

令和4年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2023.4

金沢大学がん進展制御研究所

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		間質圧上昇が肺癌促進に果たす役割の解明と新たな治療法の開拓
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・助教・徳田 深作
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・准教授・山田 忠明
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学・教授・高山 浩一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	ほとんどの癌組織では間質圧が上昇していることが報告されている。しかし間質側からの物理的な圧力が癌の病態に果たす役割について調べた報告はほとんどない。肺癌はその病態に関与するドライバー遺伝子やシグナル経路の解明と新規抗癌剤の開発が進んでいるが、遠隔転移を有する肺癌を根治することは未だに難しく、その予後は依然として厳しい状況である。本研究では肺癌細胞に基底側からの圧力が及ぼす影響を検討し、間質圧の上昇が肺癌の病態に果たす役割を明らかにすることによって新たな治療戦略を開拓することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究ではEGFR変異肺癌の培養細胞株を用いて実験を行った。間質圧の上昇が肺癌細胞に及ぼす影響を調べるため、肺癌細胞をフィルター上でコンフルエントに培養し、水面の差をつけることによって静水圧を加えてその影響を検討した。 HCC827細胞に基底側から圧を加えて走査型電子顕微鏡で観察したところ、基底側から圧を加えた条件では上皮の表面は凹凸不整な構造を示した(図)。垂直切片を光学顕微鏡で観察したところ、基底側から圧を加えた条件では上皮の重層化が確認された。さらに透過型電子顕微鏡では重層化した上皮の内部に微絨毛を有する腔が観察され、基底側からの圧によって上皮の重層化や極性異常が引き起こされることが示唆された。BrdU法では基底側から圧を加えたときにBrdU陽性細胞が増加していた。また基底側からの圧によって重層化が生じた後に圧を取り除くと、アポトーシスが生じて上皮が単層に戻ることを確認された。これらの結果から、基底側からの圧によって細胞増殖の亢進やアポトーシスの抑制が引き起こされると考えられた。 肺癌細胞が圧を感知して様々な細胞応答を示すメカニズムを調べる方法の一つとして、肺癌細胞に圧の感知に関与することが予想される遺伝子のノックアウトなどの修飾を加えてその影響を検討する方法が考えられるが、これらの修飾を加えると上皮シートの形成・維持ができなくなるため実験的にこれらの影響を調べることは困難であった。そこで上皮シートを形成した肺癌細胞に圧を加えた条件で上からGFPでラベルした肺癌細胞を播いて生着するかどうかを検討したところ、基底側から圧を加えた条件では上から播いた肺癌細胞は生き残ることが確認された。今後は上から播く細胞に修飾を加えて検討を進めることによって、肺癌細胞が間質圧の上昇を肺癌細胞が感知するメカニズムをさらに明らかにする予定である。 本研究により間質圧の上昇が肺癌細胞の増殖亢進、アポトーシスの抑制、極性異常を引き起こすことが明らかとなった。間質圧の上昇を肺癌細胞が感知するメカニズムをさらに明らかにして、新たな方向からアプローチする癌の治療戦略の開拓につなげたいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】	Katayama Y, Yamada T, Tanimura K, Tokuda S, Morimoto K, Hirai S, Matsui Y, Nakamura R, Ishida M, Kawachi H, Yoneda K, Hosoya K, Tsuji T, Ozasa H, Yoshimura A, Iwasaku M, Kim YH, Horinaka M, Sakai T, Utsumi T, Shiotsu S, Takeda T, Katayama R, Takayama K. ‘Adaptive resistance to lorlatinib via EGFR signaling in ALK-rearranged lung cancer’ NPJ Precis Oncol. 7(1):12. 2023.
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

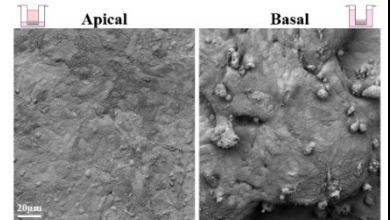


図:間質圧による上皮の重層化肺癌細胞の走査型電子顕微鏡図。基底側からの圧によって上皮の重層化が引き起こされた。

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		癌内線維芽細胞による癌細胞内 RECK 活性の制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座・主任教授・折茂 彰
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	共同研究者の高橋教授の先行研究において、通常のフォームに加えて、RECK には alternative splicing により long isoform と short isoform のバリエーションフォームが形成されることがわかっている（未発表）。興味深いことに long isoform は CAFs により産生され、short isoform は癌細胞により産生されることが preliminary な実験で示唆されている。long isoform と short isoform は機能的に相互関係があることより、癌細胞により産生された RECK の short isoform が CAF の long isoform に依存した機能を制御している可能性が推測される。本研究は癌微小環境中の CAFs が腫瘍細胞由来の RECK の機能を調節する分子機構を解明し、新規の RECK 関連創薬の開発に繋げることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	癌微小環境を構成する主な間質細胞である癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts; CAFs) は癌細胞の浸潤・転移能を促進することが知られている。申請者は CAFs がサイトカインなどを分泌することで癌の増殖・浸潤・転移を促進することを示してきた (Matsumura et al. Life Sci Alli, 2019)。しかし、CAFs が癌細胞の浸潤性を促進する機序は不明な点が多い。 今回、申請者らは不死化したヒト乳癌由来 CAFs である exp-CAFs (Kojima Y et al. PNAS, 2010) を使用し RECK の発現レベルを評価した。興味深いことにコントロールの正常乳腺線維芽細胞と比較して、CAFs では RECK 蛋白の long isoform および short isoform 発現量が顕著に低下していた。 今後は、異なる乳癌より樹立された複数の exp-CAFs ラインにおける RECK の発現を調査することに加えて、乳癌細胞との共培養や共移植モデルを使用し、CAFs で低下した RECK の発現が癌細胞与える影響に関して調査を進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 無し	
	【学会発表】 無し	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

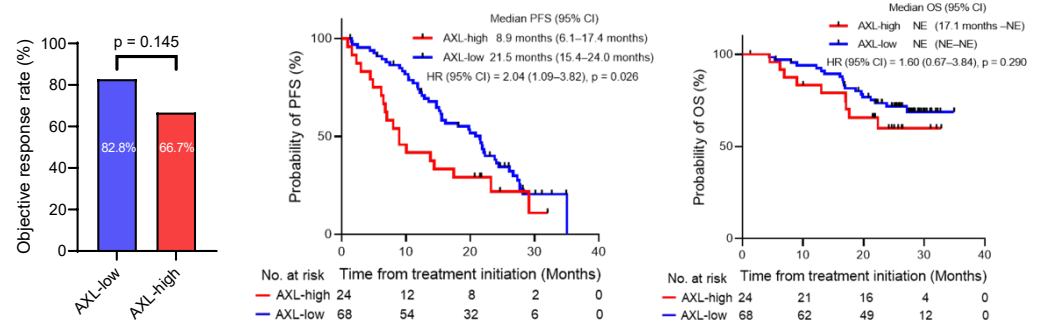
研究課題		肺がん分子標的治療の薬剤抵抗性に関わる新規コンパニオン診断法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学・助教・吉村彰紘
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学・准教授・山田忠明
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院呼吸器内科学・教授・高山浩一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍内科研究分野・教授・矢野聖二
【研究目的】 ① EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんにおける EGFR-TKI の効果の限界 現在までに本邦では EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんに対して複数の EGFR-TKI が承認されている。中でも第三世代 EGFR-TKI、オシメルチニブは第一世代 EGFR-TKI と比較して有意な無増悪生存期間の延長を認め (N Engl J Med. 2018)、現在の日常診療では一次治療として最も汎用されている。オシメルチニブは高い治療効果を発揮するものの、それでもその効果は一時的であり、最終的には、ほぼすべての患者で耐性をきたす。中には、早期に薬剤耐性を示す症例もあり、早期に耐性化をきたす症例を診断・抽出することは臨床上、重要な課題である。 ② 薬剤耐性—AXL シグナル— 治療開始後に出現する薬剤耐性は治療の最大の障壁であり、治療後の腫瘍増大・進行は、がんの不均一性 (Heterogeneity) を助長し難治化に寄与する。それゆえ、治療抵抗性を示す症例の早期診断とその対策は極めて重要な課題である。AXL は慢性骨髄性白血病患者から単離された TAM 受容体ファミリーに属するチロシンキナーゼ受容体のひとつであり、がん細胞では過剰に発現し増殖や転移などに関与している。また、がん領域における薬剤耐性にも影響し、腫瘍内の AXL タンパク発現は予後不良因子と報告されている (J Thorac Oncol. 2016)。我々はこれまでに EGFR 遺伝子変異陽性肺がん細胞のオシメルチニブ治療抵抗性に AXL シグナルの活性化が重要な役割を担うことを明らかにしてきた (Nat Commu2019)。 ③ 薬剤耐性—PD-L1 発現— 腎細胞癌の臨床検体を用いた解析において、腫瘍内 AXL 発現と Programmed death-ligand 1 (PD-L1) 発現の有意な相関性や、免疫チェックポイント阻害薬の治療効果との関連が報告されている (Clin Cancer Res. 2021)。我々はこれまでに EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんの腫瘍内 PD-L1 高発現はオシメルチニブの効果不良因子であることを報告した (Transl Lung Cancer Res. 2021)。 以上より、本研究では肺がんの初回治療導入時に生じる AXL シグナル活性によるオシメルチニブ治療抵抗性に着目し、臨床検体を用いたコンパニオン診断法として腫瘍内 AXL や PD-L1 発現の有用性を検証する。その結果、将来的な治験・臨床試験の基盤として発展させることを目的とする。 本研究の意義 AXL シグナル活性と腫瘍内 PD-L1 発現との関連も検討することで、より精度の高いコンパニオン診断法の開発に役立つと考えている。今後、この診断法を用いることで、EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺がんに対する有望な新規治療における症例選択が可能となるため、重要な研究成果につながることを期待され、その結果として将来的に社会的に大きな意義を有すると考えられる。		

【研究内容・成果】

(図表・説明図等を入れていただいても結構です。)

① 腫瘍内 AXL 発現とオシメルチニブの治療効果の検討

本学および共同研究施設において初回治療としてオシメルチニブが選択された EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者を対象に、治療開始前の腫瘍内 AXL 発現とオシメルチニブの治療効果の関連について前向きに検討した。腫瘍内 AXL 発現の染色性の程度によって 0、1+、2+、3+ に分類し、腫瘍内 AXL 発現 0、1+ を低発現群、2+、3+ を高発現群と定義した。

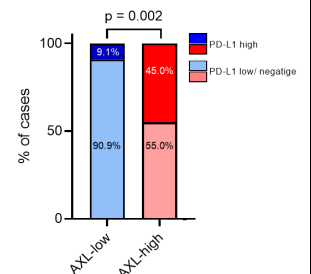


AXL 高発現群のオシメルチニブ治療の奏効率は低発現群のと比較して低い傾向がみられた。AXL 高発現群のオシメルチニブ治療の無増悪生存期間は低発現群のと比較して有意に短縮し、全生存率に関しても短縮の傾向がみられた。これらにより EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌患者に関しても AXL 発現はオシメルチニブの効果との関連が示唆された。

② 腫瘍内 AXL 発現と腫瘍内 PD-L1 発現の評価

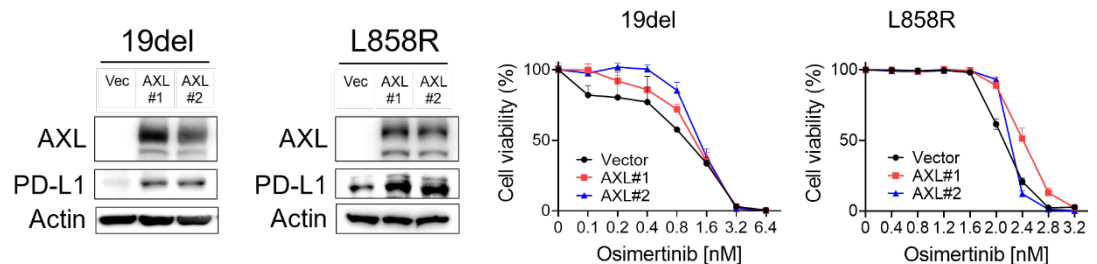
EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌においても、腫瘍内 AXL 発現と腫瘍内 PD-L1 発現に関連があるのかを検討した。検討に関しては腫瘍内 PD-L1 発現は得られた臨床情報をもとに t 検定で評価した。

評価により腫瘍内 AXL 高発現群において、腫瘍内 PD-L1 発現が多く、腫瘍内 AXL 発現と腫瘍内 PD-L1 発現には有意な相関が認められた (p = 0.002)。



③ AXL 遺伝子導入 Ba/F3 細胞の作製およびオシメルチニブの薬感受性の評価

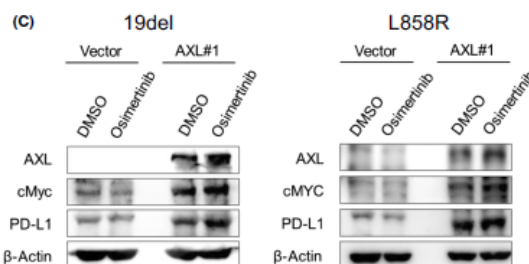
EGFR 遺伝子変異 (Exon19 欠失、L858R 変異) が導入された Ba/F3 細胞を用いて、full length の AXL 遺伝子をリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行った。Western Blotting 法を用いて AXL 遺伝子導入がされていることを確認し、AXL 遺伝子導入によるオシメルチニブの薬感受性を WST-8 アッセイ法で評価した。



Western Blotting 法により AXL 遺伝子の導入によりそれぞれの Ba/F3 細胞の PD-L1 タンパク発現が亢進し、また、オシメルチニブの感受性の低下がみられた。

④ AXL 遺伝子導入による生存に寄与するシグナルの検討

上記で作製した AXL 遺伝子導入 Ba/F3 細胞のシグナル活性について Western Blotting 法を用いて評価する。具体的には、オシメルチニブ治療における AXL、PD-L1 などの変化について評価し、AXL 遺伝子導入の有無による影響の解明を試みた。



オシメルチニブ治療により AXL、PD-L1 のタンパク発現の亢進に加えて、cMyc のタンパク発現も更新しており、この結果より AXL-cMyc-PD-L1 経路によって、PD-L1 のタンパク発現が亢進されることを見出した。これが AXL 高発現群でオシメルチニブ治療の感受性を低下している原因と考えられた。

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 Yoshimura Akihiro, et al. Cancer Sci. 2023;114(2):606-618. High levels of AXL expression in untreated EGFR-mutated non-small cell lung cancer negatively impacts the use of osimertinib
	【学会発表】 吉村彰紘ら、第26回日本がん分子標的治療学会学術集会 未治療 EGFR 遺伝子変異陽性非小細胞肺癌を対象としたオシメルチニブ治療効果と腫瘍内 AXL 発現に関する検討
	【その他特筆事項】 特記事項なし

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		CDK4・CDK6 阻害によるがん抑制の代謝的基盤の研究
研究代表者	所属・職名・氏名	奈良先端科学技術大学院大学・教授・加藤 順也
研究分担者	所属・職名・氏名	奈良県立医科大学・教授・庄 雅之
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	パルボシクリブ等の CDK4, 6 阻害薬は Rb 遺伝子が野生型のがん細胞に対し Rb 経路を活性化することで増殖阻害を誘導する薬剤であるが、作用機序には不明な点も多い。本研究では、CDK4, 6 阻害薬が細胞老化を誘導する機構や、耐性細胞が出現する機構についての解明を目指す。特に、代謝経路の変化との関連に注目する。また、細胞株は不死化の過程で付加的突然変異を起こしており、細胞老化の分子機構が元のがん細胞と変化している可能性があるため、生体内の状態に近いがん組織を再現し観察できる系（患者サンプルを利用した PDX モデル系）を構築し、将来の研究利用に資する。	
【研究内容・成果】 （図表・説明図等を入れていただいても結構です。）	パルボシクリブ、リボシクリブ、アベマシクリブなどの CDK4, 6 阻害薬は Rb 経路を活性化することで細胞周期の G1 期停止を誘導する薬剤であるため、Rb 遺伝子に変異のあるがん細胞には効果が期待できない。本研究では、Rb 遺伝子が野生型で、かつ、CDK4, 6 阻害薬に抵抗性を示すがん細胞に焦点を当てた。樹立された乳がん由来がん細胞株の中から、パルボシクリブに対し、感受性の異なる細胞株を 2 グループ選別した。この両者は、Rb 遺伝子は両遺伝子座共に野生型であり、高濃度のパルボシクリブ存在下では細胞周期を停止し細胞老化が誘導された。しかし、低濃度のパルボシクリブ存在下では応答が全く異なった。高感受性株は低濃度パルボシクリブ投与でも細胞周期が停止したが、低感受性株は増殖可能であった。この両細胞株に対し、mRNA の発現プロファイルを比較検討した結果、同じ機能グループに属する遺伝子の発現に違いが見られた。これらの遺伝子がコードするタンパク質の機能を調べた結果、ある種のアミノ酸の合成・代謝経路に関わる酵素群であることが判明した。この代謝経路の最終生成物を培地に加えたところ、パルボシクリブに対する感受性に違いが見られたことから、がん細胞では、代謝経路を大きく変化させることで、パルボシクリブに対する抵抗性を獲得する可能性が指摘された。今後は、この代謝経路の律速段階に関わる酵素の発現を人為的に変化させることにより、CDK4, 6 阻害薬に対する感受性が変わるかについて検討する予定にしている。 細胞周期制御因子は、細胞の増殖、生存のみならず、細胞株樹立時の不死化とも関連が深い。それゆえ、がん細胞株は樹立時に多くの付加的突然変異を獲得することが明らかとなっており、遺伝子型が元のがん細胞と同じとはいえない。特に、細胞老化を制御する分子機構は細胞株樹立時の標的であり、抗がん剤への感受性の違いの原因との指摘もある。CDK4, 6 阻害薬の薬効が細胞老化を介する可能性があるため、これは無視できない点である。さらに、患者の体内にあるがん細胞は独自のがん組織を形成しており、抗がん剤の効果が細胞への直接効果と同じとは限らず、さらに、ヒトがん組織構造体の不均一性も考慮する必要がある。しかし、患者由来のがん組織サンプルはそのまま in vitro で継続的に培養することは不可能であり、抗がん剤評価に使うことはできない。こうした問題点に対処するために、患者から単離したヒトがん細胞・組織（奈良県立医科大学との共同研究により提供）を直接免疫不全マウスに移植した Xenograft モデルマウス系（Patient-Derived Xenograft (PDX)）を構築した。本研究の最初の例として、化学療法を受けたことがない膵がん患者から摘出したがん組織片をヌードマウスに移植し継代したところ、がん組織を維持できることが判明した。モデルケースとして、抗がん剤や候補化合物を投与し薬効を評価したところ、がん細胞株を用いた Xenograft モデルマウス系（Cell line-Derived Xenograft (CDX)）と同様に解析できることがわかった（Scientific Reports 12 (1), 22419, 2022 に発表済み）。以後は、種々のがんサンプルを用いて解析範囲を広げるとともに、パルボシクリブの薬効の評価を行う予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Targeting Abnormal Cell Cycle in Cancer: A Preface to the Special Issue. C Takahashi, J Kato., Onco 2 (1), 34-35, 2022	
	Preclinical evaluation of pentagamavunone-1 as monotherapy and combination therapy for pancreatic cancer in multiple xenograft models. N Kamitani, I Nakamae, N Yoneda-Kato, J Kato, M Sho., Scientific Reports 12 (1), 22419, 2022	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		染色体安定性における JSAP の役割とその分子基盤の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・教授・橋本真一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・助教・岩渕禎弘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	染色体不安定性は、がん発生・悪性化の要因の1つである事が知られている。これまでの多くの研究から、染色体の均等分配機構は分子レベルで明らかにされつつある。しかし、染色体分配に関わる鍵分子の「ダイナミックな局在変化」や染色体を安定に保持するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、染色体分配における新規制御因子としての JSAP に焦点を当て、JSAP 制御の破綻が染色体不安定性を誘導するかを検証するとともに、その分子基盤の解明を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々は、これまでに、薬剤（ドキシサイクリン）によって JSAP2 タンパク質の発現誘導が可能な RPE-1 細胞システムの構築・解析を行い、野生型 JSAP2 の発現亢進は異数性を誘導することを明らかにしている。本年度は、さらに解析を進め、異数性細胞では染色体分配異常が高頻度で起こり、核膜崩壊から後期開始までの時間も短くなることを見出した（図1、図2）。 さらに、JSAP2 発現亢進に伴い、前中期動原体において、MAD2 や BUB1 など、紡錘体形成チェックポイント（SAC）の鍵分子の局在量が顕著に低下することを見出した。一方、ダイニン中間軽鎖（DLIC1）との結合能を欠く変異型 JSAP2 について、野生型 JSAP2 と同様の解析を行なったが、異数性の誘導は認められなかった。以上の結果から、野生型 JSAP2 の発現亢進によってダイニンモーター活性が異常に高くなり、SAC の時期尚早なサイレンシングを引き起こし、最終的に異数性が誘導されると考えられる。また、JSAP2 ノックダウン RPE-1 細胞について、1 細胞ゲノム解析を行い、染色体の一部の領域が 1.5 倍化あるいは 2 倍化していることを見出した。 今後、JSAP がどのように染色体安定性の制御に関与しているのかをより詳細に調べる予定である。 図1. JSAP2発現亢進による染色体分配異常 ドキシサイクリン(Dox)の添加により、遅延染色体や染色体橋などの染色体分配異常が高頻度で観察された。 図2. JSAP2発現亢進による分裂遅延 Doxの添加により、核膜崩壊から後期開始までの時間が短くなった。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん細胞における受容体型チロシンキナーゼ EphA2 の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・助教・周 越
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井 宏明
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	受容体型チロシンキナーゼ EphA2 は様々な腫瘍にて高発現し、がんの悪性化進展に関わる。当研究室では、これまでに成長因子によって活性化した ERK の下流キナーゼ RSK が EphA2 Ser-897 リン酸化を誘導し、がん細胞の遊走能を亢進させることを報告した。一方、がん微小環境では、炎症性サイトカインなどにより、ストレス応答キナーゼ p38 が恒常的に活性化し、がん細胞の悪性化に寄与する。このように RSK-EphA2 経路もストレス応答キナーゼもがんの悪性化に関わるが、その相互作用については解析されていない。そこで本研究では、ストレス応答キナーゼ p38 による RSK-EphA2 の制御機構の解明を目指し、解析を進めた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒト子宮頸癌細胞 HeLa に対し、成長因子 EGF または p38 の活性化を誘導するタンパク質合成阻害剤アニソマインを作用させたところ、RSK および EphA2 のリン酸化が誘導された。p38 阻害剤を前処理しても、EGF では RSK および EphA2 のリン酸化が誘導されたが、興味深いことに、アニソマイシンではこれらのリン酸化は完全に抑制された。同様の現象は p38 の下流キナーゼ MK2 に対する阻害剤の前処理でも認められた。このことから、ERK と p38-MK2 はそれぞれ異なる刺激に応答して RSK-EphA2 経路を制御することが明らかとなった。 次に、MK2 による RSK の活性化機構を解析した。RSK には4種類のアイソフォームがあり、今回はがん細胞で過剰発現する RSK1 について検討した。まず、MK2 が直接 RSK のリン酸化を誘導すると考えたため、インビトロキナーゼアッセイを行った。予想通り、活性型 MK2 は RSK1 Ser-380 のリン酸化を触媒した。RSK1 は分子内に2つの機能の異なるキナーゼドメイン NTKD (N末端キナーゼドメイン) と CTKD (C末端キナーゼドメイン) を持っており、Ser-380 はその間のリンカー領域に存在する。ERK による RSK1 の活性化では、ERK は RSK1 の C 末端に結合し、CTKD の活性化を誘導することで、Ser-380 のリン酸化を誘導し、NTKD を活性化させると報告されている(図1.左)。しかしながら、MK2 は直接 Ser-380 のリン酸化を誘導することで、CTKD 活性に依存せずに、NTKD を活性化させた(図1.右)。また、MK2 による NTKD の活性化機構も ERK の場合とは異なった。以上のことから、ERK と MK2 はいずれも RSK-EphA2 経路の活性化を誘導するが、その制御機構は異なることがわかった。	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>Zhou Y.</u>, Oki R., Tanaka A., Song L., Takashima A., Hamada N., Yokoyama S., Yano S., Sakurai H.: Cellular stress induces non-canonical activation of the receptor tyrosine kinase EphA2 through the p38-MK2-RSK signaling pathway., Journal of Biological Chemistry (in press) 【学会発表】 1. <u>周越</u>、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明、RSK-EphA2 経路を介したがんの悪性化、第26回日本がん分子標的治療学会 2. 浜田成、<u>周越</u>、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明、EMK4-ALK 陽性肺がん細胞における MK2 を介した EphA2 の非定型的な活性調節、第26回日本がん分子標的治療学会 3. <u>周越</u>、大木良太、田中章裕、高島惇誌、浜田成、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明、細胞内ストレスは p38-MK2-RSK-EphA2 経路を介して細胞遊走を促進する、第31回日本がん転移学会学術集会・総会 4. 浜田成、<u>周越</u>、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明、Non-canonical activation of EphA2 via the p38-MK2 pathway, 第81回日本癌学会学術総会 【その他特筆事項】 なし	

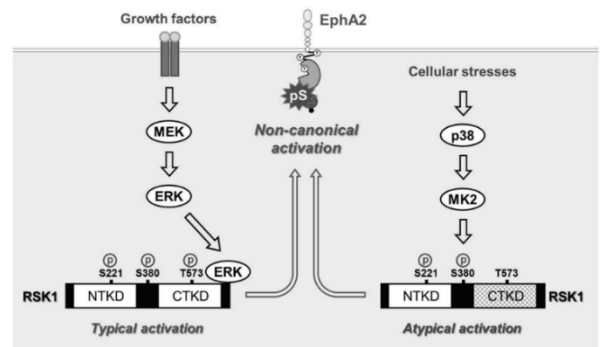


図1. ERKおよびMK2によるRSK-EphA2経路の活性化機構

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		既存薬を用いた糖鎖分解酵素発現制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学薬学部薬学科・准教授・東 恭平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司 先生
【研究目的】	私達はこれまでに、ヘパラン硫酸 (HS)特異的分解酵素ヘパラーゼ (HPSE)の発現に atypical protein kinase C (aPKC)が関与することを明らかにした。本研究では、抗リウマチ薬 auranofin (AUF)の他、FDA-Approved Drug Library と ICCB Known Bioactives Library より新たに見出した 11 種の薬剤 (ascorbic acid、disulfiram、staurosporine、gliotoxin、MG-132、Z-Leu3-VS、ikarugamycin、calyculin A、valinomycin、bafilomycin A1、および diphenyleneiodonium)の作用機作から HPSE 遺伝子の転写発現調節機構の詳細を明らかにすることを目的とした。また、上記の薬剤がコンドロイチン硫酸 (CS)/ヒアルロン酸 (HA)分解酵素であるヒアルロニダーゼ 1 (HYAL1)遺伝子のプロモーター活性を抑制するかどうかについても検討した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1. 既存薬による HPSE 遺伝子発現抑制機構 HCT116 細胞に HPSE 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を融合させたプラスミドを形質導入し、12 種の薬剤をそれぞれ培地に添加したところ、全ての薬剤でルシフェラーゼ活性の減少が認められた。12 種の薬剤の作用機作を調べたところ、PKC (auranofin、staurosporine)や NF-κB (gliotoxin、ascorbic acid、disulfiram、MG-132、Z-Leu3-VS)の阻害活性が報告されていたことから、aPKC とその下流の NF-κB によって HPSE 遺伝子は発現調節を受けていると考えられた。現在、HPSE 遺伝子の転写発現に NF-κB が関与しているかどうかを検討中である。 2. aPKC を阻害した時の HPSE タンパク質発現量の確認と癌細胞浸潤 乳癌細胞株 MDA-MB468、231 および 157 に auranofin を添加した時の HPSE タンパク質の発現量の変化を Heparan Degrading Enzyme Assay Kit を用いて調べた。その結果、各細胞種の HPSE 活性は auranofin 添加により有意に減少したことから、auranofin は HPSE の発現抑制に有用であることが確認できた。浸潤アッセイは、マトリゲルの入手に時間がかかってしまったため、現在検討中である。 3. ポリアミンによる GCFC2 合成促進機構 私達はこれまでに、HCT116 細胞における転写因子 GCFC2 の発現は細胞増殖促進因子ポリアミンによって翻訳レベルで調節されていること、および GCFC2 は HPSE 遺伝子の転写に関与することを明らかにしている。今年度は、EGFP レポーターシステムを用いて検討した。その結果、GCFC2 mRNA の開始コドン下流の特徴的な塩基配列がポリアミンによる GCFC2 の合成促進に重要であることを明らかにした。 3. HYAL1 転写活性を阻害する新規候補化合物の探索 HCT116 細胞に HYAL1 遺伝子のプロモーター領域とルシフェラーゼ遺伝子を融合させたプラスミドを形質導入し、12 種の薬剤をそれぞれ培地に添加したところ、全ての薬剤でルシフェラーゼ活性の減少が認められた。以上の結果より、HCT116 細胞の HYAL1 遺伝子は、HPSE1 遺伝子と同じく aPKC とその下流の NF-κB によって発現が制御されていることが考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. 宮下佳那美, 米野雅大, 三尋木結花, 三輪有由奈, 多森翔馬, 秋本和憲, 東伸昭, 須田貴司, 東恭平 (2022) ヘパラーゼ遺伝子の発現は aPKC-NF-κB シグナリングによって制御されている 第 95 回日本生化学会大会 (名古屋)	
	【その他特筆事項】	

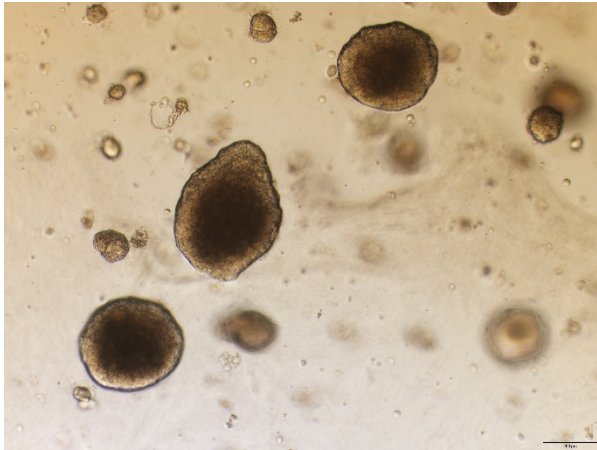
令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		転移性脳腫瘍に関わる KRAS 変異ステータスの分子プロファイリング
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学・助教・田中伯享
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	関西医科大学・学長特命教授・坂本毅治
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	KRAS はあらゆるがん種において変異頻度の高いがん遺伝子の一つであり、遺伝子変異のパターンによって肺からの脳転移頻度が異なるというコホート研究の報告がある。しかしながら、その詳細な分子メカニズムは明らかになっていない。近年、非小細胞肺癌を対象に KRAS 阻害剤が承認されたことでさらなる開発研究が活発になっている。KRAS 阻害剤に対する耐性に関する報告もあることから、本耐性が脳転移に影響をおよぼす可能性も考えられる。本研究は KRAS 阻害剤が肺がんの脳転移能に与える影響および脳転移性の KRAS 陽性肺がんに与えるがん微小環境の影響について明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究は、各種変異を保持する KRAS 遺伝子 (G12C や G12V など) を肺がん細胞に導入した後、BALB/c ノードマウスの左心室に移植することで脳転移能を解析する計画であった。移植に使用する細胞を作製するにあたり、細胞ごとの形質のばらつきに伴う脳転移能の差を排除するために、同一の細胞についてゲノム編集によって KRAS 遺伝子内に変異を導入する予定であった。しかしながら、当初計画したゲノム編集が困難であること、また使用予定の肺がん細胞株が脳転移を生じにくく解析モデルの確立が困難であることから外因性に各種変異陽性の KRAS 遺伝子を導入する方針へと変更した。各種 KRAS 遺伝子のレンチウイルスベクターを作製し、目的とする産物を一部樹立した (KRAS G12C、G12D、G13D)。一方で、未だに樹立が完了していないベクターがあるため、引き続きそれらの作製に取り組む。 また、in vivo の実験として BALB/c ノードマウスの左心室への細胞移植が必要となるが、その技術指導のために本共同研究の受入れ担当者である平田英周先生の下へ出向き、技術指導を賜った。その後同技術の習得に向けて練習を続け、ほぼ確実にシリッジを用いてマウス左心室への投与 (移植) が可能となった。 今後は、B16F10 細胞をベースとした各種細胞株を樹立した後、実際にマウスに細胞を移植して脳転移に関する評価を実行する。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 田中伯享、坂本毅治 KRAS 阻害剤に対する耐性化と EMT に関する解析、第 31 回日本がん転移学会学術集会・総会、ポスター	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がんクロマチン環境における非コード RNA 産生機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・野島孝之
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	なし
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	近年の大規模転写産物解析から、100,000 種類以上の非コード RNA (ncRNA) が検出されている。しかしながら、現在までに機能が明らかになっている ncRNA は一握りである。研究代表者は、ncRNA 産生を制御する転写終結機構に注目している。転写終結は遺伝子下流での異常な RNA 産生を防いでいるが、特定のがん患者にみられる遺伝子変異 (<i>SETD2</i>) を有する細胞では転写終結が破綻し、遺伝子間領域でリードスルー転写産物と呼ばれる ncRNA を産生する。本研究では、独自の新生 RNA 解析技術を用いて、がん特異的な転写終結破綻機構とそれ由来の ncRNA を明らかにする。将来的には、ncRNA を標的とした新たな治療アプローチの開拓を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がん細胞ではクロマチン制御遺伝子に多くの変異が見られ、その多くの場合、それら由来のタンパク質は活性を失っている。その中でも、ヒストン H3 リジン 36 番目のトリメチル (H3K36me3) 転移酵素、<i>SETD2</i> 遺伝子は腎臓がんをはじめ多くのがんで変異 (loss of function) が認められる。研究代表者は以前に、独自の新生 RNA 解析法により <i>SETD2</i> 遺伝子をノックアウト (KO) した細胞で大きな転写終結破綻を検出した。今回、腎臓がん ccRCC 患者由来細胞 A498 (<i>SETD2</i>-) の新生 RNA 解析においても、同様にリードスルー ncRNA が検出された。さらに、<i>SETD2</i> タンパク質を迅速にノックダウンする Degron システム細胞 (<i>SETD2</i>-AID HCT116 cell) を樹立した。この細胞を用いて、以下2つの条件を見出した。① <i>SETD2</i> タンパク質が欠失されたのみで H3K36me3 が存在する。② <i>SETD2</i> タンパク質と H3K36me3 の両方が欠失している。今後研究代表者は、この条件の <i>SETD2</i>-AID 細胞と <i>SETD2</i> KO 細胞を用いて、クロマチン画分や RNA polymerase II (Pol II) 転写複合体を、質量分析法にて網羅的に解析する。同定した転写終結候補因子群は、siRNA によって細胞内ノックダウンし、定量的 RT-PCR 法にて転写終結破綻が誘起されるか確かめる。さらに、<i>SETD2</i> KO 細胞のクロマチン環境を調べるため、他のヒストン修飾 (H3K36me2, H3K27me3 など) を Cut&Tag 法によって解析する。<u>鈴木健之教授グループと共同で <i>SETD2</i> のがん浸潤性、転移性に関する役割も調べる</u>。実際のがん患者細胞では2種類以上のクロマチン制御遺伝子に変異が起きていることがある。<u>そのため、<i>SETD2</i> 遺伝子に加えて複数のクロマチン制御遺伝子を KO した細胞の樹立も試みる</u>。樹立した細胞は独自の新生 RNA 解析法によって転写終結由来の ncRNA を網羅的に解析する。以上の方法で、がんクロマチン環境における ncRNA 産生機構を明らかにする。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし。 ただし、令和5年度内に共同研究成果を biorxiv にて公開予定である。	
	【学会発表】 JST 創発自発的な融合の場 第1回分子生命反応創発討論会 (2023年2月、金沢大学)	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		頭頸部癌オルガノイドライブラリーの確立と表現型の統合的理解及び潜在的治療への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・耳鼻咽喉科頭頸部外科 遠藤一平 講師
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・耳鼻咽喉科頭頸部外科 吉崎智一 教授
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・耳鼻咽喉科頭頸部外科 宇野大祐 大学院生
受入担当教員	職名・氏名	分子病態研究分野 後藤 典子 教授
【研究目的】	頭頸部癌に関与する遺伝子変異は多く、病理学的に同じ腫瘍であっても遺伝子変異が異なることが明らかになっている。従来の癌研究においては二次元培養された樹立細胞株を用いているが、生体内とは細胞性質が異なり、元の癌細胞の性質を喪失していることが問題視されている。 本研究では三次元培養によって作成される生体臓器に類似した組織体であるオルガノイドを用いて頭頸部癌におけるがん遺伝子異常と癌の表現型の関連性を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	①頭頸部癌オルガノイドライブラリーの確立 同意の得られた患者標本から頭頸部扁平上皮癌のオルガノイド作成とライブラリーの作成を行っている。令和4年度に13例のオルガノイド作成に成功した。内3例は継代も成功している。 ②オルガノイドを用いた薬剤感受性動態の検証 癌は遺伝学的に不均一な細胞の集団であり、特に頭頸部癌では複数の遺伝子変異の相互作用によって薬剤応答性は変容することが予測されている。今回 in vitro での複数の細胞種から構成される頭頸部癌オルガノイドを利用して薬剤感受性評価を行うことにより、癌細胞（特に癌幹細胞）自体への効果のみならず、癌細胞相互作用等を標的とした、すなわち癌微小環境を標的とした新たな治療標的の同定を目指す。 ③頸部癌における癌微小環境の確立 頭頸部癌をはじめとした固形癌は、がん細胞だけでなく間質細胞（間葉系細胞、血管内皮細胞、免疫細胞）と細胞外マトリックスから構成されている。オルガノイドは癌細胞だけでなく、正常細胞でも培養が可能である。そのためがん組織からのオルガノイドとがん周囲組織の間質細胞のオルガノイドをそれぞれ樹立し、共培養することで癌の微小環境を再現する。特に癌免疫療法において従来の癌細胞の平面培養では不可能であった腫瘍免疫微小環境を再構成し頭頸部癌における免疫チェックポイント阻害剤の投与を検証する。  喉頭癌オルガノイド day12	
【成果等】	【主な論文発表】なし	
	【学会発表】なし	
	【その他特筆事項】なし	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		シングルセル RNA-seq による RB1 欠損 MCF7 細胞株の不均一性及び遺伝子発現特徴の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・特定准教授・Thumkeo Dean
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	Rb は多くのがんで loss of function(LOF)変異が見つかっており、代表的ながん抑制遺伝子とされている。これまで、多くの研究により細胞周期における Rb の古典的機能の詳細が明らかになったが、近年、細胞周期以外の様々な細胞機能についても Rb の関与が少しずつ明らかになってきた。しかし、現在でもはまだ不明な部分が多く、さらなる解明が必要である。このような背景から、本研究では Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いて、scRNA-seq による解析を行い、Rb 不活性化がん細胞の不均一性と遺伝子発現の特徴を明らかにし、未知のがん細胞における Rb の非古典的機能を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究は、COVID の影響で、研究代表者は最近までがん進展制御研究所に出向くことができず、目標の Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いた scRNA-seq 解析の実施にはまだ至っていない。しかし、令和4年度の年度末に、COVID の状況が改善し、scRNA-seq 実験の準備を行うことができ、あと数ヶ月以内に実施できる見込みとなっている。これまで実験を実施できなかった期間については、研究代表者は所属機関にてヒト表皮細胞を用いて、scRNA-seq 実験 platform 及び scRNA-seq のデータ解析 pipeline などを立ち上げ、Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞の scRNA-seq 解析に応用できる体制を確立した (Siriwach, その他2名, Thumkeo, STAR Protocols 3: 101906, 2022)。また、申請者は <i>in vitro</i> 培養細胞を用いた scRNA-seq に加え、マウス腫瘍モデルの腫瘍標本の scRNA-seq 実験系・解析系も立ち上げた。これまで、マウス LLC1 (Lewis Lung Carcinoma) の腫瘍内浸潤 CD45+免疫細胞の scRNA-seq による profiling に成功し、論文を発表している (Thumkeo et al., Cell Reports, 39: 110914, 2022)。さらに、現在は手術で得られるヒトがん組織の scRNA-seq も行っており、scRNA-seq 解析の経験を着実に積んでいる (図, Thumkeo et al. 未発表)。今後、この経験を本研究に活用し、Rb 欠損腫瘍細胞の腫瘍モデルの腫瘍内微小環境 (TME) を明らかにしたいと考えている。control と比較することにより、実際の腫瘍内で Rb が腫瘍微小環境にどのような影響を及ぼし、<i>in vivo</i> レベルの Rb の非古典的機能解明につなげたいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) Thumkeo D, Punyawatthanakool S, Prasongtanakij S, Matsuura R, Arima K, Nie H, Yamamoto R, Aoyama N, Hamaguchi H, Sugahara S, Takeda S, Charoensawan V, Tanaka A, Sakaguchi S, Narumiya S. PGE₂-EP2/EP4 signaling elicits immunosuppression by driving the mregDC-Treg axis in inflammatory tumor microenvironment. Cell Reports 39: 110914, 2022. 2) Siriwach R, Ngo AQ, Narumiya S, Thumkeo D. An optimized protocol to identify keratinocyte subpopulations <i>in vitro</i> by single-cell RNA sequencing analysis. STAR Protocols 3: 101906, 2022. 【学会発表】 タムケオ ディーン. LLC1 マウス腫瘍モデルにおける PGE₂-EP2/EP4 シグナル伝達の免疫抑制機構の解明。第 81 回 日本癌学会学術総会、横浜、2022 年 9 月 29 日 (ポスター発表) 【その他特筆事項】	

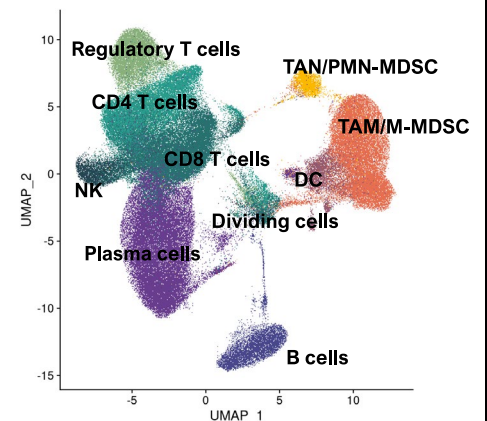


図 ヒトがん浸潤免疫細胞の scRNA-seq 解析の一例

研究課題		質量分析と機械学習を用いたハイスループット大腸がん診断システムの構築
研究代表者	所属・職名・氏名	山梨大学・講師・吉村 健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学・助教・堂本 貴寛
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	質量分析を用いた成分分析を基盤とした新規がん診断法の確立に向けた研究が世界的に進められているが、組織の採取が必要であることや、前処理やクロマト分離に時間がかかること等の理由により、従前法による病理診断を超える方法論の確立には至っていない。そこで本研究では、組織を採取することなく非侵襲的に成分を分析し、そこからがん特異的な組成変化を検知することで10秒以内に悪性腫瘍の存在を示すことが可能な、ハイスループットがん診断システムを構築することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ハイスループットの成分分析を可能とするための要素技術である、Liquid Probe Ionization (LPI, 旧名称 Sheath-flow Probe Electrospray Ionization, 特許 7109731 号) の原理と、プローブの構造を図 1A に示す。LPI は質量分析に用いるイオン化部であり、金属製の針を樹脂製の外套に貫通させたプローブを上下運動させ、試料採取と成分のイオン化を連続的に行う。プローブ先端の小さな孔からは金属針がわずかに突出しており、かつ表面には溶媒の膜が形成されており、この溶媒膜によって試料中の成分が採取される。採取された成分は電圧の印加により溶媒と共にエレクトロスプレーされ、質量分析装置へと導入される。液体、固体を問わず生体試料を前処理なしで扱えるため、質量分析の所要時間を劇的に短縮することができ、オートサンプラーを連結すれば数千検体/日の分析も可能となる。 図 1 A. LPI の原理 B. 試作プローブ C. LPI を連結した質量分析装置 (LPI-MS) <u>イオン化プローブ</u>: プローブ形状は分析結果に最も影響を与える重要部であるため、複数種の試作品を作成し比較検討を行った。ヒト血清を用いた分析における成分の検出感度と再現性を基に、最適なプローブ形状が決定された (図 1B, 特許出願予定のため途中段階のもの)。 <u>質量分析装置との連結</u>: 移動距離や周期などのプローブ挙動や、それに同期した電圧印加を制御するための機構とプログラムを構築し、市販の質量分析装置に連結した (図 1C)。最終的には組織の直接分析を可能とすることを目指すが、検討段階としては前処理なしのヒト血清を10秒で成分分析できることが確認された。得られたマスペクトルからは低分子代謝産物や脂質が認められた。 <u>今後の方針</u>: ヒト由来の大腸粘膜および大腸がん組織の直接分析に係る条件検討を行う。分析条件の確定後、各組織の成分分析結果をデータベースに蓄積し、マーカー分子の探索や、人工知能の一種である機械学習を用いたがん判別アルゴリズムの構築を目指す。がん特異的な生体分子の発現量変化 (代謝変化) を解析し、大腸がんの分子病態解明の基盤を構築することも併せて企図する。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	要素技術に関する特許出願準備中 (2023 年 4 月出願予定)。

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・准教授・岡橋伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・教授・清水浩
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・教授・松田史生
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・博士前期課程・谷口昶夫
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	がん細胞は活発な細胞増殖を支える活発な代謝を行うことが知られている。しかし、そのような特異的な代謝を実現するメカニズムや未分化性を維持したがん幹細胞の代謝は明らかとなっていない。これまでの研究では、細胞内代謝の流れを定量的に計測できる ^{13}C 代謝フラックス解析法を使って種々のがん細胞株の代謝解析を実施し、実験的に得られた代謝状態を再現するために必要な代謝制約を <i>in silico</i> 代謝シミュレーションを用いて探索した。その結果、がん細胞は、代謝熱の放散を低く保つという制約下で ATP 獲得を最大化していることが示唆された。そこで本年度は、がん代謝と熱の関係性について精査した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1mol の ATP を獲得する際に発生する代謝熱は、解糖系が 55.0 kJ/mol ATP、酸化的リン酸化が 88.2 kJ/mol ATP であり、効率的な ATP 獲得が可能な酸化的リン酸化よりも解糖系を使った方が代謝熱の発生を低く保つうえで好ましい。これががん細胞が効率の悪い解糖系を利用する理由の一つであると考えられる。実際に代謝の変動で代謝熱が変化するかを調べるために、酸化的リン酸化の阻害時の解糖系の代謝フラックスや細胞内温度が変化するか検証した。種々の呼吸鎖阻害剤を処理した MCF-7 細胞では、グルコース取り込みと乳酸排出が増加し、シミュレーションの結果と一致して、酸化的リン酸化の阻害による ATP 不足を解糖系で補うことが確認された。この時の細胞内温度を蛍光プローブを用いて計測したところ、予想に反して細胞内温度の大きな有意な変動は認められなかった (図)。これは、酸化的リン酸化の阻害で減少した代謝熱と解糖系の代償的活性化で増加した代謝熱がバランスし、細胞内温度が一定に保たれていることを示唆しており、細胞内代謝が温度恒常性を維持するようにリワイヤリングされている可能性が示唆された。この結果は、3次元構造をとるがん幹細胞では、代謝熱の放散が2次元よりも困難になることから、がん幹細胞に特徴的な代謝最適化戦略が存在することを示唆しており、引き続きがん幹細胞の代謝解析を進める。	
【成果等】	【主な論文発表】 Nobuyuki Okahashi, Tomoki Shima, Yuya Kondo, Chie Araki, Shuma Tsuji, Akane Sawai, Hikaru Uehara, Susumu Kohno, Hiroshi Shimizu, Chiaki Takahashi, Fumio Matsuda, Metabolic flux and flux balance analyses indicate the relevance of metabolic thermogenesis and aerobic glycolysis in cancer cells. <i>bioRxiv</i>, https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.11.16.468557v2	
	【学会発表】 岡橋伸幸, 島知輝, 近藤佑哉, 荒木千絵, 辻周真, 澤井茜, 上原ひかる, 河野晋, 清水浩, 高橋智聡, 松田史生 がん培養細胞株比較オミクス解析が示唆する好氣的解糖と代謝熱の関連 第16回メタボロームシンポジウム 2022/9/14~16	
	【その他特筆事項】 なし	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Met-CDCP1 複合体の構造解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学 微生物病研究所・助教・梶原 健太郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学 微生物病研究所・特任助教・松田 真
	所属・職名・氏名	大阪大学 微生物病研究所・特任研究員・赤松 香奈子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本 邦夫
【研究目的】	がん細胞は微小環境において周囲の細胞から様々な因子の供給を受けることで、がん形質を獲得している。その因子のひとつ HGF は受容体 Met に結合することで細胞内シグナルを活性化させ、がん進展に寄与している。我々は細胞膜上の Met 制御メカニズムの理解を目指して解析を進めてきた。これまでに CDCP1 は Met と細胞外領域を介して結合しており、その活性化を制御していることを明らかにしてきた。さらに、この制御には CDCP1 の細胞外領域の構造変化（切断）が重要であることを明らかにした。しかし、CDCP1 の構造変化が Met との相互作用に与えるインパクトの構造的な理解には至っていない。本研究では、CDCP1 と Met の相互作用を構造レベルで明らかにして、Met の精密な制御、さらにはがん進展の抑制を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<u>1) CDCP1 と Met の大量発現システムからの回収と精製</u> 前年度までに、CDCP1 と Met の大量発現システムの構築と精製プロセスの最適化を実施していた。その知見をもとに、両タンパク質の精製を実施した。 CDCP1 と Met の細胞外ドメインの C 末端側に精製用の His6 タグと TEV プロテアーゼ切断配列を付加したコンストラクトを哺乳動物細胞 Expi293F にトランスフェクションした。大量培養を実施して、得られた培養上清を回収後、そこから Ni-NTA レジンで粗回収を行った。ゲルろ過クロマトグラフィ後、TEV プロテアーゼ処理とエンドグリコシダーゼ処理を実施して、再度ゲルろ過クロマトグラフィに供した。得られたピークはすべて SDS-PAGE および CBB 染色に供して、目的タンパク質の精製と純度の確認を行った。 <u>2) CDCP1 単独、CDCP1-Met 複合体の結晶化</u> (大阪大学蛋白質研究所中川敦史教授との共同研究) 前年度までに、CDCP1 細胞外ドメイン単独の結晶化条件の最適化を完了していた。その知見をもとに、CDCP1 の高純度のタンパク質から結晶を得た。 CDCP1-Met 複合体の形成を試みた。単独で精製した細胞外ドメインを混合させたが、FPLC では複合体に相当するピークは認められなかった。また、細胞外ドメインを混合させた状態での相互作用を等温滴定型カロリメトリー ITC で解析したが、複合体形成を示唆する結果を得ることができなかった。そこで、細胞膜上での CDCP1-Met 複合体の形成を NanoBiT で解析したところ、両タンパク質の相互作用が確認された。以上の結果から、CDCP1-Met の複合体形成は膜貫通領域や細胞内ドメインが必要であることが推測される。よって、CDCP1-Met 複合体の結晶化は一時保留することにした。 <u>3) X 線結晶構造解析</u> (大阪大学蛋白質研究所との共同研究) 2 で得られた CDCP1 のタンパク質結晶を X 線照射施設 SPring-8 (BL44XU) にて構造解析に供した。(得られた構造に関する情報は、論文公開まで差し控えさせていただきます。)	
【成果等】	【主な論文発表】 原著論文 1) Src activation in lipid rafts confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell competition. <u>Kentaro Kajiwara</u>, Ping-Kuan Chen, Yuichi Abe, Satoru Okuda, Shunsuke Kon, Jun Adachi, Takeshi Tomonaga, Yasuyuki Fujita, Masato Okada. <i>Current biology</i>, 32(16) 3460-3476 (2022)	

- 2) Secretory glycoprotein NS1 plays a crucial role in the particle formation of flaviviruses.
Tomokazu Tamura, Shiho Torii, Kentaro Kajiwara, Itsuki Anzai, Yoichiro Fujioka, Kisho Noda, Shuhei Tagawa, Yuhei Morioka, Rigel Suzuki, Yuzy Fauzyah, Chikako Ono, Yusuke Ohba, Masato Okada, Takasuke Fukuhara, Yoshiharu Matsuura.
PLoS pathogens, 18(6) e1010593-e1010593 (2022)
- 3) SRC kinase activator CDCP1 promotes hepatocyte growth factor-induced cell migration/invasion of a subset of breast cancer cells.
Naoyuki Kawase, Atsuya Sugihara, Kentaro Kajiwara, Michio Hiroshima, Kanako Akamatsu, Shigeyuki Nada, Kunio Matsumoto, Masahiro Ueda, Masato Okada.
Journal of biological chemistry, 298(3) 101630-101630 (2022)
- 4) A novel TGF- β -responsive enhancer regulates SRC expression and epithelial-mesenchymal transition-associated cell migration.
Soshi Noshita, Yuki Kubo, Kentaro Kajiwara, Daisuke Okuzaki, Shigeyuki Nada, Masato Okada.
bioRxiv, <https://doi.org/10.1101/2022.11.25.517908> (2022)

総説

- 5) 腎臓の代償性肥大メカニズム
梶原健太郎, 山野荘太郎, 岡田雅人
Urology Today 29(3) 4-8 2022年10月

【学会発表】

- 1) 生体維持の仕組みを悪用するがん細胞
梶原健太郎
愛媛大学応用化学セミナーシンポジウム 2023年1月
- 2) 細胞膜を舞台にしたシグナル伝達の制御メカニズム
梶原健太郎
第12回シグナルネットワーク研究会 2022年10月
- 3) 生体の維持システムを悪用するがん細胞
梶原健太郎
福井大学医学部「基礎化学」 2022年10月

【その他特筆事項】

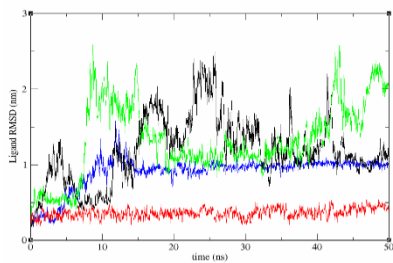
- 1) 腎臓の代償性肥大の仕組みを悪用する癌細胞
日経メディカル 2022年9月
- 2) Osaka University identifies fate determination factors of epithelial cancer cells
JST Science Japan 2022年9月
- 3) たんぱく質阻害でがん化細胞排除 阪大が発見、初期段階の創薬標的に
日刊工業新聞 2022年7月
- 4) 「がん細胞 排除？ 増殖？」阪大微研が運命決定因子を同定
科学新聞 2022年7月

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

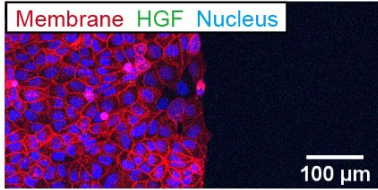
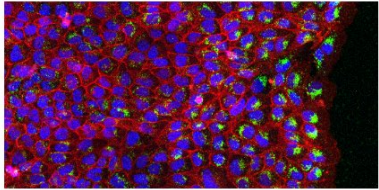
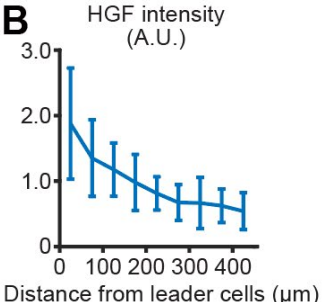
研究課題		抗がん薬の体内消失における小胞体輸送体の役割解明
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授・荒川大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	薬物の小胞体における代謝反応の分子メカニズムの理解は、主に薬物間相互作用や遺伝子変異による薬効や副作用発現の個体差の観点から、創薬や薬物治療において重要な役割を持つ。一方、これまで抗がん薬の薬物代謝研究の大部分はシトクロム P450 や UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) など代謝酵素の機能解明に焦点が置かれ、UGT や加水分解酵素 CES の基質結合部位が存在する小胞体膜輸送体に着目されてこなかった。本申請研究では小胞体輸送体 A に着目し、カペシタビンなど抗がん薬の薬物代謝反応調節における小胞体膜透過の重要性を明らかにし、さらに薬物間相互作用や薬物動態の個人差の原因となっているかを明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	小胞体代謝を受ける OAT2 の基質を明らかにするため、UGT 基質薬物 (SN38 など) および CES1 基質薬物 (カペシタビンなど) の基質認識試験を、ヒト発現細胞を用いた取り込み試験により行った。その結果、SN-38 は小胞体輸送体 A の基質とならなかったものの、カペシタビンが小胞体輸送体 A の基質となることが明らかとなった。カペシタビンの副作用発現に小胞体輸送体 A の遺伝子変異が関わっている報告をもとに、血漿中濃度プロファイルの遺伝子変異に基づく薬理遺伝学的解析を行った。その結果、小胞体輸送体 A の C>T 変異体では C/C 変異体よりも長い半減期を示した。カペシタビンの主要代謝臓器が肝臓であることから、ヒト肝臓における小胞体輸送体 A の局在を免疫染色により調べた。小胞体輸送体 A は門脈周辺領域において小胞体マーカーである calnexin と共局在し、肝細胞の小胞体に局在することが明らかとなった。初代培養ヒト肝細胞において、カペシタビンから 5'-DFCR への加水分解は、小胞体輸送体 A 阻害剤存在下で減少した一方、肝細胞におけるカペシタビンの取り込み及びヒト肝ミクロソームにおけるカペシタビンの加水分解は影響を受けなかった。また、HepaRG 細胞において小胞体輸送体 A のノックダウンにより、カペシタビンから 5'-DFCR への加水分解が減少した一方、カペシタビンの細胞内への取り込みは減少しなかった。これらの結果から、小胞体輸送体 A が肝小胞体におけるカペシタビンの加水分解に関与していることが示された。さらに、小胞体輸送体 A の小胞体膜輸送体としての役割を明らかにするために、蛍光基質の細胞内分布を調べた。小胞体輸送体 A 発現系 HeLa 細胞における蛍光基質の分布を観察したところ、空ベクター導入細胞と比較して小胞体マーカーである ER-Tracker Red との共局在が増加した。この結果から小胞体輸送体 A がカペシタビンの小胞体分布に関与し、加水分解活性を調節していることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		シグナリング代謝物を介したがん代謝適応システムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学 先端科学技術研究センター・准教授・大澤 毅
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	がんの増殖と転移には腫瘍微小環境やがん代謝が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを見いだし報告してきた。低酸素・低栄養で生存する癌細胞は、癌幹細胞の維持を促進し悪性化に寄与することが示唆されるが、その詳細な“代謝適応システム”は不明である。本研究は、がん悪性化における“代謝と栄養シグナル”がどのようにがん幹細胞維持に関与するかを解明し、現存する化学療法との併用に相乗効果が期待できる標的分子の探索など治療への応用のための基盤となる研究を目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がんの悪性化にはがん微小環境が重要な役割を果たす。申請者らはこれまで低酸素・低栄養・低 pH というがん微小環境ががんの悪性化を促進することを報告してきた。本研究では、がん微小環境における“がん代謝システムと代謝物シグナリングの解明”をがん細胞株や in vivo マウスを駆使して行うことを目的とした。 具体的には、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス統合解析から“代謝と栄養シグナル”の解明という分野横断的な共同研究を展開することを目的とした。 研究計画としては、以下の2項目について検討を行った。 【1】 低酸素・低栄養・低 pH におけるがん幹細胞維持に必須な代謝経路の解明 申請者は低酸素・低栄養・低 pH ががん悪性化に関与することを報告しているが、がん微小環境で亢進するがん代謝物がどのような代謝シグナリングを介して悪性化に寄与するかは不明である。 そこで申請者は、低酸素・低栄養・低 pH のがん細胞で特異的な代謝物や代謝経路を解明することを目的として、ターゲット・ノンターゲットメタボロミクスを行い、低 pH 微小環境ではポリアミン経路の新規がん代謝物が好中球の浸潤を介して、がん悪性化に関わる可能性を見出した。さらに、この経路の律速酵素を阻害することで in vivo の腫瘍増殖能を抑制することを見出した(論文投稿中)。 【2】 低酸素・低栄養・低 pH におけるがん幹細胞の代謝物シグナリングの解析 申請者は、がん細胞株に共通して低酸素・低栄養・低 pH で特異的に発現誘導される特徴的な遺伝子発現を解明するため、RNA-Seq 解析、エピゲノム解析、パスウェイ解析を行った。さらに、この機能解析を行った結果、PI3K-AKT-mTOR などのシグナル伝達系や新たな標的候補として、オルガネラダイナミクスを制御するキネシン・アクチン蛋白やオルガネラ間の小胞輸送に関わる興味深い因子を見出した。 さらに、これらシグナル経路の阻害剤や si/shRNA やゲノム編集等によるマウス腫瘍移植実験において抗腫瘍効果を見出している。 本共同研究から、がん微小環境におけるがん幹細胞維持機構の解明が期待され、既存の抗がん剤や血管新生阻害剤との併用において相乗効果が期待できる分子標的の探索や新しい制癌法の開発に繋がる研究が期待できる。	
【成果等】	【主な論文発表】 Pan M et al., and Osawa T*. Glutamine deficiency in solid tumors confers resistance to ribosomal RNA synthesis inhibitors. <i>Nat Commun.</i> 13, 3706, 2022. など、8報	
	【学会発表】 大澤毅、「オルガネラダイナミクスを介した代謝変容ががん進展を促進する」、シンポジウム、第45回日本分子生物学会：2022年11月30日-12月2日、幕張など、招待講演7件	
	【その他特筆事項】	

研究課題		HGF-Met タンパク質間相互作用インターフェースを標的とした抗がん薬の同定を目指した次世代データ駆動型創薬基盤の確立									
研究代表者	所属・職名・氏名	九州工業大学情報工学研究院・教授・青木 俊介									
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名										
	所属・職名・氏名										
	所属・職名・氏名										
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫									
【研究目的】	本研究では HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立を目指した。種々の <i>in silico</i> スクリーニング手法を駆使することで抗癌剤の標的となりうる HGF-Met のタンパク質間相互作用部位、HGF α 鎖と β 鎖の Met への結合に関与するポケットに嵌まり込む低分子化合物を探索する。また機械学習や時間軸を考慮した分子動力学計算法 (MD) も駆使することにより水溶液中での化合物の動態を精密に予測可能となる。本研究では、これら機械学習等を活用したデータ駆動型創薬技術と MD を組み合わせることによって HGF-Met タンパク質間相互作用インターフェースを制御する抗がん剤を大規模化合物ライブラリから探索し高活性低分子リード化合物を同定する事を目指す。										
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまで HGF β 鎖の結合ポケットを用い、フレキシブルドッキング手法を 2 種類利用するスクリーニング経路により HGF の Met への特異的相互作用を選択的に阻害する比較的高活性のリード化合物 (IC₅₀ 値= 11 μM) を同定した。本研究ではより活性の高い新規類縁体を探索した。160 万化合物からなる大規模構造ライブラリを MACCSkey フィンガープリント法ならびに Morgan フィンガープリント法により Tanimoto 係数を指標にスクリーニングし、機械学習による結合予想ツールである GNINA によって結合ポーズを予測した後に水分子と各種イオン存在下で時空間的な分子動力学シミュレーション (Molecular Dynamics Simulation; MDS) を行つて ligand RMSD 値 (値が低いほど化合物が動かず安定している) による化合物の HGF β 鎖に対する結合安定性を評価した。最終的に 150 万化合物の中から選別された 7 種類の新規類縁体化合物に関して 50 nsec の MDS を行つた結果、リード化合物よりも ligand RMSD 値が低い新規の類縁体を 2 化合物 (Compound 1, Compound 2) 同定する事に成功した (下図)。化合物のタンパク質に対する結合モードを予測する PLIP 法によって解析したところ Compound 1 と Compound 2 はそのピペラジン基によって HGF の Glu656 と強い塩橋を形成していることが明らかになった。MDS の trajectory 解析からとりわけ Compound 2 は塩橋に加え最大 3 つの水素結合を形成していることも明らかになった。さらに MDS の trajectory データを用い MM-PBSA 法によって結合自由エネルギーを見積もった。その結果、両化合物ともにリード化合物よりも低い結合自由エネルギーが見積もられ (下表)、より結合親和性が高い阻害類縁体であることが示唆された。今後、<i>in vitro</i> 実験によってこれらの化合物の HGF に対する活性阻害における IC₅₀ 値を決定する必要がある。 <table><tr><th>化合物名</th><th>リード化合物</th><th>Compound 1</th><th>Compound 2</th></tr><tr><td>ΔG (kcal/mol)</td><td>-12.62 ± 3.33</td><td>-15.49 ± 2.87</td><td>-16.37 ± 2.68</td></tr></table>			化合物名	リード化合物	Compound 1	Compound 2	ΔG (kcal/mol)	-12.62 ± 3.33	-15.49 ± 2.87	-16.37 ± 2.68
化合物名	リード化合物	Compound 1	Compound 2								
ΔG (kcal/mol)	-12.62 ± 3.33	-15.49 ± 2.87	-16.37 ± 2.68								
【成果等】	【主な論文発表】 (1) Kuriki K, Matsumoto R, Ijichi C, Taira J and <u>Aoki S</u>. Establishment of <i>in silico</i> prediction methods for potential bitter molecules using the human T2R14 homology-model structure. <i>Chemical Biology Letters</i> 9, 351, 2022. (2) Nakashima J, Takeuchi M, Kawamoto S, Monobe K, Taira J, <u>Aoki S</u>. Establishing a parallel compound screening method and identifying novel antimicrobial compounds targeting <i>Staphylococcus aureus</i> dihydrofolate reductase. <i>J Appl Pharm Sci</i>, online ahead of print. 2022. (3) Taira J, Murakami K, Monobe K, Kuriki K, Fujita M, Ochi Y, Sakamoto H, <u>Aoki S</u>. Identification of novel inhibitors for mycobacterial polyketide synthase 13 via <i>in silico</i> drug screening assisted by the parallel compound screening with genetic algorithm-based programs. <i>J Antibiot</i> (Springer Nature), online ahead of print, 2022. 【学会発表】 【その他特筆事項】										

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肝細胞増殖因子による先導細胞運命決定の機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・准教授・寺井健太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	IST Austria・研究員・日野直也
	所属・職名・氏名	京都大学大学院生命科学研究科・大学院生・松田樹生也
	所属・職名・氏名	京都大学大学院生命科学研究科・教授・松田道行
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	上皮組織の創傷治癒の過程では、傷に面した細胞が先導細胞として機能し、後続の細胞を牽引することで集団での協調的な細胞移動が行われる。我々はこれまでに、肝細胞増殖因子 (HGF) が先導細胞特異的に作用し、持続的な ERK MAP キナーゼの活性化を引き起こすことで、集団を牽引する能力を付与することを見出した。しかし、なぜ HGF が先導細胞のみに作用するのかは未解明である。本研究では、HGF から下流の細胞内シグナル伝達経路のどのレベルで先導細胞と後続細胞の差異が生まれるのかを検証し、先導細胞特異的な HGF-Met シグナル活性化機構の解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	まず初めに免疫染色により細胞膜上の HGF 受容体 Met の発現量を免疫染色法によって解析したところ、先導と後続の細胞に差は認められなかった。そこで、HGF の Met への結合が異なる可能性を考え、松本教授との共同で作出した蛍光標識 HGF を用いて HGF 分布を可視化した。その結果、細胞膜表面への HGF 結合は検出できなかったが、先導細胞が後続よりも多くの HGF を細胞内へ取り込むことが分かった (下図)。この先導細胞内への HGF の取り込みはエンドサイトーシスもしくは Met の阻害剤によって顕著に減少した。一方で、エンドサイトーシス阻害条件でも Met 下流の ERK 活性は阻害されなかった。以上のことから、HGF 存在化では先導細胞特異的に Met が活性化し、HGF-Met 複合体のエンドサイトーシスが起ることが示唆された。 先導細胞は後続細胞よりも伸展した形態を示す。そこで次に、細胞形態と HGF シグナルとの関連を解析した。遊走中の細胞で細胞面積と HGF 取り込み量を同時に解析したところ、これらが正の相関を示すことが明らかになった。また、細胞密度を変化させることで細胞の形態変化を模倣し、Met リン酸化レベルをウェスタンブロット法で解析したところ、細胞面積が大きくなる低密度条件では高密度条件と比較して HGF 処理時の Met リン酸化レベルが上昇した。よって、以上のことから Met 活性化は HGF の存在のみでなく、細胞形態による制御も受けており、これが集団遊走時の先導細胞の機能獲得に重要であることが分かった。 A Time after HGF addition (hr) -0.5  5.5  B HGF intensity (A.U.)  図. 遊走細胞への HGF の取り込み	
【成果等】	【主な論文発表】 Naoya Hino, Kimiya Matsuda, Yuya Jikko, Gembu Maryu, Katsuya Sakai, Ryu Imamura, Shinya Tsukiji, Kazuhiro Aoki, Kenta Terai, Tsuyoshi Hirashima, Xavier Trepate, Michiyuki Matsuda. A feedback loop between lamellipodial extension and HGF-ERK signaling specifies leader cells during collective cell migration. Developmental Cell, Volume 57, Issue 19, 2022, Pages 2290-2304.e7.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		網羅的 MAPK-KO 細胞を用いた, がん細胞の翻訳制御クロストーク経路の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪医科薬科大学薬学部・教授・福永 理己郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪医科薬科大学薬学部・助教・伊藤 千紘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	MAPK-Mnk 経路と PI3K-mTOR 経路の翻訳制御クロストークにおける各種 MAP キナーゼおよび足場タンパク質 JSAP の役割を解明するために, ヒトがん由来培養細胞において各種プロテインキナーゼ遺伝子ノックアウトを行い, 翻訳調節機構を標的としたがん治療法の分子基盤を解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	①CRISPR/Cas9 法によってヒトの培養細胞で多数の遺伝子を同時にノックアウト(KO)する手法の開発を目的として, pX330 由来 Cas9/sgRNA 発現プラスミドの共トランスフェクションによる NHEJ 依存性変異導入を試みた結果, 少なくとも7種類の遺伝子の同時 KO 細胞を非常に高い効率で作成できることを見出した(論文1)。 ②上記の手法により, HeLa 細胞を用いて, SAPK ファミリー遺伝子 (JNK の3遺伝子と p38MAPK の4遺伝子) について, JNK1/2/3-triple KO(TKO), p38α/β/γ/δ-quadruple KO(QKO), SAPK-septuple KO(SK0) の各細胞, さらに7遺伝子のうち1遺伝子だけを残存させた単独残存型 hexuple KO(HKO) 細胞を作製した。これらの細胞を用いて, Anisomycin によるストレス刺激で誘導される各種転写因子のリン酸化を解析した結果, CREB の Ser133 リン酸化には p38α が主に関与し, p38β/γ/δ の寄与は小さいこと, また, c-Jun のリン酸化には JNK1 が主に働くこと, ATF-2/ATF-7 のリン酸化には JNK1 と JNK2 の双方が同等に寄与することが判明した。 ③善岡教授との共同研究において, HCT116 細胞に由来する ERK1 または ERK2 の単独 KO 細胞, あるいは auxin 誘導性デグロン付加 ERK2 を発現する ERK1/2 double KO 細胞を作成して解析し, 細胞周期の G1-S 移行およびエトポシド誘導性 G2/M 停止において2種類の ERK が重複した機能を担っていることを示した(論文2)。 ④単球系 THP-1 細胞を用いて多重遺伝子同時 KO の作製について検討し, 上記と同様の共トランスフェクションによって JNK-TKO, p38-QKO, SAPK-SKO 細胞などを容易に樹立する条件を確立した。得られた細胞を用いて炎症シグナル応答について解析した結果, SAPK-SKO 細胞においても PMA 刺激によるマクロファージへの分化能は保持されており, この分化過程における SAPK の関与は小さいことが示唆された。一方, LPS 刺激による炎症性サイトカイン (IL-1β 及び TNF-α) の産生については, JNK-TKO 細胞で有意に低下し, SAPK-SKO 細胞では顕著に低下したことから, SAPK の関与が明らかになった。	
【成果等】	【主な論文発表】(1)A simple, rapid, and efficient method for generating multigene- knockout culture cells by the CRISPR/Cas9 system. Genes to Cells, 2023 in press; DOI:10.1111/gtc.13021 (2) Redundant roles of extra-cellular signal-regulated kinase (ERK) 1 and 2 in the G1-S transition and etoposide-induced G2/M checkpoint in HCT116 cells. Drug Discov Ther. 2023 in press, DOI: 10.5582/ddt.2022.01120 【学会発表】(1)SAPK 遺伝子の網羅的多重ノックアウト HeLa 細胞を用いたシグナル経路の解析: 伊藤千紘ら計6名, 第68回日本生化学会近畿支部例会, 2022年5月, 大津市 (2)HeLa 細胞における Mnk1 および Mnk2 に対する各種阻害剤の阻害特性の解析: 和辻佑美子ら計7名, 第72回日本薬学会関西支部大会, 2022年10月, 枚方市 (3) MAPKAP キナーゼファミリー遺伝子の網羅的および単独残存型ノックアウト HeLa 細胞を用いたシグナル経路の解析: 伊藤千紘ら計8名, 第72回日本薬学会関西支部大会, 2022年10月, 枚方市 【その他特筆事項】 なし	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		消化器・難治がんのリボソーム生合成の新規メカニズム解明と診断，治療法への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・北村浩一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・検査部部长・松下一之
	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・臨床検査技師・田中信子
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	PUF60 (poly (U)-binding splicing factor 60)のスプライシング変異体である FIR (FBP interacting repressor) は <i>c-myc</i> 遺伝子転写抑制因子として働く一方、FIR の転写抑制部位である exon2 を欠失した変異体 FIRΔexon2 は様々な癌で過剰に発現し FIR を拮抗阻害している。がん細胞では FIR は SF3B1 とタンパク質相互作用することで、FIR のスプライシング変異 (FIRΔexon2 の産生) が誘導されて c-Myc 発現増大が惹起され、細胞増殖、アポトーシスやリボソーム合成など様々なパスウェイに影響を与える。本研究は FIR や FIRΔexon2 の増減で変化する遺伝子やリボソーム RNA の変化を調べ、細胞の分化や癌化における新規機能や新規ターゲット遺伝子を探索し、治療法の開発につなげる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【FIR や FIRΔexon2 の新規機能・ターゲット遺伝子の探索。】 PUF60 のスプライシング変異体である FIR や FIRΔexon2 は癌細胞で過剰に発現している。前年度の報告では、HeLa 細胞株で得られた結果を比較するために、HCT116 細胞株に FIR または FIRΔexon2 を FLAG や siRNA を用いてトランスフェクションし、発現を増減させ、10 遺伝子の発現について qPCR を用いて検証した。 TFIIH/p62 の PH domain は、幾つかのタンパク質 (TFIIIEa、p53、DP1 等) の共有配列と相互作用して複合体を形成し、機能していると報告されている。今年度は FIR の配列中に存在する TFIIH/p62 の PH domain と類似した認識配列部分について、FIR や FIRΔexon2 と直接相互作用するかどうか検討した。 TFIIH/p62 との相互作用を調べるために、HepG2 細胞株または HCT116 細胞株を使用し、siRNA を用いて FIR または FIRΔexon2 の発現を減少させた。結果は FIR タンパク質の発現減少において、TFIIH/p62 タンパク質の発現が減少したが、FIRΔexon2 では変化がみられなかった。次に TFIIH/p62 の PH domain と FIR や FIRΔexon2 の相互作用を調べるために Isothermal titration calorimetry (ITC) 測定を実施した。結果は FIR と TFIIH/p62 の PH domain は親和性が高く、相互作用していることが示唆されたが一方、FIRΔexon2 では相互作用していないことが示唆された。 これらの結果より TFIIH/p62 は FIRΔexon2 ではなく、FIR と相互作用することが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 論文投稿準備中 (再投稿)。	
	【学会発表】 なし (令和5年度は検査系学会や癌学会等で発表を予定)	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

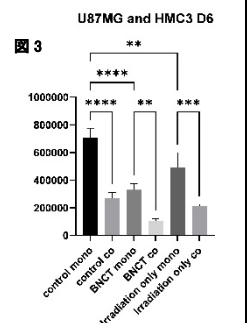
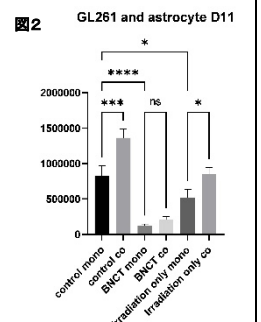
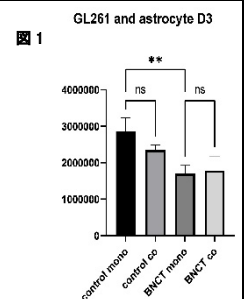
研究課題		肺がんの患者由来腫瘍オルガノイドおよびPDXの作成
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・教授・松本 勲
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・助教・吉田 周平
	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・助教・齋藤 大輔
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・助教・小谷 浩
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	近年、患者由来腫瘍を免疫不全マウスに直接移植する patient derived xenograft (PDX)モデルやマトリゲル内で増殖させ樹立するオルガノイドなどのヒトがん組織を忠実に再現する実験モデルが注目されており、個々の患者のがん組織を in vitro や実験動物レベルで再現するモデルとして、がん研究に必要不可欠となってきた。 金沢大学附属病院呼吸器外科では、がん進展制御研究所腫瘍内科の矢野教授との共同研究として、呼吸器外科が肺がん患者の切除組織を提供し腫瘍内科がPDXを作成するプロジェクトをがん進展制御研究所の共同研究課題として平成29年度から令和元年に実施し、複数の論文発表を行った。本課題は、さらにオルガノイドモデルの確立も行い、オルガノイドやPDXモデルで増大した腫瘍の凍結保存と臨床情報のデータベース化を強化し、将来の共同研究基盤を強固にすることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに術後病理診断に影響を及ぼさずかつ術前治療歴のない比較的大きい肺がん原発巣に対して外科的切除された肺がんの腫瘍組織を用いてオルガノイドおよび2D細胞株の作成を試みた結果、それぞれ8例中4例・12例中8例で成功した。腺癌、扁平上皮癌、多型癌、小細胞癌と組織型によらずオルガノイドと2D細胞株同時作成手順が確立された(手順図)。 今後は、免疫不全マウスへの移植生着率の評価の中で、Patient-derived organoid xenograft (PDOX)やPatient-derived cell line xenograft (PDCX) 作成手順も確立していく。さらに遺伝子異常の評価、臨床情報と照合したデータベース化などを行い、外部施設との共同研究に供与可能な肺がんの基礎実験モデルを構築する。引き続き適宜症例を蓄積しつつ、更なる手法の一般化・若手研究者への伝達を目標とする。 Surgically resected tissue& the Digested specimen	

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. Cancer Med. 2023;12(5):5809-5820. 2. Suzuki C, Nishiyama A, Arai S, Tange S, Tajima A, Tanimoto A, Fukuda K, Takumi Y, Kotani H, Takeuchi S, Yanagimura N, Ohtsubo K, Yamamoto N, Omori K, Yano S. Inhibition of EGFR and MEK surmounts entrectinib resistance in a brain metastasis model of NTRK1-rearranged tumor cells. Cancer Sci. 2022;113(7):2323-2335. 3. Yanagimura N, Takeuchi S, Fukuda K, Arai S, Tanimoto A, Nishiyama A, Ogo N, Takahashi H, Asai A, Watanabe S, Kikuchi T, Yano S. STAT3 inhibition suppresses adaptive survival of ALK-rearranged lung cancer cells through transcriptional modulation of apoptosis. NPJ Precis Oncol. 2022;6(1):11.
	【学会発表】
	【その他特筆事項】 R4年度は、本研究の手法確立と簡便化を同時に挑戦しつつ、症例数の増加に努めた。次年度以降も本研究課題を発展させるために継続が必要である。

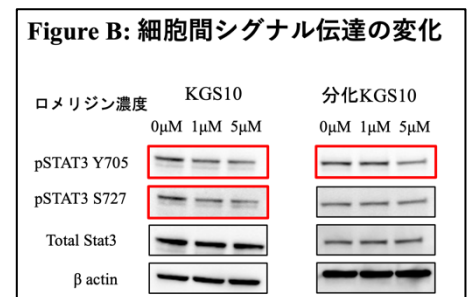
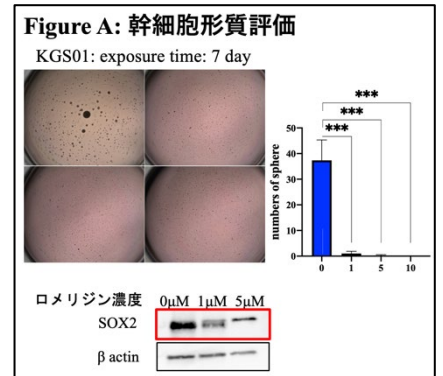
令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		染色体転座陽性肉腫における PI3K 阻害剤のクロマチンリモデリング作用の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・特任研究員・礒山 翔
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・部長・旦 慎吾
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	骨軟部肉腫は骨や筋肉などに発生する悪性腫瘍であり、転移をとまなう場合一般に予後不良であるうえ有効な治療薬が少ないため、新たな治療薬の開発が求められている。当研究室で見出された PI3K 阻害剤 ZSTK474 は、第 I 相臨床試験の結果から、肉腫に対する有効性が示唆されている。われわれはこれまでに種々の肉腫細胞株に対する ZSTK474 の抗腫瘍活性を検討し、本剤が一部の染色体転座陽性肉腫(TRS)組織型に選択的にアポトーシスを誘導することを示してきた。これらの TRS では、それぞれの肉腫の原因遺伝子である融合遺伝子がいずれも SWI/SNF クロマチン制御複合体と相互作用することで細胞のがん化を誘導することが報告されている。本研究では、PI3K 阻害剤が TRS に選択的にアポトーシスを誘導するメカニズムを明らかにするため、TRS における PI3K シグナルと SWI/SNF 複合体の機能の関連を分子レベルで解明することを目的として以下の研究を進めた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまで PI3K 阻害剤が滑膜肉腫やユーイング肉腫など一部の染色体転座陽性肉腫(TRS)に選択的にアポトーシスを誘導し、Bcl2 family の PUMA、BIM の発現誘導がそのアポトーシス誘導に寄与していることを報告した(Isoyama S, et al. Cell Death Dis 2023)。これらの PI3K 阻害剤によりアポトーシスが誘導される TRS 組織型では、それぞれの肉腫の原因遺伝子である融合遺伝子がいずれも SWI/SNF クロマチン制御複合体と相互作用し、SWI/SNF 複合体のエピジェネティックな遺伝子発現制御機構に作用することで細胞のがん化を誘導することが報告されている。このことから、われわれはこれらの TRS では PI3K 阻害剤が融合遺伝子と相互作用している SWI/SNF 複合体の機能に作用することで、アポトーシスを誘導していると仮説を立て以下の検討を行った。 1. 肉腫以外の染色体転座陽性がんに対する PI3K 阻害剤のアポトーシス誘導効果の検討 SWI/SNF クロマチン制御複合体と相互作用する融合遺伝子を有する肉腫以外のがん細胞株として、TMPRSS2-ERG を有する前立腺がんを用いて PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導効果について検討した。その結果、TMPRSS2-ERG 陽性の前立腺がん 2 細胞株中 2 細胞株で PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導が認められた一方、TMPRSS2-ERG 陰性の前立腺がんではアポトーシスは認められなかった。 2. TRS における PI3K 阻害剤の SWI/SNF 複合体の機能に対する作用の検討 PI3K 阻害剤による SWI/SNF 複合体の機能への作用を調べるため、PI3K 阻害剤処理した際の SWI/SNF 複合体の構成因子を共免疫沈降法と質量分析計を組み合わせる方法により網羅的に解析した。すなわち、PI3K 阻害剤を処理した滑膜肉腫細胞から SWI/SNF 複合体を免疫沈降により回収し、そこに含まれるタンパク質を質量分析計により網羅的に同定、定量した。その結果、SWI/SNF 複合体の主要なタンパク質および融合遺伝子を形成する SS18、SSX1 タンパク質が高いシグナル値で検出され、良質なデータが得られていることが確認された。また、PI3K 阻害剤処理によって SWI/SNF 複合体に含まれるタンパク質量が変動したタンパク質が複数認められた。今後、PI3K 阻害剤処理で SWI/SNF 複合体中の量が変動したタンパク質を同定し、それらの PI3K 阻害によるアポトーシス誘導との関連を検討していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. <u>Isoyama S</u>, Tamaki N, Noguchi Y, Okamura M, Yoshimatsu Y, Kondo T, <u>Suzuki T</u>, Yaguchi SI, <u>Dan S</u> Subtype-selective induction of apoptosis in translocation-related sarcoma cells induced by PUMA and BIM upon treatment with pan-PI3K inhibitors. <i>Cell Death Dis</i> 14, 169 (2023). 【学会発表】 1. <u>礒山翔</u>、玉城尚美、<u>旦慎吾</u> 染色体転座陽性肉腫におけるクラス 1A PI3K アイソフォームの機能解析 第 26 回日本がん分子標的治療学会学術集会 オンライン 2022 2. <u>礒山翔</u>、玉城尚美、<u>旦慎吾</u> 染色体転座陽性肉腫における Class1A PI3K アイソフォーム阻害による抗がん作用の解析 第 81 回日本癌学会学術総会 横浜市 2022 3. <u>礒山翔</u>、玉城尚美、野口豊、<u>旦慎吾</u> 染色体転座陽性肉腫の増殖・生存におけるクラス 1A PI3K アイソフォームの機能解析 2022 年度若手支援技術講習会 名古屋市 2022 4. <u>礒山翔</u>、玉城尚美、<u>旦慎吾</u> 染色体転座陽性肉腫におけるクラス 1A PI3K アイソフォームの機能解析 第 6 回日本サルコーム治療研究学会学術集会 神戸市 2023 【その他特筆事項】 なし	

研究課題		腫瘍微小環境がもたらす BNCT 抵抗性悪性グリオーマの機序解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・助教・近藤夏子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	悪性 Glioma は予後不良であり、特に Grade IV の Glioblastoma (GBM)は手術、放射線化学療法を行っても生存期間が約 14 か月で、免疫治療も効果を認めない。我々は、これまでにホウ素中性子捕捉療法(Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)を上記 Grade IV と III に適用し、予後延長を確認した。しかし本法では根治に至らず、再発の課題が残る。Glioma の微小環境は治療抵抗性や腫瘍の再発に関わると報告がある。そこで本研究では微小環境の細胞としてミクログリアやアストロサイトが Glioma の BNCT 抵抗性に関与するか、また関与する場合はどのような因子を介するのかを調べることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【材料・方法】細胞: C57BL/6 マウス由来グリオーマ GL261 細胞およびヒトグリオーマ細胞 U87MG (<i>delta EGFR</i>)細胞を用いた。ミクログリアはヒト由来不死化細胞株 HMC3 細胞、アストロサイトは C57BL/6 仔マウスより平田先生が樹立したアストロサイトを用いた。熱中性子線照射: 照射 1 時間前に Glioma 細胞にホウ素化合物 ^{10}B enriched-boronophenylalanine (BPA)を 20ppm 培地中に投与し、京大複合研の原子炉重水設備 (1MW 運転) で熱中性子を 20 分照射した。サンプリング: 照射後、Glioma 細胞を 6 ウェルプレートに播種し ($1\sim 7.5\times 10^4/\text{well}$)、単培養群 (mono-culture: mono, $n=3$) とインサートに播種したミクログリア ($5\times 10^4/\text{well}$) またはアストロサイト ($10^4\sim 1.5\times 10^5/\text{well}$) との共培養群 (co-culture: co, $n=3$) を作製した。経時的に単培養群と共培養群のグリオーマ細胞数を数え、培養液と細胞を -80°C 保存した。【解析】統計ソフト GraphPad Prism ver. 9.5 を用いて解析した。 【結果】G261 細胞とアストロサイトを共培養した BNCT3 日後は、BNCT mono 群は非照射 control mono 群に比べて細胞数が少なかった。非照射群、BNCT 群ともに co、mono 群間で細胞数に有意差はなかった (図 1)。BNCT11 日後、control co 群は control mono 群と比べて細胞数が多く、BNCT-mono、co 群間は細胞数に有意差が無く、BPA を添加せずに照射した Irradiation only mono または co 群で co の方が多かった (図 2)。一方、U87MG と HMC3 の共培養群は照射 6 日後、非照射群、BNCT 群、照射単独群すべてにおいて co 群は mono 群よりも細胞数が少なかった (図 3)。この結果は昨年 (BNCT5、11 日後)の結果報告と同様であった。 【考察】液性因子を介した 2D 共培養実験ではミクログリアは照射に関わらず、グリオーマの細胞数を抑えるように働く。アストロサイトはミクログリアと異なり長期間共培養すると control、照射単独群の細胞数を増やす。一方 BNCT は殺細胞効果が高く、細胞数が著しく減少し、アストロサイトを共培養してもグリオーマ細胞数は増えないと考える。BPA が取り込まれず、BNCT 後グリオーマ細胞が再発する際には、照射単独群のアストロサイトとグリオーマ細胞の相互作用が関与するかもしれない。今後アストロサイトのトランスクリプトーム、培養液中の液性因子などを調べる予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	未発表
	【学会発表】	未発表
	【その他特筆事項】	なし



研究課題		片頭痛薬ロメリジンによる膠芽腫幹細胞抑制効果の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・医薬保健研究域医学系 教授 中田 光俊
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学・脳神経外科 特任助教 玉井 翔
	所属・職名・氏名	金沢大学・集中治療部 特任助教 一ノ瀬 惇也
受入担当教員	職名・氏名	教授 平尾 敦
【研究目的】	膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍である。難治性である原因としてグリオーマ幹細胞の存在が示唆されている。グリオーマ幹細胞を治療標的とした基礎研究が進んでいるが、現在臨床応用されている薬剤は存在しない。当科ではドラッグ・リポジショニングの研究手法を用い、グリオーマ幹細胞に対する新規治療薬の抽出に努めてきた。今回、グリオーマ幹細胞に対し強い抗腫瘍効果を有する薬剤のスクリーニングから、ロメリジンを抽出した。本研究はロメリジンによる膠芽腫幹細胞抑制効果及びその作用機序について明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	患者由来手術検体より独自に確立したグリオーマ幹細胞株3株 (KGS01, KGS10, KGS15)及びその分化細胞株、汎用されている膠芽腫細胞4株を使用し、以下を明らかにした。 1. グリオーマ幹細胞株に対し、SOX2の発現を抑制することで幹細胞性を低下させる 上記グリオーマ幹細胞株3株に対し、control群(溶媒のみ)及びロメリジン使用群(1μM, 5μM, 10μM)の4群間において sphere-forming assayを行い、ロメリジン曝露群では sphere が形成されにくいことを確認した。また、全グリオーマ幹細胞株において幹細胞マーカーである SOX2 の濃度依存性の発現低下を認めた (Figure A)。 2. ロメリジンは膠芽腫細胞の STAT3 の活性を阻害する 上記の膠芽腫細胞株10株に対し、control群(溶媒のみ)及びロメリジン使用群(1μM, 5μM)の3群間における細胞間シグナル伝達の変化について Western blotting で評価した。結果、全細胞株においてリン酸化 STAT3 Y705 の濃度依存性の発現低下を認めた。幹細胞においてはさらにリン酸化 STAT3 S727 についても濃度依存性に発現が低下した(Figure B)。 今後は <i>in vivo</i> 評価を行い、臨床応用への基礎基盤を強固にした上で、最終的にヒトへの応用(第2相臨床試験)を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 Tamai S, Ichinose T, Jiapaer S, Hirai N, Sabit H, Tanaka S, Kinoshita M, Kobayashi M, Hirao A, Nakada M. Therapeutic potential of pentamidine for glioma initiating cells and glioma cells through multimodal anti-tumor effects. Cancer Sci, in press 【学会発表】 一ノ瀬惇也, 玉井翔, 小林雅明, 白浜翔平, 中原光尊, 淑瑠へムラサビット, 王一, 田中慎吾, 木下雅史, 小林昌彦, 平尾敦, 中田光俊 片頭痛薬ロメリジンによるグリオーマ幹細胞を標的とした新規治療の臨床応用へ向けた基礎研究(シンポジウム) 第22回日本分子脳神経外科学会、令和4年7月22-23日、石川	



研究課題		がん関連線維芽細胞およびオルガノイドを用いた化学療法抵抗性を示す大腸癌に対する新規治療標的因子の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・准教授・梶原由規
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・講師・望月早月
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・永田健
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・安部紘生
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・教授・上野秀樹
受入担当教員	職名・氏名	大島 正伸
【研究目的】	大腸癌の病理組織標本における線維性癌間質反応(DR)または腫瘍浸潤先進部の脱分化所見である簇出や低分化胞巣(PDC)はそれぞれ優れたリンパ節転移の予測能や予後分別能を有することが明らかとなっている。一方、これらの病理所見の形成に関わっていると考えられる癌関連線維芽細胞(CAF)と癌細胞の相互作用が治療抵抗性に影響を与えるメカニズムについては明らかになっていない。本研究ではこの一端を解明すべく、大腸癌手術検体から大腸癌オルガノイドと CAF を採取・培養し、CAF と共培養したオルガノイドまたは大腸癌細胞株の治療抵抗性を評価するとともに、癌悪性度や治療抵抗性について臨床応用可能な治療標的因子の同定を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	PDC に関して早期大腸癌のリンパ節転移予測の有用性の検証と進行大腸癌における効率的な PDC の評価法を再検討した。進行癌では最深部を含む代表断面のみでの判定で予後分別に十分な精度を保てることが示され、PDC 判定の省力化が可能であった。また、PDC 判定の均霑化を目標とした病理診断アトラスを作成した。 これまでの検討で PDC が高度な大腸癌は化学療法に対する治療抵抗性を示し、ADAM12 の発現が亢進していることが示されているが (図 1)、大腸癌オルガノイドにリコンビナント ADAM12 を投与することでオルガノイドの発育が亢進することが示唆された。現在、が高度な大腸癌から採取した大腸癌オルガノイドを用いたマウス皮下移植モデルに抗 ADAM12 抗体を投与することで腫瘍の増殖抑制効果が得られるか検討中である。 CAF を用いた検討では、採取元組織の DR 分類により CAF が大腸癌のがん幹細胞性に及ぼす影響が異なることを見出し、特に immature な DR に存在する CAF が Periostin の分泌を介してがん幹細胞性を亢進させていることを明らかにした。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Tadakazu Ao, Satsuki Mochizuki, Yoshiki Kajiwara, Keisuke Yonemura, Takehiro Shiraishi, Ken Nagata, Eiji Shinto, Koichi Okamoto, Ines P Nearchou, Hideyuki Shimazaki, Yoji Kishi, Yasunori Okada, Hideki Ueno: Cancer-associated fibroblasts at the unfavorable desmoplastic stroma promote colorectal cancer aggressiveness: potential role of ADAM9. <i>Int J Cancer</i> 15;150(10):1706-1721,2022 2. Yusuke Ishibashi, Satsuki Mochizuki, Keisuke Horiuchi, Hironori Tsujimoto, Keita Kouzu, Yoji Kishi¹, Yasunori Okada and Hideki Ueno : Periostin derived from cancer-associated fibroblasts promotes esophageal squamous cell carcinoma progression via ADAM17 activation. <i>Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis</i> 2023. doi: 10.1016/j.bbadis.2023.166669 【学会発表】 1. 梶原由規、他. T1 大腸癌における効果的なリンパ節転移リスク分別を目指した新たな評価因子の組み合わせ. 第 77 回日本大腸肛門病学会学術集会パネルディスカッション「T1 大腸癌の治療戦略」2022 年 10 月 14 日 2. 梶原由規、他. 病理判定の省力化を企図した大腸癌における「低分化胞巣」の評価法の検討. JDDW2023. 2022 年 10 月 28 日 3. 安部紘生、梶原由規、他. 大腸癌における癌関連線維芽細胞の TGF β 1 発現—Desmoplastic Reaction 分類別の検討. 第 122 回日本外科学会. 2022 年 4 月 16 日 4. 安部紘生、梶原由規、他. CAFs in the immature desmoplastic reaction stroma promote cancer stemness through Periostin expression via TGF-β pathway. 第 81 回日本癌学会. 2022 年 9 月 30 日 5. 安部紘生、梶原由規、他. 大腸癌の癌関連線維芽細胞における Periostin の発現とがん幹細胞性との関連について—Desmoplastic Reaction 分類別の検討. JDDW2023. 2022 年 10 月 28 日 【その他特筆事項】なし	

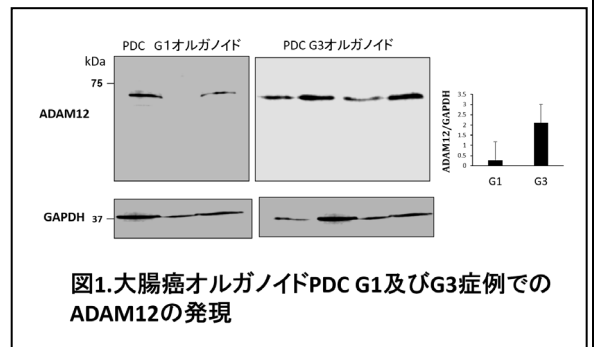


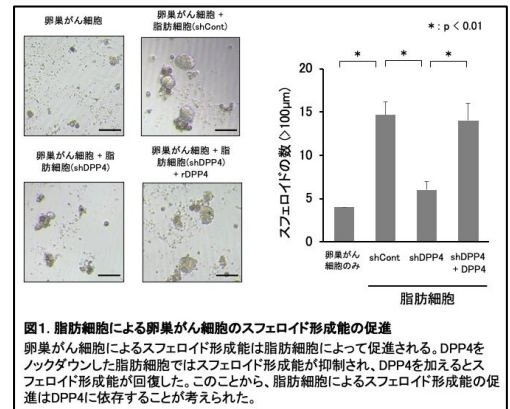
図1.大腸癌オルガノイドPDC G1及びG3症例でのADAM12の発現

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ヒト乳がんモデルを用いた代謝標的治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・講師・町田雪乃
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・准教授・道下正貴
	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・学部生・小名木れみ花
	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・学部生・石崎優奈
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	雌イヌで最も発生が多い乳腺腫瘍は、悪性腫瘍が約50%で、組織学的に①乳腺上皮様腫瘍細胞のみが増殖する腫瘍、②乳腺上皮様腫瘍細胞と筋上皮様腫瘍細胞が両方増殖する腫瘍、③②に加えて軟骨と骨の増殖がみられる腫瘍に分類される。乳腺上皮細胞のみが増殖する腫瘍と比較し、筋上皮細胞が増殖している腫瘍では予後良好の傾向がみられる。 ミトコンドリア内葉酸代謝酵素の一つである MTHFD2 は、様々ながんで発現しており、がんの代謝に重要な役割を果たしている。本研究では、MTHFD2 がイヌの乳腺腫瘍の治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、イヌ乳がんの MTHFD2 発現解析および分子標的薬 MTHFD2 阻害剤の抗腫瘍効果を <i>in vitro</i> にて検証した。また shRNA を用いた MTHFD2 のノックダウンによる機能解析を実施した。 実験にはイヌ乳がん株化細胞 CIPp、CHMp、CNMp、CTBp を用いた。MTHFD2 のウェスタンブロット解析の結果、全ての細胞株において MTHFD2 に相当する位置(38kDa)にバンドがみられた。中でも CIPp が最も高い発現を示した。接着細胞の免疫染色では、全ての細胞株で MTHFD2 が核および細胞質で発現していた。MTHFD2 阻害薬の <i>in vitro</i> 投与では、各細胞株に対して濃度依存性に増殖抑制効果を示した。次に、MTHFD2 の発現が最も高い CIPp を使用し、MTHFD2 のノックダウン実験を実施した。MTHFD2 ノックダウン細胞では上皮マーカーの E-cadherin の発現上昇がみられ、間葉上皮転換が起きたと推察された。スクラッチアッセイでは、MTHFD2 ノックダウン細胞は遊走性が抑制された。 このことから、イヌ乳がん細胞では MTHFD2 が発現し、上皮間葉転換および遊走能獲得に寄与すると考えられる。また、MTHFD2 阻害薬はイヌ乳がんに抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	なし	
	【学会発表】	
	小名木れみ花、町田雪乃、落合和彦、道下正貴：イヌの乳腺癌細胞の葉酸代謝経路阻害による抗腫瘍効果、第165回日本獣医学会学術集会、オンライン開催、2022年9月6-8日	
	【その他特筆事項】	
	なし	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

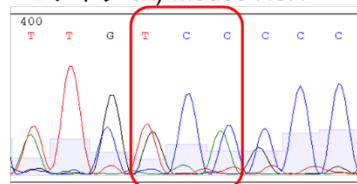
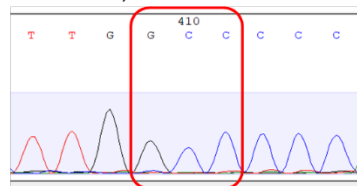
研究課題		卵巣がんの幹細胞性を制御する脂肪細胞分泌因子 DPP4 の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部 講師 前田 真男
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部 講師 林 孝典
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部 助教 ベフヌーシュハレディアン
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部 教授 下野 洋平
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部 教授 浅井 直也
受入担当教員	職名・氏名	教授 後藤 典子
【研究目的】	がんの間質組織はがんの発生や維持に必須の役割を果たすが、がんの間質の一つである脂肪細胞はさまざまな分泌因子(アディポカイン)の分泌を介してがんの進展を制御すると考えられている。卵巣がんは脂肪細胞に富む大網腹膜に転移することが多く、卵巣がんの進展に脂肪細胞の働きが重要と予想される。私たちは大網由来の脂肪細胞から分泌されるアディポカイン DPP4 に着目し、脂肪細胞が DPP4 を介して卵巣がんのがん幹細胞性を制御する分子機構の解明を目指している。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	卵巣がん患者の手術検体より樹立したがん患者由来異種移植腫瘍(PDX)細胞と、大網の脂肪細胞由来幹細胞(ADSC)を用いて解析し、脂肪細胞から DPP4 が分泌され、卵巣がん細胞よりも脂肪細胞で DPP4 の発現が高いことがわかった。DPP4 阻害剤は卵巣がん PDX 細胞によるスフェロイド形成能を抑制した。本研究では脂肪細胞の分泌因子 DPP4 に着目して、脂肪細胞が卵巣がんのがん幹細胞性を制御する分子機構の解明を目指す。 1. 脂肪細胞は DPP4 を介して卵巣がん PDX 細胞のスフェロイド形成能を制御する。 卵巣がん PDX 細胞と脂肪細胞を混合培養すると、スフェロイド形成能が促進する。DPP4 をノックダウンした脂肪細胞を樹立し、HEK293 細胞に His タグをつけた DPP4 を発現させ、ニッケルビーズにより DPP4 の精製を行なった。DPP4 をノックダウンした脂肪細胞では、卵巣がん PDX 細胞のスフェロイド形成能の増強が抑制された(図 1.)。また、DPP4 をノックダウンした脂肪細胞に精製した DPP4 を加えると、抑制されたスフェロイド形成能が回復した(図 1.)。このことから、脂肪細胞は、DPP4 を介して卵巣がん PDX 細胞のスフェロイド形成能を制御すると考えられた。 2. 脂肪細胞から分泌された DPP4 は卵巣がんのがん幹細胞性の増強に関与する。 DPP4 が卵巣がん細胞に直接作用してスフェロイド形成能が促進されることを確認するため、卵巣がん PDX 細胞に精製した DPP4 を加えて 3D culture を行った。その結果、精製した DPP4 により卵巣がん PDX 細胞のスフェロイド形成能が促進されることを確認した(図 2A.)。また、DPP4 を加えた卵巣がん PDX 細胞について、qPCR により mRNA の転写量の変化を調べたところ、DPP4 を加えることにより CD44、BMI1、ZEB1、SNAI1、NANOG の mRNA の転写量が有意に増加した。以上より、DPP4 が卵巣がん細胞のがん幹細胞性の促進に関与していることが考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	1. Maeda M, Nishio E, Hayashi T, Khaledian B, Ushida K, Okada S, Suzuki M, Asai N, Fujii T, Saya H, Shimono Y. Adipokine DPP4 enhances cancer stem cell-like properties in ovarian cancer. 第 81 回 日本癌学会総会、2022 年
	【その他特筆事項】	なし



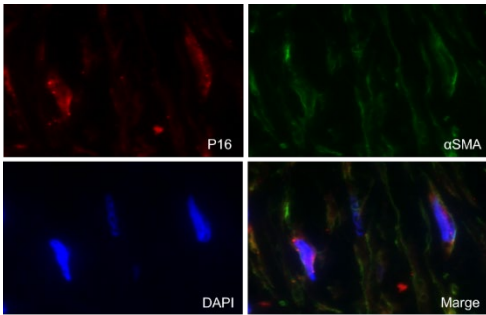
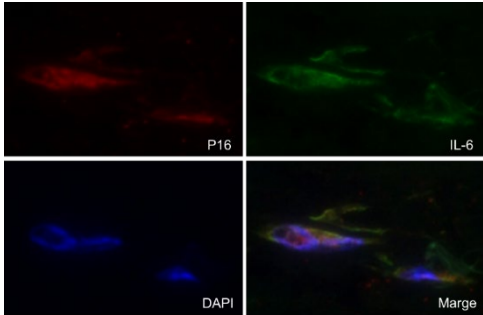
令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		多量体化人工抗体による、MET を標的とした人工成長因子の創成
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学系研究科・助教・相川春夫
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学（現東京工業大学）・特任助教（現特任准教授）・寺坂尚紘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	MET 等の成長因子受容体は細胞の分化や増殖に関与しており、がん治療や再生医療のターゲットとして注目されている。天然の成長因子は発現コストや安定性の問題から薬剤として用いることは困難であり、代替分子の創成が望まれる。 申請者の所属する研究グループでは、MET に高い親和性 (K_d 数 nM) を示す環状ペプチド (aMD4 等) および環状ペプチドのファーマコフォア配列を足場タンパク質のループに導入する Lasso-grafting 法の開発に成功している。そこで本申請研究では、新たにユビキチンを足場タンパク質として aMD4 の配列を導入した人工抗体 (U-body) を開発し、さらに U-body を多量化することで MET の二量体化を促進する人工成長因子の創成を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	＊特許・論文発表の関係上、配列や方法論の詳細は公開しない。 初めにユビキチンを足場として aMD4 のファーマコフォア配列を挿入するループ位置の検討を行なった。Lasso-grafting 可能な 6 箇所のループの内、1 箇所のループにおいて grafting 体も wild type ユビキチンと同程度の量のタンパク質発現が可能であった。しかし、単純なグリシンをスペーサーとして U-body を作成すると MET に対する結合が元の環状ペプチドに比べて約 50 倍以上弱くなることが分かった。そこで挿入配列の前後のスペーサー配列を検討した。スペーサーは in vitro セレクションをベースとして最適化した。得られた候補配列を有する U-body をそれぞれ発現・精製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置により MET への結合を評価したところ、全て nM 領域の K_d を有しており、最も良いもの (Ub-aMD4) は元の環状ペプチドと同程度の K_d を示した。スペーサー配列を最適化することで元の環状ペプチドの結合活性を減弱させることなく、lasso-grafting 可能であることが分かった。 次に、細胞表面の MET に対する結合を確かめるために U-body を蛍光ラベル化した分子を作成した。Flow cytometry による分析を行なったところ、wild type の U-body (Ub) を用いた場合はヒストグラムに変化が見られなかったのに対し、Ub-aMD4 を用いた場合にはヒストグラムの大きな変化が見られた。コントロール実験として MET をノックアウトした細胞を用いて同様の実験を行ったところ、Ub および Ub-aMD4 どちらの場合もヒストグラムの変化は見られなかった。このことから Ub-aMD4 は MET 発現細胞に結合し、その結合が MET を認識していることによるものだと示された。 ユビキチンに lasso-grafting することで環状ペプチドに比べて血清安定性が向上することが期待された。そこで、ヒト血清中で aMD4 および Ub-aMD4 をインキュベートし、未分解の (MET 結合活性のある) 分子を SPR を用いて定量した。半減期を比べると lasso-grafting により約 50 倍半減期が伸び、血清安定性の向上も可能であることが分かった。 さらに、Ub-aMD4 をタンデムに連結して二量体とすることで MET の二量体化を促進する人工成長因子の開発を行なった。単量体を連結するリンカーの種類および長さを種々検討し、最適化した。MET のリン酸化を指標に MET 二量体化活性を調べたところ、1 nM で活性が見られるものもあった。今回開発した Ub-aMD 二量体は天然のリガンドである HGF に比べると高濃度が必要であるものの、MET の最大リン酸化値は HGF を用いた場合と同程度であり、人工成長因子として非常に有用な方法論であることを示すことができた。	
【成果等】	【主な論文発表】 該当なし	
	【学会発表】 該当なし	
	【その他特筆事項】 該当なし	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		染色体分配におけるポリコーム崩壊の分子機構の解明																																																																																																																																																																		
研究代表者	所属・職名・氏名	早稲田大学・教授・寺田泰比古																																																																																																																																																																		
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	早稲田大学・講師・隈本宗一郎																																																																																																																																																																		
	所属・職名・氏名	早稲田大学・修士2年・谷川佳樹																																																																																																																																																																		
	所属・職名・氏名																																																																																																																																																																			
	所属・職名・氏名																																																																																																																																																																			
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡																																																																																																																																																																		
【研究目的】	ポリコーム群複合体の1つである PRC1 は、凝集することで PcG body を形成する。ヒト悪性黒色腫の9割以上では PcG body の肥大化した CAP body を形成することが知られている。CAP body は、細胞周期依存的な挙動を示し、間期では凝集体形成、分裂期において拡散する(ポリコーム崩壊)。しかし、CAP body の崩壊不全が起こると、染色体分配の際に、第1染色体の姉妹染色分体間で CAP body 複合体を介した架橋構造を形成することが当研究室で明らかになった。しかしながら、ポリコーム崩壊の詳細な分子メカニズムや生理的意義は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、ポリコームの崩壊異常が与える影響やその分子メカニズムおよび染色体異数化やがん化との関係性の解明を目的とした。																																																																																																																																																																			
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々の先行研究より、CDK1 による PHC2 S216 のリン酸化によって起きるポリコーム崩壊が正常な染色体分配を制御し、崩壊不全の場合には架橋構造によって異数化をもたらす可能性が培養細胞株を用いた実験で示唆された。そこで、本研究ではリン酸化されない PHC2 S216A 変異が実際にマウス個体で腫瘍形成に寄与するか点変異マウスを作製することを試みた。また、染色体不安定化の分子メカニズムを詳細に解析するために、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集によって、ヒト結腸がん細胞の HCT116 細胞およびヒト網膜色素上皮細胞の RPE1 細胞へ、PHC2 S216A 変異導入を試みた。 結果：点変異マウスの作製に関しては、26 個体中 5 個体で S216A の変異が見られた。変異の有無の確認は PCR によるジェノタイピングとシークエンスにより行った。図 1 にシークエンス結果を示す。次に、HCT116 細胞および RPE1 細胞への変異導入に関しては、pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 および pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) を用いて試みた。しかし、タンパク質の導入は確認できたが、その後の点変異の導入までは至らなかった。 表 1 マウス個体の作製結果 <table><tr><th>Mouse ID</th><th>Date of birth</th><th>Sex</th><th>CRISPR condition</th><th>Note</th><th>Genotype</th></tr><tr><td>1</td><td>2022/7/17</td><td>F</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>2</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>3</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td>High</td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>4</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>5</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>6</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td>8/20死亡</td><td>Homo</td></tr><tr><td>7</td><td>2022/7/17</td><td>F</td><td></td><td>死亡</td><td>Homo</td></tr><tr><td>8</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td>High</td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>9</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>10</td><td>2022/7/17</td><td>F</td><td></td><td></td><td>Insertion</td></tr><tr><td>11</td><td>2022/7/17</td><td>F</td><td></td><td></td><td>Homo</td></tr><tr><td>12</td><td>2022/7/17</td><td>F</td><td>Low</td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>13</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>14</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>15</td><td>2022/7/17</td><td>M</td><td></td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>16</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>17</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td>High</td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>18</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td></td><td></td><td>Homo</td></tr><tr><td>19</td><td>2022/7/18</td><td>F</td><td></td><td></td><td>モザイク</td></tr><tr><td>20</td><td>2022/7/18</td><td>F</td><td></td><td></td><td>WT</td></tr><tr><td>21</td><td>2022/7/18</td><td>F</td><td>Low</td><td></td><td>Deletion</td></tr><tr><td>22</td><td>2022/7/18</td><td>F</td><td></td><td>死亡</td><td>Deletion</td></tr><tr><td>23</td><td>2022/7/18</td><td>F</td><td></td><td>小さい</td><td>WT</td></tr><tr><td>24</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td>Low</td><td>小さい</td><td>モザイク</td></tr><tr><td>25</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td></td><td>小さい</td><td>Homo</td></tr><tr><td>26</td><td>2022/7/18</td><td>M</td><td>Low</td><td></td><td>WT</td></tr></table> モザイク ex) Mouse No.1  Homo ex) Mouse No.6  図 1 シーケンス結果 今後、DNA メチル化阻害剤である 5-Aza-2'-deoxycytidine をマウスに投与することで CAP body 形成を促進させることや、悪性黒色腫の発生要因として挙げられる紫外線 (UV) 照射をおこなう。これらの外部要因により、変異個体と異数化やがん化の進行について検証していく。		Mouse ID	Date of birth	Sex	CRISPR condition	Note	Genotype	1	2022/7/17	F			モザイク	2	2022/7/17	M			モザイク	3	2022/7/17	M	High		WT	4	2022/7/17	M			WT	5	2022/7/17	M			WT	6	2022/7/17	M		8/20死亡	Homo	7	2022/7/17	F		死亡	Homo	8	2022/7/17	M	High		モザイク	9	2022/7/17	M			WT	10	2022/7/17	F			Insertion	11	2022/7/17	F			Homo	12	2022/7/17	F	Low		WT	13	2022/7/17	M			モザイク	14	2022/7/17	M			モザイク	15	2022/7/17	M			WT	16	2022/7/18	M			モザイク	17	2022/7/18	M	High		WT	18	2022/7/18	M			Homo	19	2022/7/18	F			モザイク	20	2022/7/18	F			WT	21	2022/7/18	F	Low		Deletion	22	2022/7/18	F		死亡	Deletion	23	2022/7/18	F		小さい	WT	24	2022/7/18	M	Low	小さい	モザイク	25	2022/7/18	M		小さい	Homo	26	2022/7/18	M	Low		WT
Mouse ID	Date of birth	Sex	CRISPR condition	Note	Genotype																																																																																																																																																															
1	2022/7/17	F			モザイク																																																																																																																																																															
2	2022/7/17	M			モザイク																																																																																																																																																															
3	2022/7/17	M	High		WT																																																																																																																																																															
4	2022/7/17	M			WT																																																																																																																																																															
5	2022/7/17	M			WT																																																																																																																																																															
6	2022/7/17	M		8/20死亡	Homo																																																																																																																																																															
7	2022/7/17	F		死亡	Homo																																																																																																																																																															
8	2022/7/17	M	High		モザイク																																																																																																																																																															
9	2022/7/17	M			WT																																																																																																																																																															
10	2022/7/17	F			Insertion																																																																																																																																																															
11	2022/7/17	F			Homo																																																																																																																																																															
12	2022/7/17	F	Low		WT																																																																																																																																																															
13	2022/7/17	M			モザイク																																																																																																																																																															
14	2022/7/17	M			モザイク																																																																																																																																																															
15	2022/7/17	M			WT																																																																																																																																																															
16	2022/7/18	M			モザイク																																																																																																																																																															
17	2022/7/18	M	High		WT																																																																																																																																																															
18	2022/7/18	M			Homo																																																																																																																																																															
19	2022/7/18	F			モザイク																																																																																																																																																															
20	2022/7/18	F			WT																																																																																																																																																															
21	2022/7/18	F	Low		Deletion																																																																																																																																																															
22	2022/7/18	F		死亡	Deletion																																																																																																																																																															
23	2022/7/18	F		小さい	WT																																																																																																																																																															
24	2022/7/18	M	Low	小さい	モザイク																																																																																																																																																															
25	2022/7/18	M		小さい	Homo																																																																																																																																																															
26	2022/7/18	M	Low		WT																																																																																																																																																															
【成果等】	【主な論文発表】 特になし 【学会発表】 ○谷川佳樹、浅井裕一郎、隈本宗一郎、寺田泰比古. CDK1 による分裂期特異的なポリコーム複合体崩壊は正確な染色体分配を制御する。第 45 回日本分子生物学会年会 【その他特筆事項】 特になし																																																																																																																																																																			

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

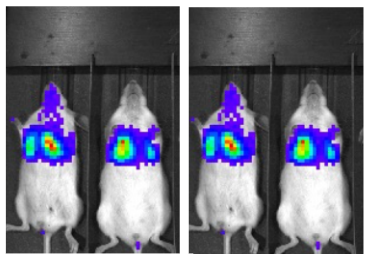
研究課題		膵癌微小環境内の腫瘍関連線維芽細胞の改変に着目した新規治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・准教授・宮下知治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・准教授・島崎猛夫
	所属・職名・氏名	金沢医科大学一般・消化器外科・教授・高村博之
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌は極めて予後不良の固形癌のひとつであるが、これは膵癌組織が豊富な線維性間質を有して高度の薬剤抵抗性、免疫寛容状態に陥っていることが最大の要因である。この線維性間質で構築された膵癌の“がん微小環境”において、腫瘍進展・発育に寄与するがん細胞周囲の線維芽細胞の存在が明らかになり、腫瘍関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast: CAF) と定義されている。近年、この間質の「細胞老化」が癌の増殖や進展を誘導することが示唆されている。細胞老化は本来異常な細胞の増殖(癌化)を抑制する癌抑制機構であるが、老化細胞が長期間生存し続けると、IL-6 などの炎症性サイトカインや細胞外マトリックス分解酵素 (MMP) など、炎症や発癌を促進する因子を分泌する SASP(senescent associated secretory phenotype)とよばれる現象が惹起される。さらに最近では、SASP 因子を誘導する mTOR の誘導に GSK3 β が関与していることが示唆されている。本研究では、膵癌間質内での腫瘍関連線維芽細胞における細胞老化と SASP という視点から“がん微小環境”を解明するとともに、細胞老化に着目した新規治療法の開発を行うことを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	共同研究初年度は、ヒト膵癌切除標本を用いて蛍光免疫染色を施行し、膵癌微小環境において老化した腫瘍関連線維芽細胞が存在するかどうかを検討した。腫瘍関連線維芽細胞のマーカーとしてはαSMA を用いた。まず膵癌間質内の腫瘍関連線維芽細胞と老化蛋白との関連を検討すると、老化蛋白(p16: red)を発現する腫瘍関連線維芽細胞(αSMA: green)が散見された(図1)。次に腫瘍関連線維芽細胞における老化蛋白と SASP 因子の発現との関連を検討すると、腫瘍関連線維芽細胞において老化蛋白(p16: red)および SASP 因子(IL-6: green)の発現が散見された(図2)。これらのことから、膵癌間質内に SASP に至った老化した腫瘍関連線維芽細胞が存在すると考えられた。これらの現象を膵癌の腺管から離れた間質領域において、1 視野あたりの p16 および IL-6 陽性間質細胞数を計測すると、膵癌間質における p16 と IL-6 の発現には正の相関関係が認められた。以上のことから、膵癌の間質内には SASP 因子を発現する老化腫瘍関連線維芽細胞が存在すると考えられた。  図1  図2	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		E3 ユビキチンリガーゼ Cop1 により制御されるエピジェネティック変化を介した AML 発症機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科大学・講師（特任）・角南 義孝
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京医科大学・特任教授・中村 卓郎
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木 健之
【研究目的】	ユビキチン修飾系は多くの生命現象を制御し、その異常はがんの原因となる。一方、翻訳後修飾異常に着目した急性骨髄性白血病(Acute myeloid leukemia: AML)の病態解明は、十分になされてない。私たちの研究室は、これまでに Pseudokinase 蛋白質 Trib1 を AML 原因遺伝子として同定しており、Trib1 による AML 発症機序として E3 ユビキチンリガーゼ Cop1 を介して C/EBPα を分解させることを報告している。本研究では、Cop1 コンディショナルノックアウトマウス骨髄細胞由来の AML 細胞を解析し、Cop1 による蛋白質分解制御が、AML の発症・悪性化において果たす役割を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	Cop1 flox/Rosa26-Cre-ERT2 マウスの骨髄細胞に Trib1 を遺伝子導入して AML 細胞株を樹立し、4-OHT 投与により、<i>in vitro</i> で Cop1 をノックアウト(KO)できるシステムを確立した。Trib1 を導入した AML 細胞 (FT1CL)は、Cop1 KO により細胞増殖が抑制され、顆粒球分化が亢進した。さらにこの時、Cop1 基質である C/EBPα p42 アイソフォームの発現が一過性に増加した。また Cop1 KO により Trib1 の発現がタンパク質レベルで、極めて強く亢進することを発見し、Trib1 自身が Cop1 により分解されていることを見出した。Trib1 による AML 発症機序として、Cop1 を介した C/EBPα p42 の分解以外に、Trib1 と MEK1 の直接結合を介した ERK シグナルの活性化を私たちの研究室から報告している (Yokoyama T, et al. Blood. 116(10): 2768-75, 2010)。Cop1 KO により Trib1 が増加した状態で ERK のリン酸化は亢進したが、細胞増殖抑制と顆粒球分化を誘導したことから、Trib1 による AML 発症・悪性化には C/EBPα p42 分解がもっとも強く寄与し、MEK/ERK 経路活性化は、Trib1 により C/EBPα p42 が分解されている状況でのみ作用すると考えられた。さらに Cop1 flox/Rosa26-Cre-ERT2 胎児マウスより MEF 細胞を採取し、SV40 により不死化した後に、GFP fusion Trib1 遺伝子を導入し、4-OHT による Cop1 KO 後の Trib1 発現を GFP によりトレースした。AML 細胞と異なり、GFP-Trib1 発現 MEF 細胞では、Cop1 KO 後の Trib1 発現上昇は観察されず、Cop1 による Trib1 分解は造血細胞特異的な現象と考えられた。次に、shRNA を用いて FT1CL 細胞の C/EBPα をノックダウンしたところ、Cop1 KO 後の C/EBPα p42 の回復が緩徐となり、細胞増殖抑制や顆粒球分化誘導も阻害された。さらに C/EBPα をノックダウンした FT1CL 細胞に CEBP4 p42 を導入することで Cop1 KO による細胞増殖抑制効果を模倣できたことから、C/EBPα p42 は Trib1 発現 AML において、腫瘍抑制因子として機能していると考えられた。本研究は、Cop1/Trib1-C/EBPα p42 経路が AML 悪性化に極めて重要であることを示しており、この経路が AML の治療標的となる可能性を示唆している。今後、Cop1/Trib1 の蛋白質相互作用を標的とした創薬事業を計画しており、現在、準備を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 角南義孝, 芳野聖子, 中村卓郎. AMLの発症と悪性化におけるE3ユビキチンリガーゼCop1の白血病発症と造血における役割. 第27回 造血器腫瘍研究会, 広島, 日本, 2023年1月 Sunami Y, Nakamura T. The role of E3 ubiquitin ligase COP1 in AML development and progression. 第 84 回日本血液学会学術集会, 福岡, 日本, 2022 年 10 月 Sunami Y, Yoshino S, Nakamura T. The role of E3 ubiquitin ligase Cop1 in AML development and progression. 第 81 回日本癌学会学術総会, 横浜, 日本, 2022 年 9 月	
	【その他特筆事項】 第 84 回日本血液学会学術集会 優秀ポスター 2022 年 10 月	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		高特異性 MMP-9 阻害タンパク質によるがん悪性進展阻害効果の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	横浜市立大学 生命ナノシステム科学研究科・教授・東 昌市
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 ナノ生命科学研究所・特任助教・佐藤 拓輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本 邦夫
【研究目的】	私達はβ-アミロイド前駆体蛋白質(APP)の細胞外領域に、がん治療における標的 MMPs の一つとされる MMP-2 を選択的に阻害するアミノ酸配列を見出し、APP-IP と命名した。また、APP-IP を構成するアミノ酸を改変することで、酵素選択性を変換し、MMP-9 に対する選択性を向上させたペプチドインヒビターを創出した。さらにこのペプチドを MMP-9 の非触媒部位と親和性を持つタンパク質と融合することで、極めて特異性が高く、かつ強力な MMP-9 阻害タンパク質の分子設計に成功した。本研究ではこの高特異性 MMP-9 阻害タンパク質のがん悪性進展阻害効果を動物実験で検証することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	動物実験に必要な量の高特異性 MMP-9 阻害タンパク質を得るため、このリコンビナントタンパク質を大量調製する方法の確立を試み、これに成功した。具体的には浮遊培養した HEK293 細胞にリコンビナントタンパク質を一過性発現させることにより、培養液 1L 当たり約 300 mg のタンパク質を得ることができた。次に得られた高特異性 MMP-9 阻害タンパク質を用いた動物実験により、本タンパク質によるがん転移抑制効果の検証を計画していたが、薬効試験に先んじて実施した薬物動態試験の結果、本タンパク質の血中半減期が極めて短いことが判明した。加えて、動物種間の特異性の違いから本タンパク質はヒト MMP-9 の活性は強く阻害するものの、マウス MMP-9 に対する阻害活性は低いことが判明し、短い血中半減期を考慮すると動物実験により、薬効を調べることは困難であると判断した。そこで、本タンパク質の分子デザインを再考し、血中半減期の延長を試みた。具体的には本タンパク質とイムノグロブリンの Fc 領域との融合タンパク質を作製し、この融合タンパク質が MMP-9 阻害活性を持つことを確認した。一方、化学修飾法を用いたポリエチレングリコール(PEG)の付加による本タンパク質の薬物動態の改善も試みたが、こちらは化学修飾に伴い MMP-9 阻害活性が失われてしまうことが判明した。そこで、化学修飾を受けるリジン残基のうちのいくつかを他のアミノ酸残基に置換したところ、PEG を付加しても MMP-9 阻害活性が保持されることを見出した。しかし、アミノ酸置換を導入した融合タンパク質のいくつかは発現量が著しく低く、動物実験に持ち込むことができなかった。今後、比較的発現量の高い改変体に絞ってタンパク質を調製し、動物実験を行う予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1. 富永 明里、東 昌市：MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるエンドサイトーシスおよび細胞内シグナルの寄与。第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(松山)、演題番号 8、2022年8月19-20日 2. 杵野 弘樹、常住 淳、東 昌市：MMP-7が誘導するがん細胞凝集に及ぼす化合物スラミンの阻害効果。第27回日本病態プロテアーゼ学会学術集会(松山)、演題番号 17、2022年8月19-20日 3. 富永 明里、東 昌市：MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構におけるエンドサイトーシスの寄与。第95回日本生化学会大会(名古屋)、演題番号 2P-282 2022年11月9-11日	
	【その他特筆事項】	

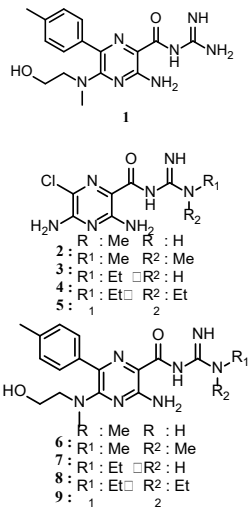
研究課題		ヒト血漿模倣培地におけるヒト乳がん細胞株の形態変化とエピジェネティック制御
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・学振 PD 研究員・中山淳
研究分担者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・外来研究員・山元智史
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	近年、ヒト血漿と同じ濃度の塩を含み、アミノ酸・核酸・糖・小有機酸など 60 種類以上の極性代謝物の組成を模倣したヒト血漿様培地 (Human Plasma-like Medium : HPLM) が開発された (Cantor <i>et al.</i>, Cell, 2017; Leney-Greene <i>et al.</i>, iScience, 2020)。本研究の目的は、ヒト血漿様培地 (HPLM) 培養条件下における乳がん細胞の表現型・オミクス解析 (RNA-seq・ATAC-seq) を行い、乳がん細胞株の特性を再評価することである。また、FDA 承認薬剤ライブラリを用いたスクリーニングより、HPLM 培養条件下における高転移細胞の薬剤応答性を評価する。	
【研究内容・成果】	ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞を、通常培地 (RPMI-1640, 10%FBS) と HPLM (10%FBS) のそれぞれで培養し、比較検討を行った。本研究では、HPLM で 2 週間以上培養したものを HPLM 培養細胞として用いている。まず、細胞増殖速度の検討を行った結果、培地変更に伴う変化は見られなかった。しかし、低吸着培地にて浮遊培養を行った場合、HPLM-MDA-MB-231 細胞のほうがより多くの細胞が浮遊して増殖している傾向が確認された。 In vivo における細胞の表現型を確認するため、2 つの培地でそれぞれ培養した細胞を、免疫不全マウス NOD-SCID の皮下に移植した。結果として、HPLM-MDA-MB-231 細胞は通常培養と比較して、造腫瘍速度が速いことがわかった (図左)。次に、NOD-SCID の尾静脈に移植し、乳がん肺転移を IVIS による発光イメージングでモニタリングした。結果として、HPLM-MDA-MB-231 細胞では移植後 2 週間の時点で、通常培養よりも強い発光が検出された。以上の結果から、ヒト血漿を模倣した培地で馴化することで、in vivo における表現型が充進することがわかった。 Cells: MDA-MB-231  HPLM 通常培地 <u>皮下移植による造腫瘍アッセイ</u> Cells: MDA-MB-231  通常培地 HPLM <u>尾静脈注射による肺転移アッセイ</u> また、RNA-seq による遺伝子発現解析の結果、HPLM 培養によって STAT3 を中心とした炎症系の遺伝子が多く発現していることがわかった。さらに、FDA ライブラリを用いた薬剤感受性スクリーニングの結果、HPLM 培養ではイオンチャネルを標的とする薬剤への感受性が大きく変化していた。また、ATAC-seq の結果、ヘテロクロマチン領域が大きく変化していることが確認されたが、今後 RNA-seq の結果と組み合わせ、詳細な解析を行う予定である。 以上より、ヒト血漿を模倣した HPLM 培養を行うことで、乳がん細胞株の表現型に大きな変化が確認された。従来の人工培地よりも、ヒト生体内に近い現象を確認することができていると考えている。これらの表現型と遺伝子変動について、さらなる解析を進め、乳がんの腫瘍形成速度や転移能に寄与するメカニズムの同定を今後の課題とする。 なお、ATAC-seq は公益財団法人癌研究会研究所 がんエピゲノムプロジェクト 丸山玲緒博士、宮田憲一博士との共同研究として実施した。この場をお借りして御礼申し上げます。	

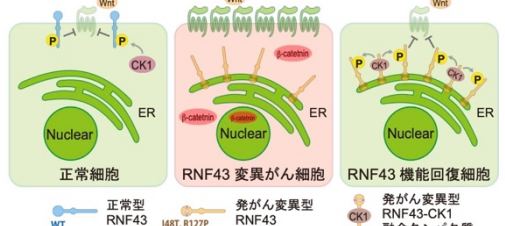
【成 果 等】	【主な論文発表】 責任著者*, Contributed equally† 1. Azuma K, Sakamoto M, Katayama S, Matsui A, Nakamichi K, Goshima N, Watanabe S, <u>Nakayama J*</u>, and Semba K*. HOXB7 induces STAT3-mediated transformation and lung metastasis in immortalized mammary gland NMuMG cells. <i>Genes to Cells.</i>, 2023, in press. 2. Watanabe N†, Fujita Y†, <u>Nakayama J†</u>, Mori Y, Kadota T, Hayashi Y, Shimomura I, Ohtsuka T, Okamoto K, Araya J, Kuwano K, and Yamamoto Y*. Anomalous Epithelial Variations and Ectopic Inflammatory Response in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. <i>American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology</i>, 67(6):708-719, 2022. 3. Tokura M†, <u>Nakayama J†</u>, Prieto-Vila M, Shiino S, Yoshida M, <u>Yamamoto T</u>, Watanabe N, Takayama S, Suzuki Y, Okamoto K, Ochiya T, Kohno T, Yatabe Y, Suto A, and Yamamoto Y*. Single-Cell Transcriptome Profiling Reveals Intratumoral Heterogeneity and Molecular Features in Ductal Carcinoma In Situ. <i>Cancer Research</i>, 82(18):3236-3248, 2022. 4. <u>Nakayama J*</u>, Matsunaga H, Arikawa K, Yoda T, Hosokawa M, Takeyama H, Yamamoto Y, and Semba K*. Identification of two cancer stem cell-like populations in triple-negative breast cancer xenografts. <i>Disease Models & Mechanisms</i>, 15(6): dmm049538, 2022.
	【学会発表】 1. 山口かれん, <u>山元智史</u>, <u>中山淳</u>, 山本雄介, HPLM を用いた培養条件下での口腔癌細胞株の分子生物学的比較, 第81回日本癌学会学術総会, ポスター発表 2. <u>山元智史</u>, <u>中山淳</u>, 落谷孝広, 山本雄介, セリン代謝異常によるがん細胞特異的な細胞外小胞分泌の誘導とがん転移の亢進, 先端モデル動物支援プラットフォーム2022年度若手支援技術講習会, 口頭発表 3. <u>中山淳</u>, 仙波憲太郎, 山本雄介, 乳がんにおけるがん幹細胞様集団の腫瘍内不均一性, 第31回日本がん転移学会学術集会・総会, ワークショップ5「Cluster 転移」 4. <u>山元智史</u>, <u>中山淳</u>, 山本雄介, 落谷孝広, セリン代謝亢進による細胞外小胞の分泌異常と乳がん転移機構, 第31回日本がん転移学会学術集会・総会, シンポジウム1「転移微小環境生物学の新基軸」
	【その他特筆事項】

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		スフェア形成法を用いた膵癌幹細胞に有効な薬剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長・石渡俊行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・係長級研究員・佐々木紀彦
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌は早期診断が困難で術後再発も多い高齢者を中心に増加している難治性癌で、5年生存率は10%程度である。膵癌細胞には多様性があり、自己複製能と多分化能を有する癌幹細胞が注目されている。膵癌培養細胞株を低接着プレートで培養すると培地中に形成されるスフェアには、癌幹細胞マーカー陽性細胞が多く含まれている。このスフェアに幹細胞関連低分子化合物Xを添加すると、癌幹細胞マーカー陽性細胞が増加する。FDA 認証薬剤ライブラリーの中からスフェアの形成を阻害し癌幹細胞を死滅させる可能性のある薬剤を探索し、その中で低分子化合物Xと相乗的に癌幹細胞抑制効果のある薬剤を同定し作用機序を解明する。(289/300字)	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	低接着プレートで培養したヒト膵癌培養細胞株のPANC-1細胞のスフェアは、接着培養に比べ癌幹細胞マーカーのOct3/4, Sox2, ALDH1などが高値を示した。さらに、スフェアに幹細胞関連低分子化合物Xを作用させることで、これらの癌幹細胞マーカーの発現が増加し、形態的にも疎な結合の粒状の大型のスフェアから小型の球形のスフェアへと変化した。他の5種類のヒト膵癌培養細胞株(PK-59, PK-8, PK-1, KP4, MIA PaCa-2)においては、PK-8, PK-1, MIA PaCa-2で低分子化合物Xによる癌幹細胞マーカーの増加がみられ、スフェア表面の変化も観察された。低分子化合物Xを添加したPANC-1細胞とMIA PaCa-2細胞のスフェアに対して、抗癌剤のGemcitabineとnab-Paclitaxelの殺細胞効果が増強し、PK-1細胞ではnab-Paclitaxelによる殺細胞効果が増強することが明らかとなった。これらのスフェアでは薬剤トランスポーターの発現は低下しており、殺細胞効果増強の一因であることが示唆された。さらに低分子化合物Xとの併用効果のある薬剤を探索するため、低分子化合物Xで処理したPANC-1細胞のスフェアに、710種類のFDA 認証薬剤ライブラリーの薬剤を添加し、殺細胞効果を検討した。スフェアの形態的解析と、ATP アッセイによる生存率の解析から、7種類の薬剤で著明に増殖抑制効果が確認された。7種類の薬剤のうち2種類は、低分子化合物Xとの相乗的な増殖抑制効果が濃度依存的に認められた。他の5種類のヒト膵癌培養細胞株のスフェアでは、MIA PaCa-2細胞においてのみ相乗効果がみられた。2種類の薬剤について、作用機序を検討した結果、活性酸素や細胞内Ca ²⁺ の増加、ミトコンドリア膜電位の低下が低分子化合物Xとの併用で認められた。また、アネキシンV染色やCaspase-3の発現性から、アポトーシス経路が活性化されていることも明らかとなった。さらに細胞内代謝として、Warburg効果が2種類の薬剤により低下することを見出した。今後は、2種類の薬剤が低分子化合物Xとの併用で相乗効果を示す機構について明らかにするとともに、動物実験も加えて膵癌幹細胞を標的とする新規治療法の開発を目指す予定である。(964/1000字)	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Na ⁺ -H ⁺ 交換輸送体 NHE1 を標的とする新規抗転移剤の創薬研究
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・宇都義浩
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学・教授・浅田元子
	所属・職名・氏名	徳島大学・M2・小宮悠生
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・准教授・遠藤良夫
	所属・職名・氏名	金沢大附属病院胃腸外科・准教授・二宮致
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	本研究は、Na⁺/H⁺交換輸送体 (NHE) を標的とした新規抗転移剤の創薬研究を実施することを目的とする。NHE は細胞膜を介して Na⁺と H⁺を交換することで、細胞内 pH を調節するイオン性輸送膜タンパク質であり、がん細胞の浸潤能・増殖能と関連している。NHE アイソフォームの一つである NHE1 は、神経膠腫細胞や口腔扁平上皮がん細胞の転移・浸潤に関係していることが報告されており、効果的な NHE1 阻害剤は抗転移剤としての可能性を有する。我々は既に NHE アイソフォームの非選択的阻害剤であるアミロライドをリード化合物として新規 NHE5 阻害剤の開発に成功しており、今回はこの知見を基に構造活性相関的手法を用いて NHE1 選択的阻害剤の創製を試みた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	今回は NHE5 選択的阻害剤 1 のグアニジノ基に着目した誘導体展開によって NHE1 阻害活性が向上するか検討した。まずは、3,5-ジアミノ-6-クロロカルボン酸メチルのメチルエステルに各種グアニジン類縁体をアミドエステル交換反応により導入し、化合物 2-5 を合成した。また、3-アミノピラジン-2-カルボン酸のメチルエステル化、続いて SO₂Cl₂を用いたピラジン環 5,6 位のジクロロ化を行った。次に芳香族求核置換反応により N-メチルアミノエタノールをピラジン環 5 位に導入した。その後、鈴木-宮浦クロスカップリング反応により p-トリルボロン酸をピラジン環 6 位に導入した。最後に、メチルエステルを各種グアニジン類縁体に変換した化合物 6-9 を合成した。次に NHE1 強発現細胞 (AP-1 rNHE1 細胞) および NHE5 強発現細胞 (PS120 hNHE5 細胞) を用いて WST-1 アッセイにより細胞毒性を評価し、NHE 阻害活性評価における化合物の濃度を決定した。NHE1 および NHE5 阻害活性は pH 応答性蛍光指示薬で細胞染色後、NH₄Cl プレパルス法による細胞内酸性化からの pH 回復率を蛍光法により評価した。 その結果、アミロライドのグアニジノ基にメチル基、エチル基を導入した化合物 2, 4 はアミロライドと比較して NHE1 阻害活性が低下した。また、グアニジノ基にジメチル基、ジエチル基を導入した化合物 3, 5 は NHE1 阻害活性を有さなかった。このことより、アミロライドの NHE1 阻害活性にはグアニジノ基の水素結合における水素供与性が重要であることが示唆された。一方、UTX-143 のグアニジノ基を各種グアニジン類縁体に変換した化合物 6-9 は UTX-143 と比較して NHE5 阻害活性が向上した。中でも、ジメチル基、ジエチル基を導入した化合物 7, 9 は大きく NHE5 阻害活性が向上した。以上の結果から、NHE1 と NHE5 では NHE 阻害剤のグアニジノ基に対して異なる結合様式を有していることが示唆された。  1 2: R¹: Me R²: H 3: R¹: Me R²: Me 4: R¹: Et R²: H 5: R¹: Et R²: Et 6: R¹: Me R²: Me 7: R¹: Et R²: H 8: R¹: Et R²: Et 9: R¹: Et R²: Et	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	・小宮悠生, 森本華真, 篠原侑成, 二宮致, 遠藤良夫, 滝野隆久, 宇都義浩, アミロライド誘導体の構造活性相関による新規 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 5 (NHE5) 選択的阻害剤 UTX-143 の創製, 2022 年日本化学会中国四国支部大会, 2022 年 11 月 12-13 日
	【その他特筆事項】	なし

研究課題		RNF43 の遺伝子変異を標的とした新たながん治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究院・助教・築山忠維
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	大腸がんでは、Wntシグナルの異常活性化が発がんの第一段階となることが古くから知られている。Wntシグナルの量的調節には、Wnt受容体のユビキチン化による分解調節が重要である。この受容体の分解調節を行っているユビキチン化酵素のRNF43は、その活性がリン酸化により制御されており、リン酸化により活性化するとがん抑制遺伝子として機能する。しかし、大腸がん同定された変異を持つRNF43ではリン酸化が消失しているため、機能を失いがん遺伝子に転換している。本研究ではこの発がん変異を持つRNF43を細胞内で強制的にリン酸化し、がん抑制遺伝子へと再転換する手法の開発を目指した検討を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	正常個体では Wnt 受容体分解の正負両方向への調節は、幹細胞特異的ユビキチンリガーゼ RNF43 のリン酸化状態により可逆的に調節される。がんにおいては、RNF43 の細胞内局在は遺伝子変異により細胞膜/エンドソームから小胞体 (ER) へと変わる。ER に集積した変異型 RNF43 はリン酸化修飾を失い不活性化状態となるため、Wnt 受容体の蓄積を導きがん遺伝子に機能転換する。この変異型 RNF43 のリン酸化状態を人工的に再現すると、ER 上に局在したまま Wnt シグナルと発がんを抑制する機能を取り戻す。ER に局在している変異 RNF43 をリン酸化すれば、がん抑制が可能となる (図 1)。 その実現に向け、下記の実験を行った。 RNF43 は二量体を形成するため、RNF43 の細胞内ドメインの一部を CK1 に置換した融合変異体を作製した。さらに RNF43 タンパク質の局在を ER へ変える能力を持ち発がん活性を持つことが確認されている細胞外ドメインのミスセンス変異(I48T,R127P) を、この RNF43-CK1(WT) 融合変異体に導入したものを作製した (図 1)。 その結果、細胞膜に局在する RNF43-CK1(WT) は Wnt リガンドに依存せずに Wnt シグナルを自律的に大きく活性化した。これは計画通りの結果であり、別グループから報告のあった RNF43(R519X) 発がん変異体の結果を強く支持した。しかし ER に局在する RNF43-CK1(I48T,R127P)変異体ではこの Wnt 活性化能は大きく減弱していた。このことから、予想通り CK1 を細胞膜から ER へと移動させることが Wnt シグナル抑制の鍵となることが明らかになった。  図 1 : RNF43 のリン酸化を利用したがん治療へ向けた基礎研究	
【成果等】	【主な論文発表】 Wnt/β-Catenin Signaling Stabilizes Hemidesmosomes in Keratinocytes; Kosumi H, Watanabe M, Shinkuma S, Nohara T, Fujimura Y, Tsukiyama T, Donati G, Iwata H, Nakamura H, Ujiie H and Natsuga K; Journal of Investigative Dermatology, 142(6), 1576-1586, 2022 【学会発表】 - Wnt receptor regulation and maintaining homeostasis, Tadasuke Tsukiyama, CGE International Seminar Series 2023 - 多段階発がんにおける RNF43 遺伝子変異の意義, 築山忠維, 北海道がん若手研究者交流会 - A role of RNF43 other than Wnt receptor regulation in oncogenesis (oral), Tadasuke Tsukiyama, Wnt 2022 - A role of RNF43 other than Wnt receptor regulation in oncogenesis (poster), Tadasuke Tsukiyama, Wnt 2022 - Wnt 受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割, 築山忠維, 畠山鎮次, 第 81 回日本癌学会学術総会 - Wnt 受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割, 築山忠維, 第 59 回日本生化学会北海道支部例会 【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		難治性乳がんのがん幹細胞を標的とした新規治療標的に関する研究開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・講師・栗本遼太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・教授・浅原弘嗣
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・助教・千葉朋希
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学システム発生再生医学分野・研究員・内田雄太郎
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	分子病態研究分野 教授・後藤典子
【研究目的】	乳がんは日本で年間9万人以上が罹患する、女性において最も頻度が高いがんである。中でも乳がん全体の約20%を占めるトリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、他のタイプの乳がんに比べ予後不良な疾患として知られる。これらの治療抵抗性を説明する上で重要な要素に乳がん幹細胞の存在が挙げられ、TNBCではとりわけ乳がん幹細胞の構成率が高いことが知られている。近年では、膵臓がんや血液腫瘍においてMusashi2やLIN28などといったRNA結合タンパク質(RBP)がその制御を担うことが報告されている。我々はその中でTNBCにおいて乳癌幹細胞に特異的に発現する新規RBPとしてZNFRの同定に成功している。このZNFRの治療標的としての可能性、分子制御機構の解明を本研究の目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<i>in vitro</i> の系において、ZNFR タンパクと RNA の結合を網羅的に同定する PAR-CLIP (Photoactivatable Ribonucleoside-enhanced Cross-linking immunoprecipitation) や、RNA の安定性・転写速度を核酸アナログ BrdU、s4U により同時定量する Dyrec-Seq (Kawata et al, <i>Genome Res.</i> 2020)を用いた解析から、CD44、NRP1、ZEB1 など乳がん幹細胞特異的な遺伝子の mRNA の 3' UTR に直接結合し標的遺伝子の発現を RNA 階層で安定化させることを明らかにした。さらに、ZNFR の発現を調節する因子を探索するため、ChIP-Seq データおよび TCGA の乳がん RNA-Seq データを再解析したところ、ZNFR の発現上昇には ZEB1 による転写調節が重要であることを明らかにした。すなわち、<u>ZEB1 による転写調節と ZNFR による RBP としての転写後調節のクロストークが形成されることが乳癌幹細胞性を維持する上で重要である</u>ことが強く示唆されている。 また、ZNFR の発現を調節する化合物をスクリーニングしたところ、ZNFR の発現を上昇させる化合物として BET inhibitor やトポイソメラーゼ阻害剤といった TNBC 治療に用いられる化合物が特異的に ZNFR を発現上昇させること、一方で Wee1-Chk1 阻害剤が ZNFR の発現を減少させることが明らかとなっており、TNBC の抗がん剤標準治療に対する治療抵抗性を RNA 階層にて規定する因子として ZNFR が重要な役割を果たすことを示しつつある。<u>BET inhibitor と ZNFR に対する核酸製剤との併用によって相加的に腫瘍抑制効果を及ぼす結果を細胞株、および TNBC-PDX に対する xenograft モデルで明らかにしている。</u> これらの結果は ZNFR の乳癌幹細胞を標的とした治療を行う上で有力な候補因子であることを強く示している。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 Yutaro Uchida, Ryota Kurimoto, Tomoki Chiba, Yasuto Takeuchi, Noriko Gotoh, Hiroshi Asahara. Post-transcriptional regulation of breast cancer stemness by the novel RNA binding protein. 第23回日本RNA学会年会 2022.07.21	
	【その他特筆事項】	

研究課題		大腸がん関連間質細胞を介したがん形成機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東邦大学・助教・仁科隆史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東邦大学・教授・中野裕康
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	代表者は、大腸がん増悪に働くサイトカインインターロイキン (IL) -11 ががん細胞ではなく、その周囲に存在する間質線維芽細胞で特異的に産生されていることを見出した(Nishina et al, Nat commun, 2021)。 本研究では、いまだ不明ながん関連間質細胞の腫瘍形成促進機構を明らかにするために、IL-11 産生がん関連間質細胞の特性を明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的とする。特に本共同研究においては、腫瘍オルガノイドを用いて、腫瘍形成時ならびに腫瘍転移時に認められるがん関連間質細胞の特性を明らかにすることを研究目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究は、IL-11 を産生するがん関連間質細胞 (IL-11 producing cancer-associated fibroblasts; 11CAFs) の特性を見出し、それをもとに新たな治療標的の同定を目指し、以下の研究を遂行した。 前年度までに大腸癌マウスモデルを用いて、腫瘍形成に関わる IL-11 産生細胞の同定を試みた。具体的には、IL-11 遺伝子プロモーター下流で EGFP を発現するように遺伝子を組換えたマウスを用いて、直腸への同所移植や脾臓へのがんオルガノイド移植を行い肝転移モデルを作製し、解析を行った。その結果、腫瘍細胞の周辺に EGFP 陽性細胞が出現することを見出していた。しかし、移植したオルガノイドによる腫瘍形成率が10%ほどと低かった。そこで、プロトコルの改変し、同所移植モデルならびに肝転移モデル移植成功率が100%となる実験系を確立した(未発表)。本モデルにおいても、腫瘍形成に伴い、腫瘍細胞の周辺に EGFP 陽性細胞が認められるだけでなく、α-Smooth Muscle actin (αSMA) 陽性細胞や、Vimentin 陽性細胞の腫瘍組織内への浸潤が認められた (図1)。現在、新規確立モデルを用いて、11CAFs ならびに腫瘍微小環境の特性の解析を進めている。 また、これらの研究と加えて当該年度中に以下の点が明らかとなった。炎症誘発性大腸がんモデルマウスでは、がん形成前に大腸炎が断続的に誘導される。IL-11 は、大腸炎に伴って線維芽細胞より誘導されるが、大腸炎時における IL-11 の役割は不明であった。そこで大腸炎時における IL-11 の役割について解析を進めた結果、IL-11 は大腸炎減弱に寄与しており、上皮細胞保護に働いていることを見出した、さらに、線維芽細胞による IL-11 産生は、マクロファージや好中球を含む Lysozyme-M 陽性細胞によって制御されていることが明らかとなった (Nishina et al., <i>iScience</i>, 2023)。 以上のことから、IL-11 産生線維芽細胞は、他の細胞との相互作用によってその働きが制御されており、IL-11 産生線維芽細胞を介した細胞間ネットワーク機構を明らかにすることは、大腸の恒常性ならびに大腸がんの形成機構の理解のためには重要であると考えられる。 Figure 1 consists of two panels, A and B. Panel A shows two images of liver tissue from a liver metastasis model mouse. The left image is a low-magnification HE-stained section showing multiple nodules. The right image is an 'Enlarged Imaged' view of one nodule, showing a dense cluster of cells. Panel B shows immunohistochemical staining for Vimentin and α-SMA. It is divided into 'Nontumor' and 'Tumor' sections. For each section, there are two images: a low-magnification view and an 'Enlarged Imaged' view. The 'Enlarged Imaged' views show brown staining for Vimentin and α-SMA within the tumor tissue. 図1 肝転移モデルマウス腫瘍部 A 肝転移モデルマウス腫瘍部 HE 染色 Scale:100 μm B 肝転移モデルマウス腫瘍部免疫染色 Scale:100 μm	
1	【主な論文発表】 1. <u>Nishina T.</u>*, Deguchi Y., Kawauchi M., Xiyu C., Yamazaki S., Mikami T., <u>Nakano H.</u>*. Interleukin 11 confers resistance to dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. <i>iScience</i>. 2023 Jan 5;26(2):105934. (*; co-correspondence) 2. Yamazaki S., Inohara N., Ohmuraya M., Tsuneoka Y., Yagita H., Katagiri T., <u>Nishina T.</u>, Mikami T., Funato H., Araki K., <u>Nakano H.</u> IκBζ controls IL-17-triggered gene expression program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents Th17-associated pathologies. <i>Mucosal Immunol.</i> 2022 Jun;15(6):1321-1337	

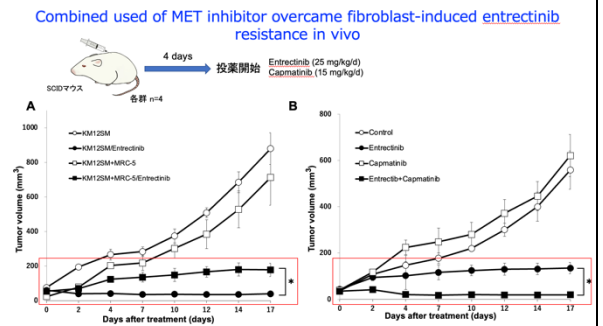
	【学会発表】 1. ◎江口秀美、<u>仁科隆史</u>、三上哲夫、<u>中野裕康</u>、炎症誘発性大腸がんモデルマウスを用いた、がん関連線維芽細胞の分化機構の解明、第19回東邦大学5学部合同学術集会、千葉、2023 2. ◎<u>仁科隆史</u>、大腸がん関連間質線維芽細胞を標的とする大腸がん新規治療法の開発、公益財団法人 沖中記念成人病研究所 年次研究報告会、東京、2023 3. ◎<u>仁科隆史</u>、Interleukin-11は、癌ならびに炎症関連線維芽細胞のマーカーであり、腫瘍形成を促進する因子である、2022年度「先進ゲノム支援」拡大班会議、神奈川、2022 4. ◎<u>仁科隆史</u>、三上哲夫、<u>中野裕康</u>、線維芽細胞が産生するInterleukin-11は、腸管恒常性ならびに大腸がん形成を制御する、第81回日本癌学会学術総会、神奈川、2023 5. ◎<u>仁科隆史</u>、<u>中野裕康</u>、Interleukin-11は、癌ならびに炎症関連線維芽細胞のマーカーであり、腫瘍形成を促進する因子である、第8回 がん代謝研究会 in 佐渡、新潟、2022 6. ◎<u>仁科隆史</u>、Interleukin-11産生間質線維芽細胞を介した大腸恒常性維持機構の解明、第3回SGHがん研究者ワークショップ、Web、2022 7. ◎Yamazaki S., Inohara N., Tsuneoka Y., Yagita H., Katagiri T., <u>Nishina T.</u>, Mikami T., <u>Nakano H.</u>, IkappaBzeta regulates IL-17-triggered gene program in intestinal epithelial cells that restricts colonization of SFB and prevents autoimmune disorders、第51回日本免疫学会学術集会、2022 8. ◎<u>Nishina T.</u>, <u>Nakano H.</u>, FIBROBLASTS-PRODUCED INTERLEUKIN 11 CONFERS RESISTANCE TO DEXTRAN SULFATE SODIUM (DSS)-INDUCED COLITIS IN MICE, Cytokines 2022, Hawaii, USA, 2022
	【その他特筆事項】 (受賞) 1. <u>仁科隆史</u>、令和4年度東邦医学会賞 受賞、2022 (メディア報道) 1. Interleukin-11 found to ameliorate acute colitis in mice, Medical Xpress, 2023 2. Interleukin-11 found to ameliorate acute colitis in mice, PUBLIC NEWS TIME, 2023 3. Protective Partnership, BPoD (BIOMEDICAL PICTURE OF THE DAY), 2023

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		難治がんの代謝ターゲット治療に対する感受性規定因子や獲得耐性メカニズムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	宮城県立がんセンター研究所・部長・田沼延公
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	NADは、細胞内代謝ネットワーク維持に補酵素・基質として不可欠である。我々は最近、がんグルコース代謝にまつわる知見を起点に、NADへの抜きんてた高依存を示す難治がん群を発見した。それら感受性がんでは、NAD低下が苛烈なエネルギー欠乏をもたらして細胞死を誘発する。しかし、そのような代謝脆弱性を規定する腫瘍側因子は良く分かっていない。また、そのような脆弱性をターゲットする治療（NADターゲット治療）を動物モデルにて行うと、高感受性腫瘍が、徐々に耐性化していくことも分かってきた。これら知見を踏まえ、NADターゲット治療への感受性/抵抗性規定因子や獲得耐性のメカニズム解明に取り組んだ。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒト肺がん細胞株パネルをモデルとして、解析を行った。SCLC・NSCLC株におけるNAMPT阻害後のNADレベルは、SCLCではほぼゼロ、NSCLCではそれより若干高かった(図A)。僅かな差だが、細胞の生死決定には重要な差と考えられた。差を産むメカニズムとして、TrpからNADを合成する能力の違いが示唆された(図B. de novo経路)。SCLCでは同経路を担ういくつかの酵素(TDO2, KMO, KYNU)の遺伝子発現が低かった。 マウスへの異種移植系を用いた治療実験では、要する期間に株間の差異がかなりあるものの、治療/再発のサイクルを重ねると、NADターゲット治療への耐性化がすすむことが確認された。典型的なケースとして、前立腺小細胞がん細胞株H660を用いた実験を行った。担癌マウスに対し、NADターゲット治療を行った。同治療を繰り返すなか出現した、治療抵抗性の再発がんについて、断続的に収集・再培養・保存をすすめた。今後、収集したこれら細胞の性状を解析する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	Tanuma N., Targeting NAD biogenesis in lung and prostate neuroendocrine carcinomas. 第12回 日米癌合同会議(マウイ)
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		エヌトレクチニブ耐性における微小環境由来因子の関与を検討する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	大分大学附属病院・呼吸器外科・医員・内匠陽平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大分大学医学部・呼吸器・乳腺外科学講座・教授・杉尾賢二
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	NTRK 融合遺伝子は稀なドライバー遺伝子異常であるが、肺がんや大腸がんをはじめ多くのがん種に検出される重要な治療標的である。TRK 阻害薬エヌトレクチニブは2019年にNTRK 融合遺伝子陽性固形がんおよびROS1 融合遺伝子陽性肺がんに認可された分子標的薬である。それぞれのがん種に対し高い奏効率を示し無増悪生存期間を延長するが、約40%の症例は初期抵抗性を示す。また、奏効例もほぼ例外なく耐性を獲得するため、抵抗性や耐性を克服する必要がある。 腫瘍微小環境が分子標的薬の抵抗性や耐性を惹起する要因の一つである。本研究では、微小環境の構成要因の一つである線維芽細胞がいかにエヌトレクチニブの耐性を誘導するかを検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【研究対象および方法】 NTRK1 融合遺伝子を有する大腸癌細胞株 (KM12SM) および ROS1 融合遺伝子を有する NSCLC 細胞株 (HCC78) を用い、① HGF によるエヌトレクチニブ耐性誘導、HGF 産生源として線維芽細胞との共培養、② MET 阻害薬 (カプマチニブ) 併用による細胞増殖抑制試験とシグナル解析、③ in vivo でのエヌトレクチニブと MET 阻害薬併用の治療実験を行った。 【結果】他の成長因子と比較して、HGF は、その受容体である MET を活性化することで、KM12SM 細胞および HCC78 細胞に対して、最も強力にエヌトレクチニブ抵抗性を誘導した。HGF によるエヌトレクチニブ耐性は、in vitro では活性型 HGF 特異的大環状ペプチド HiP-8 と MET 阻害薬であるカプマチニブにより回復した。Western blot によるシグナル解析では、エヌトレクチニブ存在下でも、HGF を投与することで、MET のリン酸化が上昇し、下流シグナルである ERK・AKT のリン酸化も上昇したが、カプマチニブを併用により、MET シグナル経路は抑制された。さらに、HGF を産生する線維芽細胞は、in vitro において、エヌトレクチニブ耐性を促進し、その効果は抗 HGF 抗体によりキャンセルされた。KM12SM と HGF 産生線維芽細胞を接種した皮下腫瘍モデルでは、エヌトレクチニブ単剤では、腫瘍の増殖速度は抑制できたが、縮小には至らなかった。カプマチニブの使用により、腫瘍は縮小し、エヌトレクチニブ抵抗性が克服された。 【結語】 HGF などの腫瘍微小環境における成長因子が、NTRK1 や ROS1 融合遺伝子を有する腫瘍において、エヌトレクチニブに対する耐性を誘発する可能性を示唆した。さらに、抵抗性を誘発する成長因子の阻害薬を最適に併用することで、エヌトレクチニブの治療効果を最大化できる可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. Cancer Med. 2023 Mar;12(5):5809-5820. doi: 10.1002/cam4.5342. Epub 2022 Nov 23. PMID: 36416133; PMCID: PMC10028024.	
	【学会発表】 Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements.: 12th AACR-JCA Joint Conference, 2022. 12-14 (Maui, USA)	
	【その他特筆事項】	



令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		TP53 変異が EGFR 変異肺癌における腫瘍免疫応答に及ぼす影響の検討
研究代表者	所属・職名・氏名	岡山大学呼吸器・アレルギー内科 准教授大橋 圭明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 中須賀崇匡
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 平生 敦子
	所属・職名・氏名	岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 大学院生 大川 祥
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野 聖二
【研究目的】	EGFR 変異は、EGFR 肺癌のドライバー遺伝子であり、腫瘍微小環境を免疫抑制的な環境へ誘導している。TP53 変異は EGFR 変異と共存することが知られているが、腫瘍免疫応答にどのような影響を与えるかは未解明である。本研究では EGFR 変異肺癌マウスと TP53 欠失マウスを交配させ、EGFR 変異肺癌における、TP53 の役割を検証することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	岡山大学が保有する EGFR 遺伝子改変マウスを金沢大学へ移送し、金沢大学が保有する TP53 遺伝子欠失マウスと交配し EGFR 変異/TP53 欠失の両方を有する新規の肺癌マウスモデルの安定的な樹立を試みた。残念ながら EGFR,TP53 の両方に遺伝子異常があるマウスは十分に生育することが出来ない結果となった。マウス2型肺胞上皮特異的に EGFR 変異を導入した肺癌マウスモデルにおいて、TP53 欠失をさせることで肺癌シグナルが促進されるが、マウスの生育不十分な原因の可能性として考慮された。今後、安定生育できる条件設定を検討していく必要がある。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】	

研究課題		腸内細菌叢が膵がんの病態に与える影響の解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・山村凌大	
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学・教授・園下将大	
	所属・職名・氏名		
	所属・職名・氏名		
	所属・職名・氏名		
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸	
【研究目的】	我々はこれまで、肥満や潰瘍性大腸炎、統合失調症の病態に影響を及ぼす腸内細菌種やその代謝産物をそれぞれ同定してきた (Yamamura et al. <i>Biosci Microbiota Food Health</i> 2020; Yamamura et al. <i>Obes Res Clin Pract</i> 2021; Yamamura et al. <i>J Pers Med</i> 2021)。本研究で我々は、複数の膵がん個体モデルや臨床検体を相補的に使用し、腸内細菌およびその代謝産物が膵がんの発症・進展・治療応答性に与える影響とその詳細な機序を解明する。さらに、この成果に立脚して膵がんの新規治療法を開発する。		
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	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 <u>4 遺伝子変異</u> (がん遺伝子 <u>KRAS</u> の活性化、がん抑制遺伝子群 <u>TP53・CDKN2A・SMAD4</u> の不活性化) を模倣した世界初のモデル生物 <u>4-hit ハエ</u> を作出した (図 1)。ハエはヒトと遺伝的保存度が高く (ヒト疾患の異常遺伝子の 7 割以上を保有)、機能的に対応する体内構造を有する ほか、遺伝子ノックアウト系統やレポーター系統等の遺伝学的解析ツールが充実しており、飼育も迅速・安価である (約 10 日間で次世代が得られ、飼育費用はマウスの約 1/1,000)。さらにハエは、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 (Jiang, Yamamura et al. <i>Front Oncol</i> 2022; Yamamura et al. <i>Cancer Sci</i> 2021; Sonoshita et al. <i>Curr Top Dev Biol</i> 2017)。 次に申請者らは、ハエの全キナーゼ (252 遺伝子) に着目し、各々のヘテロ接合性変異体を 4-hit ハエに導入する網羅的遺伝学スクリーニングを実施した。その結果、膵がんの新規治療標的として MEK を同定した (図 2 control <i>ptc>GFP</i> 翅原基 (上皮) 1-hit <i>Ras^{G12D}</i> 4-hit <i>Ras^{G12D}-p53^{shRNA}-CycE-Smad4^{shRNA}</i> ハエ生存率 (%) 100 55 0 図 1：膵がん遺伝子型ハエモデル。翅原基で、<i>patched (ptc)</i>プロモーター活性を利用して約 10 細胞ぶんの幅の単層上皮細胞に遺伝子操作を施した。輪郭 (赤) に囲まれた黒い領域には野生型細胞が存在する。<i>Ras</i> を活性化すると、形質転換細胞の増殖が亢進して GFP の帯が広がる (1-hit)。4 遺伝子異常ハエ (4-hit) では一層増殖が活発になり、遊走能が亢進した腫瘍細胞が出現し (矢頭)、ハエは致死となる。 A ハエ生存率 (%) 0 * MEK1^{+/+} MEK1^{+/-} 4-hitハエ 図 2：MEK の阻害は腫瘍の進展を抑制する。A, MEK のヘテロ接合性変異による 4-hit ハエの生存率の改善。*, $P < 0.05$ in Student t-test. B, MEK 阻害薬 trametinib によるヒト膵がん細胞ゼノグラフトの成長の抑制。週 5 回・4 週間投与。1 本の棒が 1 匹のマウスの腫瘍体積変化率を示す。*, $P < 0.05$ in Mann Whitney U test.		

A)。この結果に基づき申請者らは、膵がんモデルマウスに MEK 阻害薬 trametinib を胃内投与し、trametinib が vehicle と比較してヒト膵がん細胞ゼノグラフトの成長を顕著に抑制することを発見した（前頁図 2B：国際特許出願済み、Sekiya et al. *under review*）。さらに申請者は最近、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

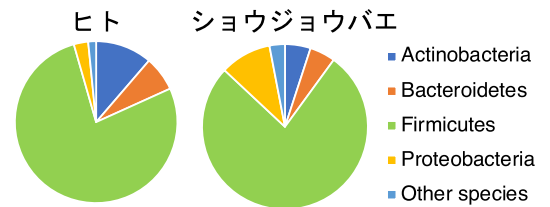


図3：ヒト（左）とショウジョウバエ（右）の腸内細菌叢は非常に類似している。申請者が解析した健常日本人 585 名の腸内細菌叢と、ハエ 200 匹の腸内細菌叢の比較。両者は Analysis of similarities で有意に類似 ($P < 0.05$)。

した（図 3）。申請者らはこの解析基盤を活用し、4-hit ハエの腸では対照ハエ（非遺伝子組換え）と比較して全菌種のうち細菌 X の存在割合が著明に減少していることを見出した（図 4）。加えて申請者らは、細菌 X の主要な代謝産物である Y が 4-hit ハエにおいて trametinib の効果を増強することを予備的に見出した（図 5）。

現在我々は、膵がん患者の腸管における細菌 X およびその代謝産物 Y の変動を明らかにするため、膵がん患者と消化器疾患の既往歴のない健常対照者の腸内細菌叢およびその代謝産物を解析し比較する臨床研究を実施している。また、我々は今後、ハエ実験で得られた結果を哺乳類モデルで確認し、その詳細な分子機序を明らかにする予定である。

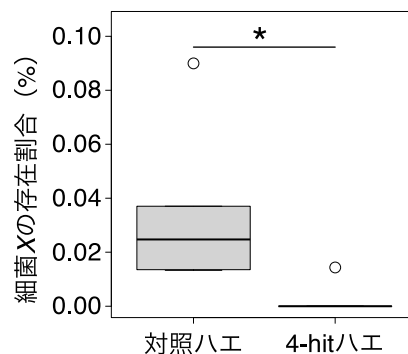


図4：4-hit ハエにおける腸内細菌 X の減少。各群 100 匹のハエ幼虫の後腸（ヒトの大腸に相当）の細菌叢の組成を網羅的に比較した。*、 $P < 0.05$ in Student t-test。

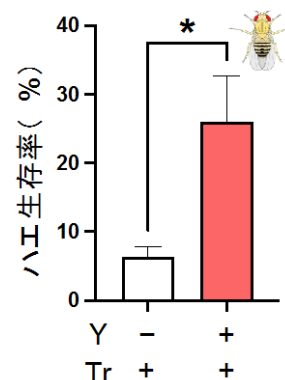


図5：4-hit ハエにおいて Y (1.0%) は MEK 阻害薬 trametinib (Tr, 0.1 μM) の抗腫瘍効果を増強する。Y と Tr はハエに混餌投与した。*、 $P < 0.0001$ in Student t-test。

【成果等】

【主な論文発表】

- Jiang H, Kimura T, Hai H, **Yamamura R***, Sonoshita M*, *Drosophila* as a toolkit to tackle cancer and its metabolism. *Frontiers in Oncology* 2022, 12: 982751. (* Corresponding authors)
- Shimizu Y, **Yamamura R**, Yokoi Y, Ayabe T, Ukawa S, Nakamura K, Okada E, Imae A, Nakagawa T, Tamakoshi A, Nakamura K, Shorter sleep time relates to lower human defensin 5 secretion and compositional disturbance of the intestinal microbiota accompanied by decreased short-chain fatty acid production. *Gut Microbes* 2023, 15(1): 2190306.

【学会発表】

- Yamamura R**. Dysbiosis of the gut microbiota and decreased fecal levels of short-chain fatty acid in patients with ulcerative colitis: A hospital-based case-control study. 9th World Congress on Targeting Microbiota. 2022 年 10 月 20 日, パリ

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	2. <u>山村 凌大</u> , 大久保 亮, 勝又 紀子, 小田巻 俊孝, 清水 金忠. 統合失調症患者に対するプロバイオティクスの治療効果に腸内細菌の機能遺伝子プロファイルが及ぼす影響. 第26回腸内細菌学会学術集会, 2022年7月7日, 東京
	【その他特筆事項】 特になし

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		RNA 結合タンパク質-miRNA 初期転写産物の複合体形成における m ⁶ A 修飾の関与の検証
研究代表者	所属・職名・氏名	高知大学 総合研究センター ・助教・樋口琢磨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	高知大学 総合研究センター ・教授・坂本修士
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	機能性小分子 RNA であるマイクロ RNA(miRNA)の中にはがん抑制作用を有するものが存在し、当該 miRNA の産生低下が発がんおよびがんの悪性化に寄与する。我々はこれまで、RNA 結合タンパク質複合体 NF90-NF45 が複数のがん抑制 miRNA の産生を阻害することを明らかにしてきた。一方で、RNA 修飾の一つであるアデニンのメチル化(m⁶A)が miRNA 生合成に対し促進的に作用することが知られている。本研究では、「NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA の生合成阻害」と「m⁶A 修飾による miRNA の生合成促進」の関連を明らかにし、がん抑制 miRNA の産生を司る新規制御機構の解明を試みる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに我々は、NF90-NF45 ががん抑制 miRNA の一つである let-7a の初期転写産物(pri-let-7a)に直接結合し、pri-let-7a-1 のプロセッシングを阻害することで let-7a の生合成を負に制御することを報告している。また我々は、前年度までの解析結果より、非メチル化 pri-let-7a-1 と比較し人工的に m⁶A 塩基を導入した pri-let-7a-1 に対して NF90-NF45 の結合能が低下することを明らかにしている。また培養細胞系を用いて NF90-NF45 を過剰発現させると let-7a の産生量は低下するが、当該細胞に m⁶A 修飾酵素 METTL3 および METTL14(METTL3/14)を共発現することで let-7a の産生量が回復することも見出している。この結果は、「METTL3/14 が pri-let-7a-1 の m⁶A 修飾を行うことで、NF90-NF45 による let-7a の生合成阻害効果を軽減させる」ことを示唆している。一方で、METTL3/14 が pri-let-7a-1 を修飾しているかについては十分明らかではない。そこで、METTL3/14 が pri-let-7a-1 に m⁶A 修飾を導入するか否かを明らかにするため、<i>in vitro</i> m⁶A modification assay を実施した。 <i>In vitro</i> 転写により作製した pri-let-7a-1 に対して、リコンビナント METTL3/14 を基質とともに混合し反応させた後、ニトロセルロース膜にスポットして抗 m⁶A 抗体にて m⁶A 修飾された RNA を検出した。解析の結果、m⁶A 抗体で検出できるシグナルは pri-let-7a-1 とともに添加した METTL3/14 の濃度依存的に増加することが分かった (図 A)。さらに、METTL3/14 と共にリコンビナント NF90-NF45 を添加して反応させたと、追加した NF90-NF45 の濃度依存的に m⁶A 修飾を示すシグナルが減衰することを発見した (図 B)。これらの結果とこれまでの知見を合わせると、「NF90-NF45 は m⁶A 修飾されていない pri-let-7a-1 に優先的に結合し、METTL3/14 による m⁶A 修飾を妨げ、プロセッシングを阻害することで let-7a の生合成経路を抑制する」という新たな可能性が見出された。 本研究成果は第 63 回日本生化学会中国四国支部例会および令和 4 年度金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点研究成果報告会において発表した。	
【成果等】	【主な論文発表】 [原著論文] ・Sylvia Lai, <u>Takuma Higuchi</u>, Masayuki Tsuda, Yasunori Sugiyama, Keiko Morisawa, Taketoshi Taniguchi, Shuji Sakamoto NF90-NF45 is essential for β cell compensation under obesity-inducing metabolic stress through suppression of p53 signaling pathway ・ Scientific Reports, 12, 8837, 2023	

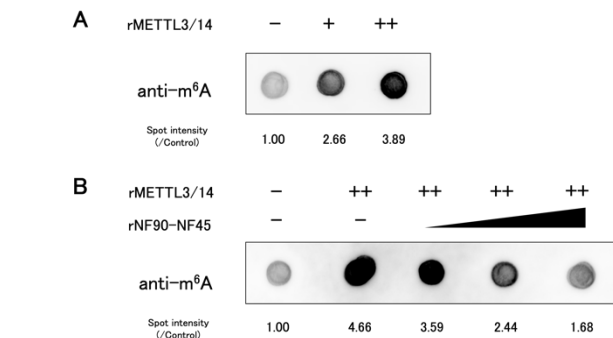


図 METTL3/14によるpri-let-7a-1のm⁶A修飾効果の検証とNF90-NF45が与える影響の解明
A: METTL3/14とpri-let-7a-1 probeを用いた*in vitro* m⁶A modification assay の結果. 添加する METTL3/14の濃度依存的にm⁶Aのシグナルが増加する。
B: Aの条件に追加してNF90-NF45を添加した結果. 添加したNF90-NF45の濃度依存的に m⁶Aのシグナルが減衰する。

	【学会発表】 ① 樋口琢磨、絹川勝晶、藤田浩志、森澤啓子、鈴木健之、坂本修士 がん抑制miRNA産生調節におけるRNA修飾の影響 第63回日本生化学会中国四国支部例会、2022年5月28-29日 ② 坂本修士、樋口琢磨、森澤啓子、戸高寛、松川和嗣 DRBPs による筋分化マスターMyoD の質的变化を介した筋成熟化抑制 第8回日本筋学会学術集会、2022年6月6日 ③ Lai Sylvia、樋口 琢磨、津田 雅之、杉山 康憲、森澤 啓子、坂本 修士 NF90-NF45はp53シグナル経路の抑制を介し肥満誘導代謝ストレスによる膵β細胞の代償性肥大を引き起こす 第44回 日本分子生物学会年会, 2022年11月30日-12月2日
	【その他特筆事項】

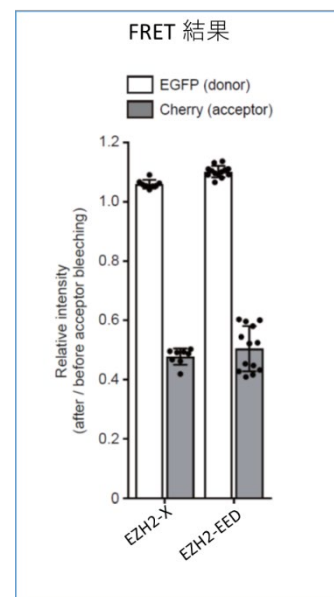
令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		メカノバイオロジーから迫るがん転移機構
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・石原 誠一郎
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	がんによる死因の 90%以上は転移によるものであるため、転移を抑制する治療法の開発が急務である。しかしながら転移が生じるメカニズムには不明な点が多い。本研究では、がんは由来が異なっているにもかかわらず共通の臓器に転移することに着目し、それが起こる原因を明らかにすることを目指した。申請者は高転移性臓器には未知の共通した性質が存在すると考え、高転移性臓器では血管周囲の組織の硬さが共通していると仮定した。そしてその硬さに応答した血管内皮細胞が特異的な分子を発現させ、がん細胞の転移を促進させると考えた。本研究ではこれらの仮説を証明し、転移に寄与する分子を同定し、それをターゲットとした新規治療法を提案することを目指した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでにコラーゲンとマトリゲルを混合した基質上にヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を播種しコンフルエント状態から 9 日以上培養することによって、細胞運動が抑えられた HUVEC のシート (<i>In vitro</i> 血管モデル) を作製することに成功している (未発表)。そこでこの培養系を用いて硬さの異なる基質上で <i>In vitro</i> 血管モデルを作成し、その上にがん細胞を播種してがん細胞が <i>In vitro</i> 血管モデルに潜り込むかを検証した。<i>In vitro</i> 血管モデルの上に緑色蛍光タンパク質で標識した肺がん細胞株 H1299 細胞を播種したところ、H1299 細胞は <i>In vitro</i> 血管モデルに浸入せずに塊になることがわかった。今後は他の細胞を用いるとともに、培養時間や培地などを検討することで、がん細胞が <i>In vitro</i> 血管モデルに潜り込む様子が観察できるかを検証する。 さらに、コラーゲンゲルに架橋剤であるゲニピンを添加することで、ゲル中のコラーゲン濃度を変えずに硬さを変化させる実験系の確立を行った。ゲニピン濃度を 0-10 mM で調整することで、10 Pa 程度から 10 kPa 程度まで約 1000 倍のレンジでコラーゲンゲルの硬さを制御することが可能となった (図)。このレンジは正常な臓器と腫瘍組織の硬さを含んでいるため、今後はこのゲル上で HUVEC を培養して <i>In vitro</i> 血管モデルを作製し、がん細胞を播種して <i>In vitro</i> 血管モデルに潜り込むかを検証する。 硬さ(ヤング率, kPa) 硬さ平均値 0.029 0.267 0.678 1.493 3.356 9.198 12.527 (kPa) 100 10 1 0.1 0.01 0 0.01 0.05 0.1 0.5 1 10 ゲニピン濃度 (mM) 脳 肺 肝臓 がん組織 図:ゲニピンによるコラーゲンゲルの硬化	
【成果等】	【主な論文発表】 1. S. Ishihara, H. Kurosawa, H. Haga: Stiffness-Modulation of Collagen Gels by Genipin-Crosslinking for Cell Culture, <i>Gels</i>, 9, 148 (2023). 【学会発表】 1. 石原 誠一郎、芳賀 永: “がん細胞における転写因子 ATF5 を介したメカノレスポンス” 第 7 回日本メカノバイオロジー学会学術総会 (2023 年 3 月 30 日 札幌 北海道大学) <口頭> 2. 石原 誠一郎、芳賀 永: “メカニカルな刺激により引き起こされるがん悪性化” 第 1 回北海道がん若手研究者交流会 (2023 年 3 月 17 日 札幌 北海道大学) <口頭> 3. 石原 誠一郎、芳賀 永: “「硬さ」を認識したがん細胞が転写因子 ATF5 を介して悪性化するメカニズム” 令和 4 年度北大細胞生物研究集会 (2023 年 3 月 14 日 札幌 北海道大学) <口頭> 【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞におけるビタミンKサイクルの機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	岐阜薬科大学・助教・深澤和也
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia: AML)は、予後不良の難治性造血器腫瘍の1種であり、65歳以下の5年生存率は約40%である。近年、AML 幹細胞などの微量の治療抵抗性細胞群が AML の悪性化進展や抗がん剤に対する抵抗性を担うことが示されている。また近年、ビタミン、アミノ酸、グルコースなどの食事由来の代謝物が、がん幹細胞の機能をどのように制御するのか? という疑問に注目が集まっている。本研究課題では、ビタミン K サイクル制御因子 GGCX を分子基軸とすることで、新規 AML 幹細胞制御メカニズムの解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ビタミンKは脂溶性ビタミンに分類される栄養素である。天然のビタミンKはK1とK2の2種類に分類される。細胞内に取り込まれた酸化型ビタミンKは、ビタミンKエポキシド還元酵素 (VKORC1)によって還元型ビタミンK (=活性化型ビタミンK)に変換される。さらに、還元型ビタミンKは、ビタミンK依存性カルボキシラーゼ (GGCX)によって、再度酸化型ビタミンKに変換される。この一連の反応 (ビタミンKサイクル)によって、ビタミンKは生体内で効率よく利用されている。 本研究課題では、ビタミンKサイクル制御因子 GGCX を分子基軸とし、① AML におけるビタミンKサイクルの機能的役割の解明、② 高ビタミンK食によるAML治療・予防効果の検討、③ ビタミンKサイクルによるAML幹細胞制御メカニズムの解明、④ ビタミンKサイクルの臨床的意義の解明、の計4項目の実施を目指す。 今年度は、まず、公共データベースを用いて、GGCX発現とAML患者の生存期間に相関があるかどうかを検討した。その結果、GGCX高発現群では、GGCX低発現群と比較して、有意に生存期間が短縮していることが見出された。また、VKORC1阻害剤であるワルファリンを用いて、ビタミンKサイクルを薬理的に阻害した際に、AMLの病態進展がどのように制御されるのかを検討した。MLL-AF9導入AMLモデルマウスに、0.5 mg/kg ワルファリンを連日投与したところ、ワルファリン投与群において、生存期間が有意に短縮することが観察された。くわえて、組織学的解析およびフローサイトメトリーにより、骨髄中のAML細胞数が増加していることも同時に見出した。また、骨髄中におけるc-Kit陽性AML幹細胞集団の割合の有意な増加が認められた。現在は、これらの実験結果の再現性を検討している。今後、shGGCXやshVKORC1を用いたノックダウン細胞の移植実験などについても実施していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Fukasawa K, Lyu J, Kubo T, Tanaka Y, Suzuki A, Horie T, et al. MEK5-ERK5 Axis Promotes Self-renewal and Tumorigenicity of Glioma Stem Cells. <i>Cancer Res Commun.</i> 2023;3(1):148-59.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

研究課題		ヒストンメチル化酵素 EZH2 と新規複合体を形成するタンパク質の同定と機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学大学院医学系研究科・講師・新城恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田英周
【研究目的】	ヒストンメチル化酵素 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコーム複合体 2) の構成タンパク質であり、多くのがんで発現が高い。近年 EZH2 阻害薬は臨床応用されているが、一方で EZH2 酵素活性阻害薬は、EZH2 が過剰発現した腫瘍のすべてで有効ではないことも明らかとなってきた。EZH2 はがんにおいて PRC2 とは異なる複合体を形成することが知られており、アンドロゲンレセプター、STAT3、NF- κ B と複合体を形成し、悪性化に寄与することが報告されている。我々はこれまでに EZH2 が過剰発現している複数の腫瘍細胞において、EZH2 はヒストン修飾酵素 X(protein X)と複合体を形成していることを見出した。この新規 EZH2 複合体は通常の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。本共同研究では、新規複合体の機能解明を目的に研究を進めた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに脳腫瘍 (GBM)、乳がん (Breast ca.)、前立腺がん、肺がんなど複数のがん種の細胞株を用いて、この異常複合体が存在することを確認した。EZH2 は核内に多く局在するが、EZH2-protein X 異常複合体も核内で認めることが免疫沈降から明らかとなった。複合体の存在は Proximity ligation assay (PLA) でも確認を試みた。複数の細胞で PLA 反応を行ったところ、複合体を示す PLA のスポットはがん細胞で多い傾向があった。 長鎖非翻訳 RNA はヒストン修飾タンパクをクロマチン上にリクルートすることが知られており、EZH2 も複数の lncRNA に結合することが報告されている。EZH2-protein X 異常複合体形成に長鎖非翻訳 RNA が関与しているかを検討するため、細胞から得られたタンパク質を、RNaseA で処理したのち、免疫沈降を行った。RNaseA 処理の有無で複合体の存在量は変わらず、タンパク質が直接結合している可能性が考えられた。 さらに EZH2-protein X 結合を確認するために FRET 実験を行った。EZH2 と protein X とにそれぞれ GFP と mCherry 蛍光タンパク質を結合し、同一ベクター内で発現させる系を作成した。このベクターを HEK293T 細胞で発現させ、FRET 実験を行った (平田先生実施)。コントロールの EZH2-EED ベクターで明らかな FRET を認めた。EZH2—X ベクターでも同様な EGFP の上昇が観察され、FRET が生じている可能性が高いことが明らかとなった。さらに別のコントロールベクターを用いた確認実験を予定している。 今後はクロマチン免疫沈降を行い、この複合体による標的遺伝子部位を同定することを目指している。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし



令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸癌における循環腫瘍 DNA を用いた抗 EGFR 抗体薬耐性の検出と病状モニタリングの確立
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋市立大学消化器代謝内科学・准教授・久保田英嗣
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院胃腸外科・講師・中村慶史
	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田 武
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究の目的は、 <i>RAS</i> 野生型切除不能大腸癌患者において、治療前に循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA; ctDNA) における EGFR (epidermal growth factor receptor) 経路関連遺伝子の変異や増幅を検出することにより、ctDNA による EGFR 抗体薬の効果予測の可能性を検討することである。さらに、EGFR 抗体療法を行っている <i>RAS</i> 野生型切除不能大腸癌患者において、ctDNA における EGFR シグナル経路に関連する複数の候補遺伝子の変異や増幅を経時的に検索することにより、ctDNA による病状モニタリングの可能性を検討することである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	研究対象は、手術標本もしくは生検標本で <i>RAS</i> 野生型 (<i>RAS</i> 変異陰性) と確認された切除不能進行大腸癌で、EGFR 抗体薬を含む化学療法を行う予定の 47 例とした。治療開始前、開始 4 週間後、その後は病状進行 (PD) まで 10 週間隔で、腫瘍マーカーの測定や画像診断に合わせて血液採取を行った。治療開始前、PD 後に採取した血液 (血漿) から ctDNA を抽出し、デジタル PCR 法により、EGFR 抗体薬の治療効果 (化学療法の感受性) を予測するドライバー遺伝子変異 (<i>KRAS</i> exon 2/3, <i>NRAS</i> exon 2/3, <i>BRAF</i> V600 周辺, <i>PIK3CA</i> exon 9/20) と遺伝子増幅 (<i>MET</i>, <i>ERBB2</i>) の解析を行った。3 以上の変異クローンが認められた場合に変異陽性、4 以上のコピー数増加が認められた場合に増幅陽性と判断した。治療開始前もしくは PD 後のいずれかの検体で変異/増幅陽性であった場合、その遺伝子については、経過中に採取された血液についても変異解析を行った。 結果として、47 例中 15 例 (32%) の治療前検体において <i>KRAS</i> (12%)、<i>NRAS</i> (3%)、<i>BRAF</i> (6%)、<i>PIK3CA</i> (8%)、<i>HER2</i> (7%) のいずれか、もしくは複数に変異/増幅が検出された。いずれかの遺伝子に変異/増幅があった 13 例、変異/増幅がなかった 29 例の奏効割合は、それぞれ 31%および 59%であり、変異/増幅なしの群で高率であった ($p=0.095$)。また、いずれかの VAF (variant allele frequency) 0.5%で変異陽性と陰性を区分した場合、VAF が 0.5%以上の 6 例、0.5%未満の 7 例の奏効割合はそれぞれ 0%、57%となった ($p=0.049$)。さらに、CT 検査で標的病変が認められた 41 例において、治療前検体における遺伝子変異のカットオフ値を VAF 0.5%、増幅のカットオフ値を 4 としたとき、変異/増幅のある患者とない患者では、最大奏効における腫瘍縮小割合に有意差があった (32.1% vs 10.5%, $p=0.037$)。 結論として、本研究は EGFR 抗体による治療奏効の予測について、血漿中の EGFR シグナル伝達経路関連遺伝子における少数の変異サブクローン同定の臨床的有用性を示した。本研究の結果、治療奏効群と非奏効群の鑑別に望ましい遺伝子変異の VAF の閾値は 0.5%である可能性が示唆された。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】Takahashi N, Nakamura K, Kito Y, Kubota E, Asayama M, Kumegawa Y, Hara H, Matsushima T, Tsuji K, Kataoka H, Tsuyada A, Sasaki Y, Idogawa M, Tokino T, Sawada T. Prospective observational study of monitoring gene alterations in plasma cell-free DNA using droplet digital PCR system during anti-EGFR antibody treatment in patients with RAS wild-type advanced colorectal cancer. American Society of Clinical Oncology Gastrointestinal Cancers Symposium (ASCO-GI) 2023	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脳腫瘍特異的なドライバー変異遺伝子の検出法・治療法の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学・助教・丹下正一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	准教授・平田 英周
【研究目的】	膠芽腫は、標準治療による生存期間中央値は約1年であり、脳腫瘍のなかでも悪性度が高く極めて予後不良である。申請者がTCGA、CPTAC等の公共データベースに収録されている膠芽腫患者検体の体細胞変異データを用いて行った解析では、EGFR遺伝子の変異がPTEN、TP53に次いで高頻度であり、約20%の患者で確認された。 膠芽腫で確認されるEGFR変異は、肺癌で確認される変異と異なり細胞外ドメインに集中しており、肺癌等で適用されているコンパニオン診断薬や分子標的薬の使用が困難である。本共同研究はこのような背景を踏まえ、膠芽腫特異的な変異の発見・治療に寄与するツールおよび阻害薬の探索を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	・EGFR変異陽性膠芽腫細胞株の樹立：これまでに、細胞外ドメイン変異EGFRをコードするレトロウイルスベクターを構築し、膠芽腫細胞株U87に導入することでEC変異EGFR陽性膠芽腫細胞株を作成中である。細胞株の樹立が確認され次第阻害薬のスクリーニングを開始する予定である。 ・デジタルPCR法を用いたEGFR変異検出法の確立：これまでにコンパニオン診断薬が検査対象としていなかったEGFR蛋白質の細胞外ドメイン変異(図上)を引き起こすような体細胞変異を検出するデジタルPCR用プローブを作成する。現在までに複数個所の変異を検出するプローブをデザインしており、順次デジタルPCR機(Thermo社製、図下)を用いて有用性について評価を進めていく予定である。 上：主要なEGFR変異を示す。本研究では、細胞外ドメインに生じた変異を対象とする。 下：本研究では、札幌医科大学が保有するThermo社製デジタルPCR機「QuantStudio Absolute Q」を用いて膠芽腫特異的な変異の検出系の構築を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】	該当なし
	【学会発表】	該当なし
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		日本人の前立腺がんにおける SUCLA2 遺伝子欠失																		
研究代表者	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 助教 田代康次郎																		
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 准教授 木村高弘																		
	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学病理学 准教授 鷹橋浩幸																		
	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学病理学 助教 佐藤峻																		
	所属・職名・氏名																			
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍分子生物学研究分野 教授 高橋智聡																		
【研究目的】	貴学の高橋智聡教授、河野晋博士らは、進行性前立腺癌において RB1 遺伝子と SUCLA2 遺伝子の共欠失が高頻度に生じていることを論文発表されている。また、SUCLA2 欠失を標的とした創薬開発も進行しており、チモキノンという化合物を得ている。 我々、東京慈恵会医科大学泌尿器科では、前立腺癌の臨床検体を用いて RB1-SUCLA2 の共欠失についての臨床的特徴を確認するとともに、SUCLA2 欠失症例のバイオマーカー探索を患者採血から ctDNA を抽出し解析を行う。																			
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々、東京慈恵会医科大学泌尿器科で前立腺癌と診断され、前立腺全摘により得られた組織検体の Tissue Micro Array 約 100 例について SUCLA2 の抗体で免疫染色を行った。その結果、グリソンスコア（前立腺癌の悪性度）が高くなるにつれて SUCLA2 の欠失率も増加する相関性を認めた（図1） <table border="1"> <caption>SUCLA2欠失率 (%)</caption> <thead> <tr> <th>悪性度 (グリソンスコア)</th> <th>例数 (N)</th> <th>SUCLA2欠失率 (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3+3</td> <td>22</td> <td>4.5</td> </tr> <tr> <td>3+4</td> <td>34</td> <td>14.7</td> </tr> <tr> <td>4+3</td> <td>19</td> <td>31.6</td> </tr> <tr> <td>4+4</td> <td>10</td> <td>40</td> </tr> <tr> <td>9≤</td> <td>5</td> <td>60</td> </tr> </tbody> </table> また、東京慈恵会医科大学附属病院および同葛飾医療センターにおける進行前立腺癌（転移を有する去勢抵抗性前立腺癌）患者から末梢血採取を行い、検体を高橋教授らの研究室で ctDNA を抽出し、RB1 および SUCLA2 の欠失について eProbe 法によってコピー数解析する体制を貴学と本学での共同研究の倫理委員会承認のうえ整えた。現時点で解析の条件検討が終了し、11 例の解析が終了している。順次、検体採取を進め研究期間全体で全 50 例の解析を予定している。 次年度は ・RB1 および SUCLA2 の欠失部位について臨床組織検体から得た DNA について全エクソン解析を行う。 ・前立腺癌で死亡した剖検検体組織における RB1 および SUCLA2 の発現（欠失）について免疫染色を行う。		悪性度 (グリソンスコア)	例数 (N)	SUCLA2欠失率 (%)	3+3	22	4.5	3+4	34	14.7	4+3	19	31.6	4+4	10	40	9≤	5	60
悪性度 (グリソンスコア)	例数 (N)	SUCLA2欠失率 (%)																		
3+3	22	4.5																		
3+4	34	14.7																		
4+3	19	31.6																		
4+4	10	40																		
9≤	5	60																		
【成果等】	【主な論文発表】 【学会発表】 田代康次郎、本田真理子、笠井奏子、木村章嗣、相川浩一、木村高弘、転移性去勢抵抗性前立腺癌における <i>BRCA</i> 遺伝子検査およびオラパリブの治療成績. 第 37 回前立腺シンポジウム 2022 年 12 月 10-11 日(東京コンファレンスセンター・品川 12/11 口頭) 【その他特筆事項】 田代康次郎 去勢抵抗性前立腺癌、BRCA コンパニオン診断とオラパリブ使用の実際 雑誌泌尿器外科 2023 年 4 月号 (Vol.36 No.4)																			

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

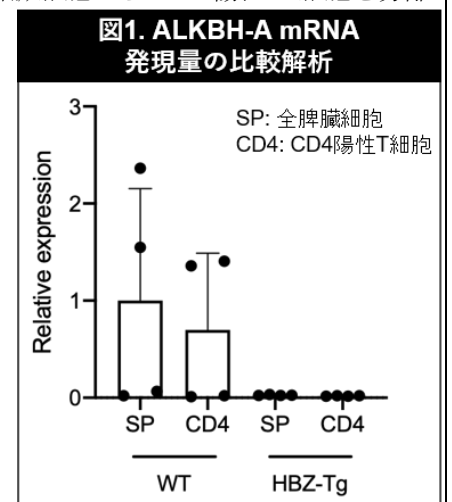
研究課題		新規パイロトーシス阻害剤の構造展開と標的同定研究
研究代表者	所属・職名・氏名	理化学研究所・専任研究員・闌闌孝介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	理化学研究所・研究員・Rajiv Kumar Verma
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	パイロトーシスは細菌が感染したマクロファージで誘導される炎症誘導性のプログラム細胞死の一つであり、近年がんをはじめとして様々な疾患と関連することが報告されるようになってきている。特に皮膚がんなどのある種のがん組織でパイロトーシスは、がん微小環境の形成に関与することで、がんの悪性化に寄与する可能性が報告されている。そこで、本研究では我々が見出した新規パイロトーシス阻害剤を出発点にして、その標的分子の同定や動物モデルへの適用などを経て、新たな創薬ターゲットを見出すことを目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでに我々はパイロトーシス阻害剤として KH 化合物を見出すことに成功している。KH 化合物はリソソームに存在するプロテアーゼの1つカテプシン B の阻害剤をベースにして開発されたもので、カテプシン B と共有結合を形成できる acyloxymethyl ketone (AOMK) という官能基を持つ。一方で本共同研究においてカテプシン B をノックアウトした細胞株を用いた検討を行い、カテプシン B 阻害活性とパイロトーシス阻害活性は相関しないことも明らかにしている。さらに昨年度の検討で、KH 化合物のカテプシン B との相互作用部位を改変した誘導体にもパイロトーシス阻害活性があることもわかった。そこで本年度はカテプシン B を阻害せずに、パイロトーシス阻害活性を持つ化合物を中心に構造展開を進め、さらにその標的の同定を行うことを目指してプローブ開発を進めた。 これまでにアルキンタグおよび AOMK が持つ反応性と独自に開発した解析技術を利用し、KH 類縁化合物がカテプシン B と結合する部位を明らかにすることに成功している。本年度はこの解析技術をさらに広げ、カテプシン B 以外の標的も同定できるプローブを開発すべく、新たなタグの開発や AOMK 部位の構造修飾を進めた。その結果、アルキンタグ以外にも解析に適用可能な新しいタグを見出し、その解析技術を新たに開発することに成功した(論文投稿中、under revision)。さらに AOMK 部位の改変も進め、新しいプローブ分子を得ることに成功した。現在これらプローブに新しい解析技術を適用して標的の同定を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 蛋白質アダクトの同定を目指したアルキンタグ解析技術の開発 第49回日本毒性学会学術年会、札幌、2022年7月1日	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		非乳頭部十二指腸腫瘍における ERBB 受容体ファミリーの解析と治療標的の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学医療人育成センター生物学・教授・佐々木泰史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野・研究協力員・澤田 武
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院胃腸外科・講師・中村慶史
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	本研究の目的は、非乳頭部十二指腸腺腫・進行癌において、ERBB 受容体ファミリーの遺伝子異常を次世代シーケンスで、蛋白発現を免疫組織化学で評価することにより、発癌への関与を明らかにすることである。それにより、十二指腸癌診療における、ERBB 受容体ファミリーの治療標的としての可能性を検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	研究協力施設において内視鏡的もしくは外科的に切除され、保存されている非乳頭部十二指腸腺腫、粘膜内癌、浸潤癌の計 71 病変を対象とした。これらの病変は、複数の消化管専門病理医によって病理学的に再評価され、粘液形質の免疫組織化学 (MUC5AC, MUC6, CD10, MUC2, PG-I) の結果もあわせて小腸型腺腫 32 病変、幽門腺腺腫 6 病変、鋸歯状腺腫 1 病変、小腸型粘膜内癌 12 病変、胃型粘膜内癌 7 病変、浸潤癌 13 病変と診断された。 各病変のホルマリン固定パラフィン包埋切片から DNA 抽出を行い、<i>HER2 (ERBB2)</i>, <i>ERBB3</i>, <i>ERBB4</i> の遺伝子変異、コピー数変化 (遺伝子増幅) の解析を行った。また、並行して EGFR, HER2, ERBB3, ERBB4 の免疫組織化学を施行した。HER2 の免疫組織化学で 2+であった症例のみ、dual color in situ Hybridization (DISH) での評価を行った (図)。 図. 非乳頭部十二指腸腫瘍におけるERBB受容体ファミリーの免疫組織化学、遺伝子変異/増幅 SIA, small intestinal-type adenoma; PGA, pyloric gland adenoma; SA, serrated adenoma; SCA, small intestinal-type intramucosal adenocarcinoma; GCA, gastric-type intramucosal adenocarcinoma; NOS, not otherwise specified; Muc, mucinous adenocarcinoma 今後は ERBB 受容体ファミリーの遺伝子変異/増幅や免疫組織化学の陽性例について、胃型腫瘍と小腸型腫瘍における比較、早期病変と進行癌における比較、各粘液形質マーカー陽性例と陰性例における比較を行い、どのような病変がトラスツズマブなどのモノクローナル抗体薬や、ラパチニブなどのチロシンキナーゼ阻害薬の効果が期待できるかを考察する。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

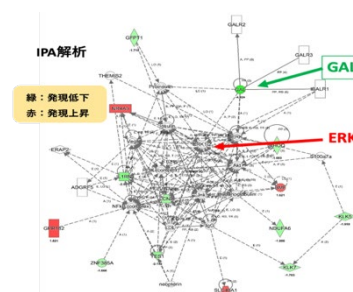
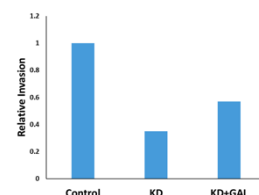
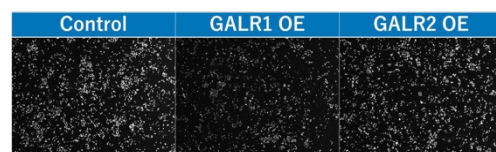
令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍化に寄与するエピゲノム変異の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	川崎医科大学・助教・和田雄治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	川崎医科大学・教授・齊藤峰輝
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	成人 T 細胞白血病 (adult T cell leukemia: ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型 (Human T-cell leukemia virus type 1: HTLV-1) の感染により惹起される予後不良の T 細胞性白血病・リンパ腫である。近年のエピゲノム研究の発展により、がん関連遺伝子のエピジェネティックな制御異常が発がんの要因となる事が指摘されている。本研究では、ATL モデルマウスとして確立されている HTLV-1 bZIP factor (HBZ) トランスジェニックマウス (HBZ-Tg) を用いて、AlkB ホモログ (ALKBH) ファミリーを解析対象とし、ATL の病態形成機序とエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の関連性について探索する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究室のこれまでの研究活動及び令和 2 年度金沢大学がん進展制御研究所共同研究課題:【ATL 発症に関与し新規治療標的となるエピゲノム異常関連長鎖非コード RNA の同定と解析】より、ATL の臨床病態と関連してある種の ALKBH ファミリー (ALKBH-A) の遺伝子発現が制御される事が見出された。令和 4 年度において、ATL 患者由来末梢血単核球 (PBMC) の遺伝子発現動態をより詳細に解析した結果、HTLV-1 の発がん性ウイルスタンパク質である HBZ の mRNA 発現量が、ALKBH-A mRNA 発現量と有意に相関する事が明らかとなった。また、ATL 患者由来 PBMC の DNA メチル化動態を網羅的に解析した既存のデータベースを活用し、ALKBH-A の発現抑制にエピゲノムの変化が関与する可能性を探索した [参照: Watanabe T, <i>et al.</i>, <i>Blood.</i>, 2020.]. その結果、ALKBH-A プロモーター領域の近傍に ATL の病態進行と関連して DNA メチル化動態が変動する領域が確認され、ALKBH-A の遺伝子発現にエピジェネティックな機序が関与する可能性が示唆された。 続いて、令和 3 年度金沢大学がん進展制御研究所共同研究課題:【HTLV-1 感染 T 細胞の腫瘍化に寄与するエピゲノム変異の解析】において採取・保存した HBZ-Tg の脾臓細胞を用いて、ALKBH-A の遺伝子発現動態と HBZ の関連性を探索した。HBZ-Tg は CD4 陽性 T 細胞特異的に HBZ を発現する事から、磁気ビーズ法により脾臓細胞から CD4 陽性 T 細胞を分離し、全脾臓細胞と CD4 陽性 T 細胞の ALKBH-A mRNA 発現量を qRT-PCR 法により比較解析した。その結果、統計学的な有意差は認められなかったが、野生型と比較して HBZ-Tg では ALKBH-A mRNA 発現量が低い傾向が観察され、HBZ により ALKBH-A mRNA の発現が制御される可能性が示唆された (図 1)。また、HBZ-Tg において全脾臓細胞と CD4 陽性 T 細胞の ALKBH-A mRNA 発現量は同程度であった事から、CD4 陽性 T 細胞のみではなく脾臓細胞全体で ALKBH-A mRNA の発現が抑制されている事が示唆された。 以上の成果より、ALKBH-A mRNA の発現は HBZ により制御される事が明らかとなった。また、ALKBH-A の遺伝子発現はエピジェネティックな機序により制御される可能性が推察された。上記の研究成果をまとめ、本研究代表者を筆頭著者として論文投稿を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】	無し
	【学会発表】	1) HTLV-1 感染により制御される ALKBH ファミリー遺伝子発現動態の解析 (口頭発表) 発表者: 和田雄治、第 69 回日本ウイルス学会学術集会、2022 年 10 月、長崎
	【その他特筆事項】	無し

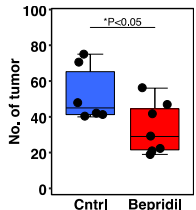


令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ガラニンレセプターGALR2によるがん細胞浸潤抑制分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・田代康介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡 克次
【研究目的】	我々は、術後再発した患者腫瘍と予後良好な患者腫瘍の遺伝子発現を網羅的に解析した結果、神経ペプチド galanin (GAL)が再発群において高発現していることを見出し、さらに、大腸がん由来細胞株 HCT116 を用いた浸潤アッセイにおいて、GALは浸潤に関与することを明らかにしている。本研究では、GALによって制御される下流遺伝子の特定も含めた浸潤の詳細な経路を明らかにすることを最終目的とし、特に、Galanin 受容体による浸潤抑制のシグナル経路を明らかにすることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1) galanin 受容体の機能 まず、galanin ペプチドの受容体として同定されている 3 つの G タンパク質共役型受容体 (GALR1、GALR2、GALR3) について、浸潤への関与を再検討した。GalR1 及び GalR2 の発現が低いがん細胞 HCT116 において、それぞれの過剰発現 DNA を導入したところ、GALR2 の浸潤抑制が認められ、さらに、GALR1 において、強い浸潤抑制活性が検出された (右上図)。一方、GALR3 は HCT116 がん細胞において高発現状態であるが、これを siRNA によってノックダウンしたところ、浸潤の低下が起こること、すなわち、GALR3 は浸潤促進する分子であることが明らかとなった (右下図)。 2) 以前の解析により、Galanin の浸潤促進は、MAP キナーゼカスケードのうち、ERK 経路が関与することを見出していた (右図) が、ERK 阻害剤を添加の効果解析したところ、ERK 阻害剤の添加により Galanin の浸潤促進活性は抑制されることが明らかとなった。一方、興味深いことに GALR1 及び GALR2 による浸潤抑制活性に対する ERK 阻害剤の添加は、抑制活性を低下させることも見出した。 以上の結果より、galanin によるがん細胞浸潤制御において、その受容体 GALR1 及び GALR2 は浸潤抑制に機能する分子であること、また、Galanin による浸潤制御には、MAP キナーゼシグナルが重要であることが明らかとなった。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	ヒト大腸がん由来細胞 HCT116 の浸潤における Galanin 受容体の機能 第 45 回日本分子生物学会 2022 年 12 月 梶塚香月、岡本愛華、田代康介
	【その他特筆事項】	なし



令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		転移性大腸がん幹細胞の未分化性制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・分野長・青木正博
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・主任研究員・藤下晃章
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	がん幹細胞はがん組織内の多様性をもたらし、がんの再発・転移、そして治療抵抗性に深く関与している。申請者らは、転移性大腸がんマウスモデル（CKPS マウス）およびそれから作出した細胞株を利用することで、大腸がんの転移にがん幹細胞性に関与することを明らかにしている。大腸がんの幹細胞性の維持に関わる分子やシグナル経路を同定して大腸がん幹細胞の幹細胞性制御機構を明らかにするとともに、それらを標的とした転移性大腸がん治療戦略の開発につなげることを本研究の目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申込者らは大腸がん関連遺伝子（ <i>Ctnnb1</i> , <i>Kras</i> , <i>p53</i> , <i>Smad4</i> ）の複合変異を腸管上皮細胞に導入することで、肝臓に自然転移する大腸がん自然発症・転移モデル（CKPS マウス）を開発した。この CKPS マウスから樹立した大腸がん細胞株(CKPS 細胞)は、スフェロイド培養時に大腸がん幹細胞マーカーとして知られている ALCAM(CD166)や PROM1 (CD133)などを高発現し、脾臓への移植による肝転移モデルでも強い転移能を有している。 ALCAM や PROM1 の発現レベルを指標として化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施したところ、Rottlerin や Bisindolylmaleimide I など PKC 阻害薬、Bezamil や Dichlorobenzamil など一部のカルシウムチャネル阻害薬が ALCAM の発現を抑制することが分かった。そこで、これらの阻害薬の標的シグナル経路が大腸がんのがん幹細胞性維持に関与する可能性について検討した。また、Ca ²⁺ チャネル阻害薬 Bepiridil について、CKPS 細胞の移植モデルにおいて肝転移を抑制するかどうかを検証した。 <u>大腸がんのがん幹細胞性維持における PKC 経路の役割の検討</u> Rottlerin や Bisindolylmaleimide I など PKC 阻害薬が3次元培養条件下における CKPS 細胞の ALCAM の発現を抑制したことから、他の PKC 阻害薬についても検討したが Sotrastaurin および GSK690693 を処置しても ALCAM や PROM1 の発現抑制効果は認められなかった。このことから Rottlerin や Bisindolylmaleimide I などによる ALCAM 抑制効果はオフターゲットによるものと推測され、PKC 経路自体ががん幹細胞性に関わる可能性は低いと考えられた。 <u>Ca²⁺チャネル阻害薬の大腸がん転移抑制効果の検討</u> CKPS 細胞をマウスの脾臓へ移植することで肝転移巣を形成させるモデルを用いて、Ca ²⁺ チャネル阻害薬 Bepiridil の効果を検討した。CKPS 細胞移植5日後から Bepiridil 20 mg/kg を経口投与し、移植開始から20日後における肝転移巣の数を測定したところ、コントロール群（52±14）と比較して、Bepiridil 投与群（33±10）で減少する傾向が認められた(右図)。	
		
【成果等】	【主な論文発表】	Fujishita T, Kojima Y, Kajino-Sakamoto R, Mishiro-Sato E, Shimizu Y, Hosoda W, Yamaguchi R, Taketo MM, Aoki M. The cAMP/PKA/CREB and TGFβ/SMAD4 Pathways Regulate Stemness and Metastatic Potential in Colorectal Cancer Cells. Cancer Res. 2022;82(22):4179-4190.
	【学会発表】	マウスモデルを用いた大腸がんの幹細胞性・転移形成能に関与するシグナル経路の解析 青木 正博、武藤 誠、藤下 晃章 Tumor microenvironment-related pathways critical for stemness and metastatic potential of colorectal cancer 青木 正博、武藤 誠、藤下 晃章 第82回日本癌学会学術総会 Transposon-based screening of metastasis-related genes in a colorectal cancer mouse model 藤下晃章、梶野リエ、小島康、三城恵美、武藤誠、青木正博 第82回日本癌学会学術総会
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん悪性化のエピジェネティック制御におけるメディエーター複合体キナーゼモジュールの役割
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・学術研究部 薬学・和漢系・准教授 廣瀬 豊
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 鈴木 健之
【研究目的】	上皮間葉転換（EMT）は、がん悪性化過程にみられる細胞運命変換プロセスであり、遺伝子発現ネットワークの大規模な再構築を必要とする。この過程を制御する分子メカニズムの解明はがん進展制御において重要な課題となっている。CDK8/19 は転写メディエーター複合体キナーゼモジュール(KM)を構成し、様々な転写・クロマチン制御因子のリン酸化を介して転写を正または負に調節する。本共同研究では、TGF-β 誘導性 EMT の転写・エピジェネティック制御における KM とその新規相互作用因子 CHD3/4 の関与を検証し、そのメカニズムを分子・細胞レベルで解明することを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	メディエーター複合体は、エンハンサー依存性の転写開始過程に必須であり、多様な転写制御シグナルを統合する巨大複合体である。この複合体を構成するキナーゼモジュール(KM)は、CDK8, Cyclin C, MED12, MED13 の4つのサブユニットから構成され、メディエーターサブユニットや種々の転写制御因子のリン酸化を介して、細胞の運命決定や環境応答における転写制御において重要な役割を果たす。 これまでに、KM の機能解明のため CDK8 および CDK19 (CDK8 と機能重複した脊椎動物パラログ)の新規相互作用因子を検索し、クロマチン再構築複合体 NuRD のサブユニット CHD3/4 を同定した。続いて CDK8 と CHD4 によって共制御される遺伝子群を ChIP-seq/RNA-seq データをもとに検索したところ、TGF-β 経路を含むがん関連経路の遺伝子が濃縮されていた。そこで、TGF-β 誘導性転写制御への KM、CHD3/4 の関与を、A549 肺がん細胞株をもちいて解析した。 CDK8/19 の二重抑制または CHD4 の抑制によって、TGF-β 刺激による間葉系マーカー <i>VIM</i> や EMT 制御マスター転写因子 <i>SNAIL</i> の発現誘導が阻害された。特に CHD4 の単独抑制によって非常に強い抑制が観察された。さらに薬剤による CDK8/19 キナーゼ阻害によっても <i>SNAIL</i> 発現が阻害され、E-カドヘリンの発現が脱抑制されることを見出した。これらの結果から、KM および CHD4 が TGF-β 誘導性 <i>SNAIL</i> 転写活性化に必要であり、EMT を制御する遺伝子発現ネットワークの再構築に関与することが示唆された。さらにこの TGF-β 依存性 <i>SNAIL</i> 活性化のメカニズムを ChIP で解析したところ、TGF-β 刺激によって <i>SNAIL</i> プロモーターへの CHD4 の局在が増大した。したがって、CHD4 は <i>SNAIL</i> 転写を直接活性化している可能性が示唆された。 NuRD 複合体は通常転写抑制に機能するため、今後はこのような非標準的な CHD4 による転写活性化の分子機構をさらに解析していく予定である。さらに近年、TGF-β 誘導性遺伝子発現調節に複数の長鎖非コード RNA (lncRNA) が関与することが報告されているため、KM、CHD4 および TGF-β 誘導性 lncRNA との機能的相互作用の解析も行いたいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1) Endo.K <i>et al.</i> "Molecular mechanism of coupling between transcription and alternative polyadenylation" 第23回日本RNA学会年会2022年7月20～22, 京都 2) 中山皓介 等「試験管内再構成系を用いたヒトメディエーター複合体 Kinase モジュールの生化学的機能解析」日本薬学会北陸支部 第134回例会2022年11月20日, 富山 (他、7件)	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		植物抽出物によるヒト肺腺がん由来細胞株の増殖抑制に関与する遺伝子群の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	昭和女子大学大学院・教授・高尾哲也
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	順天堂大学大学院・非常勤助教・須賀比奈子
	所属・職名・氏名	新郷中央診療所・院長・野村将春
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	アブラナ科野菜は肺がんの発症率を低下させることが報告されている。申請者らは2020年、アブラナ科以外の植物抽出物から、肺腺がん細胞の増殖を抑制するものを見出した。2021年より貴研究所の共同研究に採択していただき、肺腺がん由来細胞株 PC-9, A549, H838 などで、植物抽出物の効果を確認した。本研究の目的は、植物抽出物による肺腺がん細胞の増殖抑制に関与する分子機構を明らかにし、肺腺がんの新規予防法や治療法の開発に応用することである。この研究を進める前に、移植マウスモデルを用いた植物抽出物の抗腫瘍作用の検討が必要であると考え、第2の目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	(1) 肺腺がん由来細胞株 PC-9 は EGFR 遺伝子、A549 は KRAS 遺伝子に変異があり、H838 は EGFR 遺伝子にも KRAS 遺伝子にも変異が無い。本研究では、p53 遺伝子が欠損し NRAS 遺伝子に変異がある肺大細胞がん由来細胞株 H1299 を用いて、植物抽出物が細胞増殖を抑制するかどうかを調べた。その結果、植物抽出物は H1299 細胞の増殖を強く抑制することが確認できた。このことから、この植物抽出物の作用は、EGFR や KRAS だけでなく、p53 や NRAS の活性には関与していないことが考えられた。 H1299 細胞に、様々な濃度の植物抽出物を添加し、細胞増殖抑制効果について調べたところ、細胞増殖抑制は植物抽出物の濃度依存적であることが分かった。また、H1299 細胞に、様々な濃度の植物抽出物を添加し、細胞の形態を顕微鏡で観察したところ、細胞の形態は植物抽出物の濃度依存的に変化することが分かった。 乳がん由来細胞株 MCF7 では植物抽出物の細胞増殖抑制作用が低いことを明らかにしている。今後、肺正常細胞を用いて、植物抽出物の作用を比較し、植物抽出物による肺腺がん細胞の増殖抑制に関与する分子機構を解明したい。 (2) 本研究では、肺腺がん細胞の移植マウスモデルを作製し、植物抽出物の抗腫瘍作用の検討を行った。具体的には、ヒト肺腺がん由来細胞を、ヌードマウスに皮下投与した。プレリミナリーな結果ではあるが、約2ヶ月間、腫瘍サイズの計測を行うことにより、腫瘍の形成を確認した。また、この移植マウスを用いて、植物抽出物の抗腫瘍作用の検討を行った。今後、n数を増やし、植物抽出物による肺腺がん細胞の増殖抑制に関与する分子機構を解明したい。 本研究に必要な動物実験の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(平成25年環境省告示84号)、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」(平成18年文部科学省告示第71号)に基づいて制定された順天堂大学動物実験等管理規則を遵守して行った。実験はいわゆる3Rに基づいて計画し、順天堂大学動物実験委員会に計画書を提出し審議の上、受理されている。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 高尾恭一, 須賀比奈子, 野村将春, 後藤典子「ヒト肺がん由来細胞株 H1299 に対する植物抽出物の増殖抑制活性の解析」2023年3月、日本生理学会 第100回記念大会(京都)	
	【その他特筆事項】	

令和4年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん幹細胞マーカーCD44の発現を抑制する薬剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・助教・谷村信行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・特定研究員・三野彰久
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・大学院生・Liu Tien-Hsuan
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・教授・藤田恭之
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	現在の主要ながんの診断や治療は、がん原性の変異が蓄積し、がん化が進展したものを対象としている。一方、がん発生の初期段階において、変異細胞の悪性化を阻害することはがん治療にとって重要であると考えられる。しかし、初期段階のがん細胞を対象とした研究は十分に進んではいない。そこで、本研究では、がん発生の初期段階を培養細胞系を用いて再現し、そこで発現上昇する膜貫通型糖タンパク質 CD44v6 に着目した。CD44v6 はがんの進展に関与することが示唆されているため、この発現を減少させる分子機構を解明することを目的とする。これにより、初期のがん細胞の悪性化を抑制する方法を開発できると考えられる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	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、がん幹細胞マーカーである膜貫通型糖タンパク質 CD44 の発現が上昇することがわかっている。CD44 にはいくつかの variant が存在するが、がんの転移に関与することが知られている CD44 variant 6 (CD44v6) に着目した。実際、CD44v6 は、RasV12 を発現するマウス乳腺上皮細胞での発現上昇が観察され、さらに、後藤典子教授にご提供頂いた乳がんモデルマウス (MMTV-ErbB2 マウス) の乳腺上皮においても発現が上昇することが示唆された。以上のことから、CD44v6 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たため、上述の RasV12 を発現するマウス乳腺上皮細胞を用いて、CD44v6 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、CD44v6 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 CD44v6 発現量抑制の強い効果を示すこと、さらに、組み合わせることにより、それぞれの薬剤濃度を減少させることができることが示された。また、生体内での薬剤効果を検証するため、強い効果を示した薬剤のうち、MEK 阻害剤である trametinib を脾臓がんモデルマウスに投与した結果、前がん病変の形成が抑制され、残存する前がん病変での CD44v6 発現量が減少することが示唆された (図 1)。今後は、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。 最後になりましたが、がん進展制御研究所からのご支援と共同研究を行なって頂いた分子病態研究分野の後藤典子教授に深く感謝致します。	
【成果等】	【主な論文発表】 Kuromiya K, Aoki K, Ishibashi K, Yotabun M, Sekai M, <u>Tanimura N</u>, (他 14 名) Hino N, Fujita Y. Cell Rep. 2022 Jul 12;40(2):111078. Mori Y, Shiratsuchi N, Sato N, Chaya A, <u>Tanimura N</u>, Ishikawa S, Kato M, Kameda I, Kon S, Haraoka Y, Ishitani T, Fujita Y. Curr Biol. 2022 May 23;32(10):2144-2159.e5.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

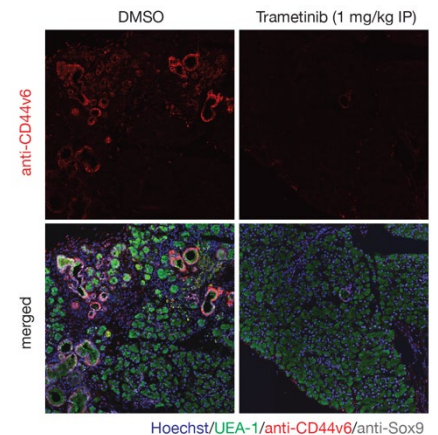
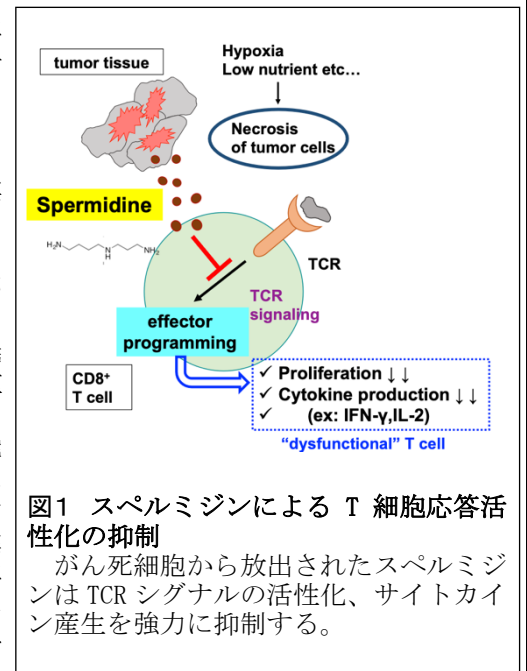


図 1. MEK 阻害剤 trametinib 投与により前がん病変の形成が抑制される

研究課題		がん微小環境における抗腫瘍免疫抑制機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授・柳井秀元
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員・日比野沙奈
	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員・衛藤翔太郎
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	腫瘍免疫応答を抑制するがん死細胞由来分子について探索を行い、オンコメタボライト（スperlミジン）を同定した。スperlミジンは、大腸がんや膵臓がん患者唾液中において高値に検出されることが知られており、がん細胞の増殖に作用することも報告されているが、細胞外スperlミジンが抗腫瘍免疫応答を抑制することについてはあまり解析がなされていない。本研究において、スperlミジンによるT細胞応答抑制機構の解明、およびスperlミジン阻害とICBの併用療法による腫瘍抑制効果について検討する。またさらに、新規に見出しつつある死細胞由来免疫制御分子についても解明を進める。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	スperlミジンによるT細胞活性化の抑制メカニズムの解明を目指して研究を進めた。これまでの解析から、スperlミジンがCD8⁺T細胞の活性化を <i>in vitro</i> において抑制することを見出している(図1)。しかしながらスperlミジンがどのようにCD8⁺T細胞に取り込まれ、また活性化を抑制するのか、メカニズムの詳細が不明であった。そこで <i>in vitro</i> の培養系を用いて、スperlミジンのT細胞活性化に及ぼす影響を遺伝子発現レベルで解析した。その結果、スperlミジンがCD8⁺T細胞中のコレステロール合成に影響を及ぼすことを示唆するような知見が得られた。今後スperlミジンによるコレステロール合成制御がT細胞活性化に及ぼす影響について検討を進める予定である。 また、B16F10細胞の担がんマウスにおいてスperlミジン合成阻害剤の投与によりCD8⁺T細胞の活性化が促進される知見が得られた。癌細胞自身のポリアミン合成や取り込み機構を標的としたポリアミン阻害療法は、神経芽腫をはじめとする種々の癌種に対して治療効果を発揮し、臨床試験も実施されている(Gamble <i>et al. Sci Transl Med.</i> 2019)。また、ポリアミン阻害療法を行った担癌マウスの免疫学的解析を行った報告は複数あるが(Hayes <i>et al. Cancer Immunol Res.</i> 2014 など)、いずれも免疫細胞自身のポリアミン合成系の意義という視点から研究がなされており、細胞外(=腫瘍局所)に過剰に存在する癌細胞由来のポリアミンがT細胞を中心とした腫瘍浸潤免疫細胞の機能に対して直接的に与える影響については明らかにされてこなかった。本研究においてスperlミジン合成阻害剤の投与が腫瘍中のT細胞活性化を促進することを初めて見出した。ここにも細胞外スperlミジンによるコレステロール合成制御が関与しているのかどうか解析する。またヒト腫瘍病態への関与についても検討を行いたい。	
【成果等】	【主な論文発表】	



【学会発表】

柳井秀元. 細胞死による炎症・免疫反応を標的とした制がん, 第 26 回日本がん分子標的治療学会, シンポジウム, 2022

柳井秀元. がん死細胞由来分子による腫瘍中の免疫微小環境制御の解析, 第 43 回日本炎症・再生医学会, シンポジウム, 2022

柳井秀元. TCTP による免疫抑制とがん増殖機構, 第 30 回日本 Cell Death 学会, シンポジウム, 2022

Yanai H. Modulation of tumor immune responses by dead cell-derived molecules, Asian Oncology Society AOS2022, Symposium, 2022

【その他特筆事項】

研究課題		テロメアを介したオートファジー制御と発癌機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	香川大学・准教授・水津 太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	香川大学・教授・松田陽子
	所属・職名・氏名	香川大学・技術職員・山川けいこ
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵発癌過程では、加齢によるテロメア長の短縮と、染色体異常の蓄積を伴った膵管上皮細胞が増殖する過形成を経て前癌病変へと進展し、癌が惹起される。本研究では、細胞の複製老化および、テロメアクライシス期におけるテロメア制御因子や TERRA によるオートファジー制御および、細胞死の分子機構解明に向けた解析を進める。これら一連の細胞の老化を伴う細胞死制御と膵発癌の分子機序の解明により、超高齢化社会における、癌の予防、診断、治療に結び付く効果的な臨床応用を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	難治性癌の代表である膵癌の罹患率は60歳から上昇し、高齢になるほど高くなることから、加齢が膵発癌や癌進展を促進すると考えられている。我々はこれまでに、膵発癌の過程（正常な膵管上皮⇒前癌病変 PanIN; pancreatic intraepithelial neoplasia⇒膵癌）において、染色体末端のテロメア長の短小化が病理組織学的異常の発生前から始まっていること、テロメア長の短縮の最も大きな原因は加齢であることを明らかにした（図1, Matsuda et al. <i>PLoS ONE</i>, 2015）。通常細胞は、テロメアの短小化によって複製老化および、テロメアクライシスと呼ばれる状態に陥る。短小化したテロメアは DNA 損傷として認識され、DNA 修復反応とともに不可逆的な細胞周期停止により、細胞の腫瘍化の原因となりうる染色体異常が抑えられる（図2）。この間、ほぼすべての細胞は死滅するため、腫瘍化細胞の出現は非常にまれである。しかし、ごく一部の細胞は、細胞死を回避し増殖し続ける能力を獲得することによって染色体異常が蓄積し、それが細胞の腫瘍化を駆動する原因となる。それゆえに、複製老化およびテロメアクライシス期の細胞死は、重要な腫瘍抑制チェックポイント経路と考えられている（図2）。近年、細胞のオートファジー（自食作用）活性化がこのテロメアクライシス期の細胞死に必須であることが報告された（図2, Nassour et al. <i>Nature</i>, 2019）。 本研究ではこれまでに、テロメア領域から発現する一本鎖非翻訳 RNA TERRA (telomeric repeat-containing RNA) の発現がオートファジー活性に重要であることを見出した（図3、投稿準備中）。したがって、膵癌の発生は、遺伝的要因や環境要因だけでなく、加齢に伴う TERRA 発現やオートファジー活性の低下が、癌化イニシエーションの中心的役割を担うと推察できる。今後は、これまでに解析結果を基に、細胞の複製老化および、テロメアクライシス期におけるテロメア制御因子や TERRA によるオートファジー制御および、細胞死分子機構解明に向けた解析を進める。これら一連の加齢に伴った膵発癌の分子機序の解明により、超高齢化社会における、より効率的な癌の予防、診断、治療に結び付く臨床応用を目指す。 膵癌のテロメアFISH像 赤、テロメア; 緑、セントロメア; 青、DAPI 図1. 膵癌の発癌進展過程におけるテロメア長の短縮 図2. 加齢にともなうテロメア長、オートファジー活性、細胞死、腫瘍化との関係 sham TERRA 図3. 膵癌細胞株 PANC-1 への TERRA 過剰発現による細胞死の誘導	
【成果等】	【主な論文発表】	Matsuda Y, Ye J, Yamakawa K, Mukai Y, Azuma K, Wu L, Masutomi K, Yamashita T, Daigo Y, Miyagi Y, Yokose T, Oshima T, Ito H, Morinaga S, Kishida T, Minamoto T, Kojima M, Kaneko S, Haba R, Kontani K, Kanaji N, Okano K, Muto-Ishizuka, Yokohira M, Saoo K, Imaida K, Suizu F*. <i>Journal of the National Cancer Institute</i> . 26: djac226 (2022)
	【学会発表】	該当なし
	【その他特筆事項】	特記事項なし