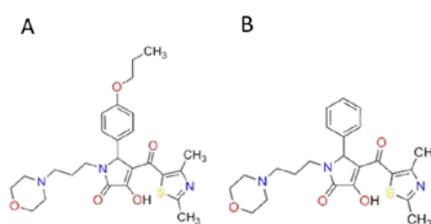


平成28年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2017.4

金沢大学がん進展制御研究所

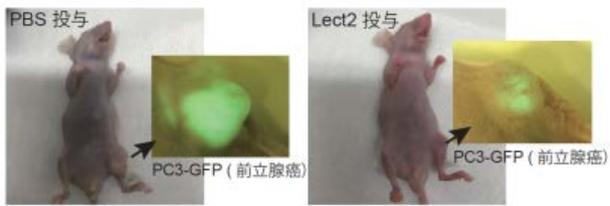
研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・教授・青木 俊介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究では、HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。in silico スクリーニング手法ならびに類縁化合物探索手法、 π 結合やスタッキング相互作用の予測法等を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、とりわけ HGF サイド α 鎖と β 鎖の Met 結合に関与するポケット（窪み部分）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、大規模化合物立体構造ライブラリから 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の類縁体設計ならびに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】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>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 in silico スクリーニング手法によって HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害し、HGF による Met のリン酸化を阻害しうる新規低化合物候補を複数同定していた。そこで、標的結合部位、化学骨格や作用機序等が異なるが同様に抑制効果を有する化合物をさらに探索するために、新たに HGF α 鎖の化合物結合ポケットに着目した。HGF α 鎖 NK1 部分の結晶構造 (PDB コード ; 1BHT) を用いて、先行研究の情報等も活用しつつ剛体ドッキングとフレキシブルドッキングからなる複数の化合物結合シミュレーション系を構築した。約 46 万化合物ライブラリの中から、これら結合シミュレーションと、さらに MACCS key を利用したクラスタリング手法によるスクリーニングを多段階的に行うことによって候補化合物を 8 種類選定し入手した。これら化合物に関して HGF に対する阻害活性の検証実験を松本研究室で行っていただいた。細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイの結果、2 種類の化合物に弱いながらも濃度依存的な阻害活性が確認された。次に、これら 2 種類の化合物に関して Mv. 1. Lu 細胞を用い HGF の細胞増殖阻害活性に対する阻害効果を検証した。その結果、これら 2 種の化合物は細胞増殖抑制効果を有していなかった。これらの化合物の抑制作用が Met リン酸化を弱くしか抑制できず増殖シグナルをシャットダウンするには十分でないと考えられた。しかしながら、この 2 種の化合物は 2 つの五員環と 2 つの六員環からなる共通母核構造を有する化合物であることが明らかになり (図 A. B), より強い活性有する類縁体を既存化合物ライブラリから探索するための手がかりとなると考えられた。今後、これらの構造情報を元により大きな化合物ライブラリを 2D ならびに 3D similarly screening することで、より強力な阻害効果を有する新規類縁体を同定できる可能性が考えられた。また、複数の結合化合物の構造を用いることが可能になればより精緻な化合物-タンパク質結合モデル構造の構築に役立てる事ができ、in silico スクリーニングの精度向上に役立てることができる。さらに、有機合成展開も視野に入れた化合物設計の可能性が考えられた。</p>	
	 <p>図. 本研究で新たに同定された化合物の構造</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>(1) Tsunosaki J, Mieno Y, Hamade Y, Aoki S, Prediction of antimicrobial action mechanism on chemical compounds of essential oils using chemoinformatics methods. Japan Journal of Aromatherapy 16, 25-36. 2016.</p> <p>(2) Yuji Koseki, Hironori Kanetaka, Joji Tsunosaki, Hélène Munier-Lehmann, Shunsuke Aoki, Tetrahydro-2-furanyl-2,4(1H,3H)-pyrimidinedione Derivatives as Novel Antibacterial Compounds against Mycobacterium, Int. J. Mycobacterology, 6, 61-69, 2017.</p> <p>(3) Junichi Taira, Takashi Ito, Hitomi Nakatani, Tomohiro Umei, Hiroki Baba, Shotaro Kawashima, Taira Maruoka, Hideyuki Komatsu, Hiroshi Sakamoto, Shunsuke Aoki, In silico Structure-based Drug Screening of Novel Antimycobacterial Pharmacophores by DOCK-GOLD Tandem Screening, Int. J. Mycobacterology, in press, 2017.</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>【学会発表】 (1)安恒 英、青木俊介、松本邦夫、酒井克也、馬場弘樹、角崎丈司 “増殖因子-受容体相互作用をターゲットとした抗癌剤候補化合物の探索” 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 金沢, 2月14日, 2017.</p> <p>【その他特筆事項】</p>
--	---

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Rb が制御するニューロン代謝経路の解析
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
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>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、G1-S 期移行のブレーキとして主に機能する。そのブレーキは、細胞外増殖シグナルによる Rb のリン酸化で解除されるが、逆遺伝学の手法で Rb ファミリーを急性的に欠損させても同様に解除される。これらの方法でブレーキ解除された細胞は細胞周期を S 期まで進めるが、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。本研究では、Rb ファミリーを欠損し、S 期を通過した後に増殖するニューロンと細胞死を起こすニューロンで作動している代謝経路を明らかにし、その代謝経路の役割を明らかにすることを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度までの研究により、Rb ファミリー欠損時に起こるニューロン細胞死は細胞分裂の実行とは異なるシグナル因子により制御されていることが明らかとなった。また、細胞周期のチェックポイントに関わるタンパク質 X の活性化が細胞分裂の実行及び細胞死の抑制機能に必要十分であることが明らかとなった。そこで本年度は、タンパク質 X の下流で機能することが知られており、細胞死実行の鍵となるがん抑制遺伝子 p53 に着目し、Rb ファミリー欠損ニューロン細胞死の実行における p53 とタンパク質 X の役割を明らかにした。具体的には、Rb-TKO マウス (Rb Lox/Lox; p107 -/-; p130 Lox/Lox) 及び p53-Rb-QKO マウス (p53 -/-; Rb Lox/Lox; p107 -/-; p130 Lox/Lox) を掛け合わせにより作製して検討した。上記変異マウス胎生 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 Cre 存在下で GFP を発現する GFP レポータープラスミド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染色を行った。その解析の結果、以下のことが明らかとなった。1) p53 を欠損させると S 期を通過したニューロンの細胞死が抑制され、また、上記タンパク質 X を欠損させた際に起こる細胞死も抑制された。2) タンパク質 X を活性化させると S 期を通過したニューロンが細胞分裂するが、p53 を欠損させても細胞分裂しなかった。3) タンパク質 X と p53 が直接的に相互作用することが報告されているが、我々の実験系では相互作用が認められなかった。今後は、我々が独自に確立した実験系を利用し、代謝経路の差異に着目し、S 期を通過した後に増殖するニューロンと細胞死を起こすニューロンにおける細胞内シグナルの差異とその生理的意義を明らかにする。将来的には、ニューロン細胞死を抑制する新しいタイプの薬剤を同定することを目指す。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Oshikawa M et al., (in revision) 2) Oshikawa M, Okada K, Kaneko N, Sawamoto K, and Ajioka I, Affinity-Immobilization of VEGF on Laminin Porous Sponge Enhances Angiogenesis in the Ischemic Brain, Adv Healthcare Mat, (in press) 3) Fujioka T, Kaneko N, Ajioka I, Nakaguchi K, Omata T, Ohba H, Fässler R, García-Verdugo J, Sekiguchi K, Matsukawa N, and Sawamoto K, $\beta 1$ integrin signaling promotes neuronal migration along vascular scaffolds in the post-stroke brain, EBioMedicine, 16, 195-203 (2017) 4) Ishizu N, Yui D, Hebisawa A, Aizawa H, Cui W, Fujita Y, Hashimoto K, Ajioka I, Mizusawa H, Yokota T, and Watase K, Impaired striatal dopamine release in homozygous Vps35 D620N knock-in mice, Hum Mol Genet, 25, 4507-4517 (2016) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 味岡逸樹, 低酸素状態で構造変換するタンパク質を用いる脳再生デバイスの創製, 日本化学会第 97 春季年会 (シンポジウム), 2017. 3. 16 (横浜) 2) 味岡逸樹, 脳発生に倣う人工足場創製: 成体損傷脳の再生を目指して, 第 39 回日本分子生物学会年会 (フォーラム), 2016. 12. 1 (横浜) 3) 味岡逸樹, 脳卒中再生治療を目指したバイオアセンブラ, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016 (シンポジウム), 2016. 11. 21 (福岡) <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		肝臓から分泌されるヘパトカイン Lect2 は HGF-MET 系を介して乳癌及び前立腺癌の骨転移を抑制する。
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 (適宜、行を追加してください。)	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・助教・白崎尚芳
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>前立腺がんや乳がんの 5 年後生存率は、抗がん剤の開発や投与方法の最適化に伴い改善しているが、再発した骨転移巣に対してはまだ強い抵抗性がある。また、肥満や糖尿病は前立腺がんや乳がん自身の増悪だけでなく転移をも促進し、閉経もまた転移促進の因子であることが分かってきた。しかしこれらのメカニズムはほとんど分かっていない。今研究は Lect2 という肥満、糖尿病、閉経と高度に関係したタンパク質と骨転移の関係を明らかにすることを目的としている。今研究の肥満、糖尿病、閉経という多方面からの解析によりこれらの関係、メカニズムが解明できれば、現在、治療法が限られている骨転移に対して新たな治療法を確立する手がかりとなる。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>マウスに高脂肪食を食べさせると肝臓での Lect2 発現が増加し、血中でのタンパク質濃度も高くなる。Lect2 ノックアウトマウスは、野生型マウスに比べ骨量が減少しているが、高脂肪食を与え肥満状態にすると骨量の差はさらに大きくなった。また、Lect2 は老化により減少し、老化による骨量減少と相関があった。この骨量の減少は、血中の破骨細胞活性化マーカー、TRAP5b が Lect2 ノックアウトマウスで上昇していたことから(骨芽細胞活性化マーカー、Type I collagen は血中濃度に有意な差はなかった)、Lect2 が破骨細胞を抑制していることが原因と考えられた。実際、破骨細胞の前駆体マクロファージに Lect2 を添加すると破骨細胞への分化が抑制された。破骨細胞分化シグナル、NFATc1、c-fos、PGC-1β の発現抑制、ERK のリン酸化の抑制に加えて、炎症マーカー遺伝子の発現も増えていた。また形態的にも樹状細胞様の突起が増え、そのマーカー遺伝子の発現も増加していた。</p> <p>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。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ことが考えられたため、骨転移モデルとして、ヌードマウスに前立腺がん Cell line、PC3-GFP を大腿骨に移植し、同時に腹腔内から Lect2 タンパク質を投与した。その後 12 週間に渡って GFP によって光るがん細胞を追跡し、癌転移の程度を観察した。すると明らかに Lect2 を添加したマウスのがん細胞の転移巣が小さくなっていることが観察された。今回の研究結果を踏まえて今後、Lect2 のがん細胞への直接作用も検討する。</p>	
		
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		トリプルネガティブ乳癌幹細胞維持における転写因子 NF- κ B 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
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・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- κ B-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の臨床検体に由来する乳癌細胞における意義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】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>乳癌は発現プロファイルによって大きく 4 つのサブタイプに分類される。中でも TNBC に分類される Basal-like 乳癌や Claudin-low 乳癌は分子標的治療法が確立しておらず、また増殖能や遊走性などの悪性度も高く予後が悪い。</p> <p>我々は Basal-like 乳癌細胞株である HCC38 細胞や HCC1143 細胞、一部の乳癌臨床検体において Basal-like 乳癌様の EpCAM を強く発現する細胞集団と、Claudin-low 乳癌様の EpCAM 発現が低い集団が共存していることに注目し、これら性質の異なる細胞集団が共存する機構を解析した。その結果、EpCAM 発現の高い集団は E-cadherin や CLDN を高く発現する上皮細胞様の性質を示し、EpCAM 発現の低い集団は N-cadherin や Vimentin、EMT 誘導転写因子 ZEB1 を高く発現する間葉系細胞様の性質を持つことが分かり上皮間葉転換 (EMT) の関連が示唆された。この EMT 制御機構を調べるために、各細胞集団を単独もしくはお互いの集団を混合して培養を行ったところ、間葉系細胞の集団は周囲の上皮細胞の EMT を促進し、逆に上皮細胞の集団は周囲の間葉系細胞の MET を促進することが分かった。またこの EMT/MET には TGF-β1 や JAK2 の活性化によって誘導される転写因子 ZEB1, SLUG の活性化が重要であることが明らかとなった。一般に上皮細胞は増殖能が高く腫瘍形成に重要である一方、間葉系細胞は遊走能や細胞生存能が高く治療抵抗性との関連が報告されており、Basal-like 乳癌における両細胞のバランス維持機構の解明は新たな治療戦略の創出に繋がると考えられる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 Yamamoto, M., Sakane, K., Tominaga, K., Gotoh, N., Niwa, T., Kikuchi, Y., Tada, K., Goshima, N., Semba K. and Inoue, J. Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. <i>Cancer Sci.</i> 2017, in press.	
	【学会発表】 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月、横浜	
	【その他特筆事項】	

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	近畿大学 医学部・講師・上田健
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	<p>近年、Hedgehog (Hh)シグナル経路活性化とヒト悪性腫瘍(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ている。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の移行が促進され、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)が存在する。本研究では、特に活性型 GLI ひとつである GLI-1 に着目して、マウス悪性黒色腫モデルにおける癌転移制御機構における役割の解析をおこなっている。</p>	
<p>【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)</p>	<p>マウス悪性黒色腫細胞株 B16 のうち、マウス移植モデルにおいて低転移能を有することが知られるサブラインである B16F0 細胞株に対して、GLI-1 を安定的に発現させると低酸素応答遺伝子群の発現の上昇と転移能の亢進が観察された。一方で、高転移能を有する B16F10 において GLI-1 の発現を抑制した場合には、転移能が低下することを見出した。</p> <p>そこで、GLI-1 の発現とヒト皮膚悪性黒色腫の予後との関連を The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータに基づき解析した。その結果、解析対象 403 例のうち GLI-1 高発現群 (40 症例)においては、それ以外の症例 (363 症例)と比較して、無病生存率が有意に低い (Log rank test, $p < 0.012$) ことが判明した (図参照)。悪性黒色腫では、遺伝子変異が特に多いことが知られている。しかし GLI-1 高発現群例のうち、GLI-1 遺伝子に変異を有するものは一例 (C 末端ミスセンス変異)のみであり、変異の機能に対する影響を予測する mutation assessor により本変異による機能的影響は低いことが予想された。以上のことからヒトにおいても、GLI-1 高発現が悪性黒色腫の病態に促進的に機能していることが強く示唆される。今後、ヒト悪性黒色腫症例における GLI1 高発現とマウス B16 細胞株の細胞生物学的解析、遺伝子発現解析から得られた結果との機能的関連についてさらに解析をすすめたい。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Tong KI, Ota K, Komuro A, <u>Ueda T</u>, Ito A, Anne Koch C, Okada H. Attenuated DNA damage repair delays therapy-related myeloid neoplasms in a mouse model. Cell Death Dis. 2016;7(10):e2401. <u>Ueda T</u>, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda Z, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113(37):10370-5.</p> <p>【学会発表】 ① <u>上田健</u>、中田雄一郎、長町安希子、山崎憲政、金井昭教、松井啓隆、稲葉俊哉、本田浩章 EED 変異体による PRC2 活性化障害の造血器腫瘍発症における役割 第 89 回日本生化学会大会 (ポスター) ② <u>上田健</u>、池田健一郎 ヒストン脱メチル化酵素 Fbx110 の白血病発症における機能解析 第 20 回日本がん分子標的治療学会 (ポスター)</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

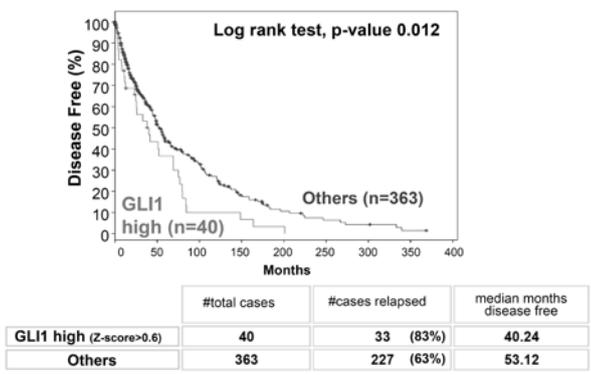
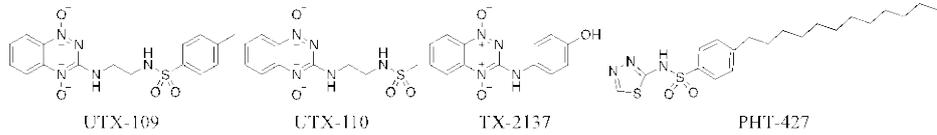


図 皮膚悪性黒色腫における、GLI1高発現 (Z-score>0.6) 症例とそれ以外の症例における無病生存率の比較

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトがん細胞を用いた低酸素選択的 Akt/MMP 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 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・山田久嗣
	所属・職名・氏名	徳島大学・D2・芝 一休
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博, 准教授・遠藤良夫, 准教授・滝野隆久
【研究目的】	<p>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 23-27 年度の共同研究において、低酸素サイトトキシン誘導体 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 は TX-2137 よりも強い抗転移活性を有することを示した。そこで本年度は、既知の Akt 阻害剤 PHT-427 をリードとして、低酸素選択的ファルマコフォアであるベンゾトリアジン-1,4-ジオキソド骨格を導入した新規 Akt/MMP 阻害性抗転移剤の開発を目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>平成 28 年度は、Akt の pleckstrin homology (PH)-domain に結合し Akt のリン酸化を阻害するスルホンアミド化合物に着目し、低酸素サイトトキシン Tirapazamine にスルホンアミド骨格を導入した UTX-109 及び UTX-110 を設計・合成した(下図)。3-amino-1,2,4-benzotriazine-1-oxide のアミノ基をクロロ基に置換した 3-chloro-1,2,4-benzotriazine-1-oxide(3-Cl)を合成し、3-Cl にエチレンジアミンを導入して Tirapazamine アミノエチル誘導体を合成し、次いで、<i>p</i>-トルエンスルホンアミド及びメタンスルホニルクロリドとカップリングさせて、最後に酸化反応を行い UTX-109 及び UTX-110 を合成した。生物活性評価については、細胞増殖抑制、低酸素細胞毒性、MMP 阻害活性、マトリゲル浸潤阻害活性を評価した。B16-F10 細胞、MKN-45 細胞、KKLS 細胞、HT-1080 細胞に対してそれぞれ UTX-109 は 9.9~15.8 μM、UTX-110 は 21.3~64.5 μM の IC₅₀ 値で細胞増殖抑制効果を示し、特に、UTX-109 は Akt 阻害剤である PHT-427 よりも高い細胞増殖抑制効果を示した。UTX-109 の MMP 阻害活性をヒト繊維肉腫である HT-1080 細胞を用いて評価したところ、有意な MMP 阻害活性は確認されなかった。次に、UTX-109 において浸潤阻害活性を調べるために HT-1080 細胞を用いてマトリゲル浸潤阻害活性を評価したところ、濃度依存的に阻害効果を示した。また、シトクロム P450 還元酵素の過剰発現がみられる A549 細胞を用いて UTX-109 と UTX-110 の低酸素細胞毒性を評価したところ、低酸素において、UTX-109 は 7.7 μM、UTX-110 は 40.4 μM の IC₅₀ 値を示し、常酸素と比較して UTX-109 は 7.3 倍と TX-2137 よりも高い低酸素選択性を示した。以上の結果より、新規低酸素指向性抗転移剤として UTX-109 と UTX-110 の創製に成功した。</p>	
 <p>各化合物の化学構造</p>		
【成果等】	【主な論文発表】	・Anticancer Research 誌に投稿中
	【学会発表】	<p>・第 20 回バイオ治療法研究会(12 月 10 日・福岡市), 低酸素指向性を有する抗転移剤 TX-2137 及び TX-2282 の創製, 宇都義浩, 芝一休, 山田久嗣, 遠藤良夫, 佐藤博, 北里慶子, 永廣信治</p> <p>・平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム</p>
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん抑制遺伝子 p53 機能喪失による胃がん悪性化機構の本態解明
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学研究室 独立ユニット長・大木理恵子
研究分担者 (適宜、行を追加 してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>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。</p> <p>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。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>現在、p53 遺伝子欠損 Gan マウスの解析を進めている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 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 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。 <p>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。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>外国語論文</p> <p>1. Issei Ezawa, Yuichiro Sawai, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Yuka Kobayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and Rieko Ohki (corresponding author). A novel p53 target gene FUCA1 encodes a fucosidase and regulates growth and survival of cancer cells. Cancer Science, 107(6):734-45, 2016.</p>	

2. Yoshinori Asano, Tatsuya Kawase, Atsushi Okabe, Shuichi Tsutsumi, Hitoshi Ichikawa, Satoko Tatebe, Issay Kitabayashi, Fumio Tashiro, Hideo Namiki, Tadashi Kondo, Kentaro Semba, Hiroyuki Aburatani, Yoichi Taya, Hitoshi Nakagama and Rieko Ohki (corresponding author).

IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis.

Scientific Reports, 6, 19174; doi: 10.1038/srep19174 (2016).

3. Masahiro Takikawa and Rieko Ohki (corresponding author). A vicious partnership between AKT and PHLDA3 to facilitate neuroendocrine tumors.

Cancer Science, in press.

日本語論文

1. 浅野良則, 大木理恵子.

IER5 は新規の低リン酸化型の活性化 HSF1 を誘導し、がん化を促進する。

実験医学, 34, pp. 1783-1785, 2016.

【学会発表】

口頭発表 (国内 12)

1. PH domain-only protein PHLDA3 is a novel p53-regulated repressor of Akt and a novel tumor suppressor of neuroendocrine tumors 口頭発表 大木理恵子 日本分子生物学会 ワークショップ 2016 年 12 月. 於: 横浜 国内

2. がん抑制遺伝子 p53 が制御する様々ながん制御経路 口頭発表 大木理恵子 第 19 回学習院大学生命科学シンポジウム 2016 年 5 月. 於: 学習院大学 国内

3. がん研究の最前線 ～がん抑制遺伝子 p53 はどのようにがんを抑制するのか?～ 口頭発表 大木理恵子 2016 年 6 月. 於: 女子学院同窓会館 国内

4. 研究者という職は、女性に向いている職である 口頭発表 大木理恵子 第 2 回 Rikoh ティータイム シンポジウム～ワセダで輝く・ワセダから輝く、アナタの未来～ 2016 年 5 月. 於: 早稲田大学 国内

5. p53 標的遺伝子 IER5 は新規の低リン酸化型の活性化 HSF1 を作り出し、がん化を促進する 口頭発表 大木理恵子 第 11 回 臨床ストレス応答学会大会 2016 年 11 月、於: 山口大学 国内

6. がんの生物学・分子生物学 口頭発表 大木理恵子 日本がん治療認定医機構 【JBCT】教育セミナー 2016 年 11 月. 於: 幕張メッセ 国内

7. IER5 generates a novel hypo-phosphorylated active form of HSF1 and contributes to tumorigenesis 口頭発表 大木理恵子 2016 年 11 月、International Cancer Forum for Young Scientists、2016 年 11 月. 於: 北海道大学 国内

8. 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 口頭発表 大木理恵子 平成 28 年度第 2 回金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2017 年 2 月. 於: 金沢東急ホテル 国内

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>9. がん抑制遺伝子 PHLDA3 の下垂体腺腫における機能喪失性変異の同定と機能解析 口頭発表 山口 陽子、富永 航平、陳 好、峯岸 舞子、山田正三、大木理恵子 第 27 回日本間脳下 垂体腫瘍学会 2017 年 2 月. 於：日経カンファレンスルーム 国内</p> <p>10. PHLDA3 は下垂体腺腫の新規がん抑制遺伝子である 口頭発表 陳 好、峯岸 舞子、斎藤 梢、山田正三、並木 秀男、仙波 憲太郎、大木理恵子 第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会 2017 年 2 月. 於：日経カンファレンスルーム 国内</p> <p>11. がんの分子生物学 口頭発表 大木理恵子 がんゲノム医療講習会 2017 年 3 月、於：国 際研究交流会館 国内</p> <p>12. 膵内分泌腫瘍の新規がん抑制遺伝子 PHLDA3 の機能抑制を利用した膵島移植効率向上法の 確立 口頭発表 大木理恵子 「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」共同研究報 告会 2017 年 3 月. 於：京都大学 国内</p> <p>ポスター発表 (国内 3)</p> <p>1. がん抑制遺伝子 p53 の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 2016 年 12 月、日本分子生物学会</p> <p>2. 様々ながん種におけるがん抑制遺伝子 <i>PHLDA3</i> の機能喪失性変異の同定と機能解析 富永 航平, 西川 雷羅, 山口 陽子, 永田 喜三郎, 大木 理恵子 2016 年 12 月、日本分子生 物学会</p> <p>3. Glycosidase をコードする新規 p53 標的遺伝子 p53G1 は糖鎖の切断を介してがん細胞の増 殖と生存を制御する 江澤 一星, 澤井 勇一郎, 川瀬 竜也, 仙波 憲太郎, 大木 理恵子 2016 年 12 月、日本分子 生物学会</p>
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>該当せず</p>

研究課題		転写因子 RUNX1 エンハンサー-eR1 を用いた癌幹細胞の純化：異なる組織の癌幹細胞に共通する発癌分子基盤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	熊本大学・教授・大里元美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	<p>がん治療法開発を目指す癌幹細胞研究をすすめるためには癌細胞集団より極少数しか存在しない癌幹細胞を同定・分離（純化）する必要がある。この目的のために細胞表面マーカーを用いた方法が現在広く用いられているが造血系以外の組織においてはまだ不十分な点が多い。別の純化法として、幹細胞に特異的な遺伝子の発現制御領域下にレポーター遺伝子を発現させる方法もある。申請者は転写因子 <i>Runx1</i> の造血幹細胞特異的エンハンサー-eR1 を同定し報告した。eR1 活性は造血系以外の組織においても見られ、eR1 は比較的広範囲な組織に共通した新たな正常および癌幹細胞のマーカーとなりうることを示唆されたので、本研究ではその可能性を検証する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>a) 白血病幹細胞の純化 変異 <i>Kras</i> 導入により惹起されるマウス白血病モデルに eR1 レポーター (eR1-EGFP Tg) マウスを交配させたうえで、白血病細胞を eR1 活性 (GFP 陽性) 群と eR1 非活性 (GFP 陰性) 群に分画採取し、<i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の実験を行い増殖能など白血病原性につながる細胞の性質を比較した。<i>in vivo</i> 実験としては野生型マウスへ白血病細胞を移植して白血病を引き起こすことができるかを検討した。GFP 陽性群からは白血病が起こるが、GFP 陰性群からは起こらないという結果を得た。また GFP だけによる純化では癌幹細胞の頻度が十分に高くないという結果も見られたので、GFP に加え <i>c-Kit</i> など幹細胞マーカーも組み合わせて白血病幹細胞の濃縮を可能な限り高めることを図り、最終的に白血病幹細胞を 200 細胞に 1 個というレベルまで濃縮することに成功した。これらの結果は eR1 が白血病幹細胞のマーカーになりうることを示していると考えられる。</p> <p>b) 造血系以外の組織幹細胞における eR1 活性 eR1-EGFP Tg マウスの GFP シグナルは造血系に限らず比較的多くの組織において見られ、eR1 は広範囲な組織に共通した新たな正常および癌幹細胞のマーカーとなりうることを示唆されたので、その可能性を検証した。本年度、胃について詳細な解析を行い、eR1 活性が胃上皮の幹細胞分画特異的に見られることを確認し報告した (図 1) (文献 1)。</p>	

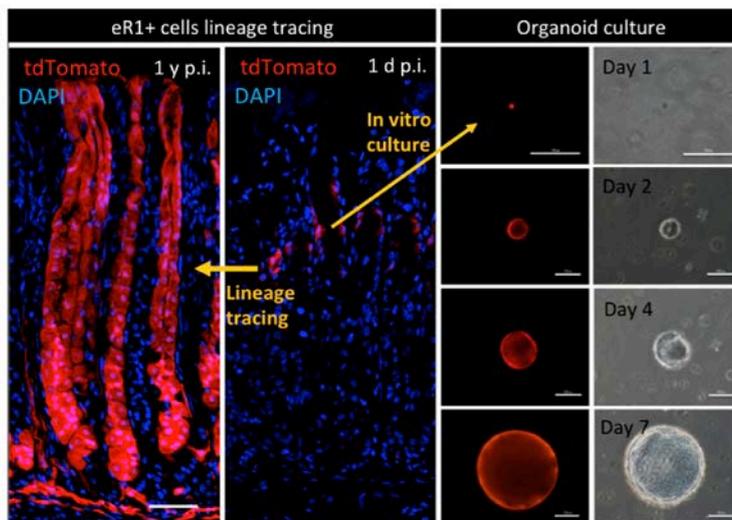


図 1、Runx1エンハンサー-eR1は胃の幹細胞マーカーである
胃粘膜上皮のeR1陽性細胞よりlineage tracingが起こり、organoidが形成される。これらはeR1陽性細胞が胃の幹細胞であることを示唆している。

<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain Z, Heng DL, Kohu K, Voon DCC, Hiai H, Unno M, So JBY, Zhu F, Srivastava S, Meng T, Yeoh KG, <u>Osato M*</u>, Ito Y*. Identification of stem cells in the epithelium of the stomach corpus and antrum of mice. Gastroenterology (IF 18.817),152:218-31, *corresponding author 2. Wang QXC, Mok MMH, Tergaonkar V, Yokomizo, T, <u>Osato M*</u>. Runx family genes in tissue stem cell dynamics. Advances in Experimental Medicine and Biology (IF 1.953) 962:117-138, 2017 3. Liao WS, Tan SH, Lawton LN, Wang CQ, Feng H, Tergaonkar V, Gong Z, <u>Osato M</u>, Young RA, Look AT, Sanda T. Aberrant Activation of the <i>GIMAP</i> Enhancer by the Oncogenic TAL1 Complex Contributes to T-cell Leukemogenesis. Leukemia (IF 12.104), epub ahead of print 4. Chin WLD, Sakurai M, Nah SG, Du L, Jacob B, Yokomizo T, Matsumura T, Suda T, Huang G, Fu XY, Ito Y, Nakajima H, <u>Osato M*</u>. Runx1 haploinsufficiency results in granulocyte-colony stimulating factor hypersensitivity. Blood Cancer Journal (IF 3.467), 6: e379, 2016
	<p>【学会発表】</p> <p>2017年 2月 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、金沢 2016年 12月 第39回分子生物学会年、横浜 2016年 5月 第14回幹細胞シンポジウム、淡路</p>
	<p>【その他特筆事項】</p>

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		マウス脳内神経幹細胞/グリア細胞へのがん遺伝子導入による <i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルの構築ならびに解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・特任助教・大西 伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>グリオブラストーマ(glioblastoma multiforme: GBM)は極めて悪性度が高く予後不良な悪性脳腫瘍である。GBMは放射線・化学療法に抵抗性を持ち、効果的な治療は未だ確立されておらず、治療戦略を考案するためには適切な発がんモデルの構築が必須である。これまでに申請者らは、マウス脳より樹立した神経幹細胞(neural stem cell: NSCs)にがん遺伝子を導入して同系マウス脳内に移植するマウス GBM モデルを構築した。本研究ではこのモデルを発展させ、より臨床的で汎用性が高い発がんモデルの開発を目的に、新生児マウス脳内に <i>in vivo</i> エレクトロポレーションを用いて直接がん遺伝子を導入する <i>in vivo</i> 発がんモデルの構築ならびに性状解析を試みた。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでに申請者らは、悪性脳腫瘍の性状を理解し新たな治療戦略を考案することを目的に、ヒト GBM において高頻度に異常がみられるがん抑制遺伝子 <i>Ink4a/Arf</i> の欠損(KO)マウス NSCs にレトロウイルスを用いて活性型 H-RAS (H-RAS V12) を導入し同系マウス脳内に移植することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、ヒト GBM に酷似した特徴を有するマウス GBM モデルを構築している(Neoplasia. 13:784-91. 2011)。さらに、申請者は piggyBac system を用いてウイルス感染を伴わずに <i>Ink4a/Arf</i> KO マウス NSCs のトランスポゾン配列にがん遺伝子を挿入後マウス脳内への移植により上記同様に脳腫瘍を形成することに成功している。本研究では、piggyBac system と新生児マウス脳内に直接遺伝子を導入することができる <i>in vivo</i> エレクトロポレーションを組み合わせることで <i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルの構築を試みた。具体的には、まず野生型マウスに導入する 2 種類の piggyBac system 用 plasmid (Transposase 発現ベクターならびに K-RAS V12 と <i>shInk4a/Arf</i> を同時に発現するベクター) を構築した。これら 2 種類の plasmid をガラスキャピラリーで野生型マウス脳室にインジェクションし、NSCs が存在する側脳室に遺伝子導入するために電極を当てて <i>in vivo</i> エレクトロポレーションを行った。経過観察し、約 2 ヶ月後に脳腫瘍を形成することができた。形成された脳腫瘍は病理学的所見より、移植モデル同様にヒト GBM と似た特徴を示し、移植モデルとは異なった点として強いリンパ球浸潤が観察された。また、免疫組織化学的所見から Nestin(未分化マーカー)陽性部位と Gfap(アストロサイト)陽性部位が混在する不均一な腫瘍であることが分かった。これらの結果から、今回新たに構築した <i>in vivo</i> 脳腫瘍モデルはこれまでの移植モデルに比べてより臨床的な要素を再現し得る発がんモデルであることが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 1. Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of Rho GTPase 1 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells. Ishimoto T et al. <i>Gastroenterology</i>. pii: S0016-5085(17)35398-2. 2017 2. Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. Miyawaki S et al. <i>Nat Commun</i>. 7:11471. 2016</p>	
	<p>【学会発表】 Development of novel mouse brain tumor model using <i>in vivo</i> electroporation and piggyBac system. Onishi N et al. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 7 日, 横浜</p>	
	<p>【その他特筆事項】</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		胃癌の悪性化における Protein Phosphatase 6 の役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・准教授・大浜剛
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・学振特別研究員・矢部滝太郎
	所属・職名・氏名	山口大学 共同獣医学部・学振特別研究員・藤原信行
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>Protein phosphatase 6 (PP6) は、Type2A タンパク質脱リン酸化酵素ファミリーに属するセリン・スレオニン タンパク質脱リン酸化酵素である。近年、メラノーマ患者の腫瘍組織において高頻度に PP6 の変異が認められることが報告され、腫瘍における PP6 の役割が注目を集めている。申請者らは、PP6 タンパク質レベルがオートファジーにより制御されていることを見出した。最近、予備的な知見として、胃癌自然発症モデルマウス Gan マウスの腫瘍組織では、PP6 発現が顕著に増加していることを確認している。そこで、本研究では、PP6-autophagy axis の胃癌における役割を、培養細胞、モデルマウス、およびヒト臨床サンプルを用いて明らかにすることを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究では、A) PP6-autophagy axis による胃癌悪性化の分子機構の解明 (培養細胞)、B) PP6 がマウス担がんモデルにおいて胃癌の成長に与える影響の解析 (マウスモデル)、C) ヒト胃癌病変における PP6 発現変化の解析 (ヒトがん組織バンク)、D) 胃癌自然発症モデルマウスの腫瘍部におけるオートファジー活性の変化の解析 (Gan マウス) の 4 つの項目を行った。</p> <p>項目 A に関しては、PP6 がオートファジー誘導に必須の VPS34-Beclin 1 複合体を解離させることでオートファジー活性を抑制していることを明らかにした。興味深いことにこの作用に PP6 のホスファターゼ活性は不要であった。項目 B に関しては、ヒト胃癌細胞株 MKN45 で PP6 発現を安定的に抑制し、NOD/SCID マウスに移植して xenograft モデルを作製した。その結果、PP6 は in vivo の担がんモデルにおいても胃癌の成長に寄与していることが明らかになった。項目 C に関しては、US Bio 社から組織マイクロアレイスライドを購入し、各種消化器癌における PP6 タンパク質発現とオートファジー活性の関係を検討し、PP6 タンパク質レベルと p62 タンパク質の蓄積 (オートファジー活性の低下) に正の相関関係が存在することを明らかにした。項目 D に関しては、大島教授から提供を受けた Gan マウスの組織サンプルにおいて PP6 タンパク質発現と、p62 の蓄積 (オートファジー活性の低下) を確認した。現在、電子顕微鏡を用いた解析により Gan マウスの腫瘍におけるオートファジー活性の低下を確認中である。</p> <p>以上の結果から、PP6 はオートファジーの負の調整因子であり、胃癌において PP6 発現が上昇するとオートファジーが抑制され、悪性度が上昇する可能性が考えられる。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 本課題に関連するデータは現在投稿準備中である。</p>	
	<p>【学会発表】</p> <p>1) Fujiwara N, Usui T, Sato K, <u>Ohama T</u> Regulation of Beclin 1 Phosphorylation and Autophagy by PP2A and DAPK3 The 12th International Conference on Protein Phosphatase, Osaka, Japan</p> <p>2) Yabe R, Usui T, Sato K, <u>Ohama T</u> Modification of PP2A Methylation Status Assay and Implication for Protein Phosphatase Methyltransferase-1 (PME-1) as a Therapeutic Target for a Subset of Melanoma The 12th International Conference on Protein Phosphatase, Osaka, Japan</p>	
	<p>【その他特筆事項】</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		抗がん免疫応答におけるケモカイン受容体 XCR1 発現樹状細胞および XCR1 の機能的意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学生体調節機構研究部・教授・改正恒康
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学生体調節機構研究部・准教授・邊見弘明
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学生体調節機構研究部・学内助教・大田友和
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	樹状細胞 (DC) は、抗原提示細胞として機能し、抗がん免疫に重要な役割を果たすが、機能的特性の異なるいくつかのサブセットに分けられる。本研究では、細胞傷害性 (CD8) T 細胞への分化を誘導する能力の高い樹状細胞サブセット (ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞、XCR1+DC) に焦点を当て、その樹状細胞サブセットが、恒常性維持あるいは抗がん免疫応答にどのように関与しているのかを解明し、XCR1+DC を標的とした抗がん免疫療法の確立を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1. 遺伝子改変マウスを用いた、XCR1+DC の動態、機能的意義の解明 XCR1 遺伝子座に cre レコンビナーゼをノックインしたマウス (XCR1-cre マウス) と ROSA26-STOP-DTA マウスを交配させることにより、XCR1+DC だけでジフテリアトキシン A サブユニット (DTA) が発現し、XCR1+DC が選択的かつ構成的に欠失するマウス (XCR1-DTA マウス) を得た。XCR1-DTA マウスを用いて、がん自然発症モデルにおける XCR1+DC の機能的意義の解明を試みる。このマウスにおいては、腸管内の T 細胞が著明に減少し、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の投与により誘導される腸炎の症状が悪化した。そこで、まず、Azoxymethane を腹腔内注射後、DSS を経口投与し、大腸がんを誘発させるモデルで解析したが、XCR1-DTA マウス、コントロールマウス (XCR1-cre マウス) いずれにおいても大腸がんが発生し、その数や大きさは有意差は見られなかった。 今後、APC 遺伝子のヘテロ変異による腸管ポリープ、腺腫モデル (Oshima et al. PNAS 1995)、DMBA+TPA の塗布による皮膚がんモデルで解析を進める。</p> <p>2. 抗原と XCL1 の融合タンパクによる抗がん免疫応答の誘導 卵白アルブミン (OVA) 由来の抗原ペプチド (OT-I) と XCR1 のリガンド (マウス XCL1、mXCL1) の融合タンパク (mXCL1-OVA) を免疫アジュバント (二本鎖 RNApoly(I:C)) と共に投与することにより、抗原特異的な CD8T 細胞応答および OVA を発現するメラノーマ細胞株 (B16-OVA) に対する抗がん免疫応答が誘導できた。mXCL1-OVA は XCR1+DC に選択的に送達されたが、その送達は XCR1 欠損マウスでは認められなかった。また、XCR1 欠損マウスでは、抗原特異的な CD8T 細胞応答は低下した。この結果から、mXCL1-OVA による抗がん免疫応答の誘導は XCR1 を介していることが示唆された。これらの効果、その機序についてさらに解析を進める。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 H. Hemmi, K. Hoshino, T. Kaisho. In vivo ablation of dendritic cell subset expressing the chemokine receptor XCR1. <i>Methods Mol Biol.</i> 1423:247-53,2016. E. W. Roberts, M. L. Broz, M. Binnewies, M. B. Headley, A. E. Nelson, D. M. Wolf, T. Kaisho, D. Bogunovic, N. Bhardwaj, M. F. Krummel. 2016. Critical role for CD103+/CD141+ dendritic cells bearing CCR7 for tumor antigen trafficking and priming of T cell immunity in melanoma. <i>Cancer Cell</i> 30:324-336,2016. Y. Sato, A. Mii, Y. Hamazaki, H. Fujita, H. Nakata, K. Masuda, S. Nishiyama, S. Shibuya, H. Haga, O. Ogawa, A. Shimizu, S. Narumiya, T. Kaisho, M. Arita, M. Yanagisawa, M. Miyasaka, K. Sharma, N. Minato, H. Kawamoto, M. Yanagita. 2016. Heterogeneous fibroblasts underlie age-dependent tertiary lymphoid tissues in the kidney. <i>JCI Insight</i> 1:e87680,2016.</p> <p>【学会発表】 T. Ohta, H. Hemmi, Y. Fukuda, I. Sasaki, T. Orimo, T. Kaisho. Dec. 5-7, 2016. Crosstalk between XCR1-expressing dendritic cells and intestinal T cells keeps intestinal homeostasis through the XCR1-XCL1 chemokine axis. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Ginowan, Japan. Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Sugiyama, T. Ohta, Y. Fukuda, A. Miyamoto, H. Yamaue T. Kaisho. Dec. 5-7, 2016. Chemokine-directed cancer antigen peptide delivery to the XCR1+ dendritic cell subset. The 44th Annual Meeting of The Japanese Society for Immunology. Ginowan, Japan.</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脳転移性乳がん細胞の <i>BCL2A1</i> 高発現によるがん悪性化と臨床との関連性の評価																																				
研究代表者	所属・職名・氏名	星薬科大学先端生命科学研究センター・准教授・加藤良規																																				
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	星薬科大学先端生命科学研究センター・准教授・五十嵐勝秀																																				
	所属・職名・氏名	星薬科大学先端生命科学研究センター・助教・大塚まき																																				
	所属・職名・氏名																																					
	所属・職名・氏名																																					
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子																																				
【研究目的】	我々は、前年度の共同研究から、トリプルネガティブヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 の脳転移株である MDA-MB-231BR が、抗腫瘍薬 5-フルオロウラシルに対して耐性を示し、その耐性は抗アポトーシスタンパク質 <i>BCL2A1</i> の過剰発現に由来していることを見出した。この現象は、①親株及び骨転移株では観察されないことから、脳転移株に特異的であると考えられ、また②MDA-MB-231BR は、薬物の前処置なく 5-フルオロウラシルへの耐性を示していることから、通常の薬物耐性細胞とは異なり、非常に興味深い。また <i>BCL2A1</i> 遺伝子の発現は NF- κ B を介していることから、炎症性因子等の関与も考えられる。さらに興味深いことに、炎症性乳がんは乳がん全体の約 1% と患者数自体は少ないながらも、非常に悪性度の高いがんであり、なおかつ脳転移の割合が比較的高いことが知られている [Warren LE. et al. <i>Breast Cancer Res Treat</i> 2015;151:225]。そこで本研究では、まず炎症性乳がん細胞株の遺伝子を RNA シークエンシング (RNAseq) により網羅的に解析し、その中でも <i>BCL2A1</i> 遺伝子の発現を比較検討した。																																					
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト由来炎症性乳がん細胞株として、SUM149PT および SUM190PT を Asterand Bioscience 社より購入した。SUM190PT の脳転移株である SUM190BR3 は、米国がん研究所 (National Cancer Institute) の Dr. Steeg 研究室より入手した。まず炎症性乳がん細胞マーカーである P-カドヘリン (<i>CDH3</i>) [Hamida AB. et al. <i>BMC Cancer</i> 2008;8:28] の遺伝子発現を qRT-PCR にて確認したところ、炎症性乳がん細胞株である SUM149、SUM190PT、SUM190BR3 においてのみ過剰発現を認めた (表 1)。SUM149 は、シクロオキシゲナーゼ-2 (<i>PTGS2</i>) 遺伝子の発現が高かったものの、<i>BCL2A1</i> の過剰発現は認められなかった (表 1)。また SUM149 同様、SUM190PT および SUM190BR3 においても <i>BCL2A1</i> の過剰発現は確認されなかった (表 1)。さらに、RNAseq による網羅的な解析により、脳転移に関与すると報告されている 15 遺伝子について、</p> <p style="text-align: center;">表 1. qRT-PCR によって得られた Ct 値</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;">細胞株</th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"><i>PTGS2</i></th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"><i>BCL2A1</i></th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"><i>ERBB2</i></th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"><i>CDH3</i></th> <th style="border-top: 1px solid black; border-bottom: 1px solid black;"><i>GAPDH</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>MDA-MB-231</td> <td>30.39</td> <td>32.50</td> <td>28.49</td> <td>31.33</td> <td>19.88</td> </tr> <tr> <td>MDA-MB-231BR</td> <td>28.82</td> <td>24.56</td> <td>29.35</td> <td>37.14</td> <td>19.59</td> </tr> <tr> <td>SUM190PT</td> <td>32.93</td> <td>35.97</td> <td>19.70</td> <td>20.45</td> <td>19.37</td> </tr> <tr> <td>SUM190BR3</td> <td>32.59</td> <td>35.94</td> <td>19.93</td> <td>20.65</td> <td>19.24</td> </tr> <tr> <td>SUM149</td> <td>24.31</td> <td>30.70</td> <td>27.78</td> <td>19.44</td> <td>19.47</td> </tr> </tbody> </table> <p>MDA-MB-231BR および SUM190BR3 両脳転移株で親株より発現が高い遺伝子を抽出したところ、<i>ST6GALNAC5</i>、<i>PCDH7</i>、<i>LEF1</i>、<i>SERPINB2</i>、<i>TMEM47</i> の 5 遺伝子の発現が上昇していた。また、アストロサイトの共培養下でがん細胞の生存関連遺伝子が発現上昇することや [Kim SJ. et al. <i>Neoplasia</i> 2011;13:286]、MDA-MB-231BR で脱メチル化が起こり特定の遺伝子過剰発現を招いていることから [Sagara A. et al. <i>Breast Cancer Res Treat</i> 2017;161:269]、MDA-MB-231BR における <i>BCL2A1</i> 遺伝子およびタンパク質の過剰発現は、脳への転移指向性に寄与しているのではなく、MDA-MB-231 が脳転移後に脳内微小環境下で引き起こされたエピジェネティックな事象であり、MDA-MB-231BR の脳での生存に関わっていると考えられる。実際に脳転移を伴った乳がん患者からの脳転移性乳がん細胞の取得は困難であるが、今後本研究によって得られた知見と臨床との関連性の解明に期待される。</p>		細胞株	<i>PTGS2</i>	<i>BCL2A1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>CDH3</i>	<i>GAPDH</i>	MDA-MB-231	30.39	32.50	28.49	31.33	19.88	MDA-MB-231BR	28.82	24.56	29.35	37.14	19.59	SUM190PT	32.93	35.97	19.70	20.45	19.37	SUM190BR3	32.59	35.94	19.93	20.65	19.24	SUM149	24.31	30.70	27.78	19.44	19.47
細胞株	<i>PTGS2</i>	<i>BCL2A1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>CDH3</i>	<i>GAPDH</i>																																	
MDA-MB-231	30.39	32.50	28.49	31.33	19.88																																	
MDA-MB-231BR	28.82	24.56	29.35	37.14	19.59																																	
SUM190PT	32.93	35.97	19.70	20.45	19.37																																	
SUM190BR3	32.59	35.94	19.93	20.65	19.24																																	
SUM149	24.31	30.70	27.78	19.44	19.47																																	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Atsunobu Sagara, Katsuhide Igarashi, Maky Otsuka, Takeshi Karasawa, Noriko Gotoh, Michiko Narita, Naoko Kuzumaki, Minoru Narita, Yoshinori Kato. "Intrinsic resistance to 5-fluorouracil in a brain metastatic variant of human breast cancer cell line, MDA-MB-231BR." <i>PLoS One</i> 2016;11(10):e0164250.</p> <p>【学会発表】 相良篤信, 五十嵐勝秀, 大塚まき, 唐澤武司, 児玉章弘, 杉浦礼衣, 山下睦, 成田道子, 葛巻直子, 成田年, 加藤良規. 脳転移性乳がんにおける 5-FU 耐性自然獲得メカニズムの解析. 第 10 回日本緩和医療薬学会年会. 2016 年 6 月 3-5 日 浜松 (静岡)</p> <p>【その他特筆事項】</p>																																					

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌における ALK 阻害薬の耐性機序解明
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学病院 呼吸器アレルギー内科・教授・木浦勝行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・大学院生・磯崎英子
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・血液・腫瘍・呼吸器内科学・市原英基
	所属・職名・氏名	岡山大学病院・腫瘍センター・久保寿夫
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>EML4-ALK 融合遺伝子を有する進行・再発非小細胞肺癌患者においては、ALK チロシンキナーゼ阻害剤が著効する。しかしながら、投与開始数ヶ月後には多くの症例で再燃をきたす（耐性化する）ことが知られている。本研究では、ALK 阻害剤の耐性のメカニズムを解明し、克服する手段を探索する。そして <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> で耐性克服に有用な薬剤の効果を検証する。この結果をもとに臨床介入研究を行い、新たな EML4-ALK 融合遺伝子陽性肺癌に対する治療戦略を立案することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者は、多剤化学療法不応性 ALK 阻害薬未使用 ALK 融合遺伝子陽性肺癌患者胸水より肺腺癌細胞株 ABC-11 (Isozaki et al. Jpn J Clin Oncol, 2014) および米国で樹立された ALK 融合遺伝子陽性肺腺癌細胞株 H2228 を用いて、本研究を行った。</p> <p>まず、H2228 および ABC-11 に対して、培養フラスコ内でごく低濃度のアレクチニブ (30 nM) を持続曝露した。継代の度に濃度を段階的に上げ約 5 か月かけて高濃度曝露下で安定増殖するアレクチニブ耐性細胞株 (H2228/CHR および ABC-11/CHR) を樹立することに成功した。親株および各耐性株クローンについてウェスタンブロッティング、PCR、FISH、免疫染色、ELISA、ゼノグラフトモデル等の手法を用いて、親株と耐性株を比較し、耐性機構を分析した。各耐性株 (H2228/CHR および ABC-11/CHR) は、それぞれ異なる機序によりアレクチニブに耐性をきたしていた。H2228/CHR では Driver Oncogene である EML4-ALK 融合遺伝子が消失し、ALK 阻害剤は無効となっていた。また、代替の生存経路として IGF1R および HER3 経路の活性化が認められた。IGF1R チロシンキナーゼ阻害薬 (OSI-906) および EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (エルロチニブ) の併用により、H2228/CHR の増殖を抑制することができた。一方、ABC-11/CHR においては、肝細胞増殖因子 (HGF) を自己分泌することによって、MET 経路が活性化することでアレクチニブに耐性をきたしていた。さらに、FISH により HGF 遺伝子が他の遺伝子に転座していることが明らかとなった。本転座が HGF 自己分泌に与える影響をさらに検討中である。ABC-11/CHR においては、ALK および MET を阻害するクリゾチニブが有効であることが <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> にて証明された。今回の結果をもとに申請者は、アレクチニブ耐性後のクリゾチニブの有効性を検討する多施設共同の第二相試験を計画し、現在進行中である (Isozaki et al. Clin. Lung Cancer. 2016)。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Isozaki H, Hotta K, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Kubo T, Ninomiya T, Ninomiya K, Oda N, Yoshioka H, Ichikawa H, Inoue M, Takata I, Shibayama T, Kuyama S, Sugimoto K, Harada D, Harita S, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Protocol Design for the Bench to Bed Trial in Alectinib-Refractory Non-Small-Cell Lung Cancer Patients Harboring the EML4-ALK Fusion Gene (ALRIGHT/OLCSG1405). Clin. Lung Cancer. 2016; 17:602-605.</p> <p>Isozaki H, Ichihara E, Takigawa N, Ohashi K, Ochi N, Yasugi M, Ninomiya T, Yamane H, Hotta K, Sakai K, Matsumoto K, Hosokawa S, Bessho A, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Non-small cell lung cancer cells acquire resistance to the ALK inhibitor alectinib by activating alternative receptor tyrosine kinases. Cancer Res. 2016; 76:1506-1516.</p> <p>Mechanisms of Acquired Resistance to ALK Inhibitors and the Rationale for Treating ALK-positive Lung Cancer. Isozaki H, Takigawa N, Kiura K, Cancers (Basel). 2015;7(2):763-83.</p> <p>A New Human Lung Adenocarcinoma Cell Line Harboring the EML4-ALK Fusion Gene. Isozaki H, Yasugi M, Takigawa N, Hotta K, Ichihara E, Taniguchi A, Toyooka S, Hashida S, Sendo T, Tanimoto M, Kiura K. Jpn J Clin Oncol. 2014;44(10):963-8.</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>【学会発表】 平成 28 年 4 月 American Association for Cancer Research Annual meeting 2017 poster session 9 月 第 75 回 日本癌学会学術集会総会 シンポジウム</p>
	<p>【その他特筆事項】 平成 27 年 10 月 第 53 回日本癌治療学会学術集会優秀演題賞 平成 27 年 12 月 Travel Grant at European Society for Medical Oncology (ESMO) Asia 2015 平成 28 年 2 月 Tenth AACR-JCA Joint Conference Scholar-in-Training Award 平成 28 年 6 月 平成 27 年度岡山医学会賞がん研究奨励賞（林原・山田賞）受賞 平成 28 年 12 月 2016 年度日本肺癌学会若手奨励賞 受賞</p>

研究課題		HGF-Met 蛋白質間相互作用を制御するための構造基盤の構築と阻害剤設計
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪府立大学大学院理学系研究科・准教授・木下誉富
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>HGF (肝細胞増殖因子) は Met 受容体を介して多彩な生理機能を発揮する。HGF は肝臓など複数の組織において再生や保護を担う生理活性タンパク質である。一方、悪性腫瘍の本態といえるのが、がん細胞のもつ高い浸潤・転移能である。HGF は様々ながんに対して、浸潤・転移を強力に促すことから、HGF-Met 受容体系はがんの浸潤・転移阻止につながる分子標的になると考えられている。したがって、HGF-Met 受容体系を阻害する分子 (HGF-Met アンタゴニスト) は、がんの浸潤・転移・成長阻害につながる新規制がん分子になる。本研究はインシリコ創薬技術の中核として HGF と Met の相互作用面を標的とする低分子阻害剤の創成を目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>HGF の β 鎖にある、Met 受容体の結合に関与する分子内ポケットの構造に着目したインシリコスクリーニングを行い、HGF-Met 結合阻害アッセイやバイオアッセイによってリード化合物を選択した。リード化合物の最適化のための主たる方法として、標的ポケット構造への化合物のフィッティング状態を分子レベルで明らかにし、Structure-Based Drug Design (SBDD) により標的分子への親和性や特異性を向上させる分子設計法を用いる。本研究ではリード化合物と HGF-β 鎖の結合様式の詳細を知るために、HGF-β 鎖あるいは k4-β鎖と阻害剤との複合体 X 線結晶構造解析を試みた。</p> <p>九州工業大学・青木俊介准教授がインシリコ技術を駆使して見出した、HGF-Met 相互作用を阻害する注目化合物と HGF/β鎖あるいは HGF/β-k4 との複合体について結晶を調製した。HGF/β-k4 複合体における X 線回折データを収集し、分子置換法による結晶構造解析を行った。低分解能解析にもかかわらず、β鎖全域とジスルフィド結合でつながった k4 ドメインの一部の主鎖構造を決定することができた (図 1)。結晶中では Met 結合部部位が向かい合った、擬似的ダイマー構造を形成していることがわかった。しかしながら、k4 の大部分と化合物に相当する電子密度は観測されず、全構造解析には至らなかった。今後は結晶化条件の最適化を行い良質の結晶を調製し、高分解能構造解析を進めて、k4 ドメイン及び化合物の構造を明らかにする。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>1. Y. Sogabe, T. Hashimoto, T. Matsumoto, Y. Kirii, M. Sawa, T. Kinoshita, A crucial role of Cys218 in configuring an unprecedented form of MAP2K7, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 473, 476-481 (2016).</p> <p>2. N. Furuya, T. Momose, K. Katsuno, N. Fushimi, H. Muranaka, C. Handa, T. Ozawa, T. Kinoshita, The juxtamembrane region of TrkA kinase is critical for inhibitor selectivity, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 27, 1233-1236 (2017).</p>
	【学会発表】	<p>1. 露口正人、青木俊介、高木淳一、海津正賢、松本邦夫、木下誉富、HGF-Met 蛋白質間相互作用を制御するための構造基盤の構築と阻害剤設計、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム (2017 年)、金沢</p>
	【その他特筆事項】	

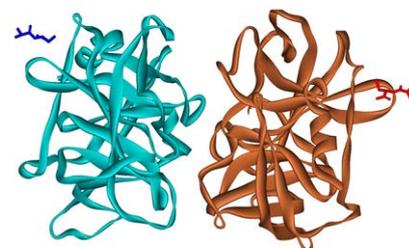
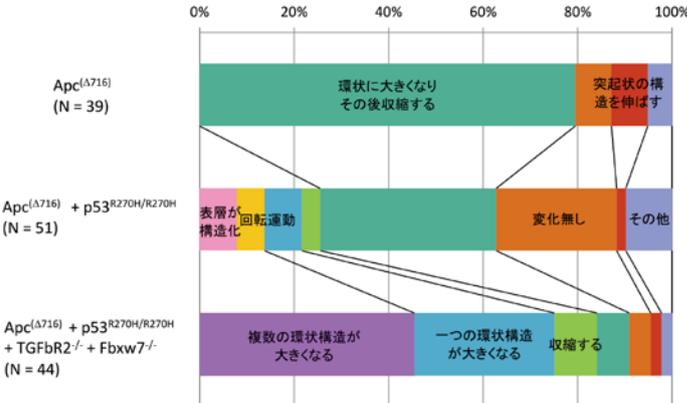
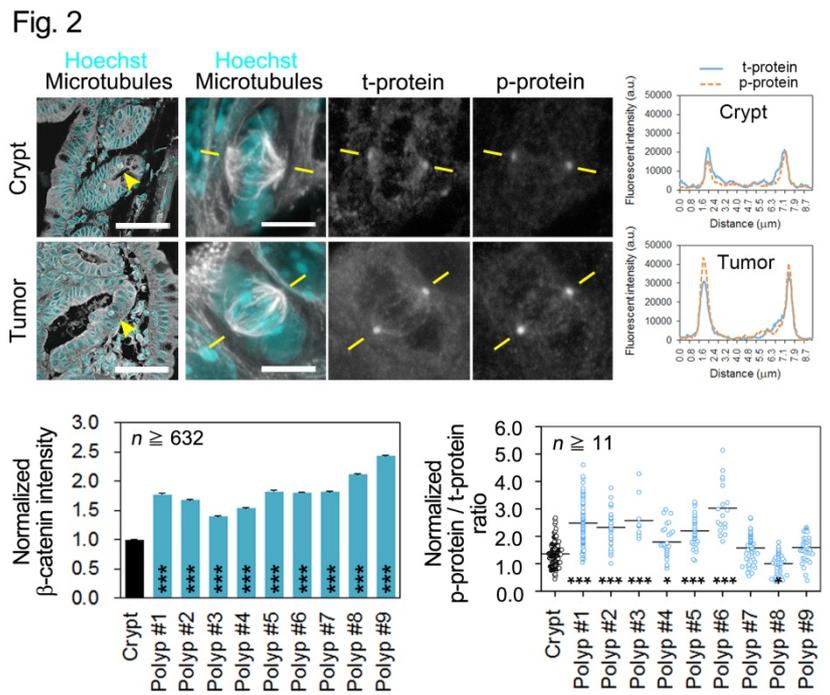
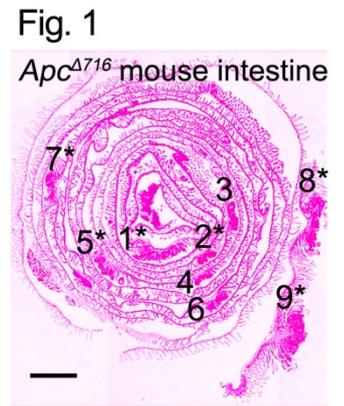


図 1 HGF- β -k4 複合体の構造

研究課題		大腸癌の肝転移を制御する微小環境の可視化																																								
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学 医学部 病理学 I 教授 清川悦子																																								
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学 医学部 病理学 I 助教 市川壮彦																																								
	所属・職名・氏名																																									
	所属・職名・氏名																																									
	所属・職名・氏名																																									
受入担当教員	職名・氏名	教授 大島正伸																																								
【研究目的】	<p>消化管では陰窩を伴うシート状構造を上皮細胞が作るが、腫瘍では形態が管状・篩状など複雑化する。生体内での構造を試験管内で再構成する方法として、細胞を細胞外マトリクスに富むゲル内で培養し内腔を単層の細胞が取り囲む類器官を培養する方法が確立されており、生体組織幹細胞からも類器官を作製することも可能である。複数の遺伝子変異を導入したマウスの消化管では腫瘍が発生するが、これらが形態に及ぼす影響はまだ明らかになっていない。そこで、本研究では、マウス消化管の腫瘍細胞から成る類器官の形成過程をライブで詳細に観察し、形態形成の分子機構を研究する基盤を作ることを目的とした。</p>																																									
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>各種遺伝子改変マウス消化管から類器官を作製し、炭酸ガス供給倒立顕微鏡にて 3-5 日間観察する条件を確立した。形態変化を肉眼的に分類すると、右表のようになる。すなわち APC 変異のみでは 8 割程度の類器官が大きくなった後収縮するといった表現型を示したのに対し、p53 変異が加わると表層の構造変化、回転運動が見られ、さらに TGFβ2, Fbxw7 のノックアウトが加わると 1 つもしくは複数の環状構造が大きくなる表現型が多く見られるというものである。</p> <p>細胞レベルでの形態・動態を明らかにするために蛍光観察も行った。株化した遺伝子改変マウス消化管上皮細胞に GFP を発現させ、高速で 3 次元構造を取得することが可能な炭酸ガス供給のニポウ板共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察した。左下図は APC、p53、Ras の変異と TGFβ2 ノックアウトの細胞から成る類器官の形成過程の 3 次元画像である。複数の腺管様構造が経時的に大きく、また複雑に成長することがわかる。これらの複雑な形態は、マウス消化管における不整腺管の出現率とよく相関しており、類器官培養は生体の形態を再現できていると考えられた。また、複数の遺伝子変異を持つ類器官は脾に移植すると肝に転移することが大島研究室で明らかにされており、このような複雑な腺管形成が、転移の過程においてなんらかの役割を果たす可能性があり、各種蛍光バイオセンサーなどが導入できれば、複雑な類器官形態の分子機構を明らかに出来る可能性を示している</p> <div style="display: flex; align-items: center;"> <div style="flex: 1;"> <p>0 48 96 hrs</p>  </div> <div style="flex: 2;">  <table border="1"> <caption>Organoid Morphology Percentages</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>環状に大きくなりその後収縮する</th> <th>突起状の構造を伸ばす</th> <th>表層が構造化</th> <th>回転運動</th> <th>変化無し</th> <th>その他</th> <th>複数の環状構造が大きくなる</th> <th>一つの環状構造が大きくなる</th> <th>収縮する</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Apc^(A716) (N=39)</td> <td>~80%</td> <td>~20%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>Apc^(A716) + p53^(R270H/R270H) (N=51)</td> <td>~40%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~20%</td> <td>~10%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> <td>0%</td> </tr> <tr> <td>Apc^(A716) + p53^(R270H/R270H) + TGFβ2^{-/-} + Fbxw7^{-/-} (N=44)</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> <td>~10%</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div>		Genotype	環状に大きくなりその後収縮する	突起状の構造を伸ばす	表層が構造化	回転運動	変化無し	その他	複数の環状構造が大きくなる	一つの環状構造が大きくなる	収縮する	Apc ^(A716) (N=39)	~80%	~20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	Apc ^(A716) + p53 ^(R270H/R270H) (N=51)	~40%	~10%	~10%	~10%	~20%	~10%	0%	0%	0%	Apc ^(A716) + p53 ^(R270H/R270H) + TGFβ2 ^{-/-} + Fbxw7 ^{-/-} (N=44)	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%
Genotype	環状に大きくなりその後収縮する	突起状の構造を伸ばす	表層が構造化	回転運動	変化無し	その他	複数の環状構造が大きくなる	一つの環状構造が大きくなる	収縮する																																	
Apc ^(A716) (N=39)	~80%	~20%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%																																	
Apc ^(A716) + p53 ^(R270H/R270H) (N=51)	~40%	~10%	~10%	~10%	~20%	~10%	0%	0%	0%																																	
Apc ^(A716) + p53 ^(R270H/R270H) + TGFβ2 ^{-/-} + Fbxw7 ^{-/-} (N=44)	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%	~10%																																	
【成果等】	【主な論文発表】	なし																																								
	【学会発表】	市川 壮彦、中山 瑞穂、坂井絵梨、大島 正伸、清川 悦子「腸管オルガノイドを用いた管腔構造形成過程の解明」 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2017年2月14-15日、金沢市																																								
	【その他特筆事項】																																									

	研究課題	APC (adenomatous polyposis coli)変異マウスの腫瘍形成における遺伝子型-表現型相関の分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・ユニットリーダー・清末優子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	理化学研究所・テクニカルスタッフ・武玉萍
	所属・職名・氏名	理化学研究所・研究支援パートタイマー・濱地知子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	我々は、腫瘍形成／発がんにつながる APC 変異を有する培養非がん細胞モデルを用いて、APC 変異に起因する染色体分配エラーの原因となる分子機構を明らかにしてきた。この現象が、腫瘍進展や発がんの過程にどのように関与しているのかを調べるため、大島研究室より <i>Apc^{Δ716}</i> マウス試料の提供を受け、腸管切片の蛍光免疫染色による分子機能／活性測定や、組織から抽出したゲノム DNA の解析を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々の細胞生物学・生化学的解析から、APC 変異細胞における染色体分配エラーの主要な原因は、APC 機能喪失によって安定化された β-catenin が、細胞分裂を正確に進行させるために中心的な役割を果たす細胞分裂キナーゼの活性化を阻害することであることを見出している。その結果、細胞は様々な染色体異常を誘発して染色体再編成をおこし、細胞分裂を繰り返すうちにより優位な染色体構造を獲得して増殖能が亢進した細胞集団となる。</p> <p>この過程が腫瘍形成のどの段階で生じているのかを調べるために、本共同研究を開始して <i>Apc^{Δ716}</i> マウス試料を提供いただいた。<i>Apc^{Δ716}</i> マウス (ヘテロ) では、正常アレルが LOH により失われるとポリープを形成開始することから (図 1)、正常 APC を保持するクリプト細胞とポリープ内の腫瘍細胞の分裂期像を取得し、染色体分配エラーや細胞分裂キナーゼの状態を解析した。蛍光免疫染色により総キナーゼとリン酸化キナーゼ (活性型) の比率を求めたところ、以外なことに、β-catenin レベルが上昇しているにも関わらず、腫瘍細胞の方が活性型キナーゼの比率が高い傾向にあった (図 2)。しかし、腫瘍においてはキナーゼ活性化因子のレベルも同時に上昇していた。その理由が染色体再編による遺伝子コピー数の増幅である可能性を考え、個々のポリープから採取したゲノム DNA の Comparative genomic hybridization (CGH) 解析を行ったところ、キナーゼ活性化因子遺伝子の増幅が検出された。これらの結果から、APC 変異に起因する染色体不安定性が、腫瘍形成の初期の段階において増殖やサイババルに優位となる染色体再編成を誘導している可能性が示唆された (論文投稿中)。</p>	



<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Pronobis MI, Deutch N, Posham V, <u>Mimori-Kiyosue Y</u>, Peifer M. ” Reconstituting regulation of the canonical Wnt pathway by engineering a minimal β-catenin destruction machine” Mol Biol Cell. 2017 Jan 1;28(1):41-53. doi: 10.1091/mbc.E16-07-0557. 2. <u>清末優子</u>. “ライトシート型超解像顕微鏡による 3D ライブイメージング” 実験医学別冊 『初めてでもできる！超解像イメージング』, p. 277, 羊土社, 2016.
	<p>【学会発表等】</p> <ol style="list-style-type: none"> 3. WS「細胞骨格、形態、運動を制御する分子機構」／座長のみ 細胞生物学会 2016 年会, 2016-06-16 (京都). 4. <u>清末優子</u> “格子光シート顕微鏡による細胞分裂過程の定量解析” 広島大学 HiFA セミナー, 2016-10-30. 5. <u>Mimori-Kiyosue Y</u> “Aurora A kinase is the primary dysregulated mitotic factor upon mutation in the APC tumor suppressor gene” The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2016-10-06 (Yokohama). 6. <u>Mimori-Kiyosue Y</u> “Dissecting 3D Dynamics of Mitotic Spindles by Lattice Light-Sheet Microscopy” International Congress on High-Speed Imaging and Photonics, 2016-11-09 (Osaka). 7. <u>清末優子</u> “APC がん抑制因子を基軸とする中心体複合体による細胞分裂制御機構 — 革新イメージング技術が明かす隠された細胞機能 —” 神戸大学シンポジウム, 2016-12-26. 8. <u>清末優子</u> “APC 変異に起因する染色体不安定性と、腫瘍進行におけるその役割” 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 2017-02-14 (金沢).
	<p>【その他特筆事項】</p>

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞形質を指標とした薬剤耐性メカニズムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野・分野長・河野隆志
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所ゲノム生物学研究分野・研究員・中奥敬史
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>報告者らは、悪性度の高い肺腺がんである浸潤性粘液腺がんの 5-15%において NRG1 融合遺伝子が認められることを見出した(Nakaoku T, et al. <i>Clin Cancer Res.</i> 2014)。さらに、NRG1 遺伝子にコードされる neuregulin 1/heregulin タンパク質は、HER2/HER3 受容体のリガンドとして機能し、NRG1 融合遺伝子産物は NK-κB シグナルを介し IGF2 の発現を亢進させることにより、がん細胞の幹細胞様形質を増強することを明らかにした (Maruyama T, Nakaoku T, et al, <i>Cancer Res.</i> 2016)。一方で、RET 融合遺伝子は肺腺がんの 1~2%に認められる遺伝子異常であり、RET チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) へ有効性を示す。しかしながら、RET-TKI に対して抗腫瘍効果が認められた症例でも、数ヶ月程度で薬剤耐性が出現する。本研究では、RET 融合遺伝子陽性肺がんの薬剤耐性を対象に、耐性機構を明らかにすること、その制御に向けた知見を得ることを目標としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者らの報告した RET 融合遺伝子は肺腺がんにおける新たな治療標的として期待されているが、薬剤耐性の出現が治療上、問題となることが予想される。そこで、RET 耐性機構の解明するために、現在市販されている唯一の RET 融合遺伝子陽性ヒト肺がん細胞である LC-2/ad を用いて、バンデタニブおよびカボザンチニブ等の複数の RET 阻害剤に対する薬剤耐性株を樹立した。臨床応用の期待される RET 阻害剤に対する耐性株をすでに樹立した。これらの LC2/ad 耐性細胞株に対して、癌関連遺伝子 50 個のホットスポットを調べるターゲットシーケンスを行ったが、遺伝子変化は認めなかった。バイパス経路の探索のため、抗体アレイを行い、耐性細胞では複数のキナーゼタンパク質の活性化が認められた。実際に LC2/ad 親株に対するそれらのリガンドの添加は、RET-TKI 感受性を低下させた。</p> <p>それに加え、他の RET 耐性モデルとして RET 融合遺伝子 cDNA 安定発現させた H3122 細胞株と Crispr/Cas9 遺伝子編集システムによる人工的 RET 融合遺伝子を発現させた細胞株を樹立し、耐性クローンを作成した。引き続き、これらの細胞を用いて、RET 融合遺伝子陽性の肺がん細胞株におけるバイパスシグナルによる薬剤耐性を対象に、RET 阻害剤に対する耐性機構を、主に増殖因子や細胞内シグナルによるサーキット形成に関わる候補を探索している。同定している候補因子には、がん幹細胞様形質の獲得に寄与することが報告されているものもあり、今後はその関与について機能的な機構について研究を続ける。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>1. Murayama T, Nakaoku T (co-first author), ... Kohno T*, Gotoh N*(co-corresponding author). Oncogenic fusion gene CD74-NRG1 confers cancer stem cell-like properties in lung cancer through a IGF2 autocrine/paracrine circuit, <i>Cancer Res.</i> 2016, 15;76(4):974-83.(本共同研究支援による発表).</p>
	【学会発表】	<p>1. 中奥 敬史、...、村山 貴彦、...、後藤 典子、河野 隆志: NRG1 Gene Fusion Enhances Cancer Stem Cell-like Properties in Lung Cancer. 横浜, 第 75 回日本癌学会学術総会. 2016 年 10 月</p>
	【その他特筆事項】	なし

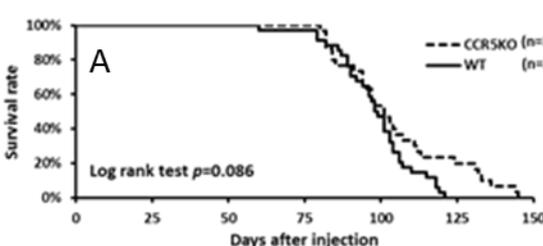
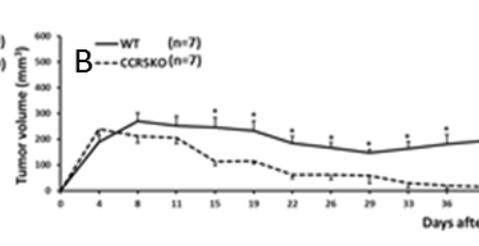
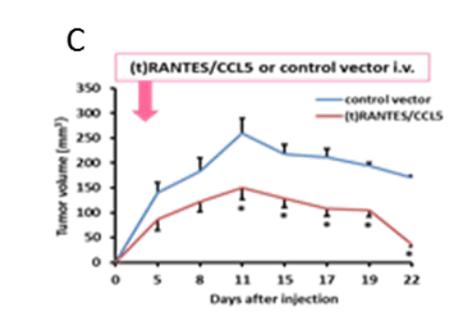
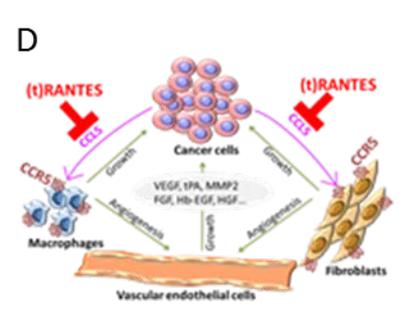
平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		β-カテニン/Tcf の転写標的 CRD-BP の分子病理学的特性と大腸がん病態の関連解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科学・教授・小坂健夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科学・准教授・木南伸一
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科学・講師・藤田秀人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科学・大学院・大西敏雄
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科学・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】	本研究は 2015 年度までの共同研究を進展させ、大腸がんにおける β-カテニン/T-cell factor (Tcf) の転写標的分子 coding region determinant-binding protein (CRD-BP) と、これにより mRNA が安定化される c-Myc や insulin-like growth factor (IGF)-II の相互発現とがんの臨床病理学的因子や病期との関連を解析する。これにより、β-カテニン/CRD-BP に誘導される機軸分子経路を指標として大腸がんにおける Wnt 経路の分子病態を新たな視点から明らかにし、がん診療への応用を検討することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>2013 年～2015 年度までの共同研究により、少数例の大腸がん症例を対象に CRD-BP により mRNA が安定化される分子の発現を mRNA レベルで比較解析した。そして、CRD-BP と β-transducin repeats-containing protein (TrCP)、c-myc および IGF-II の mRNA 発現が相関し、CRD-BP と c-myc の発現がリンパ管侵襲やリンパ節転移と相関することを示す予備結果が得られた。これを踏まえて今年度は、解析症例数を追加して mRNA レベルの発現相関の検証に加えて、免疫組織化学的に蛋白質レベルでこれらの分子の発現を比較解析し、それぞれの発現の相関や大腸がんの臨床病理学的因子、病期や予後などとの関連について検討した。</p> <p>実際には、貴研究所ヒト消化管がん組織バンクに登録されている 42 例の大腸がん症例を対象にした。各症例の腫瘍と非がん部(正常)組織検体から cDNA を調製し、定量的 RT-PCR により CRD-BP、β-TrCP1、c-myc と IGF-II の mRNA 発現を測定し、glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部対照とした ΔΔCt 法により相対的に評価した。β-カテニンと CRD-BP の蛋白発現は免疫染色により解析した。データの統計解析には Mann-Whitney U 検定、χ²検定、スピアマン順位相関係数を用い、p<0.05 を有意差ありとした。</p> <p>その結果、大腸がん症例における各分子の発現陽性頻度は CRD-BP: 66.7%、β-TrCP1: 71.4%、c-myc: 61.9% と IGF-II: 52.4% であった。CRD-BP mRNA 発現は β-TrCP1 (p=0.00)、c-myc (p=0.02) と IGF-II (p=0.02) と有意に相関した。臨床病理学的因子との検討では、年齢 65 歳以上で CRD-BP の発現が有意であったが、独立した予後不良因子は示唆されなかった。予後に関する検討では、CRD-BP 発現亢進を示す症例はそうでない症例に比べて、生存期間は短かった。これらの結果から、大腸がんにおいて β-カテニンの活性化により誘導される CRD-BP は β-TrCP1 や 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、原発腫瘍において CRD-BP の発現亢進は予後不良因子となりうる可能性があることが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tomita Y, et al, Minamoto T, Kosaka T. Expression of coding region determinant-binding protein (CRD-BP) and its influence on target gene expression and clinical characteristics in colorectal cancer. 投稿準備中。 2. S Kinami, T Onishi, J Fujita, Y Tomita, H Funaki, H Fujita, Y Nakano, N Ueda, T Kosaka: Optimal settings and accuracy of indocyanine green fluorescence imaging for sentinel node biopsy in early gastric cancer. <i>Oncology letters</i>, 11: 4055-62, 2016 3. M Noguchi, M Noguchi, Y Ohno, E Morioka, Y Nakano, T Kosaka, N Kurose, H Minato: Feasibility study of axillary reverse mapping for patients with clinically node-negative breast cancer. <i>Eur J Surg Oncol</i>, 42: 650-6, 2016 4. M Noguchi, M Yokoi-Noguchi, Y Ohno, E Morioka, Y Nakano, T Kosaka, T Kurita. Oncoplastic breast conserving surgery: Volume replacement vs. volume displacement. <i>Eur J Surg Oncol</i>, 42: 926-34, 2016 5. Y Nakano, M Noguchi, M Yokoi-Noguchi, Y Ohno, E Morioka, T Kosaka, T Takahashi, H Minato: The role of 18F-FDG-PET/CT and US-guided FNAC in assessment of axillary nodal metastases in breast cancer patients. <i>Breast cancer</i>, E-pub, 2016 6. M. Noguchi, S. Miura, E. Morioka, M. Noguchi, Y. Nakano Reply to: "Is there a role for axillary reverse mapping in the current management of breast cancer treatment?" <i>European Journal of Surgical Oncology</i> 42:153-154 2016 7. S. Kinami, H. Funaki, H. Fujita, Y. Nakano, N. Ueda, T. Kosaka Local resection of the stomach for 	

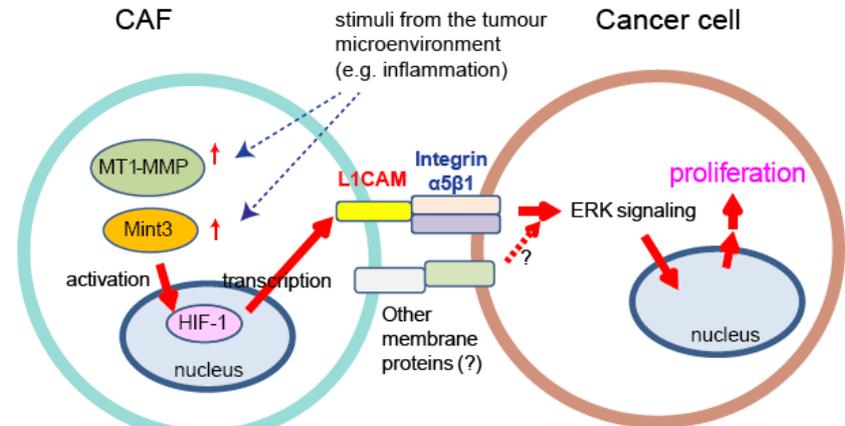
	<p>gastric cancer Surgery Today E-pub, 2016</p> <p>8. S.Kinami Perspective of new techniques overcoming laparoscopic sentinel node biopsy for early gastric cancer Transl Gastroenterol Hepatool E-pub, 2016</p> <p>9. S.Kinami Function-preserving curative gastrectomy guided by ICG fluorescence imaging for early gastric cancer ICG fluorescence imaging and navigation surgery 2016, chapter13 151-161</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. Y.Ohno, M.Noguchi, E.Morioka, M.Noguchi, Y.Nakano, T.Kosaka, H.Minato: Tangential frozen section analysis for the surgical margins in breast-conserving surgery. 8th Annual Asian Oncology Summit, 12th Annual Conference of the OOTR and Kyoto Breast Cancer Consensus Conference 2016 March 3rd, Kyoto</p> <p>2. Y.Nakano, M.Noguchi, M.Noguchi, Y.Ono, E.Morioka, T.Kosaka, T.Takahashi, H.Minato: The roles of 18F-FDG-PET/CT and US-guided FNAC in assessment of axillary nodal metastases in breast cancer patients. 8th Annual Asian Oncology Summit, 12th Annual Conference of the OOTR and Kyoto Breast Cancer Consensus Conference 2016 March 3rd, Kyoto</p> <p>3. S.Kinami, T.Onishi, Y.Fujii, J.Fujita, D.Kaida, Y.Tomita, H.Fujita, Y.Nakano, N.Ueda, T.Kosaka: The application of ICG fluorescence sentinel node biopsy for early gastric cancer to the laparoscopic function preserving gastrectomy. ISNS 2016 Biannual Meeting 2016 May 1st, Milan</p> <p>4. T.Onishi, C.Hashizume, T.Kosaka, T.Okazaki: Effects of colonic tumorigenesis in sphingomyelin synthase knockout mice. SphingoTherapy Conference 2016 June 17th, Kaga</p> <p>5. S.Miura, N.Ueda, S.Kinami, Y.Fujii, J.Fujita, D.Kaida, T.Onishi, Y.Tomita, H.Fujita, Y.Nakano, T.Kosaka: Gastrointestinal decompression by venting per cutaneous endoscopic gastrostomy: symptomatic relief of end-stage malignancies - case report. 40th World Congress of the International College of Surgeons / 62nd Annual Congress of the International College of Surgeons Japan Section 2016 Oct 24th, Kyoto</p> <p>6. S.Kinami, S.Miura, T.Onishi, Y.Tomita, H.Fujita, Y.Nakano, N.Ueda, T.Kosaka: Effect of surgical procedures, adjuvant chemotherapy and complications on prognosis following resection of advanced gastric cancer. 40th World Congress of the International College of Surgeons / 62nd Annual Congress of the International College of Surgeons Japan Section 2016 Oct 25th, Kyoto</p> <p>7. 大西敏雄、橋爪智恵子、韓佳、Lusi Oka Wardhan、Gao Rongfen、古元秀洋、小木曾英夫、谷口真、小坂健夫、岡崎俊朗. スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS)2 ノックアウト (KO) マウスでは炎症性大腸発癌、及び、急性大腸炎症が抑制される. 第 58 回日本脂質生化学会 (秋田)、2016 年 6 月</p> <p>8. 大西敏雄、藤井頼孝、小坂健夫、橋爪智恵子、小木曾英夫、古元秀洋、岡崎俊朗、谷口真. スフィンゴミエリン合成酵素 (SMS)2 ノックアウト (KO) マウスでは炎症性大腸発癌、及び、急性大腸炎症が抑制される. 第 27 回日本消化器癌発生学会総会 (鹿児島)、2016 年 9 月</p> <p>9. 富田泰斗、藤井頼孝、三浦聖子、藤田 純、甲斐田大資、大西敏雄、藤田秀人、木南伸一、中野泰治、上田順彦、小坂健夫、堂本貴寛、源 利成. 大腸がんにおける CRD-BP の発現とがんの臨床病理学的特性や分子病態との関連解析. 金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 2017 年 2 月 14 日, 15 日, 金沢東急ホテル, 金沢.</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>
--	--

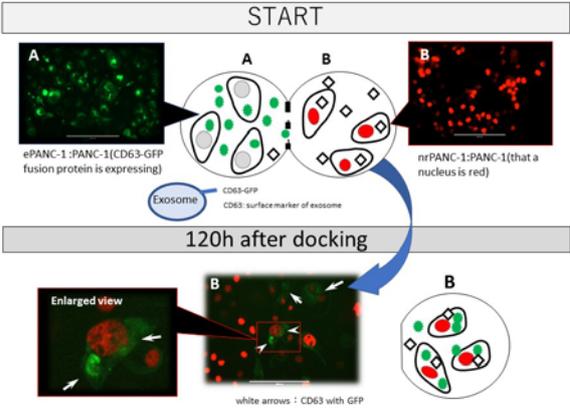
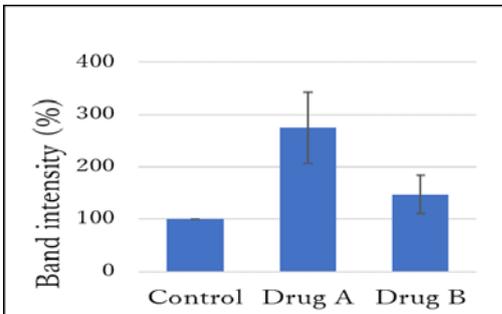
研究課題		CML 患者における TKI の継続的投与に伴うケモカイン CCL3 発現量の推移
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学・教授・小松 則夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	順天堂大学・助教・森下 総司
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>向田らのグループにより作出された CML の病態モデルマウスを用いた検討で、CML の発生段階ではケモカインの一種である CCL-3 が高発現していることが明らかとなった。この知見をもとに、本共同研究では、CML 患者においても CCL-3 が高発現しているかを調べることを目的として検討を進めてきたが、ヒトでは CML 診断時が発症時ではないため、単純に末梢血中の CCL-3 発現量を定量しても健常人との比較や経時的な変化に有意な差は認められなかった。</p> <p>本研究では、上記を踏まえ、チロシンキナーゼ阻害薬により治療され、BCR/ABL1 mRNA の発現が 2 年間継続的に検出されなかった症例を対象に、投薬治療中止後の CML 患者末梢血中の CCL-3 発現量を定量し、再発の有無や BCR/ABL1 mRNA 発現量との相関を調べることにした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>チロシンキナーゼ阻害薬による治療が施され、BCR/ABL1 mRNA の発現が 2 年間継続的に検出されなかった CML 患者において、投薬治療中止後の BCR/ABL1 mRNA 発現量、CCL-3 発現量を 1 ヶ月ごとに定量し、CML を再発した群 (relapse)、しなかった群 (CMR) との間に見られる特徴を調べた。その結果、再発例では BCR/ABL1 mRNA 発現量の上昇に伴い CCL-3 mRNA 発現量も上昇する様子を確認できたが、非再発例では CCL-3 発現量低値を維持している例や一時的な発現量上昇が見られる例もあり、再発の有無による CCL-3 発現量に明確な差は認められなかった (図 1)。これは、CCL-3 が体内の様々な変化に対して鋭敏に反応するケモカインであるため、末梢血中の発現量では CML 発生段階の様子を捉えきれていないことが原因と考えられた。</p> <div style="text-align: center;"> </div>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

図 1 CML 再発例 (relapse) と非再発例 (CMR) における CCL-3, BCR/ABL1 mRNA 発現量の経時変化

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
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・教授・近藤稔和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・准教授・木村章彦
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・講師・石田裕子
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・助教・野坂みずほ
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・学内助教・小林 彩
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>卵巣癌の腹膜播種での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について、CCR5に着目し、卵巣癌進展におけるCCR5システムの分子病理学的役割を検討する。最終的に本研究により得られた結果に基づいて、卵巣癌の進展に強く影響するケモカイン・ケモカインレセプターを同定することによって、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。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>8 から 10 週齢の雌 C57BL/6 マウス (WT) 及び CCR5^{-/-} マウス (KO) にマウス卵巣癌細胞株 ID8 (5 × 10⁶ 個/匹) を腹腔内または皮下移植し、腫瘍の増殖・進展を検討した。また、腫瘍組織中の増殖因子やサイトカインの遺伝子発現、並びに炎症細胞浸潤、血管新生、線維芽細胞について解析した。腹腔内移植モデルでは、両群マウスの生存率について KO マウスで WT マウスに比較して、相対的に生存率の延長が認められた (A)。腹水量及び腹腔内播種数については、KO マウスでは WT マウスに比べて有意に減少していた。また、皮下腫瘍モデルでは腫瘍接種後 13 日までは KO マウス、WT マウスの両群で腫瘍が同程度に発育したが、それ以後、WT マウスでは、漸次腫瘍が増大したが、KO マウスでは腫瘍の有意に退縮した (B)。実際、この卵巣がんモデルで、WT マウスにおいて CCR5 の発現がマクロファージおよび線維芽細胞に観察された。次に KO マウスでは腫瘍組織内へのマクロファージの浸潤が有意に減弱していた。さらに、腫瘍組織内の線維化および血管新生について検討したところ、線維化・血管新生のいずれも KO マウスで有意に減弱が認められた。さらに、腫瘍組織内の腫瘍増殖関連因子 (VEGF, MMP2, t-PA, Col1a1, HGF, FGF) の遺伝子発現を検討したところ、いずれの遺伝子発現についても、WT マウスに比べて KO マウスで有意に抑制されていた。最後に WT マウスに CCR5 のリガンドである CCL5 の変異遺伝子をベクターを用いて投与したところ、対照群と比較して、腫瘍増殖が有意に抑制され (C)。このことから、卵巣癌の増殖において、CCL5-CCR5 を介したシグナルが重要な役割を果たしていることが示唆された。</p>	
   		

<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】 Kimura A, Ishida Y, Nosaka M, Kuninaka Y, Hama M, Kawaguchi T, Sakamoto S, Shinozaki K, Iwahashi Y, Takayasu T, Kondo T. Exaggerated arsenic nephrotoxicity in female mice through estrogen-dependent impairments in the autophagic flux. <i>Toxicology</i>, 339:9-18. 2016 doi: 10.1016/j.tox.2015.11.005.</p> <p>Shimomatsu T, Kanazawa N, Mikita N, Nakatani Y, Li HJ, Inaba Y, Ikeda T, Kondo T, Furukawa F. The effect of hydroxychloroquine on lupus erythematosus-like skin lesions in MRL/lpr mice. <i>Mod Rheumatol</i>, 26:774-778. 2016 doi: 10.3109/14397595.2016.1140711.</p> <p>Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kawaguchi T, Yamamoto H, Kuninaka Y, Kondo T. Immunohistochemical detection of intrathrombotic fibrocytes and its application to thrombus age estimation in murine deep vein thrombosis model. <i>Int J Legal Med</i>, 131:179-183. 2016 DOI: 10.1007/s00414-016-1465-6</p>
	<p>【学会発表】 Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Mukaida N, Kondo T. Absence of CCR5 axes accelerates thrombus formation through reduced uPA and tPA expression in murine deep vein thrombosis model. The 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages 2016 (MMCB2016). Abstracts, 105, Tokyo, 2016.6</p> <p>Mizoguchi M, Nosaka M, Ishida Y, Kuninaka Y, Kimura A, Mukaida N, Kondo T. The absence of CX3CR1 impairs inflammation-induced preterm labor through the reduction of intrauterine macrophage recruitment. 第 45 回日本免疫学会総会学術集会. <i>Proceedings of the Japanese Society for Immunology</i> 45, 124, Okinawa, 2016.12</p> <p>近藤稔和. 侵襲と組織修復－皮膚から心臓まで. 第 46 回日本創傷治癒学会. 抄録集, 85, 東京, 2016.12</p>
	<p>【その他特筆事項】 特記事項なし</p>

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
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・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。本年の研究では特に線維芽細胞および腫瘍関連線維芽細胞における MT1-MMP/Mint3 axis の役割の解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>線維芽細胞は腫瘍組織における主要な細胞でありがんの進展や薬剤耐性に影響するが、線維芽細胞によるがん悪性化の理解は不十分である。本研究では通常酸素下で HIF-1 を活性化する分子である Mint3 の線維芽細胞における役割を解析した。マウス胎児性線維芽細胞 (MEF) において Mint3 欠損は共移植したヒト乳癌細胞株や扁平上皮癌株の造腫瘍能と <i>in vitro</i> のがん細胞増殖を抑制した。さらなる解析の結果、線維芽細胞において Mint3 が HIF-1 依存的に接着分子 L1CAM の発現を誘導し、L1CAM はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介してがん細胞の ERK シグナルを活性化することが明らかとなった。ヒト乳癌患者検体由来の腫瘍関連線維芽細胞 (CAF) においても Mint3 および L1CAM はがん細胞の <i>in vitro</i> の増殖と造腫瘍能を促進した。ヒト乳癌組織において、L1CAM、Mint3、Mint3 による HIF-1 活性化を促進する MT1-MMP の陽性線維芽細胞数は非がん組織に比べて有意に高かった。これらのことから、線維芽細胞における Mint3 はがん細胞・間質細胞の相互作用を制御する良い標的に成るかもしれない。</p>  <p>図：本研究によって明らかとなった CAF の MT1-MMP/Mint3 によるがん細胞増殖機構</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Nakaoka HJ, Tanei Z, Hara T, Weng JS, Kanamori A, Hayashi T, <u>Sato H</u>, Orimo A, Otsuji K, Tada K, Morikawa T, Sasaki T, Fukayama M, Seiki M, Murakami Y, <u>Sakamoto T*</u>. Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin $\alpha 5 \beta 1$ and tumour growth. <i>Oncogenesis</i>, in press.</p> <p>【学会発表】 ポスター発表. <u>坂本 毅治</u>、中岡 寛樹、種井 善一、金森 茜、佐藤 博、清木 元治、村上 善則. Mint3 は線維芽細胞において L1CAM 発現を誘導することでインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介したがん細胞増殖と造腫瘍能を促進する. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、金沢東急ホテル (金沢市)、2017/2/14</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

	研究課題	癌細胞エクソソームの分子病態解明によるがん治療法の開発								
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 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・助手・山本 聡子								
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御・助教・堂本 貴寛								
	所属・職名・氏名									
	所属・職名・氏名									
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成								
【研究目的】	<p>エクソソームと呼ばれる細胞分泌小胞が細胞間相互作用において重要な役割をもつことが明らかとなってきている。エクソソームは細胞間を移動し、エクソソームを受け取った細胞の形質を変化させ、種々の生命現象の制御に寄与している。しかし、この研究分野はまだ初期段階にあり、基礎的な分子機構以外にも、種々の条件での機能については十分に理解されていない。エクソソーム分泌や取り込み機構を中心とした分子機構の解明を行うことにより、新たながん治療法の開発の研究を行う。</p>									
<p>【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 60%;"> <p style="text-align: center;">Exosome Intake experiments</p> <p style="text-align: center;">START</p>  <p style="text-align: center;">120h after docking</p>  <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <caption>Band intensity (%)</caption> <thead> <tr> <th>Condition</th> <th>Band intensity (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Control</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>Drug A</td> <td>~280</td> </tr> <tr> <td>Drug B</td> <td>~150</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div style="width: 35%;"> <p>エクソソームは細胞から分泌される大きさ 50-200 nm 程度の脂質二重膜構造をもつ小胞である。近年の研究により、エクソソームは細胞間相互作用の媒体として重要な役割をもつことが明らかになってきている。これまでの研究では、細胞から回収・濃縮したエクソソームを他の細胞に投与する研究方法が一般的である。しかし、真に生体内で一方向的なエクソソームの授受が起きているかは不明である。つまり、生体内では様々な状況の細胞が近接しており、エクソソームの授受は、相手側の反応も含めて解析する必要がある。</p> <p>そこで、双方を同時に観察できる細胞の共培養容器を利用して、エクソソームの授受に関する評価系を構築し、薬剤によるエクソソーム授受の定量的評価を行った。送出側の細胞のエクソソームをラベルし、受け手側細胞での取り込み量を測定することにより、間接的にエクソソームの産生・分泌量を測定した。薬剤によるエクソソーム産生量の違いを検討したところ、薬剤により大きくエクソソーム産生量が異なっており、特に抗がん剤は、細胞内の機能に影響を与えることから、エクソソームの産生・分泌に影響する分子生物学的な機序の推定が可能になる。核酸合成障害を強く来す薬剤では、エクソソームの産生・分泌量が特に増加することが明らかとなった。今後は、さらなる検討を行う予定である。</p> </div> </div>		Condition	Band intensity (%)	Control	100	Drug A	~280	Drug B	~150
Condition	Band intensity (%)									
Control	100									
Drug A	~280									
Drug B	~150									
【成果等】	<p>【主な論文発表】なし</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1.島崎猛夫、源利成ら. 膵癌細胞のエクソソーム動態に影響する因子の検討、日本癌学会 2016 2.島崎猛夫、源利成ら.膵癌細胞のエクソソーム動態に影響する因子の検討、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム 2017 <p>【その他特筆事項】</p> <p>本研究は、継続的な研究が必要です。引き続きご支援の程お願いします。</p>									

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学情報科学研究科・教授・清水 浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学情報科学研究科・准教授・松田史生
	所属・職名・氏名	大阪大学情報科学研究科・博士後期課程学生・岡橋伸幸
	所属・職名・氏名	大阪大学情報科学研究科・博士前期課程学生・前田昂亮
	所属・職名・氏名	大阪大学情報科学研究科・博士前期課程学生・荒木千絵
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>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。昨年までに、培養細胞に適用可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法の基盤を開発し、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きの把握が可能になった。本年度は、これまで確立した手法を <i>p53</i> ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株(<i>p53KO</i>)に適用し、詳細なフラックス解析を行うこととした。また、標的代謝酵素の阻害を同定するために必要となる代謝酵素発現量を解析するため、定量プロテオーム分析法の開発を行った。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>がん幹細胞仮説を代謝工学的あるいはシステム生物学的にとらえ直し、がん悪性進展制御法の新たなブレークスルーに繋げることを目指し、中心代謝のフラックス解析および定量プロテオーム分析法の開発を行った。<i>p53</i> ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株(<i>p53KO</i>)と変異型 <i>p53</i> を再導入した <i>p53mut</i> 株を DMEM 中で培養し、培地中の成分組成の経時変化を HPLC で測定したところ、<i>p53mut</i> 株は <i>p53KO</i> 株に比べて、ワールブルグ効果の指標となる乳酸の比生産速度が 17%減少していた。<i>p53</i> のステートが中心代謝に影響を及ぼしていることが示唆された。</p> <p>そこで、<i>p53KO</i> 株を対象に ^{13}C 代謝フラックス解析法の適用し代謝状態の定量的描写を試みた。$[1-^{13}\text{C}]$グルコースを投与した <i>p53</i> ノックアウトマウス軟部腫瘍由来細胞株(<i>p53KO</i>) から、細胞内代謝中間体を経時的に回収し、GC-MS を用いて代謝物質の ^{13}C 標識濃縮度を測定した。経時変化データから解析プラットフォーム(OpenMebius)(Kajihata, 2014, Okahashi, 2015)を用いて代謝フラックス分布を推定した。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きを推定することができた。この株では、リンゴ酸酵素が触媒するリンゴ酸デヒドロゲナーゼ (脱炭酸) 反応が主要な NADPH 再生反応であることが明らかとなった。</p> <p>また、代謝フラックスの変動要因の解明を目指し、中心代謝酵素発現量を一斉測定可能な定量プロテオーム分析法を構築した。マウス細胞株由来のタンパク質画分から調製したトリプシン消化ペプチドのナノ LC-MS/MS 分析を繰り返し行い、PGAM2 をはじめとする 50 種の中心代謝酵素を定量可能な SRM アッセイメソッドを構築した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	

平成 28 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) 荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、清水浩、代謝阻害剤で処理した動物培養細胞の¹³C代謝フラックス解析、日本質量分析学会 第64回質量分析総合討論会 2016 大阪、ホテル阪急エキスポパーク、5月18-19日(2016)
- 2) 岡橋伸幸、前田昂亮、荒木千絵、河野晋、松田史生、高橋智聡、清水浩、同位体ターンオーバー情報を用いた中心代謝フラックス解析法の構築、第4回がんと代謝研究会、かごしま県民交流センター、7月7-8日(2016)
- 3) 岡橋伸幸、松田史生、河野晋、高橋聡、清水浩、¹³C代謝フラックス解析法を用いた動物培養細胞のNADPHターンオーバー速度の計測、第68回日本生物工学会大会、富山国際会議場 ANAクラウンプラザホテル富山、9月28-30日(2016)
- 4) 岡橋伸幸、河野晋、前田昂亮、荒木千絵、松田史生、高橋智聡、清水浩、がん幹細胞特異的代謝フラックスの解明、平成28年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、金沢東急ホテル2月14日(2016)
- 5) 上原ひかる、荒木千絵、前田昂亮、岡橋伸幸、松田史生、清水浩、中心代謝フラックス分布のがん細胞株間比較、化学工学会82年会、芝浦工業大学、豊洲キャンパス、3月6日-8日(2017)

【その他特筆事項】

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍形成に関わる間質細胞由来メタロプロテアーゼの機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学医学部・病理学教室・講師・下田将之
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	慶應義塾大学医学部・病理学教室・講師・望月早月
	所属・職名・氏名	慶應義塾大学医学部・外科学教室・准教授・大塚崇
	所属・職名・氏名	順天堂大学大学院医学研究科・運動器・腫瘍性疾患病態学講座・客員教授・岡田保典
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	細胞機能統御研究分野・教授・佐藤博
【研究目的】	<p>がん組織はがん細胞と間質成分から構成され、間質成分としては線維芽細胞、血管内皮細胞、炎症細胞などの多種の細胞、細胞膜表面や細胞間に局在する細胞外マトリックスが含まれる。その中でも、がん関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) は腫瘍間質の主要な構成成分であり、がんの進展に関わることが知られている。本研究では、メタロプロテアーゼの内因性インヒビターである TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) 欠損線維芽細胞を用いて CAF 形質維持におけるメタロプロテアーゼ活性の役割を明らかにするとともに、マイクロアレイデータをもとに CAF で高発現するメタロプロテアーゼ分子の探索を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>がん関連線維芽細胞 (CAF) はがん間質の主要な構成成分であり、種々のがん組織において CAF の存在ががんの悪性度と相関していることが報告されている。本研究では、はじめに内因性のメタロプロテアーゼ阻害因子である TIMP 分子を欠損した TIMP 欠損線維芽細胞を作製し、CAF 形質維持に関わる TIMP 分子の役割を検討した。Timp 遺伝子欠損マウスより単離した初代培養 TIMP 欠損線維芽細胞は、野生型線維芽細胞と比べ活性化した筋線維芽細胞様性質を示すとともに、種々の腫瘍促進因子を高発現し、ヒト CAF に類似した形質を有していることが明らかとなった。また、TIMP 欠損線維芽細胞と種々のヒトがん細胞株を用いたマウスへの移植モデルでは、TIMP 欠損線維芽細胞は、ヒト乳がん細胞、肺がん細胞、頭頸部がん細胞株の増殖を有意に亢進するとともに、肺への自然転移を亢進した。蛍光ペプチドを用いた解析から TIMP 欠損線維芽細胞は高いメタロプロテアーゼ活性を有するとともに、種々のメタロプロテアーゼ阻害剤により TIMP 欠損線維芽細胞における活性化線維芽細胞様形質が抑制されることがわかった。以上の結果は、がん間質の線維芽細胞で発現する TIMP 分子がメタロプロテアーゼ活性をコントロールすることにより CAF 形質獲得および腫瘍進展に関与している可能性を示唆している。さらに、ヒトがん組織より採取したがん間質あるいはマウス CAF において発現変動するメタロプロテアーゼおよび TIMP 分子の探索を行った。ヒト浸潤性乳がんあるいは非がん乳腺間質から microdissection 法により採取したがんおよび非がん間質組織を用いたマイクロアレイデータの解析から、乳がん間質において種々のメタロプロテアーゼ分子の発現が有意に上昇しているとともに、メタロプロテアーゼ阻害分子である TIMP3 の発現が有意に低下していることを見出した。一方、マウス由来 CAF マイクロアレイデータの解析から、CAF 特異的に高発現する種々のメタロプロテアーゼ候補分子を同定した。今後これらの解析をもとに、CAF で高発現するメタロプロテアーゼを欠損したマウスなどを用いて、腫瘍進展に関わる CAF 発現メタロプロテアーゼの役割解析を進める予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p><u>Shimoda M, Ota M and Okada Y: Isolation of cancer stem cells from human lung carcinoma cell lines by Hoechst side population method. Methods Molec Biol (Springer), 2017, in press.</u></p> <p><u>Shimoda M, Jackson HW and Khokha R: Tumor suppression by stromal TIMPs. Mol Cell Oncol, 3:e975082, 2016.</u></p> <p>【学会発表】</p> <p>下田将之、Rama Khokha、岡田保典：がん関連線維芽細胞形質維持に関わるメタロプロテアーゼの機能解析。ポスター。金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム。2017年2月14日。金沢。</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		超早期転移乳がん幹細胞を特徴づける幹細胞性維持機構の解析
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・下野洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・特任助教・西村建徳
	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・大学院生・向山順子
	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南博信
	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・鈴木 聡
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>乳がん幹細胞は、がん組織の形成と維持、さらにはがんの転移にも関わる。乳がんの転移は、時として治療による寛解後 10 年以上経過してから出現するが、再発転移に中心的な役割をもつ「転移乳がん幹細胞」を特徴づける分子機構は明らかではない。本研究では、原発巣と転移巣の乳がん幹細胞の遺伝子発現解析およびパスウェイ解析の結果をもとに、転移巣の乳がん幹細胞の幹細胞性の制御に特有の分子機構を解析する。原発巣と比べ治療が極めて困難である転移巣のがん幹細胞の性質を解明する研究を通じて、乳がん患者の予後改善に大きく貢献できる知見を得ることを目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>乳がんの手術検体を免疫不全マウスに移植したヒト乳がん異種移植マウス (PDX) の原発巣および臓器転移巣よりがん幹細胞を分離し、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析およびパスウェイ解析を行った。転移乳がん幹細胞は、1. 細胞増殖シグナル活性の低下、2. 低酸素応答の低下 3. 上皮間葉転換の抑制、などの点で原発巣のがん幹細胞とは大きく異なる性質をもつことが明らかになった。これらの成果を踏まえ、本研究では低酸素応答と転写因子 MEF2 に特に着目して、転移がん幹細胞に特有の分子機構を解析した。</p> <p>(1) 転移環境における組織低酸素環境の減弱：Pimonidazole を用いた組織染色法により、原発巣と転移巣を比較した。原発巣はその多くの部分が組織低酸素環境にあるのに対し、転移巣では大半のがん細胞は非低酸素領域に局在した。</p> <p>(2) 転移がん幹細胞における低酸素応答性 miR-210 の発現低下：PDX 由来乳がん幹細胞では、低酸素培養で miR-210 の発現が上昇した。ヒト乳がん PDX より分離した転移がん幹細胞でも、低酸素応答性 miR-210 の発現は顕著に低下していた。</p> <p>(3) 転移がん幹細胞における miR-210 の標的遺伝子の発現上昇 (図)：PDX 由来転移がん幹細胞では、KMT2D や MEF2 など miR-210 の標的候補遺伝子の発現が上昇していた。またこの知見は、転移がん幹細胞で MEF2 のパスウェイが亢進していることとも一致する。</p> <p>本研究により、転移巣のがん幹細胞では、低酸素環境の減弱に伴う miR-210 の発現低下により、MEF2 などの標的遺伝子の発現上昇を誘導している可能性が示された。</p>	
<p>図. 転移乳がん幹細胞における低酸素応答の変化 A. 低酸素応答に関連するパスウェイは転移がん幹細胞では、原発巣がん幹細胞と比べ顕著に減弱している。 B. 低酸素応答性 miR-210 の発現が低下している転移がん幹細胞では、miR-210 の標的候補遺伝子の発現上昇がみられる。</p>		

【成 果 等】

【主な論文発表】

1. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji EI, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, Akashi K, Tada KI, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh N. Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. *Oncogene*, 36: 1276-1286, 2017.
2. Nishio M, Maehama T, Goto H, Nakatani K, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Hippo vs. Crab: tissue-specific functions of the mammalian Hippo pathway. *Genes Cells*, 22: 6-31, 2017.
3. Nakatani K, Maehama T, Nishio M, Goto H, Kato W, Omori H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Targeting the Hippo signalling pathway for cancer treatment. *Journal of Biochemistry*, 161: 237-244, 2017.
4. Sakaguchi M, Hisamori S, Oshima N, Sato F, Shimono Y, Sakai Y. miR-137 Regulates the Tumorigenicity of Colon Cancer Stem Cells through the Inhibition of DCLK1. *Molecular Cancer Research*, 14: 354-362, 2016.
5. Kitayama M, Mizutani K, Maruoka M, Mandai K, Sakakibara S, Ueda Y, Komori T, Shimono Y, Takai Y. A Novel Nectin-mediated Cell Adhesion Apparatus That Is Implicated in Prolactin Receptor Signaling for Mammary Gland Development. *Journal of Biological Chemistry*, 291: 5817-5831, 2016.
6. Ijuin T, Takeuchi Y, Shimono Y, Fukumoto M, Tokuda E, Takenawa T. Regulation of CD44 expression and focal adhesion by Golgi phosphatidylinositol 4-phosphate in breast cancer. *Cancer Science*, 107: 981-990, 2016.
7. Mukohyama J, Shimono Y, Yamashita K, Sumi Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y. Effect of Xenotransplantation Site on MicroRNA Expression of Human Colon Cancer Stem Cells. *Anticancer Research*, 36: 3679-3686, 2016.
8. Mukohyama J, Iwakiri D, Zen Y, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y, Shimono Y. Evaluation of the risk of lymphomagenesis in xenografts by the PCR-based detection of EBV BamHI W region in patient cancer specimens. *Oncotarget*, 7: 50150-50160, 2016.
9. Shimono Y, Mukohyama J, Isobe T, Johnston DM, Dalerba P, Suzuki A. Organoid Culture of Human Cancer Stem Cells. *Methods in Molecular Biology (Springer)*, 2016.

【学会発表】

1. Shimono Y. MicroRNA Regulation of Cancer Stem Cells in Human Solid Tumors. 神戸大学・ワシントン大学・オスロ大学国際合同シンポジウム, 神戸, 2017.3.
2. Suzuki M, Maehama T, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. Role of Hippo pathway in vivo. 神戸大学・ワシントン大学・オスロ大学国際合同シンポジウム, 神戸, 2017.3.
3. 近藤 弘基、下野 洋平、向山 順子、鈴木 聡. 低酸素環境における MCM7 とそのイントロン領域に存在するマイクロ RNA-25 の発現解離. 第 20 回バイオ治療法研究会学術集会, 福岡, 2016.12.
4. Mukohyama J, Mukohara T, Minami H, Kakeji Y, Shimono Y. Upregulation of Oncogenic miR-221 in Human Colon Cancer Stem Cells. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.
5. Shibuya N, Mukohyama J, Isobe T, Kondo H, Mukohara T, Kakeji Y, Minami H, Suzuki A, Shimono Y. Selectively upregulated miR-221 regulates the clonogenicity of human colon cancer stem cells. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.
6. Nishio M, Goto H, Otsubo K, Togashi H, Shimono Y, Maehama T, Suzuki A. Role of Hippo pathway in vivo. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.
7. Shimono Y. Identification of the proteins specific for human breast cancer stem cells. Collaboration in response to societal challenges between Kobe University and Belgian Universities, 神戸, 2016.10.
8. Nishio M, Goto H, Miyachi Y, Togashi H, Shimono Y, Suzuki A. The Hippo signaling Pathway: Function, Disorders, and Therapeutic Targeting. 第 89 回日本生化学会大会, 仙台, 2016.9.
9. 田中雅人、後藤裕樹、西尾美希、中谷圭佑、前濱朝彦、富樫 英、下野洋平、鈴木 聡. 第 48 回日本臨床分子形態学会, 熊本, 2016.9.
10. Mukohyama J, Shimono Y, Mukohara T, Kakeji Y, Minami H. Upregulation of Oncogenic miR-221 in Human Colon Cancer Stem Cells. 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸, 2016.7.
11. 下野 洋平、向山 順子、西村 建徳、磯部 大地、向原 徹、鈴木 聡、後藤 典子、南 博信. 臓器への潜在転移に関わるヒト乳がん幹細胞の解析. 第 26 回日本サイトメトリー学会, 福岡, 2016.7.
12. Shimono Y, Mukohyama J, Nishimura T, Gotoh N, Minami H, Suzuki A. Molecular characterization of quiescence and stemness of metastatic breast cancer stem cells: implication for their therapeutic resistance. 第 41 回内藤コンファレンス, 札幌, 2016.7.
13. Shimono Y, Nishimura T, Mukohyama J, Isobe T, Mukohara T, Gotoh N, Minami H. Molecular characterization of dormant metastatic human breast cancer stem cells. 第 14 回 幹細胞シンポジウム, 兵庫, 2016.5.

【その他特筆事項】

特になし。

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		IRSp53 のがん形成におけるシグナル伝達および代謝における役割
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
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>I-BAR ドメイン含有タンパク質である IRSp53 は細胞突起を形成するタンパク質であり、がん細胞に多く見られる細胞突起との関連が示唆されるがその役割は明らかではない。私たちは、がん形成のモデルとなるがん抑制遺伝子 TP53 の欠損マウスの発がんにおける IRSp53 の影響を調べた。その結果、IRSp53 のタンパク質量の減少は、TP53 欠損マウスの寿命を延ばすことを見いだした。本研究では、これらの知見を踏まえ、IRSp53 のがん形成における役割をマウスの病理解析と細胞生物学的解析を中心に検討する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト癌においては、公開されているがんゲノム解析の結果、頭頸部癌やグリオーマにおいて、IRSp53 の発現量が高い場合に予後が悪くなることが認められた。IRSp53 の発現の低下ががんの進展にどのような影響を及ぼすのか調べるために、CRISPR/Cas9 系を用いて、ヒト頭頸部癌由来の細胞株(Ca9-22)やグリオーマ由来の細胞株(U251)、及び HeLa 細胞株を用い、IRSp53 欠損細胞株を作成した。これらの細胞株は、いずれも TP53 の欠損あるいは変異を持つ。Ca9-22、U251、HeLa 細胞のいずれの IRSp53 欠損細胞株は、欠損前の親株と比べ細胞増殖の低下が見られた。ところが興味深いことに、マウスのメラノーマである B16 細胞は、TP53 野生型を持つが、B16 の IRSp53 欠損細胞株は、細胞増殖の低下が見られなかった。次に、Ca9-22、U251、及び HeLa 細胞の親株と IRSp53 欠損細胞を比較した RNA sequence を行い、遺伝子変化を調べている。</p> <p>次に、細胞増殖の低下が、細胞自律的であるかどうかを調べるために、IRSp53 欠損細胞と、親株の細胞を共培養した。その結果、それぞれ単独で培養した時の増殖とは異なり、共培養した場合の増殖の速さは親株の増殖の速さと同じであった。このことは、IRSp53 は、細胞間のコミュニケーションに関与することで、細胞増殖の代謝などのシグナルを制御し、がんの進展に関わる可能性を示唆している。</p> <p>今後は RNA sequence の知見などをもとに、マウスの病理解析を再び行う予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん関連遺伝子による乳癌の発症・悪性化における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
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>遺伝子増幅は、乳癌において特徴的なゲノム変化であり、遺伝子増幅領域（アンプリコン）においては、発がんに関与するドライバー遺伝子と、それと協調的に作用するサポーター遺伝子の両者が増幅している可能性がある。私たちは、乳癌組織の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システムを構築し、培養細胞や動物モデルを用いて、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・悪性進展のプロセスを主にエピゲノム変化の側面から解析することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>まず、ヒト乳癌細胞株で高発現している 845 種類の遺伝子のうち、膜タンパク質とリン酸化酵素をコードする 205 種類の遺伝子を有望ながん関連遺伝子候補として選択した。これらを行くつかのサブグループに分割した後、高効率遺伝子導入レトロウイルスシステムを用いて、ルシフェラーゼをマーカーとして発現するマウス乳腺上皮細胞 NMuMG に導入した。これらの細胞をヌードマウスに移植し、腫瘍形成を <i>in vivo</i> イメージングで観察し、評価した。スクリーニングの結果、造腫瘍性を持つ 3 つの遺伝子 <i>ADORA2B</i>, <i>PRKACB</i>, <i>LPAR3</i> を同定した。これら 3 つの遺伝子をそれぞれ発現する細胞は、<i>in vitro</i> ではトランスフォーメーションしないことから、<i>in vivo</i> の微小環境が腫瘍形成に重要であることが示された。また、同様のスクリーニングで同定したがん遺伝子 <i>HNF1B</i> が転移をも促進することを見いだした。現在、いくつかの遺伝子について、発癌を誘発する過程で、どのようなエピゲノム変化を誘導するのかを解析している。具体的には、遺伝子を導入した細胞移植マウスに生じた腫瘍において、DNA メチル化アレイやヒストン修飾抗体による ChIP seq 法などを用いて、DNA メチル化とヒストン翻訳後修飾の変化をゲノムワイドに調べ、エピゲノムの異常を解析する。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 法で解析することによって、腫瘍の発症と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明らかにする計画である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. J. Nakayama, E. Ito, J. Fujimoto, S. Watanabe, and <u>K. Semba</u>, “Comparative analysis of gene regulatory networks of highly metastatic breast cancer cells established by orthotopic transplantation and intra-circulation injection”, <i>International journal of oncology</i> ., 50, 497-504(2016). 2. A. Matsui, J. Fujimoto, K. Ishikawa, E. Ito, N. Goshima, S. Watanabe, and <u>K. Semba</u>, “Hepatocyte nuclear factor 1 beta induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition” <i>FEBS Lett.</i>, 590, 1211-1221(2016). 3. T. Ihara, Y. Hosokawa, K. Kumazawa, K. Ishikawa, J. Fujimoto, M. Yamamoto, T. Muramkami, N. Goshima, E. Ito, S. Watanabe, and <u>K. Semba</u>, “An <i>in vivo</i> screening system to identify tumorigenic genes”, <i>Oncogene</i>, 36, 2023-2029(2017). 	

	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 中山淳、伊藤恵美、藤元次郎、渡辺慎哉、仙波憲太郎、同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析、日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 2. 中山淳、伊藤恵美、藤元次郎、渡辺慎哉、仙波憲太郎、Transcriptome analysis of early metastasis using breast cancer cells established by orthotopic transplantation、生命医薬情報学連合大会(IIBMP2016)、お台場、2016 年 9 月 3. 小林雄太、石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、高感度トランスポゾントラップベクターを用いた刺激応答細胞と遺伝子の単離技術の開発、日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 4. 上岡有紀乃、石川公輔、仙波憲太郎、BAC ベクターを用いた遺伝子導入乳腺再構築技術、日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 5. 清野宗一郎、藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎、Establishment of the screening system for identification of cancer-related genes enhancing cell migration mechanism、日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 6. 藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎、Functional analysis of HER2 shedding by TMPRSS4 protease、日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 7. 石川公輔、渡辺慎哉、仙波憲太郎、Development of highly sensitive promoter-trap vector system、日本癌学会学術総会、横浜、2016 年 10 月 8. 藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎、膜貫通型プロテアーゼ TMPRSS4 による ErbB2 チロシンキナーゼの切断と活性化機構、日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月 <p>【その他特筆事項】</p> <p>中山淳、伊藤恵美、藤元次郎、渡辺慎哉、仙波憲太郎、同所性移植手法を用いた乳がん高転移株の作製とその Transcriptome 解析、新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】」平成 28 年度若手支援技術講習会、長野県茅野市蓼科 蓼科グラントホテル滝の湯、2016 年 9 月、ベストポスター賞</p>
--	--

研究課題		プロテアーゼ切断による HGF 活性化の構造的基盤
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学蛋白質研究所・教授・高木淳一
研究分担者	所属・職名・氏名	大阪大学蛋白質研究所・特任助教・海津正賢
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>HGF (肝細胞増殖因子) はチロシンキナーゼ型受容体である Met (または c-Met ともいう) に結合して増殖シグナルを ON にする。このシグナリング経路の異常な活性化はがんの進展や薬剤耐性の獲得に寄与しており、それゆえ、HGF-Met シグナリング経路の活性状態をコントロールするための阻害剤の開発が精力的に行われている。しかし、細胞外領域において HGF がどのように Met レセプターに結合し、細胞膜部分を経て、細胞内へとそのシグナルを伝えるかという疑問に答えるに十分な構造学的情報はまだ得られていない。本研究では、共同研究による構造生物学的な解析と生化学的、細胞生物学的解析の融合を通して、これらの機構の解明をめざす。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>HGF は、1 つの N 末端ドメイン(N)、4 つの Kringle ドメイン(K1~K4)、1 つの Serine Protease 様ドメイン(SP) という 6 つのモジュールが数珠つなぎになったマルチドメイン蛋白質であり (図 1)、モジュール間の可動性のために溶液中で一定の構造を取らず、その全体の立体構造の決定は未だに達成されていない。本研究ではまず、人工的な Factor Xa 切断部位を導入することで同一のコンストラクトから切断型 (活性型) と未切断型 (不活性型) 両方の HGF 蛋白質を調製し、6 種類のモノクローナル抗体を樹立した (図 1)。このうち、活性型の HGF のみに結合する t8E4 抗体を得ることに成功し、その Fab と活性型 HGF フラグメントの複合体結晶構造を 2.9Å で決定した (図 2)。この結果、t8E4 抗体は HGF の切断に伴い新たに生じる N 末端領域を認識しており、切断前後でこの領域が大きく構造変化することがシグナリングに重要であることが示唆された。さらに、別の抗体 (t5A11) の Fab との共結晶化により、HGF の K2 領域から SP 領域まで (K2-SP) の 4 つのドメインを含む活性型 HGF フラグメントの複合体結晶構造を 3.3Å で決定することに成功し、切断後の K4 領域と SP 領域を含む構造を初めて明らかにした。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>図 1</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>図 2</p> </div> </div>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Umitsu M, Sakai K, Ogasawara S, Kaneko M, Asaki R, Tamura-Kawakami K, Kato Y, Matsumoto K, and Takagi J. (2016) Probing conformational and functional states of human hepatocyte growth factor by a panel of monoclonal antibodies. <i>Scientific Rep.</i> 9 (6), 33149. doi: 10.1038/srep33149</p> <p>【学会発表】 海津正賢、酒井克也、小笠原諭、金子美華、加藤幸成、松本邦夫、高木淳一、プロテアーゼ切断による HGF 活性化の構造的基盤、第 16 回日本蛋白質科学学会 (福岡) 海津正賢、有森貴夫、酒井克也、小笠原諭、北郷悠、金子美華、加藤幸成、松本邦夫、高木淳一、HGF/c-Met シグナリングの解明に向けた二本鎖 HGF の構造決定、第 39 回日本分子生物学会 (横浜)</p> <p>【その他特筆事項】 平成 28 年 9 月 10 日付け北国新聞、北陸中日新聞に掲載。</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		変異 p53 や p53-Rb/GATA3 ネットワークによる乳癌がんの未分化性に関わるメバロン代謝経路の制御機構の解明
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・田中知明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・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・博士大学院生・吉田晶代
	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	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	本研究では、乳癌の癌幹細胞制御の共通分子基盤の解明と新たな創薬基盤構築を目的に、CRISPR/Cas9 による KO 細胞株による機能的スクリーニングシステムと LC-MS/MS による GATA3 複合体解析を通じて、SREBP 依存的癌幹細胞制御の上流シグナルの分子機構を明らかにする。この研究を通じて発見される乳癌幹細胞性を制御する「脂質代謝」の key regulator とその代謝産物制御因子は、治療抵抗性の乳癌の新たな創薬の標的分子基盤候補や予後不良の予測因子となり可能性がある。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者は p53 や GATA3 の転写因子研究における複合体解析を行い、GATA3 会合分子 Ruvb12 の同定と機能的転写制御機構を明らかにした (PNAS 2013)。また、Akt が GATA3 をリン酸化することで、GATA3 の複合体を組み替えて転写抑制作用を調節するメカニズムを明らかにした。しかしながら、これらの分子メカニズムの乳癌における役割は全く解析されておらず、p53-GATA3-Rb 転写ネットワーク自身についても、どのような分子メカニズムで脂質代謝調節を行うかは、明らかにされていない。そこで、まずはじめに、乳がん細胞株 MCF-7 を用いて、LC-MS/MS による GATA3 複合体解析を施行した。その結果、多くのクロマチン制御因子群を同定したが、GATA3-RuvB12 の複合体を確認することができた。</p> <p>次に、CRISPR/Cas9 による p53 変異(あるいは変異に WT を)導入細胞株、p53・Rb・GATA3KO 株を樹立して、それらを用いスフィアアッセイにて解析を行った。その結果、興味深いことに、p53 変異体である” gain of function” あるいは、p53 と Rb・p53 と GATA3 の double ノックアウトにおいてのみ、高い sphere 形成能を持つ細胞を濃縮できることを見出し、がん幹細胞様特性を示す細胞では、グルタミン取り込みとトランスポーターの発現が増加しており、p53-Rb-GATA3 経路による代謝制御と癌幹細胞性は密接に結びつきを明らかにした。最後に我々は偶然の産物として、乳がん細胞における休眠状態の誘導法を見出している。CRISPR/Cas9 を用いて、p53 変異体≠WT の組み替えや KO 細胞株を樹立/スクリーニングする過程で、特定の培養条件下において 6 週間栄養飢餓状態にすると、p53 が変異型である場合のみ Dormant な状態(DNA 合成ほぼ低下・幹細胞マーカー高発現)で生存しているが、p53 を KO すると完全に死滅してしまう現象を発見した。驚くことに、この休眠状態に refeeding すると、再びがん細胞の顕著な増殖が再開する(腫瘍起源化)ことが判明した。そこで今後、がん幹細胞の休眠スイッチ機構のメカニズムを明らかにする目的で、休眠細胞誘導法を利用して、休眠状態≠増殖状態間の単一細胞レベルでの比較解析と、栄養因子の探索を行う予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kitajima S, Yoshida A, Kohno S, Li F, Suzuki S, Nagatani N, Nishimoto Y, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M, Baebie D, Hirose O, Tanaka T. The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. <i>Oncogene</i>. (in press). (査読有) 2. Yoshida A, Kitajima S, Li F, Cheng C, Takegami Y, Hayashi N, Nishimoto Y, Nagatani N, Kohno S, Muranaka S, Nishiuchi T, Suzuki S, Nakao S, Tanaka T, Hirose O, and Takahashi C. MicroRNA-140 mediates RB tumor suppressor function to control stem cell-like activity through interleukin-6. <i>Oncotarget</i>. 8:13872-85. (2017). (査読有) 3. Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsushita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. <i>Oncotarget</i>. 7:82493-503. (2016). (査読有) <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		メタボローム解析による肺がん上皮間葉転換を標的とした治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学政策メディア研究科・特任助教・田畑祥
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	慶應義塾大学環境情報学部・学生 (B4)・中宿 文絵
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	本研究では、キャピラリー電気泳動/質量分析 (CE-MS) を用いたメタボローム解析、およびマイクロアレイを用いたトランスクリプトーム解析を組み合わせ、肺がん細胞の EMT における代謝機構を包括的に解析し、EMT の代謝に着目した治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) は、がんの転移において重要なプロセスの一つで、上皮細胞が間葉系細胞に形態変化する現象である。EMT を獲得したがん細胞は極性の喪失、移動・浸潤能が亢進し、がんの転移に大きく貢献する。また、最近では遊走および浸潤だけではなく、がん幹細胞様性質、老化、アポトーシス、細胞周期、放射線および化学療法の抵抗性など、様々ながんの進展機構において EMT の関与が報告されている。これまでの EMT 研究では、EMT に関連する遺伝子の転写、翻訳機構、非コード RNA の制御、選択的スプライシングやタンパク質安定性など、様々な分子機構が報告されているが、EMT 特異的な代謝変化およびその機構についてはよく理解されていない。今回、EMT における網羅的な代謝解析を行うことで、新しい側面から EMT を捉えることができ、新規分子機構の発見が期待される。</p> <p>これまでの解析で、以下の結果が得られた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. メタボローム解析によって、TGF-β で EMT を誘導した非小細胞肺がん細胞 3 種 (A549、HCC827 および H358) で 19 代謝経路が共通して変化していることが明らかになった。 2. トランスクリプトーム解析によって上記代謝の Key となる 8 つの候補遺伝子を見出した。そのうち、4 つは新規 EMT 関連代謝遺伝子であった。 3. TGF-β で EMT を誘導した肺がん細胞において、上記の 4 遺伝子の発現を siRNA で抑制したところ、N-cadherin (間葉系マーカー) の発現低下が認められ、EMT の抑制効果が示唆された。 4. 着目した 4 遺伝子うち、3 遺伝子に対する siRNA は、EMT による移動能を抑制した。また、2 遺伝子に対する siRNA は、EMT によるエルロチニブ (抗がん剤) 耐性を抑制した。 <p>今後、動物実験等を用いて (今回見出した) EMT 関連代謝遺伝子が治療ターゲットとなるか検討を行う予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	Fumie Nakasuka, Sho Tabata, Tadaaki Yamada, Goto Hisatsugu, Seiji Yano, Yasuhiko Nishioka, Tomoyoshi Soga, Masaru Tomita. Metabolic Hallmark of TGF- β -induced Epithelial Mesenchymal Transition in Non-Small Cell Lung Cancer 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 (パシフィコ横浜: 神奈川県)
	【その他特筆事項】	なし

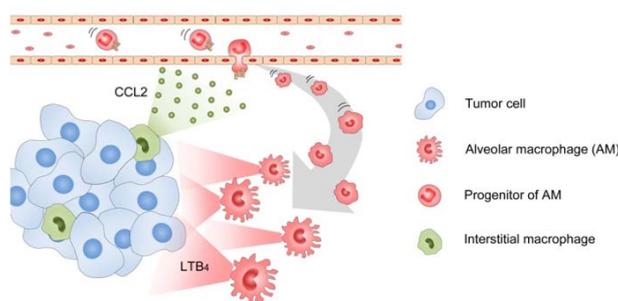
平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		To11 様受容体内因性リガンドによるがん微小環境形成に伴う胃がん増悪化
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学薬理学教室・助教・出口 敦子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京女子医科大学薬理学教室・教授・講座主任・丸 義朗
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・教授・大島 正伸
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・助教・大島 浩子
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	<p>To11 様受容体を介するシグナル伝達は、感染防御としての重要な役割を持つが、がん進展において惹起される炎症にも関与することが示唆されるようになった。我々は、がん周辺部に存在するがん微小環境に加えて、癌細胞が転移先臓器に生着する前の段階に転移先遠隔臓器に微小環境(転移前微小環境)が存在し、To11 様受容体 4(TLR4)内因性リガンド S100A8 や血清アミロイド A3 が転移前肺微小環境の形成に関与することを見いだしている。さらに、TLR4 ノックダウンさせたがん細胞を移植した担がんマウスでは、TLR4 発現がん細胞を移植した場合と比較して、腫瘍の進展が遅延することから、がん細胞自身の TLR4 もリガンド刺激を受けていることが示唆される。本研究では、大島正伸教授らが作出した胃がんモデルマウスである <i>Gan</i> マウス (<i>K19-Wnt1/C2mE</i> マウス) を用いて、遠隔臓器由来の TLR 内因性リガンドが、がん周辺部に存在する炎症様がん微小環境をフィードバック的に増悪化させ、がんの進展を促進するかを検証する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>転移前肺微小環境形成に関与する TLR4 内因性リガンド S100A8 は、転移前微小環境だけでなく原発巣周囲に存在するがん微小環境形成に関与することを担がんマウス実験を用いて見いだしている (Deguchi, <i>et al</i>, <i>Oncogene</i>, 2016)。S100A8 リコンビナントタンパク質のマウスへの投与は骨髄からの骨髄由来抑制細胞 (MDSC) の動員を誘導し、がん増悪化に関与することが示唆された。本研究では、大島先生が保有する胃がんモデルマウスの胃がん増悪化に S100A8 が関与しているかを検証した。その結果、<i>Gan</i> マウスの胃病変部において、胃がん発症後、週齢依存的に S100A8 の発現が亢進していることを見いだした。この結果は、大島先生らが既に得られた DNA マイクロアレイ解析の結果と相関する。また、抗 S100A8 抗体による免疫染色により、S100A8 は主に、胃がん病変部の間質に存在する CD11b 陽性細胞、顆粒球に発現が認められた。さらに、S100A8 は TLR4 の内因性リガンドとして働くことから、まず、マクロファージや血管内皮細胞に焦点をあて、エンドトキシンフリーグレードの S100A8 リコンビナントタンパク質刺激による炎症性サイトカイン等の発現を qPCR 法にて解析を行った。野生型マウス由来の骨髄由来マクロファージや肺微小血管内皮細胞において、S100A8 は TNF, Ccl2 等を誘導した。この結果により、<i>Gan</i> マウスにおける S100A8 発現上昇は、がん微小環境下の炎症様サイトカインやケモカインの発現を誘導し、がんの進展を促進する働きを持つ可能性が示唆された。さらに、S100A8 や他の TLR2/4 リガンド刺激によるがん細胞への作用については、<i>Gan</i> マウス由来胃がん病変からのオルガノイド培養下において検証を進めている。</p> <p>来年度、引き続き TLR 内因性リガンドによる胃がん増悪化の分子機序の解析と胃がん転移マウスモデルの構築を行う。さらに、胃がん転移前微小環境の形成と肺がんや大腸がんによる転移前微小環境と類似の微小環境形成が存在するかを検証する。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> *Tomita T, *Deguchi A, and Maru Y. Metastatic cancer stem cell niche and the TLR4-mediated premetastatic microenvironment. <i>Cancer Metastasis and Cancer Stem Cell/niche</i>, Bentham Science Publisher, 74-108, 2016 <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 出口敦子、大島浩子、大島正伸、丸義朗、胃がん増悪化における To11 受容体内因性リガンドの関与. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 石川県金沢市, 2017 年 2 月 <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		悪性脳腫瘍に対するドラッグリポジショニングの試み
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】	<p>悪性グリオーマは脳原発悪性腫瘍である。ヒトとしての高次機能を司る脳という臓器の特質を踏まえた時、手術で全部摘出することは不可能である。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。</p> <p>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がん進展制御研究所が所有する約 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。</p> <p>申請者らは平成 25 年より本プロジェクトに着手した。これまでの結果から候補薬剤を fluspirilene に絞っている。本年度申請する研究プロジェクトでは、マウス膠芽腫モデルに fluspirilene を投与する非臨床試験、さらに fluspirilene によるグリオーマ幹細胞のシグナル伝達の変化を解析することにより臨床試験のプロトコール作成へつなげる。</p>	
【研究内容・成果】	<p>【方法】 Fluspirilene に注目して <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> での検証実験を行った。3 種類のグリオーマ幹細胞株を使用して sphere forming assay による幹細胞形質阻害効果を、4 種類のグリオーマ細胞株を使用して増殖、浸潤アッセイを行った。Fluspirilene 処理によるグリオーマ細胞内の増殖シグナル・浸潤シグナル分子の変化を <i>in vitro</i> で観察した。悪性グリオーマの主要な増殖・浸潤シグナルである RAS/Raf/MAPK 経路と PI3K/Akt/mTOR 経路に加え、Notch, STAT といった幹細胞性維持に関わるシグナル分子の発現及び活性度についても検討した。さらにグリオーマ幹細胞をマウス脳内に移植した膠芽腫モデルに対して治療実験を行った。マウス膠芽腫モデルで得られた腫瘍組織の薄切切片を用いて候補シグナルの変化を免疫染色にて確認した。</p> <p>【結果】 Fluspirilene はグリオーマ幹細胞形質を濃度依存性に阻害し、使用したすべてのグリオーマ細胞株の増殖、浸潤を濃度依存性に抑制した。Fluspirilene は幹細胞性維持に関与する STAT3 のリン酸化を濃度依存性に抑制した。さらにマウス脳内の膠芽腫の形成、増殖、浸潤を抑制した。膠芽腫モデルで得られた腫瘍組織の薄切切片では Fluspirilene 投与により STAT3 のリン酸化が阻害されていた。</p> <p>【考察】 Fluspirilene はグリオーマ幹細胞及びグリオーマ細胞の両者に対して抗腫瘍効果を有する薬剤であると考えられた。その分子機構として STAT3 のリン酸化抑制作用が関与していると考えられた。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 なし</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A.</u> Screening of existing drugs to target glioma stem cells. 13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting, September 11-14, 2016, Sydney, Australia 2. <u>董宇, Hemragul Sabit, 北林朋宏, 古田拓也, Shabierjiang Jiapaer, 平尾敦, 中田光俊</u> Identification of antipsychotic drug as a potential anti-glioma agent 第 17 回日本分子脳神経外科学会, 平成 26 年 8 月 26 日-27 日, 東京 3. <u>中田光俊, 董宇, 北林朋宏, 淑瑠へムラサビト, 古田拓也, 平尾敦</u> 既存薬の応用による膠芽腫に対する新規化学療法 第 75 回日本脳神経外科学会総会, 平成 28 年 9 月 29 日-10 月 1 日, 福岡 4. <u>中田光俊</u> 脳腫瘍に対するドラッグリポジショニングの試み(特別講演) 第 9 回香川県脳腫瘍学術講演会, 平成 28 年 10 月 28 日, 高松 5. <u>Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A.</u> Drug repositioning targeting glioma stem cells. Society for Neuro-Oncology 21st Annual Meeting 2016, November 17-20, 2016, Scottsdale, Arizona, USA 6. <u>中田光俊, 董宇, 北林朋宏, 淑瑠へムラサビト, 古田拓也, 平尾敦</u> 既存薬による膠芽腫に対する新規化学療法 第 34 回日本脳腫瘍学会, 平成 28 年 12 月 4 日-6 日, 甲府 <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究課題		肝臓がんの転移におけるマクロファージの役割とケモカインの解析
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学・教授・中本 安成
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	福井大学・大学院生・野阪 拓人
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>種々のがんの発症・進展過程には、がん微小環境内での炎症反応が密接に関与していると考えられている。また、炎症反応において重要な役割を果たしている白血球の病巣への浸潤過程は、ケモカインに代表される白血球走化因子によって協調的に制御されていることも知られている。肺内には肺間質に存在する間質マクロファージ：Interstitial macrophages(IMs)と肺胞マクロファージ：Alveolar macrophages(AMs)の2種類のマクロファージが存在している。がん細胞の肺転移過程において、IMs がケモカインシグナルを介してがん細胞の生着や増殖の過程に重要な役割を果たすことは報告されている一方で、AMs の役割や機能は知られていない。本研究を通して、転移過程における肺内マクロファージの役割を解明することによって、新たな視点からの転移制御法の開発に繋がる基盤的な知見を得ることを目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>マウス由来肝がん細胞株 BNL 細胞株を野生型 BALB/c マウスの尾静脈に投与し、肺転移巣を形成させる肺転移モデルを用いて、研究分担者の野阪らは以下の点を昨年度明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Leukotrienes(LTs)、Prostaglandins(PGs)、そして Hydroxyeicosatetraenoic acid(HETE) など、多くのアラキドン酸代謝産物量が転移肺で増加した。 2. 5-lipoxygenase(LOX)阻害薬投与により、2mm 以上の、径の大きい肺転移巣の数が減少した。一方で cyclooxygenase 阻害薬投与では肺転移巣に影響はみられなかった。 3. 5-LOX の代謝産物である LTB₄ が <i>in vitro</i> で直接的にマウス、ヒト肝がん細胞株の増殖を促進した。 4. 転移巣に顕著に浸潤するマクロファージの内、AMs が 5-LOX を発現していた。 5. 選択的に AMs を枯渇することで、転移肺の LTB₄ 産生量が減少し、径の大きい肺転移巣の数が減少した。 6. 転移巣内に浸潤した IMs が CCL2 を産生することで、血中由来の CCR2 を発現した AMs が肺にリクルートされ、LTB₄ を産生した。 7. 肝がん患者の転移肺においても、転移のない肝がん患者の肺と比較して、5-LOX を発現した AMs が増加していた。 <p>以上の結果から、本来、生理的条件下で異なる作用をもつ AMs と IMs が、がん細胞の肺転移を契機に、協調的に肺転移の進行を支持する機能を有することを野阪らは示した (右図)。</p> <p>CCL2-CCR2 軸を介した、がん細胞肺転移の微小環境における新たなマクロファージサブセット間の作用と、AMs の肺転移における新たな腫瘍支持的役割を明らかにした。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Alveolar macrophages drive hepatocellular carcinoma lung metastasis by generating leukotriene B ₄ . <u>Takuto Nosaka</u> , Tomohisa Baba, Soichiro Sasaki, Tatsunori Nishimura, Yoshiaki Imamura, Hideaki Yurino, Shinichi Hashimoto, Makoto Arita, <u>Yasunari Nakamoto</u> , and <u>Naofumi Mukaida</u> . J Exp Med (in submission).
	【学会発表】	<u>Nosaka T</u> , Baba T, Sasaki S, <u>Nakamoto Y</u> , and <u>Mukaida N</u> . Alveolar macrophages have a crucial role in the lung metastasis. 2016年10月6日～8日。第75回日本癌学術総会。
	【その他特筆事項】	なし



平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		口腔癌細胞における microRNA-205 の MT1-MMP 制御機構の 解明
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学・講師・長谷川正午
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	筑波大学・医員・内田文彦
	所属・職名・氏名	筑波大学・大学院生・長井宏樹
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・川尻秀一
	所属・職名・氏名	金沢大学・講師・加藤広禄
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	<p>癌の浸潤・転移には、細胞周辺の細胞外基質 (extra cellular matrix、ECM) の分解に関与する蛋白質分解酵素である (matrix metalloprotease、MMP) の役割が大きく影響する。TIMP-2 は膜型マトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) と複合体を形成することで MMP2 を活性化して ECM の分解を促進する。本研究では、miRNA の TIMP-2 制御を介した口腔癌細胞浸潤にかかわる役割を明らかとする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【方法】 口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC3 および SAS に miR205mimic を導入し、Type1-A コラーゲンを用いた 3 次元培養法にて migration assay、chamber 型キットを用いて invasion assay を行った。また TIMP-2、MT1-MMP の mRNA の発現を RT-PCR で測定した。また、蛍光免疫染色にて細胞内 TIMP-2 タンパク質発現を可視化した。さらに培養上清から TIMP-2 タンパク質を抽出し ELISA 法にて定量し、同時に培養上清中の MMP2 活性の変化をゼラチンザイモグラフィで測定した。</p> <p>【結果】 miR205mimic 導入により浸潤能、遊走能ともに有意な低下を認めた。また TIMP-2、MT1-MMP の mRNA、タンパク質は、いずれもコントロール群と比較して有意に発現低下を認めた。さらに、培養上清中に分泌された TIMP-2 も有意な発現低下を認め、MMP2 の活性もコントロール群と比較して有意な低下を認めた。</p> <p>【まとめ】 miR205 は、TIMP-2 の発現制御を介して MMP2 活性を抑制し、ECM の分解を抑制することで口腔癌細胞の浸潤・遊走を抑制する可能性が示唆された。</p> <pre> graph TD miR205[miR-205-5p] -- TIMP2[TIMP-2] TIMP2 -- Complex[TIMP-2 / MT1MMP complex] MT1MMP[MT1-MMP] -- Complex Complex -- ProMMP2[Pro-MMP2] ProMMP2 --> ActiveMMP2[Active-MMP2] </pre>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム	
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳がん骨転移 niche 形成に関わるがん細胞-間質相互作用における NK 細胞の役割解明
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・准教授・早川 芳弘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>ナチュラルキラー (NK) 細胞は自然免疫系に属する免疫担当細胞で、これまでに NK 細胞が腫瘍免疫監視機構において非常に重要な役割を担っている。このような NK 細胞を含む様々なエフェクター細胞を介した抗腫瘍免疫応答が存在する一方で、腫瘍微小環境における炎症性免疫応答が、サイトカインやケモカイン、様々な成長因子の産生を介して細胞の増殖浸潤さらには転移といった悪性化進展を促進する可能性が指摘されている。本研究ではがん細胞の悪性化に寄与するような宿主応答における NK 細胞の関与について、乳がん骨転移過程における NK 細胞の役割、ならびに乳がん骨転移 niche 形成に重要な CCL4-CTGF axis における NK 細胞の関与を明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>BALB/c マウス由来乳がん細胞株である 4T1 細胞から in vivo selection 法にて高骨転移株 4T1.3 を樹立した。またこの高転移株が骨へと転移する niche の形成過程にはがん細胞由来の CCL4、さらには宿主細胞由来の connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) の産生が関与している。</p> <p>4T1.3 乳がん細胞の骨転移過程における NK 細胞の役割を明らかにするため、まず骨転移を経時的にリアルタイムモニタリング可能にする発光イメージング系を樹立するためリポフェクション法にてルシフェラーゼ遺伝子の安定発現 4T1.3-Luc2 細胞株を樹立した。現在、4T1.3-Luc2 細胞株を用いて乳がん自然骨転移の発光イメージング系の確立と、NK 細胞除去マウス (抗アシアロ GM1 抗体投与) における骨転移イメージング解析によって、4T1.3 の骨転移 niche 形成における NK 細胞の役割について検討をさらに進めている</p> <p>また、NK 細胞が腫瘍増殖促進に働く好中球性炎症を抑制している可能性を示し、さらに NK 細胞除去マウスでは腫瘍血管新生が増加する事、ならびに腫瘍内での TGF-β、VEGF-A 産生量が増大する結果を得た。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<p>早川芳弘： シンポジウム 3 「炎症と転移 ～がんの進展と転移における炎症・微小環境の役割～」、自然リンパ球をターゲットとしたがん関連炎症の制御、第 25 回日本がん転移学会、2016. 07. 21-22, 米子。</p> <p>早川芳弘, 小倉圭介, 松下まりも, 入村達郎, 田原秀晃, 済木育夫：自然リンパ球をターゲットとしたがん関連炎症制御, International Sessions: Targeting innate lymphocytes to regulate cancer-associated inflammation, The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016. 10. 06-08, Yokohama.</p> <p>山本 優, 小倉 圭介, 佐々木 宗一郎, 向田 直史, 早川 芳弘, 乳がん骨転移 niche 形成に関わるがん細胞-間質相互作用における NK 細胞の役割解明、金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム、2017 年 2 月 14～15 日、金沢</p>
	【その他特筆事項】	なし

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		個々の MMP 活性を選択的に制御する分子の創出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・教授・東 昌市
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤 博
【研究目的】	<p>悪性がん組織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、細胞膜表面および細胞外のタンパク質分解を介してがんの増殖・浸潤・転移および血管新生を支えることが示唆されてきたが、これまで開発されてきた多くの MMPs 阻害剤は個々の MMP に対する選択性が低く、臨床試験の過程で種々の副作用が認められたことにより、未だ治療薬としての利用に到っていない。本研究では、がんの悪性進展を促進する MMPs のみを特異的に制御する分子を創出し、副作用の少ない抗がん剤開発に繋げることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度までの研究成果から、MMP-2 に対し、高い選択性を持つ β-アミロイド前駆体タンパク質 (APP) 由来 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) のアミノ酸配列を改変し、MMP-7、MMP-9、MMP-14 に対する高選択性インヒビターの創出に成功していた。また、MMP-9 に対する阻害選択性を高めたペプチドは MMP-9 結合性タンパク質である TIMP-1 と融合することにより、その阻害活性を飛躍的に高めることに成功したが、TIMP-1 が MMP-2 の非触媒領域とも結合することが明らかになり、MMP-9 と MMP-2 の両方を阻害するインヒビターとなることが判明していた。そこで、本年度はこの融合タンパク質の TIMP-1 部分を改変することにより、MMP-9 選択性を高めたインヒビターの分子設計を試みた。その結果、この改変により、MMP-9 と MMP-2 の双方に対する親和性が低下したものの、1~100 nM の濃度範囲において、この融合タンパク質改変体が MMP-9 選択的インヒビターとなることが判明した。</p> <p>一方、昨年度の研究成果から、がん細胞表面のコレステロール硫酸に MMP-7 が結合すると、この酵素が I 型膜タンパク質である HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) 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増強することを見出した。また細胞凝集に関わる HAI-1 分子内領域がセリンプロテアーゼインヒビター領域を含まない 141-162 に相当するアミノ酸配列中に存在することを同定していた。本年度は、HAI-1 の 141-249 に相当する断片の中の幾つかのアミノ酸をアラニン残基に置換した種々のバリエーションを作製したところ、細胞凝集誘導活性を失ったものが得られた。また、大腸がん細胞を MMP-7 処理する際に、この HAI-1 断片の誘導体を添加したところ、MMP-7 が誘導する細胞凝集を効果的に抑制することが判明した。したがって、こうした HAI-1 断片の誘導体は MMP-7 の酵素活性そのものには影響を与えないものの、MMP-7 によるがん転移促進効果を選択的に抑制する薬剤として利用できる可能性があると考えた。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Kamoshida G, Tansho-Nagakawa S, Kikuchi-Ueda T, Nakano R, Hikosaka K, Nishida S, Ubagai T, Higashi S, Ono Y. (2016): A novel bacterial transport mechanism of <i>Acinetobacter baumannii</i> via activated human neutrophils through interleukin-8. <i>J Leukoc Biol.</i> 100, 1405-1412. DOI: 10.1189/jlb.4AB0116-023RR.</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. 近藤 優希、東 昌市：MMP-2 選択的インヒビターペプチド APP-IP のアミノ酸改変による新規 MMP-2 インヒビターの開発。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号 20、2016 年 8 月 5-6 日</p> <p>2. 佐々木 祐太、東 昌市：MMP-9 に対して高い阻害活性と選択性を併せ持つペプチドインヒビターの開発。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号 19、2016 年 8 月 5-6 日</p> <p>3. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市：可溶性 HAI-1 による細胞間接着機構の解析。第 21 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号 9、2016 年 8 月 5-6 日</p>	

4. 近藤 優希、東 昌市：MMP-2選択的インヒビターペプチドAPP-IPのアミノ酸改変による新規MMP-2インヒビターの開発。第89回日本生化学会大会（仙台）、1T06-02、1P-275、2016年9月25-27日

5. 佐々木 祐太、東 昌市：MMP-9に対し高い選択性を持つペプチドインヒビターの分子設計。第89回日本生化学会大会（仙台）、1P-269、2016年9月25-27日

6. 石川 智弘、木村 弥生、平野 久、東 昌市：培養がん細胞においてMMP-7がセリンプロテアーゼ様活性を促進する機構の解析。第89回日本生化学会大会（仙台）、2P-295、2016年9月25-27日

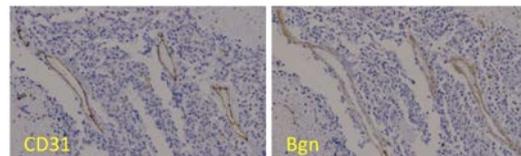
7. Tomohiro Ishikawa, Yayoi Kimura, Hisashi Hirano, Shouichi Higashi: MMP-7-catalyzed processing of HAI-1 induces cancer cell aggregation and promotes cancer metastasis. The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, Shizuoka, Oct. 17th-21st, 2016

【その他特筆事項】
研究室学生の受賞がありました。

1. Tomohiro Ishikawa, The 1st Joint Meeting of ISFP and PA Workshop, Travel grants

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		消化器がん発生・悪性化における腫瘍血管内皮マーカー発現の時空間的解析
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・特任准教授・樋田京子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	同・助教・間石 奈湖
	所属・職名・氏名	北海道大学病院循環器・呼吸器外科・准教授・樋田泰浩
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	<p>現在の血管新生阻害剤は、正常血管にも必須の VEGF シグナルを遮断することから生じる副作用の問題や、コンパニオン診断薬がないことから長期薬剤使用後のがんの悪性化や薬剤耐性などが問題となっており、腫瘍血管新生のモニタリングの必要性が認識され始めている。われわれがこれまで見出してきた腫瘍血管内皮マーカーは血中に検出される可能性が高く、低侵襲でかつ安全で早期に診断可能なツールとして期待できる。本研究においては貴研究所大島正伸教授が樹立された、ヒトと同じ分子機序で発生するマウス消化器癌発生モデルを用いて「発がんならびにがんの進展に伴う腫瘍血管内皮マーカーの時空間的な発現解析」を行うことを目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>平成 28 年度は腫瘍血管内皮マーカーのうち、本研究に適したものを選択するために、実際のヒト臨床検体を持ちいて患者の臨床病理学的因子との関連が確認できるものを選択することにした。北海道大学病院の呼吸器外科で肺がんと診断された 37 例の患者の血清を用いて、複数の分泌型の TEC マーカー (SBSN, PTX3, Biglycan) のレベルを計測した。このうち、Biglycan に関してはがんの T 因子や血管内浸潤とその血中レベルに相関があることが見出された。この症例数では転移の有無とは有意な差はみられなかったが転移症例で高い傾向があった。血中レベルが高かった症例では腫瘍血管ならびに周囲の間質に Biglycan 染色をみとめ、血管内皮から分泌された biglycan が細胞外基質に結合しているという過去の報告と一致した見解が得られた (右図)。また、昨年度にはわれわれは腫瘍血管が分泌する Biglycan によりがんの血管内浸潤が誘導され肺転移が増加することをマウスモデルにおいて証明した (Maishi et al., Sci Rep 2016)。このように、マウス・ヒト両方においても Biglycan 分子ががんの悪性度に相関している可能性が示唆された。現在、がんの転移巣における Biglycan 分子の血管、または血管周囲の発現を解析するために大島教授との共同研究により、Apc、Tgfbr2、K-ras、p53 の 4 重変異を持つマウス腸管腫瘍由来オルガノイドを脾臓に移植後の肝転移巣組織検体を用いて腫瘍血管における Biglycan の発現解析をおこなっている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 (* = corresponding author)</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Hojo T., Maishi N.[§], Alam Mohammad Towfik, Akiyama K., Ohga N., Shindoh M., Hida Y., Minowa K., Fujisawa T., *Hida K.: ROS enhance angiogenic properties via regulation of NRF2 in tumor endothelial cells, <i>Oncotarget</i>, in press 2. Torii C., Hida Y., Shindoh M., Akiyama K., Ohga N., Maishi N., Ohiro Y., Ono M., Totsuka Y., Kitagawa Y., Tei K., Sato Y., *Hida K.: Vasohibin-1 as a novel prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma, <i>Anticancer Res</i>, in press 3. *Hida K., Maishi N., Dorcas Akuba-Muhyia Annan, Kondoh M., Hojo T., Umma Habiba, Ohga N., Ishikawa K, Sato M., Torii C., Yanagiya M., Morimoto M., Hida Y., Shindoh M.: 	



- Aneuploidy of murine immortalized endothelial cell line, MS1, *J Oral Biosci*, 59(2017), 50-54, 2017
4. Habiba U., *Hida K., Kitamura T., Yanagawa Matsuda A., Higashino F., Ito M Y., Ohiro Y., Totsuka Y., Shindoh M., : ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia, *Oncol Lett*, 13, 321-328, 2017
 5. *Hida K., Maishi N., Kawamoto T., Akiyama K., Ohga N., Hida Y., Yamada K., Hojo T., Kikuchi H., Sato M., Torii C., Shinohara N., Shindoh M. : Tumor endothelial cells express high pentraxin 3 levels, *Pathol Int*, 66(12), 687-694, 2016
 6. *Hida K., Maishi N., Torii C., Yanagiya M., Annan Akuba-Muhyia Dorcas., Morimoto M., Alam Mohammad Towfik : Comparison of characteristics of mouse immortalized normal endothelial cells, MS1 and primary cultured endothelial cells, *Hokkaido Journal of Dental Science*, 37(1), 40-48, 2016
 7. Maishi N., Ohba Y., Akiyama K., Ohga N., Hamada J., Nagao-Kitamoto H., Mohammad Towfik Alam, Yamamoto K., Kawamoto T., Inoue N., Taketomi A., Shindoh M., Hida Y., *Hida K. : Tumour endothelial cells in high metastatic tumours promote metastasis via epigenetic dysregulation of biglycan, *Sci Rep*, 6, 28039

【学会発表】

1. 間石奈湖, 樋田京子 : 第75回日本癌学会学術総会特別シンポジウム2「癌研究における女性研究者」, “腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進”, 2016.10.7 (横浜)
2. 樋田京子 : 第53回大阪大学数理医学研究会, “腫瘍血管の特性解明と新しいがん治療戦略”, 2016.9.28 (大阪府豊中市)
3. 樋田京子 : 千里ライフサイエンスセミナーK3「エクソソーム研究の最前線: 疾患のメカニズム解明から診断・治療まで」, “腫瘍血管の特異性とエクソソーム”, 2016.9.16 (大阪府豊中市)
4. 間石 奈湖、樋田 京子 : 第 69 回日本酸化ストレス学会学術集会シンポジウム「酸化ストレスと発がん～最新の知見～」, “活性酸素が腫瘍血管内皮細胞に及ぼす影響”, 2016.8.31 (仙台)
5. 樋田京子, 間石奈湖 : 第58回歯科基礎医学会学術大会「A New Horizon for Oral Health Science～世界に飛躍するオーラルヘルスサイエンスの最前線～」, “がん微少環境における血管内皮細胞の特異性解明とその分子機構”, 2016.8.24 (札幌)
6. 樋田京子, 間石奈湖 : 第25回日本がん転移学会学術集会・総会シンポジウム「がん転移の新しい治療標的としてのエクソソーム研究」, “高転移性腫瘍miRによる血管内皮における薬剤耐性誘導”, 2016.7.21 (米子)
7. 間石奈湖 : 腫瘍血管内皮細胞によるがん転移促進, 第12回北海道癌免疫制御研究会, 2016.7.9 (札幌)
8. 樋田京子 : 第70回日本口腔科学会学術集会「口腔疾患治療の科学革命 (パラダイムシフト)」指名報告, 腫瘍血管内皮細胞の特異性解明と新たながん治療への応用, 2016.4.17 (福岡)
9. Hida K. : Heterogeneity of Tumor Endothelial Cells, Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2016, 2016.4.1, Breckenridge, Colorado.

【その他特筆事項】

1. 2016.11.21 Annan Dorcas Akuba Muhyia The Kanazasa Univ-Hokkaido Univ International Cancer Forum for Young Scientists, Best Discusser Prize
2. 間石奈湖 The 19th International Vascular Biology Meeting (IVBM2016), The JVBMO Young Investigator Travel Award 2016.10
3. 間石奈湖 文部科学省新学術領域研究「先端モデル動物支援プラットフォーム」平成 28 年度若手支援技術講習会 ベストトーク賞 2016.9.17

研究課題		白血病の進展における C/EBPβ の機能解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・医学研究科・助教・平位 秀世
研究分担者 (適宜、行を追加 してください。)	所属・職名・氏名	京都大学・医学研究科・研究員・横田 明日美
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>我々は、白血病の病態における、ストレス負荷時の造血を制御する転写因子 C/EBPβ の関与及び機能解明を進めている。慢性骨髄性白血病 (CML) は m その血液像が感染・ストレス負荷時と類似しており、C/EBPβ がその病態形成に重要な働きをしていることを明らかにしてきた (Hayashi Y et al., Leukemia, 2013)。本研究計画では、CML が進展するメカニズムの中でも、1) 正常細胞を骨髄から駆逐するケモカイン CCL3 の白血病細胞からの分泌と、2) 白血病細胞の刺激による正常造血細胞側の枯渇における転写因子 C/EBPβ の機能的意義を明らかにすることを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等 を入れていただ いても結構で す。)	<p><u>1) 白血病細胞内における CCL3 遺伝子発現制御への C/EBPβ の関与</u></p> <p>ケモカイン CCL3 は、CML 細胞から分泌され、正常造血細胞を骨髄造血スペースから駆逐する作用がある (Baba T et al., 2013)。一方、C/EBPβ は、CML の原因である BCR-ABL 融合タンパク質により活性化される。CCL3 の発現制御における C/EBPβ の関与を明らかにするために、BCR-ABL 遺伝子を野生型 (WT) もしくは C/EBPβ ノックアウトマウス (KO) 由来の骨髄細胞に遺伝子導入し、放射線照射したマウスに移植して CML モデルを作製した。白血病を発症した時点で、白血病由来の幹細胞・前駆細胞・成熟血球の三分画における CCL3 mRNA レベルを測定したところ、WT の成熟血球のみで高い発現が認められ、KO 成熟血球では認めなかった。一方、マウス造血幹細胞株である EML 細胞に C/EBPβ を過剰発現させたところ、有意に CCL3 mRNA の発現が亢進した。したがって、CML 細胞における CCL3 の発現亢進には、BCR-ABL の下流で活性化された C/EBPβ の直接、あるいは分化などを介した間接的な関与が示唆された。</p> <p><u>2) 正常細胞の枯渇誘導における C/EBPβ の関与</u></p> <p>転写因子 C/EBPβ は、感染やサイトカイン刺激時によって活性化されストレス負荷時の好中球造血を促進する転写因子として知られている。CML 細胞は、IL-6 などのサイトカインを分泌して、正常細胞の分化を誘導し、枯渇に導くことが知られている。そこで、正常造血幹細胞の枯渇誘導における C/EBPβ の関与を検討した。造血幹細胞の枯渇を誘導するために、WT または KO の骨髄細胞を放射線照射したマウスに移植し、その後 1 ヶ月毎に 5-fluorouracil (5-FU) を投与した。5-FU 投与毎に経時的に移植細胞のキメリズムを解析したところ、KO は野生型と比べて有意に造血幹細胞の枯渇が抑制された。一方で、正常造血幹細胞と類似の特徴を持つ CML 幹細胞は Interferon-α による刺激で C/EBPβ を介して、枯渇を誘導できることが判明した。</p> <p>転写因子 C/EBPβ は、CML 細胞が、正常細胞を駆逐しながら進展していく過程で、白血病細胞および正常細胞のいずれでも重要な関与があることが示唆された。一方で、Interferon-α による CML 幹細胞特異的 C/EBPβ の過剰な誘導は、CML 幹細胞を枯渇させることから、治療標的となりうることが示唆された。</p>	

【成 果 等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>該当なし</p>
	<p>【学会発表】</p> <p>Yokota A, Hirai H, Shoji T, Maekawa T, Okuda K : ABL family kinase, ARG drives mastocytosis in mice by sensitizing HPCs to IL-3 and SCF. [Abstract #OS-3-11] The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology 第 78 回日本血液学会学術総会（横浜） 平成 28 年 10 月 15 日（2016）</p> <p>Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Sato R, Adachi H, Sato F, Sato A, Tamura A, Miura Y, Nakano M, Tashiro K, Maekawa T: The C/EBPβ transcription factor promotes exhaustion of CML stem cells in response to interferon-α. [Abstract #E-2040] The 75th Annual Meeting of Japanese Cancer Association 第 75 回日本癌学会学術総会（横浜） 平成 28 年 10 月 7 日（2016）</p> <p>Yokota A, Hirai H, Hayashi Y, Sato R, Adachi H, Sato F, Sato A, Tamura A, Iwasa M, Fujishiro A, Shoji T, Kashiwagi T, Kamio N, Torikoshi Y, Miura Y, Nakano M, Tashiro K, Maekawa T: C/EBPβ is a critical regulator of CML stem cell differentiation and exhaustion induced by interferon-α. [Abstract#1120] The American Society of Hematology 58th Annual Meeting and Exposition, San Diego, Ca, USA, December 5, 2016.</p> <p>平位秀世：転写因子 C/EBPβ を介した Interferon-α による慢性骨髄性白血病幹細胞の枯渇誘導。 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム「がん・生命科学・個性・多様性」（金沢市） 平成 29 年 2 月 14 日(2017)</p>
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>該当無し</p>

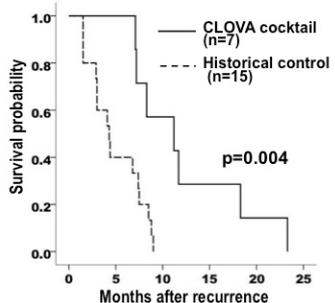
平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脳転移肺がん細胞の薬剤応答と耐性のキネティクス解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・講師・平田 英周
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>肺がんは早期に脳転移を来しやすく、頻度としても転移性脳腫瘍の原発巣として実に約 50%を占めている。また EGFR 変異を有する肺がんに対しては EGFR 阻害剤が一定の効果を示しているが、薬剤耐性の問題も相俟り根治には至っていない。本研究では EGFR 阻害剤に対する脳転移肺がん細胞の初期応答から耐性獲得に至るまでの一連のプロセスを経時的生体内イメージングによって可視化し、初期応答を規定する因子を特にがん細胞と微小環境の相互作用に注目して明らかにする。最終的には、EGFR 阻害剤に対する初期応答を改善させ得る標的分子を同定し、脳転移を来した肺がんに対する画期的な治療法の開発につなげる。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1.マウス心腔内接種による肺がん脳転移モデルの作成 EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 に蛍光蛋白質 (EGFP) とルシフェラーゼを発現させ、ヌードマウス心腔内に接種することにより全身転移を誘導した。PC9 細胞は明らかな organ tropism を示すことなく全身の臓器に転移巣を形成し、脳転移巣は cooperative growth pattern を示すことが明らかとなった。これら転移がん細胞の EGFR 阻害剤に対する初期応答評価を目的として、がん細胞接種から 2 週間後より EGFR 阻害剤ゲフィチニブの投与 (0, 20, 50 mg/kg/day、2 週間) を行った。結果、20 mg/kg/day・50 mg/kg/day のいずれにおいても全身転移巣は劇的な縮小を示し、脳転移巣も極めて良好に応答することが明らかとなった。しかしながら病理学的に詳細な評価を行ったところ、脳転移がん細胞は完全には消失しておらず、脳組織内に散在する形で多数の細胞が生存していた。興味深いことに、脳転移がん細胞の周囲には GFAP 強陽性の活性化アストロサイトが多数存在していたが、ゲフィチニブ投与開始 2 週間後に生存しているがん細胞の周囲にはこれら活性化アストロサイトがほとんど認められなかった。また生存細胞の多くが Ki67 陰性の非分裂細胞 (休眠細胞) として存在していることが明らかとなった。</p> <p>2. 初期応答のキネティクス解析 脳転移巣におけるゲフィチニブ応答と初期耐性機構を時空間的に明らかにすべく、MAPK/ERK 活性をモニタリングする FRET バイオセンサー EKAREV-NLS を発現させた PC9 細胞株を心腔内接種して脳転移を誘導した。この脳転移巣をマウス頭蓋骨に設置したイメージングウィンドウを介して 2 光子励起顕微鏡下にイメージングを行い、ゲフィチニブに対する応答を可視化した。結果、ゲフィチニブ投与から約 40 分後にがん細胞の ERK 活性が低下する様子を捉える事に成功した。しかしながら経時的なイメージング (~2 週間) では同部位を追跡することは難しく、直径約 4mm のイメージングウィンドウの直下でかつ脳表から 500 um 以内の範囲に初期耐性を示すがん細胞を偶然捉えることは確率的にも低いと考えられた。そこで現在、brain tropism により効率的に脳転移を形成する亜細胞株 PC9-BrM3 を用いた解析を遂行中である。</p> <p>3. トランスクリプトーム解析による初期耐性シグナルの網羅的描出 脳転移がん細胞 (ゲフィチニブ 0 mg/kg/day) と脳転移生存がん細胞 (ゲフィチニブ 20 mg/kg/day) を脳組織から抽出し、初期薬剤耐性に関わるシグナルの網羅的描出を目的としたトランスクリプトーム解析を現在遂行中である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウムにて成果発表 (平成 29 年 2 月 15 日)
	【その他特筆事項】	なし

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		成人 T 細胞白血病 (ATL) 発症モデルマウスにおけるエピゲノム変化の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学・教授・藤澤順一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病 (ATL) の原因となるウイルスである。私たちは、NOG-SCID (NOD-SCID / IL2Rγ-chain knock-out) マウスに、ヒト造血幹細胞を骨髄移植することによってヒト化マウスを作製し、このマウスに HTLV-1 を感染させることで、ATL 様病態モデルマウスを確立することに成功した。現在、このモデルマウスを用いて、in vitro の実験では再現できない生体環境内でのがんの発症過程を解析している。本共同研究では、HTLV-1 感染ヒト化マウスで再現された ATL 様病態の発現プロセスを、主にエピゲノム変化に注目して解析することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本邦で 100 万人以上存在する HTLV-1 感染者の約 5% が、平均余命 1 年以内の悪性の白血病、成人 T 細胞白血病 (ATL) を発症するが、有効な治療法は確立されていない。HTLV-1 感染から ATL 発症に至るには数十年に及ぶ長い潜伏期を要することから、私たちは NOG-SCID マウスへのヒト造血幹細胞移植により作製したヒト化マウスを用いて、数ヶ月で ATL に特徴的な花弁様分核を持つ CD25(+)CD4 T 細胞のクローン性増殖等、ATL 様病態を再現するモデルマウスを作製した。感染マウスの経時的な解析から、腫瘍化の進展に伴い HTLV-1 感染 CD25(-)CD4 T 細胞クローンの CD25(+)への形質転換が示唆されたが、ATL 発症に重要な役割を果たすと考えられている HTLV-1 Tax 遺伝子の発現は逆に抑制される結果となった。そこで、CD25(-) 感染細胞における Tax の機能と関連した宿主細胞遺伝子のゲノムあるいはエピゲノムの変異と、その結果としての感染細胞の CD25(+)への形質転換および異常増殖性発現の可能性を想定し、CD25(-)および CD25(+)感染細胞の cDNA マイクロアレイ解析およびゲノムメチル化の網羅解析を行った。その結果、CD25(-)から CD25(+)への転換に平行して DNA メチル化が減少し、かつ発現が上昇している遺伝子が多く検出されたが、逆に DNA メチル化が増大する遺伝子は少なかった。Tax にはヒストン翻訳後修飾レベルでの転写調節機能が存在することから、これが DNA メチル化レベルでの調節に繋がる可能性が示唆されるため、DNA メチル化と遺伝子発現に相関が見られる遺伝子の中から、がん化および幹細胞関連の遺伝子に注目し、ヒストンメチル化を中心とした解析を進めている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Miwa M, Ida C, Yamashita S, Tanaka M, <u>Fujisawa J</u>. Poly(ADP-ribose). Structure, Physicochemical Properties and Quantification in vivo, with special reference to poly(ADP-ribose) binding protein modules. Current Protein and Peptide Science, 17, 683-692, 2016</p>	
	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ancy Joseph, Takaharu Ueno, Yihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Masakazu Tanaka, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>: Both HBZ Protein and mRNA are Required for Leukemic Growth of HTLV-1-infected T-cells in Humanized Mouse Model, 18th International Conference on Human Retrovirology, 2017.3.7-10, Tokyo 2. Masakazu Tanaka, Yihua Ren, Jinchun Yao, Sung-il Lee, Norihiro Takenouchi, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>: Effect of Adjuvant in the Tax Vaccination of Humanized Mouse to Prevent HTLV-1 Infection, 18th International Conference on Human Retrovirology, 2017.3.7-10, Tokyo 3. Ancy Joseph, Takaharu Ueno, <u>Jun-ichi Fujisawa</u>: Establishment of HTLV-1-infected Jurkat cell lines with mutated Tax and HBZ genes, 第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016. 8, 鹿児島 4. 任 翊華、田中正和、姚 錦春、李 成一、<u>藤澤順一</u>: ATL 発症過程における感染細胞内 Tax 遺伝子発現の変動、第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016. 8. 26-28, 鹿児島 5. 田中正和、任 翊華、竹之内徳博、姚 錦春、李 成一、<u>藤澤順一</u>: HTLV-1 感染ヒト化マウスを用いた感染予防ワクチンにおけるアジュバント効果の検討、第 3 回日本 HTLV-1 学会学術集会, 2016. 8. 26-28, 鹿児島 	
	<p>【その他特筆事項】</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膠芽腫に対する既存薬転用 GSK3β 標的治療の確立																					
研究代表者	所属・職名・氏名	久留米大学医学部病理学講座・助教・古田拓也																					
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・教授・中田光俊																					
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・助教・宮下勝義																					
	所属・職名・氏名	金沢大学脳・脊髄機能制御学・博士研究員・淑瑠ヘムラサビット																					
	所属・職名・氏名	金沢大学脳・脊髄機能制御学・博士課程学生・董宇																					
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成																					
【研究目的】	<p>本研究の目的は膠芽腫に対する安全で効果的な glycogen synthase kinase 3β (GSK3β) 標的療法の可及的すみやかな確立である。我々はこれまでに異常な GSK3βの活性化が膠芽腫の悪性形質に寄与し、これを阻害することが合理的な治療法であることを基礎実験で確認している。これを実臨床に応用するため、前臨床試験が不要な既存薬転用 (drug repositioning) による治療法開発を立案した。本研究は GSK3β活性を阻害する 4 種の既存医薬品の膠芽腫に対する有効性・安全性を評価するトランスレーショナルリサーチである。</p>																						
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>膠芽腫の手術標本を用いた検討では、活性化型GSK3βの高発現は独立した予後不良因子で、GSK3βの活性を阻害することが膠芽腫治療として合理的であると考えられた。GSK3β阻害作用を有する既存薬剤のシメチジン(Cim)、リチウム(Li)、オランザピン(Ola)、バルプロ酸(VPA)の4剤“CLOVA cocktail” (CLOVA)を膠芽腫細胞株および膠芽腫マウスモデルに投与し有効性と安全性を評価した。CLOVAが膠芽腫細胞のGSK3β活性を阻害することを、GSK3βの特異的な基質であるglycogen synthase (GS) のリン酸化低下により確認し各種実験を行った。In vitroではCLOVAは膠芽腫細胞株の浸潤・増殖を抑制した。In vivoでは、CLOVA投与により細胞周期活性の指標であるMIB-1標識率の低下が認められ増殖抑制効果が示された。また、CLOVA投与群ではリン酸化GS陽性細胞の減少、幹細胞マーカーのひとつであるnestin陽性浸潤細胞の減少、細胞骨格の再構築に関与する活性化Rac1の局在変化が認められ、GSK3β阻害による浸潤抑制メカニズムと考えられた。CLOVA投与群は対照群に比べて生存期間が有意に延長した。</p> <p>基礎実験の成果をもとに膠芽腫に対する標準治療へのCLOVAの上乗せ効果を検証する臨床試験を立案し、金沢大学附属病院臨床試験審査委員会の承認を得て施行した (UMIN Clinical Trial Registry: UMIN000005111)。再発膠芽腫7例に対して標準治療にCLOVAを併用し、標準治療のみで治療を行った対照15例と安全性と有効性を比較検討した。CLOVA+標準治療群は対照群よりも再発後生存期間が有意に延長(右図)し、副作用は忍容可能であった。既存薬転用GSK3β標的治療は新たな膠芽腫治療法として期待される。</p>																						
	 <table border="1"> <caption>Survival Probability Data (Estimated from Plot)</caption> <thead> <tr> <th>Months after recurrence</th> <th>CLOVA cocktail (n=7)</th> <th>Historical control (n=15)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>1.0</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>1.0</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>0.6</td> <td>0.4</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>0.3</td> <td>0.2</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>0.2</td> <td>0.1</td> </tr> <tr> <td>25</td> <td>0.1</td> <td>0.0</td> </tr> </tbody> </table>		Months after recurrence	CLOVA cocktail (n=7)	Historical control (n=15)	0	1.0	1.0	5	1.0	0.8	10	0.6	0.4	15	0.3	0.2	20	0.2	0.1	25	0.1	0.0
Months after recurrence	CLOVA cocktail (n=7)	Historical control (n=15)																					
0	1.0	1.0																					
5	1.0	0.8																					
10	0.6	0.4																					
15	0.3	0.2																					
20	0.2	0.1																					
25	0.1	0.0																					
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Furuta T, Sabit H, Dong Y, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Ya, Hayashi Yu, Minamoto T, Nakada M. Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase-3β-targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. <i>Oncotarget</i> Advance Publications 2017.</p> <p>【学会発表】 古田拓也, 淑瑠ヘムラサビット, 董宇, 宮下勝吉, 木下雅史, 内山尚之, 林康彦, 林裕, 源利成, 中田光俊. 膠芽腫に対するテモゾロミド併用 GSK3β標的治療. 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会, 平成 28 年 12 月 4-6 日, 甲府.</p> <p>【その他特筆事項】</p>																						

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		早期薬剤耐性獲得に関わるシグナル伝達経路の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・室長・北條浩彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・流動研究員 ・福岡聖之
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	<p>薬剤耐性は、抗がん剤治療や感染症治療において治療を減速させ、そして制限させる大きな問題の一つである。効果的かつ持続的な投薬治療を行うためには、薬剤耐性の発生を回避し抑制することが重要である。そのためには薬剤耐性のメカニズムを理解することが必要である。そして、多くの研究が行われてきた。その成果として薬剤耐性に関わる遺伝子変化が明らかにされた。しかしながら、それらの遺伝子変化が、薬剤の暴露を初めて受けた（ナイーブな）がん細胞内で 早急に成立したとは考えられない。突然変異率に基づいて考えると、むしろ時間をかけてそのような遺伝子変化が成立し、固定化したと考える方が自然である。では、初めて薬剤に暴露したがん細胞が、どのようにして生き延びたのか？この最もシンプルで重要な問いに答える明確な回答は、無い。そこで本研究は、その問いに答える「(未だ解明されていない) 細胞サバイバル戦術」を明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々はヒト非小細胞肺癌細胞株、PC-9 細胞を用いて研究を行った。この PC-9 細胞はユニークな特徴を持った細胞で、ナイーブな細胞は抗がん剤ゲフィチニブに対して強い感受性を示すが、長期にわたって暴露し続けるとゲフィチニブ耐性に変化する。ゲフィチニブ感受性から耐性への変化が同一の細胞株で観察・解析できることから、PC-9 細胞は薬剤耐性獲得の良いモデル細胞として研究されてきた。我々はまず、この細胞を用いてゲフィチニブ感受性・耐性での遺伝子発現変化を網羅的に解析した。その結果、ゲフィチニブ処理によって線維芽細胞増殖因子 (FGF2) とその受容体 (FGFR1) 遺伝子の発現が顕著に増加することを見出した。そして、ゲフィチニブと共に FGFR1 阻害剤や FGF2 を用いた細胞生物学的解析を行った結果、ナイーブな PC-9 細胞が最初のゲフィチニブ暴露を受けた時、ゲフィチニブによって殺された近傍の細胞から漏れ出る FGF2 が、まだ生残っている細胞の生存を助けていることが示唆された。これは、すなわち、最初のゲフィチニブ暴露から細胞が生き延びるための「利他的なサバイバル戦術」であるといえる。この研究成果は、H28 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウムで発表（ポスター発表）し、国際誌にも報告した。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Takahashi M., Fukuoka M., Yoshioka K., and Hohjoh H. (2016) Neighbors' death is required for surviving human adenocarcinoma PC-9 cells in an early stage of gefitinib treatment. <i>BBRC</i>, 479: 393-397.</p>	
	<p>【学会発表】 H28 年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム（ポスター発表）</p>	
	<p>【その他特筆事項】 特になし。</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		c-Myc 制御、DNA 損傷修復、癌代謝に関わる FIR に着目した消化器・難治がんの診断法および包括的がん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院検査部・遺伝子診療部・検査部部长、診療教授・松下一之
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学大学院薬学研究院・准教授・星野忠次
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・大学院生・北村浩一
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院検査部・遺伝子診療部・講師・西村基
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・大学院生・小林崇平
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院検査部・技術補佐員・田中信子
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>細胞内相互作用の中でも FIR-SAP155 の相互作用を阻害することにより副作用の少ない新規作用機序に基づくがん治療法開発を目的とした。FIR-scFv (single-chain Fragment variables)/低分子/核酸医薬などの FIR-SAP155 の阻害剤は癌治療の優れた良い分子標的の候補である。FIR は DNA 損傷修復タンパク質 (ku86/70, DNA-PKcs, PARP1) とも相互作用し、SAP155 は p27Kip1 の pre-mRNA のスプライシング因子としても働く (文献 10)。臨床試験としては SF3B 複合体を標的とする Pladienolide や Spliceostatin A が強力な抗癌活性を有することが報告されている。本研究は FIR-UHM (C 末端) に対する FIR-SAP155 相互作用を特異的 (かつ可逆的) に阻害する副作用の少ない新規機序に基づくがん治療法 (低分子/FIR-scFv/核酸医薬など) の開発を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1. <u>FIR の発現と癌代謝 (解糖系との関連を明らかにした)</u> FIR と癌代謝 (FIR は解糖系の PKM2 の発現調節に関与していること: Oncotarget 査読中) の関連を明らかにした。我々が樹立した FIR ヘテロ KO マウスと TP53 ホモ KO マウスの交配による T 細胞性急性リンパ性白血病発症モデルマウスでは胸腺リンパ腫も発症する。胸腺リンパ腫組織からタンパク質を網羅的に抽出して、TMT (Thermo Scientific™ Tandem Mass Tag™) による解析を行ったところ、FIR ヘテロ KO マウスに発生するリンパ腫では癌代謝における pyruvate kinase (PK) M2 の発現が確認された (論文準備中)。このことは、FIR の発現の多寡が癌代謝 (解糖系) にも関与していることを示唆している。以上のように FIR は相互作用する相手により <i>c-myc</i> の転写・転写後調節、DNA 損傷修復、癌化・白血病化、癌代謝に関わる多機能分子であり癌診断・治療の良い標的である。</p> <p>2. <u>FIR (PUF60) および FIR スプライシングバリエント (FIRΔ exon2) に対するがん患者血清中の自己抗体を検出した。</u> ヒト癌患者・健常者血清を用いた FIR 検出系 (AlphaLISA, ELISA) を隔離した。既存の抗 FIRs 抗体の N 末端アミノ酸を解析し、抗 FIRs 抗体 (C 末端) と、FIR、FIRΔ exon2 をサンドイッチできるモノクローナル抗体の選定を行った。現在ファージディスプレイを用いて抗 FIR (PUF60) 抗体を同定して、抗 FIR (PUF60) 自己抗体検出のための ELISA キットの作製を目指した。現在、FIR ペプチドに対するファージディスプレイを検討中。既存の抗 FIRs 抗体の N 末端アミノ酸を解析し、抗 FIRs 抗体 (C 末端) と、FIR、FIRΔ exon2 をサンドイッチできるモノクローナル抗体の選定を行う。選定された抗 FIR モノクローナル抗体、抗 FIRΔ exon2 モノクローナル抗体、および抗 FIRs 抗体 (C 末端) の遺伝子のクローニングをする。それらをビオチン化 Fab として発現精製し、サンドイッチ ELISA 法の検出系を確立する。</p> <p>3. <u>FIR に結合する低分子化合物の生理活性 (グザヌル・田中・松下)</u>: 我々は、理化学研究</p>	

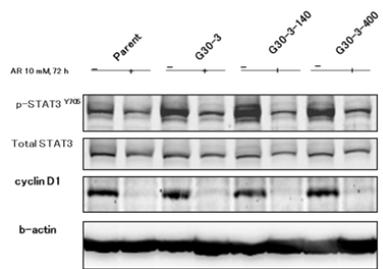
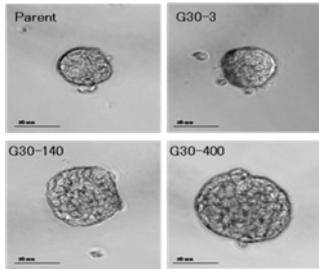
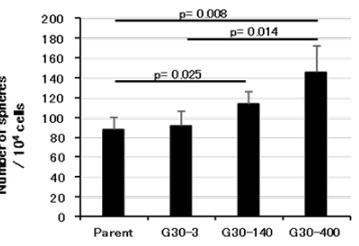
	<p>所の天然化合物バンク（約 25,000 種類の化合物）から、FIR および FIRΔ exon2 に強く結合するもの 1 種類、FIR に強く結合するもの 4 種類、FIRΔ exon2 に強く結合するもの 2 種類をリガンドスクリーニングにより獲得した。</p> <p><u>4. FIR が癌細胞内で相互作用する核酸・タンパク質 (ChIP による同定) (北村・松下)</u> : FIR が癌細胞内で相互作用する核酸 (RNA, DNA)・タンパク質を ChIP により同定する。核酸 (RNA, DNA) は RNA-Seq、タンパク質は質量分析により同定を試みている (現在進行中)。</p>
<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】 Kobayashi S, Hoshino T, Hiwasa T, Satoh M, Rahmutulla B, Tsuchida S, Komukai Y, Tanaka T, Matsubara H, Shimada H, Nomura F, Matsushita K. Anti-FIRs (PUF60) auto-antibodies are detected in the sera of early-stage colon cancer patients. <i>Oncotarget</i>. 2016 Dec 13;7(50):82493-82503. doi: 10.18632/oncotarget.12696</p> <p>【学会発表】 <u>Matsushita K.</u> Rahmutulla B, Kitamura K, Beppu M, Nishimura M, Satoh M and Nomura F. Alternative splicing as biomarkers for DNA damage response: A novel mechanism of cancer progression through a single-nucleotides binding/multi-functional protein, <i>FIR</i>. ICHG2016 [The 13th International Congress of Human Genetics April 3-7, 2016. Kyoto, Japan.</p> <p>【その他特筆事項】 なし。</p>

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膵組織幹細胞の老化機序解明による疾患発症機序の解明
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 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター病理診断科・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・石渡俊行
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>膵臓の加齢に伴う変化は、糖尿病や膵臓癌の発症と関連しているため、健康寿命に大きな影響を及ぼす因子と考えられる。幹細胞は多分化能、自己複製能を有する細胞であり、膵組織幹細胞は病的状態の発症や進展の中心的役割を担うと考えられる。本研究では、膵組織中の組織幹細胞について、(1) 加齢に伴う生体内での局在や数の変化、(2) 機能の変化、(3) テロメア長の制御機構、(4) 膵臓癌との関連を明らかにする。これにより、老化と発癌における組織幹細胞のヒト生体内での役割を解明し、膵臓の発癌予防を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>平成 27 年度の共同研究にて、膵臓の組織幹細胞では、急速なテロメアの短縮あるいは細胞の消失が生じることを確認した。今年度は、その機序の解明のため、膵組織幹細胞の免疫組織学的なマーカーの一つである SOX9 について、ヒト膵組織中での発現の局在性、及び陽性細胞数の変化について検討した。SOX9 陽性細胞は、膵臓の外分泌細胞に少数認められ、膵管周囲の腺組織である pancreatic duct gland と腺房中心細胞に陽性細胞を多く認めた。ラ氏島、腺房は SOX9 陰性を示した。また、小児、若年者では SOX9 陽性細胞を膵組織内に多数認めたが、加齢とともに SOX9 陽性細胞数の減少を認めた。また、膵癌組織では、癌細胞に SOX9 発現を高頻度に認めた。</p> <p>以上より、SOX9 陽性を示す膵組織幹細胞の数が加齢とともに減少することが、長いテロメアを有する細胞の減少と一致して生じていた。加齢とともに進行するテロメア機能不全は、組織幹細胞にも生じ、このような変化が膵臓の発癌過程において重要な役割を担う可能性があると考えられる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Matsuda Y, Ishiwata T, Yoshimura H, Yamahatsu K, Minamoto T, Arai T. Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. Cancer Sci. 2017 108:354-361.
	【学会発表】	膵前駆細胞の老化の組織学的解析、金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム、平成29年2月14日
	【その他特筆事項】	なし

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん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 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学・教授・野田亮
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	概日リズムは、日々の睡眠サイクルを含む一日約 24 時間の生体の恒常性を制御している生物の基本的な機構である。近年の大規模疫学研究によると、シフトワーク従事者（看護師、パイロット）は、がん罹患率が有意に上昇することが報告された。また、正常な概日リズムが保てない <i>Period2</i> 欠損マウスは癌になりやすいことが報告されている。このことは、がんと概日リズムの密接な関連性を示唆しているが、その分子機構は不明な点が多い。本研究課題では、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> が概日リズム遺伝子を制御する機構を解明し、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> と概日リズムの新たな関連を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度までの共同研究により、以下のような結果を得ている。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 培養細胞への pRb の強制発現により、<i>Cry1</i> プロモーターの転写活性を抑制した。 2. pRb に対する shRNA を作用させた培養細胞の <i>Per2</i> 発現リズムをリアルタイムに測定した結果、pRb が概日リズム周期へ影響を与えることを見出した。 3. pRb ヘテロマウスの概日リズム行動解析により、pRb 欠損は概日リズムに影響を与えた。 <p>以上の結果を踏まえて、平成 28 年度は以下の検討を行い、一定の成果を得た。</p> <p>A. <i>Rb</i> による <i>Cry1</i> 転写制御の詳細な分子機構の解析</p> <p>pRb と PER2 の相互作用が <i>Cry1</i> の転写制御に重要である可能性及び、PER2 の PAS ドメイン(二量体形成に重要であると報告されている) の結合への関与の可能性を、pRb と野生型 PER2 及び PAS ドメイン欠損変異体 PER2 を用いて検討し、pRb が PER2 の PAS ドメイン依存的に制御を行うという知見を得た。</p> <p>B. コンディショナル <i>Rb</i> 欠損マウスを用いた <i>In vivo</i> での <i>Rb</i> の役割の解析</p> <p><i>Rb</i> を完全に欠損した組織を観察するために、Albumin-Cre; <i>Rb</i>^{flox/flox} マウス (Albumin-Cre; Jackson laboratory) の肝臓を 4 時間毎に 24 時間回収し、概日リズム遺伝子 (<i>Cry1</i>, <i>Per2</i>, <i>BMAL1</i>) 転写量を qPCR 法により解析した。その結果、<i>Rb</i> 欠損マウスの肝臓では、概日リズム遺伝子 <i>Cry1</i> の発現に異常が見られた。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	1. <u>Takao Miki</u> , Z. Zhao, C.C. Lee. Interactive organization of the circadian core regulators PER2, BMAL1, CLOCK and PML. <i>Scientific Reports</i> 6:29174 DOI: 10.1038/srep29174 2016
	【学会発表】	2. <u>Takao Miki</u> 「Interaction between tumor suppressors and the core circadian clock mechanism」 2016 年 10 月 25 日 International Society for Chronobiology in Suzhou, 中国
	【その他特筆事項】	

研究課題		膵がん治療耐性に伴う幹細胞性獲得機構における GSK3β/STAT3 経路の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・肝胆膵移植外科・助教・宮下知治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学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・消化器・腫瘍・再生外科学大学院生・竹中 哲
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所・腫瘍制御・堂本貴寛
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所・腫瘍制御・上原将大
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>膵癌（浸潤性膵管癌）は予後が極めて不良な疾患であり、本邦においても罹患者数および死亡率ともに増加傾向にある。その予後を不良にしている主な要因の一つは化学療法や放射線療法への耐性であるが、この化学放射線療法への高い抵抗性に癌幹細胞の存在が深く関与している可能性が示唆されている。そのため膵癌治療成績の更なる向上の為には、癌幹細胞形質のメカニズムの解明とそれに対する戦略が不可欠と考えられる。</p> <p>signal transducer and activator of transcription (STAT)3 は炎症のメディエーターとして働く転写因子であるが、膵癌の発生・進展過程においても STAT3 が深く関与していることが報告されている。</p> <p>本研究では、膵癌の化学療法において第一選択薬となっている gemcitabine (GEM) に段階的な耐性を示すように樹立されたヒト膵癌細胞株を用いて、膵癌の治療標的として同定された glycogen synthase kinase (GSK) 3β を指標にして、膵癌幹細胞形質の維持に作用する STAT3 経路の機能解析を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>教室では、北里大学北里研究所病院バイオメディカルリサーチセンター竹内教授らがヒト膵癌細胞 BxPC-3 をもとに樹立した GEM 耐性細胞株 (Anti-cancer Drugs 2015;26:90-100) を供与頂いている。</p> <p>研究初年度である本年度の研究では、GSK3β/STAT3 経路による膵癌幹細胞形質の維持機構を明らかにするため、GEM 耐性株の強度ごとに pSTAT3 の発現を Western blotting にて検討した。結果は pSTAT3 の発現が獲得耐性強度に応じて亢進し、GSK3 β 阻害剤により減弱することが確認できた (図 1)。また GEM 耐性株ごとに Sphere assay を行ったところ、獲得耐性強度に応じて Sphere 形成数が増加した (図 2、3)。以上より GEM 耐性株では GSK3 β /STAT3 経路が、癌幹細胞性に関連していることが示唆された。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>図 1</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>図 2</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>図 3</p> </div> </div> <p>次年度は癌幹細胞性のマーカーである SOX2、Nanog、Oct3/4 の発現を GEM 耐性株の強度ごとに検討し、さらに GSK3 β 阻害剤を用いてその抑制効果を検討する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	竹中 哲, 宮下知治, 太田哲生, 堂本貴寛, 源 利成. GSK3 β を阻害することによる膵臓がんの化学療法耐性解除への可能性. 第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会. 2016.07.21~07.22 於: 米子
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		神経膠芽腫幹細胞への、サイトメガロウイルス感染により誘導されるケモカイン関連遺伝子の影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	北陸大学・教授・村山次哉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北陸大学・講師・武本眞清
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>近年グリオブラストーマ (GBM) からヒトサイトメガロウイルス (HCMV) の遺伝子やタンパクが高頻度に検出されており、両者の関連性が注目されている。HCMV 感染は多くのケモカインを誘導する事から、HCMV 感染症の様々な病態に関与している可能性がある。さらに GBM の病態形成にもケモカインが関与しているとの報告があり、ケモカインを介して HCMV が GBM の病態形成に寄与している可能性が高い。本研究では GBM 細胞株ならびに神経膠腫幹細胞に HCMV を感染させ、誘導されるケモカインとその受容体を同定する。さらにそれら因子が GBM の形質と神経膠腫幹細胞の未分化性維持に与える影響を検討することにより、GBM の病態形成において HCMV が果たす役割を明らかにする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>GBM 細胞株 (T98G、A172) および星状膠細胞腫株 (U373MG) に HCMV 実験室継代株 (Towne) および臨床分離株 (91S) を感染させたところ、HCMV 感染許容細胞である T98G および U373MG において、CCL2 (MCP-1) および CCR2 の 2 種類のアイソフォーム (CCR2A、CCR2B) の mRNA の発現上昇が認められた。また T98G 細胞において CCR2 の他のリガンドである MCP-2、MCP-3、MCP-4 の遺伝子発現も、上昇することが明らかとなった。次にこれらの細胞株を幹細胞培地 (20 µg/ml EGF, 20 µg/ml FGF-basic, 10 µg/ml LIF, 2 µg/ml sodium heparin 含有 D-MEM/Ham' s F-12 培地) にて GBM 幹様細胞 (GSLC) に誘導して、同様に解析したところ、HCMV 感染非許容細胞である A172-GSLC においても CCR2A の mRNA が発現上昇していた。さらに、各感染細胞の培養上清中のケモカイン・サイトカイン産生量を蛍光マイクロビーズアレイにより解析した結果、これらの GSLC において MCP-1 タンパク質の産生上昇が認められた。同時に解析した 23 項目のケモカイン・サイトカインのうち、MCP-1 に加えて IL-8 のタンパク質量も GSLC において顕著に上昇していた。そこで IL-8 レセプターである CXCR-1 および CXCR-2 の遺伝子発現量を mRNA レベルで確認したところ、これらは HCMV 感染によって発現上昇していないことが明らかとなった。</p> <p>今回、GBM および GSLC に HCMV が感染することにより、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4 および IL-8 等のケモカインと、ケモカインレセプター CCR2A/CCR2B の発現上昇が明らかとなった。これらのケモカインおよびそのレセプターは、GBM の悪性化だけでなくウイルスの増殖にも寄与していることを我々は過去に報告してきた。さらに最近我々は、生薬成分中の tricetin (4', 5, 7-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone) が、MCP-1 および CCR2 依存的に HCMV の複製を抑制する事を見だし、報告してきた。今後 GBM の病態形成におけるこれら因子の役割を明らかにするとともに、GBM と HCMV の両者を同時に抑制できる治療標的としても検討していく。</p>	

<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p>
	<p>【学会発表】</p> <p>1、武本眞清、村山次哉 等：CCL5 依存性ヒトサイトメガロウイルス増殖の triclin による抑制効果。第 26 回抗ウイルス療法学会総会、名古屋、2016 年 5 月 13～15 日</p> <p>2、武本眞清、村山次哉 等：ヒトサイトメガロウイルス感染による神経膠芽腫幹細胞のケモカイン・ケモカイン受容体の発現誘導。第 64 回日本ウイルス学会学術集会、札幌、2016 年 10 月 23～25 日</p> <p>3、武本眞清、村山次哉 等：ヒトサイトメガロウイルス感染による神経膠芽腫幹細胞のケモカイン・ケモカイン受容体の発現誘導。日本薬学会北陸支部第 128 回例会、北陸大学薬学部、2016 年 11 月 27 日</p> <p>4、T. Murayama et al.; Inhibition of CCL2 dependent human cytomegalovirus replication by triclin. 17th International Congress on Infectious Diseases, March 2-5, Hyderabad, India, 2016</p> <p>5、T. Murayama et al.; Inhibition of host factor-dependent human cytomegalovirus replication by triclin. 2nd World Congress & Expo on Pharmaceutics & Drug Delivery Systems (Pharmaceutics- 2017), March 27-28, Kuala Lumpur, Malaysia, 2017</p>
	<p>【その他特筆事項】</p>

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		スキルス胃癌の間質増生機序特定と癌性腹膜炎発症機構の本態解明に基づく新規胃癌標的治療法の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学・教授・安本 和生
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医療センター・科長・川島 篤弘
	所属・職名・氏名	金沢医科大学・助教・葛西 傑
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>胃癌の発症と死亡は今なお非常に高率で、その対策は喫緊の重要課題である。中でも、スキルス胃癌に代表される高度な癌間質増生を伴うびまん浸潤性胃癌（以下、スキルス胃癌）は、進行・再発胃癌死亡の半数以上を占め、悪性腹水を伴う癌性腹膜炎を高頻度に発症する極めて予後不良な胃癌である。本病態特異的な発育進展、とくにびまん性癌細胞浸潤と高度な癌間質増生ならびに癌性腹膜炎高頻度発症の成因は不明であり今なお効果的な治療法がない。本研究では、癌微小環境の新たな視点に基づく解析、すなわちスキルス胃癌特異的な癌間質細胞の真の成り立ちとその役割について、今後の癌間質を標的とした治療のパラダイムシフトをも視野に、スキルス胃癌特異的な癌間質の性状・活性化因子の同定・癌細胞との相互作用から解明を図り、新規胃癌標的治療法の確立を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究では、スキルス胃癌特異的な癌間質の成り立ちと増生、その真の役割について、今後の癌間質を標的とした治療のパラダイムシフトをも視野にスキルス胃癌特異的な癌間質の性状・活性化因子の同定（PDGF/HB-EGFの役割を中心に解析）・癌細胞との相互作用から、スキルス胃癌特異的な癌間質の成り立ちと増生、その真の役割について解明を図る。</p> <p>本研究では、がん細胞とともに浸潤転移の中心的役割を果たすがん間質（線維芽細胞・マクロファージなど）に着目し、その形質特性と biology の詳細な検討から、治療のパラダイムシフトを視野に新たなバイオマーカーの開発から新規標的治療法の開発を目指すことを目的に研究活動を行っている。【方法】がん間質の形質特性を明らかにするためにスキルス胃癌原発巣 24 例を対象に、α-SMA、Galectin-1 (α-SMA 陽性 myofibroblast 産生増強作用が報告)、線維芽細胞活性化因子の一つである Fibroblast activation protein (FAP) ならびに、間質線維芽細胞より産生誘導されがん細胞の増殖遊走活性化に深く関与する HGF の発現を免疫組織学的に検討した。FAP では、その産生制御および生物活性を胃がん細胞株ならびに初代培養線維芽細胞を用い、臨床サンプルのがん性腹水中の濃度も検討。【成績】免疫組織染色結果から (10% 以上を陽性)、α-SMA、Galectin-1、FAP、HGF の発現陽性率は、それぞれ 87.5% (21/24)、29.1% (7/24)、91% (31/34)、83.3% (20/24) であった。FAP は胃癌細胞に対して著明な遊走活性増強作用を認め、がん性腹水中には、非がん性に比して約 10 倍高濃度の FAP が存在することが判明した。【結論】スキルス胃がんのがん間質は、増殖浸潤性亢進に深く関わる α-SMA、FAP 高度陽性および HGF 高産生性の線維芽細胞が構成することが判明した。がん間質線維芽細胞から FAP、HGF 産生誘導能をもつ HB-EGF の origin ならびに biology について今後も継続して詳細な検討を加え報告したい。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	安本 和生 et al. “The characteristic features of cancer associated fibroblasts (CAF) in human gastric cancer metastasis” 第 75 回日本癌学会 2016 年 10 月 横浜
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Rb/Akt 経路を基軸とした新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの開発
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・特任研究員・山野 荘太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・主任研究員・大木理恵子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>文部科学大臣、厚生労働大臣、経済産業大臣は、「がん対策推進基本計画」に基づき、平成 26 年度からの「がん研究 10 か年戦略」を定め、3 省が一体となり日本における癌研究戦略を推進しているが、新規対策課題として、希少がんに関する研究戦略を重要視している。毎年の病気の発生率が人口 10 万人あたり 6 人未満と規定される希少がんは、適応外薬や未承認薬の実用化研究を含む、民間主導の研究開発が進みにくく、治療薬開発のみならず治療薬開発のためのモデル動物開発も 5 大がんと比較し、大きな遅れを取っている。本研究の目的は、現在治療薬開発が遅れている希少がんの治療薬開発に資する新規マウスモデルの開発及びその発がん臓器の決定である。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの樹立</p> <p>PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスを交配し、PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスを樹立する。PHLDA3 欠損マウスでは膵島及び下垂体に、Rb ヘテロ欠損マウスでは下垂体及び甲状腺に神経内分泌細胞の増殖性病変が形成されることがすでにわかっているが、その他の臓器における神経内分泌細胞の増殖性病変に関する詳細は、明らかにされていない。そのため、本研究では樹立した PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスと PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスについて、一般状態の悪化をエンドポイントとして最大 52 週で剖検を行い、検索臓器に対して肉眼的及び病理組織学的解析を行う。加えて、神経内分泌マーカー各種の免疫組織学的染色を行い、軽度の増殖性病変や転移巣に対しても精査する。</p> <p>本年度では、研究所の大規模な移転及び新動物舎設立のため、Rb マウスの分与、精子凍結及びクリーニングを行い、交配の準備を行った。次年度も継続して動物の作成を行う予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1, Hirayama Y, Gi M, <u>Yamano S</u>, Tachibana H, Okuno T, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Anti-PD-L1 treatment enhances antitumor effect of everolimus in a mouse model of renal cell carcinoma. <i>Cancer Sci.</i> 2016 Dec;107(12):1736-1744.</p> <p>2, Tachibana H, Gi M, Kato M, <u>Yamano S</u>, Fujioka M, Kakehashi A, Hirayama Y, Koyama Y, Tamada S, Nakatani T, Wanibuchi H. Carbonic anhydrase 2 is a novel invasion-associated factor in urinary bladder cancers. <i>Cancer Sci.</i> 2017 Mar;108(3):331-337.</p> <p>3, Ishii N, Gi M, Fujioka M, <u>Yamano S</u>, Okumura M, Kakehashi A, Wanibuchi H. Diphenylarsinic acid exerts promotion effects on hepatobiliary carcinogenesis in a rat medium-term multiorgan carcinogenicity bioassay. <i>J Toxicol Pathol.</i> 2017 Jan;30(1):39-45.</p> <p>4, Yamaguchi T, Gi M, <u>Yamano S</u>, Fujioka M, Tatsumi K, Kawachi S, Ishii N, Doi K, Kakehashi</p>	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	A, Wanibuchi H. A chronic toxicity study of diphenylarsinic acid in F344 rats in drinking water for 52 weeks. Exp Toxicol Pathol. 2017 Jan;69(1):1-7.
	【学会発表】 学会名：第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、演題名：ラット腎癌肺高転移株を用いた転移亢進に寄与する CAMs に関する検討、ポスター発表
	【その他特筆事項】 第 25 回日本がん転移学会優秀ポスター賞受賞

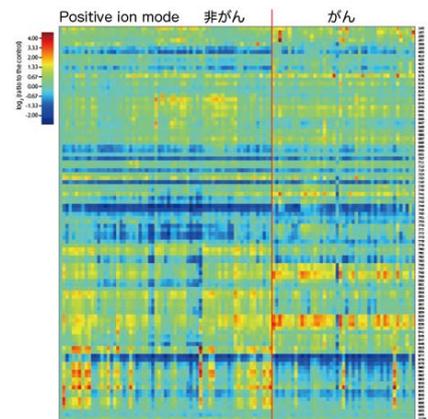
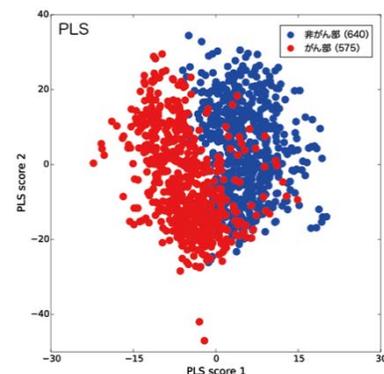
平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		軟部肉腫の 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	金沢大学地域医療救急 整形外科学講座・特任教授・山本憲男
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 整形外科・教授・土屋弘行
	所属・職名・氏名	金沢大学 整形外科・医員・阿部健作
	所属・職名・氏名	金沢大学 がん研究所腫瘍制御・助教・堂本貴寛
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学 がん研究所腫瘍制御・教授・源利成
【研究目的】	<p>当診療科での軟部肉腫の基本的な治療方針は、アドリアマイシンやイホスファミドなどを中心とする抗がん剤治療と手術療法である。しかし、抗がん剤に抵抗性の症例や、骨髄抑制や多臓器不全など抗がん剤の強い副作用により投与中止を余儀なくされる症例も少なくなない。そのため、これまでの抗がん剤とは違うメカニズムで作用する新しい治療薬の開発が望まれている。</p> <p>このような背景から我々は、これまで軟部肉腫では未発達である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 を標的とする軟部肉腫（滑膜肉腫、線維肉腫など）の新しい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。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>① <i>In vitro</i></p> <p>i) Western blot による各軟部肉腫細胞株と線維芽細胞株の活性型 GSK3β 発現の差を検討 →軟部肉腫細胞株において、強く活性型 GSK3β の発現を認めた。</p> <p>ii) 特異的 siRNA を用いた RNA 干渉による GSK3β の発現抑制と抗腫瘍効果の関連性を検討 →軟部肉腫細胞株において、特異的 siRNA を用いると、GSK3β の発現が抑制された。MMT assay にて、抗腫瘍効果も認められた。</p> <p>iii) MMT assay による GSK3β 阻害薬の軟部肉腫細胞増殖への効果の検討 →時間・濃度依存性に抗腫瘍効果が認められた。</p> <p>② <i>In vivo</i></p> <p>滑膜肉腫および線維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の検討 →GSK3β 阻害薬投与群において有意に大きさ・質量が縮小していた。また病理像においても腫瘍細胞の減少・壊死を認めた。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	論文発表はまだです。
	【学会発表】	第 31 回 日本整形外科学会基礎学術集会（福岡） 10 月 13-14 日 GSK3 β 阻害による軟部肉腫の治療効果の検討 阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林克洋, 武内章彦, 三輪真嗣, 稲谷弘幸, 樋口貴史, 谷口裕太, 源利成, 土屋弘行
	【その他特筆事項】	

平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		mTORC1 の脱制御機構の解明・克服は、進行期 CML の薬剤耐性を打破できるか？
研究代表者	所属・職名・氏名	東大医科研病院血液腫瘍内科・助教・ 横山和明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	遺伝子・染色体構築研究 教授 平尾 敦
【研究目的】	慢性骨髄性白血病 (CML) の原因である BCR-ABL を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 耐性は問題であるが、その一因として mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の活性化が報告され注目されている。mTOR 経路は CML において TKI 耐性克服の薬物標的と考えられ、TKI とこれらの阻害剤を併用する試みは前臨床実験において一定の効果をあげているが新たな薬剤耐性などを生じる懸念もあり次世代の mTOR を標的とした治療法の開発が必要であると考えられる。申請者は mTOR 複合体が、進行期 CML 症例においてのみ脱制御を受けている可能性を見出した。本研究は進行期 CML 症例での mTOR 脱制御の機序の解明のうえでの基盤を確立することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	予備実験において進行期 CML 症例にて、mTORC1 の主要構成要素である Raptor の脱制御が生じている可能性を見出した。そこで医科研病院のゲノム解析同意取得進行期 CML 症例 (n=1)、慢性期 CML 症例 (n=1)、Ph (+) ALL 症例 (n=1)、非ホジキンリンパ腫症例 (n=1) の RNA-seq による発現解析を行った。Library 調整 kit として Truseq RNA access (illumina 社) を用い、次世代シーケンサは NextSeq500 を用いた。サンプルは total RNA20ng を input とした。解析 pipeline は Genomon RNA を用いた。結果、CML-BC 症例だけでなく、Ph+ALL において、低頻度の割合ではあるが Exon skipping が確認された。これらは CML-CP 症例や control の非ホジキンリンパ腫症例では観察されなかった。次に Exon skipping の原因を探求するため、全長 420kbp の RPTOR 遺伝子座、及び骨髄系腫瘍関連 58 遺伝子をカバーするカスタムパネルをデザインし、上記進行期 CML 症例の target sequence を行った。ライブラリ調整 kit は illumina 社の Nextera custom enrichment panel を用いた。Input DNA は 50ng、生殖細胞変異 control として同症例の頬粘膜 DNA を用いた。次世代シーケンサとして NextSeq500 を用いた。解析 pipeline として Genomon2 を用いた。結果 Raptor の intron 領域の大きな欠失、変異は同定し得なかったが、U2AF1 のサブクローン体細胞変異を同定した。U2AF1 は RNA スプライシング因子の一つであり、骨髄性の慢性造血器悪性腫瘍、特に骨髄異形成症候群において変異が報告されている。CML での報告は皆無であるが U2AF1 変異は splice 異常を in vitro で引き起こす事が報告されている (Nat Genet. 2011;44(1):53-7) ことから、当症例では exon skip の原因は splice site の変異ではなく、U2AF1 変異による可能性があると考えられた。今後症例数を増やして CML-BC 症例で同様の事象が観察されるか解析予定である。また U2AF1 異常による in vitro での mTOR 経路の遺伝子発現異常などの解析も併せ行っていきたい。	
【成果等】	【主な論文発表】	特記事項なし
	【学会発表】	Exploratory introduction of cognitive computing to clinical sequencing in hematological malignancies Kazuaki Yokoyama, et al The 78th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology Oct 13, 2016
	【その他特筆事項】	

研究課題		質量分析と機械学習を用いた大腸がんの判別アスゴリズム構築 および分子病態解明
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学・助教・吉村 健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	山梨大学・教授・竹田 扇
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・太田 哲生
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・中村 慶史
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本 貴寛
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究では大気圧イオン化法を連結した質量分析装置を用いて、ヒト大腸組織検体のマスペクトルを取得し、そのマスペクトルを比較することで非がん/がんの診断を迅速に行う、一連のシステムを構築することを目的とする。本システムでは診断アルゴリズムに学習機械を用いており、これによってマーカー分子に依らない判別が可能であるが、従前の統計解析手法を用いて疾患特異的に発現量が変化するピークを抽出し、大腸がんの分子病態解明の分子基盤を形成することも目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1)大腸組織検体のマスペクトルデータベース構築 これまでに 74 症例、475 切片の大腸組織から、非がん部 1, 240 スペクトル (SP)、がん部 1, 135 SP を取得し、腫瘍のグレードや組織型のラベルと共にデータベースにインポートし、関係データベースを構築した。本年度は更なるデータベースの拡充に向けて新たに 150 症例、288 切片の大腸組織を収集し、分析を進めている。同組織には従来型の装置に加えて、高分解能の装置を用いた質量分析が行われており、マスペクトルに含まれるピークが、生体のどのような分子に由来するのかが近日同定される予定である。</p> <p>2)大腸がんの診断アルゴリズム構築 部分最小二乗法-ロジスティック回帰 (partial least squares-logistic regression, PLS-LR) による判別において、全マスペクトルを一個抜き交差検証 (leave-one-out cross-validation, ROOCV) で検証した結果、86. 76%の正答率で非がん/がんを判別できた。さらにがんのグループを低分化、中分化、高分化に細分化した場合の正答率は 83. 64%とやや低下するが、これは低分化と、高分化のがんに由来するデータが少ないことによる学習不足が原因であった。現在さらなるデータ収集を開始している。また診断システムとして一体化した際にアルゴリズムを簡便に利用することができるよう graphical user interface (GUI) の構築を行なった。</p> <p>3)大腸がん特異的に変化するピークの選別 本システムで得られるマスペクトルには 1990 ピークが存在するが、それぞれに対して有意差検定を行なった。その結果約 50 ピークが、がん組織において有意にイオン強度を変化させることが明らかとなった。これらのピークは主に脂質に由来することが明らかとなったが、現在さらに詳細な脂質種の同定を進めている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



平成 28 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳癌細胞由来の内因性 GM-CSF が癌微小環境に与える影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学・准教授・吉村禎造
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学・教授・松川昭博
	所属・職名・氏名	岡山大学・技術補佐員・佐藤美和
	所属・職名・氏名	岡山大学・学生・中村薫
	所属・職名・氏名	岡山大学・留学生・Chunning Li
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>腫瘍微小環境内では腫瘍・非腫瘍細胞間のクロストークによりケモカインをはじめとする種々のサイトカインが産生され腫瘍の進展を促している。我々はこれまでにマウス 4T1 乳がんモデルを用い、1) 非腫瘍細胞が産生するケモカイン monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) が 4T1 細胞の肺転移を促進すること、2) 4T1 細胞由来の granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) がマクロファージを活性化し MCP-1 産生を誘導すること、3) 4T1 腫瘍内 MCP-1 の産生は大部分 GM-CSF 非依存性であるが、腫瘍の局所での増殖には GM-CSF が何らかの働きをしていることを報告した。本研究の目的は、4T1 腫瘍細胞により産生される GM-CSF がどのようなメカニズムで腫瘍の増殖を促進するかを明らかにすることである。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1. 抗 GM-CSF 抗体による GM-CSF 活性中和の 4T1 腫瘍進展に及ぼす影響 正常の Balb/c マウス乳腺脂肪組織内に 10^5 個の 4T1 細胞を移植し、Day 0、4、7、11 に抗 GM-CSF 抗体を腹腔内に投与した。移植 2 週後に腫瘍組織を採取し、合計 176 のケモカイン・サイトカイン遺伝子の発現を qRT-PCR で検討した。その結果、21 の遺伝子の発現に有意な差が認められたが、その生物学的意義については今後の検討が必要である。その他、有意な差ではないが、IL-12b、CXCL1、CXCL2 の発現が抗体処理群で減少する傾向が見られた。これらの分子は 4T1 腫瘍の増殖に直接関係している可能性があり、更なる検討が必要である。</p> <p>2. GM-CSF 欠損 4T1 細胞株の作成 腫瘍細胞由来 GM-CSF の腫瘍環境に及ぼす影響をより直接的に検討するために、CRISPR-Cas9 法を用いて GM-CSF 欠損 4T1 細胞株を作成した。作成した GM-CSF 非産生クローン (A8) とコントロール細胞をマウスの乳腺脂肪組織に移植後、局所での増殖・肺転移の有無を検討した。A8 とコントロールの間で局所での増殖に有意差はなかったが、A8 の肺転移に減少が見られた。サイトカイン・ケモカイン遺伝子の発現を現在 qRT-PCR を用いて検討中である。</p> <p>3. 多クローン性 4T1 細胞株より単一細胞クローンの分離・樹立 以前より 4T1 細胞株が多クローン性の細胞株であることは示唆されているが、我々は本研究過程でその多クローン性を確認し 12 個の単一細胞クローンを分離・確立した。興味あることに、その形態と GM-CSF 産生能が各クローン間で異なっていた。このうち形態と GM-CSF 産生能の異なる 4 クローンを選び、マウスの乳腺脂肪組織に移植後、局所での増殖・肺転移を調べた。クローン間で局所での増殖に差は認めなかったが、肺転移に有意な差が認められた。この差は GM-CSF の産生能に非依存性で、GM-CSF 欠損細胞株の場合と結果が異なる。GM-CSF が腫瘍の進展にどのように作用するのか今後更なる検討が必要である。また、今後これらの細胞を用い異なった性格を持った腫瘍細胞の相互作用がいかに関わっているかを検討したい。 本共同研究から得られる結果は将来のがん治療の新しい標的を明らかにする上で重要だと思われる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	