

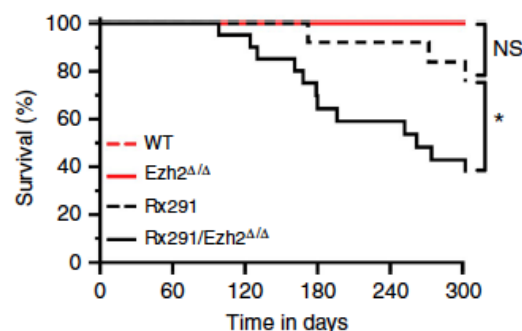
平成26年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2015.4

金沢大学がん進展制御研究所

研究区分		特定共同研究
研究課題		白血病幹細胞のエピジェネティクス制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・教授・岩間厚志
研究分担者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・講師・指田吾郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	造血幹細胞の維持・機能に関わるエピジェネティック分子の機能異常がどのように白血病幹細胞の増殖優位性に繋がるのか、重要な課題である。申請者らが解析を進めているポリコーム群遺伝子は、造血器腫瘍で変異が認められ、その変異は <i>TET2</i> 変異や <i>RUNX1</i> 変異、またはコヒーシン関連遺伝子変異と共存することが報告されており、このような変異との協調作用により白血病幹細胞の成立・維持に機能するものと想定される。そこで、これらの変異をポリコーム群遺伝子欠損造血幹細胞に導入し、移植マウス個体における造血の解析を通して、ポリコーム群遺伝子と協調して白血病発症に関わるこの仮説を検証する。	
【研究内容・成果】	ポリコーム群複合体は、ヒストン修飾を介して転写を抑制的に制御する。ポリコーム群複合体は、幹細胞制御に重要な分子群として解析されてきたが、ポリコーム群遺伝子 <i>EZH2</i> の機能喪失型変異が骨髓異形成症候群 (MDS) をはじめとした骨髓球系腫瘍で同定された。固形腫瘍においてもポリコーム群遺伝子 <i>EED</i> や <i>SUZ12</i> の欠失や機能喪失型変異が報告され、ポリコーム群遺伝子は病態により癌抑制遺伝子として機能するものと想定される。本研究においては、平尾先生のご指導のもと、レトロウイルスを用いてマウス造血幹細胞に MDS で見られる <i>RUNX1</i> 変異体を発現させ、その後、造血細胞特異的に <i>Ezh2</i> を欠損させるとマウスにおいて MDS の発症が著明に促進されることを明らかにした。この知見は、MDS において、ポリコーム群遺伝子と <i>RUNX1</i> 変異が高率に共存する事実と符合するものであり、異なる変異遺伝子間の協調作用を明白に示している (Sashida et al., Nat Commun 2014)。近年、non-canonical ポリコーム群複合体構成遺伝子として <i>BCOR</i>, <i>BCORL1</i> が同定されたが、これらの遺伝子の機能喪失型変異も MDS や急性白血病、再生不良性貧血においても同定されている。現在は、<i>BCOR</i> 欠損マウスや <i>BCORL1</i> ノックダウンの系を用いて、その造血腫瘍への関与を解析中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sashida G, Harada H, Matsui H, Oshima M, Yui M, Harada Y, Tanaka S, Mochizuki-Kashio M, Wang C, Saraya A, Muto T, Inaba T, Koseki H, Huang G, Kitamura T, and <u>Iwama A</u>. Ezh2 loss promotes development of myelodysplastic syndrome but attenuates its predisposition to leukemic transformation. Nat Commun 5:4177, 2014.	
	【学会発表】 <u>Iwama A</u>. "Role of polycomb group genes in the pathogenesis of myeloid malignancies" Stem cells and epigenetics in cancer, EMBO workshop. October 16-18, 2014 (Hong Kong, China)	
	【その他特筆事項】 なし	



平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究																																																																																																
研究課題		NOG マウスをプラットフォームとした消化器がん発生・悪性化研究のための新規モデルマウスの開発																																																																																																
研究代表者	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所動物資源基盤技術センター長・高橋利一																																																																																																
研究分担者	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所動物資源基盤技術センター資源開発室・研究員・伊田幸																																																																																																
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター資源開発室・研究員・香川貴洋																																																																																																
	所属・職名・氏名	公財) 実験動物中央研究所 動物資源基盤技術センター資源開発室長 後藤元人																																																																																																
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸																																																																																																
【研究目的】	発がんの特に初期過程において、免疫反応が発がんにどのように作用するのかは、spontaneous cancer model を用いた解析はあまりなされていない。金沢大学がん進展制御研究所・大島正伸教授が開発された APCΔ716 ノックアウトマウスに対して、実中研で開発した NOG マウスの重度免疫不全形質の導入により、APC 遺伝子変異による Wnt 活性化による大腸がん発生過程において宿主免疫反応の役割を解明できる。本研究ではゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas システムを利用して、APC 遺伝子に変異を持った NOG マウス (APC-NOG) を作製することを目的とした。																																																																																																	
【研究内容・成果】	1) 標的配列の設計 MIT の Feng Zhang の研究室のホームページで公開されている、CRISPR Design Tool を使って、APC 遺伝子の 716 番目のコドン近傍に、4 種類の標的配列を設計することができた。																																																																																																	
	2) GFP アッセイの結果 pX330 プラスミドおよび pCAG-EGFP プラスミドを用い、HEK293 細胞を使った GFP アッセイにて標的配列の切断活性を評価し、3 つの標的配列を選抜した。																																																																																																	
	3) DNA インジェクションの結果 NODxNOG マウス受精卵に対し、既報に基づき DNA 量を 5ng/ul で 1st トライを行ったが産子取得から低迷し、離乳産子 2 匹を得るのみであった。APCΔ716 ノックアウトマウスはホモ致死であることから、DNA 量を 1.5ng/ul に変更し 2nd トライを行った結果、26 匹の産子を得る事ができた。																																																																																																	
	4) 変異個体の選抜 28 匹 (2 匹 (1st) +26 匹 (2nd)) で得られたファウンダーマウスのテールからゲノム DNA を抽出、PCR し、PCR 産物をダイレクトシーケンスした。ダイレクトシーケンスでは判断できなかった個体については、PCR 産物を TA クローニングすることによって分離してからシーケンスした。その結果 19 匹 (0 匹 (1st) +19 匹 (2nd)) の変異個体が得られ、そのうち、6 種のフレームシフトの起こる個体 (モザイクも含む) が 10 匹得る事が出来た。(下表)																																																																																																	
	<table><tr><th colspan="8">APCΔ変異 ファウンダーマウスリスト</th></tr><tr><th>個体番号</th><th>誕生日</th><th>性別</th><th>APC</th><th>APC変異</th><th>APCΔ</th><th>IL-2Rg</th><th>scid</th></tr><tr><td>4</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>6</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>7</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-13, -6, -5, -1</td><td>Δ719, Δ733, Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>8</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>10</td><td>2014/9/24</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-15+5, -35</td><td>Δ717, Δ723</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>16</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>+/Y</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>18</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-1</td><td>Δ723</td><td>+/Y</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>23</td><td>2014/10/1</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-2, -2+6</td><td>Δ734, Δ736</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>24</td><td>2014/10/1</td><td>♀</td><td>MT/WT</td><td>-5</td><td>Δ733</td><td>KO/+</td><td>scid/+</td></tr><tr><td>28</td><td>2014/10/1</td><td>♂</td><td>MT/WT</td><td>-2</td><td>Δ734</td><td>+/Y</td><td>scid/+</td></tr></table>			APCΔ変異 ファウンダーマウスリスト								個体番号	誕生日	性別	APC	APC変異	APCΔ	IL-2Rg	scid	4	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	6	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	7	2014/9/24	♀	MT/WT	-13, -6, -5, -1	Δ719, Δ733, Δ723	KO/+	scid/+	8	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+	10	2014/9/24	♀	MT/WT	-15+5, -35	Δ717, Δ723	KO/+	scid/+	16	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/Y	scid/+	18	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/Y	scid/+	23	2014/10/1	♀	MT/WT	-2, -2+6	Δ734, Δ736	KO/+	scid/+	24	2014/10/1	♀	MT/WT	-5	Δ733	KO/+	scid/+	28	2014/10/1	♂	MT/WT	-2	Δ734	+/Y
APCΔ変異 ファウンダーマウスリスト																																																																																																		
個体番号	誕生日	性別	APC	APC変異	APCΔ	IL-2Rg	scid																																																																																											
4	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																											
6	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																											
7	2014/9/24	♀	MT/WT	-13, -6, -5, -1	Δ719, Δ733, Δ723	KO/+	scid/+																																																																																											
8	2014/9/24	♀	MT/WT	-1	Δ723	KO/+	scid/+																																																																																											
10	2014/9/24	♀	MT/WT	-15+5, -35	Δ717, Δ723	KO/+	scid/+																																																																																											
16	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/Y	scid/+																																																																																											
18	2014/10/1	♂	MT/WT	-1	Δ723	+/Y	scid/+																																																																																											
23	2014/10/1	♀	MT/WT	-2, -2+6	Δ734, Δ736	KO/+	scid/+																																																																																											
24	2014/10/1	♀	MT/WT	-5	Δ733	KO/+	scid/+																																																																																											
28	2014/10/1	♂	MT/WT	-2	Δ734	+/Y	scid/+																																																																																											
5) 今後の展望 NOG マウスとの交配により F1 マウスを作出し、APCΔ716 と同様に腸管腫瘍が発生するか検証する。またオフターゲット切断の有無の検査を実施する。また、今後本系統の頒布に向けシーケンシングに寄らない PCR genotyping 検査系を確立する。APCΔ-NOG マウスの系統樹立及び論文化を目指す。																																																																																																		
【成果等】	【主な論文発表】 なし																																																																																																	
	【学会発表】 なし																																																																																																	
	【その他特筆事項】 なし																																																																																																	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		p53-Rb ネットワークによるがん幹細胞代謝制御機構の基盤的研究
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・准教授・田中知明
研究分担者	所属・職名・氏名	Columbia University・教授・Carol Prives
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・助教・鈴木佐和子
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士研究員・河野晋
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士大学院生・吉田晶代
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	p53 と Rb のクロストークによる代謝制御の基盤的研究については、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たし、幹細胞性/がん幹細胞性制御と密接に関わる事がわかってきた。加えて、p53KO マウス由来の腫瘍において、Rb 経路をサイレンシングすると、がん幹細胞様の形質を引き起すだけでなく、ES/iPS と同様の代謝変化が生じ、中でもグルタミン代謝が重要であることを突き止めてきた。本共同研究では、これまでの p53-Rb ネットワークの知見を、がん組織や動物モデルの発現解析と密接に結びつけ、がん幹細胞制御の具体的な分子標的の探索と創薬シーズ発掘を目指す。	
【研究内容・成果】	乳癌における癌幹細胞の存在は、増殖、再発、転移、そして治療抵抗性と密接に関与することが知られている。近年では p53 が、癌幹細胞の自己再生・複製や somatic/progenitor 細胞のリプログラミングを抑制することで、乳癌の増殖・進行を防ぐことが報告され注目を集めている。一方で、p53 と共に 2 大癌抑制経路を司る Rb やその上流遺伝子 GATA3 も progenitor 細胞の増殖や悪性化を抑制することが明らかとなり、更には、10%以上の原発性乳がん、p53, GATA3 および PIK3CA にしか体細胞変異が見られないという報告もある。しかしながら、癌幹細胞における、それらの関連性や分子メカニズムは十分に明らかになっていない。そこで、癌幹細胞制御に重要な役割を果たす p53 と GATA3 に焦点をあて、GATA3 結合タンパクの探索的解析、乳がん組織における悪性度・予後への影響を検討した。Sphere assay を用いた癌の悪性度を評価する系より、p53 経路の調節解除が乳がんにおける悪性形質転換に重要な役割を果たすことが示唆された。次に、GATA3-Rb 経路の幹細胞制御機構を明らかにする目的で、LC-MS/MS を用いて GATA3 結合分子の同定を行った。その結果、いくつかの GATA3 転写複合体の会合分子が、乳癌細胞において同定された。その中の一つである、クロマチン複合体関連分子 RuvBL2 に着目した。乳がん患者の GEO database 解析を行った結果、RuvBL2 は、癌の悪性度などで高発現群と低発現群の間に有意な差がみられ、Kaplan-Meier 法にて、高発現群が低発現群に対し累積生存の有意な短縮を認めた。これらの結果は、p53 や GATA3 の癌抑制作用のひとつとして、癌幹細胞性の悪性形質抑制のメカニズムが示された。また、MS 解析により GATA3 結合タンパク、RuvBL2 を同定した。RuvBL2 は GATA3 の抑制機能を負に阻害することで癌促進的に働く可能性が示され、実際に、ヒト乳がん患者の予後悪化に関与していることが示唆された。現在これらの、p53 と GATA3/RuvBL2-Rb システムが、脂質合成経路やグルタミン代謝制御とどのように関わっているか、さらにそれらがどのように乳癌における幹細胞性性質(スフィア形成能)を制御しているかを解析している。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Hosokawa, H., Kato, M., Tohyama, H., Tamaki, Y., Endo, Y., Kimura, M. Y., Tumes, D. J., Motohashi, S., Matsumoto, M., Nakayama, K. I., Tanaka, T., and Nakayama, T.: Methylation of Gata3 at Arg261 regulates transactivation of the <i>Il5</i> gene in T helper 2 cells. <i>J Biol Chem.</i> (査読有) 橋本直子、田中知明 p53 と老年疾患, <i>医学のあゆみ</i>, 253 (9):15107-1512. (2015)	
	【学会発表】 - 中山哲俊、鈴木佐和子、橋本直子、永野秀和、小田瑞穂、松本雅記、横手幸太郎、田中知明 (2014) 癌幹細胞制御を目指した転写因子 p53 と GATA3 の機能的役割と乳癌における予後・悪性度との関わり。第 73 回日本癌学会学術総会、9 月 25 日、横浜。 - 鈴木佐和子、池田和博、井上聡、鈴木穰、菅野純夫、横手幸太郎、田中知明 (2014) - Mitochondrial GLS2 regulates pluripotency in human ES/iPS cells through the control of glutamine metabolism. ミトコンドリア分子 GLS2 のヒト ES/iPS 細胞におけるグルタミン代謝を介した幹細胞制御機構。第 73 回日本癌学会学術総会、9 月 26 日、横浜。	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		がん幹細胞形質を指標とした新規がん治療標的分子の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・分野長・河野隆志
研究分担者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・ポスドク研究員・中奥敬史
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	肺がんでは、RET, ALK, ROS, NRG1 等の受容体型チロシンキナーゼ遺伝子や関連遺伝子の融合が生じ、融合遺伝子はマウス線維芽細胞の形質転換能を持つことを明らかになっている。その中でも、NRG1 は融合のみならず高発現によるがん化への寄与も散見され、その対象は肺がんに限られないことが最近明らかとなってきた。しかし、NRG1 を標的とした治療を実現するためには、NRG1 ががん幹細胞形質・薬剤抵抗性に与える影響や、それに関連する下流シグナル伝達経路の解明が必須である。そこで、本共同研究では、NRG1 融合遺伝子 cDNA を強制発現させたヒトがん細胞株における、がん幹細胞形質の獲得と薬剤によるその形質の阻害作用を検討した。本研究の成果は、NRG1 融合遺伝子を標的としたがん治療法開発に大きな意義を持つ。	
【研究内容・成果】	1. 研究倫理審査委員会の承認のもと、浸潤性粘液腺がん等の肺がんの臨床検体を用いて、全 RNA シークエンス／全エクソンシークエンスを行った。同定された NRG1 遺伝子融合を対象に融合遺伝子 cDNA を発現するベクターを構築した。ベクターとしては、共同研究者（後藤典子教授）が精通し、かつ、がん幹細胞形質の研究に用いているレンチウイルスを用いることとした。遺伝子組み換え実験は、研究施設の規定を遵守して行った。 2. 共同研究者がこれまでにがん幹細胞形質の研究で用いているヒト肺がん培養細胞 NCI-H322、ヒト乳がん培養細胞 BT20、MCF7 を用いて、CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立した。CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現するがん細胞株では、スフェア形成能が有意に上昇することが確認でき、幹細胞マーカーの発現も認められた。 3. CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現するがん細胞株に対して、NRG1 による HER2:HER3 シグナルを抑制する承認薬剤を用いると、スフェア形成能が抑制され、幹細胞マーカーの発現低下も認められた。 4. in vivo でも NRG1 シグナルによる幹細胞形質の獲得を確認するために、ヌード・マウスに CD74-NRG1 融合タンパク質を恒常的に発現するがん細胞株を、濃度を段階的に希釈の上、移植し、腫瘍形成するかどうかを調べる実験に着手した。この動物実験は研究施設の規定を遵守して行った。 以上の結果は、CD74-NRG1 融合遺伝子が、がん幹細胞形質を上昇させる力を持つことを示している。今後、NRG1 による下流シグナルへの影響をしらべることで、幹細胞形質に関わる細胞内シグナルの変化を調べることで、新たな治療標的となる因子の探索を行う。	
【成果等】	【主な論文発表】 Murayama T, Gotoh N, Kohno T, Nakaoku T, et al. 投稿準備中	
	【学会発表】 1. 中奥敬史、蔦幸治、渡邊俊一、軒原浩、金永学、三嶋理晃、横田淳、河野隆志：Lung invasive mucinous adenocarcinoma (IMA)における治療標的となる新規遺伝子融合、第 55 回日本肺癌学会学術総会、京都、11 月、2014 年 2. 中奥敬史、市川仁、白石航也、坂本裕美、江成政人、荻原秀明、軒原浩、岡山洋和、金永学、三嶋理晃、横田淳、吉田輝彦、河野隆志：Druggable Oncogene Fusions in Invasive Mucinous Lung Adenocarcinoma, 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月、2014 年 3. Takahiko Murayama, Takashi Nakaoku, Koji Tsuta, Masato Enari, Tatsunori Nishimura, Kana Tominaga, Asuka Nakata, Arinobu Tojo, Sumio Sugano, Takashi Kohno, Noriko Gotoh. CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties.第 73 回日本癌学会学術総会、横浜、9 月、2014 年	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		特定共同研究
研究課題		肺がん・中皮腫における血管新生阻害薬耐性機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・西岡安彦
研究分担者	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・埴淵昌毅
	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・柿内聡司
	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・後東久嗣
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	申請者らは、胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma: MPM)の分子病態に基づく新規治療法の開発を目的に臨床を反映するヒト MPM の同所移植モデルを確立し、腫瘍血管新生に中心的な役割を担う VEGF に焦点を当て、分子標的治療の基礎検討を進めてきた。これまでの検討から本モデルにおける抗 VEGF 抗体（ベバシズマブ）耐性現象を確認し、その耐性には線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor: FGF）2 が重要であること、また FGF2 は宿主側の線維細胞（fibrocyte）から産生されることを見出している。本研究では、fibrocyte が骨髄由来細胞であることを確認し、さらに同様の現象がヒトヒト肺がん組織でも生じている可能性について解析することを目的とする。	
【研究内容・成果】	これまでのベバシズマブ耐性腫瘍（Y-MESO-14）における免疫組織染色法による検討から、ベバシズマブ耐性腫瘍内には宿主側 FGF2 が代替因子として増加しており、FGF2 産生細胞として collagen type I⁺/CXCR4⁺細胞（fibrocyte）が同定され、ベバシズマブ耐性腫瘍ではコントロール腫瘍と比較して有意に fibrocyte 数が増加していた。これらの結果を受けて、次にこれらの細胞が fibrocyte であることを免疫染色法以外の方法で確認することとした。腫瘍からマウス CD45⁺細胞を抽出し、フィブロネクチンコートディッシュで一定期間培養することで fibrocyte を単離したところ、ベバシズマブ耐性腫瘍ではコントロール腫瘍と比較し有意に fibrocyte 数が増加していた。さらに、腫瘍内に集積した fibrocyte が骨髄由来であることを確認するため、GFP 陽性骨髄細胞を移植した GFP キメラマウスを作成し、これまで同様に Y-MESO-14 細胞をキメラマウスに同所移植後、ベバシズマブ治療実験を行った。結果、ベバシズマブ耐性腫瘍ではコントロール腫瘍と比較して腫瘍組織内の GFP 陽性細胞数が有意に増加しており、さらにこれらの細胞が FGF2 を発現していることも確認した。これらの結果から、腫瘍のベバシズマブ耐性化には宿主から産生される FGF2 が重要であり、その産生細胞としての fibrocyte の重要性が確認された。 さらにこれらの現象が実際のヒト悪性腫瘍で生じていることを確認するため、ベバシズマブ投与後に切除されたヒト肺がん組織検体を用いて、腫瘍内 fibrocyte を免疫組織学的に検出した。比較対象として、ベバシズマブを含まない化学療法施行後に摘出された検体と、手術のみが施行された検体も同時に検討した。結果、ベバシズマブを含む化学療法後に切除された検体では、他の群と比較して有意に fibrocyte 数および FGF2 産生細胞数が増加していた。さらに興味深いことに、腫瘍内 fibrocyte 数と術前ベバシズマブ投与サイクル数および腫瘍内血管長に正の相関を認めた。これらの結果から、実際のヒト肺がんにおいても腫瘍のベバシズマブ耐性に fibrocyte が深く関わることを確認された。 今後、この fibrocyte が関わる抗 VEGF 治療耐性が他の血管新生阻害剤に対しても起こり得る普遍的な現象か否かについてや、また fibrocyte の腫瘍内集積メカニズムについて検討を進めていく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, Yoshimaru T, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, Katagiri T. Early Growth Response 4 Is Involved in Cell Proliferation of Small Cell Lung Cancer through Transcriptional Activation of Its Downstream Genes. PLoS ONE. 9(11):e113606, 2014. 2) Goto H, Mitsuhashi A, Nishioka Y. Role of surfactant protein A in non-infectious lung diseases. J Med Invest 61(1,2):1-6, 2014. 3) Nishioka Y. New wave of immunotherapy against lung cancer rolls in to clinic. Transl Lung Cancer Res 3(1):1, 2014. 4) Hanibuchi M, Kim SJ, Fidler IJ, Nishioka Y. The molecular biology of lung cancer brain metastasis: an overview of current comprehensions and future perspectives. J Med Invest 61(3,4):241-253, 2014.	

【学会発表】

- 1) Hisatsugu Goto, **Yasuhiko Nishioka**. The role of surfactant protein A in the host defense of the lung. The 117th Conference of KATRD (Invited lecture). Buan, Korea. 2014 年 4 月 11 日.
- 2) Hisatsugu Goto, Atsushi Mitsunashi, Atsuro Saijo, Trung The Van, Yoshinori Aono, Hirohisa Ogawa, Soji Kakiuchi, Masaki Hanibuchi, **Seiji Yano**, Keisuke Izumi, **Yasuhiko Nishioka**. The role of fibrocytes in the resistance to anti-angiogenic therapy in malignant pleural mesothelioma and lung cancer. ATS 2014 International Conference (Mini-symposium). San Diego, CA. 2014 年 5 月 21 日.
- 3) **西岡安彦**. がん分子標的治療の基礎と臨床. 平成 25 年度徳島臨床細胞学会総会および学術集会(特別講演). 徳島. 2014 年 3 月 6 日.
- 4) **西岡安彦**. 肺がん・中皮腫における血管新生阻害薬耐性. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム). 大阪. 2014 年 4 月 26 日.
- 5) 後東久嗣, 三橋惇志, 阿部秀一, 青野純典, **西岡安彦**. 呼吸器疾患における慢性炎症と fibrocyte. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム). 大阪. 2014 年 4 月 27 日.
- 6) **後東久嗣**, 三橋惇志, 西條敦郎, 倉本卓哉, 田畑祥, 埴淵昌毅, 柿内聡司, 青野純典, 上原久典, **西岡安彦**. ベバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞 (fibrocytes) の役割. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会(シンポジウム). 仙台. 2014 年 6 月 27 日.
- 7) **西岡安彦**. がん免疫療法の過去と未来: エビデンスが示した新たな可能性. 第 62 回日本口腔学会 中国・四国地方部会(特別講演). 徳島. 2014 年 10 月 25 日.
- 8) 阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 東満美, 後東久嗣, 埴淵昌毅, **西岡安彦**. 悪性胸膜中皮腫同所移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 大阪. 2014 年 4 月 25 日.
- 9) 柿内聡司, 大塚憲司, 佐藤正大, 西條敦郎, 坂口暁, 後東久嗣, 埴淵昌毅, **西岡安彦**. 当院における間質性肺炎合併肺癌の治療の現状. 第 54 回日本呼吸器学会学術講演会. 大阪. 2014 年 4 月 26 日.
- 10) 大塚憲司, 阿部真治, 埴淵昌毅, 木宿昌俊, 川添和義, 加藤幸成, **西岡安彦**. 胸膜中皮腫同所移植モデルにおける抗ポドプラニン抗体の抗腫瘍効果. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 仙台. 2014 年 6 月 26 日.
- 11) 後東久嗣, 三橋惇志, 倉本卓哉, 田畑祥, 西條敦郎, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 上原久典, **西岡安彦**. 肺癌多臓器転移モデルにおける sphere 形成癌幹細胞様分画の役割. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 金沢. 2014 年 7 月 10 日.
- 12) 山子泰斗, 後東久嗣, 三橋惇志, 倉本卓哉, 田畑祥, 西條敦郎, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 小川博久, 上原久典, **西岡安彦**. ヒト小細胞肺癌骨転移に対する RANKL 標的治療における IGF-1 の関与. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 金沢. 2014 年 7 月 10 日.
- 13) 加藤幸成, **西岡安彦**. 血小板凝集因子 Podoplanin に対するがん特異的抗体の開発. 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会. 金沢. 2014 年 7 月 11 日.
- 14) 大塚憲司, 後東久嗣, 葉久貴司, 兼松貴則, 浦田知之, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 大串文隆, 曾根三郎, **西岡安彦**. 高齢者進行非小細胞肺癌患者を対象として PRO 評価を取り入れた TS-1 療法の臨床第Ⅱ相試験. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 福岡. 2014 年 7 月 18 日.
- 15) 坂口暁, 後東久嗣, 大串文隆, 葉久貴司, 兼松貴則, 浦田知之, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 曾根三郎, **西岡安彦**. 高齢者進行 NSCLC 患者を対象として PRO 評価を取り入れた TS-1 療法の臨床第Ⅱ相試験. 第 52 回日本癌治療学会学術集会. 横浜. 2014 年 8 月 28 日.
- 16) 後東久嗣, 三橋惇志, 西條敦郎, 柿内聡司, 埴淵昌毅, 上原久典, **矢野聖二**, **西岡安彦**. ベバシズマブに対する獲得耐性メカニズムとしての線維細胞 (fibrocytes) の役割. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2014 年 9 月 27 日.
- 17) 加藤幸成, 金子美華, 小笠原諭, **西岡安彦**. がん特異的抗ポドプラニン抗体の樹立. 第 73 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2014 年 9 月 27 日.
- 18) 柿内聡司, 大塚憲司, 佐藤正大, 西條敦郎, 坂口暁, 後東久嗣, 埴淵昌毅, **西岡安彦**. 当院における間質性肺炎合併肺癌の治療の現状. 第 55 回日本肺癌学会学術集会. 京都. 2014 年 11 月 16 日.

【その他特筆事項】

なし

研究区分		一般共同研究
研究課題		新規 ER 制御分子 BIG3 を介した内分泌療法耐性メカニズムの解明と 新規乳癌治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター・教授・片桐豊雅
研究分担者	所属・職名・氏名	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター・助教・吉丸哲郎
	所属・職名・氏名	徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター・特別研究学生・宮川義仁
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	本研究は、アロマターゼ阻害剤やタモキシフェンを含む内分泌療法耐性乳癌細胞における新規エストロゲン受容体(ER)制御分子 BIG3 と ER 活性抑制因子 PHB2 の複合体の生理的意義、特に、非ゲノムの活性化経路である PI3K-AKT とその下流である mTOR シグナル活性化における BIG3 の関与および内分泌療法耐性乳癌における BIG3-PHB2 結合阻害ペプチド (ERAP) の抗腫瘍効果を検討し、内分泌療法耐性乳癌に対する ERAP の新規治療薬の可能性および ER 二量体化を阻害する ER 選択的機能阻害剤フルベストラントと ERAP の併用による抗腫瘍効果について検討する。	
【研究内容・成果】	臨床的に問題となっているエストロゲン (E2) と増殖因子によるシグナルのクロストークが内分泌療法耐性獲得に寄与していることが報告されている。本研究では、E2 と IGF、EGF シグナルのクロストークおよび E2 と Her2 増幅のクロストークによるタモキシフェン耐性を獲得した乳がん細胞における ERAP ペプチドの効果について検討した。その結果、ERAP 投与により、全てのクロストークシグナルの抑制が確認され、それによって細胞増殖の抑制ができることが明らかとなった。また、タモキシフェンとの併用により、相乗的な抑制効果を導くことが分かった (成果論文 2)。一方、ER 選択的機能阻害剤であるフルベストラントとの併用では、相加的、相乗的な効果は認められなかった。これは、BIG3 から放たれた PHB2 の標的である ER がフルベストラントによって分解され留ことに寄るのかもしれない。 このように BIG3-PHB2 相互作用阻害を導くことができる ERAP であるが、実際の臨床応用を考えると、その阻害効果がわずか 4 8 時間で半減することから、より安定的な抗腫瘍効果を導くことが必須である。そこで、これまでに PHB2 と直接結合を認めることが報告されていた天然化合物 Xanthohumol (XN) に着目した。また XN は、乳癌をはじめ多くの癌種において抗腫瘍効果を認めることが報告されていたが、エストロゲン依存性乳癌におけ抗腫瘍効果については不明であった。そこで、XN の ER 陽性乳癌におけるエストロゲン依存性の抗腫瘍効果について検討した。その結果、XN は PHB2 と直接結合することで、BIG3 と PHB2 の相互作用を効率的に阻害して、PHB2 の ER 活性の抑制機能を回復させて、エストロゲン依存性乳癌細胞株の細胞増殖を顕著に抑制した。さらに、ER 陽性乳癌細胞株を同所移植したマウスを用いた <i>in vivo</i> 抗腫瘍効果の検討においても、顕著な抗腫瘍効果を認めた (成果論文 3)。	
【成果等】	【主な論文発表】 (* corresponding author) 1. Nam-Hee Kim N-H, <u>Yoshimaru T</u>, Chen Y, Matsuo T, Komatsu, Miyoshi Y, Tanaka E, Sasa M, Mizuguchi K, <u>Katagiri T*</u>. PLoS One. 2015 in press. 2. <u>Yoshimaru T</u>, Komatsu M, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, <u>Katagiri T*</u>. Therapeutic advances in BIG3-PHB2 inhibition targeting the crosstalk between estrogen and growth factors in breast cancer. Cancer Sci. 2015 in press. 3. <u>Yoshimaru T</u>, Komatsu M, Tashiro E, Imoto M, Osada H, Miyoshi Y, Honda J, Sasa M, <u>Katagiri T*</u>. Xanthohumol suppresses oestrogen-signalling in breast cancer through the specific inhibition of BIG3-PHB2 interactions. Sci Rep. 2014 Dec 8;4:7355. 4. Matsuo T, Dat LT, Komatsu M, <u>Yoshimaru T</u>, Daizumoto K, Sone S, Nishioka Y, <u>Katagiri T*</u>. Early growth response 4 is involved in cell proliferation of small cell lung cancer through transcriptional activation of its downstream genes. PLoS One. 2014 Nov 20;9(11):e113606. 5. Chen YA, Murakami Y, Ahmad S, <u>Yoshimaru T</u>, <u>Katagiri T</u>, Mizuguchi K. Brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) is predicted to interact with its	

	partner through an ARM-type α helical structure. BMC Res Notes. 2014 Jul 6;7:435. 【学会発表】 <u>吉丸 哲郎</u>, 小松 正人, 松尾 泰佑, <u>片桐 豊雅</u> (口頭発表) エストロゲン受容体制御分子 BIG3 を標的とした新規 ER 陽性乳がんの治療法の創製 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2014 年 6 月 <u>吉丸 哲郎</u>, 小松 正人, 三好 康雄, 笹 三徳, <u>片桐 豊雅</u> (口頭発表) エストロゲン受容体制御分子 BIG3 を標的とした新規 ER 陽性乳がん治療法の開発 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 <u>宮川 義仁</u>, 小松 正人, 清谷 一馬, <u>吉丸 哲郎</u>, 笹 三徳, 三好 康雄, <u>片桐 豊雅</u> (ポスター発表) トリプルネガティブ乳癌における癌抑制遺伝子 BCL11 の発現低下について 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 <u>片桐 豊雅</u>, <u>吉丸 哲郎</u>, 小松 正人 (口頭発表) 新規エストロゲンシグナル制御分子 BIG3 による新たながん抑制因子 prohibitin2 の機能喪失機構の解明 第 73 回日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 <u>片桐 豊雅</u>, <u>吉丸 哲郎</u>, 小松 正人 (口頭発表) エストロゲンシグナル制御分子 BIG3 による新たながん抑制因子 prohibitin2 の機能喪失機構の解明 第 87 回日本生化学学会大会 2014 年 10 月 <u>Toyomasa Katagiri</u>. A novel AKAP protein, BIG3 coordinates estrogen signaling pathways in breast cancer cells. 11th International Conference on Protein Phosphatase 2014 年 11 月 【その他特筆事項】 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2014 年 6 月、吉丸 哲郎 優秀演題賞受賞
--	--

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

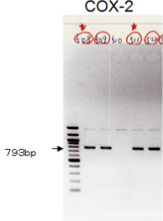
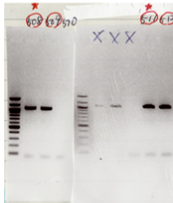
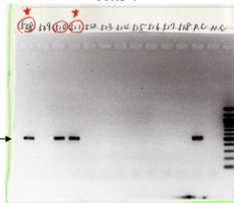
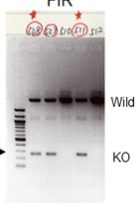
研究区分		一般共同研究
研究課題		IDH 変異を有するがんのモデル動物の作成
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター・分野長・北林一生
研究分担者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター・研究員・小川原陽子
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) をコードする <i>IDH1</i> 遺伝子及び <i>IDH2</i> 遺伝子は、急性骨髄性白血病の他、脳腫瘍・骨髄異形成症候群・胆管がん・軟骨肉腫・骨肉腫・骨巨細胞腫・血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫など様々ながんにおいて高頻度に変異が見られる。野生型 IDH は、イソクエン酸を α ケトグルタル酸 (α-KG) に変換するが、変異型 IDH は、野生型と異なり、α-KG を 2 ハイドロキシグルタル酸 (2HG) に変換する活性を持つことから、変異型 IDH は正常細胞にはないがん特異的な理想的な治療標的である。しかしながら、これまでにがんにおける変異型 IDH の役割を評価する動物モデルがないため、変異型 IDH を標的とした治療薬の開発は困難であった。本研究では変異型 IDH 遺伝子変異を有する急性骨髄性白血病のマウスモデルを作製し、変異型 IDH の標的妥当性を検証を行う。	
【研究内容・成果】	変異型 IDH 依存的な AML 発症モデルマウスの作製を試みた。マウス造血系前駆細胞に IDH2/R140Q, NPMc, DNMT3A/R882H, FLT3-ITD (この組み合わせを以後略して INDF と称する) を感染させてマウスに移植すると、全マウスが AML を発症した。このとき、INDF 4 変異遺伝子のうちどれか一つを欠いた 3 遺伝子の組み合わせでは AML の発症が著しく遅延したことから、INDF 4 変異遺伝子全ての発現が速やかに AML を発症させるためには必要であることが明らかになった。この変異型 IDH2 は依存的な AML モデルマウスを用いて、変異型 IDH2 が AML の維持に必要であるかどうかを調べることが可能となった。 変異型 IDH2 が AML の維持に必要であるかを調べるために、IDH2/R140Q を loxp 配列で挟み込み、tamoxifen により Cre の発現を誘導して IDH2/R140Q をノックアウト出来る系を作製した。この floxed-IDH2/R140Q を NPMc, DNMT3A/R882H, FLT3-ITD と共に NPM+/-造血系前駆細胞に感染させて AML を発症させ、そしてその AML 細胞を用いて 2 次移植を行った。2 次移植したマウスに tamoxifen を投与すると 2HG レベルが減少し、そしてマウスの生存期間が著しく伸びた。tamoxifen 投与をしたマウスの AML 細胞では、まず既知の白血病幹細胞マーカー (L-GMP, MCSFR) を発現する細胞の割合が減少し、その後 AML 細胞の減少が起きていた。このことは、変異型 IDH は白血病幹細胞の生存および維持には必要であるが、分化した細胞における必要性は低いことを示唆している。tamoxifen 処理をした AML 細胞を 3 次移植すると白血病を発症出来なかったことから、白血病幹細胞性が失われていることが示された。すなわち、IDH2/R140Q は、白血病幹細胞の維持に必要であることが明らかになった。	
【成果等】	【主な論文発表】 Ogawara Y, Katsumoto T, Aikawa Y, Shima Y, Kagiya Y, Soga T, Matsunaga H, Seki T, Araki K, Kitabayashi I. IDH2 and NPM1 Mutations Cooperate to Activate Hoxa9/Meis1 and Hypoxia Pathways in Acute Myeloid Leukemia. Cancer Res. 2015 Mar 20. [Epub ahead of print]	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究
研究課題	がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がん病体モデルの作製と解析
研究代表者	所属・職名・氏名 国立がん研究センター研究所・主任研究員・大木理恵子
受入担当教員	職名・氏名 教授・大島正伸
【研究目的】	本研究により、悪性胃がんの良いモデルマウスを作製するとともに、胃がんの悪性化メカニズムを解明し、胃がん患者と死亡者を減らす事につながる新しい胃がん治療薬／診断薬の開発につながる研究成果を得たいと考えている。 大島正伸教授が作製した胃がんモデルマウスである Gan マウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(intestinal adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、悪性度が低く、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究では Gan マウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、ヒト悪性化胃がんを分子機序から再現する新規悪性胃がん病体モデルを作製する。さらに、このマウスで発症したがんを解析する事により、胃がんの悪性化に関わる p53 標的遺伝子群を同定する。このようにして選出されたがん悪性化を抑制する p53 標的遺伝子は、細胞レベル、遺伝子欠損マウスを使った個体レベルでの機能解析を行う。
【研究内容・成果】	これまでに p53 遺伝子欠損 Gan マウスの作製に成功している。 1. 消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)と p53 欠損マウスを掛け合わせる。p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取した。p53 欠損 Gan マウスの胃癌組織では、通常の Gan マウスには見られない浸潤が認められ、p53 欠損が実際にがんの悪性化を引き起こす事が示された。 2. 得られた癌組織より、mRNA を精製した。p53 を野生型で持つ Gan マウスの胃癌では p53 が活性化しており、p53 標的遺伝子が転写誘導されていた。今後、マイクロアレイ発現解析により、p53 依存性に発現する遺伝子群を同定する。 3. 申請者は、ゲノムワイドな p53 結合部位を ChIP-chip 解析により同定している。そこで、p53 依存性に発現する遺伝子の中から、p53 結合が認められる遺伝子、すなわち p53 の直接の標的遺伝子を同定する。 4. 同定した遺伝子が、胃がんの発生及び悪性化とどのように関わるか解析する。 今後、さらに詳細に p53 欠損 Gan マウスで発症した癌を解析することにより、胃癌の悪性化をいかにして p53 が抑制しているか明らかにしたいと考えている。
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Rieko Ohki</u> (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors. PNAS, 111 (23), E2404-E2413, 2014. 2. Toshitsugu Fujita, Miyuki Yuno, Daisuke Okuzaki, <u>Rieko Ohki</u>, and Hodaka Fujii. Identification of non-coding RNAs associated with telomeres by enChIP-RNA-Seq. PLoS One, accepted. 【学会発表】 1. Establishment and analysis of a novel malignant gastric cancer mouse model harboring loss of tumor suppressor gene p53. Junko Ohtsuka, Issei Ezawa, Hideo Namiki, Ryo Abe, Masanobu Oshima, Rieko Ohki 日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日。於:神奈川県横浜市 国内。 2. がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析。大塚 旬子、江澤一星、安部良、大島正伸、大木 理恵子。2015 年 2 月、2015「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 【その他特筆事項】 なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		<i>Gan</i> マウスに対しての外科的組織侵襲が胃腫瘍の形成・悪性化に与える影響の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・助教・後藤修
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	胃癌自然発生モデルマウスを用いた動物実験系において、ヒト胃癌の発生・悪性化の機序を解明することを目的として、Wnt1、COX-2、mPGES-1 を同時に高発現させたトランスジェニックマウス (<i>K19-Wnt1/C2mE</i> マウス: <i>Gan</i> マウス) において、胃壁の切開縫合による組織侵襲が新たな胃癌の形成を誘発するか、また、自然発生した胃癌の悪性度を上昇させるかについての検討を行った。また、処置部にきたした組織学的変化の分子メカニズムを解析した。	
【研究内容・成果】	<u>〈検討 1〉切開・縫合による腫瘍形成の実験</u> 外科的侵襲が、胃腫瘍の悪性化に与える影響を検討するため、8-16 週齢の <i>Gan</i> マウスに対して麻酔下に開腹し、胃体部および扁平上皮-腺上皮移行部(Squamo-columnar junction: SCJ) を 5mm 切開した後、6-0 絹糸にて縫合し閉腹した(胃体部群 6 匹および SCJ 群 5 匹)。また、別の <i>Gan</i> マウス 5 匹に対して開腹した後、切開・縫合をせず閉腹し control 群とした。その後経過観察を行い、腫瘍形成の有無、粘膜下浸潤の有無などを病理学的に評価した。また、処置部の組織を用いて RT-PCR を行い炎症性サイトカインの発現を解析した。 15 週後に犠死させ胃を摘出したところ、胃体部群の 6 匹中 5 匹 (83%) において処置部に新たな腫瘍の形成を認めた。この二次性腫瘍は自然発生した腫瘍と組織学的に極めて類似した構造を呈していた。腫瘍の高さは平均 1.1mm±0.5mm であり、自然発生した SCJ 部の腫瘍と有意差を認めなかった。また、免疫染色において胃癌幹細胞の機能的マーカーの一つである CD44v、細胞増殖を反映する Ki-67、前癌病変としての spasmodic polypeptide expressing metaplasia (SPM) のマーカーである TFF2 が高発現していた。一方、壁細胞マーカーである H⁺/K⁺ ATPase は発現の低下がみられた。上記の変化は自然発生腫瘍にも同様に認められた。さらに、処置部(二次性腫瘍部)においては内因性 COX-2 および TNF-α、mPGES-1、IL-1β の発現が自然発生腫瘍部と同様に上昇していた。 SCJ 群においては自然発生腫瘍の明らかな増大傾向はみられなかった。また腫瘍組織の一部が粘膜下層にも認められたが、病理学的には悪性度の変化がみられなかったことから、この現象は腫瘍の浸潤能の獲得によるものよりも切開・縫合による組織の implantation によるものと考えられた。 <u>〈検討 2〉切開・縫合による腫瘍悪性化の実験</u> 縫合に使用した絹糸による慢性炎症と悪性化との関係を検討するため、20-28 週齢の <i>Gan</i> マウスに対して麻酔下に開腹し、SCJ を 5mm 切開し縫合した後閉腹した(SCJ 群 3 匹)。また、Control として 5 匹に対して切開・縫合をせず閉腹した。 15 週の経過観察後犠死させ胃を摘出した。いずれも SCJ 部に腫瘍が形成されていたが、その大きさは両群で有意差を認めなかった。また、SCJ 群において粘膜下層に腫瘍細胞が散見されたが、いずれも病理学的に明らかに高悪性度とはいえなかったことから、検討 1 における SCJ 群と同様、外科的処置に伴う腫瘍組織の implantation が原因と考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】 他の検討結果を集積した上で英語論文化する予定としている。	
	【学会発表】 他の検討結果を集積した上で国内外の主要な学会にて発表する予定としている。	
	【その他特筆事項】 なし	

研究区分		一般共同研究																																											
研究課題		Gan (Wnt・PGE2 活性化) マウスと c-myc 活性化マウス (FIR+/-) の交配による胃癌悪性化メカニズムとバイオマーカー候補の探索																																											
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学・准教授・松下一之																																											
研究分担者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・助教・佐藤守																																											
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・バイオメディカル研究センター・教授・幡野雅彦																																											
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学・教授・野村文夫																																											
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸																																											
【研究目的】	臨床に役立つスキルス胃癌の早期診断マーカーを同定する。「 <u>Gan マウス</u> 」受精卵（熊本大学動物センターから輸送）を千葉大動物舎で生体にして（幡野雅彦教授）「 <u>FIR[±]マウス</u> 」と交配することにより「Gan マウス」に発生する低悪性度胃癌に浸潤や転移が見られるかを調べる。本研究では FIR [±] と <u>Gan マウス</u> を交配させ（掛け合わせ）、ヒト悪性化胃がんを分子機序から再現する新規悪性胃がん病体モデル（Gan・FIR [±] マウス）を作製する。さらに交配により発症したがんを解析する事により、胃癌の悪性化に関わる標的遺伝子（マイクロアレイ）やタンパク質群（プロテオーム）を同定する。本研究により、悪性胃がんの良いモデルマウスを作製するとともに、胃がんの悪性化メカニズムを解明し、胃がん患者と死亡者を減らす事につながる新しい胃がん治療薬／診断薬の開発につながる研究成果を得たいと考えている。将来的にはスキルス胃癌の早期診断マーカーの実用化につなげたい。																																												
【研究内容・成果】	本年度は本研究の目的である悪性胃がん病体モデル（Gan・FIR[±]マウス）が2匹（オス・メス各1匹）が誕生した。今後はこれらマウスの胃癌の性状（組織型やがん浸潤の程度、癌関連分子の発現など）を詳細に調べる。 マウスタイピングPCRの結果 COX-2  mPGES  Wnt-1  FIR  ♀ C-217(FIR KO Heteroマウス)と♂ GanA-5(K19-wnt1/C2mEトランスジェニックマウス)を交配させて、2/22に5匹の子供が生まれました。 タイピングPCRをした結果、K19-wnt1/C2mEトランスジェニック/ FIR KO Heteroマウスが2匹生まれました。 <table><tr><td></td><td></td><td>COX-2</td><td>mPGES-1</td><td>Wnt1</td><td>FIR KO</td><td></td></tr><tr><td>Gan B-508</td><td>♀</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>Hetero</td><td>K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero</td></tr><tr><td>Gan B-509</td><td>♀</td><td>○</td><td>○</td><td></td><td>Hetero</td><td>K19-C2mE/FIR KO Hetero</td></tr><tr><td>Gan B-510</td><td>♂</td><td></td><td></td><td>○</td><td>Wild</td><td>K19-Wnt1</td></tr><tr><td>Gan B-511</td><td>♂</td><td>○</td><td>○</td><td>○</td><td>Hetero</td><td>K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero</td></tr><tr><td>Gan B-512</td><td>♂</td><td>○</td><td>○</td><td></td><td>Wild</td><td>K19-C2mE</td></tr></table>					COX-2	mPGES-1	Wnt1	FIR KO		Gan B-508	♀	○	○	○	Hetero	K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero	Gan B-509	♀	○	○		Hetero	K19-C2mE/FIR KO Hetero	Gan B-510	♂			○	Wild	K19-Wnt1	Gan B-511	♂	○	○	○	Hetero	K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero	Gan B-512	♂	○	○		Wild	K19-C2mE
		COX-2	mPGES-1	Wnt1	FIR KO																																								
Gan B-508	♀	○	○	○	Hetero	K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero																																							
Gan B-509	♀	○	○		Hetero	K19-C2mE/FIR KO Hetero																																							
Gan B-510	♂			○	Wild	K19-Wnt1																																							
Gan B-511	♂	○	○	○	Hetero	K19-Wnt1/C2mE/FIR KO Hetero																																							
Gan B-512	♂	○	○		Wild	K19-C2mE																																							
【成果等】	【主な論文発表】 - Kazami T, Nie H, Satoh M, Kuga T, <u>Matsushita K</u>, Kawasaki N, Tomonaga T and Nomura F. Nuclear accumulation of annexin A2 is involved in chromosomal instability by coilin-mediated centromere damage. Oncogene, 2014; 27 October, - Rahmutulla B, <u>Matsushita K (corresponding author)</u>, Nomura F. Alternative splicing of DNA damage response genes and gastrointestinal cancers. Review. World J of Gastroenterology. 2014;20:17305-13. - Tanaka N, Araki K, Mizokami D, Miyagawa Y, Yamashita T, Tomifuji M, Ueda Y, Inoue M, Hasegawa M, <u>Matsushita K</u>, Nomura F, Shimada H, Shiotani A. Sendai virus-mediated c-myc suppressor far-upstream element binding protein interacting repressor gene transfer suppresses head and neck squamous cell carcinoma. Gene																																												

	Therapy. 2015;22:297-304. 4. Mizokami D, Araki K, Tanaka N, Suzuki H, Tomifuji M, Yamashita T, Ueda Y, Shimada H, <u>Matsushita K</u>, Shiotani A. Gene therapy of c-myc suppressor FUSE-binding protein-interacting repressor by Sendai virus delivery prevents tracheal stenosis. Plos One. 2015;10:e0116279. 5. <u>Matsushita K</u>, Kitamura K, Rahmutulla B, Tanaka N, Ishige T, Satoh M, Hoshino T, Miyagi S, Mori T, Itoga S, Shimada H, Tomonaga T, Kito M, Nakajima-Takagi Y, Kubo S, Nakaseko C, Hatano M, Miki T, Matsuo M, Fukuyo M, Kaneda A, Iwama A and Nomura F. Haploinsufficiency of the c-myc transcriptional repressor FIR, as a dominant negative-alternative splicing model, promoted p53- dependent T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by activating Notch1. Oncotarget. 2015;6:5102-17 【学会発表】 1. 松下一之、佐藤 守、朝長 毅、野村 文夫。 Interactions between SF3b1(SAP155) and FUSE-binding protein-interacting repressor (FIR) coordinates c-Myc and P27Kip1 expression revealed by GeLC-MS analysis. 第12回JHUP0 2014. (つくば市)。 2014.7.17-18. 【その他特筆事項】 なし
--	---

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ニトロソアミン高感受性の CYP2A 遺伝子ノックイン胃発がんマウスの作製
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 研究所・施設長・今井俊夫
研究分担者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 研究所・ユニット長・戸塚ゆ加里
	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 研究所・ユニット長・平岡伸介
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	我が国のがんの死亡のうち、男性で 40%、女性で 5%は喫煙が原因と考えられているがニトロソアミン類等化学物質が主発がん要因であり、代謝酵素の CYP2A6 の高活性が肺がん、大腸がん及び膀胱がんのリスクと関連することが示されている。ニトロソアミン類に対する種間の発がん感受性差の原因の詳細は不明であるが、肝マイクロゾームの CYP2A5/2A6 によるクマリン 7-水酸化酵素活性は、マウス、ラットに比しハムスターでは 3 倍以上、ヒトでは更に 10 倍近く高活性であることが知られておる。本研究ではニトロソアミン感受性マウス胃がんモデルの作製と関連する基礎データの蓄積を目的とし実施した。	
【研究内容・成果】	コンディショナルにヒト CYP2A6 を過剰発現させニトロソアミンに高感受性を示すノックインマウスを作製し喫煙関連がんの動物モデルを確立することを計画し、現在当該キメラマウスから F1 が得られた段階である（国立がん研究センター開発研究費にて実施中）。本共同研究では、マウスにおける CYP2A6 の内因性オルソログである CYP2A5 を CRISPR-Cas9 システムを用いてノックアウトし、ニトロソアミンに対する感受性を野生型マウスと比較するための検討を開始した。具体的には、C57BL 系統の ES 細胞（DS フェーマ製）に guide RNA（crRNA:tracrRNA）と Cas9 タンパク質を 1 つのベクターで発現するシステム（SBI 製）を Fu GENE HD Transfection Reagent を用いて導入した。ノックアウトの標的とした部位は CYP2A5 遺伝子の Exon1 あるいは Exon2 の PAM 配列近傍とした。ES 細胞に対する遺伝子ノックアウト処置と並行し、ICR 雌マウスを用いて PMSG と hCG（あすか製薬製）にて過排卵処置した後自然交配し、2 日後に卵管還流により 2 細胞期胚を採集し培養液中にて 8 細胞期胚にした後 CYP2A5 遺伝子をノックアウトした ES 細胞と共培養することによりキメラマウスの作製を試みた。その結果、無処置対象としてベクターを導入しなかった ES 細胞と ICR マウス胚との共培養ではキメラマウスが得られたが（写真）、ベクター導入した ES 細胞を用いた共培養では 4 例の仮親に移植した胚からは死産などによりキメラマウスが得られなかった。現在も検討を継続しているが、原因は明らかにできていない。	
【成果等】	【主な論文発表】 Kitahashi, T., Takahashi, M., Imai, T.: Biphasic alterations in expression and subcellular localization of MUC1 in pancreatic ductal carcinogenesis in Syrian hamsters. <i>Pancreas</i> 44, 76-86 (2015)	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	



研究区分		一般共同研究
研究課題		2 光子顕微鏡を用いた胃癌におけるマクロファージの可視化
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学 病理学 I・教授・清川悦子
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学 病理学 I・助教・吉崎尚良
	所属・職名・氏名	金沢医科大学 病理学 I・助教・武田はるな
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	胃癌モデルマウスである Gan マウスにおける炎症細胞の動態の試験管内・生体内観察を目的とする。Gan マウスでは、マクロファージは自ら産生する TNF-αによって活性化され、胃癌形成促進に重要であることが報告された (Oshima, Oncogene, 2013)。この活性化されたマクロファージがどのようにして胃上皮細胞の増殖を促すのかはまだわかっていない。胃組織における動態や上皮構造、コラーゲンなどの間質の構造に与える影響をマクロファージの動態を酵素の活性化と併せて仔細に観察することで、マクロファージの役割について考察する。	
【研究内容・成果】	生体マウスの胃上皮細胞を観察するために、2 光子顕微鏡を用いた胃のイメージング法の確立を試みた。蛍光たんぱく質を全身に発現するマウスを用い、生体マウスの胃腺管を漿膜側より観察することに成功したが、胃では腸に比べて固有筋層が厚く漿膜側からのアプローチでは、増殖する細胞があると考えられている峽部を安定して観察することが困難であった。Gan マウスでは固有筋層が肥厚する例もあり、また内腔にポリープを形成するタイプの腸型の癌では、観察が難しいことも予想された。胃内腔を露出させ、対物レンズを固定する手法も試みたが、侵襲性が強くマウスを生きたまま維持することが出来なかった。基底膜近くの上皮細胞のタイムラプス撮影も試みたが、胃は拍動の影響を受けやすく非常に困難であった。そこで、比較的観察が容易な腸において癌を発症するマウスを用いた観察に切り替えた。このモデルマウスは TGF-β II 型受容体を腸上皮で欠損しており、Dextran Sodium Sulfate (DSS) 投与で慢性炎症を伴う癌を消化管に形成する。形成される癌は漿膜側に浸潤するタイプであるので、漿膜側からの観察に適していると考えられる。このマウスに、GFP トランスジェニックマウスから単離した骨髓細胞群を移植し、腫瘍組織における骨髓細胞を可視化し観察した。まず、腫瘍上皮の浸潤の初期段階を観察するために、DSS 投与後 2 週間で観察したが、腫瘍形成部位の特定が困難であったので、腫瘍形成が進んだ時期に観察することとした。DSS 投与後 10 週間では、腫瘍が目視で確認できるほど大きくなっており、その漿膜側に対物レンズを当てて 1 時間のタイムラプスを行うことができた。その結果、腫瘍組織中の骨髓由来細胞が活発に動いているのが観察された。動いている骨髓由来細胞は、腫瘍上皮の近傍や、腫瘍腺管内腔に蓄積した粘液内に多く観察された。慢性炎症を伴う消化管の腫瘍組織内で、骨髓細胞の動態を撮影した例はまだなく、この結果は新しい知見である。今後は、この動いている細胞種の同定のため、特にマクロファージのみを蛍光標識することを試み、腫瘍内での動きを観察することで腫瘍形成促進にどのように寄与しているかその機構を探る予定である。 EGFPラベルされた骨髓由来細胞が腫瘍組織中を動く様子を二光子励起顕微鏡で撮影した。(a),(b)においてそれぞれ四角で囲んだ細胞の拡大写真が (a'),(b')である。 Epi:腫瘍上皮と考えられる部分。Bar: 40 μm。表示時間: mm:ss	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	【学会発表】 Haruna Takeda, Hisayoshi Yoshizaki, Hiroko Oshima, Masanobu Oshima and Etsuko Kiyokawa In vivo imaging using a two-photon microscope in the mouse intestine 日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2015 年 1 月 21-22 日 金沢 県立音楽堂交流ホール 金沢
	【その他特筆事項】 なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・教授・清水浩
研究分担者	所属・職名・氏名	大阪大学・准教授・松田史生
	所属・職名・氏名	大阪大学・博士後期課程学生・岡橋伸幸
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	診断・治療技術が格段に進歩した今日においてもがん死が減少しないのは、がんの再発・転移や薬剤抵抗性の制御が十分に実現されていないためである。最近、このようながん悪性形質の獲得機序とがん細胞が獲得し得る「未分化性」、すなわち、がん幹細胞の関連が注目されている。本研究では、培養細胞に適用可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法を開発し、がん細胞において、解糖系、TCA 回路、ペントースリン酸(PPP)経路、グルタミン経路などの中心炭素代謝の動態を明らかにし、がん細胞の代謝経路の流れが様々なコンテキストにおいてどのように変化するかを解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】	平成 26 年度は、従来、微生物培養の代謝フラックス解析に適用されてきた手法を培養細胞に展開するために解析系のフィッティングを行った。 マウスの解糖経路、ペントースリン酸経路、TCA サイクル、グルタミン代謝経路を含む炭素中心代謝において、化学反応の原子マッピングや量論に関する情報を収集し、^{13}C 標識濃度から代謝フラックスを定量的に解析することを可能とする代謝モデルを構築した。また、^{13}C 標識グルコースやグルタミンを細胞に取り込ませた後、細胞代謝をクエンチして代謝物質を抽出する方法、各代謝物質の濃度プロファイルおよび、^{13}C 標識濃度を GC-MS、LC-MS/MS で測定する方法などを細胞培養に適用するための検討を行った。培地中からのグルコース、グルタミンをはじめとするアミノ酸の取り込みおよび排出、乳酸の排出などを観測する方法も確立した。モデル構築と代謝解析には我々が独自に開発したソフトウェア OpenMebius を用いた。 高橋らが作成した <i>p53</i> ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株細胞の代謝フラックスを解析するために上記の方法の適用可能性を検証し、解析可能であることが確認された。 ^{13}C 標識グルコースや ^{13}C 標識グルタミンを用いた培養結果から、炭素中心代謝のフラックスを解析し、代謝物中の ^{13}C 標識濃度および OpenMebius によるシミュレーション結果より、取り込まれたグルコースの大部分が乳酸へ流れていることが明らかとなり、また、グルタミンの還元的代謝の存在が強く示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 S. Kajihata, C. Furusawa, F. Matsuda, H. Shimizu, OpenMebius: An open source software for isotopically nonstationary ^{13}C-based metabolic flux analysis, <i>BioMed Research International</i>, Article Number 627014 (2014)	
	【学会発表】 松田史生、岡橋伸幸、梶嶋秀一、清水 浩、^{13}C 代謝フラックス解析ソフトウェア OpenMebius の開発、第 2 回がん代謝研究会、東京理科大学（東京）、7 月 10 日-11 日 (2014) (ポスター賞銅賞受賞) 他、国内学会 4 件、国際学会 1 件の発表を行った。	
	【その他特筆事項】 なし	

研究区分		一般共同研究
研究課題		Rb1 の関与する発ガンにおける p107 と IRSp53 の役割
研究代表者	所属・職名・氏名	奈良先端科学技術大学院大学・教授・末次志郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	がん細胞は、多くの場合親株となる細胞とは異なり形態を呈することで認識される。がん細胞は悪性化すると高増殖能と浸潤能を獲得し、その際にがん細胞は、多数の突起構造を獲得する場合が多いと考えられる。細胞突起を形成する I-BAR ドメイン含有タンパク質である IRSp53 はがん細胞、その中でも特に網膜繊維芽種 (retinoblastoma) において高発現することが認められるがその意義は明らかではない。I-BAR ドメインは、脂質膜に結合する以外に病原性細菌の持つタンパク質の NPY モチーフと結合する。NPY モチーフを持つタンパク質は、がん抑制遺伝子 (Rb1) のファミリーメンバーである p107 が含まれる。従って、IRSp53 は Rb ファミリータンパク質と結合することで細胞周期の調節を行っている可能性も考えられる。本研究では、IRSp53 のがん細胞における突起形成における役割を検討する。	
【研究内容・成果】	IRSp53 のノックアウトマウスと、高頻度のがん発症により短命化するがん抑制遺伝子 p53 および Rb1 のノックアウトマウスを掛け合わせる事により、IRSp53 の減少により、がん抑制遺伝子欠損によるがん発症のための短命化がどのようになるのか、生存曲線解析を行った。IRSp53 のヘテロ接合型ノックアウトマウス (+/-) は、野生型マウスの半分の IRSp53 タンパク質をもつ。IRSp53 遺伝子の欠損による IRSp53 タンパク質の減少により、p53 ホモ接合型 (-/-) ノックアウトマウスの平均寿命が延びる事がわかった。しかし、形成されるがんの種類に顕著な違いは見られなかった。Rb1 ヘテロ接合型 (+/-) に比べて IRSp53 と Rb1 の両方の遺伝子をヘテロ接合型 (+/-) に持つマウスは平均寿命が延びることがわかった。また驚くべき事に、Rb1 (+/-) マウスの多くが脳腫瘍を発症するが、IRSp53 (+/-); Rb1 (+/-) マウスの脳組織ではがん細胞は認められず、すべて正常であった。従って IRSp53 の減少は Rb1 欠損により引き起こされる脳腫瘍を抑える事が示唆された。現在このような違いが、どのような原因によっているのか、培養細胞を用いて増殖と浸潤の解析を行うとともに、がん組織などでの血管新生の状態を調べる予定である。また、p107 についても引き続き検討する予定である。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 がん化における IRSp53 の役割 塙京子¹、橋田光¹、松原大祐²、北嶋俊輔³、高橋智聡³、末次志郎¹ ¹奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科、²東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野、³金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野 日本癌学会シンポジウム / 共同利用・共同研究拠点シンポジウム がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦 平成 27 年 1 月 21 日～22 日 石川県立音楽堂交流ホール	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		Rb ファミリー遺伝子を欠損した神経細胞におけるがん特異的代謝異常経路の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・准教授・味岡逸樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	癌抑制遺伝子 Rb とそのファミリー遺伝子 (p107, p130) は細胞周期制御の中心的な役割を担い、細胞増殖のブレーキとして機能する。Rb ファミリーを急性的に欠損させた細胞は細胞周期を進めるが、その後、細胞分裂する場合と細胞死を起こす場合があり、その運命は「文脈特異的」(context-specific) である。最近我々は、神経前駆細胞で Rb ファミリーを欠損させるとニューロンが増殖し、一度分化を開始したニューロンで Rb ファミリーを欠損させると細胞死を起こすことを見いだした。本研究では、「文脈特異性」とがん特異的代謝異常経路の関連を明らかにすることを最終的なゴールとして設定し、「文脈特異性」と N-Ras 活性化との関連を明らかにすることを主な目的とした。	
【研究内容・成果】	高橋教授より恒常的活性化型 N-Ras (N-RasV12) の cDNA を入手し、ニューロン特異的に N-Ras を活性化するためのプラスミドを作製した。具体的には、CAG プロモーターと開始コドンの後に loxP-stop-loxP 配列を持つプラスミド pCALNL を材料とし、その下流に N-RasV12 cDNA を挿入して、pCALNL-NRasV12 を作製した。続いて、作製したプラスミドを用いて、ニューロン特異的に N-Ras を活性化するシステムが作動するかどうか検討するために、マウス胎生 14 日目の大脳組織に、ニューロン特異的に Cre を発現するプラスミド pMAP2-Cre と pCALNL-NRasV12 をエレクトロポレーション法で遺伝子導入し、4 日間組織培養して免疫組織染色を行った。なお、N-RasV12 には HA タグをコードする cDNA が挿入されており、N-RasV12 の発現を HA 抗体にて検討した。その解析の結果、神経前駆細胞では N-RasV12 の発現が認められず、ニューロンでのみ発現が認められたことから、期待通り、ニューロン特異的に N-Ras が活性化することが示唆された。さらに、N-Ras の役割を検討するために細胞周期解析を行った結果、N-RasV12 発現ニューロンは S 期へと進行していることが明らかとなった。また、S 期へと細胞周期を進めたニューロンは分裂せず、細胞死を起こすことも明らかとなった。一度分化を開始したニューロンは、細胞周期から離脱して G0 期にいと考えられており、上記の結果から、N-Ras の活性化によって、ニューロンの細胞周期を停止するためのブレーキが解除されるという新しい知見が示唆された。今後は、Rb ファミリー欠損マウスや、p53-Rb ファミリー欠損マウス等を用いて、ニューロンにおける N-Ras 活性化の役割とその活性化機構について検討する予定である	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん抑制遺伝子と概日リズムの関連に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・特定助教・三木貴雄
研究分担者	所属・職名・氏名	京都大学・教授・野田亮
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	概日リズムは、日々の睡眠サイクルや代謝等、生体の一日約 24 時間のリズムを制御している生物の基本的な機構である。長期的なリズムの欠失は、がんや糖尿病等の疾患と関連することが疫学研究において報告されている。一方、がん患者では、睡眠リズム障害が見られることや、糖尿病患者では、インスリン代謝リズム障害等が見られ、がんの罹患率も高いことが報告されている。上記の知見は、がん概日リズムには、緊密な関連性があることを示唆しているが、詳細な機構は不明である。そこで我々は、がん概日リズムの関連を、がん抑制遺伝子による概日リズムの分子レベルでの制御という視点から解明しようと試みている。	
【研究内容・成果】	pRb の概日リズムにおける役割を in vivo で検討するために、成体マウスの脳視交叉上核において、pRb を欠損するマウスの作製を試みた。pRb 欠損マウスは胎生致死のため、視交叉上核において、多く存在すると報告されている GABA 作動性神経において特異的に pRb を欠損する Vgat-Cre;Rbflx/flox マウスを作製した。しかし、このマウスは生後まもなく死亡してしまい、概日リズムの解析には不向きであった。そこで次に、タモキシフェン依存的 ubiquitin C-Cre プロモーターによる成体での pRb 欠損マウスの作製を行い、解析を行った。しかしながら、タモキシフェン投与依存的な Cre の活性化は、視交叉上核では軽微なものに留まり、pRb を完全に欠損することは出来なかった。そのため現在は Albumin-Cre ; Rbflx/flox マウスを用いて、肝臓特異的に pRb を欠損させ、pRb による概日リズム遺伝子への影響を検討するため、マウスの交配に取り掛かっている。 また、pRb による概日リズム制御機構の解析のため、培養細胞（野生型マウス胎児線維芽細胞）を用いて pRb を発現させ、Per2 プロモーターへの影響を検討した。その結果、pRb の存在下で約 20 % の Per2 プロモーター活性の上昇が見られたため、そのメカニズムの解析を試みた。pRb の主要なパートナーである E2F や、PML は、pRb の細胞周期制御の機能に非常に重要である。そのためこれらの蛋白質を培養細胞に発現させ、Per2 プロモーター活性を測定した。しかし、Per2 プロモーター活性に関して、pRb との関連を示唆するデータは得られなかった。 実験が当初の計画どおりに進まなかったため、代替案として pRb を発現させた時の他の概日リズム遺伝子の発現量を qPCR 法により定量した結果、転写抑制因子の発現が減少していることにより、Per2 プロモーター活性が上昇しているのではないかという知見が得られた。今後はこの得られた知見を、そのプロモーター解析等と組合せ、詳細に解明していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 三木貴雄 「がん抑制遺伝子 p53、PML と概日リズムの関連」日本解剖学会、日本生理学会合同大会（招待講演）2015 年 3 月 21-23 日 神戸国際会議場	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ヒトがん細胞を用いた Akt/MMP-9 阻害性抗転移剤の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者	所属・職名・氏名	徳島大学・D1・多田竜
	所属・職名・氏名	徳島大学・M2・芝一休
	所属・職名・氏名	徳島大学・M2・玉谷大
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤博, 准教授・遠藤良夫
【研究目的】	がんはがん細胞だけでなく、血管や結合組織、免疫担当細胞といったがん周囲組織との相互作用の上で成り立っており、治療戦略としてがんの縮小ではなく再発期間の延長という観点から、がん転移を抑制できる血管新生阻害剤は最適な制癌剤であると思われる。平成 23-25 年度の共同研究において、低酸素サイトキシン誘導体 TX-2137 は、Akt および MMP-9 産生の抑制を介して抗転移活性を示すことを明らかにした。また、TX-2137 をリード分子として新たに分子設計・合成した TX-2282 が TX-2137 よりも強い抗転移活性を有することを示した。そこで、平成 26 年度は、TX-2137 および TX-2282 をリードとして中性子捕捉による抗腫瘍・抗転移活性の増強を目的とした抗転移剤の開発を試みる。	
【研究内容・成果】	これまでに TX-2137 のフェノール基をフェニルボロン酸に置換した化合物 1 を分子設計・合成し in vitro 抗腫瘍活性、MMP-9 阻害活性および発育鶏卵を用いた in vivo 抗転移活性を評価したが有意な結果は得られなかった。今年度は、TX-2137 および化合物 1 の in vitro 低酸素細胞毒性を MCF-7 細胞および MDA-MB-231 細胞を用いて評価した結果、TX-2137 は低酸素条件下で常酸素条件よりも数倍高い抗腫瘍活性を示したが化合物 1 はほとんど抗腫瘍活性を示さなかった。この結果より、化合物 1 はボロン酸基の高い水溶性により細胞内取込が低下したことで薬理活性が失われたと推察した。そこで、TX-2137 および化合物 1 を用いて MCF-7 細胞に対する細胞内取り込みを評価したところ、TX-2137 は細胞内に取り込まれていたのに対し、化合物 1 は検出限界以下であった。よって、化合物 1 の疎水性を向上させる必要性が示されたため、化合物 1 の疎水性向上を目的としてフェニルボロン酸のヒドロキシル基をフッ素化もしくは MIDA 保護した化合物を新たに分子設計した。さらに in vivo 試験に必要な水溶性を保持するために TX-2137 のベンゾトリアジン骨格にフェノール基を付加した化合物を分子設計した。その結果として、フッ素化体はかなり不安定であり合成に失敗したため、現在は MIDA 保護体を合成中である。また、チラパザミンにフェノール基を付加した 3-chloro-1,2,4-benzotriazine-7-ol-1-oxide の合成時に、クロロ化反応で骨格のフェノール基もクロロ基に置換されたため、フェノール基を TBDMS 保護した誘導体の合成を試みており、現在のところ 3-Chloro-1,2,4-benzotriazine-7-ol-1-oxide TBDMS 保護体まで完了している。 今後は、3-amino-1,2,4-benzotriazine-7-ol-1-oxide TBDMS 保護体を用いて TX-2137 誘導体および TX-2137 ボロン含有誘導体の合成及び MIDA 保護体の合成を完了させ、in vitro 抗腫瘍活性、MMP-9 阻害活性、発育鶏卵を用いた in vivo 抗転移活性および中性子併用による抗腫瘍活性を評価する予定である。 また、新規 Akt 阻害剤をリードとした低酸素指向性抗転移剤の創製も行う予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 ・Uto Y, Tamatani D, Mizuki Y, Endo Y, Nakanishi I, Ohkubo K, Fukuzumi S, Ishizuka M, Tanaka T, Kuchiike D, Kubo K, Inui T, Hori H. Evaluation of the sonosensitizing activities of 5-aminolevulinic acid and Sn(IV) chlorin e6 in tumor-bearing chick embryos. Anticancer Res., 34(8), 4583-7, 2014.	
	【学会発表】 ・芝 一休, 遠藤良夫, 佐藤 博, 宇都義浩 : Development of antimetastatic hypoxic cytotoxin TX-2282 targeting for Akt/protein kinase B based on TX-2137, 第 73 回日本癌学会学術総会, 横浜市, 2014 年 9 月 25-27 日.	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分	一般共同研究
研究課題	がん組織における MT1-MMP の新規機能の解析
研究代表者	所属・職名・氏名 東京大学医科学研究所・助教・坂本毅治
受入担当教員	職名・氏名 教授・佐藤博
【研究目的】	我々はこれまでに膜型プロテアーゼである MT1-MMP の新規機能として、プロテアーゼ活性に依存しない MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化機構の解析を行ってきたが、これらのメカニズムが生体、特にがん組織においてどのように機能しているかは不明である。また、その制御機構も不明な点が多い。そこで本研究では、マウスを用いた <i>in vivo</i> の表現型解析や細胞機能・生化学的解析により、がん組織における MT1-MMP の新規機能の役割と制御機構の解明を目指す。
【研究内容・成果】	1. MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化機構の解明 MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 の活性化には mTOR シグナルが重要な役割を果たしていることを報告しているが(Sakamoto et al., MCB, 2014)、他にどのような分子、シグナルにより制御されるかについては不明である。H26 年度の共同研究において、酵母ツーハイブリッド法を用いて Mint3 結合分子を探索した結果、分子 X を同定した。この分子 X は MT1-MMP/Mint3 依存的にヒト線維肉腫細胞株 HT1080 細胞の HIF-1 標的遺伝子の発現および通常酸素下での解糖系を亢進させていることが明らかとなった。また、分子 X のノックダウンにより、Mint3 と FIH-1 との結合が減弱する一方、MT1-MMP による MMP-2 活性化には影響を与えないことが明らかとなった。 2. がん間質細胞における MT1-MMP/Mint3 の役割の解明 H26 年度では、線維芽細胞における MT1-MMP/Mint3 の役割の解析に着手した。がん細胞とマウス胎児線維芽細胞(MEF)との共移植において、Mint3 欠損 MEF は野生型 MEF に比べ腫瘍増殖促進活性が低下していることが明らかとなった。また、<i>in vitro</i> の共培養実験においても Mint3 欠損 MEF は癌細胞の増殖促進能が低下していることが明らかとなった。 3. 発がんモデルマウスを用いた MT1-MMP/Mint3 の役割の解明 MT1-MMP 欠損マウスは生後 14 日ほどで死亡するため、Mint3 欠損マウスを用いて MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化機構の発がんモデルでの役割の解析に着手した。H26 年度では、膀胱癌モデルマウス、乳癌モデルマウスと Mint3 欠損マウスとの掛け合わせを行った。
【成果等】	【主な論文発表】 なし
	【学会発表】 なし
	【その他特筆事項】 なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		標的 MMPs に対する高特異性阻害剤の分子設計とがん悪性進展抑制法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	横浜市立大学・准教授・東昌市
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤博
【研究目的】	悪性がんの組織内で高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、がん細胞の浸潤性増殖および転移を支えることから、がん治療の有望な標的分子である。しかし、従来型 MMP 阻害剤は特異性が低く、臨床試験の過程で様々な副作用を示したため、それらを抗がん剤として開発することに成功していない。そこで本共同研究では、個々の MMP の酵素活性あるいはそれらの一機能を特異的に阻害するインヒビターを創出することにより、副作用の極めて少ないがん治療薬の開発へ繋げることを目的とした。	
【研究内容・成果】	昨年度に引き続き、β-アミロイド前駆体タンパク質 (APP) に由来する 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) が高い MMP-2 選択性を持つこと、および MMP-2 選択性に関与する APP-IP のアミノ酸残基がこれまでの研究で明らかになっていることを利用して、APP-IP を改変し、他の MMPs 対して選択性を持つペプチドインヒビターを開発することを試みた。 APP-IP の改変方法としては、選択性に関与するアミノ酸残基を一つずつ 20 種のアミノ酸を網羅するようにランダム変異を導入し、標的 MMP との特異性獲得を指標に選別を行った。選別方法は、APP-IP 改変体を GST 融合タンパク質として菌体内に発現させ、各クローンの溶解物について標的 MMP および MMP-2 をリガンドとしたリガンドブロッキング法により親和性を調べる方法を用いた。その結果、MMP-9 と MMP-7 のそれぞれに対する親和性が高まり、反対に MMP-2 との親和性が顕著に低下する APP-IP 改変体を得られた。一方、MT1-MMP は各種 APP-IP 改変体に対する親和性スペクトラムが MMP-2 のそれと類似しており、選択性を顕著に高めることは困難であったが、MMP-2 に対する親和性より MT1-MMP に対する親和性が高い APP-IP 改変体を得られた。また、MMP-9 に対する阻害選択性を高めたペプチドはこれをいくつかの MMP-9 結合性タンパク質と組み合わせることにより、その阻害活性と MMP-9 選択性を飛躍的に高めることに成功した。 一方、私達は、がん細胞表層のコレステロール硫酸に MMP-7 が結合すると、近傍にある膜タンパク質を切断し、がん細胞の細胞凝集を誘導するとともに、それらの転移能を顕著に上昇させることを見出してきたが、MMP-7 によって切断される膜タンパク質は未同定であった。今回、がん細胞の表層タンパク質をビオチン標識した後、MMP-7 処理を行い、培養液中に切り出されてくるビオチン標識タンパク質断片をトリプシン消化→質量分析を行うことにより同定したところ、I 型膜タンパク質である HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) が MMP-7 に切断されることを明らかにした。また、切り出された HAI-1 細胞外領域に細胞凝集誘導活性があることを明らかにし、本タンパク質の切断ががん細胞の転移能上昇に関与することが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Takashi Ogawa, <u>Shouichi Higashi</u>, and Kaoru Miyazaki (2014) Amino-terminal fragments of laminin γ2 chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. <i>Cancer Sci.</i> 105, 168-175 2. Go Kamoshida, Takashi Ogawa, Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Eriko Komiya, <u>Shouichi Higashi</u>, Kaoru Miyazaki, and Tsutomu Tsuji (2014) Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). <i>Clin. Exp. Metastasis</i> 31, 285-291 3. Eriko Komiya, Hiroki Sato, Naoko Watanabe, Marii Ise, <u>Shouichi Higashi</u>, Yohei Miyagi, and Kaoru Miyazaki (2014) Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin αvβ3. <i>Cancer Med.</i> 3, 537-549	

	4. Jun Oyanagi, Nako Kojima, Hiroki Sato, <u>Shouichi Higashi</u>, Keiji Kikuchi, Katsuya Sakai, Kunio Matsumoto, and Kaoru Miyazaki (2014) Inhibition of transforming growth factor-β signaling potentiates tumor cell invasion into collagen matrix induced by fibroblast-derived hepatocyte growth factor. <i>Exp. Cell Res.</i> 326, 267-279 5. Kazuhiro Yamamoto, Kaoru Miyazaki, and <u>Shouichi Higashi</u> (2014) Pericellular proteolysis by matrix metalloproteinase-7 is differentially modulated by cholesterol sulfate, sulfatide, and cardiolipin. <i>FEBS J.</i> 281, 3346-3356
	【学会発表】 1. 佐野 未奈、<u>東 昌市</u>：がん細胞浸潤および血管内皮細胞増殖に及ぼす高特異性MMP-2 インヒビターの効果。第36回日本血栓止血学会（大阪）、演題番号0-112, P-032、2014年5月29-31日 2. 佐藤 拓輝、<u>東 昌市</u>：がん浸潤マーカー・ラミニンγ2 鎖の血管内皮下浸潤活性とその機構。第36回日本血栓止血学会（大阪）、演題番号0-113, P-033、2014年5月29-31日 3. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、<u>東 昌市</u>：MMP-7により切断修飾を受ける細胞表層タンパク質の同定。第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号9、2014年8月8-9日 4. 佐野 未奈、<u>東 昌市</u>：高特異性MMP-2インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果と血管新生に及ぼす効果。第87回日本生化学会大会（京都）、2P-396、2014年10月15-18日 5. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、<u>東 昌市</u>：がん細胞表層に結合したMMP-7によって切断され、細胞凝集を惹起するタンパク質の同定。第87回日本生化学会大会（京都）、2T15a-12、2P-399、2014年10月15-18日 6. 得津奏子、菅原経継、井野洋子、倉田洋一、木村弥生、<u>東 昌市</u>、平野 久：ヒト 26S プロテアソームサブユニットのリン酸化修飾状態の解析。第65回日本電気泳動学会総会・シンポジウム（横浜）、P-8、2014年10月24-25日
	【その他特筆事項】 研究室学生の実績があり、それぞれ、横浜市立大学 HP で紹介して頂きました。 1. 佐野 未奈、第 36 回日本血栓止血学会 優秀ポスター発表賞 http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/140623.html 2. 石川 智弘、第 19 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 Young Investigators Award http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/140828.html 3. 石川 智弘、第 87 回日本生化学会大会 若手優秀発表賞 http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/141215.html 4. 得津奏子、第 65 回日本電気泳動学会総会・シンポジウム 優秀ポスター賞 http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/141212.html

研究区分	一般研究	
研究課題	ヒト型抗 ADAM28 抗体開発と ADAM28 活性調節機構解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・専任講師・望月 早月
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	本研究では ADAM28 の細胞膜上での活性調節機構を解析するとともに、ヒト型抗 ADAM28 抗体による in vivo での腫瘍細胞増殖・転移抑制効果を実験的に検証し、肺癌に対する新規分子標的治療薬開発のための基礎研究を進める。また、ADAM28 特異的合成蛍光ペプチドを用いた簡便で迅速な活性測定法を確立する。	
【研究内容・成果】	肺癌治療を目指して Human Combinatorial Antibody Library よりヒト型抗 ADAM28 抗体(211-12 と 211-14)を開発した。Luciferase と Venus の融合遺伝子を導入した細胞株(PC-9^{ffLuc-cp156})を作製し、マウス尾静脈内注入による肺転移モデルでの 211-14 抗体の作用を検討した。PC-9^{ffLuc-cp156}細胞を注入3週間後の肺転移が進行した状況下で 211-14 抗体を投与すると、肺転移の遅延とマウスの生存期間がコントロール抗体投与群では移植後 17 週ですべて死亡するのに対し、211-14 抗体投与群では 28 週まで延長した(図 1)。さらに、マウス ADAM28 活性を阻害するヒト型 ADAM28 抗体を有効量の 10 倍量を投与する毒性試験では、体重や臓器重量、血液検査、各臓器の病理組織学的所見に著変は認められなかった。以上より、我々が開発したヒト型 ADAM28 活性阻害抗体は、ADAM28 分子標的治療薬剤として応用できる可能性が期待される。 図 1 マウス尾静脈内入による肺転移モデルでの 211-14 抗体の作用 PC-9^{ffLuc-cp156}細胞尾静脈注入 3 週後に 211-14 抗体で治療すると全身転移の有意な抑制が見られ、平均生存率期間が 11 週間延長した。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Miyuki Chijiwa, <u>Satsuki Mochizuki</u>, Tokuhiko Kimura, Hitoshi Abe, Yukie Tanaka, Yutaka Fujii, Hidenori Shimizu, Hiroyuki Enomoto, Yoshiaki Toyama and Yasunori Okada : CCN1 (Cyr61) is overexpressed in human osteoarthritic cartilage and inhibits ADAMTS4 (aggrecanase-1) activity. Arthritis Rheum. 2015 in press. 【学会発表】 <u>Satsuki Mochizuki</u>, Hitoshi Abe, Masayuki Shimoda, Noriko Aramaki-Hattori, Yuka Miyamae, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada : Effects of human antibodies against ADAM28 on cancer cell growth and metastasis. 1st Matrix Biology Europe Conference, Rotterdam, 2014 年 6 月 23 日 - 望月 早月、岡田 保典：非小細胞肺癌の分子標的治療を目指したヒト型抗 ADAM28 抗体の作用機構 (シンポジスト) 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、金沢、2014 年 7 月 10 日 【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ケモカインを始めとする炎症性サイトカインと癌の病態に関して
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・教授・中本安成
研究分担者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・大学院生・内藤達志
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	複数の抗がん剤で癌組織への白血球浸潤・免疫反応の増強が認められることが報告されている。しかし、その分子・細胞レベルでの機構についてはいまだ不明な点が多い。本研究では腫瘍を皮下接種したマウスに抗がん剤を投与し、腫瘍部位に誘導される白血球や産生されるケモカインの同定と機能解析を行うことによって、最終的に抗がん剤による免疫賦活化過程に重要な役割を果たしている機構やケモカインを標的とした治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】	方法 1) マウス肝癌細胞株 BNL 1ME A. 7R. 1 (BNL) を野生型マウスならびにヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍を形成した時点で 150 mg/kg のシクロホスファミド (CTX) を腹腔内に単回投与し、腫瘍容量を観察した。 2) 抗 CD4 抗体あるいは CD8 抗体を投与した野生型マウスに同様の処置を行い、腫瘍容量を観察した。 3) CTX 投与 3 日目のマウス腫瘍組織に関して浸潤したリンパ球をフローサイトメトリー (FCM) で同定する。また、リアルタイム PCR で Perforin と Granzyme B の発現を検討した。さらに免疫蛍光法で抗 CD4、抗 Granzyme B 抗体で陽性となる CD4 陽性細胞傷害性 T 細胞 (CD4⁺CTL) を確認した。 4) 担癌マウス (CD45. 2⁺) に CTX を投与し、翌日に CFSE で標識したマウス脾細胞 (CD45. 1⁺) を尾静脈より移入した。経時的にレシピエントマウスの腫瘍と所属リンパ節を採取し、腫瘍および所属リンパ節での CFSE 標識リンパ球の増殖および浸潤リンパ球表面の細胞傷害顆粒膜蛋白 CD107a の発現状況を FCM で解析した。 5) CTX 投与後、マウス腫瘍組織を採取し、リアルタイム PCR 法を用いて発現が亢進していたケモカインを同定した。 6) 5) で同定したケモカインに対する受容体のノックアウト (KO) マウスを用いて、1) と同様の観察を行った。 7) 受容体 KO マウス由来脾細胞を 4) と同様に、野生型マウスに移入し、腫瘍内に浸潤する脾細胞数を検討した。 成果 1) 野生型マウスで形成された BNL 腫瘍は CTX の単回投与で消失したのに対し、ヌードマウス群では消失せず、再増大した。抗 CD4 抗体を投与し、CD4 陽性細胞を減少させた野生型マウスでは、Nude マウス群同様に CTX 投与後に腫瘍が再増大した。腫瘍が消失した野生型マウスに、BNL を再接種しても生着せず、特異的免疫の成立を認めた。 2) CTX 投与後、リアルタイム PCR で腫瘍内での Perforin と Granzyme B の発現の上昇を確認した。さらに、腫瘍内で Granzyme B 陽性 CD4⁺CTL の存在を、免疫組織染色法ならびに FCM 法で確認した。 3) 脾細胞の養子移入後 3 日目にマウスの腫瘍内で CD107a 陽性 CD4 陽性細胞 (CD4⁺CTL) を認めた。経時的観察により CD4⁺CTL はリンパ節での抗原提示や腫瘍内での増殖を介さずに、腫瘍内へ浸潤していることが確認できた。 4) CTX 投与により腫瘍内で CCL3・CCL4 の発現上昇を認めた。 5) CCR5KO マウスでは野生型マウスに比べ有意に腫瘍再増大が早かった。さらに CCR5KO マウス由来脾細胞を養子移入すると野生型脾細胞に対して有意に腫瘍内への浸潤が少なかった。 上記の結果より、CTX による抗腫瘍効果に CD4⁺CTL への関与、さらに CD4⁺CTL の腫瘍浸潤メカニズムに CCL3・4-CCR5 軸が関与していることが示唆された。これにより CCR5 を標的とした新たな治療戦略の基盤的知見が得られた。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) High-dose cyclophosphamide induces specific tumor immunity with concomitant recruitment of LAMP1/CD107a-expressing CD4-positive T cells into tumor sites. Tatsushi Naito, Tomohisa Baba, Kazuyoshi Takeda, Soichiro Sasaki, Yasunari Nakamoto, and Naofumi Mukaida. Cancer Letters (in submission). 2) 放射線療法が著効した Helicobacter pylori 除菌治療抵抗性直腸 MALT リンパ腫の 1 例, 内藤 達志ほか, 雑誌 ENDOSCOPIC FORUM for digestive disease 2014, 30(2)131-136	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	【学会発表】 1) Cytotoxic CD4+ cells play a crucial role in cyclophosphamide-mediated cytotoxicity without antigen priming. 内藤達志、馬場智久、中本安成、向田直史 第 73 回日本癌学会総会(横浜) 2014 年 9 月 25 日 2) Cytotoxic CD4+ Cells Play a Pivotal Role in Cyclophosphamide-Mediated Cytotoxicity against Hepatoma without Antigen Priming. Tatsushi Naito, Tomohisa Baba, Naofumi Mukaida, Yasunari Nakamoto AASLD The Liver Meeting 2014(ボストン) 2014 年 11 月 8 日 3) 抗癌化学療法における CD4 陽性細胞傷害性 T リンパ球による自然免疫反応の検討. 内藤達志、根本朋幸、松田秀岳、大谷昌弘、須藤弘之、中本安成 第 50 回日本肝臓学会総会(東京) 2014 年 5 月 29 日 【その他特筆事項】 なし
--	--

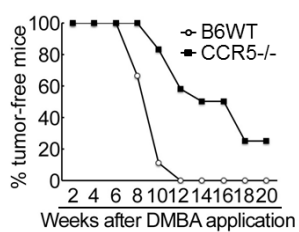
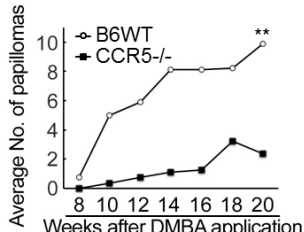
平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ケモカインを標的とした炎症制御による乳がん転移治療法の開発研究
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・和漢医薬学総合研究所・早川芳弘
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	がん転移病態形成過程の解析のためマウス乳がん自然転移モデルにおける肺転移プロセスに関わる炎症性微小環境でのケモカインの重要性について明らかにするとともに、新たながん転移治療標的としてのケモカインの可能性を検証する。特に生体内における炎症性微小環境の成立過程を、がん細胞での炎症性シグナル活性化に着目した生物発光イメージングの手法を用いて以下の点について探索する事を目的とする。 ○ がん細胞における炎症性シグナル活性化を指標として生物発光イメージングで可視化する「in vivo がん炎症イメージング」の実験手法を用いてケモカイン／ケモカイン受容体相互作用の炎症性腫瘍微小環境形成における重要性を明らかにする。 ○ ケモカイン／ケモカイン受容体相互作用をターゲットとした腫瘍局所での炎症制御によるがん悪性化進展、特にがん転移標的治療の可能性を in vivo イメージングで明らかにする。	
【研究内容・成果】	転移に代表されるがん悪性化進展過程において原発巣または転移巣の腫瘍微小環境の重要性が指摘されている。なかでも腫瘍微小環境における炎症性免疫応答とそれに伴うがん細胞での炎症性シグナルの関与が示唆されているが、がん病態での時空間的变化やその役割は未だ明らかではない。そこで本研究では転写因子 NFκB に着目し、マウス 4T1 乳がん細胞での NFκB 活性の経時的変化をモニタリング可能な生物発光イメージング系を確立し、生体内での炎症性腫瘍微小環境の形成過程についてがん細胞の NFκB 活性を指標として解析した。4T1 細胞の NFκB レポーターシステマを樹立し、同系 Balb/c マウスへ移植して腫瘍増殖に伴う発光活性の経時的変化を測定した。乳腺脂肪組織へ同所性移植した場合では対照群である皮下組織への移植の場合と比較して移植 5～7 日後をピークに NFκB 活性の一過性の上昇が観察された。さらに SCID マウス及び nude マウスの免疫不全マウスにて同様の検討を行った結果、NFκB の活性上昇が消失したことから宿主獲得免疫系、特に T 細胞が腫瘍微小環境における 4T1 細胞の NFκB の活性化に必須であることが示された。NFκB 活性の一過性の上昇が観察される移植 7 日後の炎症性サイトカイン／ケモカインの発現解析、ならびに腫瘍浸潤宿主免疫細胞の解析の結果、腫瘍局所での IL-1 ならびに MIP-1 の産生増強と腫瘍浸潤マクロファージの増加が乳腺脂肪組織へ同所性移植した場合では対照群である皮下組織への移植の場合と比較して認められた。	
【成果等】	【主な論文発表】 投稿準備中	
	【学会発表】 高橋恵生、永井直、小倉圭介、済木育夫、入村達郎、早川芳弘、4T1 乳がんモデルにおける炎症性腫瘍微小環境形成における T 細胞の重要性、日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム、「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」。2015 年 1 月 21 日。金沢	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		卵巣癌微小環境におけるケモカインシステムの分子病理学的役割の解析および分子標的治療の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・教授・井篁一彦
研究分担者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・准教授・木村章彦
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・大学院生・谷崎優子
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学院生・小林彩
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	卵巣癌は、特に早い段階で腹膜播種という増殖、進展、転移、再発形式をとる点で、血行性転移やリンパ行性転移を主体とするような他の癌種とは異なっている。癌微小環境におけるマクロファージや線維芽細胞などの間質細胞の浸潤・増殖にはケモカインシステムが関与していることが示唆されているが、これまで卵巣癌の腹膜播種におけるケモカインシステムについての詳細な研究はほとんどみられていない。申請者は、卵巣癌微小環境内の間質細胞と腫瘍細胞のクロストークにおけるケモカインシステムの病態生理的役割を解析している。 さらに、卵巣癌の播種、転移に対する新たな治療法樹立や治療薬の開発といった臨床応用へ向けて基盤の確立を目指す。	
【研究内容・成果】	【目的】我々は、ケモカインの一つであるフラクタルカイン (CX3CL1) およびそのレセプター (CX3CR1) に着目し、卵巣癌腹膜播種における CX3CL1-CX3CR1 システムの分子病理学的役割を検討した。 【方法】(1) C57Bl/6 マウス (WT) および <i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスに ID8 細胞 (5x10⁶個/マウス) を腹腔内移植し、腹膜播種の程度、生存率及び腫瘍関連分子の発現を検討した。(2) 手術検体より得られたヒト卵巣腫瘍組織について、CX3CL1 および CX3CR1 の mRNA およびタンパクレベルでの発現を検討した。 【成績】(1) ID8 細胞を WT および <i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスに腹腔内移植し、Day79 および Day84 に開腹したところ、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスでは腫瘍形成、腹水量は有意に減少していた。また、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスの生存期間は WT マウスに比べて有意に延長した。腫瘍組織の免疫組織学的検討では、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスにおいて腫瘍内のマクロファージと線維芽細胞の減少を認めた。また、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスでは MMP-2、TGF-β の遺伝子発現及び産生細胞の減少を認めた。さらに MMP-2 及び TGF-β 産生細胞はマクロファージと判明した。 (2) ヒト卵巣腫瘍において、漿液性腺腫に比べ漿液性腺癌では CX3CL1 および CX3CR1 の mRNA レベルでの発現が有意に高く、免疫組織染色を行ったところ、CX3CL1 は癌細胞に、CX3CR1 は間質細胞に局在していることが明らかとなった。 【結論】癌微小環境内において、CX3CL1-CX3CR1 システムがマクロファージの動員に関与し、腫瘍内に浸潤したマクロファージは Tumor-associated macrophage (TAM) として、卵巣癌進展に有利な環境を作りだしていることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 未発表	
	【学会発表】 平成 26 年 6 月 (兵庫) マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 平成 26 年 7 月 (石川) 第 23 回 がん転移学会学術集会 平成 26 年 7 月 (栃木) 第 56 回 日本婦人科腫瘍学会 平成 26 年 12 月 (和歌山) 和歌山悪性腫瘍研究会 平成 27 年 4 月 (神奈川) 第 67 回 日本産婦人科学会学術集会	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		化学物質誘発性皮膚がんにおけるケモカインの病態生理学的役割解析
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学法医学教室・講師・石田裕子
研究分担者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学法医学教室・教授・近藤稔和
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	がんの炎症性微小環境では、慢性炎症により組織の恒常性が失われており、実質細胞に由来する腫瘍細胞と間質細胞とのクロストークにより、がんの発症・進展に関与することが証明されている。本研究では、ケモカイン・ケモカインレセプター遺伝子欠損マウスを用いてがんの微小環境内細胞とケモカインシステムの役割に焦点をあて皮膚がんの発症・進展メカニズムを解析する。さらに、その他のケモカインシステムについて、皮膚がんの発症予防や進展抑制の分子標的となり得るか否かについて明らかにすることが本研究の目的である。	
【研究内容・成果】	1) 遺伝子欠損マウス C57BL/6 マウスを遺伝子背景とする CC ケモカインレセプター-5 (CCR5) の遺伝子欠損マウスを用いた。 2) 腫瘍形成 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 100 μg/200 μl acetone) をマウス背部に塗布後、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA, 30 μg/200 μl) を 20 週連続塗布して腫瘍形成を誘導し、各マウスで腫瘍形成の状況を比較・検討した。 3) 病理組織学的および免疫組織化学的検索 背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、表皮の厚さを計測した。また、CCR5、マクロファージ、および新生血管を免疫組織化学的に検索した。 2. 研究成果 1) 野生型マウスにおいて TPA 塗布 2 および 10 週間後において、皮膚組織における CCR5 の遺伝子発現が、未処理の皮膚組織と比較して有意に上昇していた、さらに、蛍光 2 重染色によりマクロファージに CCR5 の発現が確認された。すなわち、化学物質誘発性皮膚がんモデルにおいて CCR5 シグナルが関与している可能性が示唆された。 2) TPA 塗布 6 週目までは野生型マウスおよび CCR5 遺伝子欠損マウスのいずれにおいても乳頭腫形成は認められなかった。野生型マウスでは約 8 週目から約 40% において肉眼的に乳頭腫形成が観察され、10 週目では 90%、12 週以降では野生型マウスの全例で乳頭腫形成が確認された。一方、CCR5 遺伝子欠損マウスでは、10 週目ではじめて乳頭腫が約 20% 確認され、その後乳頭腫を形成するマウスの割合は増加したが、TPA 塗布 20 週目においても約 20% の CCR5 遺伝子欠損マウスでは乳頭腫形成は認められなかった (図 1)。また、各マウスにおける乳頭腫の数について、TPA 塗布 20 週目に野生型マウスでは平均 10 個程度であったが、CCR5 遺伝子欠損マウスでは平均 3 個程度であった (図 2)。 3) 病理組織学的に野生型マウスは表皮肥厚が観察されたが、CCR5 遺伝子欠損マウスでは表皮層の肥厚が有意に減弱していた。さらに、免疫組織化学的検索において、野生型マウスでは F4/80 陽性マクロファージ浸潤が顕著に観察されたが、CCR5 遺伝子欠損マウスでは、有意に減弱していた。さらに、血管新生についても、CCR5 遺伝子欠損マウスでは腫瘍内血管数が有意に少なかった。 以上、化学物質誘発性皮膚がんモデルにおいて、CCR5 を介するシグナルがマクロファージ浸潤を介して発がんに促進的に作用していることが、示唆された。今後は、CCR5 陽性マクロファージ浸潤と血管新生との関係、発がんにおける CCR5 リガンドについて検討をしていく。  図 1  図 2	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	1. <u>Ishida Y</u> , Kuninaka Y, Nosaka M, Tanaka T, Shinozaki K, Kimura A, <u>Mukaida N</u> , <u>Kondo T</u> . The absence of CCL3/MIP-1 α exaggerated CaCl ₂ -induced aortic aneurysm. 第 43 回日本免疫学会学術集会, 京都, 2014.12
	【その他特筆事項】	なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		慢性骨髄性白血病患者におけるケモカイン CCL3 発現量の経時解析
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学・教授・小松則夫
研究分担者	所属・職名・氏名	順天堂大学・助教・森下総司
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	向田らは、慢性骨髄性白血病のモデルマウスを用いた検討により、慢性骨髄性白血病の発症初期において、BCR-ABL 陽性白血病細胞中の CCL3 発現量が顕著に上昇することを見出した。本研究はこの結果に着想を得、ヒト慢性骨髄性白血病患者において、チロシンキナーゼ阻害薬による治療の過程における CCL3 発現の経時変化を解析し、臨床的意義を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】	順天堂大学医学部 血液内科学講座にて初診時から保管されている慢性骨髄性白血病患者 12 名の骨髄より採取した total RNA を対象として、初発時（未治療時）とチロシンキナーゼ阻害薬による投薬治療開始後 3 ヶ月経過時点での CCL3 発現量と BCR-ABL 発現量を定量した。CCL3 発現量定量には$\Delta\Delta Ct$法を用い、内在性コントロールとして GAPDH を用いた。BCR-ABL 発現量定量は定量的 RT-PCR 法を用い、ABL を内在性コントロールとして検体間の差を標準化した。結果として、全ての検体においてチロシンキナーゼ阻害薬投薬に伴う BCR-ABL 発現量の低下を認めたが、CCL3 発現量は上昇した。これは、CCL3 を発現する初期段階の白血病細胞はチロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性であり、採取した検体中の CCL3 発現細胞の割合が高くなることによるものと考えられた。 また、検討した 12 例のうち 3 例において、投薬開始後 18 ヶ月まで CCL3 と BCR/ABL 発現量を追跡したところ、BCR/ABL 発現量はいずれの検体においても減衰していき、検出感度以下となったが、CCL3 発現量はこれに相関せず、初診時と比較し高値を維持した。しかしながら、BCR/ABL が検出されない状態にあっても CCL3 の発現量は検体間で差があり、TKI 治療抵抗性の初期段階にある白血病細胞量の推移を検出している可能性が考えられた。この結果をより詳細に考察するためには、チロシンキナーゼ阻害薬治療を中止した後の CCL3 発現量を追跡する必要があると考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

研究区分		一般共同研究
研究課題		shRNA ライブラリーを用いたパイロトーシス関連遺伝子の網羅的同定
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院新領域創成科学研究科・教授・鈴木 穰
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	パイロトーシスは、カスパーゼ 1 依存性のネクローシス様プログラム細胞死である。当初は、細菌に感染したマクロファージなどで見られる細胞死として報告されたが、神経細胞、心筋細胞、がん細胞など様々な細胞種でも同様の細胞死が報告されており、神経変性疾患、糖尿病、がんなど様々な疾患に関与することが示唆されている。パイロトーシス死細胞からは種々の炎症誘導物質が放出されるため、腫瘍内でパイロトーシスが起きれば炎症性微小環境の形成に寄与すると考えられる。しかし、パイロトーシスの分子メカニズムについてはほとんど解明されておらず、したがってその人為的な制御法も確立されていない。	
【研究内容・成果】	須田らが樹立したムラミルジペプチド(MDP)刺激に応答して全ての細胞がパイロトーシスを起こす NOMO-1/C12N2 細胞に DECIPHER プロジェクトコンソーシアムが配布する shRNA Library の内、ヒト遺伝子を標的とする 3 つのサブライブラリーを導入し、MDP 刺激でパイロトーシスを誘導する前後に、生細胞のゲノム内に組み込まれた個々の shRNA の頻度を、次世代シーケンスの手法で網羅的に決定した。その後、MDP 刺激前に比べ、刺激後の生き残った細胞内に濃縮される shRNA を同定した(右図)。同定された shRNA はパイロトーシスのシグナル伝達に働く遺伝子を標的とすると考えられる。実際、同定された shRNAの中には、パイロトーシスのシグナル伝達において重要な役割を果たすことが知られているアダプター分子 ASC の遺伝子(PYCARD)を標的とするものが複数含まれていたことから、このスクリーニングは機能したと考えられる。今後は、同定された shRNA の標的遺伝子のうち複数の shRNA の濃縮が確認された遺伝子 20 種類について、須田らとの共同研究でパイロトーシスにおける役割を検証する予定である。 図) 右下 2 次元ドットプロット内の赤い四角で囲まれたドットが MDP 処理後に濃縮された shRNA を示す。この内 3 つが ASC 遺伝子(PYCARD)を標的とする shRNA であった。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		Fas および Fas リガンドに対するアゴニスト、アンタゴニスト環状ペプチドの開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科化学専攻・教授・菅裕明
研究分担者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科化学専攻・助教・後藤佑樹
	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科化学専攻・修士課程学生・宮地大輝
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	Fas は Fas リガンドに結合することで細胞にアポトーシスを誘導する細胞表面受容体である。Fas や Fas リガンドの欠損は悪性リンパ腫や扁平上皮癌の発生頻度を高める。したがって、Fas アゴニストはこれらの悪性腫瘍の治療に有用である可能性がある。一方、肝炎を含む様々な炎症性疾患で Fas/Fas リガンド系の病理的役割が報告されている。従って、Fas アンタゴニストは肝炎などの治療に有用である可能性がある。そこで、本共同研究では、我々が開発した RaPID システムを用い、Fas に対するアゴニスト、アンタゴニストの開発を試みた。	
【研究内容・成果】	我々は、独自の方法で非天然アミノ酸を tRNA にアミノアシル化し、任意のアミノ酸配列を持つペプチドを翻訳合成すると技術と、膨大な種類のペプチドをコードした人工遺伝子の複合体の中から、任意の蛋白に結合するペプチドを迅速にスクリーニングする技術、RaPID システムを開発した。この技術を駆使することで、様々な蛋白に極めて高い親和性で結合する大環状特殊ペプチドの同定が可能になり、種々の受容体蛋白に対するアゴニストやアンタゴニストの開発に応用することが出来る。 そこで、須田らが調製した Fas の細胞外領域とヒト IgG1 抗体 Fc 領域の融合蛋白、Fas-Fc をプロテイン A カラムに固定化して、Fas-Fc カラムを調整した、RaPID システムで作成したペプチド-人工遺伝子複合体ライブラリーを Fas-Fc カラムに添加し、結合した複合体から人工遺伝子を回収して増幅した。このサイクルを 6 回繰り返すことで、11 種類の Fas 結合ペプチドを獲得した。ペプチドは、HPLC で精製し MALDI-TOF で確認した。 次に、得られた Fas 結合ペプチドがアゴニスト (Fas リガンド様) 活性を示すか検討する目的で、Fas 発現細胞株 (W4) に添加し、6 時間培養後の細胞の生存率を WST1 アッセイで検討したが、残念ながらアゴニスト活性を示すペプチドは得られなかった。さらに、得られた Fas 結合ペプチドがアンタゴニスト (Fas リガンド阻害) 活性を示すか検討する目的で、ペプチドを W4 細胞に添加した後、Fas リガンドを添加し、さらに 6 時間培養後の細胞生存率を検討した。この検討でも、残念ながら Fas リガンドによる細胞死誘導を阻害するペプチドは見出されなかった。今後は、Fas 結合ペプチドの多量体化により Fas に対するアゴニストペプチドを得られるか検討するとともに、Fas リガンドを固定化したカラムを作成し、Fas リガンド結合ペプチドの獲得を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		ビタミン B6 によるインフラマソームの制御とがんの一次予防
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学大学院生物圏科学研究科・教授・加藤 範久
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	ビタミン B6 はピリドキサル (PL)、ピリドキサミン (PM)、ピリドキシン (PN) およびそれらのリン酸化体 (PLP, PMP, PNP) からなる水溶性ビタミンである。我々は、ビタミン B6 が Azoxymethane 誘導マウス大腸がんモデルにおいて発がん予防効果を示すこと、NF-κB 活性化を抑制し、発がんに関与する iNOS や COX-2 の発現を抑制することを見出した (J. Nutrition, 131:2204-2207, 2001)。 また、須田教授らとの共同研究で、ビタミン B6 がマクロファージからの炎症性サイトカイン IL-1β の産生を抑制することを見出した。そこで、本研究では、ビタミン B6 による IL-1β 産生抑制機構を解析するとともに、動物モデルでも効果を検討した。	
【研究内容・成果】	IL-1β の産生には、NF-κB の活性化によるプロ IL-1β の発現に加え、カスパーゼ 1 の活性化による IL-1β の成熟が必要である。最近の研究から、カスパーゼ 1 の活性化には NLRP3、NLRC4 などの細胞質パターン認識受容体やアダプター蛋白 ASC を含むインフラマソームと呼ばれる蛋白複合体の形成が必要であることが判明している。本研究では以下の結果を得た。 1) LPS 処理でプロ IL-1β を誘導したマウス腹腔マクロファージを、NLRP3 を活性化する ATP、ニグリシン、尿酸ナトリウム結晶、黄色ブドウ球菌感染などで刺激すると、IL-1β の産生が誘導される。この実験系で、NLRP3 活性化刺激を加える前に PL や PLP で刺激すると IL-1β の産生が抑制された。一方、PM や PN にはそのような活性は無かった。同様の現象はヒト単球様細胞株 THP-1 を用いても認められた。また、NLRC4 を活性化するサルモネラ菌感染による IL-1β の産生には影響しなかった。これらのことから、PL や PLP はヒトとマウスの両方で、NLRP3 依存性の IL-1β 産生を抑制することが明らかになった。 2) LPS で前処理した腹腔マクロファージをニグリシンなどで刺激すると、巨大な ASC の凝集体が形成される。この ASC 凝集体の形成は効率的な IL-1β 産生に必要であることが報告されている。この実験系でニグリシン処理前に PL または PLP で処理すると ASC 凝集体の形成が阻害された。従って、PL および PLP は ASC 凝集体の形成より上流で NLRP3-ASC-カスパーゼ 1 経路を阻害すると考えられる。 3) 致死量の LPS をマウス腹腔に投与することで誘導する NLRP3 依存性の敗血症モデルにおいて、高容量のビタミン B6 を事前に投与することにより、腹腔内の IL-1β レベルの上昇が抑制され、マウスの生存率が改善した。逆にビタミン B6 欠乏食で飼育したマウスは LPS 腹腔投与による IL-1β 産生が増加する傾向を示したが、今回の実験条件では生存率の有意な変化は認められなかった。 以上の結果より、ビタミン B6 は NLRP3 依存性 IL-1β 産生を抑制するとともに、NLRP3 が関与する疾患の治療に有効である可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 未発表	
	【学会発表】 (発表予定) Zhang P, Kinoshita T, Kushiya H, Suidasari S, Kato N, Suda T. Vitamin B6 prevents IL-1β production through inhibition of NLRP3 inflammasome activation. 12th Asian Congress of Nutrition, May 16, 2015, Yokohama	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		PYNOD 遺伝子が獲得免疫反応に及ぼす影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	鳥取大学・准教授・吉野三也
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	炎症反応に関与する NLRP ファミリー分子で唯一炎症抑制に働くと報告されている PYNOD (Nlrp10) 分子が獲得免疫反応に及ぼす影響を、T 細胞機能と生体内樹状細胞の動態の二点から解析するのが目的である。須田らは、PYNOD 分子を独自にクローニングしノックアウトマウスを作製 (Wang et al, Int. Immunol. 2004)、このマウスで、獲得免疫反応が低下していることを見出した。一方、同分子の欠損が樹状細胞の遊走を抑制するという報告が出たため (Eisenbarth et al, Nature, 2012)、われわれの保持している皮膚樹状細胞をマーキングできるマウスおよび試験管内実験系で、PYNOD 欠損マウスの樹状細胞の生体内の動態に獲得免疫反応低下の原因が無いかを解析することにした。	
【研究内容・成果】	1. PYNOD 欠損マウスの生体内樹状細胞の動態解析 PYNOD 欠損 (<i>Pynod</i> (-/-)) マウス (須田教授より分与) を、われわれの保持している皮膚樹状細胞をマーキングできる 2 系統のトランスジェニックマウス、<i>KRT14-Kit1-Tg</i> (表皮にメラニンの蓄積が出る) <i>KRT14-HGF-Tg</i> (真皮にメラニンの蓄積が出る) に各々交配し、<i>Pynod</i> (-/-) <i>Tg</i> マウスを作製、生理的状态での皮膚から所属リンパ節への樹状細胞の遊走状況を、組織標本および皮膚自己抗原輸送量定量で評価した。その結果、表皮、真皮両方からの樹状細胞遊走には変化が見られず、PYNOD 欠損の影響の可能性は低いと考えられた。 2. PYNOD 欠損樹状細胞の T 細胞刺激能評価 <i>Pynod</i> (-/-) マウスの骨髓細胞由来樹状細胞を試験管内で誘導し、T 細胞刺激能で機能を評価した。GM-CSF および Flt3-ligand で誘導した樹状細胞にオブアルブミン (OVA) を抗原としてパルスし、OVA 特異的な TCR を持つ CD4 T 細胞 OT-II を試験管内で刺激、増殖を指標に機能を解析した。その結果、<i>Pynod</i> (-/-) 樹状細胞の T 細胞刺激能はヘテロのコントロール樹状細胞と変わらず、また、分化誘導後の樹状細胞の細胞表面マーカー解析でも、<i>Pynod</i> (-/-) 群で特定のサブセットが欠損しているなどの異常も見られなかった。 以上の結果から、<i>Pynod</i> (-/-) マウスで見られる獲得免疫反応の低下に、樹状細胞の分化異常や、生体内での樹状細胞遊走低下が関わっているとは言い難いと現時点では結論した。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	第 43 回日本免疫学会学術集会(京都) 口頭発表 1-C-W4-2-O/P Migration of skin antigen-transporting cells in PYNOD-deficient mice. YOSHINO Miya, IMAMURA Ryu, MURATA Akihiko, SHIMODA Yuhki, HIKOSAKA Mari, SUDA Takashi, HAYASHI Shin-Ichi.
	【その他特筆事項】	なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		肺がん細胞の増殖・薬剤耐性における Ror1-Rif 経路の役割と HGF-Met 系との相互作用
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・准教授・西田満
研究分担者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南康博
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	肺がんは日本における死亡者数および死亡率の最も高いがんであり、中でも肺腺がんは肺がんの60%程度を占める。受容体型チロシンキナーゼ Ror1 はヒト肺腺がんにおいて高発現し、がん細胞の生存や増殖を促進するだけでなく、分子標的薬に対する獲得耐性にも関与することが示唆されている。しかしながら、その分子基盤についてはほとんど解明されていない。 我々は、ヒト子宮がん細胞株 HeLa を用いて、Ror1 が Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rif を介して糸状突起形成を誘導することを見出している。本研究では、Ror1-Rif 経路による肺腺がん細胞の増殖制御機構の解明を目的とした。	
【研究内容・成果】	本研究では Ror1 と Rif を高発現しており、上皮成長因子受容体遺伝子 (<i>EGFR</i>) に活性型変異を有するヒト肺腺がん細胞株 PC-9 を用いて解析を行った。まず、Ror1 と Rif の糸状突起形成への関与について検討するため、<i>Ror1</i> と <i>Rif</i> をそれぞれノックダウン (KD) し、1 μm 以上の長さの糸状突起の数を計測した。その結果、コントロール細胞に比べ、<i>Ror1</i> KD 細胞と <i>Rif</i> KD 細胞では糸状突起の数が顕著に減少した。さらに、糸状突起形成に関与する別の低分子量 G タンパク質 Cdc42 やアクチン核化因子 mDia2 の KD によっても同様に糸状突起の数が減少した。次に、Rif が Ror1 の下流で機能している可能性を検討するため、<i>Rif</i> KD 細胞における Ror1-GFP 過剰発現の影響を検討した。その結果、Ror1-GFP の過剰発現によって促進される糸状突起形成は、<i>Ror1</i> KD によって抑制されなかった。したがって、PC-9 細胞においては、Ror1 は Rif 非依存的に糸状突起形成を誘導することが示唆された。 次に、<i>Ror1</i>、<i>Rif</i> の KD が PC-9 細胞の増殖に及ぼす影響を解析した。その結果、<i>Ror1</i> KD、<i>Rif</i> KD どちらも細胞増殖を有意に抑制した。また、<i>Cdc42</i> KD も同様に細胞増殖を抑制したが、<i>mDia2</i> KD についてはコントロールと比べ増殖率に有意差は認められなかった。前述のように、<i>mDia2</i> KD は糸状突起形成はを阻害することから、PC-9 細胞の増殖には糸状突起は必要ではないと考えられる。さらに、<i>Ror1</i> や <i>Rif</i> が浸潤に関与する可能性について検討するため、matrigel invasion assay を行った。その結果、<i>Ror1</i> KD、<i>Rif</i> KD どちらも浸潤能を有意に抑制することが明らかになった。 以上の結果から、Ror1 や Rif は PC-9 細胞の糸状突起形成、増殖、浸潤をそれぞれ促進していることが示された。Ror1 や Rif による細胞機能制御の分子基盤を明らかにするため、細胞内シグナル伝達経路について解析を行ったが、EGFR やその下流シグナル因子である Ras, Raf, Rac, Cdc42, Erk, Akt の活性は、<i>Ror1</i> や <i>Rif</i> の KD によってほとんど影響を受けなかった。そこで、<i>Ror1</i> KD によって変動する細胞内代謝産物を同定するため、メタボローム解析を行った。その結果、<i>Ror1</i> KD によって細胞内のポリアミン（プロリン、スベリミジン）含量が減少することを見出した。ポリアミンはすべての生物に存在し、DNA 合成や遺伝子発現などを制御することによって細胞の増殖や分化などに必須な役割を担っている。一般に、がん細胞ではポリアミンの生合成や細胞外からの取り込みが亢進しており、がん細胞におけるポリアミン濃度の上昇は、増殖・浸潤といったがんの悪性進展に関与していると考えられている。現在、Ror1/Rif がポリアミンの代謝や取り込みを調節することで、肺腺がん細胞の悪性進展に関与している可能性について検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Endo, M., <u>Nishita, M.</u>, Fujii, M., and Minami, Y. Insight into the role of wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. <i>Int. Rev. Cell Mol. Biol.</i> 314: 117-148, 2015. <u>Nishita, M.</u>, Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., and Minami, Y. Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. <i>Mol. Cell. Biol.</i> 34:3096-3105, 2014. 【学会発表】 <u>Nishita, M.</u>, Role of Wnt5a-Ror2 signaling in tumor invasion. University of Washington and Kobe University International Joint Symposium. Kobe, 2014 【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・准教授・青木俊介
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究では、HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。階層的結合シミュレーションによる <i>in silico</i> スクリーニング手法ならびに類縁化合物探索手法、π 結合やスタッキング相互作用の予測法 (PLIF/LI 法) 等を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位に結合する低分子化合物を探索するための計算科学的な創薬基盤を確立する。最終的には、大規模な化合物立体構造ライブラリから計算科学的手法により HGF-Met のタンパク質間相互作用を阻害する高親和性の新規低分子化合物を複数種類同定することを目的とし、それらリード化合物からの有機合成展開も視野に入れた創薬研究を展開する。	
【研究内容・成果】	本研究の標的タンパク質の 1 つである HGF の立体構造に着目し、c-Met との分子間結合面に存在する潜在的な化合物結合部位となるポケット構造 (窪み部分) を探索した。HGF の立体構造 PDB ID : 4K3J を用い、結晶解析では検出されない水素原子を付加するとともに電荷の付加を行った。分子表面抽出ツール dms を用いてタンパク質のファンデルワールス表面上に水分子の仮想球を転がすことで HGF タンパク質の分子表面を抽出した。この分子表面構造から、ポケット構造探索ツールである sphgen を用い仮想原子球を入り込ませて、仮想原子球のクラスター (仮想低分子化合物) が入り込める c-Met との結合面にあるポケット構造を複数同定した。グリッドドッキング手法に基づくドッキングシミュレーションツール DOCK ならびに遺伝的アルゴリズムに基づくドッキングシミュレーションツール GOLD 等からなる階層的ドッキングシミュレーション手法を用いた <i>in silico</i> 化合物スクリーニングを HGF 立体構造を標的として行い、約 46 万化合物の 3 次元構造から構成される化合物構造ライブラリから HGF と結合し、c-Met への結合ならびに活性化作用を阻害する可能性を有する低分子化合物を選定した。また、HGF 分子表面に存在する潜在的結合ポケット全てに関してドッキングシミュレーションを行った。DOCK でのグリッド計算による一次スクリーニングにより約 46 万化合物から HGF と c-Met 受容体間の結合阻害化合物候補 2000 化合物を選定した。次に遺伝的アルゴリズムによる二次スクリーニング (GOLD) により一次スクリーニングによって選定された 2000 化合物の単一の初期配座のみを考慮した化合物構造に対して結合シミュレーションを行い、44 化合物に絞り込んだ。さらに選定された 44 化合物の複数配座を 1 つの化合物に対して最大で 10 配座を生成して、遺伝的アルゴリズムによる再シミュレーションを行い結合エネルギースコアの再計算を行った。その後、フィルタリングとして PLIF 解析ならびに LI 解析を行うとともにリピンスキーの法則等を考慮して、最終的に阻害化合物の候補を選定した。これら、選定された化合物を入手し HGF-Met タンパク質間相互作用に対する阻害活性を松本研究室において主として以下の 3 種の生物学的実験で評価した。(1) 細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイ、(2) FITC ラベル HGF を用いた Met の直接結合系での阻害アッセイ、(3) Met 固定化ビアコアによる HGF を用いた Met の直接結合系における阻害アッセイ。最終的に他の複数の増殖因子とそれらの受容体への結合は阻害せず HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害し、HGF による Met のリン酸化も阻害する新規低分子化合物を 1 種同定することが出来た。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sakai K., Aoki S., Matsumoto K., Hepatocyte growth factor and Met in drug discovery. J. Biochem. (2015) in press.	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		悪性乳癌幹細胞維持における転写因子 NF-κB の役割解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・教授・井上純一郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	乳癌は遺伝子発現パターンや治療標的分子が異なるサブタイプに分類されることが知られている。研究代表者は、これまでに乳癌細胞株を用いて難治性の Basal-like サブタイプ乳癌特異的に NF-κB-JAG1-NOTCH 経路が、がん幹細胞の維持に関与していることを見出している。本研究では、この経路によるがん幹細胞の制御が臨床検体に由来する乳癌細胞でも存在することをサブタイプ特異性に着目して解析を行う。	
【研究内容・成果】	臨床検体を用いて乳癌の各サブタイプの性質を保持した培養法の確立を目的として検討を行った。また、0.1 グラム程度の検体が多いため、これまでよりもより少量の細胞から効率的な培養を可能とする方法についても検討を行った。約 0.1 グラムの検体をメスで細断し、コラゲナーゼ、ヒアルロニダーゼ、DNase で処理した。酵素で消化されなかった繊維等をフィルターによって取り除き、弱遠心によって癌細胞をスフェロイドのまま回収した。このスフェロイドをコラーゲンコートされた培養ディッシュに播種し HuMEC 培地で培養をしたところ、上皮細胞が伸展し増殖した。従来の酵素処理によって得られた単一懸濁細胞を播種するよりも生存率や増殖能が高く長期培養可能な腫瘍細胞が得られることが示唆された。次にサブタイプ特異的な遺伝子発現のパターンを解析したところ、スフェロイドの状態では Luminal-like サブタイプのマーカーである ESR1 や ERBB2-enriched サブタイプのマーカーである ERBB2 を強く発現する検体であっても培養後継代を数回繰り返すことで、これらのマーカー発現が低下し、Basal-like サブタイプのマーカーである FOXC1 の発現が亢進することが分かった。また、一部の腫瘍では 3～5 回程度継代を繰り返すことで Luminal-like や Basal-like サブタイプのマーカーである EpCAM の発現が低下し、Claudin-low サブタイプと良く似た表現系を示す細胞が現れることが分かった。こういったサブタイプの変化は臨床においても悪性化や治療抵抗性の発現に伴って見られることから、この培養法を用いることで、培養初期は Luminal-like サブタイプとして、数回の継代を経ることで Basal-like もしくは Claudin-low サブタイプとして継代回数ごとに異なるサブタイプの特徴を持った細胞を評価することが可能になると考えられる。また、これまでの検討から培養によって Basal-like サブタイプの性質を示すようになった細胞株について TNFα 処理により JAG1 の発現が亢進し、JAG1 発現細胞との共培養によって NOTCH 刺激を加えることで乳癌幹細胞画分が増加することを見出しており、Basal-like サブタイプの乳癌において NF-κB-JAG1-NOTCH シグナルが乳癌幹細胞の維持に関与する事が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		乳がん臨床検体スフェア培養を用いたドライバー変異の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学医科学研究所先端医療研究センター・教授・東條有伸
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	申請者は、当研究所の後藤との共同研究にて、「初代乳癌細胞のスフェア培養」の系を立ち上げた(PNAS, 109, p6584, 2012)。本研究では、これを用いて、革新的ながん根治療法につながる分子標的を見いだすことを大きな目的とする。次世代シーケンサーを用いた解析に加えて、先端的バイオインフォマティクスも駆使して、ドライバー変異や、癌幹細胞のアキレス腱やハブとなる鍵分子を同定する。	
【研究内容・成果】	手術日に病院から 2 時間以内の研究室（東京大学医科学研究所・分子療法分野もしくは金沢がん研）へ新鮮臨床検体を氷冷状態で運搬する。東大病院、公立昭和病院、南町田病院からは、医科研へ搬送、金大病院からは金沢がん研へ搬送する。 検体を、酵素などで処理してシングルセルにし、ビーズ処理により、血球や間質細胞を取り除き、スフェア培養を行う。当日シングルセルにするのが困難な場合は、一旦接着培養させたのちに、数日以内にスフェア培養に持ち込む。残った組織は-80 度で凍結保存し、後日、免疫不全マウスに移植するなどの実験を行う。 得られたドライバー変異候補分子のノックダウン並びに過剰発現系などによる評価を、臨床検体スフェア培養系や、PDX モデルを用いて、詳細に解析した。この系を用いて、がん幹細胞の安定化を司る候補分子の評価を行った。その結果、HER2/3-PI3 kinase-NF κB ウエイは、がん幹細胞ニッチとして機能するがん細胞内に、IGF2 サイトカインの産生を促すことがわかった。また、IGF2 の受容体である IGF1 受容体(IGF1R)ががん幹細胞の性質を持った細胞に特異的に発現しており、IGF1R シグナルをがん幹細胞内で活性化、その下流で未分化性のマスター調節因子である ID1 転写制御因子の発現を上昇させ、さらにその下流で IGF2 自身が産生されることがわかった。つまり、ポジティブフィードバックメカニズムにより IGF2-IGF1R-ID1-IGF2 サーキットが回転し、一旦これが回転しはじめるとがん幹細胞はこれに依存し安定化されることが明らかになった。	
【成果等】	【主な論文発表】 投稿中	
	【学会発表】 ① Tominaga K, <u>Tojo A</u>, <u>Gotoh N</u> 「HER2/3-NFκB-IGF2-ID1 circuit addiction as a fundamental mechanism for stabilization of the stemness of breast cancer cells in their niche」『第 13 回幹細胞シンポジウム』東京（2015 年 5 月） ② Tominaga K, <u>Tojo A</u>, <u>Gotoh N</u> 「HER/NF-κB induced IGF2 loop as a fundamental mechanism for breast cancer stem and niche cell maintenance」『第 37 回 日本分子生物学会年会 ワークショップ、がん幹細胞研究の新展開：多様性と可塑性』横浜（2014 年 11 月） ③ Tominaga K, <u>Tojo A</u>, <u>Gotoh N</u> 「HER/NF-κB induced IGF2 loop as a fundamental mechanism for breast cancer stem and niche cell maintenance」『第 73 回日本癌学会学術総会 International Sessions, Cancer Stem Cells』横浜（2014 年 9 月）	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		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
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・教授・福永理己郎
研究分担者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学・講師・藤井忍
受入担当教員	職名・氏名	大阪薬科大学・講師・藤井忍
【研究目的】	翻訳開始を制御する細胞内シグナル伝達系である mTOR 経路と Mnk 経路の相互作用における JSAP1/JLP の機能を明らかにすることを目的として本研究を計画した。近年、mTOR などの翻訳促進分子を標的とするラパマイシン類縁体 (Everolimus など) による治療が開始され、がんの進展における翻訳制御経路の解明が重要な課題となっている。本研究では、がん治療において mTOR 経路と Mnk 経路の両者に対する阻害剤を併用する試みの分子的基盤を解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】	がん細胞の増殖における Mnk1 の役割を解析するために、種々の細胞でヒト Mnk1 のノックダウンを行っている。ヒト Mnk1 に対する 2 種類の miR30-mimetic shRNA (Mnk1-5 および Mnk1-7) を設計し、HEK293T 細胞において内生 Mnk1 の発現を効率良く抑制することを確認した。現在、Tet-on 応答プロモーターを有する pTMP ベクターを利用して 2 種類の shRNA を培養細胞に導入し、誘導的に Mnk1 のノックダウンを行う系を構築している。 他方、米国の Dr. Platanias との共同研究によって、髄芽腫における mTOR 経路と Mnk 経路のクロストークについて解析し、Daoy 髄芽腫細胞をラパマイシンで処理すると eIF4E の Ser209 リン酸化が亢進することを見いだした。また、この mTOR 阻害によるフィードバックリン酸化は、MAP キナーゼや Mnk1 は関与しないにも関わらず、Mnk2 によって媒介されることも見いだした。さらに、Daoy 細胞を Mnks 阻害剤 CGP57380 で処理したり、siRNA によって Mnk2 をノックダウンすることによって、細胞の mTOR 阻害剤感受性が高まり、足場非依存性増殖能の低下が認められた。以上により、髄芽腫 Daoy 細胞では mTOR 阻害によるフィードバック制御を受けて MAP キナーゼ非依存的に Mnk2 を活性化する経路が存在することが明らかとなり、mTOR 阻害剤と Mnk 阻害剤の併用による髄芽腫治療の可能性が示唆された。Mnk2 が Mnk1 とは異なる機構で活性化されることから、これらの活性化機構と生理的機能の相違を明らかにする目的で、Mnk1 と Mnk2 のキメラ分子を作成した。現在、Mnk-ダブル KO 細胞を用いて Mnk1/2 の活性化動態を解析する細胞系を構築しており、この系を用いて解析を行う。 一方、MAP キナーゼの標的タンパク質の探索により、新たにプロテインホスファターゼ PTP9Q22 を同定した。PTP9Q22 は N 末端側にチロシンホスファターゼドメインを有し、C 末端側ドメインに複数の MAP キナーゼリン酸化部位が存在すると予想された。GST タグを結合させた PTP9Q22 を HEK293 細胞で発現させ、組換え PTP9Q22 を精製し、p-ニトロフェニルリン酸を基質に用いて酵素活性の測定を試みたが、有意な脱リン酸化活性は検出されなかった。現在、種々のホスホチロシン含有ペプチドを用いてホスファターゼ活性を検討中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 (1) Chevallard-Briet, M., Quaranta, M., Grézy, A., Mattera, L., Courilleau, C., Philippe, M., Mercier, P., Corpet, D., Lough, J., Ueda, T., <u>Fukunaga, R.</u>, Trouche, D., Escaffit, F.: Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. <i>Hum Mol Genet.</i> 23, 2120-2131 (2014) (2) Cendrowski, J., Sánchez-Arévalo Lobo, V. J., Sendler, M., Salas, A., Kuhn, J.-P., Molero, X., <u>Fukunaga, R.</u>, Mayerle, J., Lerch, M. M., and Real, F. X.: Mnk1 is a novel acinar cell-specific kinase required for exocrine pancreatic secretion and response to pancreatitis in mice. <i>Gut</i> 2014 Jul 18 (2014) (3) Eckerdt, F., Beauchamp, E., Belli, J., Iqbal, A., Su, B., <u>Fukunaga, R.</u>, Lulla, R. R., Goldman, S., and Platanias, L. C.: Regulatory effects of a Mnk2-eIF4E feedback loop during mTORC1 targeting of human medulloblastoma cells. <i>Oncotarget</i>, August 6, 2014, PMID: 25193863 (2014) (4) Panja D, Kenney JW, D'Andrea L, Zalfa F, Vedeler A, Wibrand K, Fukunaga R, Bagni C, Proud CG, Bramham CR.: Two-stage translational control of dentate gyrus LTP consolidation is mediated by sustained BDNF-TrkB signaling to MNK. <u><i>Cell Rep.</i></u> 2014 Nov 20;9(4):1430-45. doi: 10.1016/j.celrep.2014 【学会発表】 マウスロイシンリッチ α_2 グリコプロテインとシトクロム <i>c</i> の相互作用：中村舞音、松村有紗、矢野可央里、藤井忍、<u>福永理己郎</u>、池田潔、井上晴嗣、第 87 回日本生化学会大会、2P-098 (2014 年 10 月、京都) 【その他特筆事項】 なし	

研究区分		一般共同研究
研究課題		Hedgehog シグナルを介した癌転移制御機構に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学 原爆放射線医科学研究所・助教・上田健
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	近年の臨床検体を用いた遺伝子発現解析、ならびに遺伝子改変マウスを用いた解析から Hedgehog (Hh) シグナル経路活性化とヒト腫瘍(神経膠芽種、基底細胞癌、悪性黒色腫など)の病態との関連が示唆される。Hh リガンドがその受容体 Patched に結合すると、転写因子 GLI ファミリー(glioma-associated oncogene family zinc finger 1-3)の細胞質から核内へ移行が促進され、標的遺伝子の発現が誘導される。GLI ファミリーには、活性型 (GLI-1, 2)、抑制型 (GLI-3) が存在し、各々の GLI ファミリー遺伝子の機能ならびに標的遺伝子群を明らかにすることは、Hh シグナルを介した癌進展機構の解明及びこの経路を標的とした治療法の開発にも有用であると考えられる。本研究では、特に、癌転移に着目し、GLI の下流で制御される標的遺伝子群の網羅的な解析を行う。	
【研究内容・成果】	低転移能を有するマウスメラノーマB16F0細胞株に、活性型GLIのひとつGLI-1を安定的に発現させた株を善岡研究室において樹立し、解析を行った結果、GLI-1高発現株では転移能が亢進するという知見を得た。 そこで本研究では、GLI-1高発現による転移能亢進の分子基盤について明らかにすることを目的とし、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析を行った。得られた遺伝子発現データを基にGene set enrichment analysis (GSEA) 解析を用いて、発現データ中で特定の機能をもつ遺伝子群がどのように変動しているかについて検討した。その結果、GLI-1高発現株では、低酸素または化合物 Dimethylxaloylglycineにより誘導される低酸素応答遺伝子群の発現上昇や、Hypoxia inducible factor 1A (HIF1A), HIF2Aの標的遺伝子群の発現の上昇が有意に認められることが明らかとなった (図、表参照)。 低酸素応答は、癌の浸潤・転移能の亢進と密接に関係していることが知られており、これら低酸素応答遺伝子群の発現上昇がGLI-1による癌転移能亢進に促進的に機能している可能性がある。これら遺伝子群の発現上昇が細胞機能に及ぼす影響、ならびにGLI-1依存的な低酸素応答遺伝子の発現制御機構の解析を進める。また他のGLIファミリー分子が、転移能に及ぼす影響についても検討することを計画している。	
【成果等】	【主な論文発表】 Chevillard-Briet M, Quaranta M, Grézy A, Mattera L, Courilleau C, Philippe M, Mercier P, Corpet D, Lough J, Ueda T, Fukunaga R, Trouche D, Escaffit F. "Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling." Hum Mol Genet. 2014;23(8):2120-31. 【学会発表】 上田 健, 長町安希子, 中田雄一郎, 山崎憲政, 松井啓隆, 本田浩章 Disease-associated EED Ile363Met mutation increases susceptibility to hematologic malignancies 第 87 回日本生化学会大会 (ポスター) 2014.10.16 【その他特筆事項】 なし	

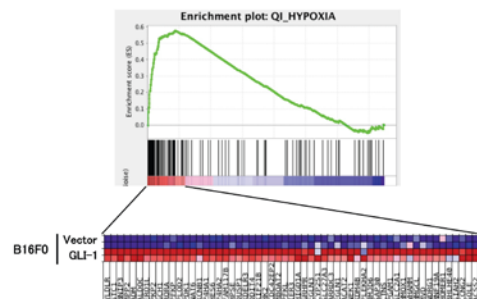
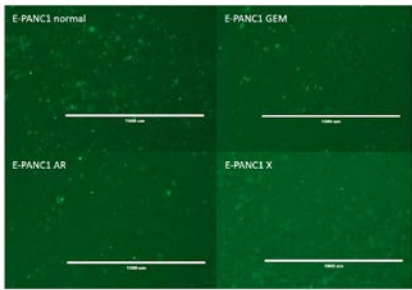
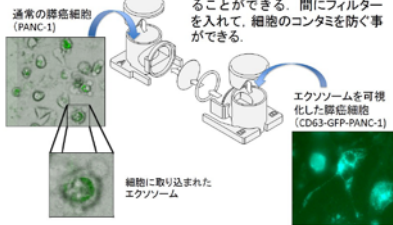


図 GLI-1高発現株で発現上昇が認められた遺伝子とQi et al. Cancer Cell 2010 による低酸素応答遺伝子群との発現の比較

表 GLI-1高発現株で有意な発現上昇が認められた低酸素応答遺伝子群を含む主なGene Set (Molecular Signature Database (MSigDB))

Gene set	Size	Normalized enrichment score	Nominal p-value	False discovery rate
Q1_HYPOXIA	114	2.507	0.000	0.00000
MENSE_HYPOXIA_UP	81	2.398	0.000	0.00000
FARDIN_HYPOXIA_11	26	2.297	0.000	0.00028
KIM_HYPOXIA	22	2.279	0.000	0.00021
ELVIDGE_HYPOXIA_BY_DMOG_UP	102	2.245	0.000	0.00038
ELVIDGE_HIF1A_AND_HIF2A_TARGETS_DN	81	2.220	0.000	0.00137

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		膵がんエクソソームと GSK3 β の交絡的病理作用の解明とがん治療薬スクリーニングへの応用
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎猛夫
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・教授・石垣靖人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・研究員・辰野貴則
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	これまでの共同研究により我々は、glycogen synthase kinase (GSK) 3βが消化器癌に共通する治療標的であることを提唱してきている。また近年、癌細胞が分泌するエクソソーム(exosome) が癌の転移において重要な役割を担っている可能性が示唆されている。なかでも膵癌は強度の浸潤、転移性と各種治療に抵抗する難治癌であるため、我々が樹立したエクソソーム可視化膵癌細胞株と新たに開発した連結式培養プレート(NICO-1)を用いて、エクソソームの動態及びエクソソームが周囲の細胞に与える影響と、GSK3βを含む各種キナーゼの阻害薬等の影響について検討することを目的とした。	
【研究内容・成果】	 NICO-1: New Intercellular communication observation tool 特徴: 上清を共有しながら細胞を培養でき、両者を同時に観察することができる。間にフィルターを入れて、細胞のコンタミを防ぐ事ができる。  通常の膵癌細胞 (PANC-1) エクソソームを可視化した膵癌細胞 (CD63-GFP-PANC-1) 細胞に取り込まれたエクソソーム エクソソームの合成・分泌機構については、まだ初期段階にあり、十分には分子機構が理解されていない。今までに、種々の細胞膜小胞形成に関わる endosomal-sorting complex required for transport (ESCRT) を形成する一連の分子群 (Raiborg C, et al, Nature 2009) や、エクソソームの膜成分であるセラミド合成の律速酵素 neutral sphingomyelinase 2 (Trajkovic K et al. Science 2008)、細胞内の膜小胞輸送に関わる Rab GTPase ファミリー分子群 (Ostrowski M, et al. Nat Cell Biol 2010)、ヘパラン硫酸分解酵素である heparanase (Thompson CA et al. J Biol Chem 2013) などの分子が同定されている程度である。そこで我々は、e-PANCI を用いて、まず各種薬剤投与下でのエクソソームの動態について観察を行った。その結果、薬剤非投与化と比較して、5FU などの薬剤投与状態ではエクソソームの動きが活発となった。一方、GSK3β阻害剤 (AR-A014418) 投与下ではエクソソームの動きがほとんどみられない状態となったことから、エクソソームの動態に関係する分子と GSK3β の関与が示唆された。また、GSK3β 阻害剤投与下では、エクソソームの形成数が低下したことから、エクソソームの形成にも影響する可能性が示唆された。つぎに、薬剤スクリーニングの過程で、ある薬剤 X の投与時によりエクソソーム顆粒が消失し、細胞内にびまん性に GFP が分布したことから、薬剤 X はエクソソームの形成維持過程と密接に関係していることが示唆された (図上)。また、NICO-1 を用いた実験では、エクソソームがフィルターを通り抜けて細胞内に取り込まれる状況を観察することができた (図下)。今後、これらの結果をもとにさらなる分子機構を解析する。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし (論文作成準備中)
	【学会発表】	なし (2015 年度に予定)
	【その他特筆事項】	なし

研究区分		一般共同研究
研究課題		質量分析型迅速がん診断システムを用いた大腸がんの新規診断法の開発と発がんメカニズムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学・助教・吉村健太郎
	所属・職名・氏名	山梨大学・教授・竹田扇
	所属・職名・氏名	早稲田大学・招聘研究員・田邊國士
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	本研究では山梨大学と島津製作所で共同開発した極微量の検体を大気圧下で質量分析が可能な装置 (PESI-2020) を用いて、大腸がん検体の迅速診断システムを構築することを目的とする。 またシステム開発の中で得られたデータベースに存在する、大腸の非がん部粘膜及び、がん組織のマススペクトルを統計解析することで、大腸がん特異的な生体分子のプロファイルを炙り出し、発がんメカニズムの解明や、治療法開発の基盤を形成することを目的とする。	
【研究内容・成果】	得られた成果と今後の展望 (1) 大腸組織の測定条件検討：大腸検体からイオン強度の高いマススペクトルを再現性良く取得可能な条件の検討を行った。種々の溶媒を検討したところ、約 2 mm 角の組織を 100 μl の 50%エタノールで破碎後、遠心上清を測定することで目的とするクオリティーのマススペクトルを得ることが可能となった。 (2) 多数検体の測定とデータベースの構築：79 患者より得られた非がん部及びがん部検体を質量分析し、1580 スペクトルからなるデータベースを構築した。また、種々の患者情報をラベル化し、マススペクトルに連結した関係データベース (RDB) を構築した。RDB が構築されたことで、上記 2 つの目的夫々に応じた解析が可能となった。 (3) 統計解析：今回得られたマススペクトルデータは一つが 20,000 項目からなるため、統計解析を用いて非がんとかんの差異を比較した。統計解析を行う目的は大きく二つに分けられ、一つはマススペクトルのデータを基に、非がんとかんを判別 (診断) することである。もう一方は、がん部で特異的に変化するピーク (がんマーカー) の検出である。 ・がん診断：得られたマススペクトルを主成分分析で比較したところ、非がん部とがん部それぞれがクラスターを形成することが明らかとなった (図 1)。現在更に判別分析を用いて、盲検検体の非がん/がんを診断するシステムの構築を進めている。 ・マーカー探索：非がん部およびがん部より得られたマススペクトルを比較したところ、がん部特異的に発現量が増加/減少するピークを見いだした (図 2)。今後は有意差検定を行い、がんマーカーとなりうるターゲットピークを決定し、さらに分子の同定を試みる。 図1、スペクトルの主成分分析 非がん部とがん部それぞれが特徴的なクラスターを形成している 図2、非がん部とがん部69検体ずつの平均化スペクトル比較	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		大腸がんにおける Wnt 経路標的分子 CRD-BP の分子病理学的特性と病態の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・教授・小坂健夫
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・准教授・木南伸一
	所属・職名・氏名	金沢医科大学・講師・藤田秀人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学・大学院・大西敏雄
	所属・職名・氏名	金沢医科大学・大学院・富田泰斗
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	大腸がんの分子病態のなかでも Wnt 経路の活性化は重要であるが、そのがん病態における役割は研究途上である。本研究では、これまでの共同研究で集積してきたがん組織検体とデータをもとに、がん組織におけるβ-カテニン/Tcf 複合体の転写標的分子 CRD-BP (coding region determinant- binding protein) の発現を調べ、既知のがん関連分子の異常や臨床病理学的因子などを総合的に比較解析する。これにより、CRD-BP が大腸がんの病態、進行度や治療後経過の分子指標となるかを検討し、大腸がんにおける Wnt 経路の病理作用の一端を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】	【背景】 大腸癌細胞において CRD-BP は β-catenin と IκBα (inhibitor of nuclear factor-κB α) に共通の E3 ユビキチン連結酵素 β-TrCP1 (β-transductin repeats-containing protein)、c-myc、IGF-II (insulin-like growth factor-II) の mRNA を安定化するトランス因子であり、β-catenin により発現誘導されることを見出した。これまでに、少数例の大腸癌や卵巣癌を対象に CRD-BP の発現解析が報告されているが、癌病態との関連は明らかではない。本研究では、ヒト大腸癌における CRD-BP の発現が複数の細胞増殖経路を誘導すると仮定し、mRNA レベルでの分子発現の関連性や臨床病理学的因子と比較解析することで、CRD-BP が癌病態の分子指標になるかを検討した。 【方法】 ヒト大腸癌摘出検体 74 例の腫瘍及び正常粘膜の新鮮組織検体から cDNA を調製し、RT-PCR を用いて標的遺伝子 CRD-BP、β-TrCP1、c-myc と IGF-II の発現解析を実施し、GAPDH を内部対照としたΔΔCt 法により相対的に評価した。統計解析は T 検定、χ²検定を用いて解析し、p<0.05 を有意差ありとした。 【結果】 大腸癌において標的遺伝子別の発現高値症例は CRD-BP: 23%、β-TrCP1: 28%、c-myc: 21%、と IGF-II: 18%であった。分子発現の関連性は、CRD-BP と β-TrCP1 (p=0.004)、c-myc (p= 0.0006) の発現に有意差を認め、CRD-BP 発現高値群で β-TrCP1 と c-myc は高値となる相関が認められたが、IGF-II との相関関係はなかった。臨床病理学的因子との解析では、β-TrCP1 が年齢で p= 0.01 と高齢者では発現高値となり、進達度で p=0.02 と SS 以深と進行した症例で高値であった。IGF-II は直腸癌で p=0.01 となり、結腸癌よりも直腸癌で高値となった。CRD-BP と c-myc は病理学的因子との関連性は認められなかった。 【まとめ】 大腸癌において β-catenin の活性化により誘導される CRD-BP は、β-TrCP1 と c-myc の発現を介して腫瘍の増殖を促進すると考えられた。そして、原発腫瘍における CRD-BP の発現は深達度や病期の分子指標となりうる可能性があることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. 舟木洋, 三浦聖子, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫: 進行・再発食道癌における Biweekly Docetaxel / Nedaplatin 併用療法の検討, 癌と化療, 41:2384-2386, 2014. 2. K.Matsunaga, R.Hayashi, T.Otsuka, D.Kaida, N.Ueda, T.Kosaka, T.Arisawa: A case of IgG4-related disease complicated by duodenal bulbitis with IgG4-positive plasma cell infiltration, Endoscopy, 46:E408-E410, 2014. 3. 大西敏雄, 上田順彦, 小坂健夫, 中田聡子, 湊宏: 無治療で 1 年 4 カ月の経過観察後に治癒切除し得た intraductal papillary neoplasm of bile duct (IPNB) の 1 例, 胆道, 28:81-88, 2014. 4. 上田順彦, 甲斐田大資, 富田泰斗, 大西敏雄, 舟木洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 小坂健夫: 長期生存が得られた 16 番リンパ節転移陽性 IPMN 由来浸潤癌の 1 例, 癌と化療, 41:2202-2204, 2014.	

	【学会発表】 1. Tomita Y, Miura S, Fujita J, Morioka E, Kaida D, Oonishi T, Oono Y, Noguchi M, Funaki H, Fujita H, Kinami S, Nakano Y, Ueda N, Kosaka T, Minamoto T. Expression and clinical relevance of CRD-BP in colorectal cancer. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis: Symposium 2 “New Frontier in Cancer Genome Research”, November 13th~14th, 2014, Hotel Nikko Fukuoka, Fukuoka, Japan. 2. 富田泰斗, 三浦聖子, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫, 源 利成. 大腸癌における CRD-BP の発現と臨床病理学的因子との関連. 第 25 回日本消化器癌発生学会総会: シンポジウム2「がんゲノム研究の新展開」, 2014 年 11 月 13 日, 14 日, ホテル日航福岡, 福岡. 3. T.Kosaka, J.Fujita, Y.Tomita, T.Onishi, S.Kinami : A Conversuin Gastrectomy for Patients with Initially Unresectable Stage VI Gastric Cancer Provides Survival Benefit., 11th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, (Taipei, ' 14.05). 4. Y.Tomita, S.Kinami, S.Miura, J.Fujita, E.Morioka, D.Kaida, T.Onishi, Y.Ono, M.Noguchi, H.Funaki, H.Fujita, Y.Nakano, N.Ueda, T.Kosaka, T.Minamoto : The Expression and the Clinical Role of the CRD-BP, the Transcriptional Target of the β-Catemin in the Wnt Signaling Pathway, in the Colorectal Cancer, 11th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, (Taipei, ' 14.05). 5. 富田泰斗, 藤田秀人, 藤田純, 甲斐田大資, 大西敏雄, 舟木洋, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫, 黒瀬望, 湊宏: 当院における内分泌細胞腫瘍の 7 例の検討, 第 80 回大腸癌研究会, (東京, ' 14.01), 第 80 回大腸癌研究会プログラム・抄録集, 88, 2014. 6. 富田泰斗, 藤田秀人, 三浦聖子, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大野由夏子, 大西敏雄, 野口美樹, 舟木 洋, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫: 当院における大腸癌肺転移切除症例の検討, 第 36 回日本癌局所療法研究会, (八尾, 14.06), 第 36 回日本癌局所療法研究会プログラム・抄録集, 96, 2014. 【その他特筆事項】 なし
--	---

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		Nestin のリン酸化制御による、膵癌分子標的治療の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター病理診断科・医長・松田陽子
研究分担者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター病理診断科・部長・新井富生
	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター老年病理学研究チーム・部長・田久保海誉
	所属・職名・氏名	日本医科大学統御機構診断病理学・准教授・石渡俊行
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	膵癌は極めて予後不良であり、新規分子標的治療薬の開発が望まれている。申請者らは、中間径フィラメントタンパク質の nestin について、膵癌の治療標的としての有用性を検討し、浸潤性膵管癌の 30% の症例で nestin の発現を細胞質内に認め、その発現が膵癌の浸潤や転移と関連することを明らかにした。Nestin は、細胞骨格タンパク質として細胞の形態や運動性に関与するとともに、様々なタンパク質の発現量や活性化、翻訳後修飾に関与することが報告されている。本研究では、膵癌における nestin のリン酸化を抑制することで nestin の機能を効果的に制御することが可能になるとの仮説に基づき、nestin のリン酸化制御による新たな膵癌治療法を開発を目指す。	
【研究内容・成果】	ヒト膵癌培養細胞株において、リン酸化 nestin は M 期の細胞に強く発現を認め、その発現は細胞増殖と関連を示した。Nestin 発現ベクターと、nestin リン酸化部位に変異を加えてリン酸化を阻止したベクターを作成し、膵癌培養細胞株に遺伝子導入した。Wild type の nestin 発現ベクターを遺伝子導入すると増殖と遊走、浸潤が亢進した。一方、リン酸化部位に変異を加えた nestin を遺伝子導入した細胞では、増殖、遊走、浸潤、転移が抑制された。リン酸化 nestin を制御する上流の機構について検討したところ、cyclin dependent kinase, AKT, Aurora の阻害剤にて nestin のリン酸化が阻害された。以上の結果より、リン酸化 nestin を制御することは膵癌の分子標的として有用な可能性が示された。以上の結果は論文投稿中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Hagio M, Arai T. Inhibition of nestin suppresses stem cell phenotype of glioblastomas through the alteration of post-translational modification of heat shock protein HSPA8/HSC71. Cancer Lett. 2015 357:602-11. 2. Matsuda Y, Ishiwata T, Izumiyama-Shimomura N, Hamayasu H, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Nakamura K, Ishikawa N, Aida J, Takubo K, Arai T. Gradual telomere shortening and increasing chromosomal instability among PanIN grades and normal ductal epithelia with and without cancer in the pancreas. PLoS One. 2015 10:e0117575.	
	【学会発表】 松田陽子、石渡俊行、吉村久志、源利成、新井富生。膵癌におけるリン酸化 nestin の役割と抑制効果。日本癌学会シンポジウム・共同利用共同拠点シンポジウム. 2015. 金沢	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん細胞の上皮・間葉転換におけるヒストンの翻訳後修飾の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京工業大学・教授・木村宏
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	本共同研究では、がんに関与するヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析し、エピゲノム異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明することを目的とする。そのために、申請者らが開発したヒストンの翻訳後修飾特異的、修飾部位特異的なモノクローナル抗体を用いて、ChIP sequence 法などによるエピゲノム解析と、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン翻訳後修飾の動態解析を行う計画である。特に、がんの悪性進展過程に重要な上皮・間葉転換（EMT）における新しいエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目指している。	
【研究内容・成果】	ヒストン H3 のメチル化修飾部位のうち、遺伝子の発現制御に重要な 4 番目の Lys 残基 (K4)、および K9、K27、K36、K79 について、それぞれのメチル化修飾の状態を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を遂行した。また、アセチル化、リン酸化など他の翻訳後修飾とメチル化修飾が併存する状態を認識する抗体についても開発を進行した。作製した抗体を用いて、正常細胞とがん細胞、あるいは悪性度の異なるがん細胞を比較しながら、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン修飾のダイナミクスを解析した。特に、がんの悪性進展過程に重要な上皮・間葉転換（EMT）のプロセスにおいて、ヒストンのメチル化修飾の変化を調べ、その分子メカニズムを解析することを試みた。 がん細胞の悪性進展過程のモデルとして、A549 肺がん細胞株が TGF-β 処理によって、上皮・間葉転換（EMT）を誘導される実験系に着目した。これらの特異的修飾認識抗体を用いて、EMT 誘導前後の個々の細胞レベルでのヒストン H3 の翻訳後修飾の変化を調べた。その結果、ヒストン H3K27 のトリメチル化 (me3) レベルの著しい上昇を検出することができた。次に、ヒストン H3K27 メチル化修飾を担う酵素群である PRC2 および PRC1 複合体の細胞内動態（複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など）の解析をスタートした。これまでに、PRC2 複合体の構成要素である EED と、複合体のアクセサリ因子である JARID2 が、EMT 誘導プロセスにおける PRC2 の標的遺伝子へのリクルートとヒストンメチル化の制御に、重要な役割を果たしていることを見いだした。今後も、こうした酵素複合体の解析を通じて、EMT プロセスにおける動的クロマチン構造制御の分子基盤を解明していきたいと考える。	
【成果等】	【主な論文発表】 Hieda M, Matsuura N, and Kimura H. Histone modifications associated with cancer cell migration and invasion. <i>Methods Mol Biol</i> 1238, 301-317 (2015). Hayashi-Takanaka Y, Stasevich TJ, Kurumizaka H, Nozaki N, and Kimura H. Evaluation of chemical fluorescent dyes as a protein conjugation partner for live cell imaging. <i>PLoS One</i> 9, e106271 (2014) Stasevich TJ, Sato Y, Nozaki N, and Kimura H. Quantifying histone and RNA polymerase II post-translational modification dynamics in mother and daughter cells. <i>Methods</i> 70, 77-88 (2014)	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

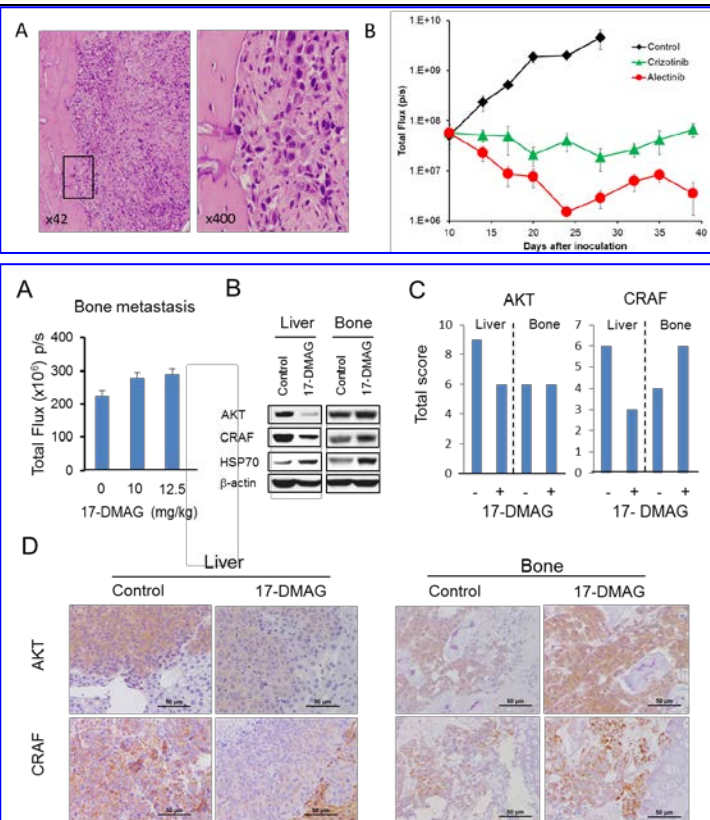
研究区分	一般共同研究
研究課題	乳癌発症に伴うエピゲノム変化の解析
研究代表者	所属・職名・氏名 早稲田大学・教授・仙波憲太郎
受入担当教員	職名・氏名 教授・鈴木健之
【研究目的】	乳癌におけるゲノムの変化では、点変異や転座とともに「遺伝子増幅」が普遍的に観察される。複数の遺伝子が増幅する遺伝子増幅では、塩基配列情報や変異検出頻度だけから、原因遺伝子を特定することは困難である。申請者らは、乳癌組織の遺伝子増幅領域（アンプリコン）からドライバー遺伝子とサポーター遺伝子を体系的に同定する新しいシステムを構築し、細胞レベルでの様々な遺伝子機能評価系を確立してきた。本共同研究では、アンプリコン候補遺伝子の過剰発現を特徴とする <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 遺伝子評価系を利用し、遺伝子増幅による乳癌の発症および悪性化の過程をエピゲノム変化の側面から解析することを目的とする。
【研究内容・成果】	我々は <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> の癌化能の様々な評価系を用いて、乳癌に観察される遺伝子増幅領域（アンプリコン）から、複数のがん遺伝子候補（<i>ADORA2B</i>, <i>TBX2</i>, <i>RARA</i> など）を同定することに成功した。これらの遺伝子が発癌を誘発する過程で、細胞にどのようなエピゲノム変化を誘導するのかを調べる研究計画を立案した。具体的には、がん遺伝子を導入する前後の細胞において、DNA メチル化アレイおよびヒストン修飾抗体による ChIP シークエンス法などを用いて、DNA のメチル化とヒストンの翻訳後修飾の変化をゲノムワイドに調べ、乳癌発症・悪性化におけるエピゲノム異常を包括的に解析することにした。また、がん遺伝子を導入した乳癌モデルマウスから生じた乳癌についてもエピゲノム変化の情報を収集して、比較解析を行うことにした。さらに、エピジェネティック制御に関与する数十種類の酵素群（DNA メチル化・脱メチル化酵素、ヒストンメチル化・脱メチル化酵素など）の発現や動態の変化を、定量 PCR や特異的抗体による免疫染色、ChIP 法で解析することで、乳癌発症および悪性進展をエピジェネティック制御機構の破綻という視点から解析した。 これまでの実験から、エピジェネティック制御に関与する数十種類の酵素群のうち、悪性度の高い乳癌として知られるトリプルネガティブ型乳癌で顕著に発現が変化する酵素や、低酸素刺激後の乳癌細胞株において発現変化が顕著に誘導される酵素を同定した。乳癌細胞株において、これらの酵素の発現を強制発現やノックダウンによって変化させると、癌幹細胞様の性質を有するスフィアの形成能に影響を与えることを見いだした。こうした結果をふまえて、乳癌の悪性進展過程における酵素の役割と分子レベルでの作用機序について、さらに詳細な解析を進行中である。
	【主な論文発表】 ・ Doi A., Ishikawa K., Shibata N., Ito E., Fujimoto J., Yamamoto M., Shiga H., Mochizuki H., Kawamura Y., Goshima N., <u>Semba K*</u>, Watanabe S., Enhanced expression of retinoic acid receptor alpha (RARA) induces epithelial-to-mesenchymal transition and disruption of mammary acinar structures, <i>Mol Oncol.</i> 2015 Feb;9(2):355-64.(*:corresponding author) ・ Ito-Kureha T., Koshikawa N., Yamamoto M., <u>Semba K.</u>, Yamaguchi N., Yamamoto T., Seiki M., Inoue J., Tropomodulin 1 expression driven by NF-κB enhances breast cancer growth, <i>Cancer Res.</i> 2015 Jan 1;75(1):62-72. 【学会発表】 ・ Ishikawa K., <i>et al.</i>, Retinoic Acid Receptor Alpha (RARA) Overexpression Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Malignant Tumor Progression with <i>ERBB2</i> in Mammary Gland, POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF CELL SIGNALING, San Diego, USA ・ Matsui A., <i>et al.</i>, Identification and functional analysis of HNF1B as a Novel Oncogene, POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF CELL SIGNALING, San Diego, USA ・ 松井貴香 他, 上皮細胞を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定とその機能解析, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜 ・ 公地将大 他, 17q23 アンプリコンにおける新規トランスフォーミング遺伝子 TBX2 の機能解析, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜 ・ 三上紘史 他, SLUG と SOX9 による乳腺上皮細胞の幹細胞化に伴う p53 経路の活性化, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜 ・ 小林 舜 他, 遺伝子機能解析に用いるマウス乳腺組織構築系の開発, 第 37 回日本分子生物学会年会、横浜

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	・公地将大 他, 17q23 アンプリコンにおける推定がん遺伝子 TBX2 のトランスフォーミング活性, 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜 ・細川義人 他, In vivo スクリーニングによるがん遺伝子の同定, 第 73 回日本癌学会学術総会、横浜 ・藤元次郎 他, プリン受容体ファミリー遺伝子 P2Y6 の ERBB2 に依存した細胞癌化能の同定及び解析, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、仙台 ・伊原辰哉 他, ヒト完全長 cDNA クローンを用いた <i>in vivo</i> スクリーニングシステムの確立とそれを用いたがん遺伝子の同定, 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、仙台 ・松井貴香 他, 上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析, 第 2 回低酸素研究会
	【その他特筆事項】 なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		分子標的薬耐性を克服する治療の安全性の前臨床評価
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科探索病理・特任准教授・西原広史
研究分担者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科探索病理・特任助教・王磊
	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科腫瘍病理・研究員・毛利普美
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍内科研究分野・矢野聖二
【研究目的】	がん治療の現場において、分子標的治療薬の薬剤耐性並びに副作用の克服は重要かつ喫緊の課題となっている。我々は、昨年度までの本共同研究によって、Gefitinib 及び Crizotinib 併用による副作用出現を検証するマウスモデルの樹立に成功した。今年度はさらにこのモデルのヒト組織との整合性や、治療効果予測及びその予防に関する病理学的因子の探索を行うことで、治療抵抗性の腫瘍に対する革新的治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】	【研究方法的概要と結果】 1. EML4-ALK 融合遺伝子を発現している肺癌細胞株 A925L を用いて、分子標的薬である crizotinib, alectinib の有効性に対する病理学的評価を行った。具体的には胸腔内に腫瘍細胞は播種させて、その後の骨転移や脳転移の発症に対するこれらの薬剤の有効性を病理学的に評価した。その結果、alectinib の方が crizotinib に比して有効な腫瘍転移抑制効果を発揮することが判明した（上図）。 2. 小細胞肺癌の細胞株 SBC-5 を用いて、HSP90 阻害剤である 17-DMAG の組織特異的な転移抑制効果の病理学的検討を行った。In vivo imaging model を用いた検討の結果、骨及び肝臓ともに転移を有効に抑制することが示され、その機序として肝臓においては CRAF と AKT の活性の低下、骨においては破骨細胞の活性化が関与していることが示唆された（下図）。 上記の二つの共同研究の成果は、1 は既に論文化され、2 については現在投稿中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Cancer Sci. 2015 Jan 8. doi: 10.1111/cas.12600. [Epub ahead of print]	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	



平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		TKI 抵抗性慢性骨髄性白血病及びフィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病におけるエピジェネティック制御機構の解明と新規治療戦略構築
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科人間科学専攻創薬イノベーション研究室・准教授・上久保靖彦
研究分担者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻血液・生体防御学研究室・教授・足立壮一
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻血液・生体防御学研究室・修士・森万純
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻血液・生体防御学研究室・修士・上山郁美
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻血液・生体防御学研究室・修士・野路由依
受入担当教員	職名・氏名	准教授・仲一仁
【研究目的】	本研究では ○CML、Ph1ALL 白血病における RUNX1-HAT コンプレックス：p300、HIPK2 によるエピジェネティクス修飾の重要性の解明 ○RUNX1-HAT コンプレックス抑制による造血器悪性腫瘍 RAS Gene Module (RGM) 抑制プロファイルの解明 ○CML、Ph1ALL 白血病における腫瘍ニッチ環境下増殖機構抑制法を解明 ○造血器悪性腫瘍共通治療薬候補としての HAT Inhibitor、HIPK2 Inhibitor 開発を中心に新規エピジェネティック薬剤開発及び独創の治療戦略提唱することを研究目的とする。	
【研究内容・成果】	知的財産権に係る内容であり、下記詳細は秘匿させていただきます。 CML、Ph1ALL 及び TKI 耐性 CML、TKI 耐性 Ph1ALL 細胞株を用いた研究：A 抑制剤、B 抑制剤を各種細胞株に投与し、RAS Gene Module 構成経路（古典的 MAPK 経路、PI3-Akt 経路、JAK-STAT 経路、その下流の C-Myc、JUN、Fos、FOXO など）の蛋白発現プロファイル、リン酸化ステータスを解明した。：投稿準備中 A、B 抑制剤の投与後、タイムコースでサンプリングを行い、Micro-Array にて Heatmap 解析を行った。 TKI 耐性 BCR-ABL 白血病：A、B 抑制により BCR-ABL ヒュージョン蛋白自体及び C を効率的に消去できる。 TKI 耐性は BCR-ABL ポイントミューテーションによるが、蛋白自体の消去が可能であり、耐性メカニズムを超えたコンセプトである（特許申請準備中） マウスの骨髄にレトロウイルスにて、p210BCR-ABL (CML)、T351I-p210BCR-ABL (TKI 耐性 CML)、p190BCR-ABL (Ph1ALL)、PML-PAPA (APL) 導入モデルをセットアップ中、ワイルドタイプマウスに移植することにより TKI 耐性 CML マウスモデル及び Ph1ALL マウスモデル、ATRA 耐性 APL マウスモデルを作成。 申請者が独自で新規にスクリーニングした A 抑制剤及び B 抑制剤、TKI 抑制剤 (Imatinib) を投与し、治療効果を比較する (BCR-ABL 白血病)。	
【成果等】	【主な論文発表】 Potent p300 inhibitor C646 overcomes resistance to tyrosine kinase inhibitors in acute lymphoblastic leukemia. Masumi Mori, Ken Morita, Yui Noji, Ayaka Ikeuchi, Hidemasa Matsuo, Hiroshi Ito, Kazuhito Naka, Toshio Kitamura, Kosei Ito, Paul Liu, Yasufumi Kaneda, Yasuhiko Kamikubo and Souichi Adachi BBRC 投稿準備中	
	【学会発表】 1:エピジェネティック制御による遺伝子変異阻害メカニズムの解明と難治性急性骨髄性白血病個別化治療法の開発」京都大学大学院医学研究科人間健康科学専攻 ○野路 由依、矢野 礼佳、上久保 靖彦、足立 壮一 第 29 回京都がん研究会 京都 平成 27 年 3 月 20 日 2:Inhibition of p300 induce cell cycle arrest and apoptosis in ph⁺ALL cells ○Masumi Mori, Yasuhiko Kamikubo, Ayaka Ikeuchi, Yui Noji, Hiroshi Itoh, Souichi Adachi 第 77 回日本血液学会学術集会 平成 27 年 10 月 22 日~23 日	
	【その他特筆事項】 なし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		白血病幹細胞の in vivo 治療マウスモデルおよび標的薬剤に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学・講師・南陽介
受入担当教員	職名・氏名	准教授・仲一仁
【研究目的】	急性骨髄性白血病（Acute Myeloid Leukemia; AML）細胞株やプライマリー細胞を、骨髄ストローマ細胞共培養や免疫不全マウス（NOG、NOD マウス）へ移植・継代する系を用いて、抗がん剤やキナーゼ阻害剤に対する微小環境における治療抵抗性モデルを樹立する。詳細な機序について、遺伝子発現プロファイルや阻害剤パネルを用いた網羅的解析等を行い、ヘッジホッグ（Hedgehog; Hh）シグナル伝達経路の病態関与を含めて解明する。Hh シグナル上の Smoothened（SMO）標的阻害剤は、AML を含む造血器腫瘍において臨床試験が進行中だが作用機序は明確ではなく、妥当なバイオマーカーの探索を行なうとともに、スクリーニングから得られた新規分子標的薬候補を含めて、治療抵抗性克服療法としての基盤を創出する。	
【研究内容・成果】	従来の白血病治療は、増殖能が亢進した芽球細胞を死滅させることを目標に進められてきたが、多くの症例において一時的な寛解が得られるのみで長期の治癒が得られ難い状況である。白血病幹細胞（leukemic stem cells; LSC）が骨髄微小環境下において治療抵抗性を有することが示され、その機序としては、分子の発現異常・薬物動態・生存シグナルの亢進・oncogene-addiction の差異・ニッチからのシグナルなどが複雑に絡み合っていると考えられている。これらの特性を共有する細胞群に対する有効な治療法が、急性骨髄性白血病（AML）に対する突破口となり得ると期待されている。ヘッジホッグ（Hedgehog; Hh）シグナル伝達経路は、胎生期の臓器形成において重要な機能を担うとして研究が進められてきたが、近年、複数の癌腫におけるアベラントな活性化や、LSC の維持に対する関わりが示されつつある。Hh シグナルを制御する膜蛋白 Smoothened（SMO）を標的とする阻害剤は、基底細胞癌などにおいて治療効果を示し、AML に対する早期臨床試験においても耐容性や有望な効果が示されているが（Jamieson, <i>et al.</i> ASH, 2011）、詳細な作用様式・治療効果の裏付け（principle of concept; POC）などについては明らかにされていない。本研究は、AML における Hh シグナルの病態関与を解明するとともに、新規 Hh 阻害剤 PF-913 の効果と POC の検証を目的として進められた、臨床検体や細胞株を含む基礎実験系を用いたトランスレーショナル研究である。 プライマリーAML 細胞の CD34 陽性細胞分画（免疫不全マウスで高い白血病構築能を有する）において、Hh シグナルの活性上昇が示された。その分画に高頻度な静止期細胞が PF-913 投与によって減少し、コロニー形成や免疫不全マウス移植系における Hh シグナル阻害が白血病再構築能を低下させることが示され（正常臍帯血細胞への毒性は伴わず）、網羅的な DNA マイクロアレイ解析やメタボローム解析によっても裏付けられた。また、PF-913 投与によって、静止期細胞の細胞周期回転が促され Ara-C との併用効果が認められることや、ストローマ共培養下における治療抵抗性が克服されることが示された。本研究の結果より、Hh シグナルに対する分子標的療法が、耐性・残存 AML に対する新たな治療戦略となり得る可能性が示唆された。	

【成 果 等】	【主な論文発表】 1) Treatment with Hedgehog inhibitor, PF-913, attenuates leukemia-initiation potential in acute myeloid leukemia cells <u>Y Minami</u>, N Fukushima, S Kakiuchi, H Minami, and T Naoe <i>Annals of Oncology</i>, 25 (Suppl 5), 2014 2) Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoforms expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia H Shinohara, K Taniguchi, M Kumazaki, N Yamada, Y Ito, Y Otsuki, B Uno, F Hayakawa, <u>Y Minami</u>, and T Naoe <i>Cancer Letter</i>, 360 (2015): 28-38, 2015
	【学会発表】 1) Treatment with Hedgehog inhibitor, PF-913, attenuates leukemia-initiation potential in acute myeloid leukemia cells <u>Y Minami</u>, N Fukushima, H Minami, A Sadarangani, C Jamieson, and T Naoe <i>AACR Annual Meeting</i> , San Diego, USA, 2014 2) 急性骨髄性白血病に対するヘッジホッグ阻害剤 PF-913 による効果とバイオマーカーの検討 <u>南陽介</u> 福島庸晃 鍬塚八千代 早川文彦 垣内誠司 南博信 C Jamieson 清井仁 直江知樹 第 76 回日本血液学会総会（一般口演）、大阪、2014 年
	【その他特筆事項】 現在、主な成果に関して、論文投稿中（<i>PNAS</i>）

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		既存薬剤ライブラリーを用いた抗グリオーマ幹細胞効果を有する薬剤の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・教授・中田光俊
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・董宇
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・北林朋宏
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	悪性グリオーマは、人類に残された最も悪性の腫瘍の一つであり、本疾患の克服は医学上の重要課題である。とりわけ本腫瘍の予後を改善させるには新たな化学療法の確立が急務であると言える。新規薬物治療開発においては <u>ドラッグリポジショニング</u> の有用性が認識されている。これは、既存医薬品の適応外疾患に対する効果を調べることで適応拡大を目指す試みである。 本研究は、悪性グリオーマ発生の根幹をなすグリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する薬剤を約 1,300 種類の既存医薬品の中から探索し悪性グリオーマに対する安全で効果的な化学療法を確立することを目的とする。今回申請する研究プロジェクトでは、グリオーマ幹細胞に対する効果的な既存薬剤を <i>in vitro</i> でスクリーニングする。	
【研究内容・成果】	【研究内容のまとめ】研究プロジェクト全体の概要は、グリオーマ幹細胞に対する効果的な既存薬剤の同定から、独自の動物モデルを使用した簡便な前臨床試験を行った後の特許出願およびヒトへの応用(第 I 相臨床試験)の立案・遂行である(図)。初期の薬剤スクリーニングにより 3 種類の候補薬剤を同定し、そのうち有望な一剤の検証を行った。 【方法】サブタイプの異なる 2 種類のグリオーマ幹細胞株 (Proneural type, Mesenchymal type) を使用した。がん進展制御研究所が保有する 1,301 種類の既存薬剤によるグリオーマ幹細胞の増殖抑制効果を調べるために非接着 384 穴プレートを用いた WST 増殖アッセイを行った。既存薬剤を 3 種類の濃度で振ってアッセイを行うことで濃度依存性の効果を検討した。陽性コントロールとして PI3K/mTOR 阻害剤である NVP-BEZ235 を使用した。引き続き 4 種類の膠芽腫細胞株 (U87, U251, T98G, SNB19) を用いて候補薬剤の増殖・浸潤抑制効果を AlamarBlue 増殖アッセイ、<i>in vitro</i> 遊走・浸潤アッセイにより観察した。 【結果】89 種類の薬物が様々な程度のグリオーマ幹細胞増殖抑制効果を示した。このうちこれまでの論文報告から新規性の高い薬剤を 36 種類選別し、両サブタイプに対して濃度依存性かつ低濃度で強い効果を示す 3 種類の薬剤を選択した。このうち 1 種類の薬剤により、すべての膠芽腫細胞株に対して濃度依存性の増殖・浸潤抑制効果を確認した。 【成果】既存医薬品の中から有望な抗グリオーマ幹細胞薬を抽出した。動物実験を経て早期に臨床試験を計画し、膠芽腫に対する新規化学療法を確立したいと考えている。 ドラッグリポジショニングによる新規化学療法の確立	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Tanaka S, <u>Nakada M</u>, Yamada D, Nakano I, Todo T, Ino Y, Hoshii T, Tadokoro Y, Ohta K, Ali MAE, Hayashi Y, Hamada JI, <u>Hirao A</u>. Strong therapeutic potential of γ-secretase inhibitor MRK003 for CD44-high and CD133-low glioblastoma initiating cells. <i>J Neurooncol</i> 121: 239-250, 2015	
	【学会発表】 1. 董宇、<u>中田光俊</u>、北林朋宏、古田拓也、<u>平尾敦</u>、林裕 Screening of existing approved drugs for inhibiting glioma stem cell proliferation 第 32 回日本分子脳神経外科学会、平成 26 年 9 月 25 日-26 日、山形 2. <u>中田光俊</u>、董宇、北林朋宏、古田拓也、<u>平尾敦</u>、林裕 ドラッグリポジショニングを指向したグリオーマ幹細胞に対する既存薬剤スクリーニング(シンポジウム) 第 73 回日本脳神経外科学会総会、平成 26 年 10 月 9 日-11 日、東京 3. <u>中田光俊</u>、董宇、北林朋宏、古田拓也、宮下勝吉、木下雅史、<u>平尾敦</u>、林裕 グリオーマ幹細胞に対して抗腫瘍効果を有する既存医薬品の探索 第 32 回日本脳腫瘍学会、平成 26 年 11 月 30 日-12 月 2 日、千葉	
	【その他特筆事項】 抽出薬剤に関する特許出願を検討中	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

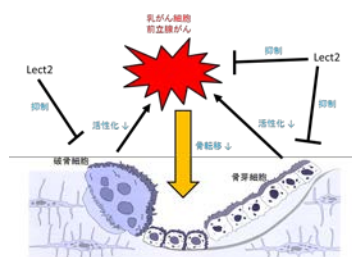
研究区分		一般共同研究
研究課題		ERCC1 の高発現に起因するシスプラチン耐性化の機序に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授・松永司
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教・若杉光生
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	DNA 傷害性抗がん剤による治療において、がん細胞の DNA 傷害応答反応をモジュレートできれば奏功性の向上が期待できる。最近、我々は化合物ライブラリースクリーニングによってヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) 反応を阻害する低分子化合物 A6 を見つけ、シスプラチンとの併用によりがん細胞の致死効果を増強させる結果を得た。また、この化合物は NER 必須因子の一つである ERCC1 の分解誘導を引き起こし、これが NER 阻害の機序であることを明らかにした。本研究ではこの化合物の作用機序を究明し、ERCC1 の高発現に起因するシスプラチン耐性化メカニズムの解明に寄与するとともに、耐性がんの治療に向けた本化合物の応用に関して基礎データを得ることを目的とする。	
【研究内容・成果】	① ERCC1 の分解誘導メカニズムの解明 これまでの解析で、化合物 A6 による ERCC1 の分解誘導はプロテアソーム阻害剤 MG-132 で抑制されることがわかっていたが、今回、実際に ERCC1 のポリユビキチン化体を検出し、ERCC1 の分解自身がユビキチン・プロテアソーム依存的であることが示唆された。また、がん進展研究所の薬剤ライブラリーから、キナーゼおよびホスファターゼの阻害剤ライブラリーの供与を受け、A6 の NER 阻害活性に及ぼす影響を検討した。その結果、キナーゼ阻害剤の 1 種において A6 による NER 阻害を抑制する作用が認められた。一方で、これらの阻害剤ライブラリーの単独処理による NER 反応への影響も検討したところ、キナーゼ阻害剤から 5 種、ホスファターゼ阻害剤から 3 種において部分的な反応遅延が観察された。これらの阻害剤について、市販品等入手して再現性も含めてさらに検討を進める予定である。 ② ERCC1 の高発現に起因するシスプラチン耐性化がん細胞に対する増感作用の検討 ERCC1 を高発現するシスプラチン抵抗性卵巣がん細胞を米国 Fox Chase Cancer Center から入手し、A6 処理後の ERCC1 の細胞内レベルを測定したところ、これまでに調べたがん細胞と同様に、ERCC1 の顕著な減少が観察され、このタイプの耐性がんの治療に有用である可能性が示された。 ③ 幹細胞への影響を検討するための関連技術の習得 骨髓から造血幹細胞および造血前駆細胞を分離する技術の教授を受けて習得した。	
【成果等】	【主な論文発表】 Wakasugi, M., Sasaki, T., Matsumoto, M., Nagaoka, M., Inoue, K., Inobe, M., Horibata, K., Tanaka, K. and Matsunaga, T. (2014). Nucleotide excision repair-dependent DNA double-strand break formation and ATM signaling activation in mammalian quiescent cells., J. Biol. Chem., 289, 28730-28737. Enkhtuya, R., Sato, T., Wakasugi, M., Tuvshintugs, B., Miyata, H., Sakurai, T., Matsunaga, T. and Yoshioka, K. (2014). The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B-induced apoptosis in mice., Genes Cells, 19, 350-358. Zhao, X., Nogawa, A., Matsunaga, T., Takegami, T., Nakagawa, H. and Ishigaki, Y. (2014). Proteasome inhibitors and knockdown of SMG1 cause accumulation of Upf1 and Upf2 in human cells., Int. J. Oncol., 44, 222-228. 【学会発表】 松永司、斎藤臣雄、長田裕之、遠藤良夫：シスプラチン抵抗性関連因子 ERCC1 を分解誘導する新規低分子化合物の同定、第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成 26 年 6 月 25 - 27 日、仙台。 高森千枝、宮崎幸太郎、西永真理、大澤琢郎、若杉光生、松永司：DNA 修復因子 ERCC1-XPF の安定性と細胞内局在性を決定する要因の解析、日本薬学会第 135 年会、平成 27 年 3 月 25 - 28 日、神戸。 【その他特筆事項】 特になし	

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

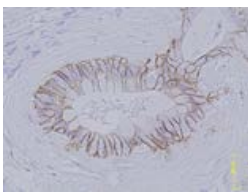
研究区分	マウスモデルを用いた消化器がん発生・悪性化に関する研究 (腫瘍遺伝学研究分野)
研究課題	消化器癌の増殖・進展におけるプロスタグランジン輸送体の役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名 金沢大学薬学系・准教授・中西猛夫
受入担当教員	職名・氏名 教授・大島正伸
【研究目的】	慢性大腸炎は大腸癌のリスク因子であり、プロスタグランジン E ₂ (PGE ₂) は大腸炎および大腸癌の進展に寄与する炎症メディエーターである。PGE ₂ は細胞内で合成され受容体に作用するが、大腸腫瘍組織における PGE ₂ 濃度調節機構は十分に理解されていない。申請者らは、これまでに PGE ₂ の細胞内外の濃度が膜輸送体 SLCO2A1 (PGT) により厳密に制御され、PGT の機能欠損が炎症性疾患の進展に貢献することを報告してきた (PLOS ONE 10:e0123895, 2015)。このような背景から、本研究においては、マウス大腸癌モデルを用いて PGT が大腸癌の増殖・進展に果す役割を検討した。
【研究内容・成果】	ヒト大腸癌 LoVo 細胞において、酸化的ストレスの付与により、PGE₂ の細胞内局在へ変化し、Pgt が形質膜付近へ移行することが明らかになった。PGT のノックダウンにより、細胞外の PGE₂ 量が有意に減少した。これらの結果から、細胞内で合成された PGE₂ の細胞外への分泌に、PGT が関わり細胞内外の濃度調節に主要な役割を果すことが明らかになった。メカニズムについては今後の検討が必要である。 一方、<i>in vivo</i> においても PGT の役割を検討した。Slco2a1^{-/-}/Apc^{Δ716/+}マウスにおける腸管腺種の総数は Apc^{Δ716/+}マウスと同程度であったが、径が 2 mm 以上の腺種数は Pgt^{-/-}/Apc^{Δ716/+}マウスで有意に減少した。免疫組織化学的検討により、Slco2a1^{-/-}/Apc^{Δ716/+}マウス腸管由来腺種組織における単位面積あたりの微小毛細血管数は、Slco2a1^{-/-}/Apc^{Δ716/+}マウスと比較して有意に減少した。さらに、Pgt ホモ欠損およびヘテロ欠損 Apc^{Δ716/+}マウスの平均寿命は、Pgt 野生型 Apc^{Δ716/+}マウスと比較して、有意に延長することが明らかになった。この原因を追究するために、Pgt の腫瘍組織内発現を明確にした。Pgt タンパク質は血管内皮細胞、間質組織中マクロファージおよび大腸腫瘍細胞の順に強く発現した。血管内皮細胞に最も強く発現したことから、ヒト血管内皮細胞モデルである HUVEC を用いた血管形成試験により PGT 機能と管の形成能との関係を検討した。PGT 阻害剤存在下あるいは発現抑制時に管の形成が有意に低下することが示された。以上より、血管内皮細胞に発現している PGT が腫瘍形成に伴う血管新生に関与するため、Pgt 欠損 Apc^{Δ716/+}マウスにおいて、腫瘍の増殖能が低下することが示唆された。これらの結果は、Pgt の阻害剤の開発が大腸癌治療に有効であることを意味し、大腸癌治療薬の開発に有益な情報を与える成果である。
【成果等】	【主な論文発表】 現在準備中
	【学会発表】 1. Nakanishi T, Kasai T, Tamai I: Prostaglandin transporter (PGT)-mediated PGE ₂ secretion from human colorectal cancer cells in response to oxidative stress. 19th North American ISSX/29th JSSX Meeting, October 19-23, 2014, San Francisco, CA, USA (ポスター) 2. 大野康弘、中西猛夫、大島浩子、大島正伸、玉井郁巳「大腸癌の増殖におけるプロスタグランジン輸送体 PGT の役割」 日本薬学会第 135 年会、神戸 (口頭、2015 年 3 月 27 日)
	【その他特筆事項】 本研究成果により、財団法人北國がん研究振興財団より助成金を受けた。

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

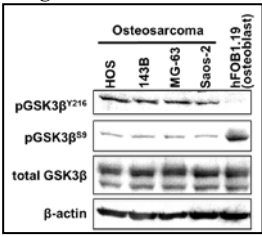
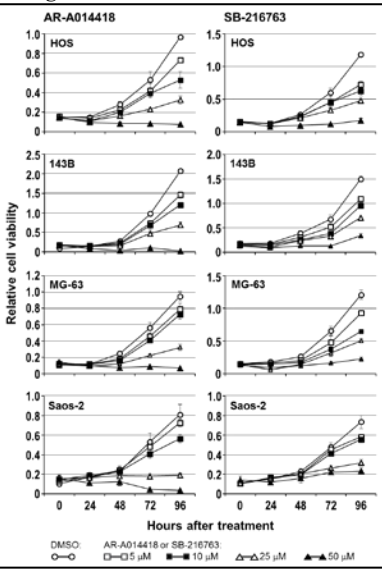
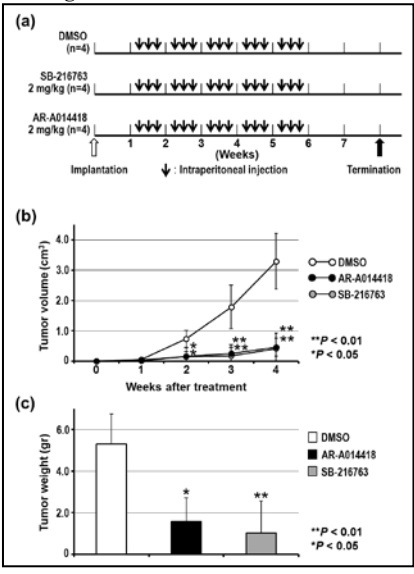
研究区分		一般共同研究
研究課題		HGF-Met シグナルを阻害する Lect2 の骨転移における役割
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・特任准教授・石井清朗
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・篁俊成
	所属・職名・氏名	金沢大学・准教授・御簾博文
	所属・職名・氏名	金沢大学・研究員・菊地晶裕
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	骨転移は骨性疼痛、高カルシウム血症、骨折、神経圧迫症候群といった合併症のため、著しく患者の QOL を低下させる。しかし、骨転移による癌形成が他の臓器より遅いため、短期間では命にかかわる病態にはなり難いことに加え、他の臓器では有効な治療法が骨転移癌には効果が薄いことから、骨への積極的な治療は先送りとなり、対処療法にとどまっているのが現状である。 今研究では Lect2 と HGF-Met 系による骨転移の関与をシグナル伝達の面から解明し、新たな癌転移抑制剤としての可能性を探る。また Lect2 は肥満により肝臓からの分泌量が増えることから、生活習慣病と癌との関係を明らかにすることも目的としている。	
【研究内容・成果】	Lect2 ノックアウトマウスにおける骨形態計測を行い、野生型マウスよりも骨量が減少していることが分かった、また高脂肪食を与え肥満状態にすると野生型マウスの血液中における Lect2 濃度が上昇し、結果としてノックアウトマウスとの骨量の差がより大きくなることも分かった。細胞レベルでは骨芽細胞よりも破骨細胞に大きな影響があり、Lect2 添加によってマクロファージから成熟破骨細胞への分化が抑制されること、その過程でのシグナル、転写因子 NFATc1、c-fos、PGC-1β の発現抑制、ERK のリン酸化の抑制がみられることが分かった。分化の段階としてはマクロファージから前破骨細胞という分化初期に影響が大きく、成熟破骨細胞のアポトーシスには影響がなかった。Lect2 ノックアウトマウスにおいても、血清中の骨芽細胞活性化マーカーよりも破骨細胞活性化マーカーの方が顕著に増加していた。骨芽細胞では Lect2 により初期の間葉系幹細胞の増殖は緩やかに抑制するものの、分化段階には大きな影響がみられなかった。破骨細胞へ Lect2 を添加した際の遺伝子発現を網羅的に解析するためにマイクロアレイを行い、炎症に伴う遺伝子の発現が増えており、さらに樹状細胞様のマーカー遺伝子の発現も増えていることが分かった。 がん細胞は破骨細胞を活性化する因子を分泌し、その破骨細胞により削られた骨の部位に転移する。また破骨細胞からもがん細胞を活性化する因子を分泌することが知られている。実際、Lect2 添加の際に破骨細胞で発現が抑制される遺伝子には TGF-β や IGF-1 といったがん細胞を活性化する因子が含まれていた。これらの因子が肝臓から分泌される Lect2 によって抑制され、破骨細胞の不活性化と相まってがん細胞の骨転移を抑制する可能性がある。今後、がん細胞や骨芽細胞においても Lect2 による抑制作用があるか検討していく。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	



平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		GSK3 β 阻害による食道発癌の予防とその機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・肝胆膵移植再生外科・助教・宮下知治
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・がん局所制御学・教授・太田哲生
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・がん局所制御学・准教授・藤村隆
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・肝胆膵移植再生外科・助教・田島秀浩
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬学総合研究科・がん局所制御学・大学院生・松井大輔
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	近年、食生活の欧米化に伴い本邦でも大腸癌や乳癌とともにバレット食道（前癌病変）や食道（バレット）腺癌の発生が増加している。当教室が開発したラット食道発癌モデルは十二指腸液あるいは胃液との混合液を食道に逆流させる手術を行うと、発癌剤を投与せずに約 40 週後に食道腺癌が発生する画期的なモデルである。また、このモデルで発生する腫瘍はヒトの食道腺癌と非常に類似した遺伝子変化が認められることも報告されている。一方、GSK3β の発現や活性の亢進が大腸癌の増殖に関与していることが注目されていることから、食道の扁平上皮癌よりはむしろ食道腺癌の発生過程に関与していることがおおいに予想される。そこで本研究では、この食道発癌に対する GSK3β 阻害による化学予防の可能性を基礎と臨床の両面から解析、評価するために共同実験を行うこととした。	
【研究内容・成果】	今年度の研究では、ラットの逆流手術は完了し、術後 40 週を経過したラットは順次屠殺し、対照群（DMSO のみ投与）と治療群（GSK3β 阻害剤の AR-A014418 (2mg/kg 体重) を投与）の標本を採取している。一方、本報告の段階では、まだ一部のラットの治療を継続中であり、治療実験は完了していない。 これまでに屠殺した固体の観察により、対象群では食道空腸吻合部に食道腺癌が高頻度に発生し、その近位側の食道壁は拡張、肥厚とバレット食道が観察された。一方、GSK3β 阻害剤投与群では肉眼的には食道腫瘍の発生は観察されず、食道壁の病的所見は認められないか軽微であった（図 1 a, b）。以上の結果より、GSK3β 阻害は食道の慢性炎症に伴う食道腺癌発生を抑制することが示唆される。 現在、切除標本を用いて β-カテニンや Cyclin D1 の発現も免疫染色を用いて検討しており、β-カテニンの核内移行が認められないことや、Cyclin D1 の核内での発現を高率に認めている（図 2a, b）。  図 1a. GSK3β 阻害剤投与群 （吻合部は明瞭で下部食道の拡張も認めず、粘膜面は平滑である）  図 1b. 対照群 （吻合部に腫瘍が発生し、下部食道は拡張して、粘膜も粗造である）  図 2a. β-カテニン発現  図 2b. Cyclin D1 発現 今後はすべてのラットの食道病変組織を対象に病理組織学的検査、免疫組織学的検査、分子生物学的検査や、全身主要臓器の検査による GSK3β 阻害剤のがん化学予防効果や有害作用の解析を順次行う。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

平成 26 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		骨肉腫の GSK3 β を標的とする新規治療法の開発と分子メカニズム
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医学保健学総合研究科・特任教授・山本憲男
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医学系研究科機能再建学・教授・土屋弘行
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・医員・下崎真吾
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	本研究は、骨肉腫に対する新しい分子標的治療の開発を目的とする。 骨肉腫の標準的治療は化学療法と手術であるが、化学療法抵抗性の症例や強い副作用のために治療を継続できない症例も認められる。他のがん種では、分子標的治療の研究がすすみ臨床でも効果を認めているが、骨肉腫は希少疾患であるために製薬企業を始めとする治療薬開発の研究が進んでいないのが現状である。このような背景から我々は、これまで骨肉腫では開発のすすんでいない分子標的治療に着目し、臨床応用へ向けて研究を行っている。本研究の目的は、GSK3β を標的とする新規骨肉腫治療法開発のための基礎的研究を行い、早期臨床応用へむけて研究開発を行うことである。	
【研究内容・成果】	① <i>In vitro</i> まず、Western blot による骨肉腫細胞株における活性型 GSK3β(pGSK3β^{Y216})の発現を調査 (Fig. 1)。ついで、GSK3β 阻害薬 (AR-A014418, SB-216763)、GSK3β に対する siRNA 導入による細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導を検討 (Fig. 2)。さらに、阻害薬作用経路が Wnt/β-catenin 経路と関係していることを TOP/FOP Flash luciferase assay や免疫染色を用いて調査した。 ② <i>In vivo</i> ①を受けて、骨肉腫細胞移植マウスに対する GSK3β 阻害薬投与による抗腫瘍効果を調査 (Fig. 3)。※①②から骨肉腫に対する GSK3β 阻害薬による治療効果とその作用経路を確認した。 (Fig. 1)  (Fig. 2)  (Fig. 3)  (Fig.1)Western blot による、GSK3β 測定。骨肉腫細胞では骨芽細胞と比較して活性型 GSK3β が高かった。 (Fig.2) 阻害薬投与後 WST-8 Assay。骨肉腫細胞増殖抑制効果を認めた。 (Fig.3)骨肉腫細胞移植マウスに対する GSK3β 阻害薬の効果、腫瘍体積、重量ともに減少した。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	第 41 回日本生体電気・物理刺激研究会 (横浜) American Society of Clinical Oncology 50th Annual Meeting (シカゴ, 米国) 第 47 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 (大阪) 第 123 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 (名古屋) 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (鹿児島)
	【その他特筆事項】	この研究に対する論文は現在 Cancer Science 誌に投稿中である。 Shimozaki S, Minamoto T, et al. Therapeutic effect of glycogen synthase kinase 3β inhibition against osteosarcoma via β-catenin activation. Cancer Sci, in submission.