がん微小環境研究プログラム

がん微小環境研究プログラム

Division of Immunology and Molecular Biology
免疫炎症制御研究分野

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

【 Abstract 】

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

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

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

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

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

＜2023 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

１．自然免疫応答におけるモーター蛋白 KIF11 の役割の解析

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

２．カスパーゼ 12 による GSDMD 切断活性化の解析

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

３．マスト細胞におけるインフラマソーム応答の解明

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

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著（共同研究）

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

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

総説

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

＜学会発表＞

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

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

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

4. Kinoshita T, Tsuchiya K, and Suda T. Kinesin molecular motor Eg5 functions during innate immune signaling. 第 46 回日本分子生物学会年会. 2023 年 12 月 8 日、神戸ポートアイランド

＜外部資金＞

1. 須田貴司（代表）科学研究費補助金　基盤研究(C)「マスト細胞におけるインフラマソーム応答の特徴と役割」2023 年度直接経費 1,600 千円

2. 土屋晃介（代表）科学研究費補助金　基盤研究(B)「細菌由来分子を認識する新たなパターン認識受容体の機能解析と応用」2023 年度直接経費 400 千円

3. 土屋晃介（代表）科学研究費補助金　挑戦的研究（萌芽）「ガスダーミン・ファミリー分子を成熟化させる細菌・真菌由来プロテアーゼの探索」2023 年度直接経費 1,200 千円

4. 土屋晃介（分担）AMED 循環器疾患・糖尿病等生活習慣病対策実用化研究事業「過栄養による肝細胞死の様式変容とその生活習慣病発症・増悪のメカニズムの解明」2023 年度直接経費 1,000 千円

Division of Tumor Dynamics and Regulation
腫瘍動態制御研究分野

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

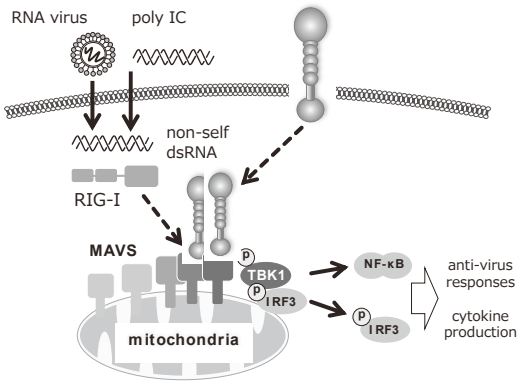
【Abstract】

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

＜2023 年の研究成果，進行状況＞

1. Non-canonical MET 受容体経路を介した自然免疫制御

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



2. 転移ニッチ微小環境形成とイメージング診断分子創成

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

3. 高速 AFM を利用した MET 受容体活性化の動的構造

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

4. 高機能受容体アゴニスト創成

(1) MET アゴニスト創成: MET 結合環状ペプチド配列を IgG の Fc 領域に Lasso-Graft（内挿）することにより，MET 受容体を活性化する分子を創成した（*Sakai et al, Nat Biomed Eng*）。これらは長期血中安定性を示し，慢性疾患治療に有用と考えられ，NASH（非アルコール性脂肪肝炎）モデルにおいて薬効を解析した結果，MET アゴニストは肝臓での炎症や脂肪蓄積を抑制し，線維化を抑制・改善した。NASH 改善の医薬候補と期待される（*Chaverra et al.* 論文改訂中）。

(2) ユビキチン（UB）を scaffold とするアゴニスト創成: UB を scaffold として，MET 受容体結合ペプチドを内挿する UB の Lasso-Graft 体オリゴマーが高い MET 活性化能をもつことを検証した（*Kawakami, Sato, et al. Angewandte Chemie, Int Ed*）。

(3) 成長因子受容体（Growth Hormone Receptor/GHR）アゴニスト創成: GHR 結合ペプチドを Fc に内挿し，野生型・変異型 GHR を活性化するアゴニストを創成した（*Li, Kida, et al.* 論文準備中）

【 研 究 業 績 】

＜論文発表＞

（研究室主体）

1. Sakai K†, Sugano-Nakamura N, Mihara E, Rojas-Chaverra NM, Watanabe S, Sato H, Imamura R, Voon DC, Sakai I, Yamasaki C, Tateno C, Shibata M, Suga H, Takagi J†, Matsumoto K†. Designing receptor agonists with enhanced pharmacokinetics by grafting macrocyclic peptides into fragment crystallizable regions. ***Nat Biomed Eng***, 7: 164-176, 2023. (†corresponding authors)

2. Warashina S§, Sato H§, Zouda M, Takahashi M, Wada Y, Passioura T, Suga H, Watanabe Y, Matsumoto K†, Mukai H†. Two-chain mature hepatocyte growth factor-specific positron emission tomography imaging in tumors using ^{64}Cu-labeled HiP-8, a non-standard macrocyclic peptide probe. ***Mol Pharmaceutics***, 20: 2029-2038, 2023. (§equal contribution; †corresponding authors)

3. Kawakami N§, Sato H§, Terasaka N, Matsumoto K†, Suga H†. MET-activating ubiquitin multimers. ***Angewandte Chemie***, ***Int Ed***, 62, e2023071, 2023. (§equal contribution; †corresponding authors)

4. Imamura R†, Sato H, Voon DC, Shirasaki T, Honda M, Kurachi M, Sakai K†, Matsumoto K. Met receptor is essential for MAVS-mediated antiviral innate immunity in epithelial cells independent of its kinase activity. ***Proc Natl Acad Sci***, 120: e2307318120, 2023. (†corresponding authors)

（共同研究）

1. Takumi Y, Arai S, Suzuki C, Fukuda K, Nishiyama A, Takeuchi S, Sato H, Matsumoto K, Sugio K, Yano S. MET kinase inhibitor reverses resistance to entrectinib induced by hepatocyte growth factor in tumors with NTRK1 or ROS1 rearrangements. ***Cancer Medicine***, 12: 5809-5820, 2023.

2. Kamoshita K, Ishii K, Tahira Y, Kikuchi A, Abuduwaili H, Tajima-Shirasaki N, Li Q, Takayama H, Matsumoto K, Takamura T. Long-term insulin stimulation suppresses ubiquitination via the deubiquitinating enzyme ubiquitin-specific protease 14, independent of proteasome activity in H4IIEC3 hepatocytes. ***J Pharmacol Exp Therapeutics***, 385: 5-16, 2023.

3. Nishita M, Kamizaki K, Hoshi K, Aruga K, Nishikaku I, Shibuya H, Matsumoto K, Minami Y. Rho family small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1-Dvl2 signaling and promotes lung adenocarcinoma progression. ***J Biol Chem***, 299: 105248, 2023.

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

＜総説・著書＞

（共同研究）

1. Sakai K, Sato H, Matsumoto K. Cytokine mimetics with various modalities. ***Israel Journal of Chemistry***, in press.

2. 酒井克也. 第 19 回金沢大学十全医学会賞受賞論文 人工細胞成長因子・阻害分子の創成と応用の研究. **金沢大学十全医学会雑誌** 第 132 巻第 1 号 pp. 2-6, 2023.

＜学会発表・シンポジウムなど＞

1. 松本邦夫. ネオバイオロジクス：高機能細胞増殖因子の分子創成. Beyond 研究会. 2023 年 3 月 19 日（東京）

2. 松本邦夫. 高機能増殖因子（ネオバイオロジクス）創成と応用展開. 「感染・免疫・がん・炎症」全国共同研究拠点シンポジウム. 2023 年 3 月 29 日（札幌）

3. 山口有紀子、増尾友佑、津本彩乃、酒井克也、今村龍、水谷栄介、牛田貴文、小谷友美、梶山広明、松本邦夫、水谷栄彦、加藤将夫. Aminopeptidase A-Fc 融合タンパク質のリンカー配列最適化. 日本薬剤学会年会. 2023 年 5 月 18 日（名古屋）

4. 松本邦夫. 大学だからできるアカデミア創薬の強みや弱みと事業化を支える人. 「創薬ベンチャーエコシステムの現状とそこから見える創薬の未来像」第 445 回 CBI 学会研究講演会 2023 年 5 月 26 日（オンライン）

5. 柏勇希、酒井克也、松本邦夫、寺坂尚紘、相川春夫、菅裕明. 自己集合タンパク質に立脚した受容体チロシンキナーゼ人工活性化剤の開発. 日本ケミカルバイオロジー学会. 2023 年 5 月 30 日（大阪大学）

6. 喜田明日香、酒井克也、松本邦夫. 血液-脳関門を通過する MET/HGF 受容体作動分子の創成. 日本生化学会北陸支部第 41 回大会 6 月 3 日（富山大学）

7. 佐藤拓輝、矢野聖二、松本邦夫. 遠隔臓器における HGF-MET シグナルのエンドクライン的活性制御機構と転移ニッチ形成. 第 27 回 日本がん分子標的治療学会. 2023 年 6 月 22 日（佐賀）

8. 松本邦夫. アカデミアでの研究とスタートアップの意義. シンポジウム「産学連携シンポジウム　アカデミア創薬- 出口戦略とその展望」第 27 回 日本がん分子標的治療学会. 2023 年 6 月 23 日（佐賀）

9. 松本邦夫. バイオベンチャー起業の思いと大学発スタートアップ創出のために. 金沢大学イノベーションシンポジウム 2023 夏. 2023 年 6 月 29 日（金沢）

10. Sato H, Sakai K, Watanabe Y, Mukai H, Suga H, Matsumoto K. Application of Macrocyclic Peptides for Cancer Imaging Diagnosis and Therapeutics. 第 83 回 日本癌学会総会. 2023 年 9 月 21 日～9 月 23 日（横浜）

11. 田村かい、田中友輝、松本邦夫、木下誉富. cMet キナーゼドメイン両端領域の活性制御機構. 第 60 回ペプチド討論会. 2023 年 11 月 9 日（大津市）

12. 松本邦夫. 高機能増殖因子: ネオバイオロジクスの創成と応用. 第 13 回シグナルネットワーク研究会. 2023 年 11 月 24 日 （金沢）

＜知的財産＞

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

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

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

＜外部資金＞

1. 松本邦夫: AMED 次世代がん医療創生研究事業（P-PROMOTE）「環状ペプチド基盤プラットフォーム分子技術によるイメージング診断・治療用高機能分子創成と検証」（代表）（直接経費）8,742 千円

2. 松本邦夫: 科学研究費補助金　挑戦的研究（開拓）「超機能バイオロジクスリガンドの創成と検証の研究」（代表）（直接経費）5,000 千円

3. 松本邦夫: 産学連携共同研究 「HGF タンパク質を用いた難治性疾患治療薬の開発」クリングルファーマ株式会社 （代表）（直接経費）2,880 千円

4. 松本邦夫: AMED CiCLE 「組換え HGF タンパク質を用いた難治性疾患治療薬の開発」（代表）クリングルファーマ株式会社からの再委託研究開発（分担）（直接経費）3,300 千円

5. 松本邦夫: 産学連携共同研究 「NASH 治療薬を目指す Met アゴニストの医薬品特性の検証」 ミラバイオロジクス株式会社（代表）（直接経費）3,750 千円

6. 酒井克也: AMED 肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業）「環状ペプチドファルマコフォア内挿型の組換えアゴニストによる肝機能・線維化改善に基づく汎用的肝炎治療の開発」（代表）（直接経費）15,000 千円

7. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金　若手研究「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」（代表）（直接経費）900 千円

8. 佐藤拓輝: リレー・フォー・ライフ・ジャパン「プロジェクト未来」課題名: 細胞増殖因子および高機能ミメティック・アゴニストを用いた神経保護・再生作用に基づく化学療法誘因性末梢神経障害(CIPN)の根本的治療法開発（代表）1,000 千円

Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging
腫瘍細胞生物学研究分野

Associate Professor	Eishu Hirata　平田 英周
Assistant Professor	Kojiro Ishibashi　石橋 公二朗
Graduate Student	Peifu Yu　于 沛夫（医薬保健学総合研究科 D2）
	Ryo Mizutani　水谷 涼（自然科学研究科・卓越大学院 D1）
Research Students	Riki Kadokawa　角川 立樹（医学類 4 年),
	Anis Zianne　ジアン アニス（医学類 2 年）
Technical Assistant	Sayuri Yamagishi　山岸 小百合

【 Abstract 】

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

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

＜2023 年の研究成果，進捗状況及び今後の計画＞

1. がん細胞とグリア細胞との多面的相互作用に関する研究

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

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

2. Fibulin-1 によるがん脳転移制御機構に関する研究

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

3. 肺がん薬剤耐性における pre-persister 細胞に関する研究

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

4. 双性イオン液体の生命科学分野への応用に関する研究

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

【 研 究 業 績 】

＜発表論文＞

原著

（共同研究）

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

＜学会発表＞

1. 平田 英周 「がん細胞とグリア細胞の多面的相互作用と細胞死」第 31 回日本 Cell Death 学会学術総会（招待講演）（東京　2023 年 7 月 15-16 日）
2. 石橋 公二朗、新城 恵子、近藤 豊、平田 英周 「代謝型グルタミン酸受容体を介した脳転移がん細胞の生存戦略」先端モデル動物支援プラットフォーム 2023 年度 若手技術支援講習会（口頭発表）（名古屋　2023 年 9 月 8-10 日）
3. 于 沛夫 「脳転移における fibulin-1 アイソフォームの役割」先端モデル動物支援プラットフォーム 2023 年度 若手技術支援講習会（ポスター発表）（名古屋　2023 年 9 月 8-10 日）
4. Eishu Hirata “Induction of mGluR1 expression and enhanced dependence on its signalling in lung cancer brain metastasis” 第 82 回 日本癌学会学術総会（シンポジウム）（横浜　2023 年 9 月 21-23 日）
5. Kojiro Ishibashi, Eishu Hirata “Investigation of novel therapeutic targets for brain metastasis using MGS method” 第 18 回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム（口頭発表）（東京　2023 年 10 月 5-6 日）

＜知的財産＞

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

＜外部資金＞

1. 挑戦的研究（萌芽）［研究代表者：平田 英周］「グリオーマ関連ミクログリア・マクロファージの機能制御」3,380 千円
2. AMED 革新的がん医療実用化研究事業 ［研究代表者：平田 英周］「代謝型グルタミン酸受容体を標的としたがん脳転移治療法の開発」22,230 千円
3. 2023 年度 三谷研究開発支援財団研究助成 ［研究代表者：平田 英周］「グリアがん免疫制御による脳腫瘍治療戦略の開発」1,000 千円
4. 若手研究 ［研究代表者：石橋 公二朗］「ミクログリアを用いた脳転移細胞療法の開発基盤の構築」1,300 千円
5. JST ACT-X ［研究代表者：石橋 公二朗］「シグナル伝達物質として機能する DNA を介した細胞間コミュニケーション」3,250 千円
6. 国際共同研究加速基金（海外連携研究）［研究代表者：石原 誠一郎　研究分担者：石橋 公二朗］「がん転移におけるメカノバイオロジー」624 千円

（学内研究資金）

7. 先魁プロジェクト（2022-2023）［研究代表者：黒田 浩介　研究分担者：平田 英周］「双性イオン液体によるライフサイエンス基盤の革新と社会実装」500 千円

＜その他＞

（受賞）

1. 石橋 公二朗　2023 年度 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会　ベストディスカッサー賞

（アウトリーチ活動）

2. 平田 英周，石橋 公二朗　未来のがん研究者を育むがん克服プロジェクト「がん研 EEP」（2023 年 8 月 1-4 日）