

金沢大学  
がん進展制御研究所  
年報  
2019年

---

Annual Report  
Cancer Research Institute  
Kanazawa University

## 巻頭言

本研究所では、創立以来一貫して「がんに関する学理及びその応用研究」を進めています。国立大学附置研の中で唯一、がんの研究に特化した研究所として、優れた基礎研究とそのシーズを活用した革新的な診断・治療法の開発、また、将来のがん研究や医療を担う人材の育成をミッションとして活動しております。2019年度は、特に、①特色ある共同研究の推進、②国際的ネットワークの形成、③融合研究の推進に焦点を当て、以下のような活動を進めました。

共同利用・共同研究拠点活動として、本年度は、65件の課題を採択し、共同研究を進めました。その中で、7件は、若手研究者枠として他より経費を上積みし支援しました。また、国際共同研究(11件)に加え、ナノ研と共同で異分野融合研究枠を新設し、5件の課題を採択するなど、本拠点の特色を明確にできるような体制の構築に努めました。

国際的ネットワーク形成のため、シンガポール DUKE-NUS(10月)および中国復旦大学(9月)とのジョイントシンポジウムを開催し(金沢国際がん生物シンポジウム)、海外連携研究機関との研究交流を進めました。12月には北海道大学遺伝子病制御研究所とジョイントシンポジウム、また通年で海外の著名な研究者を招聘した国際セミナーを開催しました。さらに、招聘型リサーチプロフェッサー(Barker教授)の研究分野の支援を行いました。その成果は、Nature および Nature Commun に本学の業績として発表されるなど、レベルの高い研究を推進する拠点としての役割を果たすことができました。

融合研究の推進として、ナノ生命科学研究所所属の Bio-SPM や超分子化学の研究者との共同研究を積極的に推進し、WPI 事業にも貢献しました。また、新学術創成研究機構での融合研究を推進するため、革新的統合バイオコアのメンバーと共同研究を実施しました。その結果、HGF を阻害する環状ペプチド HiP-8 を見出し、高速原子間力顕微鏡(AFM)観察により、小分子がタンパク質分子の動態をも阻害できることを発見するなど(Nature Chemical Biology)、「融合研究を基盤としたアプローチにより、革新的ながんの診断・治療研究に貢献する研究所」であることを国内外にアピールすることができました。

基礎研究のみならず、臨床治験への参加や、がんの診断・治療・予防に寄与する新規医療技術の開発を進めました。これらの活動は、附属病院の「がんゲノム医療拠点病院」の指定に大きく貢献したと考えています。

ここに、2019年の各研究分野の活動状況を報告いたします。本研究所の取り組みについてご理解いただく機会となれば幸いです。

金沢大学がん進展制御研究所長 平尾敦



# 金沢大学がん進展制御研究所年報2019年

## 目次

### 巻頭言

### 研究概要と研究業績

#### 先進がんモデル共同研究センター

腫瘍遺伝学研究分野	2
分子病態研究分野	7
上皮幹細胞研究分野	14

#### がん幹細胞研究プログラム

遺伝子・染色体構築研究分野	20
腫瘍分子生物学研究分野	25
分子生体応答研究分野	30

#### がん微小環境研究プログラム

免疫炎症制御研究分野	36
腫瘍動態制御研究分野	40
腫瘍細胞生物学研究分野	45

#### がん分子標的探索プログラム

シグナル伝達研究分野	50
腫瘍制御研究分野	53
機能ゲノミクス研究分野	61

#### がん分子標的医療開発プログラム

腫瘍内科研究分野	66
----------	----

#### 中央実験施設

#### 新学術創成研究機構若手PI

上皮可塑性・炎症ユニット	84
がん幹細胞環境制御ユニット	86
ミトコンドリア動態ユニット	88
がん-免疫系相互作用ユニット	90

#### 基礎統計・教育活動

#### 各種シンポジウム開催状況



先進がんモデル共同研究センター

## Division of Genetics

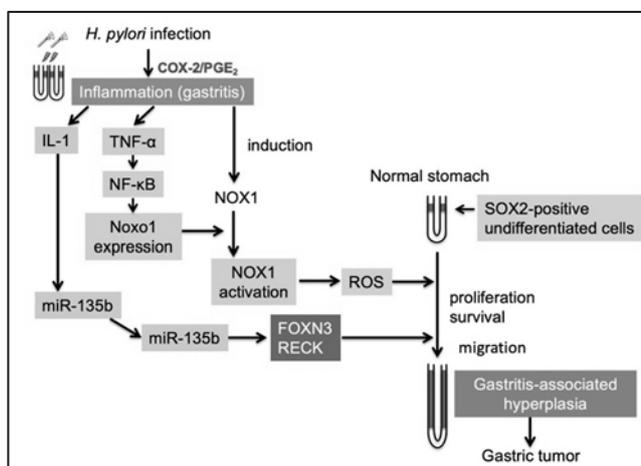
### 腫瘍遺伝学研究分野

Professor	Masanobu Oshima 大島 正伸
Associate Professor	Hiroko Oshima 大島 浩子
Assistant Professor	Mizuho Nakayama 中山 瑞穂, Dong Wang (WPI)
Graduate Student	Sau Yee Kok (D4) , Zachary Wei Ern Young (D4) Daisuke Yamamoto 山本 大輔, Toshikatu Tsuji 辻 敏克 (D4) Atsuya Morita 森田 敦也 (D1)
Technical Assistant	Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子

### 【 Abstract 】

Inflammatory microenvironment plays an important role in CRC development. It has been suggested that Stat3 is one of the candidate molecules that link inflammation and cancer. To examine the role of Stat3 in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis, we generated *villin-CreER Stat3<sup>lox/lox</sup>* mice and crossed with *Apc<sup>Δ716</sup>* mice. Notably, Stat3 is indispensable for regeneration of damaged intestinal mucosa. However, Stat3 is not required for tumorigenesis if Wnt signaling is activated. Mechanistically, we found that Stat3 induces *Itga5/6* expression, which is required for survival of normal stem cells through FAK activation (Oshima et al, **FASEB J**, 2019).

On the other hand, in the stomach, *Helicobacter pylori* infection has shown to be an important risk factor for cancer development. Using inflammation-associated gastric cancer mouse model, we investigated the role of cytokines, IL-1 and TNF, in tumorigenesis. IL-1 induces miR-135b expression in gastric epithelial cells, resulting in downregulation of possible tumor suppressor FOXN and RECK, which promotes epithelial proliferation (Han et al, **Gastroenterology**, 2019). TNF- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B, leading to induction of Noxo1 expression and activation of NOX1 complex, which further induces ROS production. ROS signaling in gastric mucosa increases the number of SOX-2-expressing stem cell populations (Echizen et al, **Oncogene**, 2019). Based on these findings, we think that these cytokine-induced pathways will be therapeutic targets against gastric cancer development.



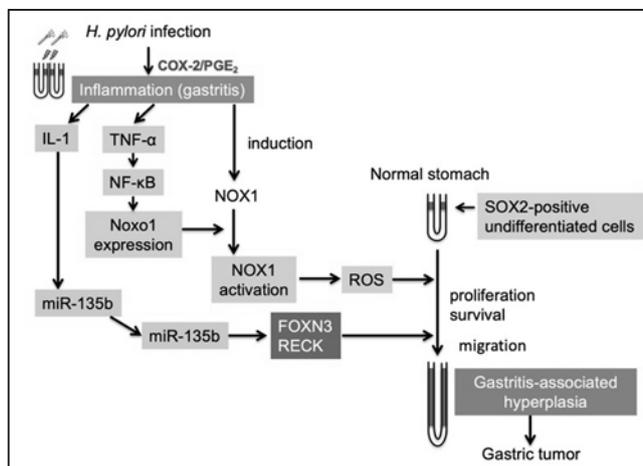
## <2019年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

### 1. 腸管上皮恒常性および腫瘍化における Stat3 の役割

炎症で活性化する転写因子 Stat3 の, 腸管粘膜恒常性および発がんにおける役割を遺伝学的に解析した。Stat3 欠損マウスの腸上皮細胞は, 生存能力が顕著に低下し, 粘膜傷害からの再生や, オルガノイド形成が抑制された。一方で, APC 変異や Wnt リガンド刺激により Wnt シグナルが亢進した腫瘍上皮細胞では, Stat3 が欠損してもオルガノイドは形成され, 腸管腫瘍の抑制は見られないことを明らかにした (Oshima et al, **FASEB J**, 2019)。以上の結果から, Stat3 阻害薬の抗がん作用は Wnt 活性の影響を受ける可能性が考えられた。

### 2. 炎症反応による胃がん発生機構の研究

ヒト胃粘膜では, ピロリ菌感染による慢性炎症反応が発がん促進に作用する。炎症依存的な胃がんモデル (Gan マウス) を用いた解析により, IL-1 が, 胃粘膜上皮の miR-135b 発現を誘導し, FOXN3 や RECK などの標的分子の発現を抑制して胃粘膜上皮の増殖を亢進することを明らかにした (Han et al, **Gastroenterology**, 2019)。また, TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 経路が NOX1 複合体を活性化し, それに依存して活性酸素 (ROS) 産生を誘導し, 未分化上皮細胞の増殖を亢進することを示した (Echizen et al, **Oncogene**, 2019)。これらの結果は, 炎症依存的な胃がん発生の新しい分子機構として考えられた。



### 3. p53 遺伝子型に依存した大腸がん悪性化機構の研究

p53 は大腸がんの約半数で変異が認められる重要ながん抑制遺伝子である。これまでの研究により, アミノ酸置換によるミスセンス (gain-of-function, GOF) 型の変異 p53 が, 新規に獲得した機能により腸管腫瘍の粘膜下浸潤を誘導することを明らかにした (Nakayama et al, **Oncogene**, 2017)。さらに, データベース解析により, GOF 変異を持つヒト大腸がんのほとんどは LOH により野生型 p53 遺伝子を欠損していることが明らかとなった。そこで, マウス腸管腫瘍由来オルガノイドを用いた解析を実施した結果, 野生型 p53 は, 変異型 p53 の細胞内局在を制御し, がん細胞の生存や dormant な状態からの増殖能力を亢進して転移性の獲得に関与する結果を得た (論文投稿中)。

### 4. 大腸がんポリクローナル転移機構の研究

マウス腸管腫瘍から樹立した高転移性オルガノイド (AKTP 細胞) と非転移性オルガノイド (AP 細胞) を用いて, マウス脾臓移植による肝転移実験を行なった結果, 悪性化したがん細胞は間質増生を誘導して生存に有利な微小環境を形成することを明らかにした。今後, 微小環境形成の分子機構解明を目指して研究を推進する。

## 【研究業績】

### < 発表論文 >

#### 原著論文

(研究室主体)

1. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, and Oshima M. Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. **FASEB J**, 33: 1873-1886, 2019.
2. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong WE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, and Oshima M. Interleukin 1 upregulates microRNA-135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice. **Gastroenterology**, 156: 1140-1155, 2019.
3. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, and Oshima M. NF- $\kappa$ B activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. **Oncogene**, 38: 4250-4263, 2019.
4. Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, Ali MAE, Oshima H, Yamamoto D, Park JW, Takegami Y, An T, Jenkins NA, Copeland NG, and Oshima M. CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 116: 15635-15644, 2019.
5. Nakayama M, and Oshima M. p53 mutation in colon cancer. **J Mol Cell Biol**, 11: 267-276, 2019. [Review]

(共同研究)

1. Jangphattananont N, Sato h, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, and Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF from its precursor form in developing and repairing the stomach. **Int J Mol Sci**, 20: E2955, 2019.
2. Cao D, Wu Y, Jia Z, Zhao D, Zhang Y, Zhou T, Wu M, Zhang H, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, and Cao X. 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid inhibited mitochondrial energy metabolism and gastric carcinogenesis through methylation regulated TLR2 signaling pathway. 2018 Oct 26. **Carcinogenesis**, 67: 1179-1195, 2019.
3. Buzzelli JN, O'Connor LO, Scurr M, Catubig A, Ng G, Oshima M, Oshima H, Giraud AS, Sutton P, Judd LJ, and Menheniott TR. Overexpression of IL-11 promotes premalignant gastric epithelial hyperplasia independently of Helicobacter pylori infection or JAK-STAT driver mutations. **Am J Phys Gastrointest Liver Physiol**, 316: G251-G262, 2019.
4. Chang CY, Jeon SB, Yoon HJ, Choi BK, Kim SS, Oshima M, Park EJ. Glial TLR2-driven innate immune responses and CD8<sup>+</sup> T cell activation against brain tumor. **Glia**, 67: 1179-1195, 2019.
5. Suzuki K, Sentani K, Tanaka H, Yano T, Suzuki K, Oshima M, Yasui W, Tamura A, and

Tsukita S. Deficiency of stomach-type claudin-18 in mice induces gastric tumor formation independent of *H. pylori* infection. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 8: 119-142, 2019.

日本語著書・総説

1. 大島正伸. がん創薬のための動物モデル. 「進化するがん創薬・第8章」清宮啓之編. (化学同人), 94-104, 2019
2. 大島浩子, 越前佳奈恵, 大島正伸. がんと自然炎症. 炎症と免疫 (先端医学社) vol. 27, 428-432, 2019.
3. 大島正伸. 大腸がん悪性化進展機構のモデル研究. **Precision Medicine** (北隆館) vol. 2, 152-156, 2019.

<学会等発表>

(国際学会・シンポジウム)

1. Oshima M. The role of inflammatory microenvironment for gastrointestinal tumorigenesis. *Tumor Microenvironment and Precision Oncology*, Joint symposium between Kanazawa Univ-CRI and Seoul National University-GCRC, Seoul (韓国), 2019年5月13日
2. Oshima M. Inflammatory transcription factors for gastric and intestinal tumorigenesis. *KSNO-NCC GCSP Joint cancer symposium*, Jeju (韓国), 2019年5月25日
3. Oshima M. Inflammation: A gastric cancer promoter, *Surgical Grand Round Lecture at Seoul National Univ Hospital (SNUH)*, Seoul, (韓国), 2019年8月21日
4. Oshima M. Biological mechanism of polyclonal metastasis of colorectal cancer. *50<sup>th</sup> Commemorative International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, 東京, 2019年11月13日
5. Oshima M. Multistep tumorigenesis and polyclonal metastasis of colon cancer. *24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society of Cancer Prevention (KSCP)*, Seoul, (韓国), 2019年12月14日

(国内学会・セミナー)

1. 大島正伸. 遺伝学的アプローチによる大腸がん悪性化研究の新展開. 第1回日本遺伝学会春季分科会「遺伝学の将来を考える」, 三島, 2019年3月8日
2. Nakayama M, Sakai E, Oshima H, Tan P, Oshima M. p53-loss of heterozygosity with p53 gain-of-function mutation leads to cancer dormancy of intestinal tumors. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月26日
3. Sau Yee Kok, Oshima H, Sakai E, Nakayama M, Oshima M. Mechanism for intestinal tumor metastasis by polyclonal origins. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月26日
4. Terakado Y, Murakami K, Oshima H, Oshima M, Barker N. The role of Lgr5 as cancer stem cell in gastric cancer and regulatory mechanism. 第78回日本癌学会学術総会, 京

都, 2019年9月26日

5. Oshima H, Maeda Y, Tsuji T, Oshima M. Regulation of Foxo3a localization in gastric cancer cells. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月27日
6. Park JW, Oshima H, Nakayama M, Oshima M. A novel gene expression signature for colorectal cancer metastasis. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月28日
7. 大島正伸. 大腸がん発生と悪性化機構のモデル研究. 北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー, 札幌, 2019年11月5日

#### <外部資金>

1. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん細胞の多段階悪性化が制御する微小環境形成ネットワーク機構の解明と新規予防治療戦略の確立」 16,830 千円
2. 基盤研究 (A) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん自然転移・再発モデルの開発による悪性化進展機構の研究」 8,600 千円
3. 挑戦的研究 (萌芽) [研究代表者: 大島 正伸]  
「TGF-beta による大腸がん抑制作用から悪性化誘導へのスイッチ制御機構の解明」 2,500 千円
4. 基盤研究 (B) [研究代表者 大島 浩子]  
「炎症性・線維性微小環境による大腸がん転移促進機構の解明」 5,000 千円
5. 基盤研究 (C) [研究代表者 中山 瑞穂]  
「大腸がん転移・再発における p53 遺伝子 LOH と不均一性獲得に関する個体モデル解析」 1,200 千円

#### <その他>

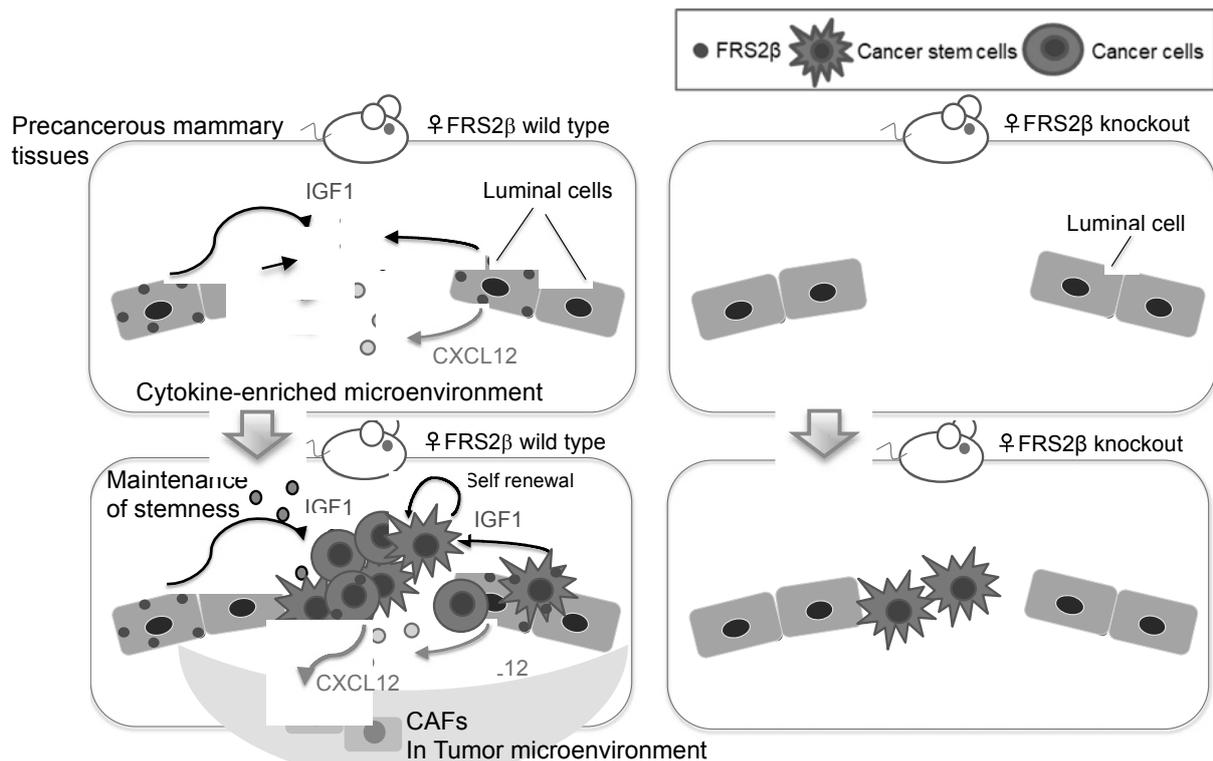
文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会開催 (実行委員長: 大島正伸): 2019年9月5~7日, 長野県蓼科 (全国から大学院生 (修士・博士課程)、若手研究者約95名参加)

## Division of Cancer Cell Biology 分子病態研究分野

Professor	Noriko Gotoh 後藤 典子
Assistant Professor	Tatsunori Nishimura 西村 建徳 Yasuto Takeuchi 竹内 康人 (2019,12~)
Project Assistant Professor	Takahiko Murayama 村山 貴彦
Graduate Student	Reheman Yiming (D3), Xiaoxi Chen (D3), Li Mengjiao (D2), SARENQIQIGE (D1), Wang Yuming (D1) Rojas Nichole (M2) Lee Jin (M1)
Assistant Staff	Kiyoko Take 武 紀代子

### 【 Abstract 】

It remains largely unknown how the precancerous tissue microenvironment contributes to tumor onset, and there is still no effective preventive strategy for breast cancer. We discovered that FRS2 $\beta$  plays critical roles in cytokine production by mammary epithelial cells, and that the resultant cytokine-rich precancerous microenvironment is essential for tumor onset. Deficiency of FRS2 $\beta$  suppressed mammary tumorigenesis and reduced tumor stroma in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2 mice. Wild-type, but not FRS2 $\beta$ -deficient precancerous mammary tissues, allowed tumorigenesis by xenografted wild-type FRS2 $\beta$  tumor cells. Levels of insulin-like growth factor (IGF) 1 and CXC chemokine ligand (CXCL) 12 were lower in FRS2 $\beta$ -deficient precancerous epithelial cells, in which activation of AKT and the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) was reduced. Treatment with inhibitors of these cytokines in wild-type FRS2 $\beta$  precancerous mice greatly diminished the ability of the mammary tissues to support tumor growth. In human breast cancer tissues, high expression of FRS2 $\beta$  in tumor cells was associated with more stroma and poorer prognosis. Thus, FRS2 $\beta$  appears to stimulate the AKT–NF $\kappa$ B axis to promote cytokine production in precancerous epithelial cells and tumor cells. Mammary epithelial cells triggered by FRS2 $\beta$  to produce cytokines generate a precancerous microenvironment that could be targeted to prevent cancer.



乳がん発症には、乳腺ルミナル細胞内で、アダプターFRS2beta を介して産生されるサイトカイン豊富な微小環境が必須である。

前がん状態の乳腺ルミナル細胞は、細胞内アダプター分子 FRS2beta 依存的に IGF1 や CXCL12 などのサイトカインを産生し、サイトカイン豊富な乳腺微小環境を構築している。MMTV-neu 乳がんモデルマウスの乳腺内では、がん幹細胞の自己複製や、がん間質細胞 Cancer Associated Fibroblasts (CAFs)の遊走のために、これらのサイトカインが使われ、腫瘍細胞が増殖しやすい微小環境が整えられている。FRS2beta ノックアウトマウスの乳腺ルミナル細胞は、サイトカインが産生されず、がん幹細胞が出現しても、増殖しない。FRS2beta は、がん発症を予防する標的となる。

### <2019 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

乳がん注目して新たなマウスがんモデルの作出と，患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC)のスフェロイド培養技術を工夫し，Patient-derived xenograft (PDX)モデルの構築とそのカタログ化を行っている。今後乳がん PDC と PDX モデルを拡充し，世界的なコンソーシアムの形成に貢献することを目指している。

1) MCM10 は複製ストレスへの迅速な対処を促すことで乳がん幹細胞を維持する乳がんにおいてがん幹細胞の維持に寄与している分子を同定するため、PDC を用いて RNA-seq を行った。詳細な解析の結果、mini-chromosome maintenance protein (MCM) 10 ががん幹細胞維持に重要であることがわかった。さらにがん幹細胞では、分化の進んだがん細胞に比べて DNA 複製ストレスのレベルが高いことが明らかとなり、複製フォーク停止時のレスキューにおいて MCM10 が重要な役割を担っていることを示す結果も得られた。

## 【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Tominaga K, Minato H, Murayama T, Sasahara A, Nishimura T, Kiyokawa E, Kanauchi H, Shimizu S, Sato A, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Ogawa T, Ishii H, Mori M, Akashi K, Okamoto K, Tanabe M, Tada K, Tojo A, Gotoh N.: Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 116(2), 625-630, 2019.
2. Nishimura T, Nakata A, Chen X, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S-I, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, Gotoh N.: Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*, 38(14), 2464-2481, 2019.

総説

1. Murayama T, Gotoh N.: Drug resistant mechanisms of cancer stem-like cells and their therapeutic potential as drug targets. *Cancer Drug Resist*, 2, 457-470, 2019.
2. Murayama T, Gotoh N.: Patient-derived xenograft models of breast cancer and their application. *Cells*, 8(6), E621, 2019.
3. Gotoh N.: Elucidation of breast cancer tissue diversity by comprehensive analysis of minimum unit omics. *Impact*, 2019(3), 30-32, 2019.
4. 西村建徳、東條有伸、後藤典子. 「MTHFD2 の酵素活性阻害によるがん治療」 *BIO Clinica* (北隆館), vol. 35(1): p88-91.2020.
5. 西村建徳、東條有伸、後藤典子. 「MTHFD2 の酵素活性阻害によるがん治療」 *Medical Science Digest* (ニューサイエンス社), vol. 45(9): 2019.
6. 村山貴彦、後藤典子. 「がん関連線維芽細胞によるがん幹細胞制御機構」 *Cytometry Research*, vol. 29(1): p1-6, 2019.
7. 村山貴彦、後藤典子. 「乳癌などのオルガノイド培養」 *実験医学別冊：患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド*(羊土社)、 p117-123, 2019.
8. 村山貴彦、後藤典子. 「乳がんの PDX」 *実験医学別冊：患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド*(羊土社)、 p117-123, 2019.
9. 西村建徳、Chen Xiaoxi、後藤典子. 「乳腺オルガノイド」 *実験医学別冊：オルガノイド実験スタンダード* (羊土社), p281-289, 2019.

<学会発表>

<国際学会>

1. Noriko Gotoh: “Growth factor signaling regulates cancer stem cells and their niche” **The 6<sup>th</sup> Symposium on Anti-tumor Agents and Individual Therapy** 2019年11月 Shantou city, China (招待講演)
2. Noriko Gotoh: “One carbon metabolic enzymes play important roles for cancer cells and cancer stem-like cells” **3<sup>rd</sup> World Congress on Cancer** 2019年9月, Prague, Czech Republic (招待講演)
3. Noriko Gotoh: “Growth factor signaling regulates cancer stem cells and their niche” **International Symposium of Advances in Cancer Stem Cell Therapeutics** 2019年8月, Zhengzhou, China (招待講演)
4. Noriko Gotoh: “Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells” **Symposium: The State-of-the-Art 3D Tissue Culture & Organoids** 2019年3月, 沖縄 (招待講演)
5. Noriko Gotoh: “Critical roles of luminal progenitor cells in creating the cytokine-rich precancerous niche for mammary tumorigenesis” **International Society for Precision Cancer Medicine (ISPCM), 2019** 2019年3月, Seoul, Korea (招待講演)
6. Noriko Gotoh: “Critical roles of luminal progenitor cells in creating the cytokine-rich precancerous niche for mammary tumorigenesis” **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
7. Tatsunori Nishimura, Noriko Gotoh: "Downregulation of MTHFD2, an enzyme of one-carbon metabolism in mitochondria, inhibits tumor growth and cancer stem-like properties." **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
8. Takahiko Murayama, Noriko Gotoh: “MCM10 maintains breast cancer stem like cells through contributing to rapid response to DNA replication stress” **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
9. Takahiko Murayama, Noriko Gotoh: “MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging rapid response to DNA replication stress” **Keystone Symposia 2019, DNA Replication and Genome Instability: From Mechanism to Disease**, 2019年1月, ユタ 米国 (ポスター発表)
10. Mitsuhiro Hirano, Takahiko Murayama, Noriko Gotoh, Yoichi Imai, Arinobu Tojo: “Combined HDAC and AKT inhibition as a strategy to overcome multi-drug resistant multiple myeloma” **62<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition**, 2019年12月, San Diego, USA (ポスター発表)

<全国学会>

1. 後藤典子：“乳がん臨床検体由来がん幹細胞濃縮細胞群の1細胞解析” 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ「技術革新がもたらすがん治療難治性の理解克服へむけた新しい方向性」2019年12月，福岡（招待講演）
2. 後藤典子：“乳がん三次元培養を用いたがんの微小環境、不均一性の解明乳がんの三次元培養とPDXを用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（口頭発表）
3. 後藤典子：“乳がん患者検体由来三次元培養細胞とがん間質細胞の共培養系を用いたがん幹細胞ニッチシグナルの解析” 第78回日本癌学会学術総会 シンポジウム14「Cancer Stem Cell」2019年9月，京都（招待講演）
4. 後藤典子：“プリン合成経路にあるミトコンドリア内酵素 MTHFD2 は、がん幹細胞性とゲフィチニブ耐性を賦与する” 第92回日本生化学会大会 シンポジウム「ミトコンドリア生化学が切り開く新たな疾患病態」2019年9月，東京（招待講演）
5. 後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains patient-derived breast cancer stem-like cells that constitutively experience DNA replicative stress” 講演会「患者由来がんモデル～基礎研究から臨床応用まで～」2019年7月，東京（招待講演）
6. 後藤典子：“微小環境と治療抵抗性メカニズム” 第27回日本乳癌学会学術集会 シンポジウム15「ゲノム・エピゲノム解析の進歩」 2019年7月，東京（招待講演）
7. 後藤典子：“乳がんの1細胞解析” 第29回サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム「固形がんの1細胞解析」 2019年5月，東京（招待講演）
8. 西村建徳、後藤典子：“ミトコンドリア内葉酸代謝経路酵素阻害による抗腫瘍効果の評価ならびにその機序の解明” 第29回日本サイトメトリー学会学術集会 2019年5月，東京（ポスター発表）
9. 西村建徳、後藤典子：“Critical roles of FRS2beta for creating the cytokine-rich precancerous microenvironment for mammary tumorigenesis” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（招待講演）
10. 西村建徳：“ミトコンドリア内葉酸代謝経路酵素を標的としたがん治療の可能性” 第3回がんと代謝研究会若手の会 2019年11月，熊本（口頭発表）
11. 西村建徳、後藤典子：“One carbon metabolic enzymes play important roles for cancer stem-like cells” 第78回日本癌学会学術集会 International Session「Advancement of cancer stem cell biology and novel therapeutic approaches」 2019年9月，京都（招待講演）

12. 西村建徳、後藤典子：“Changes of stem cell related phenotypes under inhibition of enzymes of One-carbon metabolism” 第7回がん代謝研究会 2019年8月，宮城（ポスター発表）
13. 西村建徳、後藤典子：“ミトコンドリア内葉酸代謝酵素 MTHFD2 を分子標的とした際の抗腫瘍効果の評価” 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月，大阪（口頭発表）
14. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging response to replication stress” 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月，大阪（口頭発表）
15. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains breast cancer stem-like cells that constantly experience DNA replicative stress” 第78回日本癌学会学術集会 2019年9月，京都（口頭発表）
16. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains breast cancer stem-like cells that constantly experience DNA replicative stress” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（ポスター発表）
17. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging response to replication stress” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（ポスター発表）
18. Nicole M Rojas Chaverra, 西村建徳、村山貴彦、後藤典子：“Recombinant FGFR1 in its monomeric and dimeric forms observed through High Speed-Atomic Force Microscope (HS-AFM).” 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月，京都（ポスター発表）
19. Nicole M Rojas Chaverra, 西村建徳、村山貴彦、後藤典子：“Recombinant FGFR1 in its monomeric and dimeric forms observed through High Speed-Atomic Force Microscope (HS-AFM).” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（ポスター発表）
20. 佐藤誠、後藤典子、Dominic Voon：“Mathematical modeling of cancer stem cells” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（ポスター発表）
21. Mitsuhiro Hirano, Takahiko Murayama, Noriko Gotoh, Yoichi Imai, Arinobu Tojo: “Combined HDAC and AKT inhibition as a strategy to overcome multi-drug resistant multiple myeloma” 第81回日本血液学会学術集会 2019年10月，東京（ポスター発表）

<研究会開催>

後藤典子：第3回がん三次元培養研究会 2019年11月 東京

<外部資金>

1. 後藤典子, 基盤研究 B (一般), 2018.4.1-2020.3.31, 代表, 13,500 千円
2. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 6,500 千円
3. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2019.11-2022.3.21, 分担, 4,680 千円
4. 後藤典子, 挑戦的萌芽研究, 2019.4.1-2022.3.31, 代表, 6,500 千円
5. 後藤典子, 高松宮妃癌研究助成金, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 928,402 円
6. 西村建徳, 若手研究, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 2,470 千円
7. 村山貴彦, 活動支援スタート, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 1,430 千円

## Division of Epithelial Stem Cell Biology 上皮幹細胞研究分野

Research Professor      Nicholas Barker (シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員)  
Assistant Professor      Kazuhiro Murakami 村上 和弘  
Assistant                  Kenji Kita 北 賢二 (共同研究拠点)  
Postdoctoral Researcher Yumi Terakado 寺門 侑美  
Collaborative Researcher Masaki Yamazaki 山崎 雅輝 (中外製薬)  
Assistant Staff          Yoshie Jomen 定免 良枝, Kikue Saitou 齋藤 喜久江

### 【 Abstract 】

Gastric cancer is a complex disease that often arises in a setting of chronic inflammation. For gastric tumorigenesis, *Helicobacter pylori* infection is an important risk factor, and COX-2/PGE2 pathway is induced in the infection-associated chronic gastritis tissues. Despite recent extensive efforts to molecularly classify gastric cancers to try and stratify treatment regimens according to underlying mutational spectra, gastric cancer remains a relatively poorly understood disease with a poor prognosis for most patients.

Cancer stem cells are defined as the unique subpopulation in the tumors that possess the ability to initiate tumor growth and sustain self-renewal as well as metastatic potential. Those tumor-resident cells with stem cell characteristics are thought to be resistant to conventional anti-cancer therapies, allowing them to survive and drive tumor recurrence in many patients.

Recently, we have identified *Lgr5*<sup>+</sup> chief cells in the corpus stomach, which serve as reserve stem cells to effect epithelial renewal following oxyntic atrophy. These reserve stem cells drive spasmodic polypeptide-expressing metaplasia in the stomach following conditional KRasG12D driver mutation, highlighting their likely contribution to gastric cancer initiation *in vivo* (Leushacke, M. *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2017).

But still it is not clear whether the *Lgr5*<sup>+</sup> chief cell serves as an origin of gastric cancer cell under the chronic inflammation and how cancer stem cell is induced from *Lgr5*<sup>+</sup> reserve stem cells. To study the effects of chronic inflammation on stem cell-driven cancer formation and progression in the corpus stomach, we are focusing on evaluating a potential cancer stem cell function of *Lgr5*<sup>+</sup> cells present within Wnt-driven inflammation-dependent gastric tumors. We would like to leverage on the extensive knowledge and mouse models available through my collaborator, Professor Masanobu Oshima to study the effects of chronic inflammation on stem cell driven cancer formation and progression in the corpus stomach. This is physiologically relevant because the majority of human gastric cancer is considered to arise in a setting of chronic inflammation caused by infection with *Helicobacter Pylori*.

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

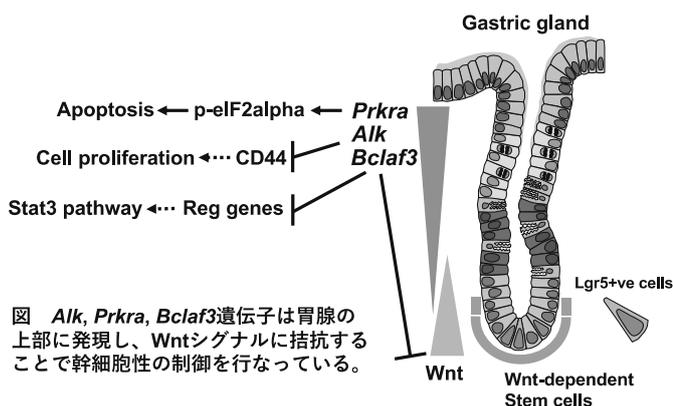
### 1. 新規胃癌マウスモデルの解析

*APC*, *KRas*, *p53* 遺伝子変異を組み合わせることで、悪性度の高い胃癌マウスモデルを得た。これらのマウスよりオルガノイドを樹立し、免疫不全マウスの胃に同所移植を行うことで、生体内の胃癌の浸潤・転移を模倣できる新たな移植モデルを確立した。これらのマウスで薬剤処理を行い *Lgr5* 陽性の胃癌細胞を選択的に除去することで、転移が抑制されることが明らかとなった。このことは、悪性度の高い胃癌の浸潤・転移には *Lgr5* 陽性細胞が必須である事を示唆している。これらの結果は、第 78 回日本癌学会総会において発表された。

### 2. 幹細胞制御因子の同定と解析

胃癌・大腸癌マウスモデルより樹立されたオルガノイドを用いて、消化管がんの悪性を導く細胞内分子機構の詳細な解析を行なった。その結果、いくつかの転写因子が、*Lgr5* 陽性細胞の幹細胞性を亢進させることで、がんの悪性に寄与していることが明らかとなった。この結果は、第 78 回日本癌学会総会において発表された。今後は、ヒト胃癌・大腸癌から樹立されたオルガノイドを用いて、マウスで得られた結果の検証を行う。

一方、マウス正常胃オルガノイドを用いてゲノムワイドスクリーニングを行なった結果、*Alk*, *Bclaf3*, *Prkra* 遺伝子が胃オルガノイドの幹細胞性を制御していることが明らかとなった(図)。この結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会にて発表された。



### 3. 新たな胃組織幹細胞マーカーAQP5の発見

シンガポール A\*Star の研究グループとの共同研究により、胃前庭部における新たな新規幹細胞マーカー、*Aquaporin-5* を見出した。この成果は、国際誌である *Nature* に受理された。

### 4. 胎児期の子宮における組織幹細胞の同定

シンガポール A\*Star の研究グループとの共同研究により、胎児期の子宮の発生に必須である *Lgr5* 陽性の組織幹細胞を同定した。この成果は、国際誌である *Nature Communications* に掲載された。

### 5. AIを用いた画像解析システムの構築

Dr. Pingzhao Hu (カナダ Manitoba 大学), Dr. Anna Junker (ドイツ Munster 大学) との国際共同研究により、人工知能を応用した画像解析システムを構築した。この成果は、国際誌である *Cells* に掲載された。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

(共同研究)

1. Si Hui Tan, Yada Swathi, Shawna Tan, Jasmine Goh, Ryo Seishima, Kazuhiro Murakami, Masanobu Oshima, Toshikatsu Tsuji, Phyllis Phuah, Liang Thing Tan, Esther Wong, Aliya Fatehullah, Taotao Sheng, Shamaine Wei Ting Ho, Heike Grabsch, Supriya Srivastava, Ming Teh, Simon L. I. J. Denil, Seri Mustafah, Patrick Tan, Asim Shabbir, Jimmy So, Khay Guan Yeoh and Nick Barker. AQP5 Enriches for Stem Cells and Cancer Origins in the Distal Stomach. *Nature*. 2020 Feb 5 578(7795):437-443. doi: 10.1038/s41586-020-1973-x.
2. Seishima R, Leung C, Yada S, Murad KBA, Tan LT, Hajamohideen A, Tan SH, Itoh H, Murakami K, Ishida Y, Nakamizo S, Yoshikawa Y, Wong E, Barker N. Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development. *Nature Communications*. 2019 Nov 26;10(1):5378. doi: 10.1038/s41467-019-13363-3.
3. Liu Q, Junker A, Murakami K, Hu P. Automated Counting of Cancer Cells by Ensembling Deep Features. *Cells*. 2019 Sep 2;8(9). pii: E1019. doi: 10.3390/cells8091019.
4. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K. Distinct Localization of Mature HGF from its Precursor Form in Developing and Repairing the Stomach. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 17;20(12). pii: E2955. doi: 10.3390/ijms20122955.
5. Xue Y, Barker N, Hoon S, He P, Thakur T, Abdeen SR, Maruthappan P, Ghadessy FJ, Lane DP. Bortezomib Stabilizes and Activates p53 in Proliferative Compartments of Both Normal and Tumor Tissues *In Vivo*. *Cancer Res*. 2019 Jul

15;79(14):3595-3607. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3744. Epub 2019 May 28.

著書・総説

1. A contemporary snapshot of intestinal stem cells and their regulation. Seishima R, Barker N. *Differentiation*. 2019 Jul - Aug;108:3-7. doi: 10.1016/j.diff.2019.01.004. Epub 2019 Jan 25.

<学会発表>

**Nick Barker;**

1. 2019年度AMED幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム公開シンポジウム”Stem Cell and Regenerative Biology”, Tokyo, Japan (November 2019)(招待講演)

**村上和弘;**

2. AMED Interstellar Initiative Program 「Analysis of mechanisms which regulate stem cells in normal and cancer development」 2019年2月7日 ドイツ ミュンスター

3. SNU-GCRC and KU-CRI joint symposium 「Analysis of mechanisms which regulate stem cells in normal and cancer development.」 2019年5月13日 韓国 ソウル

4. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 「CRISPR/Cas9 based genome-wide approach reveals novel stemness-regulating factors in stomach organoids」 2019年9月5-7日 長野県茅野市

5. 第78回日本癌学会学術総会 「Analysis of mechanisms which regulate the tumor malignancy in LGR5 expressing gastric cancer cells」 2019年9月26-28日 京都府京都市

**寺門侑美;**

6. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 「Analysis of stem cell and its regulatory mechanism in gastric cancer」 2019年9月5-7日 長野県茅野市

7. 第78回日本癌学会学術総会 「The role of Lgr5 as cancer stem cell in gastric cancer and regulatory mechanism」 2019年9月26-28日 京都府京都市

## <外部資金>

1. 基盤研究(A) [研究代表者 : Nick Barker]

「Developing mouse models of inflammation-driven invasive gastric cancer to reveal novel therapeutic targets」 1070 万円

2. 基盤研究(C) [研究代表者 : 村上 和弘]

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」 130 万円

4. 公益財団法人 内藤記念科学振興財団 第 2 回(2017 年度) 内藤記念次世代育成支援研究助成

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」

[研究代表者 : 村上 和弘] 200 万円

3. 若手研究 [研究代表者 : 寺門 侑美]

「胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明」 100 万円

# がん幹細胞研究プログラム

## Division of Molecular Genetics

### 遺伝子・染色体構築研究分野

Professor	Atsushi Hirao 平尾 敦
Assistant Professor	Yuko Tadokoro 田所優子, Masahiko Kobayashi 小林昌彦, Masaya Ueno 上野将也, Si Sha 司沙 (Nano-LSI)
Postdoctoral Researcher	Chiaki Ito 伊藤千秋 (学振 PD), Kenta Kurayoshi 倉吉健太
Graduate Student	Jing Young Wei, Pharm Thi Loc, Chen Xi
Assistant Staff	Kazue Sawa 澤和恵, Yukiko Takai 高井由紀子

#### 【 Abstract 】

Nutrients, such as amino acid, sugar, lipid and vitamin, are critical determinants of cell survival, proliferation and differentiation processes in normal and malignant tissues. Recent studies have revealed critical roles of metabolic control in stem cell properties, so called "stemness", which contribute to malignant progression of cancers. Our group aims to elucidate molecular mechanisms underlying metabolic control of normal and malignant stemness.

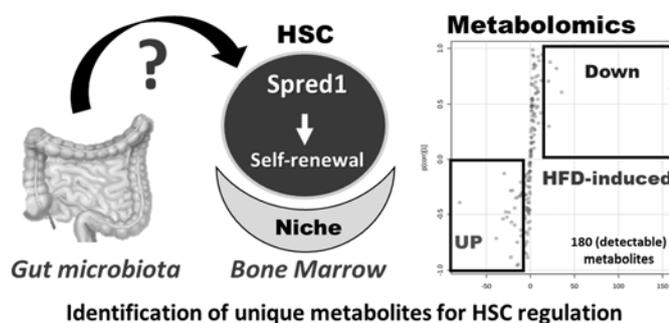
Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain hematopoietic homeostasis by both self-renewing and differentiating into mature blood cells. We previously reported that loss of *Spred1* causes abnormality of self-renewal and malignancy by high-fat diet (HFD). To identify critical mediators between HFD and HSC regulation, we performed metabolomics analysis of HFD fed mice. We found that several candidate metabolites which are remarkably down- or up-regulated by HFD. Interestingly, we found that *Spred1* deficient mice exhibited leukemia development by administration of a candidate metabolite that is up-regulated with HFD, indicating that the metabolite may be a critical mediator for leukemogenesis in response to HFD. On the other hand, we found several metabolites that are remarkably downregulated by HFD. Thus, we currently aim to identify functional metabolites, which contribute to prevention or treatment of diet-induced hematopoietic diseases.

We also aim to identify critical metabolic pathways controlling malignant properties. To identify functional downstream molecules of FOXO or mTOR, which are both involved in metabolic regulations in malignancy, we performed sgRNAs library screening of molecules responsible for malignant properties of leukemias. As a result, we identified a critical cis-element for induction of molecule for blockage of leukemia differentiation in FOXO downstream. Therefore, we currently pursue to develop new drugs based on the FOXO downstream molecule. Also, we have identified critical metabolic pathways, including vitamin metabolisms, for cell survival under chemotherapeutic condition. Importantly, mice genetically lack the vitamin enzyme can survive normally (*Manuscript preparation*), indicate that the pathway is specifically essential for tumorigenesis. We believe that investigation of molecular functions in these pathways will lead to the development of successful therapeutics.

## <2019年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

### 1. 高脂肪食摂取による造血幹細胞の異常と白血病発症機構の解明

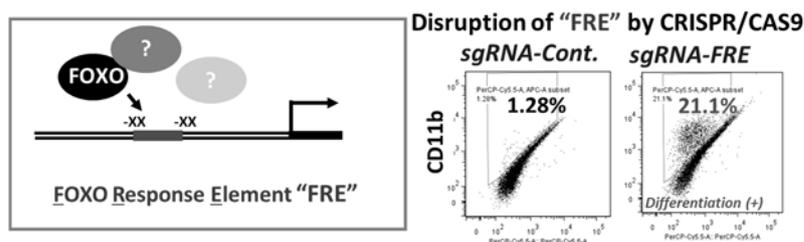
近年、高脂肪食など異常な全身的栄養環境の変化は、がんの発生・悪性化に深く関与していることが知られるようになってきた。我々は、高脂肪食の長期摂取が、腸内細菌叢の変化を介して、Spred1 欠損マウスにおいて造血幹細胞の異常な自己複製と発がんの起因となることを見いだした。そこで、高脂肪食や加齢による造血幹細胞の自己複製の異常、つまり、臓器間（腸管/骨髄）、細胞間（ニッチ/幹細胞）コミュニケーションを司るメディエーターを明らかにする目的のためメタボローム解析を実施した。その結果、高脂肪食によって上昇あるいは低下する複数の低分子代謝物を特定した。その中で高脂肪食により上昇する代謝物のひとつを普通食の Spred1 欠損マウスに投与することにより、高脂肪食と同様の病態を示すことを見出した。現在、「ステムネスを制御するメタボライト」の制御メカニズムを理解することにより、予防や治療に寄与できるよう研究を進めている。



### 2. がん特異的代謝制御分子の特定と悪性化制御メカニズム

個体や細胞レベルでの栄養状態は、体内のアミノ酸、糖、脂質など、様々な栄養素の量や質に影響し、がん細胞の動態に影響を与える。我々は、ステムネスと治療抵抗性を制御する代謝経路の特定のため、①栄養飢餓で活性化するストレス応答因子 FOXO の下流分子および②mTOR 経路の下流分子を対象とした CRISPR/CAS9 ライブラリースクリーニングを実施した。

①として、白血病細胞分化を阻害する分子を同定し、発現制御機構の解明に取り組んだ。その結果、白血病細胞を分化誘導するためのシスエレメントを同定した。そこで、その



Deletion of FOXO binding element (FRE) leads to leukemia cell differentiation

機能を阻害するペプチドを作製し新たな治療薬の開発を目指して研究を進めた。

②として、ビタミン代謝経路ががんの増殖・生存に必須であること、さらに、分子標的治療（チロシンキナーゼ阻害剤：TKI）の感受性に寄与することを見いだした。ビタミン代謝のがん特異的役割を解明するとともに、その治療法の開発を進めている。

このように、本研究では、バイオマーカー、予防、治療のために寄与する標的分子や代謝物を通して、がんの本態解明と将来の社会還元を目標としている。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko VV, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. **Nat. Immunol.** 20:1631-1643, 2019
2. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Hayashi Y, Kobayashi M, Domoto T, Minamoto T, Hirao A, Nakada M Identification of GSK3  $\beta$  inhibitor kenpaullone as a temozolomide enhancer against glioblastoma. **Sci. Rep.** 9: 10049 2019
3. Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, Hoshii T, Hirao A, Miyake K, Barber GN, Arita M, Ishii KJ, Akira S, Saito T. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. **Life Sci Alliance.** 2, 2019.

著書・総説

上野将也, 平尾敦: がん幹細胞 進化するがん創薬 化学同人 266-273, 2019

### < 学会発表 >

1. Hirao A: Critical roles of gut microbiota in self-renewal of hematopoietic stem cells and leukemogenesis 2nd Japan-German symposium Oct.3<sup>rd</sup>, 2019, Kanazawa
2. Hirao A: The nutrient signals in self-renewal of hematopoietic stem cells and tumorigenesis 2019 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies, Feb. 19, 2019, Hawaii, USA
3. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis. Eleventh AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. Feb.12 2019. Hawaii, USA
4. 平尾敦 : Critical regulation of metabolites for hematopoietic homeostasis and leukemogenesis 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月5日、福岡
5. 平尾敦 : Critical role of nutrient signals in hematopoietic stemness and malignancy 第92回日本生化学会大会 2019年9月20日、東京
6. 平尾敦 : 幹細胞 第12回 研修医のための血液学セミナー 2019年7月6日
7. 平尾敦 : 造血幹細胞自己複製の制御と腸内細菌叢 北海道大学「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム 2019年3月27日、東京

8. Tadokoro Y, Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites. Joint symposium on tumor microenvironment and precision oncology between SNU-GCRC and CRI, May 13, 2019, Seoul
9. 田所優子, 平尾敦: 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞機能制御 第15回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾) 2019年7月6日, 東京
10. 田所優子, 平尾敦: 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞の機能制御 第92回日本生化学会大会 2019年9月18日, 横浜
11. Tadokoro Y, Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites. International symposium on tumor biology in Kanazawa/Duke-NUS and KU-CRI joint symposium, Oct. 29, 2019, Kanazawa
12. Ueno M, Takase Y, Kurayoshi K, Ohta K, Fuse K, Nishida Y, Kojima K, Hirao A: Identification of FOXOs-mediated differentiation block pathway in LSCs 第81回日本血液学会学術集会, 令和元年10月11-13日, 東京
13. Ueno M, Takase Y, Kurayoshi K, Hirao A: Identification of critical downstream molecules of FOXO for targeting leukemic stem cells 第17回幹細胞シンポジウム, 令和元年5月24-25日, 兵庫
14. Kobayashi M, Hirao A: Construction of a reporter system of undifferentiated cells to characterize patient-derived glioma-initiating cells 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月28日, 京都
15. Kobayashi M, Vu HT, Hegazy AM, Jing Y, Chen X, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Hirao A: Identification of molecular targets in autophagy pathway to achieve efficient therapy of malignant gliomas 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2-3日, 大阪

#### <外部資金>

1. 平尾敦: 基盤研究(A) R1~R4年度「代謝調節によるがんステムネス制御の分子基盤」8,500千円
2. 平尾敦: 次世代がん医療創生研究事業 R1~R3年度「代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発」16,846千円
3. 田所優子: 基盤研究(C) R1~R3年度「栄養環境変化による造血幹細胞恒常性維持機構の解明」1,100千円
4. 田所優子: 令和元年度 日本血液学会 研究助成「アクチン重合調節による造血幹細胞の自己複製能制御技術の開発」1,000千円
5. 上野将也: 基盤研究(C) H29~H31年度「mTOR複合体2による白血病の治療耐性制御機構の解明」1,100千円
6. 小林昌彦: 基盤研究(C) H29~H31年度「エネルギー調節と未分化性制御の協調的相互関係の分子基盤」700千円

7. 伊藤千秋：特別研究員奨励費 H28～H31 年度「選択的オートファジーによる白血病幹細胞制御機構の解明」1,040 千円
8. 司沙：若手研究（B）H31～R1 年度「アクチン動態制御による造血幹細胞の自己複製調節機構の解明」1,600 千円
9. 倉吉健太：若手研究 令和 1~2 年度「ゲノム編集技術を用いた白血病幹細胞の分化制御に関わる因子の同定と機能解析」1,700 千円

## Division of Oncology and Molecular Biology

### 腫瘍分子生物学研究分野

Professor	Chiaki Takahashi 高橋 智聡
Assistant Professors	Shamma Awad シャムマ アワド (～2019.6) , Susumu Kohno 河野 晋, Mitsuhiro Tomosugi 友杉 充宏 (2019.6.1～)
Graduate Students	Yuki Nishimoto 西本 裕希 (～2019.3.31) , Li Fengkai 李 鳳凱, Paing Linn, Kulathnga Liyana Arachchillage Nilakshi, Sheng Jindan 盛 金丹, Zhang Zhiheng 張 智恒, Yu Hai 余 海 (2019.10.1～) , Gong Linxiang 龔 麟祥 (2019.10.1～)
Technical Assistant	Naoko Nagatani 永谷 直子

#### 【 Abstract 】

We innovate *in vitro* and *in vivo* cancer model systems that can be readily analyzed by molecular biology techniques; this aims to find pathways critical for carcinogenesis, malignant progression, metastasis, drug resistance and stem cell-like behaviors in cancer cells. In recent years, we have been trying to find effective targets of cancer therapy in the retinoblastoma tumor suppressor gene 1 (RB1) inactivated signature. Our efforts highlighted pivotal roles of RB1 gene in tumor metabolism, tumor microenvironment, apoptosis and epigenetics. In addition, we are attempting to develop new drugs targeting cancer-specific genomic abnormalities in metabolic genes.

#### <2019 年の成果、進行状況と今後の計画・展望>

コモンタイプのがんにおける RB1 不活性化は、イニシエーション時ではなくプログレッション時においてより頻繁に起こる。悪性進展の様々なコンテキストにおいて RB1 不活性化シグナチャーを決定するアプローチによって見えてきたのは、RB1 の多様な代謝制御機能とサイトカイン・ケモカイン発現誘導を介する微小環境への影響であった。

RB1 の機能喪失によってがん細胞の未分化性が亢進するコンテキストにおいて、解糖系酵素の中でほぼ唯一 HIF や Myc による転写制御を受けない PGAM1,2 が RB1 によって転写活性化されることを見出している。本年度は、PGAM1 の発現低下が胃がん細胞の未分化性を亢進することを見出した。これを突破口に、がんの未分化性制御において解糖系が果たす役割を探索する (河野、永谷、大阪大学との共同研究)。

同様のコンテキストにおいて、RB1 不活性化が CCL2 の分泌促進を介して Treg, MDSC, マクロファージ等の免疫細胞をリクルートすることを見出した。RB1 不活性化によって乳腺の過形成を誘導する系を CCR2 欠損背景に導入したところ、病変はほぼ完全に抑制された。RB1 が CCL2 の発現を制御する機構を探索し、AMPK、脂肪酸酸化や JNK がこれを介在することを明らかにした (李ら *Cancer Res.*、龔)。RB1 が

AMPK の活性を制御する機構は非常に興味深いところであるので、次年度も探索を続ける。

RB1 の標的遺伝子として同定した ELOVL6 にも注目している。ELOVL6 は脂肪酸の鎖長延長を司る。乳がんや肺がんで発現が高く、予後にも関与する。乳がんにおける ELOVL6 の不活性化は、セラミドの顕著な蓄積とスフィンゴリエリンの低下、そして、G1 停止を誘導した（張、友杉、筑波大学島野仁教授、小野薬品工業との共同研究）。ELOVL6 阻害剤と組み合わせた時に効果を発揮する抗がん剤を探索している。RB1 はまたコレステロール生合成経路の制御にも関与する。前立腺がんにおいてこの臨床的意義を探索している（友杉）。

がんは RB1 機能を保持しているか喪失しているかに分類できる。RB1 を保持しているがんの治療法として CDK4/6 阻害剤があげられ、本邦では、HR<sup>+</sup>;Her2 進行乳がんに対し保険適応がある。今後適応拡大が予想され、耐性出現も問題になると思われる。CDK4/6 阻害剤には RB1 依存的・非依存的な作用機構があり、我々は、RB1 依存的な機能に対する耐性に興味を持った。肝細胞がんは、RB1 変異は頻度が少ないものの、D-type cyclin の増幅や HCV タンパクによる RB1 不活性化など、RB1 経路の異常が高頻度に起こる。Trp53<sup>-/-</sup>; Rb<sup>flox</sup>; p107<sup>-/-</sup>; p130<sup>flox</sup> マウス肝にハイドロダイナミックス法によって cre recombinase を導入したところ AFP 陽性肝がんの発生を認めた。つまり、RB1 経路の破綻は肝がんを発症させる。CDK4/6 阻害剤の RB1 依存的な機能を探索するために、RB1 陽性肝がん細胞株 HepG2 において RB1 の恒常的活性化変異体である 7LP を導入したところ、部分的な細胞死と細胞老化を認めた。これらを増強する化合物をスクリーニングしたところ、IKKβ阻害剤がヒットした。7LP を導入した細胞では、IKKβあるいはその下流の NF-κB の活性が亢進していた。この原因を探索したところ、RB1 の活性化によって核酸の合成が低下し、DNA 損傷応答が誘導されたことが判明した。CDK4/6 阻害剤によっても IKKβは活性化した。免疫不全マウスに移植した HepG2 の増殖は、CDK4/6 阻害剤の単独投与によっては抑制できなかったが、IKKβ阻害剤を併用することによって完全に抑制された（盛、河野）。

一方、RB1 陰性がん細胞に対する治療として、Chk1, PLK, Aurora-A, B 等の阻害が提案されている。我々は、進行前立腺がんにおいて頻繁にホモ欠失する RB1 の近傍に位置し RB1 欠失に伴って欠失する SUCLA2 に注目した。SUCLA2 とそのアイソザイムである SUCLG2 の両欠失は、合成致死性を示さなかった。しかし、SUCLA2 欠失細胞には一定の代謝脆弱性が認められたため、SUCLA2 欠失細胞を選択的に傷害する薬剤をスクリーニングし、二つのヒット化合物を得た。このうちの一つは、抗がん活性が知られ、フェーズ I の臨床試験を通過している。この化合物は、免疫不全マウスへの投与が可能であり、しかも、移植した SUCLA2 欠失前立腺がん細胞において高度の細胞死を誘導した。しかし、現在得られている IC<sub>50</sub> は薬理的に十分ではないのと分子標的が未同定のため、釣り竿法による標的の同定も目指し構造展開を開始している。現在までに 13 種類の類縁体を試験したが、もとのヒット化合物を超える活性を見いだせなかった。AMED 次世代がんの支援も得て、新規合成による構造展開を目指している。JFCR39 アッセイによる標的推定も進行している。あるいは、スクリーニングのスケールを大きくすることによって活性を同じくする異なる化合物の取得も目指している（河野、Linn、永谷、余、共同研究者多数、特願 2019-228526）。

最後に、予防医学的な取り組みとして、前思春期に限定した高脂肪食摂取が乳腺に及ぼす影響を解析している。同処置は Trp53<sup>-/-</sup>マウスの乳腺上皮において c-Myc を安定化させた（Kulathunga, 河野、西本）。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

#### 原著論文

(研究室主体)

1. Li F, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie D A, Mukaida M and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Research*, 79:3903-3915, 2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3604.

(共同研究)

1. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S, Saitoh K, Kato K, Kaori I, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida M, Yano S, Soga T, Tojo A and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*, 38:2464-2481, 2019. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1
2. Thumkeo D, Katsura Y, Nishimura Y, Kanchanawong P, Tohyama K, Ishizaki T, Kitajima S, Takahashi C, Hirata T, Watanabe N, Krummel MF and Narumiya S. mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse. *Science Advances* 2019 (in press)

(著書・総説)

1. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「p53 によるがん抑制はメバロン酸経路を介して行われる」 Vol.37 No.6 p916-917, 2019 富田泰輔 編, 羊土社刊

### < 学会発表 >

1. Takahashi C. RB tumor suppressor functions in metabolic regulation. VI International conference "Modern biotechnology for science and practice" 2019年4月26日 (サンクトペテルブルク/サンクトペテルブルク国立第一医科大学: 4/26-27)
2. 河野晋, Paing Linn, 曾我朋義, 高橋智聡. RB 欠損に付随する代謝遺伝子欠損を標的とした治療法の探索. 第7回がんと代謝研究会 2019年8月2日 (仙台市/東北大学医学部星稜会館: 8/1-2)
3. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced cytokine and chemokine secretion. 第9回中国復旦大学上海がんセンタージョイントシンポジウム 2019年9月3日 (金沢市/金沢大学)

4. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment. 世界展開カロシ  
ア シンポジウム (Russia-Japan Medical symposium) 2019年9月13日 (サンク  
トペテルブルク/サンクトペテルブルク国立第一医科大学 : 9/11-16)
5. Li F, Kitajima S and Takahashi C. RB inactivation enhances protumoral microenvironment  
by elevating CCL2 expression. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都  
市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
6. Kulathunga N, Kohno S, Muranaka H and Takahashi C. High Fat Diet Exposure Induces  
c-Myc Stabilization in Mammary Gland Epithelium. 第78回日本癌学会学術総会  
2019年9月28日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
7. Paing Linn, Kohno S and Takahashi C. Therapeutic Vulnerability of RB1-SUCLA2  
co-deleted Prostate Cancer. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月28日 (京都市  
/国立京都国際会館 : 9/26-28)
8. 河野晋, 高橋智聡. RB-KDM5Aによる代謝制御機構の解明. 第78回日本癌学会学  
術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
9. 三木貴雄, 高橋智聡, 野田亮. RBに着目したがんと概日リズムの連関の解析. 第  
78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
10. 岡田宣宏, 村中勇人, 吉川清次, 妹尾昌治, 高橋智聡. 乳がん治療薬抵抗性獲得機  
構におけるNFYAの機能解明. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京  
都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
11. Kitajima S, Takahashi C and Barbie DA. STING signaling in KRAS-driven lung cancer.  
第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
12. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced  
CCL2 secretion. 2019 International RB Conference 2019年9月30日 (チャールスト  
ン USA : 9/29-10/2)
13. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment. International  
Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019 2019年10月29日 (金沢 : 10/29)
14. 河野晋. RB欠失による脆弱性を標的とした前立腺がん新規治療法の探索. 第3回  
がんと代謝研究会・若手の会 2019年11月13日 (熊本市/熊本大学発生医学研究  
所 : 11/13-14)
15. Paing Linn, Kohno S and Takahashi C. Pharmacologically targetable vulnerability in  
prostate adenocarcinoma carrying RB1-SUCLA2 deletion. 第42回日本分子生物学会  
年会 2019年12月6日 (福岡市/福岡国際会議場 : 12/3-6)
16. 村田富保, 河野晋, 高橋智聡, 疋田清美, 金田典雄. リポポリサッカライドによっ  
て惹起される炎症反応に対する regucalcin の抑制効果. 第42回日本分子生物学会  
年会 2019年12月4日 (福岡市/福岡国際会議場 : 12/3-6)

### <知的財産>

2019年12月18日 特願 2019-228526: 「SUCLA2 遺伝子欠失前立腺がんを特異的に死滅させる化合物」 発明者: 高橋智聡、河野晋、Paing Linn

### <その他>

金沢大学公開講座

高橋智聡. がん遺伝子～がんを起こす遺伝子・がんを止める遺伝子～ 2019年5月11日 (金沢市/サテライト・プラザ)

### <外部資金> (2019年度/H31年度・R1年度が含まれる課題)

高橋智聡

1. 次世代がん医療創生研究事業 (AMED) R1～R2年度「SUCLA2 遺伝子欠失によって生じる代謝脆弱性を標的とする新規がん治療法探索」(代表) 8,000 千円
2. 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) H27～R2年度「脂肪酸の鎖長を基軸とした疾患の制御機構と医療展開に向けた基盤構築」(分担) 8,000 千円
3. 科学研究費補助金 基盤研究 (B) H29～H31年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」(代表) 4,700 千円
4. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) R1～R3年度「関節リウマチ滑膜の上皮間葉移行の新規制御分子 DIP2C の解析と治療作用点の検討」(分担) 200 千円
5. 学術研究助成基金助成金 挑戦的研究 (萌芽) R1～R2年度「SUCLA2 欠失によって生ずる代謝脆弱性を標的とする新規創薬研究」(代表) 2,500 千円

## Division of Molecular Bioregulation

### 分子生体応答研究分野

Professor	Naofumi Mukaida 向田直史
Associate Professor	Tomohisa Baba 馬場智久
Assistant Professor	Soichiro Sasaki 佐々木宗一郎
Graduate Students	Yamato Tanabe 田辺和 (D4) 、 Di Zhang 張迪 (D3) Olga Namakanova (モスクワ大学大学院からの特別研究生、2019年9月~11月)
Technical Assistance	Kuniko Minami 南邦子

#### 【 Abstract 】

#### 1. Pathogenic role of leukemia cell-derived extracellular vesicles (EVs) in donor cell-derived leukemia (DCL) after bone marrow (BM) transplantation

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is widely used for various hematologic malignancies as a curative strategy. We demonstrated that the transplantation with normal BM cells after sublethal irradiation could induce chronic myeloid leukemia-bearing mice to develop several types of hematopoietic malignancies arising from donor cells, the condition which mimics DCL. We further proved that replication nuclear damage-mediated stimulator of interferon genes (STING) pathway activation induced leukemia cells to load dsDNA into EVs, which can initiate leukemogenesis by interacting with intracellular DNA sensor signaling pathway in adjacent normal hematopoietic cells.

#### 2. BCR-ABL-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype (SASP)

Transplantation of BCR-ABL-expressing hematopoietic stem/progenitor cells caused CML in mice with an increase in bone marrow BCR-ABL<sup>+</sup>CD41<sup>+</sup>CD150<sup>+</sup> leukemic megakaryocyte-lineage (MgkL) cells, which exhibited senescence-associated  $\beta$ -galactosidase activities and increased expression of p16 and p21, the molecules crucially involved in senescence. Moreover, deficiency of p16 and p21 gene depressed BCR-ABL-induced abnormal megakaryopoiesis and reduced CML cell stemness. The expression of TGF- $\beta$ 1, a representative molecule of SASP, was enhanced in leukemic MgkL cells, and TGF- $\beta$ 1 inhibition attenuated the replication capacity of CML cells. Furthermore, BCR-ABL-expressing MgkL cells displayed enhanced autophagic activity and autophagy inhibition reduced bone marrow MgkL cell number and prolonged the survival of CML mice, which transiently received a tyrosine kinase inhibitor, imatinib, beforehand. Thus, BCR-ABL-induced expansion of senescent leukemic MgkL cells can promote CML progression by providing TGF- $\beta$ 1, a mediator which is crucially involved in CML cell stemness maintenance.

#### 3. The roles of transcription factors in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model

We previously established 4T1.3 clone with a high capacity to metastasize to bone after orthotopic injection, from a murine triple-negative breast cancer cell line, 4T1.0. Comprehensive gene analysis revealed that 4T1.3 cells at bone metastasis sites exhibited the enhanced expression of three transcription factors, Lmo2, Nfe2, and Myb, compared with its parental clone, 4T1.0. Among these transcription factors, the gene transduction of Nfe2 but not that of other factors conferred higher capacity to grow in bone cavity on 4T1.0 cells, when the cells were injected into bone cavity, suggesting the contribution of Nfe2 to bone metastasis formation.

### <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

#### 1. ドナー由来白血病 (DCL) 発症過程での白血病細胞由来細胞外小胞 (EV) の役割

骨髄幹細胞移植は、種々の血液系の悪性腫瘍の根治的治療法として広く用いられている。慢性骨髄性白血病 (CML) マウスに対して、放射線照射後に骨髄移植を行うと、DCLに類似した、ドナー細胞由来の種々の骨髄系の悪性疾患が発症するモデルを樹立した。このモデルにおいて、核の複製障害によって、simulator of interferon genes (STING) 経路が活性化された白血病細胞が生成した二重鎖DNAを含むEVが、隣接の正常骨髄細胞に伝播され、DNA感知経路を活性化することによって、正常骨髄細胞を白血病化することを明らかにした。

#### 2. BCR-ABLによる細胞老化と細胞老化関連分泌形質(SASP)

BCR-ABL 発現骨髄幹/前駆細胞を移植すると、CML が発症するとともに、 $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 活性を示すとともに、細胞老化に密接に関与している p16・p21 が発現している BCR-ABL 陽性 CD41 陽性 CD150 陽性の巨核球様白血病細胞 (MgkL) が骨髄内で増加した。BCR-ABL 発現 p16・p21 の重複欠損骨髄幹/前駆細胞の移植では、MgkL の増加は認められず、CML 細胞の幹細胞能も低下した。SASP の一つである TGF- $\beta$ 1 の発現が MgkL 細胞で亢進していて、TGF- $\beta$ 1 抑制で CML 細胞の複製能も低下した。BCR-ABL 発現 MgkL 細胞はオートファジー活性が上昇し、CML マウスに対してオートファジーを抑制すると骨髄内 MgkL 細胞数が減少するとともに、チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ投薬後の生存率も改善することを認めた。したがって、BCR-ABL によって増加した MgkL 細胞は、CML 細胞の幹細胞能の維持能を示す TGF- $\beta$ 1 を産生することで、CML の進行に関与していると考えられた。

#### 3. 骨転移巣乳がん細胞に選択的に発現亢進している転写因子の役割

マウス triple-negative 乳がん細胞株 4T1.0 株から、免疫不全の認められない BALB/c マウスの乳房脂肪組織への同所接種後に、高率に骨へ転移する亜株 4T1.3 株を樹立した。包括的遺伝子発現解析の結果、骨内の 4T1.3 株では、Lmo2・Nfe2・Myb の3つの転写因子が、4T1.0 株に比べて、発現が亢進していた。これらの転写因子のうち、Nfe2 を 4T1 株に遺伝子導入した株のみが、コントロール株に比べて、骨内接種した時の腫瘍形成が亢進していたことから、Nfe2 が骨内転移巣形成に密接に関与していることが示唆された。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

#### 原著論文

(共同研究)

1. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Horike S, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene* 2019, 38 (14): 2464–2481. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1.
2. Li F, Kiajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie DA, Mukaida N, and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Res* 2019, 79 (15): 3903-3915. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3604.
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Furuta M, Kimura A, Taruya A, Yamamoto H, Shimada E, Akiyama M, Mukaida N, and Kondo T. CCL2-mediated reversal of impaired skin wound healing in diabetic mice by normalization of neovascularization and collagen accumulation. *J Invest Dermatol* 2019, 139 (12): 2517-2527.e5. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.022.
4. Ji DX, Yamashiro LH, Chen KJ, Mukaida N, Kramnik I, Darwin KH, and Vance RE. Type I interferon-driven susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by IL-1Ra. *Nature Microbiol* 2019, 4 (12): 2128-2135. doi: 10.1038/s41564-019-0578-3.
5. Song Y, Ji B, Jianga C-X, Chen Z-M, Yao N-H, Mukaida N, and Huang H. IL17RB expression might predict prognosis and benefit from gemcitabine in patients with resectable pancreatic cancer. *Pathol Res Pract* 2019, 215 (12): 152650. doi: 10.1016/j.prp.2019.152650.
6. Thiel G, Mukaida N, and Rössler O. Regulation of stimulus-induced interleukin-8 gene transcription in human adrenocortical carcinoma cells – role of AP-1 and NF-κB. *Cytokine* (in press) doi: 10.1016/j.cyto.2019.154862.
7. Yoshimura T, Nakamura K, Li C, Fujisawa M, Shiina T, Imamura M, Li T, Mukaida N, and Matsukawa A. Cancer cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is dispensable for the progression of 4T1 murine breast cancer. *Int J Mol Sci* (in press)

#### 総説論文.

1. Mukaida N, Nosaka T, Nakamoto Y, and Baba T. Lung macrophages: multifunctional regulator cells for metastatic cells (Invited review). *Int J Mol Sci* 2019; 20 (1): 116. doi: 10.3390/ijms20010116. Special issue on “Tumor microenvironment”

#### <学会発表> (筆頭発表者が分野所属の者に限る)

1. 佐々木宗一郎, 向田直史。骨転移巣特異的に乳がん細胞で発現が亢進する転写因子の解析。第23回日本がん分子標的治療学会学術集会。2019年6月12日～14日。大阪。
2. 佐々木宗一郎, 向田直史。骨微小環境特異的にマウス乳がん細胞株で発現が亢進する転写因子を介した骨転移制御機構の解析。第28回日本がん転移学会学術集会・総会。2019年7月25日～26日。鹿児島。
3. Baba T and Mukaida N. Crucial contribution of leukemia-derived extracellular vesicles to the development of donor cell-derived leukemia. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
4. Zhang D, Sasaki S, Baba T, and Mukaida N. The role of transcription factors, Lmo2, Nfe2l3, Myb, in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
5. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. The pathological role of BCR-ABL-induced senescence in chronic myeloid leukemia. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
6. 馬場智久, 向田直史。ドナー細胞由来白血病における白血病細胞由来細胞外小胞の病態生理学的役割。金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム2019。2019年12月16日。金沢。

#### <学術雑誌の編集>

向田直史

1. Associate Editor, Cytokine, An official Journal of International Cytokine and Interferon Society.
2. Guest Editor, Int J Mol Sci, Special issue on “Tumor Microenvironment”.

#### <外部資金>

向田直史

1. AMED 肝炎等克服実用化研究事業(分担) 「獲得免疫反応の賦活化により核内HBV cccDNAを排除する方法の開発」(直接経費 1,385千円, 間接経費 415千円)

佐々木宗一郎

1. 科学研究費・基盤研究(C) (代表) 「新規乳がん骨転移モデルの解析を通じた, 新規標的分子の探索」(直接経費 1,600千円, 間接経費 480千円)
2. AMED 創薬ブースター (代表) 「骨転移したがん細胞の増殖を選択的に抑制するメカニズムの標的検証」(直接経費 4,545千円, 間接経費 456千円)



# がん微小環境研究プログラム

## Division of Immunology and Molecular Biology

### 免疫炎症制御研究分野

Professor	Takashi Suda 須田 貴司
Assistant Professor	Takeshi Kinoshita 木下 健, Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介
Graduate Student	Mahib, Muhammad Mamunur Rashid (D3~D4)
Assistant Staff	Shoko Hosojima 細島 祥子
Research Cooperator	Hiroko Kushiyama 串山 裕子

#### 【 Abstract 】

Pyroptosis was discovered as caspase-1-dependent cell death of macrophages that were infected by intracellular pathogens such as *Salmonella Typhimurium*. However, pyroptosis has been observed in other cell types including T cells, intestinal epithelial cells and various cancer cell lines. Morphologically, pyroptosis resembles necrosis rather than apoptosis. Because pyroptotic cells release inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18 as well as intracellular inflammatory substances called DAMPs or alarmins, pyroptosis is inevitably inflammatory cell death as opposed to apoptosis that is often described as non-inflammatory cell death. Recent reports revealed that in addition to caspase-1, caspase-4 and 5 in humans and caspase-11 in mice mediates pyroptosis. Furthermore, it was discovered that these caspases (caspase-1, 4, 5, 11) cleaves a common protein substrate, gasdermin D (GSDMD), and the resulted N-terminal fragments of GSDMD form pores in the plasma membrane to induce pyroptosis.

Interestingly, while the caspase-4/5/11-mediated pyroptosis is highly dependent on GSDMD, we have found that activation of caspase-1 induces cell death in GSDMD-KO cells. Recently, we demonstrated that this caspase-1-mediated and GSDMD-independent cell death is apoptosis dependent on Bid, caspase-9 and 3, but not on caspase-2, 6, 7 and 8. It was previously reported that cortical neurons cultured under oxygen-glucose deprivation (OGD) conditions exhibit caspase-1-dependent apoptosis accompanied with caspase-3 and Bid cleavage. We found that wild-type cortical neurons express caspase-1 but little GSDMD, and Bid-KO neurons as well as caspase-1-KO ones are resistant to OGD treatment. In addition, wild-type bone marrow-derived mast cells, which express GSDMD at very low levels, exhibit Bid-dependent apoptosis in response to caspase-1 activation by LPS + nigericin stimulation. These results revealed that activated caspase-1 induces Bid-dependent apoptosis in both artificially and naturally GSDMD-deficient cells, although the same elicits GSDMD-dependent pyroptosis in GSDMD-sufficient cells (Nat Commun, 2019). Nevertheless, caspase-1 activation induces reduced and delayed apoptosis in GSDMD/Bid-double KO cells compared to GSDMD-single KO cells. We found that caspase-1-mediated apoptosis in GSDMD/Bid-double KO cells is caspase-7 dependent, indicating multiple back up mechanisms for caspase-1-dependent cell death (Microbiol Immunol, 2019).

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. カスパーゼ1によるアポトーシスの誘導の分子機構の解析

細菌感染などで活性化したカスパーゼ1はGasdermin D (GSDMD)を切断することで、マクロファージや腸上皮細胞などにパイロトーシスと呼ばれるネクローシス様のプログラム細胞死を誘導する。しかし、GSDMD 欠損マクロファージはカスパーゼ1依存性細胞死が完全には抑制されず、野生型細胞より遅延して細胞死を起こす。我々はこれまでに、GSDMD 欠損マクロファージや大腸癌細胞株では、カスパーゼ1の活性化により Bid 依存性および非依存性アポトーシスが誘導されることを見出してきた。本年度は、神経細胞やマスト細胞はカスパーゼ1を発現しているが、元来 GSDMD を発現しておらず、野生型マウス由来大脳皮質神経細胞を酸素・グルコース欠乏条件で培養した場合や野生型マウス骨髄由来マスト細胞を LPS+ニゲリシンで刺激した場合に、カスパーゼ1および Bid 依存性にアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Nat Commun, 2019)。また、GSDMD/Bid 二重欠損マウスのマクロファージなどを用い、GSDMD も Bid も存在しない細胞では、カスパーゼ1の活性化によりカスパーゼ7依存性のアポトーシスが誘導されることを見出した (Microbiol Immunol, 2019)。

### 2. 自然免疫応答におけるモーター蛋白 KIF11 の役割の解析

パイロトーシスシグナル伝達関連因子として単離したモーター蛋白 KIF11 が複数の NLR パスウェイを制御する可能性を検証した。蛍光免疫染色と共焦点顕微鏡観察および PLA 法で NLRC4、NOD2、NLRP3 と KIF11 が内在性タンパクレベルで結合することを確認した。NLRC4 と KIF11 の結合が KIF11 インヒビターで減弱することも観察された。また、NLRC4 および NLRP3 刺激で誘導されるカスパーゼ1の活性化が複数の KIF1 インヒビター処理で抑制されること、さらに、NLRP3 刺激で誘導されるアダプター分子 ASC の重合も複数の KIF1 インヒビター処理で抑制されることを示すデータも得た。以上より KIF11 が NLRC4、NLRP3、NOD2 活性化に関与することが示唆された。

### 3. パイロトーシス細胞が放出する低分子化合物の生理活性の解析

我々は、同一細胞株に由来し、同一刺激でアポトーシスを起こす細胞株とパイロトーシスを起こす細胞株の組み合わせを複数樹立してきた。これらの細胞株を用いてアポトーシスを起こした細胞の培養上清中とパイロトーシスを起こした細胞の培養上清中に含まれる低分子化合物を網羅的に解析した結果、パイロトーシス細胞の培養上清中に選択的に放出される物質 A を同定した。また、パイロトーシス細胞の培養上清中にマクロファージに感染した細胞内リステリアの増殖を抑制する活性を見出した。この活性は 3kD カットオフの限外濾過膜を通過し、熱処理 (95°C、5分) に抵抗性を示した。さらに、物質 A が細胞内リステリア増殖を抑制する活性を示したことから、この物質がパイロトーシス細胞の放出する細胞内リステリア増殖抑制活性の責任分子である可能性が高い。現在、物質 A の細胞内リステリア増殖抑制活性の分子メカニズムを解析している。また、今後、生理的な条件でアポトーシスやパイロトーシスを誘導したマクロファージから物質 A が放出されるか、物質 A が動物レベルでリステリア増殖抑制活性を示すかなどを検討する予定である。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Mahib MR, Hosojima S, Kushiya H, Kinoshita T, Shiroishi T, Suda T, and Tsuchiya K. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid. *Microbiol. Immunol.* 2020, 64(2):143-152.
2. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, Mahib MR, Yamaguchi Y, Miura M, Kinoshita T, Kushiya H, Sakurai M, Shiroishi T, and Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nat Commun*, 2019, 10:2091.
3. Fang R, Uchiyama R, Sakai S, Hara H, Tsutsui H, Suda T, Mitsuyama M, Kawamura I, and Tsuchiya K. ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. *Mucosal Immunol.* 2019, 12:1092-1103

(共同研究)

1. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, Yamamoto S, Imamura R, Takasaki I, Hara H, Sasahara M, Arita M, Hida S, Taniguchi S, Suda T, and Takatsu K. Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J.* 2019, 33:11821-11835.
2. Dodo K, Kuboki E, Shimizu T, Imamura R, Magarisawa M, Takahashi M, Tokuhiko T, Yotsumoto S, Asano K, Nakao S, Terayama N, Suda T, Tanaka M, and Sodeoka M. Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis. *ACS Med Chem Lett.* 2019, 10:1272-1278.

総説

1. 須田貴司. パイロトーシスの分子機構と役割. *Dojin Bioscience Series 細胞死 その分子機構、生理機能、病態制御.* 三浦正幸、清水重臣編、第 10 章、97-110 ページ

### < 学会発表 >

1. Tsuchiya K, and Suda T: Pyroptosis enhances antibiotic therapy of listeriosis. The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Sapporo, April 23-25, 2019
2. Saeki A, Tsuchiya K, Suda T, Into T, Hasebe A, Suzuki T and Shibata K: How does the mycoplasmal lipopeptide FSL-1 induce IL-1 $\beta$  release by living macrophages? The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Sapporo, April 23-25, 2019
3. Mahib MR, Tsuchiya K, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, and Suda T. Caspase-1 initiates Bid-dependent apoptosis in neurons and mast cells. The 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Death Research, Tokyo, July 12-13, 2019

4. Tsuchiya K, Mahib MR, and Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. The 17<sup>th</sup> International Congress of Immunology (IUIS2019). Beijing China, Oct 22, 2019
5. 木下 健, 土屋 晃介, 須田 貴司: 自然免疫応答におけるモーター分子 Eg5 の役割. 第 42 回分子生物学会年会, 福岡, 12 月 3-6 日, 2019
6. Tsuchiya K, and Suda T: Gasdermin D mediates IL-1 $\alpha$  maturation during inflammasome formation. The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hamamatsu, December 11-13, 2019

#### <外部資金>

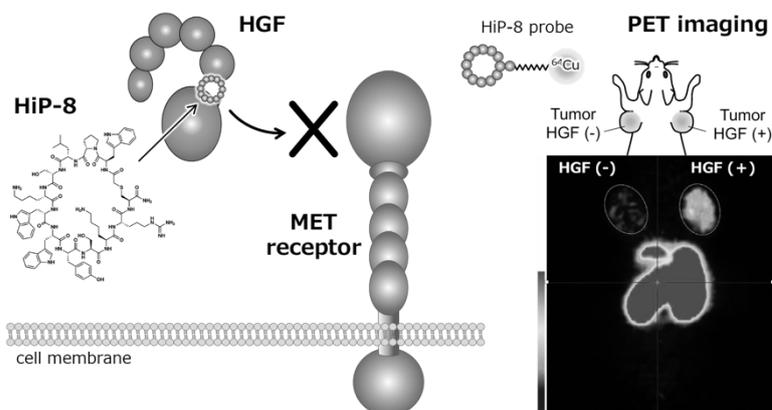
1. 土屋晃介 (研究代表者) 令和元年度 科研費 基盤研究 (C) 「細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法の協調的相互作用から理解する試み」 1,430 千円 (直接経費 : 1,100 千円、間接経費 : 330 千円)
2. 土屋晃介 武田科学振興財団 医学系研究助成 (基礎) 「カスパーゼ-1 による細胞死誘導の分子機序とインフラマソーム関連疾患における役割」 2,000 千円
3. 土屋晃介 琉球大学熱帯生物圏研究センター・2019 年度 共同利用共同研究事業 「肺胞上皮におけるインターロイキン-17F 産生の意義と分子基盤」 250 千円

## Division of Tumor Dynamics and Regulation 腫瘍動態制御研究分野

Professor	Kunio Matsumoto 松本 邦夫
Assistant Professors	Katsuya Sakai 酒井 克也 Ryu Imamura 今村 龍 Hiroki Sato 佐藤 拓輝
Graduate Student	Jangphattananont Nawaphat (2019.10 ~ 2020.03 博士研究員)
Assistant Staff	Yumiko Tahira 田平 裕美子 Izumi Hashitani 端谷 泉

### 【Abstract】

HGF (Hepatocyte Growth Factor) and MET receptor as target molecules, our research is focusing on 1) discovery of new physiological function of MET, 2) elucidation of dynamic structural base for MET receptor activation, 3) discovery of cyclic peptides for HGF/MET and application to theranostics (therapeutics and diagnosis by the same molecule). Our research progresses in 2019 are followings. (1) HGF-inhibitory Peptide-8 (HiP-8), a macrocyclic peptide which specifically binds to active two-chain HGF (tcHGF) but not inactive single-chain HGF (scHGF) was identified. HiP-8 could detect tcHGF in cancer patients' tissues and showed an excellent property as a molecular probe for PET diagnosis in cancer model. HGF showed dynamic domain movement in high-speed atomic force microscopy, whereas HiP-8 captured HGF and changed it to be static. HiP-8 seems to be an excellent molecular tool for cancer diagnosis. (2) Localization of tcHGF in the stomach was revealed, by using monoclonal antibody selective for tcHGF. HGF promoted the survival and growth of gastric stem cells, tcHGF and pMET (active MET) localization overlapped with gastric stem cells. The results suggest the importance of tcHGF in the regulation of regeneration and stem cell behavior in the stomach. (3) The significance of MET extracellular mutations are largely unknown. We found that V370D mutation in the MET impairs the functional association with HGF and is therefore a loss-of-function mutation. This mutation changed the dependence of cell growth/survival on signaling molecules, which may promote cancer cell characteristics under certain conditions. (4) MET receptor participates in inflammatory cytokine production and innate immune response upon RNA virus infection independent on its tyrosine kinase activity. MET plays a role in innate immune response upon RNA virus infection. This is new physiological function of MET, which is regulated by non-canonical tyrosine kinase-independent mechanism.



## <2019年の研究成果, 進行状況>

### 1. HiP-8 取得・作用機作・分子イメージング

HGF は前駆体 single-chain HGF (scHGF) として分泌され、がん細胞近傍で活性化 two-chain HGF (tcHGF) に変換される。tcHGF に選択的に結合・阻害する HGF-inhibitory Peptide-8 (HiP-8) を取得した。HiP-8 プローブ ( $^{64}\text{Cu}$ -HiP-8) ならびにヒトがん組織を模倣するヒト HGF ノックインマウスを用いた PET 解析から、HiP-8 は tcHGF ならびに活性化 MET を検出する優れた診断用分子ツールになることを明らかにした。また、高速原子間力顕微鏡 (AFM) 解析により、HiP-8 は HGF のダイナミックな分子動態を強く阻害することを見出した (*Nat Chem Biol*, 2019)。

### 2. tcHGF 生成とがん転移微小環境形成

悪性黒色腫の肺転移モデルを用いて、腫瘍細胞由来因子を介した肺組織血管平滑筋細胞での HGF 産生誘導と scHGF から tcHGF の変換促進、tcHGF の形成・局在に一致する腫瘍細胞の微小転移コロニーの局在を明らかにした。tcHGF の生成は転移性ニッチ形成に重要な役割を果たすと考えられる。

### 3. 胃粘膜恒常性維持や上皮幹細胞制御における tcHGF の役割

scHGF は胃粘膜平滑筋細胞に局在する一方、tcHGF は Lgr5 陽性胃粘膜幹細胞近傍に局在した。また、Lgr5 胃粘膜幹細胞で MET 活性化が認められるとともに HGF はオルガノイド形成を促進したことから、tcHGF の局所的生成を介した MET 活性化は胃粘膜上皮幹細胞の制御に関与することが示唆される (*Int J Mol Sci*, 2019)。

### 4. Non-canonical MET 経路を介した自然免疫制御

(1) RNA ウイルス感染を模倣する 2 本鎖 RNA の細胞内導入により炎症性サイトカイン産生が誘導される自然免疫応答が、MET 欠損で低下すること、(2) 自然免疫応答性は MET 細胞内ドメインが関与するものの MET 受容体チロシンキナーゼ活性に依存しないことを見出した。MET 受容体を介した 2 本鎖 RNA 自然免疫応答は、キナーゼ依存的シグナル経路とは独立であり、MET の新しい生理機能である。

### 5. がん患者で見出された MET 細胞外 SEMA 領域の V370D 変異の解析

MET 受容体の細胞外変異についての機能・意義はほとんど不明である。MET 細胞外 V370D 変異を解析した結果、この変異体は HGF に対する親和性を失った loss-of-function であり、V370D 変異による MET 活性化不全が生存・増殖の代替シグナル依存性に影響し、がん進展に関与する可能性が示唆される (*Cancer Sci*, 2019)。

## <今後の計画>

1. MET 受容体活性化の構造ダイナミクスの研究
2. HiP-8 を分子ツールとするイメージング活用創薬
3. 自然免疫制御における MET の機能に関する研究
4. HGF-MET 系を介したがん転移性ニッチ形成

## 【 研究業績 】

### <論文発表>

原著

(研究室主体)

1. Sakai K, Passioura T<sup>†</sup>, Sato H<sup>†</sup>, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe, Yano S, Shibata M, Suga H<sup>§</sup>, Matsumoto K<sup>§</sup>. Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor. *Nature Chem Biol*, 15: 598-606, 2019. (†equal contribution; §corresponding authors)
2. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF from its precursor form in developing and repairing stomach. *Int J Mol Sci*, 20: 2944, 2019.
3. Miao W, Sakai K, Sato H, Imamura R, Jangphattananont N, Takagi J, Nishita M, Minami Y, Matsumoto K. Impaired ligand-dependent MET activation caused by an extracellular SEMA domain missense mutation in lung cancer. *Cancer Sci*, 110: 3340-3349, 2019.

(共同研究)

1. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, Yamamoto S, Imamura R, Takasaki I, Hara H, Sasahara M, Arita M, Hida S, Taniguchi S, Suda T, Takatsu K. Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J*, 33: 11821-11835, 2019.
2. Dodo K, Kuboki E, Shimizu T, Imamura R, Magarisawa M, Takahashi M, Tokuhiko T, Yotsumoto S, Asano K, Nakao S, Terayama N, Suda T, Tanaka M, Sodeoka M. Development of a water-soluble indolylmaleimide derivative IM-93 showing dual inhibition of ferroptosis and NETosis. *ACS Med Chem Lett*, 10: 1272-1278, 2019.

### <総説・著書>

1. Mizutani S, Matsumoto K, Kato Y, Mizutani E, Mizutani H, Shibata K. New insights into human endometrial aminopeptidases in both implantation and menstruation. *Biochim Biophys Acta – Proteins & Proteomics*, 1868, 2019, in press.
2. 佐藤拓輝, 酒井克也, 菅裕明, 松本邦夫. 特殊環状ペプチドによる人工細胞増殖因子・阻害分子の創成と応用. ペプチド創薬の最前線(第22章). シーエムシー出版, 2019.

### <学会発表>

1. 中村希, 岩佐奈実, 川上紗代子, 有森貴夫, 酒井克也, 松本邦夫, 高木淳一. ダイナミックな運動性をもつマルチドメイン蛋白質 HGF の高難度結晶化の試み. 第19回日本蛋白質科学会年会, 2019年6月24日(神戸国際会議場)
2. 酒井克也, 佐藤拓輝, 柴田幹大, 高木淳一, 加藤幸成, 向井英司, 渡辺恭良, 矢野聖二, 菅裕明, 松本邦夫. 環状ペプチドによる HGF 阻害と高速原子間力顕微鏡による分子動態計測. 第92回日本生化学会大会, 2019年9月19日(パシフィコ横浜)

3. Sato H, Sakai K, Passioura T, Imamura R, Mukai H, Watanabe Y, Yano S, Suga H, Matsumoto K. Specific Detection of Active HGF for Diagnosis Reflecting Activation Status of HGF-MET Signaling by Macrocyclic Peptide. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 28 日(京都)
4. 葛西傑, 安本和生, 川島篤弘, 松本邦夫, 矢野聖二, 元雄良治. スキルス胃がん発育進展に特有の CAF が関与する. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 26 日(京都)
5. Nishita M, Matsumoto K, Minami Y. Wnt5a-Ror1 signaling promotes invasion of lung adenocarcinoma cells through Rif-mediated formation of filopodia. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 27 日(京都)
6. Mukai H, Warashina S, Sato H, Zouda M, Sakai K, Passioura T, Wada Y, Suga H, Matsumoto K, Watanabe Y. Mature-form hepatocyte growth factor-specific PET imaging in tumor-bearing mice using a macrocyclic peptide probe. World Molecular Imaging Congress. Sept 4 - 7, 2019, Montreal.
7. Nishita M, Kamizaki K, Nishikaku I, Shibuya H, Matsumoto M, Minami Y. Ror1 signaling through Dvl and Rif promotes invasion of lung adenocarcinoma cells. American Society of Cell Biology, Dec 7-11, 2019(ワシントン DC)
8. Tahira Y, Miao W, Sakai K, Sato H, Imamura R, Jangphattananont N, Matsumoto K. 細胞外 SEMA ドメインミスセンス変異に起因するリガンド依存性 MET 活性化の障害. 第 42 回 日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 3 日(福岡)
9. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF and precursor form in developing and repairing stomach. 第 42 回 日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 4 日(福岡)

#### <シンポジウム・講演>

1. 松本邦夫. Macrocyclic peptidetargeting HGF and MET. 理化学研究所 生命機能科学研究センターセミナー”Cancer Research and Development Advanced by PET Molecular Imaging” 2019 年 1 月 18 日(神戸).
2. Matsumoto K. Macrocyclic peptide targeting HGF-MET. Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology between SNU-GCRC and KU-CRI. 2019 年 5 月 13 日 (Seoul National University, Korea).
3. Imamura R. Novel biological function of HGF receptor Met in immune response. Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology between SNU-GCRC and KU-CRI. 2019 年 5 月 13 日 (Seoul National University, Korea).
4. 松本邦夫. 金沢大学公開講座「がん研究の基礎. 第 3 回 無限増殖の仕組み - がん分子標的薬誕生の物語. 2019 年 5 月 26 日(金沢大学サテライトプラザ).
5. Matsumoto K. Macrocyclic peptide drug discovery targeting HGF and the receptor. 量子科学技術研究開発機構 関西光科学研究所セミナー. 2019 年 6 月 4 日(関西光科学研究所).
6. Matsumoto K. Macrocyclic Peptides Targeting HGF-MET. 3rd NanoLSI Symposium at UBC in Vancouver - Supramolecular Chemistry and Nanoprobes in Life Sciences. 2019 年 8 月 8 日 (University of British Columbia, Canada).

7. Matsumoto K. SPM application for cancer research. 8th Bio-AFM Summer School. 2019年8月19日(金沢大学).
8. 松本邦夫. 環状ペプチドによる増殖因子制御の創薬. 特殊ペプチドの合成技術と創薬の最新動向. CMC+AndTech FORUM-技術セミナー. 2019年9月4日(東京).
9. Sakai K. Approaches using macrocyclic peptides and atomic force microscopy. International Sessions-7: Cancer medicine created by nano-life science. 78th The Japanese Cancer Association. 2019年9月27日(京都)
10. Matsumoto K. Macrocyclic peptide-based inhibition and nano-imaging of HGF. The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences “Frontier in Medical Science and Microbial Diseases”. 2019年10月2日(大阪大学).
11. 松本邦夫. がんを再生をコントロールする分子の話とベンチャーの挑戦. 金沢大学公開講座 ミニ講演. 2019年10月19日(金沢大学サテライトプラザ).
12. 松本邦夫. ゲノム ABC. 北信がんプロ市民公開講座「令和元年 最新のがん医療」2019年10月20日(金沢大学).
13. Matsumoto K. Macrocyclic peptide targeting growth factor and the receptor. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa. Duke-NUS Medical School, Singapore (Duke-NUS) and Kanazawa University Cancer Research Institute (KU-CRI) Joint Symposium. 2019年10月29日(金沢大学).
14. 松本邦夫. 増殖因子受容体制御のナノダイナミック制御と創薬. 大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series. 2019年11月1日(大阪大学).
15. 松本邦夫. 環状ペプチド技術と細胞増殖因子研究融合による合成バイオリジクス. 薬物動態懇話会 第42回年会. 2019年11月14日(浜松).
16. 松本邦夫. MET 受容体を制御する高機能環状ペプチドとプロテインエンジニアリング. 金沢大学がん進展制御研究所-北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム2019年12月16日(金沢大学).
17. 松本邦夫. 「がんの無限増殖とその生体分子」を観る. 金沢大学公開講座「ナノ生命科学研究所シリーズ: 顕微鏡でみる生命」. 2019年12月22日(金沢大学サテライトプラザ).

#### <外部資金>

1. 松本邦夫: 次世代がん医療創生研究事業 (P-CREATE) 「イメージング活用創薬の視点からの異分野技術融合によるシームレスな薬効評価システムの構築と実施」(分担課題) 「抗 HGF 特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬」(分担) 12,038 千円
2. 松本邦夫: 科学研究費補助金 基盤研究 (B) 「高機能環状ペプチド分子技術と融合する転移・薬剤耐性のがん微小環境の研究」(代表) 5,100 千円
3. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金 若手研究 「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」(代表) 1,000 千円

## Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging 腫瘍細胞生物学研究分野

Associate Professor            Eishu Hirata 平田 英周  
Assistant Professor            Kojiro Ishibashi 石橋 公二郎  
Technical Assistant            Sayuri Yamagishi 山岸 小百合

### 【 Abstract 】

Lung cancers often metastasize to the brain and present aggressive clinical courses. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors show certain effects in the treatment of lung cancers with EGFR mutation, however, the problem of drug resistance still remains to be solved. The treatment strategies become complicated once cancer cells acquire robust drug resistance with additional genetic mutations, therefore we crafted an initiative to target initial resistance rather than acquired resistance to reduce the number of surviving cells, which can be the source of recurrence. Brain metastasis models of PC9 and PC9-BrM3 human lung cancer cells very well respond to gefitinib, an EGFR inhibitor, however, small number of cell survive as minimal residual diseases (MRDs). Intriguingly, we find that the surviving cells have not acquired any intrinsic resistance during the responding phase, suggesting that these cells have been temporally tolerating the drug in the brain microenvironment. We also find that MRDs are surrounded by reactive astrocytes, which are marked with enhanced expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP).

To date, there is no proper system to evaluate cancer cell-astrocyte interaction in vitro because astrocytes lose the original phenotype and plasticity when cultured under conventional conditions. Here we develop a novel system and cultured astrocytes as mixed-glia cells on soft-substrates, where the astrocytes can maintain the plasticity. With this new culture method, we conduct long-term cancer cell-astrocyte co-culture experiments to investigate the mechanisms underlying the drug tolerance against EGFR inhibitors. We identify target molecules in the brain microenvironment to eliminate MRDs to obtain complete cure for lung cancer brain metastasis.

### <2019 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

2019 年 4 月より石橋 公二郎 助教が研究室に加わった。

#### (1) 脳転移休眠がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明

がん脳転移マウスモデルを用いた 1 細胞遺伝子発現解析により、脳微小環境によ

る DNMT1 発現抑制が脳転移がん細胞の生存 (pro-survival) と増殖抑制 (anti-proliferative) の原因となる遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。現在、この DNMT1 抑制をトリガーとする脳転移がん細胞のリプログラミングと細胞生存・休眠機構に関する論文を投稿中である。

#### (2) 新規アストロサイト培養法の確立と脳転移がん細胞の薬剤耐性機構の解明

EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 および PC9-BrM3 の脳転移巣は EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ) に良好に応答するが、がん細胞は完全には消失しておらず脳組織内に散在する形で微小残存病変 (MRD) を形成する。治療応答段階にある MRD は内因性の薬剤耐性を一切獲得しておらず、脳微小環境によって一時的に薬剤寛容を享受していることが示唆された。この耐性機構を明らかにすべく、これまで困難であったグリア細胞の安定的な長期培養法の確立に成功した。現在、MRD を駆逐しうる微小環境標的分子を同定すべく、新規 *in vitro* 共培養系を用いた機能解析を行っている。

#### (3) がん脳転移微小環境分子基盤の統合的理解

これまでの研究により、活性化アストロサイトにはがん促進性とがん抑制性の性質を有するものが混在していることを示唆するデータを得た。がん脳転移成立に関わる微小環境分子基盤の統合的理解に向け、現在、脳転移微小環境を構成する細胞群の 1 細胞遺伝子発現解析および薬剤スクリーニングによるアストロサイト・ミクログリアの機能変容解析を行っている。

#### (4) カルボン酸系双性イオン液体の細胞培養への応用

金沢大学理工研究域生命理工学系 黒田 浩介 博士との共同研究により、細胞培養研究において dimethyl sulfoxide (DMSO) の欠点を補いうる新たな溶媒として、ヒスチジン様構造を持つカルボン酸系双性イオン液体の可能性を見出した。現在、同イオン液体の細胞培養への応用に関する論文を投稿中である。

上記の他、金沢大学ナノ生命科学研究所 福間 剛士 博士及び柴田 幹大 博士との共同研究として (5) FRET バイオセンサーの合理的設計手法の開発に関する研究を、京都大学複合原子力科学研究所・近藤夏子博士との共同研究として (6) グリオブラストーマ治療におけるホウ素中性子捕捉療法 (Boron neutron capture therapy : BNCT) 耐性機構に関する研究を、ダブリン大学・Yan Yan 博士およびシンガポール国立大学・Chwee Ming Lim 博士との国際共同研究として (7) ネオアンチゲン搭載型がんナノワクチン療法の開発に関する研究をそれぞれ進めている。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Wang R, Yamada T, Arai S, Fukuda K, Taniguchi H, Tanimoto A, Nishiyama A, Takeuchi S, Yamashita K, Ohtsubo K, Matsui J, Onoda N, **Hirata E**, Taira S, Yano S. Distribution and activity of lenvatinib in brain tumor models of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune deficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 18(5):947-956, 2019.

著書・総説

1. **Hirata E** and Kiyokawa E. ERK activity imaging during migration of living cells in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 5;20(3). pii: E679. doi: 10.3390/ijms20030679, 2019.

2. 近藤 夏子、**平田 英周** がん生物学イラストレイテッド 第2版「第9章 6. 脳腫瘍」(編集 渋谷 正史・湯浅 保仁) 483-492頁 羊土社 (2019)

### < 学会発表 >

(招待講演)

1. **Hirata E**. “Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis” The 17th Stem Cell Research Symposium (Awaji, 24-25 May 2019)
2. **平田 英周** 「脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明」アステラス病態代謝研究会 竹中奨励賞受賞講演 (東京 2019年10月19日)

(その他)

1. **平田 英周** 「脳転移休眠がん細胞の謎を解く」 第1回日本医学会連合リトリート (木更津 2019年3月4-5日)
2. **Hirata E**. “DNMT1 suppression and epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells” Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology (Seoul, 12-15 May 2019)
3. **Hirata E**. “Epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells” The 9th KUCRI-FUSCC Joint Symposium (Kanazawa, 3 Sep, 2019)

4. 石橋 公二郎 「脳転移におけるがん抑制性・促進性アストロサイトの同定」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（大阪 2019年10月2-3日）
5. 石橋 公二郎 「転移性脳腫瘍におけるがん抑制性・促進性アストロサイトの制御メカニズム」 NanoLSI 公開セミナー（金沢 2019年11月5日）

#### <知的財産>

特願 2019-90509 「非プロトン性双性イオンを用いた未分化促進剤及び凍結保護剤」  
黒田 浩介、平田 英周

#### <その他>

（セミナー開催）

第1回腫瘍細胞生物学セミナー「発がん細胞競合」東京理科大学 昆 俊亮 先生

第2回腫瘍細胞生物学セミナー「Mechanism of cancer progression triggered by tissue stiffness」北海道大学 石原 誠一郎 先生

（受賞）

第1回日本医学会連合リトリート・優秀発表賞 [平田 英周]（木更津 2019年3月5日）

#### <外部資金>

1. 基盤研究 (C) [研究代表者：平田 英周]

「脳転移肺がん細胞の薬剤応答と初期耐性のキネティクス解析に基づく新規治療法の開発」 1,950 千円

2. 基盤研究 (C) [研究分担者：平田 英周]

「リプログラミング技術による非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍のエピゲノム解析と治療開発」 65 千円

3. AMED 次世代がん医療創生研究事業 [研究代表者：平田 英周]

「アストロサイトを標的としたがん脳転移根治療法の開発」 13,000 千円

4. 内藤記念科学奨励金・研究助成 [研究代表者：平田 英周]

「アストロサイトを標的としたがん脳転移根治療法の開発」 3,000 千円

5. MSD 生命科学財団研究助成・がん領域 [研究代表者：平田 英周]

「脳転移におけるがん促進性・抑制性アストロサイトの同定」 1,500 千円

6. 研究活動スタート支援 [研究代表者：石橋 公二郎]

「がん脳転移関連アストロサイトの制御機構の解明」 1,430 千円

# がん分子標的探索プログラム

## Division of Molecular Cell Signaling

### シグナル伝達研究分野

Professor	Katsuji Yoshioka 善岡 克次
Assistant Professor	I Ketut Gunarta (2019.5.1～)
Graduate Student	Dewi Yuliana (D4), Jambaldej Boldbaatar (D4), Ryusuke Suzuki 鈴木 隆介 (D3), Purvee Erdenebaatar (D3), Ravdandorj Odongoo (D2)
Assistant Staff	Hisayo Inotani 猪谷 久世

#### 【 Abstract 】

We have been studying intracellular trafficking of proteins and organelles, and chromosomal stability, focusing on the MAP kinase (MAPK) signaling scaffold proteins, JSAP1 and JSAP2. In recent years, JSAP2 has been identified as a candidate biomarker for cancer. Increasing evidence indicates that curcumin, a commonly used natural product for antitumor therapy, induces autophagy, MAPK pathway activation, and reactive oxygen species (ROS)-mediated cell death. We explored the role of JSAP2 in curcumin-induced cancer cell death, and found that *JSAP2* knockdown (KD) increases cell death and intracellular ROS levels. Furthermore, *JSAP2* KD impaired lysosomal accumulation around perinuclear regions, which led to the inhibition of autophagosome–lysosome fusion, and attenuated p38 MAPK activation in curcumin-treated cells. The decreases in cell viability and p38 MAPK activation were reversed by expressing wild-type JSAP2 but not a JSAP2 mutant lacking the p38 MAPK-binding domain. In addition, the inactivation of a key gene involved in autophagy increased sensitivity to curcumin-induced cell death. Collectively, these results suggest that JSAP2 mediates the induction of autophagy by regulating lysosomal positioning and p38 MAPK signaling, indicating an overall protective role in curcumin-induced ROS-mediated cancer cell death (Boldbaatar and Gunarta *et al.* BBRC, *in press*).

Chromosome segregation is one important step during mitosis, and errors in this process could lead to abnormal cell division and chromosomal instability, which are frequently observed in cancer cells. In addition, JSAP2 has been reported to interact with PLK1, a key mitotic kinase. To date, however, the role of JSAP in mitosis remains largely unknown. We are attempting to clarify the functions of JSAP1 and JSAP2, using conditional knockout mouse embryonic fibroblasts and mice, and normal human diploid cell line hTERT-RPE-1. Our results may suggest that JSAP1 and JSAP2 are critical and functionally redundant in mitotic chromosome segregation.

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. クルクミン誘導性細胞死における JSAP2 の役割とその分子メカニズム

クルクミンはウコンの主要成分であり、抗腫瘍活性を示すことが知られている。またクルクミンは、オートファジーの誘導や MAP キナーゼ (MAPK) 細胞内情報伝達経路の活性化、及び活性酸素 (ROS) を介した細胞死に関与するとの知見も得られている。しかし、クルクミン誘導性のがん細胞死について、その分子メカニズムの詳細は不明である。JSAP2 ノックダウン (KD) 細胞 (HeLa, HCT116 細胞など) の解析、及び野生型あるいは変異型 (p38 MAPK との結合能を欠く) JSAP2 を用いたレスキュー実験を行い、JSAP2-p38 MAPK 経路はクルクミン誘導性細胞死に対して抑制的に働くことを明らかにした。また、JSAP2 KD 細胞では ROS レベルが有意に高く、JSAP2 KD によるクルクミン誘導性細胞死の亢進は、抗酸化剤 NAC によってほぼ完全に抑制されることを見出した。さらに、2種類の蛍光タンパク質 (赤色蛍光タンパク質 mRFP, 緑色蛍光タンパク質 GFP) と LC3 (オートファジーマーカー) の融合タンパク質 mRFP-GFP-LC3 を用いて、クルクミン誘導性オートファジーの解析を行った。その結果、JSAP2 KD 細胞では、クルクミンに応答したリソソームの核周辺への集積が認められず、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害されることを明らかにした。以上の結果から、JSAP2 はオートファジーと p38 MAPK 経路を制御することにより、クルクミン誘導性の ROS を介したがん細胞死を抑制すると考えられる (Boldbaatar *et al*, BBRC, *in press*)。

### 2. JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御

今年度、我々は、リソソームの細胞内局在に焦点を当てた研究を行い、JSAP2 がリソソーム細胞内局在の新規制御因子として働くことを強く示唆する結果を得た。今後、より詳細な解析を行い、JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御機構を分子レベルで明らかにする。

### 3. 染色体安定性における JSAP の機能解析

我々は、これまでに、*Jsap1, 2* 二重破壊が誘導可能なマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を解析し、JSAP は染色体分配制御に関わる重要な因子であり、JSAP 機能喪失は染色体不安定性を誘導することを示唆する結果を得ている。今年度は、ヒト不死化 RPE-1 細胞 (正常二倍体の染色体数を持つ) についての解析を行った。その結果、*JSAP1, 2* ダブル KD 細胞では、増殖阻害が誘導されることを見出した。また、細胞老化マーカーである酸性  $\beta$  ガラクトシダーゼ陽性細胞も検出された。異数性が高い細胞は増殖阻害を示すことが知られており、今回得られた結果から、*JSAP1, 2* ダブル KD によって染色体不安定性が誘発された可能性が考えられる。今後、さらに解析を進め、染色体安定性における JSAP の役割とその分子メカニズムを明らかにする。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Boldbaatar J, Gunarta IK, Suzuki R, Erdenebaatar P, Davaakhuu G, Hohjoh H, Yoshioka K. Protective role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in curcumin-induced cancer cell death *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.154 (in press)
2. Suzuki R, Gunarta IK, Boldbaatar J, Erdenebaatar P, Odongoo R, Yoshioka K. Functional role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in lysosome localization and autophagy. *Drug Discov Ther*. doi: 10.5582/ddt.2020.01001 (in press)

### < 学会発表 >

1. Gunarta IK. Protective role of JLP-dependent lysosome positioning in reactive oxygen species (ROS)-induced cell death. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019, 2019年10月29日, 金沢
2. Suzuki R, Yoshioka K. Functional role of JLP in lysosomal positioning. 第42回日本分子生物学会年会, 2019年12月3日, 福岡
3. Gunarta IK, Boldbaatar J, Erdenebaatar P, Suzuki R, Yoshioka K. Role of JLP in reactive oxygen species (ROS)-induced cell death and lysosome positioning. 第42回日本分子生物学会年会, 2019年12月4日, 福岡

### < 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 若手研究 (B) (研究代表者: I Ketut Gunarta) “Role of kinesin/dynein adaptor JSAP in reactive oxygen species-induced cell death and lysosome positioning” 1,100 千円

## Division of Translational and Clinical Oncology

### 腫瘍制御研究分野

Professor	Toshinari Minamoto 源 利成
Assistant Professor	Takahiro Domoto 堂本貴寛
Postdoctoral Researcher	Ilya V. Pyko ピコ イリア(～2019年8月)
Research Fellow	Kenkei Hasatani 波佐谷兼慶(研究生, 2019年7月～)
Graduate Student	Dilireba Bolidong(D4), Hiroyoshi Nakanishi 中西宏佳(D3), Masahiro Uehara 上原将大(D3), Ryosuke Ota 太田亮介(D2), Yasuto Tomita 富田泰斗(金沢医科大学一般・消化器外科学, ～2019年3月), Kensaku Abe 阿部健作(整形外科), Satoshi Takenaka 竹中 哲(消化器・腫瘍・再生外科学)
MRT* Program Student	Shuhei Morita 守田周平, Takashi Ishida 石田 岳(2018.12.～)
Assistant Staff	Atsuko Asaka 浅香敦子, Naoko Abe 阿部尚子(組織バンク)

\*MRT: Medical research training

#### 【 Abstract 】

The mission of our division centers on laboratory and clinical research to develop the novel strategies and modalities for diagnosis and treatment of the gastrointestinal, refractory and rare cancers including glioblastoma, bone and soft tissue sarcomas. Research projects are based on biological characteristics of individual tumor types that are relevant to their invasive and metastatic potential, resistance to therapy, recurrence and outcome of patients. Our current efforts are focused on (1) research and development of the cancer therapy by targeting aberrant glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$ ; (2) understanding of malignant phenotypes of cancer by investigating pathological metabolic properties (eg., aerobic glycolysis, tumor-promoting autophagy); and (3) biological basis of gastrointestinal and refractory cancers for clinical translation. We have been also establishing the tissue material resources of human stomach and colorectal cancer for our own projects described above as well as for studies collaborating with our institutional and many other research groups. In an immediate couple of years, we have obtained the preliminary results indicating the putative roles of tumor GSK3 $\beta$  as a molecular hub that connects the pathways responsible for tumor invasion and resistance to therapy, thus enforcing its potential as a major cancer therapeutic target. We are extending this project toward investigation of the putative roles for GSK3 $\beta$  in promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC; the major type of esophageal cancer in Asia and Japan) and pancreatic neuroendocrine neoplasms as well as in acquiring chemoresistance in pancreatic cancer. We also have been trying to develop cellular and mouse models predisposing to ESCC by CRISPR-Cas9-based genome editing of the metabolic enzymes including glycogen synthase and GSK3 $\beta$ .

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$ 阻害によるがん治療法の研究、開発

Wnt 経路抑制因子と認識されている GSK3 $\beta$  が固有の分子経路を介して、がんの悪性形質を推進することを系統的に示してきた。そして、GSK3 $\beta$  阻害の強力で特異的ながん治療効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。また、学内外の外科系を中心とするグループと連携し、膵がん、膠芽腫や骨軟部肉腫などの難治、希少がんで高活性を示す GSK3 $\beta$  が、高度の腫瘍浸潤性と治療(抗がん剤、放射線)不応性の悪性形質を連結することを見出した。一連の研究をもとに、GSK3 $\beta$  阻害薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を開発し、再発膠芽腫(附属病院脳神経外科)と進行膵がん(金沢医科大学病院)を対象とする医師主導臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を検証した。現在、GSK3 $\beta$  ががんの根源的特性である糖代謝改変と核分裂機構に共通の促進機能を示すことを示唆する予備成果を得ている。また、GSK3 $\beta$  のがん促進理論の強化のため、その機能解析を患者由来膠芽腫スフェア(幹細胞)、食道扁平上皮がん、ラット食道発がんモデル、抗がん剤耐性獲得膵がんや整形外科領域の軟部肉腫を対象に進め、2019年は膵内分泌腫瘍(PNET)の共同研究を開始した。

### 2. がんの代謝特性にもとづく悪性形質の解析研究

GSK3 $\beta$  は糖代謝の初期段階でグリコーゲン代謝を制御するという観点から、がん固有の糖代謝改変(Warburg 効果)に関わる触媒酵素やがん促進性自食作用に対する GSK3 $\beta$  の機能解析を進めている。とくに、特定の間代謝産物が解糖経路と自食作用の接点になるという最近の報告をもとに、これらの代謝経路における GSK3 $\beta$  の機能を統合的に明らかにすることを目的とする。これとはべつに、食道の扁平上皮発がん初期の生物学的特性は細胞内グリコーゲンの減少、消失である。この点に鑑み、患者由来の正常食道扁平上皮細胞とマウスを対象に、グリコーゲン合成酵素と GSK3 $\beta$  のゲノム編集による食道扁平上皮発がん状態の誘発を試みる研究を2018年に開始し、現在、目的の改変マウスが得られる見込みである。

### 3. ヒト消化管がん組織バンクを中心とする大腸がんの分子病理学的研究

消化管がん研究や臨床研究の基礎資源として2008年から本事業を開始し、2010年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承して現在に至っている。この組織資源の共同利用を促進するために、日本医療研究開発機構ゲノム医療支援ポータルサイト(<http://www.biobank.amed.go.jp/biobank/index.html>)に情報公開した。共同研究者:竹田 扇教授ら(山梨大学)が開発した大気圧イオン化法-質量分析を用いて2014年より、大腸がん迅速診断法開発の基礎検討を開始した。大腸組織検体の質量分析パターンをもとに特有の統計解析と機械学習を組合わせて非がん/がんの判別(診断)アルゴリズムを構築し、90%以上の感度と特異度による判別を可能にした(論文作成予定)。現在、解析症例/検体数を増やすとともに、島津製作所基盤技術研究所と本学消化器外科学と共同で、大腸がんの質量分析-内視鏡診断法を目指して、内視鏡デバイスを考案し、開発に着手した。

## 【 研究業績 】

[註] 下線は研究室メンバー, 研究生と研究協力員

### < 発表論文 >

原著

1. Abe K\*, Yamamoto N, Domoto T\*, Bolidong D, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Inatani H, Aoki Y, Higuchi T, Taniguchi Y, Yonezawa H, Aiba H, Araki Y, Minamoto T, Tsuchiya H. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  as a potential therapeutic target in synovial and fibrosarcoma. *Cancer Sci*, in press. doi: 10.1111/CAS.14271
2. Niikura R, Nagata N, Yamada A, Honda T, Hasatani K, Isii N, Shiratori Y, Doyama H, Nishida T, Sumiyoshi T, Fujita T, Kiyotoki S, Yada T, Yamamoto K, Shinozaki T, Tanaka M, Mikami K, Hara K, Fujishiro M, Koike K. Efficacy and safety of early versus elective colonoscopy for acute lower gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2019 Sep 26 doi: 10.1053/j.gastro.2019.09.010. Epub ahead of print
3. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Jiakang Z, Guangtao Z, Hayashi Y, Kobayashi M, Domoto T, Minamoto T, Hirao A, Nakada M. Identification of GSK3 $\beta$  inhibitor kenpaullone as a temozolomide enhancer against glioblastoma. *Sci Rep* 9 (1): 10049, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-46454-8.
4. Kobayashi S, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, Hoshino T, Minamoto T, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Anti-FIR $\Delta$ exon2, a splicing variant form of PFU60, autoantibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 110 (6): 2004-13, 2019. doi: 10.1111/cas.14024. Epub 2019 May 20.
5. Hasatani K, Tamamura H, Yamamoto K, Aoyagi H, Miyanaga T, Kaizaki Y, Sawada T. Efficacy of endoscopic evaluation of acute radiation esophagitis during chemoradiotherapy with proton beam therapy boost for esophageal cancer. *Digestion* 2019 May 8.1-9. doi: 10.1159/000500039. Epub ahead of print
6. Ikehara H, Doyama H, Nakanishi H, Hatta W, Gotoda T, Ishikawa H, Yao K. Analysis of factors related to poor outcome after e-learning training in endoscopic diagnosis of early gastric cancer using magnifying narrow-band imaging. *Gastrointest Endosc* 90 (3): 440-7, 2019. doi: 10.1016/j.gie.2019.04.230. Epub 2019 Apr 26.
7. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, Oshima M. NF- $\kappa$ B-induced NOX1 activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. *Oncogene* 38 (22): 4250-63, 2019. doi: 10.1038/s41388-019-0702-

0. Epub 2019 Jan 30.

8. Han TS, Voon DCC, Oshima H, Makayama M, Echizen K, Sakai E, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Jenkins BJ, Yang HK, Oshima M. MicroRNA-135b acts downstream of interleukin-1 signaling during inflammation-associated gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* 156 (4): 1140-55.e4, 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.059. Epub 2018 Nov 30.
9. Kitamura H, Takemura H, Minamoto T. Tumor p16<sup>INK4</sup> gene expression and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 41(2): 1367-76, 2019. doi: 10.3892/or.2018.6884. Epub 2018 Nov 26.

#### <学会発表>

1. Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hiroataka Yonezawa, Yoshihiro Araki, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  is a new therapeutic target in soft tissue sarcoma: a basic research. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting 2019, Mar 12 (Wed)-16 (Sat), 2019, Sands Expo Convention Center, Las Vegas, Nevada, U. S. A.
2. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. 病理組織学的に水平断端判定不能であった食道扁平上皮癌 ESD 症例の検討. 第 105 回日本消化器病学会総会, 2019 年 5 月 9 日(木) - 11 日(土), 石川県立音楽堂ほか, 金沢市.
3. 吉村健太郎, Chen Lee Chuin, 二宮 啓, 城野悠志, 堂本貴寛, 源 利成, 竹田 扇. 質量分析内視鏡がん診断システムの開発. 日本質量分析学会 第 67 回質量分析総合討論会, 2019 年 5 月 15 日(水) - 17 日(金), つくば国際会議場, つくば市.
4. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. Narrow band imaging 併用拡大内視鏡を用いた日常診療における表在型食道扁平上皮癌発見割合の検討. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会, 2019 年 5 月 31 日(金) - 6 月 2 日(日), グランドプリンスホテル新高輪/国際館パミール, 東京.
5. 波佐谷兼慶, 青柳裕之, 海崎泰治. 早期胃癌のNBI併用拡大内視鏡観察における組織学的構築と組織型診断の検討. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会: シンポジウム 1-2: 消化管の拡大内視鏡診断の最新の知見 胃, 2019 年 5 月 31 日(金) - 6 月 2 日(日), グランドプリンスホテル新高輪/国際館パミール, 東京.

6. 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 竹内 修, 太田哲生, 源 利成. 膵がん細胞の薬剤耐性化に伴うがん悪性形質と GSK3 $\beta$  の病理作用. 第 28 回日本癌病態治療研究会:ワークショップ 1-2 がん治療抵抗性の克服:基礎と臨床, 2019 年 6 月 27 日(木), 28 日(金), ウェスタ川越, 川越市.
7. 小泉恵太, 堂本貴寛, 中尾啓子, 源 利成, 中島日出夫. heat shock protein, Fam107B は GSK3 $\beta$  を介して大腸がん細胞の遊走性を抑制する. 第 28 回日本癌病態治療研究会, 2019 年 6 月 27 日(木), 28 日(金), ウェスタ川越, 川越市.
8. 島崎猛夫, 山本聡子, 林 祐一, 松尾洋一, 源 利成. 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 年 7 月 12 日(金), 13 日(土), グランドニッコー東京 台場, 東京.
9. 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成. 膵がん細胞のゲムシタビン耐性化において GSK3 $\beta$  は幹細胞性と浸潤能を増強する. 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2019 年 7 月 25 日(木), 26 日(金), 城山ホテル鹿児島, 鹿児島市.
10. 小泉恵太, 堂本貴寛, 中尾啓子, 源 利成, 中島日出夫. がん温熱療法における Fam107B heat shock protein の機能解析. 日本ハイパーサーミア学会第 36 回大会, 2019 年 9 月 5 日(木)–7 日(土), ウェスタ川越, 川越市.
11. 伊賀祥紘, 岩嶋由紀, 小林亜希子, 安田武嗣, 源 利成, 羽澤勝治, Richard Wong. NUP88 は Nbs1 の核内移行制御を介して相同組み換え修復を活性化する. 2019 年度若手放射線生物学研究会 専門研究会, 2019 年 9 月 7 日(土), 8 日(日), 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所, 千葉市.
12. Takahiro Domoto, Tomoharu Miyashita, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK)3 $\beta$  links tumor stemness, invasion and acquisition of drug resistance in pancreatic cancer. 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, 太田哲夫, 源 利成. GSK3 $\beta$  は膵がんの幹細胞性, 浸潤能, 薬剤耐性獲得にそれぞれ関連する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日(木)–28 日(土), 国立京都国際会館, 京都市.
13. Ilya V. Pyko, Takahiro Domoto, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Therapeutic interaction of mesenchymal stem cells with glioblastoma cells by glycogen synthase kinase (GSK)3 $\beta$  inhibition. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日(木)–28 日(土), 国立京都国際会館, 京都市.

14. Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Ilya V. Pyko, Tomoharu Miyashita, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Effect of targeting GSK3 $\beta$  against esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) inducing cell cycle arrest and apoptosis. ディリラバ ボリドン, 堂本貴寛, 上原将大, 奥村知之, 遠藤良夫, イリア ピコ, 宮下知治, 中田光俊, 源 利成. 食道扁平上皮がんの GSK3 $\beta$  阻害は細胞周期停止とアポトーシスを誘導する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
15. Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Diliraba Bolidong, Ilya V. Pyko, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Pancreatic cancer depends on aberrant glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  for acquiring resistance to gemcitabine (GEM). 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ボリドン, ピコ イリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんのゲムシタビン獲得耐性は glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  に依存する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
16. Satoko Yamamoto, Yoichi Matsuo, Yuichi Hayashi, Toshinari Minamoto, Takeo Shimasaki. Influence of gemcitabine on secretion from and surface marker expression of exosomes in pancreatic cancer cells. 山本聡子, 松尾洋一, 林 祐一, 源 利成, 島崎猛夫. 抗がん剤ゲムシタビ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 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
17. Takeshi Sawada, Ryosuke Ota, Hiromu Suzuki, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Hiroyoshi Nakanishi, Eiichiro Yamamoto, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Yasushi Sasaki, Toshinari Minamoto. Methylation analysis of non-ampullary duodenal precancerous and cancerous lesions. 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 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
18. Ryosuke Ota, Takeshi Sawada, Hiromu Suzuki, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Eiichiro Yamamoto, Hiroyoshi Nakanishi, Shigetsugu Tsuji, Naohiro Yoshida, Hisashi Doyama, Hiroshi Minato, Kenkei Hasatani, Yasuharu Kaizaki, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Yasushi Sasaki, Toshinari Minamoto. Methylation analysis of non-ampullary duodenal precancerous lesions. 27th United European Gastroenterology (UEG) Week 2019, October 19 (Sat) – 23 (Wed), 2019, Fira Gran Via, Barcelona, Spain.

19. 島崎猛夫, 山本聡子, 林 祐一, 松尾洋一, 源 利成. 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:ワークショップ3. 癌遺伝子・リキッドバイオプシー, 2019 年 11 月 7 日(木), 8 日(金), ホテルメルパルク横浜, 横浜市.
20. 澤田 武, 太田亮介, 鈴木 拓, 津山 翔, 八尾隆史, 中西宏佳, 波佐谷兼慶, 海崎泰治, 吉田尚弘, 辻 重継, 土山寿志, 湊 宏, 山本英一郎, 久保田英嗣, 片岡洋望, 佐々木泰史, 源 利成. 十二指腸非乳頭部腫瘍における遺伝子メチル化と変異解析. 第 30 回日本消化器癌発生学会総会:ワークショップ4. ゲノム・エピゲノム解析とプレシジョン医学, 2019 年 11 月 7 日(木), 8 日(金), ホテルメルパルク横浜, 横浜市.
21. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. 高齢者に対する食道扁平上皮癌 ESD の治療成績と予後の検討. JDDW 2019/第 27 回日本消化器関連学会週間, 2019 年 11 月 21 日(木) - 24 日(日), 神戸コンベンションセンター, 神戸市.

#### <学会開催>

第 49 回日本消化器がん検診学会東海北陸地方会, 2019 年 11 月 30 日(土), 石川県文教会館, 金沢市.

#### <外部資金> 2019 年が含まれる課題. 下線は研究室メンバーと研究協力員

1. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題番号 19H03727  
源 利成(代表), Richard Wong, 宮下知治(分担)  
課題: 大腸がんの糖代謝改変と細胞核分裂機構を繋ぐ分子経路の解明とがん制御法開発への応用  
研究経費: 17,420,000 円(直接経費 13,400,000 円, 間接経費 4,020,000 円)
2. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K07710  
堂本貴寛(代表)  
課題: GSK3 $\beta$  によるがん促進的糖代謝特性の解明と制御への応用  
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
3. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08367  
太田亮介(代表), 澤田 武, 源 利成, ほか(分担)  
課題: RNA シーケンスによる大腸鋸歯状腺腫の発癌機構の解明と分子標的治療の基盤確立  
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)

4. 2019 年－2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08463  
澤田 武(代表), 太田亮介, ほか(分担)  
課題: 表在性非乳頭部十二指腸腫瘍の発癌機構の解明と, 進展を予測する内視鏡診断体系の確立  
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
5. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金(挑戦的研究 萌芽): 課題番号 18K19577  
源 利成(代表), 大黒多希子, ほか(分担)  
課題: 代謝酵素ゲノム編集による食道扁平上皮の易発がん状態誘発の試み  
研究経費: 6,240,000 円
6. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金(若手研究): 課題番号 18K16553  
ピコ イリア(Ilya V. Pyko) (代表)  
課題: Investigation of putative roles for GSK3 $\beta$  in glioblastoma stemness phenotype and the underlying biological mechanisms  
研究経費: 4,160,000 円
7. 2018 年－2020 年度 科学研究費補助金(基盤研究C): 課題番号 18K07983  
島崎猛夫(代表), 源 利成(連携), ほか  
課題: 膵がん細胞の exosome を介した浸潤性伝播の解明とその抑制剤の開発  
研究経費: 4,420,000 円
8. 2017 年－2019 年度 科学研究費補助金(基盤研究C): 課題番号 17K08655  
Richard Wong(代表), 源 利成(連携), ほか  
課題: 核膜孔タンパク質とクロマチン相互作用による大腸がんの病態解明  
研究経費: 3,700,000 円

## Division of Functional Genomics 機能ゲノミクス研究分野

Professor	Takeshi Suzuki 鈴木 健之
Assistant Professor	Akihiko Ishimura 石村 昭彦, Minoru Terashima 寺島 農
Graduate Student	Sasithorn Wanna-Udom (D3) Hanbing Lyu (D1) Gerelsuren Batbayar (D1) Hyuga Ajichi (M1) 按察日向
Assistant Staff	Atsuko Odawara 小田原 敦子

### 【 Abstract 】

We have been studying the function of epigenetic regulators such as histone methyl-modifying enzymes and long noncoding RNAs (lncRNAs) in the various steps of the malignant progression of cancer. This year we investigated the role of an RNA methyltransferase METTL3, another type of epigenetic regulators, during TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of lung cancer cells. N6-Methyladenosine (m6A) is the most common internal chemical modification of mRNAs and lncRNAs involved in many pathological processes including various cancers. The m6A RNA modification and the expression of its catalytic enzyme, METTL3, were increased in TGF- $\beta$ -induced EMT process. Knockdown of METTL3 inhibited TGF- $\beta$ -induced morphological conversion of the cells, enhanced cell migration potential and the expression changes of EMT-related marker genes such as CDH1/E-cadherin, FN1/Fibronectin and VIM/Vimentin. Mechanistic investigations revealed that METTL3 knockdown decreased the m6A modification, total mRNA level and mRNA stability of JUNB, one of the important transcriptional regulators of EMT. Over-expression of JUNB partially rescued the inhibitory effects of METTL3 knockdown in the EMT phenotypes. This study demonstrates that m6A methyltransferase METTL3 is indispensable for TGF- $\beta$ -induced EMT of lung cancer cells through the regulation of JUNB. Our findings validated the significance of the regulation for m6A RNA modification in the important step of cancer progression and provided the possibility to develop novel therapeutic strategies for the treatment of cancer metastasis.

### <2019 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. がん細胞の EMT における RNA メチル化酵素 METTL3 の役割

RNA の A 塩基のメチル化修飾である m6A 修飾は, RNA の安定性や翻訳効率に影響を与え, 個体発生, 細胞分化, エネルギー代謝など多くの生命現象に関与する新しいカテゴリーのエピジェネティック制御である。今年度は, 肺がん細胞の EMT において, m6A 修飾を担う METTL3 酵素が重要な役割を果たすことを見出した。TGF- $\beta$ 誘導 EMT の過程で, RNA の m6A 修飾と METTL3 の発現は有意に増加する。METTL3 の発現をノックダウンすると, TGF- $\beta$ による EMT の進行や, 細胞の運動性の上昇がほぼ完全にブロックされ, これは EMT 進行に必要な遺伝子発現プログラムが阻害されることが原因と示唆された。そこで, METTL3 酵素によって m6A 修飾を受ける標的遺伝子候補のうち, EMT 誘導遺伝子発現に関わる転写制御因子を重点的に探索した。これまでに, JUNB 転写制御因子が, その最重要候補であることを見いだした。METTL3 酵素による JUNB の m6A 修飾は, JUNB mRNA の安定化を引き起こし, EMT における JUNB の機能を保証することがわかった。すなわち, がん悪性進展のエピジェネティック制御において RNA の化学修飾は重要な役割を担っており, その機能解明は, 新しいアプローチによるがん治療戦略の開発に貢献できると期待される。

## 2. がん悪性形質獲得に関与するエピジェネティック制御因子の探索

がん悪性進展の際のエピジェネティック制御の重要性を調べるために, ドライバー遺伝子変異導入がん細胞株の悪性形質獲得に対して協調的に働くエピジェネティック制御因子を CRISPR/Cas9 スクリーニング法によって探索している。今年度は, P53 欠損 MCF7 細胞とヒストン脱メチル化酵素 sgRNA サブライブラリーを用いて, スフィア形成を指標にスクリーニングを行った。その結果, KDM3B と KDM8 酵素が同定された。これらの候補因子は, TCGA 解析でもその発現低下と乳がん悪性度との相関性が確認され, ノックダウン実験によっても乳がん悪性化に寄与することが確認された。現在, 数種類のドライバー変異導入がん細胞株を用いて, 様々な悪性形質獲得(スフィア形成能, 細胞浸潤能, 薬剤耐性能)を指標に探索を進めており, エピジェネティック制御因子とドライバー変異との新しい関係性を調べている。

## 3. ヒストンメチル化修飾分布に基づく EMT 制御転写因子の探索

これまでに, EMT に関与する遺伝子発現の制御に, ヒストンメチル化制御酵素によるゲノム上の H3K4me3 修飾の再構成が重要であることを示してきた。H3K4me3 修飾は, 細胞の特異性を決定する重要な遺伝子座に, より広範囲にマークされることが報告されている。そこで, EMT 進行をコントロールする新しい因子を同定するために, EMT 誘導の前後で H3K4me3 修飾の ChIP-seq 解析を行い, 誘導後に H3K4me3 修飾範囲が拡大する遺伝子を探索した。得られた候補には, SNAIL や SLUG など既知の EMT を制御する転写因子に加えて, EMT との関係性が未報告の転写因子が 5 種類含まれていた。現在, ノックダウンや過剰発現を用いて, これらの転写因子の EMT への影響を解析しており, がん転移過程における新規 EMT 制御機構の解明を目指している。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Wanna-Udom S, Terashima M, Lyu H, Ishimura A, Takino T, Sakari M, Tsukahara T and Suzuki T. The m6A methyltransferase METTL3 contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press, 2020.

(共同研究)

2. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Nakagawa T, Taniguchi H, Suzuki T, Yamada T, Nishihara H, Ninomiya H, Ishikawa Y, Baba S, Takeuchi K, Horiike A, Yanagitani N, Nishio M and Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. *Cancer Res.*, 79(7):1658-1670, 2019.
3. Yamahana H, Takino T, Endo Y, Yamada H, Suzuki T and Uto Y. A novel celecoxib analog UTX-121 inhibits HT1080 cell invasion by modulating membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, pii: S0006-291X(19)31988-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.092., Oct 16, 2019. [Epub ahead of print].

### < 学会発表 >

国際学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Long noncoding RNAs contribute to the epigenetic progression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. The 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research. (Hawaii 2019年2月)

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Functional analysis of the epigenetic factors in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第78回日本癌学会学術総会 (京都2019年9月)
2. Ishimura A, Wanna-Udom S, Tange S, Lyu H, Terashima M and Suzuki T. Screening of epigenetic factors related to breast cancer malignancy. 第42回日本分子生物学会年会 (福岡2019年12月)
3. Terashima M, Ishimura A, Nishimura T, Tange S and Suzuki T. Analysis of epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factor candidates in cancer cells. 第42回日本分子生物学会年会 (福岡2019年12月)

4. Suzuki T, Terashima M, Wanna-Udom S, Lyu H, and Ishimura A. Functional analysis of the epigenetic factors in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第42回日本分子生物学会年会（福岡2019年12月）
5. Wanna-Udom S, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. The m6A methyltransferase METTL3 is involved in the process of epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. 第6回北陸エピジェネティクス研究会（福井2019年10月）
6. Wanna-Udom S. The m6A methyltransferase METTL3 contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells, HOKURIKU RNA CLUB（金沢2019年12月）

#### <外部資金>

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 鈴木健之, 1,300 千円 研究課題名「ゲノムワイドな挿入変異を利用した疾患関連 lncRNA の機能解析」
2. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 石村昭彦, 1,200 千円 研究課題名「がん悪性形質獲得に関係するエピジェネティック制御因子の探索」
3. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 寺島農, 1,000 千円 研究課題名「上皮間葉転換を制御する lncRNA の探索とその機能の解明」
4. 公益財団法人三谷研究開発支援財団 研究助成金, 研究代表者 鈴木健之, 1,500 千円 研究課題名「がんの悪性進展を司るエピジェネティック制御の解明と治療戦略の開発」

#### <その他>

1. 国立研究開発法人科学技術振興機構グローバルサイエンスキャンパス (GSC), 2017年度~2019年度, 第2 (展開) ステージ, 研究室に配属希望した高校生の研究活動を指導

# がん分子標的医療開発プログラム

## Division of Medical Oncology

### 腫瘍内科研究分野

Professor	Seiji Yano 矢野 聖二
Lecturer	Koshiro Ohtsubo 大坪 公士郎, Shinji Takeuchi 竹内 伸司
Assistant Professor	Kaname Yamashita 山下 要, Akihiro Nishiyama 西山 明宏 Azusa Tanimoto 谷本 梓, Koji Fukuda 福田 康二 Yuta Adachi 足立 雄太 (2019年3月まで) Sakiko Ohtani 大谷 咲子 Yohei Takumi 内匠 陽平 (2019年6月から)
Assistant	Sachiko Arai 新井 祥子
Graduate Student	Chiaki Suzuki 鈴木 千晶, Naohiro Yanagimura 柳村 尚寛 Hiroyuki Sakaguchi 坂口 裕之 (2019年4月から)
Assistant Staff	Junko Dohbayashi 堂林 淳子, Tomoko Kohori 小堀 朋子

#### 【 Abstract 】

Our researches focus on clarifying mechanism of targeted drug resistance and circumvention of the resistance in various types of cancers with driver oncogenes.

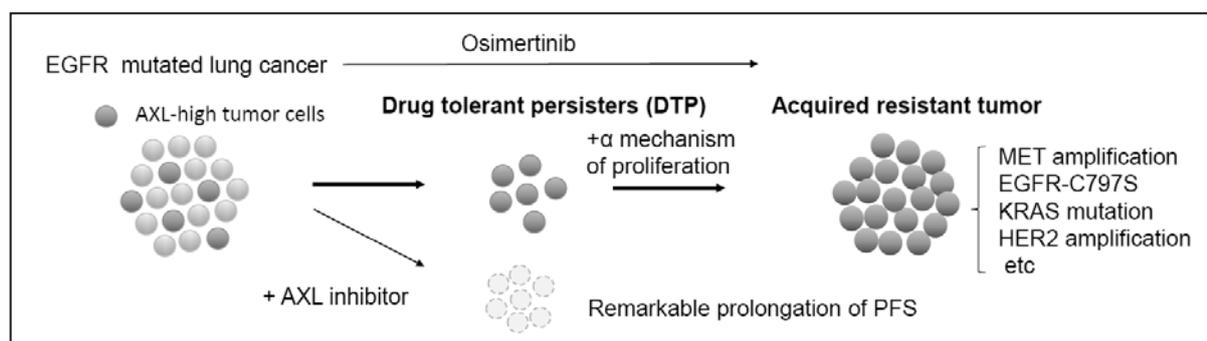
In this year, we reported a pivotal role for AXL in the intrinsic resistance of EGFR-mutated lung cancer to EGFR tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) osimertinib and the emergence of osimertinib-tolerant cells. Osimertinib stimulated AXL by inhibiting a negative feedback loop with SPRY4. Activated AXL was associated with EGFR and HER3 in maintaining cell survival and inducing the emergence of cells tolerant to osimertinib. In the EML4-ALK cancer model, we found that ALK mutation and EMT, associated with decreased expression of miR-200c and increased expression of ZEB1, can coexist as independent mechanisms of ALK-TKI resistance. Pretreatment with the histone deacetylase (HDAC) inhibitors reverted the EMT status and re-sensitized tumor cells to ALK-TKIs. HDAC inhibitor pretreatment followed by a new generation ALK inhibitor may be useful to circumvent resistance constituted by coexistence of resistance mutations and EMT in the heterogeneous tumor.

We completed two investigator initiated trials for lung cancer patients. In the phase I study of a HDAC inhibitor vorinostat with gefitinib in BIM deletion polymorphism/EGFR mutation double positive lung cancer, we demonstrated that the combined treatment preferentially induced pro-apoptotic BIM protein in the patients and recommended dose for phase II study is 400 mg vorinostat combined with 250 mg gefitinib. We also contributed Kanazawa University Hospital to be designated as a Cancer Genome Medicine Central Hospital.

## <2019年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

### 1. AXLの薬剤抵抗性細胞誘導とAXL阻害薬併用による耐性克服

分子標的薬に曝露されたがん細胞は，一部が抵抗性細胞(Drug tolerant persisters : DTP)として生存し，後に増殖を可能にする耐性因子を獲得して耐性腫瘍を形成する。AXL高発現EGFR変異肺がん細胞は，オシメルチニブ（第3世代EGFR-TKI）に曝露されEGFR/ERK経路が阻害されるとSPRY4により抑制されていたAXLが活性化し，AKT経路を介して生存シグナルが補われるためDTPになることを明らかにした。さらに，AXL阻害薬の併用でオシメルチニブの治療効果を高めAXL高発現EGFR変異肺がん細胞の耐性化を防ぎうることを示した。（Nat Commun, 2019）



今後は，AXL低発現EGFR変異肺がん細胞にDTPが発生する機構を解明する。

### 2. EMTが惹起する耐性のHDAC阻害薬併用による克服

ALK-TKIに曝露されたALK肺がん細胞が，腫瘍細胞のALK遺伝子変異と腫瘍細胞が上皮系から間葉系へと変化する上皮間葉転換(EMT)の2つの異なるメカニズムによって耐性化することを解明した。さらに，ALK肺がん細胞の胸腔内移植モデルにおいてHDAC阻害薬の治療後にALK-TKIを投与することで，腫瘍細胞を間葉系から上皮系へと戻しALK-TKIへの耐性を克服しうることを示した。（Cancer Res, 2019）

### 3. BIM遺伝子多型陽性のEGFR変異肺がんにおける医師主導第I相試験

BIM遺伝子多型陽性のEGFR変異肺がんは，アポトーシス誘導に必要なBIM蛋白質機能低下によりEGFR-TKI感受性が低下しているが，HDAC阻害薬であるポリノスタットが活性型BIM蛋白質の発現を上昇させEGFR-TKI感受性を回復させることを2013年に報告した。この基礎研究成果に基づき，BIM遺伝子多型を有するEGFR変異肺がん患者12例に対し，ポリノスタット+ゲフィチニブ併用療法の医師主導第I相試験を行い，末梢血単核球中の活性型BIM蛋白質が上昇することを確認した。さらに，併用療法の安全性を確認し，第II相試験の推奨用量をポリノスタット400mg/日+ゲフィチニブ250mg/日と決定した。（Cancer Sci, 2019）

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Takeuchi S, Hase T, Shimizu S, Ando M, Hata A, Murakami H, Kawakami T, Nagase K, Yoshimura K, Fujiwara T, Tanimoto A, Nishiyama A, Arai S, Fukuda K, Katakami N, Takahashi T, Hasegawa Y, Ko TK, Ong ST, Yano S. Phase I study of vorinostat with gefitinib in BIM deletion polymorphism/EGFR mutation double-positive lung cancer. **Cancer Sci**, 2019 Nov 29. doi: 10.1111/cas.14260. [Epub ahead of print]
2. Adachi Y, Yano S. Caput Medusae-like Venous Dilatation in Lung Cancer. **Intern Med**, 2019, 58(22):3341-2. doi: 10.2169/internalmedicine.2577-18.
3. Ohtsubo K, Miyake K, Arai S, Fukuda K, Yanagimura N, Suzuki C, Otani S, Adachi Y, Tanimoto A, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Notohara K, Yoshimura K, Yano S. Aberrant methylation of tumor suppressive miRNAs in bile from patients with pancreaticobiliary diseases. **Anticancer Res**, 2019 39(10):5449-59. doi: 10.21873/anticancer.13738.
4. 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 110(10):3215-24. doi: 10.1111/cas.14171.
5. Wang R, Yamada T, Arai S, Fukuda K, Taniguchi H, Tanimoto A, Nishiyama A, Takeuchi S, Yamashita K, Ohtsubo K, Matsui J, Onoda N, Hirata E, Taira S, Yano S. Distribution and activity of lenvatinib in brain tumor models of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune deficient mice. **Mol Cancer Ther**, 2019 18(5):947-56. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0695.
6. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Nakagawa T, Taniguchi H, Suzuki T, Yamada T, Nishihara H, Ninomiya H, Ishikawa Y, Baba S, Takeuchi K, Horiike A, Yanagitani N, Nishio M, Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. **Cancer Res**, 2019 79(7):1658-70. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2052.
7. Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Goto H, Suto H, Chayahara N, Toyoda M, Ito Y, Miya A, Miyauchi A, Otsuki N, Nibu KI, Minami H. Exploratory analysis of prognostic factors for lenvatinib in radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. **Head Neck**, 2019 41(9):3023-32. doi: 10.1002/hed.25784.
8. Taniguchi H, Yamada T, Wang R, Tanimura K, Adachi Y, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, AL, Boroni M, Yoshimura A, Shiotsu S, Matsumoto I, Watanabe S, Kikuchi T, Miura S, Tanaka H, Kitazaki T, Yamaguchi H, Mukae H, Uchino J, Uehara H, Takayama K, Yano S. AXL confers intrinsic resistance to osimertinib and advances the emergence of tolerant cells. **Nat Commun**, 2019 10(1) 259. doi:10.1038/s41467-018-08074-0.

(共同研究)

1. Peng S, Wang R, Zhang X, Ma Y, Zhong L, Li K, Nishiyama A, Arai S, Yano S, Wang W. EGFR-TKI resistance promotes immune escape in lung cancer via increased PD-L1 expression. **Mol Cancer**, 2019 18(1):165. doi: 10.1186/s12943-019-1073-4.
2. Staub Y, Nishiyama A, Suga Y, Fujita M, Matsushita R, Yano S. Clinical Characteristics Associated With Lenvatinib-induced Fistula and Tumor-related Bleeding in Patients With Thyroid Cancer. **Anticancer Res**, 2019 39(7):3871-8. doi: 10.21873/anticancer.13537.
3. Kimura T, Kawaguchi T, Chiba Y, Yoshioka H, Watanabe K, Kijima T, Kogure Y, Oguri T, Yoshimura N, Niwa T, Kasai T, Hayashi H, Ono A, Asai K, Tanaka H, Yano S, Yamamoto N, Nakanishi Y, Nakagawa K. Phase I/II study of intermitted erlotinib in combination with docetaxel in patients with recurrent non-small cell lung cancer (WJOG4708L). **Jpn J Clin Oncol**, 2019 49(10):947-55. doi: 10.1093/jjco/hyz088.
4. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K. Distinct Localization of Mature HGF from its Precursor Form in Developing and Repairing the Stomach. **Int J Mol Sci**, 2019 20(12). pii: E2955. doi: 10.3390/ijms20122955.
5. Sakai K, Passioura T, Sato H, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe Y, Yano S, Shibata M, Suga H, Matsumoto K. Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor. **Nat Chem Biol**, 2019 15(6):598-606. doi: 10.1038/s41589-019-0285-7.
6. Nishikawa Y, Kohno A, Takahashi Y, Suzuki C, Kinoshita H, Nakayama T, Tsubokura M. Stable Iodine Distribution Among Children After the 2011 Fukushima Nuclear Disaster in Japan: An Observational Study. **J Clin Endocrinol Metab**, 2019 104(5):1658-66. doi: 10.1210/jc.2018-02136.

著書・総説

1. 山下 要, 矢野聖二. 大腸癌化学療法におけるバイオマーカーと個別化治療  
消化器・肝臓内科 5(1): 10-6, 2019

<学会発表>

1. 第 116 回日本内科学会講演会 大谷咲子, 板谷勇輝, 柳村尚寛, 鈴木千晶, 足立雄太, 西山明宏, 谷本 梓, 山下 要, 大坪公士郎, 竹内伸司, 矢野聖二. 金沢大学附属病院における若年がん患者の妊孕性温存についての現状 2019 年 4 月 名古屋
2. 医学生・研修医の日本内科学会ことはじめ 2019. 坂口裕之, 谷本 梓, 柳村尚寛, 鈴木千晶, 大谷咲子, 西山明宏, 山下 要, 竹内伸司, 大坪公士郎, 矢野聖二. 膵癌に対する一次化学療法として FOLFIRINOX 療法と GEM+nab-PTX

療法の治療選択に関する後方視的検討. 2019年4月 名古屋

3. 第105回日本消化器病学会総会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 矢野聖二. 各種膵胆道疾患における胆汁中癌抑制型 miRNA のメチル化に関する検討. 2019年5月 金沢
4. 第13回日本緩和医療薬学会年会 谷本 梓. 分子標的薬の自然耐性に着目した基礎研究と臨床応用への試み. 2019年6月 千葉
5. 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 矢野聖二. 肺がんの治療抵抗性メカニズムの最新情報. 2019年6月 大阪
6. 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 西山明宏, 新井祥子, 谷本 梓, 竹内伸司, 矢野聖二. 中枢神経系転移における耐性機構. 2019年6月 大阪
7. 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 福田康二, 竹内伸司, 新井祥子, 片山量平, 西尾誠人, 矢野聖二. 肺がんにおいて上皮間葉転換は ALK 阻害薬耐性メカニズムとして機能する. 2019年6月 大阪
8. 第50回日本膵臓学会大会 大坪公士郎, 山下 要, 坂井健二, 矢野聖二. 当科における Trousseau 症候群を併発した膵癌症例の検討. 2019年7月 東京
9. 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 西山明宏, スタッフ由紀子, 菅 幸生, 藤田未来也, 松下 良, 矢野聖二. 甲状腺癌におけるレンバチニブによる瘻孔形成および腫瘍関連出血の危険因子の検討. 2019年7月 京都
10. 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 西山明宏, 竹内伸司, 足立雄太, 大谷咲子, 谷本 梓, 佐々木素子, 松本慎吾, 後藤功一, 矢野聖二. 血漿 T790M 陽性肺癌患者のオシメルチニブ耐性に MET 増幅が関与していた. 2019年7月 京都
11. 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会 谷本 梓, 松本慎吾, 西山明宏, 竹内伸司, 後藤功一, 矢野聖二. Proteasome inhibitor overcomes ALK-TKI resistance by p53 inactivation through Noxaexpression in EML4-ALK NSCLC 2019年7月 京都
12. 第17回日本臨床腫瘍学会学術集 Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Rikitake J, Sai S, Koyama T, Hyogo Y, Nagatani Y, Funakoshi Y, Toyoda M, Otsuki N, Nibu K, Minami H. The effect of tumor burden and growth rate on the treatment outcomes of nivolumab in head and neck cancer. 2019年7月 京都
13. 第28回日本がん転移学会学術集会・総会 新井祥子, 竹内伸司, 福田康二, 西

- 山明宏, 谷本 梓, 谷口寛和, 片山量平, 山本卓志, 矢野聖二. EML4-ALK 肺癌の髄膜癌腫症モデルにおける amphiregulin に起因するアレクチニブ耐性の克服. 2019年7月 鹿児島
14. 第78回日本癌学治療学会学術集会 坂口裕之, 谷本 梓, 柳村尚寛, 鈴木千晶, 大谷咲子, 西山明宏, 山下 要, 竹内伸司, 大坪公士郎, 矢野聖二. 膵癌に対する一次化学療法として FOLFIRINOX 療法と GnP 療法の選択に関する後方視的検討. 2019年10月 福岡
  15. 第78回日本癌学会学術総会 矢野聖二. Mechanisms of drug tolerant cells to osimertinib in EGFR mutated lung cancer. 2019年9月 京都
  16. 第78回日本癌学会学術総会 西山明宏, 吉田博徳, 松本直久, 岩永健太郎, 海老規, 矢寺和博, 荒金尚子. Prospective study for usefulness of plasma DNA on prediction of third generation EGFR tyrosine kinase inhibitors. 2019年9月 京都
  17. 第83回呼吸器合同北陸地方会 西山明宏, 坂口裕之, 柳村尚寛, 大谷咲子, 谷本 梓, 竹内伸司, 矢野聖二. たこつぼ型心筋症による心原性ショックを発症した EGFR exon20 insertion mutation 陽性肺がんの一例. 2019年11月 黒部
  18. 第61回日本消化器病学会大会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 矢野聖二. 胆汁中癌抑制型 miRNA のメチル化解析による膵胆道疾患の良悪性鑑別に関する検討. 2019年11月 神戸
  19. 第60回日本肺癌学会学術集会 矢野聖二. Circumvention of targeted drug tolerance in EGFR mutated lung cancer. 2019年12月 大阪
  20. 第60回日本肺癌学会学術集会 谷本 梓, 松本慎吾, 後藤 功一, 矢野聖二. ALK 融合遺伝子陽性肺癌において p53 の機能低下がもたらす ALK-TKI 自然耐性の克服. 2019年12月 大阪

#### <学会発表・国際>

1. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. Yano S. Mechanism of the intrinsic resistance and emergence of tolerant cells to osimertinib in EGFR mutated lung cancer. 2019年2月 Maui, Hawaii
2. 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. Nishiyama A, Kita K, Tanimoto A, Takeuchi S, Tajima A, Kinoshita T,

Yano S. Foretinib overcomes entrectinib resistance associated with the NTRK1 G667C mutation in NTRK1 fusion-positive tumor cells in a brain metastasis model. 2019年2月 Maui, Hawaii

3. 2019 ASCO-SITC Clinical Immuno-Oncology Symposium. Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Rikitake J, Sai S, Koyama T, Hyogo Y, Nagatani Y, Funakoshi Y, Toyoda M, Otsuki N, Nibu K, Minami H. Relationship between tumor burden to growth rate and treatment outcomes of nivolumab for patients with head and neck squamous carcinoma. 2019年2月 San Francisco, USA
4. The Joint Symposium Microenvironment and Precision Oncology. Yano S. Circumvention of targeted drug resistance in lung cancer. 2019年5月 Seoul, Korea
5. IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Nanjo S, Katayama R, Takeuchi K, Nishio M, Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. 2019年9月 Barcelona, Spain.
6. IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer. Otani S, Yamada K, Miyamoto S, Azuma K, Ishii H, Bessho A, Hosokawa S, Kunitoh H, Miyazaki K, Tanaka H, Miura S, Aono H, Nakahara Y, Kusaka K, Hosomi Y, Hamada A, Okamoto H. A multicenter phase II study of low-dose erlotinib in frail patients with EGFR mutation-positive, non-small cell lung cancer: TORG1425. 2019年9月 Barcelona, Spain.
7. IASLC 2019 World Conference on Lung Cancer. Arai S, Takeuchi S, Fukuda K, Nishiyama A, Tanimoto A, Taniguchi H, Satouchi, M Nanjo S, Katayama R, Nishio M, Zheng M, Wu YL, Yano S. Osimertinib overcomes alectinib resistance caused by amphiregulin in a leptomeningeal carcinomatosis model of EML4-ALK lung cancer. 2019年9月 Barcelona, Spain.
8. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019. Yano S. Circumvention of targeted drug tolerance in lung cancer. 2019年10月 Kanazawa, Japan
9. 89th Annual Meeting of the American Thyroid Association. Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Goto H, Suto H, Chayahara N, Toyoda M, Ito Y, Miya A, Miyauchi A, Otsuki N, Nibu K, Minami H. Exploratory analysis to predict treatment timing of lenvatinib for patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. 2019年11月 Chicago, USA
10. The 50th Anniversary Joint Meeting of American Pancreatic Association and Japanese Pancreas Society. Otsubo K, Miyake K, Arai S, Fukuda K, Yanagimura N, Suzuki C, Otani S, Adachi Y, Tanimoto A, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Notohara K, Yoshimura K, Yano S. Analyses of Aberrant Methylation of Tumor Suppressive miRNAs in Bile in Patients With Pancreaticobiliary Diseases. 2019年11月 Maui, Hawaii
11. The 24th JFCR-ISCC. Yano S. Drug-tolerant persister cells and AXL. 2019年12月 Tokyo, Japan

#### <外部資金>

1. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業  
矢野聖二 研究代表者

- RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析 30,750千円
2. 日本医療研究開発機構 次世代がん医療創生研究事業  
 矢野聖二 研究代表者  
 MAPKシグナル抑制が誘導するフィードバック機構の不均一性解明と制御に基づくKRAS/BRAF変異腫瘍に対する新規治療開発 7,692千円
3. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業  
 矢野聖二 研究分担者  
 遺伝子スクリーニング基盤（LC-SCRUM-Japan）を利用した，MET遺伝子異常陽性の進行非小細胞肺癌に対する治療開発を目指した研究 500千円
4. 基盤研究（B）日本学術振興会  
 矢野聖二 研究代表者  
 分子標的薬で肺がんの根治を目指す治療の非臨床研究基盤の形成 5,300千円
5. 厚生労働科学研究費補助金 がん政策推進総合研究事業  
 矢野聖二 研究分担者  
 3学会合同「がんゲノムネット」を用いた，国民への「がんゲノム医療」に関する教育と正しい情報伝達に関する研究 300千円
6. 基盤研究（C）日本学術振興会  
 大坪公士郎 研究代表者  
 膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロRNA発現異常領域の同定 600千円
7. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業  
 竹内伸司 研究分担者  
 RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析 2,000千円
8. 基盤研究（C）日本学術振興会  
 竹内伸司 研究代表者  
 アポトーシス抵抗性に起因する変異型選択的EGFR-TKI耐性克服治療の開発 1,300千円

9. 基盤研究 (C) 日本学術振興会  
竹内伸司 研究分担者  
miR-200sを標的とした肺癌のEMTに起因するTKI耐性克服治療の開発  
100千円
10. 基盤研究 (C) 日本学術振興会  
山下 要 研究分担者  
膵癌における早期エピゲノム診断を目指したマイクロRNA発現異常領域の同定  
100千円
11. 若手研究 日本学術振興会  
西山明宏 研究代表者  
NTRK1融合遺伝子陽性腫瘍の分子標的薬耐性の分子機構解明と克服を目指す基礎研究  
1,000千円
12. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業  
西山明宏 研究分担者  
RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析  
250千円
13. 若手研究 日本学術振興会  
谷本 梓 研究代表者  
ALK融合遺伝子陽性肺がんにおけるアポトーシス抵抗性因子の解明と克服治療の開発  
1,100千円
14. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業  
谷本 梓 研究分担者  
RET肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析  
250千円
15. 基盤研究 (C) 日本学術振興会  
福田康二 研究代表者  
miR-200sを標的とした肺癌のEMTに起因するTKI耐性克服治療の開発  
800千円

16. 若手研究 日本学術振興会  
新井 祥子 研究代表者  
ALK肺癌の髄膜癌腫症におけるALK-TKI耐性克服治療の開発 1,600千円
17. 共同研究 ノイロイミュン・バイオテック株式会社  
矢野聖二 研究代表者  
悪性腫瘍に対する免疫療法に関する研究 1,000千円
18. 金沢大学附属病院 臨床研究助成金  
矢野聖二  
RET 肺がんに対するアレクチニブの医師主導治験と耐性機構解析 3,500 千円
19. 日本イーライリリー株式会社研究助成金  
矢野聖二  
免疫チェックポイント阻害薬の肝転移に対する効果を増強する基礎研究  
1,000千円

## <その他>

### 1. 教育プログラムの運営

- 1) 文部科学省 平成 29 年度大学教育再生戦略推進費：多様なニーズに対応する「がん専門医療人材（がんプロフェッショナル）」養成プラン「超少子高齢化地域での先進的がん医療人養成」（北信がんプロ）を事業責任者として推進
- 2) 石川県がん診療連携協議会研修会の開催（7月11日，10月17日）

### 2. がん教育

中学生に対するがん教育の実施：羽咋中学校（11月15日）

### 3. 啓蒙活動

- 1) 金沢大学医学展と合同の北信がんプロ市民公開講座の実施：金沢大学宝町キャンパス十全講堂（10月20日）
- 2) 石川県がん診療連携協議会による県民公開講座の実施：根上総合文化会館（能美市）10月14日

### 4. ゲノム医療の提供

金沢大学附属病院でがんゲノム医療センターを開設し、がんゲノム医療拠点病院の指定（9月19日）に貢献

#### **5. 先進的医療の提供**

医師主導治験「RET 融合遺伝子を有する進行非小細胞肺癌における RET チロシンキナーゼ阻害薬耐性の分子機構を明らかにする研究（ALL-RET：UMIN000020628）」の完遂

#### **6. 外来化学療法提供**

金沢大学附属病院で外来化学療法センターを運営

# 中央実験施設

**Central Research Resource Branch**  
**中央実験施設**

Professor	Kunio Matsumoto 松本 邦夫
Associate Professor	Yoshio Endo 遠藤 良夫, Kouji Kuno 久野 耕嗣
Assistant Professor	Shamma Awad シャムマ アワード

**【 Abstract 】**

**Enhancing effect of novel Schiff base derivatives on 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (Endo Y)**

Photodynamic diagnosis and therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA) is widely accepted as a non-invasive strategy against various cancers. Previously, we had shown that the Schiff base derivative TX-816 markedly increased the effect of ALA-based photodynamic therapy (ALA-PDT) by facilitating intracellular PpIX accumulation. However, TX-816 was unstable in aqueous solutions and quickly hydrolyzed into 3,5-dichlorosalicylaldehyde (DCSA) and 2-chloro-4-nitroaniline. Recently, we found that TX-816 derivatives in which 2-chloro-4-nitroaniline was substituted with 4-pentyl or 4-hexyl aniline were more stable than TX-816. Therefore, we examined the ALA-PDT enhancing effect of novel 4-alkyl aniline derivatives, which were synthesized from 4-methoxysalicylaldehyde (MeOSA) and 4-alkyl anilines with various alkyl chains from C = 1 to C = 6. Consequently, the MeOSA-based 4-pentyl or 4-hexyl aniline derivatives showed higher stability and stronger ALA-PDT-enhancing effect than the DCSA-based derivatives. These findings indicate that MeOSA derivatives are excellent lead compounds for the development of novel ALA-PDT sensitizers.

**Analysis of the functional roles of ADAMTS-1 in female genital organs (Kuno K)**

ADAMTS-1 is an extracellular matrix (ECM)-anchored metalloproteinase that degrades ECM molecules such as proteoglycans and regulates ECM remodeling. Recently, we found that ADAMTS-1 null mice on a BALB/c background exhibited impaired parturition. Uterine strips from these mice showed decreased contractile responses to uterotonins and decreased spontaneous contractile activity. ADAMTS-1 null mice also showed reduced uterine expression of genes encoding contraction-associated proteins (CAPs), suggesting that ADAMTS-1 is required for uterine activation prior to parturition. Decidual activation is an important process for labor progression, wherein the morphology of the decidual layer changes significantly from late pregnancy to active labor in mice, including the dilation of uterine glands. As the morphology of the decidual layer of ADAMTS-1 null mice on gestation day 19 sometimes differed from that of wild-type mice, we are investigating the role of ADAMTS-1 in decidual layer tissue organization during the prepartum period.

**Mechanisms of tumor suppressor network in repression of pluripotency and self-renewal capacity (Shamma A)**

The proteasome-mediated degradation of the core reprogramming proteins determines the stem cell fate decision. How the core reprogramming proteins are identified and recruited for proteasomal degradation is greatly unknown. We demonstrate that simultaneous inactivation of pRb and ATM reciprocally induces and stabilizes Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc (OSKM) proteins, and consequently enables self-renewal capacity and pluripotency. We further show that pRB recruits Kat3b and inhibits the transcription of HDAC5, whereas ATM binds and sequesters HDAC5, leading to acetylation labeling of the OSKM proteins that become

identified and assembled by ATM in a complex with the E3 ubiquitin ligase Uhrf1 or Fbxw7 for ubiquitination and subsequent proteasomal degradation. Furthermore, ATM-kinase inhibition in Rb-negative cells rescues the OSKM proteins and self-renewal capacity, suggesting that ATM kinase activation signaling antagonizes reprogramming of Rb-deficient cells.

### <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

#### アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対して感受性増強作用を有する新規シッフ塩基誘導体の開発 (遠藤)

我々は5-アミノレブリン酸 (ALA) を用いる光線力学的治療 (PDT) において、ALA との同時処理により細胞内PpIX量を増加させてPDT効果を増強する低分子化合物として、3,5-ジクロロサリチルアルデヒド (DCSA) と2-クロロ-4-ニトロアニリン (CNA) からなるシッフ塩基TX-816を見出した。本年度は、TX-816のCNAを4-アルキルアニリン (C=2からC=6) に置換した誘導体とTX-816の活性本体であるDCSAを4-メトキシサリチルアルデヒド (MeOSA) に置換した4-アルキルアニリン誘導体を合成し、ALA-PDT効果増強活性の比較検討を行った。DCSAおよびMeOSAの4-アルキルアニリン誘導体はいずれもTX-816やDCSAよりも強いALA-PDT効果増強作用を示し、溶液中での安定性も顕著に向上していた。中でもMeOSAの4-ペンチルおよび4-ヘキシルアニリン誘導体はDCSAの誘導体よりも増強作用が強く、安定性も高いことも示され、がん細胞内で活性化されるプロドラッグ型効果増強剤の有用なリード化合物となる可能性が示唆された。今後、さらに有用な効果増強剤の開発を目指して研究を展開する。

#### ADAMTS-1の雌生殖機能における役割の解析 (久野)

ADAMTS-1<sup>-/-</sup>マウス (129/B6 遺伝子背景) は、排卵、卵胞生育過程に異常を示す。一方 BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1<sup>-/-</sup>マウスは分娩異常を示すが、同マウスの子宮平滑筋では uterotonin に対する収縮応答性が低下し、収縮調節関連遺伝子群の発現が低下していることを見出している。また ADAMTS-1<sup>-/-</sup>マウスの分娩前の子宮脱落膜層では、野生型マウスとは異なる形態が認められることから、今回、分娩前の脱落膜組織の構築における ADAMTS-1 の役割について調べた。抗ラミニン抗体を用いて基底膜の染色を行ったところ、分娩直前の ADAMTS-1<sup>-/-</sup>マウスの脱落膜組織では、脱落膜上皮細胞下の基底膜の一部で肥厚が観察された。この結果から、ADAMTS-1 が基底膜の形成制御を通して、分娩に向けての脱落膜組織の形態変化と維持に関わっている可能性が示唆された。今後、ADAMTS-1<sup>-/-</sup>マウスの子宮組織のさらに詳しい組織学的解析を行って分娩時の子宮機能における ADAMTS-1 の役割を調べるとともに、子宮頸管熟化過程についても解析を行い、ADAMTS-1 の分娩過程全般における役割を明らかにする。また ADAMTS-1 によるがん微小環境の制御について解析を行う。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 > (共同研究)

1. 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*. 2019 Oct 16. pii: S0006-291X(19)31988-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.092. [Epub ahead of print]
2. Murakami Y, Kimura Y, Kawahara A, Mitsuyasu S, Miyake H, Tohyama K, Endo Y, Yoshida N, Imamura Y, Watari K, Ono M, Okamura T, Kuwano M: The augmented expression of the cytidine deaminase gene by 5-azacytidine predicts therapeutic efficacy in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2019 Mar 19;10(23):2270-2281. doi: 10.18632/oncotarget.26784. eCollection 2019 Mar 19.
3. Sarker MAK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y. Class II PI3K  $\alpha$  and  $\beta$  are required for Rho-dependent uterine smooth muscle contraction and parturition in mice. *Endocrinology*. 2019;160(1):235-248.

### < 著書・総説 >

1. Yoshio Endo: The history of the development of chick embryo tumor xenograft models. In “Chick Chorioallantoic Membrane Model and Precision Cancer Therapy,” Fuyuhiko Tamanoi (ed). *The Enzymes: ENZ Volume 46*, pp11 – 22, Elsevier, 22nd November 2019.
2. Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Mana Futawaka, Hisatsugu Yamada, Masahide Tominaga and Yoshio Endo: *In vivo* drug screening method of radiosensitizers using tumor-bearing chick embryo. In “Chick Chorioallantoic Membrane Model and Precision Cancer Therapy,” Fuyuhiko Tamanoi (ed). *The Enzymes: ENZ Volume 46*, pp113 – 127, Elsevier, 22nd November 2019.
3. 玉野井冬彦, 遠藤良夫, 宇都義浩, 楠橋由貴, 二若真菜, 松本光太郎: がんの個別化医療を切り拓く鶏卵モデル (Next Tech Review). *実験医学* Jan; 37(1): 88-92, 2019.

### < 学会発表 >

1. 遠藤良夫, 宇都 義浩, 篠原 侑成, 安部 千秋, 小幡 徹, 小倉 俊一郎, 米村 豊: 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対する耐性化機構とその克服 日本薬学会第139年会 2019年3月20日(水) -23日 (土) (千葉、幕張メッセ)
2. Kitano Yuto, Miyashita omoharu, Makino Isamu, Kinoshita Jun, Nakamura

- Keishi, Tajima Hidehiro, Takamura Hiroyuki, Ninomiya Itasu, Fushida Sachio, Endo Yoshio, Yamamoto Yasuhiko, Ohta Tetsuo: PANCREATIC SENESCENT STROMA INFLUENCE ON PROGNOSIS IN PDAC. Digestive Disease Week (DDW2019) May 18-21, 2019 (San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA) Gastroenterology Volume 156, Issue 6, Supplement 1, May 2019, Pages S-765. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(19\)38859-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(19)38859-6)
3. Yusei Shinohara, Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Yoshio Endo: Enhancing effect of novel Schiff base derivatives on photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. 新規 Schiff 塩基による 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強作 第 78 回日本癌学会学術総会 2019 年 9 月 26 日 (木) ~28 日 (土) (京都、国立京都国際会館)
  4. Bolidong Dilireba, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Pyko Iiya V, Tomoharu Miyashita, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto: Effect of targeting GSK3b against esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) inducing cell cycle arrest and apoptosis. 食道扁平上皮がんの GSK3b 阻害は細胞周期停止とアポトーシスを誘導する 第 78 回日本癌学会学術総会 2019 年 9 月 26 日 (木) ~28 日 (土) (京都、国立京都国際会館)
  5. 生水真紀夫, 多久和陽, 松島綱治, °久野耕嗣 (°発表者) 「マウス分娩時の子宮組織構築における ADAMTS-1 の役割の解析」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019 年 12 月, 福岡、福岡国際会議場)



新學術創成研究機構若手 PI

# Inflammation and Epithelial Plasticity

## 上皮可塑性・炎症ユニット

Associate Professor            Dominic Chih-Cheng VOON

Graduate Student            Zachary YONG (D3) (Co-supervisor: Prof. Masanobu Oshima)

### 【 Abstract 】

The link between inflammation and cancer has long been established. A proinflammatory tumor microenvironment is generally regarded as one that promotes carcinogenesis, tumor growth and the suppression of tumor immunity. Although great advances have been made in terms of the cellular composition and immune interaction within a tumor niche, how cell-intrinsic mutations within the epithelium drive this process, through the aberrant secretion of growth factors and cytokines, is under appreciated. We are interested in two specific aspects of this interaction: 1) the role of epithelial-derived IL23A in modulating immunity during gastrointestinal infection and carcinogenesis; and 2) the increased epithelial plasticity during gastrointestinal inflammation and repair.

### < 2019 research achievement and future plan >

Following the successful completion of our collaborative work with Prof Oshima's group on the oncogenic activities of miR-135b in inflammation-associated gastric carcinogenesis, we resumed our investigation on the regulation and function of epithelial cell-derived IL23A. In intestinal epithelial cells, we found that IL23A is secreted in a novel, IL12B-independent form, which is strongly driven by mitogenic and inflammatory signals. We believe this means IL23A has an independent function from canonical IL-23 (IL23A/IL12B), and contributes a distinct immune signal during intestinal inflammation, regeneration, and possibly carcinogenesis. Accordingly, we observed that certain MAPK mutant CRC lines have constitutively high *IL23A* expression, which could be targeted by MEK1/2 and/or NF-κB pathway inhibitors. The use of these inhibitors also revealed a strong cooperativity between mitogenic and inflammatory signals. To understand this, we interrogated the *IL23A* promoter and found that these signals cooperate at the promoter level through the assembly of a promoter enhancer complex consisting of c-Jun, RUNX3/1 and RelA/p65. This novel mechanism provides a satisfactory explanation to the cooperativity of the agonists and pharmacological inhibitors we observed. A manuscript that reports these novel observations is currently under revision. In the coming year, our focus shall be on elucidating the immune functions of epithelial-derived IL23A, especially in the interaction with primary innate lymphoid cells (ILCs) and proinflammatory

IL-17-secreting T lymphocytes. In addition, we shall be investigating the potential role of epithelial-derived IL23A in modulating tumor immunity and tumor growth through the xenograft models we have established this year.

## **【 Achievements 】**

### **< Publications (Primary) >**

1. Han TS, **Voon DC\***, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong ZWE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, Oshima M\*. (2018) *MicroRNA-135b acts downstream of Interleukin-1 signaling during inflammation-associated gastric carcinogenesis.* Gastroenterology. 2019 Mar;156(4):1140-1155.e4. \*Joint Corresponding Author.

### **< Publications (Collaboration) >**

1. Lim KS, Mohamed MS, Wang H, Hartono, Hazawa M, Kobayashi A, **Voon DC**, Kodera N, Ando T, Wong RW. (2020) *Direct visualization of avian influenza H5N1 hemagglutinin precursor and its conformational change by high-speed atomic force microscopy.* Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020 Feb;1864(2).

### **< Symposiums (Oral Presentations) >**

1. **Voon DC.** *An emerging role for RUNX proteins in immune modulation via cytokine production.* The 22<sup>nd</sup> RUNX International Meeting. 18<sup>th</sup> Oct- 21<sup>st</sup> June 2019. Seoul, **Korea.** (Invited)
2. **Voon DC.** *An emerging role for RUNX proteins in immune modulation via cytokine production.* The 9th KU-CRI-FUSCC Joint Symposium on Cancer Biology. 3<sup>rd</sup> Sep 2019. Kanazawa, **Japan.**
3. **Voon DC.** *Inflammatory and mitogenic signals drive IL23A secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells.* 78<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association. 26-28<sup>th</sup> Sep 2019. Kyoto, **Japan.**

### **< 2019 research funds >**

### **< Others Contribution >**

2019

9<sup>th</sup> FUSCC-CRIKU Joint Symposium

Co-Coordinator

# Microenvironment Regulation in Cancer Stem Cells

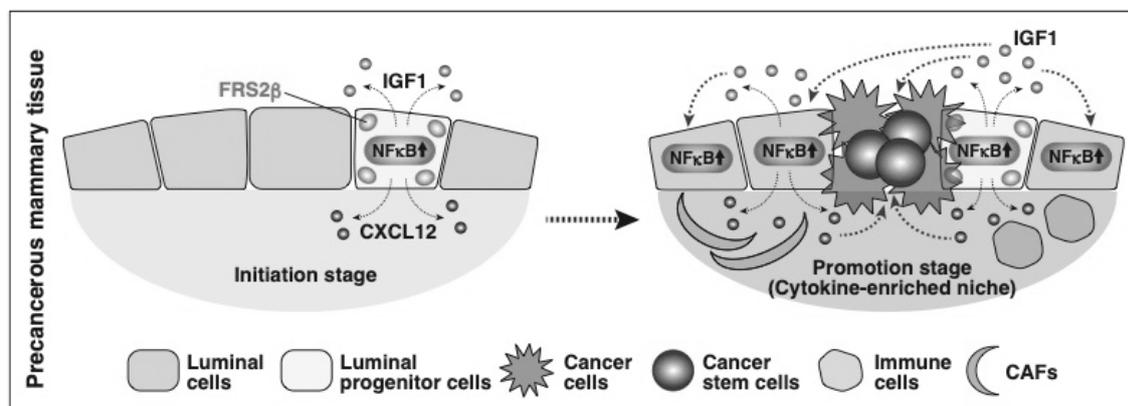
## がん幹細胞環境制御ユニット

Assistant Professor Yasuto Takeuchi 竹内 康人

### 【 Abstract 】

Accumulating evidence indicates the presence of cancer stem-like cells (CSCs) in many types of tumors. They are defined as cell populations which have self-renewal ability and multi-differentiation capacity, and have been thought to contribute to tumor initiation and recurrence. Stem-cell properties are thought to be maintained in the CSC niche that is the tumor microenvironment surrounding CSCs. Therefore, our final goal is to identify key factors regulating the interaction between cancer stem-like cells (CSCs) and their niche.

We demonstrated that FRS2 $\beta$  was expressed in a small subset of luminal progenitor cells and induced the production of cytokines, including IGF1 and CXCL12, through activation of the NF $\kappa$ B pathway. IGF1 and CXCL12 amplify NF $\kappa$ B activation in surrounding mammary cells, leading to the establishment of a cytokine-rich microenvironment. This microenvironment supports the growth of cancer cells and facilitates the migration of stroma cells and immune cells to develop more favorable condition for breast cancer.

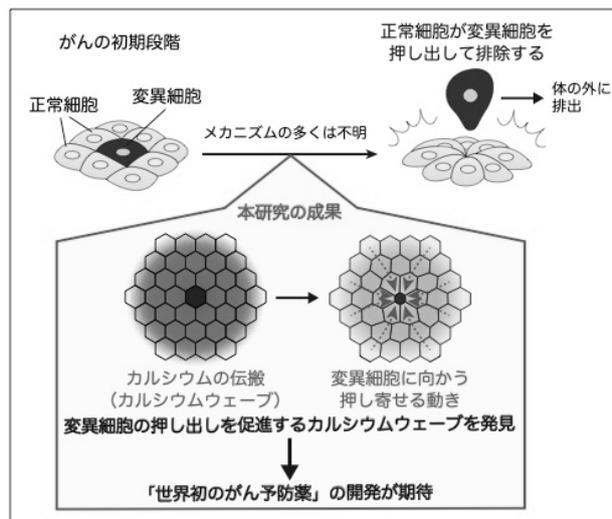


### <2019年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

発がんの超初期段階において、変異細胞が正常細胞から排除される際に、変異細胞から周囲の正常細胞に向かってカルシウムイオンが、花火のように同心円状に伝搬することを突き止めた。さらに、このカルシウムウェーブを受けた周囲の正常細胞が、変異細胞に向かって押し寄せるように動くことによって、変異細胞の排除を促進していることが分かりました。変異細胞の排除に伴うカルシウムウェーブは、哺乳類培養細胞層及びゼブラフィッシュの皮膚細胞層の両方で同様に観察されたことから、進化の過程で保存された普遍的な現象であることが示唆されます。これらの研究成果は、

これまでブラックボックスであったがんの超初期段階で生じる現象を世界で初めて明らかにした。本研究によりがん予防薬の開発に繋がることを期待できる。

今後は、がん幹細胞と、その周囲に存在するがん組織を形成する周囲細胞との相互作用に着目した研究を進めていく。がん幹細胞が周囲細胞によってどのように制御されているのか、そのメカニズムを明らかにしたい。



## 【 研究業績 】

### <発表論文>

1. Takeuchi Y, Narumi R, Akiyama R, Elisa Vitiello, Shirai T, Nobuyuki Tanimura, Keisuke Kuromiya, Ishikawa S, Kajita M, Tada M, Haraoka Y, Akieda Y, Ishitani T, Fujioka Y, Ohba Y, Yamada S, Hosokawa Y, Toyama Y, Matsui T, Fujita Y. Calcium wave promotes cell extrusion. *Current Biology*. 2020. Feb 24;30(4):670-681.

### <学会発表>

なし

### <外部資金>

なし

## Mitochondrial Dynamics in Stem Cells ミトコンドリア動態ユニット

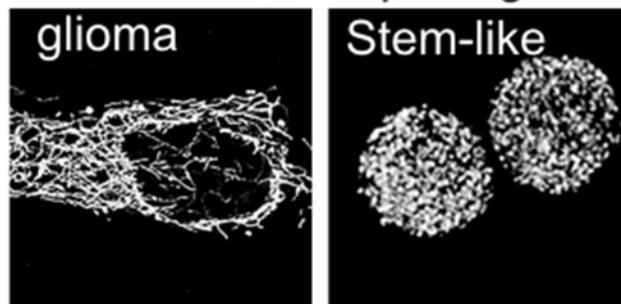
Assistant Professor Atsuko KASAHARA 笠原敦子

### 【Abstract】

Mitochondria play pleiotropic roles in metabolic pathways, calcium and redox homeostasis, and apoptosis. These diverse mitochondrial functions are reflected by their extremely dynamic morphology, and distribution in the cells. Mitochondrial quality, distribution, size, and motility are excellently tuned by their continuous fusion and fission. Equilibrium of fusion and fission shapes the specific mitochondrial network depending on physiological conditions, and cell types. In general, mitochondria appear immature structure with poorly developed cristae in stem cells, while a complex network with developed cristae in differentiated cells. Stem cells are special cell population with self-renewal and differentiation potentials. Healthy stem cells contribute to tissue maintenance and repair, whereas tumour stem-like cells commit tumour malignancy, such as recurrence, drug resistance, and metastasis.

Mitochondrial intracellular localisation in the cell impacts on calcium homeostasis, and Notch1 signalling in embryonic stem cells (Kasahara A. *et al.* Science 2013). Therefore, mitochondria would direct their host cell fate, through controlling signalling cascades by changing their shape and distribution also in cancer cells. We are trying to understand the molecular mechanism of how “mitochondrial dynamics” could control the maintenance and acquisition of stemness in tumour cells.

### Mitochondrial shape in glioma



3D-reconstructed mitochondrial shape in glioma differentiated and stem-like cells (Bossoy E. Y., Kasahara A., *et al.* EMBO J 2017)

### <2019年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

gefitinib 耐性肺がん細胞についての解析を進め、耐性細胞で、発現が非常に上昇していたミトコンドリア融合因子 Opa1 の発現を低下させると、gefitinib 感受性がやや回復すること、異常なネット状クリステ構造のミトコンドリアの割合もやや減少することを確認した。一方で、小胞体とミトコンドリアとの距離が、幹細胞性に關与している可能性について、人工的にこれら 2 つのオルガネラを近づけるコンストラクトを用いて距離を近づけると、マウス ES 細胞では、多能性マーカーである Oct4 の発現が減少することがわかった。今後は、カルシウム濃度依存的に蛍光する変異 GFP (GCaMP6)を用いて、人工的に 2 つのオルガネラを近づけた細胞の細胞質、ミト

コンドリア、小胞体のカルシウムレベルの挙動の測定などを含めた、Oct4 を減少させるメカニズムや、グリオーマの幹細胞性について調べていく予定である。

## 【 研究業績 】

### <発表論文>

なし。

### <学会発表>

“Mitochondrial dynamics in malignant progression: retrograde control from mitochondria”  
**Kasahara A.** The 42th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 3-6 Dec, Fukuoka, Japan, Workshop AMED-CREST/PRIME [Mechanobiology] “Novel linkage between the structure and molecular function in mitochondria” Oral presentation

### <外部資金>

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究（C）

「がん幹細胞性におけるミトコンドリア動態の果たす役割を明らかにする」  
3,300千円 3年間

第33回北國がん基金

「がん分子標的薬剤耐性機構におけるミトコンドリア動態・機能の役割」  
1,000千円

## Cancer-Immune System Interactions がん-免疫系相互作用ユニット

Assistant Professor      Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

### 【 Abstract 】

Caspase-1 is activated in response to various inflammatory stimuli, including microbial pathogens, endogenous danger signals, and irritants. Once activated, caspase-1 induces pyroptosis, a form of regulated necrosis, characterized by cell membrane disruption and release of cellular contents, leading to inflammation. Gasdermin D (GSDMD), a caspase-1 substrate, mediates pyroptosis: after being cleaved by caspase-1, the N-terminal fragment of GSDMD forms pores on the plasma membrane, resulting in water influx, cell swelling, and membrane rupture. Recently, we found that apoptosis is induced after caspase-1 activation in GSDMD-deficient cells, suggesting that caspase-1 can initiate both pyroptosis and apoptosis, depending on the expression of GSDMD. We previously found that in the absence of GSDMD, caspase-1 processes Bid into the mature form tBid, leading to apoptosis via the mitochondrial pathway. However, an additional mechanism that mediates this cell death independently of Bid has also been suggested. Here, we investigate the mechanism and physiological significance of caspase-1-induced cell death. Our study suggests that caspase-7, a substrate of caspase-1, mediates apoptosis induced by caspase-1 in a Bid-independent manner. It has also been suggested that caspase-1-induced apoptosis can occur in neurons and mast cells that express undetectable or low levels of GSDMD, respectively. Moreover, release of IL-1 $\beta$  and maturation of IL-1 $\alpha$  were dependent on cell death (pyroptosis or apoptosis) following inflammasome activation. These results suggest that caspase-1 induces cell death in various cell types through multiple signal transduction pathways and that caspase-1-induced cell death plays a critical role in IL-1-mediated inflammation.

### <2019年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

Caspase-1による細胞死誘導の機序および意義について詳細な検討を行った。前年までに caspase-1 が Bid の切断を介してアポトーシスを誘導することを明らかにしていたが、caspase-1によるアポトーシス誘導のシグナル伝達分子として新たに caspase-7を見出した。また、神経細胞やマスト細胞のような GSDMD 発現レベルが低い細胞種において実際に caspase-1 依存的なアポトーシスが起きうることを示した。さらに、caspase-1による細胞死誘導が IL-1 $\beta$ の放出や IL-1 $\alpha$ の成熟化に重要な役割を果たすことを明らかにした。今後、caspase-1誘導性細胞死の生理的意義についてさらに検討を進め、炎症性疾患の病態形成やがん微小環境などにおける役割を明らかにする。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著（研究室主体）

1. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Thi Nguyen D, Hattori T, Manh Le T, Hori O, Mahib MR, Yamaguchi Y, Miura M, Kinoshita T, Kushiyama H, Sakurai M, Shiroishi T, Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. Nat Commun. 2019 10:2091.
2. Fang R, Uchiyama R, Sakai S, Hara H, Tsutsui H, Suda T, Mitsuyama M, Kawamura I, Tsuchiya K. ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. Mucosal Immunol. 2019 12:1092-1103.
3. Mahib MR, Hosojima S, Kushiyama H, Kinoshita T, Shiroishi T, Suda T, Tsuchiya K. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid. Microbiol Immunol. 2019 doi: 10.1111/1348-0421.12756.

### < 学会発表 >

1. Kohsuke Tsuchiya, Mamunur Rashid Mahib, Takashi Suda. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. The 17th International Congress of Immunology (IUIS2019). Oct 22, Beijing, China
2. Kohsuke Tsuchiya, Takashi Suda. Pyroptosis enhances antibiotic therapy of listeriosis. 第92回日本細菌学会総会 4月25日 札幌市
3. Kohsuke Tsuchiya, Takashi Suda. Gasdermin D (GSDMD) mediates IL-1 $\alpha$  maturation during inflammasome formation. 第48回日本免疫学会学術集会 12月12日 浜松市

### < 外部資金 >

1. 土屋晃介（研究代表者）令和元年度 科研費 基盤研究（C）「細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法の協調的相互作用から理解する試み」 1,430 千円（直接経費：1,100 千円、間接経費：330 千円）
2. 土屋晃介 武田科学振興財団 医学系研究助成（基礎）「カスパーゼ-1による細胞死誘導の分子機序とインフラマソーム関連疾患における役割」 2,000 千円
3. 土屋晃介 琉球大学熱帯生物圏研究センター・2019 年度 共同利用共同研究事業「肺胞上皮におけるインターロイキン-17F 産生の意義と分子基盤」 250 千円

### < その他 >

金沢大学プレスリリース

<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/67529>

<https://www.kanazawa-u.ac.jp/rd/72580>

西南大学プレスリリース（中国語）

<http://222.198.125.159/seeyon/xndxNewsData.do?method=userView&id=R3YxdIVxU1FB RytQL3UrcFNoakR6MXVETzNHN0hMUEY=&t=1562829499651>

# 基礎統計

## 決算額（運営費交付金）

（単位：千円）

区 分		平成 27 年度	平成 28 年度	平成 29 年度	平成 30 年度	令和元年度
運営費交付金		603,234	584,800	539,525	498,004	507,855
内 訳	人件費	433,247	451,496	404,750	369,283	404,442
	物件費等	169,987	133,304	134,775	128,721	103,413

## 科学研究費補助金（間接経費を含む）

（単位：千円）

研究種目	年度		平成 27 年度		平成 28 年度		平成 29 年度		平成 30 年度		令和元年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
特定領域研究	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
新学術領域研究	3	33,670	4	34,450	5	35,100	4	30,680	0	0	0	0
基盤研究（A）	2	23,140	2	20,800	3	36,270	3	36,660	3	36,270	3	36,270
基盤研究（B）	3	19,110	4	22,620	5	21,450	4	25,480	7	42,250	7	42,250
基盤研究（C）	12	20,410	12	19,370	13	21,060	15	23,660	16	24,570	16	24,570
挑戦的萌芽研究	6	12,090	3	4,810	1	910	0	0	0	0	0	0
挑戦的研究（萌芽）					4	13,650	5	15,600	4	13,390	4	13,390
若手研究（S）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
若手研究（A）	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
若手研究（B）	8	15,340	12	24,959	10	18,590	7	12,480	0	0	0	0
若手研究							5	11,700	9	15,080	9	15,080
研究活動スタート支援	3	4,290	2	2,730	2	2,730	1	1,300	2	2,860	2	2,860
特別研究員奨励費	0	0	1	1,170	3	2,940	4	3,894	1	1,040	1	1,040
国際共同研究加速基金	1	14,300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
最先端・次世代研究開発支援プログラム	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
合 計	38	142,350	40	130,909	46	152,700	48	161,454	42	135,460	42	135,460

## 外部資金（間接経費を含む）

（単位：千円）

研究種目	年度		平成 27 年度		平成 28 年度		平成 29 年度		平成 30 年度		令和元年度	
	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額	件数	金額
受託研究	10	367,280	11	355,400	10	408,031	9	208,623	9	186,055	9	186,055
受託事業経費	1	2,500	1	2,600	1	2,400	2	2,510	0	0	0	0
補助金	1	19,070	1	9,000	1	9,000	1	2,000	0	0	0	0
民間等との共同研究	8	10,240	2	4,360	2	17,000	4	3,489	4	10,482	4	10,482
寄附金	18	17,752	29	36,753	28	29,080	24	22,935	19	19,170	19	19,170
合 計	38	416,842	44	408,113	42	465,511	40	239,557	32	215,707	32	215,707

## 土地・建物

区 分		研究所
建築面積		894 m <sup>2</sup>
建物延床面積	鉄骨コンクリート造	(6F) 5,072 m <sup>2</sup>

# 教育活動

## 大学院生・研究生数

令和2年5月1日現在

			先進がん モデル 共同研究 センター	がん幹細胞 研究 プログラム	がん微小 環境研究 プログラム	がん分子 標的探索 プログラム	がん分子標的 医療開発 プログラム	合計 (人)	
大学院生	医薬保健学総合研究科	修士課程	I		3			40	
			II	1	1		1		
		博士課程	I		1				
			II	3			3		
			III	1	2		2		
			IV	4	7	2	8		
	医学系研究科	博士課程	I						
			II						
			III						
			IV			1			
	先進予防医学研究科	博士課程	I						
			II						
			III						
			IV						
	自然科学研究科	前期課程	I				1		1
II									
後期課程		I							
		II							
		III							
		IV							
研究生（特別研究学生含む）			1	1		1	2	5	

※平成24年度に医学系研究科から医薬保健学総合研究科へ改組

## 交流協定校

令和2年5月1日現在

交流協定校	協定大学・部局等名	国（都市名）
大学間交流協定 Partner Universities	蘇州大学	中国（蘇州）
	四川大学	中国（成都）
	ハルビン医科大学	中国（ハルビン）
	釜山国立大学校	韓国（釜山）
	バルナ医科大学	ブルガリア（バルナ）
	モンゴル国立大学	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル科学アカデミー	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル国立医科大学	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル国立がんセンター	モンゴル（ウランバートル）
	モンゴル国立第二病院	モンゴル（ウランバートル）
	ナレーズワン大学	タイ（ピサヌローク）
	台北医学大学	台湾（タイペイ）
	シャルジャ大学	アラブ首長国連邦（シャルジャ）
	サンクトペテルブルク医科大学	ロシア（サンクトペテルブルク）
部局間交流協定 Partner Faculties	韓国科学技術研究院遺伝工学研究所	韓国（大田）
	復旦大学上海がん病院	中国（上海）
	ソウル大学校がん研究所	韓国（ソウル）
	ソウル大学がん微小環境研究センター	韓国（ソウル）

# 各種シンポジウム開催状況

## 1. 金沢大学がん進展制御研究所・復旦大学上海がんセンタージョイントシンポジウム

The 9<sup>th</sup> KUCRI-FUSCC Joint Symposium on Tumor Biology 2019

**目 的：**がんの基礎的ならびに臨床的研究の一層の発展と国際交流の推進を図ることを目的とし、今回は若手研究者を中心に、実施した研究についての成果報告およびディスカッションを行う。

**日 時：**2019年9月3日(火)  
13:00～16:30

**場 所：**金沢大学自然科学系図書館棟AVホール  
**来場者数：**約100名

**プログラム：**

### ①セッション1：

「Regulation of Breast Cancer Stem Cells and Drug Resistance」

**Suling LIU** (復旦大学上海がんセンター)

「Epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells」

**平田 英周** (金沢大学がん進展制御研究所)

「Aberrant Splicing Events in Cancer Progression and Development」

**Yingjun ZHAO** (復旦大学上海がんセンター)

### ②セッション2：

「Characterization of a novel epithelial IL23A complex」

**Dominic VOON** (金沢大学がん進展制御研究所)

「Necroptosis, From Molecular Mechanisms to Cancer and Drug Discovery」

**Zhenyu CAI** (復旦大学上海がんセンター)

「RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced cytokine and chemokine secretion」

**高橋 智聡** (金沢大学がん進展制御研究所)





## 2. 金沢国際がん生物学シンポジウム

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019

**目 的：**世界的に著名な研究者との交流と最新の  
がん研究の動向についてディスカッショ  
ンを行うことを目的とする。

**日 時：**2019年10月29日(火)  
9:00~17:00

**場 所：**金沢大学医学部記念館

**来場者数：**約120名

**プログラム：**

### ①セッション1：

「Targeting mitochondrial enzymes of one-carbon metabolism for cancer treatment」

**西村 建徳** (金沢大学がん進展制御研究所)

「RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment」

**高橋 智聡** (金沢大学がん進展制御研究所)

「Genomic and Epigenomic Alterations in Gastrointestinal Cancer : Opportunities for Precision Oncology」

**Patric TAN** (デューク・シンガポール国立大学医学部)

### ②セッション2：

「Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites」

**田所 優子** (金沢大学がん進展制御研究所)

「Macrocyclic peptide targeting growth factor and the receptor」

**松本 邦夫** (金沢大学がん進展制御研究所)

「The potential role of multi-drug resistance protein ABCB1 for tumor suppression in bats」

**板鼻 康至** (デューク・シンガポール国立大学医学部)

### ③特別講演：

「Drugging the Wnt pathway – Where it helps, where it hurts, and what it teaches us」

**David VIRSHUP** (デューク・シンガポール国立大学医学部)

### ④セッション3：

「Protective role of JLP-dependent lysosome positioning in reactive oxygen species (ROS)-induced cell death」

**I Ketut GUNARTA** (金沢大学がん進展制御研究所)

「Circumvention of targeted drug tolerance in lung cancer」

**矢野 聖二** (金沢大学がん進展制御研究所)

「The polycomb repressive complex drives epigenetic convergence in blast crisis chronic myeloid leukemia」

**S.Tiong ONG** (デューク・シンガポール国立大学医学部)

### ⑤セッション4：

「CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes.」

**武田 はるな** (国立がん研究センター研究所)

「The mechanism and physiological significance of programmed cell death initiated by caspase-1」

**土屋 晃介** (金沢大学がん進展制御研究所)





## 金沢大学がん進展制御研究所年報2019年

---

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

URL <http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/>