

金沢大学

がん進展制御 研究所

2023年 **年報**

Annual Report
Cancer Research Institute
Kanazawa University

巻頭言

2024年1月1日に発生した令和6年能登半島地震は、石川県を中心に甚大な被害をもたらしました。多くの尊い命が犠牲になり、被災された方々は今もなお不自由な生活を余儀なくされています。私たち金沢大学がん進展制御研究所も研究機器の破損などの被害を受けましたが、幸いにも研究所の構成員は皆、無事であり、研究活動への影響は限定的と考えられます。これまで多くの国内外の研究者の方々から、お見舞いやご支援のお申し出をいただきました。温かいお心遣いに対しまして心よりお礼を申し上げます。研究所一丸となって、がん研究の発展に努めるとともに、被災地の復興に少しでも貢献できるよう取り組んで参りたいと決意を新たにしております。

設立以来、本研究所は、「がんに関する学理及びその応用の研究」に焦点をあて、がんの悪性進展メカニズムを解明し、先進的な診断・治療技術を開発すること、また、将来のがん研究や医療を担う優秀な人材を育成することを使命と位置付けています。文部科学省から「がんの転移と薬剤耐性に関する先導的共同研究拠点」としての認定を継続して受けており、2023年度は73件の研究課題（うち国際共同研究11件、異分野融合研究5件）を採択し、共同研究を推進しました。また新たに2023年度、文部科学省の共同利用・共同研究システム形成事業「学際領域展開ハブ形成プログラム」に採択され、「健康寿命の延伸に向けた集合知プラットフォームの形成」プロジェクトを開始することができました。ご参画いただいた東北大学加齢医学研究所、大阪大学微生物病研究所、慶應義塾大学先端生命科学研究所の関係の先生方に厚くお礼申し上げます。本プロジェクトの始動を祝ってキックオフシンポジウム（共同利用・共同研究拠点成果報告会と同時開催）を2024年2月に金沢で開催いたしました。様々な研究分野を専門とする研究者が交流を深めお互いの研究を理解し、新しい学際領域融合研究「健康寿命科学」をスタートする良い機会となったと確信しています。

また7月に、金沢国際がん生物学シンポジウムとして、成長・発展の著しいインドとのがん研究国際シンポジウムを初めて開催しました。インドの代表的な4つの研究所から研究者を招き、東アジアにとどまらない国際連携の拡充に努めました。従来通り、中国復旦大学（9月）およびDUKE-NUSシンガポール（2024年3月）とのジョイントシンポジウムは順調に継続しており、国内外の生命科学研究者との交流を図って、国際的研究拠点としての機能強化に取り組んでいます。

このほか、2回目の取り組みとして、高校生向け研究体験プログラム「がん研究早期体験プログラム」を8月に開催しました。本プログラムは、クラウドファンディング（2021年）や『未来のがん研究者を育てる基金』などに寄せられたご寄附を運営資金として実施しています。研究体験やセミナーに延べ56名の高校生が参加し、現役の研究者から研究内容の解説を受け、研究の現場を実際に体験しました。参加した高校生が、将来、アカデミアや産業界で研究に携わり、国際的に活躍する優秀な研究者に成長することを願っています。

2023年の各研究分野の活動状況をがん研年報としてここに報告いたします。本研究所の取り組みにつきまして、皆様にご理解いただく機会となれば幸いです。

金沢大学がん進展制御研究所長 鈴木健之

金沢大学がん進展制御研究所年報2023年

目次

巻頭言

研究概要と研究業績

先進がんモデル共同研究センター

| | |
|-----------|----|
| 腫瘍遺伝学研究分野 | 2 |
| 分子病態研究分野 | 8 |
| 上皮幹細胞研究分野 | 16 |

がん幹細胞研究プログラム

| | |
|---------------|----|
| 遺伝子・染色体構築研究分野 | 20 |
| 腫瘍分子生物学研究分野 | 25 |
| がん・老化生物学研究分野 | 30 |

がん微小環境研究プログラム

| | |
|-------------|----|
| 免疫炎症制御研究分野 | 38 |
| 腫瘍動態制御研究分野 | 41 |
| 腫瘍細胞生物学研究分野 | 47 |

がん分子標的探索プログラム

| | |
|-------------|----|
| 腫瘍制御研究分野 | 52 |
| 機能ゲノミクス研究分野 | 57 |

がん分子標的医療開発プログラム

| | |
|----------|----|
| 腫瘍内科研究分野 | 62 |
|----------|----|

中央実験施設

人材育成プログラム

| | |
|----------------|----|
| 上皮可塑性・炎症ユニット | 78 |
| がん-免疫系相互作用ユニット | 81 |
| がん幹細胞環境制御ユニット | 83 |
| ミトコンドリア動態ユニット | 86 |
| 老化細胞動態解析ユニット | 88 |

基礎統計・教育活動

各種シンポジウム開催状況

先進がんモデル共同研究センター

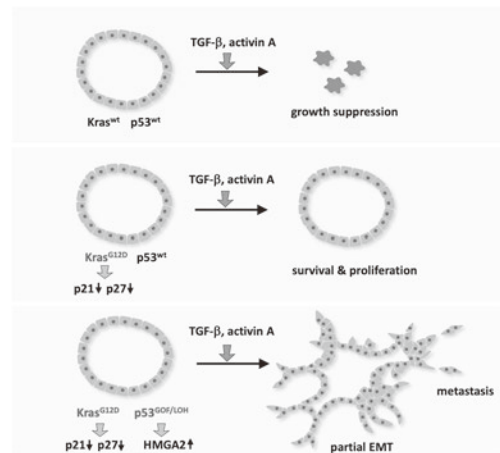
Division of Genetics

腫瘍遺伝学研究分野

| | |
|----------------------|---|
| Professor | Masanobu Oshima 大島 正伸 |
| Associate Professors | Hiroko Oshima 大島浩子, Mizuho Nakayama 中山瑞穂 |
| Assistant Professor | Dong Wang (WPI-Nano LSI 特任助教) |
| Research Associate | Sau Yee Kok (JSPS 外国人特別研究員) |
| Graduate Students | Xuelian Lei 雷 雪蓮 (D4), I Wayan Ardyan Sudharta Putra (D1) Yuichiro Furutani 古谷裕一郎 (D4), Hiroshi Saito 齋藤浩志 (D3) Ryosuke Machi 真智涼介 (D2) (YF, HS, RM 消化管外科学) |
| Technical Assistants | Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子 |

【 Abstract 】

TGF- β family signaling plays a tumor suppressor role, while it promotes malignant progression through epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Here, we have investigated the switching mechanism of the “tumor suppressor” and “tumor promoter” using intestinal tumor-derived organoids that we established from genetic mouse models. We treated these organoid cells with activin A, a TGF- β family cytokine, and found that a *Kras*^{G12D} mutation protected organoid cells

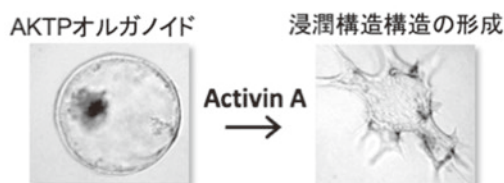


from activin A-induced growth suppression by inhibiting p21 and p27 expression. Importantly, additional *Trp53*^{R270H} gain-of-function (GOF) mutation together with loss of wild-type *Trp53* by LOH promoted activin A-induced partial EMT with development of multiple protrusions on the organoid surface, which was associated with increased incidence of metastasis (see Figure). Histological analysis confirmed that tumor cells at the protrusions showed loss of apical-basal polarity and glandular structure. Moreover, RNA-seq analysis indicated that expression of *Hmga2*, encoding a co-transcription factor for EMT inducers, was significantly upregulated by *Trp53* GOF/LOH mutation. Furthermore, disruption of *Hmga2* suppressed activin A-induced partial EMT and metastasis in *Trp53* GOF/LOH organoids. These results indicate that combination of *Kras* and *TP53* GOF/LOH mutations is a key genetic state for the induction of TGF- β -induced partial EMT and metastasis of colorectal cancer. Therefore, TGF- β /activin signaling will be an effective therapeutic target against the malignant progression of colorectal cancer. (Wang D, et al, **Cancer Res**, 2023).

<2023年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

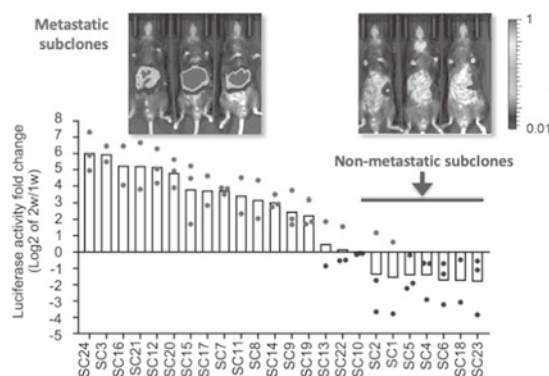
1. TGF- β /activin シグナルによる大腸がん悪性化誘導機構

TGF- β シグナルには、腫瘍細胞の分化誘導によるがん抑制性作用と、EMT の誘導による悪性化促進作用が知られている。この TGF- β によるがんの抑制と促進作用の制御機構について、マウス腸管腫瘍由来オルガノイドを用いた実験により解析した。TGF- β ファミリーの activin A は、*Kras* 変異を持たない腫瘍細胞の増殖抑制を誘導した。重要なことに、*Kras* 活性化変異に加えて、*Trp53* R270H ミスセンス変異（機能獲得型変異）を導入した AKTP オルガノイドでは、上皮性の極性を失った腫瘍細胞による浸潤突起構造の形成が認められ（右図）、細胞外基質への浸潤および遠隔臓器への転移が認められた。以上の結果により、*Kras/TP53* 変異が、TGF- β /activin による悪性化誘導に重要に関与することが明らかとなった。（Wang D, et al, **Cancer Res**, 2023）。これらの結果を基盤とし、今後はがん細胞のクラスター浸潤機構の研究へと展開する。



2. ネガティブ選択によるがんの悪性化進化

がんの進化過程は、遺伝子変異と生存に有利な獲得形質による選択の繰り返しで説明される。しかし、転移性の腸管腫瘍オルガノイド（AKTP）のサブクロニング実験により、がん細胞集団では一定の頻度で獲得した転移性を失った細胞が出現しており（右図）、それらの亜集団はネガティブ選択により排除されることを明らかにした。（Morita et al, **Cancer Sci**, 2023）。



3. 機能獲得型（GOF）変異 p53 による微小環境局所 Wnt シグナル制御

変異型 p53 はエピジェネティクス制御機構により、遺伝子発現プロファイルの変化を誘導する。レポーターアッセイにより、GOF-p53 が Wnt シグナルを活性化する事を発見した。さらに、腫瘍組織内の局所微小環境では、GOF-p53 が安定化した細胞が、GOF-p53 が分解されたがん細胞の Wnt シグナル活性化にも関与する事が明らかとなり、今後は分子機構の解明に向けた研究を展開する。

4. 新規胃がんモデル開発と Wnt 依存的な転移機構

胃がん悪性化機構の解明を目的とし、胃粘膜上皮で *Kras*, *Tgfbr2*, *Trp53* の 3 遺伝子に変異を導入した KTP マウスと、さらに腫瘍細胞が Wnt リガンドを産生する WKTP マウスを作製した。これらのマウス由来オルガノイドの移植実験の結果、リガンド依存的な Wnt シグナル活性化が、胃がんの浸潤転移等の悪性化誘導に関与する可能性を示す結果が得られ、今後の解析により分子機構の解明を目指す。

5. 低分子化合物による大腸がん治療実験

オルガノイドを用いたスクリーニングにより、特定の遺伝子変異を持つがん細胞では HDAC 阻害薬が効果的に増殖阻害することを明らかにした。新規治療法の開発を目指して、今後はヒト大腸がん患者由来検体を用いた解析を推進する。

【研究業績】

< 発表論文 >

● 原著論文

(研究室主体)

1. Wang D, Nakayama M, Hong CP, Oshima H, Oshima M. Gain-of-function p53 mutation acts as a genetic switch for TGF- β signaling-induced epithelial-to-mesenchymal transition in intestinal tumors. **Cancer Res.** 2023 Oct 18. Doi: 10.1158/0008-5472.CAN-23-1490. Online ahead of print.
2. Morita A, Nakayama M, Wang D, Murakami K, Oshima M. Frequent loss of metastatic ability in subclones of *Apc*, *Kras*, *Tgfbr2* and *Trp53* mutant intestinal tumor organoids. **Cancer Sci**, 114: 1437-1450, 2023. Doi: 10.1111/cas.15709.
3. Wang D, Nguyen HG, Nakayama M, Oshima H, Sun L, Oshima M, Watanabe S. Mapping nanomechanical properties of basal surface in metastatic intestinal three-dimensional living organoids with high-speed scanning ion conductance microscopy. **Small**, 19: e2206213, 2023. doi: 10.1002/sml.202206213.

(共同研究)

1. Kerzel T, Giacca G, Beretta S, Bresesti C, Notaro M, Scotti GM, Balestrieri C, Canu T, Redegalli M, Pedica F, Genua M, Ostuni R, Kajaste-Rudnitski A, Oshima M, Tonon G, Merelli I, Aldrighetti L, Dellabona P, Coltella N, Doglioni C, Rancoita PMV, Sanvito F, Naldini L, Squdrito ML. In vivo macrophage engineering reshapes the tumor microenvironment leading to eradication of liver metastasis. **Cancer Cell**, 41: 1892-1910, 2023. Doi: 10.1016/j.ccell.2023.09.014.
2. Ozato Y, Kojima Y, Kobayashi Y, Hisamatsu Y, Toshima T, Yonemura Y, Masuda T, Kagawa K, Goto Y, Utou M, Fukunaga M, Gamachi A, Imamura K, Kuza Y, Zenkoh J, Suzuki A, Niida A, Hirose H, Hayashi S, Koseki J, Oki E, Fukuchi S, Murakami K, Tobo T, Nagayama S, Uemura M, Sakamoto T, Oshima M, Doki Y, Eguchi H, Mori M, Iwasaki T, Oda Y, Shibata T, Suzuki Y, Shimamura T, Mimori K. Spatial and single-cell transcriptomics decipher the cellular environment containing HLS-G⁺ cancer cells and SPP1⁺ macrophages in colorectal cancer. **Cell Rep**, 42: 111929, 2023.

● 著書・総説

1. Kok SY, Nakayama M, Morita A, Oshima H, and Oshima M. Genetic and nongenetic mechanisms for colorectal cancer evolution. **Cancer Sci**, 114: 3478-3486, 2023. doi: 10.1111/cas.15891.
4. Morita A, Nakayama M, Oshima H, Oshima M. In vitro and in vivo models for metastatic intestinal tumors using genotype-defined organoids. **Methods Mol Biol**. 2691: 19-30, 2023. doi: 10.1007/978-1-0716-3331-1_2.

- 日本語総説

1. 大島浩子, 中山瑞穂, 大島正伸. 大腸がん悪性化転移機構と線維性微小環境, リンパ学 (日本リンパ学会機関誌), 46: 2-6, 2023.
2. 中山瑞穂, p53 変異と大腸がんの悪性化, 十全医学会雑誌 (Journal of the Juzen Medical Society) 132: 20-25, 2023.
3. 大島浩子, 中山瑞穂, 大島正伸. 慢性炎症が促進する発がん悪性化, 別冊・医学のあゆみ「基盤病態としての慢性炎症」(医歯薬出版) 86-91, 2023.
4. 中山瑞穂, がんモデルオルガノイドによる大腸がん悪性化研究, 細胞「がん生物学モデルの最前線」(ニューサイエンス社) 55: 4-7, 2023.

<学会発表>

- 国際学会・国際シンポジウム

1. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Ikeda Y, Matsunaga YT, Oshima M. Genetically engineered tumor-derived organoid models to examine the metastasis mechanism of gastrointestinal cancer. 41st Sapporo International Cancer Symposium, (KKR Hotel, Tokyo) Oct 12, 2023.
2. Oshima M. Gain-of-function mutant p53 for activin signaling-induced epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). 10th International MDM2 Workshop, (National Cancer Center, Tokyo) Oct 16, 2023.
3. Nakayama M, Yamamoto D, Oshima H, Inaki N, Oshima M. Wnt signaling activation in colon cancer cells by gain-of-function mutant p53 through COX-2/PGE₂ pathway. 10th International MDM2 Workshop, (National Cancer Center, Tokyo) Oct 16, 2023.
4. Oshima M. Identification of genotype-linked nano-scale physical properties of intestinal tumor cells. 7th WPI-NanoLSI International Symposium, (Berlin Harnack-Haus, Germany) Nov 2, 2023.
5. Oshima M. Organoid experiments to understand the metastasis mechanism. 5th National Cancer Center (NCC)-GCSP Inter-Academy Cancer Symposium, (National Cancer Center, Korea) Nov 24, 2023.
6. Oshima M. Collective migration and polyclonal metastasis mechanism. Seoul International Gastric Cancer Forum 2023, (Seoul National University, Korea) Dec 2, 2023.

- 国内学会・セミナー

1. 大島正伸. オルガノイドを用いた消化器がん転移機構の研究. 第13回がんゲノム・エピゲノム, 数理統計解析勉強会. (九州大学別府病院, 別府) 2023年1月28日.
2. 大島正伸. オルガノイド研究による消化器がん転移の病態解明. 第21回北陸GOG Open clinical conference, (金沢大学, 金沢) 2023年2月11日.
3. 大島正伸. 腸管腫瘍の悪性化における Kras^{G12D} 変異の役割. 京都大学 iCeMS シン

ポジウム, 変異 KRAS 分子標的薬の開発と将来への展望. (online symposium) 2023 年 4 月 26 日.

4. Oshima M, Kok SY, Wang D, Nakayama M, Oshima H. Cancer evolution by positive and negative selection. 第 20 回幹細胞シンポジウム (淡路夢舞台、神戸) 2023 年 5 月 20 日.
5. 大島浩子, 古谷裕一郎, 中山瑞穂, 稲木紀幸, 大島正伸. マウス胃がんオルガノイドによる Wnt リガンド依存的な悪性化機構の検討. (口演) 第 82 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜) 2023 年 9 月 21 日.
6. Kok SY, Oshima H, Nakayama M, Oshima M. Tumor-stromal interactions facilitate polyclonal metastasis. (口演) 第 82 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜) 2023 年 9 月 21 日.
7. 中山瑞穂, 山本大輔, 大島浩子, 稲木紀幸, 大島正伸. 腸管腫瘍内 Wnt 活性化における機能獲得型変異 p53 の関与について. (口演) 第 82 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜) 2023 年 9 月 23 日.
8. Wang D, Nakayama M, Oshima H, Oshima M. Gain-of-function p53 mutation with LOH promotes activin A-induced partial EMT and metastasis potential. (ポスター) 第 82 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜, 横浜) 2023 年 9 月 23 日.
9. 大島正伸. 消化器がん発生と悪性化進展を促進する炎症性微小環境, 第 15 回 In vivo 実験医学シンポジウム, (学士会館, 東京) 2023 年 11 月 16 日.

<その他>

●アウトリーチ活動

1. 大島正伸. がんの発生と悪性化に向かうメカニズム. (口演) AMED がんシンポジウム (しみ「しる×しる×みちる がん治療の最前線〜がんと老化〜」(オンライン) 2023 年 3 月 11 日.
2. 大島正伸. 創薬を目指した革新的基礎研究の挑戦. (AMED シンポジウム・口演) 第 82 回日本癌学会学術総会 (パシフィコ横浜), 横浜, 2023 年 9 月 22 日.

<外部資金>

1. 科研費 基盤研究 (A) [研究代表者: 大島 正伸]
「外因性リガンド依存的 Wnt シグナル活性化による胃がん悪性化転移機構の研究」
7,900 千円
2. 科研費 基盤研究 (B) [研究代表者: 大島 浩子]
「自然免疫反応と COX-2/PGE2 経路による転移微小環境の構築」2,600 千円
3. 科研費 基盤研究 (C) [研究代表者: 中山 瑞穂]
「変異 p53 タンパク質蓄積の不均一性に起因した腫瘍内局所微小環境に関する研究」
1,100 千円
4. 科研費 挑戦的研究 (萌芽) [研究代表者: 大島 正伸]
「がんの悪性化形質維持におけるネガティブ選択機構」2,500 千円
5. 科研費 若手研究 [研究代表者: Dong Wang]
「The role of activin combined with different gene mutations in colorectal cancer EMT」

1,100 千円

6. 科研費 特別研究員奨励費 [研究代表者：大島 正伸, 研究分担者：Kok Sau Yee]
「繊維性微小環境形成による消化器がん転移促進機構の研究」900 千円
7. AMED 次世代がん医療加速化研究事業 [研究代表者：大島浩子]
「胆管がん発生における線維性微小環境制御機構の探索」8,000 千円

Division of Cancer Cell Biology

分子病態研究分野

| | |
|-----------------------|---|
| Professor | Noriko Gotoh 後藤 典子 |
| Assistant Professors | Yasuto Takeuchi 竹内 康人 (若手 PI) Tsunaki Hongu 本宮 綱紀 (助教) |
| Graduate Students | Li Mengjiao (D4), Saren Qiqige (D4), Wang Yuming (D4) , Masahiro Yamaxaki 山崎 雅弘 (D3) Huazi Zhang (D2) Hiroki Kurokawa 黒川 祐貴 (D1) Shandan (D1) Risa Kashimura 柏村 里沙 (M2) Hirokazu Kusunoki 楠木 啓主 (M1)、Hauhau Liu (M1) |
| Undergraduate student | Itsuki Toriba 鳥羽 樹 |
| Research student | Guo Liwei |
| Technical Staff | Hitomi Takamura 高村 瞳 |
| Assistant Staff | Kiyoko Take 武 紀代子 |

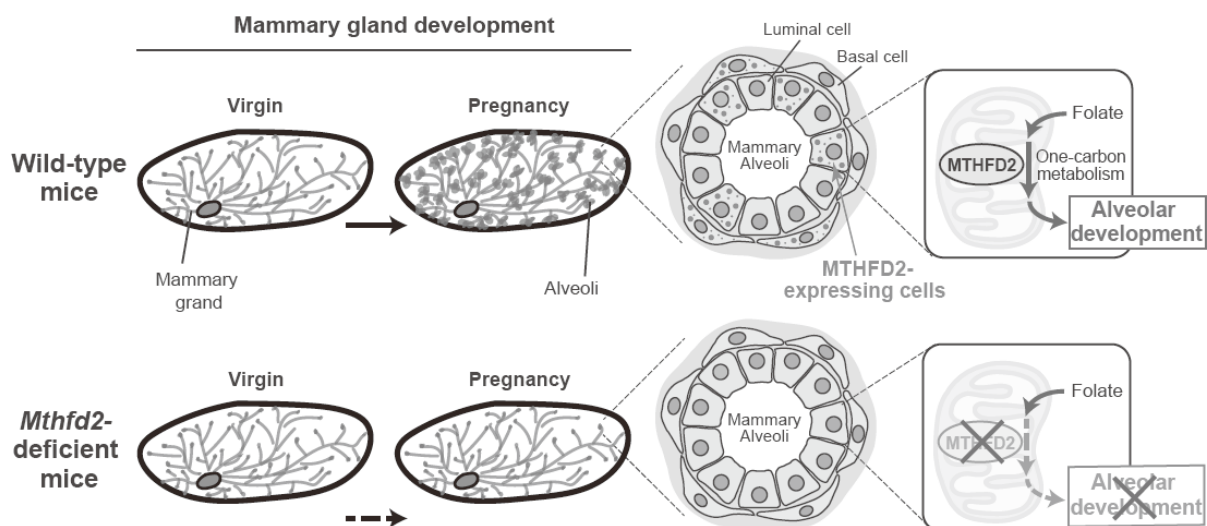
【 Abstract 】

1. Mitochondrial one-carbon metabolic enzyme MTHFD2 facilitates mammary gland development during pregnancy

Mitochondrial one-carbon metabolism is crucial for embryonic development and tumorigenesis, as it supplies one-carbon units necessary for nucleotide synthesis and rapid cell proliferation. However, its contribution to adult tissue homeostasis remains largely unknown. To examine its role in adult tissue homeostasis, we specifically investigated mammary gland development during pregnancy, as it involves heightened cell proliferation. We discovered that MTHFD2, a mitochondrial one-carbon metabolic enzyme, is expressed in both luminal and basal/myoepithelial cell layers, with upregulated expression during pregnancy. Using the mouse mammary tumor virus (MMTV)-Cre recombinase system, we generated mice with a specific mutation of *Mthfd2* in mammary epithelial cells. While the mutant mice were capable of properly nurturing their offspring, the pregnancy-induced expansion of mammary glands was significantly delayed. This indicates that MTHFD2 contributes to the rapid development of mammary glands during pregnancy. Our findings shed light on the role of mitochondrial one-carbon metabolism in facilitating rapid cell proliferation, even in the context of the adult tissue homeostasis.

2. FXYD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters

The heterogeneity of cancer stem cells (CSCs) within tumors presents a challenge in therapeutic targeting. To decipher the cellular plasticity that fuels phenotypic heterogeneity, we undertook single-cell transcriptomic analysis in triple-negative breast cancer (TNBC) to identify subpopulations in CSCs. We found a subpopulation of CSCs with ancestral features that is marked by FXYD domain-containing ion transport regulator 3 (FXYD3), a component of the Na^+/K^+ pump. Accordingly, FXYD3⁺ CSCs evolve and proliferate, while displaying traits of alveolar progenitors that are normally induced during pregnancy. Clinically, FXYD3⁺ CSCs were persistent during neoadjuvant chemotherapy, hence linking them to drug-tolerant persisters (DTPs) and identifying as crucial therapeutic targets. Importantly, FXYD3⁺ CSCs were sensitive to senolytic Na^+/K^+ pump inhibitors, such as cardiac glycosides. Together, our data indicate that FXYD3⁺ CSCs with ancestral features are drivers of plasticity and chemoresistance in TNBC. Targeting Na^+/K^+ pump could be a novel strategy to eliminate CSCs with ancestral and DTP features that could improve TNBC prognosis.



MTHFD2 は、乳腺 luminal cells と basal cells に発現し、妊娠時に乳腺組織の急激な発達に重要な役割を果たしている。

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

乳がん注目して新たなマウスがんモデルの作出と、患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC) のスフェロイド及びオルガノイド培養技術を工夫し、Patient-derived xenograft (PDX) モデルの構築とそのカタログ化を行ってきた。本学整形外科とも協力し、骨軟部腫瘍の PDX モデルの構築も行っている。

私どもが見出した乳がん再発の原因細胞となる膜タンパク質 FXYD3 を多く発現する祖先がん幹細胞は、いわゆる Drug tolerant persisters と同様の細胞である。古くから心不全治療に使われてきた心配糖体によって術前全身治療の感受性を高めることが明らかになった。今後、術前全身治療に心配糖体を加えた治療法の臨床試験実施を前提とし、外部資金獲得、前臨床試験を進めていく。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Li M, Nishimura T, Takeuchi Y, Hongu T, Wang Y, Shiokawa D, Wang K, Hirose H, Sasahara A, Yano M, Ishikawa S, Inokuchi M, Ota T, Tanabe M, Tada K-I, Akiyama T, Cheng X, Liu C-C, Yamashita T, Sugano S, Uchida Y, Chiba T, Asahara H, Nakagawa M, Sato S, Miyagi Y, Shimamura T, Nagai LAE, Kanai A, Katoh M, Nomura S, Nakato R, Suzuki S, Tojo A, Voon VC, Ogawa S, Okamoto K, Foukakis T, Gotoh N.: FXYD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters. *J Clin Invest*, 2023 Nov 15;133(22):e166666. doi: 10.1172/JCI166666.
2. Wang Y, Hongu T, Nishimura T, Takeuchi Y, Takano H, Daikoku T, Yao R, Gotoh N.: Mitochondrial one-carbon metabolic enzyme MTHFD2 facilitates mammary gland development during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*, 674, 183-189, 2023. On line publication 24 July 2023. DOI: 10.1016/j.bbrc.2023.06.074.

(共同研究)

3. 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 J-I, Itano N.: Tolerable glycometabolic stress boosts cancer cell resilience through altered N-glycosylation and Notch signaling activation. *Cell Death Dis*, in press.
4. Tanaka N, Okada H, Yamaguchi K, Seki M, Matsubara D, Goto N, Suzuki Y, Furukawa Y, Yamashita T, Inoue J-I, Kaneko S, Sakamoto T.: Mint3-depletion-induced energy stress sensitizes triple-negative breast cancer to chemotherapy via HSF1 inactivation. *Cell Death Dis*, in press.
5. Relvas CEM, Nakata A, Chen G, Beer DG, Gotoh N, Fujita A.: A model-based clustering algorithm with covariates adjustment and its application to lung cancer stratification. *Journal of Bioinform Comput Biol*. 2023 Aug;21(4):2350019. doi: 10.1142/S0219720023500191. Epub 2023 Sep 8.
6. Noguchi M, Kohno S, Pellattiero A, Machida Y, Shibata K, Shintani N, Kohno T, Gotoh N, Takahashi C, Hirao A, Scorrano L, Kasahara A.: Inhibition of the mitochondria-shaping

protein Opal restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma resistant cell line. *Cell Death Dis*, April 5;14(4), 241, 2023. DOI: 10.1038/s41419-023-05768-2.

7. Ishizaki T, Takeuchi Y, Ishibashi K, Gotoh N, Hirata E, Kuroda K.: Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. *Sci Rep*, Jan 2;13(1), 37, 2023. DOI: 10.1038/s41598-022-23913-3.

総説

1. Takeuchi Y and Gotoh N.: Inflammatory cytokines-enriched microenvironment plays key roles for the development of breast cancers. *Cancer Sci*, May, 114(5):1792-1799, 2023. Jan 26. DOI: 10.1111/cas.15734.
2. 「anti-apoptosis 経路」本宮綱記、後藤典子 単行本：がんゲノムペディア (羊土社), 2023.
3. 「がん遺伝子 ErbB と EGFR の発見は、がん治療に革命をもたらした」後藤典子 生体の科学 (公益財団法人金原一郎医学医療振興財団), vol. 74(4): 312-315, 2023.
4. 「がん細胞とがん関連線維芽細胞 CAF を用いた混合乳がんオルガノイド」竹内康人、後藤典子 医学のあゆみ (医歯薬出版株式会社)、vol. 286(7,8): 641-652, 2023.

<学会発表>

<国際学会、シンポジウム>

1. Noriko Gotoh: “FXVD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug tolerant persisters.” **AACR Annual Meeting 2023** 2023年4月14-19日 米国 フロリダ
2. Noriko Gotoh: “Heterogenous breast cancer stem cells sustain in primary and metastatic cancer stem cell niches” 第41回札幌がん国際シンポジウム 2023年10月14日 東京 招待講演
3. Noriko Gotoh: “FXVD3 functionally demarcates an ancestral cancer stem cell subpopulation with features of drug tolerant persisters” 第18回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2023年10月5日 東京 招待講演

<全国学会>

1. 後藤典子: “一炭素代謝酵素が制御する腫瘍免疫におけるポリアミン代謝” 第46回日本分子生物学会 シンポジウム 「ポリアミン研究の最前線」2023年12月8日 神戸 招待講演
2. 後藤典子: “FXVD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell

- subpopulation with features of drug-tolerant persisters” **第 46 回日本分子生物学会 シンポジウム** 「最先端テクノロジーを駆使した治療抵抗性がん微小環境の解明」
2023 年 12 月 6 日 神戸 シンポジウムオーガナイザー、講演
3. 後藤典子: “がん間質細胞 CAF 由来因子によるがん幹細胞の浸潤、骨転移” **日本患者由来がんモデル学会学術集会 2023 シンポジウム** 「がん三次元培養研究の新展開」2023 年 10 月 26 日 on line シンポジウムオーガナイザー、講演
 4. 後藤典子: “Heterogenous breast cancer stem cells sustain in primary and metastatic cancer stem cell niches” **第 41 回札幌がん国際シンポジウム** 2023 年 10 月 14 日 東京 招待講演
 5. 後藤典子: “FXVD3 functionally demarcates an ancestral cancer stem cell subpopulation with features of drug tolerant persisters” **第 18 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム** 2023 年 10 月 5 日 東京 招待講演
 6. 後藤典子: “Breast tumor microenvironment regulated by mitochondrial one-carbon metabolism”
第 82 回日本癌学会学術集会 Symposia on Specific Tumors “Frontiers of Breast and Ovarian Cancers” 2023 年 9 月 23 日 横浜 招待講演
 7. 後藤典子: **第 27 回日本がん分子標的治療学会 女性科学者シンポジウム** 2023 年 6 月 21 日 佐賀 座長、オーガナイザー
 8. 後藤典子: “One carbon 代謝と肺転移” **第 9 回がんと代謝研究会** 2023 年 6 月 1 日 愛媛県松山市 招待講演
 9. 後藤典子: “乳がん幹細胞とその治療戦略” **第 31 回日本医学会総会 Late Breaking Session** 2023 年 4 月 22 日 東京 招待講演
 10. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、柏村里沙、矢野正雄、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、堀江公仁子、井上聡、岡本康司、東條有伸、後藤典子: “CAF 由来の顆粒球コロニー刺激因子 GCSF は、トリプルネガティブ乳がんの腫瘍形成と転移を開始する” **第 13 回シグナルネットワーク研究会** 2023 年 11 月 24-25 日 金沢 口演
 11. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、柏村里沙、矢野正雄、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、堀江公仁子、井上聡、岡本康司、東條有伸、後藤典子: “CAF 由来の顆粒球コロニー刺激因子 GCSF は、トリプルネガティブ乳がんの腫瘍形成と転移を開始する” **第 82 回日本癌学会** 2023 年 9 月 21-23 日 横浜 口演
 12. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、柏村里沙、矢野正雄、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、堀江公仁子、井上聡、岡本康司、東條有伸、後藤典子: “がん関連線維芽細胞由来の顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)は、乳がんの増殖と骨転移に寄与する” **第 43 回日本分子腫瘍マーカー研究会** 2023 年 9 月 20 日 横浜

口演

優秀演題賞受賞

13. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、柏村里沙、矢野正雄、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、堀江公仁子、井上聡、岡本康司、東條有伸、後藤典子：“がん関連線維芽細胞由来の顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)は、乳がんの増殖と骨転移に寄与する” **第 27 回日本がん分子標的治療学会** 2023 年 6 月 21-23 日 佐賀
14. Yasuto Takeuchi、Noriko Gotoh : The membrane-linked adaptor FRS2beta fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. **第 20 回幹細胞シンポジウム** 2023 年 5 月 19-20 日 淡路島 招待講演
15. 本宮綱記、後藤典子、Thordur Oskarsson “乳がん転移ニッチにおけるアンジオクラインの役割とその制御” **第 13 回 シグナルネットワーク研究会** 2023 年 11 月 24 – 25 日 金沢 口演
16. Tsunaki Hongu、Hirokazu Kusunoki、Tatsunori Nishimura、Asako Sasahara、Masao Yano、Satoko Ishikawa、Masafumi Inokuchi、Tetsuo Ota、Masahiko Tanabe、Kei-ichiro Tada、Tomoe Nakagawa、Sumio Sugano、Masahiro Nakagawa、Yutaka Suzuki、Seishi Ogawa、Noriko Gotoh. “Mutation analysis of breast cancer stem cell population at a single-cell level” **第 82 回 日本癌学会** 2023 年 9 月 21 日-23 日 横浜
17. 本宮綱記、楠木啓主、Yuming Wang、西村建徳、竹内康人、後藤典子 “乳がん細胞はミトコンドリア内 1 炭素代謝酵素 MTHFD1L を用いて肺転移を起こす” **第 33 回日本サイトメトリー学会学術集会** 2023 年 7 月 22 日-23 日 オンライン 口演
18. 本宮綱記、Pein Maren、Insua-Rodriguez Jacob、Meier Jasmin、Decker Kristin、Descot Arnaud、Trumpp Andreas、Riedel Angela、後藤 典子、Oskarsson Thordur “テネイン C はマクロファージと肺血管内皮細胞の連続的な活性化を介して肺血管性転移ニッチ形成を誘導する” **第 32 回 日本がん転移学会学術集会・総会** 2023 年 7 月 20 日-21 日 仙台 **ポスター賞受賞**
19. 本宮綱記、楠木啓主、西村建徳、竹内康人、後藤典子 “乳がん細胞はミトコンドリア内 1 炭素代謝酵素 MTHFD1L を用いて肺転移を起こす” **第 9 回 がん代謝研究会** 2023 年 5 月 31 日-6 月 1 日 松山
20. 本宮綱記、Pein Maren、Insua-Rodriguez Jacob、Meier Jasmin、Decker Kristin、Descot Arnaud、Trumpp Andreas、Riedel Angela、後藤 典子、Oskarsson Thordur “乳癌肺転移における血管性ニッチの役割とその制御” **日本薬学会第 143 年会** 2023 年 3 月 25 日-28 日 札幌 シンポジウム 招待講演
21. 楠木啓主、本宮綱記、西村建徳、竹内康人、後藤典子 “乳がん細胞はミトコンドリア内 1 炭素代謝酵素 MTHFD1L を用いて肺転移を起こす” **第 27 回日本がん分子標的治療学会** 2023 年 6 月 21-23 日 佐賀
22. 楠木啓主、本宮綱記、西村建徳、竹内康人、岡本康司、後藤典子 “乳がん細胞はミトコ

ンドリア内 1 炭素代謝酵素 MTHFD1L を用いて肺転移を起こす” 第 82 回 日本癌学会 2023 年 9 月 21 日-23 日 横浜

23. Yuming Wang, Tsunaki Hongu, Tatsunori Nishimura, Takiko Daikoku, Ryoji Yao, Satoshi Kojo, Hiroshi Watarai, Tomoyoshi Soga, Noriko Gotoh: “A mitochondrial one-carbon enzyme MTHFD2 promotes breast cancer tumorigenesis and lung metastasis” 第 82 回 日本癌学会 2023 年 9 月 21 日-23 日 横浜
24. Masahiro Yamazaki, Mengjiao Li, Tatsunori Nishimura, Shigeyuki Takamatsu, Toshifumi Gabata, Masaya Ueno, Atsushi Hirao, Susumu Kohno, Chiaki Takahashi, Kuniko Horie, Kazuhiro Ikeda, Satoshi Inoue, Noriko Gotoh: “ Targeting FXYD3 positive cancer stem cells in radio-resistance” 第 82 回 日本癌学会 2023 年 9 月 21 日-23 日 横浜 口演
25. Sarenqiqige, Tsunaki Hongu, Sakai Katsuya, Neval Yilmaz, Kunio Matsumoto, Mikihiro Shibata, Noriko Gotoh: “High flexible Kinase domain of recombinant FGFR 1 observed by High Speed-Atomic Force Microscope (HS-AFM)” 第 82 回 日本癌学会 2023 年 9 月 21 日-23 日 横浜

<研究会主催>

後藤典子:第 13 回シグナルネットワーク研究会 2023 年 11 月 24-25 日 金沢市 実行委員長

<外部資金>

1. 後藤典子, AMED 創薬支援推進事業・創薬総合支援事業, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 12,820 千円
2. 後藤典子, 挑戦的研究(萌芽), 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 3,000 千円
3. 後藤典子, 基盤研究 B (一般), 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 3,200 千円
4. 後藤典子, 挑戦的研究(開拓), 2023.4.1-2024.3.31, 分担, 200 千円
5. 後藤典子, 上原記念研究助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 5,000 千円
6. 後藤典子, 武田科学ビジョナリーリサーチ助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 2,000 千円
7. 竹内康人, 若手研究, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 686,246 円
8. 竹内康人, 基盤研究 B (一般), 2023.4.1-2024.3.31, 分担, 100 千円
9. 竹内康人, 挑戦的研究(萌芽), 2022.4.1-2023.3.31, 分担, 100 千円
10. 本宮綱記, 研究活動スタート支援, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 1,100,262 円
11. 本宮綱記, 基盤研究 C, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 1,300 千円
12. 本宮綱記, アステラス病態代謝研究助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 1,881,340 円
13. 本宮綱記, 高松宮妃癌助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, 2,000 千円

- | | |
|--|----------|
| 14. 本宮綱記, ライフサイエンス研究助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, | 1,000 千円 |
| 15. 本宮綱記, 武田科学振興財団助成金, 2023.4.1-2024.3.31, 代表, | 2,000 千円 |
| 16. 本宮綱記, 北國がん基金助成金, 2023.10.1-2024.3.31, 代表, | 1,000 千円 |

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

Visiting Professor Nicholas Barker (シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員)
Associate Professor Kazuhiro Murakami 村上 和弘
Assistant Kenji Kita 北 賢二 (共同研究拠点)

【 Abstract 】

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

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

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

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

<2023 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

1. 胃幹細胞を維持する分子機構の解明

Wnt シグナルの下流因子である転写因子 Sox9 が胃正常幹細胞の維持および胃癌幹細胞の悪性化に必須であることが明らかとなった。Sox9 は胃正常幹細胞の増殖抑制を導く一方，胃癌幹細胞の悪性化を導いた。この差は，がん抑制遺伝子 *p53* の変異状況に依存していた。さらに，Sox9 下流で働く新規胃癌悪性化因子の同定に成功した。現在、これらの因子が胃癌悪性化を導く詳細な分子機構を解析している。

2. 胃癌細胞の幹細胞化を制御する機構の解明

胃癌モデルマウスにおいて *Lgr5* 遺伝子を発現する胃癌幹細胞を人為的かつ一過的に除去することで、効果的に胃癌の転移を抑制できた。一方で、それらのマウスで胃癌細胞が幹細胞化することによる胃癌の再発が確認された。胃癌幹細胞の再出現を制御する機構を明らかにするために、慢性炎症を伴い発生した悪性度の高いマウス胃癌オルガノイドを用いて、細胞解離により Akt パスウェイを介して Wnt パスウェイが活性化されることで、幹細胞化が誘導されることが明らかとなった。また、この過程は、*p53* 遺伝子とその下流の *Phlda3* 遺伝子により抑制されることが明らかになった。この結果は、第 41 回札幌国際がんシンポジウムにおいて発表された。

3. 新規びまん性胃癌マウスモデルの開発

多くのびまん性胃癌で *RhoA* 遺伝子の変異がみられる。理化学研究所 生体モデル開発チームの清成寛チームリーダーらと共同で、変異型 RhoA を発現する新規マウスを作成した。これらのマウスを *Cldn18-CreERT2/Cdh1 cKO/ p53cKO* マウスと交配し、得られたマウスにタモキシフェンを投与し、胃のみで変異型 RhoA の誘導および *Cdh1* と *p53* のノックアウトを誘導し、生じたびまん性胃癌が転移するかどうかの検証を行なっている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

(共同研究)

1. Morita A, Nakayama M, Wang D, Murakami K, Oshima M. Frequent loss of metastatic ability in subclones of Apc, Kras, Tgfr2, and Trp53 mutant intestinal tumor organoids, *Cancer Sci.*, 114(4):1437-1450, 2023.

< 学会発表 >

村上和弘;

1. The 41st Sapporo International Cancer Symposium 「p53-Phlda3 Axis Restrains Gastric Cancer Cell Plasticity by Blocking the PI3K-Akt Pathway」 2023 年 10 月 11-14 日 東京 日本
2. The 17st Anniversary India-Japan Fest BICON 2022-2023 「A Genome-Scale CRISPR screen reveals novel factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells」 2023 年 1 月 21-25 日 Jaipur, India

< 外部資金 >

1. 基盤研究(C)[研究代表者：村上 和弘]
「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」130 万円

がん幹細胞研究プログラム

Division of Molecular Genetics

遺伝子・染色体構築研究分野

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

【 Abstract 】

Nutrients undergo conversion into smaller molecules within the body, serving as crucial components for both anabolic and catabolic metabolic reactions. The coordinated regulation of these processes is paramount for sustaining life. Our group is committed to pioneering innovative therapeutics for malignant brain tumors and myeloid leukemias. We aim to achieve this by identifying nutrient metabolic pathways that characterize malignancy, focusing on the transcription factor families FOXO and MiT/TFE, critical in governing autophagy and lysosomal biogenesis.

Utilizing gene expression profiling and differentiation marker-based CRISPR/Cas9 screening, we identified TRIB1 as a functional FOXO downstream gene crucial for maintaining an undifferentiated status in acute myeloid leukemia (AML). We designed a DNA-binding pharmacological inhibitor using pyrrole-imidazole polyamides (PIPs), specifically binding to the FOXO-responsive element (FRE) in the TRIB1 promoter. Treatment with FRE-PIPs inhibited leukemia progression, promoting cell differentiation without notable adverse effects, presenting a promising therapeutic strategy (Kurayoshi K., *Cell Death Dis.* 2023, **Figure**).

Recent investigations highlight the pivotal role of metabolic organelles, such as mitochondria, in cancer development and malignant progression (Noguchi M., *Cell Death Dis.* 2023). We found that lysosomal activity emerges as a metabolic biomarker of tumorigenesis, influencing therapeutic efficacy in glioblastoma (GBM). Mechanistic studies revealed the TFE-lysosome axis as a regulator of metabolic status, contributing to the malignant signature and tolerance to temozolomide (TMZ) in GBM. Our findings identified a critical amino acid central to preserving lysosomal membrane integrity, protecting GBM cells from lysosomal damage. We successfully developed a novel lysosome-targeting therapeutic strategy by manipulating the amino acid balance in GBM cell (Jing W., *submitted*).

In addition, for the advancement of diagnosing and treating age-related diseases, several projects are currently underway. (1) Identification of biomarkers for aging: Conducting metabolomic analyses on biological samples from middle-aged and older adults to identify biomarkers of aging. (2) Establishing new analysis methods for NAD⁺ metabolism. (3) Research on the immune response of hematopoietic stem cells during aging. Through these comprehensive research initiatives, our goal is to contribute significantly to the establishment of a healthier society.

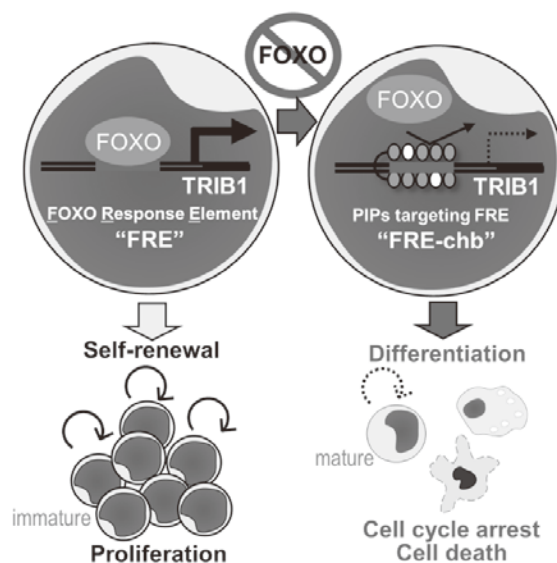
<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

様々な生体活動において、タンパク質、糖、脂質、ビタミン、ミネラル等の栄養素の摂取およびその代謝調節は極めて重要な役割を果たす。我々は、このような栄養代謝調節の観点から幹細胞の動態およびがんの悪性化制御機構を理解したいと考え、研究を進めている。特に、転写因子 FOXO, MiT/TFE ファミリーなど、オートファジーおよびリソソーム経路における重要な分子を同定することにより、悪性脳腫瘍や骨髄性白血病に対する革新的な治療法の開発を進めている。

本年は、遺伝子発現プロファイリングと分化マーカーに基づく CRISPR/Cas9 スクリーニングを利用し、未分化状態を維持するのに重要な機能的 FOXO 下流遺伝子として TRIB1 を同定した。TRIB1 プロモーター中の FOXO 応答性エレメント (FRE) を同定し、さらに特異的に結合する DNA 結合阻害剤 (pyrrole-imidazole polyamides : PIP) を作製した。FRE-PIP による治療は腫瘍の進行を抑制し、顕著な副作用なしに細胞の分化を誘導するなど、有望な治療戦略であることを示した (Kurayoshi K., *Cell Death Dis.* 2023) (図)。

最近の研究で、がんの発生と悪性化における細胞小器官の役割が解明されつつある (Noguchi M., *Cell Death Dis.* 2023)。私たちは、悪性膠芽腫 (GBM) におけるリソソーム活性は、腫瘍形成の代謝バイオマーカーであること、転写因子 TFE が悪性形質を司る代謝制御因子であり、テモゾロミド (TMZ) に対する耐性にも寄与していることを見いだした。さらに、リソソーム障害から守るために重要な役割を果たすアミノ酸を同定した。本研究により、アミノ酸バランスを操作することは新規治療法開発に有用なアプローチであることを明らかにした (投稿中)。

上記に加えて、加齢随伴疾患の診断・治療開発のため、①一般の中高年の生体試料に含まれる代謝産物 (低分子化合物) をメタボローム技術にて解析し、老化バイオマーカーの同定する、②慢性炎症を伴う老化表現型に深く関わる NAD⁺代謝の新規解析法の確立と臨床的意義の理解を通して、加齢に伴う代謝異常の診断法の開発と社会実装を進める、③造血幹細胞の老化における免疫反応に関する研究を進めるなどのプロジェクトを実施している。これらの研究を通して、老化の予防、診断、介入の観点から、健康社会の形成に貢献することを目標としている。



Critical roles of FOXO in leukemia stem cells

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(分野主体)

1. Kurayoshi K, Takase Y, Ueno M, Ohta K, Fuse K, Ikeda S, Watanabe T, Nishida Y, Horike SI, Hosomichi K, Ishikawa Y, Tadokoro Y, Kobayashi M, Kasahara A, Jing Y, Shoulkamy MI, Meguro-Horike M, Kojima K, Kiyoi H, Sugiyama H, Nagase H, Tajima A, Hirao A. Targeting cis-regulatory elements of FOXO family is a novel therapeutic strategy for induction of leukemia cell differentiation. *Cell Death Dis.* 2023,14(9):642.
2. Noguchi M, Kohno S, Pellattiero A, Machida Y, Shibata K, Shintani N, Kohno T, Gotoh N, Takahashi C, Hirao A, Scorrano L, Kasahara A. Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma resistant cell line. *Cell Death Dis.* 2023, 14(4):241.

(共同研究)

3. Nomura M, Ohuchi M, Sakamoto Y, Kudo K, Yaku K, Soga T, Sugiura Y, Morita M, Hayashi K, Miyahara S, Sato T, Yamashita Y, Ito S, Kikuchi N, Sato I, Saito R, Yaegashi N, Fukuhara T, Yamada H, Shima H, Nakayama KI, Hirao A, Kawasaki K, Arai Y, Akamatsu S, Tanuma SI, Sato T, Nakagawa T, Tanuma N. Niacin restriction with NAMPT-inhibition is synthetic lethal to neuroendocrine carcinoma. *Nat Commun.* 2023, 14:8095.
4. Arakawa H, Nakazono Y, Matsuoka N, Hayashi M, Shirasaka Y, Hirao A, Tamai I. Induction of open-form bile canaliculus formation by hepatocytes for evaluation of biliary drug excretion. *Commun Biol.* 2023, 6(1):866.
5. Tamai S, Ichinose T, Jiapaer S, Hirai N, Sabit H, Tanaka S, Kinoshita M, Kobayashi M, Hirao A, Nakada M. Therapeutic potential of pentamidine for glioma-initiating cells and glioma cells through multimodal antitumor effects. *Cancer Sci.* 2023,114(7):2920-2930.
6. Fukasawa K, Lyu J, Kubo T, Tanaka Y, Suzuki A, Horie T, Tomizawa A, Osumi R, Iwahashi S, Tokumura K, Murata M, Kobayashi M, Todo T, Hirao A, Hinoi E. MEK5-ERK5 Axis Promotes Self-renewal and Tumorigenicity of Glioma Stem Cells. *Cancer Res Commun.* 2023, 3(1):148-159.

< 学会発表 >

1. Hirao A: Cell fate determination by diet and immune system in hematopoiesis. 2023 Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies Symposium. 2023年2月22日, ハワイ
2. Hirao A: Cell fate decision by metabolic regulation in normal and malignant hematopoiesis Korea-Japan Blood and Vessel Symposium 2023年7月11日, 熊本

3. Hirao A: Metabolic Organelle Dynamics on Cell Fate Determination. India – Japan Cancer Symposium, 2023 年 7 月 25 日, 金沢
4. Tadokoro Y, Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell aging by adaptive immunity. 第 20 回幹細胞シンポジウム, 2023 年 5 月 19 日, 淡路島
5. 田所優子: 造血幹細胞競合のシステム変容と造血老化, 学術変革領域研究 (A)「競争的コミュニケーションから迫る多細胞生命システムの自律性」第 3 回 領域班会議, 2023 年 9 月 8 日, 博多
6. 田所優子: 造血幹細胞エイジング制御機構の理解とその破綻による慢性炎症疾患誘導機構の解明, AMED-JST 合同キックオフ会議, 2023 年 11 月 19 日, WEB 開催
7. 上野 将也, 平尾 敦: リソソーム活性に依存した白血病分化制御機構の解明と新規治療法の開発, 第 27 回 造血器腫瘍研究会, 2023 年 1 月 19 日 (木)・20 日, 広島
8. 上野 将也, 倉吉 健太, 平尾 敦: 白血病細胞はリソソームが制御するクロマチンリモデリングにより分化から回避している第 9 回 がん代謝研究会, 2023 年 5 月 31 日-年 6 月 1 日, 愛媛
9. Ueno M, Kurayoshi K, Pham LT, Hirao A: Lysosomes suppress leukemia cell differentiation via chromatin remodeling, 第 85 回日本血液学会学術総会, 2023 年 10 月 13 日-15 日, 東京
10. Ueno M, Kurayoshi K, Pham LT, Hirao A: Lysosomes suppress leukemia cell differentiation via chromatin remodeling, 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年 9 月 21 日-23 日, 神奈川
11. Kobayashi M, Jing Y, Hirao A: Tumor microenvironment factor regulates malignant properties through transcription networks in glioblastoma, 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年 9 月 21 日-9 月 23 日, 横浜
12. Jing Y, Kobayashi M, Hirao A: Therapeutic advantage of targeting lysosome as signaling hub for metabolic conditions in malignant gliomas, American Association for Cancer Research Annual Meeting 2023; 2023 Apr 14-19; Orlando, USA.

<特許出願>

特願 2023-120148 FOXO 阻害剤, 及び医薬組成物

国立大学法人金沢大学, 学校法人順天堂 (2023 年 7 月 24 日)

<外部資金>

1. 平尾敦: 基盤研究 (B) R5~R7 年度「代謝調節によるがんステムネス制御の分子基盤」5,400 千円
2. 平尾敦: 挑戦的研究 (萌芽) R5~R6 年度「造血幹細胞老化制御機構の解明と介入法の開発」2,000 千円
3. 平尾敦: 次世代がん医療加速化研究事業 R4~R5 年度「悪性化に伴う栄養代謝制御を標的とした革新的がん創薬に関する研究開発」33,000 千円

4. 平尾敦 : R5 年度学際領域展開ハブ形成プログラム「加齢に伴う代謝・免疫調節機構の解明と介入法の開発」 800 千円
5. 田所優子 : 基盤研究 (C) R4~R6 年度「加齢に伴う造血幹細胞ニッチ変容の解明」 1,100 千円
6. 田所優子 : 学術変革領域研究 (A) R4~R5 年度「造血の加齢変化における幹細胞競合パラドックスの解明」 4,300 千円
7. 田所優子 : 日本血液学会 2023 年度研究助成「免疫環境による造血制御機構の解明」 1,000 千円
8. 田所優子 : 金沢大学戦略的研究経費 先魁プロジェクト 2022 (分担) R4~R5 年度「先進的な健康長寿延伸医療の開発を目指した老化メカニズムの解明」 1,500 千円
9. 田所優子 : AMED-PRIME, R5~R8 年度「造血幹細胞エイジング制御機構の理解とその破綻による慢性炎症疾患誘導機構の解明」 7,000 千円
10. 小林昌彦 : 基盤研究 (C) R5~R7 年度「組織環境を介した可塑性によって規定される治療抵抗性の分子基盤」 1,300 千円
11. 上野将也 : 基盤研究 (C) R5~R7 年度「がんの悪性形質獲得におけるがん特異的ニコチンアミド代謝経路の機能解析」 1,820 千円
12. 倉吉健太 : 基盤研究 (C) R5~7 年度「リソソーム-鉄経路が規定する白血病幹細胞特異的な遺伝子発現制御機構の特定」 1,200 千円
13. Jing Yongwei : 若手研究 R5~6 年度「リソソームによる膠芽腫悪性化の制御機構」 1,800 千円

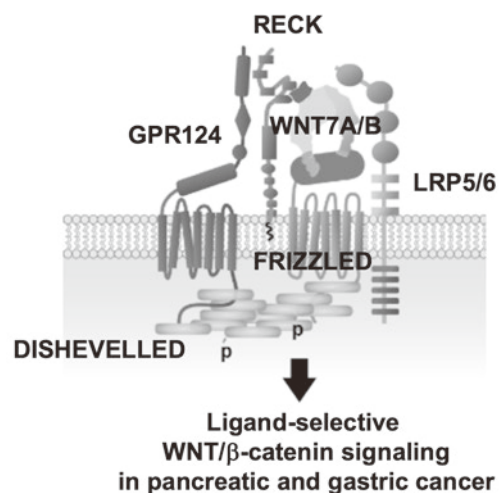
Division of Oncology and Molecular Biology

腫瘍分子生物学研究分野

| | |
|----------------------|---|
| Professor | Chiaki Takahashi 高橋 智聡 |
| Assistant Professors | Susumu Kohno 河野 晋 Santosh Kumar Gothwal (新学術創成研究機構) Nakayama Joji 中山 淨二 |
| Graduate Students | Yu Hai 余 海, Gong Linxiang 龔 麟祥, Zhang Yuanyuan 張 園園, Zhang Zixue 張 子雪 (~2022.3.31) , Yu Jinghui 于 靖暉 (~2022.3.31) , Renata Akhmetzianova, Quan Ruifang 權 瑞方 (~2022.9.30) , Yu Peifu 于 沛夫, Nada Hamdy Mohamed Hussein, Yao Ziheng 姚 子衡 , Pan Junjian 潘 俊堅 , Sarah Momtazkari, Tu Hongxin 塗 宏鑫 (2023.4.1~) , Gao Keqi 高 科奇 (2023.4.1~) , Lu Tong 盧 彤 (2023.10.1~) , HUANG YAO 黄 堯 (2023.10.1~) |
| Technical Assistant | Naoko Nagatani 永谷 直子 |

【 Abstract 】

We obtained rationales to expand the usage of CDK4/6 inhibitors to KRAS PDAC in which RB1 is prevalently intact. We found CDK4/6 or CDK2/4/6 inhibitors induce SASP-high senescence in an RTK-dependent manner however KRAS inhibitors induce SASP-low although both promotes RB1 under-phosphorylation with a similar kinetics. We assessed the influence of STK11/LKB1 and KEAP1 status on the sensitivity by which RB1-intact KRAS LUAD respond to a KRAS inhibitor AMG510. We explored number of promising therapeutic targets in RB1-inactive tumors including centrosomal mitotic kinases including AURKA, fatty acid elongation enzymes including ELOVL6 and a novel mitochondrial cholesterol-binding protein. We clarified the mechanism whereby mammary epithelial cells resist to carcinogenesis caused by RB1 deficiency. In collaboration with Jikei University School of Medicine, we identified a considerable percentage of RB1-SUCLA2-deleted



cases in Japanese advanced PC patients. We are developing a diagnostic kit using ctDNA in blood. 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone (Thymoquinone; TQ) had appeared to exhibit therapeutic effects on SUCLA2-negative PC. We identified four enzymes that bind to TQ, and so far, detected that two of them are indeed inhibited by TQ. We will newly develop inhibitors to one of these enzymes aiming to treat SUCLA2-deficient tumors. RECK appeared to cooperate with GPR124 to regulate the ligand selective WNT signaling in PDAC and GC (Figure). RECK was found to be downregulated in CAFs trained by neighboring BC cells. Loss of RECK in CAF seems to support the malignant progression of BC through MMPs and exosomes. We are investigating a metabolic gene involved in BC metastasis using a Zebrafish gastrulation system.

<2023 年の成果、進行状況と今後の計画・展望>

CDK4/6 阻害剤を KRAS 膵臓がんに適応拡大するラショナルレを探索した。CDK4/6 ないし CDK2/4/6 阻害剤と KRAS 阻害剤によって同様のキネティクスで RB1 無リン酸化状態と細胞老化が誘導されたが 随伴する SASP の様態が全く異なることがわかった。KRAS 肺がんの KRAS^{G12C} 阻害剤 AMG510 への感受性発揮において STK11/LKB1 と KEAP1 の同時欠失が与える影響を腫瘍微小環境も含め検討した。RB1 不活性化がん克服のため、AURKA を含むセントロソーム M 期キナーゼ群、ELOVL6 を含む脂質酸伸長酵素群等の治療標的としての有効性を検討した。RB1 依存的な細胞分化に関わる新規 cholesterol 標的蛋白質の機能を探索した。正常乳腺上皮が RB1 不活性化による発がんに抵抗する機序を明らかにした。進行前立腺がんにおいて RB1-SUCLA2 染色体領域の広範な欠失が起こること、および、2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone (Thymoquinone; TQ)がこのタイプの患者に有効である可能性を報告している。この化合物に結合する代謝酵素 4 種を同定、うち 2 種が TQ による活性阻害を受けることを見出した。今後 TQ 結合蛋白質に対する新規阻害剤の開発を展開する。東京慈恵会医科大学泌尿器科との共同研究により進行前立腺がん患者血中 ctDNA による SUCLA2 欠失迅速診断キットの開発を行った。RECK と GPR124 の結合が膵臓がんおよび胃がんの WNT シグナルを制御するメカニズムを探索した (図)。乳がん CAF における RECK の発現が同がん腫の挙動に与える影響も検討した。ゼブラフィッシュ系を用い乳がん転移に関わる代謝酵素を発見、この阻害剤の開発につながる POC の蓄積を目指す。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

1. Okada N, Ueki C, Shimazaki M, Tsujimoto G, Kohno S, Muranaka H, Yoshikawa K and Takahashi C. NFYA promotes the malignant behavior of triple-negative breast cancer through the regulation of lipid metabolism. *Commun Biol.*, 6(1):596, 2023. doi: 10.1038/s42003-023-04987-9

(共同研究)

1. Noguchi M, Kohno S, Pellattiero A, Machida Y, Shibata K, Shintani N, Kohno T, Gotoh N, Takahashi C, Hirao A, Kasahara A, and Scorrano L. Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma resistant cell. *Cell Death & Disease.*, 14(4):241, 2023. doi: 10.1038/s41419-023-05768-2
2. Noyes C, Kitajima S, Li F, Suita Y, Miriyala S, Isaac S, Ahsan N, Knelson E, Vajdi A, Tani T, Thai TC, Xu D, Murai J, Tapinos N, Takahashi C, Barbie DA and Yajima M. The germline factor DDX4 contributes to the chemoresistance of small cell lung cancer cells. *Commun. Biol.*, 6(1):65., 2023. doi: 10.1038/s42003-023-04444-7
3. Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara S, Ravnskjaer K, Horike S, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, and Inoue H. The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice. *Nat. Commun.*, 14(1):167, 2023. doi: 10.1038/s41467-023-35804-w
4. Ma M, Wu M, Gu S, Yang J, Wang C, Zhang Y, Cheng S, Xu S, Zhang M, Wu Y, Zhao Y, Tian X, Takahashi C, Sheng J, and Wang Y. Inactivation of CSGALNACT2 Promotes Ovarian Cancer Migration and Invasion Through the MAPK/ERK Signaling Pathway. *Cellular Oncol.*, 2023. (accepted)

(著書・総説)

1. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「がんの100年来の謎に絶対定量で迫る」 Vol.41 No.8 p1301-1302, 2023 早野 元詞, 寺尾 知可史 編, 羊土社刊

<学会発表>

1. 高橋智聡. 新学術創成研究機構ワークショップ「生体恒常性維持を担う生理機能研究の最先端の知見とその解析技術の融合へ向けて」, 2023年2月20日(金沢市/金沢大学宝町キャンパス 口頭)
2. 張園園. PDAC resists to CDK inhibition therapy through cellular senescence depending on EGFR signaling. 第5回がんと代謝研究会・若手の会, 2023年4月26日(金沢市/金沢大学がん進展制御研究所 4/26-27 口頭)
3. 龔麟祥. RB loss induces quiescent state in MCF10A cells through RAS inactivation. 第5回がんと代謝研究会・若手の会, 2023年4月26日(金沢市/金沢大学がん進展制御研究所 4/26-27 口頭)
4. Okahashi N, Shima T, Kondo Y, Araki C, Tsuji S, Sawai A, Uehara H, Kohno S, Shimizu H, Takahashi C, and Matsuda F. ¹³C-metabolic flux analysis and flux balance analysis indicates the role of aerobic glycolysis in cultured cancer cell as ATP supply avoiding excess heat generation. Metabolic Engineering Conference, 2023年6月13日(Singapore/Marina Bay Sands 6/11-15 口頭)
5. Zhang Y, Gothwal KS, Kohno S and Takahashi C. The mechanism whereby PDAC resists to CDK inhibition. 第82回日本癌学会学術総会, 2023年9月21日(横浜市/パシフィコ横浜 9/21-23 口頭)
6. 河野晋, 高橋智聡. 2-OG代謝を標的としたRB-SUCLA2欠失前立腺がん治療法の確立. 第82回日本癌学会学術総会, 2023年9月21日(横浜市/パシフィコ横浜 9/21-23 口頭)
7. 上原将大, 竹中哲, 堂本貴寛, 堀家慎一, 高橋智聡, 宮下知治, 源利成. ゲムシタビン耐性腺がんにおける Cyclin D2 の過剰発現と治療標的としての可能性. 第82回日本癌学会学術総会, 2023年9月21日(横浜市/パシフィコ横浜 9/21-23 ポスター)
8. Yamazaki M, Li M, Nishimura T, Takamatsu S, Gabata T, Ueno M, Hirao A, Kohno S, Takahashi C, Horie K, Ikeda K, Inoue S, Gotoh N. Targeting FXYD3 positive cancer stem cells in radio-resistance. 第82回日本癌学会学術総会, 2023年9月22日(横浜市/パシフィコ横浜 9/21-23 ポスター)
9. Momtazkari S, Koo JK, Choudhury AD, Le TD, Tan TZ, Mori S, Hazawa M, Wong RW, Harada K, Takahashi C, Ito Y, Voon DC. RUNX3 and p53 act cooperatively to induce S100A2 in gastric epithelial cells in response to DNA damage. 第82回日本癌学会学術総会, 2023年9月23日(横浜市/パシフィコ横浜 9/21-23 ポスター)
10. Nakayama J. Zebrafish embryo screen utilizing gastrulation identifies anti-metastasis

- drugs. 第 18 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム, 2023 年 10 月 6 日 (東京都/東京医科歯科大学 10/5-6 ポスター)
11. Kamel W, Chen Y, Sada A, Tabata Y, Sakaguchi Y, Tajima T, Takahashi C and Ohki R. Induction of an Undifferentiated State in Medullary Thyroid Carcinoma through Dual Inactivation of Rb-PHLDA3 in Parafollicular C Cells. 10th International MDM2 Workshop, 2023 年 10 月 15 日 (東京都中央区/国立がん研究センター 研究所 10/15-18 ポスター)
 12. 高橋智聡. 膵がんの CDK 阻害剤耐性発現機構. 第 61 回日本癌治療学会学術集会, 2023 年 10 月 21 日 (横浜市/パシフィコ横浜 10/19-21 口頭)
 13. Takahashi C. Targeting RB1 status in cancer. Gynecologic Oncology Symposium, 2023 年 11 月 1 日 (中国上海市/Shanghai First Maternity and Infant Hospital)
 14. 高橋智聡. KRAS 阻害剤の基礎. 日本放射線腫瘍学会第 36 回学術大会, 2023 年 12 月 1 日 (横浜市/パシフィコ横浜 11/30-12/2 口頭 招待)

<外部資金> (2023 年度/ R5 年度が含まれる課題)

高橋智聡

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (B) R2~R5 年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」(代表) 3,300 千円
2. 2023. Cancer Council SA Beat Cancer Project Research Project Grant App ID: 2018775. (Australia)
A novel model to investigate the role of high fat diet in breast cancer predisposition. (分担)
CIs: S Kumar, L Dorstyn, C Takahashi. AU\$75,000 (総額)

Santosh Kumar Gothwal

1. 科学研究費補助金 若手研究 R3~R5 年度「Different roles of C/EBP-alpha in chromosome conformation during lung injury of young and old mice.」(代表) 800 千円

中山 淨二

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) R3~R5 年度「乳がん細胞内の HSD11β1 によるホルモン生産が転移を亢進する分子機構の解明」(代表) 700 千円
2. 高橋産業経済研究財団助成金 R5 年度「乳がん細胞のホルモン自立産生機構を標的とした治療戦略の開発」(代表) 2,000 千円

Division of Cancer and Senescence Biology

がん・老化生物学研究分野

| | |
|------------------------|--|
| Professor | Yoshikazu Johmura 城村由和 |
| Associate Professor | Tomohisa Baba 馬場智久 |
| Assistant Professor | Yasuhiro Nakano 中野泰博 |
| Technical Assistant | Yoshie Jomen 定免由枝 |
| Graduate Students | Borui Lee 李博睿(D1)、Zixue Zhang 張子雪(D1)、 Gao Keqi 高科奇(M1) |
| Undergraduate Students | Ryota Kobori 小堀良太(B3)、Yuta Moriguchi 森口裕太(B3) |

【 Abstract 】

We aim to elucidate the molecular mechanisms of induction, maintenance, and function of senescent cells *in vivo*, and to develop innovative approaches to control senescent cells (Senotherapy), such as selective removal of senescent cells and cell rejuvenation by altering epigenomic information. In this year, we focused our research on the following two issues.

【1】 Pre-existed senescent fibroblasts in aged bladder create tumor permissive niche

Aging is a major risk factor for cancer, but the precise mechanism by which aging promotes carcinogenesis remains largely unknown. Here, using transgenic mouse models, we demonstrate that p16-positive senescent fibroblasts (p16h-sn fibroblasts) accumulate with age, constitute inflammatory cancer-associated fibroblasts (iCAFs), and promote tumor growth in bladder cancer models. Single-cell RNA sequencing of fibroblasts in aged mice revealed higher expression of Cxcl12 in p16h-sn fibroblasts than in p16-negative fibroblasts. We identified the high expression of Smoc2, Gucy1a1 (Gucy1a3), Cxcl12, Crisp1d2, Gas1, and Lum as a p16-positive senescent CAFs (p16h-sn CAFs) signature in both mouse and human. Importantly, the p16h-sn CAFs signature is associated with age and poor prognosis of both advanced and non-advanced bladder cancer patients. In conclusion, our results suggest that p16h-sn fibroblasts in aged bladder serve as a cancer permissive niche and promote tumor growth by secreting CXCL12 (Meguro S et al, In revision).

【2】 Cellular senescence-mediated irreversible differentiation in myeloid leukemia

Cell cycle inhibition is essential process in cellular senescence induction. On the other hand, it was reported that cell proliferation signals, MAPK and mTOR signaling pathway, are contradictorily activated in the senescent cells. A concept "Geroconversion" has been proposed to suggest that the simultaneous activation of this positive and negative cell cycle-related signaling pathways is crucial for induction of cellular senescence, but its molecular mechanism

has been elusive. In this study, we found that simultaneous induction of Erk-MAPK signaling activation by all-trans retinoic acid (ATRA), a clinically used leukemia therapeutic agent, and CDK4/6 inhibitor-mediated cell cycle inhibition, induced an irreversible cell cycle arrest by promoting myeloid cell differentiation. This strongly suggests that a molecular biological phenomenon similar to geroconversion is deeply involved in this irreversible leukemic cell differentiation.

<2023年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

1. 加齢に伴い膀胱内に蓄積した老化細胞が膀胱がんにも及ぼす影響の解析

加齢はがんの主要なリスクファクターである一方、加齢ががんの悪性進展化を制御する詳細なメカニズムは不明な点が多い。私たちは細胞老化のマーカーである p16 のプロモーター活性を指標とした老化細胞可視化マウスを用いて、p16 陽性の老化線維芽細胞が加齢とともに蓄積し、炎症を伴うがん関連線維芽細胞を構成し、膀胱がんモデルで腫瘍成長を促進することを明らかにした。加齢マウスの膀胱を用いた単一細胞 RNA シークエンシングにより、p16 陰性線維芽細胞よりも p16 陽性線維芽細胞で Cxcl12 の発現が高いことが分かった。さらに、マウスとヒトにおいて、Smoc2、Gucyl1a1、Cxcl12、Crispld2、Gas1、Lum の高発現が p16 陽性老化がん関連線維芽細胞の特徴であることを同定した。重要なことに、p16h-sn CAF の特徴は、進行性および非進行性膀胱がん患者の年齢と不良な予後と関連した。以上の検討結果により、加齢した膀胱内の p16 陽性の老化線維芽細胞ががん許容ニッチとして機能し、CXCL12 を分泌することにより腫瘍成長を促進することが示唆された (Meguro S et al, In revision)。

2. 骨髄性白血病に対する細胞老化を介した不可逆的な骨髄球分化誘導法の開発

細胞老化誘導機序において、細胞周期を抑制することの重要性は広く知られているが、これとは矛盾して老化細胞では細胞増殖を誘導する MAPK シグナルや mTOR シグナルが活性化されていることが知られている。この細胞周期に関わる正と負のシグナル経路の同時的活性化が細胞老化の誘導に重要であるとする概念「Geroconversion」が提唱されているが、分子生物学的に解明されていない。本研究では、ヒト急性骨髄性白血病細胞を用いた解析から、白血病治療薬として臨床的に用いられている all-trans retinoic acid (ATRA) による Erk-MAPK シグナルの活性化と CDK4/6 阻害剤による細胞周期の抑制を同時に誘導することで、骨髄球分化を促進することを見出した。すなわち、この不可逆的な白血病細胞分化に geroconversion に類似した分子生物学的現象が深く関与していることが強く示唆された。

3. 今後の計画

老化細胞可視化・除去マウスを用いて、特に肝疾患・血液がんを中心に、がん組織及びその周辺組織の老化細胞の全体像を明らかにすることで、個体老化とがんの発症率増加・悪性化進展のメカニズムを解明する。また、老化細胞の若返り機構の解明も目指す。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Li D, Johmura Y, Morimoto S, Doi M, Nakanishi K, Ozawa M, Tsunekawa Y, Inoue-Yamauchi A, Naruse H, Matsukawa T, Takeshita Y, Suzuki N, Aoki M, Nishiyama A, Zeng X, Konishi C, Suzuki N, Nishiyama A, Harris AS, Morita M, Yamaguchi K, Furukawa Y, Nakai K, Tsuji S, Yamazaki S, Yamanashi Y, Shimada S, Okada T, Okano H, Toda T, Nakanishi M. LONRF2 is a protein quality control ubiquitin ligase whose deficiency causes late-onset neurological deficits. *Nature Aging* 2023 3(8):1001-1019.

(共同研究)

2. Nakano Y, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Kido T. Development of a high throughput system to screen compounds that revert the activated hepatic stellate cells to a quiescent-like state. *bioRxiv* 2023 DOI: 10.1101/2023.11.01.564270
3. Harris AS, Aratani S, Johmura Y, Suzuki N, Dan L, Nakanishi M. In vivo dynamics of senescence in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2023 17:673:121-130.
4. Sinha S, Aizawa S, Nakano Y, Rialdi A, Choi HY, Shrestha R, Pan SQ, Chen Y, Li M, Kapelanski-Lamoureux A, Yochum G, Sher L, Monga SP, Lazaris A, Machida K, Karin M, Guccione E, Tsukamoto H. Hepatic stellate cell stearyl co-A desaturase activates leukotriene B4 receptor 2 - β -catenin cascade to promote liver tumorigenesis. *Nature Communications* 2023 14(1):2651.
5. Postmus AC, Kruit JK, Eilers RE, Havinga R, Koster MH, Johmura Y, Nakanishi M, van de Sluis B, Jonker JW. The chemotherapeutic drug doxorubicin does not exacerbate p16Ink4a-positive senescent cell accumulation and cardiometabolic disease development in young adult female LDLR-deficient mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 2023 468:116531.
6. Li D, Wang TW, Aratani S, Omori S, Tamatani M, Johmura Y, Nakanishi M. Transcriptomic characterization of Lonrfl at the single-cell level under pathophysiological conditions. *J Biochem* 2023 173(6):459-469.

著書・総説

1. Nakano Y, Johmura Y. Targeting cellular senescence as a therapeutic approach in non-

- alcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol* 2023 28(2):100900.
2. 大森徳貴, 城村由和: マルチオミクス解析によるセノリティクス戦略 *実験医学* 2023 41(15) 2524-2530.
 3. 馬場智久, 城村由和: 細胞老化を標的とした治療 *月刊「腫瘍内科」* 2023 32(4):411-416
 4. 大森徳貴, 城村由和: 低分子化合物による老化細胞除去の現状と未来 *医学のあゆみ* 2023 287(5).
 5. 中野泰博, 城村由和: 老化細胞の代謝特性によるセノリティクス *月刊細胞* 2023 55(2).
 6. 中野泰博, 城村由和: 抗 PD-1 抗体による老化細胞の除去 *バイオサイエンスとインダストリー* 2023 81(5).
 7. 城村由和: 新たなフェーズに入った老化研究 *医学界新聞* 2023 1月号

<学会発表>

1. 城村由和: がん間質中の老化細胞の同定と性状解析. 第 97 回日本薬理学会年会 2023 年 12 月 14 日, 神戸
2. 城村由和: 老化細胞の一細胞遺伝子発現解析による加齢に伴うがんの悪性進展機構の解明. 第 10 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス 2023 年 11 月 24 日, 東京
3. Nakano Y, Johmura Y: Analysis of the dynamics, origin, and properties of senescent cells induced during tissue damage. 第 96 回日本生化学会大会 2023 年 11 月 2 日, 福岡
4. Nakano Y, Zhang Z, Kumamoto S, Johmura Y: In Vivo Lineage Tracing of p16-expressing Senescent Cells in Acute Liver Injury. 第 18 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2023 年 10 月 6 日, 東京
5. 城村由和: 細胞老化の統合的理解による先進的な健康寿命延伸法の創出. 第 21 回大阪大学ニコンイメージングセンター シリーズセミナー 2023 年 9 月 25 日, 大阪
6. 城村由和: 細胞老化を標的とした先進的な健康寿命延伸法の創出を目指して. 第 82 回日本癌学会学術総会 2022 年 9 月 22 日, 横浜
7. Baba T, Johmura Y: Autophagy inhibitors cooperate to induce an irreversible myeloid differentiation in AML differentiation therapy. 第 82 回日本癌学会学術総会 2023 年 9 月 23 日, 横浜

8. Johmura Y: Pre-existed Senescent Fibroblasts in aged bladder create tumor permissive niche. The 11th KUCRI-FUSCC Joint Symposium on Tumor Biology 2023 2023 年 9 月 13 日, 金沢
9. 城村由和: 「21 世紀 先端医療コンソーシアム」免疫医療部会 第 3 回会議 2023 年 7 月 27 日, オンライン
10. Johmura Y: Developing the approaches to treat aging and chronic inflammatory diseases by targeting senescent cells. India - Japan Cancer Symposium International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2023 Kanazawa University SAKIGAKE Symposium 2023 年 7 月 25 日, 金沢
11. 城村由和: ユビキチンリガーゼ LONRF2 による変性タンパク質分解を介したプロテオスタシス制御. 第 75 回日本細胞生物学会シンポジウム 2023 年 6 月 28 日, 奈良
12. 城村由和: 先進的な健康寿命延伸医療の実現に向けた細胞老化制御法の創出. 金沢大学十全医学会総会・学術集会 2023 年 6 月 20 日, 金沢
13. 城村由和: 変性タンパク質選択的ユビキチンリガーゼ LONRF2 の欠損は加齢性神経変性を引き起こす. 第 23 回日本抗加齢医学会総会 2023 年 6 月 9 日, 東京
14. 城村由和: ユビキチンリガーゼ LONRF2 による変性タンパク質分解を介したプロテオスタシス制御. 日本生化学会北陸支部第 41 回大会 2023 年 6 月 3 日, 富山
15. Johmura Y: Developing the approaches to treat aging and chronic inflammatory diseases by targeting senescent cells. 日本生理学会第 100 回記念大会 2023 年 3 月 15 日, 京都
16. 城村由和: 先進的な健康寿命延伸医療の実現に向けた細胞老化制御法の創出. 第 8 回新学術創成研究機構シンポジウム 2023 年 3 月 8 日, 金沢

<外部資金>

1. 城村由和: 科学研究費補助金・学術変革領域研究(B)(代表)「慢性炎症の起点となる細胞老化のリバイバル機構の解明」 (直接経費 5,800 千円, 間接経費 1,740 千円)
2. 城村由和: 科学研究費補助金・学術変革領域研究(B)(代表)「老化時計リバイバル機構の解明 -老化研究における新たなパラダイムシフトの総括」 (直接経費 2,100 千円, 間接経費 630 千円)
3. 城村由和: 科学研究費補助金・基盤研究(B)(代表)「細胞種特異的な老化細胞制御システムを用いた個体老化・加齢性疾患病態機構の解明」 (直接経費 3,800 千円, 間接経費 1,140 千円)

4. 城村由和: 科学研究費補助金・挑戦的研究(萌芽) (代表)「個体老化・加齢関連疾患の理解を目指した変性タンパク質アトラスマップの構築」 (直接経費 2,500 千円, 間接経費 750 千円)
5. 城村由和: AMED・再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題 (基礎応用研究課題) (代表)「老化細胞リプログラミング機構の解明による加齢組織再生法の創出」 (直接経費 15,000 千円, 間接経費 4,500 千円)
6. 城村由和: AMED・PRIME (代表)「加齢に伴うプロテオスタシス破綻のメカニズム解明に基づく老化制御法の開発」 (直接経費 10,000 千円, 間接経費 3,000 千円)
7. 城村由和: 先魁プロジェクト 2022 (代表)「先進的な健康長寿延伸医療の開発を目指した老化メカニズムの解明」 (直接経費 2,000 千円, 間接経費 0 千円)
8. 城村由和: 令和 5 年度未来知実証センター ショーケース (代表)「老化肝細胞の理解に基づく画期的な肝不全治療法の開発」 (直接経費 1,400 千円, 間接経費 0 千円)
9. 城村由和: 令和 5 年度未来知実証センター ショーケース (代表)「老化肝細胞の理解に基づく画期的な肝不全治療法の開発」 (直接経費 1,400 千円, 間接経費 0 千円)
10. 城村由和: 令和 5 年度新学術創成研究機構異分野融合研究推進費 (代表)「p16 レポーターマウスを用いた個体レベルでの細胞老化と代謝異常との関連の研究」 (直接経費 850 千円, 間接経費 0 千円)
11. 城村由和: 第一三共生命科学研究振興財団 2023 年度 PI セットアップ研究助成 (代表)「細胞種特異的な細胞老化制御システムを用いた個体老化・加齢性疾患発症の分子機構の解明」 (直接経費 4,000 千円, 間接経費 0 千円)
12. 城村由和: 第 54 回 (2023 年度) 三菱財団自然科学研究助成 (代表)「部分的リプログラミングによる老化細胞の若返り機構の解明」 (直接経費 4,000 千円, 間接経費 0 千円)
13. 城村由和: 2022 年度テルモ研究助成 (代表)「老化細胞リプログラミングによる革新的な健康寿命延伸法の確立」 (直接経費 2,000 千円, 間接経費 0 千円)
14. 城村由和: 2022 年度小野医学研究助成 (代表)「非アルコール性脂肪性肝疾患の先進的治療法を指向した老化細胞リプログラミング機構の解明」 (直接経費 2,000 千円, 間接経費 0 千円)
15. 城村由和: 科学研究費補助金・基盤研究(A) (分担)「脳老化と神経疾患に共通した脳機能低下に懸かる細胞間相互作用機序の統合的理解」 (直接経費 3,000 千円, 間接経費 900 千円)

16. 城村由和: 科学研究費補助金・基盤研究(B)(分担)「がん治療薬誘導性間質細胞老化の分子病態の解明と治療応用」 (直接経費 100 千円, 間接経費 0 千円)
17. 馬場智久: 科学研究費補助金・基盤研究(C)(分担)「時空間的解析による大動脈瘤発生から進行過程でのケモカイン・システムの機能解明」 (直接経費 300 千円, 間接経費 0 千円)
18. 中野泰博: AMED・肝炎等克服実用化研究事業 (代表)「非アルコール性脂肪肝炎における老化細胞の性状解析と新規治療標的分子の探索」 (直接経費 5,500 千円, 間接経費 1,650 千円)
19. 中野泰博: 北陸銀行若手研究者助成金 (代表)「NASH 誘発性肝臓における老化細胞の性状解析」 (直接経費 600 千円, 間接経費 0 千円)
20. 中野泰博: 科学研究費補助金・学術変革領域研究(B)(分担)「組織線維化の筋線維芽細胞におけるリバイバル機構の解明」 (直接経費 2,500 千円, 間接経費 0 千円)
21. 中野泰博: 科学研究費補助金・基盤研究(C)(分担)「CRISPR とインテグラーゼを併用した長鎖 DNA 挿入法の確立とマウス作製への応用」 (直接経費 100 千円, 間接経費 0 千円)
22. 中野泰博: AMED・再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題 (基礎応用研究課題) (分担)「老化細胞リプログラミング機構の解明による加齢組織再生法の創出」 (直接経費 5,000 千円, 間接経費 1,500 千円)
23. 中野泰博: AMED・難治性疾患実用化研究事業 (分担)「細胞老化が引き起こすレット症候群発症メカニズムの解明」 (直接経費 4,000 千円, 間接経費 1,200 千円)

がん微小環境研究プログラム

Division of Immunology and Molecular Biology

免疫炎症制御研究分野

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

【 Abstract 】

We have been studying the molecular mechanism and biological roles of apoptosis and pyroptosis, both of which are mediated by caspases. In contrast to apoptosis which often results in non-inflammatory and/or immunosuppressive outcomes, pyroptosis is a highly inflammatory and immunogenic form of cell death. Thus, pyroptosis may be a more preferable way than apoptosis to kill tumor cells to induce anti-tumor immunity in therapy.

Pyroptosis was originally discovered as a programmed cell death of macrophages infected by pathogens. In this context, innate immunity activators derived from pathogens (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs) induce formation of multiprotein complex called inflammasomes, which consist of pattern recognition receptors (such as NLRP3, NLRC4, and AIM2), an adaptor protein ASC and caspase-1, and cause caspase-1 activation. Some PAMPs including lipopolysaccharide induce oligomerization and activation of caspase-4 and caspase-5. These caspases (caspase-1,4,5) cleave a cytoplasmic protein gasdermin D (GSDMD), and the N-terminal fragments of GSDMD forms pores in the plasma membrane to induce pyroptosis. GSDMD pores are also required for the secretion of inflammatory cytokines including IL-1 β .

We have found that a motor protein KIF11 contributes to inflammasome formation and induction of pyroptosis. We succeeded to obtain in vitro evidence showing that KIF11 moves on microtubules and that NLR moves along microtubules when coexisting with KIF11. These results suggest that KIF11 plays a role in the intracellular traffic of NLRs.

We are searching for novel proteases that mediates the proteolytic maturation of GSDMs. We found that caspase-12 is activated by bacterial-derived molecular patterns and cleaves GSDMD and induces pyroptosis. Analysis of the activation mechanism of caspase-12 revealed that approximately 100 amino acid residues at the N-terminus of caspas-12 are involved in the ligand recognition. These results suggest that caspase-12 functions as a novel pathogen sensor.

In macrophages, GSDMD is required for the caspase-1-mediated pyroptosis and secretion of mature IL-1 β as described above. On the other hand, we have found that mast cells and nerve cells express GSDMD at low levels, and that activated caspase-1 induces Bid-dependent apoptosis rather than GSDMD-dependent pyroptosis in these cell types. We found that the secretion of IL-1 β induced by activation of the NLRP3 inflammasome in mast cells is GSDMD-independent. We are currently elucidating the secretion mechanism of IL-1 β by mast cells.

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. 自然免疫応答におけるモーター蛋白 KIF11 の役割の解析

我々は NLR ファミリーに属する細胞内パターン認識受容体の機能発現にモータータンパク KIF11 が関与することを見出し、KIF11 が NLR の細胞内輸送に機能する可能性を検討している。これまでに HEK293 細胞を用いた免疫沈降実験、および免疫沈降物の native PAGE やショ糖密度勾配遠心法を用いた解析を行い、KIF11 が 4 量体を形成すること、4 量体の KIF11 がその両端のモータードメインを介して微小管と NLR リンクする構造をとりうることを支持するデータを得た。また、九州大学の井上大介先生との共同研究により、組換蛋白を用いた無細胞系で KIF11 が微小管の上を移動すること、NLR を共存させると NLR が微小管に沿って移動することを示す画像を取得することに成功した。引き続き、マクロファージ細胞および Hela 細胞を用いて KIF11 が NLR の細胞内輸送に寄与することを細胞レベルで示すことを試みる。

2. カスパーゼ 12 による GSDMD 切断活性化の解析

ガスダーミンファミリーに属する蛋白(GSDMs)はパイロトーシスの実行因子であり、プロテアーゼにより切断されることで活性化する。我々は特定の生物種由来のカスパーゼ 12 が GSDMD を活性化すること、カスパーゼ 12 が細菌由来分子によって活性化されることを見出した。カスパーゼ 12 の活性化機序について解析を行った結果、同分子の N 末側の約 100 アミノ酸残基がリガンド認識に関わることがわかった。また、カスパーゼ 12 がリガンド存在下で多量体化する可能性が示された。その他、GSDMs を活性化させる細菌/真菌由来のプロテアーゼの探索を行っている。新たに *Aeromonas* 属菌が産生するプロテアーゼがヒト GSDMD を活性化することが示唆された。

3. マスト細胞におけるインフラマソーム応答の解明

インフラマソームは病原体感染などの刺激に応答し、カスパーゼ 1 の活性化に働く巨大蛋白複合体である。マクロファージでは、活性化したカスパーゼ 1 は IL-1 β などの炎症性サイトカインを成熟型に転換するとともに、GSDMD を切断して、その N 末断片 (GSDMD-N) による細胞膜孔形成を誘導する。GSDMD-N による細胞膜孔は成熟型 IL-1 β などの分泌に働くとともに、大規模な細胞膜破壊へと移行し、ネクローシス様プログラム細胞死であるパイロトーシスを誘導する。一方、我々は、マスト細胞や神経細胞は GSDMD の発現が低く、活性化したカスパーゼ 1 は Bid 依存性のアポトーシスを誘導することを見出した。本年度、マスト細胞の NLRP3 インフラマソームを活性化することで誘導される IL-1 β の分泌は GSDMD 非依存性であることを見出した。現在、マスト細胞の IL-1 β の分泌機構の解明を進めている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著（共同研究）

1. Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara SI, Ravnskjaer K, Horike SI, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H. The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice. *Nat Commun*, 14:167, 2023.
2. Ogura K, Endo M, Hase T, Negami H, Tsuchiya K, Nishiuchi T, Suzuki T, Ogai K, Sanada H, Okamoto S, Sugama J. Potential biomarker proteins for aspiration pneumonia detected by shotgun proteomics using buccal mucosa samples: a cross-sectional case-control study. *Clin Proteomics*, 20:9, 2023.

総説

3. Hernández-Cuellar E, Tsuchiya K, Valle-Ríos R, Medina-Contreras O. Differences in Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *Diseases*, 11:160, 2023.

< 学会発表 >

1. Kohsuke Tsuchiya, Shoko Hosojima and Takashi Suda. A novel pyroptosis-inducing protease that senses bacteria-derived molecular patterns. The 3rd Japan and Australia Meeting on Cell Death 2023. 2023年8月16~18日（メルボルン）
2. 土屋晃介. 溶解性細胞死パイロトーシスの分子機序と感染における役割. 第35回微生物シンポジウム. 2023年9月1~2日（岡山）
3. 土屋晃介, 細島祥子, Eduardo Hernández Cuellar, 須田貴司. カスパーゼ-12は細菌リポペプチドを認識してパイロトーシスを誘導する. 第33回日本生体防御学会学術総会. 2023年9月28~30日（京都）
4. Kinoshita T, Tsuchiya K, and Suda T. Kinesin molecular motor Eg5 functions during innate immune signaling. 第46回日本分子生物学会年会. 2023年12月8日、神戸ポートアイランド

< 外部資金 >

1. 須田貴司（代表）科学研究費補助金 基盤研究(C)「マスト細胞におけるインフラマソーム応答の特徴と役割」2023年度直接経費 1,600千円
2. 土屋晃介（代表）科学研究費補助金 基盤研究(B)「細菌由来分子を認識する新たなパターン認識受容体の機能解析と応用」2023年度直接経費 400千円
3. 土屋晃介（代表）科学研究費補助金 挑戦的研究（萌芽）「ガスダーミン・ファミリー分子を成熟化させる細菌・真菌由来プロテアーゼの探索」2023年度直接経費 1,200千円
4. 土屋晃介（分担）AMED 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「過栄養による肝細胞死の様式変容とその生活習慣病発症・増悪のメカニズムの解明」2023年度直接経費 1,000千円

Division of Tumor Dynamics and Regulation

腫瘍動態制御研究分野

| | |
|----------------------|---|
| Professor | Kunio Matsumoto 松本 邦夫 |
| Associate Professor | Katsuya Sakai 酒井 克也 |
| Assistant Professors | Hiroki Sato 佐藤 拓輝 Neval Yilmaz (ナノ生命科学研究所) Ryu Imamura 今村 龍(2023年3月末まで在籍) |
| Research Fellow | Nichole Marcela Rojas Chaverra |
| Graduate Student | Asuka Kida 喜田 明日香 Yasuhiro Tsukamoto 塚本 康寛 |
| Assistant Staff | Natsuko Higashi 東 奈津子 |

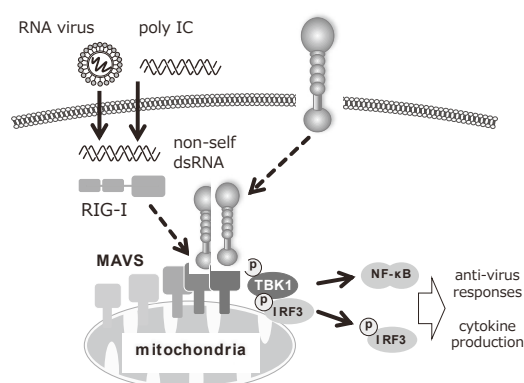
【Abstract】

Our research mission is to progress diagnosis and therapeutics based on the understanding of bioactive molecules and molecular technologies, focusing on MET/HGF receptor. Our research progresses in 2023 are followings. (1) The intracellular C-terminus of MET interacted with mitochondrial antiviral-signaling protein and played a role in the induction of cytokine production by non-self RNA, whereas the tyrosine kinase of MET was dispensable for promoting cytokine production. Our results revealed a kinase activity-independent function of MET in the promotion of antiviral innate immune responses (*by Imamura*). (2) In the lung metastasis models, the processing from precursor inactive HGF to active HGF occurred in the bronchial epithelial cells. MET activation in the bronchial epithelial cells induced expression of genes involved in metastatic niche formation. Metastatic niche formation and subsequent metastasis were suppressed by HGF-inhibitory Peptide-8. Processing of HGF in distant site facilitates MET activation which promotes premetastatic niche formation (*by Sato*). (3) Biochemical assay and molecular dynamics (MD) simulation provided MET-IPT domain-mediated MET dimer formation. High-speed AFM analysis revealed MET-IPT-connected dynamic 2:2 structure of HGF and MET purified from living cells. (*by Yilmaz*). (4) Employing Lasso-Graft technology, high-performance MET receptor agonists were created. The one is immunoglobulin Fc-based MET agonist with long circulatory residency (*by Sakai*). In preclinical model, improvement of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) was achieved by Fc-based MET agonist (*by Chaverra*). When ubiquitin was used as a scaffold for Lasso-Graft of MET-binding peptide, the MET-binding ubiquitin multimers acquired MET agonist activity (*by Sato*). On the other hand, Fc grafted with macrocyclic peptide capable of binding to both wild type and W104R mutant growth hormone receptor (GHR) could activate not only wild type but also of a mutant GHR which cannot be activated by GH. This approach serves versatile strategy to generate de novo agonists against mutant receptors (*by Kida*).

<2023年の研究成果, 進行状況>

1. Non-canonical MET 受容体経路を介した自然免疫制御

(1) RNA ウイルス感染から炎症性サイトカイン誘導に至る免疫応答が MET 欠損で低下すること, (2) MET 細胞内領域はミトコンドリア MAVS の重合を促進すること, (3) 上記応答は MET のチロシンキナーゼに依存しないことを見出した。MET を介した自然免疫応答は, キナーゼ非依存的な non-canonical シグナル経路を介して発揮される MET の新規機能である (Imamura *et al.*, *PNAS*)。



2. 転移ニッチ微小環境形成とイメージング診断分子創成

肺転移性細胞モデルを解析系として, 肺転移に先立って腫瘍由来因子の影響により肺上皮細胞で前駆体不活性 HGF から活性型 HGF への変換と MET 活性化がみられること, MET 活性化によって転移ニッチ形成に関与する分子群の発現が上昇すること, 肺局所での活性型 HGF の特異阻害は肺転移を抑制することを見出した。HGF プロセッシングを介した MET 活性化が転移ニッチ形成のトリガーとして機能すると考えられる (Sato *et al.* 論文準備中)。一方, 肺がん移植マウスモデルを用いて, 活性型 HGF に結合する環状ペプチド (HiP-8) が, がん組織における活性型 HGF ならびに MET 活性化を検出する PET イメージング診断に有用であることを検証した (Warashina, Sato, *et al.* *Mol Pharmaceutics*)。

3. 高速 AFM を利用した MET 受容体活性化の動的構造

分子動力学(MD)計算ならびに生化学的手法により, MET 分子内 IPT ドメインが 2 量体形成に関与することを明らかにした。さらに, 生細胞から生成した全長 MET, HGF-MET 複合体について高速 AFM 解析を進め, HGF:MET=2:2 複合体の構造特性を明らかにした (Yilmaz *et al.* 論文準備中)。

4. 高機能受容体アゴニスト創成

- (1) MET アゴニスト創成: MET 結合環状ペプチド配列を IgG の Fc 領域に Lasso-Graft (内挿)することにより, MET 受容体を活性化する分子を創成した (Sakai *et al.* *Nat Biomed Eng*)。これらは長期血中安定性を示し, 慢性疾患治療に有用と考えられ, NASH(非アルコール性脂肪肝炎)モデルにおいて薬効を解析した結果, MET アゴニストは肝臓での炎症や脂肪蓄積を抑制し, 線維化を抑制・改善した。NASH 改善の医薬候補と期待される (Chaverra *et al.* 論文改訂中)。
- (2) ユビキチン(UB)を scaffold とするアゴニスト創成: UB を scaffold として, MET 受容体結合ペプチドを内挿する UB の Lasso-Graft 体オリゴマーが高い MET 活性化能をもつことを検証した (Kawakami, Sato, *et al.* *Angewandte Chemie, Int Ed*)。
- (3) 成長因子受容体 (Growth Hormone Receptor/GHR) アゴニスト創成: GHR 結合ペプチドを Fc に内挿し, 野生型・変異型 GHR を活性化するアゴニストを創成した (Li, Kida, *et al.* 論文準備中)

【 研究業績 】

<論文発表>

(研究室主体)

1. Sakai K[†], Sugano-Nakamura N, Mihara E, Rojas-Chaverra NM, Watanabe S, Sato H, Imamura R, Voon DC, Sakai I, Yamasaki C, Tateno C, Shibata M, Suga H, Takagi J[†], Matsumoto K[†]. Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocyclic peptides into fragment crystallizable regions. *Nat Biomed Eng*, 7: 164-176, 2023. (†corresponding authors)
2. Warashina S[§], Sato H[§], Zouda M, Takahashi M, Wada Y, Passioura T, Suga H, Watanabe Y, Matsumoto K[†], Mukai H[†]. Two-chain mature hepatocyte growth factor-specific positron emission tomography imaging in tumors using ⁶⁴Cu-labeled HiP-8, a non-standard macrocyclic peptide probe. *Mol Pharmaceutics*, 20: 2029-2038, 2023. (§equal contribution; †corresponding authors)
3. Kawakami N[§], Sato H[§], Terasaka N, Matsumoto K[†], Suga H[†]. MET-activating ubiquitin multimers. *Angewandte Chemie, Int Ed*, 62, e2023071, 2023. (§equal contribution; †corresponding authors)
4. Imamura R[†], Sato H, Voon DC, Shirasaki T, Honda M, Kurachi M, Sakai K[†], Matsumoto K. Met receptor is essential for MAVS-mediated antiviral innate immunity in epithelial cells independent of its kinase activity. *Proc Natl Acad Sci*, 120: e2307318120, 2023. (†corresponding authors)

(共同研究)

1. Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. *Cancer Medicine*, 12: 5809-5820, 2023.
2. Kamoshita K, Ishii K, Tahira Y, Kikuchi A, Abuduwaili H, Tajima-Shirasaki N, Li Q, Takayama H, Matsumoto K, Takamura T. Long-term insulin stimulation suppresses ubiquitination via the deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 14, independent of proteasome activity in H4IIEC3 hepatocytes. *J Pharmacol Exp Therapeutics*, 385: 5-16, 2023.
3. Nishita M, Kamizaki K, Hoshi K, Aruga K, Nishikaku I, Shibuya H, Matsumoto K, Minami Y. Rho family small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1-Dvl2 signaling and promotes lung adenocarcinoma progression. *J Biol Chem*, 299: 105248, 2023.

4. Taira J, Yamaguchi M, Tashiro A, Suzuki K, Kida A, Sakai K, Matsumoto K, Aoki S. Computer-assisted identification of inhibitor with novel pharmacophore targeting first kringle domain of hepatocyte growth factor. *ChemistrySelect*, 8: e202301577, 2023.

<総説・著書>

(共同研究)

1. Sakai K, Sato H, Matsumoto K. Cytokine mimetics with various modalities. *Israel Journal of Chemistry*, in press.
2. 酒井克也. 第 19 回金沢大学十全医学会賞受賞論文 人工細胞成長因子・阻害分子の創成と応用の研究. *金沢大学十全医学会雑誌* 第 132 巻第 1 号 pp. 2-6, 2023.

<学会発表・シンポジウムなど>

1. 松本邦夫. ネオバイオロジクス：高機能細胞増殖因子の分子創成. Beyond 研究会. 2023 年 3 月 19 日 (東京)
2. 松本邦夫. 高機能増殖因子 (ネオバイオロジクス) 創成と応用展開. 「感染・免疫・がん・炎症」全国共同研究拠点シンポジウム. 2023 年 3 月 29 日 (札幌)
3. 山口有紀子、増尾友佑、津本彩乃、酒井克也、今村龍、水谷栄介、牛田貴文、小谷友美、梶山広明、松本邦夫、水谷栄彦、加藤将夫. Aminopeptidase A-Fc 融合タンパク質のリンカー配列最適化. 日本薬剤学会年会. 2023 年 5 月 18 日 (名古屋)
4. 松本邦夫. 大学だからできるアカデミア創薬の強みや弱みと事業化を支える人. 「創薬ベンチャーエコシステムの現状とそこから見える創薬の未来像」第 445 回 CBI 学会研究講演会 2023 年 5 月 26 日 (オンライン)
5. 柏勇希、酒井克也、松本邦夫、寺坂尚紘、相川春夫、菅裕明. 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. 日本ケミカルバイオロジー学会. 2023 年 5 月 30 日 (大阪大学)
6. 喜田明日香、酒井克也、松本邦夫. 血液-脳関門を通過する MET/HGF 受容体作動分子の創成. 日本生化学会北陸支部第 41 回大会 6 月 3 日 (富山大学)
7. 佐藤拓輝、矢野聖二、松本邦夫. 遠隔臓器における HGF-MET シグナルのエンドクライン的活性制御機構と転移ニッチ形成. 第 27 回 日本がん分子標的治療学会. 2023 年 6 月 22 日 (佐賀)
8. 松本邦夫. アカデミアでの研究とスタートアップの意義. シンポジウム「産学連携シンポジウム アカデミア創薬- 出口戦略とその展望」第 27 回 日本がん分子標的治療学会. 2023 年 6 月 23 日 (佐賀)
9. 松本邦夫. バイオベンチャー起業の思いと大学発スタートアップ創出のために. 金沢大学イノベーションシンポジウム 2023 夏. 2023 年 6 月 29 日 (金沢)

10. Sato H, Sakai K, Watanabe Y, Mukai H, Suga H, Matsumoto K. Application of Macrocyclic Peptides for Cancer Imaging Diagnosis and Therapeutics. 第 83 回 日本癌学会総会. 2023 年 9 月 21 日～9 月 23 日 (横浜)
11. 田村かい、田中友輝、松本邦夫、木下誉富. cMet キナーゼドメイン両端領域の活性制御機構. 第 60 回ペプチド討論会. 2023 年 11 月 9 日 (大津市)
12. 松本邦夫. 高機能増殖因子: ネオバイオリジクスの創成と応用. 第 13 回シグナルネットワーク研究会. 2023 年 11 月 24 日 (金沢)

<知的財産>

発明の名称: 妊娠高血圧症の予防／治療剤
出願日: 2023 年 5 月 12 日
出願番号: 特願 2023-78958
発明者: 松本邦夫, 今村龍, 加藤将夫, 増尾友佑, 水谷榮彦, 梶山広明, 吉原雅人

発明の名称: がんのバイオマーカーおよびがんの発症を判定する方法
出願日: 2019 年 6 月 25 日
登録日: 2023 年 7 月 13 日
特許番号: 特許第 7313005
発明者: 水谷榮彦, 柴田清住, 松本邦夫, 増尾友佑, 加藤将夫

発明の名称: 環状ペプチド
出願日: 2018 年 9 月 6 日
登録日: 2023 年 11 月 7 日
特許番号: 特許第 7380999
発明者: 菅裕明, パヒオウラトビー, 松本邦夫, 酒井克也, 佐藤拓輝

<外部資金>

1. 松本邦夫: AMED 次世代がん医療創生研究事業 (P-PROMOTE) 「環状ペプチド基盤プラットフォーム分子技術によるイメージング診断・治療用高機能分子創成と検証」(代表) (直接経費) 8,742 千円
2. 松本邦夫: 科学研究費補助金 挑戦的研究 (開拓) 「超機能バイオリジクスリガンドの創成と検証の研究」(代表) (直接経費) 5,000 千円
3. 松本邦夫: 産学連携共同研究 「HGF タンパク質を用いた難治性疾患治療薬の開発」クリングルファーマ株式会社 (代表) (直接経費) 2,880 千円
4. 松本邦夫: AMED CiCLE 「組換え HGF タンパク質を用いた難治性疾患治療薬の開発」(代表) クリングルファーマ株式会社からの再委託研究開発 (分担) (直接経費) 3,300 千円

5. 松本邦夫: 産学連携共同研究 「NASH 治療薬を目指す Met アゴニストの医薬品特性の検証」 ミラバイオロジクス株式会社 (代表) (直接経費) 3,750 千円
6. 酒井克也: AMED 肝炎等克服実用化研究事業 (肝炎等克服緊急対策研究事業)
「環状ペプチドファルマコフォア内挿型の組換えアゴニストによる肝機能・線維化改善に基づく汎用的肝炎治療の開発」 (代表) (直接経費) 15,000 千円
7. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金 若手研究「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」 (代表) (直接経費) 900 千円
8. 佐藤拓輝: リレー・フォー・ライフ・ジャパン「プロジェクト未来」 課題名: 細胞増殖因子および高機能ミメティック・アゴニストを用いた神経保護・再生作用に基づく化学療法誘因性末梢神経障害(CIPN)の根本的治療法開発 (代表) 1,000 千円

Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging

腫瘍細胞生物学研究分野

| | |
|---------------------|---|
| Associate Professor | Eishu Hirata 平田 英周 |
| Assistant Professor | Kojiro Ishibashi 石橋 公二郎 |
| Graduate Student | Peifu Yu 于 沛夫 (医薬保健学総合研究科 D2) Ryo Mizutani 水谷 涼 (自然科学研究科・卓越大学院 D1) |
| Research Students | Riki Kadokawa 角川 立樹 (医学類 4年), Anis Zianne ジアン アニス (医学類 2年) |
| Technical Assistant | Sayuri Yamagishi 山岸 小百合 |

【 Abstract 】

Using a novel glial cell culture method (mixed glial culture on/in soft substrate: MGS method) developed in our laboratory, we identified metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) as a molecule that plays an important role in lung cancer brain metastasis. Expression of mGluR1, which is involved in synaptic transmission as a receptor for glutamate, is almost exclusively restricted to the central nervous system, and mGluR1 expression is rarely observed in lung cancer cells. However, mGluR1 expression was induced in lung cancer cells metastasized to the brain, and cell proliferation was found to be dependent on mGluR1 signaling. The molecular mechanism is that astrocyte-derived Wnt-5a induces mGluR1 expression in cancer cells via nuclear translocation of the transcriptional repressor REST, and the induced mGluR1 directly binds to EGFR in a glutamate-dependent manner to stabilize it and activate the downstream MAPK pathway. Our results highlight increased dependence on mGluR1 signaling as an adaptive strategy and vulnerability of lung cancer brain metastasis.

In addition, three-dimensional time-lapse imaging using the MGS co-culture method revealed the presence of microglia that induce aggressive and cell cycle-dependent cell death in cancer cells. IFI16-mediated inflammasome formation and caspase-1 activation in cancer cells were identified as the mechanism of cell injury, and further studies are underway to elucidate the detailed molecular mechanisms.

<2023 年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. がん細胞とグリア細胞との多面的相互作用に関する研究

当研究室にて開発した新規グリア細胞培養法 (mixed-glia culture on/in soft substrate : MGS 法) を用いた解析により、肺がん脳転移に重要な役割を担う分子として metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR1) を同定した。グルタミン酸の受容体としてシナプス伝達に参与する mGluR1 の発現はほぼ中枢神経系に限られており、肺がん細胞では mGluR1 の発現はほとんど認められない。ところが脳に転移した肺がん細胞には mGluR1 の発現が誘導され、細胞の増殖が mGluR1 シグナル依存性となることが明らかとなった。その分子機構として、アストロサイト由来 Wnt-5a が転写抑制因子 REST の核外移行を介してがん細胞に mGluR1 の発現を誘導すること、誘導された mGluR1 がグルタミン酸依存性に EGFR と直接結合してこれを安定化し、下流の MAPK 経路を活性化することが明らかとなった。

また MGS 共培養法を用いた 3 次元タイムラプスイメージングにより、MGS 中にはがん細胞に積極的な細胞死を誘導するミクログリアが存在することが明らかとなった。その細胞傷害機構としてがん細胞の IFI16 を介したインフラマソームの形成とカスパーゼ-1 の活性化が明らかとなっており、現在、更なる分子機構の解明に向けた研究に取り組んでいる。

2. Fibulin-1 によるがん脳転移制御機構に関する研究

分泌糖タンパクである Fibulin-1 は、細胞外基質の再構成を介して様々な生命現象に参与していることが知られている。我々の研究により、脳転移がん細胞には Fibulin-1 が高発現していることが明らかとなった。Fibulin-1 には 4 つのアイソフォームが存在しており、現在、これらがどのようにがん脳転移を制御しているのか解析を行っている。

3. 肺がん薬剤耐性における pre-persister 細胞に関する研究

EGFR 変異を有する肺がんに対しては EGFR 阻害剤が極めて有効であるが、これらに対する薬剤耐性の出現が大きな問題となっている。治療の比較的早期に観察される persister 細胞はがん再発の発生母地と考えられているが、FRET バイオセンサーを用いた persister 細胞の経時的観察により、persister 細胞の出現には治療の超早期における ERK 再活性化が必須であることが明らかとなった。現在、これら persister 細胞出現の母地となる pre-persister 細胞の本態解明に関する研究を進めている。

4. 双性イオン液体の生命科学分野への応用に関する研究

2019 年度より、金沢大学理工研究域生命理工学系 黒田 浩介 博士との共同研究により、生体適合性の高い双性イオン液体 (zwitterionic liquid : ZIL) の生命科学分野への応用に関する研究を進めている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Kato Y, Matsuda Y, Uto T, Tanaka D, Ishibashi K, Ishizaki T, Ohta A, Kobayashi A, Hazawa M, Wong RW, Ninomiya K, Takahashi K, Hirata E, Kuroda K*. Cell-compatible isotonic freezing media enabled by thermo-responsive osmolyte-adsorption/exclusion polymer matrices. **Communications Chemistry**. 6: 260 (2023)
2. Tange S, Hirano T, Idogawa M, Hirata E, Imoto I, Tokino T. MYEOV overexpression induced by demethylation of its promoter contributes to pancreatic cancer progression via activation of the folate cycle/c-Myc/mTORC1 pathway. **BMC Cancer**. 23(1):85, 2023
3. Ishizaki T, Takeuchi Y, Ishibashi K, Gotoh N, Hirata E*, Kuroda K*. Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. **Scientific Reports**. 13(1):37, 2023 (*co-corresponding author)
4. Nakai K, Lin H, Yamano S, Tanaka S, Kitamoto S, Saitoh H, Sakuma K, Kurauchi J, Akter E, Konno M, Ishibashi K, Kamata R, Ohashi A, Koseki J, Takahashi H, Yokoyama H, Shiraki Y, Enomoto A, Abe S, Hayakawa Y, Ushiku T, Mutoh M, Fujita Y, Kon S. Wnt activation disturbs cell competition and causes diffuse invasion of transformed cells through NF- κ B-MMP21 pathway. **Nature Communications**. 14: 7048 (2023)

< 学会発表 >

1. 平田 英周 「がん細胞とグリア細胞の多面的相互作用と細胞死」第31回日本 Cell Death 学会学術総会 (招待講演) (東京 2023年7月15-16日)
2. 石橋 公二郎、新城 恵子、近藤 豊、平田 英周 「代謝型グルタミン酸受容体を介した脳転移がん細胞の生存戦略」先端モデル動物支援プラットフォーム 2023年度 若手技術支援講習会 (口頭発表) (名古屋 2023年9月8-10日)
3. 于 沛夫 「脳転移における fibulin-1 アイソフォームの役割」先端モデル動物支援プラットフォーム 2023年度 若手技術支援講習会 (ポスター発表) (名古屋 2023年9月8-10日)
4. Eishu Hirata “Induction of mGluR1 expression and enhanced dependence on its signalling in lung cancer brain metastasis” 第82回 日本癌学会学術総会 (シンポジウム) (横浜 2023年9月21-23日)
5. Kojiro Ishibashi, Eishu Hirata “Investigation of novel therapeutic targets for brain metastasis using MGS method” 第18回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム (口頭発表) (東京 2023年10月5-6日)

<知的財産>

1. 特願 2023-03404 (現在非公開) 黒田浩介、平田英周、田中大介 (特願 2022-098339 の優先権主張出願)

<外部資金>

1. 挑戦的研究 (萌芽) [研究代表者: 平田 英周] 「グリオーマ関連マイクログリア・マクロファージの機能制御」 3,380 千円
2. AMED 革新的がん医療実用化研究事業 [研究代表者: 平田 英周] 「代謝型グルタミン酸受容体を標的としたがん脳転移治療法の開発」 22,230 千円
3. 2023 年度 三谷研究開発支援財団研究助成 [研究代表者: 平田 英周] 「グリアがん免疫制御による脳腫瘍治療戦略の開発」 1,000 千円
4. 若手研究 [研究代表者: 石橋 公二郎] 「マイクログリアを用いた脳転移細胞療法の開発基盤の構築」 1,300 千円
5. JSTACT-X [研究代表者: 石橋 公二郎] 「シグナル伝達物質として機能する DNA を介した細胞間コミュニケーション」 3,250 千円
6. 国際共同研究加速基金 (海外連携研究) [研究代表者: 石原 誠一郎 研究分担者: 石橋 公二郎] 「がん転移におけるメカノバイオロジー」 624 千円 (学内研究資金)
7. 先魁プロジェクト (2022-2023) [研究代表者: 黒田 浩介 研究分担者: 平田 英周] 「双性イオン液体によるライフサイエンス基盤の革新と社会実装」 500 千円

<その他>

(受賞)

1. 石橋 公二郎 2023 年度 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 ベストディスカッサー賞 (アウトリーチ活動)
2. 平田 英周, 石橋 公二郎 未来のがん研究者を育むがん克服プロジェクト「がん研 EEP」(2023 年 8 月 1-4 日)

がん分子標的探索プログラム

Division of Translational and Clinical Oncology

腫瘍制御研究分野

| | |
|----------------------|--------------------------------------|
| Professor | Toshinari Minamoto 源 利成 |
| Assistant Professor | Takahiro Domoto 堂本貴寛 |
| Graduate Students | Satoshi Takenaka 竹中 哲 (D4:肝胆膵・移植外科学) |
| Postdoctoral Fellows | Masahiro Uehara 上原将大 |
| Assistant Staff | Atsuko Asaka 浅香敦子 |

【 Abstract 】

The mission of our division centers on laboratory and clinical research to develop the novel strategies and modalities for diagnosis and treatment of the gastrointestinal (GI), refractory and rare cancer types including glioblastoma, bone and soft tissue sarcomas and pancreatic neuroendocrine neoplasms. Research projects are based on biological characteristics of individual tumor types that are relevant to their invasive and metastatic potential, resistance to therapy, recurrence and outcome of patients. Our current efforts are focused on (1) research and development of the cancer therapy by targeting aberrant glycogen synthase kinase (GSK)3 β ; (2) understanding of malignant phenotypes of cancer by investigating pathological metabolic properties (eg., aerobic glycolysis, tumor-promoting autophagy); and (3) biological basis of GI and refractory cancer, all for clinical translation. We have been also establishing the tissue material resources of human stomach and colorectal cancer for our own projects described above as well as for studies collaborating with our institutional and many other research groups. During an immediate couple of years, we have obtained the preliminary results indicating the putative roles of tumor GSK3 β as a molecular node that is intersected by the pathways responsible for tumor invasion and resistance to therapy, thus enforcing its potential as an emerging cancer therapeutic target. We are extending this project toward investigation of the putative roles for GSK3 β in promoting pancreatic neuroendocrine neoplasms as well as in interconnecting malignant phenotypes in pancreatic cancer with acquired chemoresistance. Following the project on GSK3 β , we have recently identified a number of molecules including cyclin D2 potentially responsible for acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer by comparing the cDNA microarray-based gene expression between gemcitabine-sensitive BxPC-3 cells and BxPC-3-derived clones that acquired resistance to gemcitabine. In addition to these projects, we have participated in the collaborative studies on the pathologic roles of galectin-4 in promoting peritoneal metastasis in the diffuse-type gastric cancer and of nucleoporin 153 in facilitating the liquid-phase localization of super-enhancers resulting in progression of esophageal cancer.

<2023 年の研究成果, 進捗状況および今後の計画>

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

Wnt 経路抑制因子と認識されている GSK3 β が固有の分子経路を介して、がんの悪性形質を推進することを系統的に示してきた。そして、GSK3 β 阻害のがん治療効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。また、学内外のグループと連携し、膵がん、膠芽腫や骨軟部肉腫などの難治、希少がんで高活性を示す GSK3 β が、腫瘍浸潤性と治療(抗がん剤、放射線)不応性の悪性形質を連結することを見出した。一連の研究をもとに、GSK3 β 阻害薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を開発し、再発膠芽腫(附属病院脳神経外科)と進行膵がん(金沢医科大学病院)を対象とする医師主導臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を検証した。ついで、食道扁平上皮がんと抗がん剤耐性獲得膵がんに対する GSK3 β 阻害の治療効果とメカニズムを明らかにした。2022 年以降から現在まで、GSK3 β 阻害によるがん治療の概念実証のため、膵内分泌腫瘍(PNET)の共同研究に加えて、米国で臨床試験中の GSK3 β 阻害剤 9-ING-41 を開発した Actuate 社と共同で治療耐性膵がんの前臨床研究を進めている。

2. 膵がんの抗がん剤耐性獲得に伴う悪性形質の解析研究

膵がんで汎用されているゲムシタビン(GEM)に対する耐性獲得は、膵がん治療の未解明医療ニーズである。そこで、GEM 感受性膵がん BxPC-3 細胞から段階的に GEM 耐性を獲得させた 3 種のクローン細胞株(Anticancer Drug 2015;26:90, 北里大から供与)を対象に、GEM 耐性獲得の生物学的特性を検討した。その結果、耐性獲得に伴い腫瘍浸潤とがん幹細胞形質が増強した。また、最耐性細胞株をマウス膵内に移植すると、高度の局所浸潤と肝や腹膜転移をきたし、GEM 耐性を獲得した膵がん患者の病態を模倣する所見を呈した。さらに、GSK3 β がこれらの悪性形質のハブとして作用することを見出した(論文作成中)。ついで、耐性細胞株の遺伝子発現解析により、cyclin D2 をはじめ複数の新たな耐性獲得に関わる候補責任分子群を見出した。現在、個々の分子について解析を進めている。

3. ヒト消化管がん組織バンクを中心とするがんの分子病理学的研究

消化管がん研究や臨床研究の基礎資源として 2008 年から本事業を開始し、2010 年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承し現在に至っている。この組織資源の共同利用促進のために、日本医療研究開発機構ゲノム医療支援サイトに情報公開している。帝京大学:竹田 扇らが開発した大気圧イオン化法—質量分析を用いて、大腸がん質量分析診断法開発の共同研究を継続している。大腸組織の質量分析パターンをもとに特有の統計解析と機械学習を組合わせて非がん/がんの判別(診断)アルゴリズムを構築し、90%以上の感度と特異度による判別を可能にした。現在、山梨大学:吉村らと島津製作所基盤技術研究所との共同で、大腸がんの質量分析—内視鏡診断法の内視鏡デバイス開発を進めている。組織バンク検体を共用して、野口研究所との共同研究により、がん細胞で高発現する galectin-4 がびまん型胃がんの腹膜播種性転移に寄与することを明らかにした。また、本学ナノ生命研究所との共同研究により、核膜孔複合体因子(NUP)153 がスーパーエンハンサーの液相局在化を促進して、食道扁平上皮がんの病態を進行させることを見出した。

【 研究業績 】

<発表論文> ※下線は研究室関係者

原著

1. Kitamura K, Hoshino T, Okabe A, Fukuyo M, Rahmutulla B, Tanaka N, Kobayashi S, Tanaka T, Shida T, Ueda M, Minamoto T, Matsubara H, Kaneda A, Ishii H, Matsushita K. The link of mRNA and rRNA transcription by PUF60/FIR through TFIIH/P62 as a novel therapeutic target for cancer. *Int J Mol Sci* 24 (24): 17341, 2023. doi: 10.3390/ijms242417341
2. Hazawa M, Dini Kurnia Ikliptikawati, Iwashima Y, Lin D-C, Jiang Y, Qiu Y, Makiyama K, Matsumoto K, Kobayashi A, Nishide G, Keesiang L, Yoshino H, Minamoto T, Suzuki T, Kobayashi I, Meguro-Horike M, Jiang Y-Y, Nishiuchi T, Konno H, Koeffler HP, Hosomichi K, Tajima A, Horike S, Wong RW. Super-enhancer trapping by the nuclear pore via intrinsically disordered regions of proteins in squamous cell carcinoma cells. *Cell Chem Biol* 2023 Oct 30:S2451-9456(23)00366-5. doi: 10.1016/j.chembiol.2023.10.005
3. Koizumi K, Domoto T, Minamoto T, Satomura K, Nakajima H. Deactivation of glycogen synthase kinase-3 β by heat shock-inducible tumor small protein attenuates hyperthermia-induced pro-migratory activity in colorectal cancer cells. *Int J Oncol* 63 (2): 92, 2023. doi: 10.3892/ijco.2023.5540
4. 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* 26 (3): 352-363, 2023. doi: 10.1007/s10120-023-01366-5
5. Matsuda Y, Ye J, Yamakawa K, Mukai Y, Azuma K, Wu L, Masutomi K, Yamashita T, Daigo Y, Miyagi Y, Yokose T, Oshima T, Saito H, Morinaga S, Kishida T, Minamoto T, Kojima M, Kaneko S, Haba R, Kontani K, Kanaji N, Okano K, Muto-Ishizuka M, Yokohira M, Saoo K, Imaida K, Suizu F. Association of longer telomere length in cancer cells and cancer-associated fibroblasts with worse prognosis. *J Natl Cancer Inst* 115 (2): 208-218, 2023. doi: 10.1093/jnci/djac226

<学会発表> ※下線は研究室関係者

1. 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, 2023年7月20日(木), 21日(金), 仙台国際センター, 仙台市.
2. Hiroko Ideo, Akiko Tsuchida, Kazuko Hachisu, Yoshio Takada, Jun Kinoshita, Noriyuki Inaki, Toshinari Minamoto. Galectin-4 plays a vital role in the peritoneal dissemination of poorly differentiated gastric cancer cells. 26th International Symposium on Glycoconjugates (Glyco26), August 27th (Sun)~September 1st (Fri), 2023, Academia Sinica, Taipei, Taiwan.

3. Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Satoshi Takenaka, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. A new preclinical GSK3 β inhibitor overcomes acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. 堂本貴寛, 上原将大, 竹中 哲, 宮下知治, 源 利成. 新規 GSK3 β 阻害剤による膵がんゲムシタビン獲得耐性の克服. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年 9 月 21 日(木)-24 日(土), パシフィコ横浜, 横浜市.
4. Masahiro Uehara, Satoshi Takenaka, Takahiro Domoto, Shinichi Horike, Chiaki Takahashi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. Overexpression of cyclin D2 in gemcitabine-resistant pancreatic cancer and its potential as a therapeutic target. 上原将大, 竹中 哲, 堂本貴寛, 堀家慎一, 高橋智聡, 宮下知治, 源 利成. ゲムシタビン耐性膵がんにおける cyclin D2 の過剰発現と治療標的としての可能性. 第 82 回日本癌学会学術総会, 2023 年 9 月 21 日(木)-24 日(土), パシフィコ横浜, 横浜市.
5. 宮下知治, 源 利成, 島崎猛夫, 佐々木省三, 稲木紀幸, 藤村 隆. 食道発癌過程における STAT3/GSK3 β の関与と GSK3 β 阻害による微小環境の変化. 第 34 回日本消化器癌発生学会総会, シンポジウム1 がんの微小環境, 2023 年 11 月 24 日(金), 25 日(土), G メッセ群馬(高崎), 高崎市.
6. 堂本貴寛, 上原将大, Ludimila Cavalcante, Frank Giles, 宮下知治, 源 利成. GSK3 β 阻害剤のゲムシタビン耐性獲得膵がんの前臨床的評価. 第 34 回日本消化器癌発生学会総会, ワークショップ3 薬剤耐性のメカニズムとその克服, 2023 年 11 月 24 日(金), 25 日(土), G メッセ群馬(高崎), 高崎市.
7. 上原将大, 竹中 哲, 堂本貴寛, 堀家慎一, 高橋智聡, 宮下知治, 源 利成. 膵がんにおけるゲムシタビン耐性克服のための cyclin D2 関連経路の標的化. 第 34 回日本消化器癌発生学会総会, 2023 年 11 月 24 日(金), 25 日(土), G メッセ群馬(高崎), 高崎市.

<講演>

なし

<外部資金> ※2023 年が含まれる課題 ※※下線は研究室関係者

1. 2023 年－2025 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 23K08163
宮下知治(代表), 源 利成(分担)
 課題: 治療抵抗性膵癌のがん幹細胞性とがん関連性線維芽細胞老化を統御する分子経路の解明
 研究経費: 4,810,000 円(直接経費 3,700,000 円, 間接経費 1,110,000 円)
2. 2023 年－2024 年度 科学研究費補助金 若手研究 課題番号 23K14644
上原将大(代表)
 課題: 抗がん剤耐性獲得膵がんの分子病態解明と治療方法開発への応用
 研究経費: 4,680,000 円(直接経費 3,600,000 円, 間接経費 1,080,000 円)

3. 2023 年度 武田科学振興財団 医学系研究継続助成(がん領域(基礎))
堀江真史(代表), 源 利成, 田中秀憲(分担)
課題:臓器横断的マルチオミックス解析による神経内分泌腫瘍におけるエピゲノムと転写制御の全容解明
研究経費: 3,000,000 円
4. 2022 年－2024 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題番号 22H03144
源 利成(代表), 宮下知治(分担)
課題: 治療耐性膵がんの悪性形質を繋ぐ分子経路の解明と耐性制御法開発への応用
研究経費: 17,420,000 円(直接経費 13,400,000 円, 間接経費 4,020,000 円)
5. 2022 年－2024 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 22K07227
堂本貴寛(代表)
課題: 抗がん剤耐性獲得膵がん細胞における悪性形質連関の解明と治療法開発
研究経費: 4,030,000 円(直接経費 3,100,000 円, 間接経費 930,000 円)
6. 2022 年－2024 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 22K08014
澤田 武(代表)
課題: 非乳頭部十二指腸腺癌の 2 つの発癌経路の検証と分子機構の解明
研究経費: 4,030,000 円(直接経費 3,100,000 円, 間接経費 930,000 円)

Division of Functional Genomics

機能ゲノミクス研究分野

| | |
|----------------------|--|
| Professor | Takeshi Suzuki 鈴木 健之 |
| Assistant Professor | Akihiko Ishimura 石村 昭彦 |
| Postdoctoral Fellows | Minoru Terashima 寺島 農 Ryusuke Suzuki 鈴木隆介 |
| Graduate Students | Gerelsuren Batbayar (D4), Hanbing Lyu (D4), Risa Takatsuka 高塚理沙 (D4), Khurelsukh Buyanbat (D1), Yuuka Kubota 窪田悠夏 (M1) |
| Technical Assistant | Atsuko Odawara 小田原 敦子 |

【 Abstract 】

We have been studying the function of epigenetic and epi-transcriptomic regulators such as histone methyl-modifying enzymes, long noncoding RNAs and RNA methyltransferase complex in the various steps of cancer progression. ASH2L is a core subunit of the COMPASS complex, the most notable writer of the methylation of histone H3 lysine 4 (H3K4). We found that ASH2L mediated the cell invasion and migration activity of triple-negative breast cancer cells via association with the COMPASS components and the target genomic regions. Transcriptome analysis revealed that ASH2L regulated the expression of the genes involved in inflammatory/immune responses, such as IL1B, indicating a novel function of ASH2L on the maintenance of breast cancer malignancy through H3K4 methylation of the specific target genes. Previously we have screened novel candidates of EMT-related transcription factors based on the changes of broad histone methylation domains on their gene regulatory regions and identified CEBPG. We demonstrated that CEBPG induced EMT through the interaction with CEBPB. We also investigated the role of CEBPG in the DNA repair mechanism because the analysis of proteins interacting with CEBPG revealed several DNA repair factors as the candidates. In response to etoposide-induced DNA double-strand breaks, CEBPG enhanced DNA repair efficiency through its leucine zipper domain, suggesting the collaborative role of CEBPG and its interacting proteins in promoting DNA repair. We aim to comprehensively understand the role of CEBPG in the malignant progression of cancer and explore its potential as a novel target for cancer therapy.

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. 乳がん悪性形質獲得に関与するエピジェネティック制御因子 ASH2L の解析

がん悪性進展の際のエピジェネティック制御の重要性を調べるために, TP53 欠損乳がん細胞とエピジェネティック制御因子 sgRNA ライブラリーを用いて, スフィア形成を指標に CRISPR/Cas9 スクリーニングを行った。その結果, ヒストン H3K4 メチル化酵素 COMPASS 複合体のコア因子 ASH2L を含む複数のエピジェネティック制御因子が同定された。最も悪性度の高いトリプルネガティブ型乳がん細胞を用いたノックダウン実験から, ASH2L が乳がん細胞のスフィア形成能, 細胞増殖・浸潤能に寄与すること, ASH2L のゲノム DNA 及び COMPASS 構成因子との結合がその機能に重要であることが示された。次に ASH2L 標的遺伝子を同定するためにマイクロアレイ解析を行った結果, 免疫・炎症に関係する複数の候補遺伝子の発現調節が確認された。代表的な炎症性サイトカイン IL1B に注目してクロマチン免疫沈降実験を行ったところ, 内在性 ASH2L は IL1B 遺伝子プロモーター上に直接リクルートし H3K4me3 修飾に関与することがわかった。すなわち ASH2L は, トリプルネガティブ型乳がんサブタイプにおいて, 免疫・炎症関連遺伝子の H3K4 メチル化修飾と遺伝子発現を調節することによって乳がん悪性化に関与する可能性が示された。

2. ヒストンメチル化修飾分布に基づいた新規 EMT 転写因子 CEBPG の同定

ヒストンの H3K4me3 修飾分布は, 細胞の特異性を決定する重要な遺伝子座の目印となりうる。EMT 誘導後に H3K4me3 修飾範囲が拡大する遺伝子の中から EMT 制御転写因子の候補を探索し, SNAIL や SLUG など既知の EMT 転写因子に加えて, CEBPG を新しく同定した。CEBPG 発現による EMT の進行には自身のロイシンジッパードメインが必須であることから, CEBPG と相互作用するタンパク質を探索した。その結果, CEBPG との複合体形成が EMT の誘導に重要であることがわかった。一方, CEBPG 相互作用因子として複数の DNA 修復因子が単離されたことから, DNA 修復経路への関与が示唆された。抗がん剤である etoposide によって引き起こされる DNA 二本鎖切断に対して, CEBPG はロイシンジッパードメイン依存的に DNA 修復効率を向上させることがわかった。これは CEBPG がパートナータンパク質と協調して DNA 修復を促進することを示唆する。今後は, がん悪性化過程における CEBPG の役割を詳細に理解し, がん治療の新たな標的としての可能性を探求したい。

3. エピジェネティック制御因子の心臓発生・心疾患における役割

がんに関係する因子としてウイルス挿入変異を用いて単離したエピジェネティック制御因子 KDM8 は, がん抑制遺伝子産物 p53 の転写調節機能を阻害的にコントロールする因子として細胞の増殖に関与することを以前に報告した。今回, 私たちが作製した KDM8 コンディショナル KO マウスを用いた国際共同研究によって, KDM8 の心臓発生・心疾患における機能を明らかにした。心臓における KDM8 遺伝子欠損は, 拡張型心筋症の発症を誘導した。KDM8 は転写制御因子 TBX15 の発現をエピジェネティックに調節することによって, NAD⁺合成経路を制御し, 拡張型心筋症の発症を妨げていることを見いだした。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Batbayar G, Ishimura A, Lyu H, Wanna-Udom S, Meguro-Horike M, Terashima M, Horike SI, Takino T and *Suzuki T. ASH2L, a COMPASS core subunit, is involved in the cell invasion and migration of triple-negative breast cancer cells through the epigenetic control of histone H3 lysine 4 methylation. *Biochem Biophys Res Commun.*, 669: 19-29, 2023.
 2. Suzuki R, Kanemaki MT, Suzuki T and *Yoshioka K. Overexpression of JNK-associated leucine zipper protein induces chromosomal instability through interaction with dynein light intermediate chain 1. *Genes Cells.*, doi: 10.1111/gtc.13083, in press.
- (共同研究)
3. Ahmed A, Syed J, Wang Y, Perez-Romero C, Chi L, Lee D, Kocaqi E, Escalante-Covarrubias Q, Ishimura A, Suzuki T, Aguilar-Arnal L, Gozales GB, Kim K-H and *Delgado-Olguin P. KDM8 epigenetically controls cardiac metabolism to prevent initiation of dilated cardiomyopathy. *Nat. Cardiovasc. Res.*, 2: 174-191, 2023.
 4. Isoyama S, Tamaki N, Noguchi Y, Okamura M, Yoshimatsu Y, Kondo T, Suzuki T, Yaguchi S and *Dan S. Subtype-selective induction of apoptosis in translocation-related sarcoma cells induced by PUMA and BIM upon treatment with pan-PI3K inhibitors. *Cell Death Dis.*, 14(2): 169, 2023.
 5. *Ogura K, Endo M, Hase T, Negami H, Tsuchiya K, Nishiuchi T, Suzuki T, Ogai K, Sanada H, Okamoto S and Sugama J. Potential biomarker proteins for aspiration pneumonia detected by shotgun proteomics using buccal mucosa samples: a cross-sectional case-control study. *Clin Proteomics*, 20(1): 9, 2023.
 6. Hazawa M, Ikliptikawati DK, Iwashima Y, Lin DC, Jiang Y, Qiu Y, Makiyama K, Matsumoto K, Kobayashi A, Nishide G, Keesiang L, Yoshino H, Minamoto T, Suzuki T, Kobayashi I, Meguro-Horike M, Jiang YY, Nishiuchi T, Konno H, Koeffler HP, Hosomichi K, Tajima A, Horike SI and *Wong RW. Super-enhancer trapping by the nuclear pore via intrinsically disordered regions of proteins in squamous cell carcinoma cells. *Cell Chem Biol.*, S2451-9456(23)00366-5, 2023.

< 学会発表 >

1. Ishimura A, Terashima M, Takino T and Suzuki T. ASH2L plays a role in triple-negative breast cancer cells through the control of histone H3 lysine 4 methylation. 第82回日本癌学会学術総会 (横浜2023年9月)

2. Takino T, Takatsuka R and Suzuki T. Iron regulates MT1-MMP-mediated MMP-2 activation and cell invasion. 第82回日本癌学会学術総会（横浜2023年9月）
3. Ishimura A, Batbayar G, Lyu H, Wanna-Udom S, Meguro-Horike M, Terashima M, Horike SI, Tsutsui H, Ninomiya K, Takino T and Suzuki T. COMPASS複合体サブユニットASH2Lの悪性化乳がんにおける役割. 第46回日本分子生物学会年会（神戸2023年12月）
4. Terashima M, Suphakhong K, Nishiuchi T, Horike SI, Nishimura T, Tange S, Ishimura A and Suzuki T. Involvement of a candidate transcription factor for inducing epithelial-mesenchymal transition in DNA double-strand break repair. 第46回日本分子生物学会年会（神戸2023年12月）
5. Suzuki R, Suzuki T, and Yoshioka K. JLP overexpression induces chromosomal instability. 第46回日本分子生物学会年会（神戸2023年12月）

<外部資金>

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 鈴木健之, 1,000 千円 研究課題名「腫瘍細胞の上皮間葉転換におけるエピゲノム・エピトランスクリプトーム制御」
2. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 石村昭彦, 1,100 千円 研究課題名「EGFR 変異肺がんの薬剤耐性に関わるエピジェネティック制御因子の探索」
3. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 寺島農, 1,000 千円 研究課題名「動的エピジェネティックドメインに基づいた新規がん悪性化転写因子の同定」
4. 文部科学省科学研究費補助金, 若手研究, 研究代表者 鈴木隆介, 1,800 千円 研究課題名「染色体安定性維持におけるモーターアダプター分子 JSAP の役割とその分子機構」

がん分子標的医療開発プログラム

Division of Medical Oncology

腫瘍内科研究分野

| | |
|----------------------|--|
| Professor | Seiji Yano 矢野 聖二 |
| Lecturers | Koushiro Ohtsubo 大坪 公士郎, Shinji Takeuchi 竹内 伸司 |
| Assistant Professors | Kaname Yamashita 山下 要, Akihiro Nishiyama 西山 明宏 Shigeki Nanjo 南條 成輝(~2023. 9), Hiroshi Kotani 小谷 浩 Azusa Tanimoto 谷本 梓, Koji Fukuda 福田 康二 |
| Assistant | Sachiko Arai 新井 祥子(~2023. 3) |
| Residents | Hiroyuki Sakaguchi 坂口 裕之, Shigeki Sato 佐藤 成樹 |
| Assistant Staff | Tomoko Kohori 小堀 朋子 Yumemi Nakamura 中村 夢美(~2023. 3) Mayumi Takeda 竹田 真由美(~2023. 3) Akiko Matsuhisa 松久 昭子(2023. 4~) |

【 Abstract 】

In the clinical practice, we treated the various types of cancer patients with anticancer agents, including targeted drugs and immune checkpoint inhibitors. Furthermore, as a working unit of the Outpatients Chemotherapy Center and the Cancer Genomic Medicine Center in Kanazawa University Hospital, we managed outpatient chemotherapy and practiced cancer genome medicine, including comprehensive gene panel testing.

As basic researches, we investigated the mechanisms of tolerance and acquired resistance to entrectinib, which is approved for solid tumors with *NTRK* gene rearrangement and non-small cell lung cancer (NSCLC) with *ROS1* gene rearrangement, focusing on the growth factors produced by the tumor microenvironment, including hepatocyte growth factor (HGF) produced by tumor-associated fibroblasts. Among the growth factors assessed, HGF most potently induced entrectinib resistance in *NTRK1*-rearranged colon cancer KM12SM cells and *ROS1*-rearranged NSCLC HCC78 cells by activating its receptor MET. HGF-induced entrectinib resistance was reversed by the active-HGF-specific macrocyclic peptide HiP-8 and the MET kinase inhibitor capmatinib *in vitro*. In addition, HGF-producing fibroblasts promoted entrectinib resistance *in vitro* (culture model) and *in vivo* (subcutaneous tumor model). The use of capmatinib circumvented entrectinib resistance in a subcutaneous tumor model inoculated with KM12SM and HGF-producing fibroblasts. Our findings suggest that growth factors in the tumor microenvironment, such as HGF, may induce resistance to entrectinib in tumors with *NTRK1* or *ROS1* rearrangements. Our results further suggest that optimally coadministering inhibitors of resistance-inducing growth factors may maximize the therapeutic efficacy of entrectinib.

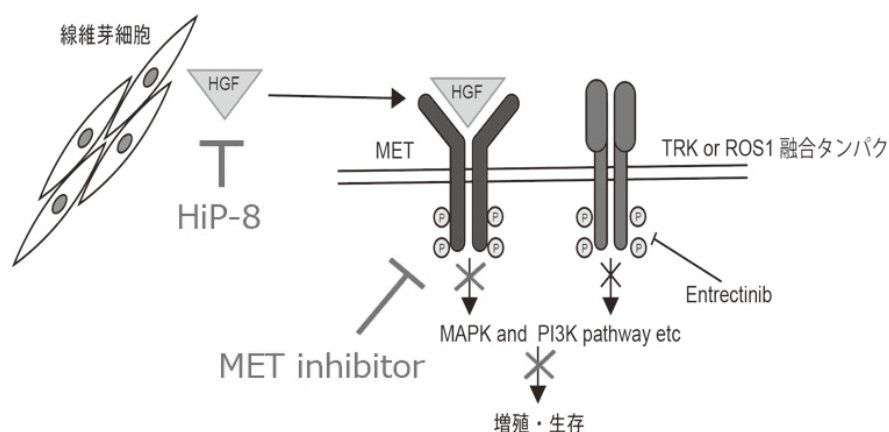
<2023 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

1. 臨床的活動

臨床的には、臓器横断的ながん患者の分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬を含む薬物治療を外来および入院で行った。さらに、外来化学療法センターおよびがんゲノム医療センターの実働部隊として、それぞれ外来化学療法の運営と、がん遺伝子パネル検査を含むがんゲノム医療を実践した。

2. 研究活動

基礎研究としては、NTRK 遺伝子再構成を有する固形がんおよび ROS1 遺伝子再構成を有する非小細胞肺癌 (NSCLC) に対して承認されているエヌトレクチニブに対する耐性と耐性獲得のメカニズムを、腫瘍関連線維芽細胞によって産生される肝細胞増殖因子 (HGF) を含む腫瘍が産生する増殖因子に焦点を当てて検討した。評価した増殖因子の中で、HGF はその受容体 MET を活性化することにより、NTRK1 再構成結腸がん細胞 (KM12SM) および ROS1 再構成 NSCLC 細胞 (HCC78) においてエヌトレクチニブ耐性を最も強力に誘導した。HGF が惹起したエヌトレクチニブ耐性は、活性型 HGF 特異的環状ペプチド (HiP-8) と MET キナーゼ阻害薬 (カプマチニブ) によって *in vitro* において抑制された。さらに、HGF 産生線維芽細胞は、*in vitro* (培養モデル) および *in vivo* (皮下腫瘍モデル) でエヌトレクチニブ耐性を促進した。KM12SM および HGF 産生線維芽細胞を接種した皮下腫瘍モデルにおいて、エントレクチニブ耐性が克服された。これらの結果から、HGF などの腫瘍微小環境内の成長因子が、NTRK1 や ROS1 再構成を伴う腫瘍においてエヌトレクチニブに対する耐性を誘導するが示唆された。さらに、耐性を誘導する増殖因子の阻害薬を適切に併用することで、エヌトレクチニブの治療効果を最大化できることが示唆された。



今後も、様々ながん種における分子標的薬耐性の分子機構を解明し、耐性克服治療の開発を目指した研究を継続する予定である。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. **Cancer Med.** 2023 Mar;12(5):5809-5820. doi: 10.1002/cam4.5342. Epub 2022 Nov 23.

(共同研究)

1. Umemoto K, Sunakawa Y, Ueno M, Furukawa M, Mizuno N, Sudo K, Kawamoto Y, Kajiwaru T, Ohtsubo K, Okano N, Matsushashi N, Itoh S, Matsumoto T, Shimizu S, Otsuru T, Hasegawa H, Okuyama H, Ohama H, Moriwaki T, Ohta T, Odegaard JI, Nakamura Y, Bando H, Yoshino T, Ikeda M, Morizane C. Clinical significance of circulating-tumour DNA analysis by metastatic sites in pancreatic cancer. **Br J Cancer.** 2023 Apr;128(8):1603-1608. doi: 10.1038/s41416-023-02189-y. Epub 2023 Feb 13.
2. Ando K, Nakamura Y, Kitao H, Shimokawa M, Kotani D, Bando H, Nishina T, Yamada T, Yuki S, Narita Y, Hara H, Ohta T, Esaki T, Hamamoto Y, Kato K, Yamamoto Y, Minashi K, Ohtsubo K, Izawa N, Kawakami H, Kato T, Satoh T, Okano N, Tsuji A, Yamazaki K, Yoshino T, Maehara Y, Oki E. Mutational spectrum of TP53 gene correlates with nivolumab treatment efficacy in advanced gastric cancer (TP53MUT study). **Br J Cancer.** 2023 Oct;129(6):1032-1039. doi: 10.1038/s41416-023-02378-9. Epub 2023 Aug 2.
3. Aoki Y, Nakamura Y, Denda T, Ohta T, Esaki T, Shiozawa M, Yamaguchi K, Yamazaki K, Sunakawa Y, Kato T, Okano N, Taniguchi H, Sato T, Oki E, Nishina T, Komatsu Y, Matsushashi N, Goto M, Yasui H, Ohtsubo K, Moriwaki T, Takahashi N, Horita Y, Boku S, Wakabayashi M, Ikeno T, Mitani R, Yuasa M, Yoshino T. Clinical Validation of Plasma-Based Genotyping for *RAS* and *BRAF* V600E Mutation in Metastatic Colorectal Cancer: SCRUM-Japan GOZILA Substudy. **JCO Precis Oncol.** 2023 Jun;7:e2200688. doi: 10.1200/PO.22.00688.
4. Nakamura Y, Yamashita R, Okamoto W, Komatsu Y, Yuki S, Ueno M, Kato K, Taniguchi H, Kagawa Y, Denda T, Hara H, Esaki T, Moriwaki T, Sunakawa Y, Oki E, Nagashima F, Nishina T, Satoh T, Kawakami H, Yamaguchi K, Ohtsubo K, Kato T, Horita Y, Tsuji A, Yasui H, Goto M, Hamamoto Y, Wakabayashi M, Ikeno T, Shitara K, Bando H, Tsuchihara K, Miki I, Ichiki H, Ohtsu A, Yoshino T. Efficacy of Targeted

Trials and Signaling Pathway Landscape in Advanced Gastrointestinal Cancers From SCRUM-Japan GI-SCREEN: A Nationwide Genomic Profiling Program. **JCO Precis Oncol.** 2023 Mar;7:e2200653. doi: 10.1200/PO.22.00653.

5. Fujiwara Y, Kuboki Y, Furukawa M, Mizuno N, Hara H, Ioka T, Ueno M, Takahashi Y, Takahashi S, Takeuchi S, Lihou C, Ji T, Tian C, Shimizu T. FIGHT-102: A phase 1 study of pemigatinib in Japanese patients with advanced malignancies. **Cancer Med.** 2023 May;12(9):10597-10611. doi: 10.1002/cam4.5798. Epub 2023 Mar 31. Clinical Trial.
6. Yamamoto M, Terashima T, Yamashita T, Seki A, Nakagawa H, Nio K, Shimakami T, Takatori H, Arai K, Mizukoshi E, Honda M, Takeuchi S, Yamashita T. Successful second-line treatment with cabozantinib for hepatocellular carcinoma harboring cytoplasmic mesenchymal-epithelial transition factor amplification. **Hepatol Res.** 2023 Oct 10. doi: 10.1111/hepr.13975. Online ahead of print.
7. Yoshimura A, Yamada T, Serizawa M, Uehara H, Tanimura K, Okuma Y, Fukuda A, Watanabe S, Nishioka N, Takeda T, Chihara Y, Takemoto S, Harada T, Hiranuma O, Shirai Y, Shukuya T, Nishiyama A, Goto Y, Shiotsu S, Kunimasa K, Morimoto K, Katayama Y, Suda K, Mitsudomi T, Yano S, Kenmotsu H, Takahashi T, Takayama K. High levels of AXL expression in untreated EGFR-mutated non-small cell lung cancer negatively impacts the use of osimertinib. **Cancer Sci.** 2023 Feb;114(2):606-618. doi: 10.1111/cas.15608. Epub 2022 Nov 11.
8. Caswell DR, Gui P, Mayekar MK, Law EK, Pich O, Bailey C, Boumelha J, Kerr DL, Blakely CM, Manabe T, Martinez-Ruiz C, Bakker B, De Dios Palomino Villcas J, I Vokes N, Dietzen M, Angelova M, Gini B, Tamaki W, Allegakoen P, Wu W, Humpton TJ, Hill W, Tomaschko M, Lu WT, Haderk F, Al Bakir M, Nagano A, Gimeno-Valiente F, de Carné Trécesson S, Vendramin R, Barbè V, Mugabo M, Weeden CE, Rowan A, McCoach CE, Almeida B, Green M, Gomez C, Nanjo S, Barbosa D, Moore C, Przewrocka J, Black JRM, Grönroos E, Suarez-Bonnet A, Priestnall SL, Zverev C, Lighterness S, Cormack J, Olivás V, Cech L, Andrews T, Rule B, Jiao Y, Zhang X, Ashford P, Durfee C, Venkatesan S, Temiz NA, Tan L, Larson LK, Argyris PP, Brown WL, Yu EA, Rotow JK, Guha U, Roper N, Yu J, Vogel RI, Thomas NJ, Marra A, Selenica P, Yu H, Bakhoun SF, Chew SK, Reis-Filho JS, Jamal-Hanjani M, Vousden KH, McGranahan N, Van Allen EM, Kanu N, Harris RS, Downward J, Bivona TG, Swanton C. The role of APOBEC3B in lung tumor evolution and targeted cancer therapy resistance. **Nat Genet.** 2023 Dec. doi:10.1038/s41588-023-01592-8. Epub ahead of print.

9. Ramkumar K#, Tanimoto A# (#: Co-first authors), Della Corte C. M, Stewart C. A, Wang Q, Shen L, Cardnell R. J, Wang J, Polanska U. M, Andersen C, Saeh J, Pease J. E, Travers J, Fabbri G, Gay C. M, Urosevic J, Byers L. A. Targeting BCL2 overcomes resistance and augments response to aurora kinase B inhibition by AZD2811 in small cell lung cancer. **Clin Cancer Res.** 2023;29(16):3237-49. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-23-0375.
10. Zhou Y, Oki R, Tanaka A, Song L, Takashima A, Hamada N, Yokoyama S, Yano S, Sakurai H. Cellular stress induces non-canonical activation of the receptor tyrosine kinase EphA2 through the p38-MK2-RSK signaling pathway. **J Biol Chem.** 2023 May;299(5):104699. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104699.
11. Taniguchi H, Akagi K, Dotsu Y, Yamada T, Ono S, Imamura E, Gyotoku H, Takemoto S, Yamaguchi H, Sen T, Yano S, Mukae H. Pan-HER inhibitors overcome lorlatinib resistance caused by NRG1/HER3 activation in ALK-rearranged lung cancer. **Cancer Sci.** 2023 Jan;114(1):164-173. doi: 10.1111/cas.15579.
12. Koizumi T, Nishino Y, Takiguchi T, Kanda S, Otsuki K, Tanaka Y, Tomita R, Araki T, Hayashi R, Yasumoto K, Uramoto H, Hirono Y, Makino T, Nakada M, Yano S. Epidemiological and therapeutic analyses in lung cancer patients over 80 years old in the Hokushin Region: a retrospective hospital administrative database study. **Clin Lung Cancer.** 2023 Mar;24(2):145-152. doi: 10.1016/j.clcc.2022.12.001.
13. Kobayashi T, Nishino Y, Takiguchi T, Kanda S, Otsuki K, Tanaka Y, Nakazawa Y, Ito KI, Hayashi R, Yasumoto K, Uramoto H, Hirono Y, Makino T, Nakada M, Yano S, Koizumi T. Epidemiological and therapeutic profiles of lung cancer patients in the Hokushin Region Japan: a retrospective hospital administrative database study. **BMC Pulm Med.** 2023 Sep 1;23(1):322. doi: 10.1186/s12890-023-02610-5.
14. Asano Y, Yamamoto N, Demura S, Hayashi K, Takeuchi A, Kato S, Miwa S, Igarashi K, Higuchi T, Taniguchi Y, Morinaga S, Sone T, Okuda M, Matsumoto I, Yano S, Tsuchiya H. Novel predictors of immune checkpoint inhibitor response and prognosis in advanced non-small-cell lung cancer with bone metastasis. **Cancer Med.** 2023 Jun;12(11):12425-12437 doi: 10.1002/cam4.5952.
15. Tsukida S, Watanabe S, Hongo M, Murase Y, Yamamoto Y, Kase K, Terada N, Koba Y, Tambo Y, Yano S. Unexpected diffuse alveolar hemorrhage following bronchoscopy. **Chest.** 2023 Sep;164(3):e71-e74. doi: 10.1016/j.chest.2023.04.027.

16. Hara J, Yamamura K, Sakai T, Takeda Y, Kobayashi T, Ohkura N, Watanabe S, Tambo Y, Kimura H, Abo M, Kasahara K, Yano S. Bronchial thermoplasty attenuates cough reflex sensitivity in severe asthma : a single-center retrospective study with 2-year follow-up. **J Med Invest**. 2023;70(1.2):271-275. doi: 10.2152/jmi.70.271.
17. Ide T, Nishino Y, Takiguchi T, Kanda S, Otsuki K, Hayashi R, Yasumoto K, Hirono Y, Makino T, Yano S, Koizumi T. Multi-institutional survey of antiemetic therapy in lung cancer patients treated with carboplatin in Hokushin region. **BMC Pulm Med**. 2023 Jun 26;23(1):228. doi: 10.1186/s12890-023-02524-2.

著書・総説

1. 小谷 浩. 新しいバイオマーカーと分子標的治療の展開. エピゲノム標的薬
腫瘍内科 32(4):378-382, 2023

<学会発表>

1. 第 20 回日本臨床腫瘍学会学術集会 西山明宏, 竹内伸司, 渡邊 淳, 関屋智子, 田嶋 敦, 池田博子, 木下雅史, 中田光俊, 矢野聖二. AYA 世代 TMB-High 膠芽腫と抗 PD-1 抗体ペムブロリズマブ奏効との関係. 2023 年 3 月 福岡
2. 第 109 回日本消化器病学会総会 ワークショップ 大坪公士郎, 三宅邦夫, 矢野聖二. 膵胆道疾患におけるリキッドバイオプシーを用いた miRNA のメチル化異常の検討. 2023 年 4 月 長崎
3. 令和 5 年度金沢市医師会卒後研修セミナー 矢野聖二. がん治療薬の最新情報. 2023 年 5 月 金沢
4. 第 27 回日本がん分子標的治療学会 片山勇輝, 谷村恵子, 森本健司, 矢野聖二, 堀中真野, 酒井敏行, 山田忠明. RET 融合遺伝子陽性がんにおける HER3 シグナル活性化を介した初期治療抵抗性機構の解明. 2023 年 6 月 佐賀
5. 第 53 回日本膵臓学会大会 大坪公士郎, 三宅邦夫, 来間佐和子, 仲程 純, 菊山正隆, 山下 要, 矢野聖二. 内視鏡下採取及び血液検体を用いた各種膵胆道疾患における miRNA のメチル化異常の検討. 2023 年 7 月 福岡
6. 第 82 回日本癌学会学術総会 森本健司, 山田忠明, 平井聡一, 片山勇輝, 矢野聖二, 堀中真野, 酒井敏行, 徳田深作, 高山浩一. KRAS-G12C 陽性肺がんにおける AXL の活性化を介した KRAS-G12C 阻害薬初期治療抵抗性. 2023 年 9 月 横浜

7. 第 82 回日本癌学会学術総会 片山 勇, 山田忠明, 谷村恵子, 森本健司, 矢野聖二, 堀中真野, 酒井敏行, 高山浩一. RET 変異がんにおける HER3 活性化を介したセルペルカチニブに対する治療抵抗性に関する基礎的検討. 2023 年 9 月 横浜
8. 第 82 回日本癌学会学術総会 小谷 浩, 矢野聖二. MYC 発現型 KRAS 変異がんに対する SUMO 化と MEK の二重阻害. 2023 年 9 月 横浜
9. 第 82 回日本癌学会学術総会 福田康二, 竹内伸司, 新井祥子, 南條成輝, 矢野聖二. EGFR 変異髄膜癌モデルにおける ARID1A 変異によるオシメルチニブ耐性獲得とその克服治療の確立. 2023 年 9 月 横浜
10. 第 31 回日本消化器関連学会週間 (第 106 回日本消化器内視鏡学会総会) 大坪公士郎, 山下 要, 矢野聖二. 非アルコール性早期慢性膵炎における長期予後に関する検討. 2023 年 11 月 神戸
11. 第 64 回日本肺癌学会学術集会 西山明宏, 佐藤成樹, 坂口裕之, 小谷 浩, 南條成輝, 山下 要, 竹内伸司, 大坪公士郎, 矢野聖二. 患者検体より樹立した KIF5B-RET 融合遺伝子陽性肺がん細胞株の有用性・優位性について. 2023 年 11 月 千葉
12. 第 64 回日本肺癌学会学術集会 南條成輝, Tej Azad, 矢野聖二, Maximilian Diehn. 脳脊髄液腫瘍由来 DNA (CSF-tDNA) を用いた EGFR 変異肺癌中枢神経系転移における治療最適化. 2023 年 11 月 横浜
13. 第 64 回日本肺癌学会学術集会 福田康二, 竹内伸司, 新井祥子, 南條成輝, 小谷 浩, 西山明宏, 矢野聖二. TP53 変異型 KRAS 陽性非小細胞肺癌における WEE1 を標的とした新規治療法の開発. 2023 年 11 月 千葉
14. 第 13 回日本臨床腫瘍学会北信越地区セミナー発表 佐藤成樹, 坂口裕之, 小谷 浩, 西山明宏, 山下 要, 大坪公士郎, 竹内伸司. Her2 陽性涙腺癌に対して Trastuzumab と Docetaxel 併用療法が著効した 1 例. 2023 年 12 月 Web

<学会発表・国際>

1. AACR Annual Meeting2023. Azusa Tanimoto, Benjamin B Morris, Bingnan Zhang, Kavya Ramkumar, Robert J. Cardnell, Shen Li, Qi Wang, C. Allison Stewart, Carl M. Gay, Jing Wang, Lauren Averett Byers. TNIK inhibition as a novel therapeutic in c-Myc high/TTF1 low SCLC. 2023 年 4 月 米国オーランド

<外部資金>

1. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業
矢野聖二 研究分担者
代謝型グルタミン酸受容体を標的としたがん脳転移治療法の開発 2,700千円
2. 基盤研究 (C) 日本学術振興会
大坪公士郎 研究代表者
膵癌高危険群における膵液中マイクロRNAとエピゲノム解析による
早期診断法の確立 900千円
3. 基盤研究 (C) 日本学術振興会
山下 要 研究分担者
膵癌高危険群における膵液中マイクロRNAとエピゲノム解析による
早期診断法の確立 200千円
4. 基盤研究 (B) 日本学術振興会
南條成輝 研究分担者
EGFR 変異肺がんを共存変異で層別化する個別化医療の理論的基盤を
形成する研究 500 千円
5. 基盤研究 (C) 日本学術振興会
南條成輝 研究代表者
分子標的治療誘導性転移の新規分子機構の解明と予防法の確立 1,250千円
6. 若手研究 日本学術振興会
小谷 浩 研究代表者
SUMO化阻害を基軸としたMYC関連悪性腫瘍に対する新規治療法開発 1,800千円
7. 基盤研究 (C) 日本学術振興会
福田康二 研究代表者
EGFR 肺癌の髄膜癌腫症における EGFR-TKI 耐性克服治療の開発 900 千円
8. 肺癌研究助成 (Grant for Lung Cancer Research) 日本肺癌学会
南條成輝 研究代表者
Kras 変異肺癌髄膜癌腫症マウスモデルを用いた Kras 阻害薬中枢神経系耐性の
克服治療開発 1,000 千円

9. 金沢大学附属病院 令和5年度戦略的研究推進プログラム B4 プロジェクト
竹内伸司 研究分担者
肺がんの分子標的薬耐性を克服する拠点の形成 500 千円
10. 金沢大学附属病院 令和5年度戦略的研究推進プログラム B4 プロジェクト
南條成輝 研究分担者
肺がんの分子標的薬耐性を克服する拠点の形成 500 千円
11. 金沢大学附属病院 令和5年度戦略的研究推進プログラム B4 プロジェクト
小谷 浩 研究分担者
肺がんの分子標的薬耐性を克服する拠点の形成 500 千円
12. 金沢大学附属病院 令和5年度戦略的研究推進プログラム B4 プロジェクト
福田康二 研究分担者
肺がんの分子標的薬耐性を克服する拠点の形成 500 千円
13. 燦燈(SANTO)プロジェクト 金沢大学
南條成輝 研究代表者
EGFR 変異肺腺癌組織標本における空間分解トランスクリプトーム (SRT) と多重
イオンビームイメージング (MIBI) を用いた EGFR 阻害薬耐性機構の解析
1,000 千円
14. 大鵬薬品工業株式会社研究助成金
矢野聖二
膵癌高危険群における膵液を用いた網羅的早期診断法の確立 400 千円

<その他>

1. 教育プログラムの運営

- 1) 文部科学省 平成29年度大学教育再生戦略推進費：多様なニーズに対応する
「がん専門医療人材（がんプロフェッショナル）」養成プラン「超少子高齢
化地域での先進的がん医療人養成」（北信がんプロ）を事業責任者として推
進
- 2) 石川県がん診療連携協議会研修会開催（3月23日，7月13日，10月26日）

2. がんゲノム医療の提供

金沢大学附属病院がんゲノム医療センターで，保険診療による遺伝子パネル検査
を実施（157件）

3. 外来化学療法提供

金沢大学附属病院で外来化学療法センターを運営

4. 金沢大学ナノ生命科学研究所
生命科学領域の研究室として参画

5. 金沢大学卓越大学院
ナノ先制医学コース教員として参画

中央実験施設

Central Research Resource Branch 中央実験施設

Professors

Atsushi Hirao 平尾 敦

Associate Professors

Yoshio Endo 遠藤 良夫, Kouji Kuno 久野 耕嗣

【 Abstract 】

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

Previously, we demonstrated that the Schiff base derivative TX-816 enhances the effect of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (ALA-based PDT) by facilitating intracellular PpIX. However, in aqueous solution, TX-816 is rapidly hydrolyzed to 3,5-dichlorosalicylaldehyde (DCSA) and 2-chloro-4-nitroaniline (CNA). Recently, we found that a TX-816 derivative (YS3-35) in which CNA was substituted with dasatinib has a strong enhancing effect on ALA-based PDT. In the present study, we examined the stability of YS3-35 in ethanol solution using the TLC method. We found that YS3-35 was very stable in ethanol solution after 48 h at room temperature, whereas TX-816 was completely hydrolyzed within a few minutes. Moreover, YS3-35 inhibited the phosphorylation of the Src family proteins in cancer cells to the same extent as dasatinib did. These findings suggest that DCSA combined with tyrosine kinase inhibitor as a Schiff base may play an important role as an ALA-PDT sensitizer. However, further enhancement of ALA-based PDT requires more efficient dissociation of DCSA from YS3-35 after incorporation into cancer cells. Structural improvements in YS3-35 and the molecular design of a novel Schiff base derivative combined with other tyrosine kinase inhibitor are planned.

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

ADAMTS-1 is an extracellular matrix (ECM)-anchored metalloproteinase that degrades ECM molecules such as proteoglycans and regulates ECM remodeling. Our previous studies showed that ADAMTS-1 is involved in the ovulatory process and in the ovarian follicular development. Recently, we found that ADAMTS-1 null mice on a BALB/c background exhibited impaired parturition. Uterine strips prepared from ADAMTS-1 null mice of the prepartum period showed reduced contractile responses to uterotonins. ADAMTS-1 null mice also showed significantly reduced expression of uterine genes encoding for contraction-associated proteins (CAPs) on gestation day 19, suggesting that ADAMTS-1 participates in the induction of CAP genes prior to onset of labor in mouse uteri. Immunohistochemical staining using anti-ADAMTS1 antibodies revealed that ADAMTS1 protein is expressed in both uterine smooth muscle and decidual layers on gestation day 19. We are currently investigating the role of ADAMTS-1 in the activation processes of both myometrial and decidual layers during the prepartum period as well as the cervical ripening process.

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

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

5-アミノレブリン酸(ALA)は、がん細胞内で代謝活性化される新世代の光感受性物質としてがんの光線力学的診断や治療(PDT)に用いられている。これまでの研究で、我々は5-アミノレブリン酸(ALA)との同時処理により細胞内 PpIX 量を増加させて光線力学的診断や治療 PDT 効果を増強するシッフ塩基化合物 TX-816 を見出した。しかし、TX-816 は水溶液中で容易に加水分解を受けることから、安定かつ多機能性を有する新規誘導体として TX-816 の CNA 部位をチロシンキナーゼ阻害薬であるダサチニブに置換した YS3-35 および YS3-35 の炭素-窒素二重結合を還元的アミノ化した YS6-39 を合成した。ABCG2 を高発現し、ヒト PEPT1 を強制発現させたヒト腫瘍細胞に対する ALA-PDT の効果増強活性を検討した結果、YS3-35 は YS6-39 やダサチニブよりも強い ALA-PDT 効果増強活性を示した。本年度の研究では、YS3-35 はダサチニブと同程度の細胞内 c-Src のリン酸化阻害作用を有することや溶液中でも安定でほとんど加水分解を受けないことなどを明らかにした。がん細胞において効果的な効果増強活性が発揮させるためには、細胞内で効果的に YS3-35 から DCSA が解離される必要があることから、今後、YS3-35 のさらなる構造変換と CNA 部位に導入するチロシンキナーゼ阻害剤について検討を行う予定である。

ADAMTS-1 の雌生殖機能における役割の解析 (久野)

ADAMTS-1^{-/-}マウス(129/B6 遺伝子背景)は、卵胞生育過程における異常や排卵障害を示すが、一方 BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1^{-/-}マウスは分娩時の異常を示す。分娩前の ADAMTS-1^{-/-}マウスから調製した子宮条片を用いた子宮筋収縮実験では、Oxytocin, プロスタグランジンへの収縮応答性が低下し、また自発収縮力の低下していることをこれまでに見いだしている。また妊娠 19 日目、分娩前の ADAMTS-1^{-/-}マウスの子宮では、Oxytocin receptor, Connexin43 などの収縮調節タンパク(CAP)遺伝子群の発現の低下が認められることから、ADAMTS-1 は分娩前の子宮において、これら CAP 遺伝子群の発現が誘導される過程に必要であることが示唆された。またその特異性を検証した ADAMTS1 抗体を用いて免疫組織染色を行った結果、妊娠 19 日目分娩前の子宮組織では、平滑筋層および脱落膜層双方で ADAMTS-1 タンパクの発現が認められた。現在、分娩前の子宮脱落膜層および平滑筋層の活性化過程や組織構築における ADAMTS-1 の役割、また子宮頸管熟化過程における役割について詳しい解析を行っている。また ADAMTS-1 によるがん微小環境の制御についても解析を行う。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

著書・総説（共同研究）

1. Ravdandorj Odongoo, I. Ketut Gunarta, Purev Erdenebaatar, Ryusuke Suzuki, Makiko Meguro-Horike, Shin-ichi Horike, Yoshio Endo, Toshihiro Fujii, Rikiro Fukunaga, Katsuji Yoshioka: Overlapping role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) 1 and 2 in imidazole ketone erastin-induced ferroptosis. *Gene Reports* 2023 December 33 (2023) 101813. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2023.101813>.

< 学会発表 >

1. 遠藤良夫, 宇都 義浩, 篠原 侑成, 安部 千秋, 小幡 徹, 小倉 俊一郎, 米村 豊: ABCG2阻害性チロシンキナーゼ阻害剤をリードとする5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対する効果増強剤の開発 日本薬学会第143年会 2023年3月25日-28日（札幌, 北海道大学）
2. Yoshio Endo, Yoshihiro Uto, Yusei Shinohara, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura: Development of a novel TKI derivative for enhancing the anticancer potential of 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. The 82th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. Pacific Convention Plaza Yokohama (PACIFICO Yokohama)
3. 森本華真, 小宮悠生, 篠原侑成, 二宮致, 遠藤良夫, 滝野隆久, 宇都義浩: アミロライドの構造活性相関による新規 Na⁺/H⁺交換輸送体5選択的阻害剤の創製 第40回メディシナルケミストリーシンポジウム 2023年11月13日-15日（名古屋, 名古屋大学豊田講堂）

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) 代表: 遠藤 良夫 (直接経費: 1,000千円)
多機能性チロシンキナーゼ阻害薬の創出とがん光線力学療法への応用研究

人材育成プログラム

Inflammation and Epithelial Plasticity

上皮可塑性・炎症ユニット

Associate Professor Dominic Chih-Cheng VOON
Graduate students Sarah Momtazkari (D2) (Co-supervisor: Chiaki Takahashi)
 Anahita Dev Choudhury (D2)
 Thanh Dong Le (D2) (Co-supervisor: Kenichi Harada)

【 Abstract 】

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

< 2023 research achievement and future plan >

We continue to deepen our investigation on the molecular mechanism through which epithelial IL23A (eIL23A) augments canonical IL-23 in the production of proinflammatory cytokines to induce tumor immunity. We previously observed that the phosphorylation of STAT3 and STAT1 were elevated by the co-treatment of eIL23A in a time- and dose-dependent manner in Kit225 T-CLL cells. In the past year, we have established a Th17/ILC3 gene signature with which we can determine if eIL23A enhances the effector functions of IL-23. To elucidate the molecular mechanism of augmentation, in collaboration with Hirotaka Takahashi (Ehime University) we have established a proximity biotinylation assay to empirically identify the extracellular and intracellular molecular partners of eIL23A during its secretion and juxtacrine signaling. During this year, we continue a fruitful collaboration with Jun Won Park (Kangwon National University; Korea), in which we study the *in vivo* contribution of epithelial IL23A by analyzing the *Il23a* conditional knockout mouse tissues during *Helicobacter*-induced gastric inflammation. Our current focus is in completing our study into the interplay between IL-23 and IL-2 in Th17/ILC3 phenotype in Kit225 cells.

【 Achievements 】

<Publications (Primary)>

1. An HW, Seok SH, Kwon JW, Choudhury AD, Oh JS, Voon DC*, Kim DY* and Park JW* (2022) *The loss of epithelial Smad4 drives immune evasion via Cxcl1 while displaying a vulnerability to combinatorial immune checkpoint blockade in gastric cancer*. *Cell Reports*, **41**(13):111878. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111878 *Joint Corresponding Authors

<Publications (Collaboration)>

1. Ma M, Wu M, Gu X, Yang J, Wang C, Zhang Y, Cheng S, Xu S, Zhang M, Wu Y, Zhao Y, Tian X, Voon DC, Sheng J, Wang Y. *Inactivation of CSGALNACT2 Promotes Ovarian Cancer Migration and Invasion Through the MAPK/ERK Signaling Pathway*. *Cell. Oncol.* doi: 10.1007/s13402-023-00903-9.
2. Li MJ, Nishimura T, Takeuchi Y, Hongu T, Wang Y, Shiokawa D, Wang K, Hirose H, Sasahara A... Tojo A, Voon DC, Ogawa S, Okamoto K, Foukakis T, Gotoh N (2023) *FXVD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters*. *J. Clin. Invest.* 133(22):e166666.
3. Yang J, Wang C, Zhang Y, Cheng S, Voon DC, Wu M, Gu S, Xu S, WU Y Wu, Wang Y (2023) *Clinical Significance and Immune Infiltration Analyses of a Novel Coagulation-related Signature in Ovarian Cancer*. *Cancer Cell International*. 23(1):232.
4. Kwon J-W, Oh JS, Seok SH, An HW, Lee YJ, Lee NY, Ha TH, Kim HA, Yoon WM, Kim SE, Oh PR, Lee SH, Voon DC, Kim DY, Park JW (2023) *Combined inhibition of Bcl-2 family members and YAP induces synthetic lethality in metastatic gastric cancer with RAS1 and NF2 deficiency*. *Mol Cancer*, **22**: 156.
5. Imamura R, Sato H, Voon DC, Shirasaki T, Honda M, Kurachi M, Sakai K*, and Matsumoto K* (2023) *Met Receptor is Essential for MAVS-Mediated Antiviral Innate Immunity in Epithelial Cells Independent of its Kinase Activity*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **120**(40):e2307318120. DOI: 10.1073/pnas.2307318120

<Conference Presentation>

1. Sarah Momtazkari , Kason K. Koo, Anahita D. Choudhury, Thank D. Le, Tuan Z. Tan, Seiichi Mori, Masaharu Hazawa, Richard W. Wong, Kenichi Harada, Chiaki Takahashi, Yoshiaki Ito, **Dominic C. Voon** (2023) *RUNX3 and p53 act cooperatively to induce S100A2 in gastric epithelial cells in response to DNA damage*. Oral presentation at the 82nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 21st-23rd September 2023, Yokohama, Japan.

<2023 Research Funds>

Not applicable.

Cancer-Immune System Interactions

がん-免疫系相互作用ユニット

Associate Professor Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

【 Abstract 】

Pyroptosis is a pro-inflammatory form of regulated necrosis caused after the formation of plasma membrane pores by gasdermin (GSDM) family proteins that are activated by cleavage by specific proteases. This study is progressing in the identification of novel proteases that activate GSDM. In this study, it was discovered that caspase-12 derived from several species activates GSDMD. Furthermore, it was revealed that caspase-12 is activated by bacterial-derived molecular patterns, suggesting that this molecule may function as a novel pathogen sensor. Analysis of the activation mechanism of caspase-12 revealed that approximately 100 amino acid residues at the N-terminus of the molecule are involved in ligand recognition. The results also suggested that caspase-12 multimerizes in the presence of the ligand. Moreover, exploration is underway for proteases derived from bacteria/fungi that activate GSDM. It was suggested that a protease produced by the *Aeromonas* genus bacteria can activate human GSDMD.

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

パイロトーシスと呼ばれるネクローシス様のプログラム細胞死は、炎症生物質を放出することで炎症を惹起し、生体防御やがん免疫の活性化などに寄与する。ガスダーミンファミリー分子 (GSDM) は、パイロトーシスの実行因子であり、特定のプロテアーゼによって切断されることで活性化する。本研究では GSDM を活性化する新規プロテアーゼの同定を進めている。

本研究において、特定の生物種由来のカスパーゼ-12 が GSDMD を活性化することがわかった。さらに、カスパーゼ-12 が細菌由来分子パターンによって活性化されることが明らかになり、同分子が新しい病原体センサーである可能性が示唆された。カスパーゼ-12 の活性化機序について解析を行った結果、同分子の N 末側の約 100 アミノ酸残基がリガンド認識に関わることがわかった。また、カスパーゼ-12 がリガンド存在下で多量体化する可能性が示された。

その他、GSDM を活性化させる細菌/真菌由来のプロテアーゼの探索を行っている。新たに *Aeromonas* 属菌が産生するプロテアーゼがヒト GSDMD を活性化することが示唆された。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

Inaba Y, Hashiuchi E, Watanabe H, Kimura K, Oshima Y, Tsuchiya K, Murai S, Takahashi C, Matsumoto M, Kitajima S, Yamamoto Y, Honda M, Asahara SI, Ravnskjaer K, Horike SI, Kaneko S, Kasuga M, Nakano H, Harada K, Inoue H. The transcription factor ATF3 switches cell death from apoptosis to necroptosis in hepatic steatosis in male mice. *Nat Commun*, 14:167, 2023.

Ogura K, Endo M, Hase T, Negami H, Tsuchiya K, Nishiuchi T, Suzuki T, Ogai K, Sanada H, Okamoto S, Sugama J. Potential biomarker proteins for aspiration pneumonia detected by shotgun proteomics using buccal mucosa samples: a cross-sectional case-control study. *Clin Proteomics*, 20:9, 2023.

総説

Hernández-Cuellar E, Tsuchiya K, Valle-Ríos R, Medina-Contreras O. Differences in Biofilm Formation by Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible *Staphylococcus aureus* Strains. *Diseases*, 11:160, 2023.

< 学会発表 >

Kohsuke Tsuchiya, Shoko Hosojima¹ and Takashi Suda. A novel pyroptosis-inducing protease that senses bacteria-derived molecular patterns. The 3rd Japan and Australia Meeting on Cell Death 2023. 2023年8月16~18日 (メルボルン).

土屋晃介. 溶解性細胞死パイロトーシスの分子機序と感染における役割. 第35回微生物シンポジウム. 2023年9月1~2日 (岡山).

土屋晃介, 細島祥子, Eduardo Hernández Cuellar¹, 須田貴司. カスパーゼ-12は細菌リポペプチドを認識してパイロトーシスを誘導する. 第33回日本生体防御学会学術総会. 2023年9月28~30日 (京都).

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 基盤研究(B)「細菌由来分子を認識する新たなパターン認識受容体の機能解析と応用」(土屋晃介) (代表) 全体期間: 2023 ~ 2026 年度 配分額 (2023 年度): 400 千円
2. 科学研究費補助金 挑戦的研究 (萌芽)「ガスダーミン・ファミリー分子を成熟化させる細菌・真菌由来プロテアーゼの探索」(土屋晃介) (代表) 全体期間: 2022 ~ 2024 年度 配分額 (2024 年度): 1,200 千円
3. AMED 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「過栄養による肝細胞死の様式変容とその生活習慣病発症・増悪のメカニズムの解明」(土屋晃介) (分担) 全体期間: 2021 ~ 2023 年度 配分額 (2023 年度): 1,000 千円

Microenvironment Regulation in Cancer Stem Cells Unit

がん幹細胞環境制御ユニット

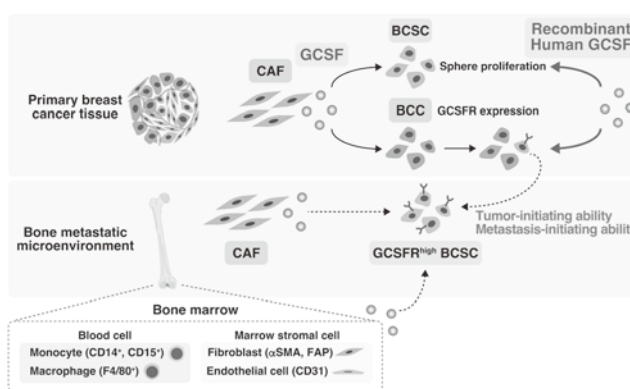
Assistant Professor

Yasuto Takeuchi 竹内 康人

【 Abstract 】

Cancer stem cells (CSCs) have been reported to exist in many cancers. CSCs have been suggested to have high tumor-initiating ability and to contribute to colonization and proliferation at metastatic sites. However, the role of tumor microenvironment in the tumor-initiating ability and metastatic potential of CSCs remains unclear. I focused on cancer-associated fibroblasts (CAFs), a major component of the cancer microenvironment to clarify their interaction with CSCs.

When human breast cancer cells (BCCs) were cultured under sphere condition in the conditioned medium of BCCs and CAFs co-culture, larger spheres were formed compared to conditioned medium of BCCs alone culture. This suggested that CAFs secreted factors that promote sphere proliferation of BCSC populations. Next, to identify the secreted factors derived from CAFs, we performed transcriptome analysis by comparing CAFs cultured alone with those co-cultured with BCCs. As a result, we identified granulocyte colony stimulating factor (G-CSF). We examined the effect of G-CSF on the tumorigenic potential of BCSCs using sphere culture and limiting dilution assay and found a concentration-dependent increase in tumorigenic potential of G-CSF. On the other hand, the expression of G-CSFR, a receptor for G-CSF, was increased in BCCs co-cultured with CAFs compared to BCCs cultured alone. In addition, the high G-CSFR-expressing cells had higher tumor-initiating ability and metastatic potential than the low G-CSFR-expressing cells, suggesting that G-CSFR-high cells have a feature of BCSCs. These results suggested that G-CSF-mediated interaction between CAFs and G-CSFR-high BCSCs is a new therapeutic target against BCSCs.



<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

多くのがんにおいて、がん幹細胞 (Cancer stem cells: CSCs) の存在が報告されている。がん幹細胞は、腫瘍形成能 (Tumor-initiating ability) が高く、転移先での生着や増殖 (colonization) に関与することが示唆されている。しかし、がん微小環境が、がん幹細胞の腫瘍形成能や転移にどのような役割を担っているのか、未だに不明である。そこで、がん微小環境の主要な構成因子であるがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) に着目し、がん幹細胞との相互作用を明らかにすることを目指した。

CAFs と乳がん細胞 (BCCs) の共培養上澄で BCCs をスフェア培養したところ、BCC

単独培養上澄と比較して、より大きなスフェアがより多く形成された。このことから、CAFは、スフェア培養における BCSCs 細胞集団のスフェア増殖を促進する因子を分泌することが示唆された。次に、CAF由来の分泌因子を同定するために、単独培養した CAFs と乳がん細胞と共培養した CAFs の比較によるトランスクリプトーム解析を行った。その結果、乳がん細胞と共培養した CAFs では、NFkB の活性化を認め、発現増加が見られた因子として、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony stimulating factor: G-CSF) を同定した。次に、乳がん幹細胞の腫瘍形成能に対する G-CSF の影響を、スフェア培養と limiting dilution assay で、調べたところ、G-CSF の濃度依存的に腫瘍形成能の増加が見られた。また、G-CSF の受容体である G-CSFR の発現を乳がん細胞で調べたところ、乳がん細胞の単独培養時と比べて、CAFs と共培養した乳がん細胞では、発現が増加していた。さらに、G-CSF 高発現細胞は、低発現細胞と比べて、腫瘍形成能や転移能が高いことが分かった。G-CSF を介した CAF と BCSCs との相互作用を阻害するために、G-CSF 中和抗体を用いたところ、乳がん原発腫瘍ならびに骨転移腫瘍の増殖を抑制することが明らかになった。これらの結果から、G-CSF を介した CAFs と G-CSFR-high BCSCs との相互作用は、乳がん原発腫瘍と転移腫瘍に対する新たな治療標的となることが示唆された。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

1. M Li[†], T. Nishimura[†], **Y. Takeuchi**[†], T. Hongu, Y. Wang, D. Shiokawa, K. Wang, H. Hirose, A. Sasahara, M. Yano, S. Ishikawa, M. Inokuchi, T. Ota, M. Tanabe, K-I. Tada, T. Akiyama, X. Cheng, C-C. Liu, T. Yamashita, S. Sugano, Y. Uchida, T. Chiba, H. Asahara, M. Nakagawa, S. Sato, Y. Miyagi, T. Shimamura, LAE. Nagai, A. Kanai, M. Katoh, S. Nomura, R. Nakato, S. Suzuki, A. Tojo, VC. Voon, S. Ogawa, K. Okamoto, T. Foukakis, N. Gotoh. FXVD3 functionally demarcates an ancestral breast cancer stem cell subpopulation with features of drug-tolerant persisters. [†]Equally contribution. *Journal of Clinical Investigation.*, 2023 Nov 15;133(22):e166666.
2. **Y. Takeuchi**, N. Gotoh. Inflammatory cytokines-enriched microenvironment plays key roles for the development of breast cancers. *Cancer Science.*, 2023 May;114(5):1792-1799.
3. T. Ishizaki, **Y. Takeuchi**, K. Ishibashi, N. Gotoh, E. Hirata, K. Kuroda. Cryopreservation of tissues by slow-freezing using an emerging zwitterionic cryoprotectant. *Scientific Reports.*, 2023 Jan 2;13(1):37.

< 学会発表 >

1. **竹内康人**, 村山貴彦, 西村建徳, 柏村里沙, 矢野正雄, 田辺真彦, 石川聡子, 太田哲生, 多田敬一郎, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 岡本康司, 東條有伸, 後藤典子: CAF 由来の顆粒球コロニー刺激因子 GCSF は、トリプルネガティブ乳がんの腫瘍形成と転移を開始する。第 13 回シグナルネットワーク研究会, 2023.11.24-11.25. 石川, 査読無

2. **竹内康人**, 村山貴彦, 西村建徳, 柏村里沙, 矢野正雄, 田辺真彦, 石川聡子, 太田哲生, 多田敬一郎, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 岡本康司, 東條有伸, 後藤典子: CAF 由来の顆粒球コロニー刺激因子 GCSF は, トリプルネガティブ乳がんの腫瘍形成と転移を開始する. 第 82 回日本癌学会, 2023.9.21-9.23. 横浜, 査読有
3. **竹内康人**, 村山貴彦, 西村建徳, 柏村里沙, 矢野正雄, 田辺真彦, 石川聡子, 太田哲生, 多田敬一郎, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 岡本康司, 東條有伸, 後藤典子: がん関連線維芽細胞由来の顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)は, 乳がんの増殖と骨転移に寄与する. 第 43 回日本分子腫瘍マーカー研究会, 2023.9.20. 横浜, 査読無
4. **竹内康人**, 村山貴彦, 西村建徳, 柏村里沙, 矢野正雄, 田辺真彦, 石川聡子, 太田哲生, 多田敬一郎, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 岡本康司, 東條有伸, 後藤典子: がん関連線維芽細胞由来の顆粒球コロニー刺激因子(GCSF)は, 乳がんの増殖と骨転移に寄与する. 第 27 回日本がん分子標的治療学会, 2023.6.21-6.23. 佐賀, 査読有
5. **Yasuto Takeuchi**, Noriko Gotoh : The membrane-linked adaptor FRS2b fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis.
第 20 回幹細胞シンポジウム, 2023.5.19-20. 淡路島, 査読有

<外部資金>

1. 「令和 5 年度 科学研究費助成事業 若手研究」, 「がん幹細胞分裂様式の制御メカニズムの解明」, 竹内康人, 代表, 令和 3 年度-令和 7 年度, 4,550,000 円
2. 「令和 5 年度 新学術創成研究機構 異分野融合研究推進費」, 「乳がん悪性転化機構の解明」竹内康人, 代表, 令和 5 年度, 1,400,000 円
3. 「令和 5 年度 戦略的研究推進プログラム 先魁プロジェクト」, 「双性イオン液体によるライフサイエンス基盤の革新と社会実装」分担, 令和 5 年度, 500,000 円
4. 「令和 5 年度 科学研究費助成事業 基盤 B」, 「低酸素評価に基づく新しい口腔がん治療戦略の構築」, 北川善政, 分担, 令和 4 年度-令和 7 年度, 100,000 円

Mitochondrial Dynamics in Stem Cells

ミトコンドリア動態ユニット

Assistant Professor

Atsuko KASAHARA 笠原敦子

【Abstract】

Mitochondria fuse and divide for their pleiotropic functions as a power plant (ATP supply) and as regulators in metabolic pathways, calcium and redox homeostasis, and apoptosis. Mitochondrial quality, distribution, size, and motility are excellently tuned by their continuous fusion and fission. Mitochondrial fusion and fission are regulated by a family of GTP-dependent dynamin-related proteins, Mitofusin1 (MFN1), Mitofusin2 (MFN2), Optic Atrophy1 (OPA1), and Dynamin-1-like protein (DRP1), and their expression can be linked to malignant phenotypes, such as chemo-resistance.

Mitochondria create contact sites between other organelles, especially with the endoplasmic reticulum (ER), for calcium homeostasis, lipid metabolism, and control of mitochondrial shape and mitophagy. The ER-mitochondria contacts are less in glioma stem-like cells, while the contacts are more created in differentiated glioma cells. Likewise, embryonic stem cells (ESCs) displayed distant organelles with fewer contacts, whereas cardiomyocytes differentiated from ESCs showed closer organelles and more contacts. Both are associated with an up-regulation of MFN2, a known tether protein, in differentiated cells.

MFN2 is involved in the fusion of the mitochondrial outer membrane with MFN1. In addition, MFN2 also resides at the ER membrane and tethers the ER and mitochondria. The molecular mechanism of how MFN2 regulates these two different events is unknown; thus, I have identified a novel MFN2-interacting protein, RAB35, in a purified mitochondria-associated membrane fraction. Knockout of RAB35 increased the ER-mitochondria contact sites by detecting the ER-mitochondria split GFP system, and this increase is MFN2-dependent, and MFN1, or PDZD8, another known tether protein, is independent.

RAB35 ablation induced mitochondrial Ca^{2+} uptake stimulated with IP3R agonist ATP, whereas RAB35 and MFN2 double knockout decreased mitochondrial Ca^{2+} uptake, which functionally confirmed that RAB35 untethers MFN2 tethered ER-mitochondria contact sites.

<2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

ミトコンドリアは小胞体と接点を形成し、この接点は主に小胞体からミトコンドリアへの Ca^{2+} の移行や脂質代謝に重要である。グリオーマ細胞の造腫瘍性の異なる細胞集団の比較で見出したミトコンドリアと小胞体の距離、接点の違いは、ES 細胞と分化心筋細胞でも同様に観察できている。これらには、ミトコンドリアと小胞体を繋ぐ因子である MFN2 のタンパク質発現変化が伴われており、繋ぐ因子の量が細胞運命状態と相関しているようである。MFN2 はミトコンドリア外膜融合因子でもあり、2 つの機能をどのように制御し分けているのか、MFN2 が繋いだオルガネラはどのように離されているのか、など詳しい分子メカニズムはわかっていない。そこで、ミトコンドリアと他のオルガネラが接触している部位を細胞分画し、MFN2 と相互作用する新規タンパク質 RAB35 を質量分析によって同定した。RAB35 欠損によって、ミトコンドリアと小胞体の接点は増加し、この増加は MFN2 欠損によって解消され、ミトコンドリア外膜融合の MFN2 のパートナーである MFN1 や、別のミトコンドリアと小胞体を繋ぐ因子 PDZD8 の欠損では増加したままであった。機能的にも、

RAB35 欠損によって、ミトコンドリアの Ca^{2+} 取り込みは上昇し、RAB35 欠損 MFN2 欠損で減少するため、RAB35 は MFN2 によるミトコンドリアと小胞体の係留を解離する因子であると推察される。今後は、小胞輸送で働く RAB35 がどのように MFN2 の繋いだミトコンドリアと小胞体を離しているか、明らかにしていきたい。

【研究業績】

<発表論文>

1. Kurayoshi K, Takase Y, Ueno M, Ohta K, Fuse K, Ikeda S, Watanabe T, Nishida Y, Horike SI, Hosomichi K, Ishikawa Y, Tadokoro Y, Kobayashi M, Kasahara A, Jing Y, Shoukamy MI, Meguro-Horike M, Kojima K, Kiyoi H, Sugiyama H, Nagase H, Tajima A, Hirao A.

Targeting cis-regulatory elements of FOXO family is a novel therapeutic strategy for induction of leukemia cell differentiation, *Cell Death Dis*, 2023 Sep 29;14(9):642, 2023

2. Noguchi M, Kohno S, Pellattiero A, Machida Y, Shibata K, Shintani N, Kohno T, Gotoh N, Takahashi C, Hirao A, Scorrano L Kasahara A.

Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma resistant cell line, *Cell Death Dis*, Apr 5; 14 (4):241, 2023

<学会発表>

1. 「細胞運命決定における MFN2-RAB35 によるミトコンドリアと小胞体の係留制御について」, 第 22 回日本ミトコンドリア学会年会, 2023 年 11 月 14-15 日, 口頭発表, つくば

2. 「ミトコンドリアと小胞体の接点形成・解離分子メカニズムを明らかにする」, 第 21 回日本ミトコンドリア学会年会, 2023 年 3 月 16-18 日, ポスター発表, 東京

<外部資金>

なし。

Senescent Cell Dynamics Unit

老化細胞動態解析ユニット

Assistant Professor Yasuhiro Nakano 中野 泰博

【 Abstract 】

Senescent cells are known not only to permanently cease proliferation but also to exhibit a senescence-associated secretory phenotype (SASP), marked by the excessive secretion of inflammatory cytokines and chemokines. We have previously demonstrated the accumulation of p16^{Ink4a}-positive senescent cells in organs and tissues in cancer and chronic inflammatory diseases, revealing their involvement in the malignancy of pathophysiology. However, the dynamics of senescent cells in acute tissue injury have not been elucidated. Therefore, this year, we induced acute liver injury in p16^{CreERT2/R26^{LSL}-tdTomato} mice, where p16^{Ink4a}-positive senescent cells can be labeled with tdTomato, to investigate the dynamics of senescent cells.

Analysis of the liver tissue immediately after injury revealed the expression of tdTomato in hepatocytes adjacent to the injury area. Subsequently, evaluation of the tissue repair process after injury revealed that tdTomato-positive hepatocytes showed marked proliferation, including expression of the proliferation marker molecule Ki67, which contributed to tissue repair. Following this, tdTomato-positive cells immediately after injury were isolated using FACS, and gene expression was analyzed by single cell RNA-sequencing. Feature analysis of cells using UMAP showed a hepatocyte cluster exhibiting characteristics similar to senescent cells, including SASP, with a neighboring cluster of proliferating hepatocytes. Additionally, this several SASP factors reported to promote liver regeneration. On the other hand, inducing acute liver injury in p16-deficient mice resulted in delayed tissue repair compared to wild-type mice. These findings suggest that some hepatocytes activate a transient cellular senescence program through p16^{Ink4a} expression, promoting proliferation of both themselves and neighboring hepatocytes *via* the expression of SASP factors, thereby contributing to tissue repair following acute liver injury.

<2023年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

老化細胞は、恒久的に増殖を停止するだけでなく、炎症性サイトカイン・ケモカインなどを過剰に分泌する表現型（SASP）を示すことが知られている。当ユニットではこれまでに、がんや慢性炎症疾患において p16^{Ink4a} 陽性老化細胞が臓器・組織内に蓄積し、これが病態の悪性化に作用することを明らかにしてきた。しかしながら、急性組織障害における老化細胞の動態は明らかになっていない。そこで本年は、p16^{Ink4a} 陽性老化細胞を tdTomato でラベル可能な p16^{CreERT2/R26^{LSL}-tdTomato} マウスに対して急性肝障害を誘発させ、老化細胞の動態を検討した。

障害直後の肝組織を解析した結果、障害領域に隣接する肝細胞において tdTomato の発現が認められた。次に、障害からの組織修復過程を評価したところ、驚くべきことにこの tdTomato 陽性肝細胞は Ki67 を発現するなど顕著な増殖を示し、組織修復に

寄与することが明らかになった。そこで、障害直後の tdTomato 陽性細胞を FACS により分取し、一細胞遺伝子発現解析によって遺伝子発現を解析した。UMAP による細胞の特徴解析を行ったところ、SASP など老化細胞様の特徴を示す肝細胞クラスターが存在し、このクラスターに隣接して増殖肝細胞クラスターが位置していた。また、この SASP 因子の一部は肝再生を促進する因子として報告されているものを複数含んでいた。上記の解析とは別に、p16 欠損マウスに急性肝障害を誘発させたところ、野生型マウスと比較して、組織修復が遅延していた。これらの知見は、一部の肝細胞が p16^{Ink4a} の発現による一過的な細胞老化プログラムを活性化し、SASP 因子の発現を介して自身と隣接する肝細胞の増殖を促進することで、急性肝障害からの組織修復に寄与することが示唆された。

今後は、p16^{Ink4a} 発現肝細胞から分泌される肝再生促進因子を同定するとともに、一過性細胞老化プログラムの分子機序を解明する。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Nakano Y, Itoh T, Tanaka M, Miyajima A, Kido T. Development of a high throughput system to screen compounds that revert the activated hepatic stellate cells to a quiescent-like state. *bioRxiv* 2023 DOI: 10.1101/2023.11.01.564270

(共同研究)

2. Sinha S, Aizawa S, Nakano Y, Rialdi A, Choi HY, Shrestha R, Pan SQ, Chen Y, Li M, Kapelanski-Lamoureux A, Yochum G, Sher L, Monga SP, Lazaris A, Machida K, Karin M, Guccione E, Tsukamoto H. Hepatic stellate cell stearyl co-A desaturase activates leukotriene B4 receptor 2 - β -catenin cascade to promote liver tumorigenesis. *Nature Communications* 2023 14(1):2651.

著書・総説

1. Nakano Y, Johmura Y. Targeting cellular senescence as a therapeutic approach in non-alcoholic steatohepatitis. *Ann Hepatol* 2023 28(2):100900.
2. 中野泰博, 城村由和: 老化細胞の代謝特性によるセノリティクス *月刊細胞* 2023 55(2).
3. 中野泰博, 城村由和: 抗 PD-1 抗体による老化細胞の除去 *バイオサイエンスとインダストリー* 2023 81(5).

< 学会発表 >

1. Nakano Y, Zhang Z, Kumamoto S, Johmura Y: In Vivo Lineage Tracing of p16-expressing Senescent Cells in Acute Liver Injury. 第 18 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2023 年 10 月 6 日, 東京

<外部資金>

1. 中野泰博: AMED・肝炎等克服実用化研究事業（代表）「非アルコール性脂肪肝炎における老化細胞の性状解析と新規治療標的分子の探索」（直接経費 5,500 千円, 間接経費 1,650 千円)
2. 中野泰博: 北陸銀行若手研究者助成金（代表）「NASH 誘発性肝臓における老化細胞の性状解析」（直接経費 600 千円, 間接経費 0 千円)
3. 中野泰博: 科学研究費補助金・学術変革領域研究(B)（分担）「組織線維化の筋線維芽細胞におけるリバイバル機構の解明」（直接経費 2,500 千円, 間接経費 0 千円)
4. 中野泰博: 科学研究費補助金・基盤研究(C)（分担）「CRISPR とインテグラーゼを併用した長鎖 DNA 挿入法の確立とマウス作製への応用」（直接経費 100 千円, 間接経費 0 千円)
5. 中野泰博: AMED・再生・細胞医療・遺伝子治療実現加速化プログラム 再生・細胞医療・遺伝子治療研究開発課題（基礎応用研究課題）（分担）「老化細胞リプログラミング機構の解明による加齢組織再生法の創出」（直接経費 5,000 千円, 間接経費 1,500 千円)
6. 中野泰博: AMED・難治性疾患実用化研究事業（分担）「細胞老化が引き起こすレット症候群発症メカニズムの解明」（直接経費 4,000 千円, 間接経費 1,200 千円)

基礎統計

決算額（運営費交付金）

（単位：千円）

| 区 分 | | 令和元年度 | 令和2年度 | 令和3年度 | 令和4年度 | 令和5年度 |
|--------|------|---------|---------|---------|---------|---------|
| 運営費交付金 | | 507,855 | 513,654 | 506,529 | 521,557 | 432,111 |
| 内 訳 | 人件費 | 404,442 | 385,923 | 373,320 | 401,064 | 352,460 |
| | 物件費等 | 103,413 | 127,730 | 133,209 | 120,493 | 79,651 |

科学研究費補助金（間接経費を含む）

（単位：千円）

| 研究種目 | 令和元年度 | | 令和2年度 | | 令和3年度 | | 令和4年度 | | 令和5年度 | |
|-------------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 |
| 学術変革領域研究（A） | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 5,460 | 1 | 5,590 |
| 学術変革領域研究（B） | - | - | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 12,870 |
| 新学術領域研究 | 0 | 0 | 1 | 3,120 | 1 | 3,120 | - | - | - | - |
| 基盤研究（A） | 3 | 36,270 | 2 | 22,230 | 2 | 20,540 | 2 | 22,230 | 1 | 10,270 |
| 基盤研究（B） | 7 | 42,250 | 8 | 43,290 | 8 | 43,030 | 7 | 35,750 | 9 | 43,054 |
| 基盤研究（C） | 16 | 24,570 | 20 | 30,420 | 18 | 23,660 | 17 | 23,660 | 21 | 30,420 |
| 挑戦的研究（開拓） | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 10,400 | 1 | 5,200 | 1 | 6,500 |
| 挑戦的研究（萌芽） | 4 | 13,390 | 3 | 9,100 | 1 | 3,250 | 3 | 9,490 | 6 | 18,590 |
| 若手研究 | 9 | 15,080 | 9 | 17,550 | 9 | 14,820 | 7 | 12,090 | 9 | 12,480 |
| 研究活動スタート支援 | 2 | 2,860 | 2 | 2,860 | 1 | 1,430 | 1 | 1,430 | 2 | 1,430 |
| 特別研究員奨励費 | 1 | 1,040 | 0 | 0 | 1 | 800 | 2 | 1,100 | 2 | 1,800 |
| 国際共同研究強化 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 15,600 |
| 海外連携研究 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合 計 | 42 | 135,460 | 45 | 128,570 | 42 | 121,050 | 41 | 116,410 | 55 | 158,604 |

外部資金（間接経費を含む）

（単位：千円）

| 研究種目 | 令和元年度 | | 令和2年度 | | 令和3年度 | | 令和4年度 | | 令和5年度 | |
|-----------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|-------|---------|
| | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 | 件数 | 金額 |
| 受託研究 | 9 | 186,055 | 9 | 136,214 | 9 | 169,937 | 14 | 355,398 | 17 | 262,989 |
| 受託事業経費 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 52 | 0 | 0 |
| 補助金 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 45,000 |
| 民間等との共同研究 | 4 | 10,482 | 3 | 23,847 | 6 | 16,475 | 4 | 6,840 | 3 | 14,680 |
| 寄附金 | 19 | 19,170 | 16 | 15,040 | 17 | 16,400 | 21 | 56,200 | 25 | 45,400 |
| 合 計 | 32 | 215,707 | 28 | 175,101 | 32 | 202,812 | 40 | 418,490 | 46 | 368,069 |

土地・建物

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

教育活動

大学院生・研究生数

令和6年5月1日現在

| | | | | 先進がんモデル共同研究センター | がん幹細胞研究プログラム | がん微小環境研究プログラム | がん分子標的探索プログラム | がん分子標的医療開発プログラム | 合計(人) | |
|---------------|------------|------|-----|-----------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|-------|--|
| 大学院生 | 医薬保健学総合研究科 | 修士課程 | I | 3 | 1 | | 1 | | 36 | |
| | | | II | 1 | 2 | | | | | |
| | | 博士課程 | I | | | | | | | |
| | | | II | 2 | 5 | | 1 | | | |
| | | | III | 3 | 4 | 1 | | 1 | | |
| | | | IV | 3 | 5 | 1 | 1 | 1 | | |
| | 先進予防医学研究科 | 博士課程 | I | | | | | | | |
| | | | II | | | | | | | |
| | | | III | | | | | | | |
| | | | IV | | | | | | | |
| | 新学術創成研究科 | 前期課程 | I | | | | 1 | | 2 | |
| | | | II | 1 | | | | | | |
| | | 後期課程 | I | | | | | | | |
| | | | II | | | | | | | |
| | | | III | | | | | | | |
| | | | III | | | | | | | |
| | 自然科学研究科 | 前期課程 | I | 1 | | 1 | | | 2 | |
| | | | II | | | | | | | |
| 後期課程 | | I | | | | | | | | |
| | | II | | | | | | | | |
| | | III | | | | | | | | |
| | | III | | | | | | | | |
| 研究生(特別研究学生含む) | | | | | 3 | 3 | | 6 | | |

交流協定校

令和6年5月1日現在

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

各種シンポジウム開催状況

1. インド - 日本がんシンポジウム及び金沢国際がん生物学シンポジウム 2023 (合同開催) 金沢大学先魁シンポジウム (合同開催)

India – Japan Cancer Symposium (Hybrid Conference) International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2023 Kanazawa University SAKIGAKE Symposium

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

日 時：2023年7月24日(月)、25日(火)

場 所：ナノ生命科学研究所4階会議室及びオンライン

参加者数：約144名

プログラム：

丸山 玲緒 (公益財団法人がん研究会)

「Dissecting intra-tumor heterogeneity in breast cancer」

Prasanna Venkatraman (TATA Memorial Centre, India)

「Beyond Assembly - Proteasomal Chaperones in Proteostasis and Cellular Homeostasis」

矢野 聖二 (金沢大学がん進展制御研究所)

「Targeted drug resistance in lung cancer」

Kulbhushan Tikoo (National Institute of Pharmaceutical Education and Research, India)

「Nanotherapeutics & Epigenetic landscape reprogramming : Interplay in triple-negative breast cancer」

浜本 隆二 (国立がん研究センター)

「Cancer Research in the Big Data Era : Medical AI Research for Clinical Application」

Surajit Karmakar (Institute of Nano Science and Technology, India)

「Development of human serum albumin

based nanoformulation for the treatment of cancers」

Sabina Quader (川崎市産業振興財団)

「Targeting Brain Cancers with Nanomedicine」

Swapnil Rane (TATA Memorial Centre, India)

「Computational Pathology – Transforming the Clinic using digital pathology, morphology and genetics using image analytics」

厚井 悠太 (National Institutes of Health (NIH))

※オンライン発表

「Imaging sensory activity in obese mice to investigate the mechanism of neuropathic pain Generation」

大森 晶子 (University of Padua, and Osaka University)

「Opa1 is required for melanocyte stem cell maintenance」

城村 由和 (金沢大学がん進展制御研究所)

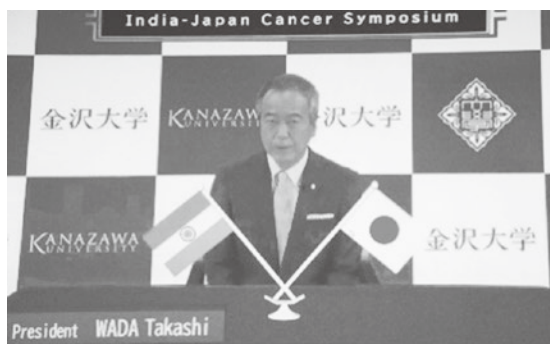
「Developing the approaches to treat aging and chronic inflammatory diseases by targeting senescent cells」

Srinivas Gopala (Sree Chitra Tirunal Institute for Medical Sciences and Technology, India)

「MTH1 Expression in Mutant IDH1 Gliomas : Relevance and Opportunities」

平尾 敦 (金沢大学がん進展制御研究所)

「Metabolic Organelle Dynamics on Cell Fate Determination in Cancer」





2. 第11回金沢大学がん進展制御研究所・復旦大学上海がんセンタージョイントシンポジウム

The 11th KUCRI-FUSCC Joint Symposium on Tumor Biology 2023

目 的：がんの基礎的ならびに臨床的研究の一層の発展と国際交流の推進を図る

日 時：2023年9月13日(水)

場 所：自然科学系図書館棟 1階大会議室

参加者数：100名

プログラム：

松本 邦夫（金沢大学がん進展制御研究所）
「High-Performance MET Receptor Agonists Created by Molecular Technologies」

Huijuan Yang（復旦大学上海がんセンター）
「PI3K pathway alteration in gynecological malignancies—its oncogenic mechanism and clinical translation」

飯田 宗穂（金沢大学附属病院消化器内科）
「Gut microbiota of chronic liver disease patients promote liver carcinogenesis in

TLR4-dependent manner」

Tong Tong（復旦大学上海がんセンター）
「Prognostic value of the consensus molecular subtype 4 (CMS4) predicted by multiparametric radiomics-based machine learning in colorectal cancer: a multi-center retrospective study」

城村 由和（金沢大学がん進展制御研究所）
「Identification and functional analysis of senescent cells in tumor microenvironment」

Yong Chen（復旦大学上海がんセンター）
「The effect of the potential new drug MITF inhibitor on malignant melanoma and its synergistic mechanism with anti-PD1 immunotherapy」



3. 文部科学省共同利用・共同研究システム形成事業 学際領域展開ハブ形成プログラム キックオフシンポジウム

The Kickoff Meeting for the Coalition of Universities for Research Excellence Program: Part I
“Establishing a collaborative intelligence platform towards extending healthy life expectancy”

目 的：健康寿命の延伸を目指し、異分野間の融合を促進することを目的とし、本事業の今後の飛躍的発展のための土台作りとして、『健康寿命の延伸に向けた集合知プラットフォームの形成』を中心テーマとしたキックオフシンポジウムを開催

日 時：2024年2月21日(水)

場 所：ホテル金沢（金沢市）

参加者数：79名

プログラム：

平田 英周（金沢大学がん進展制御研究所）

「がん細胞とグリア細胞の多面的相互作用」

齊藤 康弘（慶應義塾大学先端生命科学研究所）

「乳がんにおけるアミノ酸トランスポーター SLC7A5の病理生理学的役割とその機能的制御」

魏 范研（東北大学加齢医学研究所）

「エピトランスクリプトームに基づく加齢生物学の理解と応用に向けて」

河本 新平（大阪大学微生物病研究所）

「細胞老化の誘導に関わる腸内細菌の特定と個体老化に与える影響の解明」

田所 優子（金沢大学がん進展制御研究所）

「造血幹細胞の恒常性維持機構の解明とその制御による健康寿命延伸を目指して」

村松 史隆（大阪大学微生物病研究所）

「生体イメージングが解き明かす、鉄イオン制御を介した血管性がん微小環境」

本橋 ほづみ（東北大学加齢医学研究所）

「環境ストレス応答と硫黄代謝」



4. 共同利用・共同研究拠点研究成果報告会

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

日 時：2024年2月22日(木)

場 所：ホテル金沢(金沢市)

参加者数：87名

プログラム：

Thumkeo Dean (京都大学)

「マウス肺がんモデルにおける腫瘍免疫微小環境の解明～PGE2 シグナル伝達系の役割を例に～」

板野 直樹 (京都産業大学)

「糖代謝ストレスによるがん幹細胞維持機構」

廣瀬 豊 (富山大学)

「転写共役型新規RNA メチル化酵素PCIF1による遺伝子発現制御機構の解明」

佐々木 宗一郎 (富山大学)

「がん細胞によってもたらされる骨微小環境の変化を介した乳がん骨転移促進機構の解明」

大澤 毅 (東京大学)

「高深度オミクスから迫るがん悪性化機構の解明」

徳田 深作 (京都府立医科大学)

「間質圧の上昇による肺癌促進メカニズム」

青木 俊介 (九州工業大学)

「肝細胞増殖因子 (HGF) を標的としたin silico創薬基盤の確立」





金沢大学がん進展制御研究所年報2023年

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

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