

令和6年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2025.4

金沢大学がん進展制御研究所

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		キノン化合物の構造展開による新規進行性前立腺がん治療薬の創出
研究代表者	所属・職名・氏名	立命館大学薬学部・教授・土肥寿文
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	がん抑制遺伝子 RB の不活性化はアンドロゲン受容体のホルモン非依存的核内移行を引き起こすことから、ホルモン治療抵抗性の本態であると考えられている。これに対する治療薬は交差耐性を生じ、最終的には治療選択肢が無くなることが問題である。これまでに、進行性前立腺がんでは 30%程度 RB とその近傍にコードされる代謝遺伝子 SUCLA2 酵素が巻き込まれて欠失すること、SUCLA2 欠失を標的として 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone (TQ) により治療できることを報告した。本研究では、昨年度に TQ の標的が明らかになったことを受けて、TQ の構造展開を行い、より作用の強い化合物の創出を試みる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、TQ をよりリファインした化合物の創出を行い、その作用を代謝の観点から評価した。本研究は以下の 3 つに分けて遂行した。 1) TQ 結合標的部位の同定 TQ の標的が PCCA・MCCC1 であると明らかになっている。そこで、これらの欠失変異体を作成し、TQ ならびに新規化合物の結合部位を同定した。新規合成した化合物の PCCA・MCCC1 に対する阻害用量反応について粗ミトコンドリアを用いた系で評価した。 2) TQ 最適化 TQ より強い効果を示す化合物取得のために、置換様式最適化、炭素鎖延長、ヘテロ原子導入などの戦略により化合物展開を行った。化合物の薬効評価は、SUCLA2 欠失細胞への細胞障害性を指標に評価した。令和 6 年度の研究では数十種類の TQ 類似体を提供し、TQ に優越する阻害活性・細胞障害性を示す可能性のある複数の化合物を得た。 3) 新規化合物の代謝動態への影響の解析 TQ の薬効の本体が α-ケトグルタル酸レベルの低下であることを見出している。TQ の標的である PCCA・MCCC1 をノックアウトした場合と新規化合物を処理した場合の代謝動態を測定し、比較することで、薬理的阻害と遺伝的阻害が一致することを確認した。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん転移を進展させるインターロイキン(IL)-17F の新規機能の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	琉球大学・准教授・梅村 正幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	琉球大学・准教授・金野 俊洋
	所属・職名・氏名	福井大学・教授・木戸屋 浩康
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	IL-17 ファミリーは、複数のサブタイプから成る炎症性サイトカイン群であり、広範な細胞に作用して炎症性メディエーターや抗菌ペプチドの発現を誘導する。中でも IL-17A は、感染防御において重要である一方、慢性炎症性疾患の悪化やがんの進行に関与することが報告されている。しかし、がんにおける IL-17A の機能は、がん細胞の増殖促進と抗腫瘍免疫の誘導という相反する報告があり、明確な結論に至っていない。また、同ファミリーの IL-17F については、がんとの関連性はほとんど検討されておらず、その生理的・病理的意義は未解明である。そこで本研究では、IL-17F 欠損 (KO) マウスを用いて、B16F10 および B16BL6 メラノーマ細胞による肺転移モデルを構築し、IL-17F の欠損が転移頻度や生存率に及ぼす影響を検討する。これにより、がん転移過程における IL-17F の新規機能の解明を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、がん転移における IL-17F の役割を明らかにすることを目的として、野生型マウスおよび IL-17F 欠損マウスを用いたマウス腫瘍モデルを構築し、その機能解析を行った。IL-17 ファミリーは炎症性サイトカインとして知られ、特に IL-17F は、感染防御のみならずがん免疫やがんの進展にも関与することが報告されている。しかし、これらの分子ががんの転移過程においてどのような機能を担うかは不明であり、本研究はその解明を試みたものである。 B16F10 メラノーマ細胞を尾静脈投与することで肺転移を誘導するモデルにおいて、IL-17F 欠損マウスでは、野生型マウスに比べて有意に肺転移巣の形成が抑制され、さらに生存率も改善することが明らかとなった (図 1, 2)。この結果は、IL-17F ががん細胞の肺転移において促進的に働いている可能性を強く示唆するものである。さらに、転移の過程を「転移先組織への定着」と「定着後の増殖」の二段階に分けて解析を行った。まず「定着」に関しては、IL-17F 欠損マウスの肺組織における転移巣数の減少に注目し、IL-17F ががん細胞の転移先臓器への定着を支援する可能性を検討した。その結果、IL-17F 欠損によって肺における前転移ニッチの形成が抑制されることが組織学的に示唆され、特にマクロファージや線維芽細胞の集積の減少が観察された。加えて、炎症性サイトカインである TNF-α やフィブロネクチンの発現解析により、IL-17F が前転移ニッチの形成を誘導する分子の一つである可能性が浮上した。一方、「増殖」過程については、メラノーマ細胞株に対して IL-17F で刺激することで、細胞増殖の促進を検討した。さらに、転移巣内の肺におけるメラノーマ特異抗原量を調べたところ、IL-17F 欠損マウスでは著しい低下が確認された。これらの結果は、IL-17F が単にがん細胞の定着を促すだけでなく、定着後の転移組織におけるがん細胞の増殖を支える役割を果たしていることを示している。 現在、メラノーマ転移肺の遺伝子発現プロファイル解析(RNA-Seq)を行っている。IL-17F ががん細胞と微小環境とのクロストークを制御している可能性が考えられ、特に、IL-17F の存在下で活性化されるシグナル伝達経路の同定により、がんの進展や免疫回避に関与す	

る分子群の発現が誘導されていることが明らかになると考えている。

以上の知見より、IL-17F ががんの転移における新たな制御因子であることを示しており、IL-17F を標的とした治療介入が、がんの転移を抑制する革新的な治療戦略となりうる可能性を示している。今後は、IL-17F の抑制による転移制御効果を他の腫瘍モデルにも拡張し、悪性腫瘍に対する新規免疫治療の開発へとつなげることが期待される。

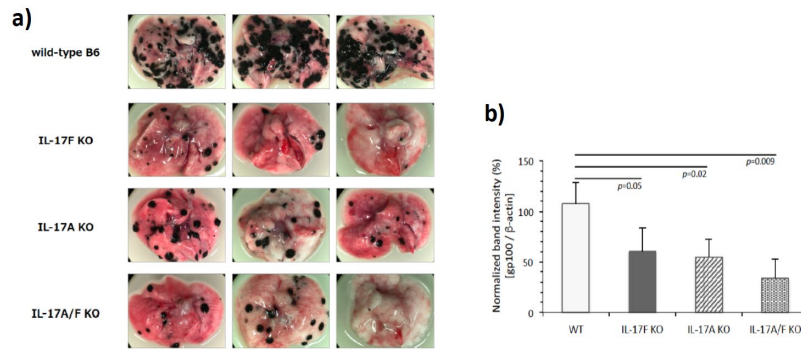


図1. 各種IL-17欠損マウス間におけるメラノーマ細胞の肺転移頻度の相違

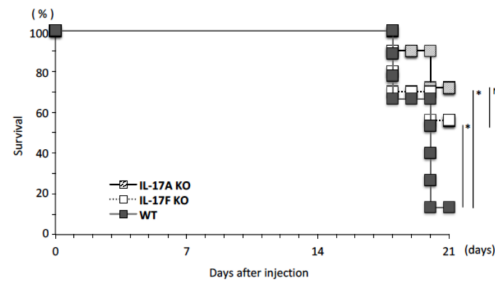


図2. IL-17欠損におけるメラノーマ細胞転移による生存率

【成果等】

【主な論文発表】

未発表（執筆中）

【学会発表】

- 梅村正幸「肺における IL-17F の局在とその特性」（2024 年度日米医学協力計画抗酸菌症専門部会国内部会，東京， 2024. 09. 27-28）
- 梅村正幸「IL-17 ファミリーサイトカインの感染防御機構」（細胞死と炎症研究発表会，金沢， 2025. 03. 26）

【その他特筆事項】

特になし

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸がん転移における体細胞変異のある微小環境細胞の役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	筑波大学・教授・坂田（柳元）麻実子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	筑波大学・大学院生・Le Thi Ai Nhan
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	大島 正伸
【研究目的】	クローン性造血とは、造血幹細胞が体細胞変異を獲得し、変異のある造血幹細胞から多様な血液細胞・炎症細胞へ分化を続ける状態のことであり、加齢とともに増加する(Jaiswal; Genovese, NEJM 2014)。固形がん患者においては、クローン性造血は約 25% と高頻度に見られる(Coombs, Cell Stem Cell 2017)。クローン性造血から分化した体細胞変異のある炎症細胞はがん組織へと浸潤し、がんの進展、転移、治療抵抗性などに関わる可能性があるが、この点は十分に明らかにされていない。本研究では、クローン性造血による大腸がん転移制御のメカニズムを明らかにし、大腸がん転移を抑制する新たな治療戦略を提案する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	「クローン性造血患者における大腸がん転移の制御」メカニズムについて研究を進めた。 1. クローン性造血モデルマウスにおける大腸がん転移 交配により、クローン性造血についての各種モデルマウスを作製した。8 週齢のマウス脾臓に大島正伸博士らが樹立したマウス大腸がんオルガノイド細胞 (Apc Δ 716、Kras+/G12D、Tgfr2-/-、Trp53L0H/R270H 変異マウスから樹立され、また蛍光マーカーとして GFP を導入済み; Sakai, Cancer Research 2018) とマトリジェルを混ぜ、注入し、注入後 30 日後に、肝臓内の転移巣における腫瘍サイズを調べた。具体的には、蛍光顕微鏡により GFP 陽性病変を定性的に観察する。さらには、肝組織のヘマトキシリンエオジン (HE) 染色後、定量的に評価した。これにより、クローン性造血に由来する免疫細胞の働きにより大腸がんの転移が制御されていること、さらには、クローン性造血由来免疫細胞のうち、T 細胞の働きが最も重要であった。 2. 上記モデルマウスの免疫細胞分画の一細胞解析 クローン性造血に由来する T 細胞は多様な分画に分類される。このうち、どの細胞が重要であるかを調べるため、肝転移巣を細胞懸濁液にし、一細胞 RNA/T 細胞受容体 (TCR) レパトア解析を行った。これにより、肝転移巣での T 細胞プロファイルが明らかになるとともに、クローン性造血モデルマウスとコントロールマウスの肝転移巣における T 細胞プロファイル、TCR 拡大パターン、遺伝子発現の違いを網羅的に抽出した。 これらの情報を利用し、大腸がん転移の制御方法を開発していく基盤となる成果であると考えられた。	
【成果等】	【主な論文発表】 投稿準備中	
	【学会発表】 札幌国際がんシンポジウム 京都 がん免疫	
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん治療薬誘導性間質細胞老化の分子病態の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・学長特命教授・坂本毅治
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・助教・田中伯享
	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・大学院生・Vu Duc Anh
	所属・職名・氏名	関西医科大学附属生命医学研究所・大学院生・生駒龍興
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	多くのがん治療薬は細胞老化を誘導するが、生体での細胞老化がどのようにがん治療に影響を及ぼすかは不明な点が多い。我々はがん治療薬投与により間質細胞に誘導される細胞老化の分子病態を理解・制御することで、既存薬の負の作用を排除し治療効果を最大化するがん治療法の創成が可能ではないかと考えた。そこで本研究では、最新のテクノロジーである老化細胞可視化・除去マウスを利用することで、これまで解析が困難であったがん治療薬投与による腫瘍間質の細胞老化の誘導機構とがん治療効果への影響を解析し、治療により誘導される間質老化細胞の影響の除去が既存がん治療薬の治療効果の改善につながるかを明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	今年度は、昨年度に設定した治療モデルのうち、トリプルネガティブ乳がん化学療法モデルにフォーカスして、同所移植モデルを用いた間質老化細胞の可視化と、がん間質の老化細胞および非・老化細胞のシングルセル RNA-seq 解析に向けた移植系のセッティングを行った。 まず、マウストリプルネガティブ乳がん細胞株 E0771 の乳腺 fat pad 移植を行い、パクリタキセルを週2回投与し、タモキシフェン投与により老化細胞を可視化し、パクリタキセルによる治療により間質細胞での老化細胞の数が増加腫瘍中のがん細胞の割合が多すぎ、シングルセル RNA-seq をそのまま実施することは困難であった。そこで、腫瘍組織の細胞からがん細胞を除去するため、E0771 細胞に Venus を高発現する E0771 細胞を樹立し、同様に移植実験を行った。しかしながら、移植時には Venus を高発現していた E0771 細胞が、腫瘍形成時には Venus の発現が著しく低下し、フローサイトメトリーでのがん細胞の分離が出来なかった。この原因として、免疫系による異物分子発現細胞の除去という選択圧がかかった結果、Venus の発現が低いがん細胞が選別されたことが考えられた。そこで、新たに理研・宮脇敦史博士から供与を受けた低免疫原性の蛍光・発光タンパク発現ベクター（論文準備中）を導入した E0771 細胞を作製し、平行して human CD2 発現ベクター、マウス CD45.1 発現ベクターを作製し、E0771 細胞に導入することで、MACS による腫瘍細胞の除去が可能な実験系の構築に着手した。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	なし	
	【学会発表】	
【その他特筆事項】	なし	
	なし	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		悪性胸膜中皮腫における DNA 修復機構阻害薬がもたらすがん免疫賦活化作用の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	長崎大学病院がん診療センター・講師・谷口 寛和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・教授・迎 寛
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・講師・竹本 真之輔
	所属・職名・氏名	長崎大学病院がん診療センター・助教・赤城 和優
	所属・職名・氏名	長崎大学病院呼吸器内科・大学院生・小野 沙和奈
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	悪性胸膜中皮腫(PM)は、治療選択肢が限られ、予後が極めて不良な疾患である。しかし、症例数が少ない稀少疾患であるため、臨床試験を実施するのが困難であり、治療法の開発が遅れている。そのため、本研究課題においては、他の疾患で臨床開発中である DNA 修復機構阻害薬と、既に臨床応用されている抗 PD-L1 抗体との併用効果とその機序を、分子レベルで明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	PM では正常組織と比較して、DNA 修復機構に関わる CHK1 が高発現であることを GEO profile で確認した。また、CHK1 高発現群は低発現群と比較して予後不良であることを TCGA の PM コホートで確認した。以上から、今回 DNA 修復機構阻害薬として CHK1 阻害薬である Prexasertib(Prexa)に着目した。 ヒト PM 細胞株である H2052・Mesol、マウス PM 細胞株である AB1 を用いて MTT アッセイを行い、Prexa は PM のキードラッグであるシスプラチンを上回る抗腫瘍効果を示した。また、アポトーシスアッセイにより、Prexa はアポトーシスを惹起することを示した。次に、Prexa 投与により type I インターフェロン、type II インターフェロン、CXCL10、CCL5 の mRNA 発現が上昇することを qRT-PCR で確認し、STING パスウェイ (STING・TBK-1・IRF-3) の活性化を来すことをウエスタンブロットで確認した。これにより、Prexa による免疫賦活化作用が示唆された。 さらに、Prexa 投与や CHK1 のノックダウンにより、PD-L1 の発現が上昇することをウエスタンブロットやフローサイトメトリーで確認した。これにより、Prexa と抗 PD-L1 抗体を併用することで、抗腫瘍効果や免疫賦活化作用の増強が期待された。 上記の in vitro で得られた結果と仮説を検証するため、in vivo の実験に移行した。まず、Balbc マウスに AB1 を皮下移植し、皮下腫瘍モデルを作成した。本モデルマウスで ①Vehicle・②PD-L1 阻害剤・③Prexa・④Prexa+PD-L1 阻害剤の 4 群に分けて薬剤投与を行い、腫瘍体積を比較したところ④で最も抗腫瘍効果が高い傾向があったが、有意差がつかなかった。これは免疫能が保たれた Balbc マウスでは腫瘍生着のバラつきが大きいことが一因と考えられた。マウス間でのバラつきを最小限に止めるため、本来 PM の微小環境である胸腔内に腫瘍を生着させる方針とした。AB1 を Balbc マウスの胸腔内に移植して胸膜播種モデルの作成を試みたところ、マイクロ CT で確認すると良好な生着が得られていた。本胸膜播種モデルを用いて 4 群で生存期間を確認したところ、Vehicle と比べて Prexa 群で、さらに Prexa より Prexa+PDL1 阻害剤群で生存期間を有意に延長した(図 1)。これにより、Prexa 投与は生存期間延長をきたし、さらに PD-L1 との併用で予後改善が期待されることが示唆された。今後は各群の腫瘍検体を回収して免疫プロファイリングの解析を行う方針である。 (図 1) Survival proportions: overall — Vehicle — αPD-L1 — Prexasertib — Prexasertib+αPD-L1 * * *	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

【成 果 等】	【主な論文発表】 なし
	【学会発表】 AACR2025 abstract accept・発表予定
	【その他特筆事項】 なし

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		癌内線維芽細胞による癌細胞内 RECK 活性の制御機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部病理・腫瘍学講座・主任教授・折茂 彰
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	共同研究者の高橋教授の先行研究において、通常のフォームに加えて、RECK には alternative splicing により long isoform と short isoform のバリエーションフォームが形成されることがわかっている（未発表）。興味深いことに long isoform は CAFs により産生され、short isoform は癌細胞により産生されることが preliminary な実験で示唆されている。long isoform と short isoform は機能的に相互関係があることより、癌細胞により産生された RECK の short isoform が CAF の long isoform に依存した機能を制御している可能性が推測される。本研究は癌微小環境中の CAFs が腫瘍細胞由来の RECK の機能を調節する分子機構を解明し、新規の RECK 関連創薬の開発に繋げることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	癌微小環境を構成する主な間質細胞である癌関連線維芽細胞 (Cancer-Associated Fibroblasts; CAFs) は癌細胞の浸潤・転移能を促進することが知られている。申請者は CAFs がサイトカインなどを分泌することで癌の増殖・浸潤・転移を促進することを示してきた (Matsumura et al. Life Sci Alli, 2019)。しかし、CAFs が癌細胞の浸潤性を促進する機序は不明な点が多い。 今回、申請者らは不死化したヒト乳癌由来 CAFs である exp-CAFs (Kojima Y et al. PNAS, 2010) を使用し RECK の発現レベルを評価した。興味深いことにコントロールの正常乳腺線維芽細胞と比較して、CAFs では RECK 蛋白の long isoform および short isoform 発現量が顕著に低下していた。また、CAFs で抑制された RECK 発現が、共培養された乳癌細胞の浸潤能亢進に寄与する可能性を示唆するデータも得られている。 MMP1 が CAFs における RECK 発現抑制に寄与している可能性も示唆された。今後は、異なる乳癌より樹立された複数の exp-CAFs ラインにおける RECK の発現を調査することに加えて、乳癌細胞との共移植モデルを使用し、CAFs で低下した RECK の発現が癌細胞与える影響に関して調査を進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がんのエピゲノムの多様性と光免疫療法の治療効果
研究代表者	所属・職名・氏名	東京科学大学・准教授・北口哲也
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京科学大学・助教・朱博
	所属・職名・氏名	東京科学大学・助教・安田貴信
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	近年、光増感剤を用いた光線力学療法ががん治療として注目されている。特に、抗体と光増感剤を結合させた複合体（APC）を用いる光免疫療法（PIT）は、高い標的選択性と優れた抗がん活性を有し、従来の化学療法よりも副作用が少ないと期待される。しかし、光増感剤による活性酸素の非特異的産生や、治療後の光線過敏症といった課題が残る。そこで我々は、がん細胞に“結合依存的”に活性化する光増感剤修飾抗体を開発し、さまざまなエピゲノム変異をもつがん細胞での効果を検討することで、副作用の低減と治療の安全性向上を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、光増感剤修飾抗体の開発を通じて、がん細胞に対する結合依存的な細胞傷害性を実現し、副作用の低減を目指した。標的抗原に結合した際にのみ活性化する独自の分子スイッチ機構を構築することで、バックグラウンドの活性酸素産生を抑制し、高い標的特異性を持つ光免疫療法の実現を目指す。 本手法は、Quenchbody (Q-body) の原理を応用し、光増感剤と消光剤をつなぐリンカーペプチドを抗体内に内包させることで達成する。抗体が標的抗原に結合すると、がん細胞やその周囲で高発現するプロテアーゼによってリンカーペプチドが切断され、光増感剤が解放される仕組みである。モデル抗体には、HER2 を標的とするトラスツマブを採用し、リンカーにはプロテアーゼ MMP2/MMP9 の認識配列を導入、光増感剤としてメチレンブルー（MB）、消光剤として BHQ3 を用いた。 MB を BHQ3 およびリンカーペプチドと連結させたところ、MB の蛍光が顕著に低下し、意図した通り BHQ3 による消光が確認された。さらに、この修飾リンカーペプチドはトラスツマブの N 末端にソルテースにより結合させても、抗体の抗原結合能は維持されていた。そして、この光増感剤修飾抗体に HER2 を添加すると、時間依存的に蛍光が上昇し、リンカーペプチドの切断に伴い BHQ3 が解離したことで MB の蛍光が回復したと考えられる。MB の蛍光は活性酸素産生と相関することから、活性酸素を測定したところ、蛍光と同様に時間依存的な上昇が検出された。 今後は、細胞株を用いた細胞傷害性試験を実施するとともに、エピゲノム変異を有するがん細胞株を用いた評価も進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	

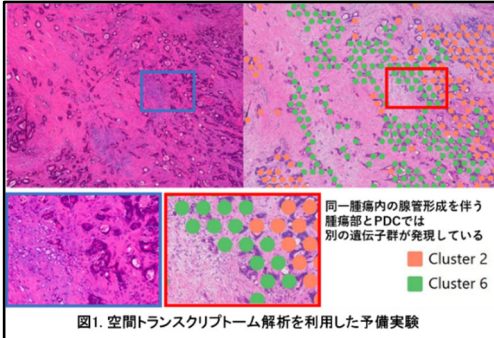
令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		細胞老化が制御するストレスレジリエンス機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学 保健科学研究所・教授・千見寺貴子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	札幌医科大学 医学部解剖学第二講座・講師・齋藤悠城
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村 由和
【研究目的】	本共同研究では、貴学の城村由和教授ら(Cell Metab, 2019)が作製した老化細胞マーカー p16 遺伝子のプロモーター下流に CreERT2 リコンビナーゼ遺伝子を挿入したマウス (p16-CreERT2 マウス)と赤色蛍光強発現遺伝子導入マウス(tdTomato マウス)を交配し、ストレス誘導性に出現する老化細胞を可視化し脳組織内の分布を検証すると同時に、ストレス負荷後に老化細胞が出現するタイミング、老化細胞が出現した後の動態をトラッキングすることで、ストレスを負荷した時の細胞老化の関与を検証することを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	うつ病の発症機構もしくはストレスレジリエンス機構への細胞老化の影響を検証するため、上記遺伝子組み換えマウスについて、城村教授ら研究チームと意見交換を実施した。特に、我々が研究対象とする遺伝子組み換えマウス系統の適切な交配や、安定した実験個体群を維持・確保するための繁殖技術に関する実践的なノウハウについて、詳細な情報交換および意見交換の機会を持った。この意見交換を通じて、マウス系統の特性に合わせた飼育管理の留意点や、効率的な繁殖ペアリングの選定方法、具体的なテクニックなど、研究遂行上、極めて有益な知見を得ることができた。 本研究は継続課題として、城村教授から凍結保存されている精子の提供を受けて提供された凍結精子を北海道大学の動物実験施設にて個体作出し、細胞老化が精神機能に及ぼす影響を個体レベルで詳細に解析するための研究基盤を確立する予定である。具体的には、当該遺伝子組み換えマウスに対して、これまで我々が用いてきた慢性緩徐ストレス(chronic mild stress [CMS]、昼夜逆転やケージの傾きなどランダムに慢性ストレスを与えることでうつ病様の病態を発症)を負荷し、脳組織の細胞老化についてトラッキングし、老化細胞について解析する。すでに野生型マウスで、これら CMS マウスの約 50%がうつ病様行動を示す一方で、50%はストレスを受けてもうつ病様行動を示さないレジリエンスマウスであることを検証済みであることから、当該遺伝子組み換えマウスにストレス負荷し、うつ病様マウスとストレスレジリエンスマウスでそれぞれの細胞老化の影響を比較・検証する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	論文データ準備中
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		希少がんのエンハンサー異常を標的とするエピゲノム編集治療の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人がん研究会がん研究所がんエピゲノム研究部・主任研究員・田中中和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	がんの発生や悪性化には、正常細胞とは異なるがん特異的な異常エンハンサーやクロマチンループの構築、DNAのメチル化やヒストン修飾の変化など、様々なエピゲノム制御の破綻が深く関わっている。ヒストンやポリコーン複合体、SWI/SNF構成因子の変異等、エピゲノム異常をもたらす原因は相次いで明らかにされる一方で、疾患特異的なエピゲノム異常を標的とした体系的な治療法は十分に確立されていない。そこで本研究では、エピゲノム編集技術を用いて腫瘍特異的なエピゲノム異常に干渉することで、将来の治療法につながるシステムの確立を目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	染色体の構造異常に基づく融合遺伝子は、様々ながん種で発症の強力な推進力となっている。融合遺伝子はがん細胞特異的であり、がん細胞の生存や増殖にも重要であることから、融合遺伝子および融合蛋白の標的は魅力的な治療標的となり得る。本研究は、染色体転座に起因する骨軟部肉腫の融合遺伝子と融合蛋白が結合する標的遺伝子の異常エンハンサー領域に対して、ガイドRNA (gRNA) を用いて転写修飾型 dCas9 を集積させる技術開発であり、このエピゲノム編集技術を確立してマウス個体で腫瘍増大の抑制を検証することにより、実用化への道を切り開く。 1. 融合遺伝子自身のエンハンサーおよび肉腫特異的なエンハンサーに gRNA を設計 対象疾患は融合遺伝子陽性のユーイング肉腫、滑膜肉腫、胞巣状軟部肉腫、CIC 再構成肉腫、粘液型脂肪肉腫で、各々の細胞株を用いてヒストン H3K27ac および H3K4me1、H3K4me3 の ChIP-seq を実施した。gRNA の設計領域は、融合遺伝子 (EWS-FLI1, SS18-SSX1, ASPSCR1-TFE3, CIC-DUX4, FUS-CHOP) の 5' および 3' のエンハンサーと、融合遺伝子の標的 (RAB27A, GPNMB, ETV4 等) のエンハンサーで、他の癌腫や正常細胞のエンハンサーと比較することで、個別の肉腫特異的エンハンサーを推測した。これらの肉腫特異的エンハンサー領域に対して、PAM 配列を考慮して gRNA を設計し、レンチウイルスベクターに導入して gRNA ミニライブラリーを作製した。 2. dCas9 細胞株の樹立と機能的 gRNA の同定 dCas9-KRAB ベクターは、オリジナルの KRAB と、これに MeCP2 または ZIM3 を融合した改良型の合計 3 種類を Addgene 社より入手した。dCas9-KRAB 肉腫細胞を樹立するために、dCas9-KRAB、dCas9-KRAB-MeCP2、ZIM3-dCas9-KRAB を各々肉腫細胞に導入してクローン化し、安定発現細胞株を作製した。胞巣状軟部肉腫細胞を用いた準備実験では、レンチウイルス gRNA の感染による遺伝子発現の抑制は、3 種類の KRAB 細胞の中で、改良型の dCas9-KRAB-MeCP2 が最も高いことがわかった。 今後は、gRNA ミニライブラリーの中から機能的 gRNA の同定を進めるとともに、gRNA と dCas9 複合体のマウス個体へのデリバリー方法の構築の準備を進める。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 1. 「がん微小環境とエピゲノム異常を制圧する治療法開発」第 70 回日本病理学会秋期特別総会、2024 年 11 月 7 日、シンポジウム 2. 「エピゲノム編集を用いたがんの治療法開発」第 9 回日本ゲノム編集学会、2024 年 6 月 18 日、一般口演	
	【その他特筆事項】 なし	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		治療抵抗性を示す大腸癌に対する新規治療標的因子の探索 — オルガノイドおよびがん関連線維芽細胞を用いた検討
研究代表者	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・准教授・梶原由規
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・講師・望月早月
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・川内隆幸
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・大学院生・大塚泰弘
	所属・職名・氏名	防衛医科大学校外科学・教授・上野秀樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	大腸癌の病理組織標本における線維性癌間質反応(DR)または腫瘍浸潤先進部の脱分化所見である簇出や低分化胞巣(PDC)はそれぞれ優れたリンパ節転移の予測能や予後分別能を有することが明らかとなっている。一方、これらの病理所見の形成に関わっていると考えられる癌関連線維芽細胞(CAF)と癌細胞の相互作用が治療抵抗性に影響を与えるメカニズムについては明らかになっていない。本研究ではこの一端を解明すべく、大腸癌手術検体から大腸癌オルガノイドと CAF を採取・培養し、CAF と共培養したオルガノイドまたは大腸癌細胞株の治療抵抗性を評価するとともに、癌悪性度や治療抵抗性について臨床応用可能な新規治療標的因子の同定を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	Stage II/III 大腸癌の粘膜下層浸潤部でも DR の形態的分類が可能であり、漿膜下層と同様に腫瘍悪性度と関連があることを報告した。また、決定木分析を用いた検討により、進行度分類に DR 分類および低分化胞巣を組み込むことで、再現性に優れた大腸癌の再発予測モデルが構築でき、術後補助化学療法の選択指標となり得ることを見出した。 術後補助化学療法症例の検討にて、大腸癌の腫瘍浸潤先進部における脱分化所見や DR 分類によって、補助化学療法施行後の再発リスクを層別化することを検証した。 空間トランスクリプトーム解析を用いて同一組織内で病理学的所見に多様性を示す症例を解析し、PDC や DR 分類別に mRNA の発現を網羅的に解析し、病理学的所見の特徴別に mRNA 発現がそれぞれ別々のクラスターとして分類され、異なる遺伝子群が機能していることを確認した(図1)。今後、治療介入に有望な遺伝子群を同定しオルガノイド等を用いた検証を進める予定である。	
【成果等】	 図1. 空間トランスクリプトーム解析を利用した予備実験	
	【主な論文発表】 1. Kajiwar Y, Ueno H: Essential updates 2022-2023: Surgical and adjuvant therapies for locally advanced colorectal cancer. Ann Gastroenterol Surg. 2024 Aug 19;8(6):977-986. 2. Tamaru Y, Kuwai T, Kajiwar Y, et al.: Long-Term Outcomes of Additional Surgery After Endoscopic Resection Versus Primary Surgery for T1 Colorectal Cancer. Am J Gastroenterol. 2024 Dec 1;119(12):2418-2425. 3. Oka S, Tanaka S, Kajiwar Y, et al.: Treatment Decision for Locally Resected T1 Colorectal Carcinoma-Verification of the Japanese Guideline Criteria for Additional Surgery Based on Long-Term Clinical Outcomes. Am J Gastroenterol. 2024 Oct 1;119(10):2019-2027. 4. Minamide T, Ikematsu H, Kajiwar Y, et al.: Impact of Lesion Location on Recurrence After Resection of T1 Colorectal Cancer: Post Hoc Analysis of a Nationwide Multicenter Cohort Study. Gastroenterology. 2024 Jan;166(1):198-201.e3.	
	【学会発表】 1. Kajiwar Y, et al. Association between Pathological Feature of Poorly Differentiated Clusters and Chemoresistance in Metastatic Colorectal Cancer. The Eighth JCA-AACR Special Joint Conference. 2024 年 7 月 29 日 2. 梶原由規、他. Stage II/III 大腸癌の粘膜下層における線維性癌間質反応に関する検討. 第 79 回日本消化器外科学会. 2024 年 7 月 18 日 3. 梶原由規、他. 大腸癌における新規病理学的因子を含めた再発予測モデルの構築 — 決定木分析を使用した検討. JDDW2024. 2024 年 11 月 1 日 4. 梶原由規、他. 大腸癌研究会の pT1 ノモグラム因子の妥当性 — 大腸癌登録データを用いた検証. 第 79 回日本大腸肛門病学会. 2024 年 11 月 30 日 5. 大塚泰弘、梶原由規、他. 術後補助化学療法が施行された Stage II/III 大腸癌症例における DR 分類の意義. 第 79 回日本消化器外科学会. 2024 年 7 月 17 日 6. 大塚泰弘、梶原由規、他. 術後補助化学療法を施行した Stage II/III 大腸癌における腫瘍脱分化所見の治療効果予測因子としての意義. 第 101 回大腸癌研究会. 2024 年 7 月 12 日	
【その他特筆事項】なし		

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

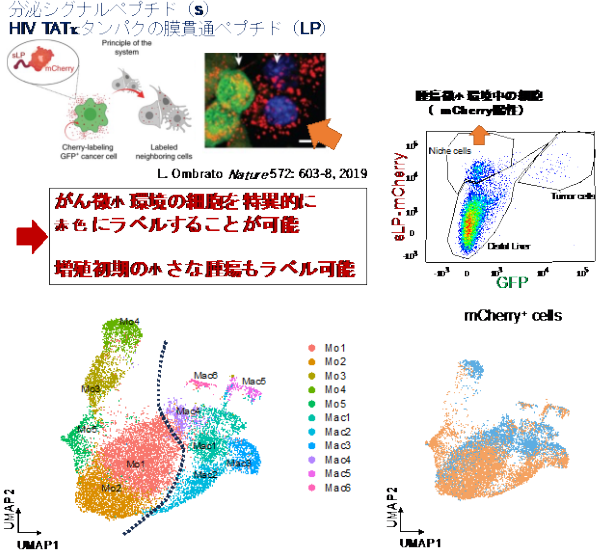
研究課題		がん悪性化および老化におけるプロリン異性化酵素の機能解明
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学医学系研究科・教授・島田 緑
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	山口大学共同獣医学部・助教・羽原 誠
	所属・職名・氏名	名古屋大学医学系研究科・助教・杉山 成明
	所属・職名・氏名	山口大学共同獣医学部・学部生・富安 遥己
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村 由和
【研究目的】	われわれは最近、乳がんの新たな治療標的として FKBP52(FK506 Binding Protein 52)が非常に有効である可能性を発表した。FKBP52 はプロリンの cis/trans 変換を促進しタンパク質の立体構造を変化させるプロリン異性化酵素の一種である。FKBP52 およびその類似分子 FKBP51 はタンパク質フォールディングの役割を持つ分子シャペロンとして機能し、異常タンパク質を再生・分解に寄与していると考えられている。実際に、FKBP52 は乳がんの悪性化と深く関連する核内受容体 Estrogen receptor α (ER α) の安定化を促進し、FKBP51 は逆に ER α の分解を促進することを発表した。その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、FKBP52 と FKBP51 による ER α タンパク質安定化機能を解明することを目的として研究を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	FKBP52 はほとんどのがんで高発現しており、その類似分子 FKBP51 は逆にがんでは発現が低いという結果を得た。また FKBP52 機能の抑制が、がんの細胞増殖に対して強い阻害効果を発揮すること、乳がんでは FKBP52 が高発現していると予後不良となり、FKBP51 が高発現していると予後良好となることを明らかとした。ER α はポリユビキチン化されることで分解され、ER α のモノユビキチン化は ER α を安定化することが知られている。FKBP52 は ER α をモノユビキチン化する BRCA1 と ER α の結合に重要であり、ER α を安定化することが明らかとなったため、FKBP51 による ER α 分解メカニズムにおいてもユビキチンリガーゼが重要であると考えた。そこでまず FKBP51 インターラクトーム解析、ユビキチンリガーゼの発現量と予後との解析などを実施し、この過程に関わるユビキチンリガーゼを同定した。そして候補遺伝子ノックダウン実験、in vitro ユビキチン化解析、AlphaFold3 を用いた構造予測などを実施し、ER α をポリユビキチン化する新規ユビキチンリガーゼの同定と機能解析を行った。現在は FKBP52、FKBP51 のプロリン異性化酵素活性が ER α の分解制御にどのように重要であるかを検討している。最終的に FKBP52、FKBP51 の発現量による ER 陽性乳がんの治療選択を行うための診断法確立や治療法開発に貢献することを目指すことを考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sato Y, Habara M, Hanaki S, Masaki T, Tomiyasu H, Miki Y, Sakurai M, Morimoto M, Kobayashi D, Miyamoto T, Shimada M*: Calcineurin-mediated dephosphorylation stabilizes E2F1 protein by suppressing binding of the FBXW7 ubiquitin ligase subunit. PNAS, 2024, e2414618121	
	【学会発表】 第 101 回日本生理学会大会 カルシウムシグナルによるがん細胞の増殖制御 佐藤悠紀、羽原誠、花木駿介、正木貴大、富安遥己、三木陽清、島田緑	
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		難治がんの代謝ターゲット治療に対する感受性規定因子や獲得耐性メカニズムの解明
研究代表者	所属・職名・氏名	宮城県立がんセンター研究所・部長・田沼延公
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	近年のがんゲノム解析の進展につれ、“標的化できるドライバー変異を持たないがん”が少なくないと分かってきた。それらがんに対してはゲノム変異以外の要素を治療標的として開拓することが求められており、例えば、代謝特性もその候補の1つとして期待されている。これら状況を踏まえ、腫瘍のNAD生合成系をターゲットする治療（NADターゲット治療）の実現や発展に資するデータの収集が本研究の目的である。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	NADサルベージ経路の律速酵素NAMPTに対する阻害剤（NAMPTi）と食事ナイアシン制限（ナイアシン除去食（NFD））とを併用する治療（以下NADターゲット治療）について、各種の検討を行った。 まず、SCLC PDXモデルにおける治療効果の検討を行った。ヒトSCLC PDX4株をNOGマウスに移植し、腫瘍が一定サイズまで生育した段階でNADターゲット治療を開始した。その結果、いずれの株に対しても顕著な腫瘍縮小・抑制効果がみとめられた。同様の治療をSCLC CDXに対しても施し、その治療効果を既存治療と比較した。既存治療としては、プラチナ製剤とエトポシドの2剤併用によるEP療法を採用した。SCLC株87-5を用いた検討では、EP療法の腫瘍抑制効果が限定的だったのに対し、NADターゲット治療は著しい腫瘍縮小効果をみとめた。またこの時、EP療法でみられるホストマウスの体重減少が、NADターゲット治療群ではほとんどみとめられなかった。NADターゲット治療の副作用を検討するため、同治療を施したマウスから各種組織を採取し、組織NADレベルをしらべた。いくつかの臓器において、NAMPTi単独による、またはNAMPTi/NFD併用による、組織NADレベルの低下がみとめられた。これら各臓器の機能に及ぼす影響を調べるのが重要と考えられた。 前年度に取得した、NADターゲット治療に耐性化したSCLC株（R株）の性状解析を行った（図A）。R株は全て、不可逆的な獲得耐性を得ていた。詳細な解析の結果、R株では、NAMPTi処理後のNADレベルが、親株と同様のレベルまで低下していることが分かった（図B）。すなわち、それらR株は、低NAD状態への耐性を獲得した株であることが分かった。今後の解析による、それらメカニズムの解明が期待される。 A B	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	田沼延公：神経内分泌がん と NAD 代謝. 第 10 回がん と代謝研究会 2024 in 別府（招待講演）, 2024.08 田沼延公：「がん治療標的としての NAD 代謝」. 第 97 回日本生化学会大会（シンポジウム講演）, 2024.11
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

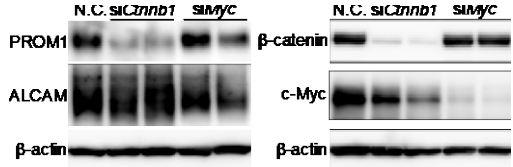
研究課題		がん微小環境における抗腫瘍免疫抑制機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター・特任准教授・柳井秀元
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター・特任研究員・ 衛藤翔太郎
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	近年、免疫チェックポイント阻害療法（ICB）などのがん免疫療法に光が当たりつつある。しかし、不応性のがんも存在するなど、未だ課題も多い。免疫療法を阻む要因として、がん死細胞から放出される分子群が腫瘍免疫応答を低下させる可能性があるのではないかと考え、これまで研究を進めてきた。実際、共同研究において、TCTP やスペルミジンなどの分子を見出してきた。そこでさらに、腫瘍免疫の制御に関与する死細胞由来分子について詳細を明らかにするため、本研究において分子の探索と同定を進める。また、腫瘍免疫に与える影響、ヒト腫瘍との関連性について、組織標本などを用いた解析から明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	免疫系が死細胞などが放出する自己分子にも反応し、炎症を誘導するということは DAMP (Damage-associated molecular pattern) 仮説として提唱されてきた。死細胞から放出される分子群の中に、自然免疫受容体である Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) のシグナル伝達経路を活性化し、これが炎症を誘導し腫瘍を増殖させると考えられている。実際、共同研究において TCTP (Translationally-controlled tumor protein) を TLR2/6 シグナル伝達系を活性化し、腫瘍増殖を促進する DAMP として同定し (Nat Immunol., 2021, 22:947-57)、また、進行胃がんにおいて血中 TCTP の高値は免疫療法の予後不良と相関があることを見出している (J. Immunother Cancer, 2025, 13:e010455)。 上記のように、これまで炎症誘導に関与する分子として DAMPs を捉え、研究を進めてきた。一方、がんも含めて、組織がダメージを受け細胞死が生じる状況においては、炎症に加えて組織修復や細胞増殖に関与するシグナルも活性化を受けるのではないかとこのような応答はがんの増殖に利することにならないか？という素朴な疑問も生じた。そこで新たな DAMP の探索を進めると同時に、腫瘍増殖過程において DAMP による応答を検出するために腫瘍ラベルシステムの確立を進めた。 DAMP の探索において、DAMP を含むと考えられる組織由来サンプルにおいて、所謂 TLR を介した遺伝子誘導パターンとは全く異なる遺伝子発現プロファイルが見られた。特に抗ストレス応答や細胞増殖に関与する遺伝子群の発現が認められ、このことは DAMP が炎症誘導とは異なる生理機能を発揮することを示しているものと考えられた。本分子の同定を現在進めている。また、腫瘍ラベルシステムを導入し、組織における増殖初期の非常に小さい腫瘍微小環境をも捕捉することができるか検討を行った (図 1)。その結果、肺において腫瘍微小環境をトラップすることができ、特にミエロイド系細胞集団の集積が見られた。したがって、本システムを用いて腫瘍増殖初期から進行期までの微小環境での応答を解析することが可能であることがわかった。今後、DAMP が腫瘍増殖のどの時期に、どのような応答を誘導するのか明らかにしていきたい。	

	分泌シグナルペプチド (S) HIV Tat タンパクの膜貫通ペプチド (LP)  Cherry-labeling GFP+ cancer cell Labeled neighboring cells L. Ombrato <i>Nature</i> 572: 603-8, 2019 がん微小環境の細胞を特異的に赤色にラベルすることが可能 増殖初期の小さな腫瘍もラベル可能 腫瘍微小環境中の細胞 (mCherry陽性) sLP-mCherry+ cells UMAP1 UMAP2 Mo1, Mo2, Mo3, Mo4, Mo5, Mac1, Mac2, Mac3, Mac4, Mac5, Mac6 Early, Late 図 1 腫瘍微小環境ラベル法を用いた検討 がん細胞 (YUMMER1.7) に GFP および sLP-mCherry を発現させ、尾静脈からマウスに接種し、肺に転移させた。mCherry 単陽性の微小環境中の細胞を確認することができた (上段右図)。 移植後 4 日目 (Early)、12 日目 (Late) の mCherry 陽性細胞を一細胞レベルで解析した。Early と Late で細胞クラスターが明確に分かれることがわかった (下図)。
【成 果 等】	【主な論文発表】 - Kim HD, Jung S, Bang YH, Kim J, Kim HJ, Lee HY, Hyung J, Yoo C, Kim WT, Yoon MJ, Lee H, Ryou JH, Jeon H, Yanai H, Lee JS, Lee G, Ryu MH. Blood TCTP as a potential biomarker associated with immunosuppressive features and poor clinical outcomes in metastatic gastric cancer. <i>J. Immunother Cancer</i>, 13: e010455, 2025. - Ito R, Sumitomo R, Iizawa M, Yanai H and Ono R. Inhibitory effect of streamer discharge on the local recurrence of B16F10 melanoma tumor in mice. <i>J. Phys. D Appl. Phys.</i>, 58: 135202, 2025. 【学会発表】 - 柳井秀元、腫瘍免疫応答に影響を与える死細胞由来分子の探索、第 21 回 日本免疫治療学会学術集会、2024 年 5 月 18 日、福島 - 柳井秀元、腫瘍死細胞スperlミジンによる T 細胞活性化の抑制、第 10 回 がん代謝研究会、2024 年 8 月 2 日、大分 - 柳井秀元、Tumor progression by oncometabolite spermidine、第 83 回 日本癌学会学術総会、2024 年 9 月 21 日、福岡 - 柳井秀元、組織特異的な腫瘍免疫微小環境形成機構の解明、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27 日、福岡 - 柳井秀元、がん微小環境における抗腫瘍免疫抑制機構の解明、令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点 研究成果報告会、2025 年 2 月 17 日、金沢 【その他特筆事項】

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		統合的肺がん 1 細胞発現解析によるがん微小環境の多様性の理解と機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター ユニット長 山本 雄介
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学 博士課程 平野悠太
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授 平田英周
【研究目的】	大規模な肺腺がんならびに肺扁平上皮がんの 1 細胞 RNA-seq データを用いて、実際のヒト検体におけるがん微小環境の包括的な解析を行う。肺がんは、同じ組織内に非常に性質の異なる腺がんと扁平上皮がんという 2 つのサブタイプの腫瘍が存在するがんであり、がん微小環境の比較検討を実施する上で最適なモデルであると考えている。2023 年度の段階で、公共データベースより取得した 1 細胞 RNA-seq データを統合して、ヒト肺がんの病変を in silico に再現する 1 細胞 RNA-seq データセットを構築する手法を開発した。2024 年度は、がん細胞の性質の違いが CAF をはじめとしたがん微小環境内の細胞の性質に対して本当に影響を及ぼすのか、もし影響を及ぼすのであれば、その影響要因がどのようなものかを解明することに焦点をあてる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	公共データベースより、肺腺がん 187 症例ならびに肺扁平上皮がん 80 症例の 1 細胞 RNA-seq データを取得し、腺がん組織由来の約 38 万細胞および扁平上皮がん組織由来の約 13 万細胞のデータを統合した肺がん細胞アトラスの作成を行った。inferCNV を用いて、正常組織とがん組織由来の細胞を単離した。細胞ごとのマーカー遺伝子の発現により、リンパ球系細胞、骨髄球系細胞、内皮細胞、間質細胞に分類し、腺がんと扁平上皮がんにおいて、各細胞の割合について検討を行った。T 細胞、形質細胞、樹状細胞、中皮細胞、がん関連線維芽細胞(Cancer Associated Fibroblast, CAF)の割合に腺がんと扁平上皮がんでは有意な差が認められた。 CAF に焦点を当てた解析から、肺腺がんにおいては、炎症性の CAF が肺扁平上皮がんよりも有意に誘導されていることが明らかになった。一方で、筋線維芽細胞様の CAF は肺扁平上皮がんにより顕著に観察された。がん細胞のサブタイプの違いが、線維芽細胞の分化に影響を与えていると考え、肺がんの細胞株と肺由来線維芽細胞の共培養実験を行った。腺がん細胞株 Calu-3 と共培養した肺線維芽細胞は、炎症性 CAF のマーカーの 1 つである IL-6 が誘導されることが確認され、扁平上皮がん細胞株 LK-1 と培養された肺線維芽細胞はより筋線維芽細胞のマーカーである α SMA を高発現することが認められた。RNA-seq を用いた遺伝子発現解析からも、同様の結果が得られた。パスウェイ解析の結果からも、腺がん細胞株 Calu-3 と共培養した肺線維芽細胞は、扁平上皮がん細胞株 LK-1 と共培養した肺線維芽細胞とは、誘導される遺伝子経路が大きくことなり、がん細胞株から受ける影響が、がんのサブタイプごとに大きく変化することを見出した。 さらに、TCGA の肺がんデータを用いて、CAF のサブタイプが患者の予後に与える影響について検証した。具体的には、遺伝子発現データから、筋線維芽細胞様の CAF と炎症性 CAF の量を推測し、それぞれの CAF 量と予後の相関を評価した。筋線維芽細胞様の CAF は、腺がんと扁平上皮がんの両方において、その増加が予後不良と有意に相関していた。しかし、炎症性の CAF は扁平上皮がんにおいてのみ、予後不良と相関が見られ、逆に腺がんにおいては、炎症性の CAF の量が多い症例は、予後が有意に良好であった。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 シングルセルメタ解析によって明らかとなった肺腺癌と肺扁平上皮癌における繊維芽細胞の特性. 平野 悠太, 鈴木 公基, 中山 淳, 山元 智史, 荒屋 潤, 藤田 雄, 山本 雄介, 山本 雄介. 日本癌学会総会 83 回 E-1018 2024 年 9 月	
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		転移性大腸がんのがん幹細胞を制御する分子の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・がん病態生理学分野・藤下 晃章
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	愛知県がんセンター研究所・副所長 兼 がん病態生理学分野長・青木正博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	大腸がんのがん幹細胞性を制御する分子メカニズムを解明し、治療標的を探索するため、薬剤ライブラリースクリーニングを実施した。これまでに、NF-κB 阻害薬 QNZ が、がん幹細胞マーカーALCAM や PROM1 の発現を抑制することを発見したが、その作用機序は NF-κB 経路とは無関係であった。本研究では、CKPS 細胞のトランスクリプトーム解析を行い、QNZ 処理によって発現が変動する遺伝子やシグナル伝達経路を特定すること、さらに質量分析により QNZ に結合するタンパク質を同定し、がん幹細胞性の維持に関与する分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	CKPS マウスから樹立した大腸がん細胞株 (CKPS 細胞) を用いて以下の解析を実施した。 大腸がん幹細胞制御遺伝子の同定 QNZ を処理し、RNA-seq データを用いたエンリッチメント解析により、QNZ が Ets1 や Egr1 などの転写因子を標的とする可能性を見出した。そこで CRISPR-Cas9 により Ets1 や Egr1 ノックアウト (KO) 細胞を作成したが、がん幹細胞マーカーである ALCAM や PROM1 の発現はコントロール細胞と比較して有意な変化は認められなかった。さらに、RNA-seq データを再解析したところ、Lgr5 や Axin2 など Wnt 経路の標的遺伝子が低下していたことから、Wnt 経路の抑制ががん幹細胞マーカーの発現に及ぼす影響を検証した。Wnt 経路を抑制するため、β-カテニン (Ctnnb1 遺伝子) および Wnt 経路標的遺伝子の一つである Myc を siRNA によりノックダウンしたところ、ALCAM の発現は変化しなかったが、β-カテニンをノックダウンした CKPS 細胞において PROM1 の発現低下が認められた(図)。一方、Myc をノックダウンしても PROM1 の発現は低下しなかった。これらの結果から、QNZ は Wnt 経路を抑制することで PROM1 の発現を減少させている可能性が示唆された。 QNZ 標的タンパクの同定・検証 QNZ を固定化したビーズを作製し、CKPS 細胞溶解液を用いてアフィニティ精製を行い、QNZ と結合するタンパクについて質量分析により同定した。その結果、Npb、Incenp、Tpt1 などのタンパクとの結合が確認された。siRNA によりこれらの遺伝子をノックダウンし、ALCAM や PROM1 の発現を検証したが、コントロール CKPS 細胞と比較して有意な変化は認められなかった。 以上の結果から、QNZ の直接の標的は特定できなかったが、Wnt 経路を阻害することでがん幹細胞マーカーPROM1 の発現を低下させることを見出した。	
	 図. siCtnnb1 および siMyc によるがん幹細胞マーカーの発現を Western blot 法により検証した。β-カテニンのノックダウンは PROM1 の発現を低下させた。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	1. T. Fujishita, M. M. Taketo, M. Aoki. Exploring signaling pathways essential for stemness and metastasis of colorectal cancer cells AACR Annual Meeting, April 9, 2024 2. 青木正博、三城恵美、武藤誠、藤下晃章. RhoC は大腸がん細胞のスフェロイド形成能および転移能を促進する第 33 回日本がん転移学会学術総会、2024 年 6 月 27 日 3. 青木 正博、藤下 晃章. Interrogating cancer hallmarks through an autochthonous mouse model of metastatic colorectal cancer 第 83 回日本癌学会学術総会、2024 年 9 月 20 日	
【その他特筆事項】		

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		1 細胞遺伝子発現解析におけるがん休眠細胞同定技術の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪国際がんセンター研究所・研究員・中山淳
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田英周
【研究目的】	がん細胞の休眠とは、可逆的な G0 期に入って、細胞代謝が落ち、転写や翻訳の大部分が抑制された状態で数ヶ月から数年という長い時間を静止している現象と定義される。治療によって寛解状態となっても、一部の患者はがん細胞が遠隔臓器に転移し、休眠している状態であると考えられている。がん休眠機構を明らかにすることは、がんの再発転移を制圧する上でも重要な課題である。 近年、1 細胞解析の発展に伴い、腫瘍内不均一性や微小環境が 1 細胞レベルで明らかにされつつある。しかしながら、休眠状態にあるがん細胞を正確に予測・同定する解析技術は乏しい現状にある。その原因は、明確ながん休眠マーカー遺伝子がほとんど同定されていないことに加え、休眠状態の細胞は ATP・RNA・タンパク量などが減少しているため、そもそも細胞として検出できていない部分がある。このような問題を解決するため、scRNA-seq データにおける新たな休眠細胞検出方法の確立と抽出した休眠関連遺伝子候補を対象とした機能解析を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでの研究から、オーファン核内受容体をコードする NR2F1 遺伝子はルミナル乳がんおよび一部の頭頸部がんにおける休眠を制御する責任遺伝子の 1 つであることが明らかにされている (Sosa et al., <i>Nat. Commun.</i>, 2015; Sanzhes Calle et al., <i>Mol. Oncol.</i>, 2019; Liu et al., <i>Nat. Commun.</i>, 2021; Khalil et al., <i>J. Exp. Med.</i>: 2022)。この NR2F1 の遺伝子発現を 1 細胞解析の感度で検出可能かどうか確認するために、Tokura and Nakayama et al., <i>Cancer Res.</i>, 2022 の乳がん 1 細胞データセットを用いて解析を行った。 結果として、ごく一部の乳がん細胞において細胞周期が G1 期 or G0 期かつ NR2F1 を発現している細胞がいることを同定した。これらの細胞集団に特徴的な遺伝子を抽出したところ、SOX ファミリーなどの転写因子や炎症に関連する遺伝子を実験的に発現していることを見出した。また、非浸潤性乳管がん (DCIS) と浸潤性乳管がん (IDC) における NR2F1 発現細胞の比較解析を行った結果、遺伝子発現パターンが大きく異なることがわかった。すなわち、がんのステージによって NR2F1 陽性細胞のプロファイルが異なることが示唆された。 一方で、代表者は休眠を制御する薬剤や遺伝子の探索を行っている。その研究から複数の休眠誘導薬を見出しており、多数の休眠細胞をサンプリングすることが可能となった。その系を用いて休眠誘導細胞の RNA-seq 解析を行い、細胞周期に関連する遺伝子の発現が低下していることを見出した。すなわち、現在の 1 細胞解析における休眠細胞抽出条件、細胞周期に関連する遺伝子を発現し、G1 期または G0 期に存在する細胞集団であることから、本来の休眠細胞を抽出できていない可能性が見出された。 細胞周期の遺伝子を発現していない集団を Selection する解析プログラムが存在しないため、今後はこの抽出プログラムの構築が課題であると考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 本研究に関わる該当論文なし	
	【学会発表】 【1】<u>Jun Nakayama</u>, Ryoichi Nishida, Kentaro Semba, Shigeki Higashiyama, Yusuke Yamamoto, Identification of Signal Pathways for Cellular Dormancy Induction in Breast Cancer, The 22nd Protein Island Matsuyama International Symposium, Ehime University E.U.Regional Commons, 15 Nov 2024, Poster presentation: No.1 【2】<u>中山淳</u>, Metastatic dormancy in breast cancer, 第 2 回ナノ生物流体研究会, 愛媛県 サンライズ糸山 今治市サイクリングターミナル, 2024 年 9 月 12 日 (招待講演)	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		細胞の老化過程における糖鎖マーカーの探索とその機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋市立大学・大学院薬学研究科・矢木宏和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・助教・中野 泰博
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	細胞の老化は、DNA 修復能が低下し、DNA の損傷が蓄積することでがん発症・悪性進展に密接に関わっていることが知られている。一方で、老化細胞を老齢個体から薬理的・免疫学的アプローチにより除去すると、慢性炎症が収束し様々な加齢性変化が改善できることも見出されつつある。このように、老化細胞は、その細胞自身ががん化するだけでなく、その周辺の細胞にも大きく影響を与えている。糖鎖は細胞表層を構成する主要な生体物質であり、主な機能として分子間相互作用を通じた細胞間コミュニケーションとシグナル伝達の調節が挙げられる。これまでに、細胞表層における特異的に発現している糖鎖は、がんマーカーや幹細胞の未分化マーカーになるだけでなく、積極的にがん化や未分化性の維持に関わっていることが報告されている。 そこで本研究では、細胞の老化前後においての糖鎖プロファイリングを行うことで、老化細胞特異的な糖鎖を見出すことを目指した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒト線維芽細胞にアンフォテリシン B などの薬剤処理や紫外線照射を行うことで細胞老化を誘導し、老化前後の細胞を調製した。これらの細胞を用いて、RNA シークエンシングおよびグラコムクス解析を実施した。 特に、アンフォテリシン B 処理によって得られた老化細胞において、MALDI-TOF-MS を用いて糖鎖の発現糖鎖の解析を行った結果、老化の誘導に伴い、「パウチマンノース型」と呼ばれる比較的小型の N 型糖鎖が顕著に増加していることが明らかとなった。 このパウチマンノース型糖鎖は、リソソーム内での糖タンパク質分解過程において出現することが知られている。老化細胞では、リソソーム酵素の発現増加やリソソームそのものの肥大化が報告されており、今回観察されたパウチマンノース型糖鎖の増加は、老化に伴うリソソーム機能の亢進と関連して生じた可能性が高いと考えられる。 今後は、本研究で同定された老化特異的糖鎖の生合成に関与する酵素の発現を抑制し、これらの糖鎖が老化過程に及ぼす影響を明らかにする予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Kiyoko F Aoki-Kinoshita, Hiromune Ando, Kiyohiko Angata, Morihisa Fujita, Jun-ichi Furukawa, Hiroyuki Kaji, Koichi Kato, Ken Kitajima, Yasuhiko Kizuka, Yusuke Matsui, Kazuki Nakajima, Shoko Nishihara, Tetsuya Okajima, Kazuma Sakamoto, Chihiro Sato, Morten Thaysen-Andersen, Akira Togayachi, Hirokazu Yagi, and Kenji Kadomatsu The Human Glycome Atlas Project for cataloging all glycan-related omics data in human <i>Glycobiology</i> , cwae052 (2024).	
	矢木宏和, 加藤晃一 技術講座：糖鎖構造のオミクス解析 細胞 56, No.4, 30-32 (2024)	
	【学会発表】 矢木宏和 糖鎖の構造解析を基軸とした糖タンパク質の機能研究 金沢大学新学術創成研究機構 異分野融合セミナー 2024 年 12 月 20 日 (金沢)	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	矢木宏和 幹細胞、がん細胞、老化細胞における糖鎖の構造機能解析 APPW2025 2025 年 3 月 19 日 (千葉) ; 3S16a-4.
	【その他特筆事項】

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		バイオ機能性ハイドロゲルを用いた大腸がん悪性化に寄与する新規膜物性変化の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京科学大学 難治疾患研究所・講師・榊康一
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学 がん進展制御研究/ナノ生命科学研究所・教授・大島正伸
	所属・職名・氏名	金沢大学 ナノ生命科学研究所・准教授・中山瑞穂
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	微小環境はがん細胞の制御における重要な手掛かりとして注目を浴びてきたが、その構成要素は細胞・分子などの生物学的要素のみならず、酸素・pH 等の化学的要素や、足場の弾性・剛性・形状等の物理的要素が複雑に絡み合って構成されている。本課題では材料還元型の新しい微小環境解析法を有する研究代表者らが、受入担当教員らの有する大腸がんの多段階悪性化モデルおよびナノスケール物性解析系を活用する異分野融合の共同研究を推進することで、がん・微小環境ナノスケール空間の物理的病態を解明し、新たに物理標的型の治療法を開発することを目的に実施した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本課題開始時に同定されていた転移性大腸がん細胞 (AKTP) に接着性のヒットポリマー10 種について、その物理的性質に多様性を付与するため、モノマーブレンド濃度の改変 (10, 30, 50, 70, 90%) と水の添加有無により、1 種類のモノマーから物性の異なる 10 種類のハイドロゲルを合成した (計 100 種類)。カバーガラス表面 (SiO₂) をアクリル化後、PET フィルム上に垂らした架橋剤を含む反応液上にマウントし、そこに UV 照射 (365nm) を行うことで、ゲルをガラス表面に固相化した培養基材を作製した。ゲル固相化ガラス上で AKTP 細胞を培養したところゲル化によって細胞接着性が失われた。唯一 ethyl methacrylate と 2-(diethylamino)ethyl methacrylate を原料とするゲル上で弱い細胞接着が維持されたが、細胞形態に明らかな変化は観察されず、膜物性解析に供すべき比較モデルを確立できなかった。そこで新たにバイオ機能性のポリマーを同定するため、1) ポリマーライブラリーの規模を増やし、2) Phalloidin 染色で細胞骨格を定量・評価し、3) より悪性度の高い AKTPF 細胞を比較対象に置くことで、高精度のスクリーニングを実施した。エジンバラ大学の Bradley 教授のロンドン大学への異動に伴い、380 種類のポリマーライブラリー (アクリル系ポリマー256 種とウレタン系ポリマー124 種) が研究代表者の元へと移管された。そこで独自にアレイスライドを作製し、スクリーニングを実施したところ、AKTP 細胞は比較的多くのポリマー、特にウレタン系のポリマーに対して良好な接着性を示し、特異的なヒットを 48 種類 (アクリル系 20 種、ウレタン系 28 種) 同定できた。一方で、より悪性度の高い AKTPF 細胞は全体的にポリマーに対する接着性の低いことが明らかとなり、特異的なヒットは 13 種類 (アクリル系 11 種、ウレタン系 2 種) のみであった。現在、定量した Phalloidin の蛍光強度から細胞骨格の変化を比較評価し、有力なヒットの抽出作業を進めている。今後、ゲル化の過程を経て、AKTP および AKTPF それぞれに特異的な機能性マテリアルを開発する。さらに、膜の構造・物性変化の比較解析へと進めることで、悪性形質の獲得・消失に寄与する新規の膜物性変化を特定する。尚、進捗に遅れのあることから、今後、ライブラリーの構築やゲルへの合成展開などの工程には分注装置・合成装置などの自動化システムを独自に開発・導入することを検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		発がんプロモーションメカニズムの解明と細胞表面構造を指標としたプロモーション活性評価法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	星薬科大学薬学部・教授・戸塚ゆ加里
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	星薬科大学薬学部・講師・今井正彦
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	ヒトがんの発生には遺伝的な素因よりも環境要因の寄与の方が大きい。環境中に存在する化学物質が DNA を修飾し、DNA 付加体を生成する。これらが DNA の自己複製の際に読み間違えを誘引し、ドライバー遺伝子に変異として固定されることが、細胞がん化の始まりとなる。一方、化学物質の中には DNA への直接的な修飾能を持たず、プロモーション活性により発がんに関与するものも存在するが、このような発がんプロモーターの本体や作用機序については未だ不明な部分が多い。そこで、本研究では、がんのドライバー遺伝子変異を導入したマウス各種臓器オルガノイドを用い、発がんプロモーターの作用機序解明を目指す。同時に、オルガノイド細胞の細胞表面構造や物理学的な性質変化を指標とした発がんプロモーターの定量的スクリーニング法の開発についても検討する。さらに、高速走査型イオン電導顕微鏡 (HS-SICM) でも解析し、これら指標と発がんプロモーション活性との相関についても検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	・マウス大腸がんモデルオルガノイドに関する打合せ 大島教授らが樹立したマウス大腸がんモデルオルガノイドを用いたプロモーション活性評価法の開発について打ち合わせを行うと共に、オルガノイドの培養法 (三次元培養法) について中山瑞穂准教授にご指導をいただいた。 ・マウス大腸がんモデルオルガノイドの供与 大腸がんのドライバー遺伝子である APC (A)、Kras (K)、Tgfb2 (T) あるいは p53 (P) を組み合わせたオルガノイドのうち、上皮間葉転換 (EMT) 前の段階である AKP オルガノイド、および高転移能を獲得した AKTP オルガノイドをご提供いただいた。 ・オルガノイドの継代培養の確立 プロモーション活性の評価のため、EMT 前の AKP オルガノイドの継代培養 (三次元培養) が当施設でも可能であることを確認した。 ・既存の大腸がんプロモーターの AKP オルガノイドに及ぼす影響 大腸発がんにおいて、プロモーション活性を有するとされるデオキシコール酸の AKP オルガノイドの増殖および形態に及ぼす影響を検討した。まず、10 倍希釈系列のデオキシコール酸を AKP オルガノイドに処理した。100 µg/ml のデオキシコール酸の処理により AKP オルガノイドは死滅したが、10 µg/ml のデオキシコール酸の処理ではオルガノイドは形態を保持し、増殖能が亢進する傾向であった。 ・今後の展望 EMT によりオルガノイドの形態が球状から変化する様子は現在見出せていない。曝露期間の延長等を行い、今後は AKTP オルガノイドの性質と比較しながらプロモーション活性評価法を構築すると共に、HS-SICM 等の細胞表面構造についても解析する予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	該当なし	
	【学会発表】	
	該当なし	
	【その他特筆事項】	
	該当なし	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		日本人の前立腺がんにおける SUCLA2 遺伝子欠失
研究代表者	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 助教 田代康次郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京慈恵会医科大学泌尿器科 教授 木村高弘
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍分子生物学研究分野 教授 高橋智聡
【研究目的】	学の高橋智聡教授、河野晋博士らは、進行性前立腺癌において RB1 遺伝子と SUCLA2 遺伝子の共欠失が高頻度に生じていることを論文発表されている。また、SUCLA2 欠失を標的とした創薬開発も進行しており、チモキノンという化合物を得ている。 我々、東京慈恵会医科大学泌尿器科では、前立腺癌の臨床検体を用いて RB1-SUCLA2 の共欠失についての臨床的特徴を確認するとともに、SUCLA2 欠失症例のバイオマーカー探索を患者採血から ctDNA を抽出し解析を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	東京慈恵会医科大学附属病院および同葛飾医療センターにおける進行前立腺癌(転移を有する去勢抵抗性前立腺癌)患者から末梢血採取を行い、検体を高橋教授らの研究室で ctDNA を抽出し、RB1 および SUCLA2 の欠失について eProbe 法によってコピー数解析している。昨年度から継続して症例の蓄積を行った。 RB1 抗体を用いた Tissue Micro Array (TMA) の染色を継続して行った。 RB1 抗体の前立腺癌への反応性は一昨年からの課題であるが、複数の抗体による染色を行っているが、適切な抗体検索は継続して必要である。次年度は外部委託を検討している。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 Case Report:Hereditary Leiomyomatosis and Renal Cell Carcinoma associated Renal Cell Carcinoma 田代康次郎, 川目裕, 原田佳奈, 金子実基子, 長嶋洋治, 佐藤峻, 占部文彦, 山田裕紀, 木村高弘 第 62 回日本癌治療学会学術集会 (日本癌治療学会×ICCJ コラボレーション企画 10/25 口演)	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膠芽腫に特異的なドライバー遺伝子変異の検出法・治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	札幌医科大学・助教・丹下正一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田 英周
【研究目的】	膠芽腫は、標準治療による生存期間中央値は約 1 年であり、脳腫瘍のなかでも悪性度が高く極めて予後不良である。申請者が TCGA、CPTAC 等の公共データベースに収録されている膠芽腫患者検体の体細胞変異データを用いて行った解析では、約 20% の患者検体で <i>EGFR</i> 遺伝子の変異が確認された。これは <i>PTEN</i>、<i>TP53</i> に次ぐ高頻度であった。 膠芽腫で確認される <i>EGFR</i> 変異は、肺癌で確認される変異と異なり細胞外ドメインに集中しており、肺癌等で適用されているコンパニオン診断薬や分子標的薬の使用が困難である。本共同研究はこのような背景を踏まえ、膠芽腫特異的な変異の発見・治療に寄与するツールおよび阻害薬の探索を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	・EGFR 変異陽性膠芽腫細胞株の樹立：細胞外ドメイン変異 <i>EGFR</i> 陽性膠芽腫細胞株を作成中である。これまでに、A289V、G598V、R108K、および del6-273 (vIII) の各種細胞外ドメイン変異 <i>EGFR</i> をコードするウイルスベクターの構築を進めており、膠芽腫細胞株 U87 への導入を順次行っている。現在までに、増殖能力に著明な変化を示す変異株候補を確認しており、今後詳細な解析を進める予定である。 ・デジタル PCR 法を用いた <i>EGFR</i> 変異検出法の確立：これまでにコンパニオン診断薬が検査対象としていなかった <i>EGFR</i> 蛋白質の細胞外ドメイン変異を引き起こすような体細胞変異を検出するデジタル PCR 用プローブを作成する。現在までに複数個所の変異を検出するプローブをデザインしており、順次 Thermo 社製デジタル PCR 機を用いて有用性について評価を進めている予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 該当なし	
	【学会発表】 該当なし	
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

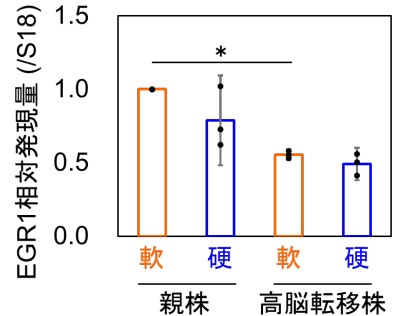
研究課題		低酸素応答に起因した肺がん分子標的薬の治療抵抗性機構 解明とその克服
研究代表者	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院 医学研究科 呼吸器内科学 助 教 片山 勇輝
研究分担者 (適宜、行を追加し てください。)	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院 医学研究科 呼吸器内科学 准 教授 山田 忠明
	所属・職名・氏名	京都府立医科大学大学院 医学研究科 呼吸器内科学 教 授 高山 浩一
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科 矢野聖二
【研究目的】	EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子を有する非小細胞肺がんは、分子標的薬により一時的に奏効するが、多くの症例で早期に薬剤耐性を獲得し、再発に至る。本研究では、薬剤耐性において腫瘍微小環境、とりわけ低酸素 (hypoxia) が果たす役割に着目した。低酸素による AXL シグナルの活性化が薬剤耐性に関与する可能性を、分子生物学的手法と薬剤感受性解析により明らかにし、さらに AXL 阻害による耐性克服の可能性を in vitro および in vivo で検証することで、治療効果向上に資する新たな戦略の開発を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、EGFR 遺伝子変異および ALK 融合遺伝子を有する複数の非小細胞肺がん細胞株を用いて、分子標的薬 (オシメルチニブ、ブリガチニブ) 治療における低酸素環境の影響を評価した。PC-9、HCC4011 などの EGFR 変異陽性細胞株、ならびに H2228 などの ALK 融合陽性細胞株において、低酸素 (1%O₂) 環境下では薬剤感受性が有意に低下した。RNA-seq 解析により、低酸素下では HIF-1α シグナル、PI3K-AKT シグナルなどの経路が活性化され、AXL、HER3、MET などの受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の発現上昇が観察された。特に AXL は低酸素により転写レベルで強く誘導され、リン酸化による活性化も確認された。AXL のノックダウンおよび AXL 阻害剤 (ONO-7475) の併用により、低酸素環境下でも AKT リン酸化抑制と薬剤感受性の回復が認められ、AXL が低酸素誘導性耐性の鍵分子であることが示唆された。 また、AXL 発現の上流制御因子として、ChEA3 トランスクリプトーム解析およびノックダウン実験により、HIF-1α および YAP が同時に関与することが明らかとなった。低酸素条件下では YAP が脱リン酸化されて核内移行し、HIF-1α と複合体を形成して AXL の転写を促進することを、免疫沈降および共局在解析により実証した。これにより、Hippo 経路と HIF-1 経路のクロストークが AXL 発現制御において機能的に連携している新たな機構が明らかとなった。 今後は HIF-1α 安定化変異体を導入した PC-9 細胞を用いて低酸素模倣モデルを構築し、AXL 阻害剤 ONO-7475 の治療効果を in vivo で検証する予定である。これにより、HIF-1α 依存的な AXL 活性化による薬剤耐性が再現され、ONO-7475 併用による感受性回復の有効性が評価可能となる。また、ヒト臨床検体における空間解析を通じて、CAF (癌関連線維芽細胞) に近接する腫瘍細胞における HIF-1α および AXL の発現を検討し、腫瘍微小環境を介した低酸素誘導と AXL 発現の関連性についての検証も進めていく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	未
	【学会発表】	未
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		シングルセル RNA-seq による RB1 欠損 MCF7 細胞株の不均一性及び遺伝子発現特徴の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・教授・Thumkeo Dean
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	Rb は多くのがんで loss of function(LOF)変異が見つかっており、代表的ながん抑制遺伝子とされている。これまで、多くの研究により細胞周期における Rb の古典的機能の詳細が明らかになったが、近年、細胞周期以外の様々な細胞機能についても Rb の関与が少しずつ明らかになってきた。しかし、現在でもはまだ不明な部分が多く、さらなる解明が必要である。このような背景から、本研究では Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いて、scRNA-seq による解析を行い、Rb 不活性化がん細胞の不均一性と遺伝子発現の特徴を明らかにし、未知のがん細胞における Rb の非古典的機能を解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究は、新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の影響により、研究代表者が約 2 年間、がん進展制御研究所に出向することができず、その結果、当初の目標であった Rb 欠損ヒト乳がん MCF-7 細胞株を用いた scRNA-seq 解析の進展はほとんど得られなかった。しかし、COVID-19 の状況が改善した令和 5 年度より、少しずつ共同研究を再開することができた。 共同研究先である高橋研究室において人員異動があった関係で、予備的な実験として、Kras (G12C) 変異を有する肺腺がんモデルを用いた解析を行った。具体的には、Kras 変異肺がんの免疫微小環境を明らかにすることを目的として、Kras (G12C) 変異肺がんモデルマウスから腫瘍を摘出し、酵素処理によって single cell suspension を作成した後、免疫細胞マーカー抗体による FACS 解析を実施した。昨年度までに得られた主な成果は以下の通りである；① Kras (G12C) 変異に Lkb1 変異 (KL 群) が加わると、Kras (G12C) 単独変異 (parental 群) に比べて、腫瘍浸潤免疫細胞の数が約 50%減少することが明らかとなった。② さらに KL 群に Keap1 変異を加えた KLK 群においても、腫瘍浸潤免疫細胞数は KL 群と同様であった。③ CD45 陽性の腫瘍浸潤性免疫細胞の減少は、CD4 T 細胞、CD8 T 細胞、TAM、M-MDSC、および cDC1 の減少に起因しており、PMN-MDSC および cDC2 の数には変化が見られなかった。これらの結果から、KL 群および KLK 群における腫瘍浸潤性免疫細胞の構成は非常に類似しており、parental 群と比較して浸潤 T 細胞の数が少なく、免疫抑制的な腫瘍環境が形成されていることが示唆された。 本年度は、主にこれらの実験結果の再現性の確認に取り組んだ。研究代表者の所属異動により研究開始が約半年遅れたが、実験を再開したところ、腫瘍細胞がマウスに生着しないという予期しない事態が発生した。詳細に検討した結果、培養に用いる血清の変更が原因であることが判明し、血清を元に戻すことで腫瘍細胞は再び生着するようになり、上記の結果を概ね再現することができた。現在は、scRNA-seq 解析を実施するための準備が完了しており、研究を継続させるために、新たな公的研究費の獲得を目指している。	
【成 果 等】	【主な論文発表】 1) Prasongtanakij S, Soontrapa K, <u>Thumkeo D</u> . The role of prostanoids in regulatory T cells and their implications in inflammatory diseases and cancers. European Journal of Cell Biology 104: 151482 (2025). 2) Punyawattananukool S, <u>Thumkeo D</u> (16th/17), Narumiya S. Prostaglandin E ₂ -EP2/EP4 signaling induces immunosuppression in human cancer by impairing bioenergetics and ribosome biogenesis in immune cells. Nat Commun 15: 9464 (2024)	
	【学会発表】 タムケオ ディーン. scRNA-seq を用いたがんモデルにおける EP4 阻害の免疫薬理学的作用機序の解明。先進ゲノム班会議、横浜、2024 年 12 月 27 日	
	【その他特筆事項】	

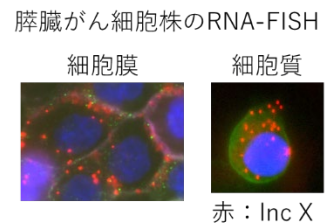
研究課題		脳転移におけるメカノレスポンス機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・石原 誠一郎
研究分担者 (適宜、行を追加し てください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田 英周
【研究目的】	脳転移は極めて重篤な状況を引き起こす。脳は生体にとって重要な臓器であるため、その機能不全は命の危機に直結する。また脳に生じた転移巣を外科的に取り除くことは技術的に困難である。脳転移に対する効果的な治療法は現在ほとんど存在しないため、脳転移のメカニズムを明らかにし、その知見をもとに脳転移の効果的な治療法を確立することが急務である。本研究では、受入担当教員と申請者のこれまでの研究成果をもとに、「軟らかい基質上で ATF5 活性を維持し EGR1 の発現を抑制する機構を獲得したがん細胞が、脳において増殖し転移巣を形成することができる」と仮説を立て、その検証を行う。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【高転移性がん細胞株および親株の増殖能】 これまでに申請者は、硬い基質上では ATF5 の活性と EGR1 の発現低下依存的にがん細胞は増殖することを見出している (Ishihara* et al., iScience, 2025)。そのため、親株は硬い基質上の方が高い増殖と生存率を示す一方、高脳転移性がん細胞株は軟らかい基質上および硬い基質上の両者において高い増殖能と生存率を示すと仮説を立てた。そこで高脳転移性がん細胞株と親株を硬さの異なる基質上で培養しその増殖を比較した。その結果、硬い基質上では両者の増殖に差がなかった一方、軟らかい基質上では高脳転移性がん細胞株は親株に比べて増殖が早いことを見出した。	
	【高転移性がん細胞株および親株の EGR1 発現】 上記の通り、EGR1 の発現はがん細胞の増殖を抑制することを見出している (Ishihara* et al., iScience, 2025)。そこで高脳転移性がん細胞株と親株を硬さの異なる基質上で培養し EGR1 の発現を比較した。その結果、硬い基質上では両者の EGR1 発現に差がなかった一方、軟らかい基質上では高脳転移性がん細胞株は親株に比べて EGR1 発現を低下させることを発見した(図)。このことから、高脳転移性がん細胞株は軟らかい基質上にて EGR1 の発現を低下させることで増殖能を獲得する可能性が示された。 【今後の展望】 今後は高脳転移性がん細胞株が軟らかい基質上で増殖能を獲得するメカニズムの解析を進める。具体的には、ATF5 の寄与やその上流分子の探索を行う。これらを通して脳という軟らかい環境下に置いてがん細胞が増殖し転移することができるメカニズムを明らかにし、それをターゲットとした新規のがん治療薬の開発を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 S. Ishihara* , A. Enomoto, A. Sakai, T. Iida, S. Tange, N. Kioka, A. Nukuda, A. Ichikawa Nagasato, M. Yasuda, T. Tokino, H. Haga: Stiff extracellular matrix activates the transcription factor ATF5 to promote the proliferation of cancer cells, <i>iScience</i> , 28, 3112057, March (2025).	
	【学会発表】 S. Ishihara , A. Enomoto, A. Sakai, H. Haga: Matrix stiffness regulates the activation of transcription factor ATF5 for promotion of proliferation in cancer cells, The 52nd Naito Conference, Sapporo, October 3rd 2024. (poster) 石原 誠一郎 、榎本 篤、芳賀 永：転写因子 ATF5 は基質の硬さ依存的に活性化しがん細胞の増殖を促進する、第 83 回日本癌学会学術総会（2024 年 10 月 21 日 福岡 福岡国際会議場）＜口頭＞	
	【その他特筆事項】	

軟らかい基質上にて、高脳転移株で EGR1 の発現が有意に低下



令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		膵臓がんの悪性化に関わる非翻訳 RNA の同定と機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学・講師・新城恵子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田英周
【研究目的】	膵臓がんマウスモデル(KPC マウス)由来の膵臓組織を用いてシングルセル解析を行い、epithelial-mesenchymal transition (EMT) に関連すると考えられる lncRNA の中からヒトと相溶性の高い lncRNA X を同定した。公共のデータベース TCGA を用いた膵臓がん症例の発現解析から、lncRNA X の高発現症例では予後不良であることが明らかとなった。lncRNA X はヒト膵臓がん細胞株でも間葉系の性質の高い細胞株で発現が高いことから、EMT に関連していることが示唆された。本研究では lncRNA X の機能解析を中心に、膵臓がんの治療標的としての可能性を検討する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	1. lncRNA X の細胞内での役割 siRNA でノックダウン実験の結果、EMT 関連遺伝子の発現低下が確認された。また、スクラッチアッセイでは lncRNA X の発現抑制により細胞の遊走能が低下することが示された。 RNA-FISH によって細胞内局在を評価したところ、細胞種や細胞の状態に応じて局在が変化することが明らかとなった。細胞膜付近に局在する場合と、細胞質に存在する場合が観察された(図)。このような細胞内局在の多様性は、マウスの膵臓がんモデル(KPC マウス)の膵臓組織においても確認された。 2. lnc X の結合タンパク質の同定 lncRNA は様々なタンパク質と相互作用することが知られている。lnc X の結合タンパク質を同定するため、RNA pull down 実験用ベクターを作成し、予備実験を行った。銀染色の結果、いくつかのタンパク質が結合している可能性が示唆された。今後、質量分析を用いてこれらのタンパク質の同定を進める予定である。 3. lncRNA X の結合タンパク質の FRET を用いた実験 上述のように、lnc X は細胞の状態に応じて細胞内局在を変化させている。2 で結合タンパク質が同定でき次第、lnc X と結合タンパク質の相互作用を FRET で確認するためのベクターの作成に着手する予定である。 lncRNA は様々なタンパク質と相互作用し、結合したタンパク質を特定の細胞内部位にリクルートすることで機能を発揮することが知られている。今回同定した lnc X は細胞の局在に応じて異なるタンパク質と結合し、異なる作用を示す可能性がある。今後は、結合タンパク質を同定とともに、より詳細な機序の解明を進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Exclusive expression of KANK4 promotes myofibroblast mobility in keloid tissues. Oishi M, Shinjo K, Takanari K, Muraoka A, Suzuki MM, Kanbe M, Higuchi S, Ebisawa K, Hashikawa K, Kamei Y, Kondo Y. Sci Rep. 2024;14(1):8725. Novel pharmacologic inhibition of lysine-specific demethylase 1 as a potential therapeutic for glioblastoma. Shinjo K, Umehara T, Niwa H, Sato S, Katsushima K, Sato S, Wang X, Murofushi Y, Suzuki MM, Koyama H, Kondo Y. Cancer Gene Ther. 2024 31(12):1884-1894.	
	【学会発表】 マルチオミクス解析による膵臓がんにおけるがん関連線維芽細胞の多様性の解明, 第83回日本癌学会学術総会、福岡、2024年9月20日、口演 Integrated Multiomics Analysis revealed the Significance of Transgelin in Driving Pancreatic Cancer-Associated Fibroblast-Mediated Cancer Progression, 2024 American Association for Cancer Research Annual Meeting, U.S.A., San Diego, USA, April 8 .2024, ポスター.	
	【その他特筆事項】	



令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん転移巣で増加する老化した線維芽細胞を介した乳がん骨転移促進機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学和漢医薬学総合研究所・助教・佐々木 宗一郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村 由和
【研究目的】	がん関連線維芽細胞 (CAF) は様々な炎症性因子を産生し、癌の悪性進展化や治療効果などに影響を与えることが知られている。申請者は骨転移時における CAF の重要性について明らかとしてきたが、CAF の起源やがん組織への動員機構、活性化機構については未だ明らかではない。そこで我々は老化した線維芽細胞が示す「炎症性タンパク質を分泌する形質」が CAF と共通した特徴を示すことに着目した。骨転移時に集積する CAF の起源やその活性化に、転移したがん細胞によって誘導される正常骨髄細胞の細胞老化が重要であると仮説立て、それらを標的とする新たな抗がん治療戦略の基盤形成をめざし、本研究計画を立案した。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	老化細胞を検出可能な C57BL/6-p16CreERT2/ROSA26-CAG-1sl-tdTomato マウスを用いて骨内腫瘍増殖モデルを作成した。8-10 週令の雌マウスの骨髄内に、マウス乳がん細胞株 E0771 細胞を接種し、腫瘍接種から 10 日後からタモキシフェンを投与した。腫瘍接種 14 日後に全骨髄細胞を回収し、tdTomato を発現した細胞を老化細胞として検出した。コントロール処置群として PBS のみを投与したマウスを用いて、腫瘍細胞増加そのものの影響を評価した。 1. 使用しているマウスがタモキシフェン投与に対して低応答性マウスである可能性を排除するため、金沢大学よりタモキシフェンに高い反応性を示すマウスを譲渡いただき、そのマウスを指標にして現在使用しているマウスの反応性について検討した。結果、これまでに富山大学で繁殖・使用していたマウスはタモキシフェンに高い反応性を示すマウスであることが示された。 2. 骨内への腫瘍接種後にマウスを経時的に回収し、骨髄内の老化細胞の変動と腫瘍巣形成との関連性について評価した。マウスの骨髄内では、接種後早期では老化細胞のシグナルは検出さなかった。その一方 IVIS で確認可能になる程度の腫瘍巣（接種後 8 日以降）では老化細胞が検出され、腫瘍巣の拡大に伴う老化細胞の増加も確認された。このことから、転移した腫瘍が骨微小環境に生着する過程よりも、生着後に増殖する過程において老化細胞が重要である可能性が示唆された。この結果は、骨転移過程において CAF は骨への生着過程ではなく、腫瘍増殖に重要であるという申請者のこれまでの実験結果と矛盾しない。 3. 腫瘍接種マウスの骨髄内にはコントロール処置群と比較して tdTomato 陽性を示す細胞集団が増加し、接種後 8 日目ではその多くが CD45 陽性の骨髄由来細胞であった。一方で、tdTomato 陽性を示す細胞集団は腫瘍巣の増加に伴い経時的に変化が見られたことから腫瘍巣の拡大に伴い細胞集団が変化する可能性が示唆された。 4. tdTomato 陽性を示す老化細胞を FACS Aria を用いて分取した。今後は包括的な遺伝子解析を行い、同一細胞間で老化細胞シグナルの有無による細胞形質の変化の解析を進める。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

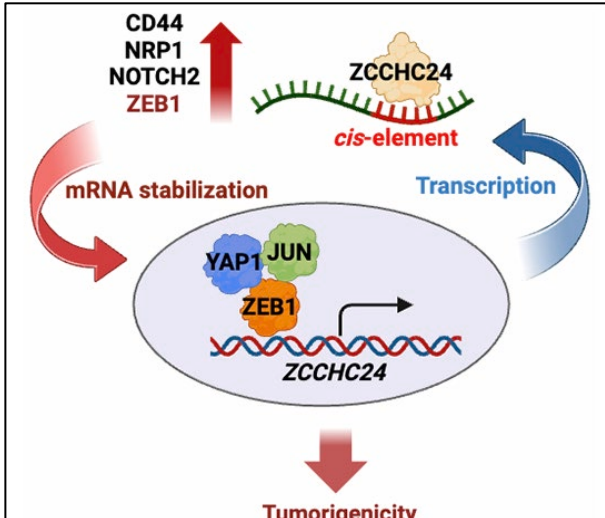
研究課題		腫瘍血管を被覆する細胞外マトリックスの機能解析
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学学術研究院基盤部門テニユアトラック推進本部・助教・高良和宏
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	福井大学学術研究院医学部門・教授・木戸屋浩康
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	組織内には実質細胞のみならず、線維芽細胞や血管内皮細胞、白血球などの多様な間質細胞が多数存在している。がんの進展過程においては、これらの細胞群で働く相互作用の重要性が明らかになりつつあるが、腫瘍組織に多く存在している細胞外マトリックス (ECM) については未解明な部分が多く残されており、ECM をメインの標的とした薬剤はない。これまで、腫瘍組織における ECM は組織中の骨格とされ、浸潤や転移に関与する構造物という視点から研究が展開されてきた。しかしながら最近では、ECM の硬さが細胞の代謝を制御するなど、細胞間相互作用に与える新たな役割が示されつつある (Ayad NME. Nature. 2020)。本研究では、血管を被覆している Vascular sleeve と呼ばれる未知なる ECM 構造体の解析を独自の技術で進め、ECM の真の機能を明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々は腫瘍血管を被覆する細胞外マトリックス (ECM) が血管新生阻害剤の治療抵抗性に影響していると考え、血管新生阻害剤投与後の腫瘍血管を被覆する ECM に着目した解析を行った。 ① 腫瘍血管を被覆する ECM イメージングマウスの作製 4 型コラーゲンが蛍光標識されているイメージングマウス (TypeIV collagen-eGFP) を用いた生体内イメージング系を用いる。血管イメージングマウス (apelin-tdTomato) と ECM イメージングマウスを掛け合わせ、腫瘍血管を被覆する ECM と腫瘍血管を同時に生体内で可視化できるマウスを作製した。本イメージングマウス的大脑表層部に CT-2A (マウスグリオーマ細胞株) を移植し、さらに移植後 17 日後に血管新生阻害剤を投与した。その結果、血管新生阻害剤投与後、未熟な腫瘍血管は退縮するが、一部の ECM が残存することが明らかとなった。また、血管新生阻害剤の投与回数に応じて、残存する ECM の数を増加していることも明らかとなり、血管新生阻害剤投与により血管内皮細胞が退縮した後も、被覆する ECM はすぐに分解されることはなく、数日間残存したままであることが明らかとなった。 ② 血管新生阻害剤投与後に残存する ECM の機能解析 血管新生阻害剤投与後に腫瘍血管が退縮し、ECM のみが残存したエリアにおいて、何らかの影響を周囲の細胞に起こすことで、細胞の局在に変化が起きていると考え、癌関連細胞の複数種免疫染色を行った。その結果、残存した ECM の局在と高い一致率の細胞をすることが出来た。現在、残存した ECM と集積した細胞の相互関係を詳細に解析するために空間トランスクリプトーム実施し、解析を進めている。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 高良和宏：腫瘍血管を被覆する細胞外マトリックスを標的としたがん治療法の確立、科研費学術変革 A 細胞外情報を統御するマルチモーダル ECM 若手の会、2025. 1. 9-10 (大阪)、口頭	
	【その他特筆事項】	

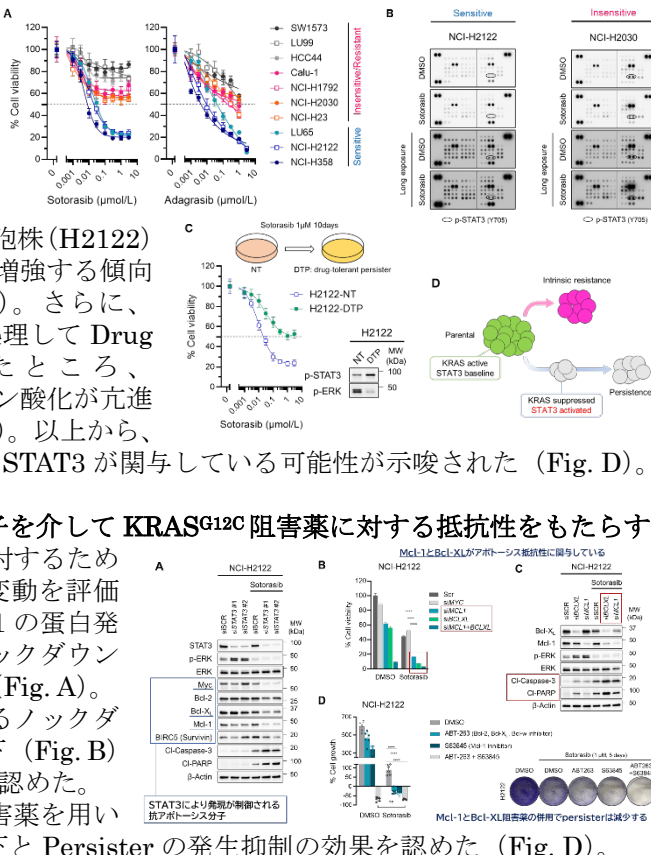
令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がんクロマチン環境における非コードRNA産生機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	九州大学・准教授・野島孝之
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	九州大学・大学院生・中山千尋
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	近年の大規模転写産物解析から、100,000種類以上の非コードRNA(ncRNA)が検出されている。しかしながら、現在までに機能が明らかになっているncRNAは一握りである。研究代表者は、ncRNA産生を制御する転写終結機構に注目している。転写終結は遺伝子下流での異常なRNA産生を防いでいるが、特定のがん患者にみられる遺伝子変異(<i>SETD2</i>)を有する細胞では転写終結が破綻し、遺伝子間領域でリードスルー転写産物と呼ばれるncRNAを産生する。本研究では、独自の新生RNA解析技術を用いて、がん特異的な転写終結破綻機構とそれ由来のncRNAを明らかにする。将来的には、ncRNAを標的とした新たな治療アプローチの開拓を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がん細胞ではクロマチン制御遺伝子に多くの変異が見られ、その多くの場合、それら由来のタンパク質は活性を失っている。その中でも、ヒストンH3リジン36番目のトリメチル(H3K36me3)転移酵素、<i>SETD2</i>遺伝子は腎臓がんをはじめ多くのがんで変異(loss of function)が認められる。研究代表者は2024年度までに、<i>SETD2</i>遺伝子をノックアウト(KO)した細胞で、85%のタンパク質コード遺伝子で転写活性の低下、残りの15%の遺伝子で転写終結破綻由来のリードスルーncRNAを検出した。また、腎臓がんccRCC患者由来A498細胞(メチル基転移酵素活性を失った<i>SETD2</i>タンパク質を発現している)においても、<i>SETD2</i>KO同様に一部の遺伝子でリードスルーncRNAが検出された。この結果は、<i>SETD2</i>メチル基転移酵素活性が転写終結制御に関わっていることを示している。それらの細胞では、一部の遺伝子において転写開始点の変化が見られたが、転写終結と相関性はなく、独立した制御であることがわかった。本研究グループは、<i>SETD2</i>タンパク質を迅速にノックダウン可能なDegronシステム細胞(<i>SETD2</i>-AID HCT116 cell)や<i>SETD2</i>特異的阻害剤を用いた実験を行い、数日間<i>SETD2</i>とH3K36me3の両方が欠失している場合においても、転写終結の破綻が起きないことを見出した。ただ、<i>SETD2</i>特異的阻害剤を長期間(9日間以上)処理した細胞においては、<i>SETD2</i>KO細胞同様に転写終結破綻が検出された。この結果は、<i>SETD2</i>は間接的に転写終結を制御し、H3K36me3がクロマチン上から失われたことで、他のエピジェネティックな変化が生じている可能性を示唆している。本研究グループが行った<i>SETD2</i>KO細胞核画分のプロテオミクス解析から、DNAメチル化酵素DNMT3A/Bの発現増加が見られた。この結果から、DNAメチル化と転写終結の関連性が示唆された。実際のがん患者細胞では、2種類以上のクロマチン制御遺伝子に変異が起きていることが多々ある。<u>今後鈴木健之教授グループと共同で、<i>SETD2</i>遺伝子に加えて、複数のクロマチン制御遺伝子(SWI/SNF構成因子の遺伝子等)をKOする。</u>その後、独自の新生RNA解析法によって転写終結由来のncRNAを網羅的に解析し、どのようなクロマチン環境が転写終結に必要とされるのかを明らかにする。<i>SETD2</i>KO細胞のプロテオミクス解析から、TGFβ関連タンパク質の変化が見られている。<u>鈴木健之教授グループと共同で、<i>SETD2</i>特異的阻害剤を用いて、<i>SETD2</i>のがん浸潤性、転移性に関する役割も調べる予定である。</u>今後、以上の方法で、<i>SETD2</i>活性を失ったがんクロマチン環境における転写制御を理解し、その制御のがん細胞においての重要性を明らかにする。	
【成果等】	【主な論文発表】 論文投稿準備中	
	【学会発表】 野島孝之 - 転写研究会 オーガナイザー講演(2025) - 日本分子生物学会2024 招待講演(2024) 3R+3C2024 口頭発表(2024) - 横浜市立大学医学部セミナー 招待講演(2024)	

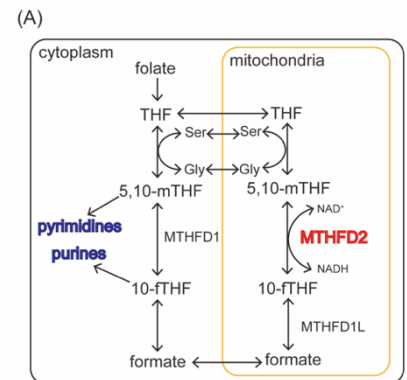
令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	5. Sir William Dunn School of Pathology, 英国 Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford 研究所セミナー 招待講演 (2024) 中山千尋 6. 日本分子生物学会 2024 ポスター発表 (2024) 7. 3R +3C 2024 ポスター発表 (2024) 8. EMBL symposium, The complex life of RNA ポスター発表 (2024) 9. 英国 UCL department seminar (2024)
	【その他特筆事項】 本プロジェクトに関して、当グループ大学院生中山千尋が以下の賞を受賞した。 2024 年 分子生物学会 EMBO Report Poster Award 受賞 2024 年 日本 RNA 学会 Travel Award 受賞 (For EMBL symposium, Heidelberg)

研究課題		難治性乳がんのがん幹細胞を標的とした新規治療標的に関する研究開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京科学大学・講師・栗本遼太
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京科学大学・助教・千葉朋希
	所属・職名・氏名	東京科学大学・研究員・内田雄太郎
	所属・職名・氏名	東京科学大学・教授・浅原弘嗣
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	乳がん全体の約20%を占めるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) の治療抵抗性の要因の一つとして、がん幹細胞の存在が報告されてきた (Li et al. JCI 2023, Lawson et al, Nature 2015)。これらのがん幹細胞を維持する機構として RNA 階層における遺伝子発現制御機構は未解明である。我々はレポーターシステムを用いた RBP の機能スクリーニング、RNA 修飾酵素の CLIP スクリーニング、およびヒト TNBC や肺がんに対する scRNAseq の再解析を組み合わせたところ、TNBC 幹細胞特異的な制御機構を担う RBP として ZNFR(ZCCHC24)、上皮間葉転換を抑制的に制御する RNA 修飾酵素 tRBPU の同定に成功した。本研究では 1). ZCCHC24 が RNA 階層における安定化機構を介して乳がん幹細胞性を制御することにより、腫瘍形成能を維持・促進する機構について、TNBC-PDX において検証する。次に、2). 上皮間葉転換を制御する RNA 修飾酵素 tRBPU について、その制御機構を乳がん PDX を用いて明らかにする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	Result 1. TNBC 手術検体や TNBC-PDX モデルにおける ZCCHC24 および ZEB1 の発現部位の検証 TNBC 手術検体や TNBC-PDX モデルにおいて、ZCCHC24 や ZEB1 に対して免疫染色を行い、ZCCHC24 や ZEB1 の共発現部位を検討した。その結果、ZEB1 の陽性細胞と ZCCHC24 陽性細胞は一致する傾向が見られた。TCGA のデータベースの解析では、Luminal 毎に ZCCHC24 発現と悪性度の間に相関関係は見られなかった。これは、Bulk の RNA sequence によって、元来僅かな割合である ZNFR や ZEB1 陽性細胞の遺伝子発現変動が検証できなかったものと考えられる。 この ZCCHC24 について、2024 年度に EMBO Reports に報告した。 Result 2. tRBPU による EMT 関連遺伝子の発現調節機構の解明 tRBPU の制御因子および薬剤の探索のため、tRBPU に HiBITag をゲノム編集で導入した細胞株を樹立し、化合物スクリーニング及び転写因子のスクリーニングを行い、候補化合物及び促進因子の探索を行なった。その結果、smad 阻害剤や mTOR 阻害剤の暴露によって EMT が抑制されるとともに tRBPU の発現の上昇が認められた。さらに、候補転写因子として、Nkx family 遺伝子による tRBPU の上昇が認められた。今後、PDX における効果を検討する予定である。また、tRBPU が担う RNA 修飾のがん病態に対する寄与を明らかにするために、Nanopore シークエンスを用いた RNA Direct sequence と機械学習を組み合わせることによってトランスクリプトームワイドな RNA 修飾の解析を行うため、条件検討を行っている。 	
【成果等】	【主な論文発表】	
	Uchida Y, Kurimoto R, Chiba T, Matsushima T, Oda G, Onishi I, Takeuchi Y, Gotoh N, Asahara H. RNA binding protein ZCCHC24 promotes tumorigenicity in triple-negative breast cancer. EMBO Rep. 2024 Dec;25(12):5352-5382. doi: 10.1038/s44319-024-00282-8. Epub 2024 Oct 17. PMID: 39420119; PMCID: PMC11624195.	
	【学会発表】	
【その他特筆事項】		

研究課題	次世代型 ALK 阻害薬に対する adaptive resistance の分子機構に基づく新規治療法の開発	
研究代表者	所属・職名・氏名	新潟大学呼吸器・感染症内科 特任助教 柳村尚寛
研究分担者	所属・職名・氏名	なし
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍内科研究分野 教授 矢野 聖二
【研究目的】	本研究では、ALK-TKI の有効性を更に高める観点から、ALK 肺がん細胞における初期治療抵抗性因子の解明、特に「①ALK シグナルの抑制に伴い誘導される、初期治療に対する適応耐性 (adaptive resistance) の分子機構の解明」と「②分子機構に基づいた、残存腫瘍の根絶による ALK 肺がんの治癒を目指した新たな併用治療の開発」を目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	現時点で、ALK 肺がんにおける初期治療抵抗性因子の解明に関して、十分な研究成果が得られていないため、同時並行で研究を進めている KRAS^{G12C} 陽性肺がんにおける KRAS^{G12C} 阻害薬に対する初期治療抵抗因子に関する研究内容・成果を報告する。 (1) KRAS^{G12C} 変異肺がん細胞の Persister において STAT3 が活性化している KRAS^{G12C} 阻害薬 (Sotorasib, Adagrasib) に対して感受性の細胞株 (H2122) と低感受性細胞株 (H2030) において (Fig. A)、1μM の Sotorasib で 72 時間処理後のリン酸化シグナルの変化を Kinase array kit で網羅的に解析したところ、感受性細胞株 (H2122) において、STAT3 のリン酸化が増強する傾向にあることがわかった (Fig. B)。さらに、H2122 を Sotorasib で 10 日間処理して Drug tolerant persister を樹立したところ、Persister において STAT3 のリン酸化が亢進していることを確認した (Fig. C)。以上から、KRAS^{G12C} 阻害薬の初期抵抗性に STAT3 が関与している可能性が示唆された (Fig. D)。 (2) STAT3 は抗アポトーシス分子を介して KRAS^{G12C} 阻害薬に対する抵抗性をもたらす STAT3 による治療抵抗性を検討するために、抗アポトーシス分子の発現変動を評価したところ、Myc、Bcl-XL、Mcl-1 の蛋白発現が、Sotorasib と STAT3 のノックダウンの併用により低下が認められた (Fig. A)。特に、BCL-XL と Mcl-1 に対するノックダウンにより、Cell viability の低下 (Fig. B) とアポトーシス誘導 (Fig. C) を認めた。さらに、BCL-XL と Mcl-1 の阻害薬を用いた実験でも、Cell viability の低下と Persister の発生抑制の効果を認めた (Fig. D)。 (3) KRAS^{G12C} 阻害薬と STAT3 阻害薬の併用治療はマウス皮下移植腫瘍に有効である マウス皮下移植モデルを用いて、Sotorasib と STAT3 阻害薬 (YHO-1701) の併用治療の有効性を検討した。H2122、LU65 いずれの Xenograft においても、Sotorasib 単剤で治療した場合と比較して併用治療は腫瘍の増大を抑制した。尚、併用治療によるマウスの体重減少等の重篤な毒性は認められなかった。今後は、PDX を用いた治療実験を検討し、第 1 相試験に導出可能なデータを得ることを目標としている。 	
【成果等】	【主な論文発表】 なし (2025 年 4 月現在) 【学会発表】 なし (2025 年 4 月現在) 【その他特筆事項】 なし	

研究課題		ヒト乳がんモデルを用いた代謝標的治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	日本獣医生命科学大学獣医病理学研究室・講師・町田雪乃
研究分担者	所属・職名・氏名	同上・准教授・道下正貴
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	イヌでは、乳腺腫瘍が雌犬に最も多く発生する腫瘍である。イヌの乳腺腫瘍における遠隔転移率は約30%である。イヌの乳がんの治療として、放射線療法、ホルモン療法、化学療法などの補助的治療が提案されている。しかし、これらの治療法はまだ臨床治療には用いられていない。 がん細胞では、葉酸は細胞質およびミトコンドリアで代謝される。葉酸代謝は核酸合成を媒介し、それによってがん細胞の増殖を促進する。葉酸代謝経路に關与する酵素の一つであるメチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲナーゼ/シクロヒドロラーゼ2 (MTHFD2)は、正常な成体細胞ではほとんど発現していないが、ヒトおよびマウスの胎児細胞やがん細胞のミトコンドリア(図A)および核内では豊富に発現している。本研究では、MTHFD2がイヌの乳がんの治療標的となり得るかを明らかにすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、イヌ乳がん細胞におけるMTHFD2の細胞内局在と機能的役割について解析を行なった。ウェスタンブロット解析により、MTHFD2は複数のイヌ乳がん細胞株に発現していることが確認され、細胞免疫染色による解析から、MTHFD2が核およびミトコンドリアに局在していることが明らかとなった。MTHFD2阻害剤を用いた短期的に阻害処理により、各細胞株の増殖抑制が認められた。さらに、RNA干渉法を用いてMTHFD2の発現を長期的に抑制した結果、細胞は上皮様形態を呈し、アポトーシスの誘導を伴うことなく遊走能の低下を示した。加えて、MTHFD2ノックダウン細胞においては上皮系マーカーであるE-cadherinの発現が増加しており、MTHFD2の発現抑制が上皮様表現型の促進に寄与する可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 Machida Y, Onagi R, Ochiai K, Nishimura T, Nagashima T, Nakagawa T, Gotoh N, Michishita M, Knockdown of methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase 2 promotes an epithelial-like phenotype in canine mammary carcinoma cells. Veterinary and Comparative Oncology (2025)	
	【学会発表】 『イヌの乳がんにおける葉酸代謝酵素 MTHFD2 ノックダウンは上皮様形質を促進する』小名木れみ花、町田雪乃、落合和彦、長島智和、西村建徳、中川貴之、後藤典子、道下正貴（第12回日本獣医病理学専門家協会学術集会、ポスター発表）	
	【その他特筆事項】	



研究課題		難治性子宮体がんの治療標的の探索と腫瘍免疫評価系の確立
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉県がんセンター研究所・研究員・丸喜明
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田英周
【研究目的】	高悪性度子宮内膜癌(HGEC)では治療抵抗性や再発が問題である。がんの本態解明や治療法を確立する上で、がんの多様性の理解は重要であり、同一患者由来の複数検体を用いたオミクス解析が実施されている。しかしながら、オミクス解析だけでは同定された分子異常の意義の検証は困難であり、それを補完するモデルとして患者由来オルガノイド(PDO)が注目されている。一方、MSI-High 陽性 EC では免疫チェックポイント阻害剤の有効性が確認される症例も存在するが、依然として選択肢が限られている。そこで、本研究ではHGEC から PDO を樹立し治療標的の探索および腫瘍免疫を評価可能な実験モデルを確立することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	従来の研究では1症例あたり PDO 1 株樹立であったが、本研究課題ではがんの多様性をより反映した疾患モデルを開発するため、同一腫瘍から複数の PDO(multiple sites-originated PDOs : MS-PDOs) 樹立を試みた。令和6年度は新規にHGEC 5 例の外科的切除検体から MS-PDOs の樹立を試み、4 例から PDO 12 株を樹立した。その内訳は、漿液性癌 2 例 5 株、癌肉腫 1 例 3 株、脱分化癌 1 例 4 株である。 樹立済みおよび新規に樹立した MS-PDOs の子宮体がんの治療で実際に使用される抗がん剤 5 種(パクリタキセル、カルボプラチン、シスプラチン、ドキシソルビシン、ドセタキセル)に対する <i>in vitro</i> における感受性を評価した。培養条件が同一にも関わらず MS-PDOs 内で明らかに感受性が異なる症例の存在を複数確認した。例として、脱分化癌である Em50 では部位 1 および部位 2 由来の PDO は部位 3 および部位 4 由来 PDO に比べ抗がん剤に対して低感受性であった(図 1)。現在、MS-PDOs を樹立した症例の腫瘍組織および MS-PDOs から抽出したゲノム DNA を用いて得られた全エクソームシーケンスのデータを解析中で、同一腫瘍内における遺伝子異常の多様性や腫瘍細胞のクローン進化についての評価を進めている。HGEC から樹立した MS-PDOs について薬剤感受性による分類が概ね完了したため、今後は化合物スクリーニングによる治療薬候補および治療標的候補の探索などを予定している。 図1. 脱分化癌由来MS-PDOsにおける多様な薬剤感受性 上述の HGEC 5 症例から MS-PDOs の樹立と並行して腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の培養を試みたが、PDO と TIL の安定的な培養に成功したのは漿液性癌 1 例のみであった(図 2)。PDO の樹立成功率に比べ、TIL の培養成功率は低く、今後の課題と考えられた。PDO と TIL の両方が存在する症例については、共培養後に培養上清を回収し TIL の IFN-γ 放出を ELISA で定量することで TIL が腫瘍細胞に反応しているかを評価する予定である。 図2. 漿液性癌からのPDOおよびTILの樹立	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	・丸喜明、「婦人科がんの本態解明および治療戦略構築に向けた患者由来がんモデルの活用」、がん関連三学会 Rising Star ネットワーキング 2025 (2025 年 3 月)
	【その他特筆事項】	なし

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		新たなインテグラーゼを用いた遺伝子改変マウス作製法の確立と細胞老化研究への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	東海大学医学部・助教・三浦浩美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・城村由和
【研究目的】	近年の CRISPR ゲノム編集技術の発展により、遺伝子改変マウスは格段に作りやすくなったものの、未だに任意の領域に大きな DNA 断片を正確に且つ高効率に挿入することは容易ではない。そこで本研究では、申請者が開発してきた 2 つの手法 (PITT/<i>i</i>-PITT 法と <i>Easi</i>-CRISPR 法) に新たなインテグラーゼ系を組み入れることで、高効率遺伝子改変マウス作製法の開発を目指す。さらに、それを共同研究者の城村らが要する細胞老化解析モデルマウス作製に应用することで、細胞老化研究に貢献する。	
【研究内容・成果 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	今年度は、昨年度に引き続き、新規遺伝子改変マウス作製系の開発を進めると共に、これまで開発してきた独自の手法を利用して、老化研究に貢献しうるマウス作製を行った。 新規遺伝子改変マウス作製系に関しては、昨年度までの実験ではマウスの胚発生効率が低く実用可能なレベルには至らなかったことから、今年度は構成成分の濃度の最適化を検討した。用いるマウス系統・遺伝子座位・使用するインテグラーゼやその濃度等の最適化を行った結果、最終的に今年度は 2～10% の効率で目的の遺伝子改変マウス胚を得ることに成功した。また、老化研究のための遺伝子改変マウス作製に関しては、以下の 5 系統のマウスを作製し、金沢大学への移動も完了した。今後は、これらが期待通りに使用できるマウスであるかも含め、評価・検討していく予定である。 1) p53RE トランスジェニック (Tg) マウス： <i>i</i>-PITT 法を用いて作製した。具体的には、p53 レスポンスエレメントを用いた新しいコンセプトの Tg マウス作製に挑戦した。その結果、20.8% の効率で目的の個体が得られた。 2) p16-STOP-CreERT2 マウス： p16-CreERT2 マウスの精子を金沢大学から搬入し、個体復元後に <i>Easi</i>-CRISPR 法により更なる遺伝子改変を加えることで、目的とするマウス作製を試みた。その結果、14.2% (2/14) の効率で目的のマウスを作製することに成功した。また、当該マウスに組換え酵素を導入することで、期待通りに STOP 配列が除去されることも確認した。 3) p21-DreERT2 マウス、4) Cdh5-Dre マウス、5) Lrat-Dre マウス： <i>Easi</i>-CRISPR 法を用いてマウス作製を試みた。標的遺伝子領域を改変することによる影響のためか、予定通りに産仔が得られない場合もあった。しかし一部工夫を加えることで、最終的に p21-DreERT2 マウスは 14.2% (7 匹中 1 匹)、Cdh5-Dre マウスは 7.6% (38 匹中 3 匹)、Lrat-Dre マウスは 4.5% (22 匹中 1 匹) の効率で目的のマウス個体が得られた。<i>Easi</i>-CRISPR 法により作出されたマウスの中には、断片が一部欠けてノックインされたものなどもあったため、今後その評価・解析を進める際には注意したい。	
	【成果等】 【主な論文発表】 一部論文準備中 【学会発表】 「簡便・効率的な遺伝子改変マウス作製のための技術開発と応用」日本ゲノム編集学会第 9 回大会 教育実習セッション、2024 年 6 月 17 日～19 日 大阪市中央公会堂 【その他特筆事項】 特になし	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		脳微小環境に着目した肺癌脳転移を制御する新規免疫療法の開発を目指した試み
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学病院呼吸器・膠原病内科・講師・荻野広和
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	徳島大学大学院呼吸器・膠原病内科学分野・教授・西岡安彦
	所属・職名・氏名	徳島大学大学院呼吸器・膠原病内科学分野・特任講師・三橋惇志
	所属・職名・氏名	徳島大学大学院呼吸器・膠原病内科学分野・特任助教・塚崎佑貴
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系呼吸器内科学・教授・矢野聖二
【研究目的】	肺癌はしばしば脳転移を生じ患者の予後やQOL悪化につながる。脳転移に対する抗がん剤や放射線治療の効果は限定的であり、新規治療法の開発が急務である。近年免疫チェックポイント阻害薬 (ICI) の登場により肺癌の治療成績は向上した。しかし脳は①血液脳関門の存在、②脳実質内にリンパ路が存在しないこと、③脳特異的な細胞集団との相互作用などにより免疫学的聖域と呼ばれる免疫抑制性微小環境が形成されることで ICI の薬効が減弱すると考えられている。本研究では腫瘍細胞と神経細胞のクロストークにより免疫抑制性微小環境が形成されるメカニズムに着目し、脳転移に対する新規複合がん免疫療法の確立を目的に研究を行った。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	近年グリオーマにおいて、腫瘍細胞と神経細胞のクロストークにより腫瘍進展が促進される現象が見出された。具体的には光刺激により亢進した神経活動が腫瘍細胞増殖を促進すること、また腫瘍細胞が神経細胞とシナプスを形成することで神経活動を亢進する機序が報告された。さらに我々はグリオーマ組織中の神経活動が高い領域において、腫瘍細胞が thrombospondin-1 (TSP-1) を高発現し、①神経細胞とのシナプス形成を促進し腫瘍を進展させること、また②骨髄由来マクロファージを免疫抑制性に誘導し免疫抑制性微小環境を形成することを見出した。これらの背景に基づき、本研究では肺癌脳転移における腫瘍細胞と神経細胞のクロストークの意義に着目した。 まず過去に報告された肺癌原発巣と脳転移巣の matched sample の RNA-seq データを再解析したところ、神経活動に関連する GABAergic synapse や Glutamatergic synapse など複数の pathway が脳転移巣で亢進していた。 またグリオーマ同様、脳転移巣において免疫抑制性マクロファージが増加していた。次に実験的脳転移モデルの作成を試みた。検討には C57BL/6 マウス由来肺癌細胞株 CMT167 および LLC に luciferase を導入した細胞を用いた。これらを C57BL/6 マウスの心腔内へ移植することで脳を含む多臓器に転移巣を形成するモデルを作成した。さらに in vivo selection を繰り返すことで高い再現性を持って脳転移を形成する細胞株を単離した (CMT167/Luc-BrM2, LL2/Luc-BrM5)。In Vitro において、高脳転移形成株は親株と比較し増殖能に差は認めないものの遊走能は亢進していた。また高脳転移形成株は親株と比較し TSP-1 発現が有意に亢進していた (図 1)。 最後に高脳転移形成株を心腔内へ移植した多臓器転移モデルにおいて、AMPA 受容体阻害薬 perampanel を用いてシナプスを介した刺激伝導を阻害したところ、体幹部の病変と比較し脳転移巣がより効果的に縮小した (図 2)。 これまでの検討により、肺癌脳転移においても腫瘍細胞と神経細胞のクロストークを標的とした治療戦略が有効である可能性が示唆された。今後は perampanel と ICI の併用効果、またその詳細な作用機序の解明を目指し検討を進める予定としている。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

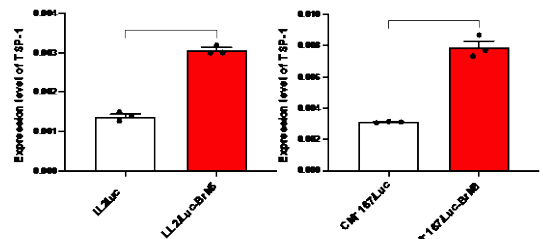


図1. 高脳転移形成株はTSP-1を高発現する

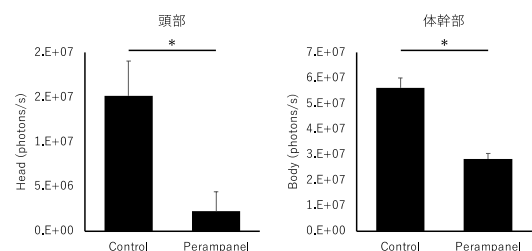


図2. Perampanelは脳転移巣の進展を抑制する

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		肺がんの患者由来腫瘍オルガノイドおよびPDXの作成
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・教授・松本 勲
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・講師・懸川 誠一
	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器外科・助教・齋藤 大輔
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所腫瘍内科・助教・小谷 浩
	所属・職名・氏名	金沢大学呼吸器内科・医員・村瀬 裕哉
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	近年、患者由来腫瘍を免疫不全マウスに直接移植する patient derived xenograft (PDX) モデルやマトリゲル内で増殖させ樹立するオルガノイドなどのヒトがん組織を忠実に再現する実験モデルが注目されており、個々の患者のがん組織を <i>in vitro</i> や実験動物レベルで再現するモデルとして、がん研究に必要不可欠となってきた。 金沢大学附属病院呼吸器外科では、がん進展制御研究所腫瘍内科の矢野教授との共同研究として、呼吸器外科が肺がん患者の切除組織を提供し腫瘍内科が PDX を作成するプロジェクトをがん進展制御研究所の共同研究課題として平成29年度から令和元年に実施し、複数の論文発表を行った。本課題は、さらにオルガノイドモデルの確立も行い、オルガノイドやPDXモデルで増大した腫瘍の凍結保存と臨床情報のデータベース化を強化し、将来の共同研究基盤を強固にすることを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	R5年度には、術前治療歴のない原発性肺がん切除検体を用いて、組織型を問わず再現性高くオルガノイドを作製する簡便なプロトコルを確立した。R6年度は対象症例を拡大し、原発巣に加え、脳転移巣や胸水由来腫瘍細胞も対象とした。計30検体でオルガノイド/PDXの作製を試み、16例で樹立に成功した。特に脳転移病変では、3例中3例での樹立に成功し、転移巣からのモデル構築も実現可能であることが示された。また、EGFR 変異(exon19欠失, L858R: 3例)やKRAS G12C 変異(3例)など、日本人肺がんに高頻度なドライバー変異に加え、ALK 融合遺伝子(2例)、ROS1 融合遺伝子(1例)、HER2 変異(1例)といった希少遺伝子変異を有する腫瘍や、治療抵抗性症例からもモデルの樹立に成功している。一部のオルガノイドではゲノム解析を開始しており、元腫瘍との比較をし、バイオリソースとしての信頼性を確認している。今後は、空間的マルチオミクス解析や薬剤スクリーニング、成長因子添加や血管網構築を取り入れた次世代培養手法の開発を進め、時間軸を加味した4D解析の実現を目指す。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Koba H, Yoneda T, Morita H, Kimura H, Murase Y, Terada N, Tambo Y, Horie M, Kasahara K, Matsumoto I, Yano S. Genomic evolutionary analysis of surgical resected specimen to assess osimertinib as a first-line therapy in two patients with lung cancer harboring EGFR mutation: Case series. <i>Thorac Cancer</i>. 2024 Mar;15(8):661-666. 2. Takata M, Tanaka Y, Saito D, Yoshida S, Matsumoto I, et al. "Hyperacute experimental model of rat lung transplantation using a coronary shunt cannula." <i>World Journal of Transplantation</i> 14.2 (2024): 92137. 3. Asano Y, Matsumoto I, Yano S, Demura S, et al. "Combining dynamics of serum inflammatory and nutritional indicators as novel biomarkers in immune checkpoint inhibitor treatment of non-small-cell lung cancer with bone metastases." <i>International Immunopharmacology</i> 136 (2024): 112276. 4. Asano Y, Yamamoto N, Hayashi K, Takeuchi A, Kato S, Miwa S, Okuda M, Matsumoto I, Yano S, Demura S. Serum inflammatory dynamics as novel biomarkers for immune checkpoint inhibitors in non-small-cell lung cancer with bone metastases. <i>Anticancer Res</i>. 2024 Oct;44(10):4493-4503. 5. Asano Y, Yamamoto N, Demura S, Hayashi K, Takeuchi A, Kato S, Miwa S, Igarashi K,	

	Higuchi T, Taniguchi Y, Okuda M, Matsumoto I, Yano S, Tsuchiya H. Combination therapy with immune checkpoint inhibitors and denosumab improves clinical outcomes in non-small cell lung cancer with bone metastases. Lung Cancer. 2024 Jul;193:107858. 6. Terada N, Koba H, Nanjo S, Tambo Y, Yano S, et al. "EGFR-V834L combined with L858R mutation reduced afatinib sensitivity and associated to early recurrence in lung cancer." Translational Lung Cancer Research 13.11 (2024): 3067. 7. Tambo Y, Shimizu T, Nanjo S, Koba H, Terada N, Ueda T, Nomura S, Murase Y, Yano S, et al. "Five-year efficacy and safety of pembrolizumab as first-line treatment in patients with non-small cell lung cancer with PD-L1 tumor proportion score$\geq$ 50%: A multicenter observational study." Lung Cancer (2025): 108422. 【学会発表】 1. 矢野聖二 第 64 回日本呼吸器学会学術講演会教育講演「肺がんの分子標的薬耐性」 2024 年 4 月 7 日（横浜） 【その他特筆事項】 本研究では、オルガノイド作製手技の標準化と簡便化を達成し、手技者に依存せず安定した樹立が可能になった。今後は凍結保存体制の整備やゲノム解析の拡充、臨床情報との統合解析を進め、バイオリソースとしての汎用性を高めるとともに、共同研究や個別化医療への応用を目指す。
--	---

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		がん悪性化のエピジェネティック制御におけるメディエーター複合体キナーゼモジュールの役割
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学 学術研究部 薬学・和漢系・准教授・廣瀬 豊
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	鈴木 健之
【研究目的】	上皮間葉転換 (EMT) は、発生やがん悪性化過程にみられる細胞運命変換プロセスであり、遺伝子発現ネットワークの再構築を必要とする。その遺伝子発現制御機構の解明はがん進展制御において重要な課題となっている。メディエーター複合体キナーゼモジュール (KM) は、細胞特異的・刺激依存的な転写調節に重要なキナーゼであるが、EMT 制御性遺伝子発現調節における役割の全容は明らかになっていない。本共同研究は、KM と新規同定した KM 相互作用タンパク CHD4 が EMT を促進する TGF-β 誘導性転写制御に果たす役割とそのメカニズムを、分子・細胞レベルで解明することを目的としている。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	KM は、CDK8 または CDK19 を触媒サブユニットとする複合体であり、種々の転写制御因子のリン酸化を介して、細胞分化やストレス応答における転写調節に重要な役割を果たす。さらに KM 阻害が抗がん作用を示すことから、がん治療標的としても注目されている。我々は近年、CDK8/CDK19 の結合因子として、クロマチン再構築 NuRD 複合体サブユニット CHD4 を同定した。これまでに、CDK8/19 または CHD4 のノックダウン (KD) によって、TGF-β 誘導性の <i>SNAIL</i> や <i>VIM</i> などの発現誘導が阻害されることを見出ししている。本研究では、CDK8/19 と CHD4 による TGF-β 誘導性 <i>SNAIL</i> 発現調節メカニズムを、A549 細胞をもちいた CHD4 抑制、CDK8/19 ダブルノックアウト (dKO) および KM 阻害により解析した。 CHD4 ノックダウン (KD) により TGF-β 誘導性 <i>SNAIL</i> 発現は顕著に抑制されるが、CHD4 の <i>SNAIL</i> プロモーター局在は TGF-β 刺激によって増大することを ChIP 解析により見出した。従って、CHD4 は <i>SNAIL</i> 発現を直接正に制御していると考えられる。 A549CDK8/19dKO 細胞においては、TGF-β によって誘導される Snail タンパクと MEG3lncRNA の発現が顕著に抑制され、さらに KM 阻害も <i>SNAIL</i> mRNA と MEG3 の発現を低下させた。従って KM は、キナーゼ活性を介して <i>SNAIL</i> および MEG3 の発現誘導に必要であることが示唆された。また興味深いことに、RNA 免疫沈降解析により KM と MEG3 の共沈降が観察され、KM と MEG3 が細胞内で結合している可能性が示唆された。さらに MEG3 KD によっても TGF-β 誘導性 <i>SNAIL</i> 発現が抑制された。 MEG3 は TGF-β 経路遺伝子の制御領域に DNA-RNA 三重鎖形成を介して EZH2 をリクルートすることで転写抑制に関与することが報告されている (Mondal <i>et al.</i> <i>Nat. Comm.</i> 2015)。しかし本結果は、MEG3 が特定の TGF-β 誘導性遺伝子の発現を促進している可能性を示唆しており、さらにそのメカニズムに KM が関与していることが予想された。以上、TGF-β 誘導性 <i>SNAIL</i> 発現調節に KM-MEG3-CHD4 軸が関与することが示唆された。現在、これら因子の抑制が TGF-β 誘導性の細胞の形態や遊走・浸潤能に与える影響を解析している。今後は、KM と MEG3 がお互いの機能をどのように調節するのか、また KM-MEG3-CHD4 軸がどのようなメカニズムで TGF-β 誘導 <i>SNAIL</i> 発現を調節しているのかを解析していく予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sugita A., Kano R., Ishiguro H., Yanagisawa N., Kuruma S., Wani S., Tanaka A., Tabuchi Y., Ohkuma Y., Hirose Y. Cap-Specific m⁶A Methytransferase PCIF1/CAPAM Regulates mRNA Stability of <i>RAB23</i> and <i>CNOT6</i> through the m⁶A Methytransferase Activity. <i>Cells</i>. (2024) 13(20):1689.	
	【学会発表】 1) Kano R. <i>et al.</i> “Cap specific m6A methyltransferase PCIF1/CAPAM modulates type I IFN responses” 第 25 回日本 RNA 学会年会 2024 年 6 月 26～28, 東京 2) 齊木淑乃 他「Mediator 複合体 Kinase モジュールとクロマチン再構築因子 CHD4 の相互作用を介した転写制御機構の解析」第 8 回北陸エピジェネティクス研究会 2024 年 12 月 3～4, 富山 (他、7 件)	
	【その他特筆事項】	

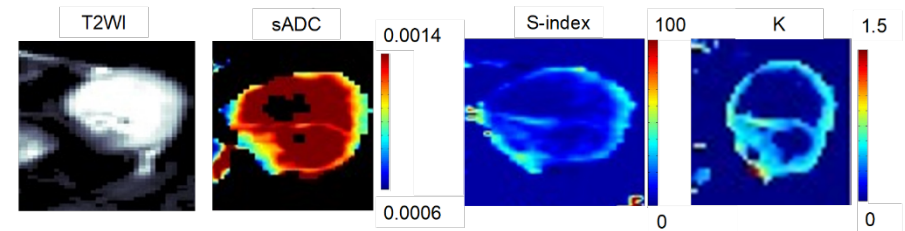
令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳癌幹細胞からの分化を制御する新規治療の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	島根大学医学部乳腺外科教授 角舎 学行
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	島根大学医学部附属病院乳腺センター助教 末岡 智志
	所属・職名・氏名	島根大学医学部附属病院乳腺センター医員 宮崎 佳子
	所属・職名・氏名	島根大学医学部附属病院乳腺センター医員 戴田 愛
受入担当教員	職名・氏名	分子病態研究分野教授 後藤 典子
【研究目的】	薬物治療の真のターゲットは癌幹細胞であり、患者個々の癌幹細胞の情報を知ることは癌の根治のためには非常に重要である。我々は手術検体からスフェロイド培養により乳癌幹細胞を選択的に培養する手技を確立した。この手法をもとに乳癌幹細胞の分化メカニズムを明らかにし、分化を制御することで治療効果を改善する新規治療の開発を進める。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	我々は、エストロゲン受容体 (ER) 陽性ヒト上皮成長因子受容体(HER2)陰性の乳癌患者の手術サンプルから乳癌組織を採取し単離後、細胞を非接着性プレート上でスフェロイド培養を行った。その結果、これまで乳癌幹細胞マーカーと考えられている CD44+/CD24-乳癌細胞の平均比率は、原発巣の 13.8%からスフェロイドでは 61.6%に増加した。さらに、スフェロイド培養した細胞は少数でもマウスへの生着に成功し、その後マウス内で再分化することを確認できたため、幹細胞であることが証明された。ER 陽性 HER2 陰性乳癌の幹細胞は、DNA マイクロアレイを用いて 2 つのグループに分類された。オントロジー解析の結果、一つのグループでは免疫応答関連遺伝子の発現が高く、もう一方のグループではタンパク質結合関連遺伝子の発現が高いことが明らかになった。我々は、患者由来の乳がん組織から乳がん幹細胞を安定かつ選択的に培養することを証明した(Sueoka, Kadoya et al, Sci Rep, 2025)。 今回の結果は、幹細胞を標的とした個別化医療や予後予測の実現に応用できると考えられる。現在、治療法選択のためのコンパニオン診断や予後予測のため、免疫染色が標準的に行われている。しかし、これらの検査は腫瘍の大部分を占めている非癌幹細胞を対象としている。そのため、われわれの研究は乳癌幹細胞を標的とした治療法の選択と予後予測の精度向上の基礎となるものである。また、我々は ER 陽性 HER2 陰性乳癌症例における乳癌幹細胞間の複雑な生物学的多様性を明らかにした。細胞の分化メカニズムを理解することで、乳がん細胞の分化や脱分化を制御することが容易になるかもしれない。今回得られた結果は、分化を制御することによって薬物療法の効果を高め、乳がん幹細胞の分化を操作する新しい治療法の開発において重要な結果であると考ええる。	
【成果等】	【主な論文発表】 Diversity of ER-positive and HER2-negative breast cancer stem cells attained using selective culture techniques. Sueoka S, Kai A, Kobayashi Y, Ito M, Sasada S, Emi A, Gotoh N, Arihiro K, Nakayama K, Okada M, Kadoya T. Sci Rep. 2025 Mar 10;15(1):8257.	
	【学会発表】 第 32 回日本乳癌学会学術総会[EXP10-5] 遺伝子発現解析に基づく乳癌幹細胞の分類 末岡 智志、角舎 学行他（島根大学医学部付属病院 乳腺センター）	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

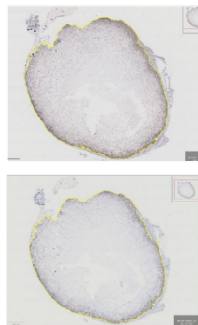
研究課題		拡散 MRI を用いたがん微細構造の非侵襲的解明
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学 大学院医学系研究科 新規低侵襲画像診断法基盤開発研究寄附講座・特任教授・飯間麻美
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	本研究は、患者腫瘍組織移植モデル(PDX)を用いて、拡散 MRI から算出される定量値と乳がんの病理学的マーカー（特に Ki-67、PARVA、ILK1 など）との関連性を検討することを目的とする。特に最適な（拡散 MRI の新たな撮影パラメーターである）拡散時間及び乳がんサブタイプ（トリプルネガティブ、Luminal、Her2）ごとの特徴的な相関パターンを特定することで、非侵襲的な乳がん微細構造評価法の確立を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	この研究では、新たな患者腫瘍組織移植モデル(PDX)を用いて拡散 MRI を実施し、特に Pshort(拡散時間:9ms)法が病理学的特徴を最も鋭敏に反映することを明らかにした。 乳がんの各サブタイプ（トリプルネガティブ、Luminal、Her2）における病理学的バイオマーカーと拡散パラメーターの相関分析結果は以下の通りである： TN（トリプルネガティブ）： ○ PARVA(がん細胞の遊走、浸潤、転移に関与)と ILK1(Integrin Linked Kinase)が(微小灌流を反映する MRI パラメーターの)fIVIM と強い相関を示す（Pshort 使用時） Her2： ○ 多くの染色方法で有意な相関が見られるが、相関係数は 0.3-0.4 と比較的小さい ○ PARVA は Sindex など他のマーカーと比較して有意な相関を示す項目が多い ○ Vimentin との相関が Luminal より若干弱い Luminal： ○ Vimentin で有意な相関(Sindex, sADC(生体内の信号減衰の傾きを計算した見かけの拡散係数))が確認される ○ Ki-67(Sindex, D*)や PARVA(fIVIM, K/NGD)も相関を示す 全サブタイプを通じて PARVA が一貫して重要なマーカーとなる可能性が示唆され、ミクロ領域の観察には Pshort(拡散時間:9ms)法が最も効果的であることが確認された。各サブタイプによって最適な分析方法や注目すべきマーカーには違いがあり、これらの知見はバイオマーカー開発の基盤となりうることを示唆される。	

The expression level of PARVA corresponded to Ki-67 expression and diffusion parameters

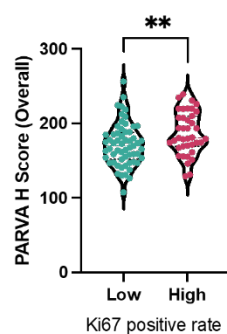


(A) 21 PDX mice with triple-negative BC underwent DWI on a 7T MRI scanner (Bruker, Germany, resolution 250 x 250 μ m, matrix size 100 $\times$ 100, field of view 25 $\times$ 25 mm, slice thickness 1.5mm, TE=57ms,TR=2500ms, 8 averages, 4 segments). Multiple diffusion times (5, 9, and 27.6ms) and b-values (0-3000 s/mm²) were employed using oscillating gradient spin echo (OGSE) and pulsed-gradient spin-echo (PGSE) sequences.

(B) PDX mice



(C) BC patients



(B) Immunohistochemical staining of breast cancer from PDX mice was performed with PARVA (Upper) and Ki-67 (Lower) antibodies.

(C) Comparison of PARVA H-scores of BC patients' cancer by high and low Ki67 positive rate.

➤ High PARVA level corresponded to high K, high S-index, and low sADC

➤ High PARVA level corresponded to high Ki-67 level

Assessment of PARVA and ILK Expression in Breast Cancer: A Time-dependent Diffusion MRI Approach

Ayu Shirakashi, Midori Takeda, Keisuke Kitahata, Minsoo KIM, Tomi Nobashi, Masako Kataoka, Marino Akamatsu, Mami Iima

ISMRM Workshop on 40 years of Diffusion: Past, Present & Future Perspectives
2025 年 2 月 より

【成 果 等】	【主な論文発表】 現在執筆中
	【学会発表】 Assessment of PARVA and ILK Expression in Breast Cancer: A Time-dependent Diffusion MRI Approach Ayu Shirakashi, Midori Takeda, Keisuke Kitahata, Minsoo KIM, Tomi Nobashi, Masako Kataoka, Marino Akamatsu, Mami Iima ISMRM Workshop on 40 years of Diffusion: Past, Present & Future Perspectives 2025 年 2 月 Non-Invasive Evaluation of Tumor Microstructure by DWI in Triple-Negative Breast Cancer: Association with CD31 and Vimentin A.Otani, M. Iima, H. Imai, M.Akamatsu, N. Gotoh, Y. Takeuchi, M.Kataoka, M. Honda, T. Nobashi, A. Yoshizawa, H. Ito, T. Nakagawa, M. Kim, D. Le Bihan, S. Naganawa, Y. Nakamoto The 9th Annual Scientific Meeting of the ISMRM Japanese Chapter 2024 年 9 月 21 日 DW-MRI Parameters Correlated with PARVA Expression in a Luminal Breast cancer PDX mouse model M.Akamatsu, M. Iima, H. Imai, N. Gotoh, Y. Takeuchi, M. Honda, T. Nobashi, M. Kataoka, A. Yoshizawa, H. Ito, T. Nakagawa, M. Kim, D. Le Bihan, S. Naganawa, Y. Nakamoto The 9th Annual Scientific Meeting of the ISMRM Japanese Chapter 2024 年 9 月 21 日
	【その他特筆事項】

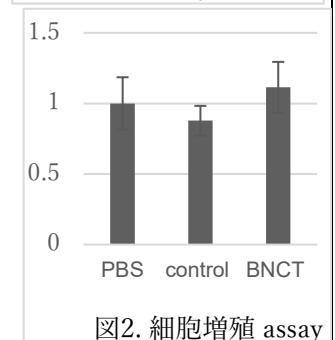
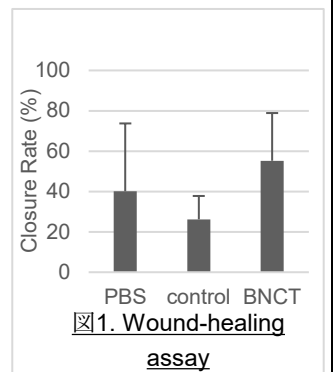
令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸がんモデルを用いた薬剤耐性研究
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所分子病理分野・研究員・小林祥久
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	EGFR 変異肺がんには EGFR チロシンキナーゼ阻害剤が標準治療となっているが、必ず耐性を獲得して効かなくなる。代表者は、EGFR 変異肺がん細胞株由来の CRISPR ゲノム編集モデルを使って、「EGFR 阻害剤に対する耐性の有無で発がん性の有無を評価する実験系」を構築し、RAS の発がん研究に応用してきた (Nature 2022)。 本研究では、大島教授との共同研究によって大腸がんモデルを使って「薬剤耐性の有無=発がん性の有無」という評価系を新たに構築することで、より多くのがん種・遺伝子についての発がん研究を行う基盤モデルの形成を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	大島教授よりご提供及び培養方法をご指導頂いたマウス大腸がん由来モデルのうち、オルガノイドから二次元培養可能な細胞株化に成功したモデル群 (AP, ATP, AKP, AKTP, AKTPF: A=Apc delta716/LOH, P=p53 R270H/LOH, K=Kras G12D/wt, T=Tgfbr2 KO, F=Fbxw7 f1/f1) に対して、まず新規 KRAS G12D 阻害剤 MRTX1133、pan-RAS 阻害剤 BI2865 および RMC6236 の in vitro 薬剤感受性を評価した。 ヒト KRAS 変異細胞株を用いた in vitro 薬剤感受性試験では、通常接着細胞として培養している細胞株でも浮遊培養の方が in vivo での治療効果と相関すると報告されているため、マウスオルガノイド由来細胞株も接着・浮遊の両方の培養条件で実施した。その結果、接着培養でも浮遊培養でも一貫した薬剤感受性の傾向がみられ、特に浮遊条件でより顕著な薬剤感受性の差がみられた。ジェノタイプ別では、予想に反して AKTP が最も感受性が高く、次いで AKP が効き、AKTPF では強い薬剤耐性を示した。 以上の多様な薬剤感受性データをもとに、マウスオルガノイド由来細胞株から CRISPR ゲノム編集モデルを作成中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		乳がん細胞株の増殖・浸潤における翻訳因子 eIF5A2 の役割と阻害剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	東京理科大学薬学部・准教授・東 恭平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京理科大学大学院・博士課程 2 年・鈴木 雅斗
	所属・職名・氏名	東京理科大学薬学部・助教・米野 雅大
	所属・職名・氏名	理化学研究所・研究員・松本 健
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田 貴司
【研究目的】	ポリアミン (プトレッシン: PUT、スペルミジン: SPD、スペルミン: SPM)は生物に普遍的に存在する塩基性生理活性物質であり、細胞増殖・分化に必須の因子である。今年度は、ポリアミンによる癌細胞の増殖促進機構の解明と翻訳開始因子 eIF5A2 の活性阻害剤の同定を目的とした。	
【研究内容・成果 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	翻訳開始因子 eIF5A(eIF5A1 と eIF5A2)は、Lys⁵⁰ 残基に SPD を基質として酵素反応によりハイプシン化をうける唯一のタンパク質である。eIF5A はリボソーム E-site 近傍に結合して tRNA^{Pro} の CCA 末端を安定化させることで、プロリンのペプチド転移反応を円滑にし、プロリンストレッチによるリボソーム停滞を解消する。eIF5A1 と eIF5A2 のアミノ酸相同性は 84% と高いにも関わらず、正常細胞の増殖には eIF5A1 のみ必須である。一方、eIF5A2 はがん遺伝子であることが報告されている。 私達は、ポリアミンによるがん細胞の増殖促進機構をプロテオミクス解析で調べた結果、SPD は eIF5A2 のハイプシン化と生合成の両方を促進すること、子宮頸がんおよび乳がん細胞株の増殖は eIF5A1 よりも eIF5A2 に依存することを見出した。また、ポリアミンはがんの悪性度に関与するリボソームタンパク質 (RPS27L、RPL36A、および RPL22L1) の発現を亢進してリボソーム構成タンパク質の組成を変えること、および eIF5A2 は eIF5A1 よりも癌細胞の増殖に特化したリボソーム E-site への結合が容易であることを予想させるデータを得た。以上の結果より、私達は eIF5A2 と癌細胞の増殖に特化したリボソームとの結合が新たな治療標的になるのではないかと考えている。 私達は更に、ミトコンドリア分裂制御因子 (MTFR)はポリプロリン配列を有し、eIF5A2 により発現制御を受けることを見出した。MTFR1 は、eIF5A の活性測定に利用できるのではないかと考え、MTFR1 遺伝子に Luc 遺伝子を融合したレポーターシステム (pMTFR-Luc)を構築した。pMTFR-Luc を形質導入した乳がん細胞株に化合物ライブラリ (FDA approved drug library V2 (BML-2843J: 765 種)、New ICCB (L2000-Z752018: 478 種)、Natural Products Compound Library (BML-2865: 502 種)を添加して培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、79 種の化合物がルシフェラーゼ活性、すなわち MTFR1-Luc 融合タンパク質の合成を阻害した。 HEK293 細胞は eIF5A2 の発現が低いことから、その増殖における eIF5A2 の関与は小さい (eIF5A1 に依存している)のではないかと考え、HEK293 細胞に pMTFR-Luc を形質導入して 79 種の化合物を添加して培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、79 種のうち 19 種はルシフェラーゼ活性を阻害しなかった。以上の結果より、19 種の薬剤に eIF5A2 特異的阻害剤が含まれている可能性が高まった。現在、MTFR1 生合成阻害活性を示す化合物の構造上の特徴を調べているところである。	
【成 果 等】	【主な論文発表】	
	ありません。	
	【学会発表】 1. がん細胞の増殖に関与するポリアミン制御遺伝子の同定 東 恭平, 日本農芸化学会 2025 年度札幌大会 (札幌), シンポジウム口頭発表, 2025 年 3 月 6 日	
	【その他特筆事項】	

研究課題		BNCT 後 small extracellular vesicle を介した微小環境制御
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・助教・近藤夏子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・講師・木野内忠稔
	所属・職名・氏名	京都大学複合原子力科学研究所・准教授・櫻井良憲
	所属・職名・氏名	慶應義塾大学薬学部・教授・松崎潤太郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・平田英周
【研究目的】	グリオーマは原発性脳腫瘍の中で最も頻度が高く、その中でも isocitrate dehydrogenase (IDH1)-wildtype の glioblastoma (GBM)の平均生存期間は手術・放射線・薬物療法を行っても 12 か月と予後が悪い。我々は悪性グリオーマに対してホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy: BNCT)の臨床研究・治験を行い、予後を延長してきた。しかし、再発が問題となる。BNCT 後の再発には微小環境中の細胞間相互作用によって再発が促される可能性が高い。細胞間相互作用において small extracellular vesicles (sEVs)が重要な役割を果たしていることが広く知られている。申請者らは先行研究で BNCT 後に GBM 細胞から放出される sEVs が、グリオーマの予後不良に関係する micro-RNA(miRNA) を内包することを見出した。本研究では、さらに sEVs がどのようにグリオーマの再発に関与するかを知るため、非照射の GBM 細胞に BNCT 後の sEVs を暴露させて、細胞遊走や増殖に与える影響を調べる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	【方法】①ヒト GBM 細胞 U87MG (<i>AEGR</i> 強制発現細胞株) 細胞にホウ素化合物 p-boronophenylalanine (BPA)を培地中濃度 25ppm 添加し取り込ませ、トリプシンで剥がし、エッペンチューブに移し、熱中性子を照射した。照射後 10cm シャーレに撒いて、3 日間培養し培養上清を集めて、遠心後 0.22μm のフィルターろ過し、-80°C に保存した。その培養上清を遠心式限外ろ過ユニットを用いて 500μl 程度に濃縮し、sEVs をサイズ排除クロマトグラフィー法で精製した。②精製した sEVs の濃度と粒子径を tunable resistive pulse sensing (TRPS)を用いて計測した。③Wound-healing assay : U87MG 細胞を 96well に 3 x 10⁴ cell/well 播種し、翌日 10μL のピペットで well の底に一筋の傷をつけて細胞を剥がし、非照射細胞または BNCT 後細胞から精製した sEVs を 5 x 10⁷ particle/mL の濃度で含む培地で処理した。0、24 時間後に顕微鏡で観察し、ふさがった傷の面積の割合を求めた。④細胞増殖 assay : U87MG 細胞を 10% sEVs free FBS 添加培地中、96well に 10⁴ cell/well を播種し、翌日 sEVs を 4 x 10⁷ particle/mL の最終濃度になるように添加した。24 時間後、Cell counting Kit-8 を添加し、450nm の波長のプレートリーダーで吸光度を測定した。 【結果】TRPS で計測した sEVs の粒子径は 30-150nm 付近が大部分を占めた。濃度は、非照射細胞、BNCT 後細胞で 2.0 x 10⁸/mL、2.5 x 10⁸/mL であった。Wound-healing assay の結果、Closure rate (%)は、PBS、非照射細胞 sEVs、BNCT 後細胞 sEVs、処理で 40.0$\pm$33.6、26.2$\pm$11.5、55.2$\pm$23.6 であった (図 1)。細胞増殖 assay の結果、PBS 添加を 1 とした場合、非照射細胞 sEVs または BNCT 後細胞 sEVs 処理細胞の増殖率は 0.87$\pm$0.10、1.1$\pm$0.18 であった (図 2)。 【結論】BNCT 後の sEVs は GBM 細胞の遊走能・細胞増殖を増加させる傾向があった。	
【成果等】	【主な論文発表】 <u>N. Kondo*</u>, T. Kinouchi, M. Natsumeda, J. Matsuzaki, <u>E. Hirata</u>, Y. Sakurai, M. Okada, M. Suzuki. Profile of miRNAs in small extracellular vesicles released from glioblastoma cells treated by boron neutron capture therapy. J Neurooncol. 2024;168(1):91-97.	
	【学会発表】 <u>N. Kondo*</u>, T. Kinouchi, M. Natsumeda, J. Matsuzaki, <u>E. Hirata</u>, Y. Sakurai, M. Okada, M. Suzuki. Profile of miRNAs in small extracellular vesicles released from glioblastoma cells treated by boron neutron capture therapy. 20th International Congress on Neutron Capture Therapy (2024 年 6 月 Krakow, Poland),	
	【その他特筆事項】 なし。	



研究課題		m ⁶ A 修飾によるがん抑制 miRNA の生合成制御を介した非アルコール性脂肪肝炎から肝細胞がんの増悪化における影響の検証
研究代表者	所属・職名・氏名	高知大学 総合研究センター ・助教・樋口琢磨
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	高知大学 総合研究センター ・教授・坂本修士
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	機能的な小分子 RNA であるマイクロ RNA (miRNA) の中にはがん抑制作用を有するもの(がん抑制 miRNA)が存在し、当該 miRNA の産生低下が発がんおよびがんの悪性化に寄与する。我々はこれまで、RNA 結合タンパク質複合体 NF90-NF45 が複数のがん抑制 miRNA の産生を阻害することを明らかにしてきた。また我々は、肝細胞がん(HCC)患者検体のがん部および非アルコール性脂肪肝炎(NASH)由来 HCC モデルマウスの肝臓において、NF90-NF45 が顕著に発現増加することを見出してきた。これらの知見から、NF90-NF45 の発現増加はがん抑制 miRNA の産生阻害を介して前がん状態である NASH の発症および NASH から肝細胞がんへの進展に寄与する可能性が想定される。加えて我々はこれまで、貴学がん進展制御研究所との共同研究を通して、RNA メチル化酵素 METTL3/14 による miRNA 初期転写産物への m⁶A 修飾効果が NF90-NF45 により阻害されることを見出してきた。miRNA 初期転写産物への m⁶A 修飾は miRNA の生合成を促進する作用が報告されており、上記機構は NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA の産生阻害機構の全容解明の一助となると考えられる。本研究では、NASH および NASH 由来 HCC の発症・進展に対する NF90-NF45 の関与の検証と、m⁶A 修飾調節を介した NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA 産生制御機構の解明を試みた。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	これまでの研究結果より、NF90-NF45 が METTL3/14 による miRNA 初期転写産物への m⁶A 修飾効果を阻害することを明らかとなってきた。一方で、これまでの解析ではがん抑制 miRNA の一つである let-7a を標的としており、他のがん抑制 miRNA についての影響は十分に確認されていなかった。そこで今回、肝細胞がんにおいて NF90-NF45 の標的となるがん抑制 miRNA 「miR-7」を新規ターゲットとして、解析を進めた。 まず、肝細胞がん細胞株である Huh7 に対して METTL3/14 を過剰発現すると、miR-7 の発現が有意に増加することが見出された。また、m⁶A 修飾予測データベースを用いた解析で、miR-7 の初期転写産物(pri-miR-7-1)が m⁶A 修飾を受ける可能性が示された。そこで <i>in vitro</i> 解析系による pri-miR-7-1 の m⁶A 修飾解析を実施した。当該解析の結果、METTL3/14 の添加により pri-miR-7-1 は m⁶A 修飾されるが、NF90-NF45 の共添加により当該作用が有意に阻害されることを見出した。また、NF90 は「長くミスマッチの少ない安定な二本鎖構造を有する miRNA 初期転写産物」に対して優先的に結合することが明らかとなっている。そこで、当該構造を有さない miRNA 初期転写産物(pri-miR-200a)を用いて同様の解析を行った結果、上記の NF90-NF45 による m⁶A 修飾阻害効果が発揮されなかった。これらの結果から、NF90-NF45 は標的とする miRNA 初期転写産物に結合し、当該 RNA と METTL3/14 の結合を阻害することで m⁶A 修飾を抑制し、結果としてがん抑制 miRNA の生合成を阻害することが示唆された(右図参照)。本成果は、第 65 回日本生化学会中国四国支部例会にて発表され、当該発表は優秀研究賞(若手)を受賞した(成果等の項目【学会発表】および【その他特筆事項】参照)。本研究結果については、現在生化学系学術誌に投稿準備中である。 また、NF90-NF45 による miRNA の生合成抑制機構と m⁶A 修飾の関連性について <i>in vivo</i> 系による検証を行うため、NASH-HCC モデルマウスによる解析を実施した。本解析にはコントロールマウスおよび我々が独自に作製した肝細胞特異的 NF90 ノックアウトマウス(Hepa-NF90KO マウス)を使用した。昨年度までの解析の結果、コントロールマウスを用いた NASH-HCC モデルでは肝臓に複数の原発性腫瘍が形成されるが、Hepa-NF90KO マウスを用いた場合では形成する腫瘍数が有意に減少することが判明している。そこで、当該肝臓組織から totalRNA を抽出し、抗 m⁶A 認識抗体により m⁶A 修飾量を定量したが、コントロールマウスと Hepa-NF90KO マウスで有意な変化は認められなかった。これは上述の <i>in vitro</i> 系解析の結果と同じく、NF90-NF45 が影響を与える標的が細胞全体の m⁶A 修飾では	

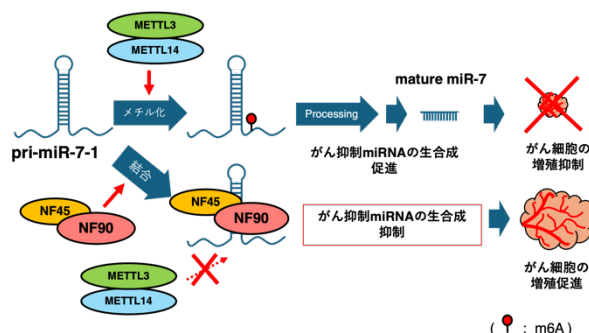
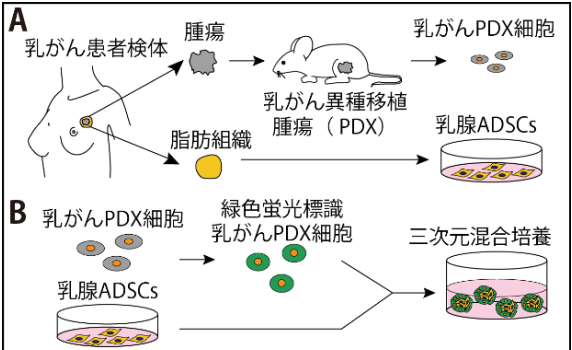


図 NF90-NF45によるm⁶A修飾制御を介したがん抑制miRNAの生合成調節機構のモデル

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	なく、NF90-NF45 が結合する特定の RNA 種である可能性を示している。そこで、miRNA アレイを用いて、当該肝臓組織において発現変動する miRNA を網羅的に解析した。その結果、線維化抑制的 miRNA である miR-3473d の発現はコントロールマウスと比較し、Hepa-NF90K0 マウスでは約 7.81 倍に増加していた。他にも、Hepa-NF90K0 マウスの肝臓では抗炎症 miRNA である miR-7578、がん抑制 miRNA である miR-455-3p の発現も有意に増加していた。前述の miR-7 の発現についても、Hepa-NF90K0 マウスでは約 1.44 倍に増加していた。この結果から、NASH-HCC で見られる抗線維化、抗炎症、がん抑制 miRNA の発現低下が NF90 の欠損により軽減されることを示唆している。今後、Hepa-NF90K0 マウスの肝臓において miR-3473d 等の初期転写産物が m⁶A 修飾を受けているか、抗 m⁶A 認識抗体を用いた免疫沈降により検証する予定である。上記解析を通して、<i>in vitro</i> 系で見出された仮説を <i>in vivo</i> 系にて実証し、m⁶A 修飾調節を介した NF90-NF45 によるがん抑制 miRNA 産生制御と NASH-HCC 発症の関連性を検証していく。
【成 果 等】	【主な論文発表】（著者名、タイトル、学術誌、巻号頁、発表年の順で記載） ① Senthilkumar Preethy, <u>Shuji Sakamoto</u>, <u>Takuma Higuchi</u>, Koji Ichiyama, Naoki Yamamoto, Nobunao Ikewaki, Masaru Iwasaki, Vidyasagar Devaprasad Dedeepiya, Subramaniam Srinivasan, Kadalraja Raghavan, Mathaiyan Rajmohan, Rajappa Senthilkumar, Samuel Jk Abraham. Enhanced expression of dystrophin, IGF-1, CD44 and MYH3 in plasma and skeletal muscles including diaphragm of mdx mice after oral administration of Neu REFIX beta 1,3-1,6 glucan. Scientific Reports, 15(1):7232. (2025) ② Susumu Muroya, Yuta Horiuchi, Kazuki Iguchi, <u>Takuma Higuchi</u>, <u>Shuji Sakamoto</u>, Koichi Ojima, Kazutsugu Matsukawa. Depth of Interbreed Difference in Postmortem Bovine Muscle Determined by CE-FT/MS and LC-FT/MS Metabolomics. Metabolites, 15(5):261. (2024) 【学会発表】（演者名、演題名、学会名、開催日の順で記載） ① <u>樋口 琢磨</u>、森岡 俊介、岸上 麗奈、森澤 啓子、津田 雅之、<u>鈴木 健之</u>、坂本 修士 がん抑制 miRNA の生合成阻害因子による m⁶A 修飾制御、第 65 回 日本生化学会 中国四国支部例会、2024 年 6 月 1-2 日 ② 坂本 修士、<u>樋口 琢磨</u>、津田 雅之、鈴木 健之 NF90-NF45 complex, a DZF protein, promotes pathogenesis of NASH-HCC. 第 83 回日本癌学会学術総会、2024 年 9 月 19-21 日 ③ <u>樋口 琢磨</u>、岸上 麗奈、森澤 啓子、津田 雅之、<u>鈴木 健之</u>、坂本 修士 二本鎖 RNA 結合タンパク質 NF90 によるマイクロ RNA 産生抑制を介した NASH-HCC 発症制御機構の検証、第 47 回日本分子生物学会年会、2024 年 11 月 27-29 日 【その他特筆事項】 【受賞（賞名、受賞者、学会名、受賞日の順で記載）】 ・優秀研究賞(若手)、樋口琢磨、第 65 回日本生化学会中国四国支部例会、2024 年 6 月 2 日受賞

研究課題		三次元共培養法を活用したがん幹細胞ニッチ細胞の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・下野 洋平
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・浅井 直也
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・助教・ベフヌーシュ ハレディアン
	所属・職名・氏名	藤田医科大学医学部・教授・喜島 祐子
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤 典子
【研究目的】	乳がんは脂肪組織に富む乳腺に発生する。また、正常乳腺の発達には脂肪組織が必須であることから、幹細胞ニッチとしての脂肪細胞の重要性が示唆される。私たちは、乳がん患者の手術検体を用いた解析により、脂肪細胞が乳がん幹細胞ニッチとして働くことを見出した。本研究では、脂肪細胞ががん種横断的にがん幹細胞ニッチ細胞として働きがんを進展させる機構を解析することで、がんの根源にあるがん幹細胞を標的とするための分子標的の同定を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	がん細胞・PDX細胞と間質細胞を用いた三次元共培養により、がん幹細胞ニッチとしての脂肪細胞の働きおよびその分子機構を解析した。 1. 三次元共培養法によるがん幹細胞ニッチ細胞の探索 間質細胞とがん細胞の三次元共培養(図1)を用いて、ヒト手術検体由来の脂肪細胞が、乳がんや卵巣がんなどのがん細胞株およびPDX細胞のニッチ細胞として働くことを見出した。 2. がん幹細胞ニッチ細胞の分泌因子探索 脂肪細胞のメタボミクス解析や遺伝子発現解析を行い、スフェロイド形成の促進因子候補を同定した。また、各種のヒト脂肪細胞の分泌因子を、サイトカインアレイにて解析し、アディプシン(補体D因子)および肝細胞増殖因子(HGF)が、乳がんなどのがん細胞株およびPDX細胞の幹細胞性を増強する分泌因子であることを同定した。つぎに、アディプシンが脂肪細胞自身のオートクライン制御因子として働き、脂肪細胞からのHGF分泌を増強することで、がん細胞のスフェロイド形成を促進する機構を同定した。 3. がん幹細胞ニッチ細胞による腫瘍形成と浸潤転移促進能の解析 アディプシンの発現を抑制あるいはノックダウンした脂肪細胞との共移植、あるいはアディプシンノックアウトマウスへの移植により、乳がん細胞株およびPDX細胞の腫瘍形成、腫瘍浸潤およびがん転移が抑制されることを見出した。	
	 図1. 乳がん PDX 細胞と乳腺 ADSC の樹立と混合培養 A. 乳がん患者組織より、乳がん PDX と乳腺 ADSC を樹立 B. 蛍光標識した PDX 細胞と ADSC を三次元混合培養して、形成されるスフェロイド数から、がん幹細胞性を評価する。	
	【成果等】 【主な論文発表】 - Yoshida J, Hayashi T, Munetsuna E, <u>Khaledian B</u>, Sueishi F, Mizuno M, Maeda M, Watanabe T, Ushida K, Sugihara E, Imaizumi K, Kawada K, <u>Asai N</u>, <u>Shimono Y</u>. Adipsin-dependent adipocyte maturation induces cancer cell invasion in breast cancer. Scientific Reports. 2024;14(1):18494. - Kotomura N, <u>Shimono Y</u>, Ishihara S. CYP19A1 expression is controlled by mRNA stability of the upstream transcription factor AP-2γ in placental JEG3 cells. Endocrinology. 2024;165(6):bqae055.	

【学会発表】

1. Mukohyama J, Yamashita K, Kakeji Y, Shimono Y. Identification of miR-221 as a functional biomarker of cancer stem cells through comprehensive miRNA profiling of colorectal cancer patient specimens. International Surgical Week 2024、2024 年.
2. Shimono Y, Yoshida J, Hayashi T, Munetsuna E, Khaledian B, Sueishi F, Kawada K, Asai N. Adipsin-dependent adipocyte maturation induces cancer cell invasion. 第 35 回日本消化器癌発生学会総会, 2024 年.
3. Shimono Y, Hayashi T, Sueishi F, Minami M, Kijima Y, Suzuki M, Asai N, Turtoi A. γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼによるがん幹細胞性促進. 第 10 回がん代謝研究会, 2024 年.
4. Shimono Y, Yoshida J, Hayashi T, Munitsuna E, Khaledian B, Kijima Y, Asai N, Kawada K. Adipsin dependent adipocyte maturation promotes breast cancer invasion. 第 22 回 幹細胞シンポジウム、2025 年.
5. Khaledian B, Hayashi T, Mizuno M, Maeda M, Watanabe T, Ushida K, Sugihara E, Kawada K, Asai N, Shimono Y. Adipokine Adipsin promotes tumor invasion by upregulation of matrix metalloproteinase-9 and Lgalectin-7 in Breast Cancer. 第 83 回日本癌学会学術総会、2024 年.
6. Shimono Y, Mizuno M, Hayashi T, Khaledian B, Sueishi F, Ushida K, Mizutani Y, Minami M, Kawada K, Suzuki M, Asai N. Adipocyte regulation of cancer stem cells and their metastatic progression. 第 83 回日本癌学会学術総会、シンポジウム 2024 年.
7. Sugiura R, Hayashi T, Sueishi F, Shimono Y. Roles of gamma-glutamylcyclotransferase variants in tumor proliferation and drug resistance in breast cancer. 第 83 回日本癌学会学術総会、2024 年.

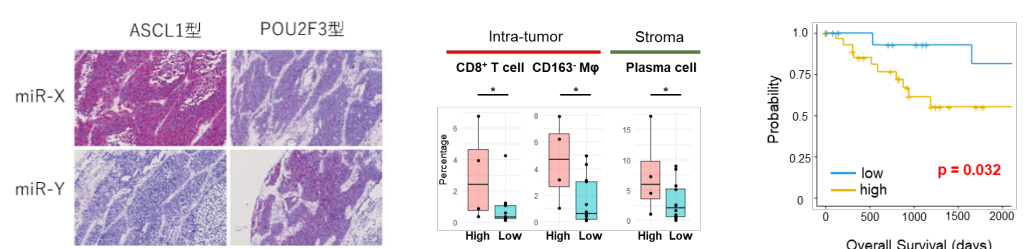
【その他特筆事項】

特になし。

研究課題		腸内細菌叢が膵がんの病態に与える影響の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学・助教・山村 凌大
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	北海道大学・教授・園下 将大
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	我々はこれまで、肥満や潰瘍性大腸炎、統合失調症など様々な疾患の病態に影響を及ぼす腸内細菌種および代謝産物を同定してきた (Yamamura et al. <i>J Nutr Biochem</i> 2025; Shimizu, Yamamura et al. <i>Gut Microbes</i> 2023; Yamamura et al. <i>Obes Res Clin Pract</i> 2021; Yamamura et al. <i>J Pers Med</i> 2021; Shimizu, Yamamura et al. <i>GeroScience</i> 2021; Yamamura et al. <i>Biosci Microbiota Food Health</i> 2020)。本研究で我々は、複数の膵がん個体モデルや臨床検体を相補的に使用し、腸内細菌叢由来成分が膵がんの病態に与える影響とその詳細な機序を解明する。さらに、この成果に立脚して膵がんの新規治療法を開発する。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申請者らは最近、ハエを活用し、膵がん患者の様々な遺伝子型を模倣した世界初のモデル動物ライブラリを構築した (図1)。そして、特に4遺伝子 (がん遺伝子 <i>KRAS</i> の活性化、がん抑制遺伝子群 <i>TP53</i>・<i>CDKN2A</i>・<i>SMAD4</i> の不活性化) の変異を模倣した <i>4-hit</i> ハエが最も悪性の形質を呈することを見出した。この結果は、この遺伝子型を有する患者が最も予後不良であるとの臨床報告と矛盾しない。これを踏まえて申請者らは、この <i>4-hit</i> ハエの遺伝学スクリーニングと、自身らが有する哺乳類解析基盤を相補的に活用し、ヒト膵がんゼノグラフトの成長を著明に抑制する、AURORA キナーゼ B と MEK の共阻害シーズ (Sekiya, Yamamura et al. <i>Cancer Res</i> 2023 : 図2) や GSK3b 阻害シーズ (Fukuda, Yamamura et al. <i>Cancer Sci</i> 2024) を見出すことに成功した。 これらの独自の研究基盤に立脚し申請者らは以下の研究を実施した。申請者はまず北海道大学病院にて臨床研究を実施し、治療介入前の膵がん患者 28 名と、膵がん患者と性・年代・人種をマッチングさせた健常対照者 40 名の腸内細菌叢の組成を網羅的に比較した。その結果申請者は、膵がん患者では健常者と比較して細菌 <i>X</i> が顕著に減少していることを発見した (図3A)。加えて、この細菌 <i>X</i> の代表的な代謝産物である <i>Y</i> の糞便中濃度をガスクロマトグラフ質量分析計で測定したところ、実際に膵がん患者では健常者と比較して糞便中 <i>Y</i> 濃度が顕著に減少していることを見出した (図3B)。 control ptc>GFP 1-hit Ras^{G12D} 4-hit Ras^{G12D}-p53^{shRNA}-CycE-Smad4^{shRNA} 翅原基 (上皮) ハエ生存率 (%) 100 55 0 図1：膵がん遺伝子型ハエモデル。翅原基で、<i>patched (ptc)</i> プロモーター活性を利用して約 10 細胞ぶんの幅の単層上皮細胞に遺伝子操作を施した。輪郭 (赤) に囲まれた黒い領域には野生型細胞が存在する。<i>Ras</i> を活性化すると、形質転換細胞の増殖が亢進して帯が広がる (<i>1-hit</i>)。4 遺伝子異常ハエ (<i>4-hit</i>) では一層増殖が活発になり、遊走能が亢進した腫瘍細胞が出現し (矢頭)、ハエは致死となる。 膵がん患者 モデル化 膵がん遺伝子型モデルハエ 全キナーゼ 網羅的遺伝学スクリーニング 新規治療標的 MEK & AURKB モデルハエでの阻害剤試験 モデルマウスでの阻害剤試験 新規治療薬候補 trametinib & BI-831266 図2：ハエを活用した膵がんシーズの同定。膵がん患者の遺伝子変異を模倣したモデルハエを出し、全キナーゼの遺伝学的スクリーニングによって新規治療標的 MEK と AURKB を同定し、さらに新規シーズとして MEK 阻害薬 trametinib と AURKB 阻害剤 BI-831266 の併用を見出した。	

	さらに申請者は最近、ハエ細菌叢の解析環境の構築に成功し、<i>4-hit</i>ハエの腸では対照ハエ（非遺伝子組換え）と比較して全菌種のうち細菌 Z の存在割合が著明に減少していることを見出した。加えて申請者らは、細菌 Z の主要な代謝産物である Y（上述の臨床研究で見出した Y と同物質）が trametinib の効果を増強し、この組み合わせ療法がヒト膵がん細胞ゼノグラフトの成長を顕著に抑制することも発見した（図4）。我々は今後、ハエおよびマウス実験で得られた結果の詳細な分子機序を明らかにする予定である。 図3：膵がん患者における代謝産物 Y 産生能の減少。A, 膵がん患者における Y 産生菌の減少。 健常者 40 名と膵がん患者 28 名の腸内細菌叢の比較。膵がん患者においては、健常者と比較してヒト腸内細菌のうち細菌 X が有意に減少している。B, 膵がん患者における糞便中 Y 濃度の低下。 各対象者の糞便中 Y 濃度をガスクロマトグラフ質量分析計で測定。***$P < 0.001$, ****$P < 0.0001$ in Student <i>t</i>-test. 図4：Y は膵がんモデルマウスにおいて MEK 阻害薬 trametinib の抗腫瘍効果を増強する。 ルシフェラーゼ標識したヒト膵がん細胞 AsPC-1 を膵臓に同所移植したマウスに、Y や trametinib (0.5 mg/kg) を投与。投与量は事前に同定した最大耐量。*$P < 0.0001$ in Student <i>t</i>-test.
【成 果 等】	【主な論文発表】 1. Ishikawa S, Hashimoto N, Okubo R, Sawagashira R, <u>Yamamura R</u>, Ito YM, Sato N, Kusumi I. Assessment of factors associated with antipsychotic-induced weight gain: A nationwide cohort study. <i>Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry</i>. 2024 111231-111231. 2. <u>Yamamura R</u>, Okubo R, Ukawa S, Nakamura K, Okada E, Nakagawa T, Imae A, Kimura T, Tamakoshi A. Increased fecal glycocholic acid levels correlate with obesity in conjunction with the depletion of archaea: the DOSANCO Health Study. <i>J Nutr Biochem</i>. 2024 139:109846-109846.
	【学会発表】 特になし
	【その他特筆事項】 特になし

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		マスター転写因子に注目した肺癌における腫瘍免疫環境の解明と新規治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科 病理学講座分子病理学分野 教授 堀江真史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科 教授 矢野聖二
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系 分子細胞病理学 教授 前田大地
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科 教授 矢野聖二
【研究目的】	肺癌は、癌死亡原因の中で部位別では最も多く、全世界で年間 100 万人以上が死亡している。その中でも肺小細胞癌 (SCLC) は肺癌全体の 10~20% を占め、転移しやすく、悪性度が高い予後不良の疾患である。SCLC は他の肺癌と比較して分子遺伝学的特徴の解明が遅れており、過去 30 年以上にわたって治療法の進歩が見られず、分子標的薬の開発も停滞していた。マイクロ RNA (miRNA) は、20~25 塩基程度の短い一本鎖 RNA であり、mRNA の 3'UTR に相補的に結合することで遺伝子発現を調節し、多様な生物学的機能を制御する役割を担う。申請者はこれまでに、SCLC が ASCL1、NEUROD1、YAP1、POU2F3 という 4 つの転写因子の発現パターンに基づいた分子サブタイプを提唱し、それぞれの薬剤感受性が異なることを報告してきた。さらに、スーパーエンハンサー (SE) と呼ばれる転写因子群とメディエーター複合体が形成する巨大なゲノムクラスターによって制御される miRNA (SE-miRNA: super-enhancer associated miRNA) が、SCLC のサブタイプ制御に寄与していることも明らかにしてきた。本研究では、ヒト検体を用いた病理学的検討およびオミクス解析を通じて SCLC のサブタイプ特異的な SE-miRNA の発現プロファイルを解明することで、SE-miRNA を軸とした SCLC の分子病理診断法の確立、さらに SE-miRNA が腫瘍免疫や微小環境に及ぼす影響を解明し、治療への応用につなげることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	金沢大学附属病院で外科的切除された 48 例の SCLC 患者の臨床検体を用いて、マスター転写因子 ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP の免疫染色による分子分類、miRNA Scope による miRNA の発現評価、イメージングマスマイトメトリーによる免疫細胞プロファイルを行い、SE-miRNA のプロファイリングを行った。miR-X は ASCL1 高発現群、miR-Y は POU2F3 高発現群で特異的に発現していた。これらは一部の症例で相互排他的に発現しており、miRNA がサブタイプのスイッチに関与している可能性が示された。また miR-Y の高発現群では間質成分が有意に多く、腫瘍内への CD8 陽性 T 細胞と CD163 陰性マクロファージの浸潤、及び間質部における形質細胞の増多が認められた。臨床病理学的検討により miR-X の高発現群は予後が有意に不良であった。以上より、SCLC におけるサブタイプ特異的な miRNA プロファイルとその意義が明らかになった。  The figure consists of several parts: 1. Immunohistochemistry (IHC) images for ASCL1 and POU2F3 in miR-X and miR-Y groups. 2. Bar charts showing the percentage of CD8+ T cells, CD163+ macrophages, and plasma cells in the intra-tumor and stroma regions for high and low expression groups. 3. A Kaplan-Meier survival curve showing overall survival (days) for low and high expression groups, with a p-value of 0.032.	
【成果等】	【主な論文発表】	現在投稿中である
	【学会発表】	第 114 回日本病理学会総会 堀江真史 工田啓史 木場隼人 伊藤行信 伊藤歩美 齋藤朗 前田大地 「小細胞肺癌における microRNA プロファイリングと臨床病理学的検討」
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		Long non-coding RNA の細胞内局在の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	名古屋大学・助教・西村 建徳
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木 健之
【研究目的】	生体分子はその局在、相互作用分子によってその役割を変える。本研究では生体分子として、いまだ機能未知の分子が多数存在する long non-coding RNA (lncRNA) に着目した。そして、局在場所としては、エネルギー産生、アポトーシス、核酸代謝に関係し、核同様にゲノムを包含するミトコンドリアに着目した。本研究では、ミトコンドリアに局在する lncRNA を同定し、その機能について解析することを目的とした。加えて、がん特異的に発現、機能している lncRNA を同定し、がん治療への展開を試みることも目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究を通し、三つの lncRNA を研究標的として同定した。三つすべてに関しては anti-sense oligonucleotides (ASO) を用いて効率よくノックダウンすることができた。本研究で、siRNA, shRNA, CRISPR-Cas9 を用いず、ASO を用いた理由は ASO が実際のがん治療に既に使われており、将来的に配列を変えるのみで新規治療法をベッドサイドに届けられると考えたからである。 実際に lncRNA がミトコンドリアに局在しているのかを検証する方法としては二つの手法を用いることとした。①細胞分画を行い、各分画ごとに RNA を精製し、qRT-PCR を行う。②fluorescent in situ hybridization (FISH), immunocytochemistry (ICC) を行う。①については抗がん剤処理なし、ありで細胞分画に成功し、各分画からの RNA の精製についても可能になった。今後、様々な遺伝子の発現についてデータを蓄積していく。②については FISH と ICC を行い、共焦点顕微鏡で観察を行った。細胞によって刺激依存的な lncRNA の局在変化に違いがあることまで明らかになった。今後、各細胞を超解像顕微鏡である STORM, STED 顕微鏡を用いて、より解像度の高い観察を行う予定である。 最終的には局在の違いによる lncRNA の働きに違いがあるのかを明らかにする。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 第 83 回日本癌学会学術総会 ポスター発表	
	【その他特筆事項】 なし	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		胃腺粘液特異的糖鎖 α GlcNAc 陰性胃がんにも有効な薬剤の選択と作用機序の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	信州大学 先鋭領域融合研究群 バイオメディカル研究所・助教・藤井千文
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	当研究室では、胃腺粘液特異的糖鎖であるα1,4-結合型 N-アセチルグルコサミン(αGlcNAc)とその結合タンパク質 MUC6 に焦点を当て、胃がんの病態解明を行っている。αGlcNAc の役割を明らかにするため、αGlcNAc の生合成酵素を欠損したマウス(<i>A4gnt</i> KO マウス)を作出したところ、αGlcNAc の欠損により胃幽門粘膜に慢性炎症が生じ、加齢と共に分化型腺がんが自然発症した。また、ヒト胃がん検体においてαGlcNAc の消失は病理学的悪性度と相関し、MUC6 陽性症例の中でαGlcNAc 陰性症例は予後不良であった。本研究では、αGlcNAc と MUC6 の分化型胃がんの発症過程における低下と病態悪性化の分子機構を解明することを目的とし、分化型胃がんの新規診断法・治療法開発へと繋げることを最終的な目標とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	<i>A4gnt</i> KO マウスでは、50 週齢にて幽門部に分化型腺がんが発症する。本マウスの幽門部腫瘍は、ヒトαGlcNAc 陰性分化型胃がんにも病理学的形態が酷似していることから、予後不良分化型胃がんのモデルとなりうることを考えた。そこで、本研究では、大島教授のグループからマウス胃オルガノイド培養法並びに実験法をご教授頂き、<i>A4gnt</i> KO マウス及び野生型マウス由来胃オルガノイドを樹立した。これらを用いて以下の検討を行った。 1. オルガノイドの樹立 50 週齢並びに 60 週齢の <i>A4gnt</i> KO マウスの幽門部腫瘍と、コントロールとして胃体部より、それぞれオルガノイドを樹立した。野生型マウスにおいても、50 週齢と 60 週齢のマウス幽門部、及び胃体部よりそれぞれオルガノイドを樹立した。以下の解析では全て、幽門部由来のオルガノイドを用いた。 2. <i>A4gnt</i> KO マウス幽門部腫瘍由来オルガノイドからの 2D 培養の試み オルガノイドレベルではなく、もし 2D 培養を行うことが可能であれば、薬剤スクリーニングや他の解析の際に、オルガノイドと共に有用な研究材料となりうることを、樹立した <i>A4gnt</i> KO マウス幽門部腫瘍由来オルガノイドからの 2D 培養を試みた。プレートのコーティング条件(種々のコラーゲン、増殖因子の有無が異なるマトリゲル)、培地組成、培養時間等について検討を行った。今回検討したいずれの条件にても、オルガノイド播種後、細胞は 2D 状態に広がったが、継代は不可の結果となった。以上より、本オルガノイドからの 2D 培養は断念した。 3. オルガノイドにおける糖鎖、ムチン、幹細胞マーカーの発現解析 αGlcNAc 結合型 MUC6 は、胃の腺粘液産生細胞にて産生される。また、腺粘液細胞は GSII レクチン陽性となる。そこで、αGlcNAc に対する免疫染色ならびに GSII レクチン染色を行った。野生型マウスでは、αGlcNAc 陽性細胞と陰性細胞のヘテロな染色性が観察された。これに対して <i>A4gnt</i> KO マウスではαGlcNAc は陰性であった。GSII レクチンによる染色性は、野生型マウス、<i>A4gnt</i> KO マウスともに陽性・陰性のヘテロな染色性を示した。胃の粘液産生細胞は、幹細胞からαGlcNAc 結合型 MUC6 を産生する腺粘液細胞に分化し、さらに MUC5AC を産生する表層粘液細胞へと分化することから、これらのオルガノイドにて、幹細胞から腺粘液細胞への分化未分化が繰り返されていることにより上記の結果が得られたと考えた。現在、胃幹細胞マーカー LGR5、AQP5、表層粘液細胞マーカー MUC5AC の免疫染色を検討中である。 4. <i>A4gnt</i> KO マウス幽門部腫瘍由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニング系の確立 本研究計画では、<i>A4gnt</i> KO マウス幽門部腫瘍由来オルガノイドを用いた薬剤スクリーニングを行い、予後不良分化型胃がん発症メカニズムの解析と治療法の確立を目指している。ハイスループット薬剤スクリーニング実験系のための培養のスケールダウンと培養時間等の検討を、CDDP をポジティブコントロールとして行い、培養条件を決定した。今年度は、条件検討が中心となった。今後、<i>A4gnt</i> KO マウス幽門部腫瘍由来オルガノイドの性質を、腫瘍原性の観点から解析し、薬剤スクリーニングへと進める予定である。	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		オルガネラを介した新規がん細胞栄養感知機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学先端科学技術研究センター ニュートリオミクス・腫瘍学分野・特任助教・安藝 翔
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	本研究では、1) 独自の腫瘍微小環境培養系、2) PIPs 代謝イメージングを融合した最先端のオルガネライメージング技術、融合することで、腫瘍微小環境におけるオルガネラダイナミクス機構、及びオルガネラを介した栄養感知機構（新規細胞内栄養センサー）、シグナル伝達系を同定し、がん細胞の腫瘍微小環境適応機構解明から、がん治療アプローチの開発に繋げる。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	申請者は、独自に開発した低酸素・低栄養・低pH培養系を用いて腫瘍微小環境におけるがん細胞の表現型解析を進める中で、腫瘍微小環境におけるダイナミックなオルガネラ形態変容を見出した。代謝の中核を担うオルガネラであるミトコンドリアの融合と分裂（ミトコンドリアダイナミクス）のバランスは、ミトコンドリアの形態・機能を維持する生命現象の根幹とも言えるイベントであり、ミトコンドリアダイナミクスの制御不全は様々ながんの悪性化を誘導することが報告されている。申請者は既に、他のオルガネラを介したイノシトールリン脂質、ホスホイノシタイド(PIPs)代謝がミトコンドリアダイナミクスを制御し、ミトコンドリア機能に寄与することを独自に発見している。大変興味深いことに、低栄養時にオルガネラの一つであるゴルジ体が崩壊（ゴルジ体ストレス）し、全アミノ酸スクリーニングにより特定のアミノ酸でゴルジ体形態の回復（ゴルジ体ストレス回避）が観察された(図)。低栄養で誘導されるゴルジ体ストレスでは、下流のTFE3 活性化が観察され、従来のリソソーム/mTOR シグナル伝達系とは異なるパスウェイが示唆された。また、ゼノグラフトモデルを用いた検証から、グルタミン制限食による TFE3 の核内移行とゴルジ体の崩壊を見出しており、in vivo レベルにおいても1アミノ酸レベルでの栄養感知を介したストレス応答機構の存在が示唆された。また、低pH ストレスに応答して制御されるPIPs 代謝は、乳がん細胞におけるミトコンドリアダイナミクスを制御し、特にトリプルネガティブ乳がん細胞株 MDAMB231、468 でPIPs の一つであるPI(4)P 代謝酵素PI4KIIIβ、ミトコンドリア切断因子 Drp1、及びアダプタータンパクであるMiD51 を介した劇的なミトコンドリア断片化を示した。PI4KIIIβ、Drp1、及びMiD51/MIEF1 の高発現が患者予後の不良化につながることや、ミトコンドリア断片化乳がん細胞では細胞遊走能が有意に亢進したことから、PI4KIIIβ、Drp1、及びMiD51/MIEF1 の阻害はミトコンドリア断片化保護を介して乳がん転移/浸潤の新たな治療ターゲットとなる事が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】 Sho Aki#, Keisuke Maeda, Maki Sugaya, Miyuki Nishida, Tomoya Matsusita, Runmei Cui, Takuma Ayano, Teppei Shimamura, Noriko Goto* and Tsuyoshi Osawa*. Acidic Extracellular pH Orchestrates Aggressive Breast Cancer through Mitochondria Dynamics. In preparation. 【学会発表】 安藝翔. 第97回日本生化学会大会. 11月8日 安藝翔. 第47回日本分子生物学会年会. 11月29日 安藝翔. APPW2025. 3月18日 【その他特筆事項】	

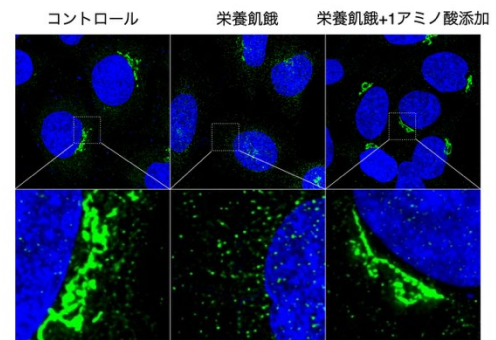
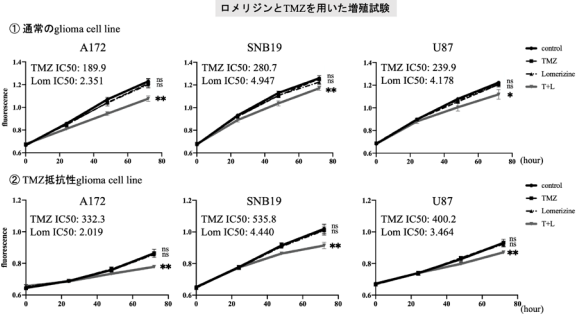
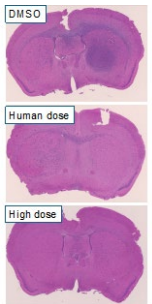
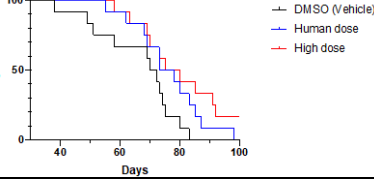


図. 栄養飢餓で誘導されるゴルジ体ストレスは特定の1アミノ酸添加で回復した

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

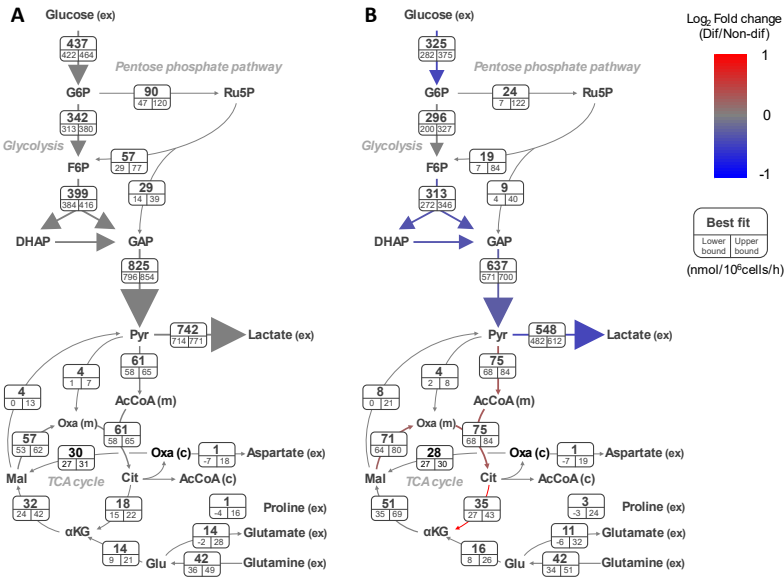
研究課題		PHLDA3/Rb の二重機能欠損による分化異常を伴った神経内分泌腫瘍マウスモデルの樹立と解析
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学ユニット 特任研究員・チン ヨ
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・基礎腫瘍学ユニット 特任研究員・Walied Kamel
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	腫瘍分子生物学研究分野・教授・高橋 智聡
【研究目的】	本研究の目的は、PHLDA3 と Rb の二重欠損による高悪性度神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor: NET) の新規マウスモデルの樹立及びマウスモデルの解析を通じる NET 悪性化機序の解明である。 希少がんである NET は神経内分泌細胞に由来する腫瘍であり、肺、膵臓、直腸、下垂体など全身の様々な臓器に生じる。近年 NET の罹患率が世界中で上昇しており、対応は急務である。NET 研究において、(1) 全ゲノム塩基配列が解読され、いくつかのがん関連遺伝子の変異が起きていることが明らかになったが、詳細な発生機序は未だに不明である、(2) 研究に役立つヒト NET と類似する早期に高悪性度 NET が発症する動物モデルが存在しない、(3) いくつかの NET の治療薬が臨床で用いられているが、最も有効な治療薬を選択するための診断マーカーがないという重大な問題点はまだ残されており、さらなる研究が求められている。 研究代表者は、国立がん研究センター研究所の大木理恵子先生と共同研究を行い、がん抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子である PHLDA3 の研究を行っている。これまでに、PHLDA3 ががん遺伝子 Akt の活性化を抑制する機能を持つこと、肺、膵臓、直腸及び下垂体の神経内分泌腫瘍においてがん抑制遺伝子として機能することを明らかにした (Cell, 2009、PNAS, 2014、PLOS ONE, 2017、Scientific Reports, 2019、International Journal of Molecular Sciences, 2020)。ヒト膵 NET 症例において、PHLDA3 はヘテロ接合性の喪失 (LOH) に加えてメチル化という two-hit によって不活化され、膵 NET の新規がん抑制遺伝子であること、さらには PHLDA3 の機能喪失は膵 NET 患者の腫瘍悪性度・予後と関連することが示され (PNAS, 2014)、PHLDA3 の診断は NET の予後予測マーカーになると考えられる。加えて、ヒト下垂体 NET 及び甲状腺 NET においても PHLDA3 の LOH が高頻度に認められることを見出した (未発表データ)。PHLDA3 欠損マウスを解析したところ、膵島の過形成を高度に呈すること (PNAS, 2014)、雌マウスにおいて下垂体 NET が高頻度に発症すること (未発表データ) が明らかになった。以上のことより、PHLDA3 は様々な臓器に発症する NET 共通のがん抑制遺伝子であることが示唆され、PHLDA3 欠損マウスは新規 NET 発症のマウスモデルとなる可能性が示された。 本研究では、金沢大学がん進展制御研究所腫瘍分子生物学研究分野高橋智聡先生との共同研究により、PHLDA3 欠損マウスと Rb ヘテロ欠損マウス (共同研究である必要性を参照) を掛け合わせることで、新規高悪性度 NET 発症マウスモデルの樹立を目指す。本マウスモデルにより、PHLDA3 単独欠損マウスで認められなかった NET の転移を視野にいった分化異常を伴った高悪性化の表現型観察が見込まれ、NET 治療薬や NET 患者の予後予測バイオマーカーの開発に資する研究成果が期待される。さらに、PHLDA3 欠損による Akt 経路、Rb 欠損による細胞周期のみならず、エピジェネティック調節機構、がん特異的代謝など細胞内シグナルのクロストークを視野にいった NET 発症機序の詳細に迫りたい。	

【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	・新規多臓器 NET 発がんマウスモデルの樹立 (図参照) PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスを交配し、PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスを樹立する。PHLDA3 欠損マウスでは膵島及び下垂体に、Rb ヘテロ欠損マウスでは下垂体及び甲状腺に神経内分泌細胞の増殖性病変が形成されることがすでにわかっているが (下図)、その他の臓器における神経内分泌細胞の増殖性病変に関して詳細に明らかにされていない。そのため、本研究では樹立した PHLDA3/Rb 2 重欠損マウスと PHLDA3 欠損マウス及び Rb ヘテロ欠損マウスについて、一般状態の悪化をエンドポイントとして最大 52 週で剖検を行い、検索臓器に対して肉眼的及び病理組織学的解析を行った。加えて、神経内分泌マーカー各種の免疫組織学的染色を行い、軽度の増殖性病変や転移巣に対しても精査した。 新規多臓器NET発がんマウスモデルの樹立 PHLDA3欠損マウス <table><thead><tr><th>臓器</th><th>病変</th></tr></thead><tbody><tr><td>膵島</td><td>過形成</td></tr><tr><td>下垂体</td><td>腫瘍</td></tr></tbody></table> Rbヘテロ欠損マウス <table><thead><tr><th>臓器</th><th>病変</th></tr></thead><tbody><tr><td>下垂体</td><td>腫瘍</td></tr><tr><td>甲状腺</td><td>腫瘍</td></tr></tbody></table> Mating PHLDA3/Rb 2重欠損マウス ✓ 検索臓器 膵臓ランゲルハンス島、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、各種消化管、胸腺、肺、さらに転移を想定して肝臓、各種リンパ節、その他異常の認められた臓器 ✓ 病理組織学的解析対象 - 増殖性病変 (過形成) - 腫瘍性病変 (良性腫瘍及び悪性腫瘍) ✓ 各種染色 - クロモグラニンA - シナプトフィジン - CD56 - SSTR2 - インスリン/グルカゴン - Ki-67	臓器	病変	膵島	過形成	下垂体	腫瘍	臓器	病変	下垂体	腫瘍	甲状腺	腫瘍
臓器	病変												
膵島	過形成												
下垂体	腫瘍												
臓器	病変												
下垂体	腫瘍												
甲状腺	腫瘍												

研究課題		片頭痛薬ロメリジンによるグリオーマ幹細胞標的治療の臨床応用へ向けた基礎研究
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学・医薬保健研究域医学系 教授 中田 光俊
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学・附属病院 脳神経外科 助教 一ノ瀬 惇也
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	遺伝子・染色体構築研究分野 教授 平尾 敦
【研究目的】	膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍であり、高い治療抵抗性の原因としてグリオーマ幹細胞の存在が示されている。グリオーマ幹細胞を治療標的とした基礎研究が進んでいるが、現在臨床応用されている薬剤は存在しない。当科ではドラッグ・リポジショニングの研究手法を用い、グリオーマ幹細胞に対する新規治療薬の発見に努めてきた。本研究の目的はスクリーニングにより見出された片頭痛薬ロメリジンのもつグリオーマ幹細胞に対する抗腫瘍効果及びその作用機序について明らかにすることである。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	片頭痛薬ロメリジンの持つグリオーマ幹細胞に対する抗腫瘍効果について明らかにするために、本年度は glioma cell line を用いた <i>in vitro</i> 実験とグリオーマ幹細胞脳内移植マウスモデル (KGS01)を用いた <i>in vivo</i> 実験の2つの実験を主に行った。結果を以下に示す。 1. <u>ロメリジンとテモゾロミド(TMZ)の併用療法是膠芽腫細胞に対し相乗的な抗腫瘍効果を有する</u> Glioma cell lineを用いた増殖実験では、ロメリジンとTMZの併用療法是膠芽腫細胞に対し相乗的な抗腫瘍効果を認めた。さらに、ロメリジンがTMZに対する抵抗性を改善すると仮説を立て、TMZ耐性株を作成し実験を継続して行った。ロメリジンとTMZの併用療法是TMZ耐性株に対し施行したところ、TMZ耐性株においても併用療法是強い増殖抑制効果を認めた。 ① 通常のglioma cell line ② TMZ抵抗性glioma cell line  2. <u>ロメリジンは脳腫瘍マウスモデルにおいて腫瘍形成を抑制する</u> グリオーマ幹細胞 (KGS01) を脳内に移植し、腫瘍移植後55日目に移植脳連続薄切切片を作成し、腫瘍径を計測した。その結果、ロメリジン投与群ではコントロール群と比較して有意な腫瘍径の縮小を認めた。さらにロメリジン高用量群では、低用量群と比較し腫瘍径がさらに縮小した。  3. <u>ロメリジンは脳腫瘍マウスモデルにおいて生存期間を延長する</u> 腫瘍径の評価と同様のマウスモデル・薬剤の投与方法を行い、脳腫瘍移植後の生存期間を評価した。結果、Kaplan-Meier 生存曲線からロメリジン投与群において生存期間が有意に延長した。これは特に高用量群で有意であった。 	
【成果等】	【主な論文発表】 国際学術誌の Major Revision 要求に対応中	
	【学会発表】 Toshiya Ichinose, Sho Tamai, Shingo Tanaka, Masashi Kinoshita and Mitsutoshi Nakada Identification of lomerizine, a prophylactic drug for migraine, as a potential anti-glioblastoma drug. 2024 CNS Annual Meeting, Sep 28, 2024 - Oct 02, 2024, Houston, Texas, USA	
	【その他特筆事項】 特になし	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		グリオーマの核小体形態変化とエネルギー代謝イメージング
研究代表者	所属・職名・氏名	広島大学両生類研究センター・助教・岡本和子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	金沢大学ナノ生命科学研究所・教授・新井敏
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	核小体は真核細胞核中にある最大の核内小器官であり、タンパク質合成に關与するリボソームの合成や外的ストレス応答に關与し、恒常性の維持や腫瘍化の進展にも極めて重要な働きをすることがわかってきている。核小体の形態は、サイズ・数が、がんを含む細胞状態に依存し変化することが知られ、病理診断に利用されるほどである。がんなど活発に分裂する細胞種の核小体は大きくまたは数が増える、とされている。しかしながら形態と機能の關係性の詳細については未だ不明な点が多い。本研究課題では核小体形態、リボソーム合成に必須である ATP 量、細胞状態の同時定量解析を行い、代謝動態をキーワードにがん化機能の一端を明らかにすることを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	核小体形態変化とがん化を含む細胞状態の關連性は古くから示唆されており、エネルギー代謝に密接に關係があるものと考えられる。蛍光共鳴エネルギー移動をベースにした ATP センサーの開発から ATP 量を画像ベースにした解析手法が発展してきた。現在、さらに定量性の高い顕微鏡法である蛍光寿命顕微鏡法 (FLIM) に適用できるセンサーが開発され本研究課題でも ATP センサー qMalioffG (Arai et al. <i>Nat Commn</i> revised.) を改変し細胞状態-核小体-ATP またはがん關連因子の關係性を見いだす計測ツールの開発を行った。qMalioffG は、ATP をミリモル濃度で検出できる単一蛍光タンパク質型の ATP センサーとして開発された。昨年度、この qMalioffG に核小体局在タンパク質 Nucleolin を融合し、核小体局在型に改変した (図 1)。本年度は、核小体の形態変化および腫瘍形成を制御することが示唆されている GTP (Kofuji, S et al. <i>Nat Biol.</i> 2019) に着目し、GTP/GDP 交換サイクルを標的とした核小体局在型 FLIM-GTP/GDP センサーの作製を行った。センサーを HEK293T 細胞に発現させ、GTP/GDP の総和の濃度の生理条件範囲 (10~1000 μM) において、その濃度域に関わらず、GTP/GDP のレシオ値を定量的に計測できることを示した。このセンサーは新たに GTP/GDP を含めたがんと核小体の關係性を明らかにするものと期待できる (図 2)。本センサーの開発は Loan Nguyen Thi Ngoc 氏の協力によるものである。	
	図 1 核小体局在型 ATP センサー 図 2 核小体局在型 GTP/GDP センサー	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

研究課題	代謝フラックス解析を用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名 大阪大学大学院情報科学研究科・准教授・岡橋伸幸
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名 大阪大学大学院情報科学研究科・教授・清水浩
	所属・職名・氏名 大阪大学大学院情報科学研究科・教授・松田史生
	所属・職名・氏名 大阪大学大学院情報科学研究科・学生・谷口 昶夫
	所属・職名・氏名 大阪大学大学院情報科学研究科・学生・橋本 隼輔
受入担当教員	職名・氏名 教授・高橋 智聡
【研究目的】	がん細胞は活発な代謝によって増殖することが知られている。しかし、そのような特異的な代謝を実現するメカニズムや、未分化性と代謝の関連は明らかとなっていない。これまでの研究では、細胞内代謝の流れを定量的に計測できる ^{13}C 代謝フラックス解析法を構築し、種々のがん細胞株の代謝状態を解析してきたほか、モデル細胞として好中球様に分化する HL-60 の分化前後の代謝をフラックスレベルで明らかにした。本年度は、これまでに得た知見を他の細胞株でも検討するべく、赤血球様細胞に分化する K562 細胞株の解析を行った。
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	K562 細胞を酪酸ナトリウムを添加して培養することで赤血球様細胞に分化させた。分化前後の細胞の ^{13}C 代謝フラックス解析を行い、中心炭素代謝のフラックス分布を得た(図1)。それぞれの細胞の代謝を比較したところ、分化後細胞では、解糖系のフラックスが分化前の7割程度に減少していた一方で、グルタミン取り込みには有意な変化は見られなかった。さらに分化後細胞では、TCA サイクルのフラックスが1.2~2 倍に増加していることが分かった。この結果は、昨年度解析した HL-60 で得た知見と似通っており、血球系細胞は分化することで、解糖系依存の代謝から好氣的代謝に移行する可能性が示唆された。  図1 分化前後のK562の代謝フラックス分布 (A) 分化前、(B) 分化後
【成果等】	【主な論文発表】 Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda (2024) ^{13}C-metabolic flux analysis reveals metabolic rewiring in HL-60 neutrophil-like cells through differentiation and immune stimulation, Metabolic Engineering Communications, e00239.
	【学会発表】 Takeo Taniguchi, Nobuyuki Okahashi, Fumio Matsuda, ^{13}C-metabolic flux analysis using GC-MS reveals metabolic rewiring in HL-60 neutrophil-like cells through differentiation and immune stimulation, 72nd ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, June, 2024.
	【その他特筆事項】 投稿中論文1件

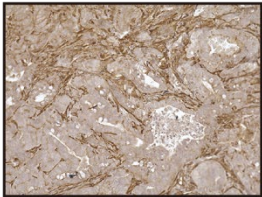
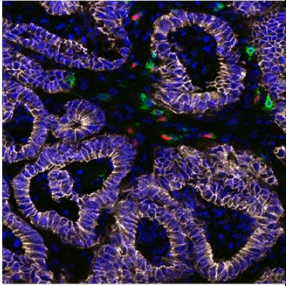
令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ノンターゲットリピドミクスを用いたがん幹細胞特異的代謝の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・教授・松田史生
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・准教授・岡橋伸幸
	所属・職名・氏名	大阪大学大学院情報科学研究科・学生・林 健太
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋 智聡
【研究目的】	遺伝子変異ががん特異的なエネルギー代謝状態を形成することが注目を集めており、中心炭素代謝に注目した創薬標的の探索が行われるようになった。一方、一連の化学反応ネットワークである代謝の変容は、細胞構成成分の生合成経路にも波及し、細胞の増殖や悪性を制御すると考えられる。例えば、がん細胞が増殖するのに好適な炎症性微小環境を作り出すのに脂質メディエーターのスフィンゴシン 1 リン酸が関わっていることや、スフィア形成によって細胞形態が大きく変化することなどから、膜を構成する脂質が重要な役割を果たすことが指摘されている。そこで本研究グループでは、がん幹細胞を脂質の観点から理解することを目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	まず、がん細胞の悪性度と脂質プロファイルに関する基礎的な知見を得るために、悪性度の異なる乳がんサブタイプを題材として研究を行った。Luminal 3 株、HER2 4 株、Triple negative 3 株の合計 10 株を培養し、LC-QTOF/MS を用いたノンターゲットリピドミクスを実施した。その結果、1040 脂質分子種を同定することに成功した。それらを主成分分析に供したところ、サブタイプごとにスコアプロットが分離する傾向が見られ、それぞれ異なる脂質プロファイルを有することが明らかとなった。SK-BR-3 は他の細胞株から大きく異なる位置にプロットされたのに対し、第二主成分軸に沿って Triple negative, HER2, Luminal のプロットが分布することが明らかとなった。そこで、悪性度と相関する脂質を探索したところ、Luminal では通常のエステル結合型リン脂質が大部分を占めるのに対し、Triple negative ではエーテル結合型リン脂質の顕著な増加が見られた。さらに、それらは特徴的に多価不飽和脂肪酸を含有していることが分かった。そこで、これらの生合成に関与する酵素遺伝子発現量を既報のマイクロアレイデータで調査したところ、エーテル脂質合成の起点となる <i>AGPS</i> や多価不飽和脂肪酸を CoA 化する <i>ACSL4</i> が Triple negative 群で高発現していた。これらの結果は、多価不飽和脂肪酸を含有するエーテル結合リン脂質ががんの悪性度と関連する可能性が示唆された。 図1 悪性度の異なる乳がん細胞株の脂質プロファイルの比較	
【成果等】	【主な論文発表】	原稿準備中
	【学会発表】	林健太 岡橋伸幸 遠山敦彦 飯田順子 松田史生, ノンターゲットリピドミクスを用いた乳がん細胞株における脂質プロファイルのサブタイプ間比較, 第18回メタボロームシンポジウム, 10月, 2024.
	【その他特筆事項】	

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

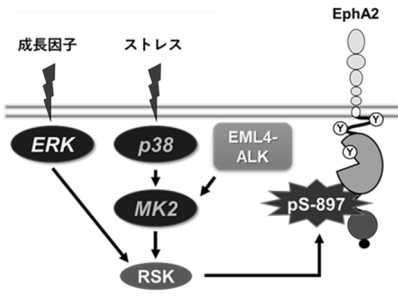
研究課題		腫瘍形成抑制活性を持つ天然化合物の同定とその作用機構に関する研究
研究代表者	所属・職名・氏名	国際医療福祉大学・准教授・須賀比奈子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	新郷中央診療所・院長・野村将春
	所属・職名・氏名	日本大学・助手・高尾恭一
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	アブラナ科野菜は肺がんの発症率を低下させることが報告されている。申請者らは、アブラナ科以外の植物抽出物に、肺腺がん細胞の増殖抑制活性を見出した。また、移植マウスモデルを用いて、この植物抽出物に抗腫瘍活性があることを明らかにした。私たちは、この植物抽出物中に抗腫瘍活性を持つ天然化合物が存在し、この化合物の構造が明らかになれば、肺腺がんの新規予防法や治療法の開発に役立つと考えた。これらのことから、この化合物を単離精製し、構造を決定し、この化合物による細胞増殖抑制活性の分子機構を解明することを本研究の目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	① 植物抽出物からの細胞増殖抑制活性の精製 植物抽出物中に含まれる抗腫瘍活性化合物を単離・精製するため、カラムクロマトグラフィーにより抽出物を分画した。各フラクションの細胞増殖抑制活性を肺腺がん細胞株 A549 を用いて評価した結果、複数のフラクションに抑制活性が認められた。中でも活性の高かったフラクション A を別のカラムで再分画し、同様に活性を評価したところ、いくつかのフラクションに細胞増殖抑制効果が確認された。特にあるフラクションは、4.0 µg/mL で顕著な抑制活性を示した。現在、このフラクションを用いたさらなる精製を進めている。 また、初回分画で得られたフラクションを用いて、¹H-NMR およびマスペクトル解析を行った結果、フラクション B について脂肪酸様化合物の存在が示唆された。(星薬科大学生薬学研究室・森田博史教授との共同研究) ② 既知の細胞増殖抑制活性を持つ脂肪酸との比較 オキシリピンは酸化脂肪酸の一群であり、細胞周期の停止、アポトーシス誘導、がんの増殖および転移の制御に関与することが報告されている。その一種である 9-オキソ-オクタデカジエン酸 (9-oxo-ODA) は、卵巣がんおよび子宮頸がん細胞の増殖を抑制することが知られている (Mogi, K. et al., Sci. Rep. 13, 19208, 2023)。本研究では、9-oxo-ODA の肺腺がん細胞に対する増殖抑制活性を測定し、フラクション B との比較を行った。9-oxo-ODA は、EGFR 遺伝子変異を有する肺腺がん細胞株 PC-9、および p53 欠損・NRAS 変異を有する肺大細胞がん細胞株 H1299 の増殖を濃度依存的に抑制し、40 µg/mL では顕著な増殖抑制および細胞形態の変化が認められた。また、KRAS 遺伝子に変異がある肺腺がん細胞株 A549 でも同様の効果が確認された。一方、これらの変異を持たない肺腺がん細胞株 H838 および乳がん細胞株 MCF7 では、同濃度で弱い増殖抑制は認められたものの、細胞形態の変化は見られなかった。これらの結果より、9-oxo-ODA は特定の遺伝子変異を有する肺がん細胞に対して選択的な増殖抑制作用を示すが、フラクション B と比較すると細胞毒性は低く、主に細胞増殖静止剤として機能している可能性が示唆された。	
【成果等】	【主な論文発表】	
	【学会発表】 (1) 須賀 比奈子、高尾 恭一、野村 将春、後藤 典子「多価不飽和脂肪酸由来生理活性物質オキシリピンの肺腺がん細胞増殖抑制作用に関する解析」2025 年 3 月、日本薬学会第 145 年会 (福岡) (2) 須賀 比奈子、高尾 恭一、野村 将春、後藤 典子「培養がん細胞の増殖に対するオキシリピンの効果」2024 年 11 月、第 97 回日本生化学会大会 (横浜)	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		大腸がん形成における Interleukin-11 産生間質線維芽細胞の機能的役割の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	東邦大学医学部・講師・仁科隆史
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東邦大学医学部・教授・中野裕康
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	申請者は新規に樹立したレポーターマウスを用いた予備的研究から、大腸がん増悪に働くサイトカインインターロイキン (IL) -11 ががん細胞ではなく、その周囲に存在する間質線維芽細胞で特異的に産生されていることを見出した(Nishina et al, <i>Nat commun</i>, 2021)。 本研究では、いまだ不明ながん関連間質細胞の腫瘍形成促進機構を明らかにするために、IL-11 産生がん関連間質細胞の特性を明らかにし、新たな治療標的を見出すことを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究は、IL-11 を産生するがん関連間質細胞 (IL-11 producing cancer-associated fibroblasts; 11CAFs)の特性を見出し、それをもとに新たな治療標的の同定を目指し、以下の研究を遂行した。 これまでに大腸癌マウスモデルを用いて、腫瘍形成に関わる IL-11 産生細胞の同定を試みている。これまで、移植したオルガノイドによる腫瘍形成率が 10%ほどと低かった。そこで、プロトコルを改変し、同所移植モデルならびに肝転移モデルにおいて移植成功率が 100%となる実験系を確立した (発表準備中)。本モデルにおいても、腫瘍形成に伴い、腫瘍細胞の周辺に EGFP 陽性細胞が認められるだけでなく、α-Smooth Muscle actin (αSMA) 陽性細胞などの間葉系細胞の浸潤が確認された。さらに、腫瘍免疫に対して抑制的に働く、制御性 T 細胞が多く浸潤しており、これらの制御性 T 細胞は平常時には認められない分子を発現していることを、予備的研究から見出している。現在、新規確立モデルを用いて、11CAFs ならびに腫瘍微小環境の特性の解析を進めている。 また、本研究と並行して代謝機能障害関連脂肪性肝炎モデルにおける IL-11 の肝線維化への関与を検討した。IL-11 は様々な臓器での線維化促進機能が報告されていたことから、脂肪性肝炎モデルを用いて、IL-11 の肝線維化促進能を検証した。このモデルでは肝臓での IL-11 発現が特異的に上昇したが、IL-11 シグナルの欠損は肝障害、炎症、線維化、およびシグナル伝達経路に影響を与えなかった。すなわち、IL-11 の線維化促進機能が臓器や疾患病因によって異なる可能性を示され、状況やモデルに応じた適切な理解が疾患を理解する上で重要であることが示された (Tsuchiya Y*, <u>Nishina T*</u> et al., <i>BBRC</i>, 2024)。 A α-SMA  B CD3 (T細胞) Foxp3 (制御性T細胞) EpCAM (癌細胞) Hoechst (核)  図 新規大腸癌オルガノイド移植法 (A) 形成後の腫瘍では、α-SMA 陽性の線維芽細胞の浸潤が認められる。(B) 形成後の腫瘍では、キラー T 細胞などを抑制する制御性 T 細胞 (Foxp3⁺) の浸潤が認められる。	
【成果等】	【主な論文発表】 1. Tsuchiya Y*, <u>Nishina T*</u>, Komazawa-Sakon S, Seki T, Mikami T, Nakano H. Interleukin-11 signaling plays limited roles for liver fibrosis in a mouse model of metabolic dysfunction-associated steatohepatitis. <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 739:150938. 2024 (*; equally contributed) 2. <u>仁科隆史</u>, 塚本夏生, 中野裕康, 「がん関連線維芽細胞 CAF の正体がみえてきた腫瘍免疫制御における CAFs の役割と炎症性 CAFs」『実験医学』羊土社, 42 巻 11 号、1677–1683 頁, 2024 【学会発表】 1. <u>Nishina T</u>, Deguchi Y, Mikami T, Nakano H: Illuminating the Diverse Role of IL-11-Producing Fibroblasts in Colorectal Cancer and Colitis, The 8th JCA-AACR Special Joint Conference, Fukuoka, 2024. 6 2. <u>Nishina T</u>., Ohmuraya M, Kumagai Y, Suzuki Y, Seki T, Yamazaki S, Mikami T, Nakano T., Illuminating the Diverse Roles of IL-11-Producing Fibroblasts in Colorectal Cancer and Colitis., Unveiling Microenvironment Science: Recurrent Fibroblast Biology, The 47th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (Symposium), 2024. 12	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

	3. <u>仁科隆史</u>, 間質線維芽細胞を介した大腸恒常性維持機構の解明, 第 4 回 ABISS 学会, 2024. 9 4. <u>仁科隆史</u>, Interleukin-11 産生線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の時空間的理解, 2024 年度「先進ゲノム支援」拡大班会議, 横浜, 2024. 12 5. <u>Nishina T</u>, Ohmuraya M, Kumagai Y, Suzuki Y, Seki T, Yamazaki S, Mikami T, Nakano H, Understanding the Diverse Roles of Inflammatory Fibroblasts in Colorectal Cancer and Colitis, THE 4TH CELL DEATH COLLOQUIUM, Kyoto, 2025. 1
	【その他特筆事項】 特になし

研究課題		ストレス応答キナーゼ MK2 を介した Ser リン酸化型 EphA2 の制御機構
研究代表者	所属・職名・氏名	富山大学・助教・周 越
研究分担者	所属・職名・氏名	富山大学・教授・櫻井 宏明
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野 聖二
【研究目的】	受容体型チロシンキナーゼ EphA2 は様々な腫瘍にて高発現し、がんの悪性化進展に関わる。当研究室では、成長因子によって活性化した ERK の下流キナーゼ RSK が EphA2 Ser-897 をリン酸化することで、がん細胞の遊走を促すことを報告した。一方、がん微小環境では、細胞内ストレスが惹起されており、この時にストレス応答キナーゼ p38 およびその下流キナーゼ MK2 が活性化する。最近、我々は抗がん剤などによる細胞内ストレスが ERK 経路とは独立して p38-MK2 経路を介して RSK-EphA2 経路を制御することを報告した。がん細胞においては発がん遺伝子産物により ERK を介して EphA2 がリン酸化されるが、このリン酸化への p38-MK2 経路の寄与は不明であった。そこで、本研究では ERK によって EphA2 Ser-897 が恒常的にリン酸化状態にある EML4-ALK 肺がん細胞を用いて、EphA2 リン酸化における p38 および MK2 の役割を解明することを目的とした。	
【研究内容・成果】	3 種類の EML4-ALK 肺がん細胞 H3122、H2228、A925L において EphA2 Ser-897 リン酸化が誘導されており、そのリン酸化は ALK 阻害剤クリゾチニブによって抑制された。また、ERK 阻害剤や RSK 阻害剤でもそのリン酸化が抑制されたため、EphA2 のリン酸化は ERK-RSK 経路に依存することがわかった。これらの細胞に対し、p38 阻害剤を作用させても RSK および EphA2 のリン酸化は変化しなかったが、MK2 阻害剤でいずれのリン酸化も部分的に抑制された。また、HEK293 細胞を用いた過剰発現系において、EML4-ALK 単独よりも、活性型 MK2 を共に発現させた細胞において、より強い RSK-EphA2 経路の活性化が認められた。以上のことから、ERK の活性化が誘導されている EML4-ALK 肺がん細胞では、p38 に依存せずに MK2 が部分的に RSK-EphA2 経路を制御することがわかった。 次に細胞遊走における MK2-RSK-EphA2 経路の寄与について検討した。A925L 細胞は上皮性を有しており、細胞遊走能は低い。一方、この細胞に対してクリゾチニブを作用させることで耐性化した細胞株 A925L-CR は上皮間葉転換により細胞遊走が亢進している。CR 細胞においても MK2 が部分的に RSK-EphA2 経路を制御したため、この細胞を用いて細胞遊走を検討した。まずは EphA2 の寄与を検討した。EphA2 阻害剤 ALW-II-41-27 (ALW) は EphA2 のセリンリン酸化も抑制することが知られている。CR 細胞に ALW を作用させたところ、EphA2 のリン酸化が抑制され、細胞遊走が抑制された。また、RSK 阻害剤でも同様の結果が得られた。以上のことから、RSK-EphA2 経路が CR 細胞の遊走を制御することがわかった。次に p38 と MK2 の寄与を検討した。細胞遊走は p38 阻害剤によって抑制されなかったが、MK2 阻害剤によって抑制された。この結果から、CR 細胞の遊走は p38 に依存せずに MK2-RSK-EphA2 経路によって制御されることがわかった。以上の結果により、EML4-ALK 細胞において、ERK だけでなく、MK2 も RSK を介して、EphA2 Ser-897 リン酸化に関わっており、この MK2-RSK-EphA2 経路は細胞遊走を制御することが明らかとなった。	
【成果等】	 図1. EML4-ALKはMK2を介して RSK-EphA2経路を制御する	
	【主な論文発表】 Zhang F.[#], Zhou Y.[#], Hamada N., Tanaka A., Yokoyama S., Yano S., Matsumoto K., Mano H., and Sakurai H.: Stress response kinase MK2 induces non-canonical activation of EphA2 in <i>EML4-ALK</i> lung cancer cells. Biol. Pharm. Bull., 48: 172-176, 2025. ([#]: co-first)	
	【学会発表】 1. 周越、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明, RSK-EphA2 経路の非定型的活性化におけるストレス応答キナーゼ p38 と MK2 の寄与, 第 28 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2. 周越、大木良太、田中章裕、浜田成、宋磊鑫、高島惇誌、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明, MK2-RSK 経路に依存した EphA2 の Ser-897 リン酸化を介した細胞遊走, 第 33 回日本がん転移学会学術集会・総会. 3. 周越、大木良太、田中章裕、浜田成、宋磊鑫、高島惇誌、横山悟、矢野聖二、櫻井宏明, MK2-RSK-EphA2 経路を介したがん細胞の遊走制御, 第 83 回日本癌学会学術総会. 【その他特筆事項】 なし	

研究課題		がん微小環境ネットワークを標的としたがんのポリクローナル転移を抑制する新規治療法の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	東京科学大学・教授・渡部 徹郎
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	東京科学大学・准教授・井上 カタジナアンナ
	所属・職名・氏名	東京科学大学・助教・小林 美穂
	所属・職名・氏名	東京科学大学・助教・高橋 和樹
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島 正伸
【研究目的】	がん細胞と血管などの間質から構成されるがん微小環境において豊富に発現している TGF-β はがん細胞の上皮間葉移行 (EMT) や血管内皮細胞の内皮観葉移行 (EndoMT) を誘導することで、がんの進展・転移を亢進するが、これらの現象を観察するモデルが存在しないため、がん微小環境を対象とした包括的な理解や新規治療法の開発を困難となっている。そこで本研究では、(1) がん細胞が血管内侵入するプロセスをライブイメージングできる「3次元がん微小環境モデル」を用いて、がん細胞の血管内侵入における EndoMT の役割を解明し、(2) そのモデルを用いて転移するがん細胞の多様性の動態を解明し、(3) 研究代表者が開発した新規 TGF-β 阻害剤を用いてがん細胞の血管内侵入を標的とした新規治療法の開発を目指す。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	(1) がん細胞の血管内侵入における EndoMT の役割の解明 代表者は大島教授 (受入担当教員) ならびに松永行子教授 (東京大学) とともに、悪性の高い消化器がん細胞 (AKTP) と低いがん細胞 (AP など) のクラスターと 3 次元微小血管から構成される 3 次元微小環境モデルを構築し、転移能が高いがん細胞クラスターが 3 次元微小血管への侵入を観察することに成功した (論文 3)。また、このがん細胞クラスターの血管内侵入において、がん細胞と血管内皮細胞が TGF-β ファミリー分子 (TGF-β やアクチビン) を分泌し、がん細胞の EMT ならびに血管内皮細胞の EndoMT が誘導されることを見出した (図)。 (2) がん細胞の血管内侵入におけるがん細胞多様性の役割の解明 代表者は過去にがん細胞が増殖や運動・転移能という点で多様性を持つことを報告した。今年度は、細胞周期を可視化できる口腔がん細胞 (SAS-Fucci 細胞) と 3 次元がん微小環境 The diagram illustrates the role of TGF-β in the tumor microenvironment. It shows cancer cells (AKTP) and cancer-associated fibroblasts (CAF) secreting TGF-β and activin, which promotes EndoMT in endothelial cells, leading to cancer cell invasion and distant metastasis. A new TGF-β inhibitor is shown to suppress cancer progression. 図：がん微小環境における TGF-β は、がん細胞の EMT を誘導するとともに、腫瘍血管内皮細胞の EndoMT を誘導することで、血管のバリア機能を低下させ、がん細胞の血管内侵入を亢進する。今年度は、EndoMT が誘導された内皮細胞が TGF-β やそのファミリー因子のアクチビンを分泌することで、がん細胞の血管内侵入を亢進することを報告した (成果論文 3)。また、代表者が開発した新規 TGF-β 阻害剤が、がん微小環境ネットワークを遮断することで、がん進展を抑制することを報告した (成果論文 2)。	

	小環境モデルを用いることで、増殖をしていないがん細胞が血管内により効率的に侵入することを見出し、がん転移におけるがん多様性の存在を可視化した。 (3) がん細胞の血管内侵入を標的とした新規治療法の開発 がん微小環境ネットワークを制御する TGF-β シグナルの阻害ががん進展に及ぼす影響を個体レベルで検討するために、代表者が開発した TGF-β 阻害 Fc 融合タンパク質を口腔がん細胞を皮下移植したマウス担癌モデルに投与したところ、腫瘍形成が顕著に抑制された（図：成果論文2）。その機序を検討するために腫瘍組織の血管新生を検討したところ、TGF-β シグナルの阻害により、腫瘍血管新生が抑制されていた。また、口腔がん細胞において TGF-β シグナルにより発現が上昇し、頭頸部がん患者の予後不良因子を探索したところ、血管・リンパ管新生制御因子を複数同定した。今後これらの候補因子ががん細胞の血管侵入に関与していくか検討していく予定である。
【成 果 等】	【主な論文発表】（本研究課題に関連が深いもの） 1. Watanabe-Takano H, Kato K, Oguri-Nakamura E, Ishii T, Kobayashi K, Murata T, Tsujikawa K, Miyata T, Kubota Y, Hanada Y, Nishiyama K, Watabe T, Fässler R, Ishii H, Mochizuki N, *Fukuhara S. Endothelial cells regulate alveolar morphogenesis by constructing basement membranes acting as a scaffold for myofibroblasts. <i>Nature Communications</i>. 2024;15(1):1622. doi: 10.1038/s41467-024-45910-y. 2. Ibi H, Takahashi K, Harada H, Watabe T, *Podyma-Inoue KA. Transforming growth factor-β signals promote progression of squamous cell carcinoma by inducing epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis. <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i>. 2024;714:149965. doi: 10.1016/j.bbrc.2024.149965. 3. Ikeda Y, Kondo M, Suehiro J, Oshima H, Kok SY, Takahashi K, Pauty J, Wang D, Sakurai H, Watabe T, *Oshima M, *Matsunaga YT. A tumor-microvessel on-a-chip reveals a mechanism for cancer cell cluster intravasation. <i>iScience</i> in press 【学会発表】（本研究課題に関連が深いもの） 1. 渡部徹郎. Targeting tumor microenvironment networks for developing novel therapeutic strategies. 第83回日本癌学会学術総会（福岡）（シンポジウム） 2024/09/19-21 2. 渡部徹郎. がん微小環境ネットワークを標的とした新規治療薬の開発. 第70回日本病理学会秋期特別総会（東京）（特別講演） 2024/11/08 3. 渡部徹郎. がん微小環境ネットワークを標的とした新規治療薬の開発. Kyushu Vascular Biology Meeting 2024（福岡）（特別講演） 2024/11/09 4. Tetsuro Watabe, Kazuki Takahashi, Miho Kobayashi, Tatsuhiko Anzai, Fumiko Itoh, Jihwan Park, Kunihiro Takahashi, Yukiko T Matsunaga, Yasuhiro Yoshimatsu, Katarzyna A Podyma-Inoue. Identification of novel markers in the subsets of endothelial cells undergoing partial endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in tumor microenvironment. 13th AACR-JCA Joint Conference. (Maui, USA)（ポスター） 2025/02/01-05. 【その他特筆事項】 特にありません。

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		初期段階のがん発生を抑制する薬剤の探索
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・助教・谷村信行
研究分担者 (適宜、行を追加し てください。)	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・特定研究員・三野彰久
	所属・職名・氏名	京都大学大学院医学研究科・教授・藤田恭之
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	現在の主要ながんの診断や治療は、がん原性の変異が蓄積し、がん化が進展したものを対象としている。一方、がん発生の初期段階において、変異細胞の悪性化を阻害することはがん治療にとって重要であると考えられる。しかし、初期段階のがん細胞を対象とした研究は十分に進んではない。そこで本研究では、がん発生の初期段階を培養細胞系を用いて再現し、そこで発現上昇する膜貫通型糖タンパク質 CD44v6 に着目した。CD44v6 は、がんの進展に関与することが示唆されているため、CD44v6 の発現を減少させる分子機構を解明し、初期のがん細胞の悪性化を抑制する方法を開発することを目的とする。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本研究では、がん発生の極めて初期の段階を培養細胞系を用いて再現するため、がん原性タンパク質 RasV12 を発現するマウス由来乳腺上皮細胞を用いた。当研究室によるこれまでの結果から、この細胞では RasV12 発現依存的に、がん幹細胞マーカーである膜貫通型糖タンパク質 CD44 の発現が上昇することがわかっている。CD44 にはいくつかの variant が存在するが、がんの転移に関与することが知られている CD44 variant 6 (CD44v6) に着目した。実際、CD44v6 は、RasV12 を発現するマウス乳腺上皮細胞での発現上昇が観察され、さらに、後藤典子教授にご提供いただいた乳がんモデルマウス (MMTV-ErbB2 マウス) の乳腺上皮においても発現が上昇することが示唆された。以上のことから、CD44v6 の発現を減少させることにより、初期のがん細胞の悪性化を抑制することができると考えられたため、上述の RasV12 を発現するマウス乳腺上皮細胞を用いて、CD44v6 の発現を減少させる薬剤を探索するスクリーニングを行った。その結果、CD44v6 発現量を減少させるいくつかの候補薬剤を挙げる事ができた。次に、これらの薬剤を、臍がんモデルマウスの臍臓から単離した腺房細胞の <i>ex vivo</i> 培養系を用いて評価した。この培養系は、臍がん発生の初期段階である腺房-導管異形成 (acinar-to-ductal metaplasia: ADM) を再現できると考えられている。その結果、オピオイド受容体のアゴニストである Loperamide が ADM の形成を抑制することを確認した (令和 4、5 年度共同研究)。しかし、他のオピオイド受容体アゴニストが効果を示さなかったため、Loperamide の構造に注目し、Loperamide の構造類自体ライブラリーを検討した。その結果、より効果が強いと期待される構造類自体を見出した (図 1、#12)。今後は、この薬剤の作用機序を検証するとともに、薬剤効果の普遍性を検討するため、乳がん幹細胞培養系、乳がん組織由来のオルガノイドや乳がんモデルマウスを用いて検証していく。 最後になりましたが、がん進展制御研究所からのご支援と共同研究を行っていただいた分子病態研究分野の後藤典子教授に深く感謝致します。	
【成果等】	【主な論文発表】	Gupta, P., Kayal, S., Tanimura, N., Pothapragada, S.P., Senapati, H.K., Devendran, P., Fujita, Y., Bi, D., and Das, T. (2025). Mechanical imbalance between normal and transformed cells drives epithelial homeostasis through cell competition. eLife: https://doi.org/10.7554/eLife.100967.1
	【学会発表】	
	【その他特筆事項】	

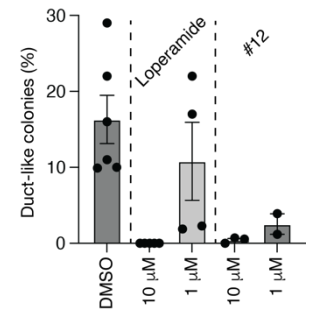


図 1. 薬剤の ADM 抑制効果

令和6年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		アミノ酸代謝変化による幹細胞機能制御とがん維持機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学・准教授・服部 鮎奈
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	京都大学・教授・伊藤 貴浩
	所属・職名・氏名	京都大学・助教・松浦 顕教
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	本研究では、加齢にともなう分岐鎖アミノ酸代謝の変化が、がん幹細胞の発生と維持に与える作用の分子メカニズムの解明を目的として研究を進めた。また、同時にアミノ酸代謝がどのようにしてがん幹細胞の未分化性および増殖を維持するかを検討した。	
【研究内容・成果 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	本年度は、加齢にともなう分岐鎖アミノ酸(BCAA)代謝の変化を検出するマウスモデルの作出と、BCAA代謝によるがん幹細胞制御の分子機構の解析を行なった。 第一に、BCAA代謝変化を検出するマウスモデルとして、FRET現象を利用したバイオセンサー型プローブ遺伝子を発現するトランスジェニック(TG)マウスを作出し、BCAA細胞内濃度をリアルタイムに可視化するシステムを構築していた。このマウスと、BCAA代謝酵素であるBcat1およびBcat2の遺伝子ノックアウトマウスとの交配を進めた。また、下流の分解酵素であるBckdhhbのコンディショナルノックアウトの作出を進めた。次年度は、得られたマウスモデルを用いて造血幹細胞およびがん幹細胞の解析を行う。 第二に、BCAA代謝によるがん幹細胞制御のメカニズムを解析するため、軟骨肉腫におけるBCAT1の役割を解析した。まず、BCAT1は軟骨肉腫細胞においてBCAAとα-KGを産生し、その増殖に必須であることをin vitroおよびin vivoの解析を用いて明らかにした。BCAT1はα-KGの産生を介してオンコメタボライトである2-HG量の亢進を担うこと、2-HGはKDM4を介してエピジェネティックにSOX9の発現を制御することを示した。SOX9は軟骨組織の分化を制御するマスターレギュレーターであるため、BCAT1機能阻害を行なった細胞では、SOX9の発現が上昇しがん細胞が分化することが明らかになった。また、BCAT1は酵素活性に依存しない形での副次機能(ムーンライティング機能)を有することを発見した。すなわち、BCAT1は自身の持つシステイン残基を用いて分裂時におけるROS除去を担うことで軟骨肉腫細胞の分裂を促進していた。BCAT1機能阻害を行うと細胞内ROS濃度が上昇すること、この上昇はROSスカベンジャーであるNAC処理によって抑制されることを見出した。以上から、BCAT1はがん細胞において、酵素活性により未分化性の維持を制御するとともに、ROS除去を介した分裂促進に寄与することが明らかになった。本成果は現在論文投稿中である。	
【成果等】	【主な論文発表】 1.Matsuura K et al., Activated branched-chain amino acid metabolism regulates the aggressive nature in human triple negative breast cancer. <i>Submitted</i>. 2.Yamamoto, Y., Ito, T., Hattori, A.* et al. Enzymatic and non-enzymatic functions of BCAT1 confer malignant properties in human chondrosarcoma. <i>In preparation</i>	
	【学会発表】 1. 服部 鮎奈. 「がん組織におけるアミノ酸代謝の役割」第39回アミノ酸セミナー. 発表予定 2025年5月東京(招待講演) 2. 服部 鮎奈. 「がん代謝におけるムーンライティングプロテインの役割」第11回がん代謝研究会. 発表予定 2025年5月草津(招待講演) 3. 服部 鮎奈. 「アミノ酸代謝変化を介したがん悪性化機構の理解。」第76回細胞生物学会. 2024年7月つくば(招待講演)	
	【その他特筆事項】	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		分子標的薬治療後の腫瘍細胞と腫瘍間質細胞の 1 細胞解析
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域・教授・内藤尚道
研究分担者 (適宜、行を追加し てください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	腫瘍は腫瘍実質細胞と間質細胞から構成されている。近年 1 細胞遺伝子発現解析の解析技術の向上により、数万細胞の単位で 1 細胞遺伝子発現解析が可能になり、これまで均一とされていた細胞集団の細胞多様性が明らかになりつつあるが、未だにその意義は十分解明されていない。本研究では腫瘍実質細胞と、血管内皮細胞や腫瘍内血球細胞を含めた腫瘍間質細胞の、シングルセル解析を実施して、分子標的薬治療後の腫瘍でどのような変化が生じるか明らかにする。とくに血管内皮細胞の細胞多様性に着目して解析をすることを目的とした。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	ヒト肺組織の血管内皮細胞の解析と並行して、マウス腫瘍モデルで解析を行った。 GFP マウスに腫瘍を移植し、GFP+CD31+CD45-血管内皮細胞と GFP+間質細胞を分離して、シングルセル解析を行った。腫瘍血管内皮細胞は、大きくは動脈様血管内皮細胞と毛細血管内皮細胞+静脈様血管内皮細胞にわかれ、後者には Tip 細胞や増殖活性の高い血管内皮細胞が含まれた。 GFP+間質細胞は血球細胞と血管内皮細胞をふくむ複数の細胞集団に分類できた。GFP+間質細胞のデータで血管内皮細胞の解析を行うと、典型的な血管内皮細胞の遺伝子発現は確認できたが、細胞多様性の解析は困難であった。そこで、GFP+血管内皮細胞と GFP+間質細胞のデータを統合して解析すると、血管内皮細胞の細胞多様性が確認でき、GFP+細胞のみで解析した場合に比べ約 20 倍の細胞間相互作用シグナルが検出できた。ヒトで同様の実験を行い、血管内皮細胞の細胞多様性を明らかにし、さらに化学療法が行われたサンプルで、これらの細胞多様性と細胞間相互作用がどのように変化するか明らかにする計画である。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし	
	【学会発表】 なし	
	【その他特筆事項】 なし	

令和 6 年度 金沢大学がん進展制御研究所 共同研究報告書

研究課題		ミトコンドリアと小胞体の接触部位解離分子はがん治療標的分子となりうるか？
研究代表者	所属・職名・氏名	東北大学生命科学研究科・助教・笠原敦子
研究分担者 (適宜、行を追加してください。)	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
	所属・職名・氏名	
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	ミトコンドリアは他のオルガネラとは融合しないが、10-80nm で近づいた接触部位を形成し、その部位を通じて様々なオルガネラと連携を図り、複雑な生命現象を制御している。小胞体 (ER)との接触部位は中でも最も研究されている部位の 1 つで、マウスモデルでは、肝臓疾患の進展や糖尿病、老化に関与することが示され、また、申請者は、グリオーマ細胞の造腫瘍性維持や細胞傷害性 T リンパ球による殺傷効率に関わることを見出している。そこで、本研究では、がんの悪性進展に関わる、ミトコンドリアと小胞体の接触部位の新規制御因子の機能解析と、その分子制御メカニズムを明らかにし、新規がん細胞治療標的として同定することを目指している。	
【研究内容・成果】 (図表・説明図等を入れていただいても結構です。)	Mitofusin2 (MFN2)は、ミトコンドリア外膜融合因子でかつ、ミトコンドリアと ER を繋ぐ因子である。これまでに、ミトコンドリアと他のオルガネラとの接触部位である mitochondria-associated membrane 画分から、MFN2 の新規相互作用因子として、膜輸送に関わる低分子量 GTPase である RAB35 を同定した。スプリット GFP を利用したミトコンドリア-ER の接触部位を検出するプローブを用いて接触部位形成度合いを検出すると、RAB35 欠損細胞では、接触部位が増加しており、電子顕微鏡による詳細なオルガネラの観察でも同様であった。さらに、RAB35 欠損細胞で MFN2 を欠損させると、増加していた接触部位が減少するため、RAB35 は MFN2 のミトコンドリアと ER を繋ぐ機能を阻害する因子であることが強く示唆された。 ミトコンドリアと ER の接触部位は、ES 細胞ではほとんど形成されていないが、心筋細胞へ分化させると顕著に形成される。そこで、ES 細胞でミトコンドリアと小胞体を人工的に近づけると、幹細胞性マーカーが低下し、同様に、ミトコンドリアと小胞体の接触部位阻害因子である RAB35 の欠損で、幹細胞性マーカーが低下することが観察された。 細胞周期間期の G1 から S 期への移行は、幹細胞性維持や細胞老化において重要である。G1 期が伸び、G0 期に移行すると、細胞は未分化性を失い、細胞分裂を停止する。ミトコンドリアと小胞体の接触部位が正常に解離することが、G1-S 期への移行に必要なのではないかと考え、RAB35 欠損細胞で細胞周期間期について精査したところ、G1 期の細胞が増加していた。ES 細胞で RAB35 を欠損させると、幹細胞性マーカーが低下し、ミトコンドリアと小胞体を人工的に近づけると、G1 期の細胞が増加することを見出した。 オルガネラ接触部位形成が小胞輸送に関わる RAB タンパク質によって制御され、その結果、細胞周期間期の調節により、幹細胞の細胞運命を司っていることを明らかにすることができた。この新規 MFN2-RAB35 分子メカニズムを、グリオーマ細胞や AML 細胞など、がん細胞の中でも幹細胞様性質によってその造腫瘍性が維持されているがん種の新規治療標的として評価していけたらと考えている。	
【成果等】	【主な論文発表】 なし。	
	【学会発表】 「Rab35 によるミトコンドリアと小胞体の接触部位の制御メカニズム」日本生化学会 3S05a オルガネラヒモロジー～マッチングが規定するオルガネラの弦～ 2024 年 11 月 8 日、パシフィコ横浜	
	【その他特筆事項】 なし。	