がん微小環境研究プログラム

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
特任助教　　淑瑠　ヘムラサビット
技能補佐員　山岸　小百合
大学院（博士）堂本　貴寛、郭　魯泱、田中　望

＜研究概要＞

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MT1-MMP)はがんの浸潤・転移・運動・増殖など様々ながん悪性化形質に関与している。MT1-MMP はMMP-2 の活性化に加えて、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分、膜たんぱく・リガンド分子などを切断・不活化する。MT1-MMP 以外の MMP については、転移促進活性と共にがん抑制因子としての活性も報告されている。特異性のない MMP 阻害薬剤による全ての MMP の阻害が治験の失敗原因のひとつと考えられている。したがって MT1-MMP 特異的な阻害剤が期待されている。我々は MT1-MMP のがん悪性化に果たす役割を明らかにするとともに MT1-MMP を標的とした制御法の開発を目指している。

＜2011 年度の研究成果・今後の計画＞

MT1-MMP によるファイブロネクチンの重合と集積抑制：

ファイブロネクチンは細胞外マトリックスの重要な構成成分であり、重合・集積し線維化することにより、細胞外マトリックスとしての機能を果たしている。糖質コルチコイドであるデキサメサゾンはヒト線維肉腫 HT1080 細胞におけるファイブロネクチンの産生を亢進するが、その重合・集積は起こさない。デキサメサゾンと共に MMP 阻害剤あるいはMT1-MMP に対する siRNA を併用処理することにより HT1080 細胞の周囲にファイブロネクチンの重合・集積を引き起こすことを見出した。ファイブロネクチンの集積にはカドヘリンを介した細胞接着が必須であり、MT1-MMP は HT1080 細胞の発現する N-カドヘリンを切断することによりファイブロネクチンの集積を制御していることが明らかとなった。HT1080 細胞の３次元コラーゲンゲル培養にデキサメサゾンと MMP 阻害剤を添加するとファイブロネクチンの著しい重合・集積が起こり、細胞浸潤は強く抑制されたが、細胞増殖は MMP 阻害剤による抑制がデキサメサゾン添加ではむしろ回復した。発育鶏卵およびヌードマウス移植 HT1080 細胞においてもデキサメサゾンと MMP 阻害剤の併用では、MMP 阻害剤単独よりも増殖抑制は弱かった。すなわち線維化したファイブロネクチンは浸潤を強く抑制するものの細

胞生存シグナルを誘導することが明らかとなった。

MT1-MMP による HAI-1 切断は Protease Storm を引き起こす：
昨年度、MT1-MMP の新規基質として膜型のセリンプロテアーゼ阻害因子 HGF Activator Inhibitor-1 (HAI-1)を同定したことを報告した。HAI-1 は膜型セリンプロテアーゼであるマトリプターゼの Cognate Inhibitor である。マトリプターゼはがんの悪性度と密接に関わる uPA (urokinase-type Plasminogen Activator)や HGF を活性化するなど、がんの悪性化に広く関与している。実際に扁平上皮がん由来 HSC-4 細胞をコラーゲンゲル３次元培養すると、MT1-MMP の活性化に伴い HAI-1 の切断・シェディングが起こりマトリプターゼの活性化が確認された。HSC-4 細胞のコラーゲンゲル内の浸潤性増殖には MT1-MMP と共にマトリプターゼも必須であった。このようにマトリプターゼが活性化された HSC-4 細胞は uPA を活性化する。uPA はプラスミンを活性化することにより一連のセリンプロテアーゼカスケイドを活性化し得る。さらにこれらのセリンプロテアーゼは MMP-9 などの多くの MMP を活性化する。すなわち MT1-MMP による HAI-1 切断がトリガーとなりセリンプロテアーゼ・MMP カスケイドが一斉に活性化される Protease Storm が起こり得ることを提唱した。現在、HAI-1 のプロテアーゼ阻害以外の機能を検討中である。

悪性脳腫瘍における MT1-MMP, PTEN, IDH1 その他関連分子の発現と悪性化の解析：
これまでにグリオーマにおける MT1-MMP 発現と悪性度の関連を報告してきた。最近、グリオーマにおける MT1-MMP のユニークな制御機構を見出し、その詳細なメカニズムを解析中である。また、近年グリオーマの初期にイソクエン酸デヒドロゲナーゼ(Isocitrate dehydrogenase-1:IDH1)の変異が生じることが発見され、IDH 特異的抗体を使用した免疫染色により浸潤グリオーマ細胞を同定することが可能となった。そこで IDH1 免疫染色により浸潤グリオーマ細胞の性質を病理学的に調べ、MT1-MMP および関連因子との関係を検討している。

＜**発表論文**＞
＜**原著論文**＞
研究室が主体となったもの：

Domoto T, Takino T, Guo L, Sato H. Cleavage of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1 by Membrane-Type MMP-1 Activates Matriptase. Cancer Sci. (in press)

Takino T, Nagao R, Manabe R, Domoto T, Sekiguchi K, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. FEBS Lett. 2011:3378-84.

＜学会発表＞

Luyang Guo, Takahiro Domoto, Takahisa Takino, Hiroshi Sato. 「Cleavage of KIM-1 by MT1-MMP」2011 年 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム-金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）

堂本 貴寛、滝野 隆久、佐藤 博
「MT1-MMP による HAI-1 切断を介したセリンプロテアーゼ系の制御」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成２3 年６月 30－７月１日　浜松）
Guo Luyang、滝野　隆久、佐藤　博
「MT1-MMP による免疫グロブリンファミリー膜タンパク KIM-1 の切断」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成２3 年６月 30－７月１日　浜松）
滝野隆久、堂本 貴寛、佐藤 博
「MT1-MMP によるフィブロネクチンの重合と集積抑制」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成２3 年６月 30－７月１日　浜松）

堂本 貴寛、滝野 隆久、佐藤 博
「MT1-MMP activates matriptase through the cleavage of its inhibitor HAI-1」
第 70 回日本癌学会学術総会（2011 年１０月３－５日　名古屋）
滝野 隆久、堂本 貴寛、佐藤 博
「MT1-MMP regulates fibronectin assembly」
第 70 回日本癌学会学術総会（2011 年１０月３－５日　名古屋）

＜外部資金＞

基盤研究（Ｂ）４５０万円（代表）佐藤博　（分担）滝野隆久、中田光俊
「膜型マトリックスメタロプロテアーゼ－１のがん悪性化形質に果たす役割の解析」

基盤研究（C）１１０万円（代表）滝野隆久
「細胞外微小環境変化と細胞運動誘導」

＜**共同研究**＞

中田　光俊　（金沢大学医学系研究科　脳外科）

「グリオーマにおける MT1-MMP 制御機構の解析」

関口 清俊　（大阪大学蛋白質研究所）

「MT1-MMP によるファイブロネクチン重合の制御機構の解析」

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　　博士研究員：佐々木宗一郎

技能補佐員：南邦子

＜研究概要＞

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。

＜2011 年度の進捗状況＞

１）アゾキシメタンとデキストラン硫酸塩との投与によって生じる大腸がんモデルにおいて、従来報告してきた腫瘍壊死因子やケモカインである CCL2 以外に、別のケモカイン CCL3 がシクロオキシゲナーゼ（COX）-2 を発現している顆粒球の大腸組織への浸潤を制御することで、大腸がん発症に関与していることを明らかにした。

２）胸腺皮質に選択的に存在する Sirpα陽性の樹状細胞亜群が血中由来の抗原の胸腺での取り込みを行い、Negative selection または抑制性 T 細胞への分化を誘導する機構が腫瘍免疫にも作用している可能性を示唆する結果が得られた。

３）IL-1 receptor antagonist 遺伝子欠損マウスにおいて自然発症する多発性関節炎に対して、内因性の CCL2 が破骨細胞の生成を制御することによって抑制的に働く一方で、薬理量の CCL2 を投与すると関節炎が悪化することを認めた。

４）医薬保健研究域薬学系の石橋弘行教授との共同研究で開発した、Pim-3 キナーゼ活性を抑制する置換フェナントレン化合物が、ヒト膵臓がん細胞株の試験管内での増殖を抑制するのみならず、ヒト膵臓がん細胞株を接種されたマウスに投与すると、明らかな副作用を引き起こさずに、腫瘍を退縮することを明らかにした。

＜今後の計画＞

１）ケモカイン関連遺伝子欠損マウスを用いて、種々の発がんモデル・転移モデルにおける病態を分子・細胞レベルで解析して、腫瘍部位に存在する腫瘍細胞・骨髄系細胞・線維芽細胞に対する、各々のケモカインの病態生理学的作用を明らかにする。

２）現在までに得られている置換フェナントレン化合物に対して種々の修飾を加えた化合物の抗がん作用を検討する。さらに、Pim-3 活性の阻害作用を指標として、抗がん作用を保有する低分子化合物のスクリーニングを行うとともに、Pim-3 の病態生理学的作用を分子レベルにて解析する。

研究業績

（所属研究者は下線で示した）

原著論文

分野主体の研究論文

1. Fujii H, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Yamagishi M, Kawano M, and Mukaida, N. Ablation of *Ccr2* gene exacerbates polyarthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum* 63 (1): 96-106, 2011.
2. Wang Y-Y, Taniguchi T, Baba T, Li Y-Y, Ishibashi H, and Mukaida N. Identification of a phenanthrene derivative as a potent anti-cancer drug with Pim kinase inhibitory activities. *Cancer Sci* (in press).

他の研究室との共同研究

1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin Exp Immunol* 163 (2): 165-177, 2011.
2. Inui M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, and Kondo T. Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Immunol* 186 (1): 423-431, 2011.
3. Shimizu K, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Matsushima K, Mukaida N, Kaneko S, and Wada T. Fractalkine and its receptor, CX3CR1, promote hypertensive interstitial fibrosis in kidney. *Hypertension Res* 34 (6): 747-752, 2011.
4. Chen Y, Chen L, Li J, Mukaida N, Wang Q, Yang C, Yin WJ, Zheng XH, Jin W, and Shao ZM. ERβ and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote invasion of breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 11 (5): 497-511.
5. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, and Kondo T. Absence of IFN-γ accelerates thrombus resolution through enhancing MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest* 121 (7): 2911-2920, 2011.
6. Liu G, Lu P, Li L, Jin H, He X, Mukaida N, and Zhang X. Critical role of SDF-1α-induced progenitor cell recruitment and macrophage VEGF production in the experimental corneal neovascularization. *Mol Vis* 17: 2129-2138, 2011.
7. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, and Kondo T. Pivotal role of CCL5-CCR5 axis for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest* (in press).

総説論文（英文論文に限る）

1. Mukaida N, Wang Y-Y, and Li Y-Y. Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis. *Cancer Sci* 102 (8): 1437-1442, 2011.

2. Mukaida N, Sasaki S, and Popivanova BK. Tumor necrosis factor and chemokines in colitis-associated cancer. *Cancers* 3: 2811-2826, 2011.
3. Mukaida N and Baba T. Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res* 318: 95-102, 2012.

学会発表（筆頭発表者が分野所属の者に限る）

1. Mukaida N. Lu P, Li L. Liu G, and Zhang X. Critical contribution of TNF-α to experimental corneal neovascularization by enhancing VEGF and iNOS expression by infiltrating macrophages. 13th International TNF Conference. May 15 to May 18, 2011, Awaji, Japan.
2. Mukaida N. Roles of chemokines in tumor development and progression. 第32回日本炎症・再生医学会。2011年6月2日、3日、京都。（招待講演）
3. 向田直史。新規のPimキナーゼ阻害剤によるヒト膵臓がん細胞株増殖抑制効果。第15回日本がん分子標的治療学会学術集会。2011年6月22日~24日、東京。
4. Wang Y-Y, and Mukaida N. Inhibition of in vitro growth of human pancreatic cancer cell lines by a novel Pim-3 kinase inhibitor. 第70回日本癌学会学術集会。2011年10月3日~5日、名古屋。（English Oral Session）
5. 佐々木宗一郎、馬場智久、楊秀峰、向田直史。炎症誘発腫瘍形成マウスモデルにおけるCCL3ケモカインの関与。第70回日本癌学会学術集会。2011年10月3日~5日、名古屋。（Japanese Oral Session）
6. 佐々木宗一郎、馬場智久、楊秀峰、向田直史。マウス大腸がん発がんモデルにおけるCCL3の重要性。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。
7. 馬場智久、向田直史。胸腺perivascular DCによる血中抗原取り込みと制御性T細胞の分化誘導。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。
8. 浜野良子、馬場智久、川野充弘、山岸正和、向田直史。抗原特異的制御性T細胞は抗原へ有意に集積する。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。

知的財産

特願2011-121088　（平成23年5月30日出願）

発明者：　向田直史、石橋弘行、谷口剛史。

発明名称：　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／または治療するための医薬組成物。

外部資金

向田直史

１．科学研究費・基盤研究（B）（代表）

「炎症を基盤とするがん化過程における腫瘍壊死因子・ケモカインの役割の解析」

（直接経費 4,600 千円、間接経費 1,380 千円）
２．戦略的創造研究推進事業 CREST「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究領域（分担）「慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤」
（直接経費 3,000 千円、間接経費 900 千円）
馬場智久
１．科学研究費・若手研究（B）
「胸腺 Sirpα+樹状細胞による自己免疫寛容の新規誘導メカニズムの解明」
（直接経費 1,700 千円、間接経費 510 千円）

学内との共同研究
１．　医薬保健研究域・薬学系　石橋弘行教授、谷口剛助教
Pim-3 キナーゼ阻害活性を指標とした、新規の抗がん剤の開発
２．　医薬保健研究域・医学系　金子周一教授
免疫樹状細胞療法の開発
３．　医薬保健研究域・医学系　和田隆志教授
腎疾患におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
４．　医薬保健研究域・医学系　川野充弘講師
関節リウマチにおけるケモカインの病態生理学的役割の解析
５．　医薬保健研究域・医学系　加畑多文助教
骨折におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
６．　フロンティアサイエンス機構　太田嗣人助教
メタボリック・シンドロームにおけるケモカインの病態生理学的役割の解析
学外との共同研究
１．　東京大学・薬学系研究科　岡部隆義教授
Pim-3 活性阻害作用を指標とした低分子化合物のスクリーニング
２．　東京大学・医学系研究科　松島綱治教授
慢性炎症・がん化過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
３．　神奈川歯科大学・歯学部　畑隆一郎教授
ケモカイン BRAK/CXCL14 のがん病態での病態生理学的役割の解析
４．　和歌山県立医科大学・医学部　近藤捻和教授
慢性炎症時の組織修復過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
５．　米国国立がん研究所 J.J. Oppenheim 博士
慢性炎症・がん化過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
６．　中国・蘇州大学・医学部　陸培英准教授
新生血管形成過程の分子病理学的解析
７．　中国・復旦大学・医学部　李影奕准教授
Pim-3 の病態生化学的役割の解析

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	王　　強 (D4)、串山　裕子(D2)
技術補佐員	劉　　璟壬

＜研究概要＞

がん組織においては血流不足による低酸素、低栄養や抗がん剤の影響で多くの細胞が死ぬ。これまでの我々や他の研究から、死につつある細胞や死細胞から様々な炎症誘導シグナルが発せられることが明らかになってきた。我々は、死細胞が発する炎症シグナルががん微小環境に影響を与え、がんの消長や悪性化に影響を及ぼすと考え、細胞死と炎症のシグナル伝達の接点で働く蛋白質に着目した研究を行っている。最近は、特に自然免疫応答や細胞死の誘導・制御に働く NLR ファミリー に属する細胞質蛋白とそのシグナル伝達因子 ASC に着目した研究を行っている。

＜2011 年度の研究成果及び今後の研究計画＞

1) トリコスタチン A の IL-1β 産生誘導機構の解析 : ヒストン脱アセチル酵素（HDAC）阻害剤は抗がん剤の候補として開発が進められている。我々は、HDAC 阻害剤のプロトタイプであるトリコスタチン A が PMA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)で前処理したヒト単球様白血病細胞株 THP-1 に細胞死と炎症性サイトカイン IL-1β の産生を誘導することを見出した。この IL-1β の産生は近年インフラマゾームの構成蛋白として注目されている NLRP3、ASC およびカスパーゼ 1 に依存した応答であり、NADPH オキシダーゼ阻害剤で抑制されることを明らかにした。また、トリコスタチン A 処理により THP-1 の活性酸素レベルが上昇したことから、トリコスタチン A は活性酸素の生成を誘導することで NLRP3 の活性化を誘導し、IL-1β の産生を誘導すると考えられる。今後は、同様の作用が他の HDAC 阻害剤でも誘導されるか、また同様の応答が他の腫瘍細胞や正常なヒト単球細胞でもみられるか検討する予定である。

2) PYNOD の機能解析 : NLR ファミリーのメンバーで、ASC とカスパーゼ 1 の阻害蛋白として我々が同定した PYNOD のノックアウトマウスを樹立し、解析を行っている。現在 B6 への戻し交配中であるが、今年度はその途中で作製した PYNOD 欠損マウスを用いて野性型マウスとのプレリミナリーな比較検討を行った。その結果、PYNOD

欠損マウスから調整したケラチノサイトは野性型に比べ UVB 刺激後の TNFα産生が低いことを見出した。今後、自然免疫系の応答をさらに詳細に比較検討するとともに、獲得免疫系などにも異常がないか検討する予定である。また、当研究所の大島教授らが開発した胃がんモデルマウス（Gan マウス）の胃病変部において PYNOD の発現が著明に増加していることを発見した。今後は PYNOD 欠損 Gan マウスを樹立し、胃がんの発症率や悪性度に変化がないか検討する予定である。さらに、当研究所の源教授との共同研究により、ヒトの胃がんや大腸がん病変部における PYNOD の発現についても検討する予定である。

3) ヒト線維肉腫 HT1080 細胞株の IL-1β 産生機構の解析：我々はこれまでにがん細胞で発現している NLRP3 が NF-κB 活性化、IL-1β mRNA の産生に寄与していることを示唆する知見を得ている。一方、多くの NLRP3 発現がん細胞では IL-1β mRNA を発現しているにも関わらず IL-1β前駆体蛋白を検出できていない。そこで代表的な細胞内蛋白質分解系であるプロテアソーム、オートファジーの各阻害剤を試したところ、オートファジー阻害剤 3-MA 処理によって、さらにはオートファジー誘導因子 Beclin-1 のノックダウンによって HT1080 細胞内の IL-1β前駆体量が増加する事を見いだした。同様の結果をメラノーマ細胞株 SK-MEL28 でも得た。興味深いことに Beclin-1 ノックダウンによって NLRP3 も増加していた。これらからがん細胞 IL-1β産生は NLRP3-NF-κB 経路による促進とオートファジー分解による抑制のバランスで制御されていることが示唆された。今後はがん細胞の NLR 経路、オートファジー誘導分子のノックダウンとその解析により、がん細胞 IL-1β産生を制御する機構の解明を目指す。また、ヒト胃がんおよび大腸がんの臨床検体サンプルの NLR, オートファジー関連因子、IL-1βの発現レベルについても解析し、がん進行度、悪性度との相関を検証する予定である。

研究業績

＜**論文発表**＞

原著

当研究室主体の発表論文

1. Motani, K., Kushiyama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., Nishiuchi, T., and Suda, T.: Caspase-1 protein induces apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)-mediated necrosis independently of its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 2011, 286(39):33963-33972

共同研究による発表論文

2. Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., and Harada, M.: Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother*. 2012, in press
3. Furuichi, K., Kokubo, S., Hara, A., Kitajima, S., Toyama, T., Okumura, T., Suda, T., Mukaida, N., Kaneko, S. and Wada, T.: Fas ligand has greater impacts on apoptosis and inflammation in ischemic acute kidney injury than TNF-α. *Nephron Extra* 2012, in press.

＜**学会発表**＞

1. Motani, K., Kushiyama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., and Suda, T.: Caspase-1 induces ASC-mediated necrosis independently of its catalytic activity. 13th International TNF Conference,（Awaji）May 18, 2011
2. Imamura, R., Kinoshita, T., Wang, Q., Kushiyama, H., and Suda, T.: Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 日本分子生物学会 第 11 回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）2011 年 5 月

1. 須田貴司 : 細胞死の様態を決定する新しい分子機構. 第 20 回日本 Cell Death 学会学術集会 シンポジウム,（東京）2011 年 7 月
2. Kushiyama, H., Imamura, R., Suda, T.: Trichostatin A induces macrophage IL-1β production by activating NLRP3 inflammasome. 2011 年日本免疫学会学術集会 ワークショップ,（幕張）2011 年 11 月
3. Suda, T., NLRs: cytoplasmic stress sensors mediating inflammation and cell death. 第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム,（横浜）2011 年 12 月
4. Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T.: NLRP3 mediates NF-κB activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会,（横浜）2011 年 12 月

＜**外部資金**＞

1. 須田貴司、科学研究費 基盤研究（B）（代表）: 炎症抑制型ＮＬＲ蛋白ＰＹＮＯＤの生理的・病理的役割の解明.（直接経費 6,000 千円、間接経費 1,800 千円）
2. 今村 龍、科学研究費 基盤研究（C）（代表）: 皮膚における ASC および PYNOD の機能の解明.（直接経費：700 千円, 間接経費：210 千円）
3. 今村 龍、科学研究費 新学術領域「発がんスパイラル」（公募）（代表）: 胃がんおよび大腸がんの発症における細胞質病原体センサー蛋白の役割の解明.（直接経費：4,500 千円, 間接経費：1,350 千円）

4. 木下　健、科学研究費　基盤研究（C）（代表）：自然免疫ストレスセンサーNLRP の新機能とその分子機構解明.（直接経費：2400 千円, 間接経費：720 千円）

＜**共同研究**＞

学外

1. 島根大学医学部・原田 守 教授、原嶋 奈々江 助教
   Toll 様レセプター刺激により誘導される前立腺癌細胞の細胞死メカニズムの解明
2. 小澤　岳昌（東京大学理学系研究科化学専攻･教授）
   ネクローシス細胞の可視化技術の開発
3. 千葉大学大学院医学研究院・神戸 直智 准教授
   ASC が関わる炎症とプログラム細胞死のクロストーク解明
4. 早稲田大学理工学術院・合田 亘人 教授
   理化学研究所植物科学研究センター・及川 彰 研究員
   プログラムネクローシス細胞のメタボローム解析

学内

1. 医薬保健研究域医学系　和田 隆志 教授、古市 賢吾 准教授
   虚血性急性腎障害における Fas リガンドの役割
2. 医薬保健研究域薬学系・太田 富久 教授、川畑 哲郎 助教
   ASC を活性化する海洋微生物由来天然物の探索

所内

1. 腫瘍遺伝学研究分野　大島 正伸 教授
   胃がん発症モデルマウスにおける PYNOD の役割の検討
2. 腫瘍制御研究分野　源 利成 教授
   ヒト消化器がんにおけるインフラマゾーム関連遺伝子発現の解析

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　酒井克也
研究協力員：鈴木芳典
大学院生：　Quig Xu（徐慶）　道越洸允　学生：　横山茉梨
技術補佐員：丹保智佳子　技能補佐員：端谷　泉

＜研究概要＞

がんは修復に至らない傷（wound that do not heal）に例えられる。組織傷害を引き金とする炎症から組織修復につながるメカニズムが、がんの微小環境の形成や微小環境を介したがんの悪性進展に関与する。HGF（hepatocyte growth factor）は Met チロシンキナーゼを受容体とし、主として間葉因子として上皮組織の３次元（3-D）形態形成、肝臓をはじめとする組織の再生を担う。一方、HGF は増殖因子の中でとりわけがん細胞の 3-D 浸潤を促す生物活性が強く、がん転移に深く関与する。加えて、HGF は抗がん剤に対する耐性獲得に関与することが明らかにされた。HGF-Met 系を介した組織修復の仕組みは悪性腫瘍の生物学的特性に深く関与すると考えられる。

私達はがん微小環境を介したがん悪性化（浸潤・転移・薬剤耐性）ならびに組織再生制御における HGF-Met 系の意義の研究を中心に進めており、とりわけ HGF に対する応答性を左右する Met 受容体活性化抑制機構、HGF による 3-D 上皮-間葉転換と形態形成のダイナミクス、HGF-Met 系を介した肝再生制御の研究などを行っている。また、研究成果を疾患の治療につなげることも研究の完成に向けた取り組みである。構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 阻害剤の創薬研究、HGF タンパク質医薬による難治性疾患の治療法開発にも力を注いでいる。

良性腫瘍と悪性腫瘍の明確な違いは、悪性腫瘍は活発に組織内を浸潤することであり、活発な浸潤性はがん転移につながる。がんの 3-D 浸潤性制御の研究から、自律的に 3-D 浸潤性を示す細胞と、たとえ HGF などの増殖因子が存在しても浸潤性を示さない非浸潤性細胞に分けられることがわかった。3-D 浸潤性獲得のメカニズムについての研究もスタートした。また、当初、Kringle ドメインをもつ受容体様分子として Kremen が発がんや幹細胞維持に関与する Wnt/β-catenin シグナル制御分子であることから、がん組織における Kremen の生理機能の研究も進めている。これらの研究を発がんやがんの浸潤・転移制御に関わる新たな展開を目指す研究として進めている。

＜2011 年度の主な成果と今後の計画＞

1. 構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 系阻害剤創製研究

バイオインフォマティクス技術やタンパク質構造解析の研究者と協力し、HGF と Met 受容体相互作用を阻害する低分子創薬研究を進めている。前年までに HGF-Met 系に対する阻害活性をもつリード化合物を数個見いだした。これらリード化合物は HGF によるがん細胞の 3-D 浸潤を阻害し、IC50 は数μM～数 10 μM であった。また、リード化合物と HGF-Met タンパク質との共結晶構造の解析に成功し、リード化合物

が HGF-Met 相互作用ポケットにドッキングする構造を明らかにした。

2. HGF-Met 系を介した肝再生制御の研究
HGF に対する応答性は傷害の有無によって制御されている。Met 受容体 OFF 機構の１つとして、Met 受容体 juxtamembrane 領域 Ser985 リン酸化に着目している。肝細胞培養系において Met-Ser985 のリン酸化が Met 受容体の細胞膜局在を減少させ HGF による Met チロシンリン酸化を抑制することを明らかにした。肝再生過程で Met 受容体 Ser985 リン酸化とチロシンリン酸化が相反的に制御されることから、傷害の有無によって HGF に対する応答性を制御するメカニズムの１つと考えられる。

3. がん細胞 3-D 浸潤性ならびに上皮 3-D 形態形成のダイナミクスの研究
各種ヒトがん細胞はコラーゲンゲル内での 3-D 培養系において、（たとえ HGF 存在化でも）浸潤性を示さないものと自立的浸潤性を示すがん細胞に分けられる。非浸潤性と浸潤性を区別するメカニズムとして細胞外マトリックス分解酵素の遺伝子のヒストン/DNA メチル化の詳細を明らかにした。

4. 低分子 IP 受容体アゴニストによる HGF 発現誘導を介した肝傷害抑制
プロスタグランジン I_2（PGI_2）や $PGE_{1/2}$ は組織傷害を抑制する作用をもつことが知られているがそのメカニズムの多く不明である。PGI2 受容体（IP 受容体）アゴニスト作用をもつ化合物（ONO-1301）を用いて、ONO-1301 は強い HGF 発現誘導活性をもち、HGF 発現誘導を介して急性肝傷害を強く抑制することを明らかにした。

5. 肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルと Kremen（Krm）の機能の研究
ヒト肺がん細胞を用いて Krm の発現が Wnt/β-catenin シグナルを抑制すること、肺がん細胞やヒト肺がん組織で Krm の発現が著しく低下していることを明らかにした。Krm の発現が失われることが肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルの抑制機能の低下につながると考えられる。

＜今後の展望＞
1. がん細胞 3-D 浸潤性ならびに 3-D 上皮形態形成のダイナミクス: 上記の成果に続き、非浸潤性 vs 浸潤性に関与する遺伝子セットの ON-OFF 制御の詳しい機構を明らかにする。一方、乳腺上皮細胞は HGF により 3-D 管腔構造を形成する。分化転換の可視化を用いることで、上皮—間葉転換のダイナミクスと 3-D 上皮形態形成機構の解明を進める。上皮は乳がん、肺がん、前立腺がんなどのルーツであり、上皮組織化機構の研究はがん微小環境を介した悪性化の理解につながる。
2. 構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 系阻害剤創製研究: 化合物-HGF 複合体の結晶構造解像度を高めることによる分子設計の精度を高めること、化学合成チームの協力を得て化合物数を増やすことによって、数十倍〜100 倍の活性向上を目指す。
3. 肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルと Kremen の機能の研究: In vitro/invivo 腫瘍形成に対する Kremen の阻害活性を解析しており、上記と合わせて論文報告する。

研究業績

＜論文＞

1. Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Imizu T, Matsumoto K. 3-D collagen- and MT1-MMP-dependent MMP-2 activation in human malignant mesothelioma cells. ***Biochem Biophys Res Commun***, 412: 98-103, 2011.

2. Xu Q, Nakayama M, Suzuki Y, Sakai K, Nakamura T, Sakai Y, Matsumoto K. Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression. ***Am J Physiol***, 302: G420-G429, 2012.

＜総説＞

1. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. ***J Gastroenterol Hepatol***, 26: 188-202, 2011.

2. Sakai K, Nakamura T, Kinoshita T, Nakamura T, Matsumoto K. HGF-antagonists: structure, activities, and anti-cancer approach. ***Current Signal Transduction Therapy,*** 6: 191-199, 2011.

3. Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Significance, mechanisms, and progress of anticancer drugs targeting HGF-Met. In "***Cancer Treatment***", InTech Open Access Publisher, pp. 313-332, 2011.

＜共同研究による論文＞

1. Komamura K, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Onoe T, Matsumoto K, Nakamura T, Miyazaki J, Horio T, Sugimachi M. Cellular injury of cardiomyocytes during hepatocyte growth factor gene transfection with ultrasound-triggered bubble liposome destruction. ***J Drug Delivery***, 2011: 1-8, 2011.

2. Azuma H, Isaka Y, Nomi H, Inamoto T, Li XK, Hőunig T, Takabatake Y, Ichimaru N, Ibuki N, Matsumoto K, Ubai T, Katsuoka Y, Takahara S. Induction of donor-specific tolerance using superagonistic CD28 antibody in rat renal allografts: Regulatory T-cell expansion before engraftment may be important. ***Transplantation***, 90: 1328-1335, 2011.

3. Mizuno S, Ikebuchi F, Fukuta K, Kato T, Matsumoto K, Adachi K, Nakamura T. Recombinant human HGF, but not rat HGF, elicits glomerular injury and albuminuria in normal rats via an immune complex-dependent mechanism. ***Clin Exp Pharmacol Physiol***, 38: 192-201, 2011.

4. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. ***Clin Cancer Res***, 17: 2260-2269, 2011.

5. Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Cui L, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto K, Matsumoto K, Tanaka M. Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells. ***Anticancer Res***, 31: 1279-1287, 2011

6. Taiyoh H, Kubota T, Fujiwara H, Matsumura A, Murayama Y, Okamoto K, Ichikawa D, Ochiai T, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. NK4 gene expression

enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis of murine colon cancer cells. ***Anticancer Res***., 31: 2217-2224, 2011.

7. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Sakai K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yasumoto K, Yano S. Pleural mesothelioma instigates tumor-associated fibroblasts to promote progression via a malignant cytokine network. ***Am J Pathol***, 179: 1483-1493, 2011.

8. Ueshima K, Kitaoka K, Nakase J, Xu Q, Matsumoto K, Tsuchiya H. Promotion of rabbit ligament healing by local delivery of hepatocyte growth factor. ***J Orthopaedic Sci***, 16: 451-457, 2011.

9. Hirata Y, Soeki T, Yamada H, Shiota A, Shimabukuro M, Sakai Y, Nakayama M, Matsumoto K, Igarashi T, Sata M. A synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, ameliorates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via upregulation of HGF in rat. ***Biomed Aging Pathol***, 1:90-96, 2011.

10. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. ***J Thoracic Oncol***, 7: 272-280, 2012.

11. Hirata Y, Shimabukuro M, Uematsu E, Soeki T, Yamada H, Sakai Y, Nakayama M, Matsumoto K, Igarashi T, Sata M. A synthetic prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity, ONO-1301, protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. ***Eur J Pharmacol***, 674: 352-358, 2012.

＜著書＞

1. 酒井克也、松本邦夫: “細胞増殖因子”、「ものづくり技術からみる再生医療」田畑泰彦編集、pp. 48-56、シーエムシー出版、2011.

＜国内学会発表＞

1. Xu Qing, Mizuho Nakayama, Yoshiki Sakai, Kunio Matsumoto. プロスタサイクリンアゴニストによる HGF 発現誘導を介したマウス急性肝傷害の抑制. 第 10 回日本再生医療学会、2011 年 3 月 1 日（京王プラザホテル、東京）

2. Katsuya Sakai, Seiji Yano, Kunio Matsumoto. Epigenetic disregulation of matrix metalloproteinase-2 expression confers mesothelioma cell invasion. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日（金沢）

3. Takahiro Nakamura, Xu Qing, Kunio Matsumoto. Functional analysis of the Kremen in lung cancer cells through Wnt/β-catenin signaling pathway. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日（金沢）

4. Xu Qing, Mizuho Nakayama, Yoshinori Suzuki, Katsuya Sakai, Takahiro Nakamura, Yoshiki Sakai, Kunio Matsumoto. Suppression of acute hepatic injury by prostacyclin agonist through enhancing hepatocyte growth factor expression in mice. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日（金沢）

5. Kazusa Sano, Tomoko Sugiura, Noritaka Nakamichi, Kunio Matsumoto, Yukio Kato. Physiologically-based pharmacokinetic model for hepatocyte growth factor. 日本薬物動態学会年会、2011 年 11 月 16 日（広島）
6. 若山友彦、仲田浩規、松本邦夫、井関尚一：セルトリ細胞特異的な肝細胞増殖因子受容体欠損による精子形成障害．第 26 回日本生殖免疫学会、2011 年 12 月 2 日（名古屋）
7. 道越洸充、中村隆弘、松本邦夫、松郷誠一：ヒト肺がん細胞に対するリポ酸の増殖抑制作用とそのメカニズム．日本生物工学会 2011 年度大会、2011 年 9 月 27 日（東京都小金井市）
8. Atsuhiro Nakamura, Noritoshi Nagaya, Hiroaki Obata, Yoshiki Sakai, Kaoru Hamada, Mizuho Nakayama, Kunio Matsumoto, Hiroshi Kimura. Oral administrations of a novel long-acting prostacyclin agonist ameliorate pulmonary arterial hypertension in Rats. American Thoracic Society 2011 International Conference, May 13-18, 2011 (Denver, Colorado, USA).
9. 竹内伸司、Wei Wang、Qi Li、山田忠明、Ivan Donev、小泉瞳、中村隆弘、松本邦夫、西岡安彦、曽根三郎、上仲俊光、矢野聖二: Met/VEGFR-2 阻害剤 E7050 は変異型 EGFR 肺癌において HGF による EGFR-TKI 耐性誘導を克服する．第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日（名古屋）

＜**外部資金**＞

1. 中村隆弘：科学研究費補助金　基盤研究（若手）「cMet/HGF 受容体 ON-OFF 機能変換を介した再生・病態・発癌制御の研究」　2,860 千円
2. 酒井克也：科学研究費補助金　基盤研究（若手）「3-D 上皮組織化モデルにおける動的細胞分化転換と形態形成の研究」　2,600 千円
3. 松本邦夫: 地域産学官連携化学技術振興事業費補助金　ほくりく健康創造クラスター「医工融合による動脈硬化の診断と治療の先導的研究／血管病変部位の治療」1,500 千円
4. 松本邦夫：受託研究（小野薬品工業株式会社）　「プロスタグランジン類の再生薬理作用における HGF の役割とメカニズムの研究」　3,412 千円
5. 松本邦夫：三谷研究開発助成金「結晶構造を基盤とするがん転移阻止のための HGF-Met 阻害剤の創薬開発」　1,000 千円
6. 酒井克也：北國銀行若手研究者助成金「3 次元組織形成を支える組織幹細胞の分化動態と染色体数異常形成の研究」　650 千円
7. 松本邦夫：共同研究（クリングルファーマ株式会社）　「難治性神経疾患に適応できる組換え HGF 蛋白質の新規製剤の開発」　630 千円
8. 松本邦夫：次世代がん研究推進プロジェクト「結晶構造解析を基盤とするリード化合物の最適化による低分子 HGF-Met 阻害剤の創製研究」　4,000 千円

＜学内外との共同研究＞

1. 金沢大学大学院医学系研究科（整形外科）土屋弘行教授: HGF による骨延長治療の基礎研究
2. 金沢大学大学院医学系研究科（組織発達構築学）井関尚一教授・若山友彦准教授: 精巣機能における HGF-Met 系の役割についての研究
3. 金沢大学理工研究域自然システム学系 松郷誠一教授: リポ酸の抗腫瘍作用とそのメカニズムに関する研究
4. 金沢工業大学ゲノム生物工学研究所 松田武久教授: In situ 成熟型人工血管技術のための血管内皮前駆細胞の増殖・分化制御の研究
5. 大阪府立大学大学院理学系研究科構造生物学 木下誉富准教授: 結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
6. 大阪大学大学院工学研究科構造物理化学 井上豪教授: 結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
7. 千葉県がんセンター細胞治療開発研究部 田川雅敏博士: NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
8. 東邦大学医学部消化器外科学講座 島田英昭教授: NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
9. 新潟大学大学院医歯薬総合研究科内部環境医学（呼吸器内科） 小屋俊之助教: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した喘息治療の研究
10. 岡山大学大学院医歯学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 槇野博史教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した慢性腎不全治療の研究
11. 奈良県立医科大学内科学第二講座（呼吸器・血液内科）木村弘教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した肺線維症・肺高血圧症治療の研究
12. 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 佐田政隆教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した心筋梗塞・拡張型心筋症治療の研究
13. 京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科 稲垣暢也教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した膵島移植・糖尿病治療の研究
14. 和歌山県立医科大学呼吸器・アレルギー内科 一ノ瀬正和教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した COPD 治療の研究
15. クリングルファーマ株式会社: HGF-Met 系制御による疾患治療の基礎研究と臨床開発
16. 小野薬品工業株式会社: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した組織再生治療の基礎研究

がん分子標的探索プログラム

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）	塩谷裕司
助教	林直之	学類４年	田中陽有
	小林昌彦		
技能補佐員	武紀代子		

＜研究概要＞

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。

＜2011 年度の進捗状況＞

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、ATM が DNA 二重鎖切断以外に、プロスタグランディン、脂質、核酸由来の代謝産物により活性化され、その ATM 活性化が DNA 塩基の修飾を介さない、ATM 蛋白に対する直接作用であることを見出した。さらに、このような DNA 損傷を介さない ATM の活性化は、Chk1 や Chk2 などの活性化は起こさないが、p53 の活性化と、代謝ストレスセンサーである AMPK のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。

2）我々は、DNA２重鎖切断のセンサー因子 NBS1 が、DNA 複製損傷チェックポイント因子 ATR の下流の Chk1 のリン酸化や FancD2 のユビキチン化にも必要であることを見出した。この ATR 経路における NBS1 の機能を解析し、in vitro で NBS1 の N 端が ATR を活性化すること、NBS1 と ATR の結合を阻害すると Chk1 のリン酸化が抑制されること、Rad17 細胞において PCNA と融合した NBS1 の N 端を発現させると Chk1 のリン酸化が起こることを明らかにした。

3）NBS1 の相互作用因子として分離した DNA メチル化酵素 DNMT1 は、活性領域中の Target Recognition Domain で結合しており、NBS1 では N 末端にある FHA Domain が結合領域であった。DNMT1 は p53 に依存して Apoptosis 阻害因子 *survivin* の発現を DNA 複製異常の条件下で抑制する。我々はこの機能が NBS1 に依存していることを示した。

＜将来の展望＞

様々な代謝ストレスによる ATM の活性化に関与するシステイン残基の同定と、その生理学的意義、特に代謝ストレス応答異常とがん化における役割との関連について細胞レベルで検討すると共に、最近その抗がん作用が注目されている糖尿病治療薬のメトフォルミンによる ATM 活性化とその活性化機序について検討する。また、NBS1 については、ATR 活性化における役割を生化学的に明らかにすると共に、NBS1 の複製停止部位への集積の機序を明らかにする。さらに、NBS1-DNMT1 相互作用については、今後、NBS1 による DNMT1 のメチル化活性制御の詳細な解析とさらに NBS1 と相互作用する他の因子の分析と機能解析を行うと共に、その生理的意義、特に、複製停止と DNA メチル化制御との関連、さらには INK4a/ARF 遺伝子のメチル化との関連について解析する。

研究業績

＜原著論文＞

1. Yoshimura, A., Akita, M., Hosono, Y., Abe, T., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Tada, S., Seki, M., and Takemi Enomoto, T. Functional relationship between Claspin and Rad17. BBRC, 414: 298-303, 2011（共同研究）
2. Shigechi, T., Tomida, J., Sato, K., Kobayashi, M., Eykelenboom, J., Pessina, F., Zhang, Y., Uchida, E., Lowndes, N. F., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., Maehara, Y., & Takata, M. ATR-ATRIP kinase complex is responsible for triggering the FA pathway activation. Cancer Res., in press, 2012（共同研究）
3. Fujinaka, Y., Matsuoka, K., Iimori, M., Tuul, M., Yoshinaga, K., Saeki, H., Gillespie, D.A., Yamamoto, K., Masaru Morita, M., Kakeji, Y., Hiroyuki Kitao, H., and Yoshihiko Maehara, Y. Rad9/Rad17-dependent and -independent activation of Chk1 kinase protects cells from 5-fluorouracil by suppressing cytotoxic DNA double-strand breaks. DNA Repair, in press, 2012（共同研究）

＜学会発表＞

１． N. Hayashi, K. Kobayashi, Y. Morimura, K. Yamamoto: The checkpoint regulatory protein, NBS1 interacts with DNA methyltransferase DNMT1. 日本分子生物学会第１１回春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム　（ポスター）

２． 小林昌彦、林直之、山本健一： DNA 複製チェックポイントにおける NBS1 の役割。第７０回日本癌学会。２０１１年９１０月、名古屋　（口頭）

３． 林直之、小林昌彦、山本健一： DNA 複製チェックポイントにおける制御因子 NBS1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 の相互作用の解析。第７０回日本癌学会。２０１１年１０月、名古屋（口頭）

４． 塩谷裕司、小林昌彦、松郷誠一、山本健一：プロスタグランジン代謝物 15d-PGJ_2

による ATM 活性化機構。第１１回予防環境医学研究会。２０１２年１月、川崎（口頭）

＜外部資金＞

研究課題名：酸化ストレスによるATMチェックポイントキナーゼの活性化機構と生理学的意義、代表・小林昌彦、若手研究（B）、平成22年度分の交付金額：直接経費（900,000円）

＜共同研究＞

1. 酸化ストレスによる ATM 活性化機構（名古屋大、内田浩二教授；熊本大、赤池孝章教授；金沢大、松郷誠一教授、篁俊成准教授）
2. ATR 活成果における NBS1 の役割（京都大、高田穣教授、小松賢志教授）

シグナル伝達研究分野

＜研究スタッフ＞

教授：　善岡 克次
助教：　佐藤 時春
事務補佐員：大橋 智江

大学院生（博士課程）：Anir Enkhbat
Baljinnyam Tuvshintugs
Radnaa Enkhtuya
（修士課程）：宮田 大史
石川 桃絵
李 蓉

学類生（４年）：太田 雅樹
望月 美希（H23.10〜、大学院生）

＜研究概要＞

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 モジュールの *in vivo* における役割解明、及び 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。また足場タンパク質 JSAP1, JLP は、MAPK シグナル伝達系以外においても重要な役割を担っていると考えられる。そこで、JSAP1, JLP の生理的機能の解明に向けた研究にも取り組んでいる。

＜2011 年度の主な研究成果と今後の研究計画＞

１．紫外線誘導性アポトーシスにおける JLP の役割とその分子機構

JLP ノックアウト（KO）マウスを用いた解析を行い、紫外線（UVB）誘導性アポトーシスが JLP 欠失によって顕著に抑制されることを見出した。また、基底細胞特異的 JLP コンディショナル KO（cKO）マウス、及び JLP KO マウス由来培養ケラチノサイトでも同様の結果を得た。現在、紫外線誘導性アポトーシスの分子機構を明らかにするため、MAPK 経路に注目して解析を進めている。一方、JSAP1 についても基底細胞特異的 cKO マウスの作出· 解析を行い、JSAP1 も紫外線誘導性アポトーシスに関与する、という予備的知見を得た。なお、基底細胞特異的 JLP cKO、及び JSAP1 cKO マウスの作出には、Cre 組換え酵素の発現が誘導可能な K14-CreER マウスを使用した。今後、Cre 組換え酵素を恒常的に発現する K5-Cre マウスを用いて、基底細胞特異的

JSAP1, JLP ダブル cKO マウスの作出· 解析を行う予定である。

２．Shh-Gli 経路と JSAP1-JNK 経路のクロストーク

Shh-Gli 経路が小脳顆粒前駆細胞（GCP）のマイトジェンとして働くことはよく知られている。我々は、これまでに、JSAP1-JNK 経路は GCP の増殖抑制及び分化促進に関わることを明らかにした。今年度は、Shh-Gli 経路と JSAP1-JNK 経路のクロストークに注目して解析を行い、JNK 経路の活性化に伴って Gli1 タンパク質の発現レベルが減少することを見出した。その発現量の低下は、プロテアソーム依存的であった。また強制発現系を用いた解析を行い、Gli1 タンパク質と JNK タンパク質が物理的に相互作用することを見出した。現在、Shh-Gli 経路と JSAP1-JNK 経路のクロストーク機構を分子レベルで理解するため、さらに解析を進めている。今後、このクロストークの破綻が細胞のがん化やがんの悪性化に関わるかについても検討する予定である。

３．部位特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出・解析

JSAP1 KO マウスは生後すぐに死亡するため、成体マウスにおける JSAP1 の機能を調べることはできない。また JSAP1 と JLP は、機能的冗長性を持つと考えられる。そこで、現在、様々な部位特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出・解析を行っている。今年度は、背側終脳特異的 JSAP1, JLP ダブル KO マウスの作出· 解析を行い、JSAP1, JLP は軸索輸送の制御因子であり、JSAP1, JLP 欠失は神経細胞死を引き起こす、という予備的知見を得た。また、小脳顆粒細胞特異的 JSAP1, JLP, p53 トリプル KO マウスの作出を昨年度から始めており、来年度は解析を開始する予定である。当該遺伝子改変マウスは、髄芽腫発症のメカニズムを分子レベルで理解するための有用なモデルマウスになるのではないかと考えている。

＜発表論文＞

原著（研究分野主体）

1. Sato, T., Enkhbat, A., and Yoshioka, K. (2011) Role of plasma membrane localization of the scaffold protein JSAP1 during differentiation of cerebellar granule cell precursors. *Genes Cells*, 16: 58-68.

原著（共同研究）

1. Uchida, S., Watanabe, N., Kudo, Y., Yoshioka, K., Matsunaga, T., Ishizaka, Y., Nakagama, H., Poon, R.Y., and Yamashita, K. (2011) SCFβ(TrCP) mediates stress-activated MAPK-induced Cdc25B degradation. *J. Cell Sci.*, 124: 2816-2825.
2. Ando, K., Uemura, K., Kuzuya, A., Maesako, M., Asada-Utsugi, M., Kubota, M., Aoyagi, N., Yoshioka, K., Okawa, K., Inoue, H., Kawamata, J., Shimohama, S., Arai, T., Takahashi,

R., and Kinoshita, A. (2011) N-cadherin regulates p38 MAPK signaling via association with JNK-associated leucine zipper protein: implications for neurodegeneration in Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* 286: 7619-7628.

＜学会発表＞

全国学会

１．佐藤時春, Tuvshintugs B., 善岡克次
Cross-talk between JSAP1/JNK and Shh/Gli signaling pathway during the differentiation of cerebellar granule cell progenitors
小脳顆粒前駆細胞分化過程における JSAP1/JNK シグナル経路と Shh/Gli シグナル経路のクロストーク
第 70 回 日本癌学会学術総会、2011 年 10 月、名古屋

２．佐藤時春, Tuvshintugs B., Enkhbat A., 李蓉, 善岡克次
FGF/JSAP1/JNK signaling accelerates degradation of Gli1 and reduces its transcriptional activity
第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜

３．望月美希, 佐藤時春, 善岡克次
Role of the MAP kinase scaffold proteins JSAP1 and JLP in cortical neurons
第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月、横浜

４．Tuvshintugs B., 佐藤時春, 善岡克次
The scaffold protein JSAP1 regulates proliferation and differentiation of cerebellar granule cell precursors by modulating JNK signaling
日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月、金沢

５．Enkhtuya R., 佐藤時春, Nomiun D., 善岡克次
Role of the scaffold protein JLP in ultraviolet-induced apoptosis
日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月、金沢

６．佐藤時春, Enkhbat A., Tuvshintugs B., 善岡克次
Subcellular localization of the scaffold protein JSAP1 during the differentiation of cerebellar granule cell precursors
日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月、金沢

＜外部資金＞

平成２３年度
科学研究費補助金　基盤研究(C) 1,500 千円（研究代表者：善岡克次）
「軸索輸送における足場タンパク質 JSAP の役割とその分子メカニズム」

＜学内外との共同研究＞

１．共同研究者：福永 理己郎（大阪薬科大学）
「がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析」

２．共同研究者：松永 司（金沢大学）
「紫外線応答における足場タンパク質JSAP1, JLPの役割とその分子メカニズム」

腫瘍制御（旧 遺伝子診断）研究分野

＜研究スタッフ＞（2011 年現在）

教授　源 利成；　准教授　川上和之；　博士研究員　廣瀬まゆみ

大学院博士課程：松之木愛香 (心肺総合外科学)，金子真美 (心肺総合外科学)，北村祥貴 (心肺総合外科学，7 月～)，下崎真吾 (整形外科学，10 月～)，富田泰斗 (金沢医科大学消化器外科学，7 月～)；　修士課程：近野祐里（薬学系，～3 月）

技能補佐員：浅香敦子

技能補佐員 (ヒトがん組織バンク)：枡井亜希子．中みぎわ (４月～)

共同研究員：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学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．なかでも，膵がん，脳膠芽腫と再発や転移を含む難治性がんの分子病態解明と制御に重点をおいている．2011 年秋から本学整形外科学と連携して，骨軟部腫瘍や骨転移がんを研究対象に加えた．

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

(1) Wnt シグナル制御破綻に関わる新しい分子細胞機構の検討

Wnt 経路の制御破綻が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 を中心に研究を進めている．大腸がんの腫瘍－宿主境界の微小環境において活性化される β-catenin が固有のがん化シグナルネットワークを形成することを明らかにしてきた．今年度は神戸大学や理研と共同研究で，大腸上皮細胞の接着や極性輸送の制御異常と β-catenin 活性化との関連を明らかにした．これまでの成果に基づいて今後は，(a) β-catenin により誘導される coding region determinant-binding protein (CRD-BP)の各種がん関連分子の mRNA 安定性に対する作用と，(b)大腸がん病巣における CRD-BP の発現と臨床所見との関連などについて，後述のヒト大腸がん組織検体資源を対象に研究を計画，開始している．

(2) glycogen synthase kinase (GSK) 3β を標的とするがん治療法の開発と臨床応用

消化器がんと脳膠芽腫を対象に GSK3β の病的作用を発見し，その阻害によるがん治療効果の分子機構の検討とがん治療の臨床研究を進めている．2009 年から GSK3β 阻害医薬品の併用による再発膠芽腫治療の第Ⅰ/Ⅱ相臨床研究を本学附属病院脳神経外科で実施中である．一昨年から今年度の実施課題と今後の計画を以下に記載する．

(a) 膵がん，膠芽腫細胞の抗がん剤や放射線耐性における GSK3β の作用を解明．
(b) がん細胞の上皮間葉転換と浸潤における GSK3β の病的作用を検討中．
(c) がん細胞の代謝，とくに Warburg 効果における GSK3β の作用を解明し，検証中．
(d) 本学整形外科学と連携し，骨肉腫における GSK3β の病的作用の共同研究を開始．
(e) GSK3β によるがん起源（幹）細胞の制御の可能性について研究を構想中．
(f) 再発膠芽腫治療の多施設臨床研究：本学脳神経外科および関連施設と連携する．
(g) 進行・再発膵がん治療の第Ⅰ/Ⅱ相臨床研究：金沢医科大学病院腫瘍内科，消化器外科と連携し，2011 年３月に開始した．2011 年 12 月までに４症例を登録した．
(h) cell-based ELISA による新規 GSK3β 阻害剤のスクリーニング法の開発準備中．
(i) 新規 GSK3β 阻害剤によるがん治療臨床試験を実施中の米国リリー社と情報交換．

２．がんの分子生物学的分類によるオーダーメイドがん化学療法

抗がん剤の感受性・有害事象予測に臨床応用できる分子生物学的診断法を開発し，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きた．さらに，LINE-1 のメチル化と 5-FU の感受性が相関することから，クロマチン構造やヒストンコードなどを含めたエピジェネティックマーカーによるオーダーメイド化学療法の実現を目的に，臨床検体を用いて抗がん剤の効果や有害事象の発現性とエピジェネティクスの関係を解析している．

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

大腸がんをモデルとして，発がん径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・細分類し，診断・治療の個別化に臨床応用することを直近の目的としている．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)やゲノム全体のメチル化状態の代用マーカーである LINE-1 を解析している．また，microsatellite instability (MSI)，chromosomal instability などの表現型や K-*ras*，B-*raf*，*APC* 遺伝子変異等のジェネティック解析を順次追加し，大腸がん発癌経路の詳細を構築中である．現在は次項のがん組織検体資源を使用して進行がんにおける分子生物学的細分類を行っているが，将来的に前がん病変や早期がんの臨床検体の解析も進め，発がんパスウェイの理解に基づく予防・診断・治療の新たな戦略構築を目指している．

４．ヒト消化管がん組織検体資源化プロジェクト

がんの分子・細胞レベルの変化，代謝変動やがん動物モデル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．この目的で，消化管がんの研究や臨床研究の基盤資源として，2008 年末から本学附属病院，金沢医科大学病院と市中の基幹病院（金沢赤十字病院，石川県立中央病院）外科と連携して，本事業を開始した．2010 年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承し，大腸がんと胃がん患者様の手術検体から正常と病巣組織を系統的に集積している．本事業の目的は昨年の当研究所年報に記載した．今年度までの運用と成果を記載する．

(1) 大腸がん 872 例，胃がん 230 例の組織検体を集積している (2011 年 12 月現在).
(2) 登録症例の診療記録（手術記録，病理検査報告書，退院要約）のデータベース化.
(3) 組織検体から DNA，total RNA，cDNA を調整，保管.
(4) 大腸がんでは，既知のがん関連遺伝子の変異やメチル化を解析しデータベース化.
(5) 切除組織ホルマリン固定病理ブロックから代表切片 (未染) を 20〜30 枚準備.
(6) 大腸がん 121 例を対象に，組織アレイを構築中で，今年度末に準備できる見込み.
(7) 外部共同研究機関・施設へこれらの検体提供のための手続きと書式を整備した.
(8) 組織検体を対象とする研究に外科系大学院と保健学類卒研生をリクルートした.

[註]アンダーラインは研究スタッフ，メンバー，研究協力員および共同研究員

論文発表

原著

1. Kawakami K, Matsunoki A, Kaneko M, Saito K, Watanabe G, Minamoto T. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is a potential biomarker for the prediction of response to oral fluoropyrimidines in microsatellite stable and CpG island methylator phenotype-negative colorectal cancer. *Cancer Sci* 102(1): 166-74, 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01776.x. 2010 Oct 18. [Epub ahead of print]
2. Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, Betz KS, Kawakami K, Minamoto T, Tomasetto C, Rio MC, Lerkowit N, Varro A, Giraud AS, Wang TC. Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone, gastrin, is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 140(3): 879-91, 2011. Epub 2010 Nov 24.
3. Mimura M, Masuda A, Nishiumi S, Kawakami K, Fujishima Y, Yoshie T, Mizuno S, Miki I, Ohno H, Hase K, Minamoto T, Azuma T, Yoshida M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an *APC* gene. *Int J Cancer* 2011, Apr 11. doi: 10.1002/ijc.26131. [Epub ahead of print]
4. Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol*, 2011 Nov 1. [Epub ahead of print]
5. Kong D, Piao YS, Oshima H, Oguma K, Minamoto T, Yamada Y, Sato K, Yamashita S, Ushijima T, Ishikawa T, Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric epithelial cells. *Oncogene*, in press, 2011.

著書・総説

6. Motoo Y, Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakajima H, Kawakami K, Minamoto T. Metabolic disorder, inflammation and deregulated molecular pathways converging in pancreatic cancer development: implications for new therapeutic strategies. *Cancers* 3(1): 446-60, 2011.
7. Nakada M, Minamoto T, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. The pivotal role of GSK3β in glioma biology. *Molecular Targets of CNS Tumors*, ISBN 978-953-307-736-9, ed. Miklos Garami, InTech, 567-590, 2011.
8. Minamoto T, Kotake M, Nakada M, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K. Distinct pathologic role for glycogen synthase kinase 3β in colorectal cancer progression. In; Buchwald P**,** ed., *Colorectal Cancer*, 2011, in press.

学会発表

国際学会

1. Menheniott TR, O'Connor L, Minamoto T, Kawakami K, Tomita H, Fox JG, Wang TC, Judd LM, Giraud AS. Interleukin-1 beta is a signal for *Trefoil factor 2* promoter methylation in gastric preneoplasia. DDW 2011, May 7-10, 2011, Chicago, Illinois, U.S.A.

2. Yuri Chikano, Mayumi Hirose, Mitsutoshi Nakada, Ayako Kitano, Katsuyoshi Miyashita, Takahisa Takino, Hiroshi Sato, Yoshimichi Sai, Ken-ichi Miyamoto, Jun-ichiro Hamada, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto. Deregulated glycogen synthase kinase (GSK) 3β participates in invasion of glioblastoma. The 6th International Symposium of Institute Network (第６回附置研究所ネットワーク国際シンポジウム). June 09-10, 2011, Tokyo, Japan.

3. Hideo Nakajima, Toshinari Minamoto, Yoshiharu Motoo. HITS (FAM107B): novel heat-shock induced protein as a maker for cancer progression and diagnosis. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, October 6-8, 2011; Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece.

国内学会

4. 大井章史，鈴木潮人，田尻亮輔，土橋 洋，源 利成．FISH 法を用いた大腸癌における EGFR 遺伝子の増幅の検討．第 100 回日本病理学会総会．2010 年４月 28－30 日，パシフィコ横浜，横浜．

5. 廣瀬まゆみ，川島博人，村井 稔幸，川上和之，源 利成．Elevation of rat plasma P-selectin in acute lung injury. 日本分子生物学会・第 11 回春季シンポジウム，金沢国際がん生物学シンポジウム，2011 年５月 25－26 日，石川県立音楽堂，金沢．

6. 廣瀬まゆみ，川島博人，村井稔幸，源 利成，岡田雅人，末次志郎，竹縄忠臣，中川敦史．各種 SH3 ドメインと N-WASP プロリンリッチ部位の相互作用の相違により N-WASP のアクチンフィラメント形成と細胞運動の相違が生じる．第 63 回日本細胞生物学会大会，2011 年 6 月 27－29 日，北海道大学・クラーク会館，学術交流会館，札幌．

7. 島崎猛夫，石垣靖人，高田尊信，中村有香，川上和之，上田順彦，小坂健夫，源利成，友杉直久，元雄良治．ゲムシタビン単剤療法の壁への挑戦：新規標的分子の同定と膵癌化学療法への展開．第 42 回日本膵臓学会大会；特別企画「進行膵がん治療の新展開」；2011 年 7 月 29－30 日，ホテルニューキャッスル，弘前．

8. Yuri Chikano, Mitsutoshi Nakada, Mayumi Hirose, Ayako Kitano, Katsuyoshi Miyashita, Hironori Fujisawa, Yutaka Hayashi, Takahisa Takino, Hiroshi Sato, Yoshimichi Sai, Ken-ichi Miyamoto, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto (近野祐里，中田光俊，廣瀬まゆみ，北野綾子，宮下勝吉，藤沢弘範，林 裕，滝野隆久，佐藤 博，崔 吉道，宮本謙一，川上和之，源 利成). Deregulated glycogen synthase kinase (GSK) 3β participates in invasion of glioblastoma (Glycogen synthase kinase (GSK) 3β は神経膠芽腫の浸潤を促進する). 第 70 回日本癌学会総会学術集会，2011 年 10 月３日－5 日，名古屋国際会議場，名古屋．

9. Masanori Kotake, Kazuyuki Kawakami, Mayumi Hirose, Hiroyuki Bandou, Tetsuji Yamada, Go Watanabe, Toshinari Minamoto (小竹優範，川上和之，廣瀬まゆみ，伴登宏行，山田哲司，渡邊 剛，源 利成). Frequent hypomethylation of LINE-1 in colorectal cancer with lymph node and distant metastases (リンパ節および遠隔転移を伴う大腸がんにおける高頻度の LINE-1 低メチル化). 第 70 回日本癌学会総会学術集会，2011 年 10 月３日－5 日，名古屋国際会議場，名古屋．

10. Takeo Shimasaki, Yasuhito Ishigaki, Takanobu Takata, Yuka Nakamura, Kazuyuki Kawakami, Tsutomu Takegami, Naohisa Tomosugi, Toshinari Minamoto, Yoshiahru

Motoo (島崎猛夫，石垣靖人，高田尊信，中村有香，川上和之，竹上 勉，友杉直久，源 利成，元雄良治). GSK3β is a new therapeutic target in pancreatic cancer: inplications for chemotherapy with new strategy (膵癌に新規治療標的としての glycogen synthase kinase (GSK) 3β：化学療法戦略の新展開). 第 70 回日本癌学会総会学術集会，2011 年 10 月 3 日－5 日，名古屋国際会議場，名古屋.

11. 中田光俊，林 裕，Pyko Ilya，近野祐里，淑瑠へムラサビット，宮下勝吉，渡邉卓也，木下雅史，喜多大輔，林 康彦，内山尚之，川上和之，源 利成，濱田潤一郎 (Mitsutoshi Nakada, Yutaka Hayashi, Pyko Ilya, Yuri Chikano, Hemragul Sabit, Katsuyoshi Miyashita, Takuya Watanabe, Masashi Kinoshita, Daisuke Kita, Yasuhiko Hayashi, Naoyuki Uchiyama, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto, Jun-ichiro Hamada)．再発膠芽腫に対する GSK3β を治療標的とした分子標的療法の現状 (Translational research focusing GSK3β as a new therapeutic target for glioblastoma)．第 70 回日本脳神経外科学会学術総会，2011 年 10 月 12－14 日，パシフィコ横浜，横浜.

12. 島崎猛夫，川上和之，上田順彦，小坂健夫，源 利成，元雄良治．切除不能進行膵癌に対する GSK3β を標的とした新規治療戦略．JDDW 2011，2011 年 10 月 20－23 日，福岡国際センター/福岡サンパレス/福岡国際会議場/マリンメッセ福岡，福岡.

13. 中田光俊，林 裕，近野祐里，Pyko Ilya，淑瑠へムラサビット，宮下勝吉，渡辺卓也，木下雅史，喜多大輔，林 康彦，内山尚之，川上和之，源 利成，濱田潤一郎 (Mitsutoshi Nakada, Yutaka Hayashi, Yuri Chikano, Pyko Ilya, Hemragul Sabit, Katsuyoshi Miyashita, Takuya Watanabe, Masashi Kinoshita, Daisuke Kita, Yasuhiko Hayashi, Naoyuki Uchiyama, Kazuyuki Kawakami, Toshinari Minamoto, Jun-ichiro Hamada)．膠芽腫の新規治療標的 GSK3β に関する基礎研究とトランスレーショナルリサーチ (Basic and translational research focusing GSK3β as a new therapeutic target for glioblastoma)．第 49 回日本癌治療学会学術集会，2011 年 10 月 27－29 日，名古屋国際会議場，名古屋.

14. 松之木愛香, 川上和之, 小竹優範, 金子真美, 源 利成．多重蛍光MethyLightによるLINE-1のメチル化解析と大腸がんにおけるその臨床的意義．第22回日本消化器癌発生学会；ワークショップ７：癌個別化治療の現状と今後の展望．2011年11月25－26日，ホテルニューオータニ佐賀，佐賀.

15. 中島日出夫，源 利成，元雄良治．新規熱ショック誘導性蛋白質（HITS）の発現を利用した癌の診断．第 22 回日本消化器癌発生学会；ワークショップ４：癌分子診断の臨床応用．2011 年 11 月 25－26 日，ホテルニューオータニ佐賀，佐賀.

16. 島崎猛夫，石垣靖人，高田尊信，中村有香，川上和之，舟木 洋，上田順彦，小坂健夫，友杉直久，源 利成，元雄良治．膵癌細胞における gemcitabine 誘導性 EMT に関連する新規分子の同定．第 22 回日本消化器癌発生学会；シンポジウム２：消化器癌の浸潤・転移．2011 年 11 月 25－26 日，ホテルニューオータニ佐賀，佐賀.

司会

17. 源 利成．浸潤・転移（１），その他．第 70 回日本癌学会総会学術集会，2011 年 10 月 3 日－5 日，名古屋国際会議場，名古屋.

18. 源 利成．ワークショップ５：消化器癌における新しい分子標的．第 22 回日本消化器癌発生学会，2011 年 11 月 25－26 日，ホテルニューオータニ佐賀，佐賀．

講演，その他

19. 源 利成．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，2011 年 1 月 19 日，金沢大学附属病院，金沢．

20. 源 利成．難治がんに対する新たながん治療薬開発への道．がんプロ市民公開講座：みんなで拓こう新しいがん治療への道～最近注目の高度・先進治療および臨床試験・治験～．2011 年 1 月 23 日，北國新聞交流ホール（赤羽ホール），金沢．

21. 源 利成．第２回専門医セミナー：Cetuximab の奏効した切除不能進行再発大腸癌の２例．第 113 回日本消化器病学会北陸支部例会，2011 年 11 月 13 日，金沢大学医学類，金沢．

22. 源 利成．がんの科学と医療．石川県立金沢泉丘高等学校 SSH（Super Science High School）模擬講義，2011 年 12 月 16 日，金沢大学医学類，金沢．

外部資金（2011 年度が含まれる課題）

1. 2010－2012 年度 科学研究費補助金（基盤研究 A）：課題番号 22249051
   源 利成（代表），川上和之，太田哲生（分担），大野博司（連携）
   課題：基幹的細胞調節経路の異常に起因する消化器がんの病態解明とがん制御への応用
   研究経費：39,470,000 円（交付当初額）

2. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 B）：課題番号 23390321
   川上和之（代表），源 利成（分担），曽我朋義（連携）
   課題：ゲノムの低メチル化とレトロポゾンの活性化を特徴とする大腸がんの診断・治療開発
   研究経費：16,340,000 円（交付当初額）

3. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23591955
   廣瀬まゆみ（代表），源 利成，川上和之（分担）
   課題：GSK3β阻害による消化器がん治療法の開発と分子機構の解明
   研究経費：4,550,000 円（交付当初額）

4. 2011－2012 年度 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）：課題番号 23659643
   源 利成（代表），川上和之（分担），曽我朋義（連携）
   課題：がん特異的エネルギー代謝を標的とする消化器がん治療法の開発
   研究経費：3,340,000 円（交付当初額）

5. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23592117
   中田光俊（代表），源 利成（連携）
   課題：悪性グリオーマの浸潤シグナルを狙った分子標的療法の確立
   研究経費：4,550,000 円（交付当初額）

6. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23590898
中島日出夫（代表），元雄良治，小泉惠太，源 利成（分担）
課題：がん温熱療法の新規分子マーカー候補 FAM107 ファミリー蛋白質の発現・機能解析
研究経費：5,200,000 円（交付当初額）

7. 2011－2013 年度 科学研究費補助金（基盤研究 C）：課題番号 23591016
島崎猛夫（代表），石垣靖人，友杉直久，元雄良治，源 利成（分担）
課題：化学療法により誘発される EMT 誘導因子の同定とその制御による膵がん治療法の開
研究経費：5,200,000 円（交付当初額）

8. 2011 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）　整理番号：12
元雄良治（代表），中島日出夫，石垣靖人，島崎猛夫，中谷直喜，源 利成（分担）
課題：GSK3β阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験
研究経費：1,000,000 円

9. 2011 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）　整理番号：13
小坂健夫（代表），表 和彦，木南伸一，大西敏雄，富田泰斗，源 利成，川上和之（分担）
課題：大腸がん個別化医療のためのバイオマーカー探索
研究経費：1,000,000 円

奨学寄附金

10. 2011 年２月　財団法人金沢総合技術研究センター　500,000 円

11. 2011 年３月　財団法人石川県予防医学協会　1,433,960 円

12. 2011 年３月　株式会社アルプ　252,000 円

共同研究

1. 2011 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）
金沢医科大学腫瘍内科学　元雄良治，島崎猛夫，ほか
課題：GSK3β阻害による新規膵がん化学療法の開発と臨床試験

2. 2011 年度 金沢大学がん研究所共同研究（一般）
金沢医科大学消化器外科学　小坂健夫，富田泰斗，ほか
課題：大腸がん個別化医療のためのバイオマーカー探索

特許出願

なし

報　道

1. 源 利成，ほか．北陸がんプロ養成プログラム，治療法開発の最前線．北國新聞日刊，2011 年 1 月 24 日．

2. 源 利成，ほか．北陸がんプロフェッショナル養成プログラム市民公開講座：みんなで拓こう新しいがん治療への道～最近注目の高度・先進治療および臨床試験・治験～．北國新聞 日刊，2011 年 2 月 27 日．

3. 小竹優範，川上和之，源 利成，ほか．北國がん基金　研究助成など 11 件，9 月 21 日に贈呈式．北國新聞 日刊，2011 年 7 月 28 日．

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

特任助教：　寺島農　事務補佐員：　小田原敦子

大学院生（博士課程）：　Zanabazar Enkhbaatar　Dulamsuren Oktyabri

＜研究概要＞

ゲノムに挿入変異を導入するレトロウイルスは、がんに関係する遺伝子を網羅的に同定し、その発症機構を解明するために有用なモバイル因子である。本研究分野では、レトロウイルス感染マウスに発症した腫瘍から、ウイルスタギングを用いて新しいがん関連遺伝子群の探索を進めており、ヒストンおよびDNAのメチル化の制御に関与する酵素群をこれまでに同定してきた。こうしたエピジェネティクス制御の異常は、可逆的に元に戻すという治療戦略が想定されるため、次世代のがん治療の標的として注目される。現在、がんの発症・悪性化の様々なステップにおいて、エピジェネティクス制御因子の果たす役割を解明することを目的として研究を進めている。

＜2011年度の研究成果、進行状況と今後の計画＞

１）がん発症・悪性化におけるヒストンのメチル化制御酵素群の重要性

DNA のメチル化やヒストンのアセチル化と発がんとの関係は、古くから研究がさかんで、既に阻害薬が開発されている。それに対し、ヒストンのメチル化制御は、最近開拓された研究分野であり、新しいエピジェネティック医薬の臨床開発への貢献が期待される。まず、ウイルス挿入変異の標的として同定したメチル化制御酵素群について、本研究所のヒトがん組織バンクを利用してがん組織での発現を調べたところ、発現異常が高頻度に検出された。また、様々な乳がんおよび大腸がん細胞株における発現解析から、細胞の浸潤能や上皮系･間葉系の特徴に相関性を示す発現様式をもつ酵素を複数同定した。さらに、肺癌細胞株の抗がん剤耐性獲得に影響を与える酵素（矢野聖二教授との共同研究）や、DNA メチル化で転写抑制されるがん抑制遺伝子の発現と相関性の見られる酵素（源利成教授との共同研究）も見いだした。これらのメチル化制御酵素が、どのような標的遺伝子の発現を調節して、がんの発症・悪性化過程に関与しているかを大規模 cDNA シークエンシングによるデジタル発現プロファイルやChIPアッセイを利用して解析している。

２）ヒストン脱メチル化酵素PLU1による細胞浸潤能の亢進

乳がんや前立腺がんで高発現が見られるがん遺伝子PLU1脱メチル化酵素が、がん

の発症だけでなく、がん細胞の細胞浸潤能を亢進する活性をもつことをはじめて示し、がんの悪性化における新たな役割を見つけた。デジタル発現プロファイルを用いてPLU1 酵素による転写制御の標的となる KAT5/Tip60 ヒストンアセチル化酵素を同定した。さらにその下流の標的である CD82/KAI1 遺伝子も含めて、PLU1 の制御する遺伝子発現カスケードが、がん細胞の浸潤に重要であることを明らかにした（文献１、東工大･野崎直仁准教授、自然科学研究科･佐藤賢二教授との共同研究）。

３）上皮-間葉転換（EMT）におけるヒストンメチル化制御酵素の新しい役割

がん抑制遺伝子候補 JMJD3 ヒストン脱メチル化酵素の発現をノックダウンすると、がん細胞株の上皮-間葉転換（EMT）が促進されることがわかった。この際に、EMT マーカー遺伝子のひとつ E-cadherin の発現が低下するが、その発現に重要な転写因子である ZEB1, ZEB2 の誘導に､JMJD3 酵素が影響を与えることを見いだした｡さらに、ZEB1, ZEB2 の発現を抑制している microRNA である miR-200 ファミリーの発現調節に JMJD3 酵素が関与することを発見し、上皮-間葉転換（EMT）におけるエピジェネティックな制御メカニズムを明らかにした（投稿準備中）。

４）がん細胞における DNA の脱メチル化に関与する酵素群の発現解析

TET ファミリー（TET1, 2, 3）タンパク質は、ゲノム DNA のメチル化されたシトシン（5-meC）をヒドロキシメチル化する酵素であり、DNA の積極的脱メチル化に関与することが最近明らかになった。様々な細胞株における TET ファミリー遺伝子の発現を調べた結果、TET1 遺伝子については、高発現細胞株と著しい低発現細胞株にほぼ二分された。さらに、低発現細胞株では、TET 1 遺伝子のプロモーター領域の DNA 高メチル化が検出された。現在、TET1 遺伝子の発現制御機構、およびがんの発症・悪性化との関係性について解析を続けている。

５）がん関連遺伝子候補 Jmjd5 脱メチル化酵素の機能解析

脱メチル化酵素である Jmjd5 がん関連遺伝子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。Jmjd5 null マウスは、胚性致死の表現系を示し、その原因のひとつが、細胞周期制御因子 p21/Cdkn1a の異常な発現亢進であることを見いだした。ChIP 解析の結果、Jmjd5 は p21/Cdkn1a 遺伝子の転写領域上のヒストン H3K36 メチル化を介して、その遺伝子発現を調節していることがわかった（文献２、都医総研･原孝彦研究員との共同研究）。さらに、p53 KO マウスとの交配実験等から、Jmjd5 が p53 シグナル経路の制御に関わる新しい因子であることが示唆されており、その作用メカニズムを解析中である。また、Jmjd5 は、転写因子のユビキチン修飾に影響して、骨細胞の分化を負に制御するという新しい機能を持つことも明らかになってきた。（投稿中、東大・加藤茂明教授との共同研究）。

＜発表論文＞

原著

1. Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Enkhbaatar Z, Nozaki N, Satou K and Suzuki T. PLU1 histone demethylase decreases the expression of KAT5 and enhances the invasive activity of the cells. Biochemical J., 437, 555-564, 2011.

2. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of *Cdkn1a* expression. Development, 139,749-759,2012.

＜学会発表＞

国際学会

1. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Hara T and Suzuki T. Jmjd5, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates the expression of Cdkn1a and modulates embryonic cell proliferation. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, May 2011, Kanazawa, Japan.

2. Terashima M, Ishimura A, Yoshida M and Suzuki T. Functional analysis of histone demethylases involved in cancer by identifying its target genes. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, May 2011, Kanazawa, Japan.

3. Enkhbaatar Z, Yoshida M, Ishimura A, Terashima M, Suzuki Y and Suzuki T. Identification of cancer related genes regulated by histone demethylase, using massively parallel sequencing technology. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa and the 11th Spring Symposium of the Molecular Biology Society of Japan, May 2011, Kanazawa, Japan.

4. Terashima M, Ishimura A, Yoshida M and Suzuki T. Functional analysis of histone demethylases involved in malignant progression of tumors. The 6th International Symposium of Institute Network, June 2011, Tokyo, Japan.

国内学会

1. Suzuki T. Identification of novel cancer related genes using retroviral insertional mutagenesis. 血液フォーラム21, May 2011, Kyoto, Japan,

2. Ishimura A, Terashima M and Suzuki T. Jmjd5, which is identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates Cdkn1a and modulates embryonic cell growth. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋2011年10月）

3. Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. Possible role of histone demethylases in malignant progression of tumors. 第70回日本癌学会学術総会（名古屋2011年10月）
4. Suzuki T, Yoshida M, Terashima M, Enkhbaatar Z, and Ishimura A. Identification of cancer related genes regulated by histone methyltransferases and demethylases. 第 70 回日本癌学会学術総会（名古屋 2011 年 10 月）
5. Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T and Suzuki T. Jmjd5, which is identified by retroviral insertional mutagenesis, regulates embryonic cell proliferation through the epigenetic control of Cdkn1a. 第 34 回分子生物学会年会（横浜 2011 年 12 月）
6. Suzuki T, Terashima M, Enkhbaatar Z, Oktyabri D, Tani N, Ogura M and Ishimura A. Functional analysis of histone methyltransferases and demethylases in the process of malignant progression of cancer. 第34回分子生物学会年会（横浜2011年12月）

＜**外部資金**＞

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究（C）, 研究代表者　鈴木健之, 1,000 千円
研究課題名「ゲノムへの挿入変異を利用した疾患関連遺伝子の単離とその機能解析」
2. 文部科学省科学研究費補助金, 新学術領域研究（がん微小環境）, 研究分担者　鈴木健之, 2,000 千円
研究課題名「呼吸器悪性腫瘍の微小環境の特性を標的とした新規制御法の開発」
3. 文部科学省科学研究費補助金, 若手研究（B）, 研究代表者　石村昭彦, 1,900 千円
研究課題名「ウイルス挿入変異法で同定された新規がん関連遺伝子 Jmjd5 の機能解析」
4. 平成 23 年度重点戦略経費, 研究活性化推進経費, 研究分担者　鈴木健之, 750 千円
研究課題名「新規がんモデルシステムと次世代バイオインフォマティクスの連携による発がん制御機構の探索」

＜**共同研究**＞

1. 原　孝彦　副参事研究員　東京都医学総合研究所　ウイルス挿入変異によって同定されたがん関連遺伝子 Jmjd5 の血液・血管の発生における機能解析
2. 加藤　茂明　教授　東京大学分子細胞生物学研究所　ヒストン脱メチル化酵素 Jmjd5 の骨分化における機能解析
3. 野崎　直仁　准教授　東京工業大学バイオフロンティア　ヒストン修飾解析ツールの開発とがんのエピゲノム解析

がん分子標的医療開発プログラム

腫瘍内科研究分野

＜研究スタッフ＞

教　授	矢野　聖二		
講　師	安本　和生	講　師	大坪　公士郎
助　教	山下　要	助　教	毛利　久継
助　教	山田　忠明	助　教	竹内　伸司
医　員	南條　成輝	医　員	石川　大輔
特任助手	北　賢二	研究員	佐野　峻子
大学院生	中川　学之	大学院生	中出　順也
大学院生	ZHAO LU		
事務補佐員	岡本　恵子	事務補佐員	堂林　淳子

＜研究概要＞

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、肺がん、胸膜中皮腫、膵がん、胃がんについて、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。特にわが国のがん死亡原因第１位の肺がんにおいて、肝細胞増殖因子(HGF)による EGFR（上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬（EGFR-TKI：イレッサやタルセバ）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医療の中核として、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。

＜2011 年度の研究成果＞

1. HGF が EGFR 遺伝子変異を有する肺がん細胞の EGFR-TKI 耐性を誘導することを見出している。本年度は国内 12 施設との共同研究として、EGFR-TKI 治療を受けた EGFR 変異肺がん症例の臨床検体を用いた解析を行い、獲得耐性腫瘍の 61% および自然耐性腫瘍の 29%に HGF が高発現していることを明らかにし、HGF が臨床的にも重要な EGFR-TKI 耐性因子であるとともに耐性克服の治療標的となることを報告した。（矢野、山田、竹内）

2. セツキシマブは進行大腸がんにおいて延命効果が示されている抗 EGFR 抗体で、非小細胞肺がんにおいても抗がん剤と併用することで統計学的に有意な延命効果が報告されている。セツキシマブは EGFR 遺伝子変異の有無にかかわらず肺がん細胞の増殖を抑制したが、HGF がセツキシマブ耐性を誘導することを明らかにした。HGF は腫瘍内線維芽細胞が高発現する場合があり、線維芽細胞の産生する HGF によりセツキシマブ耐性誘導されることが *in vitro* および *in vivo* で示されたことから、HGF を阻害することにより肺がんにおけるセツキシマブ治療の効果を強化できる可能性が示唆された。（山田、竹内、北、矢野）

3. ガングリオシド GM_2 はいくつかの固形がんに過剰発現されている糖脂質である。小細胞肺がん細胞株には GM_2 が高発現されており、ヒト化抗 GM_2 抗体（協和発酵キリンより供与）がヒト単核球存在下に抗体依存性細胞傷害反応(ADCC)を誘導し小細胞肺がん細胞を傷害することを明らかにした。また、NK 細胞除去 SCID マウスを用いた小細胞肺がん細胞株の多臓器転移モデルにおいて、ヒト化抗 GM_2 抗体による治療が多臓器転移形成を抑制することを見出した。さらに、小細胞肺がん症例の凍結組織を解析し、GM_2 が小細胞がん細胞に発現されていることを確認した。小細胞肺がんは早期から微小転移を形成することが治療の最大の障壁であるが、上記の成果から、GM_2 を高発現する小細胞肺がんの治療に抗 GM_2 抗体が有用である可能性が示唆された。（山田、竹内、北、矢野）

4. 胸膜中皮腫の同所移植モデルを用い、中皮腫細胞が産生する FGF-2 や PDGF-AA が間質の線維芽細胞を活性化し、活性化された線維芽細胞が HGF を産生して中皮腫細胞の増殖や運動能を亢進するという悪性サイトカインサイクルが存在することを見出した。さらに、兵庫県立尼崎病院との共同研究で、胸膜中皮腫症例の腫瘍組織においても中皮腫組織において FGF-2 や PDGF-AA、HGF が多くの症例で高発現されていることを明らかにした。以上の成果から、中皮腫において悪性サイトカインサイクルの遮断により治療効果を強化できる可能性が示唆された。（山田、竹内、北、安本、矢野）

＜今後の計画＞

1. HGF による EGFR-TKI 耐性肺がん症例の実用的な診断法を確立する。さらに、HGF-Met 経路の阻害薬を用いた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、220 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がん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. *in vivo* イメージングを用いた肺がんの脳転移および骨転移モデルを確立し、分子機構解析および治療法開発を推進する。

4. 胸膜中皮腫に対する血管新生因子や新規がん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. 膵がんや胃がん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。

6. 骨転移治療薬であるゾレドロネートによる発熱を予測する実用的な検査法を確立する。

7. 原発不明がんの初回化学療法および二次化学療法の有効性を検証する多施設共同臨床試験を実施する。

＜発表論文＞

原著論文

(主体となったもの)

1. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. **J Thorac Oncol** 2012;7:272-80.

2. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. **Clin Cancer Res** 2011 17;2260-9.

3. Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A, Wang W, Li Q, Donev IS, Tacheuchi S, Mouri H, Yamashita K, Ohtsubo K, Yano S. The EGFR ligands amphiregulin and heparin-binding EGF-like growth factor promote peritoneal carcinomatosis in CXCR4-expressing gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2011;17:3619-30.

4. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yasumoto K, Yano S. Pleural mesothelioma instigates tumor associated fibroblasts to promote progression via malignant cytokine network. **Am J Pathol** 2011; 179:1483-93.

5. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto U, Yasumoto Y, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. **J Thorac Oncol** 2011;6:2011-7.

6. Yamada T, Bando H, Takeuchi S, Kita K, Li Q, Wang W, Akinaga S, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Genetically engineered humanized anti-ganglioside GM2 antibody against multiple organ metastasis produced by GM2 expressing small cell lung cancer. **Cancer Sci** 2011; 102:2157-63.

（共同研究）

1. Tomimoto H, Hanibuchi M, Ogushi F, Okano Y, Shinohara T, Doi H, Yamamoto A, Takeuchi E, Yamamoto A, Azuma M, Tada H, Kanematsu T, Kakiuchi S, Goto H,

Yano S, Nishioka Y, Sone S. A multi-institutional phase II study of combination chemotherapy with S-1 plus cisplatin in patients with advanced non-small cell lung cancer. **Oncology Letter** in press.

2. Sano T, Takahashi M, Nozaki T, Takahashi Y, Tamura M, Nashimoto M. Expanding the utility of heptamer-type sgRNA for TRUE gene silencing. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 416:427-32.

3. Tanaka S, Nakada M, Hayashi Y, Nakada S, Kitamura-Sawada S, Furuyama N, Suzuki T, Kamide T, Hayashi Y, Yano S, Hamada JI. Epithelioid glioblastoma changed to typical glioblastoma -the methylation status of MGMT promoter and 5-ALA fluorescence -. **Brain Tumor Pathol** 2011;28:59-64.

4. Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Mitsuoka S, Watanabe T, Suzumura T, Tachibana K, Noguchi M, Yano S, Hirata K. Reaction of plasma hepatocyte growth factor level in lung cancer patients treated with EGFR-TKIs. **Int J Cancer** 2011 126:1410-6.

5. Shiirevnyamba A, Takahashi T, Shan H, Ogawa H, Yano S, Kanayama H, Izumi K, Uehara H. Enhancement of osteoclastogenic activity in osteolytic prostate cancer cells by physical contact with osteoblasts. **Br J Cancer** 2011;104:505-13.

6. Ogino H, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Trung Van The, Goto H, Ikuta K, Yamada T, Uehara H, Tsuruoka A, Uenaka T, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yano S, Nishioka Y, Sone S. E7080 suppresses hematogenous multiple organ metastases of lung cancer cells with nonmutated epidermal growth factor receptor. **Mol Cancer Ther** 2011;10:1218-28.

総説

1. Yano S, Li Q, Wang W, Yamada T, Takeuchi S, Nakataki E, Ogino H, Goto H, Nishioka Y, Sone S. Antiangiogenic therapy for malignant mesothelioma. **Front Biosci** 2011;16:740-8.

2. Yano S, Wang W, Li Q, Yamada T, Takeuchi S, Matsumoto K, Nishioka Y, Sone S. HGF-MET in resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in lung cancer. Hepatocyte growth factor and its receptor signaling and the therapeutic implications. **Curr Signal Transd T** 2011;6: 228-33.

3. Koizumi K, Kato S, Sakurai H, Hashimoto I, Yasumoto K, and Saiki I. Therapeutics

target of CXCR4 and its downstream in peritoneal carcinomatosis of gastric cancer. **Front Biosci** 2012; 269-76.

4. Yasumoto K, Yano S. The molecular mechanisms of gastric cancer metastasis: Role of the chemokine receptor CXCR4 and its ligand CXCR12 in peritoneal carcinomatosis. Recent advances in metastasis of gastrointestinal cancers. Ed. Kuniyasu H and Kitadai Y. **Transworld Research Network**, Keraka India, 2011.

5. 矢野聖二. 肺がんの分子標的薬の耐性機構. **Annual Review 呼吸器** 2011: 44-9.

6. 矢野聖二. 肺がんの分子標的治療の現状と今後の展望. **日本臨床内科医会会誌** 2011; 25：611-5.

7. 矢野聖二. がん遺伝子研究の治療的な意義. **呼吸** 2011; 30:3-8.

8. 矢野聖二. 進行・再発非小細胞肺癌に対する血管新生阻害剤アバスチン. **呼吸** 2011; 30：365-70.

9. 矢野聖二. EGFR-TKI 耐性メカニズムと克服の試み. **呼吸器内科** 2011; 19：389-96.

10. 矢野聖二. 秒進分歩の分子標的治療. **実験医学**(増) 2011; 29：148-52.

11. 矢野聖二. EGFR チロシンキナーゼ阻害薬―肺癌への著効と耐性克服への戦略. **実験医学**(増) 2011; 29：203-8.

12. 毛利久継、矢野聖二. 消化器癌化学療法の副作用対策 3 腎毒性. **消化器癌化学療法** 2011:315-7.

13. 山田忠明、矢野聖二. EGFR 阻害薬（ゲフィチニブなど）. **がん生物学イラストレイテッド** 2011:304-9.

14. 竹内伸司、矢野聖二. 分子標的剤の現状 呼吸器腫瘍における血管新生抑制療法. **Biotherapy 2011**; 25:834-41.

＜学会発表・国内＞

1. 第 108 回日本内科学会総会 毛利久継、竹内伸司、山田忠明、大坪公士郎、山下 要、安本和生、池田博子、矢野聖二. 男性乳癌が疑われた HER2 強陽

性の原発不明癌に対し、trastuzumab 併用化学療法が奏効した 1 例.　2011 年 4 月　東京

2. 第 51 回日本呼吸器学会総会　山田忠明、竹内伸司、橘啓盛、野口雅之、矢野聖二.　EGFR 活性型変異陽性非小細胞肺癌の EGFR-TKI 耐性腫瘍における HGF 発現の検討.　2011 年 4 月　東京

3. 第 11 回日本分子生物学会春季シンポジウム　山田忠明、小泉瞳、南條成輝、竹内伸司、矢野聖二. Hsp90 阻害剤は、HGF による EGFR 遺伝子変異陽性肺がんの薬剤耐性を克服する.　2011 年 5 月　金沢

4. 第 11 回日本分子生物学会春季シンポジウム　安本和生、山田忠明、川島篤弘、矢野聖二. CXCR4 ならびに EGF リガンドを標的とした新規胃癌標的治療法の開発.　2011 年 5 月　金沢

5. 第 97 回日本消化器病学会総会　大坪公士郎、竹内伸司、山田忠明、毛利久継、山下　要、安本和生、田島秀浩、中川原寿俊、北川裕久、萱原正都、太田哲生、蒲田敏文、松井　修、向　宗徳、佐々木素子、中沼安二、牧本和生、矢野聖二. 超音波内視鏡下穿刺術 (EUS-FNA) にて診断した膵同時性多発癌の一剖検例.　2011 年 5 月　東京

6. 第 15 回日本がん分子標的治療学会　小泉瞳、山田忠明、矢野聖二. Hsp90 阻害剤は、HGF による EGFR 陽性肺がんの薬剤耐性を克服する.　2011 年 6 月　東京

7. 第 20 回日本がん転移学会学術集会・総会　安本和生、山田忠明、川島篤弘、矢野聖二. 腹膜播種がん微小環境からみた新規標的分子阻害による腫瘍制御.　2010 年 7 月　浜松

8. 第 20 回日本がん転移学会学術集会　山田忠明、坂東英明、竹内伸司、秋永士朗、矢野聖二. ヒト化抗ガングリオシド GM2 抗体による小細胞肺癌多臓器転移の抑制効果.　2011 年 6 月　浜松

9. 第 20 回日本がん転移学会学術集会総会　山下　要、山田忠明、安本和生、矢野聖二. 急速な増大を伴う骨髄癌腫症の一例.　2011 年 6 月　浜松

10. 第 66 回日本消化器外科学会総会　安本和生、山下　要、川島篤弘. ケモカイン CXCR4 発現胃癌による癌性腹膜炎発症機序の分子生物学的解明ならびに標的治療法の開発.　2011 年 7 月　名古屋

11. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会　矢野聖二. HGF-triggered EGFR-TKI

resistance in EGFR mutant lung cancer.　2011 年 7 月　横浜

12. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会　安本和生、竹内伸司、山田忠明、毛利久継、山下　要、大坪公士郎、矢野聖二. 結合織性後腹膜浸潤から発症した稀な再発胃癌の 1 例.　2011 年 7 月　横浜

13. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術集会　毛利久継、竹内伸司、山田忠明、大坪公士郎、 山下　要、 安本和生、鈴木潮人、矢野聖二. 抗利尿ホルモン不適合分泌症候群（SIADH）を合併した原発不明低分化型神経内分泌癌の 1 例. 2011 年 7 月 23 日　横浜

14. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術総会　山田忠明、矢野聖二. Treatment for EGFR mutant lung cancer.　2011 年 7 月　横浜

15. 第 9 回日本臨床腫瘍学会学術総会　山田忠明、李チ、王偉、竹内伸司、岩切章太郎、糸井和美、矢野聖二. Analysis of tumor immunoreactivity for FGF-2,PDGF-AA, and HGF in malignant pleural mesothelioma patients.　2011 年 7 月　横浜

16. 第 70 回日本癌学会学術総会　矢野聖二. EGFR ligands induce resistance to ALK inhibitors in EML4-ALK lung cancer cells.　2011 年 10 月　名古屋

17. 第 70 回日本癌学会学術総会　安本和生、山田忠明、川島篤弘、矢野聖二. EGF リガンド（HB-EGF、Amphiregulin）は胃癌性腹膜炎形成に深く関与する 2011 年 10 月　名古屋

18. 第 70 回日本癌学会総会　山田忠明、矢野聖二. HGF/MET is a novel therapeutic target for EGFR-TKI resistant lung cancer.　2011 年 10 月　名古屋

19. 第 70 回日本癌学会学術総会　竹内伸司、王偉、李チ、山田忠明、Ivan Donev、小泉　瞳、中村隆弘、松本邦夫、西岡安彦、曽根三郎、上仲俊光、矢野聖二. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer.　2011 年 10 月　名古屋

20. 第 82 回日本消化内視鏡学会総会　大坪公士郎、毛利久継、山下　要、安本和生、北川裕久、太田哲生、蒲田敏文、松井　修、池田博子、矢野聖二. 超音波内視鏡 (EUS) による膵管内乳頭粘液性腫瘍 (IPMN) の壁在結節描出能に関する検討.　2011 年 10 月　福岡

21. 第 53 回日本消化器病学会大会　毛利久継、山田忠明、竹内伸司、大坪公士郎、山下 要、 安本和生、向　宗徳、矢野聖二. Humoral hypercalcemia of

malignancy (HHM)を合併した進行膵癌の 1 例.　2011 年 10 月　福岡

22. 第 49 回日本癌治療学会学術集会　矢野聖二. がん転移のメカニズム.　2011 年 10 月　名古屋

23. 第 52 回日本肺癌学会総会　矢野聖二. Receptor ligand-triggered resistance to molecular targeted drugs in lung cancer.　2011 年 11 月　大阪

24. 第 52 回日本肺癌学会総会　山田忠明、竹内伸司、南條成輝、曽田学、間野博明、矢野聖二. EML4-ALK 肺がんにおける ALK 阻害薬耐性 : EGFR リガンドによる新規耐性機構.　2011 年 11 月　大阪

25. 第 52 回日本肺癌学会総会　南條成輝、秦 明登、加地玲子、藤田史郎、竹内伸司、山田忠明、矢野聖二、片上信之.　非小細胞肺癌における EGFR-TKI 使用後の中枢神経系での獲得耐性に関する検討.　2011 年 11 月　大阪

＜学会発表・国際＞

1. American Association for Cancer Research (AACR), Special Conference. Ohtsubo, K, Donev IS, Yamada T, Takeuchi S, Yano S. PI3K inhibition to overcome HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. 2011 年 2 月 San Francisco, USA.

2. American Association for Cancer Research (AACR), 102nd ANNUAL MEETING. Yano S, Donev IS, Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. 2011 年 4 月　Orland, USA.

3. JSICR-MMCB 2011.Yasumoto K, Yamada T, Kawashima A ,Yano S. The EGFR ligands amphiregulin and HB-EGF promote peritoneal carcinomatosis in gastric cancer. 2011 年 5 月 Osaka.

4. 2011 American Society of Clinical Oncology (ASCO), Annual Meeting. Yano S, Yamada T, Takeuchi S, Tachibana K, Minami Y, Yatabe Y, Mitsudomi T, Tanaka H, Kimura T, Kudoh S, Nokihara H, Ohe Y, Yokota J, Uramoto H, Yasumoto K, Kiura K, Higashiyama M, Oda M, Saito H, Yoshida J, Kondoh K, Noguchi M. Hepatocyte growth factor expression in EGFR mutant lung cancer with intrinsic and acquired resistance to tyrosine kinase inhibitors in a Japanese cohort. 2011 年 6 月 Chicago, USA.

5. 14th World Conference on Lung Cancer. Yano S, Donev IS, Yamada T, Takeuchi S, Matsumoto K. PI3K inhibitors, PI-103, GDC-0941, and BEZ235, overcome HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in *EGFR* mutant lung cancer. 2011年7月 Amsterdam, Holland.

＜外部資金＞

1. 次世代がん研究　文部科学省
   矢野聖二
   研究代表者　18,000（千円）
   分子標的薬の感受性・耐性を規定する新たな分子機構の解明

2. 新学術領域　日本学術振興会
   矢野聖二
   研究代表者　10,900（千円）
   呼吸器悪性腫瘍の微小環境の特性を標的とした新規制御法の開発

3. 保健医療分野における基礎研究推進事業　医薬基盤研究所
   矢野聖二
   研究分担者　　10,000（千円）
   中皮腫の進展におけるAggrusの関与を解明する研究

4. 基盤研究（B）日本学術振興会
   矢野聖二
   研究代表者　3,000（千円）
   HGFによるEGFR活性型変異陽性肺癌の分子標的薬耐性を克服する個別化医療開発

5. 基盤研究（C）日本学術振興会
   安本和生
   研究代表者 1,700（千円）
   HGF/c-MET axisとHB-EGFを標的とした胃癌標的治療法の開発

6. 挑戦的萌芽研究　日本学術振興会
   毛利久継

研究代表者　1,200（千円）
ゾレドロネート投与と発熱およびサイトカイン産生に関する検討

7.　若手研究（B）日本学術振興会
山田忠明
研究代表者　1,700（千円）
新規足場蛋白Aki1を標的としたEGFR遺伝子変異肺癌の制御法開発

8.　若手研究（B）日本学術振興会
竹内伸司
研究代表者　2,100（千円）
Rasシグナル活性化変異を有する原発性肺癌を標的とした新規治療法の開発

9.　厚生労働省　がん研究助成金　東北大学加齢医学研究所・佐藤班
矢野聖二
研究分担者　1,000（千円）
腫瘍脈管系を標的としたがん浸潤転移とがん幹細胞制御法の確立

10. 共同研究　大鵬薬品工業
矢野聖二
研究代表者　4,762（千円）
肺がんにおける EGFR-TKI の耐性機構の解明

10. 共同研究　エーザイ
矢野聖二
研究代表者　1,420（千円）
肺癌領域におけるエーザイ品を中心とした新たな治療戦略・レジメ開発

11. 共同研究　特殊免疫研究所
矢野聖二
研究代表者　952.4（千円）
肺がんの EGFR-TKI 治療の効果予測における血液中 HGF および関連因子測定の意義を検討する研究

12. 共同研究　協和発酵キリン
矢野聖二
研究代表者　476.2（千円）

抗 GM_2 抗体の活性評価

＜共同研究＞

1. がん研究会がん化学療法センター　基礎研究部　藤田直也
「中皮腫の進展におけるAggrusの関与を解明する研究」

2. 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部　呼吸器・膠原病内科　曽根三郎、西岡安彦、神戸市立医療センター中央病院・先端医療センター　片上信之、国立病院機構高知病院　大串文隆、がん感染症センター都立駒込病院　渋谷昌彦「肺がんのEGFR-TKI治療の効果予測における血液中HGFおよび関連因子測定の意義を検討する研究」

3. エーザイ株式会社　上仲俊光
「E7050による肺癌のEGFR-TKI耐性克服」

4. 大鵬薬品工業　宇津木照洋
「肺癌におけるEGFR-TKIの耐性機構の解明」

5. 愛知県がんセンター　胸部外科　光冨徹哉
「MET 遺伝子増幅を有する肺がんの細胞内シグナル伝達に関する研究」

6. 愛知県がんセンター　分子腫瘍部　関戸好孝
「胸膜中皮腫に対する新規分子標的治療法を開発する研究」

7. 安田女子大学薬学部薬学科生命薬学講座　柳原五吉
「胸膜中皮腫に対する新規分子標的治療法を開発する研究」

8. 兵庫県立尼崎病院呼吸器外科　糸井和美、岩切章太郎
「胸膜中皮腫の分子標的の臨床検体における解析」

9. 協和発酵キリン
「抗 GM_2 抗体の活性評価」

10. 特殊免疫研究所
「肺がんの EGFR-TKI 治療の効果予測における血液中 HGF および関連因子測定の意義を検討する研究」

中央実験施設

中央実験施設

＜研究スタッフ＞

准教授　黒木 和之、遠藤　良夫、久野　耕嗣

助教　　天野 重豊

中央実験施設では、がん進展制御研究所共同利用施設および中央研究室の運営に関わると共に、黒木はB型肝炎ウイルス感染の分子メカニズムの解明、遠藤はがんの光線力学的療法の新たな応用研究を中心に、久野はADAMTS1の器官形成と機能における役割とその生理活性の解析、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。

＜研究概要、2011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感染の分子機構（黒木）

肝炎、肝がん発生の原因ウイルスであるB型肝炎ウイルスのLife cycleを理解することは、このウイルスの感染・増殖を阻止する新たな方策を探る上で大切である。これまでヒトおよびダックB型肝炎ウイルス（HBVおよびDHBV）の増殖は時計制御遺伝子群によって制御されている可能性を示してきた。これらのうち正の転写制御因子として知られるRetinoid-related orphan receptor α（RORα）は、ウイルス遺伝子の発現をひじょうに強く抑制するが、それには複数の機構があり、ひとつはC/EBPbが関わっていることを明らかにした。ウイルス遺伝子発現の抑制についてさらに解析を進めるとともに、HBV感染の分子メカニズム解明のため、モデルとしてのDHBV 2nd receptorの探索やHBV感染培養細胞系樹立を進めていく。最近、正常肝細胞によく似たプロフィールを持つ肝がん由来培養細胞を得ることができたので感染能等について検討する。

5-ALAを用いる光線力学的療法の新たな応用（遠藤）

がんの光線力学的診断と治療の新展開を目指し、5−アミノレブリン酸を用いる光線力学的治療（5-ALA-PDT）の成否の鍵を握る感受性規定因子の同定と効果増強法に関する研究を実施している。本年度は、オリゴペプチドトランスポーターPEPT1は5-ALAの細胞内取り込みおよびPpIXの蓄積に決定的な役割を果たすと共に、PpIXの排出に関与するATP−結合カセットトランスポーターABCG2の発現は5-ALA-PDT感受性を低下させ、ABCG2特異的阻害剤は5-ALA-PDT感受性を著明に改善することを実験的に証明した。さらに、独自に樹立した5-ALA-PDT耐性株における遺伝子発現プロファイルの解析結果からも、PEPT1の発現の低下とABCG2の発現亢進が耐性獲得に関与していることが確認されている。その一方、PEPT1とABCG2の発現変化を伴わない耐性株も見出されており、現在その耐性化機序の解析を行っている。

〈今後の計画〉5-ALA-PDT 効果増強剤の探索研究を継続的に実施すると共に、効果増強の作用機序の解明とそれに基づく誘導体の開発を展開する。また、5-ALA-PDT 耐性化機序の解明研究を進め、新規感受性規定因子の探索を行う予定である。

ADAMTS-1 の雌生殖機能における役割の解析（久野）

ADAMTS-1-/-マウス（129/B6 遺伝子背景）は、腎盂尿管移行部閉塞症と酷似した表現型を示し、排卵過程、卵胞生育過程、卵巣髄質部の血管形成、皮膚損傷治癒過程などにも異常を示す。一方、遺伝子背景の異なる BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1-/-マウスでは分娩異常が高頻度で起こることを最近見い出している。また ADAMTS-1-/-マウスの子宮平滑筋では、オキシトシン、hypotonic shock、 KCl 等に対する収縮応答性が低下していることを見い出している。今回、陣痛発来の起点となるプロジェステロンの調節について調べた。その結果、ADAMTS-1-/-マウスの妊娠 19 日目の血清プロジェステロン値は、野生型マウスと同程度に低下していることがわかった。このことから ADAMTS-1-/-マウスでは、黄体退縮によるプロジェステロン低下の過程は保たれており、分娩開始のシグナル自体は生じていることが示唆された。現在 ADAMTS-1-/-マウスの子宮平滑筋における収縮応答性の低下の原因を明らかにするために、同組織における組織学的変化や収縮調節因子、ECM 分子の変化等について解析を行っており、分娩過程全般における ADAMTS-1 役割について明らかにしていく予定である。

自然免疫に関わる血球の機能の進化について（天野）

哺乳類の免疫系は自然免疫系と獲得免疫系からなり非常に複雑であるが、それらは無脊椎動物の免疫系から進化してきた。より単純な無脊椎動物の血球による自然免疫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。アルシアンブルーは pH 1.0 以下では硫酸基に特異的に結合する。マボヤの血球をアルシアンブルーで染めると、fine granular cell (FGC)の顆粒が染まり、硫酸基を持つ sulfated GAGs の存在が示された。ヘパリナーゼ処理によって FGC の顆粒の染色性が失われたので、その sulfated GAGs はヘパリン様分子であると考えられる。Mast cell と同様に、FGC は compound 48/80 に反応して顆粒を細胞外に放出した。また結合組織内を移動する FGC も観察された。これらの結果は FGC が哺乳類の mast cell の起源であることを示唆している。今後、他の血球の機能と進化についても調べていく予定である。

＜発表論文＞

研究室が主体となったもの：

1. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Okura I, Ogura S: Tumor Suppressor Protein p53-dependent Cell Death Induced by 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-based Photodynamic Sensitization of Cancer cells in Vitro. ALA-Porphyrin Science, December 08, 2011, accepted.
2. Hagiya Y, Endo Y (equal contribution), Yonemura Y, Takahashi K, Ishizuka M, Abe F, Tanaka T, Okura I, Nakajima M, Ishikawa T, Ogura S: Pivotal Roles of Peptide Transporter PEPT1 and ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCG2 in 5-Aminolevulinic Acid (ALA)-Based Photocytotoxicity of Gastric Cancer Cells in Vitro. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, December 06, 2011, accepted.

共同研究：

3. Teng L, Nakada M, Zhao SG, Endo Y, Furuyama N, Nambu E, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. Silencing of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based fluorescence and photodynamic therapy efficacy. Br J Cancer. 2011 Mar 1;104(5):798-807.
4. Abe C, Uto Y, Nakae T, Shinmoto Y, Sano K, Nakata H, Teraoka M, Endo Y, Maezawa H, Masunaga S, Nakata E, Hori H. Evaluation of the In vivo Radiosensitizing Activity of Etanidazole Using Tumor-bearing Chick Embryo. J Radiat Res (Tokyo). 2011/03;52(2):208-14.
5. Hideki Katagiri, Ichiro Nishizaki, Tomohiro Hayashida, Yoshio Endo, Hisashi Miyamori and Junya Hirai: A GO similarity measurement method based on information contents and semantic values, International Journal of Biomedical Soft Computing and Human Sciences (in press), February 17, 2011, accepted.

＜総説および著書＞

1. Kuno K:　ADAMTS-1. In *the Handbook of Proteolytic Enzymes* (The third edition), eds. Neil D Rawlings & Guy Salveson. (Oxford, Elsevier Science), in press.

＜学会発表＞

1. Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Yoshio Endo and Hitoshi Hori: In vivo antioxidative activity of O-TEMPO-RNP using our developed chicken egg assay 第21回日本MRS学術シンポジウム　2011年12月（横浜、横浜市開港記念会館・横浜情報文化センター）
2. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima, Masashi Kimura:

Significance of membrane transporters in determining the ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月（名古屋、大阪国際会議場）

3. Chiaki Abe, Yoshihiro Uto, Yoshio Endo, Hiroshi Maezawa, Shin-ichiro Masunaga, Hitoshi Hori: Evaluation of the In vivo Radiosensitizing Activity of Etanidazole Using Tumor-Bearing Chick Embryo 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月（名古屋、大阪国際会議場）
4. 宇都義浩、安部千秋、川崎彩加、吉冨徹、長崎幸夫、遠藤良夫、堀均：酸化ストレス発育鶏卵モデルを用いたラジカル含有ナノ粒子 TEMPO-RNP の in vivo 抗酸化活性評価　第 64 回日本酸化ストレス学会　2011 年 7 月（北海道、ルスツ）
5. Yoshio Endo, Shun-ichiro Ogura, Yuichiro Hagiya, Yutaka Yonemura, Masahiro Ishizuka, Tohru Tanaka, Katsushi inoue, Kiwamu Takahashi, Motowo Nakajima: Role of membrane transporters in determining ALA-PDT sensitivity in human cancer cells 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム　2011 年 5 月（金沢、石川県立音楽堂）
6. Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Toru Yoshitomi, Yukio Nagasaki, Yoshio Endo, Eiji Nakata, Hitoshi Hori: Development of an *in vivo* evaluation system of antioxidants using fertilized chicken eggs International Conference on Biomaterials Science ICBS2011 in Tsukuba, Japan 2011 年 5 月（つくば、つくば国際会議場）
7. 遠藤 良夫, 小倉 俊一郎, 萩谷 祐一郎, 米村 豊, 石塚 昌宏, 井上 克司, 高橋 究, 中島 元夫：5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法感受性と膜輸送系の関連性　日本薬学会第 131 年会　2011 年 3 月（静岡、ツインメッセ静岡）
8. 生水真紀夫、多久和陽、岡本安雄、栗原裕基、松島綱治、○久野耕嗣（○発表者）「ADAMTS-1 遺伝子欠損マウス子宮筋の uterotonin に対する応答性の解析」第 34 回日本分子生物学会年会（2011 年 12 月、横浜）
9. 天野重豊：マボヤ血球の Sulfated GAGs について　第 82 回日本動物学会大会　2011 年 9 月（旭川､旭川市大雪クリスタルホール）

＜外部資金＞

1. 科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究）　Ｂ型肝炎ウイルス感染の分子機構　代表：黒木和之（100 万円）
2. 科学研究費補助金（基盤研究Ｃ）代表：遠藤良夫（130万円）
3. 厚生労働科学研究費補助金　難治性疾患克服研究事業　分担：遠藤良夫　80万円
4. 産学官連携共同研究（新規1件、2010年8月−2011年7月1件）代表：遠藤良夫

＜学内外との共同研究＞

1. 5-ALA を用いた転移性胃癌の術中診断および治療法の開発（東工大・フロンティア研究機構、徳島大・ソシオテクノサイエンス研究部、SBI アラプロモ、NPO 腹膜播種治療

支援機構）（遠藤良夫）

2. アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの細胞レベルでの解明（東工大・フロンティア研究機構）（遠藤良夫）
3. 受精鶏卵を用いる放射線増感剤感受性試験の確立
   ヒトがん細胞を用いた抗転移性制癌剤の開発
   （徳島大・ソシオテクノサイエンス研究部）（遠藤良夫）
4. 腹膜偽粘液腫の本邦における発生頻度・病態の解明・治療法の開発（NPO 腹膜播種治療支援機構）（遠藤良夫）
5. 抗腫瘍性核酸代謝拮抗剤に対する感受性規定因子の同定（愛知学院大・薬、大鵬薬品工業）（遠藤良夫）
6. 脳腫瘍における 5-ALA-PDT の感受性規定因子（金沢大・医・脳外）（遠藤良夫）

基 礎 統 計
Foundation Statistics

決算額（運営費交付金）
Settlement of accounts for Each Year (Subsidy from the National Government)

（単位：千円）
in thousand yen

区　分 Item		平成19年度	平成20年度	平成21年度	平成22年度	平成23年度
運営費交付金 Subsidy from the National Government		618,945	531,217	723,893	507,414	564,308
内訳 Items	人 件 費 Personnel Expenses	507,178	454,245	388,901	386,797	411,774
	物件費等 Other Expenses	111,767	76,972	334,992	120,617	152,534

科学研究費補助金
Grants-in-Aid for Scientific Research

（単位：千円）
in thousand yen

研究種目 ＼ 年度	平成19年度		平成20年度		平成21年度		平成22年度		平成23年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
特定領域研究 Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas	7	37,000	9	46,600	8	44,200	1	3,500	0	0
新学術領域研究 Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas							2	47,840	5	65,520
基盤研究（A） Grant-in-Aid for Scientific Research（A）	0	0	0	0	0	0	1	16,510	1	14,560
基盤研究（B） Grant-in-Aid for Scientific Research（B）	7	58,510	7	46,670	8	50,700	8	45,500	7	43,290
基盤研究（C） Grant-in-Aid for Scientific Research（C）	8	17,030	5	8,840	5	8,450	7	12,090	9	15,210
挑戦的萌芽研究 Grant-in-Aid for challenging Exploratory Research	3	6,194	0	0	1	1,500	3	5,600	4	8,840
若手研究（S）（H19～） Grant-in-Aid for Young Scientists（S）	1	27,950	1	21,307	0	0	0	0	0	0
若手研究（A） Grant-in-Aid for Young Scientists（A）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
若手研究（B） Grant-in-Aid for Young Scientists（B）	5	6,971	4	8,060	5	13,390	7	13,130	9	20,800
研究活動スタート支援 Grant-in-Aid for Research Activity start-up	1	1,320	3	5,239	1	1,560	1	1,260	1	1,508
特別研究員奨励費 Grant-in-Aid for JSPS Fellows	2	2,200	3	2,400	2	1,800	3	2,700	1	900
最先端・次世代研究開発支援プログラム Funding Program for Next Generation World-Leading Researchers（NEXT Program）							2	20,150	2	149,500
合計　Total	34	157,175	32	139,116	30	121,600	35	168,280	39	320,128

※間接経費を含む

外部資金
Other Funds

（単位：千円）
in thousand yen

研究種目 ＼ 年度	平成19年度		平成20年度		平成21年度		平成22年度		平成23年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
受託研究	4	115,900	7	112,388	8	125,161	7	89,060	7	82,343
受託事業経費	1	210	1	20,000	1	20,000	1	18,000	2	17,668
民間等との共同研究	3	3,050	9	10,875	2	2,499	4	12,850	5	8,285
寄 附 金	28	38,740	22	26,324	23	23,614	27	32,897	22	30,018
合計　Total	36	157,900	39	169,587	34	171,274	39	152,807	36	138,314

※間接経費を含む

土地・建物
Land and Buildings

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

大学院生・研究生数
Graduate Students and Research Students

平成24年４月１日現在

				プログラム				合計（人）
				がん幹細胞研究	がん微小環境研究	がん分子標的探索	がん分子標的医療開発	
大学院生	医学系研究科	修士課程	Ⅰ		1	1		25
			Ⅱ			1		
		博士課程	Ⅰ		1			
			Ⅱ	2	1	1		
			Ⅲ	1		2		
			Ⅳ	3	1			
		前期課程	Ⅰ					
			Ⅱ				5	
		後期課程	Ⅰ		1			
			Ⅱ	1	1			
			Ⅲ		1		1	
	自然科学研究科	前期課程	Ⅰ		1	2		9
			Ⅱ		1	2		
		後期課程	Ⅰ			1		
			Ⅱ			1		
			Ⅲ			1		
研究生				1	2	1		4

交流協定校
Partner Universities and Faculties

平成24年４月１日現在

交流協定校	協定大学・部局等名	国（都市名）
大学間交流協定 Partner Universities	蘇州大学	中国（蘇州）
	四川大学	中国（成都）
	ハルビン医科大学	中国（ハルビン）
	釜山国立大学校	韓国（釜山）
	バルナ医科大学	ブルガリア（バルナ）
部局間交流協定 Partner Faculties	韓国科学技術研究院遺伝工学研究所	韓国（大田）
	国立モンゴル大学生物学部	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル科学アカデミー生物学研究所	モンゴル（ウランバートル）
	復旦大学上海がん病院	中国（上海）

各種シンポジウム開催状況

Research Activities

1．共同利用・共同研究拠点認定記念シンポジウム

Joint Usage/Research Center Symposium

目　　的：共同利用・共同研究「がんの転移・薬剤耐性に関わる先導的共同研究拠点」としての認定を記念し今後の活動を推進するため，拠点認定記念シンポジウムを開催する。

日　　時：平成23年４月21日㈭　15：00～17：00

場　　所：金沢大学自然科学系図書館　大会議室

来場者数：140人

プログラム：

①「分子標的治療時代のがんモデル動物」
　野田　哲生（公益財団法人がん研究会がん研究所長）

②「がん幹細胞の治療抵抗性克服を目指して」
　平尾　　敦（金沢大学がん進展制御研究所）

③「レチノブラストーマ遺伝子研究から見えるがん進展制御」
　高橋　智聡（金沢大学がん進展制御研究所）

2．金沢国際がん生物学シンポジウム

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa

目　　的：がん及びがん関連分野の基礎及び臨床研究の国際的な交流と研究協力を促進することを目的としている。

日　　時：平成23年５月25日㈬　９：00～18：20
　　平成23年５月26日㈭　９：00～17：20

場　　所：石川県立音楽堂　交流ホール

来場者数：743名（２日間延べ）

プログラム：

①セッションⅠ：
　免疫・アレルギー・炎症の分子生物学
　小安　重夫（慶應義塾大学医学部）
　熊ノ郷　淳（大阪大学大学院医学系研究科）

②セッションⅡ：時間生物学
　吉村　　崇（名古屋大学大学院生命農学研究科）
　平山　　順（東京医科歯科大学難治疾患研究所）

③セッションⅢ：メタボリック症候群の分子生物学
　山内　敏正（東京大学大学院医学系研究科）
　箕越　靖彦（自然科学研究機構生理学研究所・総合研究大学院大学生命科学研究科）

④特別講演Ⅰ：「Apoptosis,engulfment,and next」
　長田　重一（京都大学大学院医学研究科）

⑤セッションⅣ：疼痛の分子機構
　井上　和秀（九州大学大学院薬学研究院）
　植田　弘師（長崎大学大学院医歯薬学総合研究科）

⑥セッションⅤ：再生医学とエピジェネティクス
　眞貝　洋一（京都大学ウィルス研究所）
　古関　明彦（理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター）

⑦特別講演Ⅱ：「Klotho familyの生理機能と分子機能」
　鍋島　陽一（㈶先端医療振興財団先端医療センター）

⑧セッションⅥ：Leading Edge Ⅰ
　後藤由季子（東京大学分子細胞生物学研究所）
　高柳　　広（東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科）
　濡木　　理（東京大学大学院理学系研究科）

⑨セッションⅦ：Leading Edge Ⅱ
　中山　敬一（九州大学生体防御医学研究所）
　原　　英二（公益財団法人がん研究会がん研究所）
　水島　　昇（東京医科歯科大学大学院歯学総合研究科）

3．県民公開セミナー

Open Seminar on the people of a prefecture

目　　的：がんに関する研究成果を公表するとともに，地域住民の医療・健康の向上に貢献する。

日　　時：平成23年11月6日㈰　13：30～16：30

場　　所：金沢大学医学類十全講堂

来場者数：約400人

プログラム：みんなで考えよう　がん医療の課題～がん予防・早期発見・難治がん克服・がんと共に生きる～

総合司会：膳場　貴子（ニュースキャスター）

第Ⅰ部

特別講演「がんを克服した母に寄り添った私の体験から」

仁科　仁美（女優）

第Ⅱ部　パネルディスカッション　がん医療の課題

①がんの予防（子宮頸がんワクチン、禁煙、食事）

笹川　寿之（金沢医科大学病院産婦人科）

西　　耕一（石川県立中央病院呼吸器内科）外

②がんの早期発見（乳がん、前立腺がん）

北川　育秀（金沢大学附属病院泌尿器科）

井口　雅史（金沢大学附属病院乳腺科）外

③難治がんの克服

矢野　聖二（金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科）外

④がんと共に生きる（緩和医療、就職支援、経済的負担、患者会「がんサロン」）

山田　圭輔（金沢大学附属病院麻酔科蘇生科）

和田真由美（萌の会代表）

五十嵐晶子（キャリアカウンセラー）

大神　哲明（保険会社支社長）外

4．金沢大学がん進展制御研究所・富山大学和漢医薬学総合研究所交流セミナー

Kanazawa University Cancer Research Institute/Toyama University Institute of Natural Medicine Joint Seminar

目　　的：本研究所及び和漢医薬学総合研究所がそれぞれの共同利用・共同研究拠点としてのお互いの特色を生かしセミナーを通じて研究交流を深めることで「がん研究と和漢薬研究の先導的共同研究」の発展を目指す。

日　　時：平成24年1月18日㈬　9：30～12：30

場　　所：富山大学和漢医薬学総合研究所・民族薬物資料館

来場者数：約70名

プログラム：

①炎症反応により誘導される発がん促進機構

大島　正伸（金沢大学がん進展制御研究所・教授）

②生薬活用の二面性：漢方薬資源と創薬資源

小松かつ子（富山大学和漢医薬学総合研究所・教授）

③和漢薬DBに関して

田中　　謙（富山大学和漢医薬学総合研究所・准教授）

④がんを含む慢性進行性疾患の創薬標的GSK3β

源　　利成（金沢大学がん進展制御研究所・教授）

⑤多様な天然素材をもとにした抗がん物質の探索

Suresh Awale(富山大学和漢医薬学総合研究所・特命助教)

金沢大学がん進展制御研究所年報2011年

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

URL　http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/