

令和 2 年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2021.4

金沢大学がん進展制御研究所

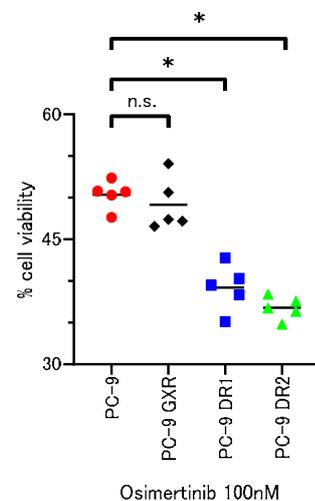
令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		皮膚発がんにおける骨髄由来間葉系前駆細胞とケモカインの相互関係および病態生理学的役割解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・法医学教室・准教授・石田裕子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・法医学教室・教授・近藤稔和
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・分子生体応答研究分野・教授・向田直史
【研究目的】	<p>皮膚は、人体の体表を被い体の外界との境界を構成する器官である。特に皮膚組織は、体の最も外側にあるために外界から恒常的に物理的または化学的的刺激を受けている。申請者らはこれまで、皮膚の創傷治癒過程における炎症性サイトカインやケモカインの病態生理学的役割を解析してきた。炎症性サイトカインやケモカインは急性、慢性を問わず炎症反応の key molecule であることから、本研究ではケモカインやケモカイン受容体の遺伝子欠損マウスを用いて、慢性炎症によるマウス皮膚がんモデルにおいてのがんの発症・進展におけるケモカインの病態生理学的役割を解析する。ケモカインと骨髄由来間葉系前駆細胞との相互関係を解析し、ケモカインが皮膚がんの発症予防や進展抑制の分子標的となり得る可能性について明らかにすることが、本研究の最終目的である。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>8週齢の雄 C57BL/6 (野生型) マウスに、DMBA+TPA 塗布による皮膚がんを惹起したところ、DMBA+TPA 塗布後2週以降で皮膚組織における Cx3cl1 及び Cx3cr1 遺伝子発現が著明に亢進していた。また、CX3CL1 タンパク発現を F4/80 陽性マクロファージに、CX3CR1 タンパク発現を F4/80 陽性マクロファージ及び CD31 陽性血管内皮に認めた。そこで、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスを用いて野生型マウスと同様に皮膚がんを惹起したところ、DMBA+TPA 塗布後20週で野生型マウスでは約80%のマウスに乳頭腫が認められたのに対し、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスでは約50%のマウスにしか腫瘍形成を認めなかった。腫瘍部への F4/80 陽性マクロファージ浸潤は、Cx3cr1 遺伝子欠損マウスで野生型マウスと比べて有意に減少していた。さらに、マクロファージのサブセットを検討したところ、野生型マウスには CD206 陽性 M2 マクロファージが多数集積しており、また、M2 マクロファージの約70%に CX3CR1 が発現していることが判明した。ヒト BCC および SCC 試料を用いて蛍光3重免疫染色を行ったところ、SCC では BCC と比べて多数の CD45⁺Col I⁺CX3CR1⁺ fibrocyte を認めた (図1)。以上より、CX3CL1-CX3CR1 系が皮膚発がん、増殖、進展に重要な役割を担っていることが示唆された。</p>	
<p>図1. ヒト皮膚がん部への fibrocyte 浸潤</p>		

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

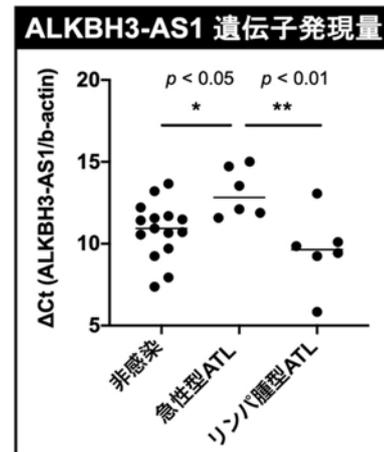
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Ishida Y , Kuninaka Y, Yamamoto Y, Nosaka M, Kimura A, Furukawa F, Mukaida N, Kondo T. Pivotal involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis for the recruitment of M2 tumor-associated macrophages in skin carcinogenesis. <i>J Invest Dermatol.</i> 2020 Mar 13. pii: S0022-202X(20)31195-7. doi: 10.1016/j.jid.2020.02.023.
	【学会発表】
	【その他特筆事項】

研究課題		EGFR 変異陽性肺癌の各種 EGFR 阻害薬による T790M 耐性変異腫瘍の heterogeneity の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・講師・山田忠明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・大学院生・片山勇輝
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・教授・高山浩一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>EGFR を標的とした第1世代から第3世代の複数の阻害薬は進行期 EGFR 遺伝子変異陽性肺癌の治療薬として認可され、初回治療薬として高い奏効性を示す。一方、EGFR 治療薬の選択性に基づく生存期間の延長に関する検討は十分なされておらず、最適治療法の確立が望まれている。第1,2世代 EGFR 阻害薬の代表的な耐性機構である EGFR-T790M 耐性遺伝子変異は獲得耐性症例の約半数で見られ、その耐性には第3世代 EGFR 阻害薬 Osimertinib の有効性が報告され、臨床において汎用されている。しかしながら、生存期間に寄与する EGFR 阻害薬の最良の選択については最終的な結論が出ていない。</p> <p>以上の臨床的な課題を解明するため、本研究では、異なる EGFR 阻害薬の治療介入により生じる T790M 変異耐性腫瘍の heterogeneity に焦点を絞り、その耐性依存性や薬剤感受性について解明し、臨床における T790M 変異腫瘍における EGFR 阻害薬の最適な逐次治療を提唱することを目的とし、研究を立案した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【実験1:各世代EGFR阻害薬による耐性細胞の樹立】</p> <p>EGFR 変異肺癌 PC-9 細胞を用いて免疫不全マウス xenograft モデルを作成し、第1世代 EGFR 阻害薬 gefitinib、第2世代 EGFR 阻害薬 dacomitinib を連日治療し、それぞれの耐性腫瘍を得た。耐性腫瘍より Gefitinib 耐性細胞株 PC-9GXR, Dacomitinib 耐性細胞株 PC-9DR1, DR2 を樹立した。それぞれの耐性株の EGFR-T790M 耐性変異について PCR 法にて陽性を確認した。</p> <p>【実験2: EGFR-T790M 耐性変異細胞の機能解析】</p> <p>上記の耐性細胞株に各世代 EGFR 阻害薬を添加し、MTT アッセイ法にて評価したところ、Dacomitinib 耐性細胞では Gefitinib 耐性細胞よりも Osimertinib に対して高感受性を示した(図)。また、Dacomitinib 耐性細胞では Osimertinib 治療により AKT シグナルの抑制効果を認めた。Dacomitinib 耐性細胞では Osimertinib によるアポトーシス誘導作用が増強していた。続いて、siRNA 法にて EGFR 遺伝子抑制効果を検討したところ、Dacomitinib 耐性細胞では Gefitinib 耐性細胞よりも細胞増殖が抑制され、EGFR 依存度がより高いことが示された。</p> <p>続いて、Osimertinib 感受性のより詳細な解明を目指し、microarray 法、NGS 法、Droplet Digital PCR 法にて解析を行った。Gefitinib 耐性細胞では、T790M 耐性変異クローン発現の頻度は高いものの、獲得耐性機構のひとつである上皮間葉転換を来とし、さらに腫瘍変異量や chromosome instability が高く、より強い tumor heterogeneity を示していた。</p> <p>以上より、Dacomitinib 耐性細胞では、Gefitinib 耐性細胞と比較し、tumor heterogeneity の進行が比較的軽微であり、EGFR シグナルへの依存度が高いため、Osimertinib に対する高感受性が維持されると考えられた。</p> <p>本研究では、EGFR 阻害薬の獲得耐性時に生じる EGFR-T790M 変異腫瘍の heterogeneity に前治療薬が関与する可能性を明らかにした。今後、臨床検体を用いた臨床研究に発展させたい。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	論文投稿準備中
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



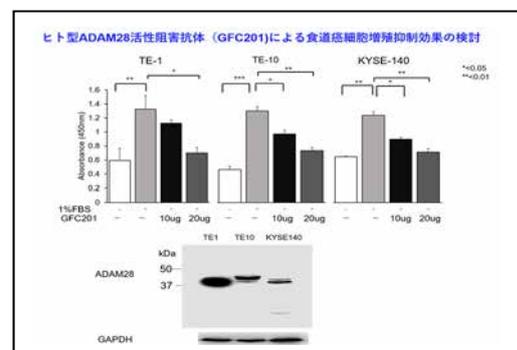
令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

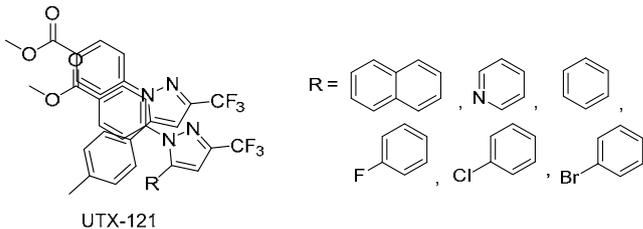
研究課題		ATL 発症に関与し新規治療標的となるエピゲノム異常関連長鎖非コード RNA の同定と解析
研究代表者	所属・職名・氏名	川崎医科大学 微生物学教室・助教・森 幸太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	川崎医科大学 微生物学教室・教授・齊藤 峰輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	機能ゲノミクス研究分野・教授・鈴木 健之
【研究目的】	<p>成人 T 細胞白血病 (ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (HTLV-1) の感染によって引き起こされる予後不良の T 細胞性白血病/リンパ腫であるが、未だ有効な治療法が存在しない。本研究では、がん進展過程におけるエピゲノム異常との関連が報告されている long non-coding RNA (lncRNA) に着目し、HTLV-1 の転写制御因子 HBZ により発現誘導される lncRNA の発現異常が ATL 発症に及ぼす病因的意義の解明と、予後・治療効果判定に有用な新規バイオマーカー・治療標的となりうるかについて検討した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト T 細胞白血病株である Jurkat Tet-ON 細胞を用いて、ドキシサイクリン存在下で目的遺伝子の発現を誘導する系を構築し、HTLV-1 の転写制御因子である HBZ により発現誘導される多種多様な non-coding RNA (ncRNA) をマイクロアレイにより網羅的に同定した。その中から 10 種類の lncRNA をランダムに抽出し、Real-time RT-PCR で検証した。その結果、試験対称群と比較し、HBZ 発現条件下で lncRNA の一種である ALKBH3-AS1 が誘導される傾向が観察された。マイクロアレイによる ncRNA 発現解析においても同様の傾向が観察されたことから、ALKBH3-AS1 は HBZ 依存的に誘導される可能性が示唆された。</p> <p>続いて、ATL の発病と ALKBH3-AS1 発現の関連性を探索する為に、ATL 患者由来末梢血単核球より抽出した RNA を用いて同様の解析を実施した。その結果、急性型 ATL 患者検体において ALKBH3-AS1 の ΔCt 値が有意に高い、すなわち ALKBH3-AS1 の発現が有意に抑制されている事が明らかとなった (右図)。HBZ のみを発現した条件下では ALKBH3-AS1 の発現が誘導される傾向にあるが、HTLV-1 感染状態にあり様々なウイルスタンパク質・ゲノムが転写・翻訳されている急性型 ATL 患者由来検体において有意にその発現が抑制されていたことから、HTLV-1 は HBZ 非依存的な ALKBH3-AS1 制御機構を有する可能性が示唆された。ALKBH3-AS1 の発現が複数の経路により精密に制御されていた場合、HTLV-1 の複製過程に ALKBH3-AS1 が何らかの影響を与えている可能性が推察される。以上より、本研究の成果として、急性型 ATL の病態発現に寄与する可能性を有する新たな lncRNA として ALKBH3-AS1 を見出す事に成功した。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>Penova M, Kawaguchi S, Yasunaga JI, Kawaguchi T, Sato T, Takahashi M, Shimizu M, Saito M, Tsukasaki K, Nakagawa M, Takenouchi N, Hara H, Matsuura E, Nozuma S, Takashima H, Izumo S, Watanabe T, Uchimaru K, Iwanaga M, Utsunomiya A, Tabara Y, Paul R, Yamano Y, Matsuoka M, Matsuda F. Genome wide association study of HTLV-1-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis in the Japanese population. <i>Proc Natl Acad Sci USA</i>. 2021. 118(11):e2004199118. doi: 10.1073/pnas.2004199118.</p>
	【学会発表】	なし。
	【その他特筆事項】	なし。



令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題	癌関連線維芽細胞とオルガノイドを用いた大腸癌浸潤先進部の形態学的変化の解明と ADAM 抗体の作用機序の解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・学内講師・望月 早月
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・永田 健
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・大学院生・安部 紘生
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・助教・岩崎 寿光
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校・教授・上野 秀樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	本研究では、ヒト大腸癌浸潤先進部の維性癌間質反応 (Desmoplastic reaction: DR) 分類別にがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts : CAFs) を培養し、それらの CAFs と共培養した大腸癌細胞株 (HCT-116, HT-29) の細胞増殖能、遊走能、細胞内 extracellular signal-regulated kinases 1/2(ERK 1/2)のリン酸化を検討し、DR が癌の悪性度に関与するメカニズムについて検討した。また、我々が開発したヒト型 ADAM28 活性阻害抗体 (211-14) を用いて食道癌細胞の細胞増殖抑制効果について検討を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>CAFs で発現する ADAM 分子について RT-PCR 法、real-time PCR 法、イムノブロット法を用いて DR 分類別に比較検討した。その結果、13 種類あるメタロプロテアーゼ型 ADAM 分子の中で、分泌型の ADAM9s は mature 症例に比べて immature 症例から採取した CAFs において有意に高発現していた。mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs の培養上清と共培養した大腸癌細胞株 (HCT-116, HT-29) は増殖能、遊走能、細胞内 extracellular signal-regulated kinases 1/2(ERK 1/2)のリン酸化が有意に促進され、shRNA を用いた CAFs での ADAM9s の発現抑制により HCT-116 と HT-29 の増殖能、遊走能、ERK1/2 のリン酸化が抑制された。さらに mature 症例と比較し immature 症例から採取した CAFs を Luciferase と Venus 融合遺伝子を導入した HCT-116^{fluc-cp156} や HT-29^{fluc-cp156} とヌードマウスの盲腸漿膜下層に混合移植した場合、有意に増殖が亢進し腹膜播種が高度に形成された。</p> <p>DR の形態的变化は CAFs における ADAM9s の発現と関連しており、ADAM9s は大腸癌細胞の細胞内 ERK1/2 のリン酸化促進と細胞増殖と遊走を促進し癌悪性度へ影響を及ぼしていると考えられた。</p> <p>また、211-14 抗体は ADAM28 高発現ヒト食道癌細胞株 (TE-1, TE-10, KYSE140) の細胞増殖を濃度依存的に抑制することが明らかとなった(図 1)。このことから 211-14 抗体は、食道癌細胞を対象とした新規分子標的治療薬剤としての応用が期待され、現在、in vivo 抗腫瘍効果の検討を進めている</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Mochizuki S.</u> (1 番目/10 名): Expression and function of ADAMs in cancer-associated fibroblasts of colorectal cancer. Digestion 101:18-24. 2020. 2. <u>Mochizuki S.</u> (3 番目/7 名): Periostin as a key molecule defining desmoplastic environment in colorectal cancer. Virchows Arch. 2020. doi: 10.1007/s00428-020-02965-8. 3. <u>望月早月, 岡田保典</u>: 線維症とメタロプロテアーゼ-MMP・ADAM・ADAMTS-「医学のあゆみ」275(10); 1040-1045, 2020. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>望月早月</u> (2 番目/9 名): 大腸癌における線維性癌間質反応と癌関連線維芽細胞による ADAM9 発現を介した癌細胞増殖との関連。第 79 回日本癌学会総会、広島、2020 年 10 月 2. <u>望月早月</u> (2 番目/8 名): 浸潤性膵管癌における ADAM28 発現と化学療法における発現低下の臨床的意義。第 79 回日本癌学会総会、広島、2020 年 10 月 <p>【その他特筆事項】 なし</p>	



研究課題		COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとする新規抗転移剤の創薬研究
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・講師・山田久嗣
	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・浅田元子
	所属・職名・氏名	徳島大学・D1・山花 啓梨
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫, 准教授・遠藤良夫, 准教授・滝野隆久
【研究目的】	本研究は、代表的非ステロイド性抗炎症薬であり、最近、様々な制がん作用を有することが示されている COX-2 阻害剤セレコキシブをリードとして、ドラッグデザインの手法を用いて強い抗転移剤を有する新規セレコキシブ誘導体の創製を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>細胞外マトリックス (ECM) は全ての臓器・組織中に存在する非細胞性の構成成分であり、生体内において重要な働きを担っている。ECM は結合組織と非常に強固な基底膜から成り、この基底膜の骨格構造は IV 型コラーゲンにより形成されている。また、癌の転移は基底膜の破壊から始まり、その後、癌細胞は結合組織へ侵入し、血管等を介して他の臓器へと輸送される。従って、癌の転移は基底膜の破壊、すなわち IV 型コラーゲンの分解によって誘導される。この IV 型コラーゲンの分解において重要な役割を担うのがマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) である。MMP は ECM 構成成分を分解するタンパク質分解酵素であるが、その中でも MMP-2, MMP-9 は IV 型コラーゲンを特異的に分解する IV 型コラーゲナーゼとして知られている。よって、MMP-2, 9 の活性化を阻害することは、薬剤の抗転移効果の向上に有効であると考えた。そこで我々は、効果的な抗転移剤を開発するにあたり、COX-2 阻害剤として知られる Celecoxib に注目した。近年では、Celecoxib が MMP の活性化を阻害するなどの COX-2 非依存的な抗転移効果を示すことも報告されている。さらに、Celecoxib のスルホンアミド基をメチルエステルに変換した UTX-121 は、Celecoxib よりも高い MMP-2, 9 阻害活性を有することが明らかとなった。以上の点から、UTX-121 をリード化合物とし、より効果的な新規抗転移剤の開発を目指した。</p> <p>UTX-121 の p-トリル基をナフタレンおよびピリジン等に置換した化合物では、MMP-2, 9 阻害活性は見られなかった。従って、p-トリル基の立体的・電子的特性が MMP の阻害に重要であることが示唆された。また、p-トリル基のメチル基を除去した化合物も MMP 阻害活性は見られなかったことから、p-トリル基のメチル基によるファンデルワールス相互作用の関与が示唆された。一方、メチル基の代わりにハロゲン (F・Cl・Br) を導入した化合物は、いずれも MMP 阻害活性を示した。中でも Cl 体および Br 体は UTX121 よりも強い MMP 阻害活性を示した。よって、標的分子に対するハロゲンの静電的相互作用が示唆される。</p> <p>今後は、得られた構造活性相関データを基に UTX-121 の p-トリル基の脂溶性・電子求引性・分子サイズ等に焦点を当て、メチル基の位置にニトロ基やメトキシ基等の置換基を導入して構造活性相関を行い、MMP-2, 9 阻害活性に優れた化合物の探索を行っていく予定である。</p>	
	 <p style="text-align: center;">UTX-121</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	・山花啓梨, 滝野隆久, 遠藤良夫, 鈴木武, 宇都義浩, Development of a Novel Celecoxib Derivative UTX-121 as an Antimetastatic Agent, 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月 1~3 日, 広島 & Web
	【その他特筆事項】	なし

研究課題		転移性乳がん細胞におけるエピジェネティック変化と増殖機構の解明																											
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・外来研究員・中山淳																											
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	早稲田大学大学院先進理工学研究科・大学院生・林祐介																											
	所属・職名・氏名																												
	所属・職名・氏名																												
	所属・職名・氏名																												
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之																											
【研究目的】	<p>原発腫瘍から自然発生的な転移を模倣する同所性移植手法を用いて樹立した乳がん肺高転移株 MDA-MB-231-LM05 細胞は、顕著な造腫瘍能と肺転移能を示すとともに、5-fluorouracil や Carboplatin などの殺細胞性抗がん剤にも耐性を有する。</p> <p>この LM05 細胞に対して標準阻害剤ライブラリーを用いた増殖能の評価を行った結果、親株 (MDA-MB-231-luc2-Parent 細胞) と比較してマルチキナーゼ阻害剤や HAT (Histone Acetyl Transferase) 阻害剤などに対する感受性が変化していることを見出した。本研究は、これら阻害剤に対する高転移性がん細胞の応答と増殖機構を明らかにすることで、転移先臓器特徴的ながん細胞増殖機構を標的とする治療戦略確立を目指す。</p>																												
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【結果】</p> <p>標準阻害剤ライブラリーを用いたスクリーニングの結果から同定した SCG-CBP30 (CBP/p300・BRD4 阻害剤) を MDA-MB-231-LM05 細胞に処理することで、LM05 細胞の viability 低下および死細胞率の増大が確認された。親株と比較して、樹立した高転移性乳がん LM05 細胞はヒストン修飾に依存した細胞増殖機構を有しており、高転移性獲得の過程でヒストン修飾を軸としたエピジェネティック変化が起きていることが示唆された。また、SCG-CBP30 類縁体や構造類似阻害剤を用いて同様の実験を行った結果、親株と LM05 細胞の間に差は確認されなかった。すなわち、この表現型は SCG-CBP30 特異的なヒストン修飾変化・下流遺伝子に依存していると考えられる。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Trypan blue assay</p> <table border="1"> <caption>Trypan blue assay results (approximate values)</caption> <thead> <tr> <th>Cell Line</th> <th>0 μM</th> <th>5 μM</th> <th>10 μM</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Parent</td> <td>100%</td> <td>~65%</td> <td>~25%</td> </tr> <tr> <td>LM05</td> <td>100%</td> <td>~35%</td> <td>~15%</td> </tr> </tbody> </table> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Flow cytometry analysis (10μM SCG-CBP30)</p> <table border="1"> <caption>Flow cytometry results (10μM SCG-CBP30)</caption> <thead> <tr> <th>Cell Line</th> <th>Q1 (7-AAD⁺, Annexin V-PE⁻)</th> <th>Q2 (7-AAD⁻, Annexin V-PE⁺)</th> <th>Q3 (7-AAD⁺, Annexin V-PE⁺)</th> <th>Q4 (7-AAD⁻, Annexin V-PE⁻)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Parent</td> <td>0.45%</td> <td>3.29%</td> <td>~95%</td> <td>~96%</td> </tr> <tr> <td>LM05</td> <td>2.77%</td> <td>6.15%</td> <td>~91%</td> <td>~93%</td> </tr> </tbody> </table> </div> </div> <p>【今後の展望】</p> <p>SCG-CBP30 とその類縁体、構造類似阻害剤を用いて、ウェスタンブロットにより SCG-CBP30 特異的なヒストン修飾変化を同定する。次に、LM05 細胞 SCG-CBP30 処理群と未処理群において、RNA-seq 解析・ATAC-seq 解析を行う。RNA-seq 解析からどの下流遺伝子が増加しているか明らかにするとともに、ATAC-seq 解析からユークロマチン、ヘテロクロマチン領域を同定する。2つの解析結果を統合し、どの下流遺伝子がエピジェネティック制御に依存した制御を受けているか明らかにすることで、LM05 細胞における増殖機構を明らかにする。同定した遺伝子の転移能への寄与および治療標的としての有用性を評価する。</p>		Cell Line	0 μM	5 μM	10 μM	Parent	100%	~65%	~25%	LM05	100%	~35%	~15%	Cell Line	Q1 (7-AAD ⁺ , Annexin V-PE ⁻)	Q2 (7-AAD ⁻ , Annexin V-PE ⁺)	Q3 (7-AAD ⁺ , Annexin V-PE ⁺)	Q4 (7-AAD ⁻ , Annexin V-PE ⁻)	Parent	0.45%	3.29%	~95%	~96%	LM05	2.77%	6.15%	~91%	~93%
Cell Line	0 μM	5 μM	10 μM																										
Parent	100%	~65%	~25%																										
LM05	100%	~35%	~15%																										
Cell Line	Q1 (7-AAD ⁺ , Annexin V-PE ⁻)	Q2 (7-AAD ⁻ , Annexin V-PE ⁺)	Q3 (7-AAD ⁺ , Annexin V-PE ⁺)	Q4 (7-AAD ⁻ , Annexin V-PE ⁻)																									
Parent	0.45%	3.29%	~95%	~96%																									
LM05	2.77%	6.15%	~91%	~93%																									
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【総説】</p> <p>(1) Nakayama J (Corresponding Author), Han Y, Kuroiwa Y, Azuma K, Yamamoto Y and Semba K. The In Vivo Selection Method in Breast Cancer Metastasis. <i>Int J Mol Sci.</i>, 22(4):E1886, 2021.</p> <p>【論文】</p> <p>(1) Nakayama J (Corresponding Author), Saito R, Hayashi Y, Kitada N, Tamaki S, Han Y, Semba K and Maki SA, High Sensitivity In Vivo Imaging of Cancer Metastasis Using a Near-Infrared Luciferin Analogue seMpai. <i>Int J Mol Sci.</i>, 21(21):E7896, 2020.</p> <p>(2) Kuroiwa Y, Nakayama J (Corresponding Author), Adachi C, Inoue T, Watanabe S and Semba K, Proliferative Classification of intracranially injected HER2-positive Breast Cancer Cell Lines. <i>Cancers</i> 12(7):1811, 2020.</p>																												

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【学会発表】

- (1) **林祐介, 中山淳**, 山本瑞生, 山本雄介, 井上純一郎, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析, 第79回日本癌学会学術総会, 2020年, 一般演題(口演発表): OJ10-2-5
- (2) **林祐介, 中山淳**, 仙波憲太郎, 乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明, 第29回日本がん転移学会学術集会・総会, 2020年, ポスター発表:P1-08
- (3) **林祐介, 中山淳**, 仙波憲太郎, 乳がん肺高転移株における殺細胞性抗がん剤耐性機構と細胞増殖機構の解明, 第24回日本がん分子標的治療学会学術総会, 2020年, ポスター発表: P9-4
- (4) **林祐介, 中山淳**, 仙波憲太郎, 同所性移植手法を用いた乳がん肺転移株のシグナル解析, 第72回日本細胞生物学会大会, 2020年, ポスター発表: P6-26

【その他特筆事項】

研究課題		新規解糖系制御解明と癌抑制の探求
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学医学部准教授 近藤祥司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学医学部ポスドク 三河拓己
	所属・職名・氏名	京都大学医学部実験補助 柴田瑛莉
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 高橋 智聡
【研究目的】	<p>ワールブルグ効果(解糖系亢進)は多くの癌で観察されるが、解糖系阻害剤の治療応用は道半ばである。解糖系を標的とする癌治療では重篤な副作用の危険性がある。この問題の克服には、癌特異的な解糖系代謝制御の深い理解が必要である。我々は、解糖系酵素 PGAM そのもののワールブルグ効果への関与に注目している。PGAM の病態に基づく制御機構を解明すれば、正常細胞での PGAM 活性を温存しつつ、PGAM を標的とした治療開発が可能となる。近年我々は、PGAM の新規結合タンパク(キナーゼ)との協調作用による解糖系代謝調節という生命現象を見出した。これら基盤データを確立し、新規アプローチ(これら結合阻害)による癌抑制という新たな臨床応用を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>近年の抗癌剤は、分子標的薬と呼ばれる癌の特性に注目して開発された薬剤が主流となりつつある。癌細胞では、解糖系代謝が亢進しているという特徴があり、ワールブルグ効果(1930年)の名で良く知られている。臨床検査でも、この解糖系代謝亢進を指標として患者体内の癌を見つける FDG-PET が普及している。そのため、解糖系代謝を標的とした抗癌剤治療の可能性は、古くから指摘されていた。しかしながら、解糖系代謝は通常細胞においても重要なエネルギー供給の代謝経路であるため、単なる解糖系阻害剤は副作用が大きく実用化できていない。本研究では、10 個の解糖系酵素の中の一つであるホスホグリセリン酸ムターゼ(PGAM)の多面的な生物学的効果に注目し、研究を続けてきた。そして、PGAM を標的とした治療法開発のため、癌におけるワールブルグ効果と PGAM の関連を検証するプロジェクトを実施した。まず、PGAM モデルマウスの解析より、発癌における解糖系代謝亢進において PGAM が重要であることが判明した。また、PGAM と結合する新規蛋白質として Chk1 キナーゼを見出した。従来、Chk1 は細胞増殖のブレーキとして働くシグナル伝達因子として知られていた。本研究では、PGAM と Chk1 の結合は、通常細胞ではなく癌細胞で、よく観察できることを見出した。PGAM と Chk1 が結合する条件では解糖系代謝が亢進し、逆にその結合を阻害すると癌の増殖や解糖系代謝が低下した。興味深いことに、PGAM と Chk1 の結合による解糖系代謝亢進には、PGAM の酵素活性は関与していない。以上の結果より、本研究は、癌特有のワールブルグ効果の分子機構を解明した(右図)。</p> <p>本研究の最大の成果は、「癌細胞において、PGAM の非酵素活性として、PGAM と Chk1 の結合による解糖系代謝亢進」を見出した点である。従来、抗癌剤としての解糖系阻害剤の開発は、酵素活性阻害剤がその主流であったため、甚大な副作用により実用化できていなかった。今回の我々の見出した「PGAM の非酵素活性」により、通常細胞の解糖系には影響の少ない形で、癌でのワールブルグ効果の阻害剤の開発が期待できる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>1) Koji Toriyama, Makoto Kuwahara, Hiroshi Kondoh, Takumi Mikawa, Nobuaki Takemori, Amane Konishi, Toshihiro Yorozuya, Takeshi Yamada, Tomoyoshi Soga, Atsushi, Shiraishi and Masakatsu Yamashita. T cell-specific deletion of Pgam1 reveals a critical role for glycolysis in T cell responses. Communications Biology. 2020 Jul 24;3(1):394. doi: 10.1038/s42003-020-01122-w.</p> <p>2) Takumi Mikawa, Eri Shibata, Midori Shimada, Ken Ito, Tomiko Ito, Hiroaki Kanda, Keiyo Takubo, Matilde E Lleonart, Nobuya Inagaki, Masayuki Yokode, and Hiroshi Kondoh</p>

Phosphoglycerate mutase cooperates with Chk1 kinase to regulate glycolysis.
iScience 2020 Jun 24;23(7):101306. doi: 10.1016/j.isci.2020.101306.

【学会発表】

2020年12月3日 「老化や加齢性疾患関連メタボライトと解糖系代謝機構の同定

Identification of the metabolites and glycolytic regulation involved in ageing and its relevant diseases」日本分子生物学会、京都

2020年9月25日 「解糖系酵素 PGAM モデルマウスの解析」日本抗加齢医学会、東京（新潟）

2020年9月25日 「PGAM の「非酵素機能」によるワールブルグ解糖系新規制御機構」日本抗加齢医学会、東京（新潟）

【その他特筆事項】

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腸内細菌叢を活用した新規がん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・教授・園下 将大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・助教・大塩 貴子
	所属・職名・氏名	北海道大学 遺伝子病制御研究所 がん制御学分野・博士研究員・山村 凌大
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	<p>膵がんは極めて高い薬物抵抗性を示すことが知られており、これが膵がんを最も予後不良のがんたらしめている大きな要因の一つとなっている。一方、膵がん患者が健常人と異なる腸内細菌叢を保有することが最近報告されたが、膵がんの発生に影響する実際の細菌叢やその機序、また細菌叢が膵臓がんの薬物治療に与える影響は完全に解明されていない。</p> <p>そこで本研究では、申請者が最近作出した膵がん遺伝子型ショウジョウバエを使用し、病態と関連する腸内細菌種を同定するとともに、その成果に立脚して新規治療法の開発を実施する。これにより、今後患者数の一層の増加が見込まれている膵がんに対して有効な治療戦略を確立し、もって福祉向上への貢献を図る。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者は最近、膵臓がん患者の中でも最も予後が悪い患者群で観察される4遺伝子変異(KRAS活性化、TP53・CDKN2A・SMAD4不活性化)を模倣した4-hitショウジョウバエを作出することに成功した。このハエは、細胞の増殖能や遊走能の顕著な亢進を示す。</p> <p>申請者は本年、大島教授との共同研究の中で、この4-hitハエと対照の非遺伝子組換えハエの腸内細菌叢を網羅的に解析し、両者の比較を実施した。その結果、4-hitハエには対照ハエと比較して酢酸菌の存在割合が有意に低いことがわかった。そこで、ハエ体内の酢酸の存在量を測定したところ、4-hitハエの体内には対照ハエと比較して酢酸量が有意に低いことが分かった。一方、酢酸以外の短鎖脂肪酸の量は両系統で差がないことが分かった。</p> <p>以上の結果から申請者は、4遺伝子の変異が何らかの機序を介して腸内細菌叢の構成に影響を与えること、そして体内酢酸量が減少することを解明した。今後は、腸内細菌叢が変化する機序や、酢酸が形質転換細胞の性質に与える影響を解明し、それらの知見に立脚して新規膵がん治療法の開発を推進する予定である。最後に、本研究に対し多大なご指導とご支援を賜りました大島教授と金沢大学がん進展制御研究所に深く感謝申し上げます。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Yamamura R, Ooshio T & Sonoshita M. (2021). Tiny <i>Drosophila</i> makes giant strides in cancer research. <i>Cancer Sci.</i> 112:505-514.
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 園下 将大 個体ケミカルバイオロジーが加速する高次生命現象の解明と創薬 第43回日本分子生物学会年会 2020年12月3日 園下 将大 個体を使用した新規がん治療薬の創出基盤 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会 2020年10月7日 Masahiro Sonoshita Determining therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer using a whole-animal platform 第79回日本癌学会学術総会 2020年10月1日 Masahiro Sonoshita Determining therapeutic vulnerabilities in pancreatic cancer using a whole-animal platform 第93回日本生化学会大会 2020年9月14日 園下 将大 遺伝学に立脚した新規がん治療法の開発 第29回日本がん転移学会学術集会 2020年7月16日 園下 将大 個体レベルの遺伝学に立脚した新規創薬手法 第86回日本生化学会東北支部例会(紙上開催) 2020年5月
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		白血病進展過程における好塩基球造血制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学医学部附属病院・検査部・客員研究員・神尾尚馨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学医学部附属病院・検査部・助教・平位秀世*
	所属・職名・氏名	(*現在・東京薬科大学・教授)
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>染色体転座によって生じた BCR-ABL 融合タンパクが原因となる慢性骨髄性白血病(CML)は、BCR-ABL の作用を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤の登場によって、その予後は大幅に改善した。しかし、CML の治癒を目指すためには、治療抵抗性や薬剤中止後の再発などの課題が残されており、さらなる病態の解明が必要である。CML では、骨髄球系細胞全体の増多の中でも、健常者ではかなり少ない好塩基球の増多が特徴的に観察される。馬場らは増多した好塩基球からの CCL3 分泌が正常造血幹細胞を骨髄の造血微小環境から駆逐して白血病の進展をもたらすことを明らかにした(Baba T et al. Blood, 2016)。われわれは、BCR-ABL の下流で活性化された転写因子 C/EBPβ が(Leukemia, 2013、Blood Adv, 2019)、CML の骨髄球系増多に関与していることを明らかにしている。さらに予備的な検討で C/EBPβ が好塩基球造血に関与することが明らかとなってきた。本研究では、CML の病態形成における C/EBPβ の新たな機能を明らかにするため、1) C/EBPβ による好塩基球の分化・増殖制御の分子メカニズム、2) C/EBPβ による CCL3 の発現制御が、好塩基球分化を介したのか、あるいは直接に制御しているかを明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<ul style="list-style-type: none"> ・ BCR-ABL による好塩基球増多における C/EBPβ の機能 BCR-ABL を遺伝子導入した野生型マウスまたは C/EBPβ ノックアウト(KO)マウス由来の骨髄細胞を、致死量放射線照射後の野生型マウスに移植した。移植後 12~14 日後のレシピエントの骨髄をフローサイトメトリーで解析したところ、KO 骨髄細胞のレシピエントでは、野生型細胞のレシピエントに比較して好塩基球の増多が有意に抑制されていた。一方、同じ FcεRI を発現する肥満細胞への分化には明らかな差を認めなかった。共通骨髄球系前駆細胞を含む Lineage⁻c-Kit⁺Sca-1⁻細胞の数・頻度は KO マウス由来骨髄細胞のレシピエントで多い傾向にあることから、共通骨髄球系前駆細胞以降の分化過程において C/EBPβ が作用していることが示唆された。定常状態の KO マウスの好塩基球および肥満細胞数は、野生型マウスと比して有意な差はないため、BCR-ABL 存在下で特異的な現象と考えられる。好塩基球と肥満細胞は、造血分化過程で一部共通の経路をたどるが、現時点では分化経路中のより詳細な C/EBPβ の作用点の同定には至っておらず、引き続き検討が必要である。 ・ CCL3 発現制御における C/EBPβ の機能 BCR-ABL 遺伝子導入後の野生型もしくは KO マウス由来の骨髄を移植したレシピエントから好塩基球を分離して qRT-PCR を実施したところ、CCL3 の発現は野生型細胞に比べて KO 細胞で有意に低いことから、C/EBPβ は好塩基球の分化のみならず、分化した好塩基球における CCL3 の発現誘導においても直接関与していることが示唆された。 ・ CCL3 のプロモーター部分への C/EBPβ の結合 現在マウス造血幹細胞株 EML 細胞を用いて、BCR-ABL の過剰発現時及び、C/EBPβ の過剰発現をする安定発現細胞株を樹立した。こららを用いて、C/EBPβ が同部位に結合するかどうかをクロマチン免疫沈降法によって明らかにする予定である。 <p>以上の結果から、転写因子 C/EBPβ は、CML の好塩基球増多と CCL3 発現制御のそれぞれに直接関与していると考えられる。今回、CML 以外の白血病進展における好塩基球の関与に関しては十分に検討できなかったため、今後の課題となった。今後白血病進展制御のために、好塩基球分化過程での作用段階の決定を含めた詳細な分子メカニズム解明及び治療標的分子の探索を行う予定である。</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成果等】	【主な論文発表】 Sato A, <u>Kamio N</u> , Yokota A, Hayashi Y, Tamura A, Miura Y, Maekawa T and <u>Hirai H</u> C/EBP β isoforms sequentially regulate regenerating mouse hematopoietic stem/progenitor cells. Blood Advances, 4(14):3343-3356, 2020
	【学会発表】 無し
	【その他特筆事項】 無し

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

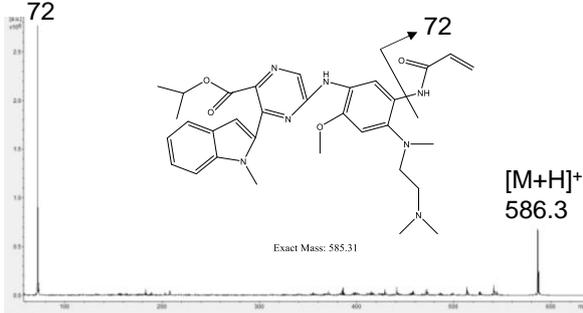
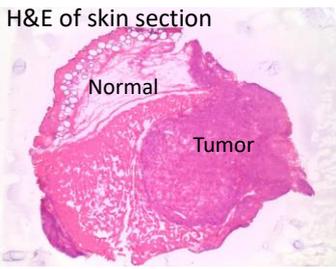
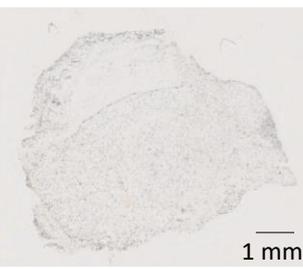
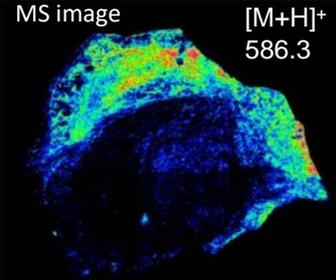
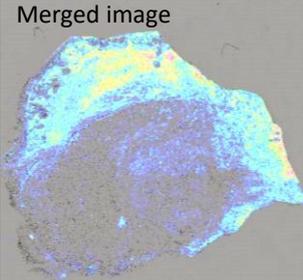
研究課題		Met-CDCP1 複合体の構造解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・助教・梶原健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学・特任研究員・赤松香奈子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>がん細胞は微小環境において周囲の細胞から様々な因子の供給を受けることで、がん形質を獲得している。その因子のひとつ HGF は受容体 Met に結合することで細胞内シグナルを活性化させ、がん進展に寄与している。我々は細胞膜上の Met 制御メカニズムの理解を目指して解析を進めてきた。これまでに CDCP1 は Met と細胞外領域を介して結合しており、その活性化を制御していることを明らかにしてきた。さらに、この制御には CDCP1 の細胞外領域の構造変化（切断）が重要であることを明らかにした。しかし、CDCP1 の構造変化が Met との相互作用に与えるインパクトの構造的な理解には至っていない。本研究では、CDCP1 と Met の結合を構造レベルで明らかにして、Met の精密な制御、さらにはがん進展の抑制を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><u>1) CDCP1 大量発現システムの構築</u></p> <p>CDCP1 の細胞外ドメインの C 末端側に精製用の His6 タグ配列と TEV プロテアーゼ切断配列を付加したコンストラクトを作製した。この CDCP1 は全長型と切断型の二種類を用意し、切断型はさらに正常配列と HRV3C プロテアーゼ切断配列に置換したものの二種類を用意した。これらのプラスミドをもとにレトロウイルスを作製して、安定発現株を作出した。使用した細胞は哺乳動物由来の HEK 細胞と CHO 細胞の二種類とした。いずれの細胞も、構造解析時のノイズの原因となる糖鎖の付加を担う GnT1 の遺伝子変異株である（HEK 細胞は Crispr/Cas9 システムを利用した遺伝子ノックアウト細胞である）。作出した安定発現細胞のクローン化を行い、各細胞のタンパク質の分泌量を評価することで、高分泌細胞を取得した。</p> <p><u>2) CDCP1 大量発現システムからの回収と精製</u></p> <p>上記の実験にて得られた細胞の大量培養（4-8 リットル）を実施して、その培養上清を Ni-NTA カラムに供した。ゲルろ過クロマトグラフィ後、TEV プロテアーゼ処理とエンドグリコシダーゼ処理を実施した。切断型はさらに HRV3C プロテアーゼの処理を実施した。酵素反応後、再度ゲルろ過クロマトグラフィとイオン交換クロマトグラフィを行った。得られたピークはすべて SDS-PAGE および CBB 染色で、目的タンパク質の精製と純度を確認した。</p> <p><u>3) CDCP1 結晶化条件の検討</u></p> <p>（大阪大学 蛋白質研究所 中川敦史 教授との共同研究）</p> <p>まず精製したサンプルの均一性を多分散性解析で評価した。全長型 CDCP1 は結晶化に供するに十分なクオリティであることを確認した。一方で、切断型 CDCP1 は均一性の低いサンプルであることを示しており、精製条件の再検討が必要であった。現在、先行して全長型 CDCP1 を結晶化条件のスクリーニングを実施している。</p>	

【成 果 等】	【主な論文発表】 CDCP1 promotes compensatory renal growth by integrating Src and Met signaling. <u>Kentaro Kajiwara</u> , Shotaro Yamano, Kazuhiro Aoki, Daisuke Okuzaki, <u>Kunio Matsumoto</u> , Masato Okada. <i>Life Science Alliance</i> , in press (2021) 【学会発表】 1) がん進展に関与する膜糖タンパク質 CDCP1 の精製と結晶化 赤松香奈子、杉本楓、 <u>梶原健太郎</u> 、亀井武蔵、松田真、山下栄樹、中川敦史、岡田雅人 第93回日本生化学会（オンライン） 2) CDCP1 細胞外領域の構造基盤の解明 杉本楓、赤松香奈子、松田真、 <u>梶原健太郎</u> 、山下栄樹、中川敦史、岡田雅人 第43回日本分子生物学会（オンライン） 3) Src シグナル伝達の時空間的制御 <u>梶原健太郎</u> 蛋白質研究所セミナー「生体膜上の生物化学」 【その他特筆事項】 なし
----------------	---

研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用を制御する高活性低分子化合物の同定を目指したデータ駆動型創薬技術の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・教授・青木 俊介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究では HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。種々の <i>in silico</i> スクリーニング手法を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、HGF α 鎖と β 鎖の Met への結合に関与するポケット、に嵌まり込む低分子化合物を探索するための計算科学的な創薬基盤を機械学習などを活用したデータ駆動型創薬技術によって確立する。最終的には、HGF-Met のタンパク質間相互作用を阻害する新規低分子化合物を高精度で予測できる創薬のための技術基盤を確立することを目的とし、創薬リード化合物の類縁体設計、複合体構造解析ならびに有機合成展開も視野に入れた創薬研究を展開する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまで本研究の標的タンパク質である HGF の立体構造に着目し <i>in silico</i> スクリーニング手法によって、HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害しうる新規低分子化合物候補を複数同定していた。昨年度の研究では HGF β 鎖を標的とした新規骨格を有する化合物を 2 種類発見する事に成功していた。機械学習等を活用した化合物の同定には活性化化合物の多様な構造情報が必要となる。そこで、さらに多くの新規骨格を有する化合物を探索するために β 鎖の S1 ならびに S2 の 2 つの結合ポケットを用い、フレキシブルドッキング手法を 2 種類利用する新規スクリーニング経路 4 種類を検討した。その結果、HGF β 鎖 S1 ポケットに結合し阻害効果を有する新規候補化合物を 10 種類選定し入手した。これらの候補化合物に関して HGF に対する阻害活性の検証実験を松本研究室で行っていただいた。細胞ベースの Met 受容体リン酸化 ELISA アッセイの結果、HGF β 鎖に対するこれまでとは全く異なる新規骨格を有する化合物を 4 種類発見する事に成功した。これらの化合物はいずれも溶解度が低く高濃度帯域の阻害活性は頭打ちとなった。しかしながら、機械学習等を用いた新規スクリーニング経路確立の為の学習データとしては活用できると考えられた。現在、これらの構造情報に加え、これまで蓄積してきた活性・非活性化化合物の構造や結合モード等をサポートベクターマシン (SVM) を用いて機械学習する活性化化合物の判別モデル (図 1) を構築している。今後、本モデルで大規模化合物ライブラリを探索することで、強力な阻害効果を有する化合物を同定できる可能性が考えられた。また今後は、有機合成展開も視野に入れた化合物設計の可能性が考えられた。</p>	
	<pre> graph TD A[pMetアッセイによって活性の有無が判別された化合物群 (2014年~2019年) DUDによるデコイ (おとり) 化合物の生成] --> B[阻害効果有り] A --> C[阻害効果無し/弱い] B --> D[特徴量抽出/分子記述子 結合スコア 原子数 疎水性 logP値 等] C --> D D --> E[サポートベクターマシン(SVM)学習・判別モデル構築] E --> F[化合物スクリーニングに応用] </pre>	
	<p>図 1 SVM を用いた機械学習活性化化合物の判別モデル</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>(1) Taira J, Umei T, Inoue K, Kitamura M, Berenger F, Sacchettini JC, Sakamoto H, Aoki S. Improvement of the novel inhibitor for Mycobacterium enoyl-acyl carrier protein reductase (InhA): a structure-activity relationship study of KES4 assisted by <i>in silico</i> structure-based drug screening. J Antibiot (Nature pub. group). 73:372-381, 2020.</p> <p>(2) Taira J, Nagano T, Kitamura M, Yamaguchi M, Sakamoto H, Aoki S. Structural modification of a novel inhibitor for mycobacterium enoyl-acyl carrier protein reductase assisted by <i>In silico</i> structure-based drug screening. Int J Mycobacteriol. 9:12-17. 2020.</p>
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞生存維持にかかわるエクソソームとシグナル伝達系の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・室長・北條浩彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立精神・神経医療研究センター神経研究所・流動研究員・清水英雄
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	<p>薬剤耐性は、抗がん剤治療や感染症治療において治療を減速させ制限させる大きな問題である。効果的かつ持続的な投薬治療を行うためには、薬剤耐性の発生を回避することが重要である。そのためには薬剤耐性獲得メカニズムを理解することが必要である。これまでの研究から、薬剤耐性に関わる多くの遺伝子変異が同定されている。しかしながら、それらの遺伝子変異が、薬剤の暴露を初めて受けた(ナイーブな)細胞で早急に成立したとは考えられない。初めて薬剤に暴露したがん細胞は、どのようにして生き延びるのか?我々は、その問いに答えるために「初期のがん細胞サバイバルメカニズム」に焦点を当て研究を行ってきた。近年、がん細胞の転移・維持に関わる新しい因子として細胞外小胞(エクソソーム)が注目されている。このエクソソームに関わるがん細胞の転移を含めた生存維持機構は、薬剤耐性獲得そしてその維持においても重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究は、薬剤耐性獲得に関わるエクソソームについて検討をおこなった。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト非小胞肺がん細胞株 PC-9 細胞は、ユニークな特徴を有するがん細胞である。ナイーブな PC-9 細胞は抗がん剤ゲフィチニブに対して強い感受性を示すが、ゲフィチニブの長期暴露によって耐性細胞へと変化する。抗がん剤感受性から耐性への変化が同一の細胞で観察できることから、PC-9 細胞は薬剤耐性獲得の良いモデル細胞として研究されている。我々は、この細胞株を用いてゲフィチニブ感受性・耐性細胞での遺伝子発現変化を調べた。その結果、ゲフィチニブ処理によって線維芽細胞増殖因子(FGF2)とその受容体(FGFR1)遺伝子の発現が顕著に増加することが分かった。そして、FGFR1 阻害剤や FGF2 を用いた細胞生物学的解析から、最初のゲフィチニブ暴露によって死んだ細胞から漏れ出る FGF2 が、まだ生残っている細胞の生存を助けていることを発見した。これは、最初のゲフィチニブ暴露から細胞が生き延びる「利他的なサバイバル戦略」であると考えられる。しかし、このサバイバル戦略は一過性であり、恒久的な薬剤耐性獲得のためには遺伝子の発現制御の変化が必要である。その初期の遺伝子発現制御として、NF-κB の早期の活性化が起こることを見出した。これらの薬剤耐性獲得に関わる遺伝子変化に加えて、我々は、がん細胞と密接な関係がある細胞外小胞、エクソソームについて薬剤耐性との関連を調べることにした。エクソソーム内には遺伝子発現を制御する機能性 RNA、マイクロ RNA が含まれている。まずは、ナイーブな PC-9 細胞とゲフィチニブ耐性を獲得した耐性 PC-9 細胞で発現するマイクロ RNA について、それぞれの発現プロファイルを解析し比較を行った。その結果、薬剤耐性獲得によってマイクロ RNA の発現プロファイルが変化することが分かった。この変化が、エクソソームによって細胞外に放出されるマイクロ RNA にも反映されているのか今後解析し検討していく予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Boldbaatar J., Gunarta IK., Suzuki R., Erdenebaatar P., Davaakhuu G., <u>Hohjoh H.</u>, and <u>Yoshioka K.</u> (2020) Protective role of c-Jun NH2-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in curcumin-induced cancer cell death. <i>BBRC</i>, 522: 697-703.</p>	
	<p>【学会発表】 なし。</p>	
	<p>【その他特筆事項】 特になし。</p>	

研究課題		高解像度イメージング質量分析によるがん転移部位の可視化と診断への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	福島大学農学群食農学類・教授・平修
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・教授・矢野聖二
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・教授・矢野聖二
【研究目的】	<p>イメージング質量分析を用いてこれまで局在解析が困難であった薬剤のような低分子を抗体を用いずにダイレクトにその局在を視覚的に示す。これは、生体内でどのような動態を示すのか、疾患部位でどのような構造で作用するのか、また、その疾患部位周囲の正常組織へ与える影響（副作用）までを網羅的に解析できるため、基礎科学、実学ともに重要な意義を持つ。今年度は、Mobocertinib（以下、TAK-788）の体内動態を可視化した。</p>	
<p>【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)</p>	<p>1) TAK-788 の MS スペクトルを示す (図1)。イオン化を確認できたことで、本研究で用いる抗がん剤がイメージング質量分析が行えることを示す基礎データとなった。</p> <div style="display: flex; align-items: center;">  <div style="margin-left: 20px;"> <p>図1 TAK-788 の MS/MS スペクトル 親イオンとして、m/z 586.3 ([TAK-788+H]⁺) が検出され、フラグメントイオンの m/z72 も観察された。</p> </div> </div> <p>2) 脳と皮下に腫瘍をもつマウスを作成し、TAK-788 (mg) を単回経口投与 (50mg/kg) した後、5 後に皮膚組織と脳組織をイメージング質量分析測定にて、TAK-788 の局在を可視化した。今回は、脳組織での局在は明確に確認できなかったが、皮膚組織では高解像度に TAK-788 の局在を解析できた (図2)。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>H&E of skin section</p>  <p>Normal Tumor</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>1 mm</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <div style="text-align: center;"> <p>MS image</p>  <p>[M+H]⁺ 586.3</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Merged image</p>  </div> </div> <p>図2 TAK-788 は、皮下組織（正常・腫瘍部位）へ送達されていることが確認できている。高解像度イメージングにおいて詳細な局在場所を明らかにすることができた。今後、投与量、投与時間、他の臓器の解析を検討することで詳細な体内動態を解析できると考えられる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】なし	
	【学会発表】なし	

【その他特筆事項】

本研究結果から高解像度イメージング技術を高く評価され、JST A-step トライアウト事業に採択された。

研究課題		RNA 修飾によるがん抑制 miRNA 産生制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	高知大学・助教・樋口琢磨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	高知大学・准教授・坂本修士
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>機能性小分子 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) の中にはがん遺伝子を標的とするがん抑制型 miRNA が含まれており、がん抑制 miRNA の産生低下は発がんやがんの増悪化に寄与する。近年、RNA の立体構造を変化させる RNA 修飾の一つであるアデニンのメチル化(m⁶A)が、miRNA 生合成経路を促進させることが報告された。一方で、我々はこれまでに二本鎖 RNA 結合タンパク質複合体 NF90-NF45 が構造特異的に miRNA 初期転写産物に結合し、がん抑制 miRNA の産生を阻害することを見出している。本研究では、「NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA 生合成阻害」と「m⁶A 修飾」の関連を明らかにし、がん抑制 miRNA の産生調節を司る新規制御機構の解明を試みる。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々はこれまで、NF90-NF45 ががん抑制 miRNA である miR-7 および let-7a の初期転写産物に結合し、当該 miRNA の生合成を負に制御することを報告している。本研究では NF90-NF45 が産生阻害する miR-7、let-7a に着目し、培養細胞レベルにおいて当該 miRNA の生合成経路に m⁶A 修飾関連酵素が関与するか否かの検証を試みた。ヒト細胞における RNA の m⁶A 修飾酵素として、「METTL3」および「METTL14」が報告されているため、当該遺伝子をクローニングし過剰発現ベクターを構築した。得られたベクターを肝細胞がん由来の培養細胞 Huh7 に導入し、METTL3/14 の過剰発現を行ったところ、コントロール細胞と比較し、成熟 miRNA である mature miR-7 および mature let-7a 量が平均 2 倍以上増加することを見出した(図 1 A)。一方で、METTL3/14 の過剰発現により当該 miRNA の初期転写産物である pri-miR-7-1、pri-let-7a-1 の産生量に顕著な変化は認められなかった(図 1 B)。初期転写産物量が変化せず、成熟型 miRNA 量が増加していたことから、METTL3/14 は miR-7 および let-7a 遺伝子の転写活性化ではなく当該 miRNA の生合成経路を促進することが示唆された。</p> <p>NF90 および NF45 は、肝細胞がんを始めとする複数のがん組織で発現増加していることが知られている。また NF90-NF45 は、pri-miR-7-1 および pri-let-7a-1 に直接結合することで核内における miRNA 生合成経路を抑制する。このため、培養細胞において NF90-NF45 を過剰発現させることで pri-miR-7-1 および pri-let-7a-1 の蓄積を検出することができる(図 2 gray bar)。また、肝細胞がんにおいては、METTL14 の発現が低下しており、正常組織において METTL14 はがん抑制 miRNA の産生促進に寄与することが報告されている。そこで、NF90-NF45 による miRNA 生合成阻害機構に対する m⁶A 修飾酵素の影響を明らかにするため、NF90-NF45 と共に METTL14 の過剰発現を行うことで、pri-miR-7-1、pri-let-7a-1 の蓄積量に変化があるかを検討した。その結果、コント</p>	

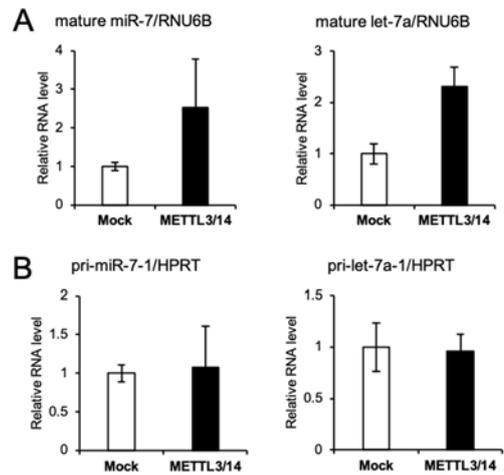


図1 METTL3/14の過剰発現によるmiR-7,let-7a 産生への影響の解析
Huh7細胞に対してMETTL3およびMETTL14を過剰発現させた際の miR-7、let-7a の mature miRNA量 (A) および pri-miRNA量 (B) をqRT-PCRにより測定した。

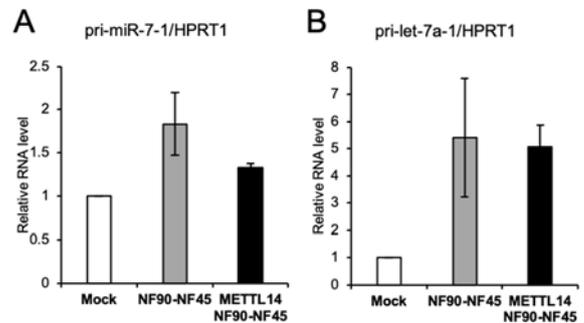


図2 NF90-NF45の過剰発現によるpri-miRNAの蓄積に対してMETTL14が与える影響の解析

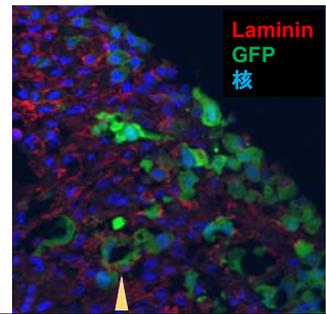
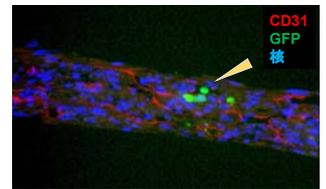
Huh7細胞に対してNF90-NF45およびMETTL14を過剰発現させた際の pri-miR-7-1 (A)、pri-let-7a-1 (B) の発現量をqRT-PCRにより測定した。

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>ロールと比較し NF90-NF45 の過剰発現細胞では pri-miR-7-1 量が平均で約 1.8 倍に増加するが、NF90-NF45 および METTL14 の共発現細胞においては NF90-NF45 の過剰発現細胞で認められた pri-miR-7-1 の蓄積が平均 30%抑制されることが見出された(図 2A)。一方で、pri-let-7a-1 量は NF90-NF45 の過剰発現によりコントロールと比較し平均で約 5 倍に増加するが、NF90-NF45 および METTL14 の共発現細胞においては pri-let-7a-1 の蓄積量に顕著な変化は見られなかった(図 2B)。以上の結果から、NF90-NF45 による pri-miR-7-1 に対するプロセッシング抑制作用に対して m⁶A 修飾酵素が阻害的に関与する可能性が示唆された。</p> <p>現在、リコンビナント METTL3 および METTL14 の作製を進めており、当該タンパク質が得られ次第、放射性同位体標識した pri-miR-7-1 プローブに対して <i>in vitro</i> 環境下でリコンビナント METTL3/14 により m⁶A 修飾を導入する。得られた m⁶A 導入 pri-miR-7-1 プローブと非メチル化 pri-miR-7-1 に対する NF90-NF45 の結合性の変化を検証する予定である。</p>
<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】 [和文論文]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 樋口琢磨, Rosemary Kiernan, 坂本修士 二本鎖 RNA 結合タンパク質が結合するマイクロ RNA 初期転写産物の構造的特徴の解析 電気泳動, 2021 (in press) <p>【学会発表】 [ワークショップ]</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ 樋口琢磨, 坂本修士 二本鎖 RNA 結合タンパク質が結合するマイクロ RNA 初期転写産物の構造的特徴の解析 第 70 回日本電気泳動学会シンポジウム、香川大学(オンライン開催)、2020 年 9 月 11 日 <p>【その他特筆事項】</p>

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

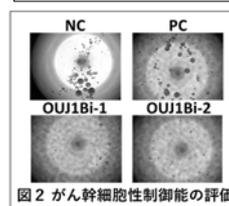
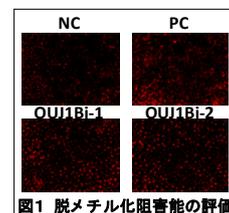
研究課題		生体外かん流培養を用いたがん転移モデルでの転移能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 関谷佐智子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>がん細胞の転移能は治療後の予後を左右する重要な性質であり、より臨床を反映するモデルが求められている。ヒトのがん転移を予測するためのモデルとしては、ヒトがん細胞の免疫不全動物への Xenograft モデル、またマウスなど同種での移植モデルなどが挙げられるが、異種組織での微小環境での挙動を解析するため、ヒト組織での挙動との隔たりが課題である。本研究では、組織工学を応用して、血管内皮細胞の網状構造を持つヒト3次元組織に対し、かん流培養系技術を応用、がん細胞を移植することでの転移モデル構築に着想し、検討を行っている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本年度はヒト肺間質を模倣する3次元組織を構築、松本研より提供された GFP 陽性肺腺がん細胞を共培養することで、転移実験を行なった。</p> <p>GFP 陽性肺腺がん細胞を共培養したヒト肺線維芽細胞と血管内皮細胞を含む3次元組織を作成、かん流培養行なったところ、構築される血管様管腔構造内に GFP 陽性がん細胞がしばしば確認された。また、一部 GFP 陽性肺腺がん細胞による管腔構造形成が確認され、ラミネン染色にて外部が覆われていることから基底膜を伴う生体内のような構造が再現された可能性が示唆された。</p> <p>しかしながら、かん流培養を継続し、流路内にはがん細胞が多く侵入、他方に設置した組織直下の流路に多数存在するにも関わらず、ポアサイズ 8μm 以下の多孔膜を介した場合は他方の組織内への GFP 陽性がん細胞侵入は確認できなかった。</p> <p>一方で、膜を介せずかん流培養を行なった場合には、数日で他方に設置した肺線維芽細胞の組織内に GFP 陽性がん細胞確認された。このため、他方の組織への侵入に必要な条件として集団として形状が 8μm を超える細胞群が流路に存在する必要性が示唆されている。今後は <i>in vivo</i> での転移能が明確な GFP 陽性がん細胞を用い、系の検証を進める予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	



研究課題		がん細胞と正常線維芽細胞との相互作用
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学・講師・昆 俊亮
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京理科大学・PD・田頭 香澄美
	所属・職名・氏名	東京理科大学・修士2年・中井 一貴
	所属・職名・氏名	東京理科大学・修士1年・Lin Hancheng
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>腫瘍微小環境では、がん細胞によって教育されたがん関連線維芽細胞 (CAF) や腫瘍関連マクロファージ (TAM) などの間質細胞が腫瘍進展に有利に作用する。しかしながら、がん細胞が間質組織に初めて出現したとき、がん細胞と正常間質細胞との間でどのような細胞間相互作用が生じるのか、その実態はよく分かっていない。これまでの予備実験の結果から、正常間質組織は本来抗腫瘍的な場であり、Ras 単独変異など比較的悪性度の低い変異細胞は排除されるのに対し、APC/Ras 二重変異など悪性度の高い細胞は腫瘍進展に有利な間質環境を構築することを示唆する結果を得ている。そこで本研究では、培養細胞を用いて、悪性度の異なるがん細胞と正常間質細胞、具体的には正常線維芽細胞との細胞間相互作用の様子を解析した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>悪性度の異なるがん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用を調べるため、ドキシサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を発現する細胞株 (RasV12 細胞) と APC 欠損と同様に Wnt シグナルを活性化する β-catenin の N 末欠損変異体を恒常的に発現し、かつドキシサイクリン依存的に活性化 Ras 変異を発現する細胞株を樹立した (β-cat ΔN/RasV12 細胞)。これらの変異細胞と正常線維芽細胞とを共培養し、各々の細胞の挙動を観察した結果、β-cat ΔN/RasV12 細胞は単独培養時と同程度に線維芽細胞と共培養した変異細胞は増殖した。一方、RasV12 細胞を線維芽細胞と共培養した場合、線維芽細胞に接した RasV12 細胞内で液泡が顕著に蓄積し、細胞肥大化が認められ、増殖率が低下した(図)。これらの結果より、正常線維芽細胞は Ras 単独変異細胞の増殖を抑制する機能を有することが示唆され、RasV12 変異に β-catenin の活性化変異を負荷すると、この抑制効果が干渉されることが分かった。現在、がん変異細胞と正常線維芽細胞との相互作用の実態をより詳細に解析中である。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>RasV12変異細胞</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>β-catΔN/RasV12変異細胞</p> </div> </div> <p>図. 正常線維芽細胞とがん変異細胞との共培養実験 RasV12 細胞と β-cat ΔN/RasV12 を単独培養、もしくは正常線維芽細胞と共培養したときの細胞サイズと細胞における液泡が占める面積を示す。正常線維芽細胞と共培養した RasV12 細胞は細胞のサイズが大きくなり、かつ細胞内で液泡が蓄積する(矢頭)。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞と腫瘍免疫をデュアルに標的化するエピゲノム創薬
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・特任助教・浅井歩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学・寄附講座講師・今野雅允
	所属・職名・氏名	大阪大学・教授・谷口正輝
	所属・職名・氏名	大阪大学・特任教授・石井秀始
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	がん幹細胞 (CSCs)は多分化能・造腫瘍能を有し、腫瘍の治療抵抗性・再発・転移に関わるため、がん治療の大きな障壁となっている。我々はこれまでに CSCs の制御に重要な分子として知られる JARID1B に対する創薬を進め、約500万化合物の低分子化合物ライブラリーから無細胞系、細胞系及びコンピュータによる <i>in silico</i> シミュレーションを組み合わせることで、高い JARID1B 阻害能を示し、構造活性相関がある複数の新規化合物 (JBIs)の同定に成功し、知財化してきた (特願 2019-86330)。本研究ではさらなる化合物の絞り込みを行い、動物実験に用いる有望な候補化合物を選定する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【研究内容】	<p>① 細胞内における H3K4 の脱メチル化阻害能の評価：膵がん細胞株 Panc-1 および乳がん細胞株 MCF-7 に対し、JBIs を処理後に Trimethyl-H3K4 を免疫染色することで細胞内における候補化合物の H3K4 の脱メチル化阻害能を評価した。</p> <p>② がん幹細胞性制御能の評価：がん幹細胞性の指標として用いられる Sphere formation assay の培地に JBIs を添加し、膵がん細胞株 Panc-1 および乳がん細胞株 MCF-7 で Sphere formation assay を行った際の Sphere 形成能を評価することで、候補化合物のがん幹細胞性制御能を評価した。</p>
	【成果】	<p>① 細胞内における H3K4 の脱メチル化阻害能の評価：JBIs を処理後に Trimethyl-H3K4 を免疫染色したところ、OUJ1Bi-1 及び OUJ1Bi-2 がネガティブコントロール(NC)およびポジティブコントロール(PC)よりも Trimethyl-H3K4 が増加しており、高い脱メチル化阻害能を示した (図1)。</p> <p>② がん幹細胞性制御能の評価：JBIs を添加した培地で Sphere formation assay を行ったところ、OUJ1Bi-1 及び OUJ1Bi-2 がネガティブコントロール(NC)およびポジティブコントロール(PC)よりも Sphere 形成を阻害しており、高いがん幹細胞性制御能を示した (図2)。</p>
【成果等】	【主な論文発表】	現在執筆中
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	PCT/JP2020/017607



研究課題		Bcl11aによるエンハンサー活性破綻を介したAML発症、悪性化機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・特任研究員・角南 義孝
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所発がん研究部・部長・中村卓郎
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	近年、転写活性化を制御するエンハンサー領域の発がんにおける役割が注目されており、がん特異的エンハンサーによる転写制御が、がん発症に関与している。zinc-finger 蛋白質をコードする転写抑制因子である Bcl11a は顆粒球分化に必須の転写因子である PU.1 の機能を阻害し、pseudokinase Trib1 と協調して AML を発症・増悪させる。本共同研究では、Bcl11a によるエンハンサー領域のヒストン修飾に着目して、Bcl11a が標的としているがん抑制遺伝子を同定することで、AML を発症・悪性化させる分子基盤の解明を目的とする	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>Trib1 高発現 AML 細胞株 (Tr1) および Trib1/Bcl11a 高発現 AML 細胞株 (TB-13) を用いて、ヒストン H3K27ac 抗体による ChIP-seq 解析を行い、スーパーエンハンサー解析を行った。TB-13 細胞は Tr1 細胞に比べて、<i>in vitro</i> での増殖が亢進し、<i>in vivo</i> では TB-13 細胞のみが AML を発症させることから、Bcl11a による標的遺伝子の転写不活化が AML 発症に寄与していることが示唆されている。Bcl11a の有無によるスーパーエンハンサーの変化を解析したところ複数領域で、スーパーエンハンサーが変動することが明らかとなった。さらに変動があったスーパーエンハンサーの近傍遺伝子の中で、Bcl11a 結合領域の近傍にあり、Bcl11a により発現が低下する遺伝子を検索したところ、Fcgr3 や Ncf4 といった顆粒球分化に関わるような遺伝子が含まれることが明らかとなった。これは Bcl11a が顆粒球分化を制御する PU.1 の機能阻害を介して AML を発症させるという、これまでの知見に矛盾しない結果であった。</p> <p>次に HDAC 阻害剤を Tr-1 細胞と TB-13 細胞に添加し、グローバルにアセチル化を亢進させた時のこれらの細胞の挙動を調べたが、TB-13 細胞特異的な細胞増殖能抑制効果は観察されなかった。一方、エピジェネティック制御因子である LSD1 の阻害剤を HDAC 阻害剤に併用したところ TB-13 細胞特異的な腫瘍抑制効果が観察された(図)。また、この HDAC/LSD1 阻害剤の AML 発症抑制効果は <i>in vivo</i> でも確認できた。以上から Bcl11a を介したエピジェネティックな変化を標的とすることで AML に対する新規治療法開発に繋がることが示唆された。</p>	
	<p>図：HDAC阻害剤とLSD1阻害剤の併用効果 (HDAC阻害剤：Pracinostat, LSD1阻害剤：GSK2879552)</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Yoshino S, Yokoyama T, Sunami Y, Nakamura T, et al. Trib1 promotes acute myeloid leukemia progression by modulating the transcriptional programs of Hoxa9. Blood. 2021. 137(1): 75-88</p> <p>【学会発表】 Sunami Y, Yoshino S, Yokoyama T, Nakamura T. Bcl11a promotes myeloid leukemogenesis by abrogating transcriptional activity of PU.1. 第79回日本癌学会学術総会. 2020年9月 角南義孝, 芳野聖子, 横山隆志, 中村卓郎. 「Bcl11a は PU.1 の転写活性阻害により AML の発症と悪性化を促進する」 先端モデル動物プラットフォーム 2020年度若手支援技術講習会. 2020年9月</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

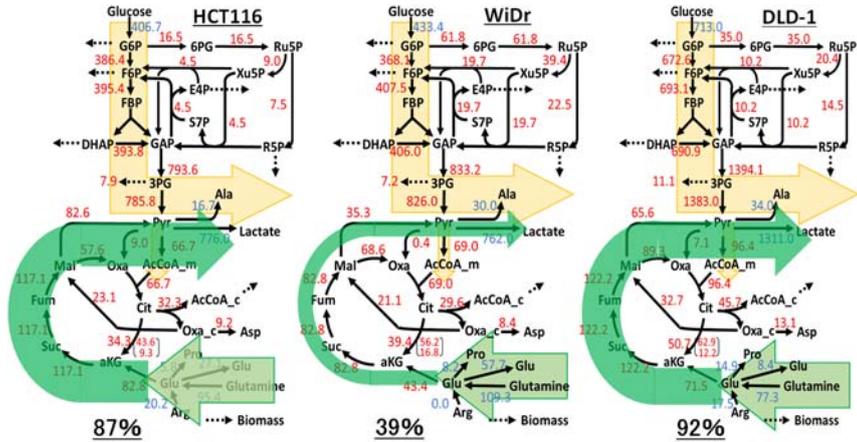
研究課題		乳がん細胞系譜転換における脂質代謝制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・助教・岡田宣宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・院生・辻本剛己
	所属・職名・氏名	岡山大学ヘルスシステム統合科学研究科・院生・植木ちひろ
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	乳がんは、ホルモン受容体陽性細胞 (Luminal) からホルモン受容体陰性細胞 (Basal) への細胞系譜転換により、内分泌療法抵抗性を獲得することが示唆されている。しかし、乳がんが悪性化進展過程で細胞系譜転換を起こすメカニズムは明らかになっていない。申請者はこれまでに、Luminal、Basal 細胞間で2種のスプライシングバリエーションの発現をスイッチさせている遺伝子 <i>NFYA</i> を同定している。また、 <i>NFYA</i> は脂肪酸合成酵素 (FASN) の転写を制御していることが報告されている。これらのことから、本研究では、 <i>NFYA</i> による脂質代謝制御と乳がん細胞系譜転換機構の関連を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><u>NFYA ノックアウト乳がん細胞の解析</u></p> <p>これまでに申請者らは、トリプルネガティブ乳がん細胞 (SUM159 細胞) において <i>NFYA</i> を欠損させると、細胞増殖、スフィア形成能、腫瘍形成能が低下することを明らかにしてきた。しかし、その制御メカニズムの詳細は不明であった。今回、培地中に脂質を添加し、細胞培養を行った結果、<i>NFYA</i> 欠損により低下した細胞増殖およびスフィア形成能を回復させることが確認できた。さらに、ブラックスアナライザーを用いて、細胞内における脂肪酸β酸化を測定したところ、<i>NFYA</i> 欠損細胞において脂肪酸β酸化が低下していることを明らかにした。これらの結果から、<i>NFYA</i> は脂質代謝を制御し、乳がん細胞における脂肪酸β酸化を介したエネルギー産生を促進させることで乳がんの悪性化に寄与していることが示唆された。</p> <p><u>NFYA による脂質代謝関連遺伝子発現制御</u></p> <p><i>NFYA</i> による脂質代謝制御メカニズムを明らかにするために、<i>NFYA</i> が発現制御を行なっている遺伝子の探索を行なった。その結果、<i>NFYA</i> 欠損細胞において、脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現が低下していることを明らかにした。さらに、脂肪酸β酸化の律速酵素として機能する CPT1A やアシル CoA 脱水素酵素 (ACADs) の発現も低下していることを確認した。また、培地中に脂質を添加し、細胞培養を行った結果、<i>NFYA</i> 欠損細胞において CPT1A やアシル CoA 脱水素酵素 (ACADs) の発現が回復することも確認できた。これらの結果は、<i>NFYA</i> が脂肪酸合成酵素 (FASN) の発現を制御することで、細胞内での脂肪酸合成および脂肪酸β酸化によるエネルギー産生を促進させていることを示唆している。</p> <p>今後、ChIP アッセイや <i>in vivo</i> マウスモデルを用いた解析を行うことで、より詳細なメカニズムの解明につなげる予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. Nobuhiro Okada, Goki Tsujimoto, Kiyotsugu Yoshikawa, Chiaki Takahashi. <i>NFYA</i> splicing variant regulates the malignant progression of breast cancer. 2020年10月. 第79回日本癌学会学術総会</p> <p>2. Goki Tsujimoto, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada. Antitumor effect of gluconeogenesis induced by <i>NFYA</i>. 2020年10月. 第79回日本癌学会学術総会</p> <p>3. Chihiro Ueki, Goki Tsujimoto, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Nobuhiro Okada. Impact of fatty acid synthesis regulated by <i>NFYA</i> on malignant progression of breast cancer. 2020年12月. 第43回日本分子生物学会年会</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞性制御に働くヘキソサミン代謝シグナルの解明と創薬
研究代表者	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学部・教授・板野 直樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学研究科・大学院生・米原 由喜
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・寺西 由紀子
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・岡田 凌
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	がん幹細胞は、抗がん剤や放射線治療に耐性を示し、治療後も残存してがん細胞を生み続けて再発を引き起こすとされ、がんの根治的治療を阻む最大の要因と考えられている。従って、今日の対がん戦略は、がん幹細胞をいかに制圧するか、という点にあることは言を俟たない。我々は、がん幹細胞性の制御機構として、ヒアルロン酸の過剰産生と“ヘキソサミン合成経路”を中心とした糖代謝のリプログラミングが深く関わっているとの新知見を得ている。そこで本研究では、ヘキソサミン合成経路の下流で働くヘキソサミン代謝シグナルががん幹細胞性の制御に働く機構の解明とその成果に基づく創薬を目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>がん幹細胞性の制御に働くヘキソサミン代謝シグナル伝達経路を特定するため、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞を用いて、ヘキソサミン代謝流束と連動して変化するタンパク質 O-GlcNAc 修飾およびリン酸化について解析した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、対照細胞に比べて、タンパク質の O-GlcNAc 修飾が亢進していることが明らかとなった。タンパク質の O-GlcNAc 修飾には、UDP-GlcNAc (N-アセチル-D-グルコサミン) が糖供与体としてその制御に重要である。そこで、UDP-GlcNAc の代謝流束や細胞内プールについて、HPLC 解析と質量分析を実施した。その結果、UDP-GlcNAc の代謝流束は、ヒアルロン酸産生増加と対応して著しく加速し、一方で、細胞内プールは低下していた。以上より、ヒアルロン酸産生が糖代謝に影響を及ぼしていることが明らかとなった。</p> <p>タンパク質の糖鎖修飾や O-GlcNAc 修飾は、受容体やシグナル分子の活性制御に重要である。そこで、がん幹細胞の自己複製との関連が示唆されている PI3K/ Akt シグナル伝達経路やその下流で制御される GSK3β に着目して、これらシグナル分子のリン酸化状態をウエスタンブロット法により解析した。その結果、ヘキソサミン合成経路の加速しているヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、Akt の Ser473 と Thr308 のリン酸化が亢進し、逆に、ヒアルロン酸欠損乳がん細胞では低下していることが明らかとなった。また、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、Akt のリン酸化と一致して、GSK3β のリン酸化が亢進していた。GSK3β のリン酸化は、β-カテニンの安定化と核移行を可能にする。そこで、β-カテニンの発現をウエスタンブロット法により解析した。その結果、GSK3β のリン酸化状態と一致して、β-カテニンの発現がヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞で上昇し、逆に、ヒアルロン酸欠損細胞で低下していることが明らかとなった。</p> <p>以上の結果より、ヒアルロン酸の産生増加とそれに伴うヘキソサミン合成経路の加速が、タンパク質の糖鎖修飾や O-GlcNAc 修飾に影響して、PI3K/Akt-GSK3β-β-カテニンシグナル伝達経路を活性化していることが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Kobayashi T, Chanmee T, and Itano N. Hyaluronan: Metabolism and Function. <i>Biomolecules</i> 10(11):1525 (2020).</p> <p>【学会発表】</p> <p>小林孝、Chatchadawalai Chokchaitaweek, 泉川友美、板野直樹 ヘキソサミン代謝によるがん幹細胞性の制御：ヒアルロン酸と O-GlcNAc シグナルの意義 第 52 回日本結合組織学会学術大会 (名古屋)</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		HGF-Met 系シグナルのアロステリック制御の分子機構に基づく活性制御剤の設計
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪府立大学大学院理学系研究科・教授・木下誉富
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	Met は HGF で活性化され、組織再生を強力に促進する。一方、過剰活性化 Met はガン治療の標的として認識される。Met の細胞外 HGF 受容ドメイン及び細胞内キナーゼドメイン (KD) で起こる活性制御機構は、構造知見に基づいて詳細に理解されている。一方、KD 両端領域に少なくとも 4 ヶ所が活性制御の分子スイッチと目されるが、これらの分子機構は未解明である。本研究では、これらリン酸化部位周辺の配列をもつペプチドについて、生化学実験及び X 線結晶構造解析を行い、KD 両端領域が司る未知の活性制御機構を包括的に解明する。本結果から、Met 活性制御薬創製に向けた、開発の優先順位及び分子基盤が顕在化する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>生化学実験及び X 線結晶構造解析を行い、KD の両端領域 (膜近傍領域 (JM) 及び C 末端領域 (CT)) の 4 ヶ所のリン酸化分子スイッチが関与する、Met のアロステリック活性制御機構を解明する。文献等から、JM 領域の 1 か所のセリン残基のリン酸化が活性抑制に、JM 及び CT にある 3 か所のチロシン残基のリン酸化は、いずれも活性を促進することが知られている。本研究では、これらの活性制御機構を効果的かつ選択的に制御する方法を見出し、低コストかつ高選択性 Met 亢進薬並びに阻害薬の創出を目指す。</p> <p>Met 細胞内全長 (JM-KD-CT) 及びキナーゼドメイン (KD) について、大腸菌系の大量調製及び高純度精製プロトコールを構築した。脱リン酸化酵素を共発現することで非リン酸化体 JM-KD-CT と KD を得た。リン酸化スイッチを中心とした 10 残基程度の配列をもつペプチドを設計した。リン酸化部位は非リン酸化体あるいはリン酸化体の合計 8 種のペプチドを準備した。</p> <p>まず、KD について活性測定法 (ELISA) を構築した。本アッセイ系では、スタウロsporin は濃度依存的に Met 活性を阻害し、IC₅₀ 値は 44nM と、すでに報告されているものと同等であった。この系を用いて、上述の 8 ペプチドについて活性制御能を調べたところ、いずれも高濃度で Met 活性を阻害することがわかった (IC₅₀:400~1500µM)。セリンスイッチについては、期待されたとおり、リン酸化により阻害が増強された。しかしながら、その増強度はわずかであった。一方、3 か所のチロシンスイッチについては、リン酸化により活性が増強されるはずであったが、逆に阻害が弱くなる傾向が観測された。いずれのペプチドも活性が見られるのは高濃度で、しかも非リン酸化体/リン酸化体の活性差がわずかであったので、これらリン酸化スイッチは非リン酸化体には作用が弱いと判断された。このことから、4 か所のリン酸化は、JM-KD-CT 体あるいはリン酸化体に備わるスイッチである可能性が高いと推察される。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>(1) An isoform-selective inhibitor of tropomyosin receptor kinase A behaves as molecular glue, N. Furuya, T. Momose, K. Katsuno, N. Fushimi, H. Muranaka, C. Handa, M. Sawa, T. Ozawa, T. Kinoshita*, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 30, 126775 (2020).</p> <p>(2) Structural basis for producing selective MAP2K7 inhibitors, Y. Murakawa, S. Valter, H. Barr, N. London, T. Kinoshita*, <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> 30, 127546 (2020).</p> <p>【学会発表】</p> <p>(1) Structural analyses of ERK2 kinase complexed with allosteric inhibitors, 吉田菜由、木下誉富、第 20 回日本蛋白質科学会年会 (2020 年)</p> <p>(2) 非 KIM 型 ERK2 アロステリック阻害剤の作用機構の解明、吉田菜由、森悠里花、木下誉富、日本結晶学会令和元年度年会 (2020 年)</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>本報告内容は、大阪府立大学・田中友輝君の卒業研究の一部として行われました。</p>	

研究課題		代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・教授・松田史生
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・教授・清水 浩
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・准教授・岡橋伸幸
	所属・職名・氏名	大阪大学・情報科学研究科・博士前期課程学生・丸山正晴
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>がん幹細胞仮説を代謝工学的あるいはシステム生物学的な観点からとらえ直すことによって、がん悪性進展制御法の新たなブレークスルーに繋げることを試みる。そのために、がん細胞系への適用可能な¹³C代謝フラックス解析法を確立し、中心炭素代謝フラックスを定量可能とすることを目指す。これを用いて、がん細胞の代謝経路の流れが様々なコンテキストにおいて、どのように変化するかを網羅的、定量的かつ動的に観察することを試みる。とくにがん幹細胞代謝をより、定量的、動的に把握するための解析研究をさらに進める。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまで、由来の異なる様々ながん培養細胞に¹³C代謝フラックス解析法を適用してきた。ここでは、消化器系のヒト大腸がん由来で悪性度が異なる HCT116, DLD-1, WiDr に注目した。これらの細胞株を[1-¹³C]グルコース含有透析血清培地で培養し、培地成分の濃度変化と24時間後の¹³C標識割合データから、専用ソフトウェア mfapy を用いて代謝フラックス分布を推定することに成功した(図)。得られた結果を比較したところ、取り込んだグルコースの多くを乳酸として排出しており、ワールブルク効果が共通して確認された(黄色矢印)。一方、3株間でグルタミン取り込みに対するグルタミン酸のTCAサイクル流入の割合が大きく異なっており、悪性度が高い HCT116, DLD-1 では0.87, 0.92と WiDr(0.39)より高くなった(緑色矢印)。これは、グルタミンを炭素源として利用できると、グルコースが不足状態にも適応可能となり、これが予後不良などの悪性化につながると推測された。今後はこれらの手法を幹細胞系へと展開していく。</p>  <p>図 ヒト大腸がん由来培養細胞 HCT116, DLD-1, WiDr の代謝フラックス分布</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Jindan Sheng, Susumu Kohno, Nobuhiro Okada, Nobuyuki Okahashi, Kana Teranishi, Fumio Matsuda, Hiroshi Shimizu, Paing Linn, Naoko Nagatani, Minako Yamamura, Kenichi Harada, Shin-ichi Horike, Hiroshi Inoue, Seiji Yano, Sharad Kumar, Shunsuke Kitajima, Itsuki Ajioka and Chiaki Takahashi (2021) Treatment of RB1-intact hepatocellular carcinoma with CDK4/6 inhibitor combination therapy. <i>Hepatology. In press</i> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 近藤佑哉 島知輝 岡橋伸幸 松田史生 質量分析を用いた大腸がん細胞株の¹³C代謝フラックス解析第68回質量分析総合討論会(大阪)2020/5/11 Fumio Matsuda, Kohsuke Maeda, Tomoki Shima, Yuya Kondo, Takeo Taniguchi, Futa Yatabe, Nobuyuki Okahashi. mfapy: A Python toolbox for isotope-based metabolic flux analysis using mass spectrometry <i>Metabolomics</i>2020/2020/10/28 <p>【その他特筆事項】 特になし</p>	

研究課題		腫瘍微小環境がもたらす悪性グリオーマ幹細胞のBNCT抵抗性の機序解明																																																																																																																																																																																																													
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・助教・近藤夏子																																																																																																																																																																																																													
研究分担者	所属・職名・氏名	秋田大学・教授・疋田正喜																																																																																																																																																																																																													
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・中田光俊																																																																																																																																																																																																													
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周																																																																																																																																																																																																													
【研究目的】	悪性神経膠腫は原発性脳腫瘍の中で最も多く、手術・放射線・化学療法を行っても生命予後が14.6 か月程度と極めて予後の悪いがんである。免疫治療も効果はみられていない。これまで我々は悪性神経膠腫に対する中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を行い、予後を延長してきた。しかし根治に至らず、再発の課題が残る。我々は、治療抵抗性であるグリオーマ幹細胞(glioma stem cell: GSC)が、BNCT後の再発に関与するものと考え、GSCへのBPAの取り込みについてMass Cytometer(Cytof)を用いて調べ、残存腫瘍と腫瘍微小環境との相互作用を明らかにする。																																																																																																																																																																																																														
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<table border="1"> <thead> <tr> <th>BPA*</th> <th>No. 1 Stem</th> <th>No. 1 DC</th> <th>No. 2 Stem</th> <th>No. 2 DC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Total</td> <td>56.0</td> <td>25.7</td> <td>35.8</td> <td>21.5</td> </tr> <tr> <td colspan="5">Differentiation*</td> </tr> <tr> <td>GFAP</td> <td>20.5</td> <td>18.4</td> <td>10.5</td> <td>8.6</td> </tr> <tr> <td>Tuji1</td> <td>21.2</td> <td>24.9</td> <td>11.5</td> <td>9.4</td> </tr> <tr> <td colspan="5">Stem*</td> </tr> <tr> <td>Oct3/4</td> <td>29.4</td> <td>9.3</td> <td>11.4</td> <td>4.9</td> </tr> <tr> <td>CD15</td> <td>19.2</td> <td>10.6</td> <td>11.0</td> <td>6.1</td> </tr> <tr> <td>CD171</td> <td>21.3</td> <td>13.9</td> <td>8.0</td> <td>4.2</td> </tr> <tr> <td>IL6Ra</td> <td>15.1</td> <td>6.4</td> <td>8.1</td> <td>4.1</td> </tr> <tr> <td>SOX2</td> <td>51.9</td> <td>15.2</td> <td>15.5</td> <td>2.9</td> </tr> <tr> <td>Nestin</td> <td>35.0</td> <td>8.3</td> <td>12.8</td> <td>3.6</td> </tr> <tr> <td>CD144</td> <td>11.6</td> <td>5.3</td> <td>6.8</td> <td>3.9</td> </tr> <tr> <td>Musashi-1</td> <td>28.1</td> <td>14.5</td> <td>19.0</td> <td>8.2</td> </tr> <tr> <td>CD133</td> <td>18.8</td> <td>9.0</td> <td>11.6</td> <td>5.8</td> </tr> <tr> <td>PDGFRα</td> <td>44.9</td> <td>15.6</td> <td>12.0</td> <td>4.6</td> </tr> <tr> <td>Notch2</td> <td>18.9</td> <td>12.1</td> <td>11.8</td> <td>4.6</td> </tr> <tr> <td>CD44</td> <td>19.1</td> <td>9.9</td> <td>11.6</td> <td>5.9</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>20.6</td> <td>6.9</td> <td>11.5</td> <td>5.0</td> </tr> <tr> <td>STAT3</td> <td>44.9</td> <td>17.2</td> <td>16.2</td> <td>1.1</td> </tr> <tr> <td>CXCR4</td> <td>18.7</td> <td>12.2</td> <td>13.5</td> <td>5.7</td> </tr> <tr> <td>c-Myc</td> <td>27.1</td> <td>11.6</td> <td>13.2</td> <td>5.7</td> </tr> <tr> <td>CD49f</td> <td>29.8</td> <td>18.7</td> <td>15.0</td> <td>2.0</td> </tr> </tbody> </table> <p>表 1 BPA+/GSC または DC marker+ の細胞の割合(%)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>CD98*</th> <th>No. 1 Stem</th> <th>No. 1 DC</th> <th>No. 2 Stem</th> <th>No. 2 DC</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td colspan="5">Stem*</td> </tr> <tr> <td>Oct3/4</td> <td>29.2</td> <td>13.3</td> <td>15.6</td> <td>3.6</td> </tr> <tr> <td>CD15</td> <td>19.3</td> <td>14.8</td> <td>16.1</td> <td>4.9</td> </tr> <tr> <td>CD171</td> <td>23.0</td> <td>22.0</td> <td>11.1</td> <td>3.1</td> </tr> <tr> <td>IL6Ra</td> <td>15.1</td> <td>9.1</td> <td>11.8</td> <td>3.5</td> </tr> <tr> <td>SOX2</td> <td>51.1</td> <td>20.4</td> <td>20.9</td> <td>2.2</td> </tr> <tr> <td>Nestin</td> <td>34.8</td> <td>11.8</td> <td>18.3</td> <td>3.0</td> </tr> <tr> <td>CD144</td> <td>11.7</td> <td>7.8</td> <td>9.3</td> <td>3.0</td> </tr> <tr> <td>Musashi-1</td> <td>27.5</td> <td>20.0</td> <td>21.4</td> <td>2.9</td> </tr> <tr> <td>CD133</td> <td>19.2</td> <td>12.9</td> <td>16.5</td> <td>4.7</td> </tr> <tr> <td>PDGFRα</td> <td>47.7</td> <td>23.2</td> <td>18.2</td> <td>3.9</td> </tr> <tr> <td>Notch2</td> <td>18.3</td> <td>16.6</td> <td>17.2</td> <td>3.5</td> </tr> <tr> <td>Nanog</td> <td>20.3</td> <td>9.5</td> <td>15.9</td> <td>3.8</td> </tr> <tr> <td>STAT3</td> <td>43.5</td> <td>23.7</td> <td>23.6</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>CXCR4</td> <td>21.1</td> <td>22.8</td> <td>19.7</td> <td>4.4</td> </tr> <tr> <td>c-Myc</td> <td>27.7</td> <td>17.5</td> <td>18.4</td> <td>4.6</td> </tr> <tr> <td>CD49f</td> <td>29.4</td> <td>26.5</td> <td>22.8</td> <td>1.6</td> </tr> </tbody> </table> <p>表 2. CD98+/GSC marker+ の細胞の割合(%)</p>	BPA*	No. 1 Stem	No. 1 DC	No. 2 Stem	No. 2 DC	Total	56.0	25.7	35.8	21.5	Differentiation*					GFAP	20.5	18.4	10.5	8.6	Tuji1	21.2	24.9	11.5	9.4	Stem*					Oct3/4	29.4	9.3	11.4	4.9	CD15	19.2	10.6	11.0	6.1	CD171	21.3	13.9	8.0	4.2	IL6Ra	15.1	6.4	8.1	4.1	SOX2	51.9	15.2	15.5	2.9	Nestin	35.0	8.3	12.8	3.6	CD144	11.6	5.3	6.8	3.9	Musashi-1	28.1	14.5	19.0	8.2	CD133	18.8	9.0	11.6	5.8	PDGFRα	44.9	15.6	12.0	4.6	Notch2	18.9	12.1	11.8	4.6	CD44	19.1	9.9	11.6	5.9	Nanog	20.6	6.9	11.5	5.0	STAT3	44.9	17.2	16.2	1.1	CXCR4	18.7	12.2	13.5	5.7	c-Myc	27.1	11.6	13.2	5.7	CD49f	29.8	18.7	15.0	2.0	CD98*	No. 1 Stem	No. 1 DC	No. 2 Stem	No. 2 DC	Stem*					Oct3/4	29.2	13.3	15.6	3.6	CD15	19.3	14.8	16.1	4.9	CD171	23.0	22.0	11.1	3.1	IL6Ra	15.1	9.1	11.8	3.5	SOX2	51.1	20.4	20.9	2.2	Nestin	34.8	11.8	18.3	3.0	CD144	11.7	7.8	9.3	3.0	Musashi-1	27.5	20.0	21.4	2.9	CD133	19.2	12.9	16.5	4.7	PDGFRα	47.7	23.2	18.2	3.9	Notch2	18.3	16.6	17.2	3.5	Nanog	20.3	9.5	15.9	3.8	STAT3	43.5	23.7	23.6	0.8	CXCR4	21.1	22.8	19.7	4.4	c-Myc	27.7	17.5	18.4	4.6	CD49f	29.4	26.5	22.8	1.6	<p>グリオブラストーマの患者から樹立し、無血清培地で培養を維持した2種のGSC(No. 1, No. 2)を用いた(Stem)。この細胞にウシ血清を最終濃度10%で添加し分化を誘導した(Differentiated cells: DC)。Stem、DCにそれぞれホウ素化合物Boronophenylalanine(BPA)を25 ppmで培地に添加し24時間暴露した。その後細胞を、金属標識した抗体(各種Stem marker、分化marker(Tuji-1, GFAP)、BPA取り込みmarker(BPA, CD98)、増殖marker(Ki-67))でラベルし、Cytofで分析した。CD98はBPAを取り込むトランスポーターLAT1と共役タンパク質で取り込みに寄与する。17種類のGSC marker+かつBPA+な細胞の割合(%)がDCに比してStemは2~15倍多く(表1)、同様にGSC marker+かつCD98+な細胞の割合(%)もStemの方が、DCよりも2~14倍多かった(表2)。またBPA取り込みに対する寄与について増殖とstemnessを比較したところ、BPA+な細胞の割合はKi-67+ or -の細胞群で数%しか差がないが、SOX2、PDGFRα、STAT3などのGSC marker+ or -の細胞群では10%~20%の差があった(発表論文参照)。増殖よりもstemnessの方がBPA取り込みに影響する可能性を示唆する。</p> <p>No. 1細胞を移植したマウス脳腫瘍モデルではBPAがSOX2、Nestin陽性の細胞に100%取り込まれるのに対して、GFAP陽性の細胞には40%程度しか取り込まれなかった。以上よりGSCがBNCTの標的になりうるということが明らかになった。</p> <p>現在BNCT後のマウス脳腫瘍モデルを用いて生存腫瘍細胞のstem markerとマクロファージの経時的変化を定量的に調べている。さらに空間的遺伝子解析を用いて、BNCT後再発に関わる微小環境からの因子を調べる予定である。</p>
BPA*	No. 1 Stem	No. 1 DC	No. 2 Stem	No. 2 DC																																																																																																																																																																																																											
Total	56.0	25.7	35.8	21.5																																																																																																																																																																																																											
Differentiation*																																																																																																																																																																																																															
GFAP	20.5	18.4	10.5	8.6																																																																																																																																																																																																											
Tuji1	21.2	24.9	11.5	9.4																																																																																																																																																																																																											
Stem*																																																																																																																																																																																																															
Oct3/4	29.4	9.3	11.4	4.9																																																																																																																																																																																																											
CD15	19.2	10.6	11.0	6.1																																																																																																																																																																																																											
CD171	21.3	13.9	8.0	4.2																																																																																																																																																																																																											
IL6Ra	15.1	6.4	8.1	4.1																																																																																																																																																																																																											
SOX2	51.9	15.2	15.5	2.9																																																																																																																																																																																																											
Nestin	35.0	8.3	12.8	3.6																																																																																																																																																																																																											
CD144	11.6	5.3	6.8	3.9																																																																																																																																																																																																											
Musashi-1	28.1	14.5	19.0	8.2																																																																																																																																																																																																											
CD133	18.8	9.0	11.6	5.8																																																																																																																																																																																																											
PDGFRα	44.9	15.6	12.0	4.6																																																																																																																																																																																																											
Notch2	18.9	12.1	11.8	4.6																																																																																																																																																																																																											
CD44	19.1	9.9	11.6	5.9																																																																																																																																																																																																											
Nanog	20.6	6.9	11.5	5.0																																																																																																																																																																																																											
STAT3	44.9	17.2	16.2	1.1																																																																																																																																																																																																											
CXCR4	18.7	12.2	13.5	5.7																																																																																																																																																																																																											
c-Myc	27.1	11.6	13.2	5.7																																																																																																																																																																																																											
CD49f	29.8	18.7	15.0	2.0																																																																																																																																																																																																											
CD98*	No. 1 Stem	No. 1 DC	No. 2 Stem	No. 2 DC																																																																																																																																																																																																											
Stem*																																																																																																																																																																																																															
Oct3/4	29.2	13.3	15.6	3.6																																																																																																																																																																																																											
CD15	19.3	14.8	16.1	4.9																																																																																																																																																																																																											
CD171	23.0	22.0	11.1	3.1																																																																																																																																																																																																											
IL6Ra	15.1	9.1	11.8	3.5																																																																																																																																																																																																											
SOX2	51.1	20.4	20.9	2.2																																																																																																																																																																																																											
Nestin	34.8	11.8	18.3	3.0																																																																																																																																																																																																											
CD144	11.7	7.8	9.3	3.0																																																																																																																																																																																																											
Musashi-1	27.5	20.0	21.4	2.9																																																																																																																																																																																																											
CD133	19.2	12.9	16.5	4.7																																																																																																																																																																																																											
PDGFRα	47.7	23.2	18.2	3.9																																																																																																																																																																																																											
Notch2	18.3	16.6	17.2	3.5																																																																																																																																																																																																											
Nanog	20.3	9.5	15.9	3.8																																																																																																																																																																																																											
STAT3	43.5	23.7	23.6	0.8																																																																																																																																																																																																											
CXCR4	21.1	22.8	19.7	4.4																																																																																																																																																																																																											
c-Myc	27.7	17.5	18.4	4.6																																																																																																																																																																																																											
CD49f	29.4	26.5	22.8	1.6																																																																																																																																																																																																											
【成果等】	<p>【主な論文発表】Kondo, N.; Hikida, M.; Nakada, M.; Sakurai, Y.; Hirata, E.; Takeno, S.; Suzuki, M. <i>Cancers</i> 2020, <i>12</i>, 3040. https://doi.org/10.3390/cancers12103040</p> <p>【学会発表】近藤夏子、疋田正喜、中田光俊、櫻井良憲、平田英周、鈴木実「脳腫瘍幹細胞によるBNCTホウ素薬剤Boronophenylalanineの取り込み」第79回日本脳神経外科学会学術集会 2020年10月</p> <p>【その他特筆事項】特になし。</p>																																																																																																																																																																																																														

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		消化器・難治がんのリボソーム生合成の新規メカニズム解明と診断, 治療法への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・北村浩一
研究分担者 (適宜, 行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・検査部部长・松下一之
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院薬学研究院・准教授・星野忠次
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・田中信子
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>PUF60 (poly (U)-binding splicing factor 60)のスプライシング変異体である FIR (FBP interacting repressor) は <i>c-myc</i> 遺伝子転写抑制因子として働く一方、FIR の転写抑制部位である exon2 を欠失した変異体 FIR Δ exon2 は様々な癌で過剰に発現し FIR を拮抗阻害している。がん細胞では FIR は SF3B1 とタンパク質相互作用することで、FIR のスプライシング変異 (FIR Δ exon2 の産生) が誘導されて c-Myc 発現増大が惹起され、細胞増殖、アポトーシスやリボソーム合成など様々なパスウェイに影響を与える。本研究は FIR や FIR Δ exon2 の増減で変化するヒストン修飾やスプライシング異常・リボソーム RNA の変化を調べ、細胞の分化や癌化における新規機能や新規ターゲット遺伝子を探索し、治療法の開発につなげる。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><u>FIR や FIR Δ exon2 のターゲット遺伝子の探索。</u> PUF60 のスプライシング変異体である FIR や FIR Δ exon2 は癌細胞で過剰に発現している。FIR や FIR Δ exon2 の増減によって遺伝子発現やエピジェネティクス変化を網羅的に調べるために HeLa 細胞株に FIR または FIR Δ exon2 を FLAG や siRNA を用いてトランスフェクションし、発現を増減させ、RNA シークエンスを行い、網羅的な解析を行った。 結果は FIR や FIR Δ exon2 の増減で発現変動した遺伝子は 10 遺伝子あった。GEO (Gene Expression Omnibus) データベースにある正常組織と比較した大腸癌、肝細胞癌、肺癌や胃癌組織の RNA シークエンス解析結果を利用し、これらの 10 遺伝子について調べたところ、同様な発現変動が見られた。これらの結果から 10 遺伝子は FIR や FIR Δ exon2 の新規ターゲット遺伝子となる可能性を示唆した。(論文投稿中のため、遺伝子名は明記なし。)</p> <p><u>FIR や FIR Δ exon2 の新規機能・パスウェイの探索。</u> 増減させて得られた遺伝子群の IPA (Ingenuity Pathway Analysis) を行ったところ、これらの遺伝子群は EIF (Eukaryotic Initiation Factor) signaling や mTOR signaling に関与していることが示唆され、これらの中にはリボソーム生合成に関与する遺伝子が含まれていた。今後はこれらの signaling に関与するリボソームに着目し、治療法の開発につなげていきたい。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	論文投稿準備中 (再投稿)。
	【学会発表】	なし (令和3年度は検査系学会や癌学会等で発表を予定)
	【その他特筆事項】	令和3年度の科学研究費基盤 C に本研究の一部が採択された (研究協力者)。

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		非乳頭部十二指腸腫瘍の発がんメカニズムの解明と内視鏡治療への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学医療人育成センター生物学・教授・佐々木泰史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田武
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・大学院生・太田亮介
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>非乳頭部十二指腸腫瘍は希少疾患であるため、発がんの分子機構は充分解明されていない。本研究では、非乳頭部十二指腸腺腫・早期がんの遺伝子変異・メチル化の解析により、十二指腸発がんの分子機構を解明することである。さらに、同定されたゲノム・エピゲノム変化と免疫組織化学を含めた病理組織学的所見、NBI 拡大観察を含めた内視鏡所見との統合解析により、腺腫からがんへの進展を予測する内視鏡診断体系を確立する。遺伝子変化がより蓄積し、発がんポテンシャルが高い非乳頭部十二指腸腫瘍の特定を行い、NBI 拡大観察を含む内視鏡所見にフィードバックすることによって、発がん可能性が高く、優先して治療すべき十二指腸腫瘍を予測することが可能となる。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>(研究方法) 小腸進行癌や十二指腸腫瘍などで従来報告のある 75 のがん関連遺伝子の変異、コピー数異常が解析可能な、Ion Torrent NGS シークエンサー用のカスタムパネル (3663 アンプリコン、パネルサイズ 366 kb) を独自に構築した。十二指腸腺腫・粘膜内癌 107 病変 (小腸型 100 例、胃型 7 例) について、ホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) 切片からの DNA を抽出し、このシステムを用いて、遺伝子変異、コピー数異常解析を行った。また、同サンプルで CIMP の有無の検討、がん関連遺伝子 p16, MLH1 のメチル化解析も行った。</p> <p>(研究結果) CIMP 陽性は腺腫より粘膜内癌で高かった。変異解析では、平均カバレッジ深度 2461 X のシークエンスを行い、97.2%の領域がカバレッジ 100 以上であった。サンプルあたりの体細胞変異数は平均 1.9 であった。遺伝子変異は APC (55%), KRAS (13%), LRP1B (10%), GNAS (8%), ERBB3 (7%), RNF43 (6%) の順に高頻度であった。また、WNT シグナル経路の異常を示す、β カテニンの核内陽性率は 85%であった。十二指腸腫瘍は粘液形質によって小腸型腫瘍と胃型腫瘍に分類されるが、部位や形態など臨床病理学的特徴が異なっていた。加えて、小腸型腫瘍で β カテニンの陽性率が高い一方で、胃型腫瘍では KRAS, GNAS 変異が多く、両者は異なる発癌経路に属している可能性が示された。腸型では APC 遺伝子変異を 65%に認め、従来の小腸進行癌において報告された変異頻度 (11-27%) と比較して高頻度であった。APC 変異の頻度は、粘膜内癌に比べ十二指腸腺腫で高率であった。また、APC 遺伝子変異の分布は、低異型度腺腫と高異型度腺腫の間では類似していたが、粘膜内癌における変異は変異集積部位以外のものが多くみられた。以上の結果より、腺腫から粘膜内癌に到る病変の頻度は低く、adenoma-carcinoma sequence の関与は限定的であることが示唆された。今後は解析症例を増やすとともに、腺腫から粘膜内癌へ進展するためのドライバー変異の同定のため、一部の症例の全エクソン解析を予定している。さらに、NBI 拡大観察を含む内視鏡所見との相関を詳細に解析し、内視鏡診断・治療への応用を目指していきたい (論文発表 9)。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Iwaya T, Endo F, Takahashi F, Tokino T, <u>Sasaki Y</u>, Nishizuka SS, Collaborators. Frequent tumor burden monitoring of esophageal squamous cell carcinoma with circulating tumor DNA using individually designed digital PCR. Gastroenterology. 160: 463-465, 2021. Idogawa M, Hida T, Tanaka T, Ohira N, Tange S, <u>Sasaki Y</u>, Uhara H, Masumori N, Tokino T, Natori 	

H. Renal angiomyolipoma (AML) harboring a missense mutation of TSC2 with copy-neutral loss of heterozygosity (CN-LOH). **Cancer Biol Ther.** 21: 315-319, 2020.

3. Suzuki N, Idogawa M, Tange S, Ohashi T, Sasaki Y, Nakase H, Tokino T. p53-induced ARVCF modulates the splicing landscape and supports the tumor suppressive function of p53. **Oncogene.** 39: 2202-2211, 2020.

4. Fujita Y, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Kitago M, Yagi H, Abe Y, Shinoda M, Tokino T, Sakamoto M, Kitagawa Y. Pathogenesis of multiple pancreatic cancers involves multicentric carcinogenesis and intrapancreatic metastasis. **Cancer Sci.** 111: 739-48, 2020.

5. Ogi K, Kobayashi J, Nakagaki T, Okamoto J, Koike K, Hirokawa N, Someya M, Sakamoto H, Takada K, Tokino T, Sasaki Y, Hiratsuka H, Miyazaki A. Chemotherapy after progression on nivolumab is essential for responders with genetic alterations of driver gene: Review of two recurrent/metastatic oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncol.** 102: 104509, 2020.

6. Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Ota R, Suzuki H, Yamamoto E, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Inagaki S, Ebi M, Kato H, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Tokino T, Minamoto T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in the Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. **PLoS One.** 15: e0229262, 2020.

7. Hida T, Idogawa M, Okura M, Sugita S, Sugawara T, Sasaki Y, Tokino T, Yamashita T, Uhara H. Genetic analyses of mosaic neurofibromatosis type 1 with giant cafe-au-lait macule, plexiform neurofibroma and multiple melanocytic nevi. **J Dermatol.** 47: 658-62, 2020.

8. Yokose T, Kitago M, Matsuda S, Sasaki Y, Masugi Y, Nakamura Y, Shinoda M, Yagi H, Abe Y, Oshima G, Hori S, Fujita Y, Nakano Y, Endo Y, Abe K, Tokino T, Kitagawa Y. Combination of KRAS and SMAD4 mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissues as a biomarker for pancreatic cancer. **Cancer Sci.** 111: 2174-82, 2020.

9. Ota R, Sawada T, Tsuyama S, Sasaki Y, Suzuki H, Kaizaki Y, Hasatani K, Yamamoto E, Nakanishi H, Inagaki S, Tsuji S, Yoshida N, Doyama H, Minato H, Nakamura K, Kasashima S, Kubota E, Kataoka H, Tokino T, Yao T, Minamoto T. Integrated genetic and epigenetic analysis of cancer-related genes in non-ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas. **J Pathol.** 252: 330-42, 2020.

10. Yoshimoto Y, Sasaki Y, Murata K, Noda S, Miyasaka Y, Hamamoto J, Furuya M, Hirato J, Suzuki Y, Ohno T, Tokino T, Oike T, Nakano T. Mutation profiling of uterine cervical cancer patients treated with definitive radiotherapy. **Gynecol Oncol.** 159: 546-553, 2020.

11. Udagawa C, Sasaki Y, Tanizawa Y, Suemizu H, Ohnishi Y, Nakamura Y, Tokino T, Zembutsu H. Whole-exome sequencing of 79 xenografts as a potential approach for the identification of genetic variants associated with sensitivity to cytotoxic anticancer drugs. **PLoS One.** 15: e0239614, 2020.

12. Ishiguro K, Sasaki Y, Takagi Y, Niinuma T, Suzuki H, Tokino T, Hayashi T, Takahashi T, Igarashi T, Matsuno Y. Aggressive variant of splenic marginal zone lymphoma characterized using a cancer panel test and treated with rituximab-containing chemotherapy: A case report. **Medicine (Baltimore).** 99: e21938, 2020.

【学会発表】
ありません

【その他特筆事項】

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

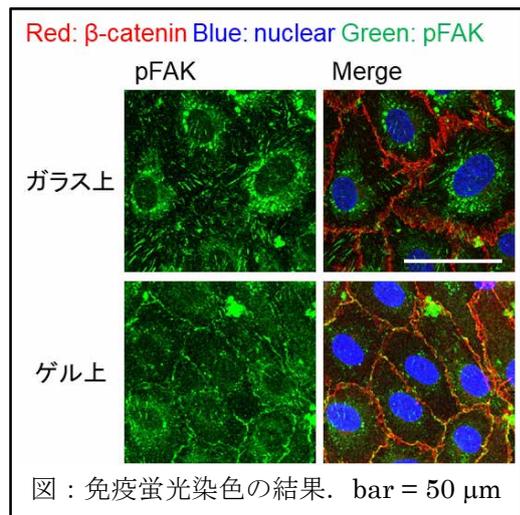
研究課題		遺伝子編集技術を応用した薬物誘発性肝毒性の新規バイオマーカー探索
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授・荒川大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	<p>薬物誘発性肝毒性は、医薬品の開発中止や上市後の撤退の主要な要因である一方で、現在、ヒトでの発症を高い精度で予測可能な評価系が存在しない。その主な理由として、薬物（または候補化合物）の肝毒性発症の原因タンパク質の多くが、特定されていないことが挙げられる。そのため、薬物の肝毒性発症に関わる原因分子を特定し、肝毒性のバイオマーカーを見出すことで、薬物の臨床試験や上市後の安全性を大きく向上させることが期待される。今年度においては、薬物の肝細胞毒性に重要な役割を果たすグルクロン酸抱合過程に着目し、小胞体膜に局在するトランスポーターの薬物代謝における役割について調べた。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>グルクロン酸抱合反応における小胞体膜トランスポーターの寄与を調べるため、マウス初代培養肝細胞において、薬物のグルクロン酸抱合活性を評価した。有機アニオン系薬物ブメタニド添加後のグルクロン酸抱合体生成量は時間依存的に増加した。また抱合体生成量は、同じく UGT の基質となる有機アニオン系化合物ナテグリニドによって低下した。一方、マウス肝ミクロソームに膜透過促進試薬を添加した系では、ナテグリニドはブメタニドのグルクロン酸抱合体生成量に影響を与えなかった。ブメタニドの肝細胞内への取り込みは、ナテグリニドによって阻害されたものの、その阻害親和性は抱合反応のそれよりも低かった。したがって、ブメタニドのグルクロン酸抱合反応に、小胞体膜に発現するナテグリニド感受性のトランスポーターが関与することが示唆された。ブメタニドのグルクロン酸抱合における小胞体トランスポーターの関与を裏付けるため、ブメタニドを輸送することが知られている OAT2 及び NPT4 の siRNA をヒト肝がん HepaRG 細胞に導入した。その結果、OAT2 のノックダウンは、ブメタニドの細胞内取り込みを低下させなかった一方、グルクロン酸抱合体生成量を減少させた。このため、OAT2 が小胞体内へのブメタニド取り込みに関わることが示された。また、myc タグを付加した OAT2 を HEK293 細胞に導入したところ、OAT2 は小胞体マーカーである calnexin と共局在し、OAT2 が小胞体に局在することが示された。さらに、OAT2 ノックアウトマウスを構築し、初代肝細胞におけるブメタニドのグルクロン酸抱合反応を評価したところ、野生型と比較し反応効率が低下した。以上の結果から、OAT2 が肝細胞の小胞体に局在し、ブメタニドの小胞体への取り込みに関わることで、グルクロン酸抱合体活性に影響を与えることが示唆された。現在、OAT2 が有機アニオン系化合物の小胞体膜輸送に関わるかを明らかにするとともに、薬物誘発毒性との関係を調べている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		MET を標的とする小分子薬剤・タンパク質複合体の構築
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・特任助教・寺坂尚紘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・博士課程学生・小松大和
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>ドラッグデリバリーは、特定の細胞に選択的に薬剤を運搬することで薬剤の効果を最大限にしつつ副作用を最小限に抑える技術である。先行研究において、60 量体カプシド構造形成タンパク質である細菌のルマジン合成酵素 (AaLS) を改変し、内部にタンパク質・RNA・小分子を内包させることに成功している。またカプシド表面には様々な化学修飾や遺伝子改変によるペプチドの提示が可能であり、AaLS はドラッグデリバリー分子として有望である。本研究では抗 MET 環状ペプチドアプタマー修飾カプシドに小分子薬剤を内包することで、MET 過剰発現がん細胞選択的に薬剤効果を発揮することを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年までの研究において、3 種類の MET 結合環状ペプチド (aMD4, aMD5, aML5) を Lasso-grafting によって導入可能な AaLS の部位を検討し、ペプチドが導入可能な部位を同定した。環状ペプチドを導入した改変 AaLS を透過型電子顕微鏡で観察した結果、野生型 AaLS と同様に 60 量体を形成することが示された。発現・精製した改変 AaLS を MET 発現培養細胞に加え、MET のダイマー化を促進するかを金沢大学がん進展制御研究所腫瘍動態制御研究分野の松本先生のグループに評価して頂いた結果、aMD4 を提示したカプシドのみが MET のダイマー化を促進することが判明した。蛍光分子 (フルオレセイン) で修飾した aMD4 提示カプシドを MET 発現細胞に加え、蛍光顕微鏡観察した所、aMD4 提示カプシドはエンドサイトーシスされていることが判明した。</p> <p>本年の研究では、環状ペプチドを提示した AaLS カプシド内に、酸性条件下で切断される薬剤 (Aldoxorubicin) を内包させる系を確立した。そして、薬剤内包改変 AaLS を用いて MET 発現細胞選択的に薬剤を運搬することを試みた。しかし、薬剤を内包したペプチドアプタマー修飾カプシドを用いたところ、MET 発現依存的な細胞死は観察されなかった。これは AaLS がエンドサイトーシスされた後にリソゾームに移行する効率が低いことが原因と考えられる。今後は薬剤の種類や内包方法、薬剤とカプシドの間のリンカー配列、カプシドの大きさなどをさらに最適化する計画である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		メカノバイオロジーから迫るがん転移機構
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・石原 誠一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	<p>がんの死因の90%以上は転移によるものといわれている。興味深いことに、由来の異なるがんであっても共通した特定の臓器に転移することが知られている。しかしながら、なぜ由来の異なるがんが共通した特定の臓器に転移するのかは明らかではない。申請者は高転移性臓器には未知の共通した性質が存在すると考え、高転移性臓器では血管周囲の組織の硬さが共通していると仮定した。そしてその硬さに応答した血管内皮細胞が特異的な分子を発現させ、がん細胞の転移を促進させると考えた。本研究ではこれらの仮説を証明し、転移に寄与する分子を同定し、それをターゲットとした新規治療法を提案することを目指した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>まず、血管内皮細胞を硬さの異なる基質上で培養し、がん細胞の転移能を評価する実験系の立ち上げを目指した。血管内皮細胞としてヒト臍帯静脈由来内皮細胞 (HUVEC) を用いた。HUVEC を細胞培養用ディッシュに播種してシートをつくらせたところ、生体内ではみられないような異常な運動がみられたため、まずはこのような運動を抑制するための培養法を確立した。様々な培養法を検討した結果、コラーゲンとマトリゲルを混合した基質上に HUVEC を播種しコンフルエント状態から9日以上培養することによって、運動が抑制された HUVEC のシート (<i>In vitro</i> 血管モデル) を作成することに成功した (未発表)。</p> <p>そこで次に、硬さの異なる基質上で <i>In vitro</i> 血管モデルを作成することを目指した。そのためにコラーゲンとマトリゲルをコートしたガラスと、コラーゲンとマトリゲルを含んだゲルを用意した。その上に HUVEC を播種し10日間培養した。Y397 がリン酸化された Focal Adhesion Kinase (pFAK) は硬い基質上の細胞で斑点状の局在を示すことが知られている。そこで上記のガラス上とゲル上に HUVEC を播種し、<i>In vitro</i> 血管モデルを作成したのちに pFAK の局在を免疫蛍光染色で観察した。その結果、ガラス上の HUVEC では pFAK は斑点状に、ゲル上の HUVEC では pFAK は主に細胞-細胞間に局在していることがわかった (未発表, 図)。このことから、上記のガラスを硬い基質として、ゲルを軟らかい基質として <i>In vitro</i> 血管モデルに用いることができることを確認した。</p> <p>がん細胞は転移巣をつくる際に転移先臓器の血管に潜り込んで増殖することが知られている。そこで今後は上記の通り確立した実験系を用いて硬さの異なる基質上で <i>In vitro</i> 血管モデルを作成し、その上にがん細胞を播種してがん細胞が <i>In vitro</i> 血管モデルに潜り込む様子を観察する。その様子を観察するために、HUVEC とがん細胞を別々の色の蛍光タンパク質で標識する。これまでに赤色蛍光タンパク質で標識した HUVEC と、緑色蛍光タンパク質で標識した肺がん細胞株 H1299 細胞を樹立することに成功している。今後は上記の実験系とこれらの細胞を用いることで、基質の硬さが転移に与える影響を検証する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	<p>石原 誠一郎、芳賀 永： “メカノバイオロジーから紐解くがん進行メカニズム” 第4回乳がん・転移若手研究会 (2020年9月5日 Web開催) <口頭発表></p>
	【その他特筆事項】	

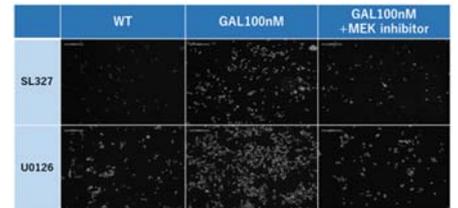
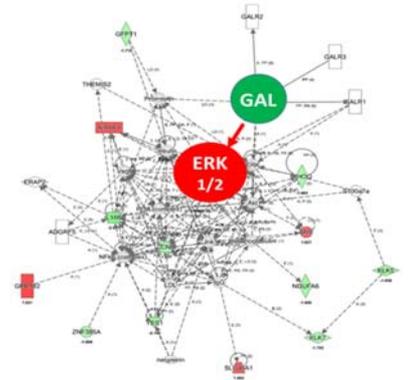


令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん由来の液性因子による個体生理変容のメカニズムに関する統合的研究
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学 ウイルス・再生医科学研究所 特定准教授 河岡慎平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>本研究の目的は、がんが分泌する液性因子（ケモカインや炎症性サイトカイン）による個体生理変容のメカニズムを、がん微小環境とマクロ環境の相互作用という観点から明らかにすることである。がんは、ケモカインや炎症性サイトカインなどの液性因子を分泌することで、個体にさまざまな変容をひきおこす。がん微小環境の形成や、マクロな代謝障害であるがん悪液質がその代表例である。これらの変容の全体像を明らかにし、変容を適切に制御することができれば、個体生理の正常化に基づいた新しいがん医療の発展へと繋がる可能性がある。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>向田教授との共同研究において議論を重ねた結果、がん悪液質に関わる有望な因子としてインターロイキン10 (IL-10) をリストアップした。IL-10は抗炎症性サイトカインであり、マウス Colon26 大腸がんモデルにおいて、がん悪液質の病態が変化する(抑制方向)ことが報告されている (Fujiki, Mukaida et al., <i>Cancer Res.</i>, 1997)。この報告は、免疫系の活性化・抑制とがん悪液質の間に何らかの関係があることを示唆している。</p> <p>向田教授より分与いただいた Colon26-IL-10 およびその対照群となる Colon26-empty vector をそれぞれマウスに移植し、マウスの表現型を再度観察するところから実験を開始した。Colon26の移植では脾臓が肥大する。これは、免疫系の過剰な活性化を示唆するデータである。Colon26-IL-10を移植したマウスでは脾臓の肥大の程度が低い傾向が観察され、IL-10による免疫の抑制が示唆された。一方、肝臓、白色脂肪細胞、腎臓といった主要な臓器の外見・重量などを比較したところ、大きな差は認められなかった。</p> <p>以上により、分与いただいた細胞株の基本的な特徴づけを完了したと考えている。現在、採取した宿主臓器に対する遺伝子発現解析や代謝物解析などを実施・検討している。また、IL-10の過剰発現ががん細胞における遺伝子発現に与える影響についても調べる必要があると考えている。このユニークな材料を用いて、がん由来のサイトカインが宿主の病態生理にどのような影響を与えるのか、そのメカニズムを明らかにしていきたい。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>小西理予、河岡慎平 (2020). エンハンサーを利用した細胞の制御 実験医学 38, 17:100-106.</p> <p>北條広朗、水野林、河岡慎平 (2020). マルチオミクスを活用したがん悪液質の理解 実験医学 38, 8:1300-1305.</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ガラニンによる大腸がん細胞浸潤促進のシグナル伝達機構
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・田代康介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	我々は、術後再発した患者腫瘍と予後良好な患者腫瘍の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、神経ペプチド galanin (GAL)が再発群において高発現していることを見出し、さらに、大腸がん由来細胞株 HCT116 を用いた浸潤アッセイにおいて、GAL は浸潤に関与することを明らかにしている。本研究では、ヒト大腸がん由来細胞の浸潤・転移における GAL の機能、特に、GALR を介したシグナル伝達系の解明及び GAL によって制御される下流遺伝子の特定も含めた浸潤の詳細な経路を明らかにすることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>昨年度までの研究により、ヒト大腸癌由来細胞株 HCT116 において、GAL 遺伝子を SiRNA 導入によってノックダウン (KD) することにより HCT116 細胞株の浸潤能は低下することから GAL の浸潤への関与を明らかにした。さらに、GAL 遺伝子をノックダウン (KD) させた細胞、および、GAL タンパク質添加によって刺激した細胞における遺伝子発現状態を DNA マイクロアレイ (Agilent 社) によって網羅的に解析し発現が変動した遺伝子群の機能分類から、GAL のシグナルには、ERK 経路が関与していることが示唆された。</p> <p>本年度は、まず、Gal シグナルにおける ERK 経路に関与を明らかにするために、ERK 経路阻害解析を行い、Gal シグナルには ERK 経路が関与することを明らかにした。さらに、CRC 細胞株である DLD-1 細胞を用いた同様の解析においても、Gal 遺伝子の浸潤への関与、そのシグナルへの ERK 経路の関与を明らかにした。</p> <p>次に、Gal レセプターである Gal-R1 及び Gal-R2 の浸潤への関与を検討した結果、予想に反して、R1 および R2 は浸潤抑制に機能することを示すデータを得た。また、R1 および R2 の発現量は悪性がん細胞において低下していることが明らかとなった。これらは、Gal-R1 および R2 は、がん細胞の浸潤を抑制する分子であるが、これらの発現量低下が浸潤を促進することを示唆している。</p> <p>これらのデータは、非常に興味深いものであり、R1 および R2 分子のがん細胞に与える影響に関しては、今後の研究課題と考えている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		染色体転座陽性肉腫における PI3K 阻害剤のクロマチンリモデリング作用の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	(公財)がん研究会・特任研究員・礪山 翔
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	(公財)がん研究会・部長・旦 慎吾
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	肉腫は発生頻度が希少であることなどの理由から治療薬の開発が遅れており、新たな治療薬の開発が求められている。当研究室で見出された PI3K 阻害剤 ZSTK474 は、固形がんを対象にした第 I 相臨床試験の結果から、肉腫に対する有効性が示唆されている。われわれはこれまでに、肉腫サブタイプ 19 種計 34 細胞株に対する ZSTK474 の抗腫瘍活性を検討し本剤がユース肉腫や滑膜肉腫などの染色体転座陽性肉腫サブタイプ由来細胞株に選択的にアポトーシスを誘導することを示してきた。そこで本研究では、PI3K 阻害剤が染色体転座陽性肉腫に選択的にアポトーシスを誘導する分子メカニズムを明らかにすることを目的として以下の研究を進めた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>1. <u>染色体転座陽性肉腫において生存シグナルとして機能している PI3K アイソフォームの解析</u></p> <p>がんで主に機能している class1 PI3K は α, β, δ, γ の 4 つのアイソフォームからなり、癌腫由来の細胞では主に α と β が、血液癌由来の細胞では主に δ と γ が機能していることが知られている。染色体転座陽性肉腫由来の細胞において生存シグナルとして機能している PI3K アイソフォームを検討した結果、PI3K α が中心的な役割を果たし、それに加えて PI3K β と δ が協調的に機能していることが明らかとなった。</p> <p>2. <u>PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導に寄与する BCL-2 ファミリー分子の検討</u></p> <p>PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導の際、染色体転座陽性肉腫由来の細胞ではミトコンドリア外膜の透過性亢進によるミトコンドリア膜電位の消失が認められた。そこで、ミトコンドリア外膜の透過性を制御している BCL-2 ファミリー分子について検討したところ、PI3K 阻害剤処理によってアポトーシスを促進する PUMA および BIM の発現誘導が認められ、さらにそれらのノックダウンによってアポトーシスが抑制されたことから、PI3K 阻害剤によるアポトーシスに PUMA、BIM の発現誘導が寄与していることが明らかとなった。</p> <p>3. <u>PI3K 阻害剤によるクロマチンリモデリング活性への作用の解析</u></p> <p>染色体転座陽性肉腫サブタイプで認められる融合遺伝子は、クロマチンリモデリングによる幅広い遺伝子のエピジェネティックな発現制御によって細胞のがん化や生存を促進することが知られている。そこで本研究では、PI3K 阻害剤が融合遺伝子によるエピジェネティックな遺伝子発現機構に影響を与え、それに起因してアポトーシスが誘導されると仮説を立てた。それを実証するために、染色体転座陽性肉腫細胞株の各融合遺伝子をノックダウンした細胞と ZSTK474 などの PI3K 阻害剤を処理した細胞でゲノムワイドなヒストンの修飾状態の変化を ChIP-seq により解析・比較し、クロマチンリモデリング活性と PI3K 阻害剤によるアポトーシスの関連を網羅的に解析することとした。現在、ChIP-seq データを取得し、その解析を進めている。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の肉腫細胞に対する細胞死誘導作用の解析 第 24 回日本がん分子標的治療学会学術集会 徳島市 2020 玉城尚美、礪山翔、旦慎吾 pan-PI3K 阻害剤 ZSTK474 の滑膜肉腫に対するアポトーシス誘導機構の解析 第 24 回日本がん分子標的治療学会学術集会 徳島市 2020 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の染色体転座陽性肉腫に対する細胞死誘導作用の解析 第 79 回日本癌学会学術総会 広島市 2020
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		パイロトーシス阻害剤の開発と作用機序解析
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・専任研究員・圃圃孝介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	<p>パイロトーシスはカスパーゼ1、4、5、11などによって誘導される炎症誘導性のプログラム細胞死であり、細菌などに感染したマクロファージの細胞死様式として見出された。しかしながら最近がん細胞でも誘導されることが明らかとなった。さらに皮膚がんなど一部のがん組織ではパイロトーシスががん微小環境の形成に関与し、がんの増殖・浸潤・転移に寄与することも報告されている。そこで本研究では、抗がん剤リードとなりうるパイロトーシスの阻害剤を開発し、その作用機序解析を行うことを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでの検討で、我々は NLRC4 の CARD ドメインと NOD2 のリガンド結合ドメイン・オリゴマー形成ドメインを融合させた C12N2 レセプターを発現させた NOMO-1 細胞 (T. Suda et al, <i>J. Biol. Chem.</i>, 2011, 286, 33963–72) を用いたスクリーニングにより、acyloxymethyl ketone (AOMK) という官能基を持つカテプシン B 阻害剤 KH 化合物がパイロトーシスを阻害することを見出した。さらにカテプシン B をノックアウトした細胞を用いても、同様にパイロトーシス誘導が起きることも見出し、カテプシン B とは異なる標的分子の同定が示唆された。</p> <p>そこで本研究では KH 化合物をリードとして種々構造展開を行うと共に、アルキンと呼ばれる非常に小さな官能基をタグとして導入することを検討した。アルキンタグを導入した KH 化合物は元の化合物と同様にパイロトーシスの阻害活性を示した。そこでアルキンタグを足掛かりにクリック反応を用いて KH 化合物の結合蛋白質を標識し、解析を行ったところ狙い通りカテプシン B とは異なる標的蛋白質候補を同定することに成功した。</p> <p>さらに KH 化合物がどのようにパイロトーシスを誘導しているかを明らかにすべく、パイロトーシス誘導に重要な因子に関してその影響を解析した。その結果、KH 化合物はカスパーゼ1には直接作用せず、間接的にその活性化を阻害することで、パイロトーシスの誘導を抑制していることが明らかとなった。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		多機能プロテアーゼによるがん幹細胞 stemness 維持機構の研究
研究代表者	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・教授・西英一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・准教授・大野美紀子
	所属・職名・氏名	滋賀医科大学・助教・岩崎広高
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>メタロプロテアーゼ、ナルディライジン (NRDC) の血中濃度は、外科的切除を行った肝内胆管がん症例予後と有意に相関し、病変部の EMT およびがん幹細胞関連遺伝子発現と高度に相関した (Clin Cancer Res. 2019)。さらに大腸がんモデルマウスにおいて腸管上皮特異的に NRDC を欠損させると、幹細胞性の鍵分子 p53 発現が上昇し発がんが抑制されることを示した (JCI Insight 2018)。一方競合的骨髄再構築での二次移植の結果、NRDC 欠損血液幹細胞の骨髄再構築能は著しく低下した。以上の背景から、本研究ではがん幹細胞 stemness 維持における NRDC の意義を、特にプロテアーゼ活性の役割に着目して明らかにすることを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>我々は M16 ファミリーのメタロプロテアーゼ、NRDC を増殖因子受容体として同定し (EMBO. J, 2001)、NRDC が HB-EGF や TNFα などの細胞外ドメイン切断 (シェディング) 活性化を介して細胞外環境を調節すること、核内では転写コレギュレーターとして働いていることを示した。NRDC 欠損マウスは複数の発がんモデルおよび炎症性疾患モデルにおいて著明な疾患抵抗性を示し (EMBO Mol Med 2012, RMD Open 2017, JCI Insight 2018 など)、NRDC 抑制が疾患治療につながる可能性が示唆された。一方 NRDC はプロテアーゼ活性を有するが、同活性が生体内で果たす役割はよくわかっていない。細胞レベルの検討では、NRDC の細胞外機能 (細胞外ドメインシェディング活性化) は自身のプロテアーゼ活性に依存しないが、核内機能の少なくとも一部は自身のプロテアーゼ活性に依存することがわかっている (Nat Commun 2014, Diabetes 2016)。本研究では、プロテアーゼ活性欠損ノックインマウスを用いて、幹細胞性維持における酵素活性の意義を明らかにすることを目的とし研究を進めている。</p> <p>1. 大腸がんモデルにおける NRDC プロテアーゼ活性の意義解明: プロテアーゼ不活性型 Nrdc ノックインマウス (E>A KI マウス) のホモ接合体は、遺伝的背景が pure BL6 の場合ほぼ 100% 周産期に死亡することが判明した。今回 ICR 系との戻し交配を行うことで、一定の生存率が得られ、周産期を越えれば発育できることを確認確した。今後本マウスを用いて、大腸がんモデル (1. APC-Min マウスとの交配: 多段階発がんモデル、2. アゾキシメタン/DSS 投与: 炎症性発癌モデル) での腺腫形成における NRDC プロテアーゼ活性の意義を検討する。</p> <p>2. NRDC プロテアーゼ阻害薬の抗がん作用検証: NRDC プロテアーゼ活性阻害効果を指標にハイスクリーンスクリーニングを行ったところ、約 30000 種類の低分子化合物のうち、140 種類が IC50: 5μM 以下の阻害活性を示した。本研究においては、大腸がんおよび肝細胞がん細胞株 (HCT116, Huh7) の増殖抑制効果を指標として、陽性化合物の二次スクリーニングを行い、有意な抑制効果を持つ化合物を選択した。今後、これらの化合物の in vivo における有用性を検証する。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Niizuma S, Matsuda S, Iwasaki H, Kimura T and *Nishi E. Nardilysin controls cardiac sympathetic innervation patterning through regulation of p75 neurotrophin receptor. <i>FASEB J.</i> 2020; 34 (9): 11624-11640</p> <p>【学会発表】 Yasukawa D, Miyake T, Tani M, Nishi E. Nardilysin in resected tissue may predict a post-operative prognosis of pancreatic cancer. 第 79 回日本癌学会学術総会 (2020 年 10 月 1-3 日 Online 開催)</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

研究課題		臨床応用を目指した抗グリオーマ幹細胞薬ペンタミジンの基礎実験
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・教授・中田光俊
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・大学院生・玉井 翔
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	本研究は、膠芽腫発生の起源となる脳腫瘍幹細胞を治療標的として、ドラッグリポジショニングの手法により増殖細胞効果を有する既存薬剤を探索し、これを使用した悪性脳腫瘍の新規化学療法の基礎基盤を構築するものである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>背景: がん進展制御研究所が所有する約 1,300 種類の既存医薬品の中から複数の候補薬剤の抽出に成功している。今回、低濃度で強い抗腫瘍作用を有する薬剤ペンタミジンが抽出された。本年はペンタミジンを使用した <i>in vitro</i>, <i>in vivo</i> の基礎実験をさらに進めた。</p> <p>結果: 当科にて独自に確立したグリオーマ幹細胞株 2 種類(KGS01, KGS07)と脳腫瘍研究で汎用されているグリオーマ細胞株 3 種類(A172, T98, U87)を用いて <i>in vitro</i> で抗腫瘍効果の検証を行った。細胞増殖アッセイではすべての細胞株においてペンタミジンの濃度依存性の増殖抑制効果を認めた。特に、グリオーマ幹細胞株においてより強い増殖抑制効果を認めた。細胞内シグナル変化の観察のため Western blotting を行ったところ、ペンタミジン処理により、細胞増殖に重要な STAT3 の活性が抑制されることを見出した。また、グリオーマ幹細胞株において抑制が強い傾向にあった。グリオーマ幹細胞株においては、幹細胞性維持に重要とされる SOX2 の発現が抑制され、幹細胞性の指標であるスフェア形成が阻害されることを確認した。グリオーマ細胞株を用いた遊走アッセイでは、ペンタミジン処理により細胞遊走が抑制されることを確認した。アポトーシスの誘導について、蛍光免疫染色で Propidium Iodide (PI)および Western blotting で Caspase-9 の発現量について評価を行ったところ、ペンタミジン処理によりグリオーマ細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。</p> <p>結論: ペンタミジンは、グリオーマ幹細胞株およびグリオーマ細胞株に対して、STAT3 活性を抑制することで増殖および遊走を阻害し、またグリオーマ細胞のアポトーシスを誘導することが示された。現在、膠芽腫マウスモデルを用いたペンタミジンの <i>in vivo</i> での抗腫瘍効果を確認する実験を開始している。本薬剤は、はからずも膠芽腫症例に対して、抗がん作用ではない別の作用を目的に使用する場合がある薬剤である。このため、早期に臨床応用へつなげることができる可能性が高いと考えている。臨床研究を踏まえ、世界に先駆けた日本発の脳腫瘍幹細胞を標的とした安全確実な化学療法の確立を試みる。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Tamai S, Hirai N, Jiapaer S, Furuta T, Nakada M. Drug repositioning for treatment of glioma: current state and future perspective. <i>Drug Repurposing</i>, ed. Farid A. Badria, InTech, 2020 in press Jiapaer S, Furuta T, Dong Y, Kitabayashi T, Sabit H, Zhang J, Zhang G, Tanaka S, Kobayashi M, Hirao A, Nakada M. Identification of 2-fluoropalmitic acid as a potential therapeutic agent against glioblastoma. <i>Curr Pharm Des</i> 26: 4675-4684, 2020 <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 玉井翔、淑瑠へムラサビツ、サビエルジャンジャパル、張光濤、張家康、王一、田中慎吾、木下雅史、平尾敦、中田光俊 既存薬剤 pentamidine の膠芽腫治療への応用 第 79 回日本脳神経外科学会学術総会 令和 2 年 10 月 15-17 日, 岡山 <p>【その他特筆事項】 特になし</p>	

研究課題		質量分析内視鏡診断システムの開発および大腸がん組織検体を用いた性能の検証
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学・助教・吉村 健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山梨大学・教授・竹田 扇
	所属・職名・氏名	金沢大学・教授・太田 哲生
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・中村 慶史
	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本 貴寛
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究では内視鏡検査時に本体軟性部を被検者の消化管内腔に挿入したまま、糸状の素材(ライン)で組織を採取して体外へと移送し、その検体を即時に成分分析して、悪性腫瘍を始めとする疾患を診断するための「質量分析内視鏡即時診断支援システム」を構築することを目的とする。成分分析の結果から疾患の存在を確実に検出するために、マーカー分子の発現量比較に加えて、ロジスティック回帰やサポートベクターマシンなどの機械学習(人工知能の一種)を用いた診断アルゴリズムを構築することも目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>機構部の改良</p> <p>質量分析内視鏡即時診断支援システムの機構部概要を図Aに示す。内視鏡鉗子孔に挿入し検体の採取、移送を行うライン式検体採取具のプロープ形状を、ラインの送りと露出が安定するように改良したことで、確実かつ低侵襲に消化管粘膜を採取することが可能となった。またラインに付着した生体成分を効率的にイオン化するために、質量分析装置の脱溶媒管内にラインを通過させているが、その内部形状を改良し、さらにイオン源との位置関係を厳密に規定することにより、シグナルの検出感度と安定性が劇的に改善した。現在の機構をもって実用レベルの装置の完成となった。</p> <p>A システム概要 モーターによるラインの駆動 エレクトロスプレー(イオン源) 質量分析装置イオン導入孔 ライン式検体採取具 検体採取ライン 内視鏡 鉗子孔 組織 検体採取プローブ</p> <p>B マウス組織からのリアルタイム生体成分分析 a) Gastric Mucosa b) Small Intestinal Mucosa c) Liver</p> <p>C 侵襲性の確認 採取前 採取後 採取後の胃(H&E染色) Lumen Abdominal cavity 500 μm</p>	
	<p>性能検証</p> <p>麻酔下のマウス胃および小腸粘膜と肝臓を対象にリアルタイム成分分析を試みたところ、それぞれの組織特異的な脂質および一次代謝物を検出可能であることが明らかとなった(図B、各ピークが種々の異なる生体成分を示す)。</p> <p>胃粘膜上皮採取後の組織からは目立った出血はなく、また組織の採取は粘膜下組織には達していなかったことから、本採取法の低侵襲性が示された(図C上:採取操作前後の胃粘膜、下:同組織のH&E染色像)。ラインと組織の接触を強くするか時間を長くすることで、任意に深層の組織を採取することも可能である。</p> <p>今後の方針</p> <p>生体成分の検出感度と再現性が実用レベルとなったので、ヒト大腸がん組織の成分組成データベースを構築し、機械学習を用いた診断アルゴリズムを確立する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肝細胞がん微小環境におけるエイコサノイドとケモカインの役割の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学 内科学(2)分野・助教・野阪 拓人
研究分担者	所属・職名・氏名	福井大学 内科学(2)分野・教授・中本 安成
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>進行肝細胞がんの制御は未だ困難で、詳細な進展機構の解明と、それに基づく治療法の開発が重要な課題である。アラキドン酸を基質に、5-リポキシゲナーゼ (5-LOX)、シクロオキシゲナーゼなどの酸化酵素により生成されるロイコトリエン (LT)、プロスタグランジンなどの生理活性脂質 (エイコサノイド) は、がん進展を促進することが報告されている。申請者らは肝細胞がん肺転移マウスモデルを用いて、肺泡マクロファージがケモカイン CCL2-CCR2 軸を介して血中より肺転移巣に誘導され、転移肺中で LTB4 を産生し、肺転移巣を増大させるという一連の細胞動態と機能解析を、向田教授らとの共同研究にて実証した (J Immunol. 200, 5, 2018; Int J Mol Sci. 20, 1, 2018)。以上の研究成果に基づき、脂質代謝学、腫瘍免疫学的側面から、肝細胞がん微小環境における新規肝細胞がん進展機構を解明し、新たな視点からの肝細胞がん制御法の開発に繋がる基盤的な知見の確立を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>令和元年度に向田教授との共同研究で、申請者らは肝細胞がん患者手術検体と、マウス由来肝がん細胞株 BNL 細胞を BALB/c マウスに経門脈的に接種する肝細胞がんモデルを用いて以下の点を明らかにした。</p> <ol style="list-style-type: none"> 肝細胞がん手術検体において腫瘍内 5-LOX 高発現群は低発現群と比較し、術後再発期間・全生存期間が不良であった (Fig. 1)。 肝癌マウスモデルで 5-LOX 阻害薬 (Zileuton) により Ki-67・CD133・CD90 陽性細胞数が減少し腫瘍増大が抑制された (Fig. 2)。 マウス、ヒト肝がん細胞株に LTB4 または LTC/D/E4 を添加すると、Sphere formation assay にて形成スフィア数が増加することを示した (Fig. 3)、癌幹細胞マーカーである CD90、CD133 が発現上昇することをフローサイトメトリー解析にて確認した。 マウス、ヒト肝細胞がん組織にて、蛍光免疫多重免疫染色法 (Opal 法; PerkinElmer) にて 5-LOX 発現細胞はマクロファージであることを示した。 マウス肝細胞がん組織において、正常肝と比較し、マクロファージ誘導能を有するケモカイン CCL2 の発現上昇を確認した (Fig. 4)。 <p>以上の実験結果から、肝細胞がんにおいて、腫瘍内マクロファージが LT 産生候補細胞であること、LT が肝細胞癌のがん幹細胞の誘導または増殖に関与している可能性が示唆された。今後は、さらに肝細胞がん内マクロファージの機能的解析や、ケモカインに関連する一連の細胞動態について解明することを目標としている。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>Fig. 1 肝細胞がん術後生存期間</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Fig. 2 Zileuton による肝細胞がん増大抑制効果</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Fig. 3 Sphere formation assay</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>Fig. 4 CCL2 発現解析</p> </div> </div>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> ロイコトリエンによる肝癌進展機構の解析と新規治療標的の可能性. 2021年4月. 第107回日本消化器病学会総会 ワークショップ. <p>【その他特筆事項】</p> <p>科研費・若手研究 「肝細胞がん微小環境におけるエイコサノイド関連腫瘍進展機構の解明と新規治療法の研究」 2019年度～2021年度 (代表者 野阪拓人、直接経費総額 3,200千円)</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		発がん過程におけるケモカイン受容体 XCR1 発現樹状細胞の機能的意義の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・講師・佐々木 泉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・教授・改正 恒康
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学先端医学研究所・特別研究員・折茂 貴是
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田 直史
【研究目的】	<p>ケモカイン受容体 XCR1 を発現する樹状細胞 (XCR1 発現樹状細胞) は、細胞傷害性 (CD8) T 細胞への分化を誘導する能力 (クロスプレゼンテーション能) が高いという機能的特性を持っており、がんに対する防御免疫、特に、細胞傷害性 T 細胞応答の誘導に重要であることがわかってきている。佐々木が所属する研究室では、これまで、がん抗原ペプチドを、XCR のリガンドであるケモカイン XCL1 と融合させることにより強い抗がん免疫を誘導できることを明らかにしてきた (Mizumoto et al., <i>Br J cancer</i>, 2020)。しかしながら、これまでの研究は腫瘍細胞株の移植の実験系がほとんどであり、化学的刺激などによる発がんにおける XCR1 発現樹状細胞の役割については不明な部分が多い。本研究では、これらを背景として、がんの発症、進展における XCR1 発現樹状細胞の機能的意義、およびその分子基盤を明らかにする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究では、XCR1 発現樹状細胞を恒常的に欠失するマウス (XCR1-DTA マウス, Ohta et al., <i>Scientific reports</i>, 2016) を用いて、7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) と 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) の塗布による皮膚発がんモデルで検討した。このとき、継時的に皮膚組織をサンプリングし、RNA を抽出し、RT-PCR や RNAseq を行い、発がんに関与する候補分子の探索を行った。野生型マウスの皮膚組織において、DMBA 塗布後 24 時間で <i>Xcl1</i> と <i>Xcr1</i> の遺伝子発現が増加し、その後継時的にこれらの発現が亢進した。また、DMBA 塗布 1 週間後に TPA を塗布すると、<i>Il23a</i> の遺伝子発現が顕著に増加した。このとき、XCR1-DTA マウスでは TPA 塗布による <i>Il23a</i> の発現増加が消失していた。以上の結果から DMBA 塗布により XCR1 発現樹状細胞が皮膚に浸潤し、TPA 塗布後 IL-23 を産生している可能性が示唆された。IL-23 は、がん移植モデルでは抗がん免疫に関与するが、自然発症がんモデルにおいては、がんの増大に関与することが報告されている。また、IL-23 の産生細胞は樹状細胞であることがわかっている。これらの知見から、XCR1 発現樹状細胞から産生される IL-23 が、皮膚発がんに影響を及ぼす可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Y. Mizumoto, H. Hemmi, M. Katsuda, M. Miyazawa, Y. Kitahata, A. Miyamoto, M. Nakamori, T. Ojima, K. Matsuda, M. Nakamura, K. Hayata, Y. Fukuda-Ohta, M. Sugiyama, T. Ohta, <u>T. Orimo</u>, S. Okura, <u>I. Sasaki</u>, K. Tamada, H. Yamaue, <u>T. Kaisho</u>. Anti-cancer effects of chemokine-direct antigen delivery to a crosspresenting dendritic cell subset with immune checkpoint blockade. <i>Br J. Cancer</i>. 2020 Apr;122(8):1185-1193. 2. R. Miyazaki, H. Saiga, T. Kato, T. Bakoshi, R. Senba, A. Shintani, M. Suzuki, K. Takao, <u>I. Sasaki</u>, A. Iizuka, M. Sugiyama, N. Iwami, Y. Fukuda-Ohta, H. Hemmi, T. Tanaka, M. Miyake, <u>T. Kaisho</u>, K. Hoshino. The mechanism of action of Spi-B in the transcriptional activation of the interferon-α4 gene. <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 2020 Apr 30;525(2):477-482. 3. D. Ashour, P. Arampatzi, V. Pavlovic, K. U Förstner, <u>T. Kaisho</u>, A. Beilhack, F. Erhard, M. B Lutz. IL-12 From Endogenous cDC1, and Not Vaccine DC, Is Required for Th1 Induction, <i>JCI Insight</i>. 2020 May 21;5(10):135143. 4. Y. Kato, T. M. Steiner, H. Park, R. O. Hitchcock, A. Zaid, J. Liang Hor, S. Devi, G. M. Davey, D. Vremec, K. M. Tullett, P. S. Tan, F. Ahmet, S. N. Mueller, S. Alonso, D. M. Tarlinton, H. L. Ploegh, <u>T. Kaisho</u>, L. Beattie, J. H. Manton, D. Fernandez-Ruiz, K. Shortman, M. H. Lahoud, W. R. Heath and I. Caminschi. Display of native antigen on cDC1 that have spatial access to both T and B cells underlies efficient humoral vaccination. <i>J Immunol</i>. 2020 Oct 1;205(7):1842-1856. <p>【学会発表】</p> <p><u>Sasaki I</u>, <u>Orimo T</u>, Harie I, Takisawa Y, Furukawa K, <u>Kaisho T</u>. The roles of unfold protein responses in cholera toxin B-induced interleukine-1β production. 第 27 回日本免疫毒性学会学術年会、2020 年 9 月 27 日、オンライン開催</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>第 27 回日本免疫毒性学会学術年会 年会賞受賞 (佐々木 泉)</p>	

研究課題		Rb/p53 経路の機能欠損を伴った高悪性度神経内分泌腫瘍 マウスモデルの樹立と解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所基礎腫瘍学ユニット・ 特任研究員・陳 好 (チンヨ)
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor; 以下 NET) は神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、膵臓、下垂体、直腸、肺など全身の様々な臓器に生じる。NET は希少がんであり、サンプルの収集が難しく、動物モデルの開発も遅れているため、未だに発生機序は十分に解明されていない。そこで、本研究の目的は、Rb 及び p53-PHLDA3 経路の異常を介した NET の新規マウスモデルの開発及び NET 発症と悪性化機序の解明である。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【研究内容】 我々は、p53 の標的遺伝子である <i>PHLDA3</i> ががん遺伝子 Akt を抑制する機能を持つ事、そして肺 NET において <i>PHLDA3</i> の機能が失われている事を明らかにした (Cell, 2009)。さらに、ヒト膵 NET、直腸 NET においても <i>PHLDA3</i> は非常に高頻度なヘテロ接合性の消失 (loss of heterozygosity; 以下 LOH) を呈し、高悪性度・予後不良及び多発がんに寄与する重要な因子である事、<i>PHLDA3</i> 欠損マウスで膵島過形成を高度に呈する事を明らかにした (PNAS, 2014、Scientific Reports, 2019)。加えて、ヒト下垂体 NET 及び甲状腺腫瘍においても <i>PHLDA3</i> の LOH が高頻度に観察された事 (未発表データ)、<i>PHLDA3</i> 欠損の雌マウスにおいて下垂体 NET が高頻度に発症する事 (未発表データ) を見出した。以上の事より、<i>PHLDA3</i> は様々な臓器に発症する NET 共通のがん抑制遺伝子である事が示唆され、<i>PHLDA3</i> 欠損マウスは新規 NET 発症のマウスモデルとなる可能性が示された。一方、がん抑制遺伝子 <i>Rb</i> ホモ欠損マウスは胎生致死であるが、ヘテロ欠損マウスは正常アレルの体性欠損に伴い、下垂体 NET 及び甲状腺 NET (C-cell adenoma) が発症する事が知られている。そこで、本研究では、<i>PHLDA3</i> 欠損マウスと <i>Rb</i> ヘテロ欠損マウスを交配する事で、Rb 経路の機能異常を背景に、p53-PHLDA3 経路の不活化が NET の発症・悪性化に及ぼす影響を検討した。詳細な研究内容は以下 2 点である (図参照)。</p> <p>① 新規多臓器高悪性度 NET 発がんマウスモデルの樹立 <i>PHLDA3</i> 単独欠損マウス及び <i>Rb</i> 単独ヘテロ欠損マウスを掛け合わせ、<i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを作製した。さらに、作製した二重欠損マウスを 45 週齢、60 週齢で解剖を行い、同じ週齢の <i>PHLDA3</i> 単独欠損、<i>Rb</i> 単独欠損マウスと比較し、全身諸臓器における新規 NET の発症、または既知の甲状腺 NET 及び下垂体 NET の悪性化・転移の有無を調べた。</p> <p>② <i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスモデルの病理組織学的解析 異なる神経内分泌マーカー及び細胞増殖マーカーの免疫組織学的染色を行い、軽度の増殖性病変の有無、発症した NET の悪性度、転移の有無を判定した。</p> <p>【研究成果】 <i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを 45 週齢、60 週齢で解剖したところ、<i>PHLDA3</i> 及び <i>Rb</i> 両遺伝子の機能喪失が相加的に甲状腺 NET 及び下垂体 NET の形成を促進したことが明らかになった。また、二重欠損マウスでは、甲状腺 NET と下垂体 NET に加えて高頻度に肝がんの発症が観察された。今後、<i>PHLDA3</i>・<i>Rb</i> 二重欠損マウスを詳細に解析することで、<i>PHLDA3</i> 及び <i>Rb</i> による新規細胞内シグナルのクロストークを解明し、NET 発症・悪性化の機序を明らかにする予定である。</p>	

新規多臓器NET発がんマウスモデルの樹立

PHLDA3欠損マウス

	
臓器	病変
膵島	過形成
下垂体	腫瘍

Rbヘテロ欠損マウス

	
臓器	病変
下垂体	腫瘍
甲状腺	腫瘍



PHLDA3/Rb 2重欠損マウス



✓ 検索臓器
膵臓ランゲルハンス島、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、各種消化管、胸腺、肺、さらに転移を想定して肝臓、各種リンパ節、その他異常の認められた臓器

✓ 病理組織学的解析対象
・ 増殖性病変 (過形成)
・ 腫瘍性病変 (良性腫瘍及び悪性腫瘍)

✓ 各種染色
・ クロモグラニンA
・ シナプトフィジン
・ CD56
・ SSTR2
・ インスリン/グルカゴン
・ Ki-67

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. <u>Yu Chen</u> and Rieko Ohki. p53-PHLDA3-Akt Network: The Key Regulators of Neuroendocrine Tumorigenesis. International Journal of Molecular Sciences, 21(11), 4098, 2020. 2. Shiori Suzuki [#] , Shuichi Tsutsumi [#] , <u>Yu Chen</u> [#] , Chikako Ozeki, Atsushi Okabe, Tatsuya Kawase, Hiroyuki Aburatani and Rieko Ohki. ([#] equal contribution) Identification and characterization of the binding sequences and target genes of p53 lacking the 1st transactivation domain. Cancer Science, 111:451-466, 2020.
	【学会発表】 <u>Yu Chen</u> , Sadahiro Iwabuchi, Tohru Kiyono, Shigeyuki Magi, Yasuhito Arai, Akihiko Yokoyama, Mariko Okada, Shinichi Hashimoto, Kentaro Semba, Rieko Ohki. Akt dysregulation by loss of <i>PHLDA3</i> is an important determinant of pancreatic neuroendocrine tumor progression. The 79th Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Hiroshima, October 2020
	【その他特筆事項】 特になし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		<i>In vivo</i> エレクトロポレーションを用いた簡便な発がんモデル作製法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学・訪問研究員・大西 伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	効果的な治療法が確立されていない悪性脳腫瘍の分子基盤解明を目的に、申請者は piggyBac システムと <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法を組み合わせることでマウス脳に直接がん遺伝子を導入し、正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルの構築を行ってきた。また、同法を用いてマウスの膵臓や卵管などへの直接遺伝子導入にも成功している。本研究では、これまでに申請者が構築してきた piggyBac/ <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法によるマウス組織への遺伝子発現システムを進展させ、安定発現細胞株を樹立する感覚で迅速かつ簡便に多様な発がんモデルを構築・解析することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに申請者らは、悪性脳腫瘍の性状を理解し新たな治療戦略を考案することを目的に、ヒト GBM において高頻度に異常がみられるがん抑制遺伝子 <i>Cdkn2a</i> の欠損 (KO) マウス NSCs にレトロウイルスを用いて活性型 H-RAS (H-RAS V12) を導入し同系マウス脳内に移植することで、高い細胞密度で周囲の脳実質に浸潤性に増殖し、ヒト GBM に酷似した特徴を有するマウス GBM モデルを構築している (Neoplasia. 13:784-91. 2011)。また、申請者は <i>in vivo</i> エレクトロポレーション法でガラスキャピラリーを用いて piggyBac 発現ベクターをマウス新生児脳に直接導入することでウイルス感染を伴わずにマウス脳内の細胞に活性型 K-RAS (K-RAS V12) と <i>Cdkn2a</i> shRNA を発現させることで正常脳から脳腫瘍を作製する <i>in vivo</i> 発がんモデルを構築済みである。これまでの <i>in vivo</i> 発がんモデルではがん遺伝子 piggyBac 発現ベクターと目的配列をゲノム内トランスポゾンに挿入するための Transposase 発現ベクターの 2 種類のベクターをインジェクションしてきたが、本研究では、目的配列の挿入効率を上げることを目的に Transposase をタンパク質でインジェクションするために、大腸菌タンパク質発現系を用いたリコンビナントタンパク質の大量精製を実施中である。これまでに、GST や MBP といった可溶性タグを用いることで、大腸菌からタンパク質をスムーズに抽出する努力がなされてきたが、一般的な大腸菌の破碎方法である超音波破碎では目的タンパク質以外の夾雑物や分解したタンパク質が多く共抽出されていた。近年報告された可溶性タンパク質融合を試験的に GFP に付加し、大腸菌破碎方法は凍結融解法ならびにリゾチームを用いてマイルドな条件でタンパク質抽出を行ったところ、飛躍的にタンパク質発現量の増加ならびに夾雑タンパク質の減少が認められた。現在は、piggyBac Transposase タンパク質に可溶性タンパク質融合を行い、精製条件を検討中であり、今後、目的配列挿入効率の評価を行う予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	<ol style="list-style-type: none"> 2-Nitroimidazoles induce mitochondrial stress and ferroptosis in glioma stem cells residing in a hypoxic niche. Koike N, Kota R, Naito Y, Hayakawa N, Matsuura T, Hishiki T, Onishi N, Fukada J, Suematsu M, Shigematsu N, Saya H, Sampetean O. <i>Commun Biol.</i> 3(1):450. 2020 Epigenetic suppression of SLFN11 in germinal center B-cells during B-cell development. Moribe F, Nishikori M, Takashima T, Taniyama D, Onishi N, Arima H, Sasanuma H, Akagawa R, Elloumi F, Takeda S, Pommier Y, Morii E, Takaori-Kondo A, Murai J. <i>PLoS One.</i> 16(1):e0237554. 2021
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

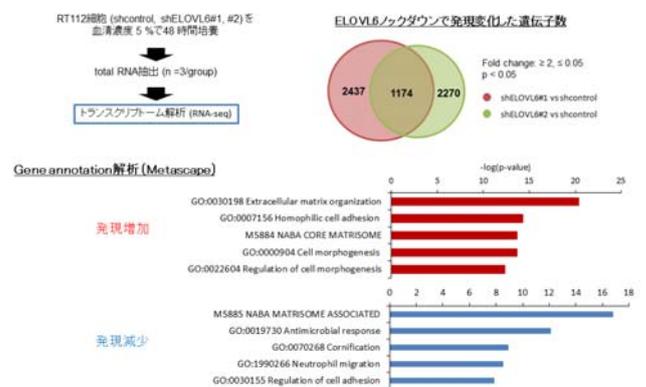
令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトの乳がんモデルの代替であるイヌの乳がん幹細胞培養系を用いたがん悪性化の分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・助教・町田雪乃
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・准教授・道下正貴
	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・学部生・石川里奈
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>雌イヌで最も発生が多い乳腺腫瘍は、悪性腫瘍が約50%で、組織学的に①乳腺上皮様腫瘍細胞のみが増殖する腫瘍、②乳腺上皮様腫瘍細胞と筋上皮様腫瘍細胞が両方増殖する腫瘍、③②に加えて軟骨と骨の増殖がみられる腫瘍に分類される。乳腺上皮細胞のみが増殖する腫瘍と比較し、筋上皮細胞が増殖している腫瘍では予後良好の傾向がみられる。</p> <p>ミトコンドリア内葉酸代謝酵素の一つである MTHFD2 は、様々ながんで発現しており、がんの代謝に重要な役割を果たしている。本研究では、MTHFD2 がイヌの乳腺腫瘍の治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>イヌの乳腺腫瘍における MTHFD2 の発現について、パラフィン切片を用いた免疫染色にて評価した。MTHFD2 発現は良性腫瘍では陽性(2/2)、①乳腺癌では弱陽性(4/6)、陰性(2/6)、②複合腺癌では弱陽性(1/3)、陽性(2/3)であった。MTHFD2 陽性細胞は、腫瘍性腺上皮細胞、筋上皮細胞および軟骨細胞であり、細胞質ないし核に発現がみられた。また腫瘍間質の線維芽細胞においても陽性を示した。このことから、イヌの乳腺腫瘍において MTHFD2 が発現し、がん細胞の代謝に関与している可能性が示唆された。</p> <p>さらに、イヌ乳がん細胞株 CTBp を用いて、乳がん幹細胞が濃縮される表面抗原 CD44⁺CD24⁻の細胞集団と非がん幹細胞の CD44⁻CD24⁺の細胞集団をフローサイトメトリーで分取し、MTHFD2 の免疫染色をおこなった。がん幹細胞集団では MTHFD2 が核で強く発現し、非がん幹細胞集団では MTHFD2 の核での発現が低い傾向が免疫染色より得られた。このことから、イヌの乳がん幹細胞集団では MTHFD2 が重要な役割を担っていることが示唆された。今後は、MTHFD2 阻害薬によって、イヌの乳がん幹細胞に対する抗腫瘍効果の評価する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

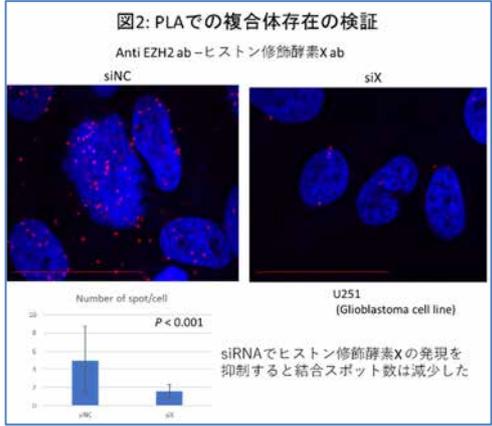
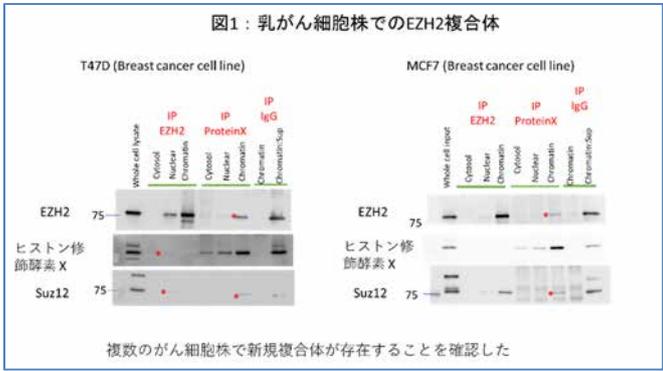
令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 の膀胱がんにおける役割
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・教授・松坂 賢
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	筑波大学医学医療系・博士研究員・大野 博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	<p>膀胱がんは尿路上皮がんの中で最も死亡率が高く、日本でも近年、泌尿器系のがんでは前立腺がんに次いで膀胱がんが増加している。膀胱がんは有効なスクリーニングマーカーが無く、その発がん機序はほとんどわかっていない。また、再発率の高いがんである。したがって、膀胱がんの有効な診断、治療および予防法の確立が求められている。我々は、脂肪酸の鎖長を制御する酵素 ELOVL6 を同定し、さらに本酵素が膀胱がんで上昇することを見出した。そこで、本研究では、ヒト膀胱がん細胞株を用いて膀胱がんにおける ELOVL6 発現誘導機序および ELOVL6 が制御する脂質多様性が膀胱がんの代謝やシグナル伝達におよぼす影響を明らかにし、膀胱がんの新規治療戦略の開発につなげることを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>ヒト筋層非浸潤膀胱癌細胞株 RT112 を用いて、膀胱癌における ELOVL6 発現制御機構を解析した。また、RT112 およびヒト筋層浸潤性膀胱癌細胞株 J82、253J、T24 において ELOVL6 をノックダウンし、細胞増殖への影響とその分子メカニズムを解析した。膀胱癌手術検体において、非癌部に比べて癌部では ELOVL6 の発現が 5.8 倍増加した。筋層非浸潤膀胱癌では変異や融合による FGFR3 の恒常的活性化が知られているが、RT112 において FGFR3 をノックダウンすると、転写因子 SREBP-1 の活性化の抑制 (核型 SREBP-1 の減少) と ELOVL6 発現の減少が認められた。ELOVL6 のノックダウンは、FGFR3 遺伝子変異を有さない T24 および 253J では細胞増殖に影響を及ぼさなかったが、活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する RT112 および J82 では細胞増殖を抑制した。Xenograft モデルによる造腫瘍能の検討では、in vivo においても ELOVL6 ノックダウンによる RT112 の腫瘍形成の抑制が認められた。さらに、ELOVL6 をノックダウンした RT112 細胞の RNA-seq 解析から、ELOVL6 の阻害は matrisome と呼ばれる細胞外微小環境に関わる遺伝子の発現を変化させることが明らかとなった。本研究により、膀胱癌では ELOVL6 の発現が亢進し、特に活性化 FGFR3 遺伝子変異を有する膀胱癌において細胞増殖能や腫瘍形成能に重要な役割を果たすこと、その分子機序として細胞外微小環境の変化が関与している可能性が示された。今後、膀胱癌の増殖や悪性進展を促進する脂質分子種およびその作用機序を解明する。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

ELOVL6のノックダウンは細胞外微小環境因子の発現を変化させる

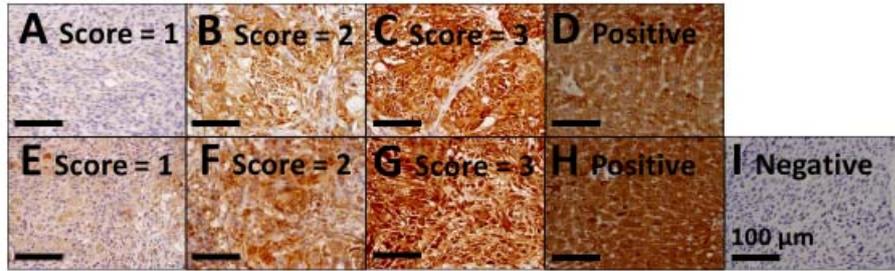


研究課題		ヒストンメチル化酵素 EZH2 と新規複合体を形成するタンパク質の同定と機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学大学院医学系研究科・講師・新城恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	<p>ヒストンメチル化酵素 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコーム複合体 2) の構成タンパク質であり、ヒストン H3 リジン 27 番をトリメチル化 (H3K27me3) 修飾することにより遺伝子発現制御に関わる。EZH2 の発現亢進は多くのがんで観察されており、がんの悪化に寄与していることが報告されている。EZH2 はがんにおいて PRC2 以外のタンパク質と複合体を形成することも知られている。我々は EZH2 が過剰発現している複数の腫瘍細胞において、EZH2 はヒストン修飾酵素 X (protein X) と複合体を形成していることを見出した。本共同研究では、新規複合体の機能解明を目指して実験を行った。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでに脳腫瘍、乳がん、前立腺がん、肺がんなど複数のがん種の細胞株を用いて、この異常複合体が存在することを確認した。EZH2 は核内に多く局在し、EZH2-protein X 異常複合体も核内で認めることが分かった (図 1)。また、この複合体には PRC2 のコアサブユニットである SUZ12 も存在することが示唆された。複合体の存在は Proximity ligation assay (PLA) でも確認を試みた。PLA のスポット数は、siRNA でヒストン修飾酵素 X の発現を抑制すると減少し、複合体形成に protein X が寄与していることが示された (図 2)。近年、長鎖非翻訳 RNA がヒストン修飾タンパクをクロマチン上にリクルートすることが知られている。そこで、EZH2-protein X 異常複合体形成に長鎖非翻訳 RNA が関与しているかを検討した。細胞から得られたタンパク質を、RNaseA で処理したのち、免疫沈降を行った。RNaseA 処理の有無で複合体の存在量は変わらず、タンパク質が直接結合している可能性が考えられた。</p> <p>本年度 EZH2 と protein X を同じベクターで発現させる系を作成した。さらに蛍光タンパク質発現できるように改良している。このベクターを用い平田准教授のご指導のもと FRET 実験を行う予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 1 日～3 日 (広島・オンライン口頭発表) ヒストンメチル化酵素 EZH2 過剰発現細胞における新規複合体の同定
	【その他特筆事項】	

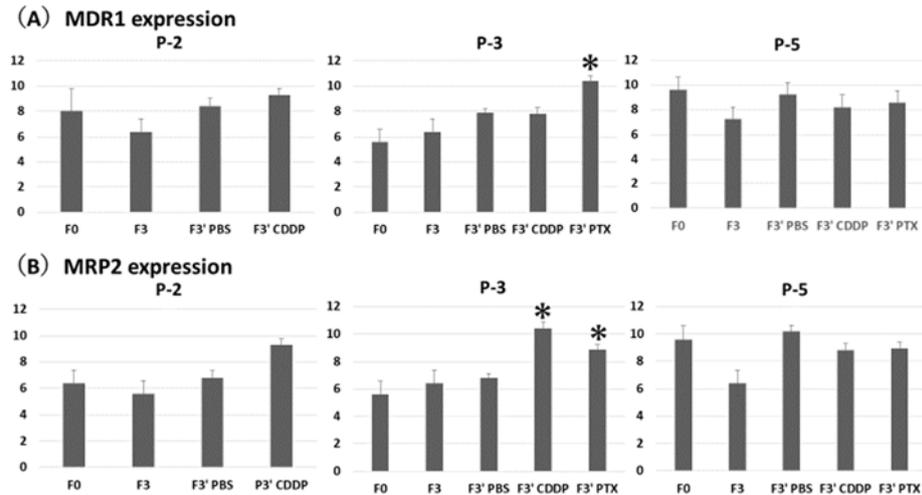


研究課題		頭頸部癌における癌代謝とオートファジー機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・耳鼻咽喉科頭頸部外科・助教・遠藤一平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学医学保健研究域 医学系・教授・吉崎智一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	<p>従来はヒト頭頸部癌から樹立された細胞株 (Cell line) を移植した Cell line-derived xenograft (CDX) モデルを用いて、新規バイオマーカー探索や新薬開発における薬剤感受性試験などの研究が広く行われてきた。しかし頭頸部癌 CDX モデルは癌の heterogeneity が失われており実際の頭頸部癌患者の臨床モデルとしては不完全であるという欠点を抱えていた。このような欠点を克服しうるモデルとして実際の癌患者の腫瘍組織を免疫不全マウスに移植した Patient-derived xenograft (PDX) モデルを用いた研究が近年国内外で行われるようになりつつある。本研究は頭頸部癌 PDX モデルの preclinical model としての有用性を検証することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>①対象と方法 2015年12月～2017年9月に本研究参加同意のえられた25名の頭頸部がん患者の腫瘍組織をNOD-SCIDマウスへ移植し、5例の頭頸部癌PDXモデル(下咽頭癌2例、舌癌1例、喉頭癌1例、副鼻腔癌1例)を確立した。これら5例のうち術後シスプラチン併用放射線化学療法のうち、①6か月以降に再発またはCR維持の症例をCisplatin responder群、②6か月以内に再発した症例をCisplatin non-responder群にわけて、①から下咽頭癌PDXモデル1例(P-3)、副鼻腔癌1例(P-5)、②から下咽頭癌PDXモデル1例(P-2)に対して薬剤感受性試験を行った。また今回抗癌剤等の薬剤を細胞の中から外へ排出する膜タンパクである adenosine triphosphate-binding cassette (ABC)-transporter に着目し、抗癌剤投与によるタンパク発現変化や薬剤耐性への影響を評価した。</p> <p>②結果 1) 薬剤感受性試験の結果 in vivo</p> <p>↑図1 図1上段P-3(下咽頭癌PDX)、P-5(副鼻腔癌PDX)が①Cisplatin responder群、下段P-2(下咽頭癌PDX)が②Cisplatin non-responder群である。PDXモデルは3代継代したものを使用した。Cisplatin responder群ではCisplatin, PaclitaxelともにPBS(コントロール)と比較して有意に腫瘍縮小効果を認めた一方、Cisplatin non-responder群ではCisplatinとPBSに有意な腫瘍サイズ変化は認めなかった。</p>	

2) ABC-transporter 発現変化について



↑ 図 2



↑ 図 3

今回は ABC-transporter のうち、Paclitaxel を基質とする MDR-1 と Cisplatin を基質とする MRP-2 に着目した。図 2 は MDR-1 と MRP-2 の免疫組織学的染色像である。図 2 に示すように MDR-1 強度スコア (A~C) とポジティブコントロール (D)、MRP-2 強度スコア (E~G) とポジティブコントロール (H)、ネガティブコントロールは (I) とし、範囲スコアを 0 (0~10%)、1 (11~25%)、2 (26~50%)、3 (51~75%)、4 (76~100%) とした。発現スコアを強度スコアと範囲スコアの積として、その平均値を図 3 に示す。F0 が患者腫瘍、F3 が 3 代継代した PDX、F3' が薬剤投与後 (PBS, Cisplatin (CDDP), Paclitaxel (PTX)) の PDX の発現スコアである。いずれの症例も患者腫瘍と比較して、継代腫瘍およびコントロールでは有意な発現スコアの変化はなかったが、P-3 でのみ患者腫瘍と比較して Paclitaxel 投与後の MDR-1 発現スコア上昇および Paclitaxel 投与後および Cisplatin 投与後の MRP-2 発現スコア上昇を認めた。

③考察

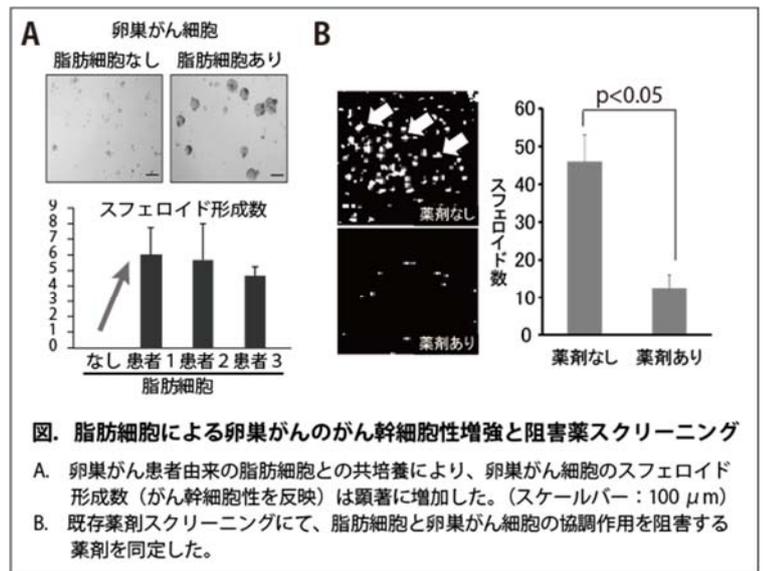
Izumuchenko (Annals of Oncology, 2017) らが種々の固形癌 (1 例頭頸部扁平上皮癌含む) の PDX が実際の患者の薬剤感受性によく相関することを示したが、本研究でも PDX と実際の頭頸部癌患者 3 例の Cisplatin の効果は相関していた。また ABC-transporter 発現については少なくとも患者腫瘍の性質を継代腫瘍が受け継いでいることが示唆され、ABC-transporter の研究モデルとしても有用である可能性がある。しかしながら今回の研究では薬剤耐性と ABC-transporter 発現変化との関連を見出すことはできなかったため、さらに検討する症例を増やし PDX モデルを確立していく必要がある。

【成果等】

【主な論文発表】

Haruna Makita, Kazuhira Endo, Yoshiya Kasahara, Asuka Nakata, Makiko Moriyama-Kita, Kazuya Ishikawa, Takayoshi Ueno, Yosuke Nakanishi, Satoru Kondo, Naohiro Wakisaka, Noriko Gotoh, Tomokazu Yoshizaki Xenografts derived from patients with head and neck cancer recapitulate patient tumour properties *Oncol Lett.* 2021 May;21(5):385

研究課題		がん転移ニッチとしての脂肪細胞の働きの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・下野洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・林 孝典
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・渡邊 崇
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・前田 真男
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・助教・ベフヌーシュ ハレディアン
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>卵巣がんの約半数は進行症例であり、その5年生存率は約40%と低い。治癒を妨げる腹膜転移は大網をはじめとする腹腔内脂肪組織にみられることから、脂肪組織は卵巣がんの進展に深く関与することが推測される。私たちは脂肪細胞の分泌因子(アディポカイン)ががん幹細胞性を亢進することを明らかにしてきた。本研究では、卵巣がん患者の手術検体より分離した卵巣がん異種移植細胞と脂肪細胞を用いて、脂肪細胞が卵巣がんのがん幹細胞性を亢進する機構を解析する。卵巣がん進展における脂肪細胞の役割の解析を通じて、卵巣がんの再発や転移を抑えるための分子標的の同定を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>私たちはがん患者の手術検体より樹立したがん異種移植(PDX)細胞と脂肪細胞を用いた解析により、脂肪細胞ががんPDX細胞の増殖および幹細胞性を亢進させること、およびその働きにアディプシンをはじめとするアディポカインが関与することを見出した(Goto H. Shimono Y. et al. Oncogene, 2019)。本研究では、肥満ががん発症の危険因子となる卵巣がんに着目し、脂肪細胞が卵巣がんのがん幹細胞性を亢進する分子機構の解明を目指す。</p> <p>1. がん幹細胞性を増強するアディポカインの同定</p> <p>同意の得られた卵巣がん患者の手術検体より脂肪細胞と卵巣がんPDX細胞を樹立し、両者を用いた共培養系を確立した(図)。サイトカインアレイにより同定した一連のアディポカインのうち、患者脂肪組織でより特異的に発現が高く、PDX細胞や患者がん組織で発現が低いあるいは検出困難なものを同定した。これらのアディポカインをノックダウンした脂肪細胞との共培養、および特異的阻害剤の添加により、脂肪細胞による卵巣がんPDX細胞のスフェロイド形成能は減弱した。</p> <p>2. 脂肪細胞とがん幹細胞の共培養モデルを用いた阻害剤の探索</p> <p>蛍光タンパク質GFPを導入した卵巣がん細胞と脂肪細胞の共培養系を用いて、スフェロイド形成能を阻害する薬剤をスクリーニングした。約800種類の既存薬剤パネルを用いたスクリーニングにより、スフェロイド形成能を抑制する候補薬剤30種類を同定した(図)。次にサイトカインアレイを用いて、阻害剤の添加により発現が低下するアディポカインを同定した。</p>	



<p>【成 果 等】</p>	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yanagi H, <u>Watanabe T</u>, Nishimura T, <u>Hayashi T</u>, Kono S, Tsuchida H, Hirata M, Kijima Y, Takao S, Okada S, Suzuki M, Imaizumi K, Kawada K, Minami H, <u>Gotoh N</u>, <u>Shimono Y</u>. Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. Cancer Science. 2020;111(12):4359-4370. 2. Shibuya N, Kakeji Y, <u>Shimono Y</u>. miR-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer. Cancer Science. 2020;111:2093-2103. 3. Nishiuchi A, Hisamori S, Sakaguchi M, Fukuyama K, Hoshino N, Itatani Y, Honma S, Maekawa H, Nishigori T, Tsunoda S, Obama K, Miyoshi H, <u>Shimono Y</u>, Taketo MM, Sakai Y. MicroRNA-9-5p-CDX2 Axis: A Useful Prognostic Biomarker for Patients with Stage II/III Colorectal Cancer. Cancers. 2019;11(12):e1891.
	<p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Shimono Y</u>, Shibuya N, Nishimura T, <u>Gotoh N</u>, Kakeji Y. MicroRNA profiling of latently metastasized human breast cancer stem cells. 第79回日本癌学会学術総会(International Session)、2020年. 2. <u>Maeda M</u>, <u>Hayashi T</u>, Nishio E, Asai N, Fujii T, <u>Shimono Y</u>. Peritoneal adipose tissue-derived stem cells enhance clonogenicity of ovarian cancer cells. 第79回日本癌学会学術総会、2020年. 3. <u>Shimono Y</u>, <u>Gotoh N</u>. 脂肪細胞によるがん幹細胞性制御能の解析. 令和2年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、2021年.
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>特になし。</p>

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		頭頸部癌における浸潤・転移の分子機構の解明と克服
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科 地域医療システム学講座 特定助教 河合良隆
研究分担者 (適宜、行を追加 してください。)	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授 大森孝一
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院 がんセンター 医員 鈴木千晶
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科 教授 矢野聖二
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野聖二
【研究目的】	<p>再発・転移性頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は根治的治療が困難で予後不良である。HNSCCの多くにEGFRの遺伝子増幅と高発現がみられ、予後に関連すること示されているが、EGFRを標的とした治療に反応するのは約10%程度と非常に少ない。また、現在まで有効なドライバー経路は同定されておらず、更なる治療成績向上のために新規治療を開発する必要がある。本研究は、局所浸潤や転移を形成しないマウス口腔癌扁平上皮癌細胞株から樹立した高率にリンパ節転移・肺転移を生じる細胞株における変化を比較検討することで、頭頸部癌における浸潤・転移の分子機構を検討し、新規治療方法の開発を行うことを目的としている。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>頭頸部癌における転移現象を再現した頭頸部癌自然転移モデルを作成し、頭頸部癌の転移メカニズムを検討した。まず、マウス頭頸部扁平上皮癌細胞 Sq-1979 の皮下移植モデルから高転移能をもつ細胞株 SS2 を樹立した。SS2 は親株である Sq-1979 よりも高い生着・増殖能があり、高率にリンパ節転移・肺転移を生じることを確認した。</p> <p>二次元培養下で細胞運動を撮影し、トラッキング解析を行ったところ SS2 は Sq-1979 よりも有意に高い運動能を獲得していた。また、三次元培養環境下で SS2 は Sq-1979 では認めない非足場依存性の増殖能を獲得していることを確認した。EGFR リガンドである EGF、AREG 刺激下では Sq-1979 でも非足場依存性増殖能を獲得することを確認した。EGFR 阻害薬存在下では SS2 は二次元培養・三次元培養ともに増殖抑制を認めたが、特に三次元培養下においてより低濃度から増殖抑制を示した。また、EGFR 阻害剤エルロチニブ存在下での二次元培養では SS2 の運動能低下が認められた。</p> <p>Sq-1979 と SS2 において DNA シークエンスにて遺伝子発現を比較したが、現在まで既知の転移に関与する報告の遺伝子変化を認めなかった。マイクロアレイ解析でのパスウェイ解析では有意なシグナル変化を示すパスウェイは認めなかったが、SS2 において Sq-1979 よりもサイトカインを含む細胞外因子に関与する遺伝子発現を多く認めた。</p> <p>サイトカイン抗体アレイにて SS2 では Sq-1979 よりも AREG、可溶性 AXL、IL1 の発現が上昇していた。また、vivo における腫瘍から抽出したタンパクにおいて発現解析を EGFR ファミリーの発現を Western Blot を用いて評価したところ、SS2 は Sq-1979 に比べて EGFR・Her3・Ax1 の発現亢進を示した。そのため、SS2 では EGFR がオートクリン作用で活性化させられ、運動能・足場非依存的増殖能を獲得している可能性があると考えた。</p> <p>上記結果から、頭頸部癌転移機構に EGFR が重要な因子になり得ると考えている。今後は、EGFR のオートクリン活性化に関与する因子・メカニズムを同定し、浸潤・転移に関与する原因因子を同定する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		グリオブラストーマに観察される細胞死を誘導する分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・教授・近藤 亨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	<p>代表的な脳腫瘍である神経膠芽腫 (GBM) は、発生臓器の重要性から外科的切除が困難である上に抗癌剤・放射線療法に耐性である。これは GBM に存在する GBM 幹細胞 (GIC) とその周辺細胞 (ニッチ細胞) が治療抵抗性に関与していると考えられている。申請者らはこれまでにヒト GBM を模倣するマウス GIC 株の樹立と性状解析、新規腫瘍抑制分泌因子 Ecr4 の同定とその抗腫瘍メカニズムを明らかにしてきた。これらの研究過程で、Ecr4 欠損 GIC が野生型マウス脳に広範な壊死と血管新生を伴うヒト GBM に酷似した腫瘍を形成することを発見した。本研究課題では、GBM の特徴の1つ細胞死における Ecr4 の機能を解析し、Ecr4 を介した GBM 組織内ネットワークの一端の解明を目的として遂行する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>B16 メラノーマ細胞の皮下腫瘍モデルを用いた解析から、野生型マウスに比べて Ecr4 欠損マウスでは腫瘍形成が亢進することを発見した。B16 細胞に Ecr4 発現は検出されないことから、ホスト細胞由来の Ecr4 が抗腫瘍効果を発揮していることを示している。そこで、Ecr4 の抗腫瘍効果のメカニズムについて、腫瘍細胞と腫瘍周辺細胞への影響について検討を行った。Ecr4 は様々なプロテアーゼにより断片化されることが報告されていることから、産生される各種 Ecr4 ペプチドを入手し、複数の癌細胞への影響を MTT アッセイにより検討した。その結果、2つのペプチドに有意な抑制効果を発見した。更に、これらペプチドが細胞増殖阻害と細胞死を誘導することを確認した。これらの結果は、腫瘍細胞における Ecr4 発現抑制が腫瘍形成に必要であることを示している。そこで、ゲノム編集法を利用した内在 Ecr4 の発現誘導実験を遂行したが、現在まで内在性 Ecr4 を癌細胞に発現誘導することに成功していない。</p> <p>次に、Ecr4 ペプチドが腫瘍周辺細胞にどのような影響を及ぼすのかについて検討を行った。研究代表者らを含む複数のグループが、Ecr4 が初代培養マクロファージ/ミクログリアを活性化し、炎症性サイトカイン産生を誘導することを報告している。Ecr4 研究を簡便に進めるために、マウスマクロファージ細胞株 Raw264.7 とミクログリア細胞株 MG6 に対する Ecr4 ペプチドの影響を検討した。既に報告されている Ecr4 ペプチド依存的な炎症性サイトカイン発現誘導について、PCR と定量 PCR を用いて検討したが、現在までに有意な発現誘導は観察されていない。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Kondo T. (2021). Glioblastoma-initiating cell heterogeneity generated by the cell-of-origin, genetic/epigenetic mutation and microenvironment. Semin Cancer Biol. In press.</p> <p>【学会発表】 該当ありません</p> <p>【その他特筆事項】 該当ありません</p>	

研究課題		染色体安定性における JSAP の役割とその分子基盤の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・教授・橋本真一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学・助教・岩淵禎弘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	細胞分裂における染色体の均等分配は、正確な遺伝情報の伝達に必須であり、その異常はがんの発生・悪性化や先天性疾患などと深く関わっている。しかし、染色体安定性維持機構については不明な点が多い。一方、JSAP は MAP キナーゼ経路の足場タンパク質、およびキネシン・ダイニンモーターのアダプターとして機能することが知られている。これまでに得られた予備的知見を基に、本共同研究では、染色体分配における新規制御因子としての JSAP に焦点を当て、JSAP 制御の破綻が染色体不安定性を誘導するか明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>レンチウイルスベクターを用いて、ヒト正常二倍体不死化 RPE-1 細胞で JSAP2(または JSAP1) タンパク質の発現を上昇させると、異数性細胞の割合が顕著に増加することを見出した。異数性誘導が JSAP 発現亢進に起因することを確認するため、薬剤 (ドキシサイクリン) によって発現誘導が可能な“JSAP2 発現カセット”をヒト 19 番染色体上の AAVS1 部位 (外来遺伝子挿入におけるゲノム上の安全部位) に挿入した。得られたクローン細胞を解析し、JSAP の発現亢進は、確かに異数性を誘導することが分かった (図 1)。次に、JSAP の発現抑制が細胞にどのような影響を与えるかを検討した。フローサイトメトリーを用いて細胞周期への影響を調べたところ、JSAP 発現抑制は G1 期停止を引き起こす可能性が示唆された。一方、異数性の誘導は、今回の 1 細胞ゲノム解析では認められなかった。さらに、リアルタイム PCR 法を用いた解析を行った。その結果、JSAP 発現抑制に伴い、MAD2 や BUB1 など、紡錘体形成チェックポイントの鍵分子の発現が顕著に低下することを見出した。</p> <p>以上より、JSAP は染色体安定性維持の新規制御因子であり、JSAP の異常 (機能喪失・発現亢進) は染色体不安定性を誘導すると考えられる。今後、JSAP がどのように染色体安定性を制御しているのか、その分子機構を明らかにする予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	鈴木 隆介, Odongoo R, 岩淵 禎弘, 橋本 真一, 善岡 克次: Role of the adaptor protein JSAP2 in chromosome stability. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 3 日
	【その他特筆事項】	なし

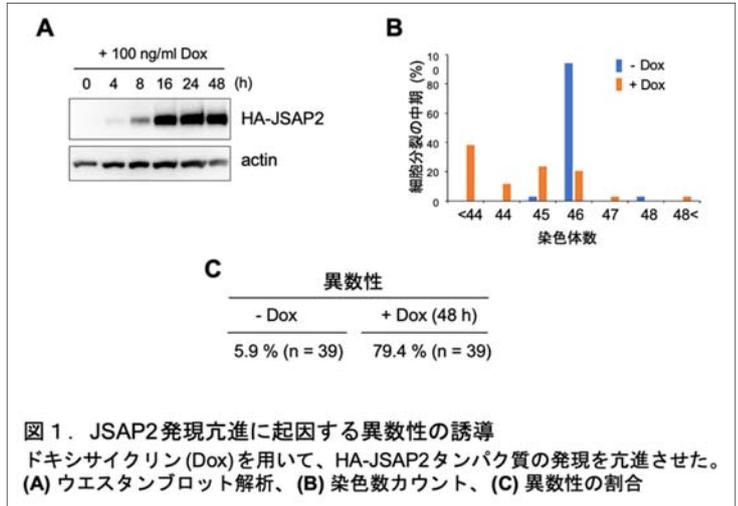


図 1. JSAP2発現亢進に起因する異数性の誘導
ドキシサイクリン(Dox)を用いて、HA-JSAP2タンパク質の発現を亢進させた。
(A) ウェスタンブロット解析、(B) 染色体数カウント、(C) 異数性の割合

研究課題		腸内細菌により産生される代謝脂質の大腸がん発症および悪性化における役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪市立大学・助教・神谷知憲
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪市立大学・教授・大谷直子
	所属・職名・氏名	大阪市立大学・大学院生/医員・楠由希奈
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	近年、ヒトがリノール酸を代謝する経路の他に、細菌が持つ特有の酵素により抗炎症効果や抗肥満効果のある脂肪酸に変換される経路が明らかにされた(Kishino et al. PNAS, 2013, Miyamoto et al. Nat Commun, 2019)。しかし、これら脂肪酸の発がんとの関係性については明らかとなっていない。さまざまな腸内細菌代謝物が存在し、機能未知なものが多い中、同一物質から異なる代謝産物を作り、かつ働きが異なる性質は、共生関係の代謝バランスがどのように保たれているかを示す有用な情報となり得る。そこで本研究では、発がんトリノール酸との関係性について注目し、大腸癌(原発巣)形成への影響を明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>【研究結果】</p> <p>前年度と同様のプロトコルにて実施し、再現性を検証した。多段階遺伝子変異大腸がんモデルマウス(ATP: <i>Apc</i>^{Δ716}, <i>Tgfbr2</i>^{M/R}, <i>Trp53</i>^{SL-R270H}, <i>Villin-CreER</i>)(Oshima et al. Cancer Res 2018)を用い、必須脂肪酸であるリノール酸の働きを確認するために、リノール酸(LA)含有量の異なる2種類の餌(2%LA-HFD or 12%LA-HFD, HFD:60kcal%脂質)を作成した。高脂肪食(HFD)となるため、対照群である低リノール酸含有食については、脂質含有量が通常の群も設けた。ATPマウスにリノール酸含有量の異なる餌を離乳時から、安楽死させるまでの間給餌し、小腸、及び大腸の病理所見にて、腫瘍形成数を確認した(図1)。その結果、いずれの群間においても有意な変化を捉えることはできなかった。</p> <p>今回使用したマウスモデルでは p53 変異も誘導しているため、腫瘍の中には癌化しているものも散見された。リノール酸の癌化への関与を確認するために、病理所見からポリープ、癌、浸潤癌を区別した(図1)。しかしながら、こちらも有意な変化は認められなかった。</p> <p>【考察/展望】</p> <p>上記の結果から、昨年度の結果の再現性を得ることは出来なかった。今回の研究では、多段階遺伝子変異モデルにてリノール酸の効果を検証しており、主に小腸での腫瘍形成に焦点を当てている。宿主のリノール酸代謝物はプロスタグランジン、細菌の代謝物は水酸化脂肪酸であり、どちらも炎症に関与する生理活性物質である。リノール酸の大腸癌への効果を検証するには大腸炎を起因とした癌について焦点を当てる必要があると考えられる。そこで今年度は、上記の <i>Tgfbr2</i> 欠損マウスを用いて、潰瘍性大腸炎モデルに使用するデキストラン硫酸ナトリウムを用いて大腸炎を誘導し、大腸癌モデルの導入し(Oshima et al. Cancer Res 2015)、癌化の確認まで完了した(図2)。今後は本モデルを用いてリノール酸の効果を検証していきたい。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>【学会発表】</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

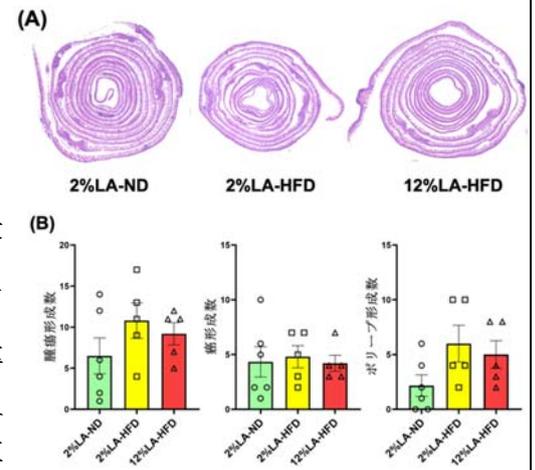


図1. 大腸癌に対するLAの効果を検証した
(A)小腸のスイスロール(HE染色)から腫瘍形成数、発癌部位を計測した。
(B)計測結果(腫瘍, 癌, ポリープ形成数)を各群グラフ化した
LA ... リノール酸, HFD ... 高脂肪食(60kcal% fat), ND ... 通常食

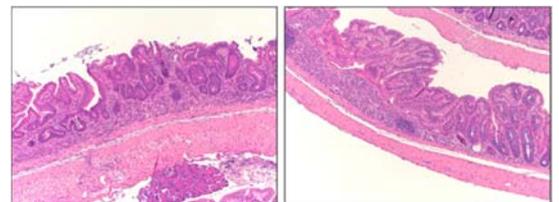


図2. 潰瘍性大腸炎誘導型の大腸ガンモデルを導入したDSS誘導型の大腸炎をTgfbr2大腸上皮細胞欠損マウスに誘発させた結果、大腸癌の所見が確認された。

研究課題		インターロイキン11産生癌関連間質細胞による大腸癌形成促進機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東邦大学・助教・仁科隆史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東邦大学・教授・中野裕康
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>申請者は新規に樹立したレポーターマウスを用いた予備的研究から、大腸がん増悪に働くサイトカインインターロイキン(IL)-11が、がん細胞ではなく、その周囲に存在する間質線維芽細胞で特異的に産生されていることを見出した。</p> <p>本研究では、いまだ不明ながん関連間質細胞の腫瘍形成促進機構を明らかにするために、IL-11産生がん関連間質細胞の特性を明らかにすることを目的とする。</p> <p>特に本共同研究においては、腫瘍オルガノイドを用いて腫瘍移植時に認められるがん関連間質細胞の特性を明らかにすることを研究目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>本研究は、IL-11を産生する癌関連間質細胞(IL-11 producing cancer-associated fibroblasts; 11CAFs)の特性解明のために、以下の項目を遂行した。</p> <p>① IL-11産生がん関連線維芽細胞の特徴の解明</p> <p>大腸がんマウスモデルを用いて、腫瘍形成に関わるIL-11産生細胞の特徴を解析した。具体的には、IL-11遺伝子プロモーター下流で蛍光タンパク質EGFPを発現するように組換えを行ったマウスを用いて、大腸がんモデルマウスを作製した。大腸がんモデルとして、炎症誘発性大腸がんモデルマウスならびに、がんオルガノイドを用いた移植モデルマウスを作製した。これらの腫瘍マウスにおいてEGFPを指標にIL-11産生細胞をFACSにより分取、タンパク質発現や、遺伝子発現情報の比較を行った。その結果、通常の大腸組織では、EGFP陽性細胞は認められないが、炎症誘発性大腸がんモデルマウスのがん組織においては、EGFP陽性細胞が認められた。さらにIL-11産生細胞の多くは、CAFsのマーカーとして用いられるVimentinやPodoplaninが陽性である一方、alpha-smooth muscle Actin陰性の線維芽細胞であることが分かった。また、遺伝子発現解析の結果から、IL-11産生細胞では、他の間質細胞と比較して、管腔形成や組織修復を促す遺伝子を高く発現していることが明らかとなった。同様に、がんオルガノイドを用いた移植モデルマウスにおいても、がん間質領域にIL-11産生細胞が認められた(図1)。解析の結果、IL-11産生細胞はVimentinなどを産生する線維芽細胞であることを見出した。</p> <p>② IL-11産生がん関連線維芽細胞(11CAFs)の特性の解明</p> <p>IL-11機能欠損マウスを用いて大腸がんモデルマウスを作製し解析したところ、IL-11の機能抑制により腫瘍形成数が減少することが確認された。このことから、11CAFsはIL-11を介して腫瘍形成促進に寄与していることが考えられるが、他の機構を介して腫瘍形成を促進している可能性も考えた。実際、上記のモデルマウスを用いて同定した遺伝子発現情報ならびにヒト大腸がん組織の遺伝子発現情報を解析したところ、11CAFsで特異的な発現認められる遺伝子の多くは、ヒト大腸がん間質でも発現が亢進しており、一部患者の予後の悪さと相関を示すことが分かった。現在、さらなる解析を進めている。なお上記の研究成果の一部は、Nature commun誌にて報告した。</p>	

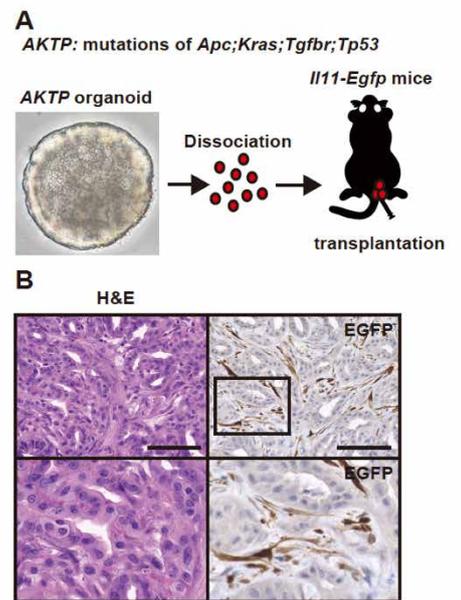


図1 腫瘍オルガノイドの移植により腫瘍周囲にIL-11産生間質細胞が認められる。
A 腫瘍オルガノイドの移植方法
腫瘍オルガノイドを分散後、レポーターマウスに同種同所移植を行った。
B 腫瘍オルガノイド移植後組織のHE染色とEGFPに対する免疫染色
腫瘍周囲にEGFP陽性IL-11産生細胞が認められる。

【主な論文発表】

1. **Nishina T***, Deguchi Y, Ohshima D, Takeda W, Ohtsuka M, Shichino S, Ueha S, Yamazaki S, Kawauchi M, Nakamura E, Nishiyama C, Kojima Y, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Nakayama M, **Oshima M**, Yagita H, Shibuya K, Mikami T, Inohara N, Matsushima K, Tada N, **Nakano H***. Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer.
Nat Commun, 12, 2281, 2021. (*; co-correspondence)
2. Kojima Y, **Nishina T**, **Nakano H**, Okumura K, Takeda K. Inhibition of Importin β 1 Augments the Anticancer Effect of Agonistic Anti-Death Receptor 5 Antibody in TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Resistant Tumor Cells.
Mol Cancer Ther, 19, 1123-1133, 2020.
3. Takeda W, **Nishina T***, Deguchi Y, Kawauchi M, Mikami T, Yagita H, Nishiyama C, **Nakano H**. Stromal fibroblasts produce interleukin 11 in the colon of TNBS-treated mice.
Toho J Med, 6 (3), 111-120, 2020. (*; correspondence)

【学会発表】

1. **仁科隆史**、「Interleukin-11 産生がん関連間質細胞による大腸がん形成促進機構の解明」、「生体組織の 4 次元モデリング機構破綻による疾患発症・重症化メカニズムの解明と医療技術シーズの創出」
第 1 回 TUGRIP 研究発表会、2020 年 7 月 14 日、東京

【その他特筆事項】

本共同研究成果の一部は、プレスリリースを行い、以下のメディアにて紹介していただいた。
EurekaAlert! 2021 年 4 月 22 日

- A new study identifies interleukin 11 as a marker of cancer-associated fibroblasts

ScienMag 2021 年 4 月 22 日

- A new study identifies interleukin 11 as a marker of cancer-associated fibroblasts

Bioengineer.org 2021 年 4 月 22 日

- A new study identifies interleukin 11 as a marker of cancer-associated fibroblasts

MedicalXpress 2021 年 4 月 22 日

- A new study identifies interleukin 11 as a marker of cancer-associated fibroblasts

Infosurhoy 2021 年 4 月 22 日

- A new study identifies interleukin 11 as a marker of cancer-associated fibroblasts.

The Medical News 2021 年 4 月 22 日

- Interleukin 11-producing fibroblasts can be potential therapeutic targets for treating colorectal cancer

Ebiotrade 2021 年 4 月 25 日

- 白细胞介素 11 是癌症相关成纤维细胞的标记物

研究課題		予後不良な膵臓癌における新規上皮遺伝子維持機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学・助教・丹下正一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	膵臓癌は現在においても5年相対生存率が10%弱にとどまっているなど、依然として根治が難しい腫瘍の一つに挙げられている。申請者は、悪性度の高いサブタイプの膵臓癌の識別が可能な遺伝子を特定することにより、治療方針の策定に資する情報の迅速な提供が可能になると考え、予後不良膵臓癌特異的なマーカーの探索研究を開始した。これにあたり、米国の公共データベースに収録されているRNA-Seq情報を用いた網羅解析を行った。この結果、機能未知な遺伝子 <i>X</i> の高発現が患者の全生存期間の短縮と有意に相関していることを見出した。このため申請者は、腫瘍形成の過程においてこの遺伝子が貢献する可能性を検討することを目的に研究を開始した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>遺伝子<i>X</i>が細胞増殖に寄与する可能性を検証するため、膵臓がん細胞株SUIT-2を用いて<i>X</i>をノックダウンした際の細胞の増殖をMTT法により検討した。これにより、<i>X</i>特異的siRNAを導入した細胞群では、コントロール群に比べて優位に増殖能力が低下することが示された(図1)。</p> <p><i>X</i>遺伝子をノックダウンしたSUIT-2細胞株とコントロールsiRNAを導入したSUIT-2細胞株からRNAを抽出してRNA-Seqを行い、更にGSEA解析によって群間で発現レベルが異なる遺伝子セットを探索した。この解析により、MYCをはじめmTOR、E2Fといった腫瘍の進展に寄与する遺伝子の標的発現レベルが<i>X</i>のノックダウンによって著明に低下することを見出した。また、一炭素基代謝経路の遺伝子群やヒストンH3のメチル化を通じて腫瘍の悪性化に貢献する<i>EZH2</i>も<i>X</i>のノックダウンによって著明に発現が低下していることが確認された(図2)。この結果から、<i>X</i>の機能を阻害することにより多岐にわたる腫瘍特有の遺伝子発現プロファイルが抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、<i>X</i>は予後不良な膵臓がんのマーカーとしてのみならず治療標的としても有用であることが示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	Tange S et al. Identification of novel epithelium-specific gene in malignant pancreatic cancer 第79回日本癌学会学術総会 2020年10月1日~3日、広島
	【その他特筆事項】	

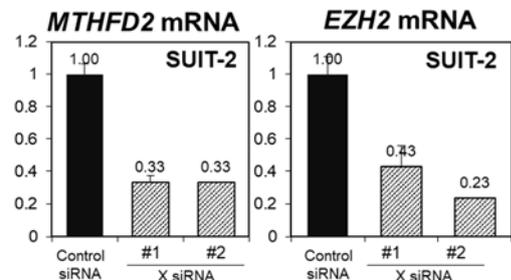
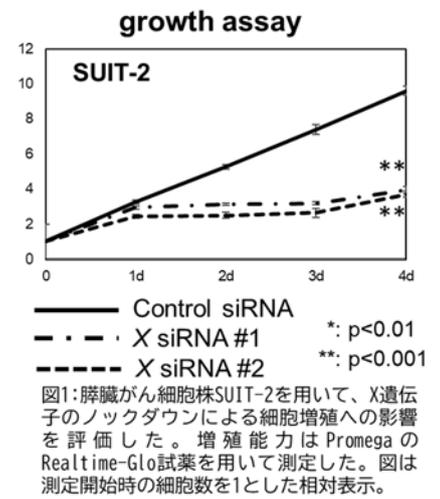


図2: 一炭素代謝経路のMTHFD2遺伝子、およびヒストンH3メチル化酵素EZH2の発現量を定量PCRによって求めた。いずれの遺伝子も、*X*のノックダウンによって発現量の減少が認められた

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸癌における循環腫瘍DNAを用いた抗EGFR抗体薬耐性の検出と病状モニタリングの確立
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋市立大学 消化器代謝内科学・准教授・久保田英嗣
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 胃腸外科・講師・中村 慶史
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田 武
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍制御研究分野 教授・源 利成
【研究目的】	本研究の目的は、RAS野生型切除不能大腸癌患者において、治療前に循環腫瘍DNA(ctDNA)における上皮成長因子受容体(EGFR)経路関連遺伝子の変異や増幅を検出することにより、ctDNAによる抗EGFR抗体薬の効果予測の可能性を検討することである。さらに、抗EGFR抗体療法を行っているRAS野生型切除不能大腸癌患者において、ctDNAにおけるEGFRシグナル経路に関連する複数の候補遺伝子の変異や増幅を経時的に検索することにより、ctDNAによる病状モニタリングの可能性を検討することである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>金沢大学と名古屋市立大学、その他の研究協力施設の倫理審査委員会の承認を得て、RAS遺伝子野生型の切除不能進行再発大腸癌と診断され、上皮成長因子受容体(EGFR)抗体薬を併用した化学療法を行う症例を対象に臨床研究を開始した。具体的には、化学療法開始前と開始4週後、10週後、以後10週間隔で病状進行(PD)まで、循環腫瘍DNA(ctDNA)抽出用の血液採取を行った。また、血液採取と並行して、腫瘍マーカー検査、CT検査などで病状の評価を行った。2021年3月に、目標としていた50例の登録と検体の採取は完了したが、うち39例の化学療法前・PD後の検体については、血漿からctDNA抽出を行った後、デジタルPCR法を用いて、EGFR抗体薬耐性関連候補遺伝子の変異解析を終了している。並行して、化学療法前に得られ、保存されていた組織検体の集積も行なっており、同検体からのDNA抽出と(次世代シーケンス法を用いた)癌関連遺伝子の変異解析も終了している。</p> <p>今後、未解析の症例について、化学療法開始前・PD後のctDNA解析を行う予定である。また、化学療法開始前もしくはPD後のctDNAにおいて、EGFRシグナル経路関連遺伝子の変異が同定された症例に関しては、経過中に採取されたctDNAについても変異検索を行い、経過のどの時点で変異が出現したのか、また変異頻度はどのように経過したのかを明らかにする。</p> <p>そして得られたctDNAの変異データ、また組織由来DNAの変異データと臨床情報の3者を比較することにより、ctDNAは組織の遺伝子変異をどの程度反映しているのか、ctDNAによって化学療法開始前にEGFR抗体薬の治療効果予測が可能かどうか、さらに、化学療法中に治療効果のモニタリング、治療無効の早期判定が可能かどうかなどを検討することとしている。</p> <p>本研究開始以前に、RAS野生型切除不能進行再発大腸癌の23症例においてctDNAの変異解析を行い、予備的なデータを得ていた。それらの症例に関して、次世代シーケンス法を用いて、原発巣18病変と転移巣8病変の癌関連遺伝子の変異解析を行った。原発巣と転移巣の遺伝子変異を比較することにより、腫瘍の不均一性の有無を検討した。さらに組織由来DNAとctDNAの遺伝子変異を比較することにより、ctDNAがどの程度組織由来DNAの遺伝子変異を反映しているのかを検討した。この予備的データを用いた研究結果は、現在論文として学術雑誌に投稿している。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍細胞死誘導と抗 PD-1 抗体併用時の抗腫瘍応答増強の分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・助教・守屋大樹
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大谷大学薬学部・教授・戸村道夫
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	免疫炎症制御分野・教授・須田貴司
【研究目的】	<p>令和元年度の須田教授との共同研究により、抗腫瘍効果が認められない低用量の抗 PD-1 抗体の単回投与時に、ジフテリアトキシン(DT)によって DT 受容体(R)発現腫瘍に細胞死を誘導すると、抗腫瘍応答増強が認められることを明らかにした。腫瘍細胞死誘導と併用時の抗 PD-1 抗体の主な作用点を解明できれば、その作用点を増強する抗がん剤と、低用量の抗 PD-1 抗体の併用でさらなる抗腫瘍応答増強が期待できる。</p> <p>そこで、本申請課題では腫瘍細胞死誘導と併用時の、抗 PD-1 抗体の主な作用点について解明することを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>腫瘍の退縮に重要な抗原特異的 CD8⁺T 細胞は主に腫瘍所属リンパ節(dLN)にて樹状細胞(DC)等の抗原提示細胞に抗原提示されることで活性化される。低用量抗 PD-1 抗体と腫瘍細胞死誘導の併用による抗腫瘍応答増強には、抗原特異的 CD8⁺T 細胞の dLN への移行促進や、dLN 内での停留増強を介した抗原提示増強がみられることが想定されるものの不明である。</p> <p>本研究では、紫色光照射で緑から赤に変換する光変換タンパク質 KikGR を全細胞が発現する KikGR マウスを用い、dLN 内での CD8⁺T 細胞の入れ替わりに着目して解析を試みた。</p> <p>昨年度までの研究と同様、腫瘍細胞死誘導のために DTR とモデル抗原として OVA を発現させた大腸ガン細胞株 MC38 (MC38-OVA/DTR)および、OVA 発現メラノーマ細胞株 B16-OVA を KikGR マウスに接種した。腫瘍接種 5 日目に抗 PD-1 抗体投与、あるいは抗 PD-1 抗体投与と共に DT 投与による腫瘍細胞死を誘導した(併用群)。その 2 日後に MC38-OVA/DTR 腫瘍の切除に加え、MC38-OVA/DTR の dLN に紫色光照射し、dLN の細胞を全て赤色 (KikGR-Red)にマーキングした。24 時間後に dLN 内の細胞を回収し OVA 特異的 CD8⁺T 細胞を OVA tetramer⁺細胞としてフローサイトメトリーにて検出した。</p> <p>対照群と比較して、OVA tetramer⁺細胞数は抗 PD-1 抗体投与群では増加傾向が認められ、併用群では有意に増加していた。さらに、OVA tetramer⁺細胞を、OVA 抗原に対する親和性の違いで OVA tetramer^{high} と OVA tetramer^{int}細胞に分けて解析した。その結果、対照群と比較して抗 PD-1 抗体投与群の OVA tetramer^{high}細胞と OVA tetramer^{int}細胞、併用群の OVA tetramer^{high}細胞は増加傾向、併用群の OVA tetramer^{int}細胞は有意な増加が認められた。これらの結果は、抗 PD-1 抗体が腫瘍抗原低親和性 CD8⁺T 細胞を誘導し、さらに腫瘍細胞死誘導が、これら細胞をより増加させた可能性を示している。そこでさらに、OVA tetramer^{int}細胞について、KikGR による細胞動態と DRAQ5 による細胞周期の同時解析を実施すると、併用群では dLN に留まった KikGR-Red OVA tetramer^{int}細胞で G₂/M 期の細胞数が有意に増加していた。</p> <p>代表者はこれまでに、腫瘍細胞死誘導が腫瘍抗原を有する DC の dLN への移行を促進することを明らかにしている。また、腫瘍抗原低親和性 CD8⁺T 細胞も高親和性細胞と同様に抗腫瘍免疫に貢献しうることが報告されている。以上より、併用群の dLN では、腫瘍細胞死誘導により増加した腫瘍抗原を有する DC が、抗 PD-1 抗体投与により誘導された腫瘍抗原低親和性の CD8⁺T 細胞の増殖をより強く促進することで dLN 内での細胞数を増加させ、最終的に、抗腫瘍応答増強に繋がったことが考えられた。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

研究課題		2光子励起顕微鏡を用いた膵癌細胞の血行性肝転移と加齢との関連の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	香川大学医学部腫瘍病理学・助教・成澤裕子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	香川大学医学部腫瘍病理学・教授・松田陽子
	所属・職名・氏名	香川大学医学部腫瘍病理学・技官・山川けいこ
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>難治性癌の代表である膵癌の罹患率は60歳から上昇し、高齢になるほど高くなることから、加齢が膵臓の発癌が癌進展を促進すると考えられている。癌の進行制御には転移の制御が極めて重要である。そこで本研究では、加齢が膵癌の肝転移にどのような影響を与えるのかを解明するために、若年マウスと高齢マウスでの血行性肝転移における癌細胞の動態について、2光子励起顕微鏡を用いた <i>in vivo</i> imaging 解析で明らかにする。</p> <p>本研究から、転移のメカニズムの解明だけでなく、加齢の影響を評価することで、高齢者癌における、癌を根絶させることではなく、如何に癌と共存できるかという考えからの天寿癌を目指す一助となることを期待する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>7週齢(若齢)および108週齢(老齢)の雄性C57BL/6マウスに、膵癌細胞株を脾内移植する血行性肝転移モデルを用いた。移植する膵癌細胞株はC57BL/6マウス由来の膵癌細胞株であるKPC細胞(ximbio)を用いた。本研究ではC57BL/6マウス由来の膵癌細胞であるKPC cellを用いることで生体内により近い環境で実験を行っている。</p> <div data-bbox="403 846 965 1220" data-label="Image"> <p>図1: 2光子励起顕微鏡により観察した肝臓 励起波長 760 nm (左) 励起波長 860nm (右) Hoechst 陽性 KPC 細胞 (矢印)</p> </div> <p>イソフルラン吸入麻酔下にて、マウスの脾臓を体外に取り出し、KPC細胞と70kDa Dextranの混合懸濁液を脾臓内へ注入した。その後、すぐに肝臓を体外へ引き出し、マウス吸引型固定装置(Olympus)を用いて肝臓を吸引圧30mmHgにて吸着させ、視野を確保した。2光子励起顕微鏡(Olympus, FV1000MPE)、レーザー照射装置(Chameleon, Ultra-IIMP laser)にて肝臓を観察した。</p> <p>励起波長760nmと860nmで肝臓を観察し、それぞれ100μmの深さまでの3D画像を取得した(図1)。励起波長760nmにて100μmの中のHoechst陽性細胞の個数をカウントし、励起波長860nmにて血管径、分岐の計測を行った。70kDa Dextranにより描出された血管の分岐は、MetaMorph®イメージングソフトウェアAngiogenesis Tube Formation Application Moduleを用いて血管径、血管分岐の数を計測した。肝臓の血管においては、若齢マウスよりも老齢マウスのほうが血管径は有意に太く、血管分岐数も有意に多かった。また、肝臓内に認められたHoechst陽性細胞(KPC細胞)は若齢マウスのほうが多い傾向があり、肝臓内で留まっている傾向が認められた。</p> <div data-bbox="403 1429 1492 1747" data-label="Figure"> <p>図2: 肝臓の血管径、血管分岐および肝臓内に認められたHoechst陽性KPC細胞 *: There are significant differences compared with Young groups. (P<0.05)</p> </div>	
	<p>さらに、本手法を用いた血行性肝転移モデルでは、KPC細胞の脾内移植から2週間以降に肝臓に転移結節が形成される。そこで血行性肝転移巢形成に加齢による影響がみられるのかを明らかにするため、現在脾内移植から2週間以降で検討を行う長期の実験が現在進行中である。長期の実験では、転移結節内の腫瘍血管径、血管分岐に加齢による違いがあるのかを検討するために、KPC細胞を脾内移植後2週間以降のマウスにおいて、転移結節の2光子励起顕微鏡による観察を行う。2光子励起顕微鏡による観察前に、肝臓を体外へ引き出し、肝臓表面に認められる白色結節にマウス吸引型固定装置を装着する。70kDa Dextranを眼静脈より注入し、2光子励起顕微鏡により転移結節内の血管を100μmの深さまでの3D画像として取得する。2光子励起顕微鏡による画像取得後はホルマリン固定し、病理組織学的検討を行う予定である。</p>	

*

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Juanjuan Y, Yokohira M, Matsuda Y. Comparison of the effect of culture medium on unfixed rat pancreatic tissue in two-photon excitation microscopy. Pers Med Univers. 2020 9:27-32.
	【学会発表】 Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Juanjuan Y, Yokohira M, Matsuda Y. Autofluorescence image of unstained live cells by a two-photon microscopy. 第79回日本癌学会学術総会, 広島, 2020年10月1-3日 成澤 裕子, 山川 けいこ, 横平 政直, 松田 陽子. 2光子顕微鏡を用いた自家蛍光による未染色生細胞の形態的解析. 第109回日本病理学会総会 福岡 2020年7月1日-31日
	【その他特筆事項】 なし

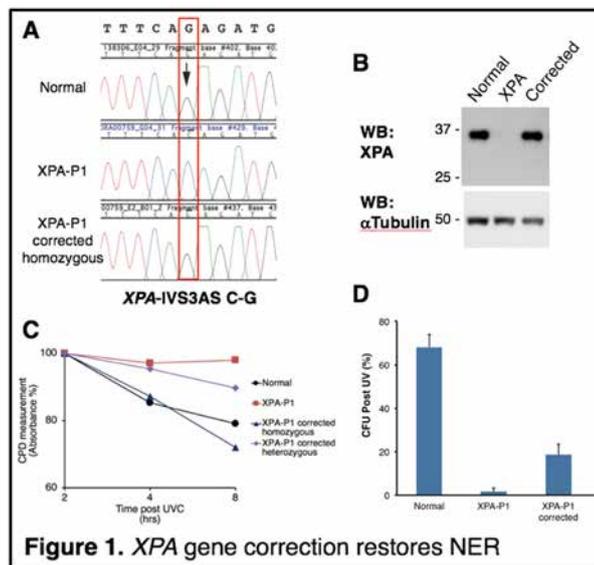
令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		慢性骨髄性白血病の新規病態モニタリング技術の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部・助教・森下総司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部・教授・小松則夫
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia: CML) では、チロシンキナーゼ阻害薬に対して抵抗性を示す CML 幹細胞の排除が、CML の新たな治療戦略として期待されているため、CML 幹細胞の存在を検出できる新たな手法が、今後の CML の病態モニタリングに必要なと考えられる。これを踏まえ、本研究は、CML 患者末梢血中のエクソソームや、血中循環 DNA (circulating cell free DNA: ccfDNA) などの細胞外核酸中の <i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子を標的とした遺伝子定量技術を構築し、CML 治療の過程における <i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子数の推移を明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p><i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子の融合点 (breakpoint: BP) は、患者によって異なることが知られている。そこで本研究ではまず、CML 患者由来細胞株を用いて、それぞれの細胞株の <i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子の BP を同定するための技術確立を目指した。本技術には次世代シーケンサーを用いた配列の解読を含むが、容易な BP 同定のため、BP のホットスポットとなる領域 (<i>BCR</i> 遺伝子のエクソン 12-15) に相補的な、ビオチン標識された RNA プローブを作製し、これをゲノム DNA と反応させることによって、ゲノムから <i>BCR/ABL1</i> を含む配列を濃縮できるか検討を行なった。</p> <p>RNA プローブ作製のため、CML 由来細胞株である K562 株より抽出したゲノム DNA から、<i>BCR</i> 遺伝子のエクソン 12-15 の領域 (約 4.5 kbp) を PCR により増幅した。増幅した領域を鋳型として、<i>in vitro</i> 転写によりビオチン標識 RNA を得た。これを 100nt 以下の長さとなるようソニケーションにより断片化し、RNA プローブを作製した。続いて、<i>BCR/ABL1</i> 融合遺伝子を有する 3 種の細胞株 (K562, TCC-S, KCL-22) からゲノム DNA を抽出し、ソニケーションによりゲノム DNA を 150bp 程度に断片化した。これを、作製した RNA プローブにハイブリダイズさせたのち、結合した DNA-RNA 鎖をストレプトアビジンコートされた磁性ビーズで回収した。回収された配列を次世代シーケンサーで解読すると、3 種の細胞株全てで <i>BCR/ABL1</i> BP を同定できることがわかった。さらに、同定した <i>BCR/ABL1</i> 遺伝子のコピー数定量のため、デジタル PCR 法による定量系の構築を行なった。同定した BP 周辺で細胞株ごとにプライマーを設計し、SYBR Green 法をベースとしてコピー数の定量を試みたところ、計算上見積もられる値に近い測定値を得ることができ、3 種の細胞株全てにおいて、<i>BCR/ABL1</i> BP のコピー数を定量できることがわかった。</p> <p>構築した定量系をヒト検体へ応用するため、15%緩衝ホルマリンで固定化された CML 患者 6 名の初診時骨髄検体を用いて同様の検討を行ない、<i>BCR/ABL1</i> BP の同定に成功した。現在、これら 6 検体について、<i>BCR/ABL1</i> BP 周辺での定量系の構築を行なっている。定量系を確立し次第、保存済みの CML 患者血漿由来 ccfDNA 中の <i>BCR/ABL1</i> コピー数を定量する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞における受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・助教・周 越
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井 宏明
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	<p>受容体型チロシンキナーゼ EphA2 は、正常細胞において、リガンドが結合するとチロシンキナーゼの活性化が誘導され、Tyr 残基のリン酸化が促進されることで細胞間接着を強固に保つ。がん細胞においては、ERK の下流キナーゼ RSK を介して EphA2 の Ser-897 残基のリン酸化が誘導され、がん細胞の遊走や浸潤を亢進させる。この Ser リン酸化は EphA2 のチロシンキナーゼ活性に依存せず、従来知られてきた EphA2 の Tyr リン酸化とは反対にがんの悪性化を誘導する。したがって、Ser リン酸化型 EphA2 は、がんの病態制御における次なる標的となりうる。しかし、そのリン酸化機構や生理機能については未解明な部分が多く、その解析が急務となっている。本研究では、新たな EphA2 Ser-897 のリン酸化機構の解明を目指した。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>増殖因子や発がん遺伝子によって ERK 活性が亢進することで、下流の RSK の活性化が誘導され、RSK が直接 EphA2 の Ser リン酸化を触媒する。細胞内ストレスが誘導されると、ERK の活性化は誘導されるが、ERK よりも同じ MAP キナーゼに属するストレス応答キナーゼ p38 の活性化が強く誘導される。EphA2 のリン酸化における p38 の寄与については未解明であるため、本研究では、p38 による EphA2 Ser-897 リン酸化の制御機構を解析した。</p> <p>HeLa 細胞に対し増殖因子を作用させた際の EphA2 のリン酸化は p38 阻害剤で抑制されなかった。しかし、細胞内ストレスを誘導するタンパク質合成阻害剤アニソマインや白金製剤シスプラチンなどで誘導される EphA2 のリン酸化は p38 阻害剤によって抑制された。その制御機構を調べたところ、p38 は EphA2 のリン酸化を直接制御する RSK の活性化を調節することがわかった。しかし、RSK の活性化に必要なリン酸化部位周辺のアミノ酸配列と p38 の基質コンセンサス配列の相同性は低かったため、p38 が直接 RSK のリン酸化を触媒する可能性は低いと考えた。そこで、p38 の下流キナーゼ MK2 に着目した。RSK のリン酸化部位周辺のアミノ酸配列と MK2 の基質コンセンサス配列の相同性は高く、HeLa 細胞では MK2 阻害剤により RSK、EphA2 のリン酸化が抑制された。また、矢野教授の研究室で樹立されたクリゾチニブ耐性化 ALK 陽性肺癌細胞株 A925LPE3-CR#4 において、恒常的な EphA2 のリン酸化が誘導されていたが、このリン酸化は MK2 阻害剤によって抑制された。以上のことから、細胞内ストレスや薬剤耐性によって p38-MK2 経路が活性化し、MK2 が直接 RSK の活性を調節することで EphA2 のリン酸化を制御することが明らかとなった。RSK-EphA2 経路は細胞遊走を制御する。そこで、次に p38-MK2 経路が RSK-EphA2 の活性化を介して細胞遊走に関わるかを検討した。HEK293 細胞を用いた過剰発現系では、p38-MK2 シグナルは RSK-EphA2 経路を介して細胞遊走を亢進させた。また、A925LPE3-CR#4 細胞において MK2 阻害剤は細胞遊走を抑制した。以上のことから、p38-MK2-RSK-EphA2 経路は細胞運動を制御することが明らかとなった。今後は MK2 と ERK による RSK の活性化制御の違いなどを明らかにしていく予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 1. Yue Zhou, Ryota Oki, Iori Yamahata, Yokoyama Satoru, Hiroaki Sakurai. Regulation of cancer cell malignancy via MK2-RSK-EphA2 axis. 第79回日本癌学会学術集会 (2020年10月1-3日、広島) 2. 周越, 横山悟, 櫻井宏明. ストレス応答キナーゼ p38 による RSK-EphA2 経路の制御機構. 第24回日本がん分子標的治療学会 (2020年10月6-8日、徳島) 3. 周越, 大木良太, 田中章裕, 山畑伊織, 横山悟, 櫻井宏明. Regulation of cancer cell motility via p38-MK2-RSK-EphA2 axis. 第43回日本分子生物学会年会 (2020年12月2-4日、オンライン)
	【その他特筆事項】	なし

研究課題		Establishment of a skin cancer model using iPSCs-derived keratinocytes from Xeroderma pigmentosum patients
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学 iPS 細胞研究所・特定研究員・Fabian Ocegueda-Yanez
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学 iPS 細胞研究所・准教授・Knut Woltjen
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	Xeroderma pigmentosum (XP) is caused by mutations in the components of the nucleotide excision repair (NER) pathway. Patients lacking XP gene components develop skin cancer due to increased sensitivity to sunlight. I aimed to model skin carcinogenesis using keratinocytes differentiated from XPA patient-derived iPSCs to identify driver genes involved in cancer progression.	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>In order to elucidate genes/pathways required for the progression of skin cancer, I aim to establish a functional assay that recapitulate skin cancer progression using keratinocytes derived from iPSCs of XPA-genetic background.</p> <p>The <i>XPA</i> IVS3AS G-C mutation leads to loss of functional XPA protein, rendering cells unable to activate the NER. XPA iPSCs were reprogrammed from XPA-patient derived fibroblasts provided by Professor Kenji Kabashima of Kyoto University Hospital. The strategy to generate isogenic control cells consisted of repairing the <i>XPA</i> IVS3AS G-C mutation using CRISPR/Cas9 gene editing with single-stranded oligonucleotides (ssODNs). Two different XPA iPSCs lines obtained from distinct donors were targeted and successfully corrected. Correction of the <i>XPA</i> locus was confirmed using Sanger sequencing and Southern blotting; restoration of the XPA protein expression was confirmed using Western blot analysis. The XPA corrected isogenic cell lines will provide with a genomic reference to compare the XPA genotype within a similar genetic background.</p> <p>The <i>XPA</i> IVS3AS G-C mutation inactivates NER, rendering cells highly sensitive to UV-light exposure, resulting in increased mutation rates. In order to test NER function, cells were subjected to UV irradiation. UVC treatment (1 J.m⁻²) of normal, XPA and gene-corrected iPSCs generated DNA mutations that were identified using anti-cyclobutane pyrimidine dimers (CPD) antibodies. It was observed that both normal and isogenic control iPSCs were able to repair CPDs and to grow and form colonies after UV-irradiation, whereas XPA-derived iPSCs did not repair CPDs (Figure 1).</p> <p>We previously demonstrated that CRISPR/Cas9 targeting of the AAVS1 locus achieves stable expression of eGFP driven by the CAG promoter in human iPSCs (Ocegueda-Yanez <i>et al.</i>, <i>Methods</i>. 2016). Using this protocol, I engineered the AAVS1 locus in normal, XPA and XPA isogenic iPSCs to express Cas9 constitutively from the CAG promoter. As a proof of principle, I transfected AAVS1-CAG::Cas9 201B7 iPSCs with sgRNAs complementary to the <i>APRT</i> gene and observed the growth of colonies in the presence of 2,6-diaminopurine (DAP) indicating knock-out of <i>APRT</i> and verifying the expression of active Cas9 from the AAVS1 locus. The resulting cells will be used to knock-out tumor suppressor genes in a systematic manner and will aid to validate driver genes required for the progression of malignancy.</p> <p>During the initial stages of cancer, acquisition of driver mutations that lead to clonal expansion and eventually confer to malignancy differ from passenger mutations</p>	



令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	<p>that have no effect on cell survival (Stratton <i>et al.</i>, <i>Nature</i>. 2009). Therefore, the temporal regulation of mutation acquisition is an important feature to understand the exact function of individual mutations during the development of cancer. Combining targeted gene editing by CRISPR/Cas9 and spontaneous mutagenesis by UV treatment, this novel system will allow us to obtain insight into the succession of mutations in genes and pathways altered during malignancy progression.</p>
<p>【成果等】</p>	<p>【主な論文発表】</p>
	<p>【学会発表】</p>
	<p>【その他特筆事項】</p>

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		葉酸代謝経路阻害下における 5-ALA を用いた光線力学療法の評価
研究代表者	所属・職名・氏名	高知大学医学部附属光線医療センター・特任助教・中山 沢
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	高知大学医学部泌尿器科学教室・教授・井上 啓史
	所属・職名・氏名	東京工業大学生命理工学院・准教授・小倉 俊一郎
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	<p>後藤らはこれまでにミトコンドリア内葉酸代謝経路の酵素が他の葉酸代謝経路の酵素と比較してがん細胞特異性が高いことを今までに報告してきた。その中でも MTHFD2 特異性阻害剤はマウス実験において高い服用量でも顕著な毒性なく腫瘍の増大を顕著に抑制した。</p> <p>5-ALA はミトコンドリア内において Glycine および Succinyl CoA より合成される天然アミノ酸の一種である。5-ALA 投与後のがん細胞において、PpIX が蓄積することが明らかとなっている。PpIX は特定の波長によって励起され、蛍光と同時に活性酸素を発生することが知られており、光線力学療法へ臨床応用されている。</p> <p>以上より、本研究ではミトコンドリア葉酸代謝経路の酵素阻害を標的とした治療と 5-ALA を用いた光線力学療法の併用による相乗効果の検証を行うことを目的とした。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>始めに、ヒト乳がん細胞株 4 種、ヒト膀胱がん細胞株 1 種、ヒト前立腺がん細胞株 1 種を用いて、MTHFD2 特異性阻害剤の毒性評価を行い、相乗効果の検証を行う上での最適濃度を探索した (図 1)。濃度 0.1 μM 以上の阻害剤によって細胞増殖が有意に抑制された。また、MTHFD2 阻害の代替経路を誘導するギ酸を投与した際に、細胞生存率が回復したため、阻害剤が特異的に MTHFD2 へ作用したことも確かめられた。</p> <p>続いて、1 mM の 5-ALA を細胞に投与して 630 nm の赤色光を 13.5 mW の強度にて照射し、細胞生存率を測定した。5-ALA 単独投与群と比較して、阻害剤と 5-ALA の共投与群では細胞生存率が極めて低下しており、顕著な併用効果が認められた (図 2)。</p> <p>今後は、細胞内の PpIX 蓄積量の定量、ポルフィリン代謝に関わる酵素およびトランスポーターの遺伝子発現解析、ギ酸投与下における生存率の変化などを検証していくことにより、詳細に MTHFD2 特異性阻害剤が 5-ALA の代謝に及ぼす影響を調査していく予定である。</p>	
	図 1 ヒト乳がん細胞株における毒性評価	図 2 ヒト乳がん細胞株における併用評価
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p>	
	<p>【学会発表】</p>	
	<p>【その他特筆事項】</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳がん幹細胞・乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素の役割
研究代表者	所属・職名・氏名	近畿大学 医学部 生化学教室・講師・古室暁義
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	近畿大学 医学部 生化学教室・教授・岡田 斉
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	乳がんの悪性化において、ヒストン脱メチル化酵素が与える影響は不明な部分が多い。ヒストン脱メチル化酵素である Utx および KDM4B の乳腺組織特異的ノックアウトマウスを用いて、乳がん発症マウス(MMTV-PyMT マウス)に及ぼす影響を検討する。乳がんの発症・増殖・転移の各段階において、個体レベルでの乳がんの悪性化への影響(発症、腫瘍増殖、転移、がん幹細胞やがん微小環境に違いがあるのか)を明らかにする。さらに、乳がん悪性化に関与するメカニズムや原因となる因子を同定・阻害することにより、治療効果が起きるか検討を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>Utx 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (Utx KO; PyMT マウス) では、①腫瘍増殖や肺転移が促進し、②Utx KO; PyMT マウス由来の乳がん細胞を同系 FVB マウスへ同所移植を行うと、PyMT マウス由来の乳がん細胞よりも腫瘍形成能が促進し、ヌードマウスへの尾静脈移植では肺転移が促進した。</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>さらに、③Utx KO; PyMT マウス由来の乳がんオルガノイド樹立して、FACS 解析を行ったところ、Basal type の細胞が増えていることが分かった。そして、④乳がんオルガノイドを I 型コラーゲン内に包埋すると浸潤形態を強く伴いながら増殖したが、この浸潤形態は BET 阻害剤である JQ1 で完全に阻害されることを見出した。次に、⑤RNA-Seq の発現解析から EMT や乳がんの悪性化にかかわる様々な因子についての関与が明らかになった。このうち、Basal-like 乳がんにおいて高発現しており転移を促進する原因因子として報告がある転写因子 X について着目したところ、この転写因子 X の発現には、Utx と Brd4 によるスーパーエンハンサー領域での発現制御が起きていることを示唆する新たな結果を得た。</p> <p>一方、Kdm4b 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (Kdm4b KO; PyMT マウス) から乳がん細胞を採取し、さらに同系 FVB マウスの乳腺に同所移植をしたところ、Luminal type 様の乳がんが発症することが分かった。Kdm4b KO; PyMT マウスの乳がんは、MMTV-Cre により Kdm4b が欠損されるはずであるが、Kdm4b が欠損している乳がん細胞の集団は減少傾向にあり、ほとんどが Kdm4b の欠損を起こしていない乳がん細胞集団になっていることが観察された。このことから Kdm4b の欠損は乳がん細胞の発生もしくは生存維持を抑制する可能性が示唆された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin. Oka N, Komuro A, Amano H, Dash S, Honda M, Ota K, Nishimura S, Ueda T, Akagi M, Okada H. Pharmacology Research & Perspectives . 8(4) e00632. (2020)	
	【学会発表】 第 24 回 日本がん分子標的治療学会学術集会 第 79 回 日本癌学会学術総会	
	【その他特筆事項】 第 24 回 日本がん分子標的治療学会学術集会 「優秀演題賞」受賞	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		腫瘍血管のリモデリングを誘導する新規ミエロイド系サブセットの解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・特任研究員・林 弓美子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・准教授・木戸屋 浩康
	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・特任研究員・村松 史隆
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>腫瘍血管を標的とした癌治療法は、腫瘍組織中でおきる血管新生(angiogenesis)の阻害による酸素・栄養分の供給路の遮断というコンセプトに基づき、開発が進められてきた。しかしながら、大きな期待を受けて登場した腫瘍血管阻害剤(VEGF 阻害剤)は単独使用では抗腫瘍効果が少なく、想定されていたような劇的な治療効果を示すことはなかった。本研究では、腫瘍血管阻害剤に対する治療抵抗性の獲得機構を明らかにするため、生体イメージング解析を行うことでこれまで観察されていなかった腫瘍血管の動態変化に着目している。特にミエロイド系細胞サブセットの分化系譜と細胞動態の解析を進め、新しい治療標的の同定を目指す。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>申請者らによるこれまでの研究から、血管発生期において血管束移動という血管リモデリング現象が起き、その過程に特殊なミエロイド系細胞サブセットが関与することを明らかにしてきた(Kidoya H, et al. Dev Cell 2015)。このミエロイド系細胞は、血管発生期の血管周囲に存在し、血管構造を支えている基底膜を構成するコラーゲンを分解するMMP9を高発現することを特徴とする。本研究では、腫瘍組織における血管束移動の検討および、治療標的としての可能性について解析を進めた。</p> <p>これまでの検討から、腫瘍組織においても発生期と同様のミエロイド系サブセットが存在することを見出しており、この細胞群を新規の「血管制御細胞」として同定している。さらに、この血管制御細胞においてもMMP9を高発現することが確認出来ている。そこで、腫瘍組織における血管制御細胞の特徴を明確にするため、シングルセル遺伝子発現解析を行った。すると、この血管制御細胞はMMP9だけではなく、幾つかの血管関連因子も高発現していることが明らかとなった(遺伝子名に関しては現在論文作成準備中のため、非公開)。また、この血管制御細胞の細胞表面マーカーの同定も進め、いくつかの候補因子を見出している。</p> <p>また、ミエロイド系細胞の動員にはケモカイン系のシグナルが一般的に働くため、血管束移動が起きる際に腫瘍組織に高発現するケモカインの解析を行った。その結果、いくつかのケモカインを同定でき、現在は特定したケモカイン受容体の阻害による抗腫瘍効果の検討を進めている。また、血管制御細胞が腫瘍中で分化している可能性を考え、胆癌モデルマウスにおいて骨髄中のMMP9産生細胞の数が変化するかを検討した。その結果、骨髄内におけるMMP9産生細胞数の増加は認められず、腫瘍内で分化している可能性が高いことが分かった。</p> <p>現在はこれらの検討に加えて、ヒト臨床サンプルにおいて血管制御細胞と予後との関連を明らかにするため、準備を進めている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1. Yohei Tsukada, Fumitaka Muramatsu, Yumiko Hayashi, Chiaki Inagaki, Hang Su, Tomohiro Iba, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura. An in vivo model allowing continuous observation of human vascular formation in the same animal over time. <i>Scientific Reports</i> 2021 11(1) 745 - 745</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. 林 弓美子、木戸屋 浩康. 微小環境変化への適応を生み出す腫瘍血管のダイナミズム. The 4th Neuro-vascular meeting. 2021年3月</p> <p>2. 林 弓美子、木戸屋 浩康、村松 史隆、高倉 伸幸. 血管新生阻害剤抵抗性腫瘍における腫瘍血管の動的変化. 第79回日本癌学会学術総会. 2020年10月</p> <p>3. Yumiko Hayashi, Hiroyasu Kidoya, Fumitaka Muramatsu, Nobuyuki Takakura. Dynamic Changes of Tumor Blood Vessels in Tumors Resistant to Angiogenesis Inhibitors. The 21st International Vascular Biology Meeting (IVBM2020) 2020年9月</p> <p>【その他特筆事項】</p>	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒトサイトメガロウイルス臨床分離株の腫瘍調節遺伝子解析
研究代表者	所属・職名・氏名	北陸大学 薬学部・講師・武本眞清
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>ヒトサイトメガロウイルス (HCMV) は、広くヒトに潜伏感染しているヘルペスウイルスであるが、以前よりがんを悪性化させる腫瘍調節性 (oncomodulation) をもつことが報告されてきた。申請者は、向田教授とのこれまでの共同研究を通して、宿主由来のケモカイン (CK) やケモカイン受容体 (CKR) の発現上昇を HCMV による腫瘍調節性因子として発見し解析してきたが、HCMV 特有のゲノム多型の存在により、CK/CKR を発現誘導するウイルス遺伝子は同定できていなかった。</p> <p>本研究は、CK/CKR に対して高発現誘導と低発現誘導を示す、どちらも臨床分離株である 91-7S と Merlin の全ゲノム塩基配列を網羅的に比較することにより、CK/CKR 発現誘導を担うウイルス遺伝子を同定することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>これまでに HCMV による CK/CKR 発現誘導を確認した細胞は、線維芽細胞株 (MRC-5)、膠芽腫細胞株 (A172、T98G、U373-MG)、大腸癌細胞株 (SW-480、LoVo) など多岐にわたるが、唯一 LoVo では HCMV IE1 および IE2 遺伝子の発現なしに、CK/CKR が発現誘導された。このことは、CK/CKR の発現誘導にウイルス遺伝子発現が不要で、ウイルス粒子タンパク質がそれを担っていることを強く示唆する。そこで、ウイルス遺伝子発現の影響を排除して、ウイルス粒子タンパク質による作用のみを検討する目的で、UV で不活化したウイルスを感染させたところ、予想に反して CK/CKR の発現誘導も消失した。以上の結果から、CK/CKR の発現誘導にはやはりウイルス遺伝子発現が必要で、その候補は主要 IE (IE1、IE2) とは独立して転写される補助 IE (UL36-38、UL115-119、TRS1/IRS1、US3) である可能性が考えられた。</p> <p>次に、91-7S の DNA をウイルス粒子より抽出・精製し、次世代シーケンサー (PromethION) により全塩基配列 235,816 bp の決定を行った。一方、Merlin の全塩基配列 243,724 bp は GenBank に登録のものを用い、両者のアラインメントを詳細に比較解析した結果、全 168 遺伝子中相同性の低い遺伝子が 25 個同定された。それらを機能別に分類すると、糖タンパク質遺伝子が 17 個、ウイルス CK 遺伝子が 2 個、ウイルス CKR 遺伝子が 1 個、その他遺伝子が 5 個であった。そしてその中には、5 個の補助 IE 遺伝子 (糖タンパク質遺伝子として UL37、UL116、UL119、US3、テグメントタンパク質遺伝子として TRS1/IRS1) が含まれていた。現在までにこれら補助 IE 遺伝子の機能のいくつかは明らかになっているが、その中に CK/CKR の発現誘導に関するものはない。</p> <p>今回、これらの遺伝子が HCMV 感染 LoVo で発現しているかどうか、また単独発現により CK/CKR を発現誘導するかどうかまでは明らかにできず、今後の課題として残った。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		癌抑制性 CAF に対する膵癌細胞の生存戦略の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北里大学医学部病理学・助教・加藤 琢哉
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	膵癌では組織内の癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblast: CAF) の中に腫瘍促進的に機能する亜集団と抑制的に働く亜集団が存在することが報告されている。膵癌患者に対する CAF を標的とした治療法の臨床試験では治療群でむしろ癌が増悪したことが報告された。このことは、膵癌が進展する際には抑制性 CAF によって囲まれた環境下で抑制性 CAF に抵抗して増殖するための何らかの変化が膵癌細胞に起きていることを示唆している。そこで本研究では膵癌細胞の抑制性 CAF に対する抵抗機構の解明を目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>前年度の研究で行ったヒトの膵癌細胞と Meflin を発現させた癌組織由来の CAF を用いた三次元共培養では、Meflin の発現によって Meflin 陰性の CAF で見られた腫瘍細胞の増殖促進は見られなくなったものの、増殖の抑制までは起こらなかった。これは元々腫瘍促進性の CAF に Meflin を発現させただけでは抑制性 CAF に転換するには不十分であったことを示唆している。そこで、本年度は前年度中に作成した、より腫瘍抑制的な性質を残していると考えられる正常な膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cell: PSC, 膵癌における CAF の origin、以下抑制性 CAF) を用いて検討した。</p> <p>抑制性 CAF と膵癌細胞株 Panc-1 または Capan-2 との三次元共培養実験を行ない、増殖能を検討した。その結果、Capan-2 は抑制性 CAF との共培養によりゲル内における増殖が抑制された一方、Panc-1 は抑制性 CAF による増殖抑制を受けないことが明らかとなった。このことは抑制性 CAF の抑制能に対する感受性が細胞株ごとに異なることを示唆している。そこで、本来の研究計画に追加して複数の細胞株について抑制性 CAF により増殖抑制が起こるか否かを検討することを考えている。それら細胞株について、抑制性 CAF に感受性のグループと抵抗性のグループに分類し、グループ間の遺伝子発現を比較することで抑制性 CAF に対する抵抗性獲得に必要な分子群の解明に繋がると考えている。</p> <p>また、従来計画に従い、抑制性 CAF に感受性を示した Capan-2 細胞を抑制性 CAF と共培養し、増殖の早かった細胞塊を回収して純化させる実験を開始している。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	<p>1. Arwert EN, Milford EL, Rullan A, Derzsi S, Hooper S, <u>Kato T</u>, Mansfield D, Melcher A, Harrington KJ, Sahai E. STING and IRF3 in stromal fibroblasts enable sensing of genomic stress in cancer cells to undermine oncolytic viral therapy. <i>Nat Cell Biol.</i> 22:758-766. doi: 10.1038/s41556-020-0527-7. 2020.</p> <p>2. Sanoyama I, Sakurai Y, Ichinoe M, Hoshino A, Kesen Y, <u>Kato T</u>, Numata Y, Umezawa A, Jiang SX, Murakumo Y. Increased expression of REV7 in small cell lung carcinomas and its association with tumor cell survival and proliferation. <i>Pathol Int.</i> 71:15-23. doi: 10.1111/pin.13040. 2021.</p> <p>3. Conti S, <u>Kato T</u>, Park D, Sahai E, Trepatt X, Labernadie A. CAFs and Cancer Cells Co-Migration in 3D Spheroid Invasion Assay. <i>Methods Mol Biol.</i> 2179:243-256. doi: 10.1007/978-1-0716-0779-4_19. 2021.</p>
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		In vitro がん微小環境モデルを用いた大腸がん悪性化機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学生産技術研究所・准教授・松永行子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・教授・大島正伸
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・准教授・大島浩子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	大腸がんに関わるドライバー遺伝子変異を持つオルガノイドを血管内外に配置し、血管との相互作用を三次元タイムラプスすることにより大腸がん転移における、大腸がんの転移パターン、壁細胞を含む血管との相互作用に関する情報を取得し、それぞれの細胞の機能的な違いについて明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>In vitro で細胞レベルの現象を模倣する生体模倣デバイス (MPS: microphysiological system) 技術に着目し、腫瘍モデルであるがんオルガノイドを周囲に配置した三次元血管モデルの構築を行った。大島研究室(金沢大がん研)では、大腸がんに関わるドライバー遺伝子変異を持つオルガノイドを確立し、それぞれの遺伝子変異の役割についての研究を行なっている。これまでに、Apc 遺伝子と変異型 p53 遺伝子を持つオルガノイド(AP)は転移能を持たないが、Apc 遺伝子欠損・変異型 K-Ras 発現・Tgfbr2 遺伝子欠損・変異型 p53 遺伝子のオルガノイド(AKTP)は、転移能を獲得することを動物実験で明らかにしている。そこで、本研究では、APおよび AKTP 細胞を低吸着プレート上でオルガノイドを形成し、これらを研究代表者が有するヒト臍帯静脈由来内皮細胞を用いた微小血管モデルと共培養し、血管内浸潤の有無についてタイムラプス観察を行った。</p> <p>がんオルガノイド側では、(i) 浸潤突起形成、(ii) 血管内浸潤と血中循環腫瘍細胞凝集塊(CTC: circulating tumor cell)クラスター化、(iii) 血管内腔への伸展浸潤などの特徴的な浸潤様式が確認された。転移能が高いがんオルガノイドでは、これらの現象の発生率が亢進することが明らかとなった。一方で、血管側に着目すると、がんオルガノイドと共培養した際、内皮間葉転換 (EndMT: endothelial-mesenchymal transition) マーカーの発現上昇や内皮細胞の内腔面からの脱落が観察された。一方で、壁細胞を含む血管においては血管内浸潤抑制化傾向が観察され、血管内浸潤における各細胞種の時空間的な役割が明らかになりつつある。今後詳細な検討が必要である。</p> <p>以上の共同研究の結果から、本デバイスによる詳細な転移メカニズムの理解と転移治療標的探索等への応用が期待できる。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	<ol style="list-style-type: none"> 1. 松永行子, “微小血管の Organ on a chip による フェノタイプ解析と治療標的探索”, 2020年度 日本学術会議シンポジウム～創薬を加速させる革新的な細胞・臓器・個体モデル～, 2021-01-18 2. 池田行徳, 中島忠章, 松永行子, 大島浩子, 大島正伸, “消化器がんの血行性転移時における細胞動態の可視化評価系構築”, 第20回東京大学生命科学シンポジウム, 2020-10-31, ポスター発表, 国内
	【その他特筆事項】	当該共同研究に携わった大学院生が、専攻長賞を受賞した。

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞維持に関わる miRNA の探索と機構解明
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学・統合生命科学研究科・助教・高橋 治子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	広島大学・統合生命科学研究科・教授・菊池 裕
	所属・職名・氏名	広島大学・理学研究科・大学院生・Huang Jie
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	<p>転写後調節因子の1つであり、腫瘍形成において大きな役割を果たすことが知られている microRNA(miRNA)に着目し、がん幹細胞(cancer stem-like cells: CSCs)の幹細胞性・治療抵抗性の獲得・維持に関わる miRNA の探索とその機構解明、及び新規治療戦略への応用を最終目的とする。本研究では、人工がん幹細胞株をモデルとして同定した CSCs で特異的な発現の変化が見られる miRNA のうち、機能未知である4つの miRNA について、CSCs における機能を解明するため、人工がん幹細胞株・患者由来の乳がん幹細胞様細胞(BCSC)を用いて解析を行う。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>梁らにより乳腺上皮細胞株 MCF-10A へリプログラミング因子(OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc)を導入して樹立された人工がん幹細胞株 iCSCL-10A [<i>Oncogene</i>, 33, 643 (2014); <i>Oncotarget</i>, 5, 8665 (2014)] をモデル CSCs として、miRNA マイクロアレイ解析を行ったところ、iCSCL-10A 細胞で MCF-10A 細胞に比べて有意に変動している 21 の miRNA を同定した。これらのうち、4つは CSCs における詳細な機能は明らかとなっていない miRNA であった。この機能未知の4つの miRNA について、公開データベース(miRDB, TargetScanHuman, miRTarBase, miRmap)を用いて標的遺伝子予測解析を行った結果、各々の miRNA について、約 30~300 個の遺伝子がターゲットとして予測された。</p> <p>標的遺伝子予測解析において予測されたターゲット候補遺伝子のうち、CSCs の幹細胞性や治療抵抗性の獲得や維持に関わる機能を持つ遺伝子を探索した結果、CSCs で特異的に発現量が低い miRNA のターゲット候補遺伝子として、脱ユビキチン化酵素 USP45(Ubiquitin Specific Peptidase 45)を見出した。この USP45 は、DNA 除去修復タンパク質 ERCC1 (excision repair cross-complementing 1)を脱ユビキチン化し、USP45 を介した ERCC-1 によるヌクレオチド除去修復は、シスプラチンなどの抗がん薬による DNA 損傷を修復することが知られている。そこで RT-qPCR 法で <i>USP45</i> の発現量を検討したところ、iCSCL-10A では MCF-10A に比べ有意に発現が高いことを明らかとした(図 1 A)。さらに、ウェスタンブロッティング法により USP45 がユビキチンレベルを調節する ERCC-1 のタンパク質発現量も有意に高いことを確認した(図 1 B)。このことから、がん幹細胞では抗がん薬や放射線治療による DNA 損傷に対して修復能が高いことが予想された。今後は、CSCs の治療抵抗性における DNA 修復機構の役割に着目し、miRNA による本修復機構の調節機構について、詳細に解析を進める予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

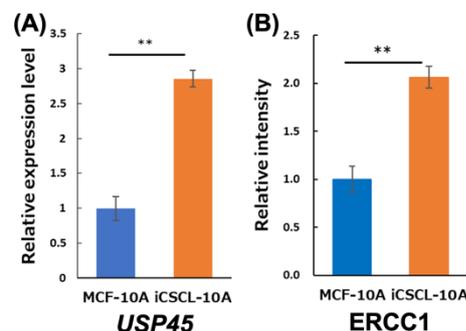


図 1. iCSCL-10A 細胞, MCF-10A 細胞における *USP45* および *ERCC1* の発現量, ** $p < 0.01$

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		細胞性粘菌の分化誘導因子 DIF-3 による細胞周期制御因子 CDC25A 発現制御系の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域（薬学系） 准教授 山下 克美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 善岡 克次
【研究目的】	<p>細胞性粘菌由来の分化誘導因子 DIF-3 で処理された HeLa 細胞をはじめとする培養株では、容量・処理時間依存的に細胞周期進行のキータンパク CDC25A の分解が誘導される。この分解は、DNA 損傷ならびにユビキチンプロテアソーム非依存的な分解である。</p> <p>本研究では、CDC25A 分解に至るシグナル伝達系、DIF-3 に誘導される特異な分解機構とその生物学的意義を明らかにすることが目的である。</p> <p>DIF-3 は粘菌においては分化を誘導する因子であり、培養細胞系では白血病由来の細胞株の分化を誘導する。本研究の成果により、がんの分化誘導や休眠誘導等のがん治療への応用の理論的な根拠をもたらされる可能性がある。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>DIF-3 処理細胞においては、細胞周期制御のキー因子の CDC25A が、DNA 損傷応答非依存的かつ、ユビキチン化とそれに続くプロテアソーム系非依存的に分解される。本研究は、DIF-3 により誘発される CDC25A の分解機構の解明を目的とした。</p> <p>CDC25A は、細胞内半減期が約 60 分と短命なタンパクであることから、タンパク合成と分解に関わる mTOR-オートファジー系に着目し、研究を進めた。</p> <p>DIF-3 処理した細胞で、mTORC1 の下流にある mTOR kinase の代表的な基質であり、翻訳促進に関わるリボソーム S6 kinase (以下、S6 kinase) と mRNA の翻訳開始抑制に関わる 4E-BP1 のリン酸化を解析した。これらの因子は、mTOR 複合体のうち、mTORC1 が活性化状態にあると mTOR kinase によりリン酸化される。S6 kinase はリン酸化状態で活性があり、リボソームにおける翻訳が促進される一方、リン酸化型の 4E-BP1 は翻訳開始抑制活性を失い、翻訳開始が促進される。すなわち、両者のリン酸化状態は、mTORC1 中の mTOR kinase 活性を反映する。</p> <p>そこで、DIF-3 処理細胞における両タンパクのリン酸化状態を測定したところ、両タンパクともリン酸化レベルが大きく低下していることを認めた。これは、DIF-3 処理細胞においては、タンパク合成が抑制されていることを強く示唆する。この結果は、DIF-3 は mTOR 系、特に mTORC1 の活性を抑制する可能性を示す。</p> <p>次に、mTOR 系においてタンパク分解に働くオートファジーの状態を解析した。mTORC1 が活性化状態にある場合にはオートファジーは抑制され、不活性化状態では活性化される。そこで、オートファジーが活性化状態でフォスファチジルエタノールアミン (PE) により修飾を受ける LC3 を解析したところ、PE-LC3 レベルの上昇が認められた。この結果はすなわち、DIF-3 処理細胞においては、オートファジーが亢進していることを示している (論文投稿準備中)。</p> <p>以上の結果を総合すると、DIF-3 を処理された細胞においては、mTOR 系、特に mTORC1 系が抑制され、タンパク合成の抑制とオートファジーの促進が誘発されたものと推察される。したがって、DIF-3 による細胞周期制御因子の CDC25A の分解は、mTOR 系の抑制が原因であると考察される。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし。
	【学会発表】	なし。
	【その他特筆事項】	なし。

令和2年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		GSK3β/STAT3 経路を基軸とする膵神経内分泌腫瘍の病態解明と治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・准教授・宮下知治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学病院肝胆膵・移植外科・講師・田島秀浩
	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎猛夫
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・教授・高村博之
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	<p>2017年のWHO分類にて膵神経内分泌腫瘍は pancreatic neuroendocrine tumor (PanNET) と pancreatic neuroendocrine carcinoma (PanNEC) に区別され、PanNETは病理組織学的にG1~G3の3段階に悪性度分類が統一された。しかしG1と診断された症例でも決して再発率は低くないことが報告されている。また現段階で有効な補助化学療法や切除不能・再発症例に対しての治療法は確立されていない。P-NETsの発生・増殖などのメカニズムについても未だ明らかになってはいないが、近年、IL-6/Stat3経路の発現が浸潤などに関与する可能性が報告されている。本研究では切除標本を用いてpStat3の発現とP-NETsの悪性度との関係を臨床病理学的に検討するとともに、Stat3リン酸化作用を有するGSK3βの腫瘍における発現・活性の状況と、GSK3βの阻害によりP-NETsに対する抗腫瘍効果が得られるかどうかを検討する。さらにGSK3β阻害によるWarburg効果への影響も検討する。</p>	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<p>源教授の教室では以前に大腸癌細胞株を用いて、GSK3βは解糖とミトコンドリアの酸化的リン酸の均衡を制御する代謝経路に作用して、癌細胞の病的代謝(Warburg効果)を誘導することを報告している。共同研究2年目の本年度は細胞の主要なエネルギー代謝経路である解糖、ミトコンドリアによる好気呼吸の状態を、細胞に対して無侵襲・高感度に経時的計測が可能な細胞代謝アナライザー(細胞外フラックスアナライザー)を用いて解析を開始した(図1)。まず予備実験として各濃度のQGP-1細胞(P-NETs細胞株)を4×6のプレートで培養し、48時間後に経時的に、Oligomycin、FCCPを投与し、変化する酸素濃度やpHを確認し、最適細胞濃度を決定した。必要十分量細胞数は1.5×10^4 cells/wellとした。次年度はGSK3β阻害剤を加えてから48時間時点でのフラックスアナライザーを用いてOCR(酸素消費速度)を測定する予定である。またQGP-1細胞株に加えて、BON-1細胞株も入手できたため、BON-1を使用した実験系も構築する予定である。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

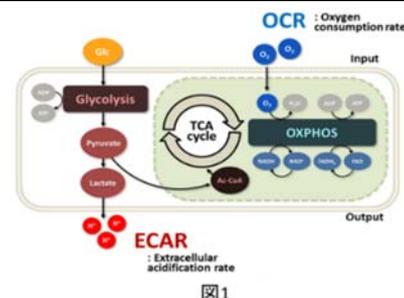


図1