

先進がんモデル共同研究センター

## Division of Genetics

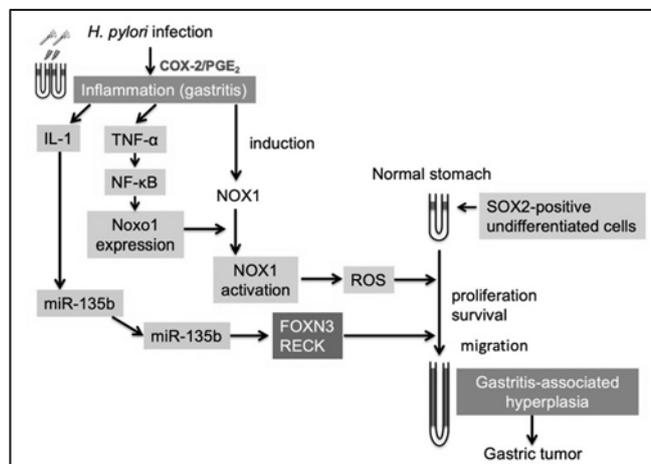
### 腫瘍遺伝学研究分野

Professor	Masanobu Oshima 大島 正伸
Associate Professor	Hiroko Oshima 大島 浩子
Assistant Professor	Mizuho Nakayama 中山 瑞穂, Dong Wang (WPI)
Graduate Student	Sau Yee Kok (D4) , Zachary Wei Ern Young (D4) Daisuke Yamamoto 山本 大輔, Toshikatu Tsuji 辻 敏克 (D4) Atsuya Morita 森田 敦也 (D1)
Technical Assistant	Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子

### 【 Abstract 】

Inflammatory microenvironment plays an important role in CRC development. It has been suggested that Stat3 is one of the candidate molecules that link inflammation and cancer. To examine the role of Stat3 in intestinal epithelial homeostasis and tumorigenesis, we generated *villin-CreER Stat3<sup>lox/lox</sup>* mice and crossed with *Apc<sup>Δ716</sup>* mice. Notably, Stat3 is indispensable for regeneration of damaged intestinal mucosa. However, Stat3 is not required for tumorigenesis if Wnt signaling is activated. Mechanistically, we found that Stat3 induces *Itga5/6* expression, which is required for survival of normal stem cells through FAK activation (Oshima et al, **FASEB J**, 2019).

On the other hand, in the stomach, *Helicobacter pylori* infection has shown to be an important risk factor for cancer development. Using inflammation-associated gastric cancer mouse model, we investigated the role of cytokines, IL-1 and TNF, in tumorigenesis. IL-1 induces miR-135b expression in gastric epithelial cells, resulting in downregulation of possible tumor suppressor FOXN and RECK, which promotes epithelial proliferation (Han et al, **Gastroenterology**, 2019). TNF- $\alpha$  activates NF- $\kappa$ B, leading to induction of Noxo1 expression and activation of NOX1 complex, which further induces ROS production. ROS signaling in gastric mucosa increases the number of SOX-2-expressing stem cell populations (Echizen et al, **Oncogene**, 2019). Based on these findings, we think that these cytokine-induced pathways will be therapeutic targets against gastric cancer development.



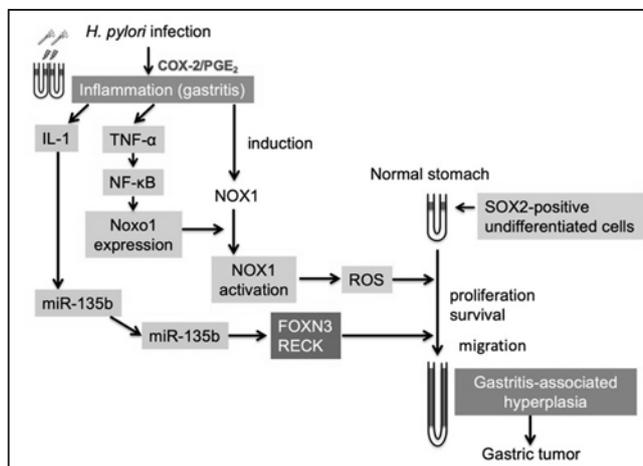
## <2019年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

### 1. 腸管上皮恒常性および腫瘍化における Stat3 の役割

炎症で活性化する転写因子 Stat3 の, 腸管粘膜恒常性および発がんにおける役割を遺伝学的に解析した。Stat3 欠損マウスの腸上皮細胞は, 生存能力が顕著に低下し, 粘膜傷害からの再生や, オルガノイド形成が抑制された。一方で, APC 変異や Wnt リガンド刺激により Wnt シグナルが亢進した腫瘍上皮細胞では, Stat3 が欠損してもオルガノイドは形成され, 腸管腫瘍の抑制は見られないことを明らかにした (Oshima et al, **FASEB J**, 2019)。以上の結果から, Stat3 阻害薬の抗がん作用は Wnt 活性の影響を受ける可能性が考えられた。

### 2. 炎症反応による胃がん発生機構の研究

ヒト胃粘膜では, ピロリ菌感染による慢性炎症反応が発がん促進に作用する。炎症依存的な胃がんモデル (Gan マウス) を用いた解析により, IL-1 が, 胃粘膜上皮の miR-135b 発現を誘導し, FOXN3 や RECK などの標的分子の発現を抑制して胃粘膜上皮の増殖を亢進することを明らかにした (Han et al, **Gastroenterology**, 2019)。また, TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B 経路が NOX1 複合体を活性化し, それに依存して活性酸素 (ROS) 産生を誘導し, 未分化上皮細胞の増殖を亢進することを示した (Echizen et al, **Oncogene**, 2019)。これらの結果は, 炎症依存的な胃がん発生の新しい分子機構として考えられた。



### 3. p53 遺伝子型に依存した大腸がん悪性化機構の研究

p53 は大腸がんの約半数で変異が認められる重要ながん抑制遺伝子である。これまでの研究により, アミノ酸置換によるミスセンス (gain-of-function, GOF) 型の変異 p53 が, 新規に獲得した機能により腸管腫瘍の粘膜下浸潤を誘導することを明らかにした (Nakayama et al, **Oncogene**, 2017)。さらに, データベース解析により, GOF 変異を持つヒト大腸がんのほとんどは LOH により野生型 p53 遺伝子を欠損していることが明らかとなった。そこで, マウス腸管腫瘍由来オルガノイドを用いた解析を実施した結果, 野生型 p53 は, 変異型 p53 の細胞内局在を制御し, がん細胞の生存や dormant な状態からの増殖能力を亢進して転移性の獲得に関与する結果を得た (論文投稿中)。

### 4. 大腸がんポリクローナル転移機構の研究

マウス腸管腫瘍から樹立した高転移性オルガノイド (AKTP 細胞) と非転移性オルガノイド (AP 細胞) を用いて, マウス脾臓移植による肝転移実験を行なった結果, 悪性化したがん細胞は間質増生を誘導して生存に有利な微小環境を形成することを明らかにした。今後, 微小環境形成の分子機構解明を目指して研究を推進する。

## 【研究業績】

### < 発表論文 >

#### 原著論文

(研究室主体)

1. Oshima H, Kok SY, Nakayama M, Murakami K, Voon DC, Kimura T, and Oshima M. Stat3 is indispensable for damage-induced crypt regeneration but not for Wnt-driven intestinal tumorigenesis. **FASEB J**, 33: 1873-1886, 2019.
2. Han TS, Voon DC, Oshima H, Nakayama M, Echizen K, Sakai E, Yong WE, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Ock CY, Jenkins BJ, Kim SJ, Yang HK, and Oshima M. Interleukin 1 upregulates microRNA-135b to promote inflammation-associated gastric carcinogenesis in mice. **Gastroenterology**, 156: 1140-1155, 2019.
3. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, and Oshima M. NF- $\kappa$ B activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. **Oncogene**, 38: 4250-4263, 2019.
4. Takeda H, Kataoka S, Nakayama M, Ali MAE, Oshima H, Yamamoto D, Park JW, Takegami Y, An T, Jenkins NA, Copeland NG, and Oshima M. CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in intestinal tumor organoids provides functional validation for colorectal cancer driver genes. **Proc Natl Acad Sci USA**, 116: 15635-15644, 2019.
5. Nakayama M, and Oshima M. p53 mutation in colon cancer. **J Mol Cell Biol**, 11: 267-276, 2019. [Review]

(共同研究)

1. Jangphattananont N, Sato h, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, and Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF from its precursor form in developing and repairing the stomach. **Int J Mol Sci**, 20: E2955, 2019.
2. Cao D, Wu Y, Jia Z, Zhao D, Zhang Y, Zhou T, Wu M, Zhang H, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, and Cao X. 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid inhibited mitochondrial energy metabolism and gastric carcinogenesis through methylation regulated TLR2 signaling pathway. 2018 Oct 26. **Carcinogenesis**, 67: 1179-1195, 2019.
3. Buzzelli JN, O'Connor LO, Scurr M, Catubig A, Ng G, Oshima M, Oshima H, Giraud AS, Sutton P, Judd LJ, and Menheniott TR. Overexpression of IL-11 promotes premalignant gastric epithelial hyperplasia independently of Helicobacter pylori infection or JAK-STAT driver mutations. **Am J Phys Gastrointest Liver Physiol**, 316: G251-G262, 2019.
4. Chang CY, Jeon SB, Yoon HJ, Choi BK, Kim SS, Oshima M, Park EJ. Glial TLR2-driven innate immune responses and CD8<sup>+</sup> T cell activation against brain tumor. **Glia**, 67: 1179-1195, 2019.
5. Suzuki K, Sentani K, Tanaka H, Yano T, Suzuki K, Oshima M, Yasui W, Tamura A, and

Tsukita S. Deficiency of stomach-type claudin-18 in mice induces gastric tumor formation independent of *H. pylori* infection. **Cell Mol Gastroenterol Hepatol**, 8: 119-142, 2019.

日本語著書・総説

1. 大島正伸. がん創薬のための動物モデル. 「進化するがん創薬・第8章」清宮啓之編. (化学同人), 94-104, 2019
2. 大島浩子, 越前佳奈恵, 大島正伸. がんと自然炎症. 炎症と免疫 (先端医学社) vol. 27, 428-432, 2019.
3. 大島正伸. 大腸がん悪性化進展機構のモデル研究. **Precision Medicine** (北隆館) vol. 2, 152-156, 2019.

<学会等発表>

(国際学会・シンポジウム)

1. Oshima M. The role of inflammatory microenvironment for gastrointestinal tumorigenesis. *Tumor Microenvironment and Precision Oncology*, Joint symposium between Kanazawa Univ-CRI and Seoul National University-GCRC, Seoul (韓国), 2019年5月13日
2. Oshima M. Inflammatory transcription factors for gastric and intestinal tumorigenesis. *KSNO-NCC GCSP Joint cancer symposium*, Jeju (韓国), 2019年5月25日
3. Oshima M. Inflammation: A gastric cancer promoter, *Surgical Grand Round Lecture at Seoul National Univ Hospital (SNUH)*, Seoul, (韓国), 2019年8月21日
4. Oshima M. Biological mechanism of polyclonal metastasis of colorectal cancer. *50<sup>th</sup> Commemorative International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund*, 東京, 2019年11月13日
5. Oshima M. Multistep tumorigenesis and polyclonal metastasis of colon cancer. *24<sup>th</sup> Annual Meeting of the Korean Society of Cancer Prevention (KSCP)*, Seoul, (韓国), 2019年12月14日

(国内学会・セミナー)

1. 大島正伸. 遺伝学的アプローチによる大腸がん悪性化研究の新展開. 第1回日本遺伝学会春季分科会「遺伝学の将来を考える」, 三島, 2019年3月8日
2. Nakayama M, Sakai E, Oshima H, Tan P, Oshima M. p53-loss of heterozygosity with p53 gain-of-function mutation leads to cancer dormancy of intestinal tumors. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月26日
3. Sau Yee Kok, Oshima H, Sakai E, Nakayama M, Oshima M. Mechanism for intestinal tumor metastasis by polyclonal origins. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月26日
4. Terakado Y, Murakami K, Oshima H, Oshima M, Barker N. The role of Lgr5 as cancer stem cell in gastric cancer and regulatory mechanism. 第78回日本癌学会学術総会, 京

都, 2019年9月26日

5. Oshima H, Maeda Y, Tsuji T, Oshima M. Regulation of Foxo3a localization in gastric cancer cells. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月27日
6. Park JW, Oshima H, Nakayama M, Oshima M. A novel gene expression signature for colorectal cancer metastasis. 第78回日本癌学会学術総会, 京都, 2019年9月28日
7. 大島正伸. 大腸がん発生と悪性化機構のモデル研究. 北海道大学遺伝子病制御研究所セミナー, 札幌, 2019年11月5日

#### <外部資金>

1. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん細胞の多段階悪性化が制御する微小環境形成ネットワーク機構の解明と新規予防治療戦略の確立」 16,830 千円
2. 基盤研究 (A) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん自然転移・再発モデルの開発による悪性化進展機構の研究」 8,600 千円
3. 挑戦的研究 (萌芽) [研究代表者: 大島 正伸]  
「TGF-beta による大腸がん抑制作用から悪性化誘導へのスイッチ制御機構の解明」 2,500 千円
4. 基盤研究 (B) [研究代表者 大島 浩子]  
「炎症性・線維性微小環境による大腸がん転移促進機構の解明」 5,000 千円
5. 基盤研究 (C) [研究代表者 中山 瑞穂]  
「大腸がん転移・再発における p53 遺伝子 LOH と不均一性獲得に関する個体モデル解析」 1,200 千円

#### <その他>

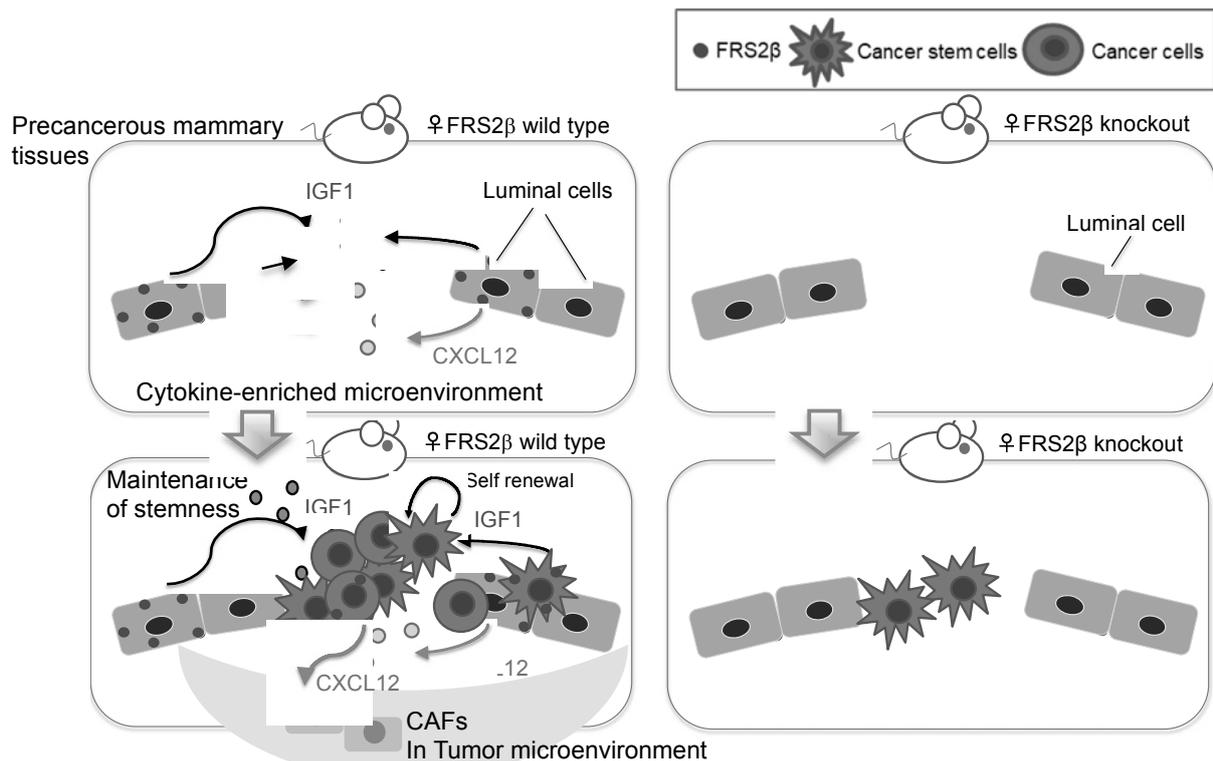
文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会開催 (実行委員長: 大島正伸): 2019年9月5~7日, 長野県蓼科 (全国から大学院生 (修士・博士課程)、若手研究者約95名参加)

## Division of Cancer Cell Biology 分子病態研究分野

Professor	Noriko Gotoh 後藤 典子
Assistant Professor	Tatsunori Nishimura 西村 建徳 Yasuto Takeuchi 竹内 康人 (2019,12~)
Project Assistant Professor	Takahiko Murayama 村山 貴彦
Graduate Student	Reheman Yiming (D3), Xiaoxi Chen (D3), Li Mengjiao (D2), SARENQIQIGE (D1), Wang Yuming (D1) Rojas Nichole (M2) Lee Jin (M1)
Assistant Staff	Kiyoko Take 武 紀代子

### 【 Abstract 】

It remains largely unknown how the precancerous tissue microenvironment contributes to tumor onset, and there is still no effective preventive strategy for breast cancer. We discovered that FRS2 $\beta$  plays critical roles in cytokine production by mammary epithelial cells, and that the resultant cytokine-rich precancerous microenvironment is essential for tumor onset. Deficiency of FRS2 $\beta$  suppressed mammary tumorigenesis and reduced tumor stroma in mouse mammary tumor virus (MMTV)-ErbB2 mice. Wild-type, but not FRS2 $\beta$ -deficient precancerous mammary tissues, allowed tumorigenesis by xenografted wild-type FRS2 $\beta$  tumor cells. Levels of insulin-like growth factor (IGF) 1 and CXC chemokine ligand (CXCL) 12 were lower in FRS2 $\beta$ -deficient precancerous epithelial cells, in which activation of AKT and the transcription factor nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) was reduced. Treatment with inhibitors of these cytokines in wild-type FRS2 $\beta$  precancerous mice greatly diminished the ability of the mammary tissues to support tumor growth. In human breast cancer tissues, high expression of FRS2 $\beta$  in tumor cells was associated with more stroma and poorer prognosis. Thus, FRS2 $\beta$  appears to stimulate the AKT–NF $\kappa$ B axis to promote cytokine production in precancerous epithelial cells and tumor cells. Mammary epithelial cells triggered by FRS2 $\beta$  to produce cytokines generate a precancerous microenvironment that could be targeted to prevent cancer.



乳がん発症には、乳腺ルミナル細胞内で、アダプターFRS2beta を介して産生されるサイトカイン豊富な微小環境が必須である。

前がん状態の乳腺ルミナル細胞は、細胞内アダプター分子 FRS2beta 依存的に IGF1 や CXCL12 などのサイトカインを産生し、サイトカイン豊富な乳腺微小環境を構築している。MMTV-neu 乳がんモデルマウスの乳腺内では、がん幹細胞の自己複製や、がん間質細胞 Cancer Associated Fibroblasts (CAFs)の遊走のために、これらのサイトカインが使われ、腫瘍細胞が増殖しやすい微小環境が整えられている。FRS2beta ノックアウトマウスの乳腺ルミナル細胞は、サイトカインが産生されず、がん幹細胞が出現しても、増殖しない。FRS2beta は、がん発症を予防する標的となる。

### <2019 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

乳がん注目して新たなマウスがんモデルの作出と，患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC)のスフェロイド培養技術を工夫し，Patient-derived xenograft (PDX)モデルの構築とそのカタログ化を行っている。今後乳がん PDC と PDX モデルを拡充し，世界的なコンソーシアムの形成に貢献することを目指している。

1) MCM10 は複製ストレスへの迅速な対処を促すことで乳がん幹細胞を維持する乳がんにおいてがん幹細胞の維持に寄与している分子を同定するため、PDC を用いて RNA-seq を行った。詳細な解析の結果、mini-chromosome maintenance protein (MCM) 10 ががん幹細胞維持に重要であることがわかった。さらにがん幹細胞では、分化の進んだがん細胞に比べて DNA 複製ストレスのレベルが高いことが明らかとなり、複製フォーク停止時のレスキューにおいて MCM10 が重要な役割を担っていることを示す結果も得られた。

## 【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Tominaga K, Minato H, Murayama T, Sasahara A, Nishimura T, Kiyokawa E, Kanauchi H, Shimizu S, Sato A, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Ogawa T, Ishii H, Mori M, Akashi K, Okamoto K, Tanabe M, Tada K, Tojo A, Gotoh N.: Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 116(2), 625-630, 2019.
2. Nishimura T, Nakata A, Chen X, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S-I, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, Gotoh N.: Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*, 38(14), 2464-2481, 2019.

総説

1. Murayama T, Gotoh N.: Drug resistant mechanisms of cancer stem-like cells and their therapeutic potential as drug targets. *Cancer Drug Resist*, 2, 457-470, 2019.
2. Murayama T, Gotoh N.: Patient-derived xenograft models of breast cancer and their application. *Cells*, 8(6), E621, 2019.
3. Gotoh N.: Elucidation of breast cancer tissue diversity by comprehensive analysis of minimum unit omics. *Impact*, 2019(3), 30-32, 2019.
4. 西村建徳、東條有伸、後藤典子. 「MTHFD2 の酵素活性阻害によるがん治療」 *BIO Clinica* (北隆館), vol. 35(1): p88-91.2020.
5. 西村建徳、東條有伸、後藤典子. 「MTHFD2 の酵素活性阻害によるがん治療」 *Medical Science Digest* (ニューサイエンス社), vol. 45(9): 2019.
6. 村山貴彦、後藤典子. 「がん関連線維芽細胞によるがん幹細胞制御機構」 *Cytometry Research*, vol. 29(1): p1-6, 2019.
7. 村山貴彦、後藤典子. 「乳癌などのオルガノイド培養」 *実験医学別冊：患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド*(羊土社)、 p117-123, 2019.
8. 村山貴彦、後藤典子. 「乳がんの PDX」 *実験医学別冊：患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド*(羊土社)、 p117-123, 2019.
9. 西村建徳、Chen Xiaoxi、後藤典子. 「乳腺オルガノイド」 *実験医学別冊：オルガノイド実験スタンダード* (羊土社), p281-289, 2019.

<学会発表>

<国際学会>

1. Noriko Gotoh: “Growth factor signaling regulates cancer stem cells and their niche” **The 6<sup>th</sup> Symposium on Anti-tumor Agents and Individual Therapy** 2019年11月 Shantou city, China (招待講演)
2. Noriko Gotoh: “One carbon metabolic enzymes play important roles for cancer cells and cancer stem-like cells” **3<sup>rd</sup> World Congress on Cancer** 2019年9月, Prague, Czech Republic (招待講演)
3. Noriko Gotoh: “Growth factor signaling regulates cancer stem cells and their niche” **International Symposium of Advances in Cancer Stem Cell Therapeutics** 2019年8月, Zhengzhou, China (招待講演)
4. Noriko Gotoh: “Semaphorin signaling via MICAL3 induces symmetric cell division to expand breast cancer stem-like cells” **Symposium: The State-of-the-Art 3D Tissue Culture & Organoids** 2019年3月, 沖縄 (招待講演)
5. Noriko Gotoh: “Critical roles of luminal progenitor cells in creating the cytokine-rich precancerous niche for mammary tumorigenesis” **International Society for Precision Cancer Medicine (ISPCM), 2019** 2019年3月, Seoul, Korea (招待講演)
6. Noriko Gotoh: “Critical roles of luminal progenitor cells in creating the cytokine-rich precancerous niche for mammary tumorigenesis” **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
7. Tatsunori Nishimura, Noriko Gotoh: "Downregulation of MTHFD2, an enzyme of one-carbon metabolism in mitochondria, inhibits tumor growth and cancer stem-like properties." **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
8. Takahiko Murayama, Noriko Gotoh: “MCM10 maintains breast cancer stem like cells through contributing to rapid response to DNA replication stress” **11th AACR JCA Joint Conference**, 2019年2月, Maui, Hawaii, USA (ポスター発表)
9. Takahiko Murayama, Noriko Gotoh: “MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging rapid response to DNA replication stress” **Keystone Symposia 2019, DNA Replication and Genome Instability: From Mechanism to Disease**, 2019年1月, ユタ 米国 (ポスター発表)
10. Mitsuhiro Hirano, Takahiko Murayama, Noriko Gotoh, Yoichi Imai, Arinobu Tojo: “Combined HDAC and AKT inhibition as a strategy to overcome multi-drug resistant multiple myeloma” **62<sup>nd</sup> ASH Annual Meeting and Exposition**, 2019年12月, San Diego, USA (ポスター発表)

<全国学会>

1. 後藤典子：“乳がん臨床検体由来がん幹細胞濃縮細胞群の1細胞解析” 第42回日本分子生物学会年会ワークショップ「技術革新がもたらすがん治療難治性の理解克服へむけた新しい方向性」2019年12月，福岡（招待講演）
2. 後藤典子：“乳がん三次元培養を用いたがんの微小環境、不均一性の解明乳がんの三次元培養とPDXを用いたがん幹細胞制御機構解明へのアプローチ” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（口頭発表）
3. 後藤典子：“乳がん患者検体由来三次元培養細胞とがん間質細胞の共培養系を用いたがん幹細胞ニッチシグナルの解析” 第78回日本癌学会学術総会 シンポジウム14「Cancer Stem Cell」2019年9月，京都（招待講演）
4. 後藤典子：“プリン合成経路にあるミトコンドリア内酵素 MTHFD2 は、がん幹細胞性とゲフィチニブ耐性を賦与する” 第92回日本生化学会大会 シンポジウム「ミトコンドリア生化学が切り開く新たな疾患病態」2019年9月，東京（招待講演）
5. 後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains patient-derived breast cancer stem-like cells that constitutively experience DNA replicative stress” 講演会「患者由来がんモデル～基礎研究から臨床応用まで～」2019年7月，東京（招待講演）
6. 後藤典子：“微小環境と治療抵抗性メカニズム” 第27回日本乳癌学会学術集会 シンポジウム15「ゲノム・エピゲノム解析の進歩」 2019年7月，東京（招待講演）
7. 後藤典子：“乳がんの1細胞解析” 第29回サイトメトリー学会学術集会 シンポジウム「固形がんの1細胞解析」 2019年5月，東京（招待講演）
8. 西村建徳、後藤典子：“ミトコンドリア内葉酸代謝経路酵素阻害による抗腫瘍効果の評価ならびにその機序の解明” 第29回日本サイトメトリー学会学術集会 2019年5月，東京（ポスター発表）
9. 西村建徳、後藤典子：“Critical roles of FRS2beta for creating the cytokine-rich precancerous microenvironment for mammary tumorigenesis” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（招待講演）
10. 西村建徳：“ミトコンドリア内葉酸代謝経路酵素を標的としたがん治療の可能性” 第3回がんと代謝研究会若手の会 2019年11月，熊本（口頭発表）
11. 西村建徳、後藤典子：“One carbon metabolic enzymes play important roles for cancer stem-like cells” 第78回日本癌学会学術集会 International Session「Advancement of cancer stem cell biology and novel therapeutic approaches」 2019年9月，京都（招待講演）

12. 西村建徳、後藤典子：“Changes of stem cell related phenotypes under inhibition of enzymes of One-carbon metabolism” 第7回がん代謝研究会 2019年8月，宮城（ポスター発表）
13. 西村建徳、後藤典子：“ミトコンドリア内葉酸代謝酵素 MTHFD2 を分子標的とした際の抗腫瘍効果の評価” 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月，大阪（口頭発表）
14. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging response to replication stress” 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会 2019年6月，大阪（口頭発表）
15. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains breast cancer stem-like cells that constantly experience DNA replicative stress” 第78回日本癌学会学術集会 2019年9月，京都（口頭発表）
16. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“The replicative factor MCM10 maintains breast cancer stem-like cells that constantly experience DNA replicative stress” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（ポスター発表）
17. 村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“MCM10 maintains breast cancer stem-like cells through encouraging response to replication stress” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（ポスター発表）
18. Nicole M Rojas Chaverra, 西村建徳、村山貴彦、後藤典子：“Recombinant FGFR1 in its monomeric and dimeric forms observed through High Speed-Atomic Force Microscope (HS-AFM).” 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月，京都（ポスター発表）
19. Nicole M Rojas Chaverra, 西村建徳、村山貴彦、後藤典子：“Recombinant FGFR1 in its monomeric and dimeric forms observed through High Speed-Atomic Force Microscope (HS-AFM).” 第3回がん三次元培養研究会 2019年11月，東京（ポスター発表）
20. 佐藤誠、後藤典子、Dominic Voon：“Mathematical modeling of cancer stem cells” 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月，福岡（ポスター発表）
21. Mitsuhiro Hirano, Takahiko Murayama, Noriko Gotoh, Yoichi Imai, Arinobu Tojo: “Combined HDAC and AKT inhibition as a strategy to overcome multi-drug resistant multiple myeloma” 第81回日本血液学会学術集会 2019年10月，東京（ポスター発表）

<研究会開催>

後藤典子：第3回がん三次元培養研究会 2019年11月 東京

<外部資金>

1. 後藤典子, 基盤研究 B (一般), 2018.4.1-2020.3.31, 代表, 13,500 千円
2. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 6,500 千円
3. 後藤典子, AMED 次世代がん医療創生研究事業, 2019.11-2022.3.21, 分担, 4,680 千円
4. 後藤典子, 挑戦的萌芽研究, 2019.4.1-2022.3.31, 代表, 6,500 千円
5. 後藤典子, 高松宮妃癌研究助成金, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 928,402 円
6. 西村建徳, 若手研究, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 2,470 千円
7. 村山貴彦, 活動支援スタート, 2019.4.1-2020.3.31, 代表, 1,430 千円

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

Research Professor      Nicholas Barker (シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員)  
Assistant Professor      Kazuhiro Murakami 村上 和弘  
Assistant                  Kenji Kita 北 賢二 (共同研究拠点)  
Postdoctoral Researcher Yumi Terakado 寺門 侑美  
Collaborative Researcher Masaki Yamazaki 山崎 雅輝 (中外製薬)  
Assistant Staff          Yoshie Jomen 定免 良枝, Kikue Saitou 齋藤 喜久江

### 【 Abstract 】

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

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

Recently, we have identified *Lgr5*<sup>+</sup> chief cells in the corpus stomach, which serve as reserve stem cells to effect epithelial renewal following oxyntic atrophy. These reserve stem cells drive spasmodic polypeptide-expressing metaplasia in the stomach following conditional KRasG12D driver mutation, highlighting their likely contribution to gastric cancer initiation *in vivo* (Leushacke, M. *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2017).

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

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

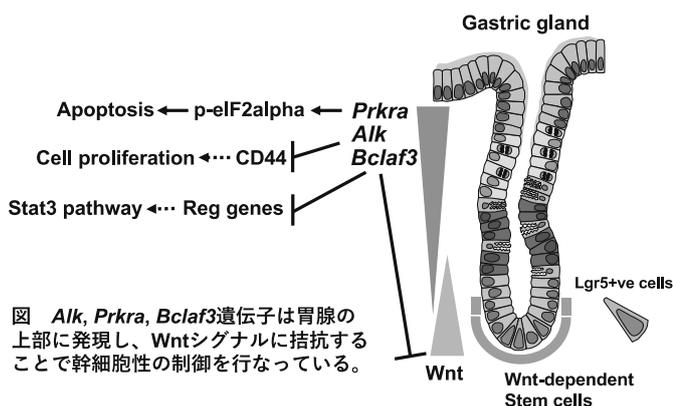
### 1. 新規胃癌マウスモデルの解析

*APC*, *KRas*, *p53* 遺伝子変異を組み合わせることで、悪性度の高い胃癌マウスモデルを得た。これらのマウスよりオルガノイドを樹立し、免疫不全マウスの胃に同所移植を行うことで、生体内の胃癌の浸潤・転移を模倣できる新たな移植モデルを確立した。これらのマウスで薬剤処理を行い *Lgr5* 陽性の胃癌細胞を選択的に除去することで、転移が抑制されることが明らかとなった。このことは、悪性度の高い胃癌の浸潤・転移には *Lgr5* 陽性細胞が必須である事を示唆している。これらの結果は、第 78 回日本癌学会総会において発表された。

### 2. 幹細胞制御因子の同定と解析

胃癌・大腸癌マウスモデルより樹立されたオルガノイドを用いて、消化管がんの悪性を導く細胞内分子機構の詳細な解析を行なった。その結果、いくつかの転写因子が、*Lgr5* 陽性細胞の幹細胞性を亢進させることで、がんの悪性に寄与していることが明らかとなった。この結果は、第 78 回日本癌学会総会において発表された。今後は、ヒト胃癌・大腸癌から樹立されたオルガノイドを用いて、マウスで得られた結果の検証を行う。

一方、マウス正常胃オルガノイドを用いてゲノムワイドスクリーニングを行なった結果、*Alk*, *Bclaf3*, *Prkra* 遺伝子が胃オルガノイドの幹細胞性を制御していることが明らかとなった(図)。この結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会にて発表された。



### 3. 新たな胃組織幹細胞マーカーAQP5の発見

シンガポール A\*Star の研究グループとの共同研究により、胃前庭部における新たな新規幹細胞マーカー、*Aquaporin-5* を見出した。この成果は、国際誌である *Nature* に受理された。

### 4. 胎児期の子宮における組織幹細胞の同定

シンガポール A\*Star の研究グループとの共同研究により、胎児期の子宮の発生に必須である *Lgr5* 陽性の組織幹細胞を同定した。この成果は、国際誌である *Nature Communications* に掲載された。

### 5. AIを用いた画像解析システムの構築

Dr. Pingzhao Hu (カナダ Manitoba 大学), Dr. Anna Junker (ドイツ Munster 大学) との国際共同研究により、人工知能を応用した画像解析システムを構築した。この成果は、国際誌である *Cells* に掲載された。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

(共同研究)

1. Si Hui Tan, Yada Swathi, Shawna Tan, Jasmine Goh, Ryo Seishima, Kazuhiro Murakami, Masanobu Oshima, Toshikatsu Tsuji, Phyllis Phuah, Liang Thing Tan, Esther Wong, Aliya Fatehullah, Taotao Sheng, Shamaine Wei Ting Ho, Heike Grabsch, Supriya Srivastava, Ming Teh, Simon L. I. J. Denil, Seri Mustafah, Patrick Tan, Asim Shabbir, Jimmy So, Khay Guan Yeoh and Nick Barker. AQP5 Enriches for Stem Cells and Cancer Origins in the Distal Stomach. *Nature*. 2020 Feb 5 578(7795):437-443. doi: 10.1038/s41586-020-1973-x.
2. Seishima R, Leung C, Yada S, Murad KBA, Tan LT, Hajamohideen A, Tan SH, Itoh H, Murakami K, Ishida Y, Nakamizo S, Yoshikawa Y, Wong E, Barker N. Neonatal Wnt-dependent Lgr5 positive stem cells are essential for uterine gland development. *Nature Communications*. 2019 Nov 26;10(1):5378. doi: 10.1038/s41467-019-13363-3.
3. Liu Q, Junker A, Murakami K, Hu P. Automated Counting of Cancer Cells by Ensembling Deep Features. *Cells*. 2019 Sep 2;8(9). pii: E1019. doi: 10.3390/cells8091019.
4. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K. Distinct Localization of Mature HGF from its Precursor Form in Developing and Repairing the Stomach. *Int J Mol Sci*. 2019 Jun 17;20(12). pii: E2955. doi: 10.3390/ijms20122955.
5. Xue Y, Barker N, Hoon S, He P, Thakur T, Abdeen SR, Maruthappan P, Ghadessy FJ, Lane DP. Bortezomib Stabilizes and Activates p53 in Proliferative Compartments of Both Normal and Tumor Tissues *In Vivo*. *Cancer Res*. 2019 Jul

15;79(14):3595-3607. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3744. Epub 2019 May 28.

著書・総説

1. A contemporary snapshot of intestinal stem cells and their regulation. Seishima R, Barker N. *Differentiation*. 2019 Jul - Aug;108:3-7. doi: 10.1016/j.diff.2019.01.004. Epub 2019 Jan 25.

<学会発表>

**Nick Barker;**

1. 2019年度AMED幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム公開シンポジウム”Stem Cell and Regenerative Biology”, Tokyo, Japan (November 2019)(招待講演)

**村上和弘;**

2. AMED Interstellar Initiative Program 「Analysis of mechanisms which regulate stem cells in normal and cancer development」 2019年2月7日 ドイツ ミュンスター

3. SNU-GCRC and KU-CRI joint symposium 「Analysis of mechanisms which regulate stem cells in normal and cancer development.」 2019年5月13日 韓国 ソウル

4. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 「CRISPR/Cas9 based genome-wide approach reveals novel stemness-regulating factors in stomach organoids」 2019年9月5-7日 長野県茅野市

5. 第78回日本癌学会学術総会 「Analysis of mechanisms which regulate the tumor malignancy in LGR5 expressing gastric cancer cells」 2019年9月26-28日 京都府京都市

**寺門侑美;**

6. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会 「Analysis of stem cell and its regulatory mechanism in gastric cancer」 2019年9月5-7日 長野県茅野市

7. 第78回日本癌学会学術総会 「The role of Lgr5 as cancer stem cell in gastric cancer and regulatory mechanism」 2019年9月26-28日 京都府京都市

## <外部資金>

1. 基盤研究(A) [研究代表者 : Nick Barker]

「Developing mouse models of inflammation-driven invasive gastric cancer to reveal novel therapeutic targets」 1070 万円

2. 基盤研究(C) [研究代表者 : 村上 和弘]

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」 130 万円

4. 公益財団法人 内藤記念科学振興財団 第 2 回(2017 年度) 内藤記念次世代育成支援研究助成

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」

[研究代表者 : 村上 和弘] 200 万円

3. 若手研究 [研究代表者 : 寺門 侑美]

「胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明」 100 万円