

金沢大学
がん進展制御研究所

年報
2021年

Annual Report
Cancer Research Institute
Kanazawa University

巻頭言

本研究所は、1967年に「がんに関する学理およびその応用の研究」を理念に設置されました。国立大学附置研の中で唯一、がんの研究に特化した研究所として、「がんの悪性化進展機構」に焦点をあてた基礎研究、基礎研究から見出される分子・モデル・技術シーズを活用した革新的な診断・治療法の研究、将来のがん研究や医療を担う人材育成を使命として活動しています。2010年に文部科学省から「がんの転移と薬剤耐性に関する先導的共同研究拠点」として認定されて以降は、共同利用・共同研究拠点としての活動も担っています。令和3年度、共同利用・共同研究拠点による共同研究課題として71件を採択・支援しました（そのうち国際共同研究11件、異分野融合研究を4件）。また、本研究の若手スタッフによる共同研究課題として11件を採択・支援し、合わせて82件の課題に対して支援しました。

本研究所では若手研究者等の研究の活性化を図る取り組みとして、「オンコロジーセミナー」を開催し、准教授、助教、若手PIが年に1回、自身の研究について発表する機会を設けています。どんな新たな展開があるか、どんな新しいテクノロジーが使われるか、どんな難しさがあるか、これらが共有される切磋琢磨の時間です。また、2021年7月に、大学院生による発表・討論を主体にする「がん研コロキウム」を開催しました。研究に対する大学院生の活発な姿勢が感じられる機会でした。9月に金沢大学がん進展制御研究所・復旦大学上海がんセンターとの、ジョイントシンポジウムを開催しました。今回が第10回になり、長年にわたる交流の結果です。双方から若手研究者3名ずつが発表しました。続いて11月には、金沢国際がん生物学シンポジウムを開催しました。欧州からの著名な3名の研究者による発表、本研究所からの若手研究者3名による発表がありました。令和3年度の共同利用・共同研究拠点成果報告会を2022年2月に開催しました。

このほか、初めての取り組みとしまして、未来のがん研究者発掘・養成のための高校生向け研究体験プログラム「金沢発！がん克服プロジェクトがん研究早期体験プログラム」を企画し、クラウドファンディングにより寄付を募りました。幸い、多くの皆様のご支援をいただき目標額を達成することができました。体験プログラムは2022年8月に開催予定です。これらの活動は、私たちの研究所の研究力強化、人材育成、国際ネットワーク形成につながっています。

2021年の各研究分野の活動状況をがん研年報として報告いたします。本研究所の各々の研究者、研究グループによる研究成果が本年報にまとめられています。本研究所の活動や取り組み、研究の進展について皆さまにご理解いただく機会となれば幸いです。

金沢大学がん進展制御研究所長 松本邦夫

金沢大学がん進展制御研究所年報2021年

目次

巻頭言

研究概要と研究業績

先進がんモデル共同研究センター

腫瘍遺伝学研究分野 2

分子病態研究分野 7

上皮幹細胞研究分野 13

がん幹細胞研究プログラム

遺伝子・染色体構築研究分野 18

腫瘍分子生物学研究分野 23

分子生体応答研究分野 28

がん微小環境研究プログラム

免疫炎症制御研究分野 32

腫瘍動態制御研究分野 36

腫瘍細胞生物学研究分野 41

がん分子標的探索プログラム

シグナル伝達研究分野 46

腫瘍制御研究分野 49

機能ゲノミクス研究分野 55

がん分子標的医療開発プログラム

腫瘍内科研究分野 60

中央実験施設 72

新学術創成研究機構PI・若手PI

上皮可塑性・炎症ユニット 78

がん-免疫系相互作用ユニット 80

がん幹細胞環境制御ユニット 82

ミトコンドリア動態ユニット 85

基礎統計・教育活動 87

各種シンポジウム開催状況 89

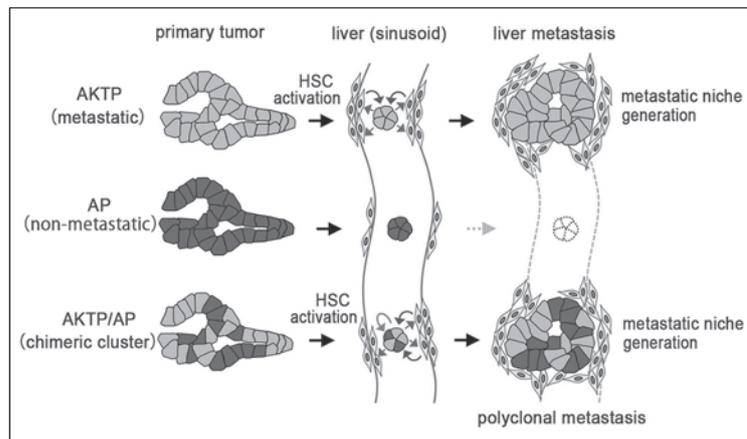
先進がんモデル共同研究センター

Division of Genetics 腫瘍遺伝学研究分野

| | |
|-------------------------|---|
| Professor | Masanobu Oshima 大島 正伸 |
| Associate Professors | Hiroko Oshima 大島浩子, Mizuho Nakayama 中山瑞穂 |
| Assistant Professor | Dong Wang (WPI-Nano LSI) |
| Postdoctoral Researcher | Yumi Terakado 寺門 侑美 |
| Graduate Students | Daisuke Yamamoto 山本 大輔, Toshikatu Tsuji 辻 敏克 (D4) Atsuya Morita 森田 敦也 (D3), Xuelian Lei 雷雪蓮 (D2) |
| Undergraduate Student | Ikumi Kawai 川合 育美 (MRT program) |
| Technical Assistants | Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子 |

【 Abstract 】

We recently established *in vivo* model of liver metastasis by spleen transplantation of mouse intestinal tumor-derived organoids (Sakai et al, Cancer Res, 2018). Using this model system, we have examined a novel concept of polyclonal metastasis. In this system, cancer cell clusters are detached from the primary site, disseminated to distant organs, and develop metastasis lesion, which can explain how genetic heterogeneity transfers from the primary site to metastatic lesions. AKTP organoids formed liver metastasis when transplanted to the spleen (Figure, *top*), while AP organoids did not (Figure, *middle*). Notably, when non-metastatic AP cells were co-transplanted with AKTP, they formed chimeric metastasis (Figure, *bottom*). Mechanistically, AKTP cells induced fibrotic niche generation by activation of hepatic stellate cells (HSCs), which may support survival and proliferation (Kok *et al*, Nat Commun, 2021).



These results expand our knowledge about cancer metastasis, which further contributes to discovery of effective drug targets against metastasis.

Using the organoid system, we further analyzed mechanical properties of tumor cell surface, such as topography and stiffness, by using Scanning Ion Conductance Microscope (SICM). Importantly, metastatic organoids (AKT, AKTP, AKTPF) showed distinct physical properties, i.e., increased roughness, membrane volume changes and softness. The results suggest a potential use of SICM for diagnosis of metastatic ability (Wang *et al*, Biomaterials, 2021).

We have established human gastric and colon cancer-derived organoids. Using these organoids, we examined the roles of tumor suppressor FOXO3 (Tsuji et al, Oncogene, 2021) and E3 ligase RNF43 in cancer development (Yamamoto et al, J Pathol, in press).

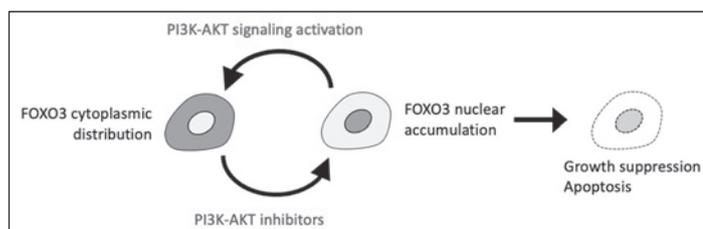
<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. 大腸がんポリクローナル転移機構の研究

新しいがん転移機構として、ポリクローナル転移モデルが提唱されている。このモデルでは、遺伝的背景の異なる細胞集団が構成する細胞塊が、原発巣から離脱して血流を介して遠隔臓器に転移巣を形成する。そこで、遺伝子変異と悪性度の異なるマウス腸管腫瘍由来オルガノイドを用いて、ポリクローナル転移機構について検証実験を行った。その結果、非転移性の AP 細胞を高い転移能を獲得した AKTP と同時に脾臓移植すると、AP 細胞と AKTP 細胞で構成する転移巣が形成された（前頁図）。興味深いことに、転移巣形成後は AKTP 細胞を枯渇させても AP 細胞単独で多発性転移巣が形成された。以上の結果は、転移機構における新しい概念の樹立につながる知見として期待される（Kok *et al*, Nat Commun, 2021）。今後、ヒト消化器由来オルガノイドを樹立して検証を行う。

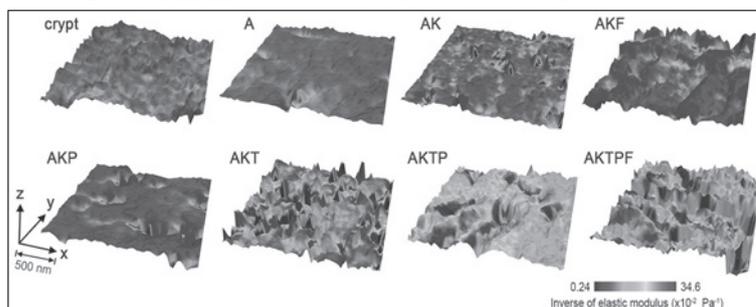
2. FOXO3 細胞質局在型の胃がん発生機構の研究

FOXO3 を高発現するヒト胃がん細胞株では、PI3K/AKT 経路の活性化により FOXO3 は細胞質に局在している。これらの細胞を AKT 阻害薬で処理すると、FOXO3 は核に局在し、細胞増殖抑制やアポトーシスが誘導される。すなわち、がん細胞は FOXO3 の細胞内局在制御により、がん抑制機能から免れると考えられた（右図）。そこで、活性化型 FOXO3 発現マウスを作製し、胃癌モデルの Gan マウスと交配実験を行った結果、腫瘍細胞での FOXO3 核移行による顕著な増殖抑制を認めた。この結果により、FOXO3 細胞質型胃がんに対する AKT 阻害薬治療の可能性が考えられた（Tsuji *et al*, Oncogene, 2021）。



3. 腸管腫瘍オルガノイド細胞表面構造の物性解析

Scanning Ion Conductance Microscope (SICM) は、マイクロピペットが細胞に近づいた際のピペット内外のイオン電流の変化から、細胞表面のトポグラフィ、弾性等の物性変化をナノレベルで計測できる走査型プローブ顕微鏡である。SICM を用いて、腸管腫瘍オルガノイド細胞表面の解析を行った結果、転移性腫瘍細胞（AKT、AKTP、AKTPF）に特徴的な変化（高い構造物の高速変動と低い剛性）が確認され、新規診断法開発につながる事が期待された（右図）。また、ヒト大腸がん由来オルガノイドを用いて、TGF- β 刺激による物性の悪性化細胞型への変化を観察した（Wang *et al*, Biomaterials, 2021）。



4. RNF43 遺伝子変異による大腸がん発生機構の研究

MSI 型がん細胞では、Wnt 受容体 Frizzled を標的とする E3 リガーゼの RNF43 遺伝子変異が見られる。MSI 型大腸がん 3 症例を含む 9 系統のヒト大腸がんオルガノイドを樹立して解析した結果、RNF43 遺伝子ヘテロ変異が R-spondin 依存型の大腸がん発生を誘導する可能性が示された（Yamamoto *et al*, J Pathol, in press）。

【研究業績】

<発表論文>

原著論文

(腫瘍遺伝学分野主体)

1. Kok SY, Oshima H, Takahashi K, Nakayama M, Murakami K, Ueda HR, Miyazono K, Oshima M. Malignant subclone drives metastasis of genetically and phenotypically heterogenous cell clusters through fibrotic niche generation. **Nat Commun**, 12: 863, 2021.
2. Tsuji T, Maeda Y, Kita K, Murakami K, Saya H, Takemura H, Inaki N, Oshima M, Oshima H. FOXO3 is a latent tumor suppressor for FOXO3-positive and cytoplasmic-type gastric cancer cells. **Oncogene**, 40: 3072-3086, 2021.
3. Wang D, Sun L, Okuda S, Yamamoto D, Nakayama M, Oshima H, Saito H, Kouyama Y, Mimori K, Ando T, Watanabe S, Oshima M. Nano-scale physical properties characteristic to metastatic intestinal cancer cells identified by high-speed scanning ion conductance microscope. **Biomaterials**, 2021. [epub ahead of print]

(共同研究)

1. Murakami K, Terakado Y, Saito K, Jomen Y, Takeda H, Oshima M, Barker N. A genome-wide CRISPR screen reveals factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, 118: e2016806118, 2021.
2. 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 , 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.
3. Hangai S, Kawamura T, Kimura Y, Chang CY, Hibino S, Yamamoto D, Nakai Y, Tateishi R, Oshima M, Oshima H, Kodama T, Moriya K, Koike K, Yanai H, Taniguchi T. Orchestration of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment by ubiquitous cellular protein TCTP released by tumor cells. **Nat Immunol**, 22: 947-957, 2021.
4. Miyata K, Imai Y, Hori S, Nishio M, Loo TM, Okada R, Yang L, Nakadai T, Maruyama R, Fuii R, Ueda K, Jiang L, Zheng H, Toyokuni S, Sakata T, Shirahige K, Kojima R, Nakayama M, Oshima M, Nagayama S, Seimiya H, Hirota T, Saya H, Hara E, Takahashi A. Pericentromeric noncoding RNA changes DNA binding of CTCF and inflammatory gene expression in senescence and cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, 118: e2025647118, 2021.
5. Dawson RE, Deswaerte V, West AC, Tang K, West AJ, Balic JJ, Gearing LJ, Saad MI, Yu L, Wu Y, Bhathal PS, Kumar B, Chakrabarti JT, Zavros Y, Oshima H, Klinman DM, Oshima M, Tan P, Jenkins BR. STAT3-mediated upregulation of the AIM2 DNA sensor links innate immunity with cell migration to promote epithelial tumorigenesis. **Gut**, 2021. [online ahead of print]
6. Iida N, Mizukoshi E, Yamashita T, Yutani M, Seishima J, Wang Z, Arai K, Okada H, Yamashita T, Sakai Y, Masuo Y, Agustina R, Kato Y, Fujinaga Y, Oshima M, Honda M,

Lebreton F, Gilmore MS, Kaneko S. Chronic liver disease enables gut *Enterococcus faecalis* colonization to promote liver carcinogenesis. **Nat Cancer**, 2: 1039-1054, 2021.

著書・総説

1. Oshima H, Ju Xiaoli, Echizen K, Han TS, Oshima M. The role of inflammation in gastric tumorigenesis. In: Research and Clinical Applications of Targeting Gastric Neoplasms, Chapter 2. Ed. by Jenkins B, Academic Press, 25-41, 2021.

(日本語総説)

1. 大島浩子, 中山瑞穂, 大島正伸. 炎症反応と胃発がん. 臨床免疫・アレルギー科 (科学評論社) 76: 708-714, 2021.
2. 中山瑞穂, 大島浩子, 大島正伸. がん悪性化をもたらす炎症反応と転移ニッチ形成. 実験医学増刊「がん微小環境に1細胞レベルで挑む」(羊土社) 39: 1921-1926, 2021.

<学会等発表>

(国際学会・シンポジウム)

1. Oshima M. Malignant cancer cells drive polyclonal metastasis through fibrotic niche generation. The 39th Sapporo International Cancer Symposium, (札幌) 2021年7月6日.
2. Oshima H. FOXO3, A latent tumor suppressor of gastric cancer. The 10th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology 2021, (金沢) 2021年9月15日.

(国内学会・セミナー)

1. 大島正伸, 中山瑞穂, 大島浩子. 「がん微小環境ネットワークを制御するシグナルを標的とした治療法の開発」第42回日本炎症・再生医学会, (東京) 2021年7月7日.
2. Oshima M. Gastric cancer mouse model: inflammation, genetic alteration, and impaired differentiation. 第80回日本癌学会学術総会, 横浜, 2021年10月1日.
3. Nakayama M, Oshima H, Oshima M. Gain-of-function mutant p53 hyperactivates Wnt signaling in colon cancer cells. 第80回日本癌学会学術総会, 横浜, 2021年10月1日.
4. Oshima H, Nakayama M, Takahashi K, Miyazono K, Oshima M. The fibrotic microenvironment that promotes polyclonal metastasis of intestinal tumors. 第80回日本癌学会学術総会, 横浜, 2021年10月2日.
5. Oshima M. Tumor-derived organoids to study gastrointestinal cancer metastasis. 第80回日本癌学会学術総会, 横浜, 2021年10月2日.

<外部資金>

1. 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-FORCE) [研究代表者: 大島正伸]
「ヒト大腸がんポリクローナル転移機構に関する研究開発」18,000千円
2. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) [研究代表者: 大島正伸]

- 「大腸がん微小転移巣形成機構の理解による新規予防治療戦略の確立」14,500 千円
3. 科研費 基盤研究 (A) [研究代表者: 大島 正伸]
「大腸がん自然転移・再発モデルの開発による悪性化進展機構の研究」7,200 千円
4. 科研費 基盤研究 (B) [研究代表者: 大島 浩子]
「炎症性・線維性微小環境による大腸がん転移促進機構の解明」3,900 千円
5. 科研費 基盤研究 (C) [研究代表者: 中山 瑞穂]
「p53 変異/欠損による大腸がん微小環境ネットワーク形成に関する個体モデル解析」1,000 千円
6. 若手研究 [研究代表者: Dong Wang]
「The role of activin combined with different gene mutations in colorectal cancer EMT」
1,400 千円

<その他>

文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会開催 (実行委員長: 大島正伸): 2021年9月6日, WEB開催 (大学院生、博士研究員、助教等の若手研究者 93名参加)

Division of Cancer Cell Biology

分子病態研究分野

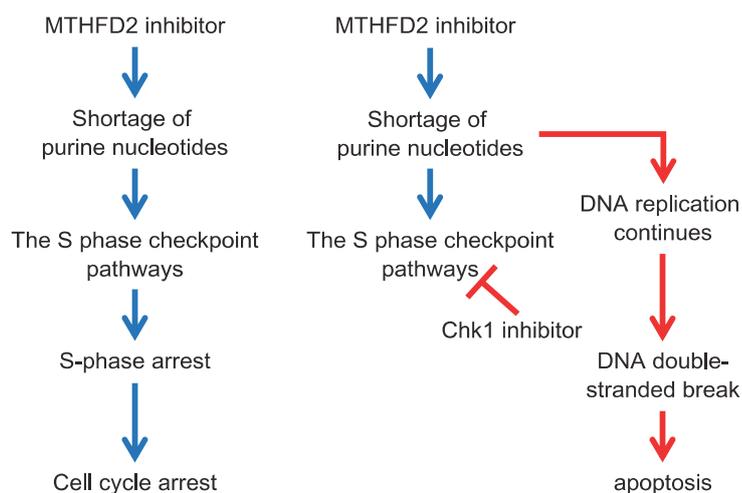
| | |
|----------------------|---|
| Professor | Noriko Gotoh 後藤 典子 |
| Assistant Professors | Tatsunori Nishimura 西村 建徳 Yasuto Takeuchi 竹内 康人 |
| Graduate Students | Reheman Yiming (D4), Xiaoxi Chen (D4), Li Mengjiao (D4), SARENQIQIGE (D3), Wang Yuming (D3) Masahiro Yamazaki 山崎 雅弘 (D1) Huazi Zhang (D1) Hiroka Matsumoto 松本 寛加 (M1) Risa Kashimura 柏村 里沙 (卒研) |
| Technical Staff | Hitomi Takamura 高村 瞳 (2021.10~) |
| Assistant Staff | Kiyoko Take 武 紀代子 |

【 Abstract 】

1. Cancer cells are characterized by their unregulated proliferation and require large amounts of nucleotides to replicate their DNA. One-carbon metabolism contributes to purine and pyrimidine nucleotide synthesis by supplying one carbon atom. Although mitochondrial one-carbon metabolism has recently been focused on as an important target for cancer treatment, few specific inhibitors have been reported. In this study, we aimed to examine the effects of DS18561882 (DS18), a novel, orally active, specific inhibitor of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD2), a mitochondrial enzyme involved in one-carbon metabolism. Combinatorial treatment with DS18 and inhibitors of checkpoint kinase 1 (Chk1), an activator of the S phase checkpoint pathway, efficiently induced apoptotic cell death in breast cancer cells and suppressed tumorigenesis in a triple-negative breast cancer patient-derived xenograft model. Combinatorial treatment with both inhibitors released cell-cycle arrest caused by activation of the S-phase checkpoint pathway triggered by MTHFD2 inhibition, but induced accumulation of DNA double-strand breaks, leading to apoptotic cell death. Collectively, a combination of MTHFD2 and Chk1 inhibitors would be a rational treatment option for patients with triple-negative breast cancer.

2. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs) are effective in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) harboring EGFR mutations. However, due to acquired resistance to EGFR-TKIs, even patients on third-generation osimertinib, have a poor prognosis. Resistance mechanisms are still not fully understood. Here, we demonstrate that the increased expression of MUSASHI-2 (MSI2), an RNA-binding protein, is a novel mechanism for resistance to EGFR-TKIs. Transcriptome analysis revealed that *MSI2* was

among the stemness-related genes highly upregulated in EGFR-TKI-resistant cells. Knockdown of *MSI2* reduced cancer stem-like properties, including the expression levels of Nanog, a core stemness factor. We demonstrated that the knockdown of *MSI2* restored sensitivity to osimertinib or gefitinib in EGFR-TKI-resistant cells to levels similar to those of parental cells in vitro. Finally, *MSI2* knockdown greatly increased the sensitivity to osimertinib in vivo. Collectively, our findings provide proof of principle that targeting the *MSI2*-Nanog axis in combination with EGFR-TKIs would effectively prevent the emergence of acquired resistance.



MTHFD2 は、がん特異的な核酸合成系であり、がんの標的として近年大変注目されているものの、未だ臨床で使用可能な阻害剤は開発されていない。今回、企業との共同研究により新規に開発された経口投与可能な MTHFD2 阻害剤を用いて、予後不良なトリプルネガティブタイプ乳がんに対する効果を調べた。患者由来移植モデル (Patient-derived xenograft[PDX]) も用いた様々な解析を行った結果、Chk1 阻害剤との併用療法により著明な相乗効果が期待されることが示された。

<2021 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

乳がんに着目して新たなマウスがんモデルの作出と、患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC) のスフェロイド及びオルガノイド培養技術を工夫し、Patient-derived xenograft (PDX) モデルの構築とそのカタログ化を行ってきた。今年度は、希少がんのオールジャパンコンソーシアムの中で、これまでの技術を活かし、骨軟部腫瘍の PDX モデルの構築も開始した。

近年多くの細胞膜上のたんぱく質や酵素活性等が、「がん幹細胞」を濃縮する手段として使えることが、私どもを含め多くの研究者より報告されている。しかし、これらのたんぱく質等を用いて濃縮された細胞集団の機能は、それぞれ異なる。つまりがん幹細胞が濃縮されている細胞集団自体不均一であることがわかってきて、がん幹細胞の親ともいえる共通の標的細胞は果たしてあるのか、あるとしたらそれがどのように維持されているのか、依然わかっていないことが多い。がん幹細胞の親をみつけるために、私どもがこれまでがん幹細胞を濃縮すると報告してきた NP1 と IGF1 受容体を用いて、トリプルネガティブ乳がん臨床検体由来の細胞をスフェロイド培養共通に分画される細胞集団を解析した。共通に濃縮される細胞群は、さらに細分化されることがわかってきて、がん幹細胞の親の正体が明らかになってきた。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原 著

(研究室主体)

1. Lee J, Chen X, Wang Y, Nishimura T, Li M, Ishikawa S, Daikoku T, Kawai J, Tojo A, Gotoh N.: A novel oral inhibitor for one-carbon metabolism and checkpoint kinase 1 inhibitor as a rational combination treatment for breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, Dec 20:584, 7-14, 2021. DOI: [org/10.1016/j.bbrc.2021.11.001](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.11.001)
2. Takeuchi Y, Kimura N, Murayama T, Machida Y, Iejima D, Nishimura T, Terashima M, Wang Y, Li M, Sakamoto R, Yamamoto M, Itano N, Inoue Y, Ito M, Yoshida N, Inoue J-I, Akashi K, Saya H, Fujita K, Kuroda M, Kitabayashi I, Voon D, Suzuki T, Tojo A, Gotoh N.: The membrane-linked adaptor FRS2beta fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci, USA*, Oct 26:118(43), e 2103658118, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2103658118.
3. Reheman Y, Takeuchi Y, Nishimura T, Li M, Wang Y, Meguro-Horike M, Kohno T, Horike S, Nakata A, Gotoh N.: MUSASHI-2 confers resistance to third-generation EGFR-tyrosine kinase inhibitor osimertinib in lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*, 2021 July 14:112(9), 3810-3821, 2021. DOI: 10.1111/cas.15036.
4. Murayama T, Takeuchi Y, Yamawaki K, Natsume T, Mengjiao L, Marcela N R-C, Nishimura T, Kogure Y, Nakata A, Tominaga K, Sasahara A, Yano M, Ishikawa S, Ohta T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S, Seki M, Suzuki Y, Sugano S, Enomoto T, Tanabe M, Tada K, Kanemaki T M, Okamoto K, Tojo A, Gotoh N.: MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells. *Cancer Sci*, 112(3), 1209-1224, 2021. DOI: 10.1111/cas.14776.

(共同研究)

5. Kozawa K, Sekai M, Ohba K, Ito S, Sako H, Maruyama T, Kaneko M, Shirai T, Kuromiya K, Kamasaki T, Kohashi K, Tanaka S, Ishikawa S, Sato N, Asano S, Suzuki H, Tanimura N, Mukai Y, Gotoh N, Tanino M, Tanaka S, Natsuga K, Soga T, Nakamura T, Yabuta Y, Saitou M, Itoh T, Matsuura K, Tsunoda M, Kikumori T, Iida T, Mizutani Y, Miyai Y, Enomoto A, Fujita Y.: The CD44/COL17A1 pathway promotes the formation of

multilayered, transformed epithelia. *Curr Biol*, 2021 Jul 26: 31(14), 3086-3097.e7, 2021. DOI: 10.1016/j.cub.2021.04.078.

6. Makita H, Endo K, Kasahara Y, Nakata A, Moriyama-Kita M, Ishikawa K, Ueno T, Nakanishi Y, Kondo S, Wakisaka N, Gotoh N, Yoshizaki T.: Xenografts derived from patients with head and neck cancer recapitulate patient tumor properties. *Oncol Lett*, 21(5), 385, 2021. DOI: 10.3892/ol.2021.12646.
7. Hirano M, Imai Y, Kaito Y, Murayama T, Sato K, Ishida T, Yamamoto J, Ito T, Futami M, Ri M, Yasui H, Denda T, Tanaka Y, Ota Y, Nojima M, Kamikubo Y, Gotoh N, Iida S, Handa H, Tojo A.: Small-molecule HDAC and Akt inhibitors suppress tumor growth and enhance immunotherapy in multiple myeloma. *J Exp Clin Cancer Res*, on line publication 23, March, 2021: 40(1), 110, 2021. DOI: 10.1186/s13046-021-01909-7.
8. Baba T, Yoshida T, Tanabe Y, Nishimura T, Morishita S, Gotoh N, Hirao A, Rikinari Hanayama R, and Mukaida N.: Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway. *Cell Death & Dis*, on line publication 4, March, 2021: 12(4), 322, 2021. DOI: 10.1038/s41419-021-03587-x.

総説

1. 「乳がん幹細胞を再現するバイオロジーとそれに関わるシグナル伝達経路」
後藤典子 実験医学別冊：がん微小環境に1細胞レベルで挑む（羊土社）、
vol. 39(12): p23(1831)-28(1836), 2021.
2. 「乳腺のオルガノイドによるマイ・メディシン」—がん幹細胞研究の立場から
後藤典子 医学のあゆみ（医歯薬出版株式会社）、vol. 276(6): p21810-21816, 2021.

<学会発表>

<国際学会>

1. Noriko Gotoh: “The cytoplasmic adaptor FRS2beta fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis.” **AACR Annual Meeting 2021**. 2021年3月26日、米国、オンライン

<全国学会>

1. 後藤典子：“乳がん患者由来モデル及びマウスモデルを用いたがん幹細胞、微小環境構築の解明” **患者由来がんモデル研究会** シンポジウム「患者由来がん細胞の三次元培養を組み合わせたがんの本態解明の研究」2021年12月16日、（オンライン）（オーガナイザー、講演）
2. 後藤典子：“The membrane-linked adaptor FRS2beta fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis” **第44回日本分子生物学会年会** シンポジウム「新たな3Dバイオロジーと組織解析テクノロジーを組み合わせたがん征圧への道」2021年12月3日、横浜（オーガナイザー、講演）
3. 後藤典子：“新薬開発へ向けた産学連携の問題点と将来展望” **第80回日本癌学会学術総会** 2021年10月1日、横浜（オーガナイザー）
4. 後藤典子：“Key molecular targets in cancer stem-like cells in triple-negative breast cancer” **第80回日本癌学会学術総会** コアシンポジウム 2021年9月30日、横浜
5. 後藤典子：“スフェロイド・オルガノイド培養を用いた腫瘍細胞不均一性の解明” **第29回日本乳癌学会学術総会** 日本癌学会合同シンポジウム「臨床を見据えたがんの基礎研究 最新のトピックス」2021年7月1日、横浜（オーガナイザー、講演）
6. 後藤典子：“患者由来乳がんのスフェロイド・オルガノイド培養を用いたがん幹細胞エコシステムの解析” **第33回日本内分泌外科学会総会** 特別講演 2-1 2021年6月4日、長野県軽井沢
7. 後藤典子：“乳がん幹細胞” **第2回日本チャールス・リバー・ウェビナー** 2021年5月24日、東京（オンライン）
8. 竹内康人、木村奈津子、村山貴彦、町田雪乃、家島大輔、西村建徳、王禹銘、坂本理恵子、山本瑞生、板野直樹、井上優介、伊藤正孝、吉田進昭、井上純一郎、赤司浩一、佐谷秀行、藤田浩司、黒田雅彦、北林一生、東條有伸、後藤典子：細胞質アダプタータンパク FRS2beta は、乳がん形成を促進する炎症性サイトカインリッチ環境を形成する。 **第80回日本癌学会**，横浜，2021.9.30-10.2.
9. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、矢野正雄、笹原麻子、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、井上聡、堀江公仁子、岡本康司、東條有伸、後藤典子：がん関連線維芽細胞由来の液性因子は乳がん幹細胞様細胞の維持に寄与する。 **2021 先端動物支援プラットフォーム**，オンライン，2021.9.6.
10. 竹内康人、後藤典子：MUSASHI-2 RNA 結合タンパク質は肺腺がんの EGFR 阻害剤オシメルチニブ耐性を賦与する。 **第25回日本がん分子標的治療学会学術集会**，オンライン，2021.5.26.
11. 竹内康人、後藤典子：The membrane-linked adaptor FRS2beta fashions a cytokine-rich

inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. 第18回幹細胞シンポジウム, オンライン, 2021.5.21-22.

12. 西村建徳、Jin Lee、Xiaoxi Chen、Yuming Wang、石川聡子、東條有伸、後藤典子：
“A novel inhibitor of one carbon metabolism with Chk1 inhibitor is a rational combination strategy to treat breast cancer” 第80回日本癌学会学術総会 2021年10月2日、神奈川県

<外部資金>

1. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2020.4.1-2021.3.31, 代表, 13,000 千円
2. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2020.4.1-2021.3.31, 分担, 3,900 千円
3. 後藤典子, AMED 創薬支援推進事業・創薬総合支援事業, 2021.10.1-2022.3.31, 代表, 3,960 千円
4. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2021.4.1-2022.3.31, 分担, 650 千円
5. 後藤典子, AMED 革新的医療実用化研究事業, 2021.8.20-2022.3.31, 分担, 650 千円
6. 後藤典子, 基盤研究 B (一般), 2021.4.1-2024.3.31, 代表, 15,110 千円
7. 後藤典子, 新学術領域研究 (公募研究), 2021.4.1-2022.3.31, 代表, 3,120 千円
8. 竹内康人, 科学研究費助成事業 若手研究, 2021.4.1-2027.3.31, 代表, 4,550 千円
9. 竹内康人, 基盤研究 B, 2021.4.1-2022.3.31, 分担, 130 千円
10. 竹内康人, 挑戦的萌芽研究, 2021.4.1-2023.3.31, 分担, 100 千円

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

| | |
|-------------------------|---|
| Visiting Professor | Nicholas Barker (シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員) |
| Assistant Professor | Kazuhiro Murakami 村上 和弘 |
| Assistant | Kenji Kita 北 賢二 (共同研究拠点) |
| Postdoctoral Researcher | Yumi Terakado 寺門 侑美 (~2021.3) |
| Assistant Staff | Yoshie Jomen 定免 良枝 |
| | Kikue Saitou 齋藤 喜久江 (~2021.2) |

【 Abstract 】

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

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

Recently, we have identified *Lgr5*⁺ chief cells in the corpus stomach, which serve as reserve stem cells to effect epithelial renewal following oxyntic atrophy. These reserve stem cells drive spasmodic polypeptide-expressing metaplasia in the stomach following conditional KRasG12D driver mutation, highlighting their likely contribution to gastric cancer initiation *in vivo*.

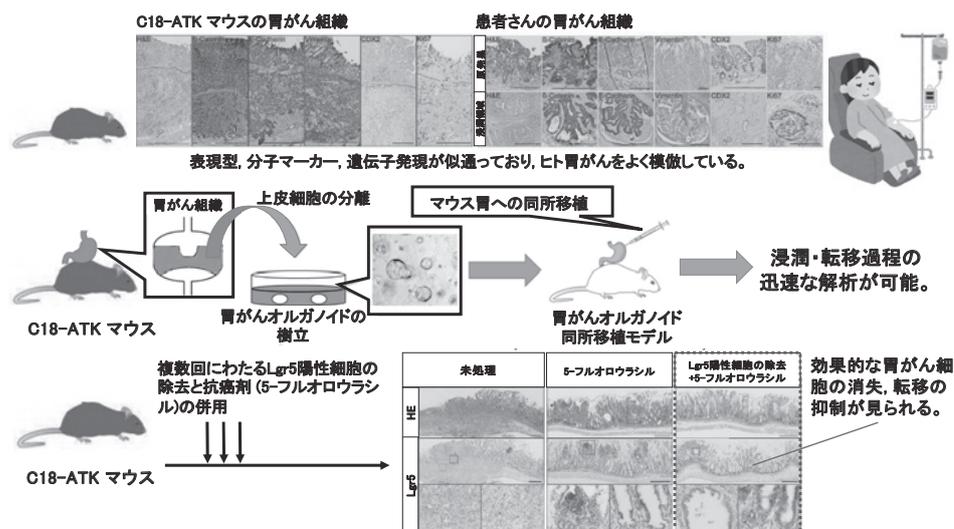
But still it is not clear whether the *Lgr5*⁺ chief cell serves as an origin of gastric cancer cell under the chronic inflammation and how cancer stem cell is induced from *Lgr5*⁺ reserve stem cells. To study the effects of chronic inflammation on stem cell-driven cancer formation and progression in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

<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. 新規胃癌マウスモデルの解析

APC, *KRas*, *p53* 遺伝子変異を組み合わせることで、悪性度の高い新たな胃癌マウスモデルを得た。これらのマウスに生じた胃癌よりオルガノイドを樹立し、免疫不全マウスの胃に同所移植を行うことで、生体内の胃癌の浸潤・転移を模倣できる新たな移植モデルを確立した。これらのマウスで *Lgr5* 遺伝子を発現する胃癌細胞を選択的に除去することで転移が抑制されることが明らかとなった。このことは、*Lgr5* 陽性胃癌細胞は、胃癌の浸潤・転移に必須ながん幹細胞である事を示唆している。

これらの結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会および第80回日本癌学会総会でポスター発表され、ポスター賞を受賞した。また、国際誌である *Nature Cell Biology* に受理された。



2. 胃幹細胞を維持する分子機構の解明

Wnt シグナルの下流因子である転写因子 *Sox9* が胃正常幹細胞の維持および胃癌幹細胞の悪性化に必須であることが明らかとなった。また、*Sox9* は胃正常幹細胞の増殖抑制を導く一方、胃癌幹細胞ではその効果を示さず、むしろ胃癌の悪性化を導くことが明らかとなった。この差は、がん抑制遺伝子 *p53* の変異状況に依存していることが明らかとなった。これらの結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会および第80回日本癌学会総会で口頭発表された。

3. 新規びまん性胃癌マウスモデルの開発

多くのびまん性胃癌で *RhoA* 遺伝子の変異がみられる。理化学研究所 生体モデル開発チームの清成寛チームリーダーらと共同で、変異型 *RhoA* を発現する新規マウスを作成した。これらのマウスを *Cldn18-CreERT2/Cdh1 cKO* マウスと交配し、胃のみで *Cdh1* 遺伝子をノックアウトしつつ変異型 *RhoA* を誘導したところ、びまん性胃癌が生じた。しかし、これらの腫瘍は転移しなかったことから、転移性胃癌を模倣するマウスモデルの作出を目指して *p53 cKO* マウスとのさらなる交配を進めている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

1. Fatehullah A*, Terakado Y*, Sagiraju S, Tan TL, Sheng T, Tan SH, Murakami K, Swathi Y, Ang N, Rajarethinam R, Ming T, Tan P, Lee B & Barker N. A tumour-resident Lgr5+ stem-cell-like pool drives the establishment and progression of advanced gastric cancers, *Nature Cell Biology*, 23, 1299-1313, 2021 (*Co-first author)

(共同研究)

2. Tsuji T, Maeda Y, Kita K, Murakami K, Saya H, Takemura H, Inaki N, Oshima M, Oshima H. *FOXO3* is a latent tumor suppressor for FOXO3-positive and cytoplasmic-type gastric cancer cells, *Oncogene*, 40(17): 3072-3086, 2021.

< 学会発表 >

村上和弘;

1. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会「胃正常組織幹細胞および胃がん幹細胞様細胞を制御する分子機構の解析」2021年9月6日 Web開催
2. 第80回 日本癌学会学術総会「LGR5陽性の胃がん幹細胞において幹細胞性を導く機構の解析」2021年9月30-10月2日 Web開催

寺門侑美;

3. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会「転移性胃がん悪性化にかかわる分子メカニズムの解明」2021年9月6日 Web開催
4. 第80回 日本癌学会学術総会「進行性胃癌発生および進行における腫瘍内 Lgr5陽性幹細胞プールの役割」2021年9月30-10月2日 Web開催

< 外部資金 >

1. 基盤研究(C)[研究代表者：村上 和弘]
「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」130万円
2. 第35回 北國がん基金[研究代表者：村上和弘]
「胃がん細胞の幹細胞性を制御する分子機構の解明」50万円
3. 若手研究 [研究代表者：寺門 侑美]
「胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明」100万円

<その他>

寺門侑美；JCA 若手研究者ポスター賞

がん幹細胞研究プログラム

Division of Molecular Genetics

遺伝子・染色体構築研究分野

| | |
|-------------------------|---|
| Professor | Atsushi Hirao 平尾 敦 |
| Assistant Professors | Yuko Tadokoro 田所優子, Masahiko Kobayashi 小林昌彦, Masaya Ueno 上野将也, |
| Postdoctoral Researcher | Kenta Kurayoshi 倉吉健太 |
| Graduate Students | Youngwei Jing, Loc Thi Pharm, Hiroki Gugiyama 杉山雄紀, Xi Chen, Yihang Gu, Yuhang Yan |
| Assistant Staff | Kazue Sawa 澤和恵, Yukiko Takai 高井由紀子 |

【 Abstract 】

Nutrients are converted by the body to smaller molecules, which are utilized for both anabolic and catabolic metabolic reactions. Cooperative regulation of these processes is critical for life-sustaining activities. Our group has been focusing on **how the regulation of nutrient-driven metabolism controls cell fate determination of stem cells and cancer cells**. For this purpose, we have examined the metabolic regulation from two perspectives: (1) the control of intracellular metabolism by the balance of anabolic and catabolic reactions; and (2) the control of organismal metabolic status by dietary intake of nutrients.

Several types of tissue stem cells, including hematopoietic stem cells (HSCs), experience long periods of quiescence or dormancy, which is supported by **catabolic regulations**, such as autophagy and lysosomal degradation process (**Figure 1**). We found a critical role of autophagy in protecting HSCs against insults during the early neonatal stage, which is essential for healthy long-term hematopoiesis (Ito C, *Sci. Rep.* 2021). Such catabolic regulation is also important for maintenance of stem cell properties in malignant tissues. We found that lysosomal degradation is essential for maintenance of undifferentiated status of myeloid leukemia, mediated by iron pathways (Pharm TL, *JSH meeting* 2021). Since the iron-dependent regulation for cell differentiation is controlled by epigenetic alterations, we are aiming to identify critical epigenetic modifiers in the downstream of lysosome activity. In addition, we have discovered that the endo-lysosomal activity is a critical biomarker for malignant progression in patient-derived glioma cells, and that lysosome is an important target for a novel therapeutic strategy (Jing Y, *JCA meeting* 2021).

It has recently been proposed that non-mutational drug resistance mechanisms underlie the survival of residual ‘drug tolerant persister’ (DTP) cancer cells, and that these DTPs display transcriptional and functional similarities to cells in “embryonic diapause” (**Figure 2**). Recently, we have identified a critical metabolic molecule induced by catabolic status, contributing to the induction of diapause state in cancer cells. We have started collaborative research for drug discovery to overcome the drug resistance, by using information technology, such as molecular simulation with a high-performance supercomputer.

In conclusion, delving into how cancer behavior is influenced by nutrient-driven metabolism leads to the development of novel therapeutics useful for treating a variety of cancers.

<2021年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

様々な生体活動において，タンパク質，糖，脂質，ビタミン，ミネラル等の栄養素の摂取およびその代謝調節は極めて重要な役割を果たす。我々は，このような栄養代謝調節の観点から幹細胞の動態およびがんの悪性化制御機構を理解したいと考え，研究を進めている。そのため，(1) 幹細胞動態に関する異化・同化制御分子の特定と機能解析，(2) 食餌中の栄養素の変動がもたらす全身的栄養代謝変動と幹細胞制御に関して複数のプロジェクトを進めた。

我々は，これまで同化制御に関わる分子としての mTOR，異化制御に関わる分子として，オートファジー・リソソーム制御分子群 (FOXO, TFEB/TFE3) の解析を進めてきた (図 1)。本年は，出生後から成体に至る過程での造血幹細胞の自己複製におけるオートファジーの役割を詳細に比較することによって，新生児期特有の環境変化に対してオートファジーが幹細胞の傷害を防ぐために重要な役割を果たすことを見出した (Ito C, *Sci. Rep.* 2021)。また，白血病幹細胞においては，リソソーム機能が鉄代謝依存的エピジェネティクス制御において重要であること，また，脳腫瘍においては，リソソーム活性がその悪性度を反映しており，重要な治療標的となることなどについて，学会報告を行った (投稿準備中)。

同化・異化調節は，がん細胞の抗がん剤耐性においても重要である。最近の研究で，がん治療中の再発の原因となる Minimal Residual Disease は，遺伝子変異が背景となるクローン由来とは別に，「休眠状態の誘導機構」の重要性が指摘された。興味深いことに，この休眠状態は，胎生期に生じる Diapause と極めて類似した制御機構が背景にあることや，Myc や mTOR のような同化制御分子の抑制により Diapause 状態が惹起されることが知られている (図 2)。我々は，異化状態で誘導される分子を同定し，抗がん剤耐性における役割の解明と阻害剤スクリーニングを実施した。現在，ヒット化合物やその類縁体のデータを基に，計算科学を用いた創薬研究の専門家とともに，スーパーコンピューターを用いた分子動態シミュレーションによる最適化を進めており，将来の治療耐性克服の実現に向けてプロジェクトを推進している。

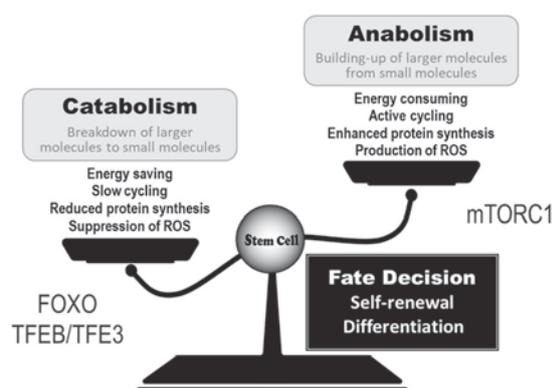


Figure 1. Anabolic/Catabolic balance

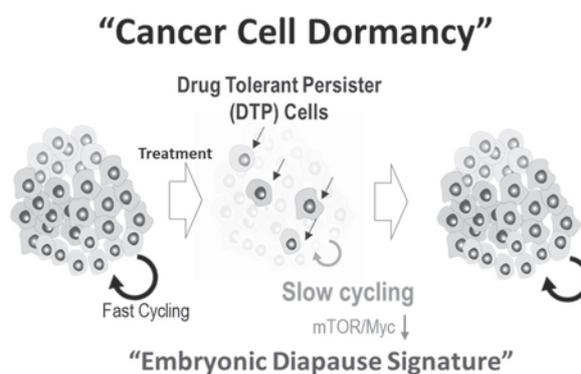


Figure 2. Diapause signature for drug resistance

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(分野主体)

1. Nomura N, Ito C, Ooshio T, Tadokoro Y, Kohno S, Ueno M, Kobayashi M, Kasahara A, Takase Y, Kurayoshi K, Si S, Takahashi C, Komatsu M, Yanagawa T, Hirao A. Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner. *Sci. Rep.* 2021, 11(1):1666.

(共同研究)

2. Hiraiwa M, Fukasawa K, Iezaki T, Sabit H, Horie T, Tokumura K, Iwahashi S, Murata M, Kobayashi M, Park G, Kaneda K, Todo T, Hirao A, Nakada M, and Hinoi E. SMURF2 phosphorylation at Thr249 modifies the stemness 1 and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating TGF- β receptor stability. *Commun. Biol.* 2022, in press
3. Tanabe M, Hosokawa K, Nguyen MAT, Nakagawa N, Maruyama K, Tsuji N, Urushihara R, Espinoza L, Elbadry MI, Mohiuddin M, Katagiri T, Ono M, Fujiwara H, Chonabayashi K, Yoshida Y, Yamazaki H, Hirao A, Nakao S. The GPI-anchored protein CD109 protects hematopoietic progenitor cells from undergoing erythroid differentiation induced by TGF- β . *Leukemia* 2021 [Online ahead of print]
4. Fukasawa K, Kadota T, Horie T, Tokumura K, Terada R, Kitaguchi Y, Park G, Ochiai S, Iwahashi S, Okayama Y, Hiraiwa M, Yamada T, Iezaki T, Kaneda K, Yamamoto M, Kitao T, Shirahase H, Hazawa M, Wong RW, Todo T, Hirao A, Hinoi E. *Oncogene* 2021, 40(15):2803-2815.
5. Baba T, Yoshida T, Tanabe Y, Nishimura T, Morishita S, Gotoh N, Hirao A, Hanayama R, Mukaida N. Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway. *Cell Death Dis.* 2021, 12(4):322.

著書・総説

平尾敦: 造血組織恒常性および腫瘍発生・増悪における腸内細菌叢の意義 臨床血液 2021, 62(7):739-743

平尾敦: がん幹細胞 新臨床腫瘍学 がん薬物療法専門医のために (改訂第6版), 2021, 47-49, 南江堂

< 学会発表 >

1. Hirao A: Cell fate decision by metabolic regulation in hematopoietic stem cell homeostasis and leukemogenesis. The 39th Sapporo International Cancer Symposium 2021 年 7 月 6-

7日, 札幌

2. Hirao A: Cell fate determination mediated by nutrient-derived metabolites in tumor development and malignant progression. 第80回日本癌学会学術総会, 2021年9月30-10月2日, 横浜
3. 平尾敦: 栄養代謝による細胞運命決定とがん, 第94回日本生化学大会, 2021年11月3-5日, Web開催
4. 田所優子: 加齢に伴う造血の変化—造血幹細胞エイジングに着目して—, BPNP2021 サテライトシンポジウム, B6J AGED 研究会 第3回講演会, 2021年7月13日, 京都
5. Kobayashi M, Jing Y, Hirao A: Acquisition of therapy-resistance through proneural-mesenchymal transition in glioblastoma, 第80回日本癌学会学術総会, 2021年9月30日-10月2日, 横浜
6. 倉吉健太, 平尾敦: FOXOs 下流因子を対象とした白血病幹細胞の分化誘導法の開発, 2021年9月6日, Web開催
7. Pham TL, Kurayoshi K, Ueno M, Hirao A: Critical roles of iron homeostasis controlled by lysosomal acidification in maintaining undifferentiated status of leukemia, 第83回日本血液学会学術集会, 2021年9月23-25日, Web開催
8. Jing Y, Kobayashi M, Hirao A: A novel therapeutic strategy for glioblastoma by targeting lysosome membrane integrity controlled by autophagy activity, 第80回日本癌学会学術総会, 2021年10月1日, 横浜
9. Chen X, Tadokoro Y, Si S, Honda H, Hirao H: Identification of diet-dependent metabolites for controlling development of hematopoietic neoplasm, 第25回造血器腫瘍研究会, 2021年1月23日, Web開催

<知的財産>

1. 平尾敦, Jing Y, 小林昌彦, 中田光俊: 腫瘍治療用医薬組成物、出願番号 2021-151703

<外部資金>

1. 平尾敦: 基盤研究 (A) R1~R4 年度「代謝調節によるがんステムネス制御の分子基盤」8,600 千円
2. 平尾敦: 挑戦的研究 (萌芽) R3~R4 年度「造血器腫瘍の治療および予防に資する代謝物探索システムの構築」2,000 千円
3. 平尾敦: 次世代がん医療創生研究事業 R1~R3 年度「代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発」16,509 千円
4. 田所優子: 基盤研究 (C) R1~R3 年度「栄養環境変化による造血幹細胞恒常性維持機構の解明」1,100 千円

5. 田所優子：令和2年度 高松宮妃癌研究基金研究助成金「遺伝子異常に依存した食餌性ストレスによる白血病進展機構の解析」2,000 千円
6. 上野将也：基盤研究（C）R2～R4 年度「がん特異的な栄養代謝経路におけるニコチンアミド代謝の機能解析」1,000 千円
7. 上野将也：日本血液学会 2021 年度研究助成「ニコチンアミド代謝を介した白血病の抗がん剤不応性（Drug tolerant persister）機構の解明」500 千円
8. 小林昌彦：基盤研究（C）R2～R4 年度「悪性脳腫瘍の不均一性と治療抵抗性に働く細胞系譜転換の分子基盤」1,100 千円
9. 倉吉健太：若手研究 R3～4 年度「リソソーム代謝経路が規定する白血病幹細胞の未分化性維持機構の解明」1,900 千円

Division of Oncology and Molecular Biology

腫瘍分子生物学研究分野

| | |
|----------------------|--|
| Professor | Chiaki Takahashi 高橋 智聡 |
| Assistant Professors | Susumu Kohno 河野 晋, Sheng Jindan 盛 金丹 (2021.10.1~2021.12.31) |
| Graduate Students | Kulathnga Liyana Arachchillage Nilakshi (~2021.3.31), Sheng Jindan 盛 金丹 (~2021.9.30) , Zhang Zhiheng 張 智恒 (~2021.9.30) , Yu Hai 余 海, Gong Linxiang 龔 麟祥, Kana Teranishi 寺西 夏菜, Zhang Yuanyuan 張 園園, Zhang Zixue 張 子雪, Yu jinghui 于 靖暉 (2021.1.1~) , Renata Akhmetzianova (2021.4.1~) , Quan Ruifang 權 瑞方 (2021.4.1~) , Yu Peifu 于 沛夫 (2021.4.1~) , Nada Hamdy Mohamed Hussein (2021.10.1~) |
| Technical Assistant | Naoko Nagatani 永谷 直子 |

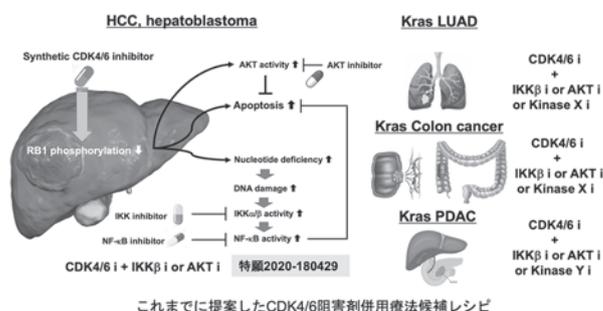
【 Abstract 】

Majority of cancers carry wild-type RB1 to those synthetic CDK4/6 inhibitors might be effective. For HR+; HER2- advanced breast cancer patients, it is recommended to use these agents in combination with endocrine therapy. However, the expansion of indications for other cancers has been developed slowly. We determined rationales for synthetic CDK4/6 inhibitor combination therapy to treat hepatocellular carcinoma, K-Ras-mutated lung, colon and pancreatic cancers. We also explored the intrinsic mechanisms whereby cancer cells resist to CDK1/2/5/9, CDK9 and newly developed CDK2/4/6 inhibitors. RB1 inactivation causes cancer initiation in limited type of cancers but in most types promotes progression. We identified a number of novel RB1 targets including ELOVL6 in the latter context and explored clinical significance. The frequency of RB1 gene deletion in primary prostate cancer is less than 10%, which reaches to 37% in metastatic lesions. RB1 deletion in advanced prostate cancer very frequently involves SUCLA2 loci located in the vicinity causing certain metabolic vulnerabilities which can be pharmacologically targetable by 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone. We are trying to identify the molecular target of this agent and discover compounds with similar/better bioactivity by a large-scale rescreening. Based on collaborations, we defined thus far the most reasonable explanation for Warburg's

effect in tumor cells, and discovered RECK as a promising therapeutic target in Alzheimer's disease.

<2021年の成果、進行状況と今後の計画・展望>

RB1 を長期に亘って無リン酸化状態に置く薬剤である合成CDK4/6阻害剤のRB1野生型非乳がんへの適応拡大を目指し、まず肝細胞がんを標的とした。RB1野生型肝細胞がんへのCDK4/6阻害剤の治療効果は部分的であったので、これを増感する化合物を探索し、IKK β 阻害剤等を得た。次いで、RB1が野生型



である事が多く加えて D 型サイクリン依存的に高度リン酸化されると考えられる KRas 変異がん（肺がん、大腸がん、膵臓がん）への適応拡大のための併用薬剤をスクリーニング、更に3種類のキナーゼ阻害剤を見出した（図、*Hepatology* 2021、特許出願準備中）。CDK1/2/5/9 および CDK9 選択的阻害剤や新規開発された CDK2/4/6 阻害剤の臨床開発の為に基盤研究にも着手した。これは RB1 インタクトがん患者にとって福音となるはずである。一方で、我々は、RB1 機能を喪失ないし遺伝子を欠失したがんの克服にも取り組んできた。近年、CHK1, PLK, Aurora-A, B 等の阻害との合成致死性が報告されている。我々は、Ras, LOX, IL6, CCL2, CCL5, SCD1, ELOVL6 等を、RB1 機能を喪失したがんの新規治療標的として報告してきた。AMED 支援によって、ELOVL6 阻害が強いがん抑制効果を示すこと、その機構にセラミドが関与する事、ELOVL6 阻害への AKT シグナルを介する内在的耐性機構も判明し、ELOVL6 阻害剤開発のための POC とした（投稿準備中）。一方、進行前立腺がんにおいて頻繁にホモ欠失する RB1 の近傍に位置し、RB1 欠失に随伴して欠失する SUCLA2 に注目した。この異常は進行前立腺がん症例の 10 から 30%に存在すると予測、慈恵会医大泌尿器科が日本人症例においてその検証を行っている。慶応義塾大学等と協力し、SUCLA2 欠失細胞に不可逆性の代謝脆弱性を見出した。SUCLA2 欠失細胞を選択的に傷害する薬剤をスクリーニングし、二つのヒット化合物を得ている。AMED 支援を得、うち 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone の構造展開を実施、金沢大薬学系において分子プローブ化、釣り竿法による分子標的同定を試みている。和光理研において、酵母を用いた化学遺伝学的アプローチによる標的推定、P1 レベルの大規模再スクリーニングを実施中。大阪大学との共同研究により、Warburg 効果の真の意味の理解に挑戦した（投稿中）。ジョンズホプキンス大学との共同研究によりアルツハイマー 治療標的として RECK 分子が有望である事を報告した (*Sci. Transl. Med.* 2021)。これまでに蓄積した新知見を臨床開発につなげる努力を続ける。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

1. Sheng J, Kohno S, Okada N, Okahashi N, Teranishi K, Matsuda F, Shimizu S, Linn P, Nagatani N, Yamamura M, Harada K, Horike S, Inoue H, Yano S, Kumar S, Kitajima S, Ajioka I and Takahashi C. Treatment of retinoblastoma 1-intact hepatocellular carcinoma with cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor combination therapy. *Hepatology* 74(4):1971-1993, 2021. doi: 10.1002/hep.31872.

(共同研究)

1. Nakamura M, Li Y, Choi BR, Matas-Rico E, Troncoso J, Takahashi C and Sockanathan S. GDE2-RECK controls ADAM10 α -secretase-mediated cleavage of amyloid precursor protein. *Sci. Transl. Med.* 17;13(585):eabe6178, 2021. doi: 10.1126 /scitranslmed.abe6178.
2. Gutiérrez J, Gonzalez D, Escalona-Rivano R, Takahashi C and Brandan E. Reduced RECK levels accelerate skeletal muscle differentiation, improve muscle regeneration and decrease fibrosis. *FASEB J.* 35(5):e21503, 2021. doi: 10.1096/fj.202001646RR.
3. Murata T, Hashimoto K, Kohno S, Takahashi C, Yamaguchi M, Ito C, Itoigawa M, Kojima R, Hikita K, Kaneda N. Chemical inducer of regucalcin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in pancreatic MIN6 β -cells and RAW264.7 macrophages. *FEBS Open Bio* 2021 Oct 28. doi: 10.1002/2211-5463.13321 (Online ahead of print)

(著書・総説)

1. Takahashi C and Kato J. Synthetic inhibitors of CDK4/6 activities and tumor suppression: a preface to the special issue. *Oncology* 1(1):1-2, 2021.
2. Linn P, Kohno S, Sheng J, Kulathunga N, Yu H, Zhang Z, Voon D, Watanabe Y and Takahashi C. Targeting RB1 loss in cancers. *Cancers* 13: 3737, 2021. doi: 10.3390/cancers13153737
3. 高橋智聡, 河野晋. 『がん細胞社会における細胞間相互作用 Which intercellular interaction should be targeted in cancer therapy?』別冊・医学のあゆみ p67-71, 2021 「細胞競合による生体制御とがん」井垣達吏編

<学会発表>

1. Kohno S, Paing Linn, Soga T, Takahashi C. Pharmacologically targetable metabolic vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion. Keystone symposia tumor metabolism and microenvironment. 2021年1月25日-28日 (オンライン開催 1/25-28 ポスター)
2. 盛金丹. New combination therapy of HCC by CDK4/6 inhibitor in combination with a kinase inhibitor. 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会 2021年2月18-21日 (オンライン開催 2/18-21 ポスター)
3. 野口 雅史, 河野 晋, 柴田 桂太朗, 河野 隆志, 後藤 典子, 高橋 智聡, 平尾 敦, スコラーノ ルカ, 笠原 敦子. ヒト肺腺がんのゲフィチニブ 耐性機構におけるミトコンドリア融合因子OPA1の役割. 第94回日本薬理学会年会 2021年3月8-10日 (札幌市/札幌コンベンションセンター/オンライン開催 3/8-3/10)
4. Kohno S, Paing Linn, Mishiro K, Kunishima M, Watanabe Y and Takahashi C. Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying *RB1-SUCLA2* loss. AACR Annual Meeting 2021 2021年4月10-15日 (オンライン開催 4/10-15,5/17-21)
5. Sheng J, Kohno S, Okada N, Ajioka I and Takahashi C. Treatment of RB1-intact cancers with CDK4/6 inhibitor combination therapy. AACR Annual Meeting 2021 2021年4月10-15日 (オンライン開催 4/10-15,5/17-21)
6. Takahashi C. Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion. Cancer Science and Targeted Therapy Conference 2021 2021年9月7日 (Melbourne, Australia / Mantra bell city 9/6-7 口頭)
7. 高橋智聡, 盛金丹, 河野晋. RB1 がん抑制遺伝子のステータスを標的とするがん治療. 第80回日本癌学会学術総会 2021年9月30日 (横浜市/パシフィコ横浜 9/30-10/2 口頭)
8. Sheng J, Kohno S, and Takahashi C. CDK4/6 inhibitor combination therapy for the treatment of RB1-intact HCC. 第80回日本癌学会学術総会 2021年9月30日 (横浜市/パシフィコ横浜 9/30-10/2 ポスター)
9. 河野晋, 高橋智聡. RB1-SUCLA2 欠失による代謝脆弱性を標的とした前立腺がん治療法の開発. 第80回日本癌学会学術総会 2021年10月2日 (横浜市/パシフィコ横浜 9/30-10/2 ポスター)
10. 高橋智聡, 盛金丹, 河野晋. 合成CDK4/6阻害剤による肝細胞がん治療. 第59回日本癌治療学会学術集会 2021年10月21日 (横浜市/パシフィコ横浜 10/21-23 口頭)
11. 河野晋, 佐々木信成, 高橋智聡. RB-コレステロールによる未分化性維持機構の解明. 第94回日本生化学大会 2021年11月3-5日 (横浜市/パシフィコ横浜 11/3-5 ポスター)

12. 盛金丹. Treatment of RB1-intact cancers with CDK4/6 inhibitor combination therapy.
第16回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2021年11月11-12日(熊本市/熊本大学 11/12 口頭)

<外部資金> (2021年度/R3年度が含まれる課題)

高橋智聡

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (B) R2~R5 年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」(代表) 3,300 千円
2. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) R1~R3 年度「関節リウマチ滑膜の上皮間葉移行の新規制御分子 DIP2C の解析と治療作用点の検討」 (分担) 200 千円
3. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) R2~R4 年度「閉経後ホルモン依存性子宮体癌の発症・進展の新たな分子機構-男性ホルモン作用の解析と臨床応用-」 (分担) 2,000 千円
4. 次世代がん医療創生研究事業 (AMED) R3~R4 年度「SUCLA2 遺伝子欠失を標的とする進行前立腺がんの新規治療法開発」(代表) 4,000 千円

河野晋

1. 学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) R2~R4 年度「晩期再発乳がんにおける休眠トリガーと分子機構の解明」 800 千円
2. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) R2~R4 年度「閉経後ホルモン依存性子宮体癌の発症・進展の新たな分子機構-男性ホルモン作用の解析と臨床応用-」 (分担) 2,000 千円
3. 次世代がん医療創生研究事業 (AMED) R3~R4 年度「SUCLA2 遺伝子欠失を標的とする進行前立腺がんの新規治療法開発」(分担) 2,500 千円

Division of Molecular Bioregulation

分子生体応答研究分野

Professor Naofumi Mukaida 向田直史 (～2021.3)

Associate Professor Tomohisa Baba 馬場智久

Technical Assistant Kuniko Minami 南邦子

【 Abstract 】

Cytoplasmic DNA accumulation-induced cytotoxicity in myeloid leukemia cells

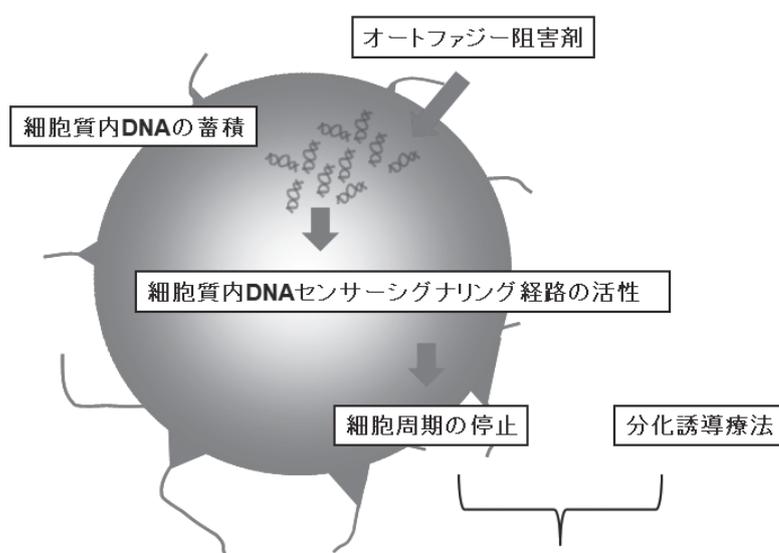
Accumulating evidence indicates the presence of cytosolic DNA in various types of malignant cells, and its involvement in anti-cancer drug- or radiotherapy-mediated DNA damage response and replication stress. However, the pathophysiological roles of cytosolic DNA in leukemias remain largely unknown. We investigated the cytosolic DNA dynamics in acute myeloid leukemia (AML) cells and revealed that autophagy can regulate cytosolic DNA accumulation. Inhibition of autophagosome formation induced cytosolic DNA accumulation, eventually triggering cytosolic DNA-sensor signaling pathways to exert cytotoxicity in AML cells. Furthermore, autophagy inhibitors augmented an effect of differentiation therapeutic drug, all-trans retinoic acid (ATRA), revealed as an irreversible myeloid cell differentiation. Thus, manipulation of cytosolic DNA dynamics can be a novel and potent therapeutic strategy for AML.

<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

細胞質内 DNA 蓄積に伴う骨髄性白血病細胞の細胞毒性

ヒト急性骨髄性白血病（AML）細胞を用いた解析から、白血病細胞では過剰な細胞分裂にともなって、核内から細胞質に2本鎖DNA断片が逸脱していることを見出した。通常はオートファジーにより分解され、恒常性を維持しているが、オートファジー形成を抑制すると、細胞質内DNAの蓄積により細胞質内DNAセンサーシグナリング経路の活性化を介して細胞毒性を示すことを明らかにした。AML細胞に対して骨髄球分化を誘導し、白血病性の異常増殖を抑制することを目的とした分化誘導療法が世界的に注目されている。これらの知見を踏まえ、ヒトAML細胞に対して分化誘導療法の代表的治療薬であるATRAとオートファジー阻害剤を併用処置した結果、AML細胞に不可逆的な骨髄球分化を誘導することで、抗白血病作用が著しく増強した（概念図）。今後AMLマウス実験モデルを用いて、ATRAとオートファジー阻害剤の併用による治療効果を生体内で検討する。

概念図



急性骨髄性白血病細胞の不可逆的な骨髄球分化

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

Baba T, Yoshida T, Tanabe Y, Nishimura T, Morishita S, Gotoh N, Hirao A, Hanayama R, Mukaida N. Cytoplasmic DNA accumulation preferentially triggers cell death of myeloid leukemia cells by interacting with intracellular DNA sensing pathway. *Cell Death Dis* 2021, 12:322. doi: 10.1038/s41419-021-03587-x.

(共同研究)

1. Zoshima T, Baba T, Tanabe Y, Ishida Y, Nakatani K, Nagata M, Mukaida N, Kawano M. CCR2- and CCR5-mediated macrophage infiltration contributes to glomerular endocapillary hypercellularity in antibody-induced lupus nephritis. *Rheumatology* (Oxford) 2021, 8:keab825. doi: 10.1093/rheumatology/keab825.

2. Sasaki SI, Zhang D, Iwabuchi S, Tanabe Y, Hashimoto S, Yamauchi A, Hayashi K, Tsuchiya H, Hayakawa Y, Baba T, Mukaida N. Crucial contribution of GPR56/ADGRG1, expressed by breast cancer cells, to bone metastasis formation. *Cancer Sci* 2021, Online ahead of print. doi: 10.1111/cas.15150.

< 学会発表 >

Baba T. Autophagy inhibitor selectively induces cytotoxicity against myeloid leukemia cells by accumulating cytosolic DNA. 第 80 回日本癌学会学術総会。2021 年 9 月 30 日～10 月 2 日。横浜。

< 外部資金 >

馬場智久

1. 科学研究費・基盤研究 (C) (代表) 「ドナー細胞由来白血病の発症にかかわる細胞外小胞の病態生理学的役割の解明」 (直接経費 1,100 千円, 間接経費 330 千円)
2. 科学研究費・基盤研究 (C) (分担) 「時空間的解析による大動脈瘤発生から進行過程でのケモカイン・システムの機能解明」 (直接経費 300 千円, 間接経費 0 千円)

がん微小環境研究プログラム

Division of Immunology and Molecular Biology

免疫炎症制御研究分野

| | | |
|---------------------|-------------------|-------|
| Professor | Takashi Suda | 須田 貴司 |
| Associate Professor | Kohsuke Tsuchiya | 土屋 晃介 |
| Assistant Professor | Takeshi Kinoshita | 木下 健 |
| Assistant Staff | Shoko Hosojima | 細島 祥子 |
| Research Cooperator | Hiroko Kushiyama | 串山 裕子 |

【 Abstract 】

In response to infection, massive cell death in the surrounding tissue, and so on, macrophages commit suicide called pyroptosis, which is a necrotic and inflammatory form of programmed cell death. Simultaneously, dying macrophages release inflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1 β and IL-18. Under these conditions, various pattern recognition receptors, such as NLRP3, NLRC4, and AIM2, form multiprotein complex called inflammasome together with procaspase-1. Caspase-1 activated in the inflammasome cleaves gasdermin D (GSDMD), whose N-terminal fragments then form pores in the plasma membrane to induce pyroptosis. Caspase-1 also cleaves proIL-1 β and proIL-18 to convert them into mature forms. During the process of pyroptosis, proIL-1 α is also converted into its mature form in caspase-1 dependent manner. However, proIL-1 α is not a substrate of caspase-1. Thus, what cleaves proIL-1 α , and how caspase-1 is involved in IL-1 α maturation has been unclear. We found that GSDMD is required for the rapid induction of IL-1 α maturation by inflammasome activators. Ablation of GSDMD abrogates the maturation of IL-1 α , but not of IL-1 β . Maturation of IL-1 α required extracellular Ca²⁺ and calpains. Ca²⁺ influx and calpain activation are induced in a GSDMD-dependent manner. These results suggest that IL-1 α is cleaved by calpains that are activated by Ca²⁺ influx through plasma membrane pores generated with caspase-1-cleaved GSDMD fragments (Cell Reports, 2021).

We have found that KIF11 contributes to inflammasome formation and induction of pyroptosis. To investigate the role of KIF11 in NLRP3 inflammasome functions in vivo, we are currently investigating the effect of a KIF11 inhibitor in mouse obesity model, because the role of NLRP3 inflammasome in obesity-mediated metabolic disorders has been reported. KIF11 is known to play an important role in spindle formation and chromosome segregation during cell division. Phosphorylation of KIF11 is required for this function of KIF11. We found that KIF11 is also phosphorylated after NLRP3 activation. The importance of KIF11 phosphorylation in inflammasome formation is currently under investigation.

<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. パイロトーシスにおけるガスダーミンD (GSDMD) の活性化機構と役割の研究
病原体感染などにより活性化されたカスパーゼ1はGSDMDを切断し、そのN末断片が細胞膜に孔を形成することでパイロトーシスを誘導する。パイロトーシスを起こしたマクロファージなどでは、IL-1 α / β 、IL-18などの炎症性サイトカインが前駆体型から成熟型に転換され、GSDMDが形成した孔から放出される。IL-1 β やIL-18の成熟はカスパーゼ1によって触媒されるが、IL-1 α の成熟機構については不明な点が多かった。我々は、GSDMD形成した細胞膜の孔からCa²⁺の流入が起こり、それによって活性化されたカルパインがIL-1 α の成熟に働くことを明らかにした (Cell Reports, 2021)。加えて、GSDMDを活性化する新規プロテアーゼの探索を行い、その結果、あるカスパーゼが細菌由来分子パターンに応じてGSDMDを活性化することがわかった。今後、その詳細な分子機序や生理的意義を明らかにする。

2. 自然免疫応答におけるモーター蛋白KIF11の役割の解析

KIF11とNLRP3のリンクをin vivoで検証する目的で、琉球大学の今村美菜子准教授らが保有する肥満モデルマウス (db/db) の耐糖能、インスリン感受性がKIF11インヒビターを投与することで改善するシステムを利用させていただき、マウスの脂肪組織サンプルにおけるNLRP3活性化を解析した。今回は高脂肪、高ショ糖餌誘発性肥満マウス脂肪組織を提供頂き、肥満誘発マウスで亢進しているcaspase-1の活性化がKIF11阻害剤投与によって抑制されていることを示す結果を得た。in vivoでKIF11がNLRP3応答に関与することを示す有力なデータであると考え。引き続き、肥満モデルマウス (db/db) の組織サンプルを提供頂き、caspase-1の活性化を解析する予定。また、紡錘体においてKIF11が機能するために必須とされるリン酸化修飾が、NLR刺激に応じてKIF11に入ることを確認した。KIF11のモータータンパクとしての機能が自然免疫応答に必須であることを示すデータと考える。該当アミノ酸変異KIF11発現と現在構築中のKIF11ノックアウト細胞システムと組み合わせてリン酸化修飾の重要性を明確にする予定。

3. パイロトーシス細胞が放出する細胞内リステリア増殖抑制活性の解析

我々は、パイロトーシスを起こした細胞の培養上清中にマクロファージの細胞内に感染したリステリア菌の増殖を抑制する活性を見出し、この活性を担いする代謝産物を同定した。本年度は、培養上清中に含まれる本物質のHPLC法による定量を試みている。今後は、リステリア感染マウスモデルにおいて、in vivoで本物質がリステリアの増殖を抑制するか検討する予定である。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Tsuchiya K, Hosojima S, Kushiya H, Mahib MR, Kinoshita T, Suda T. Gasdermin D Mediates the Maturation and Release of IL-1 α Downstream of Inflammasomes. Cell Reports, 34: 108887, 2021.

(共同研究)

1. Kumrungsee T, Peipei Zhang, Yanaka N, Suda T, Kato N. Emerging cardioprotective mechanisms of vitamin B6: a narrative review. Eur J Nutr, 2021, published online, doi: 10.1007/s00394-021-02665-2.
2. Uematsu T, Tsuchiya K, Kobayashi N, Seiki M, Inoue JI, Kaneko S, Sakamoto T. Mint3 depletion-mediated glycolytic and oxidative alterations promote pyroptosis and prevent the spread of Listeria monocytogenes infection in macrophages. Cell Death & Disease, 12: 404, 2021.

総説 (研究室主体)

1. Tsuchiya K. Switching from Apoptosis to Pyroptosis: Gasdermin-Elicited Inflammation and Antitumor Immunity. International Journal of Molecular Sciences, 22: 426, 2021.

< 学会発表 >

1. 土屋晃介, 須田貴司. Gasdermin D mediates the release and maturation of IL-1 α during inflammasome formation. 第94回日本細菌学会総会. 2021年3月23~25日(オンライン).
2. 木下健、KIF11を介した細胞死と自然免疫応答の制御、第29回日本Cell Death学会学術集会、オンライン開催、2021年7月27日
3. 木下健、キネシンモーターKIF11による自然免疫応答制御、第2回細胞死コロキウム、オンライン開催、2021年11月18日
4. Kinoshita T, Tsuchiya K, and Suda T. Kinesin molecular motor Eg5 functions during innate immune signaling. 第44回日本分子生物学会年会. Online Meeting, 2021年12月2日

< 外部資金 >

1. 須田貴司 (代表) 科学研究費 基盤研究 (B) 「パイロトーシス細胞が放出するリステリア増殖抑制因子の解析」直接経費 3,500 千円

2. 土屋晃介（分担）科学研究費 基盤研究(B)「パイロトーシス細胞が放出するリステリア増殖抑制因子の解析」直接経費: 350 千円
3. 土屋晃介（分担）AMED 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「過栄養による肝細胞死の様式変容とその生活習慣病発症・増悪のメカニズムの解明」直接経費: 1,000 千円
4. 土屋晃介（代表）武田科学振興財団 2021 年度 医学系研究継続助成（基礎）「カスパーゼ-1 による細胞死誘導の分子機序とインフラマソーム関連疾患における役割」配分額: 3,000 千円（2021～2022 年度）
5. 土屋晃介（代表）公益財団法人三谷研究開発支援財団・研究開発資金助成「炎症性細胞死パイロトーシスで免疫学的に「冷たい」がんを「熱く」する手法の開発」配分額: 1,500 千円

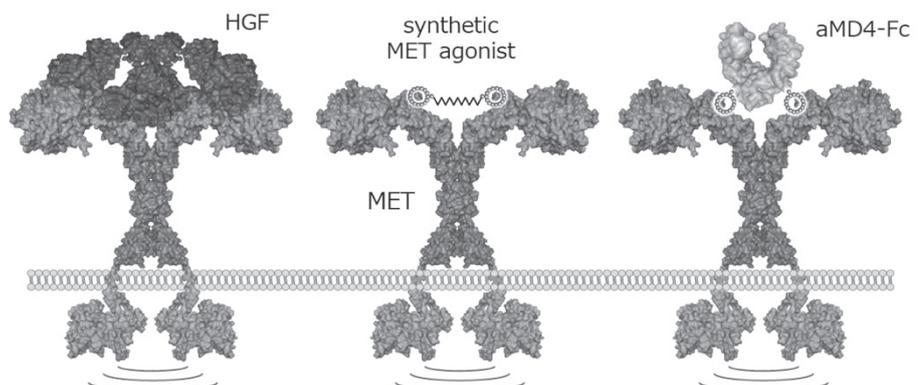
Division of Tumor Dynamics and Regulation

腫瘍動態制御研究分野

| | |
|-----------------------|---|
| Professor | Kunio Matsumoto 松本 邦夫 |
| Associate Professor | Katsuya Sakai 酒井 克也 |
| Assistant Professors | Ryu Imamura 今村 龍 Hiroki Sato 佐藤 拓輝 NEVAL YILMAZ (ナノ生命科学研究所) Xujun Han (ナノ生命科学研究所・矢野先生の研究室から出向) |
| Research Fellow | Nichole Marcela Rojas Chaverra |
| Graduate Student | Yumiko Tahira 田平 裕美子 |
| Graduate Student | Borui Lee |
| Undergraduate Student | Itsuki Sakai 酒井 伍希 |
| Assistant Staff | Natsuko Higashi 東 奈津子 |

【Abstract】

Our research is focusing on 1) discovery of new physiological function of MET/HGF receptor, 2) mechanisms of metastatic niche formation by HGF-MET activation, 3) drug discovery based on cyclic peptides and protein engineering. Our research progresses in 2021 are followings. (1) As an innate immunity, infection of RNA virus induces inflammatory cytokine production in epithelial cells. We revealed that MET intracellularly facilitates MAVS aggregation in mitochondria, which induces inflammatory cytokine production, MET tyrosine kinase activity is indispensable in this innate immune response. Promotion of innate immune response is new function of MET regulated by non-canonical kinase-independent mechanism. (2) In the model of lung metastasis, the processing from precursor HGF to active HGF occurred in the lung before the colonization of tumor cells. Newly generated HGF activated MET in epithelial cells and induced expression of genes closely involved in metastatic niche formation, and metastatic niche formation was suppressed by selective inhibition of active MET. Processing of HGF, rather than de novo gene induction, in distant site facilitates MET activation which promotes premetastatic tumor microenvironment formation before tumor cell colonization. (3) Employing Lasso-Graft technology which confers new binding properties to a variety of protein scaffolds by functional insertion of macrocyclic peptide pharmacophores, immunoglobulin Fc-based receptor agonist (right figure) and anti-transferrin antibody-based receptor agonist with long circulatory residency and the blood-brain-barrier penetrance were generated.



<2021年の研究成果, 進行状況>

1. Non-canonical MET 経路を介した自然免疫制御

(1) RNA ウイルス感染から炎症性サイトカイン産生の誘導に至る自然免疫応答性が MET 受容体欠損で低下すること, (2) MET はミトコンドリア MAVS タンパク質の重合を促進すること, (3) 自然免疫応答には MET 細胞内領域が関与するもののチロシンキナーゼ活性に依存しないことを見出した。MET 受容体を介した 2 本鎖 RNA 自然免疫応答は, MET の新しい生理機能であるばかりか, チロシンキナーゼ非依存的な non-canonical シグナル経路を介して発揮される (論文投稿中)。

2. HGF のプロセッシングを起点とするがん転移微小環境形成

がん転移に先立ち, 遠隔組織において転移を許容する微小環境 (ニッチ) が形成されるメカニズムは解明されていない。HGF は不活性前駆体 HGF として分泌・貯留され, によって MET 活性化能をもつ活性型 HGF に変換される。悪性黒色腫の肺転移モデルを解析系として, 肺転移に先立って腫瘍由来因子の作用により肺上皮細胞での活性型 HGF へのプロセッシングと MET 活性化がみられること, MET 活性化によって転移ニッチ形成に関与する分子群の発現が上昇すること, 肺局所での活性型 HGF の特異阻害は転移を抑制することを見出した。遠隔組織での HGF のプロセッシングが転移ニッチ形成に役割を果たすと考えられる (論文準備中)。

3. Lasso-Graft 法を用いた高機能 MET アゴニスト創成

MET 受容体細胞外領域に高親和性結合する環状ペプチド配列 (aMD4) を Fc 分子に内挿することによって, HGF とほぼ同等に MET 受容体を活性化するタンパク質 (aMD4-Fc) を創成した。aMD4-Fc は Fc 分子の特性に起因する長期血中安定性を示すことから慢性疾患治療に有用と考えられる。また, aMD4 を抗トランスフェリン抗体分子内に内挿し血液脳関門を通過するとともに MET 受容体を活性化できるアゴニストを創成した (論文投稿中)。

4. HGF-MET 系活性化を介した NASH 改善

NASH (非アルコール性脂肪肝炎) は肝疾患の中で最も患者数が多く, 有効な医薬がない。NASH モデルマウスを用いて HGF は脂質代謝・輸送, 細胞死抑制, 炎症抑制に関わる遺伝子群の発現を誘導し, 脂質減少と炎症抑制を介して NASH 病態を改善することを見出した。MET 活性化は NASH 改善につながる (論文準備中)。

<今後の計画>

1. HGF-MET 系を介した premetastatic niche 形成のメカニズムと意義
2. 自然免疫応答における MET 新機能の腫瘍進展における意義
3. MET 受容体活性化の構造ダイナミクスの研究
4. 環状ペプチドタンパク質工学による高機能 MET リガンドの創成, 薬効検証, 新たな生理活性タンパク質の創成

【 研究業績 】

<論文発表>

原著

(研究室主体)

1. Tahira Y, Sakai K, Sato H, Imamura R, Matsumoto K. Dimer interface in natural variant NK1 is dispensable for HGF-dependent Met receptor activation. *Int J Mol Sci*, 22: 9240, 2021. DOI: org/10.3390/ijms2217240.

(共同研究)

2. Kajiwara K, Yamano S, Aoki K, Okuzaki D, Matsumoto K, Okada M. CDCP1 promotes compensatory renal growth 1 by integrating Src and Met signaling. *Life Science Alliance*, 4: e202000832, 2021. DOI: 10.26508/lsa.202000832.
3. Mihara E, Watanabe S, Bashiruddin NK, Nakamura N, Matoba K, Yumi Sano, Maini R, Yin Y, Sakai K, Arimori T, Matsumoto K, Suga H, Takagi J. Lasso-grafting of macrocyclic peptide pharmacophores yields multi-functional proteins. *Nature Commun*, 12: 1543, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-21875-0
4. Komatsu Y, Naohiro Terasaka N, Sakai K, Mihara E, Wakabayashi R, Matsumoto K, Hilvert D, Takagi J, Suga H. De novo peptide grafting to a self-assembling nanocapsule yields a hepatocyte growth factor receptor agonist. *iScience*, 24: 103302, 2021. DOI: org/10.1016/j.isci.2021.103302
5. Puppulin L, Kanayama D, Terasaka N, Sakai K, Kodera N, Umeda K, Sumino A, Marchesi A, Weilin W, Tanaka H, Fukuma T, Suga H, Matsumoto K, Shibata M. Macrocyclic peptide-conjugated tip for fast and selective molecular recognition imaging by high-speed atomic force microscopy. *ACS Appl Material Interfaces*, 13: 54817-54829, 2021. DOI: org/10.1021/acsami.1c17708
6. Saitou A, Hasegawa Y, Fujitani N, Ariki S, Uehara Y, Hashimoto U, Saito A, Kuronuma K, Matsumoto K, Chiba H, Takahashi M. N-glycosylation regulates MET processing and signaling. *Cancer Science*, 13: 1292-1304, 2022. DOI: 10.1111/cas.15278.

<総説・著書>

1. 松本邦夫. メラノーマの浸潤・転移. 「皮膚悪性腫瘍 (第2版) 上 - 基礎と臨床の最新研究動向 -」 日本臨床社、pp 132-137, 2021.

(共同研究)

2. Yoshihara M, Mizutani S, Kato Y, Matsumoto K, Mizutani E, Mizutani H, Osuka S, Kajiyama H. New insights into human endometrial peptidases in blastocysts implantation. *Int J Mol Sci*, in press.

3. 藁科翔太, 佐藤拓輝, 造田真希, 酒井克也, Passioura Toby, 和田康弘, 菅裕明, 松本邦夫, 渡辺恭良, 向井英史. プレシジョンがん診断を指向した活性型 HGF 分子イメージング用環状ペプチド PET プローブの開発. JSMI Report, 14: 26-30, 2021.

<学会発表>

1. 藁科翔太, 佐藤拓輝, 造田真希, 酒井克也, Toby Passioura, 和田康弘, 菅裕明, 松本邦夫, 渡辺恭良, 向井英史. 腫瘍局所での HGF 活性化を捉える環状ペプチド PET プローブの開発. 第 15 回 日本分子イメージング学会 総会・学術集会, 2021 年 5 月 26 日 (熊本)
2. Hiroki Sato, Katsuya Sakai, Ryu Imamura, Kunio Matsumoto. HGF conversion in bronchial epithelial cells triggers pre-metastatic niche formation in the lung. 第 80 回日本癌学会総会, 2021 年 10 月 1 日 (横浜)
3. 日野直也, 松田樹生也, 真流玄武, 酒井克也, 今村龍, 青木一洋, 寺井健太, 平島剛志, 松本邦夫, 松田道行. 集団遊走における細胞の機械的拘束依存的な増殖因子シグナル活性動態変化による先導細胞の運命決定. 第 73 回日本細胞生物学会大会, 2021 年 6 月 29 日 (京都)
4. 梶原健太郎, 山野荘太郎, 青木一洋, 奥崎大介, 松本邦夫, 岡田雅人. 腎臓の代償性肥大における Src シグナルの時空間的制御. 第 73 回日本細胞生物学会大会, 2021 年 7 月 2 日 (京都)
5. 齋藤淳, 長谷川喜弘, 藤谷直樹, 有木茂, 上原康昭, 松本邦夫, 高橋素子. MET の糖鎖による機能制御メカニズムの解析. 第 94 回日本生化学大会, 2021 年 11 月 3 日 (オンライン)
6. 津本彩乃, 増尾友佑, 近藤友美, 今村龍, 水谷栄彦, 松本邦夫, 加藤将夫. ヒト aminopeptidase A 組換えタンパク質の臓器分布および胎児移行の解析. 日本薬物動態学会 第 36 回年会, 2021 年 11 月 18 日 (高崎)

<シンポジウム・講演>

1. 松本邦夫. 高速 AFM を起点に観える増殖因子受容体 MET の動的活性化と創薬. CBI 学会 第 419 回研究講演会. 2021 年 1 月 11 日 (オンライン)
2. 松本邦夫. "高速 AFM で観る"がん関連分子と応用. 【ナノプローブテクノロジー第 167 委員会】 第 98 回研究会. 2021 年 7 月 29 日 (オンライン)
3. 松本邦夫. バイオベンチャーの意義と産学連携の創薬開発に向き合う姿勢. シンポジウム「新薬開発に向けた産学連携の問題点と将来展望」, 第 80 回日本癌学会総会, 2021 年 10 月 1 日 (横浜)

4. 酒井克也. 環状ペプチドファルマコフォア内挿型の組換えアゴニストによる組織再生治療の試み. シンポジウム「細胞研究者が挑戦する医療イノベーション」, 第94回日本生化学会大会, 2021年11月1日(オンライン)

<外部資金>

1. 松本邦夫: AMED 次世代がん医療創生研究事業(P-CREATE)「イメージング活用創薬の視点からの異分野技術融合によるシームレスな薬効評価システムの構築と実施」(分担課題)「抗HGF特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬」(分担)(直接経費)7,050千円
2. 松本邦夫: 科学研究費補助金 基盤研究(B)「高機能環状ペプチド分子技術と融合する転移・薬剤耐性のがん微小環境の研究」(代表)(直接経費)4,100千円
3. 松本邦夫: 科学研究費補助金 挑戦的研究(開拓)「超機能バイオロジクスリガンドの創成と検証の研究」(代表)(直接経費)7,000千円
4. 松本邦夫: 産学連携受託研究「有用タンパク質の高発現細胞株の構築」 クリニングルファーマ株式会社(代表)(直接経費)1,500千円
5. 松本邦夫: 産学連携共同研究「NASH治療薬を目指すMetアゴニストの医薬品特性の検証」 ミラバイオロジクス株式会社(代表)(直接経費)2,600千円
6. 松本邦夫: 産学連携寄付金「松本邦夫研究室への研究助成」 フォーデイズ株式会社(代表)(直接経費)1,500千円
7. 酒井克也: AMED 肝炎等克服実用化研究事業(肝炎等克服緊急対策研究事業)「環状ペプチドファルマコフォア内挿型の組換えアゴニストによる肝機能・線維化改善に基づく汎用的肝炎治療の開発」(代表)(直接経費)12,000千円
8. 酒井克也: 科学研究費補助金 基盤研究(C)「高機能ペプチドとAFM分子計測・操作による増殖因子受容体の活性化機構の解明と制御」(代表)(直接経費)1,100千円
9. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金 若手研究「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」(代表)(直接経費)900千円

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

| | |
|---------------------|---|
| Associate Professor | Eishu Hirata 平田 英周 |
| Assistant Professor | Kojiro Ishibashi 石橋 公二郎 |
| Graduate Student | Ryo Mizutani 水谷 涼 (卓越大学院 M1) |
| Research Students | Riki Kadokawa 角川 立樹 (医学類 2 年)、 Peifu Yu 于 沛夫 (腫瘍分子生物学研究分野) |
| Technical Assistant | Sayuri Yamagishi 山岸 小百合 |

【 Abstract 】

Malignant brain tumors have an extremely poor prognosis regardless of whether they are primary or metastatic, and overcoming these devastating diseases is an extremely high social demand. In the case of brain metastasis, spatio-temporally diverse interactions between cancer cells and glial cells play very important roles in its progression. In the previous study, we have developed a simple and stable culture method of primary astrocytes and microglia (mixed-glia culture on/in soft substrate: MGS), which enables long-term analyses of cancer-glia interactions. Through drug screening with MGS co-culture system, we identified metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) as a key regulator of cancer cell proliferation in the brain microenvironment. mGluR1 is a G-protein-coupled receptor belonging to group I metabotropic glutamate receptors. The expression of mGluR1 is almost limited to the central nervous system, and cancer cells usually do not express this protein. However, we found that a mGluR1-specific inhibitor, LY456236, strongly suppressed the proliferation of cancer cells when co-cultured in MGS, while the drug has no effect on mono-cultured cancer cells. As molecular mechanisms, we found that mGluR1 expression is induced in cancer cells through interactions with astrocytes, and that cancer cells with induced mGluR1 expression show enhanced dependence on mGluR1 downstream signaling for survival and proliferation. These results strongly suggest mGluR1 as a potent therapeutic target of cancer brain metastasis. On the other hand, 3D-live imaging of cancer-glia interactions in MGS revealed a microglia subpopulation that shows strong cancer cytotoxicity. Cancer cell death induced by these tumoricidal microglia is cell cycle-dependent and most of the cells die in S/G2/M phase or within 2 hours after mitosis. We found that the cell death is mediated by caspase-1 via inflammasome activation in cancer cells and is completely independent from phagocytosis by the microglia. Our studies with MGS co-culture system have been revealing a series of previously unknown, multifaceted interactions between cancer cells and glial cells.

<2021年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. 新規グリア培養法を用いたがん細胞-グリア細胞ネットワークの解析

マウス新生仔脳組織由来グリア細胞の画期的な長期安定的培養法 (MGS 法: Mixed-glial culture on/in soft substrate) を確立した (Ishibashi et al., under review)。この MGS 共培養法を用いた薬剤スクリーニングにより、がん脳転移の進展に関与すると考えられる複数の分子・シグナル伝達経路を同定することに成功した。これらのうち、特にグループ I 代謝型グルタミン酸受容体である metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) が脳微小環境においてがん細胞の生存と増殖に重要な役割を担うことを見出した。mGluR1 はグループ I 代謝型グルタミン酸受容体に属する G タンパク質共役受容体であり、中枢神経系において L-グルタミン酸の受容体としてシナプス伝達に関与している。mGluR1 の発現はほぼ中枢神経系に限られており、各種がん細胞株においても mGluR1 の発現はほとんど認められていない。ところが、がん細胞単独培養下では全く効果のない mGluR1 阻害剤が、MGS 共培養下においてはがん細胞の増殖を強く抑制することが明らかとなった。この分子機構として、アストロサイトとの相互作用によってがん細胞に mGluR1 の発現が誘導されること、mGluR1 の発現が誘導されたがん細胞では、細胞の生存・増殖に関して mGluR1 下流シグナルへの依存性が強化していることを示唆するデータを得た。以上の結果から mGluR1 はがん脳転移特異的かつ強力な治療標的候補分子であると考えられ、現在、更なる解析を行っている。また MGS 共培養法を用いた 3 次元タイムラプスイメージングにより、MGS 中には強いがん細胞傷害性を有するミクログリアが存在していることが明らかとなった。このミクログリアによって誘導される細胞死は細胞周期依存性であり、がん細胞のほとんどは S/G2/M 期もしくは細胞分裂から 2 時間以内に死滅する。驚くべきことに、この細胞死はインフラマソームを介した caspase-1 の活性化によって誘導され、またミクログリアによる貪食とは無関係であることも明らかとなった。現在、腫瘍細胞傷害性ミクログリアの本態とがん細胞死の誘導機構に関して更なる研究を進めている。

2. カルボン酸系双性イオン液体の生命科学分野への応用

金沢大学理工研究域生命理工学系 黒田 浩介 博士との共同研究により、生体適合性の高い双性イオン液体 (zwitterionic liquid: ZIL) の生命科学分野への応用に関する研究を進めている。これまでに細胞凍結保存剤としての最適化 (Kato et al., Commun Chem 2021)、および類似化合物を用いた易溶解性シスプラチン製剤の開発

(Kadokawa et al., Sci Rep 2021) に成功した。現在、組織・PDX (patient-derived xenograft) の安定的凍結保存や精子・卵子・受精卵の高効率凍結保存、iPS 細胞を含む幹細胞研究分野への応用を進めつつ、これらを事業化するための金沢大学発ベンチャー企業の立ち上げを行っている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Kato Y, Uto T, Tanaka D, **Ishibashi K**, Kobayashi A, Hazawa M, Wong RW, Ninomiya K, Takahashi K, **Hirata E***, Kuroda K*. Synthetic zwitterions as efficient non-permeable cryoprotectants. *Communications Chemistry*. 4, 151, 2021 (*co-corresponding author)
2. Sharma G, Kato Y, Hachisu A, **Ishibashi K**, Ninomiya K, Takahashi K, **Hirata E**, Kuroda K. Synthesis of a cellulose dissolving liquid zwitterion from general and low-cost reagents. *Cellulose*. doi.org/10.1007/s10570-021-04185-y, 2021
3. **Kadokawa R**, Fujie T, Sharma G, **Ishibashi K**, Ninomiya K, Takahashi K, **Hirata E***, Kuroda K*. High loading of trimethylglycine promotes aqueous solubility of poorly water-soluble cisplatin. *Scientific Reports*. 11(1):9770, 2021 (*co-corresponding author)

< 学会発表 >

1. 平田 英周 「脳微小環境による脳転移がん細胞の運命決定機構」 フォーラム富山「創薬」第 53 回 研究会 (招待講演) (富山・オンライン併催 2021 年 5 月 11 日)
2. 石橋 公二郎、平田 英周 「新規 in vitro 共培養系を用いた脳転移微小環境を形成する細胞間相互作用の解明」 2021 年度 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会 (オンライン開催 2021 年 9 月 6 日)
3. 平田 英周 「がん脳転移微小環境の細胞分子基盤」 2021 年度 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 (ミニシンポジウム) (オンライン開催 2021 年 9 月 6 日)
4. 石橋 公二郎、平田 英周 「The concept of cancer associated glial-network in brain metastasis」 第 80 回 日本癌学会学術総会 (横浜市・オンライン併催 2021 年 9 月 30 日-10 月 2 日)
5. 平田 英周 「臓器特異的腫瘍微小環境」 第 80 回 日本癌学会学術総会 (モーニングレクチャー) (横浜・オンライン併催 2021 年 9 月 30 日-10 月 2 日)
6. Eishu Hirata “Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis” (Symposium) The 16th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences & KEY FORUM 2021 (Kumamoto and hybrid online, 11-12 Nov 2021)
7. Eishu Hirata “Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis” (Symposium) International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2021

(Kanazawa and hybrid online, 26 Nov 2021)

<知的財産>

特願 2021-004142 「固体組成物、液体組成物、及び固体組成物の製造方法」

黒田 浩介、平田 英周

<外部資金>

1. 基盤研究 (B) [研究代表者：平田 英周]

「がん脳転移微小環境分子基盤の統合的理解と治療への応用」 5,330 千円

2. MSD 生命科学財団研究助成・がん領域 [研究代表者：平田 英周]

「脳転移におけるがん促進性・抑制性アストロサイトの同定」 1,500 千円

3. 若手研究 [研究代表者：石橋 公二郎]

「新規 in vitro 共培養系を用いた脳転移微小環境を形成する細胞間相互作用の解明」 1,430 千円

(学内研究資金)

4. 先魁プロジェクト 2020 [研究代表者：黒田 浩介 研究分担者：平田 英周]

「イオン性材料で革新するライフサイエンス」 3,000 千円

<その他>

(国際シンポジウム開催)

Kanazawa University SAKIGAKE International Symposium “Aiming the fusion of chemistry and life science” (Zoom online meeting, 8 Nov 2021)

(アウトリーチ活動)

金沢発！未来のがん研究者を育む「がん克服プロジェクト」 クラウドファンディング実行委員

がん分子標的探索プログラム

Division of Molecular Cell Signaling

シグナル伝達研究分野

| | |
|-------------------------|---|
| Professor | Katsuji Yoshioka 善岡 克次 |
| Assistant Professor | I Ketut Gunarta |
| Postdoctoral Researcher | Ryusuke Suzuki 鈴木 隆介 |
| Graduate Students | Dewi Yuliana (D4), Purvee Erdenebaatar (D4), Ravdandorj Odongoo (D4), Yuhei Kishi 岸 勇平 (M2) |
| Assistant Staff | Hisayo Inotani 猪谷 久世 |

【 Abstract 】

JNK/SAPK-associated proteins (JSAPs), JSAP1 (also known as JIP3) and JSAP2 (also known as JLP or SPAG9), were first identified as scaffold proteins for the MAP kinase (MAPK) signaling pathways. Subsequent studies showed that JSAP proteins can also function as motor-cargo adaptors. Increasing evidence suggests that JSAP2 is overexpressed in many types of cancer and involved in cell proliferation and invasion. However, the physiological roles of JSAP in non-transformed cells remain largely unknown. Recently we found that aneuploidy was induced in non-transformed hTERT RPE-1 cells by overexpressing JSAP2 (or JSAP1). To explore the functional roles of JSAP, we analyzed JSAP2 knockdown (KD) hTERT RPE-1 cells and found reduced cell proliferation of JSAP2 KD cells. RNA-seq analyses of JSAP2 KD and control cells suggested the involvement of JSAP2 in the regulation of cell cycle progression. We are studying how JSAP2 is involved in the processes.

Curcumin, a major component of turmeric, is known to exhibit multiple biological functions including antitumor activity. We previously reported that JSAP2 reduces curcumin-induced cell death by modulating p38 MAPK and autophagy through the regulation of lysosome positioning. We investigated the role of JSAP1 in curcumin-induced stress, and found that JSAP1 also attenuates curcumin-induced cell death. However, JSAP1 knockout showed no or little effect on the activation of JNK and p38 MAPKs in response to curcumin. In addition, small molecule inhibitors of JNK and p38 MAPKs did not increase curcumin-induced cell death. Furthermore, JSAP1 depletion did not impair lysosome positioning and autophagosome-lysosome fusion. Instead, we noticed substantial autolysosome accumulation accompanied by an inefficient autophagic flux in JSAP1 knockout cells. Taken together, these results indicate that JSAP1 is involved in curcumin-induced cell death differently from JSAP2, and may suggest that JSAP1 plays a role in autophagosome degradation and its dysfunction results in enhanced cell death.

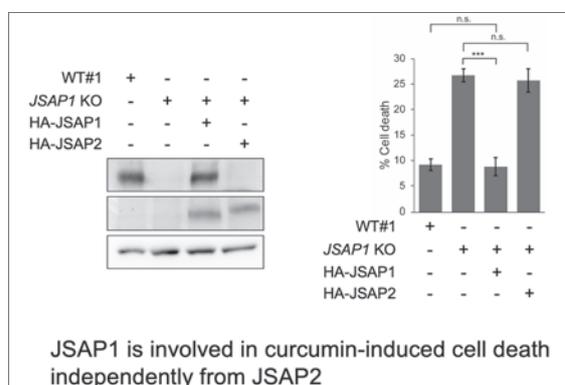
<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. 染色体安定性における JSAP の役割

染色体安定性の維持は正常な発生や恒常性の維持に必要不可欠であり、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。我々は、これまでに、ヒト正常二倍体不死化 RPE-1 (hTERT RPE-1) 細胞で JSAP2 タンパク質の発現レベル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、及び JSAP1, 2 二重欠損マウス胚性線維芽細胞では染色体分配異常が誘導されることなどを見出している。また最近、hTERT RPE-1 細胞で siRNA を用いて JSAP2 発現をノックダウン (KD) すると細胞増殖阻害が起こることが分かった。しかし、この JSAP2 KD 細胞の場合、metaphase spreads 解析に必要な分裂中期染色体を調製することはできなかった。現在、目的タンパク質を素早く分解除去することが可能なオーキシソグロン法の導入に取り組んでいる。今後、細胞周期制御における JSAP タンパク質の役割とその分子基盤の解明を目指して研究を進める予定である。

2. クルクミン誘導性細胞死における JSAP1 の役割

クルクミンはウコンの主要成分であり、抗腫瘍活性を示すことが知られている。最近、我々は、JSAP2 はオートファジーと p38 MAPK シグナル伝達経路を制御することにより、クルクミン誘導性の活性酸素を介した細胞死に対して抑制的に働くことが報告した。しかし、クルクミン誘導性細胞死における JSAP1 の役割については、これまでに報告がなく、不明である。JSAP1 KD 細胞の作製・解析および JSAP1 (あるいは JSAP2) を用いたレスキュー実験を行い、JSAP1 は JSAP2 とは異なる機序によってクルクミン誘導性の細胞死に対して抑制的に働くことを明らかにした (DDT Gunarta *et al.* 2021)。



3. ストレス応答 MAPK の解析

JNK/p38 MAPK はストレス応答 MAPK としてよく知られており、それらの解析には低分子阻害剤が頻用されている。しかし、3種類の JNK (JNK1, JNK2, JNK3) および4種類の p38 (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ), それぞれに特異的な阻害剤はなく、各アイソフォームの機能については不明な点が多い。最近、福永理己郎博士 (大阪医薬大) のグループが開発した多重ノックアウト法を用いた、ストレス応答 MAPK の詳細な機能解析に着手した (福永理己郎博士との共同研究)。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Gunarta IK, Yuliana D, Erdenebaatar P, Kishi Y, Boldbaatar J, Suzuki R, Odongoo R, Davaakhuu G, Hohjoh H, Yoshioka K. c-Jun NH₂-terminal kinase (JNK)/stress-activated protein kinase-associated protein 1 (JSAP1) attenuates curcumin-induced cell death differently from its family member, JNK-associated leucine zipper protein (JLP). *Drug Discov Ther.* 15(2): 66-72, 2021.

< 学会発表 >

1. 鈴木 隆介, 善岡 克次: Effect of JLP overexpression on chromosome stability. 第 80 回日本癌学会学術総会, 2021 年 9 月 30 日, 横浜 (オンライン)
2. Gunarta IK, Odongoo R, Iwabuchi S, Hashimoto S, Yoshioka K. Role of JSAP2 in cell cycle regulation. 第 44 回日本分子生物学会年会, 2021 年 12 月 1 日, 横浜 (オンライン)

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) (研究代表者: 善岡克次) 「新規因子 JSAP による染色体安定性の維持機構」 1,200 千円
2. 科学研究費補助金 若手研究 (B) (研究代表者: I Ketut Gunarta) “Role of kinesin/dynein adaptor JSAP in reactive oxygen species-induced cell death and lysosome positioning” 1,100 千円
3. 科学研究費補助金 研究活動スタート支援 (研究代表者: 鈴木隆介) 「モーターアダプター JLP による染色体安定性の制御機構」 1,100 千円
4. 高橋産業経済研究財団 (研究代表者: 善岡克次) 「国際連携による肝細胞癌の基礎研究」 1,000 千円

Division of Translational and Clinical Oncology

腫瘍制御研究分野

| | |
|--------------------------|--|
| Professor | Toshinari Minamoto 源 利成 |
| Assistant Professor | Takahiro Domoto 堂本貴寛 |
| Graduate Students | Hiroyoshi Nakanishi 中西宏佳 (D4: ~3 月), Masahiro Uehara 上原将大 (D4: ~3 月), Ryosuke Ota 太田亮介 (D4: 太田病院), Satoshi Takenaka 竹中 哲 (D4: 肝胆膵・移植外科学) |
| Postdoctoral Researchers | Masahiro Uehara 上原将大 (4 月~), Dilireba Bolidong (4 月~) |
| Research Fellow | Masanori Kotake 小竹優範 (9 月~) |
| MRT* Program Students | Shuhei Morita 守田周平, Takashi Ishida 石田 岳 (2018. 12. ~) |
| Assistant Staff | Atsuko Asaka 浅香敦子 *MRT: Medical research training |

【 Abstract 】

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

<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

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

Wnt 経路抑制因子と認識されている GSK3 β が固有の分子経路を介して、がんの悪性形質を推進することを系統的に示してきた。そして、GSK3 β 阻害のがん治療効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。また、学内外の外科系グループと連携し、膵がん、膠芽腫や骨軟部肉腫などの難治、希少がんで高活性を示す GSK3 β が、腫瘍浸潤性と治療（抗がん剤、放射線）不応性の悪性形質を連結することを見出した。一連の研究をもとに、GSK3 β 阻害薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を開発し、再発膠芽腫（附属病院脳神経外科）と進行膵がん（金沢医科大学病院）を対象とする医師主導臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を検証した。2021年には食道扁平上皮がんと抗がん剤耐性獲得膵がんに対する GSK3 β 阻害の治療効果とメカニズムを明らかにした。また、GSK3 β 阻害によるがん治療の概念実証のため、膵内分泌腫瘍（PNET）の共同研究に加えて、米国で臨床試験中の GSK3 β 阻害剤 9-ING-41 を開発した Actuate 社と共同で治療耐性膵がんの前臨床試験を計画した。

2. がんの代謝特性にもとづく悪性形質の解析研究

GSK3 β はグリコーゲン代謝を制御する。また、特定の間代謝産物が解糖経路と自食作用の接点になるとが知られている。そこで大腸がんを中心に、がん固有の糖代謝（Warburg 効果）に関わる触媒酵素やがん促進性自食作用に対する GSK3 β の統合的解析を進めている。これとは別に、内視鏡的にヨード不染を特徴とする食道の扁平上皮癌がん初期の生物学的特性は細胞内グリコーゲンの減少、消失である。そこで、患者由来の正常食道扁平上皮細胞とマウスを対象に、グリコーゲン合成酵素と GSK3 β のゲノム編集による食道扁平上皮癌がん状態の誘発を試みる研究を 2018 年に開始し、目的の改変マウスを作出して、経過観察を継続している。また 2021 年には、GSK3 β がエネルギーセンサー酵素 AMPK をリン酸化により不活性化するという知見をもとに、食道扁平上皮がんにおける両酵素の関連解析を始めた。

3. ヒト消化管がん組織バンクを中心とする大腸がんの分子病理学的研究

消化管がん研究や臨床研究の基礎資源として 2008 年から本事業を開始し、2010 年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承し現在に至っている。この組織資源の共同利用促進のために、日本医療研究開発機構ゲノム医療支援サイト (<http://www.biobank.amed.go.jp/biobank/index.html>) に情報公開している。山梨大学：竹田 扇らが開発した大気圧イオン化法-質量分析を用いて、大腸がん質量分析診断法開発の共同研究を継続している。大腸組織の質量分析パターンをもとに特有の統計解析と機械学習を組合わせて非がん/がんの判別（診断）アルゴリズムを構築し、90%以上の感度と特異度による判別を可能にした（論文作成予定）。現在、島津製作所基盤技術研究所と共同で、大腸がんの質量分析-内視鏡診断法の内視鏡デバイス開発に着手した。組織バンク検体を利用して、名古屋市立大学（十二指腸腺腫、早期がん）、香川大学（大腸がんテロメア解析）と共同研究を開始した。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

1. Shimasaki T, Yamamoto S, Omura R, Ito K, Nishide Y, Yamada H⁴, Ohtomo K, Ishisaka T, Okano K, Ogawa T, Tsuji H, Matsuo Y, Minamoto T, Tomosugi N, Ferain E, Ochiya T. Novel platform for regulation of extracellular vesicles and metabolites secretion from cells using a multi-linkable horizontal co-culture plate. *Micromachines* 12 (11): 1431, 2021. doi: 10.3390/mi12111431
2. Kotake M, Bando H, Kaneko M, Takemura H, Minamoto T, Kawakami K. LOH of the thymidylate synthase locus in combination with genotype has prognostic and predictive significance in colorectal cancer. *Mol Clin Oncol* 15: 235, 2021. doi: 10.3892/mco.2021.2398

< 学会発表 >

1. Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Satoshi Takenaka, Dilireba Bolidong, Tatsuhiko Furusawa, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. GSK3 β interconnects the malignant properties in therapy-resistant pancreatic cancer. The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC 2021), November 26 (Fri), 27 (Sat), 2021, Gifu, Japan (WEB).
2. Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Dilireba Bolidong, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β participates in acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC 2021), November 26 (Fri), 27 (Sat), 2021, Gifu, Japan (WEB).
3. Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Hemragul Sabit, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Mitutoshi Nakada, Tomoharu Miyashita, Richard W. Wong, Toshinari Minamoto. Potential therapeutic effect of targeting glycogen syntase kinase (GSK)3 β in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). The 10th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis (ISGC 2021), November 26 (Fri), 27 (Sat), 2021, Gifu, Japan (WEB).
4. 松田陽子, 成澤裕子, 葉 娟娟, 山川けいこ, 向井裕理, 谷元ミサ, 横平政直, 本間尚子, 源 利成. 長いテロメアを有する腫瘍の頻度と予後との関連.

- Incidence and prognostic relevance of long telomere cancers. 第 110 回日本病理学会総会, 2021 年 4 月 22 日(木)–24 日(土), 京王プラザホテル, 東京.
5. 岩嶋友紀, 羽澤勝治, 源 利成, Richard Wong. 核膜孔複合体による gene-gating 形成機序. 日本生化学会北陸支部第 39 回大会, 2021 年 6 月 5 日(土), WEB.
 6. Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Tatsuhiko Furukawa, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β renders pancreatic cancer acquiring resistance to gemcitabine via the STAT3 activation. 堂本貴寛, 竹中 哲, 上原将大, ボリドン ディレバ, 古川龍彦, 宮下知治, 源利成. GSK3 β は STAT3 の活性化を介して膵がんのゲムシタビン耐性獲得に寄与する. 第 80 回日本癌学会学術総会, 2021 年 9 月 30 日(木)–10 月 2 日(土), パシフィコ横浜.
 7. Takeshi Sawada, Eiji Kubota, Keishi Nakamura, Naoki Takahashi, Ryosuke Ota, Masashi Idogawa, Yasushi Sasaki, Takashi Tokino, Toshinari Minamoto, Hiromi Kataoka. RAS, BRAF and PIK3CA mutations in circulating tumor DNA and comparison with mutations in tissue in colorectal cancer. 澤田 武, 久保田英嗣, 中村慶史, 高橋直樹, 太田亮介, 井戸川雅史, 佐々木泰史, 時野 隆, 源 利成, 片岡洋望. RAS 野生型転移性大腸癌患者における循環腫瘍 DNA 中の RAS, BRAF, PIK3CA 変異の同定と腫瘍組織の変異との比較. 第 80 回日本癌学会学術総会, 2021 年 9 月 30 日(木)–10 月 2 日(土), パシフィコ横浜.
 8. Masaharu Hazawa, Toshinari Minamoto, Takeshi Suzuki, Richard Wong. NUP153 drives oncogenic TP63 expression through liquid-liquid phase separation mediated gene-gating in squamous cancer. 羽澤勝治, 源 利成, 鈴木 健之, ウォング リチャード. NUP153 は相分離を介した Gene-gating 機構で TP63 の発現を誘導する. 第 80 回日本癌学会学術総会, 2021 年 9 月 30 日(木)–10 月 2 日(土), パシフィコ横浜.
 9. 堂本貴寛, 上原将大, 竹中 哲, ディレバ ボリドン, 古川龍彦, 竹内 修, 宮下知治, 源 利成. GSK3 β は膵がんの難治性腫瘍形質を連関する. 第 32 回日本消化器癌発生学会総会, 2021 年 11 月 26 日(金), 27 日(土), 岐阜市(WEB).
 10. 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディレバ ボリドン, 竹内 修, 宮下知治, 源利成. Glycogen synthase kinase (GSK) 3 β は膵がんのゲムシタビン獲得耐性に寄与する. 第 32 回日本消化器癌発生学会総会, 2021 年 11 月 26 日(金), 27 日(土), 岐阜市(WEB).

11. ディリレバ ポリドン, 堂本貴寛, 上原将大, アムラ サビット, 奥村知之, 遠藤良夫, 中田光俊, 宮下知治, リチャード ウォング, 源 利成. GSK3 β 阻害による食道扁平上皮がんの治療効果とメカニズム. 第 32 回日本消化器癌発生学会総会, 2021 年 11 月 26 日(金), 27 日(土), 岐阜市(WEB).

<講演>

12. 源 利成. 基調講演: GSK3 β のがん生物学とがん治療抵抗性の一隅. 第 29 回日本癌病態治療研究会 パネルディスカッション: 癌治療抵抗性の機序解明に基づく新たな治療法の開発, 2021 年 1 月 14 日(木), 15 日(金), G メッセ群馬, 高崎市.

<外部資金> ※2021 年が含まれる課題

- 2020 年ー2022 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 20K09100
宮下知治(代表), 源 利成, ほか(分担)
課題: GSK3 β を基軸とした食道発癌機構の解明と新規治療戦略の開発
研究経費: 4,160,000 円(直接経費 3,200,000 円, 間接経費 960,000 円)
- 2019 年ー2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題番号 19H03727
源 利成 (代表), Richard Wong, 宮下知治(分担)
課題: 大腸がんの糖代謝改変と細胞核分裂機構を繋ぐ分子経路の解明とがん制御法開発への応用
研究経費: 17,420,000 円(直接経費 13,400,000 円, 間接経費 4,020,000 円)
- 2019 年ー2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究 (C) 課題番号 19K07710
堂本貴寛(代表)
課題: GSK3 β によるがん促進的糖代謝特性の解明と制御への応用
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
- 2019 年ー2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08367
太田亮介(代表), 澤田 武, 源 利成, ほか(分担)
課題: RNA シーケンスによる大腸鋸歯状腺腫の発癌機構の解明と分子標的治療の基盤確立
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
- 2019 年ー2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08463
澤田 武(代表), 太田亮介, ほか(分担)
課題: 表在性非乳頭部十二指腸腫瘍の発癌機構の解明と, 進展を予測する内視鏡

診断体系の確立

研究経費： 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)

Division of Functional Genomics

機能ゲノミクス研究分野

| | |
|----------------------|--|
| Professor | Takeshi Suzuki 鈴木 健之 |
| Assistant Professors | Akihiko Ishimura 石村 昭彦 Minoru Terashima 寺島 農 |
| Graduate Students | Kusuma Suphakhong (D4) Hanbing Lyu (D3) Risa Takatsuka 高塚理沙 (D3) Gerelsuren Batbayar (D3) Hyuga Ajichi 按察日向 (M2) |
| Technical Assistant | Atsuko Odawara 小田原 敦子 |

【 Abstract 】

We have been studying the function of epigenetic regulators such as histone methylating enzymes, long noncoding RNAs and RNA methyltransferase complex in the various steps of malignant progression of cancer. This year we investigated the role of KDM2B, a member of PRC1 complex that regulates histone ubiquitination, during TGF-beta-induced EMT of lung and pancreatic cancer cells. Knockdown of *KDM2B* inhibited TGF-beta-induced morphological conversion of the cells and increased cell migration/invasion as well as the expression changes of EMT-related marker genes. Overexpression of *KDM2B* influenced the expression of a subset of epithelial marker genes such as *CDH1*, *miR200a* and *CGN*, and enhanced the effects of TGF-beta. Mechanistic investigations revealed that KDM2B specifically recognized the regulatory regions of *CDH1*, *miR200a* and *CGN* genes and induced histone H2AK119 mono-ubiquitination as a component of PRC1 complex, thereby mediating the subsequent EZH2 recruitment and histone H3K27 methylation required for gene repression. Studies using KDM2B mutants confirmed that its DNA recognition property but not its histone H3 demethylase activity was indispensable for its function during EMT, suggesting the crucial role of KDM2B in the determination of target gene specificity. This study demonstrated the significance of the regulation of histone H2A ubiquitination in EMT process.

<2021 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. がん細胞の EMT におけるヒストンユビキチン化酵素複合体 PRC1 の役割

TGF-β誘導 EMT の進行において, ヒストンメチル化 (H3K27me) 酵素複合体 PRC2 の必須の役割をこれまでに明らかにしてきた。本年度は PRC2 と協調して作用しうる

PRC1 ヒストンユビキチン化 (H2AK119Ub) 酵素複合体の関与を調べた。CRISPR/Cas9 スクリーニングによって、PRC1 関連因子 23 種類の中から、発現抑制が EMT に最も影響を与える因子 KDM2B を同定した。KDM2B は、一部の上皮系遺伝子 (*CDH1*, *miR200a*, *CGN* など) の発現抑制制御を介して EMT 進行や細胞運動性上昇に関与することが示された。変異体解析から、KDM2B の DNA 認識活性が PRC1 によるヒストンユビキチン化と、それに続く PRC2 によるヒストンメチル化、その結果としての上皮系遺伝子の特異的発現抑制に必要であることがわかった。すなわち、EMT 誘導遺伝子発現プログラムのエピジェネティック制御において、KDM2B による特異的 DNA 部位の認識とヒストンユビキチン化修飾が先導的な役割を担うことが明らかになった。

2. RNA の m6A メチル化修飾を認識する Reader 分子による EMT 関連 mRNA 制御

EMT におけるエピトランスクリプトーム制御を理解するために、m6A 修飾を受けた標的 RNA の調節機構を調べている。EMT 進行に重要な転写制御因子 JUN と JUNB が mRNA の m6A 修飾によって、主にタンパク質翻訳効率と mRNA 安定性の点からそれぞれ調節されていることを見いだした。すなわち、異なる m6A 修飾認識 Reader 分子による制御が示唆されることから、RNA 免疫沈降法による相互作用解析によって各 Reader 分子の同定を進め、RNA の m6A 修飾の役割を明らかにする計画である。

3. 肺がん細胞の薬剤抵抗性獲得に関与するエピジェネティック制御因子の同定

肺がんの分子標的治療において、EGFR 特異的 TKI に対する耐性がんの出現は克服すべき課題である。本年度は、EGFR 変異肺がん細胞 HCC827 のオシメルチニブ耐性獲得に関与するエピジェネティック制御因子を CRISPR/Cas9 スクリーニング法によって探索した。その結果、ヒストンアセチル化酵素 HBO1 を含む複数の候補因子の同定に成功した。スクリーニングで得られた候補遺伝子特異的な shRNA を用いて発現抑制実験を行った結果、HCC827 細胞の薬剤抵抗性が著しく上昇した。今後、これら候補遺伝子の作用機序を解明して、肺がんの薬剤耐性獲得の分子基盤の一端を明らかにし、耐性克服や耐性回避のための新たな戦略の確立を目指す。

4. ヒストンメチル化修飾分布に基づく EMT 制御転写因子の探索

ヒストンの H3K4me3 修飾は、細胞の特異性を決定する重要な遺伝子座に、より広範囲にマークされることが報告されている。そこで、EMT 誘導の前後で H3K4me3 修飾の ChIP-seq 解析を行い、誘導後に H3K4me3 修飾範囲が拡大する遺伝子の中から EMT 制御転写因子の新しい候補を探索した。選抜された候補には、SNAIL や SLUG など既知の EMT 転写因子に加えて、EMT との関係性が未報告の転写因子が 5 種類含まれていた。これらのうち、CEBPG は発現抑制実験や過剰発現実験の結果、新しい EMT 誘導転写因子であることが示された。また結合タンパク質の解析から、EMT 以外に DNA 修復過程への関与も示唆されている。今後、これら候補転写因子の機能と作用機序を解明し、EMT を含む悪性進展の誘導メカニズムの理解に貢献したい。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Wanna-Udom S, Terashima M, Suphakhong K, Ishimura A, Takino T and *Suzuki T. KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines. J Biol. Chem., 296: 100213, 2021.
(共同研究)
2. Yamahana H, Terashima M, Takatsuka R, Asada C, Suzuki T, Uto Y and *Takino T. TGF-beta1 facilitates MT1-MMP-mediated proMMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. Biochem Biophys Rep., 27:101072, 2021.
3. Takeuchi Y, Kimura N, Murayama T, Machida Y, Iejima D, Nishimura T, Terashima M, Wang Y, Li M, Sakamoto R, Yamamoto M, Itano N, Inoue Y, Ito M, Yoshida N, Inoue J, Akashi K, Saya H, Fujita K, Kuroda M, Kitabayashi I, Voon D, Suzuki T, Tojo A and *Gotoh N. The membrane-linked adaptor FRS2b fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci, USA., 118(43): e2103658118, 2021.

< 学会発表 >

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Functional analysis of KDM2B, a member of PRC1, in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第80回日本癌学会学術総会 (横浜2021年10月)
2. Hazawa K, Minamoto T, Suzuki T and Wong R. NUP153 drives oncogenic TP63 expression through liquid-liquid phase separation mediated gene-gating in squamous cancer. 第80回日本癌学会学術総会 (横浜2021年10月)
3. Ishimura A, Batbayar G, Lyu H, Suphakhong K, Wanna-Udom S, Terashima M, Yano S and Suzuki T. CRISPR/Cas9 screening of epigenetic factors relating to drug resistance. 第44回日本分子生物学会年会 (横浜2021年12月)
4. Terashima M, Suphakhong K, Ishimura A, Nishimura T, Horike SI, Nishimura T, Tange S, Hazawa K, Wong RW and Suzuki T. Roles of epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factor candidates in cancer cells. 第44回日本分子生物学会年会 (横浜2021年12月)

5. Suzuki T, Wanna-Udom S, Suphakhong K, Terashima M, Lyu H, Ishimura A, Sakari M and Tsukahara T. Functional analysis of KDM2B, a member of PRC1, in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第44回日本分子生物学会年会（横浜2021年12月）

<外部資金>

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 鈴木健之, 1,000 千円 研究課題名「ゲノムワイドな挿入変異を利用した疾患関連 lncRNA の機能解析」
2. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 石村昭彦, 1,000 千円 研究課題名「がん悪性形質獲得に関するエピジェネティック制御因子の探索」

がん分子標的医療開発プログラム

Division of Medical Oncology

腫瘍内科研究分野

| | |
|----------------------|--|
| Professor | Seiji Yano 矢野 聖二 |
| Lecturers | Koshiro Ohtsubo 大坪 公士郎, Shinji Takeuchi 竹内 伸司 |
| Assistant Professors | Kaname Yamashita 山下 要, Akihiro Nishiyama 西山 明宏 Nanjo Shigeki 南條 成輝 (2021年8月から) Hiroshi Kotani 小谷 浩, Xujun Han (Nano LSI) Azusa Tanimoto 谷本 梓, Koji Fukuda 福田 康二 Yohei Takumi 内匠 陽平 (2021年5月まで) Naohiro Yanagimura 柳村 尚寛 (2021年9月まで) |
| Assistant | Sachiko Arai 新井 祥子 |
| Residents | Chiaki Suzuki 鈴木 千晶 Hiroyuki Sakaguchi 坂口 裕之 (2021年4月から) Shigeki Sato 佐藤 成樹 (2021年8月まで) |
| Assistant Staff | Junko Dohbayashi 堂林 淳子, Tomoko Kohori 小堀 朋子 Yumemi Nakamura 中村 夢美 |

【 Abstract 】

Our researches focus on clarifying mechanism of targeted drug resistance and circumvention of the resistance in various types of cancers with driver oncogenes. In this year, we investigated integrated clinical and next-generation sequencing data generated in a nationwide lung cancer genome screening project (LC-SCRUM-Japan). We found that *TP53* co-mutated patients treated with ALK-tyrosine kinase inhibitors (TKIs) showed significantly worse progression-free survival than *TP53* wild-type patients. In the cell based experiments, *ALK*-rearranged lung cancer cell lines which lost p53 function were resistant to ALK-TKI-induced apoptosis, but a proteasome inhibitor markedly induced apoptosis in the ALK-TKI-treated cells, *in vitro* and *in vivo*, by increasing the expression of a pro-apoptotic protein, Noxa which bound to an anti-apoptotic protein, Mcl-1. These clinical and preclinical results indicate that concomitant *TP53* mutations reduce the efficacy of ALK-TKIs and the combined use of a proteasome inhibitor with ALK-TKIs is a promising therapy for *ALK*-rearranged/*TP53*-mutated lung cancer.

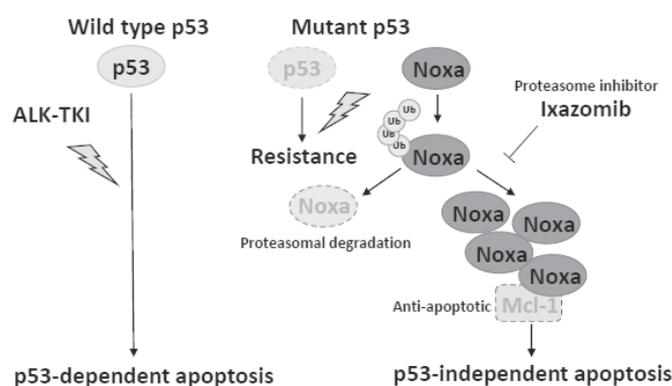
We also surveyed retrospective data on hospital cancer registration as well as information on disability certificates obtained through the Hokushin Ganpro database. In total, 93,545 cancer patients in 10 principal hospitals covering the region of northwestern Japan were registered with the Hokushin Ganpro database between 2010 and 2015. We found that 2,983 patients, which accounted for 3.2% of the total patients, had disabilities. No significant differences in

gender, age at diagnosis, cancer stage distribution, and cancer incidence rates were observed between the disabled and non-disabled patients. These results indicate that deep disparities between cancer patients with and without disabilities are not apparent and that the disabled patients in the region of northwestern Japan receive appropriate hospital follow-up.

<2021 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

1. TP53 遺伝子変異に起因する分子標的薬抵抗性の機構解明と克服

分子標的薬に曝露されたがん細胞は，一部が抵抗性細胞として生存し後に増殖を可能にする耐性因子を獲得して耐性腫瘍を形成する。また，併存する遺伝子異常が分子標的薬の感受性を低下させることが報告されてきている。本研究では，日本人における ALK 融合遺伝子陽性肺がんのデータを解析し，ALK 融合遺伝子陽性肺がん症例の 25% に TP53 の変異があり，変異型では ALK 阻害薬の無増悪生存期間が短いことを明らかにした。次に，TP53 変異を有する ALK 融合遺伝子陽性肺がん株では ALK 阻害薬によるアポトーシスが惹起されがたいために抵抗性となることを明らかにした。さらに，プロテアソームにより分解されるアポトーシス促進蛋白質 Noxa をプロテアソーム阻害薬で蓄積させることにより，ALK 阻害薬によるアポトーシスを誘導し耐性を克服しうることを明らかにした（下図）(Clin Cancer Res, 2021)。



2. 北信がんプロデータベースによる北信地域の障がい者がん患者の特徴解析

北信がんプロで作成するデータベース事業に参加している北信地域（福井県，石川県，富山県，長野県）の 10 病院の院内がん登録データを活用し，障がい者手帳の情報をもとに障害のあるがん患者の特徴を解析した。2010 年から 2015 年の間に登録された 93,545 例のがん患者のうち，障がい者と認定されていたのは 2,983 例(3.2%)であった。障がい者と非障がい者の間には，性別，診断時年齢，病期などに有意な差を認めなかった。以上より，北信地域におけるがんの診断は，障がいの有無にかかわらず適切に行われていることが示唆された(Int J Clin Oncol, 2021)。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Takeuchi S, Yanagitani N, Seto T, Hattori Y, Ohashi K, Morise M, Matsumoto S, Yoh K, Goto K, Nishio M, Takahara S, Kawakami T, Imai Y, Yoshimura K, Tanimoto A, Nishiyama A, Murayama T, Yano S. Phase I/II study of alectinib in RET-rearranged previously-treated non-small cell lung cancer (ALL-RET). **Transl Lung Cancer Res** 2021, 10(1):314-25. doi: 10.21037/tlcr-20-549.
2. Fukuda K, Otani S, Takeuchi S, Arai S, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Naoki K, Yano S. Trametinib overcomes KRAS-G12V-induced osimertinib resistance in a leptomeningeal carcinomatosis model of EGFR-mutant lung cancer. **Cancer Sci** 2021 Sep; 112(9): 3784-95. doi: 10.1111/cas.15035.
3. Sato S, Tanimoto A, Yanagimura N, Suzuki C, Takumi Y, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Ohtsubo K, Makino T, Yoshida Y, Hirono Y, Hayashi R, Koizumi T, Nakazawa Y, Ito KI, Motoo Y, Uramoto H, Nakada M, Nishino Y, Yano S. Multi-institutional survey of cancer disparities in disabled patients in the region of northwestern Japan. **Int J Clin Oncol** 2021 (6):1009-14.
4. Tanimoto A, Matsumoto S, Takeuchi S, Arai S, Fukuda K, Nishiyama A, Goto K, Yano S. Proteasome inhibition overcomes ALK-TKI resistance by p53 inactivation through Noxa expression in *ALK*-rearranged NSCLC. **Clin Cancer Res** 2021, 27(5):1410-20. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2853.
5. Nishiyama A, Hattori Y, Takeuchi S, Tanimoto A, Satouchi M, Murayama T, Yano S. Severe skin toxicity caused by sequential anti-PD-1 antibody and alectinib in non-small-cell lung cancer: a report of two cases and a literature review. **Intern Med** 2021 Nov 20. doi: 10.2169/internalmedicine.7472-21. Online ahead of print.
6. Suzuki C, Kiyota N, Imamura Y, Goto H, Suto H, Chayahara N, Toyoda M, Ito Y, Miya A, Miyauchi A, Teshima M, Otsuki N, Nibu KI, Minami H. Exploratory analysis to predict optimal tumor burden for starting lenvatinib in patients with radioiodine-refractory differentiated thyroid cancer. **Front Oncol** 2021 Jul 8;11:638123. doi: 10.3389/fonc.2021.638123.
7. Sakaguchi H, Tanimoto A, Sato S, Yanagimura N, Suzuki C, Takumi Y, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yano S. Mediastinal malignant melanoma markedly shrinking in response to nivolumab. **Intern Med** 2021 Jun 26. doi: 10.2169/internalmedicine.7452-21.
8. Ohtsubo K, Yamashita K, Yanagimura N, Suzuki C, Tanimoto A, Nishiyama A, Takeuchi S, Iwaki N, Kawano M, Izumozaki A, Inoue D, Gabata T, Ikeda H, Watanabe M, Yano S. Multiple malignant lymphomas of the bile duct developing after spontaneous regression of an autoimmune pancreatitis-like mass. **Int Med**, 2021 Feb 1; 60(3): 409-15. doi: 10.2169/internalmedicine.5429-20.
9. Nishiyama A, Staub Y, Suga Y, Fujita M, Tanimoto A, Ohtsubo K, Yano S. Sarcopenia may influence the prognosis in advanced thyroid cancer patients treated with molecular targeted

therapy. **In Vivo** 2021;35(1):401-10. doi: 10.21873/invivo.12271.

10. Sakaguchi H, Tanimoto A, Sato S, Yanagimura N, Suzuki C, Takumi Y, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yano S. Clinical outcome of inoperable pancreatic cancer pTreated with FOLFIRINOX or gplus nab-paclitaxel as a first-line therapy: a retrospective analysis. **Medicine International** 2021, doi: org/10.3892/mi.2021.8.
11. Wang M, Han X, Liu C, Takayama R, Yasugi T, Ei SI, Nagayama M, Tanaka Y, Sato M. Intracellular trafficking of Notch orchestrates temporal dynamics of Notch activity in the fly brain. **Nat Commun** 2021 Apr 7;12(1):2083. doi: 10.1038/s41467-021-22442-3.

(共同研究)

1. Uramoto H, Takiguchi T, Koizumi T, Tanimoto A, Hayashi R, Nakazawa Y, Ito KI, Nakada M, Hirono Y, Nishino Y, Yano S. Multi-institutional survey of thymic carcinoma patients in Hokushin region. **J Cancer Res Clin Oncol** 2021 May 8. doi: 10.1007/s00432-021-03620-8. Online ahead of print.
2. Uramoto H, Takiguchi T, Koizumi T, Tanimoto A, Hayashi R, Nakazawa Y, Ito KI, Nakada M, Hirono Y, Nishino Y, Yano S. Multi-institutional survey of malignant pleural mesothelioma patients in the Hokushin region. **J Cancer Res Clin Oncol** 2021 Jun 29. doi: 10.1007/s00432-021-03699-z. Online ahead of print.
3. Nakasuka F, Tabata S, Sakamoto T, Hirayama A, Ebi H, Yamada T, Umetsu K, Ohishi M, Ueno A, Goto H, Sugimoto M, Nishioka Y, Yamada Y, Tomita M, Sasaki AT, Yano S, Soga T. TGF- β -dependent reprogramming of amino acid metabolism induces epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancers. **Commun Biol** 2021 Jun 24;4(1):782. doi: 10.1038/s42003-021-02323-7.
4. Sheng J, Kohno S, Okada N, Okahashi N, Teranishi K, Matsuda F, Shimizu H, Linn P, Nagatani N, Yamamura M, Harada K, Horike SI, Inoue H, Yano S, Kumar S, Kitajima S, Ajioka I, Takahashi C. Treatment of retinoblastoma 1-intact hepatocellular carcinoma with cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor combination therapy. **Hepatology** 2021 Oct;74(4):1971-93. doi: 10.1002/hep.31872. Epub 2021 Aug 25.
5. Okura E, Nishino Y, Sakashita K, Tanimoto A, Hayashi R, Yoshida Y, Nakada M, Koizumi T, Yano S, Nakazawa Y. Cancer among children, adolescents and young adults in the Hokushin region, Japan, between 2010 and 2015. **Jpn J Clin Oncol** 2021 Nov 16;hyab174. doi: 10.1093/jjco/hyab174. Online ahead of print.
6. Goto S, Sakoda Y, Adachi K, Sekido Y, Yano S, Eto M, Tamada K. Enhanced anti-tumor efficacy of IL-7/CCL19-producing human CAR-T cells in orthotopic and patient-derived xenograft tumor models. **Cancer Immunol Immunother** 2021 Sep;70(9):2503-15. doi: 10.1007/s00262-021-02853-3. Epub 2021 Feb 8.
7. Yoshimura A, Yamada T, Okuma Y, Fukuda A, Watanabe S, Nishioka N, Takeda T, Chihara Y, Takemoto S, Harada T, Hiranuma O, Shirai Y, Nishiyama A, Yano S, Goto Y, Shiotsu S, Kunimasa K, Morimoto Y, Iwasaku M, Kaneko Y, Uchino J, Kenmotsu H, Takahashi T, Takayama K. Impact of tumor programmed death ligand-1 expression on osimertinib efficacy in untreated EGFR-mutated advanced non-small cell lung cancer: a prospective observational study. **Transl Lung Cancer Res** 2021 Aug;10(8):3582-93. doi: 10.21037/tlcr-

21-461.

8. Tanimura K, Yamada T, Horinaka M, Katayama Y, Fukui S, Morimoto K, Nakano T, Tokuda S, Morimoto Y, Iwasaku M, Kaneko Y, Uchino J, Yoneda K, Yano S, Sakai T, Takayama K. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase signaling increased apoptosis and prevented the emergence of ALK-TKI-tolerant cells in ALK-rearranged non-small cell lung cancer. **Cancer Lett** 2021 Dec 1;522:119-28. doi: 10.1016/j.canlet.2021.09.018. Epub 2021 Sep 15.
9. Yasuda H, Ichihara E, Sakakibara-Konishi J, Zenke Y, Takeuchi S, Morise M, Hotta K, Sato M, Matsumoto S, Tanimoto A, Matsuzawa R, Kiura K, Takashima Y, Yano S, Koyama J, Fukushima T, Hamamoto J, Terai H, Ikemura S, Takemura R, Goto K, Soejima K. A phase I/II study of osimertinib in EGFR exon 20 insertion mutation-positive non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**. 2021 Oct 16;162:140-6. doi: 10.1016/j.lungcan.2021.10.006. Online ahead of print.
10. Roselli E, Boucher JC, Li G, Kotani H, Spitler K, Reid K, Cervantes EV, Bulliard Y, Tu N, Lee SB, Yu B, Locke FL, Davila ML. 4-1BB and optimized CD28 co-stimulation enhances function of human mono-specific and bi-specific third-generation CAR T cells. **J Immunother Cancer** 2021 ;(10):e003354. doi: 10.1136/jitc-2021-003354.
11. Izumi K, Iwamoto H, Yaegashi H, Nohara T, Shigehara K, Kadono Y, Nanjo S, Yamada T, Ohtsubo K, Yano S, Mizokami A. Androgen replacement therapy for cancer-related symptoms in male: result of prospective randomized trial (ARTFORM study). **J Cachexia Sarcopenia Muscle** 2021 Aug; 12(4): 831-42. doi: 10.1002/jcsm.12716.
12. Jogo T, Nakamura Y, Shitara K, Bando H, Yasui H, Esaki T, Terazawa T, Satoh T, Shinozaki E, Nishina T, Sunakawa Y, Komatsu Y, Hara H, Oki E, Matsushashi N, Ohta T, Kato T, Ohtsubo K, Kawakami T, Okano N, Yamamoto Y, Yamada T, Tsuji A, Odegaard JI, Taniguchi H, Doi T, Fujii S, Yoshino T. Circulating tumor DNA analysis detects FGFR2 amplification and concurrent genomic alterations associated with FGFR inhibitor efficacy in advanced gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2021; 27 (20): 5619-27.
13. Kanno A, Yasuda I, Irisawa A, Hara K, Ashida R, Iwashita T, Takenaka M, Katanuma A, Takikawa T, Kubota K, Kato H, Nakai Y, Ryozaawa S, Kitano M, Isayama H, Kamada H, Okabe Y, Hanada K, Ohtsubo K, Doi S, Hisai H, Shibukawa G, Imazu H, Masamune A. Adverse events of endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration for histologic diagnosis in Japanese tertiary centers: Multicenter retrospective study. **Dig Endosc** 2021; 33 (7): 1146-57.
14. Kometani M, Yoneda T, Maeda Y, Ohtsubo K, Yamazaki Y, Ikeda H, Mori S, Aono D, Karashima S, Usukura M, Sasano H, Takeda Y. Carcinoma of unknown primary origin with isolated adrenal metastasis: a report of two cases. **Endocr J** 2021; 68 (10): 1209-15.
15. Quinn JJ, Jones MG, Okimoto RA, Nanjo S, Chan MM, Yosef N, Bivona TG, Weissman JS. Single-cell lineages reveal the rates, routes, and drivers of metastasis in cancer xenografts. **Science** 2021 Feb 26; 371(6532): eabc1944. doi: 10.1126/science.abc1944.
16. Boucher JC, Li G, Kotani H, Cabral ML, Morrissey D, Lee SB, Spitler K, Beatty NJ, Cervantes EV, Shrestha B, Yu B, Kazi A, Wang X, Sebti SM, Davila ML. CD28 costimulatory domain-targeted mutations enhance chimeric antigen receptor T-cell function. **Cancer Immunol Res** 2021 Jan;9(1):62-74.

17. Nishikawa Y, Suzuki C, Takahashi Y, Sawano T, Kinoshita H, Clero E, Laurier D, Phan G, Nakayama T, Tsubokura M. No significant association between stable iodine intake and thyroid dysfunction in children after the Fukushima Nuclear Disaster: an observational study. **J Endocrinol Invest** 2021 Jul; 44(7): 1491-500. doi: 10.1007/s40618-020-01454-8.
18. Ogawa S, Shimidzu H, Fukuda K, Tsunekawa N, Hirano T, Sato F, Yura K, Hasunuma T, Ochi K, Yamamoto M, Sakamoto W, Hashimoto K, Ogata H, Kanao T, Nemoto M, Inagaki K, Tamura T. Multiple mutations in RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) in *Streptomyces incarnatus* NRRL8089 enhance production of antiviral antibiotic sinefungin: modeling rif cluster region by density functional theory. **Biosci Biotechnol Biochem** 2021 Apr 24;85(5):1275-82. doi: 10.1093/bbb/zbab011.

著書・総説

1. 矢野聖二. 第3章がん微小環境を標的とした治療薬と耐性. 肺がんの炎症性微小環境および中枢神経系での薬剤耐性. **実験医学増刊** 39(12):142-6, 2021
2. 矢野聖二. Special Feature 「がんのチロシンキナーゼ阻害薬耐性獲得のメカニズム」いま知りたい、肺癌診療のすべて **PULMOMICS 2021-No** pp.7-10, 2021
3. Nakanuma Y, Uesaka K, Ohtsuka M, Ohtsubo K, Inoue D, Kozaka K. Intraductal Tumors of the Biliary Tract: Precursor Lesions and Variants. Diagnosis and Management of Cholangiocarcinoma-A Multidisciplinary Approach , **Springer**, 27-67, 2021
4. 大坪公士郎, 三宅邦夫, 山下 要, 矢野聖二. 特集 肝胆膵疾患におけるバイオマーカーの意義を探る 膵胆道癌の胆汁メチル化 miRNA 解析とバイオマーカーとしての意義. **肝胆膵** 83 (4): 595-601, 2021
5. 西山明宏, 矢野聖二. がんゲノム医療を検証する Pharmacogenomics and biomarker, NTRK 融合遺伝子. **がん分子標的治療** 19(1): 100-4, 2021
6. 西山明宏. 分子標的薬：小分子化合物 4) TRK 阻害薬. **腫瘍内科** 28(2): 130-4, 2021
7. 小谷 浩. がん薬物療法専門医のための模擬テスト 137, **腫瘍内科** 28(2): 213-4, 2021
8. 小谷 浩. がん薬物療法専門医のための模擬テスト 137—解答と解説—. **腫瘍内科** 28(3): 324-5, 2021
9. 鈴木千晶, 矢野聖二. 【特集 分子標的薬と耳鼻咽喉科】分子標的薬の耐性化機構. **JOHNS** 37(12); 1546–50, 2021

<学会発表>

1. 第 51 回日本膵臓学会大会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 山下 要, 矢野聖二. 膵胆道疾患における血漿中癌抑制型 miRNA のメチル化に関する検討. 2021 年 1 月 神戸
2. 第 18 回日本臨床腫瘍学会 矢野聖二. [新専門医制度] モデルカリキュラムについて. 2021 年 2 月 Web
3. 第 18 回日本臨床腫瘍学会 西山明宏. 薬剤の有効性が未確認の変異が検出され分子標的薬が奏効した症例. 2021 年 2 月 Web
4. 第 18 回日本臨床腫瘍学会 西山明宏. 分子標的薬で治療中の進行甲状腺がん とサルコペニアとの関連. 2021 年 2 月 Web
5. 第 18 回日本臨床腫瘍学会 Suzuki C, Sakaguchi H, Shimajima M, Yanagimura N, Takumi Y, Tanimoto A, Nishiyama A, Yamashita K, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yano S. A case of myocarditis associated with nivolumab/ipilimumab in renal cell carcinoma. 2021 年 2 月 Web
6. 第 18 回日本臨床腫瘍学会 佐藤成樹, 谷本 梓, 牧野智恵, 吉田好雄, 廣野靖夫, 林 龍二, 小泉知展, 中沢洋三, 伊藤研一, 元雄良治, 浦本秀隆, 中田光俊, 西野善一, 矢野聖二. Multi-institutional survey of cancer disparities in disabled patients in Hokushin region. 2021 年 2 月 Web
7. 第 243 回日本内科学会北陸地方会 坂口裕之, 臼倉幹哉, 浅野嵩博, 朝戸佳世, 杉田光洋, 内田幸助, 若山綾子, 青島敬二, 井野秀一. 水痘・帯状疱疹ウイルスによる無菌性髄膜炎を発症した若年者の一例. 2021 年 3 月 Web
8. 第 107 回日本消化器病学会総会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 山下 要, 矢野聖二. 膵胆道疾患における胆汁及び血漿中癌抑制型 miRNA のメチル化異常に関する検討. 2021 年 4 月 東京
9. 第 25 回日本がん分子標的治療学会学術集会 鈴木千晶, 柳村尚寛, 新井祥子, 福田康二, 西山明宏, 竹内伸司, 矢野聖二. 第二世代 TRK 阻害薬の耐性機構解明と耐性克服治療の探索. 2021 年 5 月 Web

10. 第 25 回日本がん分子標的治療学会学術集会 柳村尚寛, 竹内伸司, 新井祥子, 福田康二, 西山明宏, 矢野聖二. ALK 融合遺伝子陽性肺癌における STAT3 阻害薬の併用によるアポトーシス抵抗性の克服. 2021 年 5 月 Web
11. 第 30 回日本がん転移学会学術集会 南條成輝, Azad Tej, Bivona Trever, Diehn Maximilian. 脳脊髄液腫瘍由来 DNA (CSF- t DNA) を用いた EGFR 変異肺癌 中枢神経系転移における治療最適化. 2021 年 7 月 Web
12. 第 30 回日本がん転移学会学術集会 南條成輝, Okimoto Ross, 矢野聖二, Bivona Trever. 転移性 EGFR 変異肺癌において併存する RBM10 遺伝子変異による EGFR-TKI 阻害薬耐性. 2021 年 7 月 Web
13. 第 30 回日本がん転移学会学術集会 (研究奨励賞受賞講演) 新井祥子, 竹内伸司, 福田康二, 西山明宏, 谷本 梓, 谷口寛和, 片山量平, 山本卓志, 矢野聖二. EML4-ALK 肺癌の髄膜癌腫症モデルにおける amphiregulin に起因するアレクチニブ耐性の克服. 2021 年 7 月 Web
14. 第 52 回日本膵臓学会大会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 山下 要, 矢野聖二. 胆汁中癌抑制型 miRNA のメチル化異常による各種膵胆道疾患の鑑別と血漿への応用. 2021 年 9 月 東京
15. 第 80 回日本癌学会学術総会 Tanimoto A, Yano S. Resistance to targeted therapy stratified with oncogenes or tumor suppressor genes. 2021 年 10 月 横浜
16. 第 62 回日本肺癌学会学術集会 矢野聖二. 分子標的薬抵抗性・耐性の治療標的. 2021 年 11 月 横浜
17. 第 62 回日本肺癌学会学術集会 竹内伸司. RET 融合遺伝子及び KRAS 変異陽性肺癌における分子標的薬の開発状況. 2021 年 11 月 横浜 Web
18. 第 62 回日本肺癌学会学術集会 南條成輝, Okimoto Ross, 矢野聖二, Bivona Trever. Deficiency of splicing factor RBM10 limits EGFR inhibitor response in EGFR mutant lung cancer. 2021 年 11 月 横浜
19. 令和 3 年度北信がんプロ合同市民公開講座 矢野聖二. 北信がんプロ 5 年間のあゆみ. 2021 年 12 月 富山
20. 令和 3 年度北信がんプロ合同市民公開講座 小谷 浩. 北信がんプロデータベースで北陸・信州のがんの特徴をあぶりだす! 2021 年 12 月 富山

<学会発表・国際>

1. AACR-NCI-EORTC Virtual International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics Tanimoto A. The impact of BCL2 expression on sensitivity to the novel Aurora kinase B inhibitor AZD2811 in small cell lung cancer. 2021年10月 Virtual Meeting
2. The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR) Nanjo S. Co-mutation in splicing factor with EGFR mutations limits sensitivity to EGFR-TKIs ~Why are EGFR-TKIs less effective against EGFR L858R?~ 2021年11月 京都

<外部資金>

1. 日本医療研究開発機構 次世代がん医療創生研究事業
矢野聖二 研究代表者
MAPKシグナル抑制が誘導するフィードバック機構の不均一性解明と制御に基づくKRAS/BRAF変異腫瘍に対する新規治療開発 7,350千円
2. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業
矢野聖二 研究分担者
難治性呼吸器腫瘍等の全ゲノム配列データおよび臨床情報等の収集と解析に関する研究 5,000千円
3. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業
矢野聖二 研究分担者
遺伝子スクリーニング基盤 (LC-SCRUM-Japan) を利用した、MET遺伝子異常陽性の進行非小細胞肺癌に対する治療開発を目指した研究 100千円
4. 基盤研究 (B) 日本学術振興会
矢野聖二 研究代表者
分子標的薬で肺がんの根治を目指す治療の非臨床研究基盤の形成 3,600千円
5. 基盤研究 (C) 日本学術振興会
竹内伸司 研究代表者
ALK肺がんのアポトーシス抵抗性因子を標的とした新規治療の開発 1,100千円
6. 若手研究 日本学術振興会

- 南條成輝 研究代表者
EGFR変異肺がんにおいて併存するRBM10遺伝子変異の機能解析 2,400千円
7. 若手研究 日本学術振興会
西山明宏 研究代表者
BRAF V600E陽性甲状腺未分化がんの分子標的薬耐性と耐性を克服する基礎研究 1,000千円
8. 若手研究 日本学術振興会
福田康二 研究代表者
EGFR肺癌の髄膜癌腫症におけるEGFR-TKI耐性克服治療の開発 1,400千円
9. 研究活動スタート支援 日本学術振興会
Xujun Han 研究代表者
Molecular dynamics of the fusion oncoprotein EML4-ALK in lung cancer as revealed by high-speed AFM 1,100千円
10. 若手研究 日本学術振興会
新井祥子 研究代表者
ALK肺がんの髄膜がん腫症におけるALK-TKI耐性克服治療の開発 1,800千円
11. 金沢大学附属病院 臨床研究助成金
矢野聖二
肺がんの分子標的薬による根治を目指す FOX 1 を標的とした阻害薬の開発 1,900 千円
12. 日本イーライリリー株式会社研究助成金
矢野聖二
がん抑制遺伝子 TP53 変異に起因する分子標的薬抵抗性を克服する研究 500 千円
13. エーザイ株式会社研究助成金
矢野聖二
併存がん遺伝子異常に起因する分子標的薬抵抗性を克服する研究 1,000 千円
14. 中外製薬研究活動助成金

矢野聖二
がん抑制遺伝子異常に起因する分子標的薬抵抗性を克服する研究 800 千円

15. 大鵬薬品工業株式会社研究助成金
矢野聖二
がん制御遺伝子異常に起因する分子標的薬抵抗性を克服する研究 300 千円

<その他>

1. 教育プログラムの運営

- 1) 文部科学省 平成 29 年度大学教育再生戦略推進費：多様なニーズに対応する「がん専門医療人材（がんプロフェッショナル）」養成プラン「超少子高齢化地域での先進的がん医療人養成」（北信がんプロ）を事業責任者として推進
- 2) 石川県がん診療連携協議会研修会開催（3 月 11 日，7 月 1 日，10 月 27 日）

2. がんゲノム医療の提供

金沢大学附属病院がんゲノム医療センターで，保険診療による遺伝子パネル検査を実施（84 件）

3. 外来化学療法を提供

金沢大学附属病院で外来化学療法センターを運営

4. 金沢大学ナノ生命科学研究所

生命科学領域の研究室として参画

5. 金沢大学卓越大学院

ナノ先制医学コース教員として参画

中央実験施設

Central Research Resource Branch 中央実験施設

Professors Kunio Matsumoto 松本 邦夫 (～2021.3)
 Atsushi Hirao 平尾 敦 (2021.4～)
Associate Professors Yoshio Endo 遠藤 良夫, Kouji Kuno 久野 耕嗣

【 Abstract 】

Enhancing effect of novel Schiff base derivative combined with tyrosine kinase inhibitor on photodynamic therapy using 5-ALA (Endo Y)

Photodynamic diagnosis and therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA) is widely accepted as a noninvasive strategy against various cancers. We have previously demonstrated that the Schiff base derivative TX-816 markedly increases the effect of ALA-based photodynamic therapy (ALA-PDT) by facilitating intracellular protoporphyrin IX (PpIX) accumulation. However, TX-816 is unstable in aqueous solutions and quickly hydrolyzes into 3,5-dichlorosalicylaldehyde and 2-chloro-4-nitroaniline. Recently, we found that a TX-816 derivative (YS3-35) in which 2-chloro-4-nitroaniline was substituted with dasatinib, a dual Src/Abl tyrosine kinase inhibitor, has a high enhancing effect on ALA-PDT. Interestingly, YS3-35 exhibited strong ALA-PDT enhancing activity against cancer cells expressing high levels of ABCG2 transporter, which acts as a PpIX efflux transporter and plays an important role in regulating the intracellular PpIX level. These findings indicate that Schiff base derivatives combined with tyrosine kinase inhibitor are excellent lead compounds for the development of novel ALA-PDT sensitizers.

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

ADAMTS-1 is an extracellular matrix (ECM)-anchored metalloproteinase that degrades ECM molecules such as proteoglycans and regulates ECM remodeling. Our previous studies showed that ADAMTS-1 is involved in the ovulatory process and in the ovarian follicular development. Recently, we found that ADAMTS-1 null mice on a BALB/c background exhibited impaired parturition. Uterine strips from ADAMTS-1 null mice showed reduced contractile responses to uterotonins. In this study, we found that both precursor (110kDa) and mature forms (90 kDa) of ADAMTS-1 protein were detected in the uterine tissue at the parturition period. ADAMTS-1 null mice showed normal progesterone withdrawal but displayed significantly reduced expression of uterine genes encoding for contraction-associated proteins (CAPs), suggesting that ADAMTS-1 is required for uterine activation process prior to parturition. We are currently investigating the role of ADAMTS-1 in the

organization of myometrial and decidual tissues and their activation process during the prepartum period as well as the cervical ripening process.

<2021年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

チロシンキナーゼ阻害剤を結合させた新規シッフ塩基による5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強（遠藤）

5-アミノレブリン酸（ALA）は、がん細胞内で代謝活性化される新世代の光感受性物質としてがんの光線力学的診断や治療（PDT）に用いられている。我々は、これまでの研究でALAとの同時処理により細胞内PpIX量を増加させてPDT効果を増強するシッフ塩基化合物TX-816を見出した。本年度の研究では、TX-816の一部を分子標的治療薬として使用されているチロシンキナーゼ阻害剤のひとつであるダサチニブに置換した誘導体を合成し、そのALA-PDT効果増強活性を検討した。TX-816は水溶液中で加水分解を受け、活性本体である3,5-ジクロロサリチルアルデヒド（DCSA）と2-クロロ-4-ニトロアニリン（CNA）に分解する。このCNAをダサチニブに置換した化合物、YS3-35の各種ヒトがん細胞に対するALA-PDTの効果増強活性を調べたところ、細胞によってはDCSAより強い増強作用を示し、特に、YS3-35はPpIXの排出ポンプとして働くトランスポーターであるABCG2を高発現するがん細胞に対して強い増強作用を示す傾向が見られた。従って、YS3-35はPpIXの細胞外への排出を阻害することでALA-PDT効果増強活性を発揮することが示唆された。以上の結果より、シッフ塩基化合物TX-816にチロシンキナーゼ阻害剤を導入することで多機能型の光線力学的治療薬の分子設計が可能であることが示された。今後、これらの知見を基に更なる新規誘導体の開発を実施する予定である。

ADAMTS-1の雌生殖機能における役割の解析（久野）

ADAMTS-1^{-/-}マウス（129/B6 遺伝子背景）は、排卵、卵胞生育過程に異常を示す。一方BALB/c 遺伝子背景のADAMTS-1^{-/-}マウスは分娩異常を示す。分娩前のADAMTS-1^{-/-}マウスの子宮条片を用いた収縮実験では、Oxytocin、プロスタグランジンへの収縮応答性の低下と自発収縮力の低下をこれまでに見いだしている。分娩前のマウス子宮組織におけるADAMTS-1タンパクの発現をウエスタンブロットで調べた結果、110 kDaのprecursor formと90kDaのmature formのADAMTS1タンパクが検出された。ADAMTS-1^{-/-}マウスでは、分娩前にOxytocin receptor, Connexin43などの収縮調節タンパク(CAP)遺伝子群の発現誘導が起こらないことから、ADAMTS1は、Progesteroneが低下した後、CAP遺伝子群の発現が誘導される過程に必要であると考えられる。現在、ADAMTS-1^{-/-}マウスを用いて、ADAMTS-1の子宮平滑筋、脱落膜組織の組織構築における役割や、分娩時の子宮活性化における役割、また子宮頸管熟化過程における役割について詳しい解析を行っている。またADAMTS-1によるがん微小環境の制御について解析を行う。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著（共同研究）

1. Hirari Yamahana, Yuki Komiya, Takahisa Takino, Yoshio Endo, Hisatsugu Yamada, Chikako Asada, Yoshihiro Uto: Structure-activity relationships of UTX-121 derivatives for the development of novel matrix metalloproteinase-2/9 inhibitors. *Chem Pharm Bull* (Tokyo). 2021;69(10):1017-1028. doi: 10.1248/cpb.c21-00549.
2. Hirari Yamahana, Yusei Shinohara, Yoshio Endo, Hisatsugu Yamada, Yoshihiro Uto: Enhancing effect of novel Schiff base derivatives, UTX-134 and UTX-135, on 5-Aminolevulinic Acid-based Photodynamic Therapy. *ALA-Porphyrin Science*, in press.

著書・総説

1. Kuno K: Chapter: ADAMTS-1. *In Handbook of Proteolytic Enzymes. 4th Edition, Volume 1, Metalloproteinases, ed. Neil D Rawlings, Elsevier, in press.*

< 学会発表 >

1. Sotaro Maeda, Hirari Yamahana, Yoshio Endo, Takahisa Takino, Yoshihiro Uto: Structure-activity relationships of UTX-121 derivatives derived from celecoxib as an antimetastatic lead compound. 坑転移リード化合物としてセレコキシブから派生した UTX-121 誘導体の構造活性相関 第 80 回日本癌学会学術総会 2021 年 9 月 30 日（木）～10 月 2 日（土）（横浜、パシフィコ横浜、会議センター・展示ホール AB） The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. RIHGA Royal Hotel Hiroshima, Pacific Convention Plaza Yokohama（PACIFICO Yokohama）
2. Yuki Komiya, Yusei Shinohara, Itasu Ninomiya, Yoshio Endo, Takahisa Takino, Yoshihiro Uto: Development of NHE5 selective inhibitor UTX-143 based on the structure-activity relationship of amiloride derivatives. Na⁺/H⁺交換輸送体 5（NHE5）選択的阻害剤であるアミロライド誘導体の構造活性相関による UTX-143 の創製 第 80 回日本癌学会学術総会 2021 年 9 月 30 日（木）～10 月 2 日（土）（横浜、パシフィコ横浜、会議センター・展示ホール AB） The 80th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. RIHGA Royal Hotel Hiroshima, Pacific Convention Plaza Yokohama（PACIFICO Yokohama）

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 基盤研究（C） 代表：遠藤 良夫（直接経費：1,100千円）
多機能性チロシンキナーゼ阻害薬の創出とがん光線力学療法への応用研究

2. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) 分担：遠藤 良夫 (直接経費：200千円)
消化器癌におけるNa⁺/H⁺交換輸送体5の機能解析と特異的阻害薬の開発

新學術創成研究機構 PI・若手 PI

Inflammation and Epithelial Plasticity

上皮可塑性・炎症ユニット

Associate Professor

Dominic Chih-Cheng VOON

【 Abstract 】

Classically, a proinflammatory tumor microenvironment is regarded as one that promotes carcinogenesis and tumor growth. Although great advances have been made in terms of the cellular composition and immune interaction within a tumor niche, how cell-intrinsic mutations within the epithelium drive this process through the aberrant secretion of growth factors and cytokines is under appreciated. Moreover, with the advent of cancer immunotherapy, it is now well appreciated that recruitment of certain subtypes of immune cells hold the key to turning a “cold” tumor “hot”. In this context, we are interested in the role of epithelial-derived IL23A (eIL23A) in modulating immunity during gastrointestinal infection and carcinogenesis with a specific focus on tumor immunity.

< 2021 research achievement and future plan >

The focus of this year has been the functional characterization of epithelial-derived IL23A (eIL23A). Firstly, in a syngeneic transplantation mouse model, it was confirmed that canonical IL-23 confers strong tumor immunity. Importantly, the co-secretion of eIL23A resulted in a strong augmentation of tumor immunity and the eradication of the transplanted tumor cells. To better understand the immunological process, resident peritoneal exudate cells (PECs) were tested. This revealed that eIL23A alters the production of IL-17 by PEC in response to canonical IL-23, hence providing a basis for understanding the anti-tumor effects of eIL23A. Secondly, to study the function of IL23A during infection and inflammation a gastric-specific conditional knockout mouse model was developed. Preliminary data indicate that the loss of *Il23a* in mouse gastric epithelium altered inflammation following *Helicobacter felis* infection. These observations are consistent that epithelial-derived IL23A play a proinflammatory role. In the coming year, these two themes will remain the focus of my research.

【 Achievements 】

<Publications (Primary)>

<Publications (Collaboration)>

1. Linn P, Kohno S, Sheng J, Kulathunga N, Yu H, Zhang Z, Voon D, Watanabe Y, **Takahashi C**. *Targeting RB1 Loss in Cancers*. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 25;13(15):3737. doi: 10.3390/cancers13153737.
2. **Takeuchi Y**, Kimura N, Murayama T, Machida Y, Iejima D, Nishimura T, Terashima M, Wang Y, Li M, Sakamoto R, Yamamoto M, Itano N, Inoue Y, Ito M, Yoshida N, Inoue JI, Akashi K, Saya H, Fujita K, Kuroda M, Kitabayashi I, Voon D, Suzuki T, Tojo A, **Gotoh N**. *The membrane-linked adaptor FRS2 β fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2021. doi: 10.1073/pnas.2103658118.
3. Makiyama K, Hazawa M, Kobayashi A, Lim K, Voon DC, Wong RW. *NSP9 of SARS-CoV-2 attenuates nuclear transport by hampering nucleoporin 62 dynamics and functions in host cells* *Biochem Biophys Res Commun*. 2021;586:137-142. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.11.046.

<Symposiums Presentations (Oral)>

1. Voon DC *Epithelial-derived IL23A and its emerging role in inflammation and tumor immunity*. 10th Protein Island Matsuyama International Symposium 2021, Matsuyama, Japan. (Invited)

<2021 Research Funds>

Dominic Voon: 公益財団法人喜・榮・音典支援財団「新規サイトカイン eIL23A の生理機能とシグナル制御機構の解明」(Principal Investigator) (2021) 1,000 千円

<Other Contribution>

Not applicable.

Cancer-Immune System Interactions

がん-免疫系相互作用ユニット

Associate Professor Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

【 Abstract 】

Pyroptosis is a pro-inflammatory form of regulated necrosis caused after the formation of plasma membrane pores by gasdermin (GSDM) family proteins. Although GSDMs are expressed as inactive forms, they are proteolytically activated by certain proteases, leading to pyroptosis. Caspase-1, an inflammatory caspase, is known to induce pyroptosis by cleaving GSDMD. It has been suggested that caspase-1 activation leads to the maturation of the proinflammatory cytokine IL-1 α . However, pro-IL-1 α is not a substrate for caspase-1, and the mechanism of caspase-1-induced IL-1 α maturation remains unclear. We found that GSDMD is required for IL-1 α maturation following inflammasome activation. Inflammasome-induced maturation of IL-1 α was dependent on extracellular Ca²⁺ and the calcium-dependent proteases calpains, but not cell lysis. Ca²⁺ influx and calpain activation were induced in GSDMD-expressing macrophages stimulated with inflammasome activators. Collectively, these results suggest that during inflammasome formation, caspase-1-processed GSDMD forms membrane pores that mediate Ca²⁺ influx, resulting in calpain-dependent maturation of IL-1 α . In addition, a screen for proteases that activate GSDMD was conducted. The results showed that a caspase activates GSDMD in response to bacteria-derived molecular patterns. In the next step, we intend to clarify its detailed molecular mechanism and physiological significance.

<2021年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

パイロトーシスと呼ばれるネクローシス様のプログラム細胞死は、炎症生物質を放出することで炎症を惹起し、がん免疫の活性化などに寄与する。本研究において、IL-1 α と呼ばれるサイトカインがパイロトーシス中に成熟化および放出されることがわかり、パイロトーシスによる炎症誘導の新しい機序として示された。さらに、IL-1 α の成熟化がパイロトーシス実行因子 GSDMD に依存することがわかった。GSDMD が細胞膜に孔を形成することで Ca²⁺イオンの細胞内への流入と Ca²⁺依存的プロテアーゼであるカルパインの活性化が起こり、カルパインによって IL-1 α が成熟化されるというシグナル伝達経路が明らかになった。加えて、GSDMD を活性化する新規プロテアーゼの探索を行い、その結果、あるカスパーゼが細菌由来分子パターンに応じて GSDMD を活性化することがわかった。今後、その詳細な分子機序や生理的意義を明らかにする。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著（研究室主体）

Tsuchiya K, Hosojima S, Kushiyama H, Mahib MR, Kinoshita T, Suda T. Gasdermin D Mediates the Maturation and Release of IL-1 α Downstream of Inflammasomes. *Cell Reports*, 34: 108887, 2021.

原著（共同研究）

Uematsu T, Tsuchiya K, Kobayashi N, Seiki M, Inoue JI, Kaneko S, Sakamoto T. Mint3 depletion-mediated glycolytic and oxidative alterations promote pyroptosis and prevent the spread of *Listeria monocytogenes* infection in macrophages. *Cell Death & Disease*, 12: 404, 2021.

総説（研究室主体）

Tsuchiya K. Switching from Apoptosis to Pyroptosis: Gasdermin-Elicited Inflammation and Antitumor Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 22: 426, 2021.

< 学会発表 >

土屋晃介, 須田貴司. Gasdermin D mediates the release and maturation of IL-1 α during inflammasome formation. 第94回日本細菌学会総会. 2021年3月23~25日(オンライン).

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 基盤研究(B)「パイロトーシス細胞が放出するリステリア増殖抑制因子の解析」(土屋晃介)(分担)全体期間: 2020~2022年度 配分額(2020-2021年度): 670千円
2. AMED 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「過栄養による肝細胞死の様式変容とその生活習慣病発症・増悪のメカニズムの解明」(土屋晃介)(分担)全体期間: 2021~2023年度 配分額(2021年度): 1,000千円
3. 武田科学振興財団 2021年度 医学系研究継続助成(基礎)「カスパーゼ-1による細胞死誘導の分子機序とインフラマソーム関連疾患における役割」(土屋晃介)(代表)全体期間: 2021~2022年度 配分額: 3,000千円
4. 公益財団法人三谷研究開発支援財団・研究開発資金助成「炎症性細胞死パイロトーシスで免疫学的に「冷たい」がんを「熱く」する手法の開発」(土屋晃介)(代表)全体期間: 2021年度 配分額: 1,500千円

Microenvironment Regulation in Cancer Stem Cells Unit

がん幹細胞環境制御ユニット

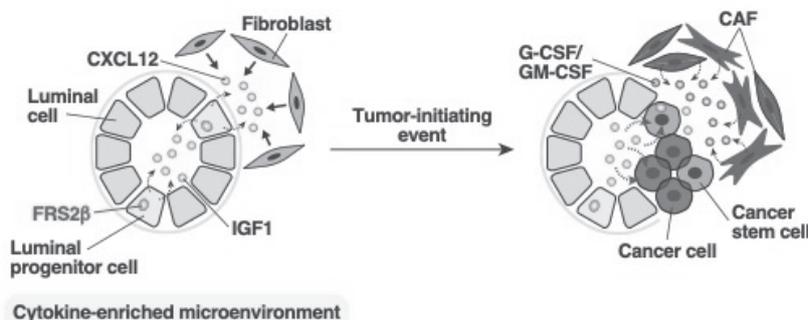
Assistant Professor Yasuto Takeuchi 竹内 康人

【 Abstract 】

Accumulating evidence has been reported the presence of cancer stem-like cells (CSCs) in many types of tumors. Cancer stem cells have a high tumor-initiating ability and are resistant to anticancer treatment, such as chemotherapy and radiation. In addition, it has been suggested that they are closely related to cancer metastasis and recurrence. [Batlle E .et al., Nature Medicine, 2017.] One of the biggest problems in today's cancer therapy is that there is still no effective treatment for metastatic or recurrent cancer. Therefore, we aim to establish a novel therapeutic method for refractory cancer by targeting cancer stem cells.

In this year, we reported that FRS2 β , a cytoplasmic adaptor protein, plays an important role in the development of breast cancer. We found that FRS2 β is expressed in a small subset of luminal cells and induces the secretion of the proinflammatory cytokine IGF1 and the chemokine CXCL12. We also elucidated that the formation of a cytokine-enriched microenvironment is necessary for the development of breast cancer.

IGF1, and inflammatory cytokine, acts on the breast cancer cells and breast cancer-stem like cells and promote their proliferation. On the other hand, CXCL12 induced the migration of fibroblasts in stroma tissues. In fact, few fibroblasts were observed in breast cancer tissues formed in FRS2 β knockout mice, suggesting that fibroblasts are crucial for the carcinogenesis and growth of breast cancer. We will clarify the significance of cancer-associated fibroblasts (CAF) that have migrated into breast cancer tissue.



<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

今年度、3つの異なる研究テーマの論文を報告した。

1つ目の論文は、DNA ストレスが生じている乳がんのがん幹細胞において、どのように薬剤耐性を獲得するのか、そのメカニズムを明らかにした。本発表論文は、Cancer Science 誌による2021年の Young Scientist Award に選出された。村山君おめでとう！！

2つ目の論文では、肺がんの薬剤耐性の獲得メカニズムを明らかにし、耐性肺がんにおける新たな治療標的 (MSI2) の発見を報告した。本研究内容は、第25回日本がん分子標的治療学会において、優秀演題賞を受賞した。イミン卒業おめでとう！！

3つ目の論文では、FRS2 β によるサイトカイン豊富な乳腺環境の形成が、乳がんの発症において重要であることを報告した。本研究内容は、第80回日本癌学会において、優秀演題賞を受賞した。今後は、乳がんとがん関連線維芽細胞との関係を明らかにしていきたいと考えている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

1. **Y. Takeuchi**[†], N. Kimura[†], T. Murayama[†], Y. Machida, D. Iejima, T. Nishimura, M. Terashima, Y. Wang, M. Li, R. Sakamoto, M. Yamamoto, N. Itano, Y. Inoue, M. Ito, N. Yoshida, J. Inoue, K. Akashi, H. Saya, K. Fujita, M. Kuroda, I. Kitabayashi, D. Voon, T. Suzuki, A. Tojo and N. Gotoh. The membrane-linked adaptor FRS2b fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. [†]Equally contribution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021 Oct 26;118(43):e2103658118.
2. R. Yiming[†], **Y. Takeuchi**[†], T. Nishimura, M. Li, Y. Wang, M. Meguro-Horike, T. Kohno, S. Horike, A. Nakata, N. Gotoh. MUSASHI-2 confers resistance to third-generation EGFR-tyrosine kinase inhibitor osimertinib in lung adenocarcinoma. [†]Equally contribution. *Cancer Science*. 2021. Sep;112(9):3810-3821.
3. T. Murayama[†], **Y. Takeuchi**[†], K. Yamawaki, T. Natsume, R. Chaverra, T. Nishimura, Y. Kogure, A. Nakata, K. Tominaga, A. Sasahara, M. Yano, S. Ishikawa, T. Ohta, K. Ikeda, K. Horie-Inoue, S. Inoue, M. Seki, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Enomoto, M. Tanabe, K. Tada, M. Kanemaki, K. Okamoto, A. Tojo, N. Gotoh. MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells. [†]Equally contribution. *Cancer Science*. 2021. Mar;112(3):1209-1224.

< 学会発表 >

1. **竹内康人**、後藤典子：細胞質アダプタータンパク FRS2b は、乳がん形成を促進する炎症性サイトカインリッチ環境を形成する。2021 患者由来がんモデル講演会，2021. 12. 15-17. オンライン，査読無
2. **竹内康人**、後藤典子：The membrane-linked adaptor FRS2b fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. 第 18 回幹細胞シンポジウム，2021. 5. 21-22. オンライン，査読無
3. **竹内康人**、後藤典子：MUSASHI-2 RNA 結合タンパク質は肺腺がんの EGFR 阻害剤オシメルチニブ耐性を賦与する。第 25 回日本がん分子標的治療学会学術集会，2021. 5. 26. オンライン，査読無
4. **竹内康人**、村山貴彦、西村建徳、矢野正雄、笹原麻子、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、井上聡、堀江公仁子、岡本康司、東條有伸、後藤典子：がん関連線維芽細胞由来の液性因子は乳がん幹細胞様細胞の維持に寄与する。2021 先端動物支援プラットフォーム，2021. 9. 6. オンライン，査読無
5. **竹内康人**、木村奈津子、村山貴彦、町田雪乃、家島大輔、西村建徳、王禹銘、坂本理恵子、山本瑞生、板野直樹、井上優介、伊藤正孝、吉田進昭、井上純一郎、赤司浩一、佐谷秀行、藤田浩司、黒田雅彦、北林一生、東條有伸、後藤典子：細胞質アダプタータンパク FRS2b は、乳がん形成を促進する炎症性サイトカインリッチ環境を形成する。第 80 回日本癌学会，2021. 9. 30-10. 2. 横浜，査読無

<外部資金>

1. 「令和3年度 科学研究費助成事業 若手研究」, 「がん幹細胞分裂様式の制御メカニズムの解明」, 竹内康人, 代表, 令和3年度-令和7年度, 4,550,000 円
2. 「令和3年度 新学術創成研究機構 異分野融合研究推進費」, 「がん幹細胞の分裂様式決定メカニズムの解明」竹内康人, 代表, 令和3年度, 1,600,000 円
3. 「令和3年度 戦略的研究推進プログラム 先魁プロジェクト」, 「イオン性材料で革新するライフサイエンス」分担, 令和3年度, 500,000 円

Mitochondrial Dynamics in Stem Cells

ミトコンドリア動態ユニット

Assistant Professor

Atsuko KASAHARA 笠原敦子

【Abstract】

Mitochondria play pleiotropic roles in glucose-amino acids-lipid metabolic pathways, calcium and redox homeostasis, and apoptosis. These diverse mitochondrial functions are reflected by and tightly connected with their extremely dynamic morphology, and distribution in the cells. Mitochondrial quality, distribution, size, and motility are excellently tuned by their continuous fusion and fission.

Mitochondrial fusion factor and anti-apoptotic protein OPA1 was up-regulated in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line, and down-regulation of OPA1 in these resistant cells restored the gefitinib sensitivity. Likewise, the OPA1 specific inhibitor, developed in the laboratory of Prof. Scorrano (University of Padua) also restored the gefitinib sensitivity in these resistant cells. This effect was mediated by the inhibition of cytochrome c release, which is regulated by OPA1. We were able to reproduce its effect on the xenograft experiment.

Endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria contacts are important for proper calcium uptake from the ER to the mitochondria, and phospholipids synthesised in both organelles are shuttling at the contacts. ER-mitochondria contacts are less in glioma stem-like cells, while the contacts are more in differentiated glioma cells. Likewise, undifferentiated embryonic stem cells (ESCs) displayed distant two organelles with fewer contacts, while differentiated cardiomyocytes (CM) showed close organelles with more contacts, with up-regulation of MFN2, which is a known tether protein. MFN2 fuses mitochondrial outer membrane (MOM) with MFN1 or MFN2, moreover, MFN2 also locates at ER membrane, and tethers ER and mitochondria with MFN1 or MFN2 at MOM. Since there is one MFN2 sequence known so far, I've assumed there is a specific molecular mechanism, which inhibits mitochondria and ER membranes fusion. For this, I purified mitochondria-associated membrane, and identified a protein X associates with MFN2. I am investigating about this protein X.

<2021年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

ミトコンドリアは、糖・アミノ酸・脂質代謝、Ca²⁺レベル、アポトーシスを制御するプラットフォームであり、細胞最大のパワープラントである、重要なオルガネラである。ミトコンドリアの融合と分裂、細胞骨格、モータータンパク質などが協調し、その特異的な形態、細胞内局在が調整されており、ミトコンドリアの多彩な機能は、随時変化するその形態と細胞内局在に由来する。

これまでに薬剤 (gefitinib) 耐性肺がん細胞で、ミトコンドリア融合因子 OPA1 の発現上昇を見出しており、OPA1 の発現低下によって gefitinib の感受性が回復したが、同様に、Scorrano 研究室 (イタリア) で同定された OPA1 特異的阻害剤が、gefitinib の感受性を回復させること、OPA1 による cytochrome c の放出阻害を低下させることを確認している。Xenograft 実験でも、この薬剤が gefitinib との併用でのみ腫瘍サイズを縮小させ、マウス個体での効果も確認することができた。

ミトコンドリアは小胞体との接点を通じて、Ca²⁺を取り込み、リン脂質は両オルガネラ感を行き来している。グリオーマの幹細胞様細胞と分化細胞で見出したミトコ

ンドリアと小胞体の距離、接点の違いを、ES細胞とES細胞から分化させた心筋細胞でも同様に見出しているが、人工的に2つのオルガネラを近づけ繋ぎ続けると、ES細胞の多能性遺伝子発現が低下することを観察した。今後は2つのオルガネラの接点に起因する、どのような分子メカニズムで、多能性マーカー発現が低下しているのか、明らかにしていきたい。

心筋細胞分化にともなって、ミトコンドリアと小胞体を繋ぐ因子、MFN2の発現が上昇する。MFN2はミトコンドリア外膜融合因子であるが、ER膜にも局在し、ミトコンドリア局在のMFN1もしくはMFN2と2つのオルガネラ間の接点を形成する。これまでにMFN2は唯一の配列が報告されており、何らかの特異的な分子メカニズムがないと、ミトコンドリア外膜-ミトコンドリア外膜融合同様に、ミトコンドリア外膜-小胞体膜が融合してしまうと考えられる。そのため、2つのオルガネラの接点の細胞分画で、MFN2と相互作用するタンパク質Xの同定を試みた。現在その候補タンパク質Xについて精査中である。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

なし。

< 学会発表 >

「Mitochondrial dynamics and intraorganellar contact sites in stemness and differentiation」、第94回生化学会大会、2021年11月3-5日、『HUMAN BIOLOGYを志向したミトコンドリア生化学/mitochondrial biochemistry and the human biology』シンポジウム2S08e

< 外部資金 >

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究（C）

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

基礎統計

決算額（運営費交付金）

（単位：千円）

| 区 分 | | 平成 29 年度 | 平成 30 年度 | 令和元年度 | 令和 2 年度 | 令和 3 年度 |
|--------|------|----------|----------|---------|---------|---------|
| 運営費交付金 | | 539,525 | 498,004 | 507,855 | 513,654 | 506,529 |
| 内 訳 | 人件費 | 404,750 | 369,283 | 404,442 | 385,923 | 373,320 |
| | 物件費等 | 134,775 | 128,721 | 103,413 | 127,730 | 133,209 |

科学研究費補助金（間接経費を含む）

（単位：千円）

| 研究種目 | 年度 | | 平成 29 年度 | | 平成 30 年度 | | 令和元年度 | | 令和 2 年度 | | 令和 3 年度 | |
|------------|----|---------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 |
| 特定領域研究 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 新学術領域研究 | 5 | 35,100 | 4 | 30,680 | 0 | 0 | 1 | 3,120 | 1 | 3,120 | 1 | 3,120 |
| 基盤研究（A） | 3 | 36,270 | 3 | 36,660 | 3 | 36,270 | 2 | 22,230 | 2 | 20,540 | 2 | 20,540 |
| 基盤研究（B） | 5 | 21,450 | 4 | 25,480 | 7 | 42,250 | 8 | 43,290 | 8 | 43,030 | 8 | 43,030 |
| 基盤研究（C） | 13 | 21,060 | 15 | 23,660 | 16 | 24,570 | 20 | 30,420 | 18 | 23,660 | 18 | 23,660 |
| 挑戦的萌芽研究 | 1 | 910 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 挑戦的研究（開拓） | | | | | | | | | | | 1 | 10,400 |
| 挑戦的研究（萌芽） | 4 | 13,650 | 5 | 15,600 | 4 | 13,390 | 3 | 9,100 | 1 | 3,250 | 1 | 3,250 |
| 若手研究（B） | 10 | 18,590 | 7 | 12,480 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 若手研究 | | | 5 | 11,700 | 9 | 15,080 | 9 | 17,550 | 9 | 14,820 | 9 | 14,820 |
| 研究活動スタート支援 | 2 | 2,730 | 1 | 1,300 | 2 | 2,860 | 2 | 2,860 | 1 | 1,430 | 1 | 1,430 |
| 特別研究員奨励費 | 3 | 2,940 | 4 | 3,894 | 1 | 1,040 | 0 | 0 | 1 | 800 | 1 | 800 |
| 国際共同研究加速基金 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合 計 | 46 | 152,700 | 48 | 161,454 | 42 | 135,460 | 45 | 128,570 | 42 | 121,050 | 42 | 121,050 |

外部資金（間接経費を含む）

（単位：千円）

| 研究種目 | 年度 | | 平成 29 年度 | | 平成 30 年度 | | 令和元年度 | | 令和 2 年度 | | 令和 3 年度 | |
|-----------|----|---------|----------|---------|----------|---------|-------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 |
| 受託研究 | 10 | 408,031 | 9 | 208,623 | 9 | 186,055 | 9 | 136,214 | 9 | 169,937 | 9 | 169,937 |
| 受託事業経費 | 1 | 2,400 | 2 | 2,510 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 補助金 | 1 | 9,000 | 1 | 2,000 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 民間等との共同研究 | 2 | 17,000 | 4 | 3,489 | 4 | 10,482 | 3 | 23,847 | 6 | 16,475 | 6 | 16,475 |
| 寄附金 | 28 | 29,080 | 24 | 22,935 | 19 | 19,170 | 16 | 15,040 | 17 | 16,400 | 17 | 16,400 |
| 合 計 | 42 | 465,511 | 40 | 239,557 | 32 | 215,707 | 26 | 175,101 | 32 | 202,812 | 32 | 202,812 |

土地・建物

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

教育活動

大学院生・研究生数

令和4年5月1日現在

| | | | 先進がん モデル 共同研究 センター | がん幹細胞 研究 プログラム | がん微小 環境研究 プログラム | がん分子 標的探索 プログラム | がん分子標的 医療開発 プログラム | 合計 (人) | |
|---------------|------------|------|-----------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|-----------|--|
| 大学院生 | 医薬保健学総合研究科 | 修士課程 | I | | | | 1 | 37 | |
| | | | II | 1 | 3 | 1 | 1 | | |
| | | 博士課程 | I | 2 | 6 | | | | |
| | | | II | 2 | 3 | | | | |
| | | | III | 2 | 2 | | | | |
| | | | IV | 2 | 3 | | 7 | | |
| | 先進予防医学研究科 | 博士課程 | I | | | | | 0 | |
| | | | II | | | | | | |
| | | | III | | | | | | |
| | | | IV | | | | | | |
| | 自然科学研究科 | 前期課程 | I | 1 | | | | 2 | |
| | | | II | | | 1 | | | |
| | | 後期課程 | I | | | | | | |
| | | | II | | | | | | |
| III | | | | | | | | | |
| III | | | | | | | | | |
| 研究生（特別研究学生含む） | | | | 2 | 1 | 1 | | 4 | |

※平成24年度に医学系研究科から医薬保健学総合研究科へ改組

交流協定校

令和4年5月1日現在

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

各種シンポジウム開催状況

1. 金沢国際がん生物学シンポジウム2021

International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2021

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

日 時：2021年11月26日(金)17:00~20:20

場 所：ナノ生命科学研究所4階会議室及びオンライン

参加者数：145名

プログラム：

Session I : Stem cell, embryogenesis and development

「Intestinal stem cells in development and disease」

Kim Jensen (Biotech Research & Innovation Centre & Novo Nordisk Foundation Center for Stem Cell Biology, University of Copenhagen, Denmark)

「Dissecting molecular mechanisms to regulate chromatin structure」

宮成 悠介 (金沢大学ナノ生命科学研究所)

「Epigenetic mechanisms of cellular plasticity」

Maria Elena Torres-Padilla (IES, Helmholtz Zentrum, Munich, Germany)

Session II: Cellular functions and tumor biology

「Mitochondrial dynamics: a new therapeutic target to beat malignant tumour cells」

笠原 敦子 (金沢大学がん進展制御研究所)

「Multifaceted interactions between cancer cells and glial cells in brain metastasis」

平田 英周 (金沢大学がん進展制御研究所)

「Uncovering how epithelial cell dynamics shape tumour evolution」

Erik Sahai (The Francis Crick Institute, UK)





2. 共同利用・共同研究拠点研究成果報告会

目 的：共同利用・共同研究拠点としての機能強化および共同研究活動活性化のため、当該年度に採択された共同研究課題の研究代表者を招聘し、研究成果報告会を開催するもの。

日 時：令和4年2月17日(木) 13:00～17:10

場 所：オンライン

参加者数：117名

【共同研究成果報告1】

「Interleukin-11産生間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明」

仁科 隆史（東邦大学医学部生化学講座 病態生化学分野）

「がん悪性化に関わる増殖因子シグナルの制御機構」

梶原 健太郎（大阪大学微生物病研究所 発癌制御研究分野）

「Bcl11aはPU.1標的遺伝子の抑制を介してAMLの発症・悪性化を促進する」

角南 義孝（公益財団法人がん研究会がん研究所 発がん研究部）

【共同研究成果報告2】

「転移性大腸がん幹細胞の可塑性・未分化性に関与するシグナル経路の解析」

青木 正博（愛知県がんセンター研究所 がん病態生理学分野）

「代謝フラックス解析から見えてきた好氣的解糖のメリット」

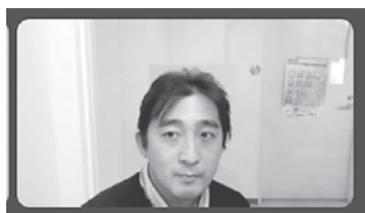
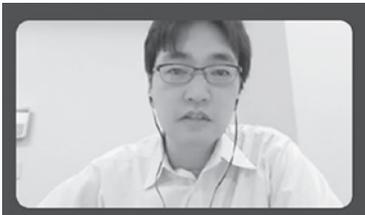
岡橋 伸幸（大阪大学大学院情報科学研究科 バイオ情報計測学講座）

「患者由来xenograft (PDX) モデルを用いた難治性乳がんの治療標的の探索」

栗本 遼太（東京医科歯科大学 システム発生再生医学分野）

「希少ドライバー遺伝子異常を有する肺がんにおける治療抵抗性機構の解明と克服」

谷村 恵子（京都府立医科大学 呼吸器内科）





金沢大学がん進展制御研究所年報2021年

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

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