

# 人材育成プログラム

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2025-05-07 キーワード: 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/0002002569">http://hdl.handle.net/2297/0002002569</a>

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International License.



# 人材育成プログラム

## Inflammation and Epithelial Plasticity

上皮可塑性・炎症ユニット

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

### 【 Abstract 】

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

### < 2023 research achievement and future plan >

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

## 【 Achievements 】

### <Publications (Primary)>

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

### <Publications (Collaboration)>

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

<Conference Presentation>

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

<2023 Research Funds>

Not applicable.

# Cancer-Immune System Interactions

## がん-免疫系相互作用ユニット

Associate Professor      Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

### 【 Abstract 】

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

### <2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

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

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

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

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

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

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

総説

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

### < 学会発表 >

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

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

土屋晃介, 細島祥子, Eduardo Hernández Cuellar<sup>1</sup>, 須田貴司. カスパーゼ-12は細菌リポペプチドを認識してパイロトーシスを誘導する. 第33回日本生体防御学会学術総会. 2023年9月28~30日 (京都).

### < 外部資金 >

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

# Microenvironment Regulation in Cancer Stem Cells Unit

## がん幹細胞環境制御ユニット

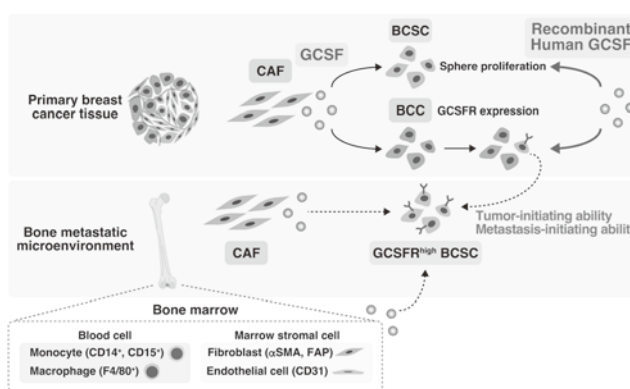
Assistant Professor

Yasuto Takeuchi 竹内 康人

### 【 Abstract 】

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

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



### <2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

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

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

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

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

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

### < 学会発表 >

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

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

<外部資金>

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

# Mitochondrial Dynamics in Stem Cells

## ミトコンドリア動態ユニット

Assistant Professor

Atsuko KASAHARA 笠原敦子

### 【Abstract】

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

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

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

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

### <2023年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

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

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

## 【研究業績】

### < 発表論文 >

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

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

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

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

### < 学会発表 >

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

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

### < 外部資金 >

なし。

## Senescent Cell Dynamics Unit

### 老化細胞動態解析ユニット

Assistant Professor      Yasuhiro Nakano 中野 泰博

#### 【 Abstract 】

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

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

#### <2023 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

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

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

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

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

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

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

(共同研究)

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

著書・総説

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

### < 学会発表 >

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

## <外部資金>

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