

令和4年度がん進展制御研究所
共同利用・共同研究拠点研究成果報告会

日 時：令和5年2月15日（水）

場 所：金沢大学ナノ生命科学研究所 4階会議室
& オンライン（Zoom）

プログラム

13:00～13:10 開会のあいさつ 研究・社会共創・大学院支援担当理事・副学長 中村 慎一

【共同研究成果報告1】 _____ 座長：がん進展制御研究所 田所 優子

13:10～13:40 microRNA 生合成制御による非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞癌の発症機序の解明

高知大学総合研究センター 分子生物学教室 樋口 琢磨・・・1

13:40～14:10 ヒストン修飾酵素を標的とした脳腫瘍新規治療薬の開発

名古屋大学大学院医学系研究科 腫瘍生物学 新城 恵子・・・2

14:10～14:40 がん代謝ターゲット治療への感受性規定因子・獲得耐性メカニズム

宮城県立がんセンター研究所 がん薬物療法研究部 田沼 延公・・・3

コーヒープレイク（14：40～15：00）

【共同研究成果報告2】 _____ 座長：がん進展制御研究所 馬場 智久

15:00～15:30 癌内線維芽細胞による癌悪性化機構

順天堂大学医学部 病理・腫瘍学講座 折茂 彰・・・4

15:30～16:00 腸内細菌由来成分を活用した新規腸がん治療法の創出

北海道大学遺伝子病制御研究所 がん制御学分野 山村 凌大・・・5

16:00～16:30 がん幹細胞マーカーCD44 の発現を抑制する薬剤の探索

京都大学大学院医学研究科 分子腫瘍学 谷村 信行・・・6

16:30～17:00 世界最深部の蛍光生体イメージング技術

京都大学大学院医学研究科 寺井 健太・・・7

17:00～ 閉会のあいさつ 副学長・がん進展制御研究所所長 松本 邦夫

microRNA 生合成制御による 非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞癌の発症機序の解明

高知大学総合研究センター 分子生物学教室・樋口 琢磨
金沢大学がん進展制御研究所 機能ゲノミクス研究分野・鈴木 健之

機能性小分子 RNA である microRNA (miRNA)は、相補的または一部相補的なメッセージRNA(mRNA)に結合することで、当該 mRNA の分解および翻訳抑制を引き起こす。miRNA はその機能を通じて様々な遺伝子発現の制御に携わり、細胞の生理的機能の調節を担っている。また、miRNA の発現変動は様々な疾患において確認されており、特に癌においては癌抑制作用を有する miRNA (anti-oncogenic miRNA, anti-oncomiR)の減少が報告されている。anti-oncomiR の産生低下は、発癌および癌の増悪化に寄与することから、癌および前癌病変に進展する疾患における anti-oncomiR の生合成制御機構の解明が求められている。我々の研究チームではこれまで、二本鎖 RNA 結合タンパク質である Nuclear Factor 90 (NF90)および NF45 の複合体(NF90-NF45)が、miRNA の初期転写産物に結合し、当該 miRNA の生合成を負に制御することを見出してきた。さらに、肝細胞癌(HCC)においては NF90 および NF45 の発現が顕著に増加し、発現増加した NF90-NF45 が anti-oncomiR の一つである miR-7 の生合成を阻害し、miR-7 の標的である EGFR の発現調節および細胞増殖促進に寄与することを明らかにしてきた。今回は、HCC の前癌病変へと進展する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)において「NF90-NF45 による miRNA 生合成阻害機構」が与える影響の検討を試みた。

NASH は肝硬変や肝細胞癌へと進展する慢性肝疾患である。我々は NASH のモデルマウスであるコリン・メチオニン欠乏食 (MCD 食) を給餌したマウスの肝臓を用いた解析を行い、通常食群と比較し MCD 食群では NF90 および NF45 の発現が顕著に増加することを明らかにした。また、MCD 食給餌マウスの肝臓および NF90 ノックダウン細胞株を用いた miRNA アレイ解析の結果から、NASH モデルマウス肝臓において NF90-NF45 が産生阻害する miRNA として「miR-483-5p」を見出した。miR-483-5p は肝臓内コラーゲン分解抑制因子 TIMP2 を標的とする抗線維化 miRNA である。また、MCD 食給餌マウスの肝臓においては TIMP2 の発現増加が認められる。そこで我々は、肝臓特異的 NF90 欠損マウス(Hepa-NF90KO mice)を作出し MCD 食給餌に伴う TIMP2 の発現変動を検討したところ、コントロールと比べ Hepa-NF90KO mice において TIMP2 の有意な発現減少が認められた。以上の結果から、MCD 食給餌マウスの肝臓における NF90-NF45 の発現増加は、miR-483-5p の産生阻害を介して TIMP2 の発現増加を促し、肝線維化に寄与する可能性が示唆された。今後は、肝線維化を介して HCC へと進展する STAM model を用いて、Hepa-NF90KO mice の肝臓における病態進行および miRNA 産生変動を解析する。当該解析により、NF90-NF45 による miRNA 産生抑制が NASH から HCC への進展においてどのように寄与するかを解明する。

ヒストン修飾酵素を標的とした脳腫瘍新規治療薬の開発

名古屋大学大学院医学系研究科腫瘍生物学・新城 恵子
金沢大学がん進展制御研究所腫瘍細胞生物学研究分野・平田 英周

がん細胞で高発現し、発がんやがん細胞の悪性化に関わるエピゲノム修飾因子は治療標的として有効であると考えられ、このような因子を標的とした治療薬が数多く開発されている。

ヒストンメチル化酵素 EZH2 はヒストン修飾酵素 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコム複合体 2) の構成タンパク質であり、ヒストン H3 リジン 27 番をトリメチル化 (H3K27me3) 修飾することにより遺伝子発現制御に関わる。EZH2 の発現亢進は多くのがんで観察されており、がんの悪性化に寄与していることが報告されている。近年 EZH2 の酵素活性を阻害する薬剤は複数開発されているが、阻害剤による治療効果が高い腫瘍は、EZH2 に遺伝子変異を有する B 細胞性リンパ腫に限られている。このことから、EZH2 は本来の酵素活性非依存的に発がんへ関与している可能性も考えられる。

EZH2 はがんにおいて PRC2 以外のタンパク質と複合体を形成することも知られている。我々は EZH2 が過剰発現している腫瘍細胞において、EZH2 はこれまでに複合体を作ることが報告されていないタンパク質 (ヒストン修飾酵素 X) と複合体を形成していることを見出した。また、*in silico* 解析からもヒストン修飾酵素 X が EZH2 に結合する可能性があることが明らかとなった。これまでに複数のがん細胞株において異常複合体が存在することを確認しており、この新規 EZH2 複合体は通常複合体とは異なる新たな機能を獲得し、悪性化に寄与している可能性がある。今後、新規複体内に含まれる構成タンパクを明らかにし、複合体の機能や修飾するゲノム領域を明らかとする予定である。

近年開発が進んでいる EZH2 酵素活性阻害薬は、EZH2 が過剰発現した腫瘍のすべてにおいて有効ではないことも示されており、EZH2 の高発現はどのようにしてがんの悪性化に関わるかは明らかになっていない点が多い。EZH2 高発現細胞において、このような異常 EZH2 複合体形成が誘導されることが一因である可能性があり、新たな治療標的となる可能性がある。

がん代謝ターゲット治療への感受性規定因子・獲得耐性メカニズム

宮城県立がんセンター研究所がん薬物療法研究部・田沼 延公
金沢大学がん進展制御研究所遺伝子・染色体構築研究分野・平尾 敦

NAD (NAD⁺と、還元型の NADH) は、細胞内代謝ネットワーク維持に補酵素あるいは基質として不可欠である。総 NAD 量の制御やその異常は、健康や老化、がんを含む疾患との関連も報告されている。しかし、がんのサブタイプ毎の NAD 生合成への依存度の違いや、NAD 前駆体であるナイアシン類ビタミンの全身性代謝については不明の点が多かった。

最近、我々は、1) 肺・前立腺領域における神経内分泌がん (NEC) が NAD サルベージ経路 (大半の細胞/組織における主たる NAD 合成経路) への干渉に著しく脆弱であること、2) 同経路の標的化による治療効果を食事改変によって劇的に高めることができること、を見出した。NEC の NAD サルベージ高依存は、腫瘍細胞の神経内分泌分化とリンクしており、少なくともその一部は、Trp/キヌレイン由来 NAD 合成能の欠損によって説明された。またマウスモデルにて、NAD サルベージ阻害と血中 NAR (非古典的ナイアシンの1つ) 低下を惹起する食事改変が腫瘍に合成致死をもたらすことを発見した。NAR が、食事に含まれる別のナイアシン類から生合成されるメカニズムも明らかになった。

一方、長期にわたる治療実験では、耐性ががんの再発がみとめられ、今後の課題と考えられた。その解決に向けて端緒を得るため、再発腫瘍の株化・保存と解析をすすめた。

参考文献

1. Morita M., Tanuma N. et al Cancer Cell '18
2. Nomura M., Hirao A., Tanuma N. et al, 投稿中.

癌内線維芽細胞による癌悪性化機構

順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座・折茂彰
金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野・高橋 智聡

癌患者の死因の90%は癌転移による。しかしながら、癌浸潤・転移の分子機構の理解は不十分であり、転移の早期発見やその根治的治療は極めて困難である。癌が悪性化し、周辺組織へ浸潤し、遠隔臓器へ致死的な転移を形成する能力の獲得には、cell-autonomousに癌細胞内に生じる genetic や epigenetic な変異だけでは不十分である。実際の癌塊中には癌細胞に加え多数の異なった非癌間質細胞が存在し、これらの間質細胞により形成された癌微小環境が、幼弱な癌細胞が癌化の過程でより悪性度の強い癌細胞に育つことを支持し、癌細胞の浸潤・転移を容易にしていると推測される。

近年、癌微小環境が癌浸潤・転移を促進する能力があることが明らかになり、癌細胞と癌間質細胞の相互作用の理解が重要視されるようになった。我々は癌微小環境中の主要な構成細胞である線維芽細胞が、癌化の過程で癌細胞との相互作用により、癌悪性化促進能を有した癌内線維芽細胞 (carcinoma-associated fibroblasts: CAFs)に進化することを明らかにした。また、CAFが癌化の過程で、癌細胞に作用し上皮間葉移行の可塑性を調節し、高浸潤・転移能を教授していることが示唆された。本発表では、CAFが及ぼす癌悪性化機構に関しての最近の知見を議論させていただく。2022年度共同研究課題であるCAFと癌細胞の相互作用がどのようにRECK活性を制御するのかについての研究も進行中である。

関連論文)

1. Mezawa Y. and Orimo A. (2022) Phenotypic heterogeneity, stability and plasticity in tumor-promoting carcinoma-associated fibroblasts. *The FEBS J.*, 289, 2429-2447
2. Matsumura Y. et al., (2019) Stromal fibroblasts induce metastatic tumor cell clusters via epithelial-mesenchymal plasticity., *Life Science Alliance*, 2019, 2, 1-24
3. Kojima, Y., et al., (2010) Autocrine TGF- β and SDF-1 signaling drives evolution of mammary stromal fibroblasts into tumor-promoting myofibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107, 20009-20014.
4. Orimo A. et al., (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion, *Cell*, 121, 335-348.

腸内細菌由来成分を活用した新規膵がん治療法の創出

北海道大学遺伝子病制御研究所がん制御学分野・山村 凌大
金沢大学がん進展制御研究所腫瘍遺伝学研究分野・大島 正伸

がんの中でも特に膵がんは、有効な治療法が存在しない代表的な難治がんで、今後も罹患者数・死亡者数ともに増加が続くことが確実視されている。このことから厚生労働省は、膵がんの治療成績向上が喫緊の福祉課題であると宣言している。

実際に近年の膵がん研究において、臨床検体や培養ヒト膵がん細胞、膵がんモデルマウスの解析により、膵がん組織における遺伝子異常や膵がんを構成している細胞種の設定が進んできた (Kong et al. *J Cancer* 2020)。しかし、培養がん細胞では臨床における臓器間相互作用や薬物応答性の再現が容易でないこと、またマウスの解析は膨大な時間や経費などの研究資源を必要とすることなどの理由から、膵がんの本態解明や治療法開発は長年極めて難航している。

一方で最近、ヒト細菌叢と膵がんの関わりについて解明が進みつつある。例えば、膵がん患者では健常人と比較して腸内細菌の一種 *Bacteroides* 属が多いことや、口腔内細菌の一種 *Porphyromonas* 属が多いことが報告された (Fan et al. *Gut* 2016)。また、腫瘍内にも細菌叢が存在し (腫瘍内細菌叢)、膵がんの短期生存者は長期生存者と比較して腫瘍内の *Saccharopolyspora* 属が少ないことも明らかとなった (Riquelme et al. *Cell* 2019)。しかし、細菌叢の変動が膵がんの発生・進展・治療効果に実際に及ぼす影響やその詳細な機序はいまだほとんど解明されていない。また、細菌叢の代謝産物に着目し膵がんの病態との関連を検討した研究は皆無である。

これらの問題を解決するため、我々は最近、膵がん患者の中で最も予後不良の群で観察される遺伝子型を模倣した膵がん遺伝子型モデルショウジョウバエを作出した。ハエは哺乳類と遺伝的保存度が高く、繁殖が迅速・容易で安価に研究を推進でき、がん治療薬に対して哺乳類と同様の応答性を示すなど、哺乳類モデルを補完する多数の利点を備えている (Yamamura et al. *Cancer Sci* 2021; Hui, Yamamura et al. *Front Oncol* 2022)。

加えて我々は最近、ハエ細菌叢の解析環境の構築に成功し、ハエがヒトと類似した腸内細菌叢を有していることを発見した。我々はこの解析基盤を活用し、膵がん遺伝子型モデルハエの腸に棲息する全菌種の中で対照ハエ (非遺伝子組換え) と比較して存在割合が著明に減少している細菌を見出した。そして我々は、その細菌の主要な代謝産物が既存のキナーゼ阻害薬の抗腫瘍形質効果を増強することを見出した。

本発表では、これら最新の知見を紹介するとともに、発表者が世界各地で実施した腸内細菌研究のフィールドワークについて時間の許す限り発表する。

がん幹細胞マーカーCD44の発現を抑制する薬剤の探索

京都大学大学院医学研究科分子腫瘍学・谷村 信行
金沢大学がん進展制御研究所分子病態研究分野・後藤 典子

悪性腫瘍の大多数は乳腺、肺、大腸、膵臓などの上皮細胞から生じ、複数のがん遺伝子またはがん抑制遺伝子の変異が蓄積することによってがんの悪性化が進展すると考えられている。現在におけるがんの診断や治療は、既にごんを生み出す変異が蓄積し、がん化が進展した状態にあるものを対象とすることが多い。しかし、このような変異が蓄積する以前、つまりがん発生の極めて初期の段階にある細胞を検出し、その悪性化を食い止めることは非常に重要であると考えられる。例えば、難治性がんである膵がんは、がんの進展過程の比較的初期から他の臓器へ転移することが知られており、予後不良の原因となっている。したがって、悪性化過程の極めて初期にあるがん細胞を標的とした治療方法の確立が望まれるが、そのための研究は十分に進んでいるとは言えない。

そこで、本研究ではがん発生の極めて初期の段階を培養細胞系を用いて再現するため、がん原性タンパク質 RasV12 を発現するマウス由来乳腺上皮細胞を用いた。当研究室によるこれまでの結果から、この細胞では RasV12 発現依存的にごん幹細胞マーカーである CD44 の発現が上昇することがわかっている。CD44 は腫瘍形成能力との関連が示唆されているため、CD44 の発現を減少させることにより、初期のがん細胞の悪性化を抑制することができると考えられる。そこで、我々はこの培養細胞系を用いて、CD44 の発現を減少させる薬剤を探索するスクリーニングを行った。その結果、CD44 発現量を減少させるいくつかの候補薬剤を挙げる事ができた。さらに、これらの薬剤を組み合わせた場合、単剤よりも CD44 発現量抑制の強い効果を示すことがわかった。今後、これらの薬剤およびその組み合わせの効果を、がん幹細胞培養系、がん組織由来のオルガノイド、がんモデルマウスを用いて検証していく。

世界最深部の蛍光生体イメージング技術

京都大学大学院医学研究科・寺井 健太
金沢大学がん進展制御研究所腫瘍動態制御研究分野・松本 邦夫

近年、二光子顕微鏡技術の発達によって生きたマウスの組織内で、細胞・分子の動態を観察することが可能となっている。しかし、一般的な可視光領域の蛍光タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いた場合、多くの組織では 300 から 500 μm の表層しか観察することができない。これは蛍光観察に用いる励起光が、主に散乱の影響を受けるためである。これらの影響が小さい近赤外領域の光を用い、深部の生体組織を観察できることが期待されている。しかし、多数の近赤外蛍光タンパク質が開発されているが、蛍光輝度の低さから依然として生体イメージングへの応用は限定的であった。本研究では近赤外蛍光タンパク質の 1 つである iRFP713 に代表されるバクテリアアフィトクロム (BphP) 由来近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を増加に挑戦した。

フィコシアノビルリン (PCB) を発色団として用いると iRFP713 の輝度を数倍にできる事が報告されているが、哺乳類細胞では PCB 合成酵素がない。そこで、PCB 合成経路を再構成する SynPCB システムを用い、近赤外蛍光タンパク質の蛍光輝度を比較した。その結果、iRFP713 変異体が PCB 存在下で最も高い蛍光輝度を示し、従来の約 10 倍の蛍光輝度を示した。また、近赤外 Ca^{2+} センサーである NIR-GECO2 に変異を加え、PCB 存在下で高輝度を示す Ca^{2+} センサー (NIR-GECOHI) の開発にも成功した。

更に、生体マウスでの PCB 合成を目的とし、SynPCB を Cre 依存的に発現する SynPCB トランスジェニックマウスを作出した。このマウスにより、深さ 2.1 mm の iRFP 蛍光を観察することに成功した。

以上のように、本研究では遺伝学的アプローチにより、近赤外蛍光タンパク質を顕著に高輝度化させることに成功し、その結果、従来不可能であった深部観察を可能にした。これらのマウスは特に神経科学分野を中心とする生体深部観察へ有用なプラットフォームとなることが期待される。