

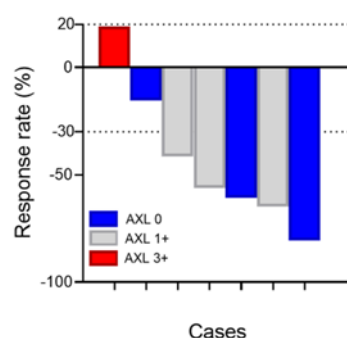
令和元年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2020.4

金沢大学がん進展制御研究所

研究課題		肺癌における分子標的治療薬の治療抵抗性細胞の解明とその克服治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・講師・山田忠明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・教授・高山浩一
	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>肺癌治療における薬剤耐性は治療の最大の障害であり、その早期診断と対策は極めて重要である。変異 EGFR に特異的な阻害活性を有するオシメルチニブは EGFR 変異陽性肺癌に対し良好な治療成績を示し、臨床における治療効果が期待されている。その一方で一部の症例ではオシメルチニブの治療効果が乏しく、治療抵抗性腫瘍の分子機構の解明とその克服法の開発は临床上、大きな課題である。本研究では、オシメルチニブ治療に抵抗性を示す EGFR 変異陽性肺癌症例を治療前に予測し、その耐性克服法を新たに開発することを目的に検討を行った。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度までに EGFR 肺癌細胞に対するオシメルチニブ治療は、SPRY4/AXL シグナルを介した negative feedback 機構を誘導することで、オシメルチニブ治療介入後も生存シグナルは維持することを見出し、報告した (Nat Commun. 2019;10(1):259)。</p> <p>本研究では、複数の EGFR 変異肺癌細胞を用いて、EGFR 阻害薬オシメルチニブ、ダコミチニブと臨床開発中の新規 AX 阻害薬 LONO-7475 の併用治療効果について検証した。さらに EGFR 変異陽性肺癌腫瘍の AXL 発現量を免疫染色法にて評価し、オシメルチニブ治療効果との関連性について検討した。</p> <p>EGFR 阻害薬オシメルチニブ、ダコミチニブと ONO-7475 の初期併用治療は AXL 高発現を有する EGFR 変異肺癌の細胞増殖および治療抵抗性細胞の出現を抑制したが、獲得耐性後の併用治療は限定的であった。EGFR 阻害薬による治療抵抗性細胞に対して ONO-7475 単剤治療は増殖抑制効果を示した。臨床検体を用いた後方視的観察研究において、AXL 高発現を有する EGFR 変異を有する肺癌症例は、オシメルチニブの治療効果 (奏効率、腫瘍縮小率) が不良である傾向を示した (図)。</p> <p>以上より、本共同研究の成果として AXL 高発現を有する EGFR 変異肺癌細胞における EGFR 阻害薬と新規 AXL 阻害薬 ONO-7475 の初期併用は有望な治療法であることを明らかにした。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>Okura N, Nishioka N, Yamada T, Yano S, et al. ONO-7475, a novel AXL inhibitor, suppresses the adaptive resistance to initial EGFR-TKI treatment in EGFR-mutated non-small lung cancer. <i>Clin Cancer Res</i> 2020 [published online ahead of print, 2020 Jan 17].</p>
	【学会発表】	<p>1) Tadaaki Yamada. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and the emergence of tolerant cells in EGFR mutated non-small cell lung cancer. 第 59 回日本呼吸器学会総会 2019/4/12 東京</p> <p>2) Tadaaki Yamada. The significance of AXL protein in tumors on the efficacy of EGFR-TKIs in NSCLC harboring EGFR mutation. 第 17 回日本臨床腫瘍学会学術集会 2019/7/20 京都</p> <p>3) 山田忠明. EGFR 変異陽性肺癌の AXL 活性に基づくオシメルチニブ治療抵抗性の解明と診断・治療法の開発. 第 60 回日本肺癌学会総会 2019/12/6 大阪</p>
	【その他特筆事項】	なし



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題	腸内細菌叢が膵臓がんの発生に与える影響の解明とそれに立脚した新規治療法の開発	
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・教授・園下 将大
研究分担者	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・助教・大塩 貴子
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	<p>膵臓がんは極めて高い薬物抵抗性を示すことが知られており、これが膵臓がんを最も予後不良のがんたらしめている大きな要因の一つとなっている。一方、膵臓がん患者が健常人と異なる腸内細菌叢を保有することが最近報告されたが、膵臓がんの発生に影響する実際の細菌叢やその機序、また細菌叢が膵臓がんの薬物治療に与える影響は完全に解明されていない。</p> <p>そこで本研究では、細菌叢が膵臓がんの発生に与える影響を解明し、その成果に立脚して新規治療法の開発を実施する。これにより、今後患者数の一層の増加が見込まれているがんに対して有効な治療戦略を確立し、もって福祉向上への貢献を図る。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者は最近、膵臓がん患者の中でも最も予後が悪い患者群で観察される4遺伝子変異 (<i>KRAS</i> 活性化、<i>TP53</i>・<i>CDKN2A</i>・<i>SMAD4</i> 不活性化) を模倣した4-hit ショウジョウバエを作出することに成功した。このハエは、細胞の増殖能や遊走能の顕著な亢進を示す。</p> <p>申請者は本年、大島教授との共同研究の中で、腸内細菌に対する免疫反応に関与すると考えられるキナーゼを4-hit ハエの遺伝学を使用して網羅的に探索した。その結果、<i>IKK</i> のヘテロ接合性変異が4-hit ハエの致死表現型を抑制することを見出した。<i>IKK</i> は <i>TLR</i> の下流として <i>NF-κB</i> を活性化して自然免疫を増強することが知られている。これらのことから申請者は、腸内細菌叢がこの経路を介して4-hit ハエの腫瘍形質を増強すると推測している。</p> <p>今後は、この経路を介して実際に4-hit ハエの腫瘍形質を増強する最近種を同定し、それを標的とする新規膵臓がん治療法の開発を推進する予定である。最後に、本研究に対し多大なご指導とご支援を賜りました大島教授と金沢大学がん進展制御研究所に深く感謝申し上げます。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Ung PMU.*, <u>Sonoshita M.*</u>, Scopton AP., Dar AC., Cagan RL., Schlessinger A. (2019). Integrated computational and Drosophila cancer model platform captures previously unappreciated chemicals perturbing a kinase network. <i>PLoS Comput Biol.</i> 15:e1006878 (*equal contribution)</p>	

【学会発表】

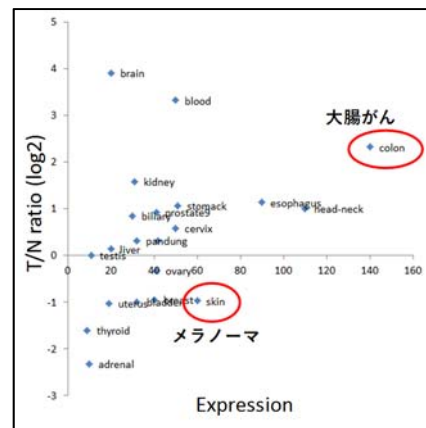
1. 「がん個体モデルを使用した新規がん治療薬の論理的創出基盤」第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月
2. 「個体を用いた新規創薬基盤」日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会 2019年6月
3. 「A whole animal platform to develop novel anti-cancer drugs」The 38th Sapporo International Cancer Symposium 2019年7月
4. 「個体を使用した新規がん治療薬の創出基盤」第28回日本がん転移学会年会 2019年7月
5. 「動物個体を用いた新規創薬基盤」第9回生命科学阿波踊りシンポジウム 2019年8月
6. 「A whole animal platform to generate novel kinase inhibitor drugs」第78回日本癌学会学術総会 2019年9月
7. 「がん個体モデルを使用した論理的創薬」第92回日本生化学会大会 2019年9月
8. 「A whole-animal platform for discovering novel anti-cancer drugs」第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2019年10月
9. 「計算科学が加速する創薬研究」北海道大学共同利用・共同研究拠点アライアンス部局横断シンポジウム「計算科学が拓く汎分野研究」 2019年10月
10. 「A whole animal platform to generate novel kinase inhibitor drugs」第42回日本分子生物学会年会 2019年12月

【その他特筆事項】

なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		マウスモデルを用いた免疫チェックポイント阻害薬と分子標的治療薬の併用療法の評価
研究代表者	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター・分野長・衣斐寛倫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター・ユニット長・細野祥之
	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・大島正伸
【研究目的】	免疫チェックポイント阻害薬の有効性は臓器により異なり、大腸がんでは、マイクロサテライト不安定性腫瘍を除きほとんど有効性が認められない。このため、新たな治療開発が急務となっている。マウス syngeneic モデルを用いた検討から、免疫チェックポイント阻害薬と MEK 阻害薬の併用が有効である可能性が示されたが、臨床試験では有用性を認めなかった。本共同研究では大島教授が樹立した大腸がん関連遺伝子変異導入による発がんモデルマウスを用い、有効性が得られなかった原因の解明と新規治療開発を目指す。	
【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>愛知県がんセンターでは、大腸がん免疫関連シグナルを負に調節するパスウェイの解析を行い、Myc パスウェイが大腸がんの免疫シグナルを負に制御することを見出した。これを受け、大島教授らは、Apc, Kras, Tgfbr2, Trp53 の遺伝子変異を同時に導入することで自然発がんするマウスモデル (AKTP マウスモデル) (Sakai et al. Cancer Res. 2018) より樹立した細胞株 (AKTP 細胞) に対し、MYC の knockout を行い AKTP-Myc KO 細胞株を作成した。AKTP 細胞株は、脾臓注入後に肝転移を起こすことが既に知られているが、AKTP-MYC KO 細胞株では肝転移形成の減少と、肝転移巣の繊維化を認めた。一方で、大腸がんでは否定された MEK 阻害薬と抗 PD-1 抗体の併用療法は、メラノーマに対する臨床試験では有効性が示された。このため、メラノーマと大腸がんとの違いを比較したところ、APC の異常等により MYC の発現量が腸がんでは他がん種と比較し上昇していた (右下図)。シグナル解析においても、MEK 阻害薬投与後の MYC の抑制はメラノーマでは発現がほぼ消失するまで抑制がされていたが、大腸がんでは不十分であることが明らかとなった。MYC の転写は MAPK シグナルに加え、複数のシグナルにより制御される。このうち、4EBP1 が MYC の転写に関わっていたことから、mTOR 阻害薬により mTOR-4EBP1 シグナルの遮断を行ったところ、MYC の十分な発現抑制が得られた。これを受け mTOR 阻害薬・MEK 阻害薬・抗 PDL1 抗体の 3 剤併用療法の有用性について予備的検討を行い、AKTP 細胞株を皮下に移植したモデルにおいて、腫瘍の縮小効果を認めた。現在治療実験を継続している。</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



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ALK 及び ROS1 融合遺伝子肺癌に対する新規阻害薬への薬剤耐性を克服する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・助教・谷口寛和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・病院講師・山口博之
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・助教・竹本真之輔
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・大学院生・梅山泰裕
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・教授・迎寛
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	<p>近年、分子生物学的手法の進歩により、発がんやがんの増殖、生存を司る Driver Oncogene が次々と発見され、それぞれに対する分子標的治療薬も次々開発されている。個別化医療の実践に向け治療法が年々進歩している。しかしながら肺癌に対する分子標的治療薬は、著明な腫瘍縮小効果を得られる一方、多くの症例では一定の奏効期間を得たのちに、獲得耐性により再発する。</p> <p>ALK 融合遺伝子陽性肺癌、ROS-1 融合遺伝子肺癌は若年者に多く、治療法の進展が必要である。第 3 世代 ALK/ROS1 阻害薬である Lorlatinib (ローブレナ[®])が承認され効果が示されているが、一定期間の治療の後、薬剤耐性を来すことが知られており、その機序を解明することを本研究の目的とした。</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>細胞株における薬剤耐性機序を解明するため、まず ALK 陽性肺癌細胞株、ROS1 陽性肺癌細胞株に対して Lorlatinib を一定濃度で慢性曝露していくことで Lorlatinib に対する耐性を獲得した細胞株を樹立した。これらの耐性化した細胞株は、高濃度の Lorlatinib や他の種類の ALK 阻害薬を曝露させても細胞増殖が抑制されなかった。ALK 陽性肺癌細胞株において、更なる解析を行った。RNA 干渉法を用いて ALK を Knockdown させても細胞増殖が抑制されず、耐性機序として、Receptor tyrosine kinase (RTK)の活性化などによるバイパスシグナルのよる薬剤耐性の可能性が考えられた。</p> <p>次に Human Phospho-Receptor Tyrosine Kinase Array や、Western blotting での解析において、薬剤耐性株では RTK の 1 つである HER3 が活性化していることが判明した。また、HER3 の Ligand である NRG1 も mRNA level で上昇しており Autocrine として HER3 の活性化が起こっていることが考えられた。</p> <p>HER3 の活性化が、Lorlatinib への薬剤耐性に関与しているかどうかを検討するため、RNA 干渉法または pan HER3 阻害薬である Afatinib、Dacomitinib で HER3 を阻害し、Lorlatinib との併用効果の有無について検討した。その結果、HER3 を阻害したうえで、Lorlatinib を投与することで Lorlatinib の耐性を解除することに成功した。</p> <p>本研究により HER3 の活性化に伴うバイパスシグナルが Lorlatinib の薬剤耐性機序として存在することが明らかとなり、pan-HER 阻害薬の併用で薬剤耐性を克服しうることを示した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

研究課題	消化器癌由来オルガノイドを用いた大腸癌浸潤先進部の形態学的変化の解明とヒト型 ADAM28 抗体作用機序の解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・学内講師・望月早月
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・米村圭介
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・永田健
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・神津慶多
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・教授・上野秀樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	本研究では、ヒト大腸癌オルガノイドとヒト大腸癌由来がん関連線維芽細胞を用いて線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) の形成機構や治療耐性の検討を行い、DR や大腸癌の悪性化に関わる分子機構を明らかにする。	
【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>我々はこれまでに大腸癌腫瘍浸潤先進部での線維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) が組織学的予後予測因子として有望であることを見出している (Ann. Surg. Oncol 22:1504-12, 2015; Am. J. Surg. Pathol 41, 1506-12, 2017)。DR はヒアリン化した collagen 束と myxoid な間質を基準に immature、intermediate、mature に分類でき、immature > intermediate > mature の順で予後不良となる (Gut 53:581-6, 2004)。このような癌間質の特異的な間質形成には、がん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts : CAFs) から産生される ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子などのタンパク質分解酵素の関与が推定される。そこで本研究では DR と ADAM 分子との関係ならびに DR が癌の悪性度に関与するメカニズムについて検討した。</p> <p>大腸癌手術切除検体から CAFs ならびにオルガノイドを培養し、CAFs で発現する ADAM 分子について RT-PCR 法、real-time PCR 法、イムノブロット法を用いて DR 分類別に比較検討したところ、ADAM9 は mature 症例に比べて immature 症例から採取した CAFs において有意に高発現していた。手術後に原発巣および非癌部組織から新鮮凍結標本を採取し、レーザーマイクロダイセクションを用いて癌先進部間質を DR 分類別に採取し、real-time qPCR 法で定量すると、ADAM9 は immature > intermediate > mature の順に発現が上昇していた。mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs の培養上清と共培養した大腸癌オルガノイドは増殖が有意に促進され、shRNA を用いた ADAM9 の発現抑制によりその増殖は抑制された (図 1)。さらに mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs と大腸癌細胞株とを混合移植した場合、マウス皮下ならびに盲腸漿膜下層での増殖と播種性転移が亢進した (図 2)。</p> <p>以上より、DR の形態的变化は CAFs における ADAM9 の発現と関連しており、大腸癌細胞増殖促進を介して癌悪性度に影響を及ぼしている可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Satsuki Mochizuki, Tadakazu Ao, Takumi Sugiura, Keisuke Yonemura, Takehiro Shiraishi, Yoshiki Kajiwara, Koichi Okamoto, Eiji Shinto, Yasunori Okada and Hideki Ueno: Expression and function of ADAMs in cancer-associated fibroblasts of colorectal cancer. Digestion 13:1-7. 2020. 2. Hideki Ueno, Kanemitsu Y, Sekine S, Ishiguro M, Ito E, Hashiguchi Y, Kondo F, Shimazaki H, Kajiwara Y, Koichi Okamoto, Satsuki Mochizuki, Tsujimoto H, Eiji Shinto: A Multicenter Study of the Prognostic Value of Desmoplastic Reaction Categorization in Stage II Colorectal Cancer. Am J Surg Pathol. 43:1015-1022, 2019. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tadakazu Ao, Satsuki Mochizuki, Yoshiki Kajiwara, Keisuke Yonemura, Eiji Shinto, Koichi Okamoto¹, Masato Yamadera, Takehiro Shiraishi, Ken Nagata, Masayuki Shimoda and Hideki Ueno: ADAM9 is highly expressed in cancer-associated fibroblasts and associates to desmoplastic reaction of colorectal cancer. Gordon Research Conference on Metalloprotenases, Lucca, Italy, 2019 年 5 月 13 日 <p>【その他特筆事項】なし</p>	

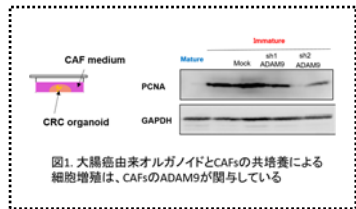


図1. 大腸癌由来オルガノイドとCAFの共培養による細胞増殖は、CAFのADAM9が関与している

した CAFs と大腸癌細胞株とを混合移植した場合、マウス皮下ならびに盲腸漿膜下層での増殖と播種性転移が

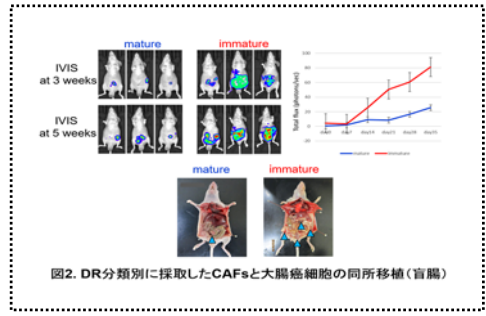
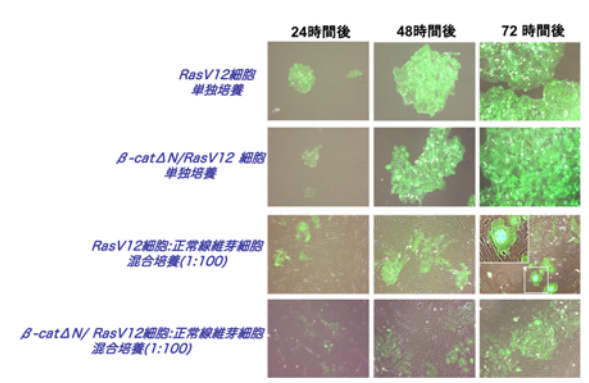


図2. DR分類別に採取したCAFと大腸癌細胞の同所移植(盲腸)

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞と正常線維芽細胞との相互作用
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学・講師・昆 俊亮
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京理科大学・助教・田崎 幸裕
	所属・職名・氏名	東京理科大学・修士2年・中井 一貴
	所属・職名・氏名	東京理科大学・修士1年・Lin Hancheng
	所属・職名・氏名	東京理科大学・学部4年・明果瑠 いるま
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>腫瘍微小環境では、がん細胞によって教育されたがん関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍関連マクロファージ (TAM) などの間質細胞が腫瘍進展に有利に作用する。しかしながら、がん細胞が間質組織に初めて出現したとき、がん細胞と正常間質細胞との間でどのような細胞間相互作用が生じるのか、その実態はよく分かっていない。これまでの予備実験の結果、正常間質組織は本来抗腫瘍的な場であり、Ras 単独変異など比較的悪性度の低い変異細胞は排除されるのに対し、APC/Ras 二重変異など悪性度の高い細胞は腫瘍進展に有利な間質環境を構築することを示唆する結果を得ている。本研究では、培養細胞を用いて、悪性度の異なるがん細胞と正常間質細胞、具体的には正常線維芽細胞との細胞間相互作用の様子を観察した。</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>悪性度の異なるがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用を <i>in vitro</i> にて解析するため、APC 欠損と同様に Wnt シグナルを活性化する β-catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現する細胞株 (β-cat ΔN 細胞) と β-catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現し、かつテトラサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を発現する細胞株を樹立した (β-cat ΔN/RasV12 細胞)。続いて、RasV12 細胞または β-cat ΔN/RasV12 細胞を単独培養、もしくはこれらの変異細胞を正常線維芽細胞と 1:100 の比率(がん変異細胞:線維芽細胞=1:100)で混合培養し、各々の細胞の挙動を経時的に観察した。まず RasV12 細胞もしくは β-cat ΔN/RasV12 細胞を単独で培養した場合、変異細胞はコロニー状に経時的に増加することが確認できた。また、β-cat ΔN/RasV12 細胞を線維芽細胞と共培養した場合も単独培養時と同程度に変異細胞は生存、増殖しており、線維芽細胞存在下でも目立った変化は認められなかった。一方、RasV12 細胞を線維芽細胞と共培養すると、時間経過とともに細胞が肥大化していき、細胞増殖能が著しく低下し、明らかに性状が変化する様子が観察された(図)。これらの結果より、線維芽細胞は RasV12 細胞の増生を抑制する機能を有することが示唆され、RasV12 変異に β-catenin の活性化変異を負荷すると、この抑制効果が干渉されることが分かった。</p>	
	 <p>図. がん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用 RasV12 細胞または β-cat ΔN/RasV12 細胞を単独培養、もしくは正常線維芽細胞と共培養したときの様子を示す。線維芽細胞と共培養した RasV12 細胞は肥大化する(72 時間後、拡大図)。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	1. 昆 俊亮: がん細胞が出現した正常間質組織でのシンギュラリティ現象の解明、新学術領域研究「シンギュラリティ生物学」、「細胞ダイバース」合同会議、東京、2020年1月23日
	【その他特筆事項】	なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		白血病の進展に関するアンジオクラインファクターの同定と解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・准教授・木戸屋浩康
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・研究員・村松史隆
	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・研究員・林弓美子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	<p>白血病には抗がん剤が有効である事から、併用化学療法を行うことにより寛解および治癒が期待できる。しかしながら、治療後の患者の多数が5年以内に再発するとされており、その場合は抗がん剤の効果が減弱して治療が困難となる。そのため、白血病の治療においては寛解後の再発の抑制法や、再発後の治療法の開発が求められている。このような白血病の再発の原因の一つとされているのが、白血病幹細胞である。白血病幹細胞などのがん組織における幹細胞は治療抵抗性を有することが知られており、治療後に残存した白血病幹細胞が再発の原因であると予想される。本研究では、新たな白血病の再発抑制法の開発を目指し、白血病幹細胞の制御に働く血管ニッチに注目し、アンジオクラインファクターの解析に取り組んだ。</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>骨髄組織の血管は、ニッチと呼ばれる特殊な微小環境を形成することで、造血幹細胞の維持や分化に働く。その分子メカニズムの解明のため、骨髄血管ニッチに存在する造血幹細胞の解析を進めてきた。その結果、Regnase1 という RNA 分解酵素が造血幹細胞の自己複製と分化のバランスを制御していることを発見した。さらに、この Regnase1 を血球細胞特異的に遺伝子欠損するマウス (Vav1-Cre:Regnase1^{flox/flox}) を作成し解析を進めたところ、AML 様の症状を呈して 14 週齢には大半が死亡した。これらの結果から、Regnase1 は AML 発症の原因遺伝子であることを明らかにし、Regnase1 遺伝子欠損マウスが白血病モデルマウスとなることを示した (Kidoya H, et al. Nature Commun. 2019)。</p> <p>次に、この白血病モデルマウスを用いて、白血病の進展に関与するアンジオクラインファクターの探索を進めた。白血病の血管にて特異的に発現が上昇する遺伝子を探索し、その中でも分泌タンパクに注目して解析を進めたところ、幾つかの候補分子を同定することができた (遺伝子名等の詳細については特許出願等のため非公開)。これらの候補遺伝子について、それぞれの遺伝子欠損マウスを作成し、Regnase1 遺伝子欠損マウス由来の白血病細胞を移植することで白血病を誘導して白血病の進展に対する影響を評価した。その結果、幾つかの遺伝子欠損マウスでは白血病の進展が抑制されており、白血病の進展を促進するアンジオクラインファクターであることが確認できた。さらに、これらのアンジオクラインファクターは Regnase1 遺伝子欠損マウス以外の白血病モデルマウスでも白血病の血管にて発現が上昇していることが確認できている。現在はヒトの急性骨髄性白血病においても同様に候補となっているアンジオクラインファクターの発現変化が起きているかを明らかにするため、ヒト臨床サンプルの解析に向けて準備を進めている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Komabayashi-Suzuki M, Yamanishi E, Watanabe C, Okamura M, Tabata H, Iwai R, Ajioka I, Matsushita J, Kidoya H, Takakura N, Okamoto T, Kinoshita K, Ichihashi M, Nagata KI, Ema M, Mizutani KI. Spatiotemporally Dependent Vascularization Is Differently Utilized among Neural Progenitor Subtypes during Neocortical Development. Cell Rep. 29(5):1113-1129. 2019.</p> <p>Jia W, Hsieh HY, Kidoya H, Takakura N. Embryonic expression of GINS members in the development of the mammalian nervous system. Neurochem Int. 129:104465. 2019.</p> <p>Kivelä R, Hemanthakumar KA, Vaparanta K, Robciuc M, Izumiya Y, Kidoya H, Takakura N, Peng X, Sawyer DB, Elenius K, Walsh K, Alitalo K. Endothelial Cells Regulate Physiological Cardiomyocyte Growth via VEGFR2-Mediated Paracrine Signaling. Circulation. 139(22):2570-2584. 2019.</p> <p>【学会発表】</p> <p>木戸屋浩康.腫瘍血管形成の真実に迫るレトロスペクティブ 4D イメージング解析.大阪大学タンパク質研究所セミナー「がん研究の新機軸」</p> <p>木戸屋浩康.造血幹細胞の恒常性維持に必須となる転写ネットワーク制御機構の解明.第 40 回日本炎症・再生医学会.神戸</p> <p>木戸屋浩康.癌微小環境遷移への適応を導く腫瘍血管のダイナミクス.第 8 回 生命科学阿波おどりシンポジウム</p>	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

木戸屋浩康.血管形成の時空間的ダイナミクスを司る新規ミエロイド系細胞群の同定.第 92 回日本生化学会大会
木戸屋浩康.白血病の発症に関与する新規の転写ネットワーク制御機構の解明.第 78 回日本癌学会学術総会
木戸屋浩康.血管新生阻害薬への治療抵抗性を生む腫瘍血管のダイナミクス.関西血管生物研究会
木戸屋浩康.アングリオインファクターが保つ組織微小環境の調和.42 回日本分子生物学会年会

【その他特筆事項】

2020 年 3 月 16 日 NHKニュース 「休校の子供に科学の特集サイト」

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がんと概日リズムの関連から同定した新規がん抑制機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学・講師・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	
	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>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。</p> <p>これらの報告は、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。我々は、現在までにがん抑制遺伝子 p53 と PML が概日リズムの直接の制御因子であることを見出し、概日リズムとがん抑制の経路に直接のクロストークが存在することを報告してきた。本研究課題では、がん抑制遺伝子 Rb 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 Rb 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。</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>がんにおいて多く見られる Rb 欠損の表現型である細胞周期異常、分化異常、代謝異常が、Rb によるヘム制御の欠損によるものである、という仮説を検証するために以下の実験を行った。現在までに我々は、がん抑制タンパク質 Rb の遺伝子欠損マウスでは PER2 のヘム結合が過剰となり、概日リズムが異常となることを見出している。この結果は、Rb が標的とヘムの結合を変化させることで標的の機能を制御することを示唆している。本研究では Rb によるヘム制御が標的制御機構に重要であるという仮説を検討した。最初のアプローチとして我々は、Rb 欠損の表現型がヘム合成阻害剤によりレスキューされるかどうかを以下のように検討した。</p> <p>近年の Rb と代謝に関する研究から、Rb 欠損によりミトコンドリアの遺伝子発現が制御されていることが報告されている (Jones et al., 2016)。そこで我々は野生型の MEF 細胞に Rb shRNA を導入した細胞の代謝活性を細胞外フラックスアナライザー xfp を用いて計測し、その Rb 欠損表現型をヘム合成阻害剤によりレスキューを試みた。</p> <p>その結果、Rb の downregulation により酸素消費速度 (OCR) と細胞外酸化速度 (ECAR) 共に減少が見られた。そこで、ヘム合成阻害剤を作用させたところ、僅かであるがレスキューがみられたが、統計的に有意な差は見られなかった。以前の報告から予想される結果は、Rb 欠損では増殖活性の上昇が観察されると期待され、OCR、ECAR 共に減少することは考えにくい。今回の我々の条件では、Rb の downregulation により OCR、ECAR 共に減少がみられていたことから、Rb の acute な downregulation により細胞障害が起きていることでヘム合成阻害剤のみではレスキューされなかった可能性が考えられる。そのため、今後は別の方法 (KO 細胞、CRISPR)、表現型 (細胞周期異常、分化異常) を用いて仮説の検討を行う計画である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 2019年度 日本癌学会	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		新規細胞間接着誘導因子可溶性 HAI-1 の機能制御によるがん転移抑制法の開発
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・松本 邦夫
【研究目的】	<p>MMP-7 は大腸がんの肝臓への転移に深く関与することが示唆されていたが、私達は MMP-7 がコレステロール硫酸を介して大腸がん細胞に結合すると、細胞表層タンパク質であり、HGF の活性制御に関わる HGF activator inhibitor type 1 (HAI-1) の切断を介してがん細胞の細胞凝集を誘導しつつ、その転移能を顕著に増強するという一連の作用機序を明らかにした。本研究では MMP-7 による HAI-1 切断がどのような機序でがん細胞の細胞凝集を誘導するのかを解明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>私達は MMP-7 により、がん転移が促進されるメカニズムとして、以下のような機序を明らかにしてきた。まず、がん細胞により生合成され、分泌された MMP-7 が、がん細胞の細胞膜成分として存在するコレステロール硫酸と結合する。コレステロール硫酸は細胞膜上のラフトと呼ばれる特殊な脂質組成を持つ領域に存在し、この領域に結合した MMP-7 が近傍の細胞表層タンパク質である HAI-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1) を切断することで、がん細胞の細胞間接着を誘導し、細胞凝集を惹起する。また、HAI-1 の細胞外領域が細胞間接着の誘導活性に重要であり、細胞間接着を誘導することが示唆されていた。</p> <p>しかし、本年度の研究を進める中で HAI-1 細胞外領域による細胞凝集の誘導は弱く、補助的な効果しか持たないことが判明した。一方、いくつかのセリンプロテアーゼ阻害剤により、MMP-7 が誘導する細胞凝集が抑制されることから、このメカニズムにセリンプロテアーゼ活性が介在することが示唆された。そこで、MMP-7 ではなく、セリンプロテアーゼでがん細胞の細胞凝集が誘導されるか調べたところ、数種のトリプシン型セリンプロテアーゼが大腸がん細胞の細胞凝集を誘導することが明らかになった。今後、MMP-7 の作用により活性を獲得し、細胞凝集を誘導するようながん細胞由来セリンプロテアーゼの探索を行うことを予定している。近年、種々のセリンプロテアーゼに対する特異的阻害剤が開発されていることを考慮すると、こうした高特異性セリンプロテアーゼ阻害剤が、MMP-7 が促進するがん転移を抑制する上で有効な薬剤と成り得る可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		非乳頭部十二指腸腫瘍の発がんメカニズムの解明と内視鏡治療への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学医療人育成センター生物学・教授・佐々木泰史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田武
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・大学院生・太田亮介
	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部人体病理病態学講座・教授・八尾隆史
	所属・職名・氏名	札幌医科大学医学部分子生物学・教授・鈴木拓
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>非乳頭部十二指腸腫瘍は希少疾患であるため、多数例での遺伝子解析の報告がほとんどない。本研究の目的は、非乳頭部十二指腸腺腫・粘膜内癌の遺伝子変異・メチル化の解析により、十二指腸発がんの分子機構を解明することである。さらに、同定されたゲノム・エピゲノム変化と病理組織学的所見、NBI 拡大観察を含めた内視鏡所見との統合解析により、腺腫からがんへの進展を予測する内視鏡診断体系を確立する。遺伝子変化がより蓄積されており、発がんポテンシャルが高い非乳頭部十二指腸腫瘍の特定を行い、内視鏡所見にフィードバックすることによって、発がん可能性が高く、優先して治療すべき十二指腸腫瘍を NBI 拡大内視鏡検査で予測することが可能となる。</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>(研究方法)</p> <p>小腸進行癌や十二指腸腫瘍などで従来報告のある 75 のがん関連遺伝子の変異、コピー数異常が解析可能な、Ion Torrent NGS シークエンサー用のカスタムパネル (3663 アンプリコン、パネルサイズ 366 kb) を独自に構築した。十二指腸腺腫・粘膜内癌 102 病変について、ホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 切片からの DNA を抽出し、このシステムを用いて、遺伝子変異、コピー数異常解析を行った。また、同サンプルで CIMP の有無の検討、がん関連遺伝子 p16, MLH1 のメチル化解析も行った。CD10, MUC2, MUC5AC, MUC6 の免疫染色により、胃型と腸型の分類を行った。</p> <p>(研究結果)</p> <p>変異解析では、平均カバレッジ深度 2461 X のシーケンスを行い、97.2%の領域がカバレッジ 100 以上であった。胃型の十二指腸腺腫、粘膜内癌では、KRAS, GNAS 変異が多かった。一方、腸型では APC 遺伝子変異を 65%に認め、従来の小腸進行癌において報告された変異頻度 (11-27%) と比較して高頻度であった。APC 変異の頻度は、粘膜内癌に比べ十二指腸腺腫で高率であった。また、APC 遺伝子変異の分布は、低異型度腺腫と高異型度腺腫の間では類似していたが、粘膜内癌における変異は変異集積部位以外のものが多くみられた。以上の結果より、腺腫から粘膜内癌に到る病変の頻度は低く、adenoma-carcinoma sequence の関与は限定的であることが示唆された。メチル化解析では、十二指腸腺腫に比べ上皮内癌で CIMP 陽性が多いことが明らかになったが、発癌早期のドライバー遺伝子は依然不明であった。今後は解析症例を増やすとともに、腺腫から粘膜内癌へ進展するためのドライバー変異の同定のため、一部の症例の全エクソン解析を予定している。さらに、NBI 拡大観察を含む内視鏡所見との相関を詳細に解析し、内視鏡診断・治療への応用を目指していきたい。</p>	

【成 果 等】

【主な論文発表】

1. Hida T, Idogawa M, Okura M, Sugita S, Sugawara T, Sasaki Y, Tokino T, Yamashita T, Uhara H. Genetic analyses of mosaic neurofibromatosis type 1 with giant cafe-au-lait macule, plexiform neurofibroma and multiple melanocytic nevi. **J Dermatol.** in press.
2. Yokose T, Kitago M, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Nakamura Y, Shinoda M, Yagi H, Abe Y, Oshima G, Hori S, Fujita Y, Nakano Y, Endo Y, Abe K, Tokino T, Kitagawa Y. Combination of KRAS and SMAD4 mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer. **Cancer Sci.** in press.
3. Idogawa M, Hida T, Tanaka T, Ohira N, Tange S, Sasaki Y, Uhara H, Masumori N, Tokino T, Natori H. Renal angiomyolipoma (AML) harboring a missense mutation of TSC2 with copy-neutral loss of heterozygosity (CN-LOH). **Cancer Biol Ther.** 21: 315-319, 2020.
4. Suzuki N, Idogawa M, Tange S, Ohashi T, Sasaki Y, Nakase H, Tokino T. p53-induced ARVCF modulates the splicing landscape and supports the tumor suppressive function of p53. **Oncogene.** 39: 2202-2211, 2020.
5. Fujita Y, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Kitago M, Yagi H, Abe Y, Shinoda M, Tokino T, Sakamoto M, Kitagawa Y. Pathogenesis of multiple pancreatic cancers involves multicentric carcinogenesis and intrapancreatic metastasis. **Cancer Sci.** 111: 739-48, 2020.
6. Ogi K, Kobayashi J, Nakagaki T, Okamoto J, Koike K, Hirokawa N, Someya M, Sakamoto H, Takada K, Tokino T, Sasaki Y, Hiratsuka H, Miyazaki A. Chemotherapy after progression on nivolumab is essential for responders with genetic alterations of driver gene: Review of two recurrent/metastatic oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncol.** 102: 104509, 2020.
7. Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. **PLoS One.** 15: e0229262, 2020.
8. Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H. DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling. **Haematologica** 104: 155-65, 2019.
9. Adachi Y, Mita H, Sasaki Y, Himori R, Onodera K, Nakamura M, Kikuchi T, Yamashita K, Yoshida Y, Ishii Y, Endo T. Malignant paraganglioma of posterior mediastinum – a case report with genetic analysis. **Mol Clin Oncol.** 10: 10-16, 2019.
10. Fukamachi H, Kim SK, Koh J, Lee HS, Sasaki Y, Yamashita K, Nishikawaji T, Shimada S, Akiyama Y, Byeon SJ, Bae DH, Okuno K, Nakagawa M, Tanioka T, Inokuchi M, Kawachi H, Tsuchiya K, Kojima K, Tokino T, Eishi Y, Kim YS, Kim WH, Yuasa Y, Tanaka S: A subset of diffuse-type gastric cancer is susceptible to mTOR inhibitors and checkpoint inhibitors. **Exp Clin Cancer Res.** 38: 127, 2019.
11. Idogawa M, Nakase H, Sasaki Y, Tokino T. Prognostic Effect of Long Noncoding RNA NEAT1 Expression Depends on p53 Mutation Status in Cancer. **J Oncol.** 2: 4368068, 2019.
12. Darwis NDM, Nachankar A, Sasaki Y (Contributed equally), Matsui T, Noda S, Murata K, Tamaki T, Ando K, Okonogi N, Shiba S, Irie D, Kaminuma T, Kumazawa T, Anakura M, Yamashita S, Hirakawa T, Kakoti S, Hirota Y, Tokino T, Iwase A, Ohno T, Shibata A, Oike T, Nakano T. FGFR Signaling as Candidate Therapeutic Target for Cancers Resistant to Carbon Ion Radiotherapy. **Int. J. Mol. Sci.** 20: 4563, 2019.
13. Shindo T, Hirobe M, Adachi Y, Sasaki Y, Tokino T, Masumori N. Genomic characterization for familial cases with urothelial carcinoma. **Int Cancer Conf J.** 8: 185-89, 2019.

令和元年度 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. 澤田 武、太田 亮介、鈴木 拓、津山 翔、八尾 隆史、中西 宏 佳、山本 英一郎、久保田 英嗣、片岡 洋望、佐々木 泰史、源 利 成. 非乳頭十二指腸腫瘍における DNA メチル化解析. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月, 京都.</p>
	<p>【その他特筆事項】</p>

研究課題		新規解糖系制御解明と癌抑制の探求
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学医学部准教授 近藤祥司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学医学部ポスドク 三河拓己
	所属・職名・氏名	京都大学医学部実験補助 柴田瑛莉
	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>ワールブルグ効果(解糖系亢進)は多くの癌で観察されるが、解糖系阻害剤の治療応用は道半ばである。解糖系を標的とする癌治療では重篤な副作用の危険性がある。この問題の克服には、癌特異的な解糖系代謝制御の深い理解が必要である。我々は、解糖系酵素 PGAM そのもののワールブルグ効果への関与に注目している。PGAM の病態に基づく制御機構を解明すれば、正常細胞での PGAM 活性を温存しつつ、PGAM を標的とした治療開発が可能となる。近年我々は、PGAM の新規結合タンパク(キナーゼ X)との協調作用による解糖系代謝調節という生命現象を見出した。これら基盤データを確立し、新規アプローチ(これら結合阻害)による癌抑制という新たな臨床応用を目指す。</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。) 1000 字以内	<p>PGAM は、解糖系酵素の 10 個の一つでしかない。しかし我々や他グループにより、PGAM の多面的生物学的効果(老化抑制、抗酸化力亢進、ミトコンドリア代謝抑制、解糖系代謝亢進、ペントースホスフェート経路活性化)が報告されている。我々も <i>in vitro</i> で PGAM 強発現による解糖系亢進・ミトコンドリア抑制効果(近藤他 <i>Can Res</i> 2005)を世界初報告したが、我々の心臓特異的 PGAM トランスジェニックマウスでは、ミトコンドリア代謝異常はあるが解糖系代謝は正常(奥田他 <i>PlosONE</i> 2013)で、<i>in vitro</i> データと乖離が見られた。</p> <p>これらの知見より、PGAM による <i>in vivo</i> 生物学的効果の解明には、全身の網羅的解析が必要と考えられ、新たに PGAM-cKO マウスや全身発現型 PGAM-Tg マウスを作成し解析を進め、我々は PGAM-TG マウスが化学発癌プロトコルでの易発癌性を見出した。同様の代謝効果をいくつかの癌細胞株でも確認した。これら <i>in vivo</i> と <i>in vitro</i> の条件を指標に、網羅的な分子探索を行い、新規 PGAM 結合因子としてキナーゼ X 同定に成功した。</p> <p>実際、PGAM とキナーゼ X は免疫沈降法により、その結合が証明された。さらに PGAM とキナーゼ X の共発現や、キナーゼ X 阻害剤による、協調的代謝制御効果も確認された(未発表)。よってその分子メカニズムの解明を目指した。PGAM そのもののプロテインホスホターゼ活性や PGAM 活性は必要ではなく(図 1)、PGAM とキナーゼ X の代謝協調作用が観察された。よって PGAM とキナーゼ X の相互作用は「非酵素」機能と結論した。興味深いことに、PGAM とキナーゼ X の結合は、発癌 Ras 依存性であることが判明した。発癌 Ras 発現により、その結合は増強し、Ras 経路の阻害剤で結合は減弱する。今後更にその分子機能解明を目指す。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 特になし	
	【学会発表】 2019年9月4日 Glycolysis in senescence and metabolites in aging リヨン大学 2019年6月8日 ヒト絶食による代謝シフトの網羅的解析 日本老年医学会、仙台 2019年6月6日 老化の多様性を規定する解糖系代謝恒常性の維持・変容・破綻による病態の解明 第61回日本老年医学会、仙台	
	【その他特筆事項】	

図 1 PGAM 変異と結合

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		スフェア形成法を用いた膵癌幹細胞に有効な薬剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長・石渡俊行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・主任研究員・佐々木紀彦
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌は各種治療法の開発にも関わらず極めて予後の悪い癌で、5年生存率は約8%と30年前とほとんど変わっていない。近年、癌は多様な癌細胞から構成されていることが明らかとなり、多様性を生む主要因として癌幹細胞の存在が注目されている。膵癌において、癌幹細胞が多く含まれるスフェアに幹細胞関連低分子化合物を作用させることで、nestinやSox2などの癌幹細胞マーカーの発現が亢進し、形態的にも細胞膜が平滑な癌細胞へと変化がoccurすることを近年、発見した。本研究では幹細胞関連低分子化合物により、スフェア内に癌幹細胞の性質を持つ膵癌細胞を増加させ、抗癌剤ライブラリーの中からこれらの細胞に有効な薬剤を探索する。	
【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>低接着プレートで癌細胞を培養すると、浮遊細胞塊のスフェアの中に自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞が増加することが知られている。ヒト膵癌培養細胞株のPANC-1細胞を低接着プレートで培養することで、接着状態での培養に比べ癌幹細胞マーカーのOct4, Sox2, nestinなどが増加することが確認された。低真空走査電子顕微鏡を用いてPANC-1細胞のスフェアを観察したところ、構成する癌細胞には細胞膜が平滑な細胞や大きな突起のある細胞、微絨毛様の突起をもつ細胞など多様な癌細胞が存在することが明らかとなった。このスフェアに幹細胞関連低分子化合物を作用させることにより、nestinやSox2などの癌幹細胞マーカーの発現がさらに亢進し、形態的にも細胞膜が平滑な癌細胞へと大部分の細胞が変化した。抗癌剤のGemcitabineや5-FUなどの効果を検討したところ、幹細胞関連低分子化合物を添加した膵癌細胞のスフェアにおいて、殺細胞効果が増強することが明らかとなった。</p> <p>次に、低接着プレートで培養したヒト膵癌培養細胞に、640種類(version 1)および765種類(version 2)のFDA-Approved Drug Libraryの薬剤を投与し、スフェアの形成能を検討した。幹細胞関連低分子化合物を添加したスフェアに100μMの薬剤を投与して4日間培養し、Cell3imager duos (スクリーンホールディング株式会社)にて形成されたスフェアの面積を測定し、薬剤のスフェア形成抑制効果を検討した。2回繰り返し実験を行った結果、114種類についてスフェアの形成が低下し、特に57種類の薬剤において、スフェアの形成を著明に抑制する効果がみられた。さらに濃度を下げた条件で検討し、最終的に8種類の薬剤を候補薬剤とし、それぞれの効果をさらに検討している。</p> <p>今後は、スフェア形成を阻害する候補薬剤によって癌幹細胞が減少しているかを癌幹細胞マーカーで確認するとともに、動物実験も加えて膵癌の癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発を目指す計画である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

研究課題		iPS 細胞とゲノム編集を用いた 効率のよいがん抗原特異的キラーT 細胞の再生
研究代表者	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・教授・縣 保年
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・准教授・寺田 晃士
	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・特任助教・富松 航佑
	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・特任助教・近藤 遼平
	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】	本研究では、京都大学の河本教授らが開発した T-iPS 細胞技術をさらに発展させ、iPS 細胞の内在性 T 細胞受容体 (TCR) 遺伝子座へ、ゲノム編集と Cre/loxP システムによるカセット交換法を用いて、がん抗原特異的な TCR 遺伝子をノックインして、再生 T 細胞を効率よく作製することを目的とした。それにより、ランダムな遺伝子挿入によるがん化を回避するとともに、TCR の高い発現を担保し、活性の高い T 細胞を短期間で効率よく再生することを目指した。	
【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>ゲノム編集を用いた効率のよい TCR 遺伝子の内在性 TCRβ 遺伝子座へのノックイン</p> <p>1) CRISPR/Cas9n を用いた薬剤耐性遺伝子カセットの TCRβ 遺伝子座へのノックイン</p> <p>まず Vβ20-1 遺伝子のプロモーターと Hygromycin 耐性遺伝子、Puromycin 耐性遺伝子-チミジンキナーゼ (TK) 融合遺伝子から構成されるカセットを作製し、その前後に内在性 TCRβ 遺伝子の相同領域を 5', 3' アームとして付加したターゲティングベクターを構築した(図 1)。次に Dβ2 遺伝子上流にニックを導入する CRISPR ガイド RNA と Cas9n を共発現するベクターを構築し、ターゲティングベクターとともに iPS 細胞へ導入する。Hygromycin で選択し、正しい組換えが起きたクローンを得た。</p> <p>2) Cre/loxP による薬剤耐性遺伝子カセットと TCRα/β 融合遺伝子の交換反応</p> <p>がん抗原特異的な TCRα/β 融合遺伝子の前後に lox2272 と loxP 配列を付加したカセット交換ベクターを構築し、Cre 発現ベクターとともに上記の iPS 細胞へ導入した。lox2272 と loxP 配列はそれぞれの間でのみ組換えが起こるため、同様に各配列で挟まれた Hygromycin 耐性遺伝子と、TCRα/β 遺伝子が交換されるとともに、PGK プロモーターの付加により Puro-TK が発現する。iPS 細胞では T 細胞へ分化させないと TCR が発現しないことから、Jurkat 細胞で実験を行い Puromycin で選択しクローンが得られたが、iPS 細胞では得られなかった。そこで PGK プロモーター活性が iPS 細胞では低い可能性が考えられたため、PGK プロモーターを、iPS 細胞で活性が高いことが知られている EF-1α プロモーターと交換したところ、正しくカセット交換されたクローンを得ることができた。</p> <p>3) FLP 組換え酵素による Puro-TK 遺伝子の欠失</p> <p>正しく TCRα/β 遺伝子が導入された iPS 細胞に FLP 発現ベクターを導入し、frit 配列で挟まれた Puro-TK 遺伝子が欠失した細胞をガンシクロビルで選択したのち、T 細胞へと分化誘導させ、高いがん抗原特異的キラー活性を持つことを見出した。以上のようにして、ゲノム編集とカセット交換法を用いて、iPS 細胞からがん抗原特異的キラーT 細胞を効率よく再生する方法の確立に成功した (論文投稿準備中)。</p>	

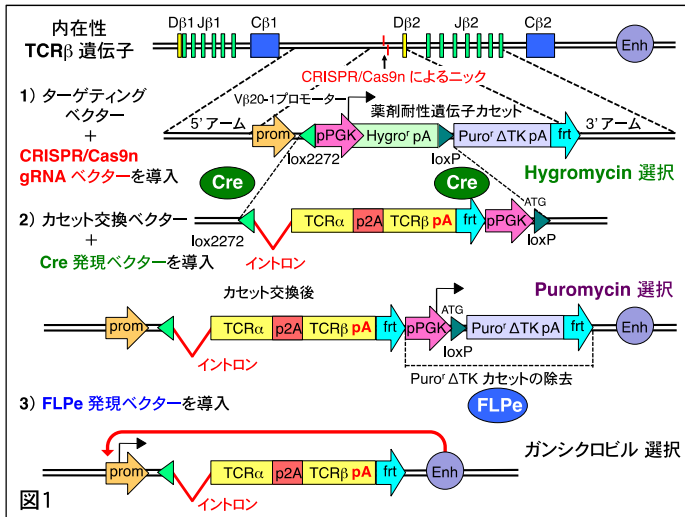


図1

<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kashima S, Maeda T, Masuda K, Nagano S, Inoue T, Takeda M, Kono Y, Kobayashi T, Saito S, Higuchi T, Ichise H, Kobayashi Y, Iwaisako K, Terada K, Agata Y, Nakamura K, Saito M, Narita S, Ogawa O, Habuchi T, Kawamoto H. Cytotoxic T lymphocytes regenerated from iPS cells have therapeutic efficacy in a patient-derived xenograft solid tumor model. iScience 2020 In press. 2. Nagasawa M, Tomimatsu K, Terada K, Kondo K, Miyazaki K, Miyazaki M, Motooka D, Okuzaki D, Yoshida T, Kageyama S, Kawamoto H, Kawauchi A, Agata Y. Long non-coding RNA MANCR is a target of BET bromodomain protein BRD4 and plays a critical role in cellular migration and invasion abilities of prostate cancer. Biochem Biophys Res Commun. 2020 Mar 18 doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.043.
	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 永野誠治、寺田晃士、近藤遼平、縣 保年、増田喬子、河本 宏. Generation of CTLs from iPSCs transduced with TCR genes: development of “TCR cassette” method. 第48回 日本免疫学会総会（2019年12月11-13日、浜松） 2. 寺田晃士、近藤遼平、永野誠治、増田喬子、河本 宏、縣 保年. Development of an efficient method to introduce TCR genes into the endogenous TCR locus by genome editing and cassette exchange. 第48回 日本免疫学会総会（2019年12月11-13日、浜松） 3. 縣 保年. iPS 細胞から再生した T 細胞とカニクイザルを用いたがん免疫療法の開発. 多様な新ニーズに対応する「がん専門医療人材(がんプロフェッショナル)」養成プラン 令和元年度「5 大学連携医療フォーラム」（2019年9月20日、京都）
	<p>【その他特筆事項】</p>

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肺がんの進展に関わるチロシンキナーゼの活性調節機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井宏明
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	教授・矢野聖二
【研究目的】	非小細胞肺がんの分子標的治療が革新的な進歩を遂げ、EGFR や EML4-ALK などの発がん遺伝子産物を標的とした治療戦略が構築されている。しかし、分子標的薬に対する獲得耐性が治療を困難にしている。我々は矢野聖二教授と共同研究を実施し、チロシンキナーゼ型受容体 EphA2 の非定型的活性化機構が肺がんの予後と相関していることを報告している。そこで本共同研究では、EphA2 の非定型的活性化機構の更なる解析を行うとともに、EML4-ALK の活性調節機構の解析を行った。我々の持つ得意分野を融合させ、本共同研究をさらに発展させることを目的にした。	
【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>1. ストレス応答時の EphA2 の非定型的活性化機構の解析</p> <p>これまでに、EGF などの増殖因子や KRAS などの発がん遺伝子シグナルにおいて、ERK 下流のキナーゼ RSK が EphA2 の Ser-897 をリン酸化するシグナル経路を見出し、これが細胞の遊走能を調節していることを明らかにしている。そこで、今年度はストレス応答時の EphA2 の Ser-897 リン酸化について検討した。その結果、タンパク質合成阻害剤アニソマイシンによって Ser-897 リン酸化が誘導された。その上流シグナルを解析した結果、p38 の関与が明らかになった。一方、EGF による Ser-897 リン酸化には p38 は全く関与しておらず、ストレス応答時に特異的なシグナル経路であることがわかった。そこで、p38 の下流シグナルを検討した結果、MAPKAPK2 の関与が明らかになった。さらに、MAPKAPK2 によって RSK が活性化されていることから、p38→MAPKAPK2→RSK 経路が EphA2 の非定型的活性化を誘導していることがわかった。RSK は N 末端キナーゼと C 末端キナーゼの二つのキナーゼドメインを有する特徴的な構造をしている。通常、ERK が C 末端キナーゼを活性化し、分子内で C 末端キナーゼが N 末端キナーゼを活性化し、下流シグナルは N 末端キナーゼが担う。現在、MAPKAPK2 によって RSK がどのように活性化されるのかを検討中である。</p> <p>2. EML4-ALK 発現細胞における RSK-EphA2 経路の活性化</p> <p>我々は以前の共同研究で、EML4-ALK 発現肺がん細胞 H2228 において、ALK チロシンキナーゼを介した RSK-EphA2 経路の活性化が起こっていることを報告している。EGFR 変異肺がん細胞では、EGFR チロシンキナーゼ阻害剤に耐性化する機構として、RSK-EphA2 経路の活性化が起こっていることが報告されている。そこで、矢野教授の研究室で樹立されたクリゾチニブ耐性 EML4-ALK 発現細胞株において、RSK-EphA2 経路が活性化されている可能性を検討した。しかし、RSK-EphA2 経路の活性化は親株に比べてむしろ低下していることがわかった。したがって、EGFR 阻害剤耐性で見られたような RSK-EphA2 経路の過剰な活性化は、今回用いた ALK 阻害剤耐性株では起こっていないと考えられた。一方、親株の A925L-PE3 細胞において、クリゾチニブ処理により EphA2 の細胞内局在が細胞内から細胞膜に変化することがわかった。現在、その再現性を検討している。</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

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

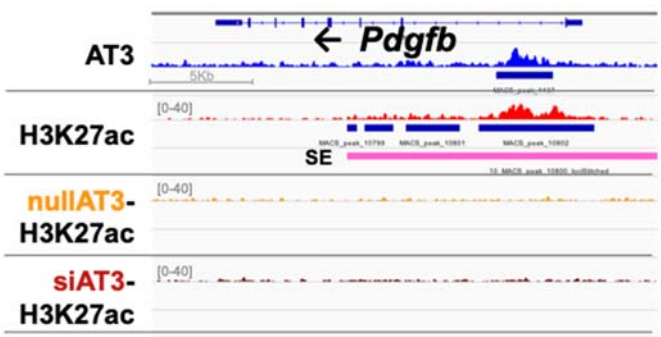
研究課題		炎症性がん微小環境のNK細胞による制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学 和漢医薬学総合研究所・教授・早川芳弘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	本研究計画では、サイトカイン・ケモカインの産生に認められる炎症性腫瘍微小環境のNK細胞による免疫調節メカニズムを明らかにすることを目的とする。特にIL-6の産生亢進にIL-17Aが必須であったことから、これらのサイトカインの炎症シグナルに関わるSTAT3/NF-κB経路に着目して研究を進める。IL-6-STAT3を介したシグナル経路のMDSCの誘導関わる炎症整備小環境の形成における役割を明らかにする。さらにはがん細胞において、転移・浸潤過程に重要なEMTの誘導やMMPsの産生、さらには転移促進に寄与すると考えられる。NK細胞除去マウスで形成されるIL-6の産生増加をはじめとする炎症性腫瘍微小環境が、がん細胞の転移形質獲得に与える影響を解析する。またNK細胞を活性化させる薬剤探索をT-betレポーターアッセイを用いて行う。	
【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>ナチュラルキラー (natural killer: NK) 細胞は、抗腫瘍エフェクター細胞として重要な自然リンパ球として広く認められているが、一方これまで腫瘍局所における炎症性微小環境の成立過程、または維持機構におけるNK細胞の役割については全く知られていない。NK細胞の新たな機能としてがん細胞を直接攻撃するのみならず、がんの悪性化進展に関わる血管新生を、炎症性細胞の好中球の機能制御を介して調節していることを明らかにした。NK細胞の機能低下・不全にともない好中球が血管内皮細胞増殖因子VEGF-Aの産生にみられる悪性化形質を獲得し、血管新生とがん細胞増殖の促進することを明らかにした。加えてNK細胞により制御される炎症性腫瘍微小環境について炎症性サイトカイン・ケモカインの産生についてマルチプレックスアッセイによって網羅的に解析した。その結果、NK細胞を除去したマウスの腫瘍組織ではIL-6、IL-23、IP-10、KC、MCP-1、RANTESといった炎症メディエーターの産生が亢進しており、特にIL-6の産生増幅が顕著に認められた。またこのNK細胞を除去した腫瘍組織で認められるIL-6の産生亢進は、IL-17A欠損マウスでは認められなかった。さらにIL-6は抗腫瘍免疫に対して抑制的に働くMDSCの腫瘍内への浸潤や活性化に重要な役割を担っていることが知られているため、NK細胞除去マウスでの腫瘍内MDSCについてさらに解析を行った。MDSCはGranulocytic-MDSC (G-MDSC)とMonocytic-MDSCs (M-MDSC)の二つのポピュレーションに大別されるが、NK細胞除去マウスでは腫瘍内に浸潤するG-MDSCの占める割合に顕著な増加が認められた。さらにNK細胞除去マウスで見られる炎症性微小環境への順応は、がん細胞において転移・浸潤過程に重要なMMPsの産生亢進、さらには転移を促進する結果を得た。また、NK細胞の活性化に重要な転写因子T-betの活性化を指標としたスクリーニングによって、NK細胞を活性化させる薬剤の同定を試みた。スクリーニングにはT-betのプロモーター部位を組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターを構築し、Jurkat細胞株に遺伝子導入後にシングルセルクローニングを経て樹立したJurkat-T-bet-Luc2細胞を用いた。がん進展制御研究所から供与いただいた化合物ライブラリーを用いてT-bet活性化薬剤候補のスクリーニングし、2つの有望な化合物を同定した。現在この化合物のNK細胞に及ぼす効果を詳細に検討中である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	投稿準備中
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 1. 藤原俊幸、宮里紀穂、早川芳弘. NK細胞のがん転移制御における臓器特異性. 第28回日本がん転移学術集会・総会; 2018 Jun 25-26; 鹿児島. 2. Yoshihiro Hayakawa. Role of NK cells in controlling cancer growth and metastasis. 第78回日本癌学会学術総会; 2018 Sep 26-28; 京都. 3. Yui YAMAMAE, Yuki SHINGURYO, Kiho MIYAZATO, Yoshihiro HAYAKAWA. Identification of novel NK cell activation agent by targeting T-bet. 1st International Symposium on Inflammation Cellular Sociology. 2019 Nov 26-27; Tokyo 4. Yoshihiro Hayakawa. Role of NK cells in controlling cancer growth and metastasis.

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

The 6th ICPAPS and The 3rd ASEAN PharmNET 2019. 2019 Nov 14-15 ; Yogyakarta, Indonesia

【その他特筆事項】

特になし

研究課題		骨軟部肉腫の悪性化における融合型転写因子とクロマチンリモデリングの役割
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・部長・中村卓郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・研究員・田中美和
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	骨軟部肉腫や白血病においては、融合遺伝子がコードする融合型転写因子が、ドライバーオンコジーンとして、がんの発生と悪性化にしばしば大きく関与している。胞巣状軟部肉腫 (ASPS) 原因遺伝子 ASPSCR1-TFE3 もその一つであり、クロマチンリモデリング機構を介して腫瘍発生と転移促進の要因となっていることが予想された。本共同研究では、ASPSCR1-TFE3 による SWI/SNF 複合体の修飾機構を明らかにし、野生型 TFE3 との機能的差異とそこに関与する責任分子を同定する。さらに、クロマチンリモデリングとの平衡が重要とされるヒストン修飾の異常を ASPS において解析し、肉腫の悪性化や転移・浸潤における役割を解明する。	
【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>ASPS のエピゲノムランドスケープ解析を行い、ASPSCR1-TFE3 のグローバルな結合部位を明らかにするとともに、H3K27Ac の集積するスーパーエンハンサーの解析を行った。ASPS 細胞を <i>in vitro</i> で継代培養していると、しばしば ASPSCR1-TFE3 の発現消失が経験されたが、細胞増殖には影響が認められなかった。すなわち、ASPSCR1-TFE3 の発現は <i>in vitro</i> における腫瘍細胞の維持には不要であることが示された。一方、ASPSCR1-TFE3 の発現を失った腫瘍細胞は <i>in vivo</i> における腫瘍形成能を喪失した。ASPSCR1-TFE3 の有無におけるスーパーエンハンサーを比較したところ、Pdgfb 遺伝子座を初めとする複数の領域でスーパーエンハンサーの有意な変動が明らかになった (図)。</p> <p>また、BRD4 阻害薬 JQ-1 を <i>in vivo</i> で投与すると、腫瘍形成能が著しく阻害され、血管形成能が抑制されることがわかった。これらの結果から、ASPSCR1-TFE3 は ASPS の血管新生を促進する機能があり、この機能は ASPSCR1-TFE3 の DNA 結合に伴うスーパーエンハンサーのリプログラミングを介して発揮される可能性が示唆された。</p>  <p>図 ASPS の ChIP-seq 解析:Pdgfb 遺伝子近傍の ASPSCR1-TFE3 (AT3) の結合とスーパーエンハンサー。</p> <p>今後、ASPSCR1-TFE3 の有無で変化するエンハンサーを狙って CRISPR スクリーニングを行い、血管形成の責任となるスーパーエンハンサーとその標的遺伝子を同定して、ASPS の発生活展機序を明らかにする、</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<ol style="list-style-type: none"> Supakul S, Yao K, Ochi H, Shimada T, Hashimoto K, Sunamura S, Mabuchi Y, Tanaka M, Akazawa C, <u>Nakamura T</u>, Okawa A, Takeda S, Sato S. Pericytes as a source of osteogenic cells in bone fracture healing. <i>Int J Mol Sci</i>, 20:1079, 2019. Teramura Y, Yamazaki Y, Tanaka M, Sugiura Y, Takazawa Y, Takeuchi K, Nakayama T, Kaneko T, Musha Y, Funauchi Y, Ae K, Matsumoto S, <u>Nakamura T</u>. Case of mesenchymal tumor with the PPP6R3-USP6 fusion, possible nodular fasciitis with malignant transformation. <i>Pathol Int</i>,

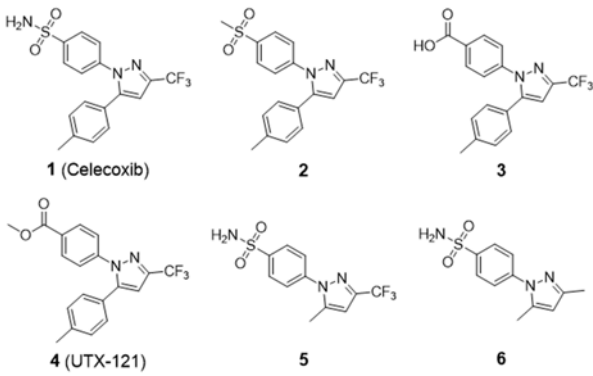
69:706-709, 2019.

3. Tanaka M, Homme M, Yamazaki Y, Ae K, Matsumoto S, Subramanian S, Nakamura T. Cooperation between SS18-SSX1 and miR-214 in synovial sarcoma development and progression. *Cancers*, 12:324, 2020.

【学会発表】

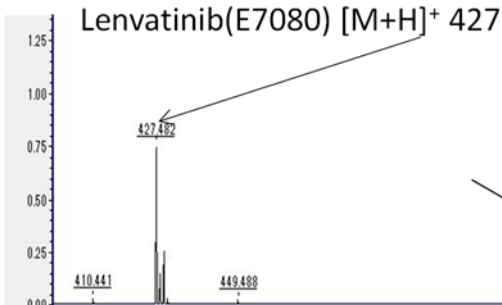
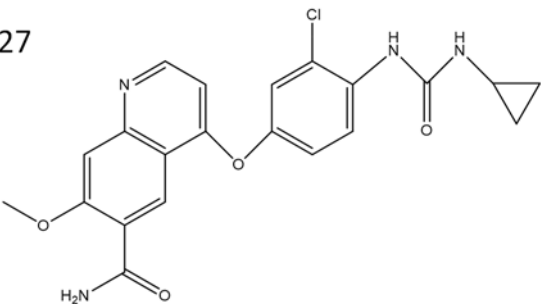
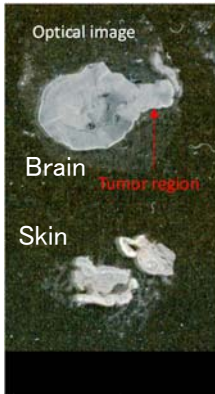
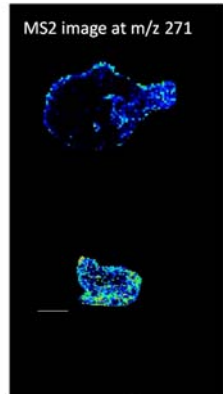
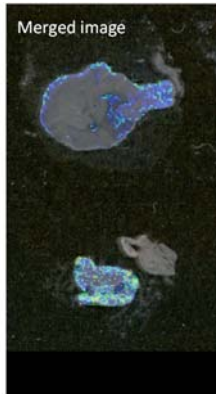
1. Tanaka M, Nakamura T. Enhancer reprogramming by ASPSCR1-TFE3 in alveolar soft part sarcoma. AACR Special Conference on Advances in Pediatric Cancer Research, Motreal, Canada, 2019
2. 中村卓郎 がんの生体内進展機構とクロマチン制御を明らかにするマウスモデル。第78回日本癌学会学術総会 京都、2019
3. 中村卓郎 私たちの肉腫研究 第4回日本肉腫学会・日本臨床肉腫学会合同年次総会 東京、2019
4. 中村卓郎 融合遺伝子陽性骨軟部肉腫：モデル化・病態解析・薬効評価 第15回日本がん分子標的治療学会 TR ワークショップ 東京、2020

【その他特筆事項】

研究課題		COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとする新規抗転移剤の創薬研究
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・山田久嗣
	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・浅田元子
	所属・職名・氏名	徳島大学・M2・山花 啓梨
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫, 准教授・遠藤良夫, 准教授・滝野隆久
【研究目的】	本研究は、代表的非ステロイド性抗炎症薬であり、最近、様々な制がん作用を有することが示されている COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとして、ドラッグデザインの手法を用いて強い抗転移剤を有する新規セレコキシブ誘導体の創製を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>Celecoxib 分子内の特徴的な部分構造であるスルホンアミド基、p-トリル基、トリフルオロメチル基に注目し、図 1 に示す誘導体を設計・合成した。4'-メチルアセトフェノンとエチルトリフルオロ酢酸の Claisen 縮合反応により合成した化合物 7 と、パラ位に種々の官能基を有するフェニルヒドラジン誘導体との環化反応により、誘導体 2 および 3 を得た。誘導体 4 (UTX-121) は、塩化チオニルを用いて誘導体 3 のメチルエステル化を行うことにより合成した。また、トリフルオロアセチルアセトンまたはアセチルアセトンを、それぞれフェニルヒドラジンと反応させて誘導体 5 および 6 を合成した。</p>  <p>図 1. Celecoxib および Celecoxib 誘導体の構造</p> <p>合成した Celecoxib 誘導体の抗腫瘍活性は、HT-1080 (ヒト線維肉腫) 細胞、KKLS (ヒト胃がん) 細胞、B16-F10 (マウス悪性黒色腫) 細胞、MKN-45 (ヒト腺がん) 細胞に各化合物をそれぞれ 0.3 - 200 μM 添加し、WST-8 アッセイにより評価した。その結果、誘導体 2 および UTX-121 は抗腫瘍活性を有することが分かった。次に、抗腫瘍活性が見られた 2 つの誘導体の MMP 阻害活性について、ゼラチンザイモグラフィおよびウェスタンブロッティングにより評価したところ、誘導体 2 は MMP-2 および MMP-9 阻害活性がほとんど見られなかったのに対し、UTX-121 は MMP-9 の産生や MT1-MMP を介した MMP-2 の活性化を強く阻害した。さらに、HT-1080 細胞を用いて創傷治癒アッセイおよび細胞浸潤アッセイを行ったところ、UTX-121 は Celecoxib に比べて癌細胞の遊走・浸潤を強く阻害した。以上の結果より、効果的な抗転移剤の開発におけるリード化合物として UTX-121 の開発に成功した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	・Yamahana H, Takino T, Endo Y, Yamada H, Suzuki T, Uto Y, A novel celecoxib analog UTX-121 inhibits HT1080 cell invasion by modulating membrane-type 1 matrix metalloproteinase, Biochem Biophys Res Commun, 521(1), 137-144, 2020.
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

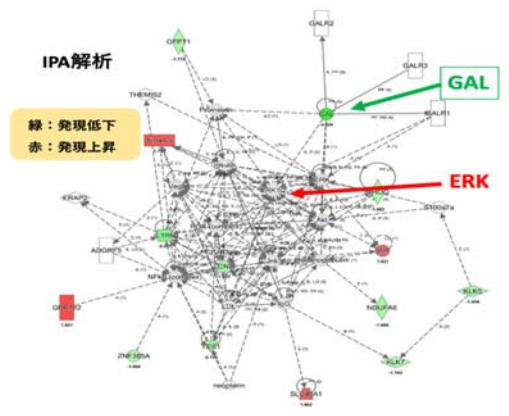
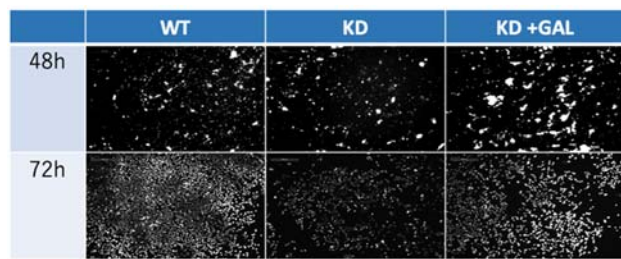
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Heat shock protein、Fam107B の GSK3 β 制御による、がん温熱療法の未説明メカニズムの探求
研究代表者	所属・職名・氏名	埼玉医科大学・特別協力研究員・小泉恵太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	埼玉医科大学／上尾中央総合病院・客員准教授・中島日出夫
	所属・職名・氏名	埼玉医科大学・特別協力研究員・中尾啓子
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本貴寛
	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>がん温熱療法は、化学療法や放射線療法との併用で、抗腫瘍効果を増強させると期待されているが、その分子レベルでの作用機序には未だ不明な点が多い。我々は、これまでの源教授との共同研究から、heat shock protein (hsp) の一種である Fam107B が GSK3 β、Ser9 のリン酸化を介して、大腸がん細胞の細胞遊走を抑制する働きがあることを明らかにした。このことから、Fam107B はがん温熱療法においても、がん進展を抑える重要な働きを持つことが期待される。そこで、本研究では Fam107B のがん温熱療法における役割について探求する。</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>がん温熱療法を想定した HCT-116 細胞への heat shock (HS) では、HS 後 24-30h に GSK3 β、Ser9 のリン酸化が上昇するが (前年度の解析)、HS 刺激後長時間経ってからのリン酸化上昇のメカニズムは不明であった。そこで、HS 後の Fam107B の mRNA 発現を解析したところ、Fam107B は HS 後 12-18h に発現上昇することがわかった。これは hsp90 などに比べ遅い反応であり、mRNA とタンパク発現のタイムラグを考慮すれば、24h から上昇する GSK3 β のリン酸化を説明できる。すなわち、HS 後の Fam107B の発現上昇が GSK3 β、Ser9 のリン酸化を誘導するものと考えられる。</p> <p>次に、HS 後の Fam107B 発現上昇が、細胞遊走に与える影響を検討するため、HCT-116 細胞に HS 刺激と Fam107B の RNAi を同時に行い、Scratch Assay にて細胞遊走を解析した。HS 後 14-38 時間 (Fam107B の mRNA 上昇: 12-18h を考慮) の細胞遊走を観察したところ、Fam107B の RNAi では control に比べ細胞遊走が促進されていた。さらに、GSK3 β との関連性を明らかにするため、同実験条件で、GSK3 β の inhibitor である AR-A014418 を細胞に加え Scratch Assay を行なった。この結果、AR-A014418 を加えた細胞では control、RNAi 双方で細胞遊走の抑制が観察されたが、RNAi による効果は相殺され、control、RNAi 間での違いが見られなくなった。このことから、Fam107B は GSK3 β を介して細胞遊走を抑制することが強く示唆された。</p> <p>次に同じ hsp の一種、hsp90 と Fam107B の関連性について検討するため、上記の実験条件下で、hsp90 の inhibitor である Geldanamycin を加え、HCT-116 の細胞遊走を観察した。この結果、Geldanamycin を加えた細胞では、control、RNAi 双方で細胞遊走抑制が観察されたが、RNAi による効果は相殺され、control、RNAi 間での差が見られなくなった。hsp90 は、がん細胞遊走を促進させるが (J Biol Chem 285: 25458-66)、Fam107B はこれを抑制させていると考えられる。このような遊走抑制効果のある hsp はユニークであり、Fam107B は、がん温熱療法の効果を促進させる新たな分子であると期待される。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【学会発表】 第 28 回日本病態治療研究会 (2019 年 6 月 27,28 日、埼玉県川越市) 日本ハイパーサーミア学会第 36 回大会 (2019 年 9 月 5-7 日埼玉県川越市)</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		イメージング質量分析によるがん転移部位の可視化と診断への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	福島大学農学群食農学類・教授・平修
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	金沢大学がん進展制御研究所・教授・矢野聖二
【研究目的】	イメージング質量分析を用いてこれまで局在解析が困難であった薬剤のような低分子を抗体を用いずにダイレクトにその局在を視覚的に示す。これは、生体内でどのような動態を示すのか、疾患部位でどのような構造で作用するのか、また、その疾患部位周囲の正常組織へ与える影響（副作用）までを網羅的に解析できるため、基礎科学、実学ともに重要な意義を持つ。	
【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>Lenvatinib(E7080)の抗がん剤のMSスペクトルを示す(図3)。その他、Entrectinib(RXDX-101)、Foretinib(GSK1363089)に関してもイオン化を確認できた。これらは、本研究で用いる抗がん剤がイオン化可能であり、イメージング質量分析が行えることを示す基礎データとなった。他、ソラフェニブのイメージングを行い再現性が得られた。</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;">  </div> </div> <p style="text-align: center;">図2 Lenvatinib(E7080)の質量分析スペクトル</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  <p>Optical image Brain Tumor region</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>MS2 image at m/z 271</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Merged image</p> </div> </div> <p>図2 Sorafenibは、皮膚は表皮、腫瘍は腫瘍部位へ局在していることが、MS/MSイメージで示すことができた。今後、さらに高解像度イメージングにおいて詳細な局在場所を明らかにする。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	本研究成果からイメージング技術を高く評価され、JST A-step 育成ステージ(1億円/2.5年)に採択された。

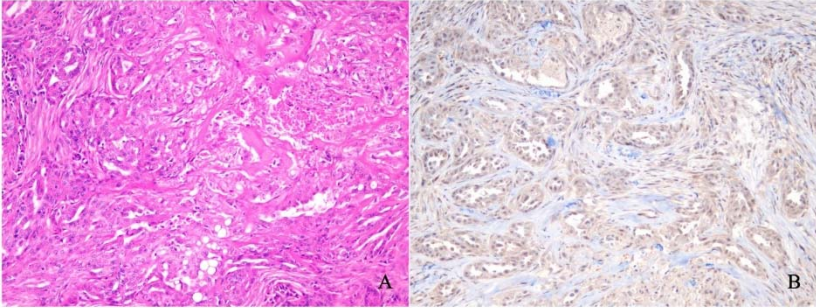
研究課題		樹状細胞サブセットを標的とした抗がん免疫増強の試み
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・講師・佐々木 泉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・教授・改正 恒康
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・特別研究員・折茂 貴是
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学中央内視鏡部・准教授・勝田 将裕
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>がん免疫療法の一つとして、これまでがん抗原ペプチドワクチンを用いた臨床試験が行われてきたが、その効果は限定的であり有効性も乏しい。我々はこれまで、細胞障害性 T 細胞 (CTL) の誘導能が高い抗原提示細胞である樹状細胞(DC)サブセット、特にケモカイン受容体 XCR1 を発現する DC サブセット (XCR1⁺DC) に着目し、その機能的意義の解明を進めてきた。本研究では、XCR1 のリガンドであるケモカイン XCL1 に抗原ペプチドを連結させた融合タンパクを用いて、抗原ペプチドを XCR1⁺DC へ選択的に送達することにより、抗がん免疫の増強を図った。</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>XCR1 のリガンドであるケモカイン XCL1 と、卵白アルブミン (OVA) 由来の OT-I ペプチドを連結させた融合タンパク (XCL1-OT-I) を作成し、XCR1⁺DC への選択的な取り込み、抗原提示能、CTL 誘導能、抗がん効果を検討した。</p> <p>XCL1-OT-I は、XCR1 依存的に XCR1⁺DC に取り込まれ、OT-I の抗原提示を誘導した。また免疫賦活剤 (二本鎖 RNA) と共に投与することにより、XCL1-OT-I は、OVA や OT-I ペプチドよりも強力な抗原特異的細胞障害性 T 細胞の活性化を誘導した。次に、XCL1-OT-I の抗がん効果を、OVA を発現するメラノーマ細胞株を用いて、予防モデル (がん移植前にワクチン投与)、治療モデル (がん移植後にワクチン投与) で検討した。いずれのモデルにおいても、OVA や OT-I ペプチドよりも XCL1-OT-I において顕著な抗がん効果が認められた。さらに、治療モデルにおいて、XCL1-OT-I は、免疫チェックポイント阻害剤 (抗 PD-1 抗体) との併用により、相乗的な抗がん効果を示した。以上の結果から、XCR1⁺DC への選択的送達が、がん免疫として有効であることが明らかとなった (図、Mizumoto et al., Br J cancer, in press)。</p>	
	<p>図. XCR1⁺DCへの選択的抗原送達による抗がん免疫の増強</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Orimo T, Sasaki I (co-first author), Hemmi H, Ozasa T, Fukuda-Ohta Y, Ohta T, Morinaka M, Kitauchi M, Yamaguchi T, Sato Y, Tanaka T, Hoshino K, Katayama KI, Fukuda S, Miyake K, Yamamoto M, Satoh T, Furukawa K, Kuroda E, Ishii KJ, Takeda K, Kaisho T. Cholera toxin B induces interleukine-1β production from resident peritoneal macrophages through the pyrin inflammasome as well as the NLRP3 inflammasome. <i>Int Immunol.</i> 2019 Sep 18;31(10):657-668.</p> <p>2. Mizumoto Y, Hemmi H, Katsuda M, Miyazawa M, Kitahata Y, Miyamoto A, Nakamori M, Ojima T, Matsuda K, Nakamura M, Hayata K, Fukuda-Ohta Y, Sugiyama M, Ohta T, Orimo T, Okura S, Sasaki I, Tamada K, Yamaue H, Kaisho T. Anti-cancer effects of chemokine-direct antigen delivery to a crosspresenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade. <i>Br J Cancer.</i>, in press</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. Sasaki I, Orimo T, Hemmi H, Furukawa K, Kaisho T. Cholera toxin B can induce interleukine-1β production in peritoneal macrophages through the pyrin inflammasome as well as the NLRP3 inflammasome. 第 26 回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム、2019 年 6 月 6~7 日、東京大学伊藤国際学術研究センター</p> <p>2. 佐々木泉、折茂貴是、邊見弘明、古川鋼一、改正恒康、コレラ毒素 B サブユニットは細胞内病原体センサー-NLRP3 と Pyrin を介して炎症性サイトカイン IL-1β の産生を誘導する、第 29 回日本樹状細胞研究会、2019 年 6 月 28 日、ニューウェルシティ出雲</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>第 29 回 (2019 年) 日本樹状細胞研究会 奨励賞受賞</p>	

研究課題		ガラニンによる大腸がん細胞浸潤促進のシグナル伝達機構
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・田代康介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	我々は、術後再発した患者腫瘍と予後良好な患者腫瘍の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、神経ペプチド galanin (GAL) が再発群において高発現していることを見出し、さらに、大腸がん由来細胞株 HCT116 を用いた浸潤アッセイにおいて、GAL は浸潤に関与することを明らかにしている。本研究では、ヒト大腸がん由来細胞の浸潤・転移における GAL の機能、特に、GALR を介したシグナル伝達系の解明及び GAL によって制御される下流遺伝子の特定も含めた浸潤の詳細な経路を明らかにすることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>まず、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 において、GAL 遺伝子を SiRNA 導入によってノックダウン(KD)させた細胞を作製し、マトリゲル浸潤アッセイを用いて、GAL と浸潤能の関連を解析した(図参照)。その結果、GAL をノックダウンすることによって、HCT116 細胞株の浸潤能は低下し、GAL タンパク質添加によって回復することが明らかとなり、GAL の浸潤への関与が明確になった。さらに、細胞増殖や細胞遊走への関与を解析した結果、GAL は細胞増殖には影響しないが、遊走能を増加させることが判明した。</p> <p>次に、GAL によって制御される下流遺伝子の特定するために、GAL 遺伝子を SiRNA 導入によってノックダウン(KD)させた細胞、および、GAL タンパク質添加によって刺激した細胞における遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイ (Agilent 社) によって網羅的に解析したところ、57 遺伝子が 3 倍以上の変動を示した。さらに、これらを IPA (ingenuity pathway analysis) を用いて機能群の分類を行なったところ、GAL のシグナルには、ERK 経路が関与していることが示唆された。</p> <p>本研究により、GAL 遺伝子は細胞の遊走に関与すること、また、そのシグナルは ERK 経路を経ていることが示された。今後、GALR から ERK 経路までのシグナル経路や遊走制御の分子機構を明らかにする予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



研究課題		代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・教授・松田史生
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・教授・清水 浩
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・准教授・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・丸山正晴
	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>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な観点からとらえ直すことによって、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試みる。細胞内の代謝様態を把握するには、がん細胞の代謝経路の流れが様々なコンテキストにおいて、どのように変化するかを網羅的、定量的かつ動的に観察する必要がある。そこで、中心炭素代謝フラックスを定量可能な ^{13}C 代謝フラックス解析法の確立とがん細胞系への適用を行う。とくにがん幹細胞代謝をより、定量的、動的に把握するための解析研究をさらに進める。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>がん幹細胞でおきる代謝リプログラミング、代謝リワイアリングと呼ばれる代謝流量の変化を検出可能な手法を開発した。これまで開発してきた解析法では、細胞を安定同位体標識し、抽出した細胞内代謝中間体の安定同位体標識パターンを質量分析法で測定する。代謝フラックス変化の推定には標識パターンの変化を注意深く読み解く必要がある。</p> <p>本研究ではより詳細な代謝フラックス解析の実現に向け、安定同位体標識パターンを自動的に解析し、代謝リプログラミング情報を可視化する方法の開発を行った。まず、安定同位体標識パターンが観測された条件下での代謝フラックスの事後分布を、メトロポリス-ヘイスティングス法で推定し、2条件間の変化の大きさをコーエンの効果量で定量化する方法を開発した。</p> <p>提案法を用いて、$[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルタミン含有培地で培養した 143B 細胞にメトホルミン処理をした過去の研究例 (Mullen et al. 2011) の有機酸の安定同位体標識パターンを解析した。その結果、既知の結果に加えて、あらたに TCA サイクルフラックス低下など新たな知見を与えることに成功した。今後はこれらの手法を幹細胞系へと展開していく。</p> <p>10 mM Metformin 処理 (143B 細胞) Mullen et al. (2011) Nature 481, 385-388 比較: 143B細胞に5mMメトホルミン処理 標識: 非標識グルコース + $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルタミン</p> <p>Figure 1: Relative abundance of metabolite isotopomers (Fum, Mal, Cit) under DMSO and Metformin treatment. The bar chart shows relative abundance (rel.) on the y-axis (0 to 0.6) and isotopomers (rel.) on the x-axis (m0, m3, m4, m5). For Fum, Mal, and Cit, the m4 isotopomer abundance decreases significantly with Metformin treatment, while the m5 isotopomer abundance increases. The diagram illustrates the metabolic pathway, showing the TCA cycle and related pathways, with Metformin treatment leading to a decrease in Cit m4 and an increase in Cit m5. The diagram also shows the effect of Metformin on the TCA cycle, leading to a decrease in TCA cycle flux.</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Fumio Matsuda, Kousuke Maeda, Nobuyuki Okahashi, Computational data mining method for isotopomer analysis in the quantitative assessment of metabolic reprogramming. Scientific Reports 10, 286 (2020) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 松田史生, 岡橋伸幸 質量分析データから代謝リプログラミング情報を可視化する方法 第 42 回日本分子生物学会年会 2019/12/06 3. 松田史生 ^{13}C-代謝フラックス解析を用いた薬剤耐性代謝アダプテーション機構の解析 第 92 回日本生化学会大会 2019/09/20 <p>【その他特筆事項】 特になし</p>	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトの乳がんモデルの代替であるイヌの乳がん幹細胞培養系を用いたがん悪性化の分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学 獣医病理学研究室・助教・町田雪乃
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学 獣医病理学研究室・准教授・道下正貴
	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学 獣医病理学研究室・学生・石川里奈
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	分子病態研究分野・教授・後藤典子
【研究目的】	<p>愛玩動物としてヒトと長い間共存してきたイヌは、食生活や環境がヒトと類似しており、またヒトで発生の多い乳がん、希少がんに分類される骨肉腫やリンパ腫を発症することからモデル動物としての有用性が着目されている。</p> <p>ミトコンドリア内葉酸代謝酵素の一つである MTHFD2 は、がん細胞の増殖と腫瘍原性能に重要な役割を果たすことが知られているが、その詳細な役割が明らかになっていない。今回、ヒトの乳癌モデルであるイヌの乳腺腫瘍における MTHFD2 の発現検索を行った。</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>イヌの乳腺腫瘍は雌で最も発生頻度が高く、約 50%が悪性である。組織学的に腫瘍性腺上皮細胞のみが増殖する乳腺単純腺腫および単純腺癌(管状乳頭状型、充実性等)に加え、腫瘍性腺上皮細胞および筋上皮細胞がともに増殖する乳腺複合腺腫・腺癌、さらに腫瘍性腺上皮細胞、筋上皮細胞、間葉系細胞(軟骨および骨など)が増殖する混合腫瘍に大別される。</p> <p>MTHFD2 のイヌの乳腺腫瘍における発現を調べるために、免疫染色を実施した。用いた生検材料は、良性腫瘍(複合腺腫 1 例、良性混合腫瘍 1 例)、悪性腫瘍(管状乳頭状乳腺癌 3 例、充実性乳腺癌 3 例、複合型乳腺癌 3 例)であった。MTHFD2 発現は良性腫瘍では陽性(2/2 例)、管状乳頭状乳腺癌では弱陽性(3/3 例、図 1)、充実性乳腺癌では陰性(2/3 例)、弱陽性(1/3 例)、複合腺癌では弱陽性(1/3 例)、陽性(2/3 例)であった。MTHFD2 陽性細胞は、腫瘍性腺上皮細胞、筋上皮細胞および軟骨細胞であり、細胞質ないし核に発現がみられた。また腫瘍間質の線維芽細胞においても陽性を示した。</p> <p>イヌの乳腺腫瘍において MTHFD2 が発現し、がん細胞の代謝に関与している可能性が示唆された。今後、MTHFD2 の乳がん幹細胞における機能解析について研究を進めていく。</p>	
	 <p>図1 管状乳頭状乳腺癌 (A) HE染色、(B)MTHFD2免疫染色</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

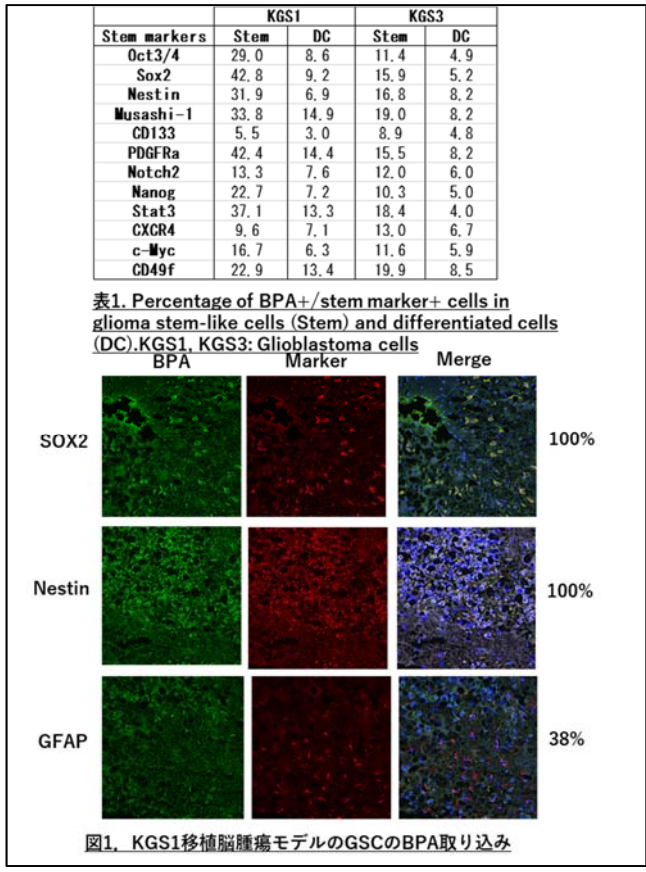
研究課題		固形がんの抗がん剤抵抗性に関わる新たな分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学・准教授・坂本毅治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>がん治療において、分子標的薬の持つ特異性と抗がん剤の持つ汎用性という一見矛盾する特性を持つ治療法の開発が望まれる。我々は MT1-MMP/Mint3 ががん組織特異的に HIF を活性化することを明らかとしてきた。HIF は抗がん剤耐性や幹細胞性に関わる遺伝子の発現を制御することから、MT1-MMP/Mint3 阻害と抗がん剤併用はがん組織特異的な細胞障害が期待される。そこで本研究では、MT1-MMP/Mint3 による HIF 活性化が固形がんの抗がん剤抵抗性にどのように関わるかを明らかにすることで、がん組織標的薬によるターゲティングと抗がん剤による細胞傷害作用を組み合わせた新たな治療法の開発を目指す。本年度は膵癌に着目して研究を行った。</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>まずヒト膵癌細胞株 AsPC1 細胞のマウス同所移植腫瘍組織における HIF-1 の局在を解析した結果、HIF-1 が激しい低酸素領域よりも通常酸素から穏やかな低酸素領域に局在しており、さらに培養下においても、膵癌細胞株 AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 細胞において HIF-1 は通常酸素下でも活性化していることを見出した。これらの知見を元に、通常酸素下での HIF-1 活性化分子 Mint3 が膵癌の悪性形質に関わる可能性を検討した。膵癌細胞株において、Mint3 の発現抑制は通常酸素下での HIF-1 活性を低下させ、p21/p27 タンパク蓄積を伴う細胞増殖抑制を引き起こした。さらなる解析の結果、膵癌細胞において、Mint3 は HIF-1 を介してユビキチンリガーゼ SKP2 の転写を促進していることが明らかとなった。また、この Mint3-HIF-1-SKP2 axis は膵癌細胞の上皮間葉転換、幹細胞形質、化学療法抵抗性を促進した。In vivo においても、Mint3 阻害は同所移植したヒト膵癌細胞 AsPC-1 細胞の腫瘍増殖を抑制し、抗がん剤との併用によりほぼ完全に AsPC-1 腫瘍を抑制した。データベースおよび組織マイクロアレイ解析により、ヒト膵癌組織において Mint3 の発現は SKP2 の発現と正に相関し、Mint3 高発現は膵癌患者の予後不良と相関した。以上より、Mint3 が膵癌悪性形質を抑制するのに有用な標的となる可能性が示された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

研究課題		乳がん幹細胞・乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素の役割
研究代表者	所属・職名・氏名	近畿大学 医学部 生化学教室・助教・古室暁義
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	近畿大学 医学部 生化学教室・教授・岡田 斉
	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】	DNA やヒストンのメチル化といった「エピゲノム制御」が、がん幹細胞や、がん微小環境にどのように影響を及ぼすか不明な点は依然として多い。ヒストン脱メチル化酵素が乳がん発症マウス(MMTV-PyMT マウス)に及ぼす影響を、2 種類のヒストン脱メチル化酵素(Utx, KDM4B)の乳腺組織特異的ノックアウトマウスを用いて検討する。乳がんの発症・増殖・転移の各段階において、個体レベルで悪性化への影響(発症、腫瘍増殖、転移、がん幹細胞やがん微小環境に違いがあるのか)を明らかにする。さらに、乳がん悪性化に関与するメカニズムや因子を同定・阻害により治療効果の検討を行う。	
【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>Utx 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (Utx KO; PyMT マウス) では腫瘍増殖や肺転移が促進している結果を得た。Utx KO; PyMT マウス由来の乳がんオルガノイドを樹立して、遺伝子発現や FACS 解析を行ったところ、Basal type の細胞が増えていることが分かった。そして、この乳がんオルガノイドを I 型コラーゲン内に包埋すると浸潤性を強く伴いながら増殖した。さらに、この浸潤性は HDAC 阻害剤で抑制され、BET 阻害剤である JQ1 で完全に阻害された。</p> <p>そこで I 型コラーゲン内の浸潤形態を示す Utx KO; PyMT マウス由来の乳がんオルガノイドや JQ1 で浸潤形態を阻害された乳がんオルガノイドにおいて RNA-Seq を行った。その結果、RNA-Seq の発現解析から EMT や、幹細胞マーカーである Sca1、がんの悪性化にかかわる様々な因子についての関与が明らかになった。</p> <div style="text-align: center;"> <p>Utx を乳腺組織特異的に欠損させた乳がん発症マウス</p> <p>乳がんオルガノイド</p> <p>Type I コラーゲンに包埋</p> <p>コントロール (浸潤性あり)</p> <p>JQ1 処理 (浸潤性が抑制された。)</p> </div> <p>一方、KDM4B 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (KDM4B; PyMT マウス) では腫瘍増殖が抑制される結果を得た。さらに、この乳がんオルガノイドは、I 型コラーゲン内での浸潤性が抑制されており、Sca1 強陽性細胞の出現率も減少していた。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. High fat diet triggers a reduction in body fat mass in female mice deficient for Utx demethylase. Ota K, Komuro A, Amano H, Kanai A, Ge K, Ueda T, Okada H. Scientific Reports. 9(1) 10036. (2019)</p> <p>【学会発表】</p> <p>第 23 回 日本がん分子標的治療学会学術集会 第 78 回 日本癌学会学術総会</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		消化器がんにおける特異的スプライシング変異体を標的とする新規診断法と治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・検査部部長・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	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・北村浩一
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・小林嵩平
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・田中信子
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>FIR (FBP-interacting repressor) は <i>c-myc</i> 遺伝子転写抑制因子として知られており PUF60 (poly (U)-binding splicing factor 60) の exon5 が欠失するスプライシング変異体である。FIR ファミリーは相互作用するタンパク質によって作用が異なることから多機能分子として考えられる。このように多くの癌細胞にみられる一方、正常細胞にはほとんど観察されないスプライシング変異による FIRs は、がんの診断治療の良い分子標的である。本研究では、FIRΔexon2 を選択的に阻害する低分子化合物の同定と癌治療薬の開発を目的とする。さらに、FIRΔexon2 に対する特異的な自己抗体を検出する ELISA 系の開発を行う。</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>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、FIRΔexon2 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 FIRΔexon2 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した。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。以上により、種々の癌患者血清中における抗 FIR Δexon2 自己抗体の存在を調べる。今後、抗 FIR/FIR Δexon2 自己抗体の ELISA による迅速かつ正確な検出系の確立を目指し、抗 FIR/FIR Δexon2 自己抗体の診断応用を目指した。</p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 70%;"> <p style="text-align: center;">FIR/FIRΔexon2検出のためのサンドイッチELISAのデザイン</p> <p>方法1: 抗FIRΔexon2抗体がFIRΔexon2に結合する。</p> <p>方法2: 抗FIR抗体がFIRに結合する。</p> <p>方法3: 抗FBW7抗体がFBW7とFIRΔexon2に結合する。</p> <p>方法4: 抗FIRΔexon2抗体がFIRΔexon2とFIRΔexon2結合ペプチドに結合する。</p> <p>方法5: 抗FIR抗体がFIRとFIR結合ペプチドに結合する。</p> </div> <div style="width: 28%;"> <p>これまでに行った基礎検討では、精製された FIR Δexon2 (513 アミノ酸) の全長タンパク質を抗原とした (星野ら)。事前に文書による同意を得た大腸癌患者あるいは健康者 (コントロール) 血清を用いて、FIR Δexon2 に対する自己抗体が存在するかをドットプロットにより調べた。既存の血清腫瘍マーカー (CEA, CA19-9) も同検体で測定し、抗 FIRΔexon2 自己抗体との比較を行った。大腸癌患者血清中には抗 FIRΔexon2 自己抗体が術前の陽性率は 34%程度と比較的高い頻度で認められた。また、大腸癌患者血清の術後において抗 FIRΔexon2 自己抗体は有意に低下を示した (p<0.01)。既存の血清腫瘍マーカーである TP53,CEA,CA19-9 では検出されなかった大腸癌患者血清において抗 FIRΔexon2 自己抗体が検出された。さらに ROC (Receiver</p> </div> </div>		

	<p>operating characteristic) 曲線で解析した結果、AUC=0.97 と良好であった。今後は、実臨床で応用可能な ELISA キットの開発を目標とする。</p>
<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】 Ailiken G, Kitamura K, <u>Hoshino T</u>, Satoh M, <u>Tanaka N</u>, <u>Minamoto T</u>, Rahmutulla B, <u>Kobayashi S</u>, Kano M, Tanaka T, Kaneda A, Nomura F, Matsubara H, <u>Matsushita K</u>. Post-transcriptional regulation of BRG1 by FIRΔexon2 in gastric cancer. <i>Oncogenesis</i>. 2020 Feb 18;9(2):26. doi: 10.1038/s41389-020-0205-4. FIR の機能解析を行った研究成果。</p> <p><u>Kobayashi S</u>, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, <u>Hoshino T</u>, <u>Minamoto T</u>, Shimada H, Nomura F, Matsubara H and <u>Matsushita K</u>. Anti-FIRΔexon2, a splicing variant form of PUF60, auto-antibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma. <i>Cancer Sci</i>. 2019 Jun;110(6):2004-2013.</p> <p>食道がんにおいて抗FIRΔexon2自己抗体が検出された報告。</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>

研究課題		腫瘍微小環境がもたらす悪性グリオーマの BNCT 抵抗性の機序解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・助教・近藤夏子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	秋田大学・教授・疋田正喜
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・中田光俊
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	悪性神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も多く、手術・放射線・化学療法を行っても生命予後が 14.6 か月程度と極めて予後の悪いがんである。免疫治療も効果はみられていない。これまで我々は悪性神経膠腫に対する中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を行い、予後を延長してきた。BNCT では、ホウ素薬剤 Boronophenylalanine (BPA)を投与し、熱中性子線を照射する。BPA はアミノ酸トランスポーターLAT1 によって取り込まれ、アミノ酸代謝の亢進した腫瘍細胞に正常細胞と比べより多く取り込まれる。BPA 中の ¹⁰ B に熱中性子を照射すると、極短飛程の α 粒子と Li 原子核の高 Linear Energy Transfer (LET)放射線が発生し、腫瘍細胞がより選択的に死滅する。本研究では BPA が治療抵抗性である Glioma stem cell (GSC) に取り込まれるか検討した。	
【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>【方法】 (<i>in vitro</i>) グリオブラストーマの患者から樹立した 2 種の GSC(KGS1, KGS3)を用いた。これらの細胞は樹立時から幹細胞培地で維持している(Stem と表記)。この細胞にウシ血清を最終濃度 10 %で添加し分化を誘導した(Differentiated cells: DC と表記)。Stem、DC にそれぞれ BPA を治療血中濃度と同じ 25 ppm で培地に添加し 24 時間暴露した。その後、金属標識した抗体でラベルし、マウスサイトメーターで BPA の取り込みを調べた。用いた抗体を以下に記載する。GSC マーカー:CD133 (156Gd) CD15 (144Nd), CD171 (147Sm), CD126 (149Sm), CD144 (154Sm), PDGFRα (160Gd), CD49f (164Dy), Notch2 (165Ho), CD44 (166Er), EGFR (170Er), CD184 (175Lu), Oct3/4 (146Nd), Sox2 (150Nd), Nestin (151Eu), Musashi-1 (155Gd), Nanog (169Tm), Stat3 (173Yb), c-Myc (176Yb)、BPA の取り込み: BPA (171Yb)。(<i>in vivo</i>) KGS1 をヌードマウスの脳に 10 万個移植し神経学的兆候が表れたときに BPA を 500 mg/kg 皮下投与し 2 時間後、PBS で灌流、4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定し脳を摘出し -80 °C で凍結保存した。クライオスタットで薄切片免疫組織染色を行った。10 %ヤギ血清、1 %bovine serum albumin、F(ab) fragment マウス IgG(H+L)抗体を用いてブロッキングを行った。用いた抗体を以下に記載する。1 次抗体、GSC マーカー:Nestin, SOX2 抗体、BPA 取り込み: BPA 抗体、分化マーカー: GFAP 抗体。2 次抗体は Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594 を用いた。核は DAPI で染色した。</p> <p>【結果】 (<i>in vitro</i>) KGS1, KGS3 とともに Stem の方が DC に比べて BPA+/Stem+の細胞の割合 (%) が 2 ~4 倍多かった(表 1)。(<i>in vivo</i>) KGS1 をヌードマウスに移植した脳腫瘍モデルマウスの GSC マーカー(SOX2、Nestin) 陽性細胞が 100% BPA 陽性であるのに対し、グリア細胞(GFAP) 陽性分化細胞は 38%程度であることを発見した(図 1)。すなわち、BNCT では GSC が BPA を取り込み、治療の標的になっているということが分かった。</p> <p>【考察】 再発する原因が何なのか、現在、照射前後の Stem と DC の腫瘍に占める割合の変化や、BPA を腫瘍関連マクロファージなどが取り込むか否か、を追跡している。</p>	



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 未発表。現在投稿中。
	【学会発表】 10th Young Researchers BNCT Meeting 2019年9月27日 ‘Take up of Boronophenylalanine by glioma stem like cells in vitro and vivo’
	【その他特筆事項】

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		パイロトーシス誘導剤および阻害剤の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・主任研究員・袖岡幹子
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・専任研究員・闔闔孝介
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	<p>パイロトーシスはカスパーゼ 1、4、5、11 などによって誘導される炎症誘導性のプログラム細胞死であり、細菌などに感染したマクロファージの細胞死様式として見出された。最近の研究でがん細胞にもパイロトーシスを誘導しうることが明らかにされており、炎症性のがん細胞死はがん免疫の活性化に寄与すると考えられている。一方、がん組織におけるパイロトーシスは炎症性のがん微小環境を形成し、がんの増殖や浸潤、転移などに寄与する可能性も考えられている。従って、パイロトーシスをコントロールする薬剤は抗がん剤リードとして期待される。そこで本研究では、パイロトーシスの誘導剤および阻害剤を開発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>パイロトーシスを誘導ないしは阻害する化合物を探索するために、NLRC4 の CARD ドメインと NOD2 のリガンド結合ドメイン・オリゴマー形成ドメインを融合させた C12N2 レセプターを発現させた NOMO-1 細胞 (T. Suda et al, <i>J. Biol. Chem.</i>, 2011, 286, 33963-72) を用いてスクリーニングを行った。すでに共同研究者である須田らは本実験系でカテプシン B 阻害剤として知られる CA-074Me がパイロトーシスを阻害することを報告している。</p> <p>一方で我々は acyloxymethyl ketone (AOMK) という官能基を持つカテプシン B 阻害剤をプローブ化し、独自に開発したケミカルバイオロジー手法と組み合わせることで、この阻害剤がカテプシン B の触媒部位に存在するシステイン残基と選択的に共有結合を形成することを明らかにしている (M. Sodeoka et al, <i>J. Am. Chem. Soc.</i>, 2016, <i>138</i>, 13901-13910)。そこで同じカテプシン B 阻害剤から新しいパイロトーシス阻害剤を見出すことを狙い、我々が保有する類縁のカテプシン B 阻害剤のパイロトーシス阻害活性を NOMO-1 細胞を用いて評価したところ、パイロトーシス阻害活性を有する誘導体を見出すことに成功した。</p> <p>さらに見出された誘導体をプローブ化し、その結合蛋白質を検討したところ、確かに細胞内のカテプシン B に結合していることが確認できた。そこでカテプシン B がパイロトーシスに必須かどうかを確認すべく、共同研究者である須田らがカテプシン B ノックアウト NOMO-1 細胞を作製し、そのパイロトーシス誘導能を確認したところ、カテプシン B が存在しなくてもパイロトーシスが同様に誘導されること、またパイロトーシス阻害剤が同様に阻害活性を示すことが明らかとなった。</p> <p>以上の結果より、本研究ではカテプシン B 阻害剤の類縁化合物より新たなパイロトーシス阻害剤を見出し、これがカテプシン B とは異なるターゲットを介してパイロトーシスを阻害することを明らかにした。現在カテプシン B 以外の結合蛋白質の同定を進めており、新しい標的分子の発見を目指して研究を進めている。</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

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん由来の液性因子による個体生理変容のメカニズムに関する統合的研究
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所・特定准教授・河岡 慎平
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 ウイルス・再生医科学研究所・特定研究員・北條 広朗
	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>本研究の目的は、がんが分泌する液性因子（ケモカインや炎症性サイトカイン）による個体生理変容のメカニズムを、がん微小環境とマクロ環境の相互作用という観点から明らかにすることである。がんは、ケモカインや炎症性サイトカインなどの液性因子を分泌することで、個体にさまざまな変容をひきおこす。がん微小環境の形成や、マクロな代謝障害であるがん悪液質がその代表例である。これまでは、それぞれの変容についての研究は独立しておこなわれる傾向にあり、その相互作用についての知見は限られていた。これらの変容の全体像を明らかにし、変容を適切に制御することができれば、個体生理の正常化に基づいた新しいがん医療の発展へとつながる可能性があると考えている。</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>本年度は、がんマクロ環境・微小環境に関わる宿主要因に対して作用する液性因子を同定し、それぞれの変容における液性因子の機能を明らかにする実験を計画した。着目する液性因子を欠失あるいは過剰に発現させたがん細胞株と、特定の変容に関わる宿主要因を改変したマウスを組み合わせることで、それぞれの変容における当該液性因子の機能を明らかにできると考えた。</p> <p>2019年度の共同研究において、向田教授との議論を重ねた結果、マクロ環境変容に関わる有望な因子としてインターロイキン 10 (IL-10) をリストアップした。IL-10 は、マウス Colon26 大腸がんモデルにおいて、代表的なマクロ変容であるがん悪液質の誘導を抑制するサイトカインである (Fujiki, Mukaida et al., <i>Cancer Res.</i>, 1997)。Colon26 に IL-10 を過剰発現させ、マウスに移植すると、野生型の Colon26 と比較して、がん悪液質の表現型が抑制されることが示唆されている。</p> <p>IL-10 の過剰発現がなぜがん悪液質を抑制するのか、その正確なメカニズムは不明である。そこで、申請者が得意とする多階層オミクス解析により、IL-10 ががんマクロ環境・微小環境にあたる影響を明らかにする実験を開始した。野生型 Colon26 を移植した個体と IL-10 を過剰発現する Colon26 (向田教授より分与いただいた) を移植した個体を比較することで、IL-10 により抑制される変容を解明すべく、これまでに得た大規模データに基づく遺伝子発現解析をおこなっている。今後は、これまでに作出したがん微小環境あるいはマクロ環境改変マウスに対して同様の実験をおこない、IL-10 と特定の環境の関係性を明らかにしたい。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Hojo MA, Masuda K, Hojo H, Nagahata Y, Yasuda K, Ohara D, Takeuchi Y, Hirota K, Suzuki Y, Kawamoto H, and *<u>Kawaoka S</u>. Identification of a genomic enhancer that enforces proper apoptosis induction in thymic negative selection. <i>Nature Communications</i> 2019; 10: 2603.</p>	

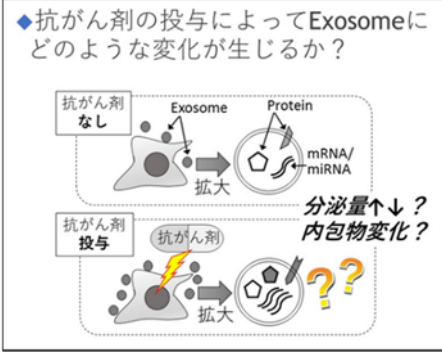
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	【学会発表】 河岡 慎平 “がんが個体に悪影響を与える仕組み：がん悪液質（Cachexia）の解明” 第40回 阿蘇シンポジウム「がん、免疫、感染症研究のフロントライン」2019年7月26日
	【その他特筆事項】

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		HGF-Met 系シグナル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・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】	HGF は再生や保護を担う生理活性タンパク質であり、HGF を投与・補充して Met 受容体を活性化することが、肝硬変などの疾患の治癒・改善につながる。一方、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。本研究では、①HGF と Met の結合を阻害する物質の探索、さらに② Met の KD 両端領域 (JM 及び CT) が担うアロステリック活性制御機構を構造生物学の視点から解き明かし、細胞内外で作用する低分子アゴニスト及びアンタゴニストの創出に向けた論理基盤を構築する。	
【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>① 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。これまでにリード化合物と HGF-β 鎖の結合様式の詳細を知るために、HGF/k4-β 鎖と阻害剤との複合体 X 線結晶構造解析を進めているが、全構造解析には至っていない。そこで、これに加えて、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) プラットフォーム機能最適化ユニットから阪大蛋白質研究所・高木研究室の支援を受けながら、高分解解析が期待される抗体との複合体について結晶化検討を行ったところ、微結晶を得ることに成功した。さらに、解析レベルの結晶を得るために結晶化条件の最適化を行っている。また、結晶に化合物を浸漬する方法について検討を重ねている。</p> <p>② X 線結晶構造解析及び生化学実験を行い、KD の両端領域 (膜近傍領域 (JM) 及び C 末端領域 (CT)) の 4 ヲ所のリン酸化分子スイッチが関与する、Met のアロステリック活性制御機構を解明する。この機構を効果的かつ選択的に制御する方法を見出し、低コストかつ高選択性 Met 亢進薬及び阻害薬の創出を目指す。Met 細胞内全長 (JM-KD-CT) 及びキナーゼドメイン (KD) について、大腸菌系の大量調製及び高純度精製プロトコールを構築した。ペプチド基質を用いた ELISA 法により、JM 領域の配列を有する合成リン酸化ペプチドが KD の活性を濃度依存的に阻害することがわかった。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. T. Matsumoto, A. Yamano, Y. Murakawa, H. Fukada, M. Sawa, <u>T. Kinoshita</u>, Ensemble structural analyses depict the regulatory mechanism of non-phosphorylated human MAP2K4, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> 521 (2020), 106-112. 2. N. Furuya, T. Momose, K. Katsuno, N. Fushimi, H. Muranaka, C. Handa, M. Sawa, T. Ozawa, <u>T. Kinoshita</u>, An isoform-selective inhibitor of tropomyosin receptor kinase A behaves as molecular glue, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 30 (2020), 126775. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 木下誉富、X線結晶構造を利用したインシリコ創薬-キナーゼのアロステリック制御薬の創製-、測定技術交流会 (夏合宿 2019) AMED/BINDS 構造解析領域 (2019 年) 2. 木下誉富、創薬標的タンパク質の中性子線結晶構造解析、CBI 学会 2019 年大会フォーカストセッション創薬に貢献する中性子の現状と今後 (2019 年) <p>【その他特筆事項】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>T. Kinoshita</u>, Chapter 3. Protein allostery in rational drug design, <i>Protein allostery in drug design</i>, Springer-Nature (2019), 45-64. 	

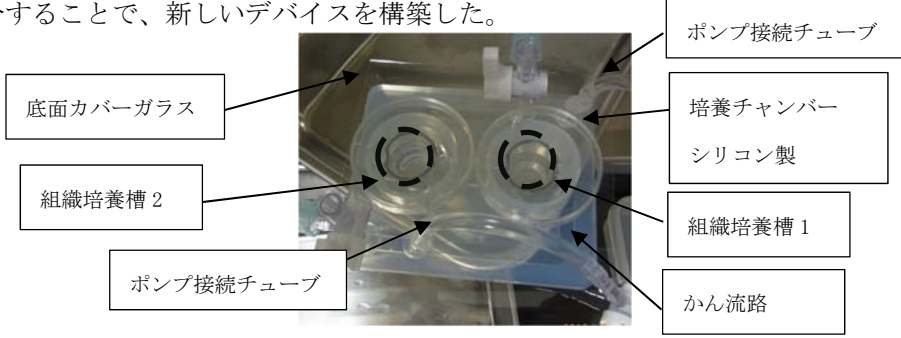
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		癌細胞エクソソームの分子病態解明による新規がん治療法の開発
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】	がん細胞が分泌するエクソソームは、タンパク質、脂質、および核酸を含んでおり、がん細胞の状況が反映されていることから、そのエクソソームを取りこんだ細胞に影響を与えることができる。エクソソームに関する様々な研究が行われているが、正常細胞、がん細胞、抗がん剤耐性細胞では、エクソソーム動態にどのような違いがあるか、抗がん剤に対するエクソソームの反応の違いなど、基本的なことは明らかにされていない。本研究では、抗がん剤によるがん細胞のエクソソーム分子機構への影響について解析を行うことにより、新たながん治療法への一助とする。	
【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>◆抗がん剤の投与によってExosomeにどのような変化が生じるか？</p>  <p>我々は、難治性がんの代表である膵がん培養細胞、正常膵管上皮細胞が分泌するエクソソームに関して、抗がん剤の影響とその影響を受けた細胞が、周囲へどのような影響を及ぼすかを明らかにする。これまで低濃度 (IC80) の GEM にてエクソソームの分泌量が増加することを見出していたため、共培養した隣の細胞内への取り込み動態について検討を行った。</p> <p>方法：ヒト膵がん培養細胞と正常膵管上皮細胞を対象に、抗がん剤 (Gemcitabine (GEM) or 5FU) によるエクソソーム分泌量変化を、微粒子数測定装置 NanoSight を用いて検討し、共培養容器及びヒト膵癌 CD63-GFP 融合蛋白産生細胞 (e-PANC-1) を用いて、エクソソーム分泌量の増加が、共培養した細胞での取り込み量増加につながるか否かについて検討した。結果：膵がん細胞では GEM 投与により、細胞内とメディウム中のエクソソームマーカータンパク質 (CD63/CD9) の発現は増加し、メディウム中のエクソソーム数も増加した。その一方正常膵管上皮細胞では、細胞内に CD63/CD9 の発現を認めず、抗がん剤による変化も認めなかった。また e-PANC1 と正常膵管上皮細胞との共培養あるいは、e-PANC1 細胞同士の共培養系において、GEM により、エクソソームの取り込み数の増加を認めた。</p> <p>考察と結論：がん細胞は、抗がん剤 GEM により、がん細胞が分泌するエクソソームの量の変化は、そのまま周囲の細胞が取り込むエクソソーム数の増加につながるということが明らかとなった。さらに、その取り込み量については、細胞腫により異なっていた。これらの特性は、抗がん剤抵抗性と関係する可能性があり、膵がん治療に際し、がん細胞のエクソソームの反応及びそのエクソソームの取り込みによる影響を考慮した治療戦略が必要である。</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. 島崎猛夫、源利成ら. Analysis of intracellular dynamics of exosomes and changes of surface marker. 国際細胞外小胞学会 (2019/04/24) 2. 島崎猛夫、源利成ら. 膵がん細胞の抗がん剤によるエクソソーム動態変化の解析. 第 50 回日本膵臓学会大会 (2019/07/11) 3. 島崎猛夫、源利成ら. 抗がん剤ゲムシタピンによる膵がん細胞のエクソソーム分泌及びエクソソーム表面マーカーへの影響. 第 78 回日本癌学会学術総会 (2019/09/25) 4. 島崎猛夫、源利成ら. 膵癌細胞エクソソームの抗がん剤による動態変化. 第 6 回日本細胞外小胞学会学術集会 (2019/10/23) 5. 島崎猛夫、源利成ら. 膵癌細胞エクソソームの抗がん剤による動態変化とその生物学的意義. 第 30 回日本消化器癌発生学会総会 (2019/11/06) <p>【その他特筆事項】</p>	

令和元年度 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 が制御する肝実質細胞の代謝経路解析
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>がん抑制遺伝子 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、逆遺伝学的手法で 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。例えば、非増殖細胞の代表例としてよく知られている神経細胞は、S 期進行後に細胞死を起こし、増殖細胞の代表例としてよく知られている肝実質細胞は、S 期進行後に細胞分裂すると考えられている。研究代表者はこれまで神経細胞における Rb とそのファミリー遺伝子の役割と、急性不活化後の表現型について詳細に解明してきたが、肝実質細胞での急性不活化後の表現型はほとんど明らかになっていない。そこで本研究では、初代培養肝細胞を用いて、Rb ファミリー急性不活化後の表現型を明らかにし、代謝経路との関連性も明らかにする。</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>昨年度までの研究において、Rb ファミリーを急性不活化した初代培養肝細胞は細胞周期を S 期へと進めるものの、細胞分裂をせずに細胞死を起こすことが明らかとなった。そこで本年度は、生体内で肝実質細胞が細胞分裂する条件、すなわち部分肝切除後に肝実質細胞を単離し、Rb ファミリー急性不活化後の表現型を検討した。具体的には、7-9 週齢 Rb-TKO (<i>RbLox/Lox; p107^{-/-}; p130Lox/Lox</i>) マウスの肝臓を 70%切除し、術後 3 日後にコラゲナーゼ灌流法で肝実質細胞を単離して培養した。なお、対照群にはヘテロマウス (<i>RbLox/+; p107^{+/-}; p130Lox/+</i>) を用いた。培養 24 時間後に、市販の遺伝子導入試薬 TransIT-LT1 を用いて Cre 発現プラスミドと Cre レポーター GFP 発現プラスミドを遺伝子導入し、遺伝子導入 96 時間後に固定して免疫染色を行った。なお、固定 24 時間前から、チミジンアナログの EdU を培養液に添加し、S 期進行の指標として EdU 染色、M 期進行の指標として抗リン酸化ヒストン (pH3) 抗体染色、細胞死の指標として抗活性化型 caspase 3 (AC3) 抗体染色で評価した。部分肝切除した場合、Rb ファミリー欠損群で EdU および pH3 陽性細胞の割合が顕著に増加していたが、AC3 陽性細胞の割合は対照群と同程度であった。これらの結果から、Rb ファミリーの急性不活化により、部分肝切除後の成熟肝実質細胞は細胞周期を進め分裂することが示唆された。今後は、分裂せずに細胞死を起こす非肝切除群と分裂する肝切除群を比較し、「文脈特異性」のメカニズムを明らかにする。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	<p>Ajioka I. Cell Cycle Dysregulation: Understanding Neuropathology of Degeneration and Tumor. XXXVII Annual Meeting of Indian Academy of Neurosciences. 2019.11.20 ニューデリー (インド)</p> <p>味岡 逸樹. 血管環境を制御する分子技術と損傷脳再生への応用. Neuro2019 (第 42 回日本神経科学大会・第 62 回日本神経化学学会大会) 2019.7.28 新潟</p>
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		組織工学技術を応用した <i>in vitro</i> がん転移モデル構築研究
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学先端生命医科学研究所 助教 関谷佐智子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 松本邦夫
【研究目的】	<p>近年、がん転移メカニズムはがん細胞の周辺細胞の関与が考慮されており、ヒト細胞を用いた生体に近いモデルが求められている。本研究では血管内皮細胞の網状構造を持つヒト腎3次元組織に対し、かん流培養系技術を応用、がん細胞の移植による転移モデル構築に着想した。現在までに①生体外3次元腎組織への移植がん細胞の少数検出の限界②がん細胞移植法と還流培養液の課題③還流装置における非特異的吸着の課題の洗い出しと対策を行い、プロトタイプ転移モデル構築まで至っている。本年度はがん原発巣からのかん流経路へのがん細胞流出における <u>HGF-Met</u> 系の役割を探索するため、かん流路流出がん細胞の性質を明確化することを目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本年度は、①リアルタイム観察対応のデバイス改良および、かん流培養により、②3次元組織から流出したがん細胞の性質解析を行った。</p> <p>① プロトタイプ転移モデルのリアルタイム観察可能なデバイスへの変更を行い、底面がカバーガラス、チャンバー部分を気体の透過性の高いシリコン製にて作製し、プラズマ処理にて接合することで、新しいデバイスを構築した。</p> <div style="text-align: center;">  </div> <p>また、</p> <p>② 流路内に検出・回収されたがん細胞の性質を解析したところ、mRNA 発現解析により CD44 およびフィブロネクチンの発現が著しく上昇する、接着能力の低い細胞が検出された。今後は、転移のリアルタイム検出を目指し、転移の異なる GFP 陽性がん細胞 (松本研作製株) の移植を行い、移植細胞周囲の組織の変化を解析することで、がん転移における3次元組織内の変化と、血管構造の変化を解析する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Sekiya S, Kikuchi T., Shimizu T., 「Perfusion culture maintained with an air-liquid interface to stimulate epithelial cell organization in renal organoids <i>in vitro</i> 」, BMC Biomedical Engineering 2019 1-12
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞制御における代謝システムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学 先端科学技術研究センター・特任准教授・大澤 毅
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>癌の増殖と転移には腫瘍微小環境や血管新生が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを見だし報告してきた。低酸素・低栄養で生存する癌細胞は、癌幹細胞の維持を促進し悪性化に寄与することが示唆されるが、その詳細な“代謝システム機構”は不明である。本研究は、がん悪性化における“代謝と栄養シグナル”がどのようにがん幹細胞維持に関与するかを解明し、現存する化学療法との併用に相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用のための基盤となる研究を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>癌の悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者らはこれまで低酸素・低栄養・低 pH という腫瘍微小環境が癌の悪性化を促進することを報告してきた。本研究では、がん微小環境における“癌代謝と栄養シグナル伝達機構の解明”を種々の癌細胞株や <i>in vivo</i> マウスを駆使して研究を行った。</p> <p>具体的には、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス統合解析から“代謝と栄養シグナル”の解明という分野横断的な共同研究を展開することを目的とした。</p> <p>研究項目としては、以下の2項目について研究を行った。</p> <p>【1】 低酸素・低栄養におけるがん幹細胞維持に必須な代謝経路の解明</p> <p>申請者は低酸素・低栄養が癌の悪性化に関与することを報告しているが、腫瘍微小環境で亢進する癌代謝物がどのように代謝さらには悪性化に関与するかは不明である。既に我々は、低酸素・低栄養において種々の癌細胞に共通して幾つかの代謝産物や脂質代謝経路が亢進することを発見しており、これらが癌の悪性化にどう関わるか検討した結果、グルタミン飢餓によって誘導される新規オンコメタボライト候補を同定し、TCA サイクルなど中心代謝経路で代謝されることなく、寧ろそれ自身がシグナル伝達物質として働き、がん細胞内のグルコース代謝の促進や、肝臓のグリコーゲンの導引する可能性を見出し報告した (1)。</p> <p>【2】 低酸素・低栄養の癌幹細胞における栄養シグナルの関与</p> <p>我々はがん細胞株に共通して低酸素・低栄養で特異的に発現誘導される特徴的な遺伝子群をマイクロアレイ解析、オントロロジー解析、パスウェイ解析から発見している。また、PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達系や FOX 転写因子の関与の解析と共にこれら標的候補の機能解析を行い、グルタミン異存的な Ets ファミリー分子である FOXA1 転写因子を見出した。また、FOXA1 は、解糖系の代謝酵素やアルデヒド代謝酵素を制御する可能性を見出している。今後、グルタミン異存的な FOXA1 転写因子のがん幹細胞における役割について si/shRNA やゲノム編集等による抗腫瘍効果をマウス腫瘍移植実験において検討する予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Osawa T*, Shimamura T*, Saito K, Hasegawa Y, Ishii N, Nishida M, Ando R, Kondo A, Anwar M, Tsuchida R, Hino S, Sakamoto A, Igarashi K, Saitoh K, Kato K, Endo K, Yamano S, Kanki Y, Matsumura Y, Minami T, Tanaka T, Anai M, Wada Y, Wanibuchi H, Havashi M, Hamada A, Yoshida M, Yachida S, Nakao M, Sakai J, Aburatani H, Shibuya M, Hanada K, Miyano S, Soga T*, Kodama T*. Phosphoethanolamine Accumulation Protects Cancer Cells under Glutamine Starvation through Downregulation of PCYT2. <i>Cell Reports</i>, 29, 89-103, 2019. Kidova H, Muramatsu F, Shimamura T, Jia W, Satoh T, Havashi Y, Naito H, Kunisaki Y, Arai F, Seki M, Suzuki Y, Osawa T, Akira S., Takakura N. Regnase-1-mediated post-transcriptional regulation is essential for hematopoietic stem and progenitor cell homeostasis, <i>Nature Commun</i>, 10:1072, 2019. <p>【学会発表】</p> <p>大澤毅、「腫瘍微小環境に適応した代謝シフトによるがん悪性化機構」、シンポジウム、第42回分子生物学会：2019年12月3日-6日、福岡など、招待講演7件、</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		遺伝子編集技術を応用した薬物誘発性肝毒性の新規バイオマーカー探索
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・助教・荒川 大
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>薬物誘発性肝毒性は、医薬品の開発中止や上市後の撤退の主要な要因である一方で、現在、ヒトでの発症を高い精度で予測可能な評価系が存在しない。その主な理由として、薬物（または候補化合物）の肝毒性発症の原因タンパク質の多くが、特定されていないことが挙げられる。そのため、薬物の肝毒性発症に関わる原因分子を特定し、肝毒性のバイオマーカーを見出すことで、薬物の臨床試験や上市後の安全性を大きく向上させることが期待される。本研究では、薬物誘発性肝毒性のうち胆汁うっ滞に着目し、薬物による肝細胞の胆管腔形成抑制を <i>in vitro</i> 試験により評価するとともに、そのメカニズムを分子的に明らかにすることを目的に検討を行った。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>薬物誘発性胆汁うっ滞に関わる因子として接着タンパク質 claudin に着目し、検討を進めた。胆汁うっ滞を伴う報告がある azathioprine 及び imipramine を選択し、それらが細胞毒性を伴わない濃度で胆管腔を形成する肝がん HepG2 細胞に加えた。その結果、azathioprine 及び imipramine によって有意に胆管腔形成数が減少した。これらの薬物について、胆管側膜に局在する 16 種の claudin 分子の mRNA 発現量に影響を与えるか調べた。その結果、7 種の claudin の mRNA の発現量低下が観察された。これら分子と胆管腔形成との関係を調べるため、siRNA による遺伝子ノックダウン試験を行ったところ、2 種の claudin の siRNA 処置によって HepG2 細胞の胆管腔形成の減少が観察された。そのため、薬物誘発性の胆管腔形成低下の機序に、これら 2 種の claudin 発現低下が関与することが示唆された。</p> <p>さらに、サンドイッチ培養ラット初代肝細胞 (SCRHs) を用い胆汁うっ滞誘発薬物の処置による胆管腔形成及び claudin 発現への影響を調べた。その結果、azathioprine 及び imipramine により SCRHs の毛細胆管様構造の形成が抑制され、点状の胆管腔の形成数が増加した。さらに、imipramine により胆管腔形成に関わることが示唆された 2 種の claudin タンパク質が低下した。したがって、生理的な肝細胞においても、薬物処置により claudin タンパク質発現量の低下を引き起こし、胆汁うっ滞による肝障害を引き起こすことが示唆された。一方、azathioprine では毛細胆管の形成は抑制されたものの、claudin のタンパク質発現量は変化しなかったことから、毛細胆管形成の抑制には claudin タンパク質発現低下以外のメカニズムが関与することが示唆された。</p> <p>今後、imipramine 及び azathioprine による claudin の発現量低下のメカニズムを追求する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 勝山 智充、荒川 大、松岡 奈津美、玉井 郁巳. 「薬物誘発性胆汁うっ滞における密着結合タンパク質 Claudin の役割」 日本薬学会第 140 年会 (2020 年 3 月 25-28 日). 演題番号 28P-pm007S	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

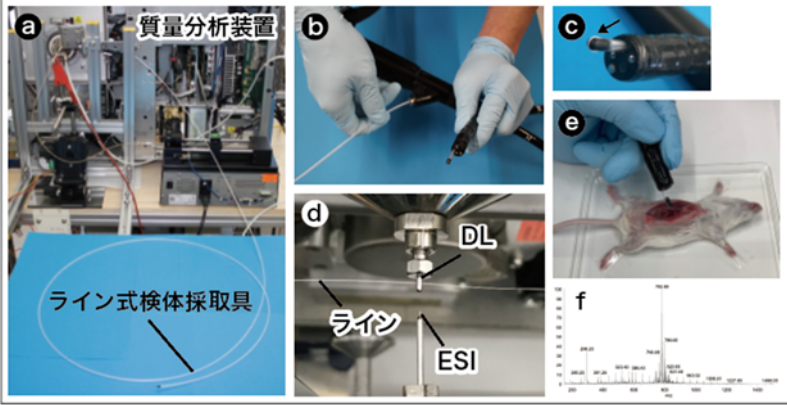
研究課題		Establishment of a skin cancer model using hiPSCs-derived keratinocytes from Xeroderma pigmentosum patients
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員・Fabian Ocegüera-Yanez
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学 iPS 細胞研究所・准教授・Knut Woltjen
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	<p>Xeroderma pigmentosum (XP) is caused by mutations in genes involved in DNA repair. Patients lacking XP gene components develop skin cancer due to increased sensitivity to sunlight. I aim to model skin carcinogenesis using keratinocytes differentiated from XPA patient-derived iPSC cells to identify driver genes involved in cancer progression.</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>XP-associated skin cancer arises as a result of somatic mutations in the stem cells. To elucidate genes/pathways required for the progression of skin cancer, I plan to differentiate keratinocytes derived from XPA iPSCs. UV-induced mutagenesis in conjunction with deletion of tumor suppressor genes using CRISPR/Cas9 will be exploited to drive cell transformation.</p> <p>XPA patient-derived iPSCs harbor a mutation located in the splice acceptor of intron 3 of <i>XPA</i> (IVS3AS, G-C / IVS3AS, G-C) (Satokata <i>et al.</i>, <i>P.N.A.S. USA</i>. 1990). I repaired the mutation using CRISPR/Cas9 and single-stranded oligonucleotides (ssODN), thus generating isogenic control cells. I engineered genetically the aforementioned cells to express Cas9 nuclease from the AAVS1 locus, following the methodology described in my previous report (Ocegüera-Yanez <i>et al.</i>, <i>Methods</i>. 2016).</p> <p>UVC treatment (1 J m⁻²) of normal and gene-corrected XPA iPSCs generated DNA mutations that were identified using anti-cyclobutane pyrimidine dimers antibodies. Consistent with this, both normal and isogenic control iPSCs but not XPA-derived iPSCs were able to grow and form colonies upon UV-irradiation, thus confirming that DNA repair was restored in XPA-corrected iPSCs. Nevertheless, XPA-derived iPSCs showed persistent colonies when treated with subacute UV-doses.</p> <p>Genome obtained from the samples of the skin cancer model will be analyzed by NGS to identify cancer causative mutations.</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	<p>Applications of genetically engineered human iPSCs to understand skin cancer development and pathology. Keystone Symposium on Tissue Organoids. Oral and Poster presentations. Vancouver, Canada. January 2020.</p>

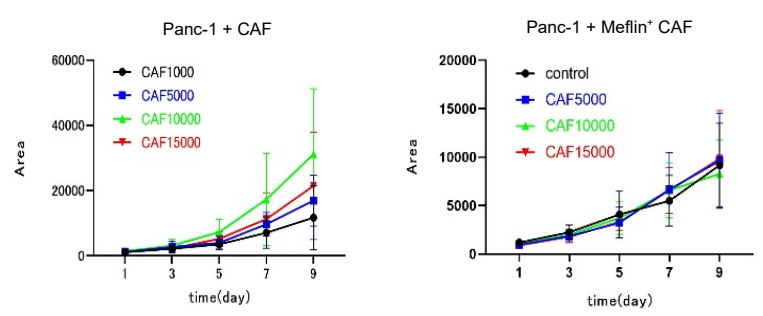
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>Application of genetically engineered iPSCs to dissect skin cancer pathology. MBSJ 日本分子生物学会. Poster presentation. Fukuoka, Japan. December 2019.</p> <p>Applications of genetically engineered human iPSCs to understand skin cancer development and pathology. CiRA International Symposium 2019. Poster presentation. Kyoto, Japan 2019.</p>
	<p>【その他特筆事項】</p>

研究課題		皮膚がんにおける fibrocyte とケモカインシステムの相互関係および病態生理学的役割の解析						
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・准教授・石田裕子						
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・教授・近藤稔和						
	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>申請者らは、これまで皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカインやケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。炎症性サイトカインやケモカインは、急性、慢性を問わず炎症反応の key molecule であることから、本研究ではケモカインやケモカインレセプターの遺伝子欠損マウスを用いて、慢性炎症によるマウス皮膚がんモデルにおける癌の発症・進展における fibrocyte とケモカインシステムの相互関係および病態生理学的役割を解析することで、fibrocyte を標的とした新たな抗がん治療法の開発のための基盤形成を目指す。</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週齢の雄 C57BL/6 (野生型) マウスに、DMBA+TPA 塗布による皮膚がんを惹起したところ、DMBA+TPA 塗布後 2 週以降で皮膚組織における Cx3cl1 及び Cx3cr1 遺伝子発現が著明に亢進していた。また、CX3CL1 タンパク発現を F4/80 陽性マクロファージに、CX3CR1 タンパク発現を F4/80 陽性マクロファージ及び CD31 陽性血管内皮に認めた。そこで、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスを用いて野生型マウスと同様に皮膚がんを惹起したところ、DMBA+TPA 塗布後 20 週で野生型マウスでは約 80%のマウスに乳頭腫が認められたのに対し、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスでは約 50%のマウスにしか腫瘍形成を認めなかった。腫瘍部への F4/80 陽性マクロファージ浸潤は、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスで野生型マウスと比べて有意に減少していた。さらに、マクロファージのサブセットを検討したところ、野生型マウスには CD206 陽性 M2 マクロファージが多数集積しており、また、M2 マクロファージの約 70%に CX3CR1 が発現していることが判明した。ヒト BCC および SCC 試料を用いて蛍光 3 重免疫染色を行ったところ、SCC では BCC と比べて多数の CD45⁺Col I⁺CX3CR1⁺ fibrocyte を認めた (図)。以上より、CX3CL1-CX3CR1 系が皮膚がん、増殖、進展に重要な役割を担っていることが示唆された。</p>							
	<table border="1"> <caption>Fibrocyte No./hpf</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Fibrocyte No./hpf</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>BCC</td> <td>~8</td> </tr> <tr> <td>SCC</td> <td>~16**</td> </tr> </tbody> </table>		Group	Fibrocyte No./hpf	BCC	~8	SCC	~16**
Group	Fibrocyte No./hpf							
BCC	~8							
SCC	~16**							
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Yuko Ishida, Yumi Kuninaka, Yuki Yamamoto, Mizuho Nosaka, Akihiko Kimura, Fukumi Furukawa, Naofumi Mukaida, and Toshikazu Kondo. Pivotal involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis for the recruitment of M2 tumor-associated macrophages in skin carcinogenesis. <i>J Invest Dermatol.</i> (in print)</p> <p>【学会発表】 1. Yuko Ishida, Yumi Kuninaka, Yuki Yamamoto, Mizuho Nosaka, Akihiko Kimura, Fukumi Furukawa, Naofumi Mukaida, Toshikazu Kondo. Pivotal roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in</p>							

	<p>skin carcinogenesis. The 26th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages. 2019.6.6, Tokyo</p> <p>2. <u>石田裕子</u>, 國中由美, 山本有紀, 野坂みずほ, 木村章彦, 古川福実, 向田直史, 近藤稔和. Pivotal roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in skin carcinogenesis. 第40回日本炎症・再生医学会. プログラム予稿集, 116, 神戸, 2019.7</p> <p>3. <u>Y Ishida</u>, Y kuninaka, H Yamamoto, M Nosaka, F Furukawa, N Mukaida, T Kondo. Pivotal roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in skin carcinogenesis. 7th Annual Meeting of the International Cytokine & Interferon Society (Cytokines2019), Vienna, 2019.10</p> <p>4. <u>Ishida Y</u>, Kuninaka Y, Yamamoto Y, Nosaka M, Kimura A, Furukawa F, Mukaida N, Kondo T. Pivotal roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in skin carcinogenesis. 第48回日本免疫学会学術集会. Proceedings of the Japanese Society for Immunology 48, 56, 浜松, 2019.12</p>
	<p>【その他特筆事項】 なし</p>

研究課題		質量分析内視鏡診断システムの開発および大腸がん組織検体を用いた性能の検証
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】	内視鏡検査における生検では、診断結果を得るまでに数時間から数日を要する。また生検を実施すると採取後の粘膜層が瘢痕化するなど、後の治療においての不利益が生じる場合があり、臨床現場からは低侵襲かつ即時に臨床判断を行うための、新規情報を提供可能な技術の開発が望まれている。そこで本研究では、内視鏡検査時に対象組織をリアルタイムで採取、移送して成分分析を行い、得られた結果を機械学習で判別してがんを検出するシステムである「質量分析内視鏡即時診断支援システム」を構築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>質量分析内視鏡即時診断支援システムの機械部構築</p> <p>機械部 (図 a) における最大の特徴は、糸状の素材をガイドするライン式検体採取具を鉗子孔に挿入し (図 b)、かつ内視鏡先端部でラインを露出させて組織を採取し (図 c)、それを質量分析装置に移送する機構にある。ライン式検体採取具の先端部は検体採取プローブとなっており (図 c 矢印)、ラインによる検体採取を、侵襲度を調節しながら行うことが可能である。ラインにより採取された組織はモーターにより質量分析装置のインターフェースへと移送され、生体成分が専用イオン化部 (図 d: DL、脱溶媒管; ESI、エレクトロスプレー) でイオン化されて装置内部へと導入される。これらの各種要素の開発および連結が完了し、試作機による生体組織からのデータ採取が可能となった。</p> <p>今後の方針</p> <p>麻酔下のマウス胃粘膜を露出させ、組織採取および成分分析の試験を行った結果 (図 e)、良好なマススペクトル (図 f: 横軸が分子種、縦軸が存在量を示す) を取得することができた。現在ヒト組織を用いた試験を進めており、データの再現性を確認後に多数検体からのデータ収集を開始する。収集されたデータは患者情報と共にデータベース化し、これをロジスティック回帰やサポートベクターマシン等で機械学習して、がんを検出するためのアルゴリズムを構築する。最終的には内視鏡を患者体内に挿入した状態で、リアルタイムに結果を閲覧できる運用を目指しているため、システム制御プログラムおよび結果を表示するためのモニターをシステムに組み込む予定である。</p> 	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 なし</p> <p>【発表】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・イノベーションジャパン 2019 ～大学見本市&ビジネスマッチング～ (2019. 8. 29-30)、東京、東京ビッグサイト、口頭およびポスター：質量分析を用いた内視鏡検査時における即時診断技術 ・第 67 回質量分析総合討論会 (2019. 05. 15~17)、茨城、つくば国際会議場エポカルつくば、ポスター：質量分析内視鏡がん診断システムの開発 <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究課題		膵癌関連線維芽細胞を標的とした新規治療戦略の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	北里大学医学部病理学・助教・加藤 琢哉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	膵癌では組織内の癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) の中に腫瘍促進的に機能する亜集団と抑制的に働く亜集団が存在することが報告されている。膵癌患者に対する CAF を標的とした治療法の臨床試験では治療群でむしろ癌が増悪したことが報告された。このことは、膵癌が進展する際には抑制性 CAF によって囲まれた環境下で抑制性 CAF に抵抗して増殖するための何らかの変化が膵癌細胞に起きていることを示唆している。そこで本研究では膵癌細胞の抑制性 CAF に対する抵抗機構の解明を目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>膵癌細胞が抑制性 CAF に対して抵抗する機構を解明するため、膵癌細胞と抑制性 CAF の3次元共培養により、抑制性 CAF の存在下でも効率よく増殖する膵癌細胞の選別を行うことを計画した。ヒト検体から樹立された CAF に抑制性 CAF の制御分子として報告されている Meflin を発現させ、膵癌細胞株 Panc-1 と ECM ゲル内での共培養を行った。Meflin 陰性の CAF との共培養では癌細胞の増殖が促進された一方で、Meflin 陽性 CAF との共培養では増殖の促進は見られなかったものの、増殖を抑制するには至らなかった (図1)。このことから、癌組織内で促進的に機能していた CAF では Meflin を発現させても抑制性 CAF に転換することはできない、という原因が考えられた。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">  </div> <p>図1. Panc-1 と CAF の3次元共培養による癌細胞増殖の検討 膵癌細胞株 Panc-1 と Meflin 陰性、陽性の CAF を ECM ゲル内で共培養し、Panc-1 細胞の spheroid の径を測定した。</p> <p>In vitro における膵癌増殖を抑制するモデルの確立は必須となる。そのため、Meflin を発現し、腫瘍抑制能を有すると考えられている正常な膵組織の膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cell; PSC、膵癌における CAF のオリジンとされる) をマウスから単離し、Panc-1 との共培養を行った。その結果、PSC を用いても CAF 同様に Panc-1 の増殖促進が観察され、想定とは逆の結果となった。その原因を追求するため、Meflin の発現を検討したところ、プラスチックで培養した PSC では Meflin の発現がほとんど見られなくなっていることが明らかとなり、そのことが原因で腫瘍抑制能を失っているものと考えられた。今後は PSC に Meflin を発現させ、in vitro での腫瘍抑制能を獲得できるかを検討する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍細胞死誘導と免疫チェックポイント阻害併用による腫瘍浸潤樹状細胞の抗原提示増強
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・助教・守屋大樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・教授・戸村道夫
	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	免疫炎症制御分野・教授・須田貴司
【研究目的】	<p>平成30年度の須田教授との共同研究により、腫瘍細胞死誘導時、死した腫瘍由来のダメージ関連分子パターン分子により腫瘍浸潤樹状細胞 (Ti-DCs) の所属リンパ節(dLN)への移行促進、そして抗腫瘍応答増強がみられることを明らかにした。一方、PD-1等の免疫チェックポイント分子阻害による抗腫瘍免疫増強は臨床的にも強い抗腫瘍効果が認められている。そこで、本研究では、腫瘍細胞死誘導にPD-1分子阻害を併用し抗腫瘍免疫応答のさらなる増強がみられるか、そして認められた場合、PD-1分子阻害の主な作用点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>まず腫瘍細胞死誘導または抗PD-1抗体投与によるPD-1分子のブロッキングそれぞれの単独処置、およびそれらの併用の腫瘍成長抑制効果について検討した。この実験では、腫瘍細胞死誘導の目的と抗腫瘍免疫応答評価の目的のために、共通抗原として卵白アルブミン(OVA)を発現させた2種類の腫瘍細胞株を用いた。具体的には、腫瘍細胞死誘導のためにジフテリア毒素(DT)受容体(DTR)とOVAを発現させた大腸ガン細胞株MC38 (MC38-OVA/DTR)を、また腫瘍サイズ計測による抗腫瘍免疫応答評価のためにOVA発現メラノーマ細胞株B16-OVAを用いた。これらの腫瘍細胞をC57BL/6マウスに接種し、腫瘍接種5日目にDT投与による腫瘍細胞死誘導、および抗PD-1抗体投与によるブロッキングを行い、さらに2日後にMC38-OVA/DTR腫瘍を切除した。その後のB16-OVA腫瘍の成長は、非投与群と比較してDTもしくは抗PD-1抗体単独処置群では抑制されなかったが、DTと抗PD-1抗体併用群では強く抑制された。以上より、腫瘍細胞死誘導とPD-1分子阻害の併用により抗腫瘍免疫応答をより強く誘導できる可能性が示された。</p> <p>次に腫瘍細胞死誘導と併用した抗PD-1抗体が(1) Ti-DCの腫瘍内での貪食、腫瘍からdLNへの移行の部分、もしくは(2) Ti-DCがdLNへ移行後のどちらに主に作用しているかについて、腫瘍細胞死誘導2日後の腫瘍切除時に抗PD-1抗体を投与する群を追加し検討した。腫瘍切除後に抗PD-1抗体を投与した群では腫瘍細胞死誘導と抗PD-1抗体を同時に投与した群と同様に強い抗腫瘍効果がみられた。以上の結果から、抗PD-1抗体は主に(2) DCがdLNに移行後の部分に作用し、dLN内でのT細胞への抗原提示や、活性化されたT細胞の腫瘍への浸潤、腫瘍への攻撃等を増強している可能性が考えられた。</p> <p>今後は、細胞の入れ替わりや移動を解析可能なKikGRマウスと細胞周期を可視化解析可能なFucciマウスのF1マウスであるKikGR/Fucciマウスを用いて、抗原特異的CD8⁺T細胞のdLN内での増殖やdLNから腫瘍への移行、腫瘍内での増殖が腫瘍細胞死誘導と抗PD-1抗体の併用により増強されるか否かについて明らかにする予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

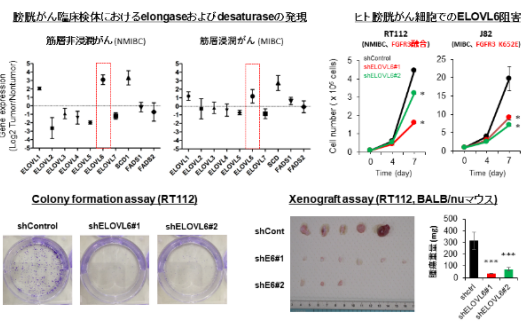
研究課題		HTLV-1 感染 CD4 ⁺ T 細胞におけるパターン認識受容体を介したパイロトーシス誘導の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学 助教 中嶋伸介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	関西医科大学 教授 藤澤順一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 須田貴司
【研究目的】	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) は成人 T 細胞白血病リンパ腫 (ATL) などの難治性疾患を引き起こす。疾患の発症予防には生体に存在する HTLV-1 感染細胞を減少させることが有効であり、疾患発症前の HTLV-1 感染細胞を標的とした治療法の開発が進められている。本研究は HTLV-1 感染細胞が恒常的に NFκB を活性化していることに着目し、NFκB 活性化と ATP などの細胞ストレス刺激が合わさった際に誘導される細胞死 (パイロトーシス) が感染細胞特異的に誘導可能か、ヒト化マウスの HTLV-1 感染モデルを用いて検討した。	
【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>(1) <u>ヒト化マウスにおける HTLV-1 感染細胞の同定と特徴の解析</u> HTLV-1 は主に CD4⁺T 細胞に感染し、ヒト末梢血の CD4⁺T 細胞においては細胞接着分子 CADM1 の発現が ATL 進展の指標になる。我々はヒト化マウスを用いた HTLV-1 感染モデルにおいて、CADM1 の発現が CD4⁺T 細胞における HTLV-1 感染の指標になること、また感染 CD4⁺T 細胞は T-bet を発現する Th1 タイプの細胞に分化していることを報告した (第 6 回日本 HTLV-1 学会学術集会 2019 年)。</p> <p>(2) <u>ヒト化マウス由来 HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞の遺伝子発現解析</u> HTLV-1 を感染させたヒト化マウスの脾臓細胞から CADM1 の発現を指標として HTLV-1 感染/非感染 CD4⁺T 細胞を分取、パイロトーシスに關与する nlrp3、caspase-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。caspase-1 の発現は HTLV-1 感染の有無によって変化せず、nlrp3 の発現は感染細胞で有意に低下した。</p> <p>(3) <u>HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞のパイロトーシス誘導の検討</u> HTLV-1 感染ヒト化マウスの脾臓細胞を ATP または nigericin を加えて 1.5 時間培養し、CD4⁺T 細胞中の CADM1 陽性細胞の割合をフローサイトメーターで測定した。HTLV-1 感染細胞である CADM1 陽性細胞の割合は ATP や nigericin 刺激によって変化しなかった。HTLV-1 構成タンパクの Tax は NFκB を活性化するが、Tax は生体中では発現が抑制されている。そこで、脾臓細胞を 24 時間培養し Tax の発現を誘導後、ATP や nigericin 刺激を行ったが、CD4⁺T 細胞における CADM1 陽性細胞の割合は変化しなかった。</p> <p>以上の結果から HTLV-1 に感染した CD4⁺T 細胞に細胞ストレスを加えても、感染細胞特異的にパイロトーシスは誘導されなかった。NFκB の活性化によって誘導される nlrp3 や caspase-1 の発現が HTLV-1 感染 CD4⁺T 細胞で増強していなかったことが一因と考えられた。現在、パイロトーシス以外の細胞死を誘導する薬剤に対する感受性を HTLV-1 感染、非感染 CD4⁺T 細胞で比較検討している。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	中嶋伸介、大高時文、李成一、藤澤順一、HTLV-1 感染ヒト化マウスにおける感染細胞の表現型解析、第 6 回日本 HTLV-1 学会学術集会、2019 年 8 月、宮崎
	【その他特筆事項】	なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		<i>In vivo</i> エレクトロポレーションを用いた簡便な発がんモデル作製法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・訪問研究員・大西 伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、申請者は piggyBac システム(非ウイルス的に目的配列をゲノムに挿入)と <i>in vivo</i> 電気穿孔法(エレクトロポレーション法)を組み合わせることでマウス脳に直接がん遺伝子を導入し、正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルの構築を行ってきた。また、同法を用いてマウスの膵臓や卵管などへの直接遺伝子導入にも成功している。本研究では、これまでに申請者が構築してきた piggyBac/ <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法によるマウス組織への遺伝子発現システムを発展させ、安定発現細胞株を樹立する感覚で迅速かつ簡便に多様な発がんモデルを構築・解析することを目的とする。	
【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>Cdkn2a</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)。また、申請者は piggyBac システムを用いてウイルス感染を伴わずに <i>Cdkn2a</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。さらに、<i>in vivo</i> エレクトロポレーション法でガラスキャピラリーを用いて piggyBac 発現ベクターをマウス新生児脳に直接導入することでマウス脳内の細胞に活性型 K-RAS (K-RAS V12)と <i>Cdkn2a</i> shRNA を発現させることで正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルを構築することができた。本研究ではまず <i>in vivo</i> 発がんモデルで作製した脳腫瘍の切片を HE 染色にて観察したところ、充実性の腫瘍細胞内に複数の細胞分裂像や巨細胞、新生血管などを確認することができ、ヒト GBM と似た病理学的特徴を示していた。また、免疫組織化学の解析から、K-RAS V12 発現細胞で増殖マーカーである Ki-67 が陽性であること、未分化マーカーである Nestin とアストロサイトマーカーである Gfap の陽性細胞が混在する不均一な腫瘍であることが分かった。今後は本実験系を用いてヒト GBM で多く見られる他のがん遺伝子群による脳腫瘍の作製にも挑戦し、詳細な比較解析を行いたいと考えている。</p> <p>また、<i>in vivo</i> 発がんモデルではがん遺伝子 piggyBac 発現ベクターと目的配列をゲノム内トランスポゾンに挿入するための Transposase 発現ベクターの 2 種類のベクターをインジェクションしているが、目的配列の挿入効率を上げるために Transposase をタンパク質でインジェクションすることを計画している。HEK293T 細胞を用いたリコンビナントタンパク質の大量精製を目的に構築した発現ベクターのシステムと従来の大腸菌を用いたリコンビナントタンパク質精製システムのそれぞれで Transposase タンパク質を精製中であり、今後、目的配列挿入効率の評価を行う予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> ROCK Inhibition Induces Terminal Adipocyte Differentiation and Suppresses Tumorigenesis in Chemoresistant Osteosarcoma Cells. Takahashi N et al. Cancer Res. 79(12):3088-3099. 2019 IMP dehydrogenase-2 drives aberrant nucleolar activity and promotes tumorigenesis in glioblastoma. Kofuji S et al. Nat Cell Biol. 21(8):1003-1014. 2019 <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 の膀胱がんにおける役割
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・教授・松坂 賢
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・博士研究員・大野 博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	<p>膀胱がんは尿路上皮がんの中で最も死亡率が高く、日本でも近年、泌尿器系のがんでは前立腺がんに次いで膀胱がんが増加している。膀胱がんは有効なスクリーニングマーカーが無く、その発がん機序はほとんどわかっていない。また、再発率の高いがんである。したがって、膀胱がんの有効な診断、治療および予防法の確立が求められている。我々は、脂肪酸の鎖長を制御する酵 ELOVL6 を同定し、さらに本酵素が膀胱がんでは上昇することを見出した。そこで、本研究では、ヒト膀胱がん細胞株を用いて膀胱がんにおける ELOVL6 発現誘導機序および ELOVL6 が制御する脂質多様性が膀胱がんの代謝やシグナル伝達におよぼす影響を明らかにし、膀胱がんの新規治療戦略の開発につなげることを目的とする。</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>ヒト筋層非浸潤膀胱がん細胞株 RT112 を用いて、膀胱がんにおける ELOVL6 発現制御機構を解析した。また、RT112 およびヒト筋層浸潤性膀胱がん細胞株 J82、253J、T24 において ELOVL6 をノックダウンし、細胞増殖への影響とその分子メカニズムを解析した。</p> <p>筋層非浸潤性膀胱がん (NMIBC) および筋層浸潤性膀胱がん (MIBC) 手術検体において、非がん部に比べてがん部では ELOVL6 の発現が有意に上昇することを確認した。筋層非浸潤膀胱癌では変異や融合による FGFR3 の恒常的活性化が知られているが、FGFR3 融合変異を有する RT112 において FGFR3 をノックダウンすると、脂質合成転写因子 SREBP-1 の活性化の抑制 (核型 SREBP-1 の減少) とともに ELOVL6 の発現の減少が認められた。すなわち、FGFR3 の活性化は転写因子 SREBP-1 を切断 (活性化) することにより ELOVL6 の発現を増加させると考えられる。また、ELOVL6 のノックダウンが膀胱がん細胞の増殖におよぼす影響を評価したところ、活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する RT112 および J82 では細胞増殖が抑制された。一方、FGFR3 遺伝子変異を有さない T24 および 253J では、細胞増殖抑制効果は認められなかった。フローサイトメーターを用いた細胞周期および細胞死への影響の検討では、ELOVL6 のノックダウンにより RT112 では G2/M チェックポイントでの細胞周期の遅延傾向が認められたが、細胞死には影響が認められなかった。Xenograft モデルによる造腫瘍能の検討では、in vivo においても ELOVL6 ノックダウンによる RT112 の腫瘍形成の抑制が認められた。さらに、ELOVL6 をノックダウンした RT112 細胞の RNA-seq 解析を行い、ELOVL6 の阻害は matrisome と呼ばれる細胞外微小環境に関わる遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。</p> <p>以上の結果から、膀胱癌では ELOVL6 の発現が亢進し、特に活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する膀胱癌において細胞増殖能や腫瘍形成能に重要な役割を果たすこと、その分子機序として細胞外微小環境の変化が関与している可能性が示された。今後、膀胱癌の増殖や悪性進展を促進する脂質分子種およびその作用機序を解明することにより、膀胱癌の新しい発症機序の解明や新規膀胱癌治療薬の開発、さらには様々ながんにおける脂肪酸鎖長の重要性の解明が期待される。</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

ELOVL6の阻害は活性化型FGFR3遺伝子変異を有する膀胱がんの増殖を抑制する



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

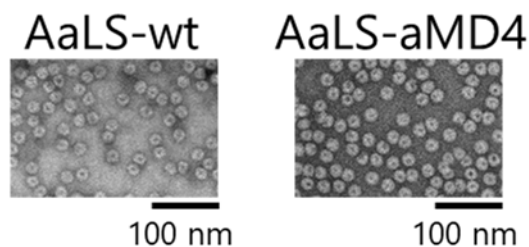
研究課題		上皮管腔形成とがん進展に關与する Src 制御タンパク質の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・助教・梶原 健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本 邦夫
【研究目的】	<p>がん患者の予後を規定する大きな要因として、がん細胞の正常組織への浸潤・転移がある。がん細胞の浸潤を理解するため、我々は腎臓をモデルとして組織の再生に注目をしたアプローチを進めてきた。その結果、腎臓尿細管の再生過程に Rsp1/CDCP1 が関与することを見出した。さらに、CDCP1 は HGF 受容体の Met と結合することで、その HGF 刺激後のシグナル伝達を制御していることを明らかにした。これらの結果から、CDCP1 を制御することで、HGF 応答性のがん細胞の浸潤を制御できると考えられる。そこで本研究では、CDCP1 と Met の機能的関連を分子レベルで明らかにして、さらにがん細胞の浸潤を制御することを目指した解析を展開する。</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>1) CDCP1 ノックアウトマウスの解析 HGF 依存性の組織再生現象である腎臓の代償性肥大をコントロールマウスと CDCP1 ノックアウトマウスを使って解析した。その結果、コントロールマウスでは施術後 12 時間以内に腎臓尿細管の肥大化が確認されたが、ノックアウトマウスではその遅延と肥大化の減弱が確認された。そこで、施術後 12 時間前後の尿細管を免疫組織染色で解析したところ、コントロールマウスでは細胞増殖と尿細管周辺の組織再編成（破壊と構築）が進行しているのに対して、ノックアウトマウスでは両プロセスとも遅延が認められた。この原因として、HGF-Met シグナル伝達の異常が考えられたので、Met と STAT3 の活性化状態を可視化した。その結果、両シグナル伝達の遅延と減弱が観察された。以上の解析結果から、CDCP1 のノックダウンによって HGF-Met シグナル伝達の減弱が起こることで、HGF 刺激によって誘導される細胞内外のイベントが全体的に遅延し、腎臓の代償性肥大が減弱することが示唆された。</p> <p>2) CDCP1 の発現制御によるがん形質の変化 CDCP1 の発現抑制によるがん形質への影響を評価するために、CDCP1 と Met をともに高発現しており高浸潤性を示す細胞を用いた解析を実施した。乳がん由来の MDA-MB-231 細胞の CDCP1 をノックダウンしたところ、HGF 依存性の形態変化と浸潤が抑制されることを見出した。同様の結果を、腎がん由来の A498 細胞でも確認した。その原因として、Met の細胞内への誤局在が考えられた。そこで、CDCP1 の Met との結合に重要と考えられる部位に変異を導入したところ、Met の誤局在が解消されて、高浸潤性も部分的に回復した。以上の解析から、CDCP1 は Met との相互作用を介して、その局在を制御することで、HGF 応答性と続くがん形質を制御していることが示唆された。</p> <p>以上の研究成果から、CDCP1 は Met と相互作用することで、HGF 刺激後のシグナル伝達を制御していることが明らかになった。がん細胞は CDCP1 の発現を増加させることで、HGF 応答性の浸潤を亢進させている戦略をとっていると考えられる。逆に、この相互作用を阻害することで、がん細胞の浸潤や他のがん進展イベントを抑制することが可能になると考えられる。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>CDCP1 controls compensatory renal growth by integrating Src and Met signaling. <u>Kajiwara K</u>, Aoki K, Okuzaki D, <u>Matsumoto K</u>, Okada M. bioRxiv (2019)</p>	

【学会発表】

- 1) シグナル伝達の時空間的制御による組織再生とがん進展
梶原健太郎
蛋白研セミナーがん研究の新機軸、2019年7月5日
- 2) シグナル伝達の時空間的制御による組織再生とがん進展
梶原健太郎
新学術領域数理シグナル第3回若手ワークショップ、2019年9月2日
- 3) 腎臓尿細管の再生におけるシグナル伝達の時空間的制御
梶原健太郎、松本邦夫、岡田雅人
第42回日本分子生物学会年会、2019年12月6日

【その他特筆事項】

研究課題		HGF-MET 系をターゲットとしたドラッグデリバリーシステムの開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・特任助教・寺坂尚紘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・博士課程学生・小松大和
	所属・職名・氏名	
	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>ドラッグデリバリーは、特定の細胞に選択的に薬剤を運搬することで薬剤の効果を最大限にしつつ副作用を最小限に抑える技術である。先行研究において、60 量体カプシド構造形成タンパク質である細菌のルマジン合成酵素 (AaLS) を改変し、内部にタンパク質・RNA・小分子を内包させることに成功している。またカプシド表面には様々な化学修飾や遺伝子改変によるペプチドの提示が可能であり、AaLS はドラッグデリバリー分子として有望である。本研究では AaLS カプシドの表面に、肝細胞増殖因子受容体である MET に強固に結合する環状ペプチドを修飾し、MET を過剰に発現しているガン細胞に選択的に薬剤分子を運搬するシステムの構築を目的とする。</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>先行研究で開発した 3 種類の MET 結合環状ペプチド(aAMD4, aMD5, aML5)を用いて、環状ペプチドが導入可能な AaLS 表面上の部位を検討した結果、ペプチドが導入可能な部位を 1 か所同定した。またペプチドを導入した AaLS モノマーと野生型 AaLS モノマーを異なるプロモーター下で大腸菌を用いて発現することで、カプシド表面に提示する環状ペプチドの数を調節する系を確立した。環状ペプチドを導入した改変 AaLS を透過型電子顕微鏡で観察した結果、野生型 AaLS と同様に 60 量体を形成することが示された (図)。</p> <p>発現・精製した改変 AaLS を MET 発現培養細胞に加え、MET のダイマー化を促進するかを金沢大学がん進展制御研究所腫瘍動態制御研究分野の松本先生のグループに評価して頂いた。その結果、aAMD4 を提示したカプシドのみが MET のダイマー化を促進することが判明した。蛍光分子 (フルオレセイン) で修飾した aAMD4 提示カプシドを MET 発現細胞に加え、蛍光顕微鏡観察した所、aAMD4 提示カプシドはエンドサイトーシスされていることが判明した。さらに MET 非発現細胞、MET リン酸化阻害剤を加えたコントロール実験の結果、aAMD4 提示カプシドは MET の活性化依存的にエンドサイトーシスされることが分かった。今後は細胞毒性を示す薬剤を aAMD4 提示カプシドに内包し、MET 発現細胞選択的に薬剤を運搬することを目指す。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



図：野生型 AaLS と aAMD4 提示 AaLS の透過型電子顕微鏡写真

研究課題		腸内細菌により産生される代謝脂質の大腸がん発症および悪性化における役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪市立大学大学院医学研究科・助教・神谷知憲
研究分担者 <small>(適宜、行を追加してください。)</small>	所属・職名・氏名	大阪市立大学大学院医学研究科・教授・大谷直子
	所属・職名・氏名	大阪市立大学大学院医学研究科・技術員・宮川英加
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>宿主と共生関係にある腸内細菌は、ヒトとは異なる独自の酵素を有している。必須脂肪酸であるリノール酸は、ヒト代謝系ではアラキドン酸カスケードを介して脂質メディエーターに代謝される一方、細菌代謝系により水酸化脂肪酸(HYA)などに代謝される。HYAは抗炎症/抗肥満効果が報告されており、宿主の恒常性や疾患に対する効果が期待される。</p> <p>大腸では、慢性的、また日々微弱に起こる炎症の蓄積により発癌が促進することから、腸管の恒常性維持に、腸内細菌の関与が考えられる。そこで本研究では、宿主、または腸内細菌が代謝・産生する脂質の大腸癌形成に与える影響を明らかにすることを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 <small>(図表・説明図等を入れていただいても結構です。)</small>	<p>【研究結果】大腸癌形成に与える影響を解析するため、多段階遺伝子変異大腸がんモデル(ATP: <i>Apc</i>^{Δ716}, <i>Tgfb2</i>^{fl/fl}, <i>Trp53</i>^{SL-R270H}, <i>Villin-CreER</i>)を導入した。そして、必須脂肪酸であるリノール酸(LA)の働きを確認するために、LA含有量の異なる2種類の餌(2%LA-HFD or 12%LA-HFD, HFD:60kcal%脂質)を作成した。この際に、高LA濃度とするには高脂肪食となるため、対照群である低LA含有食についても、LAを含まない脂質にて高脂肪食とした。この2つの餌の脂質の構成は、サフラワー油(LA含有量80%)とココナツ油(LA含有量0%)で作成した。そして、大腸癌原発巣とリノール酸との関係性を証明するため、ATPマウスにリノール酸含有量の異なる餌を離乳時(4週齢)から、安楽死(サンプリング)させるまでの間給餌した。本マウスを4週齢で離乳し、エストロゲン受容体とCreタンパクとの融合体(CreER)をVillin遺伝子の下流にて発現させており、11週齢から14週齢まで、週1回タモキシフェン4mgを腹腔内に投与し、16週齢にて安楽死させ、小腸、及び大腸の腫瘍形成数を確認した(図1A)。その結果、2%LA-HFDと比較し12%LA-HFDでは腫瘍形成数が有意に増加することが確認された(図1B)。この際に、どちらの群においても、大腸には腫瘍形成が確認されず、小腸にのみ形成された。またこの際、体重について有意な変化は認められなかった。</p> <p>【考察/展望】上記の結果から、LAには腸管において腫瘍促進効果があることが予想される。宿主と共生微生物の間で起こる代謝バランスに経口摂取された必須脂肪酸がどのように働いているのか、腸管においては腫瘍形成を促進する働きのある脂質メディエーター側に傾いていることが予想される。今後の展望としては、小腸の腫瘍形成部位における脂質の構成を質量分析器を用いて定量することで、LA代謝物の影響を解析していく。また、本実験の結果が、腸内細菌叢に非依存的に起きた結果なのか、広域の抗生物質を用い、腸内細菌叢の影響を無くした状態で検証を行う。</p> <p>腸管における宿主と腸内細菌との脂質代謝バランスについても興味深く、腸内細菌叢の分析も含め、今後の研究課題としていく。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	<p>1. Tomonori Kamiya, Fumitaka Kamachi, Tatsuya Arai, Naoko Ohtani. Anti-inflammatory microbial metabolites from linoleic acid suppress obesity-induced liver cancer development. 第48回日本免疫学会. 2019年12月11-13日</p> <p>2. 神谷知憲, 蒲池史卓, 松浦遥, 福田真嗣, 有田誠, 岸野重信, 小川順, 大谷直子. 腸内細菌が代謝する機能性脂肪酸による肥満誘導性肝がん抑制機構の解明. 第17回がん代謝研究会. 2019年8月1-2日</p>
	【その他特筆事項】	

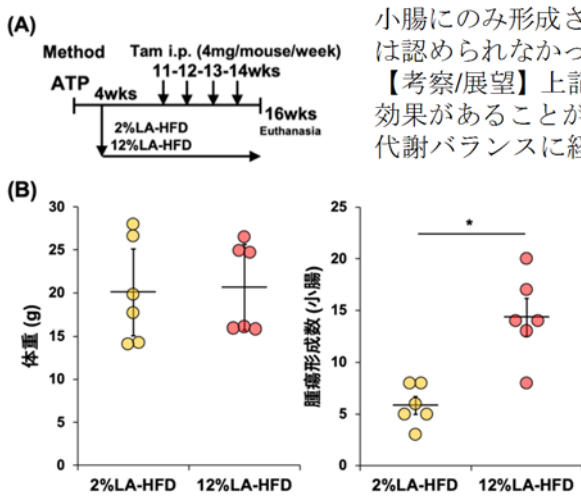
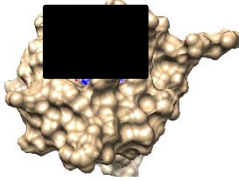



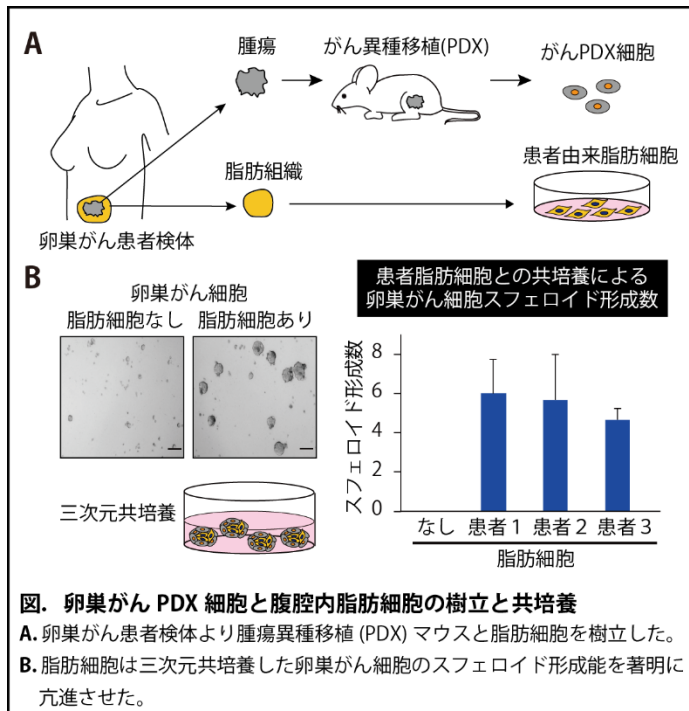
図1. 多段階遺伝子変異大腸ガンモデルマウスにおけるリノール酸の影響
(A)実験概要 (B) 実験結果
略語 ... LA; リノール酸, HFD; 高脂肪食, Tam; タモキシフェン
ATP: *Apc*^{Δ716}, *Tgfb2*^{fl/fl}, *Trp53*^{SL-R270H}, *Villin-CreER*
Mean±SEM, Student's T-test, *p<0.05

研究課題	肝細胞がん微小環境におけるエイコサノイドとケモカインの役割の解析																																											
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学 内科学（2）分野・助教・野阪 拓人																																										
研究分担者	所属・職名・氏名	福井大学 内科学（2）分野・教授・中本 安成																																										
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史																																										
【研究目的】	<p>進行肝細胞がんの制御は未だ困難で、詳細な進展機構の解明と、それに基づく治療法の開発が重要な課題である。アラキドン酸を基質に、5-リポキシゲナーゼ (5-LOX)、シクロオキシゲナーゼなどの酸化酵素により生成されるロイコトリエン (LT)、プロスタグランジンなどの生理活性脂質 (エイコサノイド) は、がん進展を促進することが報告されている。申請者らは肝細胞がん肺転移マウスモデルを用いて、肺マクロファージがケモカイン CCL2-CCR2 軸を介して血中より肺転移巣に誘導され、転移肺中で LTB4 を産生し、肺転移巣を増大させるという一連の細胞動態と機能解析を、向田教授らとの共同研究にて実証した (J Immunol. 200, 5, 2018; Int J Mol Sci. 20, 1, 2018)。以上の研究成果に基づき、脂質代謝学、腫瘍免疫学的側面から、肝細胞がん微小環境における新規肝細胞がん進展機構を解明し、新たな視点からの肝細胞がん制御法の開発に繋がる基盤的な知見の確立を目指す。</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>令和元年度に向田教授との共同研究で、申請者らはマウス由来肝がん細胞株 BNL 細胞を BALB/c マウスに経門脈的に接種する肝内転移モデルを用いて以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 肝細胞がん肝内転移後、5-LOX 阻害薬 (Zileuton) を連日腹腔内投与すると腫瘍増大が抑制された (Fig. 1)。 マウス、ヒト肝がん細胞株に LTB4 または LTC/D/E4 を添加すると、Sphere formation assay にて形成スフィア数が増加することを示し (Fig. 2)、癌幹細胞マーカーである CD90、CD133 が発現上昇することをフローサイトメトリー解析にて確認した。 マウス、ヒト肝細胞がん組織にて、正常肝と比べ 5-LOX 発現細胞の増加を免疫組織化学染色にて確認した (Fig. 3)。また、蛍光免疫多重免疫染色法 (Opal 法; PerkinElmer) にて 5-LOX 発現細胞は転移巣内マクロファージであることを示した。 マウス肝細胞がん組織において、正常肝と比較し、マクロファージ誘導能を有するケモカイン CCL2 の発現上昇を確認した (Fig. 4)。 <p>以上の実験結果から、肝細胞がん肝内転移において、腫瘍内マクロファージが LT 産生候補細胞であること、LT が肝細胞癌のがん幹細胞の誘導または増殖に関与している可能性が示唆された。今後は、さらに肝内転移巣マクロファージの機能的解析や、ケモカインに関連する一連の細胞動態について解明することを目指している。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="427 1240 619 1541"> <table border="1"> <caption>Fig. 1 Liver weight (g)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Liver weight (g)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DMSO</td> <td>~2.2</td> </tr> <tr> <td>Zileuton</td> <td>~1.8</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="692 1227 963 1594"> <table border="1"> <caption>Fig. 2 Sphere numbers per dish</caption> <thead> <tr> <th>Treatment</th> <th>Concentration</th> <th>Sphere numbers per dish</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EtOH</td> <td>-</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>LTB4</td> <td>10 nM</td> <td>~10</td> </tr> <tr> <td>LTB4</td> <td>100 nM</td> <td>~20</td> </tr> <tr> <td>LTB4</td> <td>1000 nM</td> <td>~40</td> </tr> <tr> <td>LTC/D/E4</td> <td>10 nM</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>LTC/D/E4</td> <td>100 nM</td> <td>~15</td> </tr> <tr> <td>LTC/D/E4</td> <td>1000 nM</td> <td>~25</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="979 1272 1235 1576"> <table border="1"> <caption>Fig. 3 5-LOX positive cells (numbers/fields)</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>5-LOX positive cells (numbers/fields)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal liver</td> <td>~150</td> </tr> <tr> <td>HCC</td> <td>~650</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div data-bbox="1267 1249 1490 1576"> <table border="1"> <caption>Fig. 4 CCL2 relative expressions</caption> <thead> <tr> <th>Group</th> <th>Relative expressions</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Normal liver</td> <td>~1</td> </tr> <tr> <td>HCC</td> <td>~100</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div data-bbox="389 1594 628 1648"> <p>Fig. 1 Zileutonによる肝内転移巣増大抑制効果</p> </div> <div data-bbox="660 1594 963 1626"> <p>Fig. 2 Sphere formation assay</p> </div> <div data-bbox="995 1594 1251 1626"> <p>Fig. 3 5-LOX発現細胞数</p> </div> <div data-bbox="1283 1594 1506 1626"> <p>Fig. 4 CCL2発現解析</p> </div> </div>		Group	Liver weight (g)	DMSO	~2.2	Zileuton	~1.8	Treatment	Concentration	Sphere numbers per dish	EtOH	-	~15	LTB4	10 nM	~10	LTB4	100 nM	~20	LTB4	1000 nM	~40	LTC/D/E4	10 nM	~15	LTC/D/E4	100 nM	~15	LTC/D/E4	1000 nM	~25	Group	5-LOX positive cells (numbers/fields)	Normal liver	~150	HCC	~650	Group	Relative expressions	Normal liver	~1	HCC	~100
Group	Liver weight (g)																																											
DMSO	~2.2																																											
Zileuton	~1.8																																											
Treatment	Concentration	Sphere numbers per dish																																										
EtOH	-	~15																																										
LTB4	10 nM	~10																																										
LTB4	100 nM	~20																																										
LTB4	1000 nM	~40																																										
LTC/D/E4	10 nM	~15																																										
LTC/D/E4	100 nM	~15																																										
LTC/D/E4	1000 nM	~25																																										
Group	5-LOX positive cells (numbers/fields)																																											
Normal liver	~150																																											
HCC	~650																																											
Group	Relative expressions																																											
Normal liver	~1																																											
HCC	~100																																											
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Nemoto T, Nishizawa T, Okamoto H, Nakamoto Y. 2020. Molecular signature of hepatitis B virus regulation by interferon-gamma in primary human hepatocytes. Hepatol Res 50:292-302. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 野阪拓人, 向田直史, 中本安成. 肝がん肺転移を制御するマクロファージの病態解明と標的治療の可能性. 2019年5月. 第105回日本消化器病学会総会 シンポジウム. <p>【その他特筆事項】</p> <p>科研費・若手研究 「肝細胞がん微小環境におけるエイコサノイド関連腫瘍進展機構の解明と新規治療法の研究」 2019年度～2021年度 (代表者 野阪拓人、直接経費総額 3,200千円)</p>																																											

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		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。種々の <i>in silico</i> スクリーニング手法を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、HGF α 鎖と β 鎖の Met への結合に関与するポケット、に嵌まり込む低分子化合物を探索するための計算科学的な創薬基盤を確立する。最終的には、HGF-Met のタンパク質間相互作用を阻害する新規低分子化合物を高精度で予測できる創薬のための技術基盤を確立することを目的とし、創薬リード化合物の類縁体設計、複合体構造解析ならびに有機合成展開も視野に入れた創薬研究を展開する。	
【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である HGF の立体構造に着目し <i>in silico</i> スクリーニング手法によって、HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害しうる新規低分子化合物候補を複数同定していた。昨年度の研究では α 鎖に結合する化合物 1 種類、β 鎖に結合する化合物 2 種類を同定していた。そこで、さらに高い生理活性を有する新規構造の化合物を探索するために、α 鎖結合化合物は類縁体探索を行った。一方で、β 鎖の結合ポケットを用い、フレキシブルドッキング手法を 2 種類利用する新規スクリーニング系を構築し、再スクリーニングを行った。α 鎖結合化合物の類縁体を MACCS key を利用したクラスタリング手法による類似度検索によって探索し HGF α 鎖 NK1 構造を用いて化合物結合シミュレーション系により 14 種類の類縁化合物を同定し入手した。他方、HGF β 鎖 S1 ポケットに対して約 15 万化合物ライブラリを用い、2 種類のフレキシブルドッキングによるシミュレーションを多段階的に行う新規手法を適応した。その結果、HGF β 鎖 S1 ポケットに結合し阻害効果を有する新規候補化合物を 5 種類選定し入手した。これらの候補化合物に関して 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、HGF α 鎖に対し、これまで同定していた既存化合物とほぼ同等の IC_{50} 値が $60 \mu M$ の新規阻害化合物を 1 種類 (図 1)、HGF β 鎖に対するこれまでとは全く異なる新規骨格を有する化合物を 2 種類発見する事に成功した (図 2)。これらの化合物うち 1 つは 3 つの六員環からなる化合物であり IC_{50} 値は $40 \mu M$ であった。もう 1 つは 2 つの六員環と 2 つの五員環からなる化合物であり IC_{50} 値は $60 \mu M$ と若干活性は弱かった。今後、これらの構造情報を元に、大規模化合物ライブラリを類縁体検索することで、強力な阻害効果を有する化合物を同定できる可能性が考えられるとともに、これまで蓄積してきた活性・非活性化合物の構造や結合モード等を機械学習するデータ駆動型創薬手法を活用した研究を進めてゆくことが必要と考えられた。今後は、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>	
	 	
	図 1. HGF α 鎖構造と新規同定化合物との結合モデル構造	図 2. HGF β 鎖構造と新規同定化合物との結合モデル構造
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Taira J, Nagano T, Kitamura M, Yamaguchi M, Sakamoto H, Aoki S. Structural Modification of a Novel Inhibitor for Mycobacterium Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase Assisted by <i>in silico</i> Structure-based Drug Screening. International Journal of Mycobacteriology 2020. in press.</p> <p>【学会発表】 谷口正伍, 福田亮介, Francois Berenger, 澤田隆介, 山口美穂, 井上敬太郎, 青木俊介, 山西芳裕, 沖米田司. インシリコスクリーニングによる新規 CFTR コレクターの探索. 日本薬学会. 3/25-28. 京都. 2020.</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

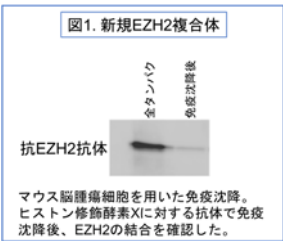
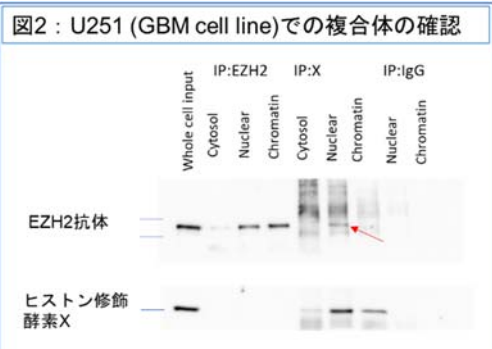
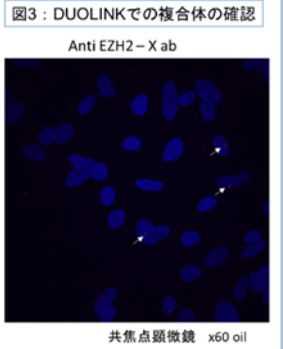
研究課題		固形がん幹細胞の転移ニッチとしての脂肪細胞の役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・下野洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・林 孝典
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・渡辺 崇
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・前田 真男
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>肥満は、子宮内膜がん、乳がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、大腸がん、卵巣がんなど各種のがんの危険因子である。肥満に伴う脂肪組織の増大および代謝の病的変化は、インスリン抵抗性、高血糖、酸化ストレス、炎症反応などの誘導を介して、がんの発症および進展に関わるとされるが、その詳細は依然明らかでない。本研究では卵巣がんと大腸がんのがん幹細胞性に特に着目して、脂肪細胞ががん幹細胞性を制御する分子機構の解析を行う。さらに、がん幹細胞制御に関わる脂肪細胞由来分泌因子（アディポカイン）を同定することで、がん進展を抑制するための治療標的を見出すことを目指す。</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>私たちは乳がん患者の手術検体より乳がん異種移植（PDX）細胞および脂肪細胞を樹立し、乳腺脂肪細胞が乳がん PDX 細胞の増殖および幹細胞性を亢進させること、乳がん形成を促進すること、およびこれらの働きに脂肪細胞の分泌因子アディブシンが関与することを見出した（Goto H. <u>Shimono Y.</u> et al. <i>Oncogene</i>, 2019）。本研究では、肥満ががん発症の危険因子となる卵巣がんも大腸がんに着目し、がん幹細胞ニッチとしての脂肪細胞の働きを解析した。</p> <p>1. 脂肪細胞によるがん幹細胞性亢進</p> <p>卵巣がんの手術検体より新たに脂肪細胞を樹立した。乳がんと同様に卵巣がん（図 1）や大腸がんの細胞でも、脂肪細胞との共培養によりがん幹細胞性の指標となるスフェロイド形成能が増強した。</p> <p>2. 手術検体由来脂肪細胞が分泌するアディポカインの解析</p> <p>卵巣がんおよび大腸がん患者の手術検体より樹立した脂肪細胞が発現するアディポカインをサイトカインアレイにより解析した。脂肪細胞で特に高発現するアディポカインの shRNA 発現レンチウイルスを作製した。shRNA 発現脂肪細胞との共培養によるがん細胞のスフェロイド形成能などからがん幹細胞性の制御との関連の解析を進めた。</p> <p>3. がん患者検体におけるアディポカイン発現量の解析</p> <p>がん幹細胞性との関連が考えられるアディポカインの発現を、卵巣がん患者検体とその PDX 腫瘍、および脂肪細胞を用いて解析した。</p>	



<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Mukohyama J, Isobe T, Hu Q, <u>Hayashi T</u>, <u>Watanabe T</u>, <u>Maeda M</u>, Yanagi H, Qian X, Yamashita K, Minami H, Mimori K, Sahoo D, Kakeji Y, Suzuki A, Dalerba P, <u>Shimono Y</u>. miR-221 Targets QKI to Enhance the Tumorigenic Capacity of Human Colorectal Cancer Stem Cells. Cancer Research, 79(20):5151-5158, 2019. 2. Nishio E, Hayashi T, Nakatani M, Aida N, Suda R, Fujii T, Wakatsuki T, Honda S, Harada N, <u>Shimono Y</u>. Lack of association of ovariectomy-induced obesity with overeating and the reduction of physical activities. Biochemistry and Biophysics Reports, 20:100671, 2019. 3. Honma S, Hisamori S, Nishiuchi A, Itatani Y, Obama K, <u>Shimono Y</u>, Sakai Y. F-Box/WD Repeat Domain-Containing 7 Induces Chemotherapy Resistance in Colorectal Cancer Stem Cells. Cancers, 11(5): E635, 2019.
	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Shibuya N, <u>Shimono Y</u>, Minami H, Kakeji Y, Suzuki A. Analyses of miR-93 that was downregulated in micrometastatic cancer stem cells in a human breast cancer xenograft model. 第78回日本癌学会学術総会、2019年. 2. <u>Shimono Y</u>, Mukohyama J, <u>Hayashi T</u>, <u>Watanabe T</u>, Isobe T, Hu Q, Sahoo D, Minami H, Mimori K, Dalerba P, Kakeji Y, Suzuki A. miR-221 targets an RNA-binding protein QKI-5 and enhances the tumorigenic capacity of human colorectal cancer stem cells. 第17回 幹細胞シンポジウム、2019年. 3. <u>Shimono Y</u>, Goto H, Funakoshi Y, Imamura Y, Toyoda M, Kiyota N, Kono S, Takao S, Mukohara T, Minami H. Adipsin is an adipokine that promotes cancer stem cell-like properties of breast cancer patient-derived xenograft cells. 第3回 がん三次元培養研究会、2019年.
	<p>【その他特筆事項】 特になし。</p>

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳がん細胞系譜転換における脂質代謝制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・助教・岡田宣宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・院生・辻本剛己
	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】	乳がんは、ホルモン受容体陽性細胞 (Luminal) からホルモン受容体陰性細胞 (Basal) への細胞系譜転換により、内分泌療法抵抗性を獲得することが示唆されている。しかし、乳がんが悪性化進展過程で細胞系譜転換を起こすメカニズムは明らかになっていない。申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞間で 2 種のスプライシングバリエーションの発現をスイッチさせている遺伝子 <i>NFYA</i> を同定している。また、 <i>NFYA</i> は脂肪酸合成酵素遺伝子の転写を制御していることが報告されている。これらのことから、本研究では、 <i>NFYA</i> による脂質代謝制御と乳がん細胞系譜転換機構の関連を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><u>乳がん細胞における遺伝子発現解析</u> 本研究で使用する乳がんモデルマウス MMTV-PyMT に発症する乳がんにおける <i>Nfya</i>、脂質代謝酵素の発現を確認した。その結果、正常乳腺細胞と比較し、乳がん細胞において <i>Nfya</i> 両バリエーションの発現が増加していることを確認した。また、乳がん細胞において脂質代謝酵素 (<i>Fasn</i>、<i>Acly</i>、<i>ACACA</i>) の発現も増加しており、MMTV-PyMT マウスに発症する乳がんにおいて脂質代謝が亢進していることも確認できた。さらに、乳がん組織の解析から、ホルモン受容体陽性細胞 (Luminal 細胞) とホルモン受容体陰性細胞 (Basal 細胞) が混在しており、悪性化進展過程で細胞系譜転換が起きていることが示唆された。</p> <p><u><i>NFYA</i> による <i>FASN</i> 発現制御</u> <i>NFYA</i> が <i>FASN</i> の発現を制御していることを明らかにするために、CRISPR/Cas9 システムにより作製した <i>NFYA</i> ノックアウト乳がん細胞を用い <i>FASN</i> の発現を解析した。その結果、ホルモン受容体陰性乳がん細胞において <i>NFYA</i> 欠損による <i>FASN</i> の発現減少が確認できた。しかし、ホルモン受容体陽性乳がん細胞では <i>NFYA</i> 欠損による <i>FASN</i> 発現への影響はなかった。これらの結果は、乳がん細胞系譜により <i>NFYA</i> による <i>FASN</i> 制御が異なることを示している。さらに、ホルモン受容体陰性乳がん細胞における <i>NFYA</i> 欠損が細胞増殖を抑制することも明らかにしており、今後脂質代謝との関連を明らかにする予定である。</p> <p><u><i>NFYA</i> ノックアウトマウス解析</u> 通常飼育環境において <i>Nfya</i> 欠損による <i>Fasn</i> の変化は確認できなかった。しかし、高脂肪食飼育下では、野生型マウスは <i>Fasn</i> の発現を増加させていたのに対し、<i>Nfya</i> 欠損マウスでは <i>Fasn</i> の発現増加が起こらなかった。今後、乳がん発生および悪性化機構への影響を詳細に解析していく予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	<p>【学会発表】 Nobuhiro Okada, Hayato Muranaka, Kiyotsugu Yoshikawa, Chiaki Takahashi. <i>NFYA</i> regulates the acquisition of drug resistance in breast cancer. 2019年9月. 第80回日本癌学会学術総会</p>	
	【その他特筆事項】	

研究課題		ヒストンメチル化酵素 EZH2 と新規複合体を形成するタンパク質の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学大学院医学系研究科・助教・新城恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	<p>ヒストンメチル化酵素 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコーム複合体 2) の構成タンパク質であり、ヒストン H3 リジン 27 番をトリメチル化 (H3K27me3) 修飾することにより遺伝子発現制御に関わる。EZH2 の発現亢進は多くのがんで観察されており、がんの悪性化に寄与していることが報告されている。</p> <p>EZH2 はがんにおいて PRC2 以外のタンパク質と複合体を形成することも知られている。我々は EZH2 が過剰発現している腫瘍細胞において、EZH2 はこれまでに複合体を作ることが報告されていないタンパク質 (ヒストン修飾酵素 X) と複合体を形成していることを見出した。本共同研究では、新規複合体の機能解明を目指して実験を行った。</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>マウスの脳腫瘍細胞では、EZH2 とヒストン修飾酵素 X が過剰発現しており、この細胞で免疫沈降により EZH2-ヒストン修飾酵素 X 複合体 (図 1) の存在することを見出した。in silico 解析からもこの二つのタンパク質が結合する可能性があることが示唆された。脳腫瘍、肺がんなど複数のがん種の細胞株を用いて、この異常複合体が存在することを確認した。EZH2 は核内に多く局在し、異常複合体も核内で認めることが多いことが分かった。図 2 は脳腫瘍細胞株 U251 のタンパク質を細胞質、核、クロマチン画分にそれぞれ分け、EZH2 抗体、ヒストン修飾酵素 X 抗体で免疫沈降を行ったものである。ヒストン修飾酵素 X 抗体での免疫沈降サンプルでは EZH2 の結合を確認できた。一方、EZH2 抗体で免疫沈降してもヒストン修飾酵素 X の結合を検出することは難しく、細胞内に存在する EZH2 の一部のみが異常複合体形成に関わっていることが考えられた。EZH2 とヒストン修飾酵素 X の結合部位を同定するため、EZH2 の一部を欠損させた Vector を作成し、結合の有無を確認する予定である。</p> <p>EZH2-ヒストン修飾酵素 X 複合体の存在を DUOLINK を用いて確認した (図 3)。今後 FRET を用いて、細胞内での局在や複合体を形成する条件などを検討する予定である。FRET 用ベクターは平田准教授より、最適な蛍光色素についてアドバイスをいただき、現在作成中である。</p> <p>また、今後タグタンパク質を付加した Vector を過剰発現させ、タグタンパク質により ChIP-seq を行い、ゲノム上の異常複合体による修飾領域を明らかにし、がん形成に関わる機序を明らかとしたいと考えている。</p>	
	 <p>図1. 新規EZH2複合体</p> <p>マウス脳腫瘍細胞を用いた免疫沈降。ヒストン修飾酵素Xに対する抗体で免疫沈降後、EZH2の結合を確認した。</p>	
	 <p>図2: U251 (GBM cell line)での複合体の確認</p>	
	 <p>図3: DUOLINKでの複合体の確認</p> <p>共焦点顕微鏡 x60 oil</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		エクソソームを介した慢性骨髄性白血病再発機構の提唱
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学・助教・森下 総司
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・教授・小松 則夫
	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】	近年、細胞外小胞などのマイクロパーティクルを介した細胞間コミュニケーションが注目されている。慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) においても、 <i>BCR/ABL1</i> 融合タンパク質などが、CML 細胞由来のマイクロパーティクルを介して正常な細胞へ取り込まれることが明らかとなってきた。そこで本研究では、申請者の所属する機関の附属病院を受診する CML 患者を対象としたコホート解析と、患者検体を用いた <i>in vitro</i> 解析により、CML 細胞由来マイクロパーティクルが、周辺の正常細胞への影響を詳細に解析することで、CML の再発に関わる、新規の細胞・分子機序を明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>CML 細胞由来のマイクロパーティクルを回収するためには、雑多な細胞の混在する骨髄検体より、CML 細胞を分取する必要がある。そこで、CML 患者の未治療時骨髄検体から微量な細胞を分取し、分取した細胞が CML 細胞であることを確認できる系を構築することとした。</p> <p>まず、微量な細胞を回収する系の立ち上げを試みた。モデル系として <i>BCR/ABL1</i> 陽性の細胞株である K562 株に、GFP 発現ベクターをトランスフェクションしたもの (K562-eGFP) を用いた。フローサイトメーターにより、K562-eGFP を 96 ウェルプレートへ 1, 10, 30, 100, 300, 1000 細胞ずつ、12 ウェルにソートした。ソート後、ウェル中に存在する細胞数を蛍光顕微鏡によりカウントしたところ、10 細胞までは再現性よく分取できることがわかった。</p> <p>続いて、分取した細胞集団中の CML 細胞を検出する系の立ち上げを行った。骨髄中に存在する CML 幹細胞は <i>BCR/ABL1</i> mRNA の発現量が低く、RNA やタンパク質を対象とした検出系では偽陰性を生じる恐れがあるため、DNA を検出する系を構築することとした。検出の標的は <i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子であるが、<i>BCR/ABL1</i> 遺伝子の融合点は、患者によって異なることから、ベンチトップタイプの次世代シーケンサーによる検出を試みた。モデル系として、CML 由来の細胞株 3 種 (K562 株, KCL-22 株, TCC-S 株) を用いた。それぞれの細胞株より DNA を抽出し、これを酵素処理により 150bp 程度に断片化し、これを用いてシーケンサー用のライブラリーを調製した。DNA ライブラリーに、<i>BCR</i> 配列に特異的で、ビオチン標識された RNA 断片 (RNA bait) をハイブリダーゼーションさせ、ストレプトアジピンコートされたマグネティックビーズで DNA-RNA bait 複合体を回収した。回収した複合体から、アルカリ処理にて <i>BCR</i> 配列を含む DNA ライブラリーを得た。このライブラリーの配列を、次世代シーケンサー (MiniSeq) にて解読したところ、3 種の細胞株すべてにおいて、<i>BCR</i> 配列と <i>ABL1</i> 配列の両方にマップされるリードがあることがわかった。これらのリードの配列から、<i>BCR/ABL1</i> 融合点の位置を推定し、プライマーを設計して PCR を行うと、特異的なバンドを得ることができた。得られた PCR 産物の配列は、サンガーシーケンスにより、<i>BCR</i> と <i>ABL1</i> にまたがる領域であることが明らかとなり、それは、細胞株ごとに固有のものであったことから、<i>BCR/ABL1</i> 遺伝子の融合点を標的とした CML 細胞検出系を構築できた。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膵癌における老化と癌微小環境の関連の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	国立大学法人香川大学医学部医学科病理病態・生体防御講座腫瘍病理学・教授・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	東京大学 広域システム科学系・博士研究員・上田善文
	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	金沢大学・がん進展制御研究所腫瘍制御分野・源利成
【研究目的】	<p>老化と癌の関連について、主に癌細胞の解析は進んでいるが、癌微小環境の老化については未だ不明な点が多く残されている。膵癌は高度の線維化を認め、腫瘍血管に乏しいという特殊な癌微小環境を有し、それにより抗癌剤の到達が阻害されると考えられている。近年では、癌微小環境を標的とした治療法の開発が着目されている。癌微小環境を構成する血管、線維芽細胞、免疫細胞等は、癌細胞と異なり遺伝子変異を有さないため、有効な治療標的を発見できれば薬剤耐性獲得を回避できる可能性がある。未だ有効な治療法のない進行膵癌に対し、癌微小環境からアプローチした治療法開発は一つの有望な戦略と考えられる。そこで本研究では、老化に伴う癌微小環境の変化が、膵癌細胞の増殖、浸潤、転移や抗癌剤の効果に与える影響を解明することを目指す。癌微小環境の解析のため、二光子顕微鏡を用い、生体内での癌細胞や癌微小環境構成細胞の動態をリアルタイムに観察する。本研究により、膵癌の新規治療法開発へ向けた基礎的情報が得られる可能性がある。</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。)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 培養細胞株での二光子励起顕微鏡観察 条件検討のため、膵癌培養細胞株を用いた二光子励起顕微鏡での自家蛍光観察を実施した。膵癌培養細胞株、正常膵管上皮細胞株、線維芽細胞株について、二光子励起顕微鏡で自家蛍光を観察でき、それぞれの細胞を自家蛍光パターンで区別できることを確認した (図 1)。 2. 蛍光発現 KPC 細胞株の樹立 マウス由来膵癌細胞株 KPC に、mcherry, GFP を遺伝子導入し、蛍光発現細胞株を作製した (図 2)。 3. KPC 細胞株の肝転移モデル作成 上述の蛍光発現細胞株をマウス脾臓内や眼窩底に注入し、転移腫瘍が形成されることを確認した (図 3)。 4. 肝転移モデルの二光子励起顕微鏡観察 マウスに上述の蛍光発現細胞株を注入した際の、肝臓での腫瘍細胞の動きを二光子励起顕微鏡で観察した (図 4)。 	

現在、老化マウス（1 年齢）と若年マウス（3 週齢）での肝転移形成の違いについて、解析中である。

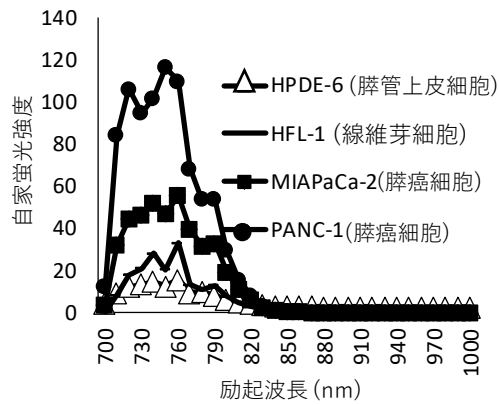


図 1 培養細胞の自家蛍光

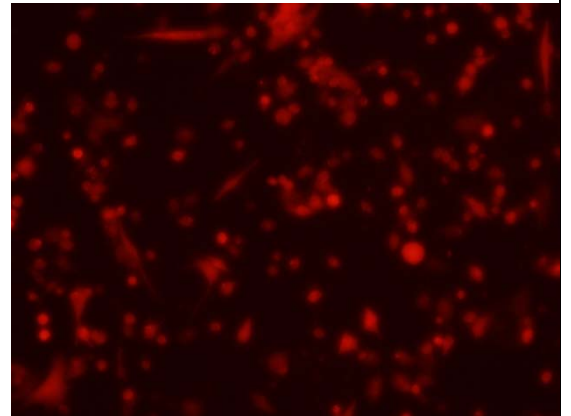


図 2 蛍光発現培養細胞株

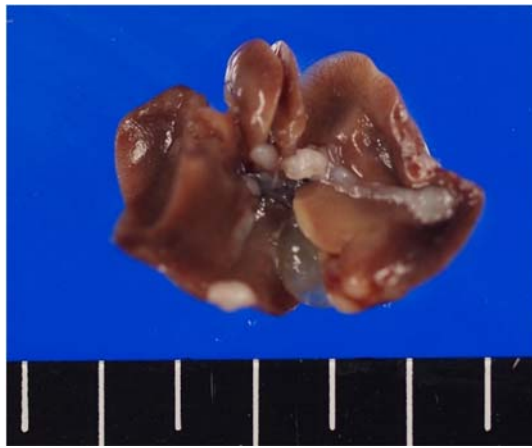


図 3 マウス肝転移

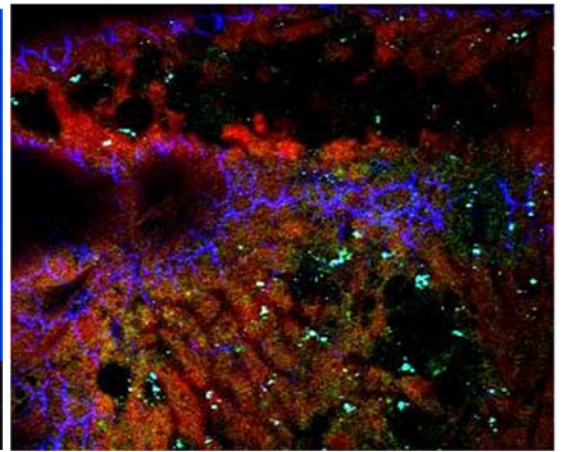


図 4 マウス肝臓の二光子励起顕微鏡観察

【成果等】

【主な論文発表】

Matsuda Y. Age-related morphological changes in the pancreas and their association with pancreatic carcinogenesis. Review. Pathology international 69(8):450-462, 2019.

【学会発表】

松田 陽子、自家蛍光による未染色生細胞の形態的解析、癌ゲノム・エピゲノム研究会、2019年10月5日

【その他特筆事項】

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトサイトメガロウイルス感染大腸がんにおけるケモカインの役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北陸大学 薬学部・講師・武本眞清
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>我が国において結腸直腸がん (colorectal cancer; CRC) の部位別がん罹患数予測は、男女合計第1位であり、部位別がん死亡数予測も男女合計第2位と高く、しかも近年増加傾向にある。ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、これまでに CRC を含む様々ながん組織から検出されている。HCMV は腫瘍原性こそないが、ケモカイン産生等の様々なメカニズムを介して、がん細胞の悪性化亢進に関与することが示唆されている。本研究では、CRC の病態形成における HCMV 感染とケモカイン発現誘導の役割を明らかにするために、CRC 細胞株に HCMV を感染させ、発現上昇するケモカインおよびケモカイン受容体を同定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>CRC 細胞株 (LoVo、SW480) に、HCMV 実験室継代株 (Towne) と臨床分離株 (91S、Merlin) を MOI=0.1 で感染させ、4日後のケモカイン遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR により定量した。LoVo と SW480 で共通して得られた結果として、HCMV 3株のうち、最も強く広汎にケモカイン遺伝子の発現を誘導したのは、91S であった。91S 感染により両細胞で共通して発現上昇したケモカイン遺伝子は、CCL2、CCL5、CCL8、CCL13、CCL16、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL8、CXCL10、CXCL11 であった。その他、CXCL5 と CXCL7 は LoVo でのみ、CCL7 と CCL11 は SW480 でのみ発現上昇が認められた。またケモカイン受容体遺伝子についても、LoVo で CCR2A と CCR2B が、SW480 で CXCR1 が 91S 感染によって発現上昇していた。Towne 感染による遺伝子発現変動幅は 91S より小さく、感染特異的な上昇が認められたのは CCL5、CXCL10、CXCL11 に留まった。興味深いことに、91S と同じく臨床分離株である Merlin は、いくつかのケモカイン遺伝子発現が感染により抑制されており (CCL5、CCL11、CCL16、CXCL6)、両細胞に共通して発現上昇した遺伝子はなかった。</p> <p>91S によるケモカイン遺伝子発現誘導をタンパク質レベルで確認するために、LoVo にウイルス感染させて4日後の培養上清中のケモカインを、抗体アレイ (ProteomeProfiler, R&D SYSTEMS) を用いて検出したが、CCL23 の上昇しか確認することができなかった。その要因としては遺伝子発現とタンパク質発現のタイムラグの可能性が考えられる。</p> <p>本研究により、CRC 細胞株で共通して発現上昇するケモカイン遺伝子を同定したが、タンパク質発現との乖離や、HCMV 株間での発現誘導能の差異が課題として残った。HCMV は極めてゲノム多様性に富むため、CRC のリスク因子となるウイルス株とそうではないウイルス株の存在が示唆される。今後 91S と Merlin のゲノム比較を行うことにより、CRC のリスク因子となる HCMV 遺伝子の特定を進めていきたい。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. ヒト網膜由来細胞株における抗水痘帯状疱疹ウイルス薬の比較検討. 武本眞清、嶺井華、定成秀貴、松原京子、村山次哉、大黒徹. 第67回日本ウイルス学会. 2019年10月. 東京 2. ヒトサイトメガロウイルス増殖が PLSCR1 により抑制される. 定成秀貴、石田朋己、小田切照、草野秀一、武本眞清、大黒徹、村山次哉. 第67回日本ウイルス学会. 2019年10月. 東京 	
【その他特筆事項】		

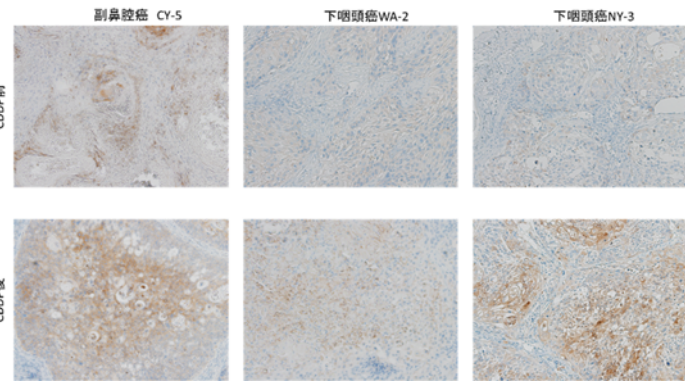
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		薬剤耐性獲得に関わる遺伝子発現制御と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・清水英雄
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	<p>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、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することが重要である。そのためには薬剤耐性獲得のメカニズムを理解することが必要である。これまでの研究から、薬剤耐性に関わる多くの遺伝子変異が同定されている。しかしながら、それらの遺伝子変異が、薬剤の暴露を初めて受けた（ナイーブな）細胞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、時間をかけてそのような遺伝子変化が成立し、ゲノム上に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は、どのようにして生き延びるのか？我々は、その問いに答えるために「初期の細胞サバイバルメカニズム」に焦点を当て研究を行った。</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>ヒト非小胞肺がん細胞株 PC-9 細胞は、ユニークな特徴を有する細胞である。ナイーブな PC-9 細胞は抗がん剤ゲフィチニブに対して強い感受性を示すが、ゲフィチニブの長期暴露によって耐性細胞へと変化する。抗がん剤感受性から耐性への変化が同一の細胞で観察できることから、PC-9 細胞は薬剤耐性獲得の良いモデル細胞として研究されてきた。我々は、この細胞株を用いてゲフィチニブ感受性・耐性細胞での遺伝子発現変化を調べた。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が分かった。そして、FGFR1 阻害剤や FGF2 を用いた細胞生物学的解析から、最初のゲフィチニブ暴露によって死んだ細胞から漏れ出る FGF2 が、まだ生残っている細胞の生存を助けていることを発見した。これは、最初のゲフィチニブ暴露から細胞が生き延びる「利他的なサバイバル戦略」であると考えられる。しかし、このサバイバル戦略は一過性であり、恒久的な薬剤耐性獲得のためには遺伝子の発現制御の変化が必要である。その初期の遺伝子発現制御として、NF-κB の早期の活性化が見出された。他方、別の抗がん剤としてクルクミンの抗腫瘍効果についても解析し、c-Jun NH2 末端キナーゼ (JNK) -関連ロイシンジッパータンパク質 (JLP) がリソソームのポジショニングと p38 MAPK シグナル伝達を調節することによってオートファジーの誘導を調節し、クルクミン誘導のがん細胞死において保護的な役割を担っていることも見出した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>Boldbaatar J., Gunarta IK., Suzuki R., Erdenebaatar P., Davaakhuu G., <u>Hohjoh H.</u>, and <u>Yoshioka K.</u> (2019) Protective role of c-Jun NH2-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in curcumin-induced cancer cell death. <i>BBRC</i>, 522: 697-703.</p>
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	特になし。

研究課題		がん特有の代謝特性を利用した新規抗がん標的探索システムの構築と抗がん剤開発												
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・特任助教・浅井歩												
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・特任教授・石井秀始												
	所属・職名・氏名	大阪大学・寄附講座講師・今野雅允												
	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>前年度までの取り組みにより、がん細胞に特異的な創薬標的として One carbon 代謝中の MTHFD2 を同定し、<i>in silico</i> シミュレーションと実験によるバリデーションにより、MTHFD2 を阻害する候補化合物として MIT, MIN を同定してきた。</p> <p>本研究では、MIT, MIN 及び <i>in silico</i> シミュレーションにおいて MTHFD2 に対して高い親和性を示した mTHF-candidate1,2, NAD-candidate1,2 を添加時の消化器がん細胞の増殖抑制効果を評価した。</p>													
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【研究内容】</p> <p>① In silico スクリーニング： Namiki ライブラリ (約 500 万化合物) を用いて、MTHFD2 の結晶構造 (5TC4) に対して、ドッキングシミュレーションを行った。生体内のタンパク質の構造変化を考慮する分子動力学計算や水分子の影響を考慮する Molecular Mechanics/Generalized Bron Surface Area (MM/GBSA)法を組み合わせ <i>in silico</i> シミュレーションを行った。</p> <p>② 増殖抑制効果の評価： MTHFD2 を高発現している大腸がん細胞株 DLD-1 に対して、<i>in silico</i> スクリーニングで抽出した阻害候補化合物を添加し、Crystal violet 法により、増殖抑制効果を評価した。</p>	<p>【成果】</p> <p>① In silico スクリーニング： MTHFD2 の結晶構造中の 2 つの活性ポケットに対して、<i>in silico</i> スクリーニングを実施したところ、いずれのポケットにおいても本来のリガンドよりも高い親和性を有する化合物を抽出できた (表)。</p> <p>② 増殖抑制効果の評価： 同定した阻害候補化合物を DLD-1 細胞に曝露したところ、論文で報告した MIT 及び MIN は他の候補化合物よりも比較的、増殖抑制効果を示した (図)。</p>												
		<table border="1"> <thead> <tr> <th>Metabolites and compounds</th> <th>ΔG (kJ/mol)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>m-THF</td> <td>-85.7</td> </tr> <tr> <td>l-THF</td> <td>-87.3</td> </tr> <tr> <td>MIT</td> <td>-169</td> </tr> <tr> <td>mTHF-candidate1</td> <td>-155</td> </tr> <tr> <td>mTHF-candidate2</td> <td>-150</td> </tr> </tbody> </table>	Metabolites and compounds	ΔG (kJ/mol)	m-THF	-85.7	l-THF	-87.3	MIT	-169	mTHF-candidate1	-155	mTHF-candidate2	-150
Metabolites and compounds	ΔG (kJ/mol)													
m-THF	-85.7													
l-THF	-87.3													
MIT	-169													
mTHF-candidate1	-155													
mTHF-candidate2	-150													
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Asai A, Koseki J, Konno M, Nishimura T, Gotoh N, Satoh T, Doki Y, Mori M, Ishii H. Drug discovery of anticancer drugs targeting methylenetetrahydrofolate dehydrogenase 2. <i>Heliyon</i>. (2018) 4(12):e01021.</p>													
	<p>【学会発表】</p> <ul style="list-style-type: none"> ● One Carbon 代謝を標的とするがん幹細胞創薬の加速化：第 5 回がんと代謝研究会。 ● がん細胞の転移に関与する One Carbon 代謝を標的とする創薬の新しい展開：第 26 回がん転移学会。 <p>One Carbon 代謝を標的とする新規抗がん剤創薬：第 76 回日本癌学会学術総会。</p>													
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>													

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		PDX モデルを用いた頭頸部癌における癌代謝機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学耳鼻咽喉科頭頸部外科・助教・遠藤 一平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学耳鼻咽喉科頭頸部外科・大学院生・牧田 春菜
	所属・職名・氏名	金沢大学医学保健研究域医学系・教授・吉崎智一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>癌遺伝子の変異は多様で複雑であるが、癌特異的な代謝の経路は解糖系の亢進など一定である。癌細胞では代謝系が変化してグルコース代謝を亢進（解糖系）亢進して増殖や転移に必要な ATP を産生する（Warburg 効果）が知られている。癌は代謝をリプログラミングすることで①エネルギー代謝シグナルを調節し癌細胞の増殖を促し、②オートファジーを用いた細胞生存シグナルから癌細胞死を抑制し、③MRP 2 などの細胞膜輸送蛋白質を通して抗癌剤耐性に寄与している。本研究は、このような癌特異的な代謝経路に着目し、癌代謝で鍵となるヘキソキナーゼ 2 と MPR2 などの細胞膜輸送蛋白質の発現が化学療法前後で変化するか検証する。</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>癌代謝で重要なヘキソキナーゼ 2 は抗癌剤耐性にも関与していることが示唆されている。抗癌剤耐性の癌細胞ではシスプラチンなどの重金属を能動的に排出させるポンプの役割を果たす MRP2 (multidrug resistance protein2) などの分子の発現が認められ、薬剤の細胞内蓄積を制御している。</p> <p>これまで PDX モデルマウスにおいてシスプラチンなどの化学療法を投与することで腫瘍内の MRP2 の発現が亢進していることがわかった。今回さらに、これらの標本のヘキソキナーゼ 2 にて免疫染色を施行した（右図）。上段が化学療法投与前、下段が化学療法投与後であるが、いずれも化学療法投与後においてヘキソキナーゼ 2 の発現が亢進していることが判明した。</p> <p>MRP2 はヘキソキナーゼ 2 により解糖系から得られた ATP を利用していることが知られている。頭頸部癌細胞を移植したマウスモデルにおいて、シスプラチンを投与することでヘキソキナーゼ 2 の発現が亢進し ATP 産生の結果、MRP2 の発現が亢進していることを認め、抗癌剤耐性に寄与していることを示した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		GSK3β/STAT3 経路を基軸とする膵神経内分泌腫瘍の病態解明と治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院 肝胆膵・移植外科 講師・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・消化器・腫瘍・再生外科学 教授・太田哲生
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵神経内分泌腫瘍(pancreatic neuroendocrine tumors: P-NETs)は、インスリノーマ、ガストリノーマ、グルカゴノーマ、VIP 産生腫瘍やソマトスタチノーマが含まれる稀な疾患で、膵悪性疾患の約 3%~5%を占める。治療は外科的切除が原則で、切除された場合の 5 年生存率は約 55%と比較的良好であるが、腫瘍が切除不能の場合にはわずかに約 15%と低率である。また現段階で有効な補助化学療法や切除不能・再発症例に対しての治療法は確立されていない。P-NET の発生・増殖などのメカニズムについても未だ明らかになっていないが、IL-6/Stat3 経路の発現が浸潤などに関与する可能性が報告されている。本研究では切除標本を用いて pStat3 の発現と P-NETs の悪性度との関係を検討するとともに、Stat3 リン酸化作用を有する GSK3β の腫瘍における発現・活性の状況と、GSK3β の阻害により P-NETs に対する抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討する。	
【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>当教室ではこれまでに P-NET の診断のもとに膵切除された患者の検体 42 例を有している。その内訳は非機能性 P-NET が 28 例、機能性 P-NET は 14 例で、機能性 P-NET はグルカゴノーマ 6 例、インスリノーマ 4 例、ソマトスタチノーマ 2 例、ガストリノーマおよび VIPoma が 1 例ずつであった。さらに 2017 年の WHO 分類に従うと G1 が 30 例、G2 が 9 例、G3 が 3 例であった。</p> <p>研究初年度はまず臨床病理学的に 42 例の検討を行った。42 例中 11 例 (26%) が術後に再発を認めており、その内訳は G1 が 46% (5/11)、G2、G3 とともに 27% (3/11) であった。再発形式は肝転移が 91% (10/11) と最も多かった。再発症例では WHO Grade 分類、腫瘍の大きさ (2cm 以上)、リンパ節転移の有無、静脈・リンパ管侵襲の有無と相関していたが、多変量解析ではリンパ節転移のみが再発の危険因子であった。</p> <p>次に標本が得られた 36 症例に対して pStat3 の発現を免疫組織学的に検討した (図 1)。pStat3 の発現は再発症例 11 例中 9 例 (82%) に認められた。一方、再発を認めなかった 25 例中 pStat3 の発現は 10 例 (40%) に認められ、pStat3 の発現症例では有意に再発が高率であった (p=0.02)。</p> <p>これらの結果より pStat3 の発現を抑制することで再発などのリスクを軽減できる可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

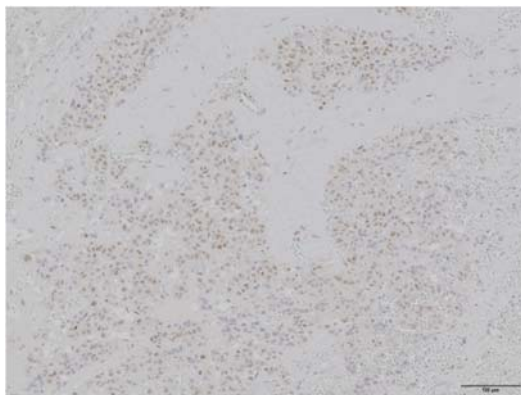


図1

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肺がんの患者由来腫瘍ゼノグラフト(PDX)モデルの作成
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・准教授・松本 勲
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学・講師・田村昌也
	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>近年、患者由来腫瘍を免疫不全マウスに直接移植する patient derived xenograft (PDX) モデルは、ヒトがん組織を忠実に再現することが知られており、個々の患者のがん組織を実験動物レベルで再現するモデルとして、がん研究に必要不可欠となっている。</p> <p>金沢大学附属病院呼吸器外科では、がん進展制御研究所研究所腫瘍内科の矢野教授との共同研究として、呼吸器外科が肺がん患者の切除組織を提供し腫瘍内科が免疫不全マウスに移植するプロジェクトを平成 28 年 6 月から開始している。本課題は、さらに症例において PDX モデルの確立を行うとともに、PDX モデルで増大した腫瘍の凍結保存と臨床情報のデータベース化を強化し、将来の共同研究基盤を強固にすることを目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>外科的切除された非小細胞肺がん 30 例の腫瘍組織を免疫不全マウスに移植した結果、腺がん 16.7% (3/18)、扁平上皮がん 60% (6/10)、大細胞がん 50% (1/2) において PDX 作成に成功した。扁平上皮がん、進行した臨床病期(III/IV 期)、縦郭リンパ節転移あり、FDG-PET の集積が高い症例において PDX の成功率が高い傾向が見られた。手術組織と PDX の腫瘍において、がん細胞の遺伝子変異や遺伝子発現は保たれる傾向が見られたが、2 回継代後には PDX の間質はマウス細胞に置換されていた。PDX が樹立できた腺がん 3 例のうち 2 例に EGFR 変異が見られ、それら PDX は EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (ゲフィチニブおよびオシメルチニブ) に高い感受性を示した。そのうち 1 例においては PDX モデルにおいて上皮間葉移行(EMT)によるオシメルチニブ耐性が再現性をもって誘導できた。以上より、本 EGFR 変異肺がんの PDX モデルは、EMT によるオシメルチニブ耐性の分子機構の解明や治療法開発に有用であることが示された。本研究成果は、2019 年 10 月 Cancer Science 誌に掲載された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Kita K, Fukuda K, Takahashi H, Tanimoto A, Nishiyama A, Arai S, Takeuchi S, Yamashita K, Ohtsubo K, Otani S, Yanagimura N, Suzuki C, Ikeda H, Tamura M, Matsumoto I, Yano S . Patient-derived xenograft models of non-small cell lung cancer for evaluating targeted drug sensitivity and resistance. Cancer Sci , 2019 Oct;110(10):3215-3224.
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和元年度 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 HER2 治療抵抗性腫瘍の耐性機序と癌幹細胞特性減弱の意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院 乳腺外科・助教・石川 聡子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所・教授・後藤典子
	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・平尾 敦
【研究目的】	HER2 陽性乳癌は乳癌の約 20%を占め、Trastuzumab や Pertuzumab、T-DM1 など抗 HER2 療法による予後改善効果が期待される。一方 HER2 発現症例の 25%が抗 HER2 療法抵抗性を示すことが報告されている。治療による幹細胞様特性が抗 HER2 治療抵抗性と関連するという予備実験結果から、抗 HER2 療法抵抗性を示す検体を集積し、抗 HER2 療法感受性腫瘍細胞との遺伝子発現を網羅的に解析し stem-cell related gene の発現を評価し、抗 HER2 療法耐性機序に対する新たな治療戦略を構築する。	
【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>2012 年～2019 年に当院で薬物療法を施行した HER2 陽性転移・再発乳癌 19 症例 (median age 59、StageIV17 例再発 2 例) の治療経過において、11 症例 (Luminal HER2 type 4 例/HER2 type 7 例) で治療開始前および抗 HER2 療法 (Trastuzumab/Pertuzumab/Docetaxel, T-DM1, Trastuzumab/Eribulin) 治療中に PD となった時点の原発巣生検組織および手術による局所切除標本が得られた。抗 HER2 療法抵抗性の検体として手術検体 5、生検組織 11 検体：計 16 検体が蓄積され、2020 年 4 月までに T-DM1 治療前後の 7 症例 14 検体を採取した。2 例が T-DM1 奏効症例 (6 か月以上の奏功期間)、5 例が T-DM1 不応症例 (6 か月未満の治療期間) であった。</p> <p>T-DM1 奏効症例 1 例の T-DM1 治療前組織において遺伝子解析を実施し、AKT1/ERBB2/PIK3CA/MDM2/MYC/RAD51D/ABL1/FGF10/MAPK2K4/NBN/RARA/TP53 の複数の遺伝子所見を捉えた。奏効症例の T-DM1 治療後 PD となった組織での遺伝子変化を解析するとともに、T-DM1 不応症例の治療前後組織の遺伝子変化を追加で解析し T-DM1 治療抵抗性に関わる stem-cell related gene 発現の位置づけを明らかにする。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		遺伝子異常に基づくがん幹細胞を指標とした発がん分子機構の解明
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的研究分野・研究員・中奥敬史
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的研究分野・分野長・河野隆志
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>クリニカルシーケンスの集積データから EGFR 全領域を見渡した場合、ホットスポット変異を含む発がん関連する既知の変異が全体の 40~50%を占める一方で、依然 50~60%は VUS であり、遺伝子異常の診断による治療上の意義は明らかになっていない。さらに、細胞外ドメインのみを集積した場合には、VUS の頻度は 80%以上に上る。がんゲノム医療の広がりの中、より適切な患者選択を行うために、このような VUS の機能を明らかにし、阻害剤への感受性を調べる事が求められている。そこで本研究では、特に VUS が多くを占める EGFR の細胞外ドメインの遺伝子異常に着目し、その遺伝子変化によるがん形質獲得(がん幹細胞様形質を含む)への影響を調べることで、VUS の意義付けを行うことを目的とする。また、明らかとなった遺伝子異常による機能獲得が阻害剤によってどのような影響を受けるか調べることで治療方法を探索する。本研究の成果は、VUS の意義付けを行い、より適切な患者選択に向けた、がん個別化医療の推進に寄与するものである。</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>本研究では、申請者が RET 融合上に生じた機能獲得型変異である S904F の解析に用いた手法(Nakaoku T, Kohno T, et al. Nat Commun. 2018)を応用させ。複数の EGFR の細胞外ドメインの活性型変異や VUS を対象に選出し、Ba/F3 細胞や一過性発現モデルに発現させ、そのアミノ酸変化によるがん形質獲得の有無を調べる。形質転換・獲得した細胞には、阻害剤を使用することで、その形質に与える影響を調べる。</p> <p>1: SCRUM-JAPAN からのレアバリエント・VUS データの収集 10,000 例超の進行肺がん・消化器がんを有する SCRUM-Japan の EGFR 遺伝子異常情報を収集した。EGFR 阻害剤の治療歴の有無や、治療の際には治療効果の情報の収集を行った。稀なホットスポット変異や VUS の集積をキナーゼ遺伝子ごとにリスト化し、ドメインや構造情報に着目しつつ、ドメイン、モチーフ、残基単位で集計し、変異の起こりやすさを統計学的に示すことで、バリエントの機能予測を見据えた重み付けに着手し、候補遺伝子異常を選出した。</p> <p>2: EGFR 遺伝子異常の in vitro 解析データ取得 解析対象の遺伝子異常を機能解析のために、バリエント遺伝子発現レンチウィルスベクターの構築を行った。同遺伝子ライブラリー細胞株に発現させ、形質転換として NIH-3T3 細胞での足場非依存性や、Ba/F3 での増殖因子依存性増殖能の獲得を調べている。遺伝子異常発現細胞に対して、標的治療薬を使用し、その感受性を調べることで、薬剤標的性を検討も行っている。結晶構造のデータに基づいて、アミノ酸変化情報を反映させ、機能変化や薬剤感受性の分子機構の解明を行う方針である。また、変異による 2 量体化に与える影響は、ジスルフィド結合による 2 量体化を調べる他、EGFR の細胞外ドメインのみを発現し、2 量体化による距離が近づきを検出する細胞ベースのアッセイ系を構築し、その変異体での機能変化を調べる。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おり、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】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Nakaoku T, Kohno T*, et al. A Secondary RET Mutation in the Activation Loop Conferring Resistance to Vandetanib. Nature Communications. 2018, 9, 625 2. Ikemura S, Yasuda H*, ..., Kohno T, Okuno Y, Goto K, Tsuchihara K*, Soejima K. Molecular dynamics simulation-guided drug sensitivity prediction for lung cancer with rare EGFR mutations. Proc Natl Acad Sci USA. 116(20):10025-10030, 2019. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Takashi Nakaoku, ..., Takashi Kohno; Identification of mechanisms of drug resistance in RET-rearranged lung cancer. 第 78 回日本癌学会学術総会、京都、日本。2019 年 9 月。ポスター <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		In vitro がん微小環境モデルを用いた大腸がん悪性化機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学生産技術研究所・准教授・松永行子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・准教授・大島浩子
	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・大島正伸
【研究目的】	<p>ゲノム研究の発展により、大腸がん発生に関わる遺伝子変異の全体像が明らかとなり、それらの遺伝子変異の積み重ねが悪性化を誘導するという「多段階発がん」の概念が確立している。一方で、単一細胞の遺伝子解析技術が実用化され、実際のがん組織では、遺伝子変異の段階的蓄積があるだけではなく、遺伝子変異パターンが異なる多様な細胞集団が構成していることが明らかになってきた。本研究では、このような遺伝子変異パターンが異なる多様な細胞集団を、血管構造を有する in vitro がん微小環境モデルに配置し、血管との相互作用を顕微鏡下で観察することで転移能に関する情報を取得し、それぞれの細胞の機能的な違いにつ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>大島研究室(金沢大がん研)では、大腸がんに関わるドライバー遺伝子変異を持つオルガノイドを確立し、それぞれの遺伝子変異の役割についての研究を行なっている。これまでに、Apc 遺伝子と変異型 p53 遺伝子を持つオルガノイド(AP)は転移能を持たないが、Apc 遺伝子欠損・変異型 K-Ras 発現・Tgfr2 遺伝子欠損・変異型 p53 遺伝子のオルガノイド(AKTP)は、転移能を獲得することを動物実験で明らかにしている。</p> <p>AP および AKTP 細胞をハンギングドロップ法により培養し、サイズを制御したオルガノイドを形成した。直径 200 μm の管腔を有するコラーゲンゲルを形成するとともに、同時に管腔の周囲に AP 細胞のオルガノイドまたは AKTP 細胞のオルガノイドを配置した。管腔内にヒト臍帯静脈由来内皮細胞(HUVEC)を培養し微小血管を伴うがん微小環境モデルを構築した。</p> <p>本 in vitro デバイス内で非転移性の AP は全ての細胞が血管内侵入を示さないが、転移性の AKTP は血管内皮細胞と相互作用して、一部の細胞が血管内浸潤を示すことが明らかとなった。どのような条件で血管内浸潤が起こるのか今後詳細な実験を重ねるとともに、今回、本デバイスが血行性転移のメカニズムを解明する有用なツールとして利用可能なことが示された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	池田行徳, 中島忠章, 大島浩子, 大島正伸, 松永行子, 第 14 回ナノ・バイオメディカル学会, 東京, 2019 年 11 月
	【その他特筆事項】	

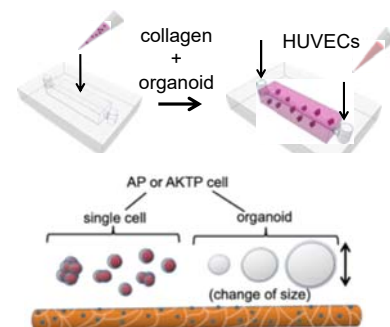
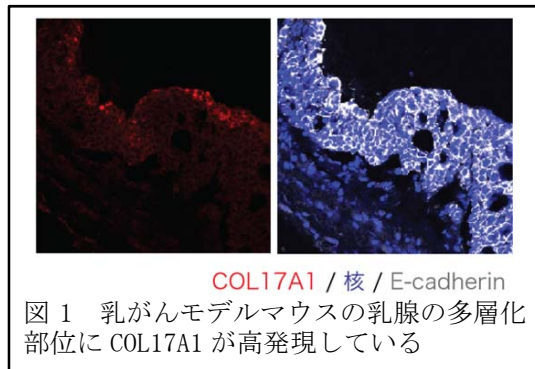


図 1. 本研究で構築した in vitro がん微小環境モデルの模式図

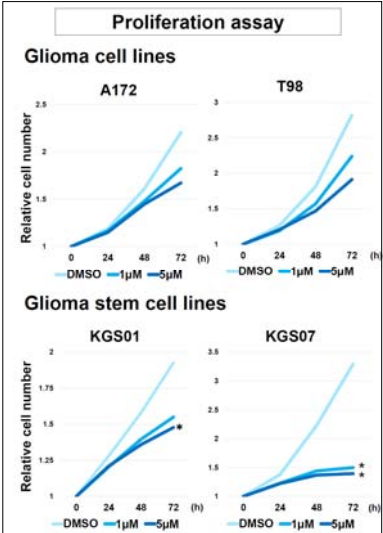
令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がんモデルマウス・オルガノイド・がん幹細胞培養系を用いた早期段階のがんを認識する抗体の評価
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・谷村信行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学・教授・藤田恭之
	所属・職名・氏名	北海道大学・特別研究学生・小澤慶
	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】	現在の主要ながんの診断や治療は、がん原性の変異が蓄積し、がん化が進展したものを対象としている。一方、がん発生の初期段階において、変異細胞を検出し、その悪性を阻害することはがん治療にとって重要であると考えられる。例えば、難治性がんである膵がんは、がんの進展過程の比較的初期から他の臓器へ転移することが知られている。しかし、初期段階のがん細胞を対象とした研究は十分に進んではない。そこで、本研究は、がん発生の極めて初期の段階を培養細胞系を用いて再現し、そこで起こる現象を分子レベルで解析することにより、初期のがん細胞を認識してその悪性を阻害する分子機構を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>上皮組織中に最初に変異細胞が生じた時、変異細胞と正常上皮細胞は混在していると考えられる。そこで、正常上皮細胞であるイヌ腎尿細管上皮由来の MDCK 細胞と、活性化型変異タンパク質 RasV12 を過剰発現するがん原性 MDCK 細胞を混合して培養した。この共培養条件下で、ファージ抗体ディスプレイ法を用いたスクリーニングを行い、両者の境界である細胞間接着部位に局在する膜タンパク質を認識する抗体を単離した。この抗体を用いて免疫沈降を行い、抗体が認識するタンパク質を質量分析によって解析した結果、膜貫通型 2 型コラーゲンタンパク質 COL17A1 が同定された。この COL17A1 を認識する抗体を用いた免疫染色により、COL17A1 が、がん原性変異細胞で高発現していることが示された。さらに、COL17A1 は、がん原性変異細胞が増殖に伴い多層化した部位において顕著に発現上昇していることが示された。さらに、がん原性変異細胞が多層構造を形成することに COL17A1 が関与していることが示唆された。</p> <p>次に、COL17A1 と多層化した前がん病変との関連を検討した。単離された抗体を用いた免疫染色を行なった結果、膵臓がんモデルマウスの多層化前がん病変において、COL17A1 が高発現していることが示唆された。さらに、後藤典子教授にご提供頂いた、乳房上皮特異的に活性化型がん遺伝子 <i>ErbB2</i> を発現する乳がんモデルマウスを用いた解析を行なった結果、乳腺の多層化部位特異的に COL17A1 の発現が上昇していることが示唆された (図 1)。したがって、本共同研究によって、膵臓と乳腺という複数の組織における前がん病変での上皮細胞の多層化に COL17A1 が関与していることを示すことができた。今後は、COL17A1 が上皮の多層化を制御する機構を明らかにすることにより、初期段階のがん発生機構の解明を目指す。</p> <p>最後になりましたが、がん進展制御研究所からのご支援と共同研究を行なって頂いた分子病態研究分野の後藤典子教授に深く感謝致します。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Takeuchi, Y., Narumi, R., Akiyama, R., Vitiello, E., Shirai, T., <u>Tanimura, N.</u> , Kuromiya, K., Ishikawa, S., Kajita, M., Tada, M., Haraoka, Y., Akieda, Y., Ishitani, T., Fujioka, Y., Ohba, Y., Yamada, S., Hosokawa, Y., Toyama, Y., Matsui, T., and Fujita, Y. (2019). Calcium Wave Promotes Cell Extrusion. <i>Curr. Biol.</i> 30, 670-681.
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	



令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		グリオブラストーマに観察される細胞死を誘導する分子機構の解析
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・教授・近藤 亨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・助教・池田 直輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	<p>代表的な脳腫瘍である神経膠芽腫（GBM）は、発生臓器の重要性から外科的切除が困難である上に抗癌剤・放射線療法に耐性である。これはGBMに存在するGBM幹細胞（GIC）とその周辺細胞（ニッチ細胞）が治療抵抗性に関与していると考えられている。申請者らはこれまでにヒトGBMを模倣するマウスGIC株の樹立と性状解析、新規腫瘍抑制分泌因子Ecr4の同定とその抗腫瘍メカニズムを明らかにしてきた。これらの研究過程で、Ecr4欠損GICが野生型マウス脳に広範な壊死と血管新生を伴うヒトGBMに酷似した腫瘍を形成することを発見した。本研究課題では、GBMの特徴の1つ細胞死におけるEcr4の機能を解析し、Ecr4を介したGBM組織内ネットワークの一端の解明を目的として遂行する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>研究代表者らのこれまでの研究から、新規腫瘍抑制分泌因子Ecr4がミクログリア/マクロファージを活性化し炎症性サイトカイン発現・分泌を誘導すること、Ecr4欠損マウスグリオーマ幹細胞（GIC）が野生型GICに比べて高効率に細胞死と血管新生を伴う脳腫瘍を形成することを報告してきた。本研究では、Ecr4の抗腫瘍効果に関わる分子メカニズムの解明を目的として遂行している。</p> <p>昨年度までに、Ecr4欠損GICと野生型GICが形成する脳腫瘍に浸潤しているミクログリア/マクロファージの精製を試みてきたが、遺伝子発現解析に必要なRNA量を確保できていない。Ecr4の抗腫瘍効果の分子メカニズムを効率よく解析するために、B16メラノーマ細胞を用いた皮下腫瘍モデル実験を進め、<u>(1) B16細胞が野生型マウスに比べてEcr4欠損マウスで腫瘍形成を亢進していることを発見した。</u> B16細胞はEcr4を発現していないことから、ホスト細胞由来のEcr4がB16細胞に直接又は間接的に働き、抗腫瘍効果を発揮していると考えられる。Ecr4は2種類のプロテアーゼにより3領域に断片化され、その2つがそれぞれミクログリア/マクロファージを活性化することから、<u>(2) これら3つのEcr4断片を発現するベクターを作製し、これらベクターを発現するB16細胞を樹立した。</u> 加えて、<u>(3) 3つのEcr4断片を293T細胞に発現させ、in vitro実験に十分な量のタンパク質を精製した。</u></p>	
【成果等】	【主な論文発表】	本研究課題に関わる発表論文はありません。
	【学会発表】	ありません。
	【その他特筆事項】	ありません。

研究課題	抗膠芽腫作用を有する既存薬を用いた基礎実験による臨床応用への基盤構築	
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・玉井 翔
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	本研究は、ドラッグリポジショニングの手法により、膠芽腫発生の起源となる脳腫瘍幹細胞を治療標的として、現在の化学療法を増強する既存薬剤を探索し、これを使用した悪性脳腫瘍の新規化学療法の基礎基盤を構築するものである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><背景> これまでに、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低濃度で強い抗腫瘍作用を有する薬剤ペンタミジンが抽出された。本剤の効果を検証するために、汎用されているグリオーマ細胞株 2 種類(T98、A172)および、当科にて手術検体より独自に確立したグリオーマ幹細胞株 2 種類(KGS01、KGS07)を使用し <i>in vitro</i> の実験を行った。細胞増殖抑制効果、がん幹細胞性抑制効果および細胞内におけるシグナル伝達変化をそれぞれ増殖アッセイ、スフェア形成アッセイおよび western blotting により評価した。</p> <p><結果> 増殖アッセイでは、すべての細胞株においてペンタミジンによる濃度依存性の細胞増殖抑制効果を認めた (図)。スフェア形成アッセイでは薬剤濃度依存性のスフェア数および長径の減少を認めた。Western blotting では、グリオーマ細胞株 2 種類における 1-5μM の薬剤暴露 6-12 時間後での STAT3 活性の低下を認めた。また、グリオーマ幹細胞株 2 種類についても 5μM の薬剤暴露 24 時間後で活性低下を認めた。</p> <p><考察> ペンタミジンは <i>pneumocystis jirovecii</i> に対する治療薬として広く使用されている抗真菌薬である。STAT3 は、幹細胞性維持に重要な働きを担っている転写因子である。STAT3 の阻害により、グリオーマ細胞の増殖能および浸潤能の抑制、化学療法に対する感受性の改善作用が報告されている。細胞増殖および幹細胞性維持に重要な STAT3 の抑制により、ペンタミジンがグリオーマ細胞およびグリオーマ幹細胞の双方に対して抗腫瘍効果を示したと考えられた。</p> <p><結論> 薬事承認薬であるペンタミジンがグリオーマ細胞およびグリオーマ幹細胞に対して STAT3 活性低下を介した抗腫瘍効果を示すことを見出した。今後は更なる <i>in vitro</i> の実験と <i>in vivo</i> 実験ののち臨床研究を計画する予定である。</p> 	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Jiapaer S, Furuta T, Dong Y, Kitabayashi T, Sabit H, Zhang J, Zhang G, Tanaka S, Kobayashi M, <u>Hirao A</u>, <u>Nakada M</u>. Identification of 2-fluoropalmitic acid as a potential therapeutic agent against glioblastoma. <i>Current Pharmaceutical Design</i> in press <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 玉井翔、淑瑠へムラサビット、サビエルジャンジャパル、張光濤、張家康、王一、田中慎吾、木下雅史、平尾敦、中田光俊 ドラッグリポジショニングを用いた抗グリオーマ幹細胞作用を有する既存薬剤の探索 (シンポジウム) 第 20 回日本分子脳神経外科学会, 令和元年 8 月 9 日-10 日, 東京 <u>Tamai S</u>, Jiapaer S, Zhang G, Zhang J, Sabit H, Tanaka S, Kinoshita M, <u>Hirao A</u>, <u>Nakada M</u>. Translational research of new chemotherapy for glioblastoma; targeting of glioma cells and glioma stem cells using drug repositioning. 67th Congress of Neurological Surgeons Annual Meeting, October 19-23, 2019, San Francisco, CA, USA <u>Tamai S</u>, Jiapaer S, Zhang G, Zhang J, Wang Y, Sabit H, Tanaka S, Kinoshita M, <u>Hirao A</u>, <u>Nakada M</u>. Pentamidine; a new chemotherapy targeting on glioma stem like cells. 24th Society for Neuro-Oncology Annual Meeting, November 20-24, 2019, Phoenix, AZ, USA 	
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>特許出願 令和元年 7 月 29 日出願 中田光俊, 玉井翔 特願 2019-138954 がん幹細胞の自己複製阻害剤及び STAT3 のリン酸化阻害剤</p>	

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		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	京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療部・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	京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療部・院生・神尾 尚馨
	所属・職名・氏名	京都大学医学部附属病院・輸血細胞治療部・研究生・佐賀井 聡
	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>BCR-ABL 融合蛋白質は慢性骨髄性白血病(CML)の原因遺伝子であり、好塩基球増多と好塩基球からの CCL3 分泌による正常造血幹細胞の駆逐を介して白血病の進展をもたらす(Baba T et al. Blood, 2016)。われわれは、BCR-ABL の下流で活性化された転写因子 C/EBPβが(Leukemia, 2013、Blood Adv, 2019)、これらの CML の病態形成に関与していることを明らかにしつつある。本研究では、さらにその分子メカニズムを明らかとするために、1) C/EBPβによる好塩基球の分化・増殖制御の分子メカニズム、2) C/EBPβによる CCL3 の発現制御が、好塩基球分化を介したのか、あるいは直接に制御しているかを明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>好塩基球造血及び CCL3 発現制御における C/EBPβの機能を解明するために以下の検討を行った。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ BCR-ABL を遺伝子導入した野生型マウスまたは C/EBPβ ノックアウト(KO)マウス由来の骨髄細胞を、致死量放射線照射後の野生型マウスに移植した。移植後 12~14 日後のレシピエントの骨髄をフローサイトメトリーで解析したところ、KO 骨髄細胞のレシピエントでは、野生型細胞のレシピエントに比較して好塩基球の増多が有意に抑制されていたのに対して、肥満細胞への分化には明らかな差を認めなかった。共通骨髄球系前駆細胞を含む Lineage⁻ c-Kit⁺ Sca-1⁻細胞は KO 骨髄細胞のレシピエントで多いことから、共通骨髄球系前駆細胞以降の分化過程において差が生じていることが示唆された。定常状態の KO マウスの好塩基球および肥満細胞数は、野生型マウスと比して少なくないため、CML に特異的な現象と考えられる。好塩基球と肥満細胞は、造血分化過程で一部共通の経路をたどるが、現時点では分化経路中の C/EBPβの作用点の同定には至っておらず、引き続き検討が必要である。 ・ BCR-ABL 遺伝子導入後の骨髄を移植したレシピエントから好塩基球を分離して qRT-PCR を実施したところ、CCL3 の発現は野生型細胞に比べて KO 細胞で有意に低いことから、C/EBPβ は好塩基球の分化のみならず CCL3 の発現誘導においても直接関与していることが示唆された。 ・ CCL3 のプロモーター部分には、C/EBPβが結合しうる塩基配列が存在している。現在マウス造血幹細胞株 EML 細胞を用いて、BCR-ABL の過剰発現時及び、C/EBPβの過剰発現によって、C/EBPβが同部位に結合するかどうかをクロマチン免疫沈降法によって明らかにすべく条件検討中である。 <p>転写因子 C/EBPβは、CML の好塩基球増多と CCL3 発現制御のそれぞれに直接関与していると考えられる。今後白血病進展制御のために、好塩基球分化過程での作用段階の決定とそこでの作用機序に関するさらに詳細な分子メカニズム解明が必要である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1) 横田明日美、<u>平位秀世</u> : Introduce My Article “C/EBPβ is a critical mediator of IFN-α-induced exhaustion of chronic myeloid leukemia stem cells. Blood Advances.” : 臨床血液. 60(7), 864, 2019</p> <p>2) <u>平位秀世</u> : I. 総論 2. 免疫系を構成する細胞・細胞亜群とその機能 : 5) 顆粒球(好中球、好酸球、好塩基球、肥満細胞) : 「小児内科」, vol. 54 (8), 1099-1103, 2019</p>	

3) 平位秀世、横田明日美、前川平 : CML 幹細胞に対する Interferon- α の作用機構 : Bio Clinica vol34(6):74-77, 2019

4) Ogawa R, Yamamoto T, Hirai H, Hanada K, Kiyasu Y, Nishikawa G, Mizuno R, Inamoto S, Itatani Y, Sakai Y, Kawada K: Loss of SMAD4 promotes colorectal cancer progression by recruiting tumor-associated neutrophils via CXCL1/8-CXCR2 axis. : Clinical Cancer Research, 25(9): 2887-2899, 2019

【学会発表】

1) Sato A, Yokota A, HayashiY, Kamio N, SagaiS, Maekawa T and Hirai H : C/EBP β Isoforms Regulate Proliferation and Differentiation of Regenerating Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. : American Society of Hematology, 60th Annual Meeting and Exposition, Orlando, FL, USA, December 9, 2019.

2) Hirai H : C/EBP β isoforms regulate hematopoietic stem cells under stress conditions. : December 4th Symposium “Gene Regulation in Differentiation and Cancer” : Boston, MA, USA, Dec 4, 2019

【その他特筆事項】

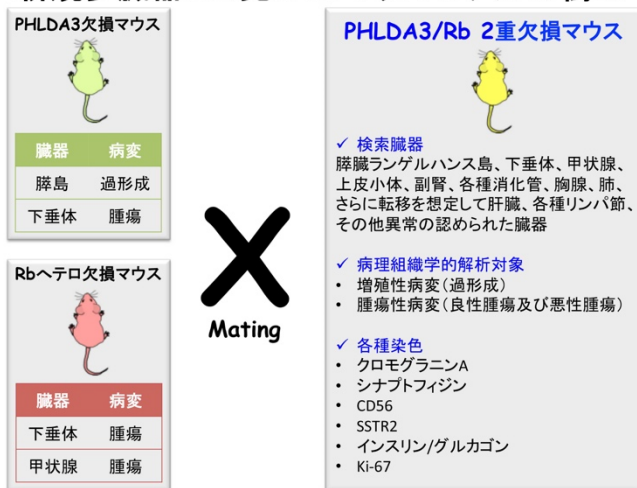
無し

令和元年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞性制御に働くヘキソサミン代謝シグナルの解明と創薬
研究代表者	所属・職名・氏名	京都産業大学・教授・板野 直樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都産業大学・研究助教・小林 孝
	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>がん幹細胞は、抗がん剤や放射線治療に耐性を示し、治療後も残存してがん細胞を生み続けて再発を引き起こすとされ、がんの根治的治療を阻む最大の要因と考えられている。従って、今日の対がん戦略は、がん幹細胞をいかに制圧するか、という点にあることは言を俟たない。我々は、がん幹細胞性の制御機構として、“ヘキソサミン合成経路 (HBP)” を中心とした糖代謝のリプログラミングが深く関わっているとの新知見を得ている。そこで本研究では、HBPの下流で働くヘキソサミン代謝シグナルががん幹細胞性の制御に働く機構の解明とその成果に基づく創薬を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>乳がん臨床検体の遺伝子発現データベースを解析し、HBP 酵素遺伝子群の発現が、乳がんに関連して上昇していることを見出した。HBP は、細胞内糖代謝の主要プログラムであり、最終産物のウリジン二リン酸-N-アセチルグルコサミン (UDP-GlcNAc) の供給により、タンパク質の O-GlcNAc 修飾やヒアルロン酸糖鎖シグナルを上流で調節している。そこで、乳がん臨床検体を用いて、ヒアルロン酸合成酵素 (HAS) の遺伝子発現を解析し、ヒアルロン酸合成酵素 2 (HAS2) 遺伝子が、乳がんの進展や予後と密接に関連して発現していることを明らかにした。この傾向は、HAS2 と HBP の律速酵素であるグルタミン・フルクトース 6-リン酸アミドトランスフェラーゼ (GFAT) との共発現において、より顕著であった。進行性乳がんモデルマウスの乳がんより樹立したがん細胞を用いて、HBP 酵素遺伝子群と HAS2 遺伝子の発現を解析し、がんの悪性化やがん幹細胞の割合と関連して、これら遺伝子の発現が亢進していることを明らかにした。</p> <p>次に、乳がんの進展に働く HBP 下流シグナルを特定するため、進行性乳がんモデルマウスの乳がんより樹立したがん細胞を用いて、ヒアルロン酸糖鎖シグナルを遺伝子改変技術により抑制した。その結果、がん幹細胞性が減弱し、免疫不全マウスにおける造腫瘍能が低下することを明らかにした。さらに、ヒアルロン酸糖鎖シグナルの抑制により、抗がん剤シスプラチンによるがん細胞の細胞死が上昇し、抗がん剤抵抗性が減弱することを示した。HBP 下流シグナルとして働くタンパク質の O-GlcNAc 修飾について同様の解析を行ったところ、O-GlcNAc 修飾が進行性乳がん細胞で上昇していることが明らかとなった。さらに、O-GlcNAc 転移酵素の阻害剤による O-GlcNAc 修飾の阻害が、がん幹細胞性を抑制し、この効果が、ヒアルロン酸糖鎖シグナルの抑制によりさらに増強されることを見出した。一方、阻害剤による O-GlcNAc 修飾の抑制が、ヒアルロン酸糖鎖シグナルの抑制により低下したシスプラチン抵抗性を再度上昇させることを明らかにした。以上の結果は、HBP 代謝と連動したヒアルロン酸糖鎖シグナルと O-GlcNAc 修飾が、がん幹細胞性の制御において相互補完的に機能しており、両者のバランスが、がん幹細胞の抗がん剤耐性獲得に重要であることを示唆している。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Chokchaitaweasuk C, Kobayashi T, Izumikawa T, Itano N. Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling networks involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to exacerbate breast cancer. <i>Cell Death & Disease</i> 10:803 (2019) 2. Itano N. Implications of altered O-glycosylation in tumour immune evasion. <i>J Biochem.</i> 165:387-390 (2019) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Itano N. Enhanced hexosamine metabolism drives metabolic and signaling circuit involving hyaluronan production and O-GlcNAcylation to promote cancer stem-like properties. Hyaluronan 2019 (Cardiff, UK) 2. 小林孝、Chatchadawalai Chokchaitaweasuk、泉川友美、板野直樹 ヒアルロン酸産生はヘキソサミン合成経路を介してがん幹細胞性を制御する 第 38 回日本糖質学会年会(名古屋) 3. Chatchadawalai Chokchaitaweasuk、小林孝、泉川友美、板野直樹 ヒアルロン酸合成に伴うがんの悪性化とヘキソサミン合成経路の代謝流束および O-GlcNAc 修飾の亢進 第 92 回日本生化学会大会(横浜) <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究課題		Rb/p53 経路の機能欠損を伴った新規 NET 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・基礎腫瘍学ユニット 特任研究員・チン ヨ
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・基礎腫瘍学ユニット 特任研究員・青木 清乃
	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	腫瘍分子生物学研究分野・教授・高橋 智聡
【研究目的】	神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor; 以下 NET) は、神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、肺、膵臓、下垂体、消化管、甲状腺など様々な臓器に生じることが知られている。しかし、NET は希少がんであるため、サンプルの収集が難しいことや動物モデルの開発が遅れていることにより、腫瘍の発生機序は十分に解明されておらず、分子標的治療薬の開発も遅れているのが現状である。そこで、本研究の目的は、新規 NET を発症するモデルマウスの開発及び解析により NET の発生機序を解明することと、NET の治療・診断マーカーを探索することである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【研究内容】 我々は、p53 の標的遺伝子 <i>PHLDA3</i> が Akt の活性化を抑制する機能を持つこと、そして肺 NET において <i>PHLDA3</i> の機能が失われていることを明らかにした (Cell, 2009)。さらに、ヒト膵 NET、直腸 NET において <i>PHLDA3</i> は非常に高頻度な LOH を呈し、予後不良及び多発がん重要な因子であること、<i>PHLDA3</i> 欠損マウスで膵島過形成を高度に呈することを明らかにした (PNAS, 2014, Scientific Reports, 2019)。加えて、ヒト下垂体 NET 及び甲状腺 NET においても <i>PHLDA3</i> の LOH が高頻度に観察されたこと (未発表データ)、<i>PHLDA3</i> 欠損の雌マウスにおいて下垂体 NET が高頻度に発生すること (未発表データ) を見出した。以上のことより、<i>PHLDA3</i> は様々な臓器に発症する NET 共通のがん抑制遺伝子であることが示唆され、<i>PHLDA3</i> 欠損マウスは新規 NET 発症のマウスモデルとなる可能性が示された。一方、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> のヘテロ欠損マウスは、甲状腺 NET (C-cell adenoma) 及び下垂体 NET が発症する。そこで、本研究では、<i>PHLDA3</i> と <i>Rb</i> を同時に欠損した二重欠損マウスモデルを作製し、<i>Rb</i> 不活化に加えて <i>PHLDA3</i> 不活化が NET の発症・悪性化に及ぼす影響を検討した。詳細な研究内容は以下 3 点である (図参照)。</p> <p>① <i>PHLDA3</i> 単独欠損マウス及び <i>Rb</i> 単独ヘテロ欠損マウスを掛け合わせ、<i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを作製した。さらに、作製した二重欠損マウスを最大 60 週齢で解剖を行い、全身の臓器に対して肉眼的及び病理組織学的解析を行った。</p> <p>② <i>PHLDA3</i> 及び <i>Rb</i> の単独欠損マウスと比較し、<i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスにて全身諸臓器における新規 NET の発見、または既知の甲状腺及び下垂体 NET の悪性化・転移の有無を調べた。</p> <p>③ 異なる神経内分泌マーカー及び細胞増殖マーカーの免疫組織学的染色を行い、軽度の増殖性病変や発症した NET の悪性度を判定した。</p> <p>【研究成果】 <i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを 60 週齢で解剖したところ、<i>PHLDA3</i> 及び <i>Rb</i> 両遺伝子の機能喪失が相加的に甲状腺 NET 及び下垂体 NET の形成を促進したことが明らかになった。また、二重欠損マウスでは、甲状腺 NET と下垂体 NET に加えて高頻度に肝がんの発症が観察された。今後、<i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを詳細に解析することで、<i>PHLDA3</i> 及び <i>Rb</i> による新規の細胞内シグナル制御機構を解明し、NET 発症・悪性化の機序を明らかにする。</p>	

新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの樹立



<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Shiori Suzuki[#], Shuichi Tsutsumi[#], <u>Yu Chen</u>[#], Chikako Ozeki, Atsushi Okabe, Tatsuya Kawase, Hiroyuki Aburatani and Rieko Ohki. ([#]equal contribution) Identification and characterization of the binding sequences and target genes of p53 lacking the 1st transactivation domain. Cancer Science, 111:451-466, 2020.</p> <p>2. Shotaro Yamano, Makoto Kimura, <u>Yu Chen</u>, Naoko Imamoto and Rieko Ohki. Nuclear import of IER5 is mediated by a classical bipartite nuclear localization signal and is required for HSF1 full activation. Experimental Cell Research, Article Number: 111686, 2019.</p> <p>3. Motohiro Kojima[#], <u>Yu Chen</u>[#], Koji Ikeda, Yuichiro Tsukada, Daigoro Takahashi, Shingo Kawano, Kota Amemiya, Masaaki Ito, Rieko Ohki, Atsushi Ochiai. ([#]equal contribution) Recommendation of long-term and systemic management according to the risk factors in rectal NETs patients. Scientific Reports, 9(1):2404, 2019.</p> <p>4. Tatsuya Kawase, <u>Yu Chen</u>, Rieko Ohki. Chapter 13: IER5 Is a p53-Regulated Activator of HSF1 That Contributes to Promotion of Cancer. Heat Shock Proteins in Signaling Pathways, Heat Shock Proteins, Vol. 17, 2019.</p>
	<p>【学会発表】</p> <p><u>Yu Chen</u>, Sadahiro Iwabuchi, Tohru Kiyono, Shigeyuki Magi, Yasuhito Arai, Akihiko Yokoyama, Mariko Okada, Shinichi Hashimoto, Kentaro Semba, Rieko Ohki. Unraveling the mechanisms of pancreatic neuroendocrine tumorigenesis using a new mouse model. The 78th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Kyoto, September 2019</p>
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>特になし</p>