

令和5年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2024.4

金沢大学がん進展制御研究所

令和 5 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		がん治療薬誘導性間質細胞老化の分子病態の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・学長特命教授・坂本毅治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・助教・田中伯享
	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・大学院生・Vu Duc Anh
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	多くのがん治療薬は細胞老化を誘導するが、生体での細胞老化がどのようにがん治療に影響を及ぼすかは不明な点が多い。我々はがん治療薬投与により間質細胞に誘導される細胞老化の分子病態を理解・制御することで、既存薬の負の作用を排除し治療効果を最大化するがん治療法の創成が可能ではないかと考えた。そこで本研究では、最新のテクノロジーである老化細胞可視化・除去マウスを利用することで、これまで解析が困難であったがん治療薬投与による腫瘍間質の細胞老化の誘導機構とがん治療効果への影響を解析し、治療により誘導される間質老化細胞の影響の除去が既存がん治療薬の治療効果の改善につながるか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。)	今年度は化学療法・分子標的治療薬による治療誘導性間質細胞老化モデルの確立を行った。治療薬として作用機序の異なる細胞傷害性抗がん剤と分子標的治療薬を用い、より実際の腫瘍環境に近づけるため同所移植モデルを用いて間質老化細胞の解析を行った。 1. トリプルネガティブ乳がん化学療法モデル トリプルネガティブ乳がんはパクリタキセルなどの細胞傷害性抗がん剤が標準治療となっている。そこでマウストリプルネガティブ乳がん細胞株 E0771 の乳腺 fat pad 移植を行い、パクリタキセルを週 2 回投与し、タモキシフェン投与により老化細胞を可視化した。その結果、E0771 腫瘍には局在指向性を持って老化細胞が存在し、細胞マーカーの免疫染色により、老化細胞の主体を形成する間質細胞を同定した。また、タモキシフェン投与により同様の間質細胞での老化細胞の数が増加する傾向が明らかとなった。 2. 肺がん分子標的治療薬治療モデル KrasG12C 変異阻害剤（ソトラシブ）は本邦において 2022 年から非小細胞肺がんの新たな治療薬として上市されている。本薬剤に対し Kras の新たな獲得変異の存在が共同研究者の田中らの研究で明らかになっている (Tanaka N et al., Cancer Discov, 2021) が、間質細胞による治療抵抗性への影響は未だ明らかではない。そこで本モデルでは KrasG12C 変異を持つマウス肺がん細胞 LLC を尾静脈移植し、肺に生着した腫瘍の老化細胞の検出を試みた。LLC 細胞は KRAS G12C を有しているが、NRAS にも変異があるためソトラシブに抵抗性を示すため、まず CRISPR/Cas9 を用いて NRAS KO LLC 細胞を作製した。NRAS KO LLC 細胞の尾静脈移植で肺に生着した腫瘍間質の老化細胞を検出したが、E0771 腫瘍と異なり腫瘍移植により発生する明確な老化細胞は観察されなかった。また、ソトラシブ投与による間質細胞老化の影響を確認しようとしたが、NRAS KO LLC 細胞へのソトラシブの効果が強く数回の投与で腫瘍がほぼ消失していたため、投薬条件の検討に着手した。また、肺転移での散在性腫瘍での解析が困難であるため、肺への直接同所移植の実験系の構築に着手した。	
【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5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に培養し、コンフルエントとなった後に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1)。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が確認された。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。 さらに、基底側から圧を加えた際の細胞の運動能の変化を評価するため、圧を加えながらtime-lapse imagingが可能な装置を作成して検討を行った。その結果、基底側から圧を加えた条件では細胞運動の亢進が認められた(図2)。 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。 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】	なし
	【学会発表】	Tokuda S, Onoi K, Yamada T, Takayama K. ‘ ‘Effects of interstitial pressure on lung cancer cells’ ’ AACR Annual Meeting 83: 594. 2023.
	【その他特筆事項】	なし

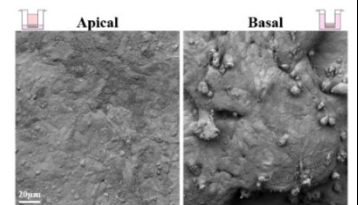


図1：間質圧による上皮の重層化
肺癌細胞の走査型電子顕微鏡図。基底側からの圧によって上皮の重層化が引き起こされた。

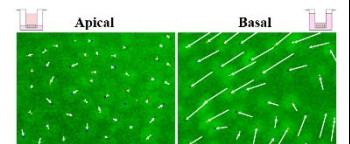
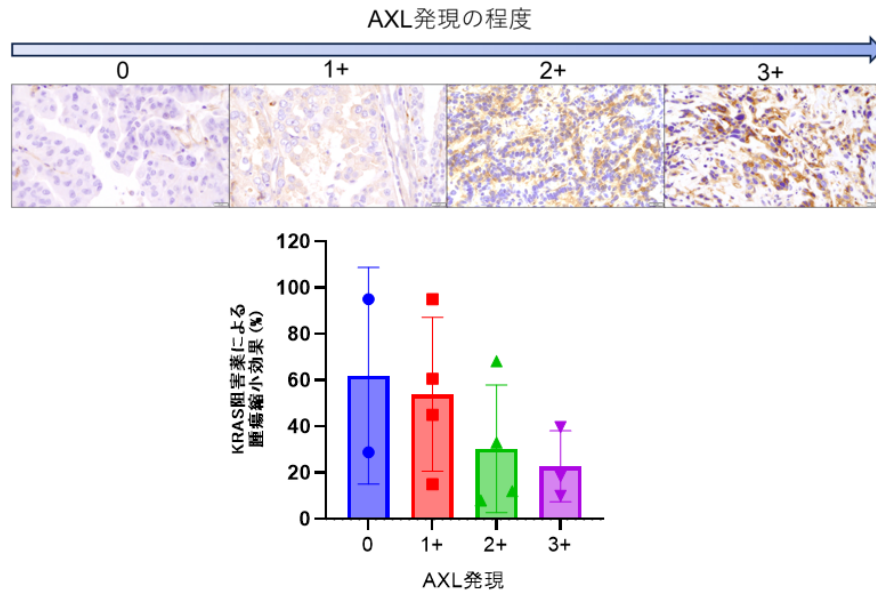


図2：間質圧による癌細胞の運動能の亢進
核を標識した肺癌細胞の30分間での移動距離(矢印)。基底側からの圧によって運動能の亢進が引き起こされた。

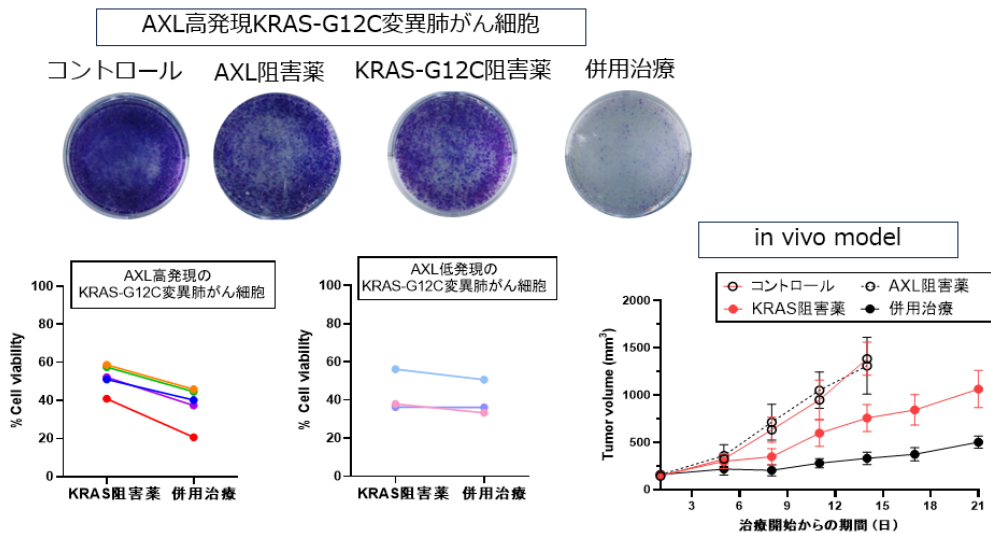
研究課題		KRASG12C 変異陽性肺がんを対象とした、初期治療抵抗性に関わる機構とその克服法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院医学研究科呼吸器内科学 助教 森本健司
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院医学研究科呼吸器内科学 教授 高山浩一
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院医学研究科呼吸器内科学 准教授 山田忠明
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	本邦において希少肺癌である,KRAS-G12C 変異を有する肺がんを対象に「分子標的薬の初期抵抗性に関わるキナーゼシグナル伝達の解明とその克服治療法開発」を行う。具体的には、分子標的治療薬である KRAS-G12C 阻害薬の開始時に誘導される薬剤抵抗性に関わるキナーゼシグナルを解明し、その克服に向けた治療法の開発を行う。in vitro および in vivo 研究を通じ、「初期治療抵抗性」に関わる分子生物学的特性を明らかにし、効果予測因子の同定および治療介入方法を検討する。さらに患者から採取した臨床検体を用いて効果予測因子の意義を検証し、臨床応用に発展させることを最終目標とする。	
【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。)	KRAS-G12C 変異肺がん細胞に KRAS-G12C 阻害薬を投与しても、一部のがん細胞は「初期治療抵抗性」によって生存する。今回の研究では、初期治療抵抗性のメカニズムに AXL シグナルの活性化が関与することを明らかにした。加えて、KRAS-G12C 阻害薬を投与されたがん細胞は、転写因子である YAP が核内に移行し,AXL シグナルの活性化誘導因子である Gas6 の産生を増加させ,AXL シグナルを活性化させることを明らかにした (図 1)。 図1 また、KRAS-G12C 変異肺がん患者では、AXL タンパクの発現の多寡によって、KRAS-G12C 阻害薬の治療効果が不良となる集団を選別できる可能性が示唆された (図 2)。	

図2: AXLが高発現しているKRAS-G12C変異肺がんでは、KRAS阻害薬による腫瘍縮小効果が低い。



さらに、AXL タンパクが高発現した KRAS-G12C 変異肺がんでは、初期治療から AXL 阻害薬と KRAS-G12C 阻害薬を併用することで、がんの「初期治療抵抗性」を克服し、再発までの期間を大幅に延長することができる可能性を示した (図 3)。

図 3 : KRAS-G12C阻害薬単独では、治療抵抗性によりがん細胞は生存するが、AXL阻害薬の併用によって、がん細胞の増殖を強く抑制する。



本研究成果をもとに、KRAS-G12C 変異肺がんの個別化医療が推進され、その治療成績の向上に寄与することが期待される。

【成 果 等】

【主な論文発表】

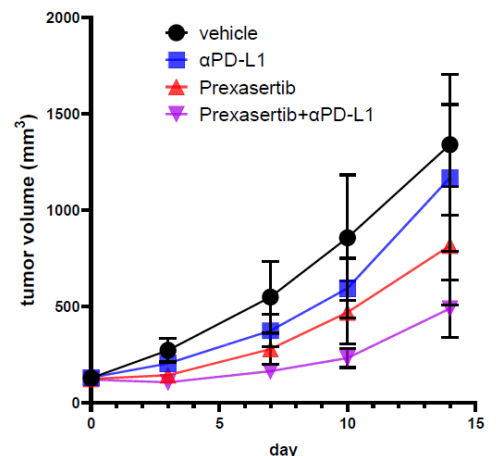
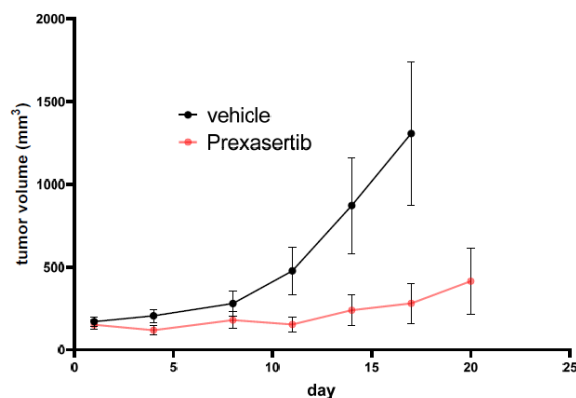
Morimoto K, Yamada T, Hirai S, Katayama Y, Fukui S, Sawada R, Tachibana Y, Matsui Y, Nakamura R, Ishida M, Kawachi H, Kunimasa K, Sasaki T, Nishida M, Furuya N, Watanabe S, Shiotsu S, Nishioka N, Horinaka M, Sakai T, Uehara H, Yano S, Son BK, Tokuda S, Takayama K. AXL signal mediates adaptive resistance to KRAS G12C inhibitors in KRAS G12C-mutant tumor cells. Cancer Lett. 2024 Feb 9;587:216692.

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	【学会発表】 2023 年 11 月 3 日 第 64 回 日本肺癌学会学術集会 シンポジウム 11 「ドライバー遺伝子変異肺癌の治癒に向けて ートランスレーション研究ー」 森本健司, 山田忠明, 平井聡一, 片山勇輝, 國政啓, 佐々木高明, 西田真, 渡部聡, 塩津伸介, 西岡直哉, 矢野聖二, 上原久典, 徳田深作, 高山浩一
	【その他特筆事項】 なし.

令和 5 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		悪性胸膜中皮腫における DNA 修復機構阻害薬がもたらすがん免疫賦活化作用の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	長崎大学病院がん診療センター・講師・谷口 寛和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・教授・迎 寛
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・病院講師・竹本 真之輔
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・大学院生・赤城 和優
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・大学院生・小野 沙和奈
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	悪性胸膜中皮腫(MPM)は、治療選択肢が限られ、予後が極めて不良な疾患である。しかし、症例数が少ない稀少疾患であるため、臨床試験を実施するのが困難であり、治療法の開発が遅れている。そのため、本研究課題においては、他の疾患で臨床開発中である DNA 修復機構阻害薬と、既に臨床応用されている抗 PD-L1 抗体との併用効果とその機序を、分子レベルで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。)	MPM では正常組織と比較して、DNA 修復機構に関わる CHK1 が高発現であることを GEO profile で確認した。また、CHK1 高発現群は低発現群と比較して予後不良であることを TCGA の MPM コホートで確認した。以上から、今回 DNA 修復機構阻害薬として CHK1 阻害薬である Prexasertib(Prexa)に着目した。 ヒト MPM 細胞株である H2052・Mesol、マウス MPM 細胞株である AB1 を用いて MTT アッセイを行い、Prexa は MPM のキードラッグであるシスプラチンを上回る抗腫瘍効果を示した。また、アポトーシスアッセイにより、Prexa はアポトーシスを惹起することを示した。 次に、Prexa 投与により type I インターフェロン、type II インターフェロン、CXCL10、CCL5 の mRNA 発現が上昇することを qRT-PCR で確認し、STING パスウェイ (STING・TBK-1・IRF-3) の活性化を来すことをウエスタンブロットで確認した。これにより、Prexa による免疫賦活化作用が示唆された。 さらに、Prexa 投与や CHK1 のノックダウンにより、PD-L1 の発現が上昇することをウエスタンブロットやフローサイトメトリーで確認した。これにより、Prexa と抗 PD-L1 抗体を併用することで、抗腫瘍効果や免疫賦活化作用の増強が期待された。 上記の in vitro で得られた結果と仮説を検証するため、in vivo の実験に移行した。まず、Balbc マウスに AB1 を皮下移植し、皮下腫瘍モデルを作成した。本モデルマウスで vehicle 群と Prexa 群に分けて薬剤投与を行い、腫瘍体積を比較したところ、Prexa 群で有意な抗腫瘍効果を示した(図 1)。 次に、①vehicle・②PD-L1 阻害剤・③Prexa・④Prexa+PD-L1 阻害剤の 4 群に分けて薬剤投与を行い、腫瘍体積を比較したところ④で最も抗腫瘍効果が高い傾向があったが、有意差がなかった(図 2)。これは免疫能が保たれた Balbc マウスでは腫瘍生着のバラつきが大きいことが一因と考えられた。マウス間でのバラつきを最小限に止めるため、本来 MPM の微小環境である胸腔内に腫瘍を生着させる方針とした。金沢大学がん制御研究所で確立された手技をレクチャー頂き、長崎大学で AB1 を Balbc マウスの胸腔内に移植して胸膜播種モデルの作成を試みたところ、比較的良好な生着が得られた。本成果は共同研究の賜物であると考え。今後は、胸膜播種モデルを用いて Prexa と抗 PD-L1 抗体の併用効果を再検する方針である。 (図 1) (図 2)	



令和 5 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】 なし
	【学会発表】 なし
	【その他特筆事項】 なし

令和5年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		遺伝子変異マウスモデルを用いた潰瘍性大腸炎関連癌における発癌・癌進展機序の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪公立大学・大学院生・楠由希奈
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪公立大学・教授・大谷直子
	所属・職名・氏名	大阪公立大学・助教・神谷知憲
	所属・職名・氏名	大阪公立大学・大学院生・西山毅
	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】	潰瘍性大腸炎(UC)が原因となる UE 関連癌(UC-CRC)の発症には[炎症→再生→異形成→癌腫の形成]が提唱されるが、散発性大腸癌に準じた治療法が選択されることが多いことから、UC-CRC のがん微小環境の詳細な解明が必要である。本研究では、腸管炎症と遺伝子変異により発症した腫瘍や前癌病変を中心とする癌微小環境を反映した UC-CRC マウスモデル解析系構築し、炎症母地より発癌誘導する免疫細胞と癌進展の関連性に着目して、免疫細胞との相互作用の解明を試みる。そこで、病理画像上の位置情報を保ったまま、場所ごとの遺伝子発現を網羅的に測定することができる空間トランスクリプトーム解析を実施し、本解析を基盤に腫瘍細胞と免疫細胞が相互に作用しながら癌進展する分子機構及びその制御破綻を時空間な視点から解析することで、UC-CRC が微小環境の全容解明を目的とした。	
【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。)	本研究では、腸管炎症と遺伝子変異により発症した腫瘍や前癌病変を中心とする癌微小環境を反映した UC-CRC マウスモデル解析系構築し、炎症母地より発癌誘導する免疫細胞の時系列的な機能変化と癌進展の関連性に着目して、免疫細胞との相互作用の解明を試みた。 ① UC-CRC マウスモデル：臨床に即したがんの発生過程(発生・進展)を再現し、微小環境を含めた癌組織構造を再現するため、マウスに DSS を投与して遺伝子変異導入前に腸管炎症状態を作り、遺伝子変異大腸がんマウスを用いた(Tgfr2^{f1/f1}、Trp53^{LSL-R270H}、Fbxw7^{f1/f1}、Villin-CreER：TPF マウス)。炎症の継続時期、解剖時期は検討し、5 週より 12 週まで隔週で DSS を 1 週間投与し、9 週よりタモキシフェン 1 回/週を 4 回で遺伝子変異導入し、13 週に解剖とした。解剖後、腸管スライスロールを作成し、腸管炎症・前癌病変・腫瘍を含む FFPE サンプルを作成した。病理組織学的に前腫瘍病変・腫瘍・炎症の組織像の評価を行った。13 週で解剖した。9 匹(雄 5 匹、雌 4 匹)のうち、7 匹に前腫瘍病変認め、1 匹腫瘍病変を認めた。 ② 空間トランスクリプトーム解析による tumor と免疫細胞のクロストーク解明：①で得られた tumor が発生したマウスの腸管 FFPE と、前腫瘍病変を認めたマウス腸管の FFPE の 2 検体で空間トランスクリプトーム解析を行った。Seurat を用いた解析を行い、2 検体のサンプルをインテグレーションした後、UMAP(uniform manifold approximation)を用いてクラスタリングを行った。Resolution=1.2 にて C0-C23 の 24 のクラスターを認めた。それぞれのクラスターについてマーカー遺伝子の発現を比較し、どのような集団であるかを特定した。 また、潰瘍、腫瘍、前腫瘍病変、リンパ濾胞、といった病理像の情報も追加し、どのクラスターに属するかも調べた。上皮細胞集団を特定する際、クラスターが腸管の局在を特徴とする分かれ方も認めたため、近位(proximal)、中間(middle)、遠位(distal)といった局在の情報も追加した。上皮細胞のクラスターを元に、全領域も局在をマニュアルで選定し、局在分けを行なった。腸管スライスロール像では、位置関係が離れているスポット同士が一部近づいてしまっているため、腫瘍が属する局在で subset し解析することとした。更に詳細なクラスタリングを行い、また位置関係を加味したクラスター同士の相互作用解析を行なっていく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 未	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】	

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

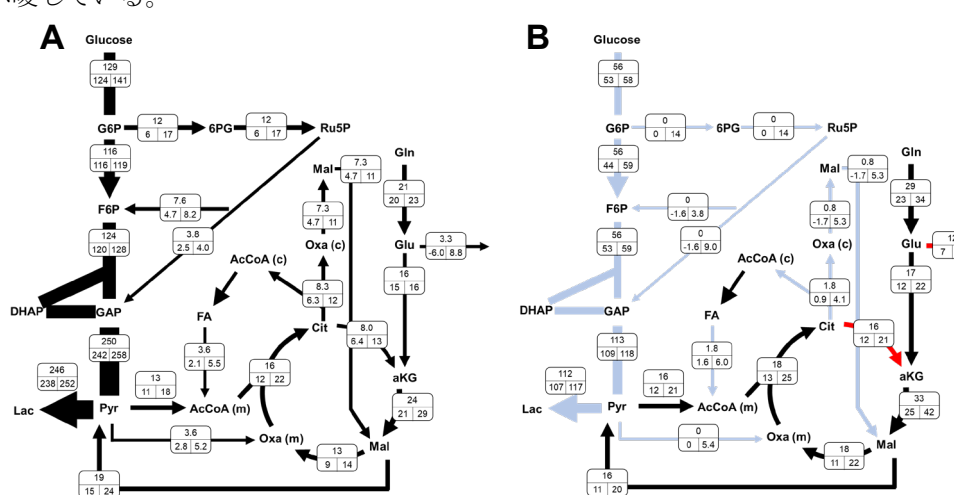
研究課題		新たなインテグラーゼを用いた遺伝子改変マウス作製法の確立と細胞老化研究への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	東海大学医学部・助教・三浦浩美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	近年 CRISPR ゲノム編集技術の発展により、遺伝子改変マウスは格段に作りやすくなった。しかしながら、未だに任意の領域に大きな DNA 断片を正確・高効率に挿入することは容易ではない。そこで本研究では、申請者らが独自に確立してきた 2 つの遺伝子改変マウス作製手法 (<i>i</i>-PITT 法と <i>Easi</i>-CRISPR 法) を組み合わせ、更に高効率に目的遺伝子を挿入可能な新しいインテグラーゼ系を活用することで、新たな遺伝子改変マウス作製法の開発を目指す。	
【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。)	今年度は、1) 培養細胞を用いた新規遺伝子改変システムの検証、および 2) マウス受精卵を用いた新規遺伝子改変システムの条件検討の 2 点を行なった。 1) 培養細胞を用いた新規遺伝子改変システムの検証 まず初めに、新たなインテグラーゼ系が上手く機能するのかを確認するために、attB 配列を有する eGFP 発現ベクター、attP 配列の下流に tdTomato 遺伝子を有するドナーベクター、インテグラーゼ発現ベクターを作製し、それらをマウス線維芽細胞 (NIH3T3) への共導入することで、組換えの有無を検証した (eGFP 発現ベクターとドナーベクター間で組換えが生じた際に赤蛍光を発することを期待)。その結果、インテグラーゼ発現ベクターを共導入した際に赤蛍光発現細胞が多く確認され、また、それらの細胞において実際に組換えが生じたことを塩基配列レベルで確認できた。このことから、用いたインテグラーゼが期待通りに機能していることが分かった。 次に、新規インテグラーゼを用いて標的ゲノム領域への目的 DNA 断片の挿入が可能かを検証した。attB 配列を含む ssDNA、attP 配列の下流に tdTomato 遺伝子を有するドナーベクター、インテグラーゼ発現ベクター、gRNA と Cas9 タンパク質の RNP 複合体、の 4 つの構成成分を同時に細胞へ共導入した結果、ドナーベクターのランダム挿入が僅かに確認されたものの、インテグラーゼを用いた場合により多くの赤蛍光発現細胞を観察することができた。また、それらの赤蛍光発現細胞では、ドナーベクターが標的ゲノム領域に挿入されていることが確認された。 2) マウス受精卵を用いた新規遺伝子改変システムの条件検討 次に、培養細胞と同様の実験をマウス受精卵を用いて行った。上記 4 つの構成成分をマウス受精卵前核に顕微注入した結果、僅かではあるが、赤蛍光発現胚を得ることができ、実際に標的ゲノム領域にドナー DNA が挿入されていることが確認できた。これにより、マウスゲノム上の任意の領域に長鎖 DNA 配列を挿入することが可能であることが示唆された。しかしながら、マウスの胚発生効率が低く実用可能なレベルには未だ至らないことから、今後は構成成分の濃度の最適化を検討するなどして更なる改善を目指したいと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】	特になし
	【学会発表】	特になし
	【その他特筆事項】	特になし

令和 5 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 1 細胞メタ解析によるがん関連線維芽細胞の多様性の理解と新規治療標的の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター ユニット長 山本 雄介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター 特任研究員 中山 淳
	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学 博士課程 平野悠太
	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】	肺腺がんと肺扁平上皮がんは、ともに肺組織において発生するがんであるが、遺伝子変異や組織型には大きな違いがある。申請者らは、肺がんのがん細胞自身だけでなく、それらを取り巻くがん微小環境にも違いがあると考えた。1 細胞 RNA-seq 解析は、がん組織に含まれるすべての細胞種をあわせて解析できる強力なツールであるが、がん微小環境に含まれる少数の細胞集団を解析するためには、大規模なデータセットが必要である。そこで、申請者らは、公共データベースに保管されている 1 細胞 RNA-seq データを統合して、大規模な肺がん 1 細胞アトラスを作製し、肺腺がんと肺扁平上皮がんにおいて、その微小環境の差異について検討を進めた。	
【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。)	GEO をはじめとした公共データベースより、肺腺がん 187 症例ならびに肺扁平上皮がん 80 症例の 1 細胞 RNA-seq データを取得し、腺がん組織由来の約 38 万細胞および扁平上皮がん組織由来の約 13 万細胞のデータを統合した肺がん細胞アトラスの作成を行った。それぞれの細胞種のマーカー遺伝子の発現パターンより、リンパ球系細胞、骨髄球系細胞、内皮細胞、間質細胞に分類し、腺がんと扁平上皮がんにおいて、各細胞の割合について検討を行った。T 細胞、形質細胞、樹状細胞、中皮細胞、がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast, CAF)の割合に腺がんと扁平上皮がんでは有意な差が認められた。近年の研究結果から、CAF は均一な細胞集団ではなく、様々なサブタイプが存在することが報告されている。そのため、本検討においても、CAF を既知のマーカー遺伝子の発現をもとに、サブタイプごとに分類して、腺がんと扁平上皮がんにおいて細胞の割合の比較検討を実施した。その結果、筋線維芽細胞マーカーを発現する CAF は扁平上皮がんでは有意に割合が増加していること、炎症性 CAF と抗原提示性 CAF は腺がんでは有意に増加していることを見出した。それらの結果は、TCGA データを用いた CIBERSORT による解析においても検証・確認された。さらに、申請者らが以前に遺伝子発現プロファイルから細胞同士の多様性を解析する手法として VARIED (Visualized Algorithms of Relationships In Expressional Diversity)法を報告した。その手法を用いて、腺がんと扁平上皮がんの間でそれぞれの細胞種ごとの細胞の多様性の定量を行った。その結果、筋線維芽細胞マーカーを発現する CAF の多様性が腺がんでは有意に高いことを見出した。次に、細胞種ごとに発現しているリガンド遺伝子と受容体遺伝子の発現パターンをもとにして、細胞間相互作用を解析した。筋線維芽細胞様の CAF は腺がんと扁平上皮がんに対して、同等の細胞間相互作用が認められたが、炎症性 CAF は腺がん細胞により大きな影響を与えていることが細胞間相互作用の観点から推測された。現在、その細胞間相互作用について、腺がんと扁平上皮がんの肺がん細胞株と線維芽細胞の共培養システムを用いて、細胞間相互作用の結果について実験的に検証中である。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 肺腺癌と肺扁平上皮癌における繊維芽細胞の特性. 平野 悠太, 中山 淳, 山元 智史, 藤田 雄, 荒屋 潤, 山本 雄介. 第 82 回 日本癌学会総会 2023 年 9 月	
	【その他特筆事項】	

令和5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		消化器癌・難治がんの特異的糖鎖を標的にした転移に関わる細胞特性の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	野口研究所研究部・研究員・井手尾浩子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	野口研究所研究部・研究員・土田明子
	所属・職名・氏名	野口研究所研究部・研究員・八須和子
	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】	消化器癌は切除可能な場合の予後は良いが、転移の見られるものは予後が悪く治療が困難である。その中でも腹膜播種は胃癌の転移・再発形式で最も多くみられ、手術による治療が難しく、十分に効果のある治療法は未だ確立されていない。その為、胃癌の腹膜播種に関与する分子およびメカニズムを解明することは重要であり、未解決の課題である。申請者らは、ガレクチン-4 が糖鎖を介して複数の重要なシグナル分子を制御することにより腹膜播種能の制御に関与していることを明らかにしてきたが、本研究では、研究が殆どなされていない腹膜播種における糖鎖の変化やその変化をもたらす合成酵素等の役割を解明することを目的として研究を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	腹膜播種に関係する糖鎖の変化を調べる為に、ヒト胃癌細胞株 NUGC4 の wild 株とガレクチン-4 ノックアウト(KO)株の比較解析を行った。細胞膜糖タンパク質の N 型糖鎖には大きな変化はなかったが、腹膜播種能に相関して中性糖脂質の組成変化が認められた。Real-time PCR による糖転移酵素の発現解析および詳細な MS 解析の結果から、変化する中性糖脂質の具体的な構造を明らかにした。Wild 株では主に Le^x type の発現が認められたが、ガレクチン-4 KO 株には Le^x type だけでなくβ1,3Gal を非還元末端に持つラクト系列の糖脂質の発現上昇が認められた。この糖脂質の組成変化の重要性をさらに検討するために、Le^a や Type I H, Type I A といったラクト系列糖鎖構造の生合成に関わる糖転移酵素を NUGC4 細胞に過剰発現させた安定発現株を樹立し特性解析を行った。その結果、安定発現株の増殖能は明らかに低下し、ガレクチン-4 の発現量も低下した。また、マウスの腹腔内にコントロール株と安定発現株をそれぞれ投与した動物実験において、コントロール株では腫瘍が形成されるのに対し安定発現株では腫瘍の形成が強く抑制されることが明らかとなった。また、安定発現株ではガレクチン-4 の脂質 raft への局在が低下し、シグナル分子の活性化の低下が観察された。これらの結果から、糖脂質の変化が脂質 raft を含む細胞膜の状態を変化させることにより、胃癌細胞の機能に影響を与えている可能性が示唆された。脂質 raft の状態を変化させる MβCD 処理(コレステロール除去)あるいは D-PDMP 処理(GlcCer 合成酵素阻害剤)を行い、ショ糖密度勾配法等による分析を行なった。その結果、これらの処理によるガレクチン-4 や pMET の raft 画分への局在に変化が起こることが明らかになった。 胃癌組織切片および正常な胃組織切片を用いた免疫組織染色を行った結果、この糖転移酵素の発現は癌化により低下していた。これらの成果に関して、1 月末に特許出願を行ない、論文投稿に向け準備中である。現在、糖鎖構造の変化が腫瘍形成を抑制するメカニズムの詳細な解明に向けて、さらに研究を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】 - Ideo H, Tsuchida A, Takada Y, Kinoshita J, Inaki N, Minamoto T. Suppression of galectin-4 attenuates peritoneal metastasis of poorly differentiated gastric cancer cells. Gastric Cancer. 2023;26(3):352-363. - Hachisu K, Tsuchida A, Takada Y, Mizuno M, Ideo H. Galectin-4 Is Involved in the Structural Changes of Glycosphingolipid Glycans in Poorly Differentiated Gastric Cancer Cells with High Metastatic Potential. Int J Mol Sci. 2023;24(15):12305. 【学会発表】 - 井手尾浩子, 土田明子, 八須和子, 高田美生, 木下淳, 稲木紀幸, 源利成. 低分化型胃癌細胞の腹膜播種転移に糖鎖結合分子ガレクチン-4 が関与する. 第 32 回日本がん転移学会学術集会 - 土田明子, 八須和子, 井手尾浩子, 高田美生. ガレクチン-4 が関与する未分化胃癌細胞の腹膜播種メカニズムの解明. 第 82 回日本癌学会学術総会. - 井手尾浩子, 土田明子, 八須和子, 高田美生, 木下淳, 稲木紀幸, 源利成. Galectin-4 plays a vital role in the peritoneal dissemination of poorly differentiated gastric cancer cell. Glyco26. - 井手尾浩子, 土田明子, 八須和子, 高田美生, 腹膜播種能の異なる低分化型胃癌細胞の糖鎖とガレクチン-4 による制御機構. 第 42 回日本糖質学会年会. 【その他特筆事項】 - 特願 2024-007757	

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・博士後期課程・谷口昶夫
	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】	がん細胞は活発な代謝によって増殖する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、未分化性と代謝の関連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¹³C代謝フラックス解析法を用いて、種々のがん細胞株の代謝状態を解析してきた。その結果、細胞の増殖速度ではなく、むしろ細胞のディッシュへの接着面積が解糖系のフラックスと強い相関を示すことを見出した。そこで本年度は、浮遊細胞であるHL-60を使い、分化前後の代謝フラックス解析を行うことで、細胞接着や増殖状態と代謝の関連を調べた。	
【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。)	未分化HL-60のグルコース取り込み速度を調べたところ、一般的な接着がん細胞株の20～50%程度と小さいことが明らかとなった。これは、仮説通り細胞接着を維持するために代謝が重要な役割を担っていることを示唆していると考えられた。さらに、レチノイン酸で好中球様細胞に分化誘導を行ったところ、グルコース取り込みは半分程度に低下した。詳細な代謝変化を調べるために、¹³C代謝フラックス解析の実施に必要な代謝モデルを検討した。培地中に含まれる炭素源を1種類ずつ¹³C標識体に置換することで、細胞に取り込まれる炭素源を調べたところ、グルコースやグルタミンなどの主要な炭素源に加え、グルタミン酸やアスパラギン酸といった比必須アミノ酸が細胞内に取り込まれていることが明らかとなった。さらに、細胞を¹³C標識し、細胞構成成分の分解を調べたところ、脂肪酸や核酸由来すると推定される¹³Cがクエン酸やリボース5リン酸に含まれていることが明らかとなった。これらの情報に基づいて代謝モデルを改変し、分化前後のHL-60の¹³C代謝フラックス解析を行うことに成功した。分化後の非増殖HL-60では解糖系やペントースリン酸経路のフラックスが半減していることが明らかとなった(図1)。これは、分化や増殖様態が糖代謝に影響を与える大きな要因であることを示唆している。  図1 分化前後のHL-60の代謝フラックス分布 (A) 分化前、(B) 分化後。上段の数値は実験値を最もよく説明するBest fit値、下段の数値は95%信頼区間の上限と下限を示す。数値の単位はnmol/10⁶ cells/h。	
【成果等】	【主な論文発表】	投稿中
	【学会発表】	Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda. Development of ¹³ C-metabolic flux analysis of neutrophil central carbon metabolism using GC-MS. 2023/8/20~8/23. AOMSC-KSMS 2023
	【その他特筆事項】	なし

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		細胞がん化における体性幹細胞・前駆細胞の細胞老化抵抗性の役割の検証
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学薬学部・准教授・菱田友昭
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・老化生物学研究分野・助教・中野泰博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	がん・老化生物学研究分野・教授・城村由和
【研究目的】	本研究提案では、細胞老化の抵抗性が認められた食道・胃上皮における体性幹細胞・前駆細胞 (Adult Stem Cells/Progenitor Cells: ASCs/PCs) に焦点を当て、細胞老化・発がんの細胞特異性を明らかにし、細胞老化と発がんの関係性を分子レベルで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。)	近年、老化研究が盛んになされ、老化の引き金となる分子基盤が明らかになりつつある。他方で、老化に伴い、発がんのリスクが上昇することは疫学的に自明であるものの、その全容は解明されていない。また、発がんのみならず、そのセーフガードになり得る細胞老化に対する感受性・抵抗性は細胞種によって異なる事が示唆されているものの、発がん細胞老化の抵抗性における細胞特異性が一対一対応するものかどうかについてはあまり解析されていない。 申請者らはこれまでに、食道・胃上皮 ASCs/PCs 特異的にがん遺伝子を誘導することで、浸潤性の高い食道がん・胃がんを誘導することを示している。特に、食道上皮については、老齢マウス (2 年齢) や早老症 (ハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群) のマウスモデルにおいて、老化関連酸性β-ガラクトシダーゼ (Senescence-associated beta-galactosidase: SA-βgal) や <i>p16</i> 遺伝子などの老化マーカーが認められず、食道上皮における ASCs/PCs が細胞老化に抵抗性を有していることを示した (Hishida T et al, <i>Front Cell Dev Biol</i> 2022)、また、ヒトにおいてもこれまで食道上皮の老化抵抗性を示唆する報告がなされているため、食道上皮では細胞老化を受けない、もしくは老化細胞を蓄積できない機序があることが想定される。 申請者らは上記の知見をさらに発展させるため、食道上皮細胞の解析をした結果、がん細胞ではないにも関わらず、Myc が高発現していることを見出した。実際 Myc を発現抑制することにより、老化細胞が出現し、細胞周期関連遺伝子の発現が減少していることから、Myc が食道上皮細胞の老化抵抗性に関与することを明らかにした。興味深いことに Myc を強制発現すると発がん性の増殖が認められたことから、少なくともこのモデル系においては、細胞老化抵抗性と発がんは Myc の発現レベルで規定される可能性が示唆された。 また胃がんのモデルにおいては Myc がトポイソメラーゼ 2a (Top2a) の発現を正に制御し、胃がんの進展に重要な役割を果たすことを見出した。 これらの成果は Myc が ASCs/PCs の老化抵抗性と発がんに密接に関与することを示唆しており、その発現制御機構や下流因子の解析が待たれる。	
【成果等】	【主な論文発表】	特になし。
	【学会発表】	特になし。
	【その他特筆事項】	特になし。

令和5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		大腸がんモデルを用いた薬剤耐性研究
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所分子病理分野・研究員・小林祥久
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所分子病理分野・特任研究員・Melvin Pan
	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】	EGFR 変異肺がんには EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が標準治療となっているが、必ず耐性を獲得して効かなくなる。代表者は、EGFR 変異肺がん細胞株由来の CRISPR ゲノム編集モデルを使って、「EGFR 阻害剤に対する耐性の有無で発がん性の有無を評価する実験系」を構築した。このモデルから、KRAS/NRAS/HRAS Q61 変異がんの発がんに関わるスプライシングの弱点を発見し、新規治療の提唱に成功した (Nature 2022)。 本研究では、大島教授との共同研究によって大腸がんモデルを使って「薬剤耐性の有無=発がん性の有無」という評価系を新たに構築することで、より多くのがん種・遺伝子についての発がん研究を行う基盤モデルの形成を目指す。	
【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。)	- 細胞モデルの打ち合わせ 大腸がんは「多段階発がん機構の解明」が最も進んでいるがん種である。大島教授は、大腸がんの複雑な多段階発がんについて個々のがん関連遺伝子の働きを詳細に解析した唯一無二のマウス大腸がん由来モデル群を構築されているため、研究所を訪問して大島教授と直接共同研究の打ち合わせを行った。これらのモデルについて詳細に解説いただき、オルガノイドおよび二次元培養可能な細胞株の培養方法をご指導いただいた。 - 細胞モデルの提供と培養 マウス大腸がんからオルガノイドを樹立され、さらに二次元培養可能な細胞株化に成功したモデル群 (AP, ATP, AKP, AKTP, AKTPF: A=Apc delta716/LOH, P=p53 R270H/LOH, K=Kras G12D/wt, T=Tgfbr2 KO, F=Fbxw7 f1/f1)を提供いただき、現在拡大培養中である。 - 次年度の計画 これらの細胞モデルに対して様々な薬剤感受性試験を実施することで「発がん性の指標としての薬剤耐性の程度」を評価し、ゲノム編集による発がん性の評価へと移行する。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

令和5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。)	昨年度においては、<i>in vitro</i>の系において、ZNFRタンパクとRNAの結合の網羅的解析やRNAの安定性・転写速度の解析から、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としてZEB1を同定し、EB1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ことが強く示唆された。 また、ZNFRの発現を調節する化合物をスクリーニングの結果、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た。 本年度はこれらを受けて、ZEB1-ZNFR axisの存在を細胞株のみならずTNBC-PDXにおいて明らかにするために、TNBC-PDXを用いて検討を行った。その結果、ZNFRの抑制によってZEB1発現を担うがん幹細胞が顕著に減少していた。さらに、ZNFRを制御する他の核酸製剤(siRNA等)による効果の検証に向けて、他の複数のがん細胞株においてRNAシーケンスによる検討を行ったところ、ZNFRが標的とするmotifを標的とすることで顕著ながん幹細胞制御の可能性が示唆された。このことから、ZNFR及びその機能を制御することによって顕著な抗腫瘍効果が期待されるものと考えられた。 さらに本年度においては、これらの研究戦略を他のRNA階層における遺伝子へも応用し、RNA修飾酵素やRNA結合タンパク質において、新たにRNA階層の制御を介して乳がん、肺がん等の制御を行う候補化合物の同定に成功しており、来年度に向けた研究を推進する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 (論文投稿中. In revision)	
	【学会発表】 内田ら. 2023年度日本RNA学会 Uchida et al. RNA Society 2023 (Poster Presentation Award)	
	【その他特筆事項】	

令和5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	
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、昨年度、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目的として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。 本年度は、この Fc 融合タンパク質の大量調製を試みた結果、Fc 領域を付加する前のタンパク質程の大量調製はできなかったものの、動物実験による薬効試験に使用可能な量のタンパク質を得ることができた。さらに、MMP-7 に対する高特異性インヒビターペプチドの作出にも成功し、同様に Fc 融合タンパク質として大量調製した。今後、これら 2 種の MMP インヒビタータンパク質について実験動物を用いて薬物動態試験および薬効試験を実施する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Kazuhiro Yamamoto, Moe Isohata, Shouichi Higashi: Expression and Purification of Active Monomeric MMP7. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) 2747 67-73 2024	
	【学会発表】 1. 五十畑 萌、東 昌市：MMP-7が誘導するがん細胞凝集機構における膜型セリンプロテアーゼ活性発現機序の解析。第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪・高槻）、演題番号 9、2023年8月25-26日 2. 池田 小春、東 昌市：マトリブターゼ前駆体の細胞外輸送には触媒ドメインにおける活性型コンフォメーションの誘導が重要である。第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪・高槻）、演題番号 10、2023年8月25-26日 3. 東 昌市：がん悪性進展に関与するMMPsを分子標的とした高特異性阻害剤の開発。第28回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪・高槻）、シンポジウム、2023年8月25-26日 4. 池田 小春、東 昌市：マトリブターゼ前駆体の細胞外輸送にはその触媒ドメイン内における活性型コンフォメーションの誘導が重要である。第96回日本生化学会大会（福岡）、演題番号 2P-486 2023年10月31日-11月2日 5. 五十畑 萌、東 昌市：弱酸性条件下でのマトリブターゼ活性発現とそのMMP-7誘導性ががん細胞凝集機構における意義。第96回日本生化学会大会（福岡）、演題番号 2P-487 2023年10月31日-11月2日	
	【その他特筆事項】	

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】	がん細胞あるいは細胞外の体液中に存在するメタボライトの総体を解析する（メタボロミクス）ことで、がんを診断することを目指した研究開発が世界的に進められている。質量分析（MS）はメタボロミクスにおける代表的な方法論であり、特にインフュージョンMSは迅速診断や多検体スクリーニングに応用が期待されている。申請者らが開発した Liquid Probe Ionization (LPI) はその手法の1つで、検体を前処理せずに成分の採取とイオン化が可能であることから、これを用いたハイスループットがん診断システムの構築を目指す。	
【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。)	LPIのプロープ先端には金属針が僅かに突出しており、この表面に外套から供給される溶媒が液体の薄い膜（溶媒シース）を形成する。溶媒シースのみが検体に接触して成分を採取し、次いで高電圧の印加によりエレクトロスプレーを生じさせ、イオンを質量分析する（図1）。電圧印加後に成分は完全に消失するため、プローブ交換なく数秒間隔でのハイスループット分析が可能となる。エレクトロスプレーの発生時間は1秒以内のため検出器の汚れが生じにくく、メンテナンス頻度が下げられ、プローブは数千検体の分析に使用できるためランニングコストが極めて低い。 質量分析のデータは、検体に含まれる成分の質量数とその存在量を示す多数のピークが合わさったマススペクトルとして得られ、それを人工知能の一種である機械学習を用いたアルゴリズムで判別することでがんの診断を行う。本年度は大腸組織よりなるべく多くのピークを含んだマススペクトルを、再現性良く取得するためのプローブ形状およびイオン化条件の検討を行った（図2）。プローブの先端に溶媒シースを形成させるためには、樹脂外套からの金属針の突出度を厳密に調整する必要があり、これを可能にするために10 μm単位でのアライメントが可能な機構を開発した（特許出願準備中）。また、多数検体を連続分析するために溶媒の封入量を増加させたものや、検体の種類に合わせた種々の形状のプローブを完成させた。多数検体の分析を自動で行うオートサンプラーの試作機も完成しており、今後はこれを用いてヒト由来の大腸がん組織を成分分析し、構築されたデータベースを基にがん診断アルゴリズムを完成させる。最終的には分析から結果提示を自動で行う一体型のシステムを構築する。 図1. LPIの概要 図2. LPIプローブ	
【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

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・衛藤翔太郎
	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・大島正伸
【研究目的】	免疫チェックポイント阻害剤の登場により、がん治療の支柱の一つとして免疫療法に光が当たりつつある。一方、最近の研究から免疫療法に不応性を示すケースも多く存在することも判明しつつあり、不応性を解除し、より効果的に抗腫瘍免疫を駆動させる手法の開発と診断マーカーの開発が求められている。 免疫療法を阻む要因の一つとして、腫瘍中に形成される免疫抑制的な微小環境があげられている。腫瘍中に免疫抑制性細胞が浸潤し、また腫瘍細胞や組織細胞が免疫抑制性因子を賛成することで、積極的に腫瘍免疫を抑制していると考えられている。しかしながらそのような微小環境がどのように形成されるのか、またどのような因子が腫瘍免疫を抑制するのか、についての理解は未だ進んでいない。 申請者らは、抗腫瘍T細胞応答を抑制する分子としてオンコメタボライト（スペルミジン）を新たに同定しつつあり、またさらに、腫瘍微小環境中の細胞集団を捕捉する手法を用いて、腫瘍の増殖、免疫制御に作用する新たな分子群も見出しつつある。そこで本研究においてスペルミジンによるT細胞応答抑制機構の解明、およびスペルミジン阻害とICBの併用療法による腫瘍抑制効果について検討する。また新規に見出しつつある死細胞由来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。)	腫瘍死細胞から放出されるオンコメタボライトの解析を行った。凍結融解、低グルコース、低酸素の条件で細胞死を誘導し、上清を回収した。この上清をT細胞に処理すると、興味深いことに、3種類の上清全てがT細胞の活性化を抑制した。T細胞活性化を抑制する因子について検討を行い、メタボライトが担っていることが判明した。そこでメタボローム解析を実施し、9種類の候補メタボライトが同定された。そのうちスペルミジンがT細胞活性化を抑制することを見出した(図1)。そこでスペルミジンによるT細胞応答の抑制メカニズムの解明を目指して研究を進めた。 <i>In vitro</i>でのCD8T細胞培養系を用いて、スペルミジン処理によるCD8T細胞中の遺伝子発現変化を調べた。その結果、スペルミジンがCD8T細胞中のコレステロール合成を低下させることを見出し、スペルミジンはコレステロール合成阻害を介してCD8T細胞の活性化を抑制する可能性が示唆された。コレステロールはT細胞の細胞膜上において、TCRクラスターと呼ばれる複合体の形成に必要であることが知られている。そこでスペルミジン処理によるT細胞クラスター形成を共焦点顕微鏡やフローサイトメーターを用いて解析を行った。その結果、スペルミジン処理によってTCRクラスターの形成が低下していることが判明した(図2)。したがって、腫瘍死細胞から放出されたスペルミジンはT細胞中のコレステロール合成を低下させることで活性化を抑制し、腫瘍増殖に寄与することが明らかになった。 そこで次に、スペルミジン合成に必須の酵素であるODC1(Ornithine decarboxylase 1)の阻害剤DFMOを用いて、スペルミジン合成阻害により腫瘍免疫応答を増強することができるかどうか検討を行った。B16F10細胞の担がんマウスにおいてDFMOを投与することによりCD8⁺T細胞の活性化が促進される知見が得られた。また、PD-1免疫チェックポイント阻害抗体による治療効果を顕著に増強させることができることが明らかとなった。 以上のことより、腫瘍死細胞から放出されるスペルミジンは腫瘍免疫を増強させるための新たな治療標的となる可能性が示唆された。これらの結果をまとめて論文として報告した(Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 120: e2305245120, 2023)。	

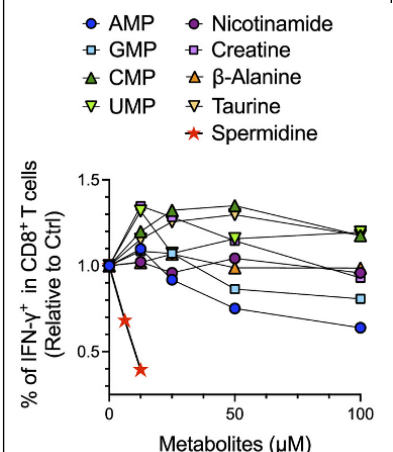
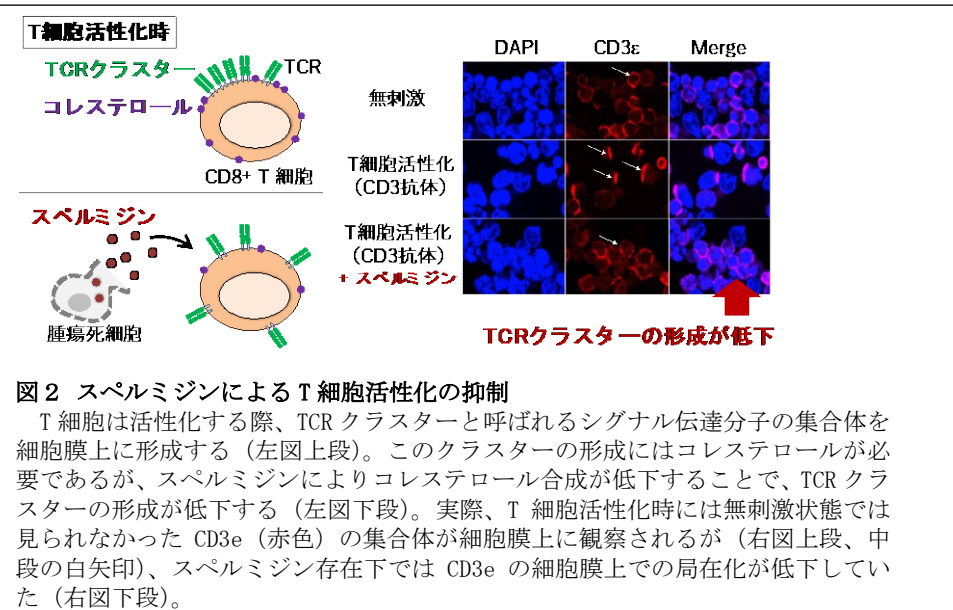


図1 T細胞活性化を抑制するオンコメタボライトの探索

CD8⁺T細胞をマウスから採取し、CD3/CD28 ビーズを用いて活性化させた。その際、培養液に9種類の候補メタボライトをそれぞれ濃度を変えて加え、T細胞の活性化について検討を行った。



【成果等】

【主な論文発表】

- ・ Hibino S, Eto S, Hangai S, Endo K, Ashitani S, Sugaya M, Osawa T, Soga T, *Taniguchi T and *Yanai H. Tumor cell-derived spermidine is an oncometabolite that suppresses TCR clustering for intratumoral CD8⁺ T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 120: e2305245120, 2023. *Corresponding authors.
- ・ Kato M, Maeda K, Nakahara R, Hirose H, Kondo A, Aki S, Sugaya M, Hibino S, Nishida M, Hasegawa M, Morita H, Ando R, Tsuchida R, Yoshida M, Kodama T, Yanai H, Shimamura T and Osawa T. Acidic extracellular pH drives accumulation of N1-acetylspermidine and recruitment of protumor neutrophils. *PNAS Nexus*, 2: pgad306, 2023.
- ・ Nakahara R, Aki S, Sugaya M, Hirose H, Kato M, Maeda K, Sakamoto D, Kojima Y, Nishida M, Ando R, Muramatsu M, Pan M, Tsuchida R, Matsumura Y, Yanai H, Takano H, Yao R, Sando S, Shibuya M, Sakai J, Kodama T, Kidoya H, Shimamura T and Osawa T. Hypoxia activates SREBP2 through Golgi disassembly in bone marrow-derived monocytes for enhanced tumor growth. *EMBO J.*, 42: e114032, 2023.
- ・ Inoue A, Chiba S, Eto S, Taniguchi T and *Yanai H. Potential of HMGB-inhibitory oligodeoxynucleotide ISM ODN to neutrophil recruitment in mouse model of hepatitis. *Genes Cells*, 28: 202-210, 2023 *Corresponding author.

【学会発表】

- ・ 柳井秀元, がん免疫と代謝: 死細胞由来スペルミジンによる腫瘍免疫制御, 第20回 日本獣医内科学アカデミー学術大会, 2023年 (招待講演)
- ・ 柳井秀元, 細胞死による炎症・免疫反応を利用した制がん, 第26回 日本がん分子標的治療学会, 2022年 (招待講演)
- ・ Yanai H, Modulation of tumor immune responses by dead cell-derived molecules, 2nd International Congress of Asian Oncology Society (AOS), 2022 (招待講演)
- ・ 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, 2022年 (招待講演)

【その他特筆事項】

令和 5 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		非乳頭部十二指腸腺癌の 2 つの独立した発癌経路の検証とその分子機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学生物医学・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】	小腸癌はまれな腫瘍であるため標準的な治療は確立されていない。また分子学的解析などの基礎的研究は十分行われておらず、分子標的薬を用いた治療も未開発である。申請者らは、小腸癌の一部である非乳頭部十二指腸腺癌の早期病変とされている十二指腸腺腫と粘膜内癌の計 102 病変についてゲノム・エピゲノムの統合解析を行い、Wnt シグナル経路の異常を主とする小腸型と <i>GNAS</i>, <i>KRAS</i> 遺伝子変異を認める胃型に大別されることを明らかにした。本研究の目的は、非乳頭部十二指腸腺癌の 2 つの独立した発癌経路を検証し、その分子機構を解明することである。その結果、腫瘍の進展予測のバイオマーカーとなるゲノム・エピゲノム異常を同定できる可能性がある。	
【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。)	1. 病理組織からの DNA 抽出とターゲットシーケンス解析 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腫瘍 54 病変（小腸型腺腫 25 病変、胃型腺腫 3 病変、小腸型粘膜内癌 10 例、胃型粘膜内癌 3 例、進行癌 13 病変）を対象とした。新規に開発した 75 のがん関連遺伝子で構成される遺伝子パネル（75 遺伝子、2 プライマープール、3,663 amplicons (1 本平均 1831.5)、Panel Size 366.1 kb、目標 coverage 1500) を用いて、次世代シーケンスで遺伝子変異・コピー数異常の解析を行った。 2. パイロシーケンス法による遺伝子メチル化解析 バイサルファイト処理を行なった後、パイロシーケンス法を用いてメチル化解析を行った。15%以上でメチル化陽性と判定した。メチル化マーカーは <i>CACNA1G</i>, <i>IGF2</i>, <i>NEUROG1</i>, <i>RUNX</i>, <i>SOX1</i> を用い、2 マーカー以上メチル化陽性で CIMP 陽性、3 マーカー以上で高度 CIMP 陽性とする。同時に <i>MLH1</i> メチル化の定量を行った。 3. 病理診断と免疫組織化学解析 病理診断と粘液形質（CD10, MUC2, MUC5AC, MUC6）の免疫組織化学による胃型と小腸型への分類は、消化管病理専門医によって行われた。免疫組織化学による β カテニン蛋白の核内異常集積の有無、ミスマッチ修復蛋白（MLH1, MSH2, MSH6, PMS2）の発現低下の有無の検索も同時に行った。 4. ゲノム情報と病理組織学的所見、内視鏡所見との比較と内視鏡診断体系の確立 遺伝子変異・メチル化の結果と、免疫組織化学を含む病理診断結果とを統合的に解析し、胃型腫瘍・小腸型腫瘍それぞれについて、分子発癌機構の解明を試みた。本研究成果は、非乳頭部十二指腸発がんの各段階の病変（腺腫・粘膜内癌・進行癌）の遺伝子異常を明らかにすることで発がん経路を確立し、それに基づいた治療戦略を示すことが期待される。今後、遺伝子変化がより蓄積し、発がんポテンシャルが高い非乳頭部十二指腸腫瘍の特定を行い、NBI 拡大観察を含む内視鏡所見にフィードバックすることによって、発がん可能性が高い病変の内視鏡的特徴を明らかにしていきたい。	

【成 果 等】	【主な論文発表】 Endo T, Kubo T, <u>Sasaki Y</u>, Takahashi H, Ishii Y, Adachi Y. Esophageal intraepithelial squamous cell neoplasia with epidermalization - A case with molecular analysis. Pathology Int. 73: 327-329, 2023. (今回開発した遺伝子パネルを用いて、食道の表皮化 (epidermalization) 粘膜に発生した上皮内扁平上皮癌についてがん関連遺伝子の異常を解析した。p53変異、がん関連遺伝子のコピー数異常が癌部だけではなく表皮化粘膜からも検出され前癌病変であることが示唆された。)
	【学会発表】 ・吉本由哉、佐々木泰史、尾池貴洋、安藤謙、濱本純子、鈴木義行、中野隆史、時野隆至、大野達也. FGF 受容体ファミリーの変異が子宮頸癌放射線治療予後に及ぼす影響 Effect of FGFR family-mutation on prognosis of cervical cancer patients treated with radiotherapy. 第 20 回日本免疫治療学会 (2023 年 6 月) ・Yasushi Adachi, Toshiyuki Kubo, Yasushi Sasaki, Yasuyo Adachi, Yukinari Yoshida, Takao Endo, Yoshifumi Ishii, Hiroaki Takahashi, and Akira Goto. Simultaneous cancers of the stomach and esophagus in autoimmune gastritis with pernicious anemia. 第 61 回日本癌治療学会 (2023 年 10 月) (いずれも今回開発した遺伝子パネルを用いてゲノム解析を行った)
	【その他特筆事項】 ありません

令和5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	講師	遠藤一平																											
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院	耳鼻咽喉科頭頸部外科	教授	吉崎智一																											
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院	耳鼻咽喉科頭頸部外科	医員	宇野大祐																											
	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】	オルガノイドは <i>in vitro</i> における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。腫瘍領域において、オルガノイド技術はヒト細胞の発癌機序を解明するうえで、極めて有用なツールであり、すでに大腸癌、胃癌、膵癌、乳癌などにおいてはオルガノイドを用いた多くの報告がある。 本研究では、頭頸部癌におけるがん遺伝子異常とがんの表現型（増殖能、浸潤能、薬剤感受性）の関係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培養の確立、ライブラリー化 前年度から今年度にかけて頭頸部扁平上皮癌の手術標本から 15 例のオルガノイド培養に成功し一部を凍結保存、バンク化した。その内 4 例では継代も可能であった。																															
	② オルガノイドを用いた薬剤感受性動態の検証 継代した頭頸部扁平上皮癌オルガノイドにシスプラチンを投与し（培養液に混注）、Celltiterを用いて生細胞量を定量的に測定した。測定は投与後 24 時間・48 時間・72 時間とし、吸光度は同一条件下での 3 つの検体の平均とした。シスプラチンの濃度依存性に生細胞量が減少することを確認した（下図）。 <table><caption>Figure 1: Absorbance vs Cisplatin Concentration</caption><thead><tr><th>シスプラチン濃度 (μM)</th><th>day1 (吸光度)</th><th>day2 (吸光度)</th><th>day3 (吸光度)</th></tr></thead><tbody><tr><td>0</td><td>1.7</td><td>2.0</td><td>1.8</td></tr><tr><td>2.1</td><td>1.6</td><td>1.7</td><td>1.5</td></tr><tr><td>4.1</td><td>1.5</td><td>1.2</td><td>1.1</td></tr><tr><td>8.2</td><td>1.2</td><td>0.8</td><td>0.6</td></tr><tr><td>16.7</td><td>0.8</td><td>0.5</td><td>0.4</td></tr><tr><td>33.4</td><td>0.5</td><td>0.4</td><td>0.3</td></tr></tbody></table>					シスプラチン濃度 (μM)	day1 (吸光度)	day2 (吸光度)	day3 (吸光度)	0	1.7	2.0	1.8	2.1	1.6	1.7	1.5	4.1	1.5	1.2	1.1	8.2	1.2	0.8	0.6	16.7	0.8	0.5	0.4	33.4	0.5	0.4
シスプラチン濃度 (μM)	day1 (吸光度)	day2 (吸光度)	day3 (吸光度)																													
0	1.7	2.0	1.8																													
2.1	1.6	1.7	1.5																													
4.1	1.5	1.2	1.1																													
8.2	1.2	0.8	0.6																													
16.7	0.8	0.5	0.4																													
33.4	0.5	0.4	0.3																													
【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5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		3次元がん微小環境モデルを駆使したがんのポリクローナル転移機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・教授・渡部 徹郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・助教・井上 カタジナアンナ
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・助教・小林 美穂
	所属・職名・氏名	東京医科歯科大学・連携研究員・高橋 和樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	がん細胞と血管などの間質から構成されるがん微小環境において豊富に発現している TGF-β はがん細胞の上皮間葉移行 (EMT) や血管内皮細胞の内皮観葉移行 (EndoMT) を誘導することで、がんの進展・転移を亢進するが、これらの現象を観察するモデルが存在しないため、がん微小環境を対象とした包括的な理解や新規治療法の開発を困難となっている。そこで本研究では、(1)「3次元がん微小環境モデル」を構築することで、がん細胞の血管内侵入における EndoMT の役割を解明し、(2) そのモデルを用いて転移するがん細胞の多様性の動態を解明し、(3) 代表者のグループが開発した新規 TGF-β 阻害剤を用いてがん細胞の血管内侵入を標的とした新規治療法の開発を目指す。	
【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。)	(1)「3次元微小血管モデル」を用いた EndoMT の観察 TGF-β による EndoMT を 3次元微小血管で観察するために、EndoMT をリアルタイムで観察できる EndoMT レポーター細胞を樹立し、3次元微小血管を作成した。この 3次元微小血管を TGF-β 処理すると、内皮細胞マーカーの発現低下ならびに間葉系マーカーの発現上昇が観察されるとともに、血管のバリア機能が低下することが示された (論文 1)。以上から TGF-β による EndoMT により、がん細胞の血管内侵入が起こりやすくなることが示唆された。 (2)「3次元がん微小環境モデル」を用いたがん細胞転移の動態の解明 代表者は受入担当教員ならびに松永行子教授 (東京大学) とともに、消化器がん細胞のクラスターと 3次元微小血管から構成される 3次元微小環境モデルを構築し、転移能が高いがん細胞クラスターが 3次元微小血管への侵入を観察することに成功した (論文 2)。また、このがん細胞クラスターの血管内侵入において、がん細胞と血管内皮細胞が相互作用することにより、TGF-β とそのファミリー分子であるアクチビンの発現量が上昇することを見出した。 (3) 新規 TGF-β 阻害剤を用いたがん新規治療法の開発 がん微小環境ネットワークを制御する TGF-β シグナルの阻害ががん進展に及ぼす影響を個体レベルで検討するために、代表者が開発した TGF-β 阻害 Fc 融合タンパク質を口腔がん細胞を皮下移植したマウス担癌モデルに投与したところ、腫瘍形成が顕著に抑制された。その機序を検討するために腫瘍組織の RNA シークエンシングを施行したところ、TGF-β シグナルの阻害により、がん細胞の増殖と腫瘍血管新生を亢進する HB-EGF などの増殖因子の発現が低下するとともに、EndoMT が抑制されていることが明らかとなった (論文 3)。以上の結果から TGF-β シグナルの低下によりがん微小環境ネットワークが破綻することでがん進展が阻害されることが示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】代表者と受入担当教員に下線 *: corresponding author 1. Takahashi K, Kobayashi M, Katsumata H, Tokizaki S, Anzai T, Ikeda Y, Alcaide DM, Maeda K, Ishihara M, Tahara K, Kubota Y, Itoh F, Park J, Takahashi K, Matsunaga YT, Yoshimatsu Y, Podyma-Inoue KA, <u>*Watabe T</u>. CD40 is expressed in the subsets of endothelial cells undergoing	

partial endothelial-mesenchymal transition in tumor microenvironment. *Cancer Science*. 2024 Feb;115(2):490-506. doi: 10.1111/cas.16045.

2. Ikeda Y, Suehiro J, Oshima H, Kok SY, Takahashi K, Sakurai H, **Watabe T**, ***Oshima M**, ***Matsunaga YT**. Tumor-microvessel on-a-chip reveals sequential intravasation cascade of cancer cell clusters. *bioRxiv* 2024 Mar 4; doi: <https://doi.org/10.1101/2024.02.28.582606>
3. Tokizaki S, Podyma-Inoue KA, Matsumoto T, Takahashi K, Kobayashi M, Ibi H, Uchida S, Iwabuchi S, Harada H, Hashimoto S, Miyazono K, Shirouzu M, ***Watabe T**. Inhibition of transforming growth factor- β signals suppresses tumor formation by regulation of tumor microenvironment networks. *Cancer Science*. 2024 Jan;115(1):211-226. doi: 10.1111/cas.16006.

【学会発表】

1. Tetsuro Watabe. TGF- β Family Members Dysregulate the Homeostasis of Lymphatic Vessels as Negative Lymphoangiocrine Signals. Gordon Research Conference-Lymphatics 2024.3.07 Ventura 米国（口演）
2. Tetsuro Watabe. Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies. FAOPS 2023 (The 10th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress) 2023.11.01 Daegu 韓国（シンポジウム）
3. Tetsuro Watabe. Roles of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) during cancer progression. 第 82 回日本癌学会学術総会 2023.9.22 横浜（シンポジウム）
4. Tetsuro Watabe. Characterization of TGF- β -induced partial endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) using EndoMT reporter cells. TGF β meeting 2023 2023.08.17 Uppsala スウェーデン（口演）

【その他特筆事項】

発明の名称：部分的内皮間葉移行マーカーとしての遺伝子の発現産物の使用

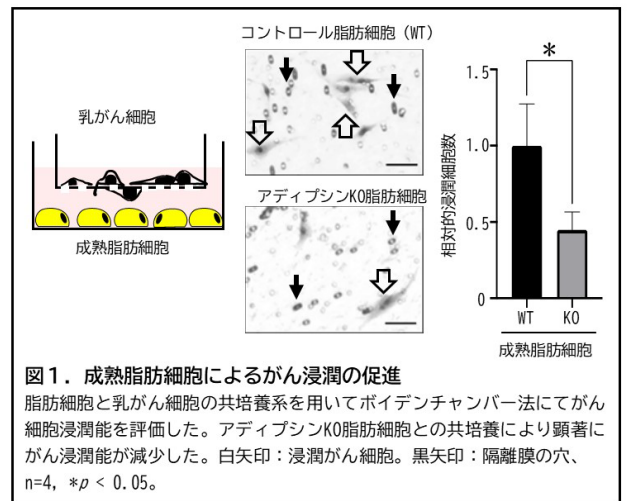
出願番号：特願 2023-205003

出願日：2023/12/5

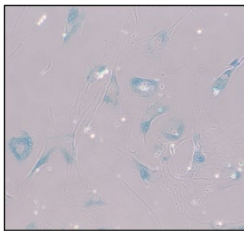
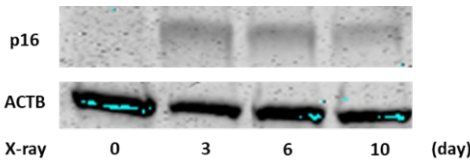
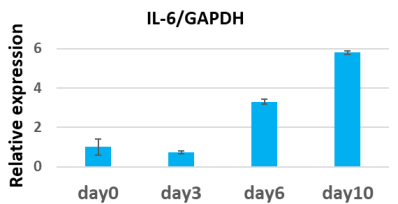
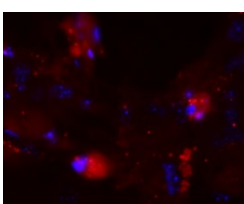
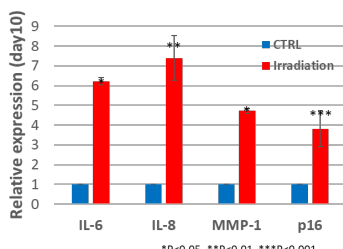
発明者：渡部徹郎 高橋和樹 小林美穂 井上カタジナアンナ

出願人：国立大学法人東京医科歯科大学

研究課題		アディプシンによるがん転移促進の分子機構
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・下野 洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・講師・林 孝典
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・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・浅井 直也
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	世界的な肥満者の増加とともに、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど各種のがんの悪性化因子としての脂肪細胞の役割が注目されている。がんの間質組織はがんの発生や維持に必須であり、脂肪細胞もがん間質の一員である。私たちは脂肪細胞の分泌因子（アディポカイン）が、がん細胞の増殖および幹細胞性を増強することを明らかにしてきた。本研究では、腫瘍関連脂肪細胞としての乳腺脂肪がアディプシンの分泌を介して腫瘍細胞の浸潤・転移能および腫瘍免疫に及ぼす影響を解明する研究を遂行することで、がん進展におけるアディプシンの多彩な作用機構を明らかにすることを目指す。	
【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。)	アディプシンは脂肪細胞から特異的に分泌される補体経路活性化因子である。私たちはアディプシンが脂肪細胞のオートクライン制御因子であり、その下流因子である肝細胞増殖因子（HGF）をはじめとしたアディポカインとともにがん細胞の増殖および幹細胞性を増強することを明らかにした (Goto H, Shimono Y et al. Oncogene, 2019; Mizuno M, Shimono Y et al. Cancers, 2021; Khaledian B, Shimono Y et al. Cancer Science, 2023)。本研究では、腫瘍関連脂肪細胞によるがん促進機構をアディプシンをはじめとしたアディポカインに着目して解析する事で、アディプシン阻害療法開発の基盤となる知見を得る。 1. 成熟脂肪細胞によるがん浸潤促進機構 アディプシンは腫瘍増殖やがん幹細胞性を促進するアディポカインである。しかし、それががん進展に及ぼす影響は明らかではない。本研究ではアディプシンが乳がん細胞の浸潤・転移能に及ぼす影響をボイデンチャンバー法にて解析した。乳がん細胞の浸潤促進能は、成熟脂肪細胞との共培養で顕著に増加したが(図1)、前駆細胞である脂肪組織由来幹細胞との共培養ではその効果は減弱した。脂肪細胞におけるアディプシンノックアウト (KO) あるいは、アディプシンの特異的阻害剤の添加により成熟脂肪細胞によるがん細胞の浸潤促進能は有意に減弱した。また、成熟脂肪細胞ではアディプシン依存性に HGF が発現し、アディプシン KO 脂肪細胞との共培養で減弱したがん細胞浸潤能は HGF の添加により回復した。これらの知見から、成熟脂肪細胞はアディプシンと HGF の発現を介して乳がん細胞の浸潤を促進する事が示唆された。 2. 腫瘍の遺伝子発現プロファイル 野生型およびアディプシン KO マウスに乳がん細胞を移植して形成された腫瘍の遺伝子発現を次世代シーケンサー解析にて解析した。アディプシン KO マウスの乳がんではがんの浸潤や上皮間葉転換に関わる遺伝子の発現が低下していた。また、乳がん細胞におけるそれらの発現はアディプシン KO 脂肪細胞との共培養により減弱した。 3. 移植腫瘍の免疫反応の解析 自然免疫である補体反応は、腫瘍細胞や腫瘍微小環境と協調して腫瘍免疫反応に幅広く影響する。アディプシン KO マウスに移植した腫瘍では、腫瘍周囲の腫瘍被膜形成が顕著に減弱するとともに、免疫細胞浸潤も低下した。これらの知見から、成熟脂肪組織はアディプシンを介してがん組織と相互作用し、がん浸潤や転移を促進する事が示唆された。	



【成 果 等】	【主な論文発表】 1. <u>Khaledian B</u>, Thibes L, <u>Shimono Y</u>. Adipocyte regulation of cancer stem cells. Cancer Science. 2023;114(11):4134-4144. 2. Toriuchi K, Kihara T, Aoki H, Kakita H, Takeshita S, Ueda H, Inoue Y, Hayashi H, <u>Shimono Y</u>, Yamada Y, Aoyama M. Monocyte-Derived miRNA-1914-5p Attenuates IL-1β-Induced Monocyte Adhesion and Transmigration. Int J Mol Sci. 2023;24(3):2829. 【学会発表】 1. Mukohyama J, Itano O, Kakeji Y, <u>Shimono Y</u>. Identification of the epigenetic mechanism for colorectal cancer stem cell regulation through the comprehensive microRNA expression profiling of human colorectal cancer tissues. 2023 ASCO Breakthrough, 2023 年. 2. Mukohyama J, Yamashita K, Shinoda M, Itano O, Kakeji Y, <u>Shimono Y</u>. Identification of the novel epigenetic mechanism for cancer stem cell regulation through the comprehensive microRNA expression profiling of human colorectal cancer tissues. ESMO 2023, 2023 年. 3. <u>Shimono Y</u>. Adipocyte-Cancer Stem Cell Interaction in Breast Cancers. FHU and CMU MOU Signing Ceremony Lecture, 2023 年. 4. <u>Shimono Y</u>, Goto H, <u>Hayashi T</u>, <u>Khaledian B</u>, Maeda M, Shibuya N, Kono S, Dunakoshi Y, Kakeji Y, Minami H. Adipocyte regulation of cancer stem cell properties. 第 34 回日本消化器癌発生学会総会, 2023 年. 5. <u>Shimono Y</u>, <u>Khaledian B</u>, Mizuno M, Yoshida J, <u>Gohoh N</u>, Kawada K. 脂肪細胞分泌因子アディプシンによるがん幹細胞性促進作用. 第 9 回がん代謝研究会, 2023 年. 6. <u>Khaledian B</u>, Yoshida J, Mizuno M, Maeda M, <u>Hayashi T</u>, Munetsuna E, Mizuno S, Mizutani Y, Okada S, Suzuki M, Sugiyama F, Takahashi S, <u>Asai N</u>, Kawada K, <u>Shimono Y</u>. Adipocytes promote cancer stem cell properties and metastatic progression of breast cancer cells through adipisin. 第 20 回 幹細胞シンポジウム, 2023 年. 7. <u>Hayashi T</u>, Okada S, Hirata M, Mizutani Y, Kijima Y, Suzuki M, <u>Shimono Y</u>. γ-Glutamylcyclotransferase, a novel regulator of cancer stem cell properties in breast cancer. 第 20 回 幹細胞シンポジウム, 2023 年. 8. <u>Shimono Y</u>, Mizuno M, <u>Khaledian B</u>, Goto H, Yoshida J, Funakoshi Y, <u>Hayashi T</u>, Munetsuna E, Maeda M, <u>Asai N</u>, Minami H, Kawada K. Adipocytes promote cancer stem cell properties in breast cancers. 日本臨床腫瘍学会, 2023 年. 9. Hou X, <u>Hayashi T</u>, Mizutani Y, Okada S, Suzuki M, <u>Shimono Y</u>. Lower expression of Rab31 confers cancer stem cell properties and therapeutic resistance to the CDK4/6 inhibitor in breast cancer. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年. 10. Sakai H, <u>Hayashi T</u>, Hirata M, Mizutani Y, Okada S, Kijima Y, Suzuki M, <u>Shimono Y</u>. γ-Glutamylcyclotransferase enhances cancer stem cell properties in breast cancer. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年. 11. <u>Hayashi T</u>, Yoshida J, Munetsuna E, <u>Khaledian B</u>, Ushida K, Mizuno M, Maeda M, <u>Asai N</u>, Kawada K, <u>Shimono Y</u>. Lack of adipokine adipisin suppresses breast cancer invasion and metastasis. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年. 12. <u>Khaledian B</u>, Yoshida J, <u>Hayashi T</u>, Mizuno M, Ushida K, Maeda M, Munetsuna E, Kawada K, <u>Asai N</u>, <u>Shimono Y</u>. Adipisin-dependent adipocyte differentiation promotes the adipocyte-breast cancer stem cell interactions. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年. 【その他特筆事項】 特になし。
----------------	--

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	富山市立富山市民病院・外科・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	
	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 GSK3β 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。)	研究 2 年目の本年度は以前に膵切除検体から樹立した膵線維芽細胞を用いて、10Gy の放射線照射により DNA ダメージを与えた後、day0, 3, 6, 10 の経時的な変化を観察した。照射された膵線維芽細胞は徐々に細胞増殖が停止し、老化細胞に特徴的な細胞および核の腫大化が認められ、Senescent-associated β galactosidase の発現が見られるようになった (Figure 1A)。以上より放射線照射による DNA ダメージにて、樹立した膵線維芽細胞に細胞老化が誘導されることが示された。	
		次に細胞老化を誘導した膵線維芽細胞において、老化蛋白と SASP 因子の発現を評価した。細胞老化の指標となる蛋白発現には様々なものがあるが、今回は p16 ^{INK4a} の発現を評価した。Western blot により p16 の発現を評価したところ、放射線を照射していない膵線維芽細胞では p16 蛋白の発現は認められなかったが、照射した膵線維芽細胞では day3 以降で恒常的に p16 蛋白の発現が確認された (Figure 1B)。
		また IL-6 の発現を RT-PCR を用いて評価したところ、漸増性の上昇が認められ、蛍光免疫染色では細胞質を中心に IL-6 の染色が認められた (Figure 1C, 1D)。
		その他のケモカイン (IL-8) や細胞外器質リモデリング因子 (MMP-1, PAI-1) に関する mRNA の発現について評価を行ったところ、放射線照射後の膵線維芽細胞であらゆる SASP 因子に関して mRNA の発現上昇が確認された (Figure 1E)。
		これらのことから、膵線維芽細胞に対して放射線照射による DNA ダメージを与えることで細胞老化が誘導されると同時に SASP 因子が発現することが確認された。今後は老化した線維芽細胞細胞と膵癌細胞株との共培養により、膵癌細胞の浸潤能および増殖能に与える影響を評価する予定である。
		

令和 5 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】 なし
	【学会発表】 なし
	【その他特筆事項】 なし

令和5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】	近年のがんゲノム解析の進展につれ、“標的化できるドライバー変異を持たないがん”が少なくないと分かってきた。それらががんに対してはゲノム変異以外の要素を治療標的として開拓することが求められており、例えば、代謝特性もその候補の1つとして期待されている。これら状況を踏まえ、腫瘍のNAD生合成系をターゲットする治療（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む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。)	前年度におけるヒト肺がん細胞株パネルの解析において、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いことが分かっていた。そこで本年度は、そのような差異が生じるメカニズムと意義について、解析を行った。 これまでの検討から、トリプトファン/キヌレニン経路に由来するNAD合成（de novo経路）が、NSCLC株におけるNAMPT阻害後に見られる、やや高いNADレベルに寄与していることが示唆されていた。この仮説を検証するため、SCLC株にde novo経路の律速酵素QPRTを高発現させたところ、NADレベル・生存細胞数の両方において、NAMPT阻害への強い耐性が獲得された（図A）。反対にNSCLC株にてQPRTをノックダウンしたところ、NAMPT阻害への耐性は有意に減弱した。しかし、その減弱幅はそれほど大きくなかった（図B）。これらの結果から、1) SCLCにおけるde novo経路の欠損が、同がん種のNAMPT阻害高感受性の原因であるものの、2) NSCLC株には、de novo経路以外の耐性要因も存在すること、が強く示唆された。また、予備的な結果ながら、¹³C-グルコースのトレーサー解析により、NSCLC株ではNAMPT阻害後も解糖系GAPDH（NADを必須の補酵素とする）の活性が部分的にしか抑制されておらず、十分量のグルコース由来炭素がTCA回路等に流入していることが示唆された。即ち、NSCLC株でNAMPT阻害後に少ないながら残存するNAD量で、中心炭素代謝は十分に維持されるように考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】	Nomura, M., Ohuchi, M., Sakamoto, Y., Kudo, K., Yaku, K., Soga, T., ... , Hirao, A. , ... Tanuma, N. (2023) Niacin restriction with NAMPT-inhibition is synthetic lethal to neuroendocrine carcinoma. <i>Nat Commun</i> , 14(1):8095.
	【学会発表】	Tanuma, N. Targeting metabolic vulnerability of neuroendocrine carcinomas. 第110回日本泌尿器学会総会（神戸）特別講演 Tanuma, N. Harnessing metabolic synthetic lethality of cancer by dietary intervention. 第97回日本薬理学会年会（神戸）シンポジウム”生体の老化・がん化における代謝制御の分子基盤と創薬展望”
	【その他特筆事項】	

令和 5 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 教授 木村高弘
	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	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。)	昨年度、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。 本年度は、予算の関係もあり主に進行前立腺癌患者からの血液検体供与を蓄積にとどまった。（約 20 例の追加）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。 次年度は進行前立腺癌により死亡した剖検検体および原発巣における RB1 および SCULA2 の発現（欠失）について行う。	
【成果等】	【主な論文発表】 Radiographic Progression at Castration-Resistant Prostate Cancer Diagnosis: A Prognostic Indicator of Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer Clin Genitourin Cancer. 2024 Mar 21;22(3):102075.	
	【学会発表】 田代康次郎、本田真理子、占部文彦、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 111 回 日本泌尿器科学会総会 2024 年 4 月 25-27 日(パシフィコ横浜・横浜 4/25 口頭・ポスター発表予定)	
	【その他特筆事項】	

令和5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	九州大学・大学院生 D2・中山千尋
	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由来のリードスルー ncRNA を検出した。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可能な 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。興味深いことに、<i>SETD2</i> と H3K36me3 の両方が欠失している細胞において、転写終結破綻は見られなかった。このことは、<i>SETD2</i> と H3K36me3 両者とも転写終結に直接的に関与しないことを示している。現在研究代表者は、H3K36me3 がクロマチン上から失われたことで、他のエピジェネティックな変化が生じ、転写終結を破綻させると考えている。現在、<i>SETD2</i> KO 細胞における H3K36me3 以外のヒストン修飾 (H3K36me2, H3K27me3 など) や DNA 修飾を Cut&Tag 法やクロマチン免疫沈降法、メチル化 DNA 沈降法によって解析しているところである。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ることが多々ある。<u>今後鈴木健之教授グループと共同で、<i>SETD2</i> 遺伝子に加えて複数のクロマチン制御遺伝子 (SWI/SNF 構成因子の遺伝子等) 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。 さらには、<i>SETD2</i> 特異的阻害剤によって産生される ncRNA 転写をプロファイルし、その ncRNA の生物学機能を明らかにする。<u>鈴木健之教授グループと共同で、<i>SETD2</i> 特異的阻害剤を用いて、<i>SETD2</i> のがん浸潤性、転移性に関する役割も調べる</u>。今後、以上の方法で、<i>SETD2</i> 活性を失ったがんクロマチン環境から産生される ncRNA を利用、もしくは標的としたがん治療アプローチを開拓する。	
【成果等】	【主な論文発表】 共同研究成果に関しての発表論文は今の所ない。 なるべく早く共同研究成果を論文化する所存である。	
	【学会発表】 <u>野島孝之 (研究代表者)</u> - 日本 RNA 学会 (2023、口頭発表) - 日本生化学会シンポジウム (2023、オーガナイザー、口頭発表) - 第 35 回 Tokyo RNA クラブ (2023、招待講演) - 第 6 回日本核酸医薬学会サテライトシンポジウム (2023、招待講演) - 日本分子生物学会ワークショップ (2023、招待講演) - 慶應大学薬学部サイヤンスセミナー (2024、特別講演) - がん研究所セミナー (2024、招待講演)	

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

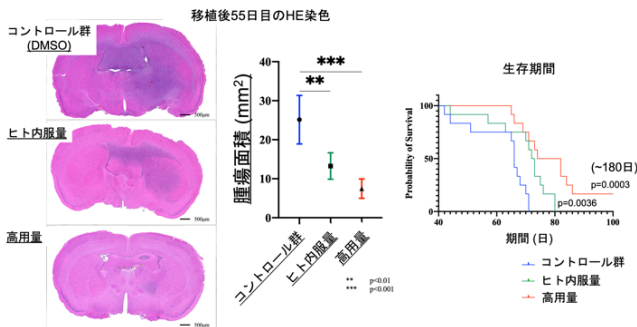
	<u>中山千尋（大学院生 D2）</u> 1. 日本 RNA 学会（2023、ポスター発表） 2. RNA フロンティアミーティング（2023、口頭発表） 3. 日本生化学学会年会（2023、ポスター発表） 4. 日本分子生物学会年会（2023、ポスター発表）
	【その他特筆事項】 <u>野島孝之（研究代表者）</u> 文部科学大臣表彰 科学技術賞（研究） <u>中山千尋（大学院生 D2）</u> RNA フロンティアミーティング 2023 ベストプレゼンテーション賞 独国 Böhringer Ingleheim Fonds トラベルアワード

令和5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		メカノバイオリ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。その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も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)。しかしながらこの現象は再現性が低く、多くの場合で <i>in vitro</i> 血管モデルでは HUVEC が激しく動き安定した血管シートを形成していなかった。そこでまずは HUVEC を接着させる培養基盤の検討を行った。マトリゲルの成分がロットごとに安定しない可能性を考慮し、ラミニン 511 をコラーゲンゲルに結合させて HUVEC を播種し培養したが、HUVEC の運動は抑制されなかった。さらに HUVEC に hTERT を導入し不死化した細胞株からクローン株を樹立し、コロニーの形状から低い運動能をもつと予測される (丸いコロニーを形成した) HUVEC クローン株を用いて血管シートを作製したが、こちらでも細胞の運動は抑制されなかった。加えて脳血管内皮細胞を用いた血管シートを作製したが、これも激しく運動していた。今後は HUVEC の不死化株を新規に作製するとともに、HUVEC に物理的な刺激を与えて運動が抑制されるかを検証する。 さらに、がん細胞株を硬さの異なる基質上で培養したところ、硬い基質上で転写因子 ATF5 の活性が上昇することを発見した (図)。硬い基質を認識したがん細胞は integrin-JAK 経路や actomyosin を介して MYC の発現を誘導し、その結果 ATF5 を核内に移行させることを見出した。さらに ATF5 は増殖抑制性分子である EGR1 の発現を抑制させることで、がん細胞の増殖を促進させることも明らかにした。本内容は現在 Revision となっている。 図: 硬い基質による ATF5 を介したがん細胞の増殖促進メカニズム	
【成果等】	【主な論文発表】	特にありません。
	【学会発表】	Seiichiro Ishihara, Atsushi Enomoto, Akihiro Sakai, Hisashi Haga: Cancer progression regulated by mechanical microenvironment, International Tumor Microenvironment Seminar in Sapporo, 2024. 石原 誠一郎、榎本 篤、酒井 晃太、芳賀 永: 「硬さ」に応答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、2024 年がん関連三学会 Rising Star ネットワーキング、2024 年 石原 誠一郎、榎本 篤、酒井 晃太、芳賀 永: 基質の硬さが転写因子 ATF5 を介してがん細胞を悪性化させるメカニズム、メカノバイオリロジー討論会 2023、2023 年 石原 誠一郎、榎本 篤、酒井 晃太、芳賀 永: がん細胞におけるメカノトランスダクションを介した悪性化、第4回 SGH がん研究者ワークショップ、2023 年
	【その他特筆事項】	特にありません。

令和 5 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、非小細胞肺がんを対象に 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。)	本研究では、各種 KRAS 変異のパターンによって脳転移能に差が生じるかを評価することを目的として、まず各種 KRAS 変異体の発現プラスミドを作製した。当該プラスミドは、N 末端側に FLAG タグを付加し、KRAS 遺伝子の終始コドンの C 末端側に KRAS 遺伝子変異ごとに 8 塩基のバーコード配列を付加した。 また、マウスメラノーマ由来の B16/F10 細胞に脳転移指向性を獲得させた後、同細胞に上述の KRAS 変異体を安定的に発現する細胞モデルの確立を目指した。mCherry を安定的に発現する B16/F10 細胞を樹立し、C57BL6/J マウスの左心室へ移植後に脳転移した同細胞を脳から単離し、in vitro での培養系を樹立した (B16F10/BrM1 細胞)。同行程をさらに 2 回繰り返し、脳転移指向性を獲得した B16F10/BrM3 細胞を樹立予定であったが、技術的な問題から今回は B16F10/BrM1 細胞の樹立に止まった。 各種 KRAS 変異体を安定的に発現する B16F10/BrM1 細胞を樹立し、KRAS 阻害剤 (ソトラシブ、アダグラシブ) に対する感受性を評価したところ、KRAS^{G12C} を発現する細胞株を含め全ての細胞について増殖阻害効果を認めなかった。また、これらの細胞について KRAS 下流のエフェクター分子の活性を評価するために phospho-ERK (MAPK シグナル経路)、phospho-Akt (PI3K/Akt シグナル経路)、phospho-TBK1 (RAL-TBK1 シグナル経路) をウェスタンブロットで検出したところ、各細胞間で変化を認めなかった。 以上より、in vitro の実験系においては KRAS 変異の違いによって活性化される KRAS のエフェクター分子に違いを生じないことが示唆された。今後も引き続き B16F10/BrM3 細胞の樹立に努め、同細胞の KRAS 変異体を樹立した後に in vivo 系での脳転移能の評価する。さらに、KRAS 変異が脳転移におよぼす影響について分子メカニズムの解明を目指す。	
【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	

研究課題		片頭痛薬ロメリジンによるグリオーマ幹細胞標的治療の臨床応用へ向けた基礎研究
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	金沢大学附属病院集中治療部 特任助教 一ノ瀬 惇也
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	遺伝子・染色体構築研究分野 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り、高い治療抵抗性の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開発に努めてきた。本研究の目的はスクリーニングにより見出された片頭痛薬ロメリジンのもつグリオーマ幹細胞に対する抗腫瘍効果及びその作用機序について明らかにすることである。	
【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。)	片頭痛薬ロメリジンのもつグリオーマ幹細胞に対する抗腫瘍効果について明らかにするために、本年度はグリオーマ幹細胞脳内移植マウスモデルを用いた以下2つの実験を主に行った。具体的な方法として、グリオーマ幹細胞 (KGS10) を脳内に移植し、移植後2日目から連日ロメリジンまたは溶媒 (DEMSOのみ) を経口投与した。ロメリジン投与量は低用量群 (ヒト等価用量を用い、60kg のヒトに対するロメリジン通常内服量及び最大内服量をマウスに換算した量：4.68mg/kg) および高用量群 (過去の報告で有害事象を認めなかったと報告された量：30mg/kg) の2群とした。結果を以下に示す。 <u>ロメリジンは脳腫瘍マウスモデルにおいて腫瘍形成を抑制する</u> 腫瘍移植後55日目に移植脳連続薄切切片を作成し、腫瘍径を計測した。その結果、ロメリジン投与群ではコントロール群と比較して有意な腫瘍径の縮小を認めた。さらにロメリジン高用量群では、低用量群と比較し腫瘍径がさらに縮小した。 <u>ロメリジンは脳腫瘍マウスモデルにおいて生存期間を延長する</u> 腫瘍径の評価と同様のマウスモデル・薬剤の投与方法を行い、脳腫瘍移植後の生存期間を評価した。結果、Kaplan-Meier 生存曲線からロメリジン投与群において生存期間が有意に延長した。これは特に高用量群で有意であった。  さらに、一般的な glioma cell line を用いた実験で、現在の膠芽腫に対する標準治療薬であるテモゾロミドとロメリジンの併用療法が膠芽腫細胞に対し相乗的な抗腫瘍効果を有することを見出しており、今後はさらなる詳細な評価を行う。	
【成果等】	【主な論文発表】 投稿準備中	
	【学会発表】 一ノ瀬惇也、玉井翔、田中慎吾、木下雅史、小林昌彦、平尾敦、中田光俊 既存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に向けた基礎研究 (シンポジウム) 第23回日本分子脳神経外科学会 2023年8月25-26日 宮崎	
	【その他特筆事項】	

研究課題		腸腫瘍由来オルガノイドを用いた転移（線維性ニッチ）制御法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所・部長・上久保靖彦
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所・上席研究員・巽康年
	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所・研究員・渡部隆義
	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所・任意研修生・増田達哉
	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】	Pan-RUNX 阻害剤(Chb-M') をマウスに投与することで、マウスの肺で RUNX ファミリー (RUNX1,2,3) の発現を抑制したのち(プレコンディショニング: Pre-conditioning)、マウストリプルネガティブ乳癌細胞株(4T1)を尾静脈より移植する(転移アッセイ)と、肺転移が劇的に抑制される。仮説として、RUNX ファミリー により転写制御されている未知なる接着因子の発現が、Pan-RUNX 阻害剤 投与により変化することにより、肺転移に必須とされる線維性ニッチ形成が影響を受け、転移が成立しないことが考えられる。本申請では、共同研究下に供与を受けた AKTP オルガノイド (マウス腸癌細胞株) を用いることで、Kras 変異型大腸癌等の肝臓や肺への転移抑制を可能とする革新的制御法を確立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。)	【研究内容】 Pan-RUNX 阻害剤(Chb-M') 我々は現 RUNX ファミリー に対する包括的阻害剤(Chb-M'、開番号 W02019/230669)を開発中である。Chb-M' は、RUNX ファミリー 転写因子の共通コンセンサス配列 5'-TGTGGT-3' を標的とするように設計された Pyrrole-Imidazole Polyamide (PIP) をアルキル化剤クロラムブシル(Chb)で修飾した薬剤候補である。(図1:Morita K, et al. J. Clin Inv 2017) 【CROX 戦略】 Cluster Regulation of RUNX (CROX) 戦略とは RUNX ファミリー を包括的に抑制し制御することで RUNX ファミリー の発現及び、RUNX ファミリー の標的因子を包括的に制御する戦略である。Chb-M' は CROX 法 を実現できる新薬候補である。 【転移に必須のニッチ制御コンセプト】 Chb-M' は接着分子: E-セレクトインを直接転写抑制し、骨髓血管微小環境(ニッチ)における AML 細胞 の生着を顕著に減少させた (Blood Adv. 2018)。我々は RUNX ファミリー による TNBC の転移能制御の可能性を想定し「CROX 戦略が肺の血管ニッチにおける E-セレクトイン抑制を介して癌細胞の接着を困難にさせる」という仮説の着想に至った。 【研究概略】 ① Chb-M' により転移が劇的に抑制されることが期待される肝臓における未知の因子(RUNX 標的)を同定する。 ② 同定された接着因子もしくは未知の因子が転移を定着させる線維性ニッチ形成に必須であることを検証する。 ③ Kras 変異型大腸がん等の転移抑制を可能とする革新的制御法を確立する。 【成果】 成果 A : 実際に Chb-M' を用いてプレコンディショニングを行ったマウス(BALBC 野生型)に TNBC 細胞株 4T1 (BALBC 由来)を尾静脈より静脈注射し移植したところ(転移アッセイ)、肺転移が劇的に抑制された。 (図2: Chb-S は標的配列の異なる PIP コントロール: 矢印は肺転移した 4T1 細胞を示す) Chb-M' 知財: 国際公 RUNX Target gene expression RUNX target gene promoter RUNXターゲット遺伝子をスイッチ"オフ"する 図1. RUNX阻害剤Chb-M'の構造式と作用機序	

マウスにChb-M'をプレコンディショニングするとマウスTNBC細胞の転移が抑制される

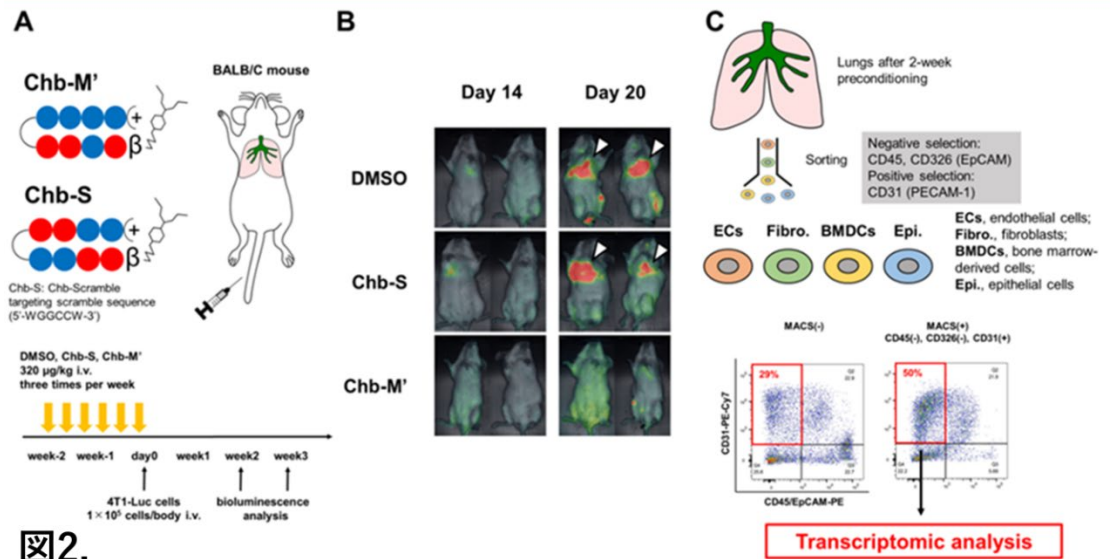


図2.

成果 B :

4T1 細胞に Chb-M' を投与し、プレコンディショニングを行った上で抑制される遺伝子群を RNA Sequence で解析し、Chb-M' により抑制される遺伝子群より遺伝子 X を抽出し、TNBC 細胞側の転移に必須の因子であることを現在確認中である。(図 3)

A:TCGA-BRCA を用いた解析:Chb-M' によりマウス TNBC 細胞株 4T1 をプレコンディショニング後、抑制される遺伝子群より遺伝子 X を抽出した。

B:遺伝子 X のプロモーター領域に RUNX1, 2, 3 は結合することを確認した。

C:TNBC 患者の中に RUNX3—遺伝子 X カテゴリーが存在することを発見した。

Chb-M' は遺伝子XをTNBC細胞において直接転写抑制する

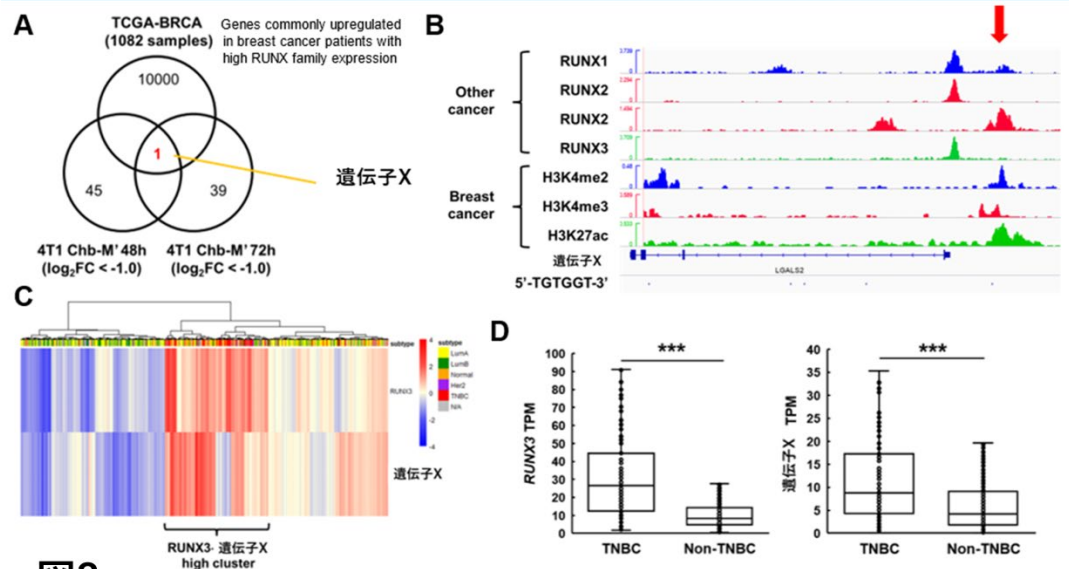


図3.

成果 C :

共同研究下に供与を受けた AKTP オルガノイド(マウス腸癌細胞株)を同型のマウス(B6)の脾臓に移植することで、現在肝臓への転移が形成されるかどうかを検証中である。また AKTP 細胞に Chb-M' を投与することで、転移が抑制されるかどうか検証中である。

【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Masuda T, Daifu T, Mikami M, Sugiyama H* and Kamikubo Y* Cluster Regulation of RUNX (CROX): Strategy against Malignant Rhabdoid Tumor Journal of Blood & lymph Volume 13, Issue 1 (2023) DOI: 10.37421/2165-7831.2023.13.296 2. Cancer accumulation and anti-cancer activity of “CROX (Cluster Regulation of RUNX)” PIP in HER2-positive gastric cancer evaluated by chicken egg cancer model Under revision International Journal of Pharmaceutics
	【学会発表】 1. 第 32 回日本分子標的治療学会 2023 年 6 月 21 日（水）～6 月 23 日（金）佐賀 “CROX (Cluster Regulation of RUNX)” strategy-dependent suppression of various cancers through the regulation of BCR-ABL1, RTK and p53-mediated apoptosis Masuda T, Watanabe T, Tatsumi Y, Ozaki T, Hippo Y, Sugiyama H, Kamikubo Y 2. 第 32 回日本がん転移学会 2023 年 7 月 20 日（木）～21 日（金）仙台 Masuda T, Tatsumi Y, Watanabe T, Ozaki T, Hippo Y, Sugiyama H, Kamikubo Y CROX (Cluster Regulation of RUNX) strategy-mediated targeting of E-selectin against vascular niche 3. 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 9 月 21 日（木）～23 日（土）横浜 神奈川県 Tatsumi Y, Masuda T, Watanabe T, R.Y.Utomo, U.M.Zulfin, E.Meiyanto, Suenaga Y, Hippo Y, Kamikubo Y Antitumor effect on osteosarcoma cells by curcumin analogs were accompanied by inhibition of histone acetylation 4. 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 9 月 21 日（木）～23 日（土）横浜 神奈川県 Masuda T, Tatsumi Y, Watanabe T, Ozaki T, Nakatani K, U.M.Zulfin, Suenaga Y, Hippo Y, Sugiyama H, Kamikubo Y 5. 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 9 月 21 日（木）～23 日（土）横浜 神奈川県 Watanabe T, Masuda T, Tatsumi Y, U.M.Zulfin, R.Y.Utomo, Suenaga Y, Hippo Y, E.Meiyanto, Sugiyama H, Kamikubo Y The use of Chorioallantoic membrane from fertilized chicken eggs as an anticancer drug evaluation system 6. 日本患者由来がんモデル学会学術集会 2023 10 月 24 日（火）- 25 日（水）- 26 日（木） RUNX 阻害剤による HER2 胃癌の治療効果及びクルクミン誘導体による骨肉腫の治療効果の検証 渡部 隆義、増田 達也、巽 康年、筆宝 義隆、上久保靖彦 7. 日本患者由来がんモデル学会学術集会 2023 10 月 24 日（火）- 25 日（水）- 26 日（木） クルクミン誘導体によるヒストンアセチル化抑制を伴った骨肉腫細胞に対する抗腫瘍効果 巽 康年、増田達哉、渡部 隆義、Rohmad Yudi Utomo, Umami Maryam Zulfin, Edy Meiyanto, 末永 雄介、筆宝 義隆、上久保 靖彦 8. 日本患者由来がんモデル学会学術集会 2023 10 月 24 日（火）- 25 日（水）- 26 日（木） フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病及び神経膠芽腫に対する RUNX ファミリー包括的制御戦略 増田 達哉、巽康年、渡部隆義、筆宝義隆、上久保靖彦
	【その他特筆事項】 特になし。

令和 5 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。また、CAFs で抑制された RECK 発現が、共培養された乳癌細胞の浸潤能亢進に寄与する可能性を示唆するデータも得られている。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】	
	【学会発表】	
	【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、統合失調症など様々な疾患の病態に影響を及ぼす腸内細菌種および代謝産物を同定してきた (Shimizu, Yamamura et al. Gut Microbes 2023; Yamamura et al. Obes Res Clin Pract 2021; Yamamura et al. J Pers Med 2021; Shimizu, Yamamura et al. GeroScience 2021; Yamamura et al. Biosci Microbiota Food Health 2020)。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、腸内細菌叢が膵がんの病態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。)	申請者らは最近、ハエを活用し、膵がん患者の様々な遺伝子型を模倣した世界初のモデル動物ライブラリを構築した (図 1)。そして、特に 4 遺伝子 (がん遺伝子 KRAS の活性化、がん抑制遺伝子群 TP53・CDKN2A・SMAD4 の不活性化) の変異を模倣した 4-hit ハエが最も悪性の形質を呈することを見出した。この結果は、この遺伝子型を有する患者が最も予後不良であるとの臨床報告 (Qian et al. JAMA Oncol 2023) と矛盾しない。これを踏まえて申請者らは、この 4-hit ハエの遺伝学スクリーニングと、自身らが有する哺乳類解析基盤 (Sonoshita et al. Nat Med 2001、Sonoshita et al. Cancer Res 2002、Sonoshita et al. Cancer Cell 2011、Sonoshita et al. Cancer Discov 2015、特許 6537143 など) を相補的に活用し、ヒト膵がんゼノグラフトの成長を著明に抑制する、AURORA キナーゼ B と MEK の共阻害シリーズ (国際特願 PCT/JP2021/007651; Sekiya, Yamamura et al. Cancer Res 2023 : 図 2) や GSK3b 阻害シリーズ (Fukuda, Yamamura et al. Cancer Sci 2024) を見出すことに成功した。さらに申請者らは、ハエと哺乳類、計算化学、創薬化学の異分野融合を展開し、副作用を招来する標的に結合しないよう認可薬の化学構造を改変して副作用を大幅に低減する新規の論理的創薬手法 Rational Polypharmacology を開発 control ptc>GFP 1-hit Ras^{G12D} 4-hit Ras^{G12D}-p53^{shRNA}- CycE-Smad4^{shRNA} 100 55 0 ハエ生存率 (%) 図 1 : 膵がん遺伝子型ハエモデル。翅原基で、patched (ptc) 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。Ras を活性化すると、形質転換細胞の増殖が亢進して帯が広がる (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。 全キナーゼ モデル化 膵がん患者 膵がん遺伝子型 モデルハエ 網羅的遺伝学スクリーニング 新規治療標的 MEK & AURKB モデルハエでの阻害剤試験 モデルマウスでの阻害剤試験 新規治療薬候補 trametinib & BI-831266 図 2 : ハエを活用した膵がんシークスの同定。膵がん患者の遺伝子変異を模倣したモデルハエを作成し、全キナーゼの遺伝学的スクリーニングによって新規治療標的 MEK と AURKB を同定し、さらに新規シークスとして MEK 阻害薬 trametinib と AURKB 阻害剤 BI-831266 の併用を見出した。		

し、甲状腺がんの治療薬リードを創出することにも成功している [Sonoshita et al. *Nat Chem Biol* 2018; Ung[#], Sonoshita[#] et al. *PLoS Comput Biol* 2019 ([#]equal contribution); 米国特許 US Patent 10,519,113]。このように申請者らは、複数のモデルや技術の連動研究基盤を活用し、新規シーズの開発を積極的に推進している。

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した。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3）。加えて申請者らは、細菌 X の主要な代謝産物である Y が trametinib の効果を増強し、この組み合わせ療法が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も発見した（図4）。

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、ハエおよびマウス実験で得られた結果の詳細な分子機序を明らかにする予定である。

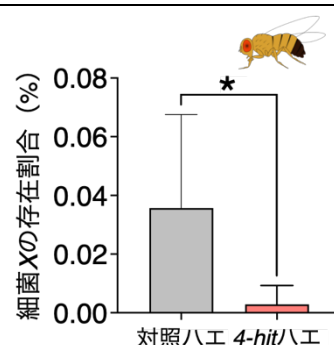


図3：4-hit ハエにおける腸内細菌 X の減少。各群 100 匹のハエ幼虫の後腸（ヒトの大腸に相当）の細菌叢の組成を網羅的に比較した。*、 $P < 0.05$ in Student's *t*-test.

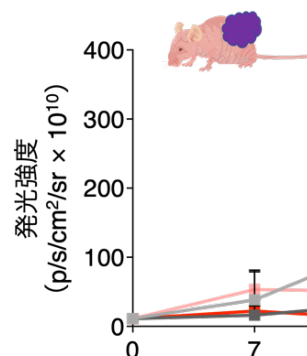


図4：細菌代謝産物 Y は膵がんモデルマウスにおいて MEK 阻害薬 trametinib の抗腫瘍効果を増強する。ルシフェラーゼ標識したヒト膵がん細胞を膵臓に同所移植したマウスに、Y や trametinib を投与。* $P < 0.0001$ in Student's *t*-test.

【成果等】

【主な論文発表】

- 関谷 翔, 佐藤 伶音, 山村 凌大, 園下 将大. 膵癌の遺伝子型を模倣したモデルショウジョウバエの活用による膵癌創薬研究の加速. *胆と膵*. 45(2), 127-134 (2024).
- Fukuda J, Kosuge S, Satoh Y, Sekiya S, Yamamura R, Ooshio T, Hirata T, Sato R, Hatanaka KC, Mitsuhashi T, Nakamura T, Matsuno Y, Hatanaka Y, Hirano S, Sonoshita M. Concurrent targeting of *GSK3* and *MEK* as a therapeutic strategy to treat pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci.* (2024).
- Tayama J, Hamaguchi T, Koizumi K, Yamamura R, Okubo R, Kawahara J, Inoue K, Takeoka A, Fukudo S. Efficacy of an eHealth self-management program in reducing irritable bowel syndrome symptom severity: A randomized controlled trial. *Sci Rep.* 14(1), 4. (2024).
- Ogawa H, Yokota S, Hosoi Y, Shindo A, Ogawa N, Yamamura R, Shimizu T, Nakade I, Arai S, Taniguchi M, Nishibata Y, Masuda S, Nakazawa D, Tomaru U, Iwasaki N, Ishizu A. Methylprednisolone pulse enhanced neutrophil extracellular trap formation in mice with imiquimod-induced lupus-like disease, resulting in ischemia of the femoral head cartilage. *Lupus Sci Med.* 10(2), e001042 (2023).
- 小菅 信哉, 平田 大賀, 関谷 翔, 山村 凌大, 園下 将大. ショウジョウバエを活用した膵がんの創薬研究. *BIO Clinica.* 8, 16-20 (2023).
- Sekiya S, Fukuda J, Yamamura R, Ooshio T, Hatanaka KC, Hatanaka Y, Mitsuhashi T, Nakamura T, Matsuno Y, Hirano S, Sonoshita M. Dual inhibition of MEK and AURKB as a candidate therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma identified in a *Drosophila* screening. *Cancer Res.* 83, 2704-2715 (2023).

7. Yamamura R, Inoue KY, Nishino K, Yamasaki S. Intestinal and Fecal pH in Human Health. *Front Microbiomes*. 2, 1192316 (2023).
8. Tayama J, Hamaguchi T, Koizumi K, Yamamura R, Okubo R, Kawahara J, Inoue K, Takeoka A, Schnei der A, Fukudo S. Efficacy of a self-management program using an eHealth system to reduce symptom se verity in patients with irritable bowel syndrome simultaneously with changes in gut microbiota: a randomized controlled trial. *medRxiv*. (2023).
9. 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*. 15, 2190306 (2023).

【学会発表】

1. 清水 由宇, 山村 凌大, 横井 友樹, 綾部 時芳, 鶴川 重和, 中村 幸志, 岡田 恵美子, 今江 章宏, 中川 貴史, 玉腰 暁子, 中村 公則. 短眠は Paneth 細胞 α -defensin 分泌量の低値および短鎖脂肪酸の産生量低下を伴う腸内細菌叢組成の攪乱に関係する. 第 27 回腸内細菌学会学術集会. 2023 年 6 月 28 日, 東京
2. 大久保 亮, 山村 凌大. 統合失調症患者の認知機能と腸内細菌叢の関連: 探索的横断研究. 第 27 回腸内細菌学会学術集会. 2023 年 6 月 28 日, 東京
3. 山村 凌大. 腸内細菌由来成分を活用した新規膵がん治療法の創出. 理化学研究所 生命機能科学研究センター 栄養応答研究チーム セミナー. 2023 年 7 月 14 日, 神戸
4. 山村 凌大. ショウジョウバエを活用した膵がん発生過程におけるマイクロバイオームの役割の解明と創薬への展開. 第 12 回 Top Runners in TRS. 2023 年 9 月 22 日, オンライン
5. Kimura T, Yamamura R, Kitagawa Y, Sonoshita M. Developing novel therapeutics for oral cancer leveraging *Drosophila*. 105th American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 2023 年 9 月 21 日, San Diego
6. Moriguchi T, Yamamura R, Sonoshita M, Shinohara N. Developing novel therapeutics for bladder cancer leveraging *Drosophila* models. European Society for Medical Oncology (ESMO) Congress. 2023 2023 年 10 月 22 日, Barcelona
7. Yamamura R, Katsurada T. 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. 19th Congress of European Crohn's and Colitis Organization 2024 年 2 月 22 日, Stockholm
8. Hata S, Ishihara S, Yamamura R, Haga H, Sonoshita M. Revealing the pathogenic impact arising from the interactions between pancreatic cancer cells and its associating extracellular matrix. Serendipity Symposium 2024. 2024 年 3 月 12 日, 石垣
9. Hata S, Ishihara S, Yamamura R, Haga H, Sonoshita M. Revealing the pathogenic impact arising from the interactions between pancreatic cancer cells and its associating extracellular matrix. フォトエキサイトニクス研究拠点 第 6 回研究会. 2024 年 3 月 27 日, 札幌

【その他特筆事項】

特になし

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機械学習ならびに分子動力学計算を駆使した次世代創薬基盤の確立																
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																	
	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】	申請者は最近、機械学習による創薬手法等と分子動力学計算手法を組み合わせた高精度で高親和性の薬理活性を有する低分子化合物を予想する手法を確立した。本手法では時間軸を考慮した分子動力学計算法も駆使することにより水溶液中での化合物の動態と結合自由エネルギーを精密に予測可能となる。本研究では、本手法を用いて 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候補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した。また、とりわけ HGF に直接結合する阻害化合物を同定し、それらリード化合物からの有機合成展開も視野に入れた次世代データ駆動型創薬研究を展開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 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 (IC_{50} 値= $11 \mu M$) を同定した。本研究ではこの化合物よりも高活性の阻害剤を得るために 3 種類の機械学習ツール (GNINA, OnionNet, BAPA[図]) を組み合わせて、さらに対数コンセンサススコア (ECR) 法を用いて化合物構造ライブラリのスクリーニングを試みた。これらの機械学習ツールの組み合わせは DUD-E データベースを用いた各種機械学習ツールの組み合わせに関する評価研究より私たちの研究グループが独自に見出したものである。本手法を用いて約 15 万化合物をスクリーニングして HGF β 鎖の Met 結合ポケットに結合する可能性のある 10 種類の化合物を選別した。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) を行って 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 を行った結果、リード化合物よりも ligand RMSD 値が低い新規の 5 化合物を同定する事に成功した。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、1 化合物は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 (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。 Gnina ・ AutoDock Vina のスコアリング関数により生成されたスコアやボーズを畳み込みニューラルネットワーク (CNN)を用いて学習したドッキングツール BAPA ・ Binding Affinity Prediction with Attention (BAPA) は、深層学習を用いたモデル。 ・ 記述子ベクトル 2500 個の記述子を用いて、結合親和性を予測 Onionnet ・ 層分子間接触に基づく畳み込みニューラルネットワーク (CNN)によるタンパク質-リガンド結合親和性予測。 <table><tr><th>化合物 ID</th><th>ΔG (kcal/mol)</th></tr><tr><td>Compound 1</td><td>-21.54</td></tr><tr><td>Compound 2</td><td>-16.91</td></tr><tr><td>Compound 3</td><td>-36.09</td></tr><tr><td>Compound 4</td><td>-22.36</td></tr><tr><td>Compound 5</td><td>-23.55</td></tr><tr><td>リード化合物 1</td><td>-12.62</td></tr><tr><td>リード化合物 2</td><td>-26.68</td></tr></table>		化合物 ID	ΔG (kcal/mol)	Compound 1	-21.54	Compound 2	-16.91	Compound 3	-36.09	Compound 4	-22.36	Compound 5	-23.55	リード化合物 1	-12.62	リード化合物 2	-26.68
化合物 ID	ΔG (kcal/mol)																	
Compound 1	-21.54																	
Compound 2	-16.91																	
Compound 3	-36.09																	
Compound 4	-22.36																	
Compound 5	-23.55																	
リード化合物 1	-12.62																	
リード化合物 2	-26.68																	
【成果等】	【主な論文発表】																	
	(1) Taira J, Yamaguchi M, Tashiro A, Kida A, Suzuki K, Sakai K, Matsumoto K, <u>Aoki S</u> , Computer-Assisted Identification of Inhibitor with Novel Pharmacophore Targeting First Kringle Domain of Hepatocyte Growth Factor, ChemistrySelect 8, 36, 2023.																	
	(2) Taniguchi S, Ono Y, Doi Y, Taniguchi S, Matsuura Y, Iwasaki A, Hirata N, Fukuda R, Inoue K, Yamaguchi M, Tashiro A, Egami D, <u>Aoki S</u> , Kondoh Y, Honda K, Osada H, Kumeta H, Saio T, Okiyoneda T. Identification of α -Tocopherol succinate as an RFFL-substrate interaction inhibitor inducing peripheral CFTR stabilization and apoptosis. Biochem Pharmacol. 215,115730, 2023.																	
	(3) Takeuchi, M, Teshima M, Okubo S, <u>Aoki S</u> , In silico and in vitro Identification of Compounds with Dual Pharmacological Activity against Metionyl-tRNA Synthetase and Isoleucyl-tRNA Synthetase of Staphylococcus aureus. ChemistrySelect 8,13, 2023.																	
	(4) Kawamoto S, Hori C, Taniguchi H, Okubo S, <u>Aoki S</u> , Identification of novel antimicrobial compounds targeting Mycobacterium tuberculosis shikimate kinase using in silico hierarchical structure-based drug screening. Tuberculosis, 141,102362. 2023.																	
	【学会発表】																	
	【その他特筆事項】																	

令和 5 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	
	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】	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、様々ながん種で発現しており、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、イヌ乳がんにおける 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。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、増殖には差がみられなかった。しかし、MTHFD2 ノックダウン細胞では上皮マーカーの E-cadherin の発現上昇と間葉マーカーの vimentin 発現低下がみられ、間葉・上皮移行がみられた。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・間葉移行および遊走能獲得に寄与すると考えられる。また MTHFD2 による遊走能獲得は細胞増殖能と異なり、容易には修復されない表現型であることが推察される。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 町田雪乃、小名木れみ花、落合和彦、中川貴之、西村建徳、後藤典子、道下正貴：イヌの乳がんにおける葉酸代謝酵素 MTHFD2 の機能解析、第 9 回がん代謝研究会、愛媛県松山市、2023 年 5 月 31 日-6 月 1 日	
	【その他特筆事項】 なし	

令和5年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

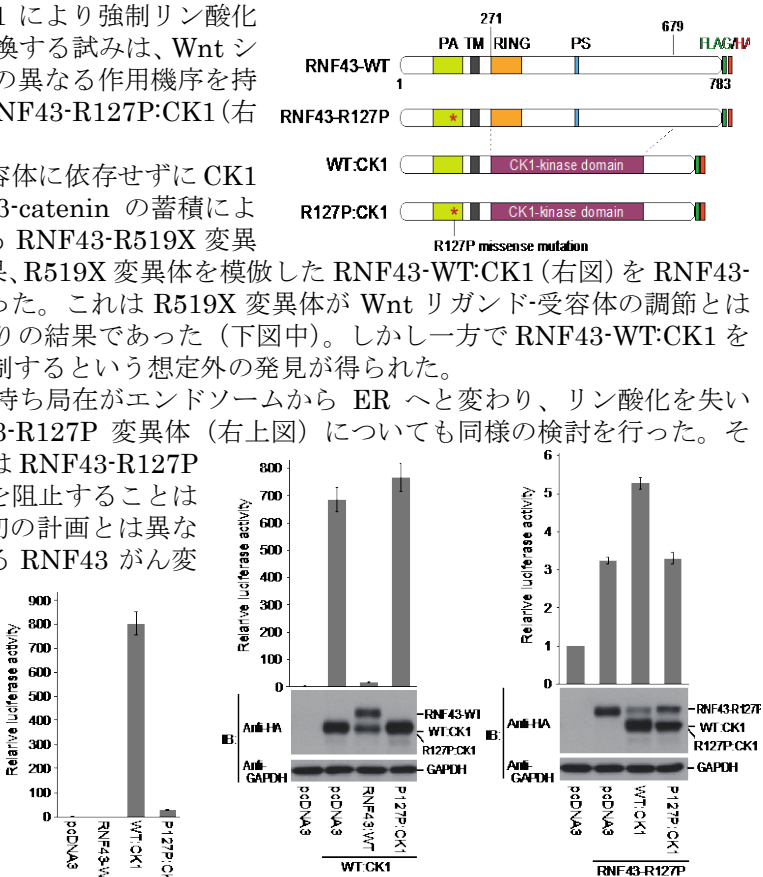
研究課題		BIG3-PHB2 複合体が乳がん薬剤耐性に果たす分子基盤と新治療戦略の開拓
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学・准教授・吉丸哲郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	医薬基盤研究所・所長・片桐豊雅
	所属・職名・氏名	徳島大学・特任准教授・内山圭司
	所属・職名・氏名	医薬基盤研究所・研究員・松下洋輔
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	これまでにホルモン依存性乳がんを高頻度に発現亢進を認めるがん特異的足場タンパク質 BIG3 が、腫瘍抑制因子 PHB2 の抑制機能を制御して乳がんの病態に寄与することを見出し、BIG3-PHB2 相互作用を標的とした分子内架橋型阻害ペプチド (stERAP) の投与が PHB2 の腫瘍抑制機能の再活性化を誘導する新たな治療法の開発に取り組んでいる。本研究は、BIG3-PHB2 複合体の局在が抗ホルモン剤タモキシフェンに対する感受性細胞株と耐性獲得細胞株でまったく異なることに着目し、stERAP を用いて BIG3-PHB2 複合体の各局在での機能と役割を評価し、BIG3 による PHB2 抑制活性の制御およびシグナル増強がタモキシフェン耐性獲得に必須であることを明らかにする。	
【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。)	近年、エストロゲン受容体 (ERα) は細胞膜近辺に局在し、エストロゲン刺激により増殖因子と膜型受容体と相互作用して、迅速な細胞内シグナルカスケードを活性化することで、内分泌療法耐性の乳がんを誘導する可能性が指摘されているが、既存の抗エストロゲン療法薬にて、これらの機序の制御は困難である。さらに、TCGA の公共データベースによると、BIG3 発現と増殖因子の膜型受容体 IGF-1Rβ の共発現が ERα 陽性乳がん患者の予後に有意に関連していることから、多岐にわたる PHB2 の抑制機能の活性化が適用できると着想した。その結果、タモキシフェン耐性獲得細胞株では、感受性細胞株と異なり、BIG3-PHB2 複合体が細胞膜で IGF-1Rβ と結合して IGF-1Rβ のリン酸化の亢進に関与していることを明らかにした。一方、stERAP 処理は BIG3 を細胞膜から解離させ、細胞膜の PHB2 は ERα と IGF-1Rβ に結合したままで抑制活性の指標である Ser39 のリン酸化が誘導され、その結果、IGF-1Rβ のリン酸化が顕著に抑制されることを見出した。これらの事実は、細胞膜に局在する PHB2 がタモキシフェン耐性獲得シグナルを効率的に抑制することを意味しており、BIG3-PHB2 複合体が細胞膜に局在する意義は、薬剤耐性シグナルの活性化を促すことであると考えられた。 さらに、タモキシフェン耐性細胞株に対して stERAP 処理したときの Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) は、mTOR, EGFR, cAMP などの多岐にわたるシグナルを抑制できることを示した。また、ERα 陽性乳がん患者では、IGF-1Rβ に加えて、EGFR との共発現も予後と有意な相関関係を示したことから、増殖因子の刺激により細胞質に局在する BIG3-PHB2 複合体が活性化され、小胞輸送を介して細胞膜に移行し、細胞膜で IGF-1Rβ および EGFR と複合体を形成することで、耐性獲得シグナルの活性化に寄与している分子機序の可能性を示唆させた。 一方で、stERAP 処理による BIG3-PHB2 複合体の崩壊は ERα 陽性乳がん細胞株およびタモキシフェン耐性細胞株の増殖を <i>in vitro</i> と <i>in vivo</i> にて抑制させ、さらに、タモキシフェンとの併用投与により相乗的な抑制効果を有していたことから、有効な治療薬として期待される。	
【成果等】	【主な論文発表】 該当なし	
	【学会発表】 1. <u>吉丸哲郎</u>、松下洋輔、片桐豊雅：BIG3-PHB2 複合体を標的とした HER2 陽性乳がんの薬剤耐性を克服する分子内架橋型阻害ペプチド stERAP の開発、第 27 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2023 年 6 月 2. <u>吉丸哲郎</u>、松下洋輔、笹三徳、三好康雄、片桐豊雅：Targeting BIG3-PHB2 interaction overcomes trastuzumab-resistance in patients with HER2-positive breast cancer、第 82 回日本癌学会学術総会、2023 年 9 月	
	【その他特筆事項】 なし	

令和5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		植物抽出物による腫瘍形成抑制効果とその分子機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学大学院・非常勤助教・須賀比奈子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	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	日本大学・助手・高尾恭一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・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、アブラナ科以外の植物抽出物から、肺腺がん由来細胞株 PC-9, A549, H838 などの増殖を抑制するものを見出した。この植物抽出物は肺大細胞がん由来細胞株 H1299 の増殖も抑制したが、胎児腎由来細胞株 293T や乳腺がん由来細胞株 MCF7 では増殖抑制効果があり見られなかった。これらの結果より、この植物抽出物が非小細胞肺がんに対して腫瘍形成抑制効果があると考え、ヒト非小細胞肺がん由来細胞株の移植マウスモデルを用いて、植物抽出物による腫瘍形成抑制効果とその分子機構を解析することを本研究の目的とした。	
【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 移植マウスモデルを用いた植物抽出物による腫瘍形成抑制効果の解析 非小細胞肺がん由来細胞株のうち、肺腺がん由来細胞株 A549 (1 x 10⁷ 個) を、ヌードマウス (BALB/c-nu/nu; ♀ 6 週齢) の腹側部に皮下投与し、移植マウスモデルを作製した。翌日から 1 日 1 回、植物抽出物を、A549 細胞を投与した腹側部に皮下投与し、数日に 1 回体重及び腫瘍サイズの計測を行った。その結果、溶媒を投与した群と比較して、植物抽出物を投与した群は腫瘍サイズの増加が抑制されていた。A549 細胞を投与した 24 日後に腫瘍を摘出し、溶媒投与群と植物投与群を比較したところ、外見からは腫瘍サイズ以外の違いは見られなかった。植物抽出物の投与間隔を 2 日に 1 回に変更した場合も同様の結果が得られた。 これらのことから、植物抽出物は腫瘍形成を抑制するが、腫瘍以外には作用しないと考えられた。 ② 移植マウスモデルを用いた植物抽出物による腫瘍形成抑制効果の組織学的解析 肺腺がん由来細胞株 A549 移植マウスより摘出した腫瘍を固定し、様々な組織学的染色を行った。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った結果、植物投与群では好中球主体の膿瘍や肉芽腫性の炎症が見られた。増殖細胞マーカーとして用いられる Ki-67 の免疫染色を行った結果、溶媒投与群では Ki-67 陽性細胞が多く見られたが、植物投与群では溶媒投与群の約 30-40% の Ki-67 陽性細胞しか見られなかった。マクロファージマーカーとして用いられる Iba1 の免疫染色を行った結果、植物投与群では Iba1 陽性細胞が非常に多く見られたが、溶媒投与群では陽性細胞は植物投与群より少なかった。T リンパ球マーカーとして用いられる CD3、及びアポトーシスマーカーとして用いられる Capsase-3 陽性の細胞はほとんど見られず、植物投与群と溶媒投与群との違いはわからなかった。 これらのことから、植物抽出物は炎症を引き起こすことにより腫瘍形成を抑制していること、アポトーシスを起こさないことが考えられた。 ③ 移植マウスモデルを用いた植物抽出物による腫瘍形成抑制に関与する遺伝子の同定 移植マウスより摘出した腫瘍を用いてがん関連遺伝子の発現解析を行うことを試みた。今後、腫瘍から皮膚の細胞や線維芽細胞、好中球、マクロファージなどを取り除き、肺腺がん細胞のみを用いて、発現解析を行う予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 須賀 比奈子、高尾 恭一、野村 将春、後藤 典子「肺腺がん細胞株の増殖に対する植物抽出物の抑制効果」2023 年 9 月、第 82 回日本癌学会学術総会（横浜）	
	【その他特筆事項】	

令和 5 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		Long non-coding RNA の細胞内局在の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学・助教・西村 建徳
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・鈴木 健之
【研究目的】	生体分子はその局在、相互作用分子によってその役割を変える。本研究では生体分子として、いまだ機能未知の分子が多数存在する long non-coding RNA (lncRNA) に着目した。そして、局在場所としては、エネルギー産生、アポトーシス、核酸代謝に関係し、核同様にゲノムを包含するミトコンドリアに着目した。本研究では、ミトコンドリアに局在する lncRNA を同定し、その機能について解析することを目的とした。加えて、がん特異的に発現、機能している lncRNA を同定し、がん治療への展開を試みることも目的とした。	
【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。)	本研究を通し、三つの lncRNA を研究標的として同定した。そのうち二つに関しては anti-sense oligonucleotides (ASO) を用いて効率よくノックダウンすることができた。今後、もう一つの lncRNA に関しても ASO でノックダウンができる配列を探し出す予定である。本研究で、siRNA, shRNA, CRISPR-Cas9 を用いず、ASO を用いた理由は ASO が実際のがん治療に既に使われており、将来的に配列を変えるのみで新規治療法をベッドサイドに届けられると考えたからである。 実際に lncRNA がミトコンドリアに局在しているのかを検証する方法としては二つの手法を用いることとした。①細胞分画によりミトコンドリアを単離し、qRT-PCR を行う。② fluorescent in situ hybridization (FISH), immunocytochemistry (ICC) を行う。①についてはいくつかの手法を試し、単離法について検討を行った。単離とバルクでの qRT-PCR はできたので、今後、複数の細胞株、培養条件 (例: 抗がん剤処理の有無) における lncRNA の発現量を定量化する。②については FISH と ICC を行い、共焦点顕微鏡で観察を行ったが、lncRNA の局在を議論できる解像度を得ることは困難であった。そこで、今後は超解像顕微鏡である STORM, STED 顕微鏡を用いた観察を行う予定である。観察に用いる色素の選定を終え、実験条件のチューニングを終えた。今後 lncRNA とミトコンドリアタンパク質を同時に蛍光染色し、観察する予定である。 lncRNA の機能についてはノックダウンができた二つの lncRNA に関してはノックダウンにより細胞死が誘導されることがわかった。しかし、どのような分子機序により細胞死が誘導されるのかについてはまだわかっていない。今後、RiboTrap 法等を用いて、lncRNA と相互作用するタンパク質を同定し、lncRNA のがんにおける機能を明らかにしたいと考えている。	
【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	

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】	幹細胞特異的ユビキチンリガーゼである RNF43 は、CK1 によるリン酸化を受けて Wnt 受容体を分解する能力が活性化される。しかし大腸がんにおいて RNF43 の細胞外ドメインに変異があると細胞内局在異常によりこの活性化が起こらないためがん遺伝子となる。しかし局在異常の変異 RNF43 をアミノ酸置換により模倣的にリン酸化状態にすると、その機能を回復しがん抑制遺伝子に戻る。本研究では、細胞内局在異常を来した変異 RNF43 を局在はそのまま人為的にリン酸化してがん抑制遺伝子に再転換することで、右側に発生し予後不良であるマイクロサテライト不安定性 (MSI) を持つ RNF43 の遺伝子変異大腸がんの新規治療法の開発を目的とした基礎検討を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	発がん変異型 RNF43 を CK1 により強制リン酸化してがん抑制遺伝子へと再転換する試みは、Wnt シグナル活性化するうえで2つの異なる作用機序を持つ RNF43 の変異に対して、RNF43-R127P:CK1 (右上図) を用いて検討した。 まず Wnt リガンドや Wnt 受容体に依存せずに CK1 と強固に結合することで直接β-catenin の蓄積による Wnt シグナルを活性化する RNF43-R519X 変異体について検討した。その結果、R519X 変異体を模倣した RNF43-WT:CK1 (右図) を RNF43-R127P:CK1 は抑制できなかった。これは R519X 変異体が Wnt リガンド-受容体の調節とは関係していないため、予想通りの結果であった (下図中)。しかし一方で RNF43-WT:CK1 を野生型の RNF43 が強力に抑制するという想定外の発見が得られた。 次に細胞外ドメインに変異を持ち局在がエンドソームから ER へと変わり、リン酸化を失い不活性型となっている RNF43-R127P 変異体 (右上図) についても同様の検討を行った。その結果、RNF43-R127P:CK1 は RNF43-R127P による Wnt シグナルの増強を阻止することは出来なかった (下図右)。当初の計画とは異なり RNF43-R127P:CK1 による RNF43 がん変異体の機能回復は実現できなかったが、RNF43-WT:CK1 に R127P 変異を導入するだけで Wnt リガンド非依存的なシグナルの活性化が阻害されるなど (下図左)、想定外かつ分子機序不明の新規情報が得られ、次の研究へと繋がる重要なシーズとなった。 	
【成果等】	【主な論文発表】 ● Tadasuke Tsukiyama, New insights in ubiquitin-dependent Wnt receptor regulation in tumorigenesis. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal, 10.1007/s11626-024-00855-w, 1-17 【学会発表】 ● Wnt 受容体分解機能を失った発がん型 RNF43 変異体を機能回復させる試み, 築山忠維, 畠山鎮次 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月8日 ● 発がん過程における Wnt シグナルから p53 へのクロストーク, 築山忠維, 畠山鎮次 第82回日本癌学会学術総会 2023年9月23日 【その他特筆事項】	

令和 5 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・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。)	新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の影響により、研究代表者は約 2 年間がん進展制御研究所に出向くことができず、そのため、目標としていた Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いた scRNA-seq 解析の実施がまだ進展がない。しかし、令和 4 年度の年度末より、COVID-19 の状況が改善し、現在はほぼ通常に戻っている。そのため、昨年度より少しずつ実験を開始することができた。共同研究を行っている高橋研究室の人員異動の関係で、準備段階の実験として、Kras (G12C) 変異の肺腺癌モデルの解析を行った。具体的には、Kras 変異肺がんの免疫微小環境を明らかにするため、Kras (G12C) 変異肺がんモデルから腫瘍を摘出し、酵素処理を行い、single cell suspension を作成した後、免疫細胞マーカー抗体染色を用いた FACS 解析を行った。その結果、以下の点が明らかになった： (1) Kras (G12C) 変異に Lkb1 の変異 (KL 群) が加わると、Kras (G12C) 単独変異 (parental 群) よりも、腫瘍浸潤免疫細胞の数が約 50%減少することが分かった。 (2) Kras (G12C) 変異と Lkb1 の変異 (KL 群) に Keap1 の変異 (KLK 群) がさらに加わっても、腫瘍浸潤免疫細胞の数は KL と同様であった。 (3) parental 群と比較して、KL & KLK 群で見られた CD45 陽性の腫瘍浸潤性免疫細胞の減少は、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、TAM、M-MDSC、および cDC1 の減少によるものであった。興味深いことに、parental 群と比較して、KL & KLK 群における腫瘍浸潤性 PMN-MDSC および cDC2 の数は変化しなかった。 以上の結果から、KL 群と KLK 群の全体的な腫瘍浸潤性免疫細胞の構成はかなり類似しており、parental 群と比較して浸潤 T 細胞が少なく、免疫抑制環境を形成していることが示唆された。現時点では、実験結果はまだ予備的なもので、今後はさらに再現性の確認が必要である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Wonchang T, Pluangnook P, Hongeng S, Wongkajornsilp A, <u>Thumkeo D</u>, Soontrapa K. Inhibition of DYRK1B suppresses inflammation in allergic contact dermatitis model and Th1/Th17 immune response. Scientific Reports 13: 7058 (2023). Watabe T, Yamahira S, Takakura K, <u>Thumkeo D</u>, Narumiya S, Matsuda M, Terai K. Calcium transients trigger switch-like discharge of prostaglandin E2 (PGE2) in an ERK- dependent manner. Elife 12: RP86727 (2024).	
	【学会発表】 タムケオ ディーン. がん免疫回避におけるプロスタグランジン E2-EP2/EP4 シグナルの役割解明. 第 96 回 日本生化学会、福岡、2023 年 11 月 2 日 (シンポジウム)	
	【その他特筆事項】	

令和 5 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		膵癌の老化誘導薬の探索と老化細胞死誘導の研究
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・研究員・五味不二也
	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター研究所・研究員・志智優樹
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・源 利成
【研究目的】	膵癌は早期診断が困難で約 80%の患者は手術ができず、5 年生存率は 10%程度と極めて低い難治性癌である。膵癌細胞に FGFR4 を選択的に阻害する小分子化合物の BLU9931 を投与すると、増殖能と浸潤能の低下がみられた。さらに一部の膵癌細胞は老化細胞に変化し、老化した膵癌細胞はセノリティック薬の投与によって細胞死が誘導された。本研究では、すでに転移性の肝細胞癌に対して臨床試験が行われている FGFR4 阻害剤の BLU554 と 5-FU の膵癌培養細胞株に対する老化誘導能について検討を行なう。	
【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。)	老化細胞は DNA 傷害などによって不可逆的に増殖を停止した細胞と考えられている。老化細胞は細胞周囲に炎症性サイトカインの senescence-associated secretory phenotype (SASP) 因子を放出することで、免疫細胞に認識され処理される。癌との関係としては、細胞老化は DNA に異常がある細胞が細胞分裂を起こすことで癌化するのを防ぐ機構として、近年注目されている。一方で老化細胞が分泌する SASP 因子によって、周囲の正常細胞が癌化するという報告もみられる。 FGFR4 とその ligand である FGF19 を高発現しているヒト膵癌培養細胞株の PK-1 と T3M-4 細胞に対して、BLU9931 を 2μM, 7 日間投与したところ老化関連 β-ガラクトシダーゼ (SA-β-Ga) 陽性細胞の増加がみられた。DNA 傷害のマーカーである γH2AX 陽性細胞数が増加し、SASP 因子の IL-1α、IL-1β、IL-6 などの増加と長寿遺伝子として知られる Sirtuin1 と Sirtuin6 の低下も認められた。このため、BLU9931 によって膵癌培養細胞株が老化誘導されたと考えた。さらに、BLU9931 で処理した PK-1 と T3M-4 細胞にセノリティック薬として知られている Quercetin, 12.5μM を投与することで生細胞数の減少が認められた。 膵癌に対する老化誘導療法の臨床応用を考え、すでに進行した肝細胞癌に対して臨床試験 (phase I/II) を行なっている FGFR4 阻害剤の BLU554 と、膵癌治療に使用されている 5-FU についても検討した。BLU554 による PK-1, T3M-4 細胞に対する増殖抑制効果は確認されたが、BLU9931 よりもその効果は少なかった。高濃度の BLU554 を投与した PK-1, T3M-4 細胞では、多数の SA-β-Gal 陽性細胞が認められた。5-FU の投与においても、SA-β-Gal 陽性細胞の増加がみられた。現在、これらの老化誘導された膵癌細胞に対して有効なセノリティック薬の探索を行なっている。 今後は、膵癌細胞をより効率的に老化誘導させることができる薬剤の網羅的な探索と、癌の老化細胞に有効なセノリティック薬を開発することで新たな治療法の開発を目指す計画である。	
	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和5年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

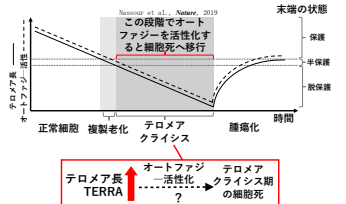
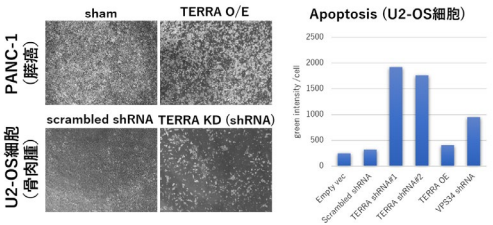
研究課題		膵臓がんにおける RB1 経路に対するフィードバック機構
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学医学部・教授・山田泰広
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学医学部・助教・三小田 直
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	我々は、KRAS 変異による Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) の発症にリプログラミング関連因子の発現誘導による ERK 経路の活性化と脱分化が必要であることを報告した (<i>Nature Commun.</i> 25:9(1):2081, 2018)。一方、高橋らは、CDK4/6 阻害剤の KRAS 膵がんへの適応拡大とコンビネーション治療レシピ策定の為のラショナーレの獲得を目指している。我々の創出した様々な遺伝学的背景の PDAC 発症マウスにおいて CDK4/6 阻害剤ないし CDK2/4/6 阻害剤への応答の様態を観察し、加えて、それらマウスを RB 経路が遮断ないしモジュレートされた遺伝学的背景に持ち込み観察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。)	高橋らと共同で、KRAS 膵がんの CDK4/6 阻害剤に対する感受性を飛躍的に上昇させる化合物をスクリーニングし ERK 阻害剤を得た。CDK4/6 阻害剤は RB1 依存的に ERK の活性を上昇させること、逆に変異 KRAS の成熟阻害によりこの活性を減少させることを見出した。ERK の活性上昇は CDK4/6 阻害剤による変異 KRAS 活性阻害が緩やかであるためにレムナントな ERK 活性が残存することと OXPHOS や JNK に依存して起こる SASP が EGFR リガンドの発現を上昇させることが原因と判明した。CDK4/6 阻害剤と EGFR 中和抗体薬が著しい相乗効果を示したことはこの知見との整合性を示した。これらの知見の臨床的レリバンスを得る為に Kras, p53 の変異を膵特異的に発現する前臨床モデルマウスを作製した。現在、高橋において、このマウスの治療実験を準備中である。データが得られ次第、共著論文を発表する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Ohta S, <u>Yamada Y</u>. Exploring the potential of in vivo reprogramming for studying embryonic development, tissue regeneration, and organismal aging. <i>Curr. Opin. Genet. Dev.</i> 2023 Aug;81:102067. doi: 10.1016/j.gde.2023.102067.	
	【学会発表】 Yamada Y. Dissecting cancer biology by studying <i>in vivo</i> reprogramming. 25th International Heidelberg Symposium, Hiroshima, Japan 11/18/2023 Yamada Y. Dissecting cancer biology with reprogramming technologies. 日本癌学会学術総会、横浜 9/22/2023	
	【その他特筆事項】	

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

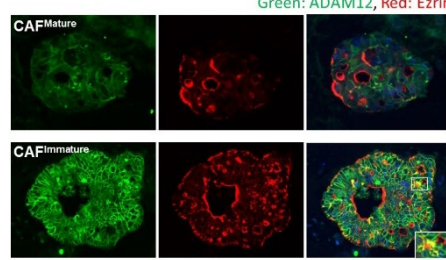
研究課題		シグナリング代謝物を介したがん代謝適応システムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学 先端科学技術研究センター・准教授・大澤毅
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	がんの増殖と転移には腫瘍微小環境やがん代謝が重要な役割を果たす。これまで申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化と治療抵抗性に関与することを見いだし報告してきた。低酸素・低栄養で生存する癌細胞は、癌幹細胞の維持を促進し悪性化に寄与することが示唆されるが、その詳細な“代謝適応システム”は不明である。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】 1. Nakahara R, et al. and Osawa T. Hypoxia Activates SREBP2 through Golgi Disassembly in Bone Marrow-Derived Cells for Tumorigenesis. <i>EMBO J</i>, 10.15252/embj.2023114032 (2023).など 8 報 【学会発表】 大澤毅、「高深度オミクスから迫るがん悪性化機構の解明」、シンポジウム、第 46 回日本分子生物学会：2023 年 11 月 27 日-12 月 1 日、神戸など、招待講演 16 件 【その他特筆事項】	

令和5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		タンパク質カプセルによる MET の多価認識と内包分子送達
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	
	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】	細胞の分化や増殖に関わる受容体 MET は、がん治療や再生医療において重要な標的の一つである。MET を介したシグナル伝達経路の活性化を促す人工分子として、申請者の所属研究グループではこれまでに、MET 結合性環状ペプチドや、そのファーマコフォア配列を足場タンパク質のループ部分に挿入(ラッソグラフティング)した標的結合性改変タンパク質の創製にも成功している。一方、この方法論を自己集合タンパク質に応用したが、その活性は天然の成長因子 HGF には及ばなかった。本研究では自己集合タンパク質とラッソグラフト体との融合タンパク質とすることで、MET 活性化と内包分子送達への応用を目的とした。	
【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。)	*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。 MET 結合性の環状ペプチド aMD4 のファーマコフォア配列をユビキチンのループに挿入したラッソグラフト体 (U-body) と自己集合タンパク質であるフェリチンとの融合タンパク質を用いて目的達成を目指した。まず初めに両タンパク質間のリンカー長および配列についてスクリーニングを行った。フレキシブルで中性な(GGGGS)_n、剛直で非イオン性の A(PA)_n、剛直でイオン性の(EAAAK)_n をリンカーとして用いたところ、(EAAAK)_n を用いた場合、他のリンカーを用いた場合に見られた分解(リンカー部位での切断)副生物は少なく、U-body-フェリチン融合タンパク質の発現に成功した。次に、U-body をフェリチン上に提示したことによるキャプシド形成への影響を見るために、融合タンパク質の電子顕微鏡観察を行った。本融合タンパク質においてもキャプシド構造の形成が確認され、融合タンパク質にしたことによる影響は見られなかった。さらに、自己集合タンパク質融合 U-body の標的結合能を、MET 固定化ビーズを用いたプルダウンアッセイによって確かめた。融合タンパク質は標的への結合を示し、フェリチンおよび自己集合後のキャプシド分子は U-body の標的に対する結合を阻害しないことが明らかになった。 標的結合能を維持したまま、キャプシド構造形成すなわち多量化が達成できたため、続いて MET を発現した哺乳細胞を用いて、本キャプシドタンパク質の MET リン酸化活性を評価した。本分子は、数 nM の濃度において天然のリガンドである HGF の 40%程度の活性を示した。活性向上を目指し、フェリチンモノマーに U-body 二量体を提示することを検討したが、発現後のタンパク質が不溶化した。U-body およびリンカーの配列等に関して検討中である。 現在までに標的に結合し、活性化する分子が得られた。即ち、MET の多価認識には成功したと考えられる。今後、活性やタンパク質発現・精製効率を向上させる条件を精査し、その改良型カプセル分子を用いて MET 過剰発現細胞への内包分子の送達を達成する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 該当なし	
	【学会発表】 1. 自己集合タンパク質に立脚した受容体チロシンキナーゼ人工活性化剤の開発 ○柏勇希、酒井克也、寺坂尚紘、相川春夫、松本邦夫、菅裕明 日本ケミカルバイオロジー学会第 17 回年会 2023 年 5 月 29 日	
	【その他特筆事項】 該当なし	

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・技術職員・山川けいこ
	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、加齢が膵発癌に寄与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 TTAGGG 繰り返しテロメア塩基配列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 (Matsuda et al. <i>PLoS ONE</i>, 2015)。通常細胞は、テロメアの短縮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 (図1)。テロメアの短い塩基配列は DNA 損傷とみなされ、DNA 修復反応を伴い不可逆的に細胞周期が停止し、染色体異常が抑えられる。この時期の細胞は、ほぼ死滅するか細胞分裂が完全に停止する。しかし、ごく一部の細胞は、細胞死を回避し増殖能力を維持することによって染色体異常が蓄積し、細胞の腫瘍化を駆動する。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、細胞のがん化抑制に非常に重要なチェックポイント機構と考えられている (図1)。近年、細胞のオートファジー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1, Nassour et al. <i>Nature</i>, 2019)。本共同研究ではこれまでに、膵癌細胞株 PANC-1 において、テロメア領域からコードされる一本鎖非翻訳 RNA TERRA の強発現がオートファジー活性化と細胞死誘導に重要であることを見出した (図2、投稿準備中) 一方、骨肉腫由来 U2-OS 細胞においては、逆に TERRA の発現を抑えた場合にオートファジーが活性化とともに細胞死が誘導された。以上のことから、老化細胞に限らず癌や肉腫細胞においても、TERRA 発現やオートファジー活性の変動が、細胞死制御の中心的役割を担うと推察できる。今後は、老化細胞や癌細胞における、TERRA やオートファジー依存性の細胞死分子機構解明により、膵癌をはじめ様々な癌腫の新規治療法開発が期待できる。   図1. 加齢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 図2. 膵癌細胞 PANC-1 では TERRA 過剰発現で細胞死誘導	
【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5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・安部紘生
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・川内隆幸
	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。)	DRの形態的分類について、進行大腸癌の粘膜下層浸潤部でも同様の分類が可能であり、腫瘍悪性度と関連があることを見出した。また、予後不良なimmature型のDRを示す大腸癌では、壁外性の神経侵襲の有無によってさらに予後の層別化が可能であり、著しく予後不良な症例群の抽出に有効であることが判明した。 CAFを用いた検討では、DRがimmature型由来のCAFはIL-6を高度に分泌しており、POSTN/TGF-β signalingを介してがん幹細胞性へ影響を及ぼしていることが示唆された。を明らかにした。 これまでの検討で、化学療法に対する治療抵抗性を示す脱分化が高度な大腸癌では、ADAM12の発現が亢進しており、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の亢進を認めていた。mature症例と比較して、immature症例のCAFの培養上清とオルガノイドを共培養した際に、ADAM12とEzrinがオルガノイドに高発現することを確認した(図1)。  図1. DR分類別のCAFの培養上清と大腸癌オルガノイドの共培養 DRがImmatureであるCAFの培養上清を用いた際に、ADAM12とEzrinが共局在でオルガノイドに発現した。	
【成果等】	【主論文発表】 1. <u>Kajiwar</u> Y, Oka S, Tanaka S, Nakamura T, Saito S, Fukunaga Y, Takamatsu M, Kawachi H, Hotta K, Ikematsu H, Kojima M, Saito Y, Yamada M, Kanemitsu Y, Sekine S, Nagata S, Yamada K, Kobayashi N, Ishihara S, Saitoh Y, Matsuda K, Togashi K, Komori K, Ishiguro M, Kuwai T, Okuyama T, Ohuchi A, Ohnuma S, Sakamoto K, Sugai T, Katsumata K, Matsushita HO, Yamano HO, Eda H, Uraoka T, Akimoto N, Kobayashi H, Ajioka Y, Sugihara K, <u>Ueno H</u>: Nomogram as a novel predictive tool for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer treated with endoscopic resection: a nationwide, multicenter study. Gastrointest Endosc. 2023 Jun;97(6):1119-1128.e5. 2. Kouzu K, <u>Kajiwar</u> Y, Tsujimoto H, Mochizuki S, Okamoto K, Shinto E, Kishi Y, Matsukuma S, <u>Ueno H</u>: Prognostic impact of desmoplastic reaction in esophageal squamous cell carcinoma patients with neoadjuvant therapy. Esophagus. 2023 Jul;20(3):474-483. 【学会発表】 1. 梶原由規、他. 進行大腸癌における粘膜下層と壁外浸潤先進部における線維性癌間質反応の関連に関する検討. 第78回日本消化器外科学会. 2023年7月12日 2. 梶原由規、他. 大腸癌の再発予測因子としての線維性癌間質反応(DR)分類と神経侵襲の関連についての検討. JDDW2023. 2023年11月3日 3. 梶原由規、他. 再発大腸癌における簇出および低分化胞巣の予後規定因子としての意義. 第78回日本大腸肛門病学会. 2023年11月10日 4. 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IL-6/STAT3 signalの変化とPeriostinを介した癌幹細胞性への関与について. 第78回日本消化器外科学会. 2023年7月12日 5. 安部紘生、梶原由規、他. 癌関連線維芽細胞由来のIL-6によるPOSTN/TGF-β signalを介した大腸癌細胞の癌幹細胞性への影響. JDDW2023. 2023年11月3日 【その他特筆事項】なし	

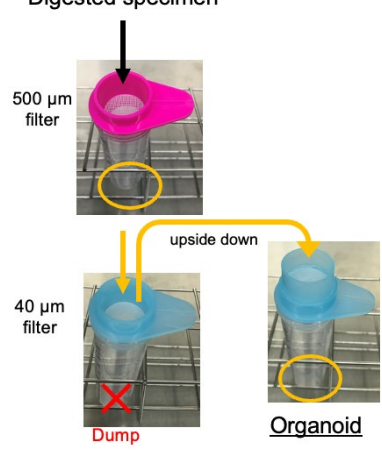
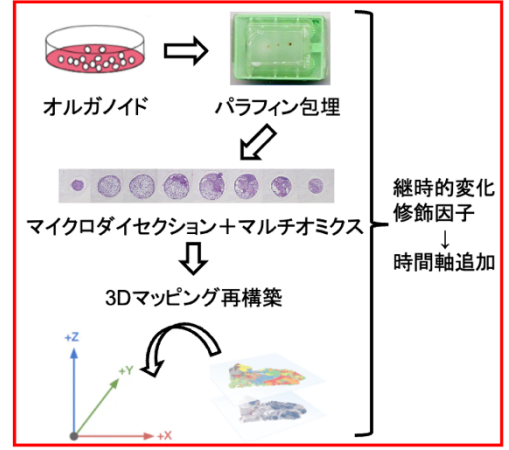
令和5年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		染色体転座陽性肉腫における PI3K 阻害剤のクロマチンリモデリング作用の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・特任研究員・礪山 翔
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	(公財) がん研究会・部長・旦 慎吾
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	染色体転座陽性肉腫 (TRS) は、発がんに必要な融合遺伝子を有し肉腫全体の約 3 分の 1 を占めるが、有効な治療薬が少ないため新たな治療薬の開発が望まれている。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。また、種々の肉腫細胞株および PDC を用いた検討から、本剤は一部の TRS 選択的にアポトーシスをともなう高い抗腫瘍効果を示すことが明らかにされている。これらの TRS では、それぞれの肉腫が有す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。)	滑膜肉腫やユーイング肉腫など PI3K 阻害剤がアポトーシスを誘導する 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。 <u>1. PI3K 阻害剤の滑膜肉腫における感受性規定因子の探索</u> PI3K 阻害剤による滑膜肉腫へのアポトーシス誘導メカニズムを解明する目的で、shRNA ライブラリーを滑膜肉腫細胞株に導入し、PI3K 阻害剤処理と非処理の細胞間で増加または減少した shRNA を抽出した。その結果、発現ノックダウンした際に PI3K 阻害剤によるアポトーシス誘導の抑制が顕著に認められる遺伝子として SWI/SNF 複合体に含まれる複数の遺伝子を同定した。興味深いことに、これらの遺伝子の発現をノックダウンすることにより、PI3K 阻害剤によって惹起される Bcl2 family の BIM の発現誘導がキャンセルされた。BIM の発現ノックダウンにより PI3K 阻害剤によるアポトーシスが抑制されることから (Isoyama S, et al. Cell Death Dis 2023)、PI3K 阻害剤による滑膜肉腫のアポトーシス誘導に SWI/SNF 複合体による BIM などのアポトーシス関連遺伝子の発現制御が寄与していることが示唆された。 <u>2. PI3K 阻害剤の SWI/SNF 複合体の機能に対する作用の検討</u> 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。そこで、PI3K 阻害剤処理によって SWI/SNF 複合体中の量的変動が認められたタンパク質を抽出した。その結果、クロマチンリモデリング因子と相互作用し遺伝子発現制御に寄与することが報告されている一連のタンパク質群の顕著な減少が認められた。また、PI3K 阻害によるこれらのタンパク質群と SWI/SNF 複合体の相互作用の減少は、ウェスタンブロットでも確認された。今後、この相互作用の減少と PI3K 阻害によるアポトーシス誘導に因果関係があるか検討する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 1. 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾 クラス 1A PI3K 阻害による染色体転座陽性肉腫選択的細胞死誘導メカニズムの解析 第 27 回日本がん分子標的治療学会学術集会 佐賀市 2023 2. 礪山翔、玉城尚美、旦慎吾 染色体転座陽性肉腫細胞の増殖・生存における PI3K $\alpha/\beta/\delta$ アイソフォームの機能解析 第 82 回日本癌学会学術総会 横浜市 2023	
	【その他特筆事項】 なし	

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

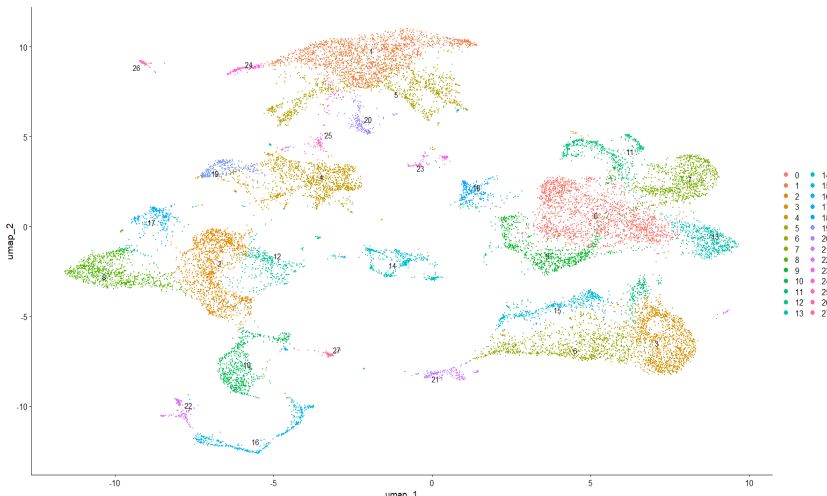
研究課題		頭頸部扁平上皮癌に対する EGFR 阻害薬の耐性機序の検討と克服
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学医学部附属病院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 特定病院助教 鈴木千晶
研究分担者 (適宜、行を追加 してください。)	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科 耳鼻咽喉科・頭頸部外科 教授 大森孝一
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 矢野聖二
【研究目的】	再発・転移性頭頸部扁平上皮癌（HNSCC）は根治的治療が困難で予後不良である。HNSCC の多くに EGFR の遺伝子増幅と高発現がみられ、予後に関連すること示されているが、EGFR 阻害薬に反応をするのは約 10%程度と非常に少ない。また、現在まで有効なドライバー経路は同定されておらず、使用可能な薬剤は限られている。本研究は、局所浸潤や転移を形成しないマウス口腔癌扁平上皮癌細胞株から樹立した高率にリンパ節転移・肺転移を生じる細胞株における変化を比較検討することで、頭頸部癌における浸潤・転移の分子機構・EGFR 阻害薬の耐性化機構を検討し、新規治療方法の開発を行うことを目的としている。	
【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。)	頭頸部癌自然転移モデルを作成し、頭頸部癌の転移メカニズムを検討するために、マウス頭頸部扁平上皮癌細胞 Sq-1979 の皮下移植モデルから高転移能をもつ細胞株 SS2 を樹立した。SS2 は Sq-1979 よりも高い生着・増殖能があり、高率にリンパ節転移・肺転移を生じることを確認した。 二次元培養下細胞運動のトラッキング解析を行ったところ SS2 は Sq-1979 よりも有意に高い運動能を獲得していた。また、三次元培養下で SS2 は Sq-1979 では認めない非足場依存性の増殖能を獲得していた。EGFR リガンドである EGF、AREG 刺激下では Sq-1979 でも非足場依存性増殖能を獲得することを確認した。EGFR 阻害薬存在下では SS2 は二次元培養・三次元培養ともに増殖抑制を認めたが、特に三次元培養下においてより低濃度から増殖抑制を示した。また、EGFR 阻害剤存在下での二次元培養では SS2 の運動能低下が認められた。以上のことから転移能に関与すると判断される足場非依存性増殖には EGFR 刺激が重要であると判明した。 マイクロアレイ解析ではシグナル変化は認めなかったが、SS2 において Sq-1979 よりもサイトカインを含む細胞外因子に関与する遺伝子発現を多く認めた。サイトカイン抗体アレイにて SS2 では Sq-1979 よりも AREG、可溶性 AXL の発現が上昇していた。また、vivo における腫瘍から抽出したタンパクにおいて、SS2 は Sq-1979 に比べて EGFR の発現亢進を示した。以上から SS2 はオートクリン作用で EGFR を活性化し、運動能・足場非依存的増殖能を獲得している可能性があると考えた。続いて、二次元培養下で EGFR 阻害薬添加後のシグナル変化を確認すると、Sq-1979・SS2 とともに経時的に EGFR・Her3・AXL の再活性化が認められた。そこで、SS2 において EGFR/Her3 の阻害作用を有する Afatinib に AXL 阻害薬を併用することで著明な増殖抑制が生じることが判明した。 9 種類のヒト頭頸部扁平上皮癌細胞を用いて EGFR・Her3・AXL の阻害作用を確認した。11% (1/9) の細胞のみが EGFR 阻害薬単独での効果を有していたがいずれにおいても Her3・AXL 阻害薬を併用すると増殖抑制が亢進した。ヒト頭頸部扁平上皮癌細胞においても EGFR・Her3・AXL 阻害が有効であることが示された。	
【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5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	金沢大学呼吸器内科・医員・村瀬 裕哉
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 <i>in vitro</i> 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の作成を試みた結果、それぞれ 19 例中 11 例で成功しており (50%を超える成功率)、尚且つ手技者の熟練度によらない簡便な手法である事が判明した。また、腺癌、扁平上皮癌、多型癌、小細胞癌と組織型によらず同一の作成手順が確立された (左下図)。 今後は、手術検体とオルガノイドのゲノム解析等を行い、研究使用目的のバイオリソースとして確かなものであるかを確認する。 また、オルガノイドにおける空間的マルチオミクス解析も検討する。その結果次第では、さらなる発展的な試みとして、薬剤処理・各種成長因子の添加・血管網構築型次世代培養なども取り入れた上で、時間軸を加えた 4D 解析に繋げていくことも模索する (右下図)。 Digested specimen  4D解析によるがん進展機序の解明 	
【成果等】	【主な論文発表】 - Koba H, Yoneda T, Morita H, Kimura H, Murase Y, Terada N, Tambo Y, Horie M, Kasahara K, Matsumoto I, Yano S. Genomic evolutionary analysis of surgical resected specimen to assess osimertinib as a first-line therapy in two patients with lung cancer harboring EGFR mutation: Case series. Thorac Cancer. 2024;15(8):661-666. Yoshida S, Matsumoto I, Saito D, Tanaka Y, Takemura H, Oi A. Partial Tracheal Defects Closure using Glutaraldehyde-Treated Autologous Pericardium. Thorac Cardiovasc Surg. 2023;71(6):490-496.	

	【学会発表】
	【その他特筆事項】 R5 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、手技者の熟練度によらないことを確認した。次年度以降も本研究課題をさらに発展させるために継続が必要である。PDX に関しては、配分予算内では実施が困難であるため、厳選した検体で試みることを検討する。

令和5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		非アルコール性脂肪肝炎悪化における老化細胞の機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	早稲田大学・講師（任期付き）・隈本宗一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・助教・中野泰博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	NASH は線維化やそれに伴った肝機能の低下が起こるだけでなく、高頻度に肝細胞癌が発生することから、この治療法開発は喫緊の課題である。近年の研究から、老化細胞のなかに NASH の病態進行に悪性化にはたらくものと改善にはたらくものが存在すると示唆される。そこで本研究では、NAFLD から肝線維化を伴う NASH への変遷およびそれを背景とした肝発癌の過程において、老化細胞がどのような影響を与えるのかを細胞・分子レベルで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。)	城村教授らにより樹立された老化細胞可視化マウス (p16-CreER/Rosa26-LSL-tdTomato) に対して、高脂肪食による NASH を誘導した (STAM モデル)。高脂肪食投与により肝細胞癌を生じた肝臓組織から tdTomato 陽性老化細胞を FACS で分取し、scRNA-seq 解析を実施した。scRNA-Seq には 10x Genomics 社の Chromium システムを用いてライブラリーを作製後、ハイスループットシーケンサーにより配列情報を取得した。解析サーバーは東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータを使用し得られた遺伝子発現データから解析を実施した。その結果、NASH 誘導性の肝細胞癌を発症した肝臓組織において tdTomato 陽性老化細胞が存在していることが明らかになった。また、scRNA-Seq による解析から、tdTomato 陽性老化細胞は 27 クラスターに分類され、報告にある肝臓を構成する細胞種よりも多く、肝細胞癌を発症した肝臓組織における tdTomato 陽性老化細胞の遺伝子発現キャラクターは非常に不均一性が高い可能性が示唆された (図 1)。多様性を獲得した tdTomato 陽性老化細胞が NASH の病態進行に悪性化と改善の二面性を担っている可能性が考えられる。  図 1. 肝細胞癌を発症した肝臓組織における tdTomato 陽性老化細胞のクラスター解析	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 Nakano Yasuhiro; Zhang Zixue; Kumamoto Soichiro; Johmura Yoshikazu. In Vivo Lineage Tracing of p16-expressing Senescent Cells in Acute Liver Injury. P-10, The 18th international Symposium of the institute Network for Biomedical Science. October 5-6, 2023. Tokyo Medical and Dental University, Japan	
	【その他特筆事項】	

令和 5 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】	抗がん剤などの薬物の体内消失において肝臓の代謝反応は重要な役割を果たすが、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)などの代謝酵素は小胞体内腔に基質結合部位が存在する。このため、小胞体代謝反応の促進には薬物代謝酵素自身に加え小胞体膜透過過程が重要な役割を果たすと考えられるが、薬物動態におけるその重要性は明らかにされていない。本申請研究では小胞体に局在することを見出した輸送体 A に着目し、昨年度に引き続き肝細胞の薬物代謝反応調節における小胞体膜透過の重要性解明を目的とした。	
【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。)	1) ヒト肝がん HepaRG 細胞を用いたノックダウン試験 ヒト肝細胞における薬物の小胞体代謝に小胞体輸送体 A が関与することを示すため、薬物の小胞体代謝反応活性が高いヒト肝がん由来 HepaRG 細胞を用い、輸送体 A のノックダウン試験を行った。薬物代謝試験を行った結果、輸送体 A の基質である zidovudine のグルクロン酸抱合体の生成量が輸送体 A のノックダウンにより低下した。一方、小胞体輸送体 A は小胞体のみならず細胞膜にも局在するアイソフォームが存在する。そこで小胞体代謝物量を細胞内取り込み量で除することで、細胞内に取り込まれたのちの輸送体 A の機能解析を行った。その結果、zidovudine の細胞内取り込み量に変化は観察されず、代謝物量を取り込み量で除した代謝活性は輸送体 A のノックダウンにより優位に低下した。このため、輸送体 A は zidovudine の小胞体膜透過に関与することで、小胞体代謝反応に関与することが示唆された。 2) 薬物相互作用における 輸送体 A の役割 輸送体 A の臨床における重要性を探索するため、薬物相互作用（薬の飲み合わせ）に輸送体 A が関わるかについて調べた。zidovudine は臨床に valproic acid, fluconazole, atovaquone, probenecid と併用すると血中濃度が上昇する。Zidovudine の主要代謝経路はグルクロン酸抱合反応のため、代謝を担う UGT の阻害が相互作用の原因と想定される。そこでこれら相互作用に UGT および輸送体 A が関わるかについて調べた。小胞体を含むヒト肝由来ミクロソーム及び HepaRG 細胞を用いて各薬物の UGT 阻害活性を評価したところ、ヒト肝ミクロソームにおける阻害活性は臨床血漿中濃度より 10 倍以上高い濃度でのみ見られ、UGT の阻害では相互作用を説明できなかった。一方、HepaRG 細胞における zidovudine のグルクロン酸抱合反応は valproic acid の添加により濃度依存的に低下し、その IC_{50} 値は $200\ \mu\text{M}$ 程度と算出され、valproic acid の臨床血中濃度 ($33.6\text{--}97.8\ \mu\text{M}$) と近い値となった。現在輸送体 A の重要性を定量的に説明するため、小胞体コンパートメントを組み込んだ数理モデル解析を行っている。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 Arakawa et al., Commun Biol, 2023 Aug 22;6(1):866.	
	【学会発表】 1) 荒川 大、玉井 郁巳. 腎・肝の細胞モダリティを用いた薬物腎毒性及び胆汁分泌評価手法の構築. 日本薬学会第 144 年会. 2024 年 3 月 28-31 日. 2) 荒川 大. 薬物動態の臓器間相互作用の解明を目的とした肝・腎細胞培養手法の構築. 第 46 回日本分子生物学会年会. 2023 年 12 月 6-8 日.	
	【その他特筆事項】	

令和 5 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		低容量糖代謝負荷による抗がん剤耐性がん幹細胞誘導機構の 解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学部・教授・板野 直樹
研究分担者 (適宜、行を追加して ください。)	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学研究科・大学院生・岩本 俊吾
	所属・職名・氏名	京都産業大学生命科学研究科・大学院生・蘆田 紗和子
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・松尾 俊
	所属・職名・氏名	京都産業大学総合生命科学部・学生・明翫 佑真
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	慢性的な低容量ストレスに曝されたがん細胞は、特有のストレス防御機構を発達させて治療抵抗性がん幹細胞を生じ、抗がん剤等による一過性で強い異種ストレスに集団として適応していると考えられる。本提案では、低容量の糖代謝負荷が、糖鎖パターンの改変により抗がん剤性がん幹細胞の出現を促すとの機構を提唱し、その機構解明を目的として研究を実施した。	
【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。)	私達はこれまでに、乳がん細胞におけるヒアルロン酸の産生が、糖代謝をリプログラミングして、抗がん剤耐性がん幹細胞の出現を促すことを明らかにしてきた。ヒアルロン酸は、細胞外マトリックスを構成する主要な高分子多糖であり、細胞内糖ヌクレオチドである UDP-<i>N</i>-アセチルグルコサミンと UDP-グルクロン酸を基質として HA 合成酵素 (HAS) により生合成される。従って、ヒアルロン酸の過剰産生による糖ヌクレオチドの消費は、細胞内糖代謝に負荷をかけることで、タンパク質の糖鎖修飾に影響を及ぼすと考えられた。そこで、乳がん病態モデルマウスより樹立した初代乳がん細胞とヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞を用いて、細胞内糖ヌクレオチド量および <i>N</i>-型糖鎖前駆体のドリコール結合オリゴ糖の HPLC 分析を行った。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、細胞内糖ヌクレオチドと成熟型ドリコール結合オリゴ糖の量がいずれも有意に減少し、糖鎖修飾が部分的に阻害されていることが明らかとなった。さらに、グライコムクス解析による糖鎖の包括的プロファイリングを実施し、ヒアルロン酸の過剰産生が <i>N</i>-型糖鎖に質的・量的変化をもたらすことを明らかにした。そこで、低用量のツニカマイシン(TM)で対照乳がん細胞を長期間処理して <i>N</i>-型糖鎖修飾を部分的に阻害したところ、ヒアルロン酸過剰産生と同様に、がん幹細胞様細胞が増加することが明らかとなった。タンパク質の <i>N</i>-結合型糖鎖修飾は、増殖因子や受容体の活性制御等、多様なシグナル伝達の調節に重要な役割を果たす。そこで、RNA-seq トランスクリプトームデータの Gene Set Enrichment 解析を実施し、低用量 TM 処理により糖代謝負荷を誘導した際に、がん細胞で変化する主要なシグナル伝達経路を解析した。その結果、低用量糖代謝負荷により、がん幹細胞性の制御に重要な Notch および Wnt/β-catenin シグナルが活性化していることが明らかとなった。 以上の結果は、ヒアルロン酸の産生が、がん細胞の糖代謝に慢性的な負荷と糖鎖修飾の変化を誘導して、ストレス耐性がん幹細胞の出現を促すことを示唆している。	
【成果等】	【主な論文発表】 Iwamoto S, Kobayashi T, Hanamatsu H, Yokota I, Teranishi Y, Iwamoto A, Kitagawa M, Ashida S, Sakurai A, Matsuo S, Myokan Y, Sugimoto A, Ushioda R, Nagata K, Gotoh N, Nakajima K, Nishikaze T, Furukawa JI, Itano N. Tolerable glycometabolic stress boosts cancer cell resilience through altered N-glycosylation and Notch signaling activation. Cell Death Dis. 2024, 15(1):53. doi: 10.1038/s41419-024-06432-z.	
	【学会発表】 板野直樹 岩本駿吾、花松久寿、古川潤一 ヒアルロン酸過剰産生がん細胞で特徴的に変化する <i>N</i> -型糖鎖のグライコムクス解析 第 3 2 回日本がん転移学会学術集会・総会 2023 年 7 月 21 日 仙台国際センター	
	【その他特筆事項】	

令和5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
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・鈴木 健之
【研究目的】	上皮間葉転換 (EMT) は、発生や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再構築を必要とする。その制御機構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。メディエーター複合体キナーゼモジュール (KM) は、転写・クロマチン制御因子のリン酸化を介して、細胞特異的、刺激依存的な転写を調節する。本共同研究は、EMT を促進する TGF-β 誘導性転写制御において、KM とクロマチン制御因子 CHD3/4 が果たす役割を、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。)	KM は、CDK8 またはその脊椎動物パラログ CDK19 を触媒サブユニットとする複合体である。KM は、様々な転写制御因子のリン酸化を介して、発生・分化過程やストレス応答における転写調節に重要な役割を果たす。さらに、KM 阻害が抗がん作用を示すことから、がん治療標的としても注目されている。我々は近年、KM の新規相互作用因子として、がん進展への関与が報告されているクロマチン再構築 NuRD 複合体の CHD3/4 を同定した。 がん進展制御における KM と CHD3/4 の協調的な役割を解明するために、CDK8 と CHD4 によって共制御される遺伝子群を検索したところ、TGF-β 経路に濃縮されていた。そこで、TGF-β 誘導性転写制御への KM と CHD4 の関与を、A549 肺がん細胞をもちいたノックダウン実験によって解析した。CDK8 と CDK19 のダブルノックダウン、または CHD4 単独ノックダウンによって、間葉系マーカー <i>VIM</i> や <i>SNAIL</i> の発現誘導が著しく阻害された。また CDK8/19 キナーゼ阻害によっても <i>SNAIL</i> 発現が阻害され、さらに上皮マーカーである E-カドヘリン発現の脱抑制が観察された。したがって、KM と CHD4 が、EMT のマスター転写因子である Snail の発現誘導を介して EMT に関与することが示唆された。現在、その分子機構を解明するために解析を行っており、これまでに CHD4 が <i>SNAIL</i> 遺伝子のプロモーターに TGF-β 誘導性にリクルートされることをクロマチン免疫沈降解析によって見出した。また現在、CRISPR/Cas9 システムをもちい、A549 細胞において CDK8/19 および CHD4 の遺伝子ノックアウトをおこなっている。 近年、長鎖非コード RNA (lncRNA) が EMT における遺伝子発現調節に重要な役割を果たすことが報告されている。加えて KM は、エンハンサーRNA などの lncRNA と結合することが報告されているため、KM が TGF-β 誘導性転写制御においても、lncRNA と相互作用して機能する可能性がある。実際、TGF-β 誘導性 lncRNA TRERNA1 は、KM の機能調節に関与することが報告されている。しかし、その詳細は不明である。本研究では、TGF-β 誘導性 lncRNA による KM の活性調節能を、バキュロウイルス-昆虫細胞発現系によって調整したヒト組換え KM と複数のモデル基質をもちいたリン酸化アッセイ系を構築して検討した。TRERNA1 は、本アッセイ系においても KM のキナーゼ活性を基質依存的に促進することを確認した。現在、他の TGF-β 誘導性 lncRNA 添加の影響を解析している。さらに、RNA 免疫沈降解析 (RIP) によって、特定の TGF-β 誘導性 lncRNA が、細胞内で KM と相互作用することを示唆する結果を得た。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1) Kaido Y. <i>et al.</i> “Functional interaction between the Mediator kinase module and the lncRNA with enhancer-like function” 第 24 回日本 RNA 学会年会 2023 年 7 月 5～7, 那覇 2) Kaido Y. <i>et al.</i> “Functional analysis of the Kinase module of human Mediator complex using an in vitro reconstitution system” 第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月 6～8, 神戸 (他、11 件)	
	【その他特筆事項】	

令和5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		CDCP1 の動的構造変化に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学・准教授・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	
	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】	がん患者の予後を規定する大きな要因として、がん細胞の正常組織への浸潤・転移がある。がん細胞はがん微小環境において周囲から様々な因子の供給を受けることで、形質が変化して浸潤能を獲得すると考えられている。その因子のひとつに、肝細胞増殖因子 (HGF) とその受容体 Met がある。HGF-Met を介したがん進展を制御するためのターゲットである細胞膜局在メカニズムは未知のままである。 我々は、Met の局在制御タンパク質として CDCP1 を同定した。Met の細胞膜局在には、CDCP1 の細胞外領域の切断による構造変化が重要であるが、その実態は不明である。そこで本研究では、高速原子間力顕微鏡 (高速 AFM) を利用して、CDCP1 の動的構造変化にアプローチする。	
【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) CDCP1 タンパク質の大量発現システムからの回収と精製 CDCP1 の細胞外ドメインの C 末端側に精製用の 6xHis タグ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。大量培養後の培養上清 (数百 mL) を回収して、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ー後、ピークの分取を行い、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。切断による構造変化したタンパク質を得る場合には、ゲルろ過クロマトグラフィー後に、セリンプロテアーゼ ST14 で処理した。再度ゲルろ過クロマトグラフィーに供して、非切断型と同様に、タンパク質の精製と純度の確認を行った。 2) CDCP1 タンパク質の高速 AFM 解析 計画 1 で回収した CDCP1-6xHis サンプルを高速 AFM (ナノ生命科学研究所に設置) で観察した。Ni²⁺処理したマイカ基板上に CDCP1 タンパク質をアプライして、複数の観察条件でその動態を観察した。 3) 構造解析データを利用した高速 AFM データの検証 これまでに我々は高分解能の CDCP1 の構造解析データを取得している (未公表)。そのデータと計画 2 で取得した高速 AFM データの比較解析を行った。その結果、高速 AFM のデータは構造解析データを補完するものであり、また新たな機能を示唆するものであった。以上の結果をまとめて、論文投稿する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1) A TGF-β-responsive enhancer regulates SRC expression and epithelial-mesenchymal transition-associated cell migration. Soshi Noshita, Yuki Kubo, <u>Kentaro Kajiwara</u>, Daisuke Okuzaki, Shigeyuki Nada, Masato Okada Journal of Cell Science (2023) DOI:10.1242/jcs.261001	
	【学会発表】 1) Src シグナル伝達の時空間的制御による細胞の運命決定 梶原健太郎、岡田雅人 2023 年度生理研研究会「上皮膜輸送と細胞極性形成機構の統合的理解を目指して」 2023 年 7 月 13 日 2) がん悪性化に関わる増殖因子シグナルの制御機構 梶原健太郎 第 86 回広島大学健康長寿研究拠点セミナー 2024 年 2 月 16 日	
	【その他特筆事項】 なし	

令和 5 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		脳の老化を制御するアンジオクラインファクターの同定
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学学術研究院基盤部門テニュアトラック推進本部・ 助教・高良和宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	福井大学学術研究院医学部門・教授・木戸屋浩康
	所属・職名・氏名	福井大学学術研究院医学部門・助教・林弓美子
	所属・職名・氏名	福井大学・医学部医学科・学部生・細江尚唯
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村 由和
【研究目的】	老化した細胞は加齢とともに組織に蓄積し、癌、動脈硬化、糖尿病及びアルツハイマー病といった様々な科齡関連疾患の発症・進展に関与することが報告されている。また、近年の研究成果より、血管の老化自体が臓器機能の低下に寄与していることも明らかとなりつつあり、マウスモデルにおいては血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のシグナル不全が複数の臓器にわたって生理的老化を促進することが明らかとなっている。しかし、血管の老化が個体の老化に繋がる詳細なメカニズムは明らかになっていない。そこで本研究では、疾患ではなく正常な脳であっても年齢とともに体積が減少し、萎縮するといった加齢変化が生じる「脳の老化」に着目した研究を行う。	
【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。)	血管は酸素や栄養を組織に運搬する輸送路という機能だけではなく、アンジオクラインファクターを産生することで組織の恒常性維持に働くこと、このアンジオクラインシステムの破綻が疾患の進展に繋がることを申請者らは明らかにしてきた。本研究では、老化の進行過程においても組織血管のアンジオクラインファクターが重要ではないかと考え、老化に働くアンジオクラインシステムの解明に挑む。 ・老化血管内皮細胞可視化マウスの作製 老化を制御するアンジオクラインファクターを同定するために、老化した血管内皮細胞を解析する必要がある。そこで Dre-rox システムを用いた血管内皮細胞特異的の老化マーカー発現細胞を可視化可能なマウスの作製に着手した。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 1) 高良和宏, リゾフォスファチジン酸の血管関連疾患への治療応用、第 7 回 Neuro-Vascular 研究会、滋賀、2 月 15 日、2024 2) 山本愛花、高良和宏、木戸屋浩康. リゾフォスファチジン酸(LPA)による皮膚創傷モデルへの薬効評価、第 19 回日本褥瘡学会中部地方会学術集会、福井、3 月 17 日、2024	
	【その他特筆事項】	

令和5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、約20%の患者でEGFR遺伝子の変異が確認された。これはPTEN、TP53に次ぐ高頻度であった。 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：EC変異EGFR陽性膠芽腫細胞株を作成中である。これまでに、A289V、G598V、R108K、およびdel6-273(vIII)の各種細胞外ドメイン変異EGFRをコードするウイルスベクターの構築を進めており、膠芽腫細胞株U87への導入を順次行っている。 ・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。現在までに複数箇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。 細胞外ドメイン 主に脳腫瘍で変異 分子標的薬：なし コンパニオン診断薬：なし キナーゼドメイン 主に肺癌で変異 分子標的薬：あり コンパニオン診断薬：あり EXTRACELLULAR DOMAIN (EC) KINASE DOMAIN (KD) EGFR R108K A289V/D T263P G598V del 6-273 (EGFRvIII) del1747-749 del1746-750 L858R 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5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		非アルコール性脂肪肝炎および肝細胞がんの発症・増悪化に対する miRNA 生合成制御-RNA 修飾の影響の解明
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(がん抑制 miRNA)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。また肝細胞がん(HCC)患者検体のがん部において、NF90-NF45 の顕著な発現増加が認められている。さらに我々は、肝細胞がんの前がん状態の一つである「非アルコール性脂肪肝炎(NASH)」モデルマウスの肝臓において NF90 および NF45 の発現が増加することを見出している。したがって、NF90-NF45 の発現増加はがん抑制 miRNA の産生阻害を介して NASH の発症および肝細胞がんへの進展に寄与する可能性が示唆される。加えて我々は、貴学がん進展制御研究所との共同研究を通して、「NF90-NF45 による miRNA 生合成制御機構に対し、RNA 修飾の一つであるアデニンのメチル化(m⁶A)が抑制的に機能すること」と「<i>in vitro</i> 条件において RNA メチル化酵素 METTL3/14 による miRNA 初期転写産物への m⁶A 修飾効果が NF90-NF45 により阻害されること」の2つを見出してきた。本研究では、NASH および NASH 由来 HCC の発症・進展に対する NF90-NF45 の関与の検証と、m⁶A 修飾調節を介した NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA 制御機構の解明を試みた。	
【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。)	これまで我々は、HCC 患者検体および NASH モデルマウス肝臓において NF90-NF45 の発現が顕著に増加することを見出している。一方で、個体レベルにおいて当該機構が発がん・がん増悪化に与える影響は未だ十分に明らかではない。そこで、我々が独自に作出した肝細胞特異的 NF90 ノックアウトマウス(Hepa-NF90KO マウス)を用いて、NASH 由来 HCC の誘発を検証した。 1 型糖尿病を誘発するストレプトゾトシン(STZ)と高脂肪食(HFD32)給餌を組み合わせた NASH-HCC model は NASH を基とする HCC(NASH-HCC)を誘導できる(Fujii <i>et al.</i>, Med Mol Morphol, 2013)。今回、生後2日の Hepa-NF90KO マウスおよび Control マウスに対して STZ を注射、生後4週齢から HFD32 を給餌した。肝硬変から HCC の発症が期待できる生後12週目まで HFD32 を給餌後、マウスを安楽死させ肝臓を摘出した。興味深いことに、<u>Control マウスと比較し、Hepa-NF90KO マウスの肝臓では、肝臓表面において確認された腫瘍の数が有意に減少していた(図参照)</u>。また、Control マウスを用いて作製した NASH-HCC モデルの肝臓では、HFD32 の給餌のみで誘導した単純生脂肪肝モデルマウスと比較し、NF90 および NF45 の発現が有意に増加していた。一方で、Hepa-NF90KO マウスでは、単純生脂肪肝モデルと NASH-HCC モデルにおいて NF90 および NF45 の発現に有意な差は見られなかった。本研究結果より、<u>NF90-NF45 の発現増加は NASH-HCC の発症に対して促進的に作用するものと考えられた。</u> また昨年度までの解析結果から、m⁶A 修飾酵素 METTL3/14 の過剰発現が、NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA(let-7a)の生合成阻害効果を軽減させる可能性が示唆された。また、METTL3/14 が let-7a 初期転写産物(pri-let-7a)の m⁶A 修飾を行う際に、NF90-NF45 が当該修飾を阻害する可能性も見出してきた。今年度は「NF90-NF45 が生合成抑制を行う他のがん抑制 miRNA」である miR-7 の初期転写産物(pri-miR-7-1)に対して、<i>In vitro</i> m⁶A 修飾解析を実施した。解析の結果、pri-miR-7-1 プローブと METTL3/14 を混合した際に m⁶A 修飾シグナルが検出できるが、当該シグナルは METTL3/14 と共にリコンビナント NF90-NF45 を添加して反応させること	

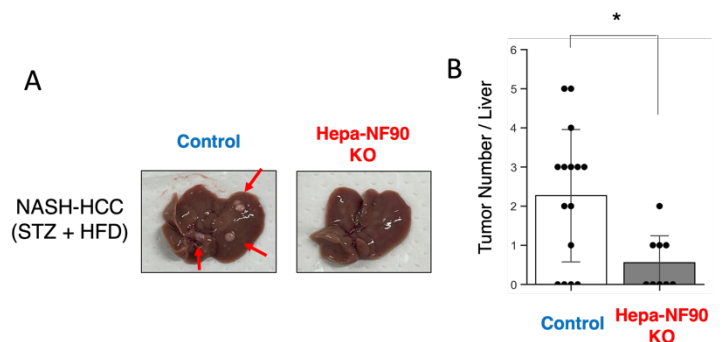


図 Hepa-NF90KO マウスの肝臓では発がんが抑制される
A. ControlおよびHepa-NF90KOマウスを用いて作製したNASH-HCCモデルの肝臓の写真。赤矢印は目視で確認できる腫瘍を示す。
B. Aで示す肝臓表面の細胞数を示したグラフ。(n=9-15, *: p < 0.05)

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	で減衰することを発見した。また NF90 を単独で添加した場合には十分な m⁶A シグナルの減衰効果は認められなかった。以上の結果から「NF90-NF45 は pri-let-7a-1 や pri-miR-7-1 の 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複数のがん抑制 miRNA の生合成経路を抑制する」という可能性が見出された。本研究成果と昨年度までの共同研究成果については、第 46 回日本分子生物学会の公募シンポジウム「修飾生物学-分子修飾が生み出す精巧な生命制御システム」に発表演題として採択され、口頭発表を行った。 今後、前述の NASH-HCC モデルマウス肝臓を用いて、当該肝臓におけるがん抑制 miRNA 初期転写産物の m⁶A 修飾状況を検討し、「NF90-NF45 による m⁶A 修飾制御を介した miRNA の生合成経路」と「NASH-HCC 発症・進展」との関連性を更に検証する予定である。
【成 果 等】	【主な論文発表】 - Ken-ichi Matsumoto, <u>Takuma Higuchi</u>, Mirei Umeki, Masafumi Ono, Shuji Sakamoto. Tenascin-X is increased with decreased expression of miR-378a-5p and miR- 486-5p in mice fed a methionine-choline-deficient diet that induces hepatic fibrosis Biomedical Research (Tokyo), 45 (2) 67-76, 2024 【学会発表】 口頭発表 <u>樋口琢磨</u>、森岡俊介、森澤啓子、鈴木健之、坂本修士 二本鎖RNA結合タンパク質複合体NF90-NF45によるm⁶A修飾制御を介したがん抑制miRNA生合成調節 第46回 日本分子生物学会年会、公募シンポジウム「修飾生物学-分子修飾が生み出す精巧な生命制御システム」、2PS-01-04、2023年12月6-8日 【その他特筆事項】 受賞 - 令和 4 年度 高知大学研究顕彰制度 若手教員研究優秀賞（2023 年 3 月受賞）

令和5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・教授・藤田恭之
	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】	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、CD44v6 の発現を減少させる分子機構を解明し、初期のがん細胞の悪性化を抑制する方法を開発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、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いただ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 (令和4年度共同研究)。令和5年度共同研究では、これらの薬剤を、腭がんモデルマウスの腭臓から単離した腺房細胞の <i>ex vivo</i> 培養系を用いて評価した。この培養系は、腭がん発生の初期段階である腺房-導管異形成 (acinar-to-ductal metaplasia: ADM) を再現できると考えられている (図1左側の白矢印)。その結果、候補薬剤の中から ADM の誘導を抑制する効果を持つと考えられる薬剤を見出すことができた (図1)。また、生体内での効果を検討するため、この薬剤を腭臓がんモデルマウスに投与した結果、ADM の誘導が抑制されることが示唆された。今後は、この薬剤の腭がんに対する効果の作用機序を検証するとともに、薬剤効果の普遍性を検討するため、乳がん幹細胞培養系、乳がん組織由来のオルガノイドや乳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いただ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】 Ito S, Kuromiya K, Sekai M, Sako H, Sai K, Morikawa R, Mukai Y, Ida Y, Anzai M, Ishikawa S, Kozawa K, Shirai T, <u>Tanimura N</u>, Sugie K, Ikenouchi J, Ogawa M, Naguro I, Ichijo H, Fujita Y. Proc Natl Acad Sci U S A. 2023 Oct 24;120(43):e2307118120.	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

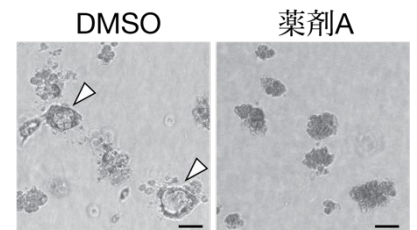


図1. 薬剤Aの添加によりADM誘導 (白矢印) が抑制される

令和5年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		グリオーマの核小体形態変化とエネルギー代謝イメージング
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学両生類研究センター・助教・岡本和子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学ナノ生命科学研究所・准教授・新井敏
	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】	核小体は真核細胞核中にある最大の核内小器官であり、タンパク質合成に参与するリボソームの合成や外的ストレス応答に参与し、恒常性の維持や腫瘍化の進展にも極めて重要な働きをすることがわかってきている。核小体の形態は、サイズや数が、細胞状態に依存し変化することが知られ、病理診断に利用されるほどである。おおまかにはがんや幹細胞など活発に分裂する細胞種の核小体は大きくまたは数が増える、とされている。しかしながら形態と機能の関係性の詳細については未だ不明な点が多い。核小体形態、リボソーム合成に必須である ATP 量、細胞状態の同時定量解析を行い、代謝動態をキーワードにがん化機能の一端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。)	核小体形態とがん化を含む細胞状態の関連性は、古くから示唆されており特に核小体はリボソーム合成の場であるため、形態変化はエネルギー代謝に密接に関係があるものと考えられるが、詳細は未だ不明である。近年、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer) をベースにした ATP センサーが開発されて以降、細胞内、また特定の小器官における ATP 量の変化を画像ベースの解析によって明らかにする手法が発展してきた。しかしながら、FRET ベースのセンサーは、2つの異なる蛍光タンパク質の成熟度(発色団形成)や分解の程度などが異なるため、大きなバラつきを生み、定量性に困難がある。また、核小体のような核内小器官への標的化は、2つの蛍光タンパク質から成る大きなサイズのセンサーでは困難なことも多い。それに対して、共同研究者らは、さらに定量性の高い顕微鏡観察手法の一つとして蛍光寿命顕微鏡法 (FLIM: Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) に適用できる蛍光 ATP センサーを開発している。特に、1つの蛍光タンパク質から成り、比較的サイズが小さいことから、標的化も期待できる。本研究課題でもごく最近開発された FLIM に適応した ATP センサーを用いて、細胞状態-核小体-ATP の関係性を高い定量性を担保した定量計測を行うこととした。 蛍光寿命型の蛍光 ATP センサーは、緑色蛍光タンパク質の一部に ATP 結合ドメインを挿入した単一蛍光タンパク質型であり、ATP をミリモル濃度で検出でき、定量性に優れている。このセンサーは細胞内小器官移行シグナル等を融合させることにより、特定の領域のみ、または複数領域での同時 ATP 量計測が可能である。今回、このセンサーに、核小体局在タンパク質 Nucleolin を融合し、核小体局在型に改変した (Fig. 1)。また他にも核内、ミトコンドリア局在型などを作製し細胞内小器官ごとに計測可能	

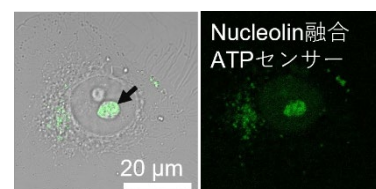


Fig.1核小体局在型ATPセンサー

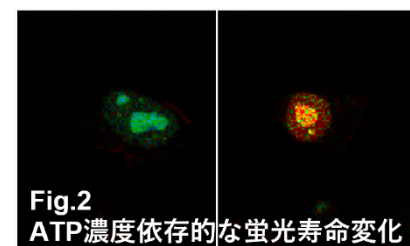


Fig.2 ATP濃度依存的な蛍光寿命変化
2.5 1.5
Fluorescence Lifetime (ns)

令和 5 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	としている。現在、各種センサーは、グリオーマに対して導入する前段階として比較的扱いやすいモデル細胞として HeLa 細胞やマウス線維芽細胞に発現させ感度や定量性、局在などを確認している。1 例を挙げる (Fig. 2)。蛍光寿命の長さに対して擬似色をつけており、蛍光寿命は ATP 濃度に依存し変化する。1 細胞レベルの測定が出来ているため、今後は、細胞ごとに個性があるか、などを詳細に調べる予定である。蛍光寿命顕微鏡、蛍光センサー、解析系を含む実験系の確立を終えているため、次年度から、がんの悪性度と核小体の動態との相関を評価しながら、グリオーマを含むがん細胞での計測を開始する。
【成 果 等】	【主な論文発表】
	【学会発表】
	【その他特筆事項】

令和5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		がん転移巣で増加する老化した線維芽細胞を介した乳がん骨転移促進機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学和漢医薬学総合研究所・助教・佐々木 宗一郎
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	教授・城村 由和
【研究目的】	がん関連線維芽細胞（CAF）は様々な炎症性因子を産生し、癌の悪性進展化や治療効果などに影響を与えることが知られている。我々はこれまでに、骨転移過程において骨内に集積するCAFの腫瘍細胞の増殖への関与を明らかとしたが、CAFの起源や活性化機構については明らかとなっていない。近年、老化した線維芽細胞は様々な炎症性タンパク質を分泌する形質(SASP)によりCAFと共通した特徴を示すことが報告されている。そこで、骨転移時に集積するCAFの起源やその活性化に、転移したがん細胞によって誘導される正常骨髄細胞の細胞老化が重要であるという仮説に基づき、骨微小環境に集積するCAFの起源・活性化の分子基盤を老化細胞に着目した解析から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。)	金沢大学より供与いただいた C57BL/6-p16CreERT2/ROSA26-CAG-1sl-tdTomato マウスを、富山大学和漢医薬学総合研究所内の動物施設内で繁殖させ以下の検討を行った。実験開始に先立ち、マウス乳がん細胞株 E0771 細胞の骨髄内接種の条件検討を行い、接種から骨転移巣形成までの期間を従来に比べて長くなるようにした。この実験系により骨微小環境が骨転移に与える影響をより詳細に解析可能になることが期待される。 1. 上記のマウス(8-10 週令) に対して、マウス乳がん細胞株 E0771 細胞を骨髄内に接種した。腫瘍接種から 10 日後からタモキシフェンを投与し老化細胞特異的に tdTomato 発現を誘導した後に全骨髄細胞を回収、フローサイトメトリー法にて老化細胞の検出を試みた。 2. 腫瘍接種マウスの骨髄内にはコントロール群と比べて tdTomato 陽性を示す細胞数の増加が見られたが、その細胞数は非常に少ないものであった。一方で、腫瘍接種から回収までのタイミングを変更することで陽性細胞数に変動が見られた。tdTomato 陽性を示す老化細胞が、骨転移巣形成に伴って経時的に変更している可能性が考えられた。今後は、エンドポイントだけでなく経時的に回収・解析を行い老化細胞数の変化と転移巣形成との関連性を検討する必要がある。 3. 骨内への腫瘍接種後に確認された tdTomato 陽性細胞集団を明らかにするために、フローサイトメトリーにて陽性細胞集団の同定を試みた。これまでの解析から、tdTomato 陽性細胞集団は骨髄細胞の複数のマーカーに陽性を示した。この結果から、腫瘍細胞接種によって誘導される tdTomato 陽性を示す老化細胞は、骨髄内の単独の細胞ではなく複数の細胞集団から構成されているものと考えられた。 4. tdTomato 陽性を示す老化細胞を FACS Aria を用いて分取・解析を試みたが現在までに十分な解析には至っていない。	
【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		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・副所長 兼 がん病態生理学分野長・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・がん病態生理学分野・藤下 晃章
	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】	申請者らは、転移性大腸がんマウスモデル（CKPS マウス）を作出し、大腸がんの浸潤・転移に関与する分子やシグナル経路について検討してきた。これまでに、がん幹細胞マーカーである ALCAM (CD166) と PROM1 (CD133) 陽性のがん細胞が、CKPS マウスの大腸がん原発巣の浸潤先端や肝転移巣に顕著に多く存在し、ALCAM/PROM1 の発現が転移を促進することを見出した。本研究では、ALCAM/PROM1 の発現調節や大腸がん幹細胞性の維持に NFκB 経路が関与する可能性について検証を行い、大腸がん幹細胞の幹細胞性制御機構の解明と転移性大腸がん治療戦略の開発につな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。)	本研究課題において、ALCAM/PROM1 の発現を制御する分子・シグナル 経路を探索するために化合物ライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、NFκB 阻害薬 QNZ は ALCAM の発現を抑制することをこれまでに見出している。本年度は CKPS マウスから樹立した大腸がん細胞株(CKPS 細胞)を用いて、NFκB 経路による ALCAM/PROM1 発現調節の検証と NFκB 阻害薬 QNZ が大腸がんの転移を抑制する可能性について以下の二つの計画に基づき検証した。 <u>計画1：ALCAM の発現を制御する NFκB 経路経路の同定</u> QNZ 以外の NFκB 阻害薬 SC-75741 および Triptolide を CKPS 細胞に処置したところ、ALCAM/PROM1 の発現が抑制された。また NFκB の上流キナーゼである IKKα/β 阻害薬および IKKϵ/TBK1 阻害薬を CKPS 細胞に処置したところ、IKKα/β 阻害薬 BMS-345541 が ALCAM/PROM1 の発現を抑制することを確認した。そのため CKPS 細胞に高発現する 4 つの NFκB ファミリー分子を siRNA により同時にノックダウンまたは IKKα および β を CRISPR-Cas9 によりノックアウトすることで ALCAM/PROM1 の発現に与える影響を評価した。しかしながら NFκB のノックダウンおよび IKKα/β のノックアウトのいずれにおいても CKPS 細胞における ALCAM/PROM1 の発現に影響を及ぼさなかった。これらの結果は QNZ などの NFκB 経路阻害薬による ALCAM/PROM1 の発現抑制効果はオフターゲットによる可能性が示唆された。現在 QNZ の標的候補となる分子の探索を行っている。 <u>計画2：NFκB 阻害薬のがん幹細胞治療薬・転移抑制薬としての検証</u> がん幹細胞性に対する QNZ の影響を検証するため、低接着プレートでのスフェロイド形成能を評価したところ、QNZ の濃度依存的にスフェロイド形成が抑制されることを確認した (図 1)。また転移巣形成に対する効果について CKPS 細胞を用いた脾注肝転移モデルによって評価したところ、対照群と比較して QNZ 投与群において有意に肝転移巣成数が減少していた (図 2)。これらの結果から QNZ は ALCAM/PROM1 を抑制することで大腸がん細胞のがん幹細胞性の維持および肝転移能を抑制することが示唆された。 図1. CKPS細胞のスフェロイド形成はQNZにより抑制された 図2. CKPS細胞の肝転移巣形成はQNZ投与により抑制された	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	牛 燕清、藤下 晃章、武藤 誠、青木 正博、大腸がん幹細胞を標的とする化合物のスクリーニング、第 82 回 日本癌学会学術総会
	【その他特筆事項】	