

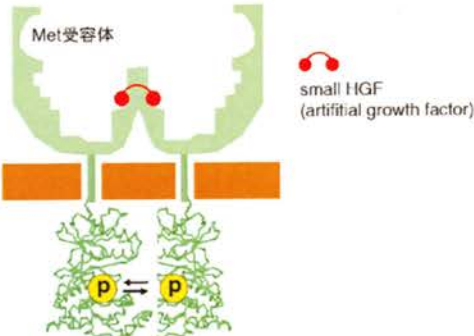
平成25年度

金沢大学がん進展制御研究所
共同研究成果報告書

2014.4

金沢大学がん進展制御研究所

研究区分	特定共同研究	
研究課題	がん幹細胞制御を目指した癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節における基盤的研究	
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・准教授・田中知明
研究分担者	所属・職名・氏名	Columbia University・教授・Carol Prives
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・助教・鈴木佐和子
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・助教・北嶋俊輔
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・博士研究員・河野晋
	所属・職名・氏名	金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・大学院生・吉田晶代
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	癌抑制遺伝子産物 p53 や Rb の新たな側面として、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たすことが明らかにされつつあり、細胞老化や核初期化に関わるエピゲノム制御機能などの多彩な生理作用と密接にクロストークしていることがわかってきた。今回、高速シークエンサーによるゲノムワイドの情報と p53/Rb の KO マウスモデルや Rb のコレステロール合成経路とイソプレノイドに関する知見を融合し、癌抑制遺伝子 p53-Rb ネットワークによる細胞内代謝・脂質代謝調節を明らかにし、創薬基盤構築とがん幹細胞制御の共通分子基盤の解明を目的とした。	
【研究内容・成果】	次世代型シークエンサーによるヒト ES/iPS に特異的に発現する p53 依存的な non-coding RNA を含めた転写産物のエピジェネティクス・トランスクリプトーム制御の解析を行った。その結果、iPS と ES に共通する linc RNA 候補が 1292 遺伝子検出された。たんぱく質をコードしない長鎖の RNA (linc RNA) は、クロマチン制御や核内構造体の構成を介して、癌の転移や悪性化に関係しているばかりでなく、幹細胞性の機能維持や核リプログラミングにおける iPS 樹立効率や性質に重要な役割を果たすことが示唆されている。また、IPA によるシグナル解析において、p53 と Rb のクロストークによる代謝制御の基盤的研究については、ROS・エネルギー代謝調節など細胞の恒常性維持に重要な役割を果たし、幹細胞性/がん幹細胞性制御と密接に関わる事が判明した。実際のメタボローム解析では、ES/iPS 細胞において、脂質合成系の亢進、グルタミン代謝の亢進、ミトコンドリア活性の低下が認められ、細胞内代謝という視点から、がん非常に似た形質を有することを見出した。興味深いことに、ES/iPS 細胞では、p53 経路と Rb 経路の顕著な抑制を認め、Rb の標的としてすでに特定されていたメバロン酸経路および脂肪酸合成経路に加えて、p53 欠損背景における Rb 不活性化により、解糖系およびヘキソースアミン経路、グルタミン代謝に関与する種々の代謝関連遺伝子群が変動することを明らかにした。p53KO マウス由来の腫瘍を用いた検討では、Rb 経路をサイレンシングすると、がん幹細胞様の形質を引き起すだけでなく、ES/iPS と同様の代謝変化が生じ、中でもグルタミン代謝が重要である可能性を見出した。実際、グルタミントランスporter (Slc1a5) の発現やグルタミン代謝酵素群の発現が亢進しており、放射性標識グルタミン誘導体を用いた解析により、実際にグルタミン取り込み量の亢進が観察された。これは、マウスのがん幹細胞様の in vitro モデルや ES/iPS 細胞の両方で観察された現象である。これらの結果は、グルタミン代謝が、がん幹細胞・ES/iPS の接点で機能する共通の代謝制御の重要な経路であることを示唆しており、新規の創薬シーズ開発や解析技術開発につながり、更なる解析が必要であると考えられた。	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> Hosokawa, H., Tanaka, T., Kato M., Tohyama H., Hanazawa A., Tamaki Y., Hirahara K., Sakikawa I., Morita A., Nagira M., Suzuki, Y. and Nakayama, T. Gata3/Ruvbl2 complex regulates T helper 2 cell proliferation via repression of Cdkn2c expression. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 110 (46):18626-18631. (2013) (査読有) Hosokawa, H., Tanaka, T. (*Co-first author), Suzuki, Y., Iwamura, C., Ohkubo, S., Endoh, K., Kato, M., Nakayama, T. Functionally distinct Gata3/Chd4 complexes coordinately establish T helper 2 (Th2) cell identity. <i>Proc Natl Acad Sci U S A.</i> 110 (12):4691-4696. (2013) (査読有) Tanaka, T. Regulation of cell metabolism by tumor suppressor p53 and its concern in cancer and lifestyle-related disease. <i>Chiba Medical Journal</i>, 89 (1): 15-20 (2013) (査読有) 田中知明, 横手幸太郎. エピジェネティクスと老化. <i>BIO Clinica.</i> 29:19-23 (2013) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 鈴木佐和子, 田中知明, 横手幸太郎 (2013) 癌抑制遺伝子 p53 によるグルタミン代謝調節作用の新局面と癌・生活習慣病における役割. 第 86 回日本内分泌学会学術総会 シンポジウム 3 若手研究者シンポジウム, 4月25日, 仙台。 田中知明 (2013) ES/iPS 細胞における転写因子解析と p53 によるグルタミン代謝調節と ROS 制御機構. 第 86 回日本内分泌学会学術総会, 4月27日, 仙台。 <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分		特定共同研究
研究課題		RaPIDシステムを用いた HGF-Met 系制御の特殊ペプチド創製研究
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科・教授・菅 裕明
研究分担者	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科・助教・加藤敬行
	所属・職名・氏名	東京大学大学院理学研究科・大学院生・伊藤健一郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	<p>画期的医薬の1つであるシクロスポリンに代表される特殊ペプチドは、高い生体内安定性と生理活性をもつ。私達は特殊ペプチドを高効率・着実に取得する中核技術 RaPID システム (Random Peptide Integrated Discovery system) を独自に確立した。一方、HGF とその Met 受容体系は肝臓の再生に代表される組織の再生・保護を支えるとともに、がんの浸潤転移、薬剤耐性に関与する。Met 受容体を活性化するのは再生を促す医薬、HGF-Met 系を阻害するものはがん転移・薬剤耐性を克服する抗がん剤候補と考えられる。本研究では、RaPIDシステムを用いて HGF-Met 系を活性化する特殊ペプチドによる小分子人工増殖因子の創製を目的とした。</p>	
【研究内容・成果】	<ol style="list-style-type: none"> 1. ヒト Met/HGF 受容体細胞外領域に高親和性に結合する環状ペプチドを取得するため、Met 細胞外-Fc タンパク質をビーズに固相化し、RaPIDシステムによって、Met細胞外に結合する環状ペプチドを複数取得した。 2. 取得した環状ペプチドは、いずれも Met 細胞外領域に極めて高い親和性(Kd = 0.9 ~ 3 nM) と特異性で結合したが、HGF によって引き起こされる Met 受容体活性化に対して、阻害作用は認められなかった。 3. Met 結合環状ペプチドを短鎖の PEG で架橋することによって、Met 活性化/チロシンリン酸化能を有する環状ペプチドダイマーが得られた。RTK アレイによって本環状ペプチドダイマーの特異性を調べた結果、環状ペプチドダイマーは Met 受容体を選択的に活性化した。さらに Met 活性化環状ペプチドダイマーが HGF-Met 系に特徴的な複数の生物活性を発揮するかどうかを、HGF との比較において調べた結果、ダイマー化環状ペプチドは、Met チロシンリン酸化、細胞遊走、3-D 形態形成、血管内皮細胞の増殖促進、正常角化細胞の in vitro wound healing アッセイなど、複数のアッセイ系において、HGF とほぼ同等の強い生物活性を発揮した。ダイマー化環状ペプチドは Met 細胞外に選択的に結合するとともに、Met 受容体の安定 2 量体化を引き起こすことによって、HGF と comparable な生物活性を発揮すると考えられる(下図)。 4. 現在、筋萎縮性側索硬化症などを対象に組織換え HGF タンパク質の臨床試験が進められ、再生を促す医薬になると考えられる。一方、本研究において、HGF に置き換える可能性をもつ小分子の人工 HGF の創製に成功した。将来、小分子人工 HGF として医療への応用が考慮される。 5. 成果を論文として投稿し、現在審査中である。 	
		
【成果等】	【主な論文発表】	Ito K, Sakai K, Suzuki Y, Hatta T, Natsume T, Matsumoto M, Suga H. Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds. Nature Communications, in review.
	【学会発表】	伊藤健一郎、鈴木芳典、松本邦夫、菅裕明: 肝細胞増殖因子受容体 c-Met を活性化させるチオエーテル大環状ペプチドの開発。日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会。2013 年 6 月 20 日(東京)
	【その他特筆事項】	なし

研究区分		特定共同研究
研究課題		GSK3β阻害による膵癌治療法の分子基盤の解明と臨床試験への応用
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・講師・島崎猛夫
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学総合医学研究所・教授・石垣靖人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学病院消化器外科・教授・上田順彦
	所属・職名・氏名	金沢医科大学病院消化器内科・教授・有沢富康
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>膵癌は強度の浸潤、転移性と各種の治療に抵抗性を示す難治癌であり、抗癌剤抵抗性に関わる分子病態の理解と高度の浸潤性のコントロールが重要な課題である。昨年度までの共同研究により、我々は膵癌で GSK3βの発現や活性が亢進し、その阻害により癌細胞の増殖と浸潤が抑制され、抗癌剤 Gemcitabine (GEM) に対する感受性が亢進することを報告してきた (Shimasaki T., Minamoto T. et al. J of Gastroenterology 2011)。その作用機序として、細胞周期を制御する分子経路と FAK (focal adhesion kinase)/Rac1/MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) 機軸経路がそれぞれ関与していることも明らかにした¹⁾。一方、GEM が膵癌細胞に糸状突起などの特徴的な形態変化を誘導することを見出していたことから、この形態変化が持つ病的意義を明らかにすることは、浸潤性や治療抵抗性を解明する糸口になると考え、GSK3β阻害との関連を含めて共同研究を行うことにした。並行して、これまでに行っていた共同研究である「GSK3β阻害作用を持つ医薬品の repositioning と GEM の併用による進行膵癌治療の第 I / II 相臨床試験 (UMIN000005111)」を継続し、安全性の確認を行った。</p>	
【研究内容・成果】	<p>今回の研究期間における研究にて、GEM により形態変化した細胞は、上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition) と似ているため、EMT の特徴とされている各種蛋白、遺伝子変化の有無や、EMT の特徴の一つである遊走性や浸潤性について検討を行った。またその EMT 様変化が GEM そのものによる作用か、あるいは間接的な作用であるかについて検討を行い、その誘引分子についての検討も行った。成果として、GEM により膵がん細胞の形態が EMT 様に変化し、E-cadherin の消失、vimentin の増加、slug の発現増加など、EMT が誘導されていることを証明した。また、GEM により細胞の遊走性が亢進することを確認した。GEM を投与した細胞の調整培地から GEM を取り除いた後の調整培地を新たに膵癌細胞に添加したところ、同様の形態変化を認めたことから GEM そのものの作用ではなく、GEM の影響を受けた細胞から分泌された何らかの因子による変化であることが推測された。そのためそれらの調整培地のプロテオーム解析を行い、調整培地中のある種の heat shock protein (HSP) が増加することと、その HSP 発現を抑制すると遊走能や形態変化が抑制されることを見出した。同様に GEM により膵がん細胞に誘導される形態と機能の変化が GSK3β阻害により抑制されることも見出した。これらにより、膵癌の治療抵抗性とその浸潤性が HSP 誘導により起きている可能性が示唆された。今後は、HSP の誘導機序についてさらなる解析を行う予定である。これらの基礎研究と併せて行っている GSK3β阻害作用を持つ複数の医薬品と GEM の併用による進行・再発膵癌の第 I / II 相臨床試験については、現在 4 例目が終了し、投与薬剤の組み合わせと投与量を確定した。今後は、これらの結果を基に第 II 相試験を多施設で行う予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1) Kitano A, <u>Shimasaki T</u> (equal contribution), <u>Ishigaki Y</u>, et al, <u>Minamoto T</u>. Aberrant glycogen synthase kinase 3β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. PLoS One 2013; 8(2):e55289.</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. Shimasaki T, Minamoto T., et. Al. Phase I clinical trial of the combination therapy using gemcitabine and GSK3beta inhibiting drugs for gemcitabine-resistant advanced pancreatic cancer patients. DDW 2013 (Orland, America)</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>本研究の成果により、本学は金沢大学と共同で、GSK3β阻害作用を有する既存医薬品による新規膵がん化学療法の特許を出願した (特願 2013-093072)。</p>	


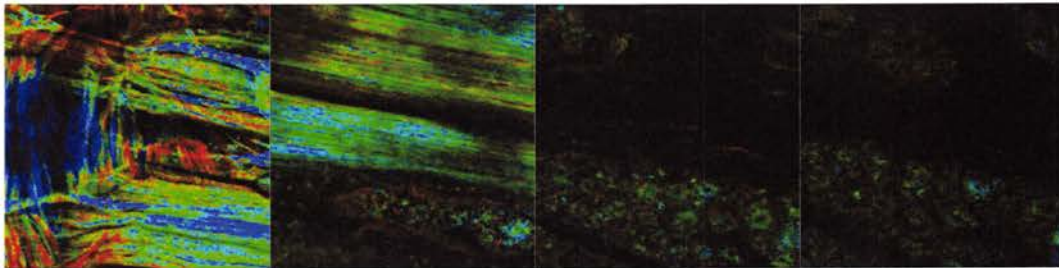
研究区分		特定共同研究
研究課題		肺がん・中皮腫における血管新生阻害薬耐性機構の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授・西岡安彦
研究分担者	所属・職名・氏名	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授・埴淵昌毅
	所属・職名・氏名	徳島大学病院・講師・柿内聡司
	所属・職名・氏名	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・講師・後東久嗣
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二
【研究目的】	<p>申請者らは、胸膜中皮腫(malignant pleural mesothelioma: MPM)の分子病態に基づく新規治療法の開発を目的に臨床を反映するヒト MPM の同所移植モデルを確立し、腫瘍血管新生に中心的な役割を担う VEGF に焦点を当て、分子標的治療の基礎検討を進めてきた。これまでの検討から本モデルにおけるベバシズマブ耐性現象を確認し、耐性腫瘍におけるマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、宿主側由来のマウス線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor: FGF) -2 が、耐性化腫瘍で増加していることを見出している。本研究では、ベバシズマブ耐性腫瘍における FGF-2 産生細胞の同定および FGF-2 を標的とした併用療法の開発を目的とする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>ベバシズマブ耐性腫瘍 (Y-MESO-14) における免疫組織染色法による検討から、ベバシズマブ耐性腫瘍内に FGF-2 発現細胞の増加を確認した。そこで、FGF-2 産生がベバシズマブ耐性化に寄与しているか否かについて、FGF 受容体の特異的阻害薬である BGJ-398 を用いて、ベバシズマブとの併用効果について検討した。Y-MESO-14 細胞を胸腔内に移植後、7 日目からベバシズマブによる治療を開始し、21 日目から 35 日目にかけて BGJ-398 を連日経口投与した。その結果、BGJ-398 単独投与によってもベバシズマブ単独投与と同程度の担癌マウスの生存期間の延長を認め、併用治療群においては、さらに生存期間の延長を認めた。以上から、本モデルにおけるベバシズマブ耐性化に腫瘍内の FGF-2 産生が寄与していることが明らかとなった。次に、ベバシズマブ耐性腫瘍内における FGF-2 産生細胞について検討を行った。これまでの報告から、ベバシズマブ耐性化に関与する細胞として Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) やマクロファージが報告されている。そこで、MDSC のマーカーである Gr-1、マクロファージのマーカーである CD68 と F4/80 による免疫染色を行った。しかしながら、いずれのマーカー発現細胞もベバシズマブ耐性腫瘍内に増加を認めず、また二重免疫蛍光染色法にて FGF-2 との共染色をほとんど示さなかった。一方、FGF-2 は CXCR4 およびタイプ I コラーゲン染色と共染色を示し、これらのマーカー発現から、FGF-2 を発現する主な細胞は fibrocyte であることが明らかとなった。実際に、タイプ I コラーゲンと CXCR4 の二重染色法では、両マーカーを発現する fibrocyte と考えられる細胞が、ベバシズマブ耐性腫瘍内で約 2 倍に増加していた。RT-PCR による検討から、ベバシズマブ耐性腫瘍内にはコラーゲン 1A1、αSMA、FAP、FSP-1 といった線維芽細胞マーカー遺伝子と、CD45、CXCR4 といったマクロファージマーカー遺伝子の両者が増加しており、これらはいずれも fibrocyte において発現するマーカー遺伝子であった。今後、本モデルにおけるベバシズマブ耐性腫瘍内への fibrocyte 集積メカニズムの検討、および肺がん臨床検体を用いた fibrocyte の検討を進める予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama SI, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A Novel Targeting Therapy of Malignant Mesothelioma Using Anti-Podoplanin Antibody. J Immunol. 15;190(12):6239-49, 2013. 2. Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. Am J Pathol. 182(5):1843-53, 2013. 3. Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, The Van T, Goto H, Hanibuchi M, Nishioka Y. Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target. Oncotarget. 4(8):1172-84, 2013. 4. Yamada T, Takeuchi S, Fujita N, Nakamura A, Wang W, Li Q, Oda M, Mitsudomi T, Yatabe Y, Sekido Y, Yoshida J, Higashiyama M, Noguchi M, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Akt kinase-interacting protein1, a novel therapeutic target for lung cancer with EGFR-activating and gatekeeper mutations. Oncogene 32(37):4427-35, 2013. 5. Takeuchi S, Wang W, Li Q, Yamada T, Kita K, Donev IS, Nakamura T, Matsumoto K, Shimizu E, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Dual inhibition of Met kinase and angiogenesis to overcome HGF-induced EGFR-TKI resistance in EGFR mutant lung cancer. Am J Pathol. 181(3): 1034-43, 2012. 6. Wang W, Li Q, Takeuchi S, Yamada T, Koizumi H, Nakamura T, Matsumoto K, Mukaida N, Nishioka Y, Sone S, Nakagawa T, Uenaka T, Yano S. Met kinase inhibitor E7050 reverses three different mechanisms of hepatocyte growth factor-induced tyrosine kinase inhibitor resistance in EGFR mutant lung cancer. Clin Cancer Res. 18 (6): 1663-71, 2012. 	

【学会発表】

1. Jun Huang, Dai-Shun Liu, Soji Kakiuchi, Hisatsugu Goto, Masaki Hanibuchi, Yasuhiko Nishioka. Therapeutic efficacy of RNA interference targeting focal adhesion kinase against orthotropic xenograft of human malignant pleural mesothelioma in SCID mice. AACR Annual Meeting 2013. 2013年4月, Washington DC.
2. 後東久嗣, 三橋惇志, 青野純典, 西岡安彦. 肺癌進展における SP-A と腫瘍関連マクロファージ. 第53回日本呼吸器学会学術講演会(シンポジウム). 2013年4月, 東京.
3. 阿部真治, 加藤幸成, 金子美華, 木宿昌俊, 川添和義, 東満美, 埴淵昌毅, 水口和生, 西岡安彦. ヒト NK 細胞を介した抗ポドプラニン抗体 NZ-8 の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍効果. 第53回日本呼吸器学会学術講演会. 2013年4月, 東京.
4. 柿内聡司, 大塚憲司, 山子泰斗, 西條敦郎, 手塚敏史, 後東久嗣, 青野純典, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 当院における間質性肺炎合併肺癌の治療の現状. 第110回日本内科学会講演会. 2013年4月, 東京.
5. Hisatsugu Goto, Atsushi Mitsuhashi, Takuya Kuramoto, Sho Tabata, Sawaka Yukishige, Masaki Hanibuchi, Soji Kakiuchi, Atsuro Saijo, Yoshinori Aono, Hisanori Uehara, Seiji Yano, Julie G Ledford, Saburo Sone, Yasuhiko Nishioka. Surfactant protein A suppresses lung cancer progression by regulating tumor-associated macrophage polarization ATS 2013 Conference. 2013年5月, Philadelphia, PA.
6. 三橋惇志, 後東久嗣, 西條敦郎, 倉本卓哉, 田畑祥, 埴淵昌毅, 矢野聖二, 曾根三郎, 西岡安彦. 悪性胸膜中皮腫同所移植マウスモデルにおける抗 VEGF 治療耐性化メカニズムの検討. 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2013年6月, 京都.
7. 黄俊, 田畑祥, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 悪性中皮腫における PAPP A の機能解析と分子標的治療法開発の検討. 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2013年6月, 京都.
8. 埴淵昌毅, 大塚憲司, 後東久嗣, 倉本卓哉, 三橋惇志, 西岡安彦, 曾根三郎, Fidler Isaiah J. Endothelin 受容体拮抗剤による肺癌脳転移抑制効果の検討. 第17回日本がん分子標的治療学会学術集会. 2013年6月, 京都.
9. 後東久嗣, 三橋惇志, 倉本卓哉, 田畑祥, 西條敦郎, 埴淵昌毅, 柿内聡司, 青野純典, 上原久典, 曾根三郎, 西岡安彦. 肺 surfactant protein A (SP-A) の肺癌進展における機能解析. 第22回日本がん転移学会学術集会・総会. 2013年7月, 松本.
10. 西條敦郎, 後東久嗣, 田畑祥, 三橋惇志, 豊田優子, 埴淵昌毅, 柿内聡司, 秋山伸一, 西岡安彦. がん細胞の遊走における thymidine phosphorylase と CXCL11 の役割. 第22回日本がん転移学会学術集会・総会. 2013年7月, 松本.
11. 西岡安彦. がん分子標的治療の基礎と臨床. 日本放射線腫瘍学会第15回放射線腫瘍学夏季セミナー(教育講演). 2013年8月, 徳島.
12. 柿内聡司, 大塚憲司, 西條敦郎, 手塚敏史, 豊田優子, 後東久嗣, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 当院における間質性肺炎合併肺癌の治療の現状. 第11回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2013年8月, 仙台.
13. 西岡安彦. 肺癌におけるベバシズマブを用いた抗血管新生療法に対する獲得耐性メカニズム. 第72回日本癌学会学術総会(International Session). 2013年10月, 横浜.
14. 手塚敏史, 豊田優子, 柿内聡司, 大塚憲司, 西條敦郎, 木下勝弘, 後東久嗣, 櫻田巧, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 当科の肺癌化学療法における short-hydration Cisplatin の忍容性に関する検討. 第51回日本癌治療学会学術集会. 2013年10月, 京都.
15. 西條敦郎, 柿内聡司, 手塚敏史, 後東久嗣, 山子泰斗, 大塚憲司, 埴淵昌毅, 西岡安彦. 当院における Bevacizumab 長期維持投与症例の検討. 第51回日本癌治療学会学術集会. 2013年10月, 京都.
16. Hisatsugu Goto, Fumitaka Ogushi, Takashi Haku, Tomoyuki Urata, Takanori Kanematsu, Soji Kakiuchi, Masaki Hanibuchi, Saburo Sone, Yasuhiko Nishioka. Phase II study of S-1 with patient-reported outcome evaluation in elderly patients with advanced non-small cell lung cancer. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013年11月, Yokohama, Japan.
17. Masaki Hanibuchi, Sun-Jin Kim, Kenji Otsuka, Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto, Yasuhiko Nishioka, Isaiah J. Fidler. Therapeutic efficacy of endothelin receptor blockade on experimental brain metastases of human non-small cell lung cancer. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013年11月, Yokohama, Japan.
18. Atsushi Mitsuhashi, Hisatsugu Goto, Takuya Kuramoto, Sho Tabata, Sawaka Yukishige, Masaki Hanibuchi, Soji Kakiuchi, Atsuro Saijo, Yoshinori Aono, Hisanori Uehara, Seiji Yano, Julie G Ledford, Saburo Sone, Yasuhiko Nishioka. Surfactant protein A suppresses progression of human lung adenocarcinoma in nude mice via modulating host immune response. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 2013年11月, Yokohama, Japan.

【その他特筆事項】

なし

研究区分	一般共同研究	
研究課題	蛍光バイオセンサーマウスと Gan マウスを用いた胃の可視化	
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部病理学 I・教授・清川悦子
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部病理学 I・助教・吉崎尚良
	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部病理学 I・研究員・春田優衣
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>胃癌モデルマウスである Gan マウスにおける炎症細胞の動態の試験管内・生体内観察を目的とする。個々の臓器によって手技や観察のノウハウがあるが、現在のところ胃を生きのまま観察した報告はなく、そのノウハウを確立することが独自であり、またこれまで観察できなかった現象を見つける早道となる。胃は小腸にくらべて心肺に近く、心拍や呼吸に撮影が影響されるという困難が予想される。体位や臓器露出の方向を詳細に検討することで克服し、美しい画像を取得し、解析する。</p>	
【研究内容・成果】	<p>① マウス胃のイメージング方法の確立</p> <p>左図のようにマウスを吸入麻酔下にて開腹し、胃壁前面を露出させる。ここへ、吸引固定装置のついた対物レンズを当て、正立型 2 光子顕微鏡下で観察した。</p> <p>下図ではリン酸化酵素 ERK の活性を検出するマウス (Eisuke) の胃を筋層から内腔へ向けて Z 軸を徐々にずらして得た連続画像の一部である。暖色は酵素活性の高い部位、寒色は低い部位を示す。心肺による画像のずれはほとんどなかったが、これは吸引固定装置の効果であると考えられる。</p> <p>左から固有筋層 (内輪外縦の筋層が交差している)、胃腺の始まりが下部に見え始め (左 2 番目)、それが続いていく (右 3-4 枚目) のがわかる。小腸では絨毛側まで画像を得ることが出来るが、胃の場合は筋層が厚く胃腺窩までは届かないことがわかった。胃の場合は小腸と異なり、幹細胞は胃腺の頸部・峽部 (内腔寄り) に位置していると考えられているので、現方法では、上皮の悪性化の初期を捉えることは出来ないと考えられる。更なる改良が必要であると考えられた。しかし、粘膜固有層の炎症性細胞などの動態はこの方法で追跡可能であると考えられた。</p>   <p>胃の大湾側から胃内腔を露出しレンズを胃の内腔に直接当てる方法も試みた。陰窩の画像は得られるもの、マウスは観察開始から 40 分で死亡してしまい、この方法も改良が必要であることがわかった。</p>	
【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

研究区分	一般共同研究	
研究課題	Gan (Wnt・PGE2 活性化) マウスと c-myc 活性化マウス (FIR+/-) の交配による胃癌悪性化メカニズムの検討	
研究代表者	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・准教授・松下一之
研究分担者	所属・職名・氏名	千葉大学医学部附属病院・助教・佐藤守
	所属・職名・氏名	千葉大学大学院医学研究院・教授・野村文夫
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	種々の臓器で c-myc の発現増大している「FIR ^{+/-} マウス」と金沢大学がん研究所 大島正伸教授が作製した「Gan マウス」を交配させ (掛け合わせ)、ヒト悪性化胃がんを分子機序から再現する新規悪性胃がん病体モデル (Gan・FIR ^{+/-} マウス) を作製して、胃癌の悪性化に関わるメカニズムを調べることを研究目的とした。	
【研究内容・成果】	Gan マウスに発生する比較的低悪性の胃癌が、FIR ^{+/-} (c-myc が高発現している) と交配することにより浸潤、転移能が活性化されるかどうかを調べるため島教授との共同研究を計画し H25 の共同研究に採択されました。Gan・FIR ^{+/-} マウスで性質変化した胃癌を解析する事により、我々が従来から研究している、胃がんの悪性化に関わる c-myc (あるいは FIR) の遺伝子群を同定することも予定しました。「Gan マウス」は熊本大学動物センターに保存されており、本研究では Gan マウス (B6、受精卵あるいは胚細胞) を千葉大動物舎に輸送して生体にした後 (千葉大・幡野教授)、FIR+/-マウス (C57BL/6) と交配する必要があります。そのための千葉大学における倫理書類や動物実験、遺伝子組み換え実験を行うための倫理審査、および金沢大学—千葉大学間の共同研究契約の手続きを行い、必要な契約書類、倫理審査が全て終了し承認されました。我々はこれまでの検討で FIRヘテロ欠損マウス (FIR ^{+/-}) と p53ホモ欠損マウス (p53 ^{-/-}) を掛け合わせると血液がん (悪性リンパ腫・白血病) が発生することを確認しています (論文準備中です)。Gan マウスに発生する比較的低悪性の胃癌が、FIR ^{+/-} (c-myc が高発現している) と交配することにより浸潤、転移能が活性化する可能性は高いと考えています。今後交配を進めるとともに、癌の発生に関しては発癌化合物などの刺激を与えて発生頻度の差を検討することも考えています。	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Matsushita K</u>, Tamura M, Tanaka N, Tomonaga T, Matsubara H, Shimada H, Levens D, He L, Liu J, Yoshida M, and Nomura F. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression. <i>Mol Cancer Res.</i> Jul;11(7):689-98. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0673. Epub 2013 Apr 17. 2. Rahmutulla B, <u>Matsushita K</u>, Satoh M, Seimiya M, Tsuchida S, Kubo S, Shimada H, Otsuka M, Miyazaki M, and Nomura F. Alternative splicing of FBP-interacting repressor coordinates c-Myc, P27Kip1/cyclinE and Ku86/XRCC5 expression as a molecular sensor for bleomycin-induced DNA damage pathway. <i>Oncotarget</i> December 21, 2013 <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Kajiwara T, <u>Matsushita K</u>, Itoga S, Nomura F. SAP155-mediated c-myc suppressor FBP-interacting repressor splicing variants as colon cancer screening biomarkers. Am Assoc Clinical Chem. Houston, USA. 2013. July 29-Aug 1. (発表 2013. July 30) 2. 松下一之、石塚寿子、糸賀 栄、野村文夫。大腸癌新規腫瘍マーカー候補：末梢血中の c-myc 転写抑制因子 FIR のスプライシングバリエント FIRΔexon2 mRNA の検出。A novel diagnostic value of splicing variant form of c-myc transcriptional repressor FUSE-Binding protein-Interacting repressor for colorectal cancers。第 20 回日本遺伝子診療学会 (浜松)。2013. 7. 18-20 (発表 7. 18)。 3. <u>Kazuyuki Matsushita</u>, Minoru Yoshida, Mamoru Satoh, Hisahiro Matsubara, Hideaki Shimada, Takeshi Tomonaga, Fumio Nomura. Interactions between SAP155 and FUSE-binding protein-interacting repressor bridges c-Myc and P27Kip1 expression. 72st JCA meeting. October 4th, 2013(Pacifico Yokohama) <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がん病体モデルの作製と解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・主任研究員・大木理恵子
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>本研究により、悪性胃がんの良いモデルマウスを作製するとともに、胃がんの悪性化メカニズムを解明し、胃がん患者と死亡者を減らす事につながる新しい胃がん治療薬／診断薬の開発につながる研究成果を得たいと考えている。</p> <p>大島正伸教授が作製した胃がんモデルマウスである Gan マウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)は、100%の頻度で胃がん(intestinal adenocarcinoma)を発症する。また、この際に生じた癌は、悪性度が低く、p53 遺伝子は野生型である事がこれまでに判明している。そこで、本研究では Gan マウスを p53 欠損マウスと掛け合わせ、ヒト悪性化胃がんを分子順序から再現する新規悪性胃がん病体モデルを作製する。さらに、このマウスで発症したがんを解析する事により、胃がんの悪性化に関わる p53 標的遺伝子群を同定する。このようにして選出されたがん悪性化を抑制する p53 標的遺伝子は、細胞レベル、遺伝子欠損マウスを使った個体レベルでの機能解析を行う。</p>	
【研究内容・成果】	<p>これまでに p53 遺伝子欠損 Gan マウスの作製に成功している。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 消化器がんモデルマウス(K19-Wnt1/C2mE transgenic mouse)と p53 欠損マウスを掛け合わせる。p53 を野生型で持つマウス、p53 を持たないマウスから生じたがん組織を採取した。p53 欠損 Gan マウスの胃癌組織では、通常の Gan マウスには見られない浸潤が認められ、p53 欠損が実際にがんの悪性化を引き起こす事が示された。 2. 得られた癌組織より、mRNA を精製した。p53 を野生型で持つ Gan マウスの胃癌では p53 が活性化しており、p53 標的遺伝子が転写誘導されていた。今後、マイクロアレイ発現解析により、p53 依存性に発現する遺伝子群を同定する。 3. 申請者は、ゲノムワイドな p53 結合部位を ChIP-chip 解析により同定している。そこで、p53 依存性に発現する遺伝子の中から、p53 結合が認められる遺伝子、すなわち p53 の直接の標的遺伝子を同定する。 4. 同定した遺伝子が、胃がんの発生及び悪性化とどのように関わるか解析する。 <p>今後、さらに詳細に p53 欠損 Gan マウスで発症した癌を解析することにより、胃癌の悪性化をいかにして p53 が抑制しているか明らかにしたいと考えている。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Rieko Ohki (corresponding author), Kozue Saito, Yu Chen, Tatsuya Kawase, Yukie Aita, Nobuyoshi Hiraoka, Raira Saigawa, Maiko Minegishi, Goichi Yanai, Hiroko Shimizu, Shinichi Yachida, Naoaki Sakata, Akihiko Yokoyama, Ryuichiro Doi, Tomoo Kosuge, Kazuaki Shimada, Benjamin Tycko, Toshihiko Tsukada, Yae Kanai, Shoichiro Sumi, Hideo Namiki, Yoichi Taya, Tatsuhiro Shibata and Hitoshi Nakagama. PHLDA3 is a novel tumor suppressor of pancreatic neuroendocrine tumors. Manuscript submitted.</p> <p>【学会発表】</p> <p>第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2013.12 がん抑制遺伝子 p53 機能喪失を伴った新規悪性胃がんモデルマウスの作製と解析 大塚 旬子、江澤 一星、並木 秀男、安部 良、大島 正伸、大木理恵子</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	炎症性腫瘍における SKAP2 の機能解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	秋田大学大学院医学系研究科・教授・田中正光
研究分担者	所属・職名・氏名	秋田大学大学院医学系研究科・助教・島村真太郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>「癌組織に集積する癌随伴マクロファージの動態に、SKAP2 がどう関わるのか明らかにする。」</p> <p>腫瘍におけるチロシンリン酸化蛋白質を精製する先行研究において、最近 SKAP2 を同定した。SKAP2 は Src の基質となるアダプター蛋白質で T リンパ球やマクロファージでの発現が知られている。実験的に炎症性胃癌を 100%誘発する Gan マウスをベースに、SKAP2 の有無が癌随伴マクロファージの癌組織への集積、炎症の程度にどう影響するかを判定したい。</p> <p>炎症性癌の進展を左右する癌随伴マクロファージの、移動能やその他の機能に影響の高い分子であれば治療標的として有用性が高い。</p>	
【研究内容・成果】	<p>SKAP2 欠損マウスと Gan マウスを用いて以下の実験を行った。</p> <p>SKAP2 遺伝子破壊マウス: SKAP2 Gt (VICTR20) 21Lex は Jackson ラボから入手した。同マウスは Gene trap 法により SKAP2 遺伝子座の破壊が確認されており、外見上の特徴は特にみられないが B リンパ球の基質接着が減弱する形質が報告されている。ホモマウスを作製後、バッククロスにより異常な形質が出現していないことを確認し、実験および Gan マウスとの交配に使用した。まず SKAP2 遺伝子破壊マウスから各臓器を採取し、脾臓や肺、肝臓などマクロファージの多く存在する組織で SKAP2 タンパク質の発現が消失している事を確認した。同マウスの腹腔マクロファージを採取し、血清濃度勾配による <i>in vitro</i> Transwell アッセイと 3 次元ゲル浸潤アッセイを行った。野生型マウスに比較して SKAP2 マウスのマクロファージは細胞移動能、ゲル浸潤能がいずれも低下しており、M-CSF/IL-4 など細胞移動促進因子に対する応答性も低下していた。その結果、複数の胃がん細胞とマクロファージの共培養において、マクロファージの SKAP2 発現の消失により、がん細胞自身のゲル浸潤性も抑制される事が観察された。</p> <p>Gan マウスは熊本大学 CARD から供給を受け、秋田大学には H25 年 10 月下旬に搬入され、施設の検疫後 1 2 月から使用可能になった。K19-Wnt1, K19-C2mE のダブルヘテロ (Gan) マウスの個体数を増やす交配を続ける一方、SKAP2 遺伝子破壊マウスと Gan マウスの交配により SKAP2 ノックアウト Gan マウスを作成中である。</p> <p>Gan マウス導入までに予想外に時間を要したため、同マウス個体を用いたアッセイは今後継続して成果を得る予定である。コントロールとしての Gan マウスと、SKAP2 欠損 Gan マウスにおいて自然感染により炎症性胃がんを発症させ、生じた胃がん組織へのマクロファージの侵入・集積状態を、M2 マクロファージのマーカーと SKAP2 に対する抗体を用いて免疫組織学的に検索する。SKAP2 の欠損により、<i>in vitro</i> での結果を反映して癌随伴マクロファージの癌組織への集積が阻害されているか、炎症反応の程度に差がみられるか、またその結果として胃癌の局所浸潤や個体の生存期間に差がみられるかを判定する。</p> <p>当課題に関しては秋田大学の組み換え DNA 実験委員会と動物実験委員会に関する承認番号を取得して実験を行った (承認番号 a-1-2435)。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>なし</p>	
	<p>【学会発表】</p> <p>SKAP2 を発現する間質マクロファージの癌の浸潤への影響の解析 島村真太郎、田中正光 第 7 2 回日本癌学会学術総会</p>	
	<p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん幹細胞と非がん幹細胞間の細胞競合
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・教授・藤田恭之
研究分担者	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・助教・梶田美穂子
	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・博士研究員・山内肇
	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・博士研究員・北本祥
	所属・職名・氏名	北海道大学遺伝子病制御研究所・大学院生・大岡敦子
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>研究代表者の研究室では、正常細胞と変異細胞が生存を争う細胞競合と呼ばれる現象に焦点を充てて研究を進めてきた。テトラサイクリン依存性に癌タンパク質（Ras、Src など）の発現あるいは癌抑制タンパク質（Scribble など）の shRNA の発現を誘導できる上皮培養細胞系を確立し、哺乳類において正常上皮細胞と変異細胞間で様々な現象が起こることを世界で初めて明らかにしてきた。一方腫瘍が一般的な細胞の集まりではなく、組織幹細胞様の役割を担うがん幹細胞と、この細胞から産み出され、腫瘍の大半を形成する、分化した非がん幹細胞が存在していることが明らかになりつつある。本研究申請では、がん幹細胞と非がん幹細胞間の細胞競合に焦点を当て、がん進展の新たなメカニズムの解明を目指す。</p>	
【研究内容・成果】	<p>我々はまず、がん幹細胞マーカーCD44 を多く発現するヒト浸潤性悪性乳がん（悪性度高）由来の MDA-MB231 細胞とヒト乳腺良性腫瘍（悪性度低）由来の MCF7 細胞を混合培養し、それぞれの細胞を単独培養した時と比較解析することによって、混合培養条件下でそれぞれの細胞に生じる非細胞自律的な現象を探索した。</p> <p>まず、MCF7 細胞に囲まれた MDA-MB231 細胞は、単独で培養した MDA-MB231 細胞に比べて、細胞増殖能が低く、一方、細胞運動能や細胞浸潤能が亢進することが明らかとなった。また、side population assay にて混合培養条件下の MDA-MB231 細胞において、Hoechst dye の細胞内への取り込みが減少していることが分かった。さらに、抗 CD44 抗体にて免疫染色をした結果、MCF7 細胞に囲まれた MDA-MB231 細胞において、CD44 が形質膜に濃縮して局在することが明らかとなった。これらのデータは、MCF7 細胞に囲まれることによって、MDA-MB231 細胞ががん幹細胞としての特質を複数獲得していることを示唆している。さらに、siRNA によって CD44 をノックダウンした MDA-MB231 細胞を MCF7 細胞で取り囲んだところ、細胞非自律的な細胞増殖の低下は観察されなかった。このことは、CD44 の発現が、悪性度の異なる腫瘍細胞間の相互作用に、重要な役割を果たしていることを示唆している。</p> <p>続いてこれらの現象の普遍性を明らかにするために、前立腺腫瘍細胞 LNCap 細胞（悪性度低）、DU145 細胞（悪性度中）、PC3 細胞（悪性度高）を混合培養し、CD44 の局在を免疫染色法にて調べた。すると、LNCap 細胞に囲まれた DU145 細胞や PC3 細胞において、単独培養時と比較して、CD44 の形質膜への局在が亢進していることが明らかとなった。これにより、乳腺腫瘍細胞のみならず、前立腺種細胞においても、悪性度の低い細胞に囲まれた悪性度の高い細胞において、がん幹細胞の特質を獲得することを示すデータが得られた。これは、heterogeneity の高い腫瘍組織において、悪性度の低い細胞との境界が、悪性度の高い細胞にとってがん幹細胞性獲得のニッチになっている可能性を示唆している。</p> <p>今後は細胞非自律的に生じる CD44 の形質膜局在を制御するメカニズムを解明するとともに、ヒトがん病理組織を調べることにより、細胞培養系で観察されたこれらの現象が実際のヒトがん組織でも起こっているかについて検証していきたい。</p>	
【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

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん幹細胞モデルにおける細胞内温度分布の可視化
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学大学院薬学系研究科・助教・岡部弘基
研究分担者	所属・職名・氏名	東京大学大学院薬学系研究科・助教・内山聖一
	所属・職名・氏名	金沢大学がん進展制御研究所・特任助教・北嶋俊輔
	所属・職名・氏名	金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・大学院生・村中勇人
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>熱（温度）は細胞内におけるあらゆる化学反応を支配する物理量であり、化学反応の一種である代謝にも重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これまでは、その測定技術の欠如により、細胞における熱と代謝の関係は一切不明であった。我々は、この問題を克服すべく、細胞内局所の温度変化を追跡可能な細胞内温度イメージング法を開発した。本研究では、この革新的技術を用いて、正常細胞、がん細胞およびがん幹細胞における細胞内温度分布の違いを検証することにより、がん特異的な代謝と温度の関係を明らかにし、生物学における新たなアプリケーションとしての細胞内温度イメージング法の応用性や発展性を探ることとした。</p>	
【研究内容・成果】	<p>【研究内容】 高橋研究室において細胞内温度測定に用いる細胞を調整し、我々の研究室に搬入後、温度感受性プローブをマイクロインジェクションにより細胞に導入、落射型照明蛍光顕微鏡・画像解析システムにより細胞内蛍光強度の定量的解析を行った。</p> <p>【研究成果】 まず、細胞間の温度差を厳密に検討するため、細胞内温度比較法の開発を行った。温度感受性プローブは温度に依存的な蛍光変化を示すが、マイクロインジェクションでは細胞に導入するプローブ濃度を一定にすることが出来ないため、単純な蛍光強度の比較では細胞間の温度差を評価できない点が難点である。そこで、温度感受性プローブと共にプローブ濃度補正用の蛍光色素（Alexa647 標識デキストラン）を導入し、両者の蛍光強度比から細胞の自発的溫度を比較するという手法を考案した。COS7 細胞等の複数の細胞においてその有用性が確認できたため、この方法を採用することにした。</p> <p>次に、がん細胞は正常細胞と比較して高温であることが報告されているが、これまでその実態は一切不明であったため、上記の手法を用いて、正常細胞およびがん細胞における細胞内温度を測定・比較した。複数の細胞株における細胞内温度を測定した結果、正常細胞と比較してがん細胞の細胞内温度が高い可能性を示唆する結果が得られた。</p> <p>さらに、がん細胞とがん幹細胞様の細胞における細胞内温度の差異を明らかにするため、高橋教授らの研究グループが確立したがん幹細胞モデルを用いて細胞内温度を比較することにした。彼らは、p53 ノックアウトマウス由来の低悪性度肉腫細胞において Rb を追加的にノックダウンすることにより、がん幹細胞様の細胞群（高い造腫瘍能および抗がん剤への抵抗性を示す亜集団）が誘導されることを見出し、この細胞集団を特異的に濃縮かつ形質を維持したまま培養するシステムを確立し、様々な代謝解析を行っている。このモデルにおいてもどのがん細胞とがん幹細胞様の細胞の細胞内温度を測定・比較したところ、がん幹細胞の細胞内温度が顕著に低いという結果が得られた。そこで、彼らがこれまでに行った代謝解析の結果（トランスクリプトーム解析、マイクロアレイ解析、メタボローム解析、細胞外フラックス解析、代謝物トレーサー解析等）と照合したところ、がん幹細胞における細胞内温度の低下は、ミトコンドリア活性の指標である酸素消費速度（oxygen consumption rate, OCR）の低下と相関することが明らかになった。</p> <p>これらの結果から、がん細胞が正常細胞と比較して細胞内温度が高く、一方で、がん幹細胞では細胞内温度が低い可能性が示唆された。また、これらの細胞内温度の差異はミトコンドリアの活性の差異に起因している可能性が示唆された。</p>	
【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

研究区分		一般共同研究
研究課題		細胞外フラックス測定機器を用いたがん幹細胞特異的代謝様式の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院農学研究科・教授・河田照雄
研究分担者	所属・職名・氏名	京都大学大学院農学研究科・助教・高橋信之
	所属・職名・氏名	京都大学大学院農学研究科・助教・後藤剛
受入担当教員	職名・氏名	教授・高橋智聡
【研究目的】	<p>申請者らは、脂肪細胞分化における核内受容体の機能研究を通して、食品に含まれる天然化合物から、核内受容体 PPARα/γの活性化を介して細胞内脂質代謝を調節するものを見いだしてきた。最近、PML-PPARγ-FAO (脂肪酸化) 経路が、幹細胞性を維持するために必要であることが明らかになっている。これらの知見は、食品中の天然物化合物が有用な創薬資源になり得ることを示唆する。本研究では、高橋教授のグループで開発されている pRb 追加欠損によってがん幹細胞様の挙動を誘導するモデルを用い、がん幹細胞に特異的な脂質代謝プロファイルの解析を行う。本共同研究により、がん幹細胞に特徴的な脂質代謝様式を明らかにし、これに関わる分子を標的にする天然化合物を見出すことを目指す。</p>	
【研究内容・成果】	<p>p53 ノックアウトマウス由来軟部腫瘍細胞において pRB を追加欠損することによって誘導するがん幹細胞モデル細胞において、脂肪酸代謝を詳細に解析し、幹細胞性維持に関わる分子の特定を試みた。特に、脂肪酸合成に至る中心炭素代謝経路に重点を置き、研究を進めた。</p> <p>中心炭素代謝とは、解糖系、グルタミン代謝経路、TCA 回路の総称であり、脂肪酸合成に必要な Acetyl-CoA を供給する。一方、幹細胞では脂肪酸酸化が Acetyl-CoA の主要な供給源となるといふ知見が得られていることから、中心炭素代謝を介した Acetyl-CoA 量が抑制されていると推測した。そこで、本モデル細胞における中心炭素代謝を解析した。我々が解析したがん幹細胞モデルでは、細胞外へ放出される乳酸量、ミトコンドリアの酸素消費量が顕著に減少すること、そして、新規合成された脂肪酸量も減少することが判明した。さらに、グルコース由来の炭素が新規合成脂肪酸へ取り込まれる率が低下していたが、グルタミン由来の炭素に関しては変化が無いことが明らかになった。これらのことから、我々の解析したがん幹細胞モデルにおいては、新規脂肪酸合成が抑制されていると同時に、炭素供給源がグルコースからグルタミンへシフトしていることが示唆された。そこで、中心炭素代謝に関連する遺伝子発現を全 RNA シーケンスで解析した。その結果、解糖系の分子の 1 つである Phosphoglycerate mutase 2 (Pgam2) の発現が、がん幹細胞で顕著に低下していることが判明した。</p> <p>次に、Pgam2 は解糖系の 1 分子であることから、Pgam2 の代謝調節機能とその発現低下の生理的意義を明らかにすることを試みた。本モデル細胞において Pgam2 を過剰発現させると、新規合成脂肪酸へのグルコースの取り込みが回復した。また、浮遊培養条件下でのスフェア形成が抑制されることが判明した。さらに、Pgam2 の過剰発現により、B6 マウスへの同所・同種移植における腫瘍形成が抑制されることが判明した。</p> <p>以上の研究により、がん幹細胞の中心炭素代謝および脂肪酸代謝が Pgam2 の発現を介して調節されており、Pgam2 は、がん幹細胞の機能調節に必須であることが明らかになった。</p>	
【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

研究区分		一般共同研究
研究課題		ヒトがん細胞を用いた MMP-9 阻害性抗転移剤の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授・宇都義浩
研究分担者	所属・職名・氏名	徳島大学大学院先端技術科学教育部・大学院生・田中涼
	所属・職名・氏名	徳島大学大学院先端技術科学教育部・大学院生・芝一休
	所属・職名・氏名	徳島大学大学院先端技術科学教育部・大学院生・玉谷大
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤博、准教授・遠藤良夫
【研究目的】	<p>がんはがん細胞だけでなく、血管や結合組織、免疫担当細胞といったがん周囲組織との相互作用の上で成り立っており、治療戦略としてがんの縮小ではなく再発期間の延長という観点から、がん転移を抑制できる血管新生阻害剤は最適な制癌剤であると思われる。平成 23-24 年度の共同研究において、低酸素サイトキニン誘導体 TX-2137 は、Akt および MMP-9 産生の抑制を介して抗転移活性を示すことを明らかにした。また、TX-2137 をリード分子として新たに分子設計・合成した TX-2282 が TX-2137 よりも強い抗転移活性を有することを示した。そこで、平成 25 年度は、中性子増感作用を有するホウ素原子を導入した新規抗転移剤の開発を目的とする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>TX-2137 のホウ素含有誘導体として、ベンゼン環をフェニルボロン酸基に置換した化合物 1 および 2 を分子設計・合成した。フェニルボロン酸は中性子捕捉能とシアル酸に対する強い反応性を有し、フェニルボロン酸基を導入することで中性子捕捉療法 (BNCT) の薬剤としての有用性とシアル酸を含有する糖タンパク質を大量に発現する転移性腫瘍に対する特異性が期待できる。</p> <p>TX-2137 および化合物 1 の <i>in vitro</i> における細胞増殖抑制活性について、マウス黒色腫 B16-F10、マウス肺癌 LLC、ヒト胃癌 KKLS および MKN-45、ヒト胎児腎細胞 293T、ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞を用いて WST-1 アッセイより評価したところ、TX-2137 の数 μM という IC_{50} 値と比較して化合物 1 は 50~100 μM 以上と低い活性を示した。また、TX-2137 は MKN-45 細胞に対してアポトーシスを誘導するのに対し、化合物 1 は DNA ポリメラーゼ阻害剤に観察される細胞の膨化を引き起こすもののアポトーシスは誘導せず、サイトスタティックな作用に止まった。TX-2137 および化合物 1 の MMP-9 産生に対する影響について HT1080 細胞を用いたザイモグラフィアッセイにて評価したところ、TX-2137 は MMP-9 産生を抑制するのに対し、化合物 1 は 100 μM まで MMP-9 の産生阻害活性は認められなかった。また、マウス黒色腫 B16-F10 細胞を移植した発育鶏卵モデルを用いて抗転移活性を評価したところ、TX-2137 は有意な抗転移活性を示したのに対し、化合物 1 は全く抗転移活性を示さなかった。さらに、核融合型小型中性子発生装置を用いて、化合物 1 の中性子併用時の抗腫瘍活性についてヒト乳癌細胞 MCF-7 および T-47D を用いて WST-1 アッセイより評価したところ、中性子による抗腫瘍活性の増強は確認されなかった。以上の結果より、化合物 1 はボロン酸基の水溶性により細胞内取込率が低下したことで薬理活性が失われたと示唆される。今後は、化合物 2 および化合物 1 のボロン酸基を保護した誘導体を分子設計・合成し、抗転移活性を評価する予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1) Abe C, Uto Y, Kawasaki A, Noguchi C, Tanaka R, Yoshitomi T, Nagasaki Y, Endo Y, Hori H, Evaluation of the <i>in vivo</i> antioxidative activity of redox nanoparticles by using a developing chicken egg as an alternative animal model, <i>Journal of Controlled Release</i>, 182C, 67-72, 2014.</p> <p>2) Kuchiike D, Uto Y, Mukai H, Ishiyama N, Abe C, Tanaka D, Kawai T, Kubo K, Mette M, Inui T, Endo Y, Hori H, Degalactosylated/desialylated human serum containing GcMAF induces macrophage phagocytic activity and <i>in vivo</i> antitumor activity, <i>Anticancer Research</i>, 33(7), 2881-2885, 2013.</p> <p>【学会発表】</p> <p>・宇都義浩、遠藤良夫、佐藤 博、堀 均: Development of antimetastatic hypoxic cytotoxin TX-2137 targeting for Akt/protein kinase B、第 72 回日本癌学会学術総会、横浜市、2014 年 9 月 25-27 日</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	生体がん組織における MT1-MMP のインビボ機能解析のための核医学分子プローブ開発	
研究代表者	所属・職名・氏名	京都大学大学院薬学研究科・助教・天満敬
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤博
【研究目的】	<p>近年、がんの早期診断を目的として、PET、SPECT を用いた核医学イメージング法が注目されている。PET、SPECT は用いる分子プローブが標的とする機能分子の非侵襲的画像化を可能とすることから、生体内機能分子のインビボ機能解析に有効な手段となる。</p> <p>がんの浸潤・転移において細胞外マトリクス (ECM) や基底膜の分解は必須のステップである。MT1-MMP は、広範囲の ECM 構成成分に対する分解活性をもつことに加え、その発現はがんの悪性度と相関することから、有望なイメージング標的である。しかし、生体がん組織における MT1-MMP の非侵襲的解析・診断を可能とする核医学分子プローブとして十分なものは未だ報告されていない。</p> <p>我々はこれまでに、抗 MT1-MMP 抗体あるいは抗 MT1-MMP 単鎖抗体を母体とした核医学分子プローブを開発し基礎的な有効性を示してきた。本研究ではこれを基盤としてさらに発展させ、抗体プローブよりも取り扱いが容易で比放射能の大幅な向上が期待できるペプチドを母体とする MT1-MMP 標的核医学分子プローブの開発を行った。</p>	
【研究内容・成果】	<p>本研究では、分子プローブの母体となるペプチドを選択し、化学合成・標識合成を経て、インビトロ評価・インビボ評価を行った。</p> <p>1. 分子プローブの設計・合成・親和性評価</p> <p>MT1-MMP への高い結合性が報告されているペプチド配列 (J Control Release 150:248:2011) を基に、SPECT 用核種である放射性ヨウ素 ($^{123/125}\text{I}$) を導入したペプチドプローブを設計した。放射性ヨウ素の導入部位としてペプチド配列中の 2 つの Lys 側鎖、あるいは N 末端に Cys を配し側鎖チオール基を介した導入を考案した。L 体アミノ酸から成るペプチドは生体内で速やかに分解を受けることが考えられたことから、D 体アミノ酸を用いたペプチドも併せて設計した。放射標識前駆体ペプチドは Fmoc 固相合成法により合成し質量分析法により合成を確認した。非放射性ヨウ素を用いた標品化合物については液相合成法を上記に続けて行い、質量分析法により合成を確認した。固相化 MT1-MMP タンパク質に対する結合親和性を調べたところ、N 末端標識体の有効性が示唆されたことから、N 末端標識体 (L 体、D 体) について以降の標識検討を行った。</p> <p>2. 分子プローブの標識合成・安定性評価</p> <p>放射標識は放射性ヨウ素導入試薬として有用な [$^{123/125}\text{I}$]iodophenyl maleimide ([$^{123/125}\text{I}$]IPM) を用いることとした。放射標識は室温 30 分の反応で速やかに進行し、逆相 HPLC 法で調べた放射化学的純度は 99% 以上であった。マウス血漿中でインキュベートしプローブの生体内安定性を調べたところ所期の通り D 体アミノ酸からなるペプチドプローブにおいて高い安定性が認められた。</p> <p>3. 担がんマウスを用いた体内分布実験</p> <p>皮下移植による担がんマウスを作製し、N 末端標識体 (L 体、D 体) を尾静脈内投与したのちの生体内分布について臓器摘出法により調べた。動物実験は京都大学動物実験委員会の承認を受けた後、関連法規・規則を遵守して行った。その結果、D 体 N 末端標識プローブにおいてイメージング指標である腫瘍筋肉放射能比の経時的な増加が認められた。以上のことから、新たに開発した D 体 N 末端標識プローブはがんにおける MT1-MMP の早期イメージングに有効である可能性が示された。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	<p>1. 近藤 直哉、天満 敬、佐治英郎、がんの in vivo 診断を目的とした MT1-MMP 標的核医学イメージングプローブの開発、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月 3 日</p> <p>2. 天満 敬、佐治英郎、Molecular imaging probes for in vivo functional diagnosis of cancer、第 72 回日本癌学会学術総会 (横浜)、2013 年 10 月 4 日</p>
	【その他特筆事項】	なし

研究区分	一般共同研究
研究課題	標的 MMPs の活性を特異的に制御する機能性分子の開発
研究代表者	所属・職名・氏名 横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科・准教授・東昌市
受入担当教員	職名・氏名 教授・佐藤博
【研究目的】	悪性がんの組織内で高発現しているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) は、がん細胞の浸潤性増殖および転移を支えることから、がん治療の有望な標的分子である。しかし、従来型 MMP 阻害剤は特異性が低く、臨床試験の過程で様々な副作用を示したため、それらを抗がん剤として開発することに成功していない。そこで本共同研究では、個々の MMP の酵素活性あるいはそれらの一機能の特異的に阻害するインヒビターを創出することにより、副作用の極めて少ないがん治療薬の開発へ繋げることを目指した。
【研究内容・成果】	<p>今回、β-アミロイド前駆体タンパク質 (APP) に由来する 10 残基ペプチドインヒビター (APP-IP と命名) が MMP-2 に対し、高い選択性を持つこと、および MMP-2 選択性に関与する APP-IP のアミノ酸残基が私達のこれまでの研究で明らかになっていることを利用して、APP-IP を改変し、MMP-7 および MMP-9 のそれぞれに対して選択性を持つペプチドインヒビターの開発を試みた。APP-IP の改変方法としては、選択性に関与するアミノ酸残基を一つずつ 20 種のアミノ酸を網羅するようにランダム変異を導入し、標的 MMP との親和性獲得を指標に選別を行った。選別の方法としては、APP-IP 改変体が大腸菌の外膜タンパク質との融合分子として、大腸菌表層にディスプレイさせる方法、および APP-IP 改変体を GST 融合タンパク質として菌体内に発現させ、各クローンの溶解物について標的 MMP をリガンドとしたリガンドプロット法を用いて親和性を調べる方法を比較した。その結果、リガンドプロット法を用いる方法が変異導入後の親和性上昇を検出するのに有効であることが判明した。この方法により MMP-9 に対する親和性を獲得したペプチド 2 種、MMP-7 に対する親和性ペプチド 1 種を得た。今後これらのペプチドと各 MMP に対して親和性を持つ生体内物質を組み合わせ、より特異性の高いインヒビターを開発する予定である。</p> <p>一方、私達は、がん細胞表層のコレステロール硫酸に MMP-7 が結合すると、近傍にある膜タンパク質を切断し、がん細胞の転移能を顕著に上昇させることを見出してきたが、MMP-7 によって切断される膜タンパク質は未同定であった。今回、がん細胞の表層タンパク質をビオチン標識した後、MMP-7 処理を行い、培養液中に切り出されてくるビオチン標識されたタンパク質断片を精製した。これらをトリプシン消化→質量分析を行うことにより、いくつかの膜タンパク質が MMP-7 の基質となっていることを明らかにした。今後、これらの細胞表層タンパク質の中でがん細胞の転移能上昇に関与するタンパク質の同定を試みる予定である。</p>
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Shouichi Higashi, Tomokazu Hirose, Tomoka Takeuchi, and Kaoru Miyazaki (2013) Molecular design of a highly selective and strong protein inhibitor against matrix metalloproteinase-2 (MMP-2). <i>J. Biol. Chem.</i> 288, 9066-9076 2. Hiroki Sato, Jun Oyanagi, Eriko Komiya, Takashi Ogawa, Shouichi Higashi, and Kaoru Miyazaki (2014) Amino-terminal fragments of laminin γ2 chain retract vascular endothelial cells and increase vascular permeability. <i>Cancer Sci.</i> 105, 168-175 3. Go Kamoshida, Takashi Ogawa, Jun Oyanagi, Hiroki Sato, Eriko Komiya, Shouichi Higashi, Kaoru Miyazaki, and Tsutomu Tsuji (2014) Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). <i>Clin. Exp. Metastasis</i> 31, 285-291 4. Eriko Komiya, Hiroki Sato, Naoko Watanabe, Marii Ise, Shouichi Higashi, Yohei Miyagi, and Kaoru Miyazaki (2014) Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin αvβ3. <i>Cancer Med.</i> in press <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 佐野 未奈、東 昌市：極めて特異性の高いMMP-2インヒビタータンパク質の分子設計とそのin vitroがん細胞浸潤に及ぼす効果の解析。第18回日本病態プロテアーゼ学会学術集会（大阪）、演題番号23、2013年8月16-17日 Young Investigators Award を受賞 2. 佐野 未奈、小柳 潤、宮崎 香、東 昌市：3次元浸潤モデル系を用いたMMP-2特異的インヒビターのがん細胞浸潤抑制効果の解析。第86回日本生化学会大会（横浜）、演題番号 1T10p-10 および 2P-396、2013年9月11-13日 3. 鴨志田 剛、小川 崇、小柳 潤、佐藤 拓輝、古宮 栄利子、東 昌市、宮崎 香、斧 康雄、辻 勉：細胞外マトリックスタンパク質ラミニン-332による単球からのマトリックスプロテイナーゼ-9産生調節。第86回日本生化学会大会（横浜）、演題番号 1T11p-12 および 1P-178、2013年9月11-13日 4. 佐藤拓輝、東昌市、宮崎香：ラミニンγ2鎖による血管透過性亢進は、N末端部EGF様リピートのヘパリン結合部に依存する。第72回日本癌学会学術総会（横浜）、P-1184、2013年10月3-5日 <p>【その他特筆事項】</p> <p>研究室学生の受賞があり、横浜市立大学 HP で紹介して頂きました。 佐野 未奈、第 18 回日本病態プロテアーゼ学会 Young Investigators Award http://www.yokohama-cu.ac.jp/campuslife/131002.html</p>

研究区分	一般研究	
研究課題	メタロプロテアーゼ ADAM28 を標的としたヒト型活性阻害抗体の開発	
研究代表者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学医学部・専任講師・望月早月
研究分担者	所属・職名・氏名	慶應義塾大学医学部・教授・岡田保典
受入担当教員	職名・氏名	教授・佐藤博
【研究目的】	本研究では、特異性の点で優れており関節リウマチや悪性腫瘍の治療で実績を有するヒト型抗体に着目し、Human combinatorial antibody library (HuCAL)より ADAM28 に対する完全ヒト型特異抗体のスクリーニングを行った。得られた抗体の中から ADAM28 の活性を特異的に阻害する抗体をスクリーニングし、ADAM28 への特異性と親和性の検討、マウスの尾静脈内注入による肺転移モデルと乳房皮下脂肪組織移植による自然転移モデルにおける増殖・転移抑制効果を検討し、ADAM28 を標的とする新規治療薬開発のための基礎研究を行った。	
【研究内容・成果】	ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28)はヒト非小細胞肺癌で癌細胞特異的に高発現し、癌細胞の増殖・転移に重要な役割を果たすことを明らかにするとともに、肺癌治療を目指して Human Combinatorial Antibody Library からヒト型抗 ADAM28 抗体(211-14)を開発した。211-14 抗体は、分泌型 ADAM28 に特異的なアミノ酸配列を認識し、ADAM28 の insulin-like growth factor binding protein-3 分解活性を 1:1 のモル比で阻害した。同抗体を用いた免疫細胞化学染色の結果、分泌型 ADAM28 は主として細胞膜上に局在し、ADAM28 の細胞膜上でのアンカリングシステムの存在が推定された。211-14 抗体は、ADAM28 高発現ヒト肺腺癌細胞株 (PC-9)の insulin-like growth factor-1 誘導性細胞増殖と運動・浸潤能を濃度依存的に抑制した。Luciferase と Venus 融合遺伝子を導入した PC-9 ^{mLuc-cp156} を作製し、マウス尾静脈内注入による肺転移モデルで本抗体の作用を検討した。PC-9 ^{mLuc-cp156} 細胞尾静脈内注入翌日から腹腔内へ 211-14 抗体を投与した結果、肺転移は有意に抑制され、生存率の著しい改善とともに 10 匹中 3 匹では腫瘍の完全消失がみられた。また、PC-9 ^{mLuc-cp156} 細胞尾静脈内注入 3 週後に抗体治療を開始した実験では、全身転移の有意な遅延がみられ、平均生存期間が 11 週間延長した (コントロール IgG 投与群 : 211-14 抗体投与群 = 17 週 : 28 週)。ヒト型抗 ADAM28 抗体 211-14 は、ADAM28 活性阻害によりヒト肺癌細胞の増殖・転移を抑制し、ADAM28 分子標的治療薬剤として応用できる可能性が期待される。	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>1.*Hitoshi Abe, *Satsuki Mochizuki, Kentato Ohara, Mari Ueno, Hiroki Ochiai, Yuko Kitagawa, Okio Hino, Hiroshi Sato and Yasunori Okada: Src plays a key role in ADAM28 expression in v-src-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. <i>Am. J. Pathol.</i> 183: 1667-1678 (2013). (*Hitoshi Abe and *Satsuki Mochizuki contributed equally)</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. Satsuki Mochizuki, Hitoshi Abe, Masyuki Shimoda, Noriko Aramaki-Hattori, Yuka Miyamae, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada: Selective inhibition of ADAM28 activity by human anti-ADAM28 antibodies suppresses cancer cell proliferation and metastasis. 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hong Kong, 2013 年 11 月 25 日</p> <p>2. 望月早月、阿部仁、尾原健太郎、落合大樹、北川雄光、樋野興夫、佐藤博、岡田保典: Src は ADAM28 の発現に重要な役割を果たす 第 72 回日本癌学会学術総会、横浜、2013 年 10 月 4 日</p> <p>3. 望月早月、岡田保典: ヒト ADAM28 活性阻害抗体の開発とそれによる癌細胞増殖・転移抑制作用 第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、松本、2013 年 7 月 11 日</p> <p>4. 望月早月、下田将之、宮越陽、古城周久、岡田保典: ADAM28 による癌細胞転移機構とその制御 第 45 回日本結合組織学会学術大会、第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、和歌山、2013 年 6 月 28 日</p> <p>5. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada.: Development of human anti-ADAM28 neutralizing antibodies that inhibit cancer cell growth and metastasis. Gordon Research Conference on Matrix Metalloprotenases, Lucca, Italy, 2013 年 5 月 23 日</p> <p>【その他特筆事項】なし</p>	

研究区分		一般共同研究
研究課題		Pim キナーゼ阻害剤の抗腫瘍剤としての開発研究
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任教授・岡部隆義
研究分担者	所属・職名・氏名	東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任講師・中野浩史
	所属・職名・氏名	東京大学創薬オープンイノベーションセンター・特任研究員・長谷川司
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>Pim1 キナーゼはある種の白血病や前立腺癌で高発現しており、アポトーシスや細胞周期制御に関わるタンパク質をリン酸化することにより、細胞の癌化やがん細胞の増悪、抗がん剤への抵抗性などを促進するセリン/トレオニン・キナーゼである(Cell, 37, pp.141-150, 1984; EMBO J., 4, pp.1793-1798, 1985; The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 37, pp.726-730, 2005; European Journal of Cancer, 44, pp.2144-2151, 2008)。</p> <p>一方 Pim3 キナーゼは肝臓がんや膵臓がんで恒常的に発現していることが知られており、アポトーシスを抑制していると考えられている(Int J Cancer, 114, pp20-218, 2005、Cancer Res.66, pp6741-6747, 2006, Cancer Sci.,98, pp321-328, 2007)。</p> <p>本研究は上記の Pim1 および Pim3 の特徴的な作用から、Pim キナーゼを抗腫瘍剤開発のターゲットとしてとらえ、その選択阻害剤を合成、評価することにより治療薬の開発を目指すものである。</p>	
【研究内容・成果】	<p>東京大学創薬オープンイノベーションセンターは Pim キナーゼ阻害剤の合成、キナーゼ阻害活性の評価、及び基礎的な ADMET 試験を担当した。具体的には</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ アザインダゾール化合物を中心に主にADMET特性の向上をめざして化合物合成を行った。 ・ Pim1、Pim3、FLT3 (ref.) キナーゼに対する酵素阻害活性を mobility shift assay を用いて評価した。 ・ ヒト白血病細胞 (MV4-11)、ヒト正常2倍体肺線維芽細胞 (WI-38) に対する in vitro での細胞増殖抑制試験を実施した。 ・ 代表的な化合物についてキナーゼ・プロファイリングを行った。 ・ 代表的な化合物について代謝安定性、CYP 阻害、経口吸収性などを評価した。 <p>このようにして選択された化合物#814、#816 の活性はそれぞれ Pim1 キナーゼに対して IC50 0.4 nM、0.6 nM、Pim3 キナーゼに対して IC50 0.4 nM、0.7 nM、MV4-11 細胞の増殖に対して IC50 5 nM、24 nM と極めて強力であった。</p> <p>次に本化合物について金沢大学がん進展制御研究所向田研究室で膵がん細胞株 Miapaca-2、PANC-1、L3.6pl に対する増殖抑制効果を調べた。化合物#814、#816 はこれらの細胞に対しても IC50 0.2~0.4 μM と強い効果を示した。</p> <p>膵がん治療にはこれまでゲムシタビンが使われてきている。そこで Pim キナーゼ阻害剤とゲムシタビンとの併用効果を調べた。上記膵がん細胞株に種々の濃度のゲムシタビンと化合物#814あるいは#816を加え72時間培養して、細胞増殖抑制への併用効果をアイソボログラムにより解析した。2化合物とも Miapaca-2、PANC-1 細胞には相乗ないし相加効果を示した。一方 L3.6pl 細胞には拮抗作用を示す結果となった。試験に用いた Miapaca-2、PANC-1 細胞は膵がん細胞株の中でも Pim3 が高発現し (L3.6pl 細胞では低い) アポトーシス抵抗性になっていると考えられる。今回の知見は Pim キナーゼ阻害剤がゲムシタビンに対する薬剤感受性を回復させた点で今後の併用療法研究に繋がるものである。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	古川 芳, 馬場 智久, 中野 浩史, 岡部 隆義, 向田 直史:ゲムシタビンに対する耐性におけるセリン/スレオニン・キナーゼ Pim-3 の関与; 第72回日本癌学会学術総会 2013.10.3 横浜
	【その他特筆事項】	特許出願 「キナーゼ阻害剤」長野哲雄、中野浩史、長谷川司、齊藤奈英、小島宏建、岡部隆義、向田直史 (特願 2014-25781)

研究区分	一般共同研究	
研究課題	抗がん剤において産生誘導されるケモカインの同定と病態生理学的役割の解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・教授・中本安成
研究分担者	所属・職名・氏名	福井大学医学部・大学院生・内藤達志
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>複数の抗がん剤を担がんマウスに投与すると、癌組織への白血球浸潤・免疫反応の増強が認められることが報告されている。しかし、その分子・細胞レベルでの機構についてはいまだ不明な点が多い。本研究では腫瘍を皮下接種したマウスに抗がん剤を投与し、腫瘍部位に誘導される白血球や腫瘍細胞の変化、産生されるケモカインの同定と機能解析を行うことによって、最終的に抗がん剤による免疫賦活化過程に重要な役割を果たしている機構やケモカインを標的とした治療法の開発を目指す。</p>	
【研究内容・成果】	<p>方法</p> <ol style="list-style-type: none"> BALB/c マウスの皮下にマウス肝がん細胞株(BNL 1ME A. 7. R. 1、以下 BNL)を接種し、一定の腫瘍容量となった時点で抗がん剤シクロフォスファミド(以下 CTX)を腹腔内投与し、抗腫瘍効果の得られる CTX 容量を決定する。 T 細胞を欠いたヌードマウスを用いて 1)と同様の実験を行い、CTX の抗腫瘍効果を確認する。 1)と同様の実験を行い、CTX 投与 1 日後および 13 日後に、抗 CD4 抗体(GK1.5)または抗 CD8 抗体(53.6.7)を腹腔内投与し、CD4 または CD8 陽性細胞の関連を検討する。 1)と同様の実験を行い、CTX 投与一定期間後に腫瘍および所属リンパ節を採取し、フローサイトメトリーによる浸潤細胞の解析、mRNA の解析を行う。 腫瘍が消失した野生型マウスに BNL および colon26 大腸癌細胞株を再接種し、BNL に対する腫瘍特異的な免疫の成立を確認する。 <p>成果</p> <ol style="list-style-type: none"> CTX 150 mg/kg の腹腔内投与により著明な抗腫瘍効果が得られ、66.7%で腫瘍は完全消失した。それ未満では腫瘍の消失を認めず、ヒトへの外挿を考慮し CTX 投与量を 150 mg/kg に決定した。 ヌードマウスでは野生型と異なり、CTX 投与で腫瘍容量は一時的に減少したものの消失せず、全例で再度増大した。 CD4 陽性細胞除去マウスでは腫瘍は全例で消失せずに再度増大した。一方 CD8 陽性細胞除去マウスでは腫瘍が消失し、未処置群との間に有意差はなかった。 CTX 投与後腫瘍内に細胞傷害顆粒膜蛋白 CD107a 陽性の CD4 陽性細胞が増加していた。CTX 投与後に CFSE でラベルした同種マウス脾臓細胞を養子移植したところ、脾細胞の分裂によらず早期より腫瘍内に CD4 陽性細胞の誘導が見られた。また、CTX の投与により腫瘍組織で種々のケモカインの mRNA の発現上昇を認めた。 腫瘍が消失したマウスでは BNL の再接種を完全に拒絶した一方で、colon26 を接種した時には未処置マウスと同様の腫瘍増殖が認められた。 <p>以上より、CTX 投与により腫瘍内に早期より誘導される細胞傷害性 CD4 陽性細胞が、腫瘍特異的な免疫応答を引き起こし、抗がん剤に付加的な効果を与える可能性が示唆された。腫瘍内に CD4 陽性細胞が誘導される機序や腫瘍を傷害する機序に関しては今後更なる検討を予定している。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>雑誌 消化器内科(科学評論社)第 57 巻第 5 号(2013 年 11 月発行)治療法別の B 型肝炎再活性化の現状：内藤達志ほか</p> <p>【学会発表】</p> <p>なし</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	ケモカイン CXCL14/BRAK による発癌と転移の抑制：CXCL14/BRAK 発現ベクターを用いた遺伝子治療法/予防法の検討	
研究代表者	所属・職名・氏名	神奈川県立大学口腔 難治疾患研究センター・特任教授・畑隆一郎
研究分担者	所属・職名・氏名	神奈川県立大学歯学部・講師・居作和人
	所属・職名・氏名	神奈川県立大学歯学部・講師・前畑洋次郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>国民の2人に1人が癌に罹患し、3人に1人は癌により死亡する。また、2010年の癌に拘わる医療費はおよそ4兆円になっている。高齢化に伴い、癌の患者数、医療費は増大する傾向があり、今後の大きな問題である。最近の抗癌剤は癌抑制効果があるが副作用が強い。今後の癌に対しては患者の負担の少ない、副作用のない治療方法、癌の理論に基づいた予防医学が重要であると考えられる。我々はこのような考えに基づいて生体内の癌抑制分子を探し、CXCL1/BRAKを見出した。実際にCXCL14/BRAKを野生型の10倍発現するトランスジェニックマウスは大腸癌の化学発癌系、癌の移植、実験的癌転移系を用いてCXCL1/BRAKが副作用を示さない、多段階癌抑制分子であることを示した（論文投稿準備中）。ヒトへの応用のために生体内のCXCL14/BRAKの発現を促進する機構を探索した。</p>	
【研究内容・成果】	<p>CXCL1/BRAKの細胞による発現制御： ERK MAP kinaseの活性化(リン酸化)する分子、シグナルはCXCL1/BRAKの細胞による発現を低下させる。一方、p38 MAP kinase δを活性化するシグナルはCXCL1/BRAKの細胞による発現を促進する（図参照）。</p> <p>図. CXCL14/BRAK 遺伝子の発現制御シグナル</p>	

	<p>細胞培養系で上皮増殖因子受容体 EGFR) の阻害剤である Gefitinib 処理により CXCL14/BRAK の発現が上昇する癌細胞は、ヌードマウスに移植後、マウスに Gefitinib 処理すると、腫瘍内の CXCL14/BRAK の発現が上昇し、腫瘍が縮小する、一方、CXCL14/BRAK 遺伝子のプロモーターがメチル化されていて、細胞培養系で Gefitinib 処理により CXCL14/BRAK の発現が上昇しない癌細胞はヌードマウスに移植して Gefitinib 処理しても CXCL14/BRAK の発現が上昇せず、腫瘍も縮小しない、このことは Gefitinib に対する感受性は CXCL14/BRAK の発現の有無に預手いることを示している。</p> <p>また、培養系で CXCL14/BRAK の発現を促進する試薬はメラノーマの肺転移を抑制するので、CXCL14/BRAK の発現を促進する試薬は癌の治療、予防に応用可能と考えられる。</p>
<p>【成果等】</p>	<p>【主な論文発表】 畑 隆一郎：再生医療、癌治療とビタミンC. ビタミン 87(11), 639-641, 2013.</p> <p>【学会発表】 畑 隆一郎：再生医療、癌治療とビタミンC 日本ビタミン学会市民公開講座、秋田, 2013. 10. 19.</p> <p>【シンポジウム講演】 Hata R. Izukuri K. Kato Y: Tumor-Suppressing Chemokine CXCL14/BRAK is a Cell-Surface Associated Matrix Component. 9th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Hong Kong, 2013. 9. 24-27.</p> <p>【一般発表・国際学会】 Miyamoto C., Ozawa S., Takahashi S-S., W-Takahashi S., Yoshino F., Lee M-C., Hata R-I., Maehata Y.: Fasudil Suppresses Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Growth by Stimulating Gene Expression and Secretion of the Chemokine CXCL14/BRAK. Pharmacology 2013, London, England, 2013. 12. 17-19</p> <p>【一般発表・国内学会】 畑隆一郎, 居作和人, 加藤靖正: PubMedを過信してはいけない. 第45回日本結合組織学会学術大会・第60回マトリックス研究会大会合同学術大会, 和歌山, 2013. 6. 28-29. 畑 隆一郎, 居作 和人, 加藤 靖正, 佐々木 宗一郎, 向田 直史 : 癌に強くなる遺伝子の発見. 第86回日本生化学会大会, 横浜, 2013. 9. 11-13. 畑 隆一郎・居作 和人・加藤 靖正: ケモカインCXCL14/BRAKは多段階癌抑制分子である. 第55回歯科基礎医学会学術大会, 岡山, 2013. 9. 20-23. Kato I. Fukunishi N. Fujimuro M. Hata R. Kurata S: A novel mechanisms of Wnt/beta-catenin signal activation by p63. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013. 10. 3-5. Hata R. Sasaki S. Kato Y. Mukaida N: CXCL14/BRAK is a multifunctional tumor suppressor. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013. 10. 3-5. 近藤忠雄, 小澤重幸, 生駒丈晴, 鈴木健司, 前畑洋次郎, 宮本千央, 畑隆一郎, 久保田英朗: CXCL14のプロモーターのメチル化は頭頸部扁平上皮癌に対するセツキシマブの抗腫瘍効果に関与する. 神奈川歯科大学学会第48回総会, 横須賀, 2013. 11. 30. 宮本千央, 生駒丈晴, 小澤重幸, 高橋俊介, 高橋聡子, 吉野文彦, 吉田彩佳, 畑隆一郎, 李 昌一, 前畑洋次郎: 頭頸部扁平上皮癌における ROCK 阻害剤による CXCL14/BRAK を介した抗腫瘍効果の検討. 神奈川歯科大学学会 第143回例会, 横須賀, 2014. 1. 9.</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>

研究区分		一般共同研究
研究課題		卵巣癌腹膜播種モデルにおけるケモカインの解析および分子標的治療の開発
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・教授・井篁一彦
研究分担者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・准教授・木村章彦
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学院医学研究科・大学院生・谷崎優子
	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学大学院医学研究科・大学院生・小林彩
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>卵巣癌は特に早い段階で腹膜播種という増殖、進展、転移、再発形式をとる点で、血行性転移やリンパ行性転移を主体とするような他の癌種とは異なっている。癌微小環境におけるマクロファージや線維芽細胞などの間質細胞の浸潤・増殖にはケモカインシステムが関与していることが示唆されているが、これまで卵巣癌の腹膜播種におけるケモカインシステムについての詳細な研究はほとんどみられていない。申請者らは、卵巣癌微小環境内の間質細胞と腫瘍細胞のクロストークにおけるケモカインシステムの病態生理的役割を解析する。さらに、卵巣癌の播種、転移に対する新たな治療法樹立や治療薬の開発といった臨床応用へ向け、基盤の確立を目指す。</p>	
【研究内容・成果】	<p>【目的】近年、癌微小環境におけるケモカインシステムの関与が明らかになってきた。今回、我々は、ケモカインの一つであるフラクタルカイン (CX3CL1) およびそのレセプター (CX3CR1) に着目し、卵巣癌腹膜播種における CX3CL1-CX3CR1 システムの分子病理学的役割を検討した。</p> <p>【方法】(1)マウス卵巣癌細胞株ID8 細胞におけるケモカイン・ケモカインレセプターの発現をreal time RT-PCRで網羅的に検討した。その中からCX3CL1-CX3CR1 システムに着目し、培養液中にCX3CL1 を添加し、ID8 細胞の増殖能、遊走能を検討した。(2) C57Bl/6 マウス (WT) および <i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスにID8 細胞 (5x10⁶個/マウス)を腹腔内移植し、腹膜播種の程度、生存率及び腫瘍関連分子の発現を検討した。</p> <p>【成績】(1)ID8 細胞において、8種類のケモカイン、8種類のケモカインレセプターのmRNA発現を認めた。CX3CL1, CX3CR1 については、mRNAおよびタンパク発現を認めた。CX3CL1 添加によりID8 細胞の遊走能は亢進したが (P<0.001)、増殖能に差は認めなかった。(2)ID8 細胞をWTおよび <i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスに腹腔内移植し、Day84 に開腹したところ、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスでは腫瘍形成は有意に減少していた (平均;48±8.0個 vs. 83±4.7個, P=0.005)。また、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスの生存期間はWTマウスに比べて有意に延長した (中央値;101 日 vs. 94 日, P=0.0025)。WTマウスの腹水中にはCX3CR1 陽性マクロファージを多数認めた。腫瘍組織の免疫染色では、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスにおいて腫瘍内のマクロファージと線維芽細胞の減少を認めた。また、<i>Cx3cr1</i>^{-/-} マウスではMMP-2、TGF-βの遺伝子発現及び産生細胞の減少を認めた。さらにMMP-2及びTGF-β産生細胞はマクロファージと判明した。</p> <p>【結論】癌微小環境内において、CX3CL1-CX3CR1 システムがマクロファージの動員に関与し、腫瘍内に浸潤したマクロファージは Tumor-associated macrophage (TAM)として、卵巣癌進展に有利な環境を作りだしていることが示唆された。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 未発表</p> <p>【学会発表】 平成 25 年 12 月 (京都) 第 3 回 アジア婦人科腫瘍学会 (ASGO) 学術集会 平成 26 年 3 月 (鳥取) 第 13 回 婦人科がん分子標的研究会学術集会 平成 26 年 4 月 (東京) 第 66 回 日本産婦人科学会学術集会</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	皮膚がんの微小環境におけるケモカインの役割の包括的解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・教授・近藤稔和
研究分担者	所属・職名・氏名	和歌山県立医科大学医学部・講師・石田裕子
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>がんの炎症性微小環境においては、慢性炎症により組織の恒常性が失われており、実質細胞に由来する腫瘍細胞と間質細胞の両者間における相互連関が、がんの発症・進展に密接に関与することが報告されている。本研究では、炎症反応の key molecule であるケモカインに着目し、ケモカイン・ケモカインレセプターの遺伝子欠損マウスを用い、慢性炎症による皮膚がんモデルにおいて、がんの発症・進展におけるケモカインシステムの病態生理学的役割を解析する。さらに、ケモカインが、皮膚がんの発症予防や進展抑制の分子標的となり得るかどうかの可能性について明らかにすることが本研究の目的である。</p>	
【研究内容・成果】	<p>1. 研究の方法</p> <p>1) 遺伝子欠損マウス C57BL/6 マウスを遺伝子背景とする CX3C ケモカインレセプター-1(CX3CR1)の各遺伝子欠損マウスを用いた。</p> <p>2) 腫瘍形成 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA, 100µg/200µl acetone)をマウス背部に塗布後、12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate(TPA, 30µg/200µl)を 20 週連続塗布して腫瘍形成を誘導し、各マウスで腫瘍形成の状況を比較・検討した。</p> <p>3) 病理組織学的および免疫組織化学的検索 背部皮膚を採取し、パラフィン包埋切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して、表皮の厚さを計測した。また、CX3CL1、CX3CR1、マクロファージ、Tリンパ球、および新生血管を免疫組織化学的に検索した。</p> <p>4) 遺伝子発現検索 背部皮膚を採取し、リアルタイム RT-PCR 法で各遺伝子発現を検索した。</p> <p>2. 研究成果</p> <p>1) 野生型マウスにおいて TPA 塗布 2 および 10 週間後において、皮膚における CX3CL1 および CX3CR1 の遺伝子発現が有意に上昇していた。また、2 重蛍光免疫染色によって、マクロファージが CX3CL1 および CX3CR1 の発現細胞であった。また、CX3CR1 は T 細胞とマクロファージにも発現が認められた。</p> <p>2) WT マウスでは、乳頭腫形成が TPA 塗布 10 週目以降から観察され、20 週目では約 80% のマウスに認められたが、KO マウスでは乳頭腫形成が有意に少なく、約半数のマウスでしか乳頭腫がみられなかった。</p> <p>3) 病理組織学的に WT マウスでは表皮肥厚が観察されたが、KO マウスでは表皮層の肥厚が有意に減弱していた。さらに、免疫組織化学的検索において、WT マウスでは F4/80 陽性マクロファージおよび CD3 陽性リンパ球浸潤が顕著に観察された。しかしながら、KO マウスでは、マクロファージ、リンパ球ともに有意に減弱していた。さらに、血管新生についても、KO マウスでは腫瘍内血管数が有意に少なかった。</p> <p>4) 皮膚局所における CXCL1、CXCL2、IL-1α、IL-6、TNFα および COX-2 の遺伝子発現が KO マウスで減弱していた。さらに発癌に寄与している Wnt3a 遺伝子発現は WT マウスに比較して KO マウスで減弱し、特に、免疫組織化学的に CX3CR1 陽性細胞が Wnt3a 産生細胞ということ明らかとなった。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】 なし</p> <p>【学会発表】</p> <p>1. <u>Ishida Y</u>, Nosaka M, Kimura A, Kuninaka Y, Kawaguchi M, <u>Mukaida N</u>, <u>Kondo T</u>. Pathophysiological roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chemical-induced skin carcinogenesis. 15th International congress of Immunology. Abstracts, 344, Milan, 2013.8</p> <p>2. <u>Ishida Y</u>, Kimura A, Nosaka M, Kuninaka Y, <u>Mukaida N</u>, <u>Kondo T</u>. Pathophysiological roles of the CX3CL1-CX3CR1 axis in chemical-induced skin carcinogenesis. 第 42 回日本免疫学会学術集会, 千葉, 2013.12</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	腫瘍随伴マクロファージによるがん死細胞貪食とがん免疫抑制機構の解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	東京薬科大学生命科学部・教授・田中正人
研究分担者	所属・職名・氏名	東京薬科大学生命科学部・助教・西舩元
受入担当教員	職名・氏名	教授・須田貴司
【研究目的】	<p>本研究では、がん細胞死に伴うマクロファージによる免疫制御のメカニズムを解明することを目的とした。これまでに我々はがん免疫担当細胞としてリンパ節洞に局在する CD169 マクロファージを同定した。本細胞はリンパ節辺縁洞に死細胞を取り込み、取り込んだがん抗原を細胞傷害性 T 細胞へ抗原提示し、これを活性化することでがん免疫を活性化していると考えられる。しかし、CD169 陽性マクロファージが細胞傷害性 T 細胞を活性化する詳しい機序は明らかになっていない。そこで、CD169 陽性マクロファージががん免疫を活性化する機構の解析を行った。</p>	
【研究内容・成果】	<p>CD169 陽性マクロファージによるがん免疫活性化機構を解析するにあたり、本研究ではリポソームによる CD169 陽性マクロファージ活性化系を用いた。</p> <p>がん抗原を封入したリポソームを投与したマウスでは、同抗原を持つがん細胞の増殖が抑制される。さらに、リポソームを取込んだ抗原提示細胞集団は、リポソームに封入した抗原特異的に、細胞傷害性 T 細胞を活性化することが明らかになった。しかし、CD169 陽性マクロファージを消去したマウス (CD169-DTR マウス) から分取した抗原提示細胞集団は、細胞傷害性 T 細胞を活性化することができない。この結果は、リポソームによる細胞傷害性 T 細胞の活性化には CD169 陽性マクロファージが重要な働きを担うことを示している。リポソームを取込んだ CD169 陽性マクロファージは、サイトカイン等の分子を高発現することで細胞傷害性 T 細胞を活性化するのではないかと考えた。そこで、そのような分子を同定するため、マウスにリポソームを接種し、リンパ節よりリポソームを取り込んだ CD169 陽性マクロファージを分取し、その遺伝子発現をマイクロアレイにより解析した。その結果、リポソーム投与時にいくつかのサイトカイン遺伝子の発現が CD169 陽性マクロファージ特異的に上昇することを見出した。これらのサイトカインは、所属リンパ節への細胞傷害性 T 細胞の遊走促進や、抗原提示を受けた際の活性化シグナルを増強する可能性があることが想定されるため、現在、これらのサイトカインが細胞傷害性 T 細胞に与える影響を検討している。さらに生体内におけるこれらのサイトカインの機能を解析するため、中和抗体の作製に着手している。</p>	
【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

研究区分	一般共同研究	
研究課題	受容体型チロシンキナーゼ Ror1 と Met の相互作用を介した肺腺がん細胞の増殖シグナルの制御	
研究代表者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・准教授・西田満
研究分担者	所属・職名・氏名	神戸大学大学院医学研究科・教授・南康博
受入担当教員	職名・氏名	教授・松本邦夫
【研究目的】	我々は、Ror1 が肺腺がん細胞の増殖を促進することや Ror1 と MET が結合することを見出している。本研究では、HGF-Met シグナルと Ror1 シグナルの相互作用による細胞増殖の制御機構と、そのゲフィチニブ耐性化における役割を明らかにすることを目的とする。また、肺腺がんの臨床検体を用いて HGF、Met、Ror1、Wnt5a (Ror1 のリガンド) の発現動態を解析し、がんの進展度やゲフィチニブ耐性との相関を明らかにする。さらに、Ror1 の細胞外領域の組換えタンパク質 (Ror1 おとり受容体) を作成し、肺腺がん細胞の増殖に対する影響を検討する。	
【研究内容・成果】	<p>我々は、EGFR 遺伝子に活性型変異を有するヒト肺腺がん細胞株 PC-9、HCC827 などにおいて Ror1 が過剰発現していることを見出している。これらの細胞において Ror1 の発現を siRNA によってノックダウンした結果、顕著な細胞増殖能の低下が認められた。しかしながら、EGFR の下流で細胞増殖を制御している Erk や Akt の活性は、Ror1 のノックダウンによって影響を受けなかったことから、Ror1 が Erk や Akt とは異なる経路で細胞増殖を制御していることが示唆された。</p> <p>Ror1 は Ror2 と同様に細胞に過剰発現させることによって細胞全体に糸状突起を誘導するが、その分子機構は不明な点が多く残されている。我々は糸状突起形成に重要な Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Cdc42 および Rif (Rho in filopodia) に着目し、Ror1、Ror2 による糸状突起形成におけるそれらの関与について検討を行った。その結果、Ror1、Ror2 の過剰発現によって誘導される糸状突起形成には、Cdc42 ではなく Rif が関与していることを見出した。また、Rif は Ror1 が過剰発現している PC-9 や HCC827 などの肺腺がん細胞や MDA-MB231 などのトリプルネガティブ乳がん細胞において高発現していることを見出した。PC-9 細胞において Rif をノックダウンした結果、Ror1 をノックダウンした場合と同様に、糸状突起数および細胞増殖能の低下が認められた。また、Rif ノックダウンによる Akt や Erk の活性変化は認められなかった。興味深いことに、Cdc42 は Ror1 による糸状突起形成には関わっていないが、Cdc42 のノックダウンによっても糸状突起数および細胞増殖能の低下が認められた。これらの結果は、Ror1 が Rif を介した糸状突起形成を誘導することによって細胞増殖を促進していることを示唆している。しかしながら、糸状突起が如何にして細胞増殖を促進するのかは明らかではなく、今後の解析が必要である。</p> <p>これまでに Ror2 おとり受容体が Wnt5a と結合し、Wnt5a-Ror2 シグナルによって起こる Dishevelled2 のリン酸化を阻害することを見出した。本研究では Ror1 おとり受容体が Ror1 の機能を阻害するかどうかを検討するため、Ror1 おとり受容体の大量発現・精製を行った。また、Biacore を用いて Wnt5a との結合を確認した。今後は Ror1 おとり受容体が肺腺がん細胞の増殖を抑制するのかといった解析を行う予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Doi, R., Endo, M., Yamakoshi, K., Yamanashi, Y., <u>Nishita, M.</u>, Fukada, S. I., and Minami, Y. Critical role of Frizzled1 in age-related alterations of Wnt/beta-catenin signal in myogenic cells during differentiation. <i>Genes Cells</i>, 19:287-296, 2014.</p> <p>Role of Wnt5a-Ror2 signaling in morphogenesis of the metanephric mesenchyme during ureteric budding. <u>Nishita, M.</u>, Joint Workshop between University Catholic Louvain and Kobe University on "Cell polarity and Cell adhesion". 2014</p> <p>Role of Wnt5a-Ror2 signaling in patterning the metanephric mesenchyme during ureteric budding. <u>Nishita, M.</u>, Qiao, S., Miyamoto, M., Okinaka, Y., Yamada, M., Hashimoto, R., Iijima, K., Otani, H., Hartmann, C., Nishinakamura, R., Minami, Y., Keystone Symposia on Developmental Pathways and Cancer: Wnt, Notch and Hedgehog(J7), 2014</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	がん細胞の増殖における Mnk プロテインキナーゼと JSAP の機能的相互作用の解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学薬学部・教授・福永理己郎
研究分担者	所属・職名・氏名	大阪薬科大学薬学部・講師・藤井忍
受入担当教員	職名・氏名	教授・善岡克次
【研究目的】	2つの主要な翻訳制御シグナル系である mTOR 経路と Mnk 経路の相互作用における JSAP1/JLP の機能を明らかにすることを目的として本研究を計画した。近年、タンパク合成の亢進が認められる多くの悪性腫瘍に対して、mTOR などのタンパク合成促進分子を標的とする治療法が試みられ、ラパマイシン類縁体の治療が行なわれている。本研究では、がん治療において両経路の阻害剤を併用する試みの分子的基盤を提供すると共に、新たな標的分子を同定することを目的とする。	
【研究内容・成果】	<p>Mnk1/2-ダブルKO マウス由来の胚性線維芽細胞 (Mnk-DKO MEF) に野生型 Mnk1 あるいは種々の Mnk1 変異体を導入し、これらの細胞を増殖因子やストレスで刺激した際の mTOR シグナル系および Mnk シグナル系について、eIF4G (Ser1108 残基) のリン酸化や eIF4E (Ser209) のリン酸化を検出するリン酸化特異抗体を用いて解析した。その結果、Mnk1 を強制発現させた Mnk1/Mnk2 ダブルノックアウト MEF 細胞を血清で刺激すると、Mnk1-Ser209 のリン酸化に伴って eIF4G-Ser1108 のリン酸化レベルが急速に低下する現象を見出した。オカダ酸や Cyclosporin などの脱リン酸化阻害剤および各種の Mnk1 変異体を用いて Ser1108 の脱リン酸化について検討した結果、プロテイン Set/Thr ホスファターゼの活性化ではなく、Ser1105 あるいは Ser1106 残基のリン酸化によってリン酸化 Ser1108 抗体による認識が阻害されている可能性が示唆された。現在、Ser1105/1106 が Mnk1 あるいは他のプロテインキナーゼによってリン酸化される可能性について解析中である。</p> <p>一方、ヒト Sprouty2 (Spry2) は <i>Drosophila</i> Spry のホモログであり、増殖因子受容体チロシンキナーゼ情報伝達系の負の制御分子として重要な機能を担っている。最近、Spry2 の機能が Mnk1/2 によって制御されることが報告されたことから、Mnk1/2 が直接に Spry2 をリン酸化する可能性について検討した。HA-Spry2 発現ベクターを Mnk1 と共に HEK293T 細胞に導入し、HA-Spry2 の SDS-PAGE 上における移動度シフトによってリン酸化解析を行なった結果、Mnk1 の活性化に伴って細胞内で Spry2 がリン酸化される事が示唆された。Spry2 のリン酸化部位と予想される Ser112 および Ser121 の Ala 変異 Spry2 ではリン酸化レベルの低下が認められたが、変異 Spry2 でもシフトバンドが残存することから、S112/S212 以外にも Mnk1 のリン酸化部位が存在することが示唆された。今後、他のリン酸化部位の同定を行なうと共に、Mnk1 による Spry2 リン酸化の生理的意義について検討する予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>(1) Shi Y, Frost P, Hoang B, Yang Y, <u>Fukunaga R</u>, Gera J, & Lichtenstein A: MNK kinases facilitate c-myc IRES activity in rapamycin-treated multiple myeloma cells. <i>Oncogene</i> 32, 190-197 (2013)</p> <p>(2) Gorentla BK, Krishna S, Shin J, Inoue M, Shinohara ML, Grayson JM, <u>Fukunaga R</u>, and Zhong XP: Mnk1 and 2 are dispensable for T cell development and activation but important for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. <i>J. Immunol.</i> 190, 1026-1037 (2013)</p> <p>(3) Chevillard-Briet M, Quaranta M, Grézy A, Mattera L, Courilleau C, Philippe M, Mercier P, Corpet D, Lough J, Ueda T, <u>Fukunaga R</u>, Trouche D, Escaffit F: Interplay between chromatin-modifying enzymes controls colon cancer progression through Wnt signaling. <i>Hum Mol Genet.</i> 2013 Dec 11. PMID: 24287617</p> <p>【学会発表】</p> <p>(1) 新規シグナル分子としての細胞外シトクロム c の機能：西村恵子、<u>福永理己郎</u>、井上晴嗣、他（計9名）第86回日本生化学会大会、3P-126（2013年9月、横浜）</p> <p>(2) ロイシンリッチα2グリコプロテインとシトクロム c の相互作用：井上晴嗣、<u>福永理己郎</u>、他（計6名）日本薬学会第134年会、28amM-049（2014年3月、熊本）</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分		一般共同研究
研究課題		Nestin の制御による、膵癌幹細胞および腫瘍新生血管に対する新たな治療戦略
研究代表者	所属・職名・氏名	東京都健康長寿医療センター・医長・松田陽子
研究分担者	所属・職名・氏名	日本医科大学医学部・准教授・石渡俊行
	所属・職名・氏名	日本医科大学医学部・ポストドクター・吉村久志
	所属・職名・氏名	日本医科大学外科学・准教授・中村慶春
	所属・職名・氏名	日本医科大学外科学・助教・松下晃
	所属・職名・氏名	日本医科大学外科学・助教・進士誠一
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>これまでに申請者らは、中間径フィラメントタンパク質である nestin について、膵癌の治療標的としての有用性を検討してきた。浸潤性膵管癌の約 30% の症例で nestin の発現を認め、その発現が膵癌の浸潤と関連することを報告した。Nestin を抑制することで、膵癌の癌幹細胞および癌周囲の新生血管形成を抑制することが可能であり、膵癌の新たな治療標的になり得ると考えた。本研究では、膵癌における nestin のリン酸化を抑制することで nestin の機能を効果的に制御することが可能になるとの仮説に基づき、nestin のリン酸化制御による新たな膵癌治療法の開発を目指す。</p>	
【研究内容・成果】	<p>ヒト膵癌培養細胞株を用い、nestin およびリン酸化 nestin の発現量を抑制する化学物質の探索を開始した。細胞播種後に薬剤投与を行い、その後、細胞を固定、nestin およびリン酸化 nestin に対する一次抗体で蛍光染色を行った。蛍光強度を InCellAnalyzer 6000 (GE ヘルスケア) にて測定した。また、同様のサンプルを用いて、RNA を抽出、real time PCR にて nestin messenger RNA 量を測定した。</p> <p>Nestin タンパク質やリン酸化 nestin タンパク質の発現量は、nestin messenger RNA 量と相関を示さなかった。一方、nestin タンパク質とリン酸化 nestin の発現量は正の相関を示した。</p> <p>リン酸化 nestin タンパク質の発現量を著明に抑制する化学物質として、cyclin dependent kinase、AKT、EGFR に対する阻害剤が同定された。逆に、リン酸化 nestin の発現量を亢進させる化学物質として、ブルトン型チロシンキナーゼや heat shock protein、TGFβ 受容体、cyclin dependent kinase に対する阻害剤が同定された。また、これら阻害剤の癌細胞数や nestin タンパク質の発現量への影響は、一定した結果を認めなかった。</p> <p>今回の検討から明らかとなった主な経路は、nestin の発現量や機能を制御するものとしてこれまでに報告されているが、本研究によって、リン酸化制御が nestin の機能を制御につながる可能性が示唆された。今後は、nestin リン酸化を抑制する新規化合物探索へ向け、さらに検討を進める。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	
	<p><u>Matsuda Y</u>, Yoshimura H, Ueda J, Naito Z, Korc M, Ishiwata T: Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid, IL-2γnull (NOG) mice, Am J Pathol 2014, 44: 1118-30.</p>	
	【学会発表】	
	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>Matsuda Y</u>, Yoshimura H, Suzuki T, Naito Z, Kawahara K, 他 3 名: Inhibition of Phosphorylation of Nestin Decrease Pancreatic Cancer Cell Growth. American association for cancer research, 104th annual meeting, April 2013. 2. 松田 陽子, 吉村 久志, 内藤 善哉, 鈴木 妙子, 河本 陽子, 川原 清子, 石渡 俊行: 膵癌の新たな治療標的としてのリン酸化 nestin. 第 72 回 日本癌学会学術総会. 2013 年 10 月 3. 松田 陽子, 吉村 久志, 松下 晃, 中村 慶春, 内田 英二, 他 2 名: 膵癌における nestin の発現と分子標的としての有用性. 第 24 回 日本消化器癌発生学会. 2013 年 9 月 	
	【その他特筆事項】	
	なし	

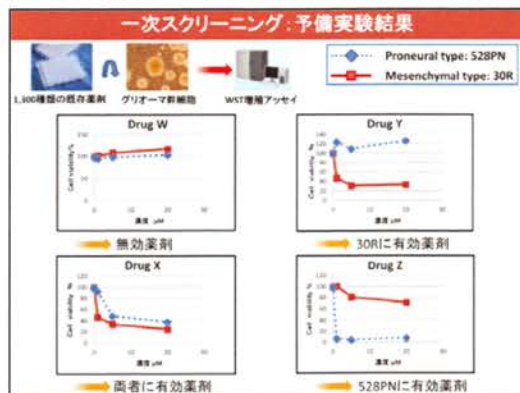
研究区分	一般共同研究	
研究課題	新規のWnt経路分子を中心とする大腸がんの分子病理学的特性と病態の解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部・教授・小坂健夫
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部・准教授・木南伸一
	所属・職名・氏名	金沢医科大学医学部・講師・藤田秀人
	所属・職名・氏名	金沢医科大学大学院医学研究科・大学院生・大西敏雄
	所属・職名・氏名	金沢医科大学大学院医学研究科・大学院生・富田泰斗
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>大腸がん治療の効果の改善と効率化には、がん分子病態の解明は重要である。我々は一昨年来、腫瘍制御研究分野と共同で、大腸がんにおける既知の遺伝子変異やエピジェネティック異常の解析をすすめてきた。大腸がんの腫瘍外科学と分子腫瘍学研究のなかでも Wnt 経路は重要視されているが、そのがん病態における役割は研究途上である。本研究では、これまでの共同研究をもとに、がん組織におけるβ-カテンin/Tcf 複合体の転写標的分子 CRD-BP (coding region determinant-binding protein) の発現を調べ、既知のがん関連分子の異常や臨床病理学的因子などを総合的に比較解析する。これにより、CRD-BP が大腸がんの病態、進行度や治療後経過の分子指標となるかを検討し、Wnt 経路の病理作用の一端を明らかにする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>CRD-BP は c-myc や IGF (insulin-like growth factor)-II の RNA トランス因子である。ヒト大腸がん細胞において CRD-BP はβ-catenin/Tcf 複合体の新しい転写標的であり、β-catenin と IκBα (inhibitor of NF-κB) に共通の E3 ユビキチン連結酵素 (βTrCP1:β-transducin repeats-containing protein 1) や Hedgehog (Hh) 経路の実行因子 Gli-1 を安定化することを源らは見出した。そして、CRD-BP がこれらの分子を介して大腸がん細胞の複数の増殖経路 (Wnt, NF-κB, c-myc, IGF-II, Hh) を機能的に結びつけると仮定した。これまでに、少数例の大腸がんや卵巣がんを対象に CRD-BP の発現解析が報告されているが、がん病態との関連は明らかではない。本研究では、大腸がん症例の腫瘍組織における CRD-BP と関連分子の発現を臨床病理学的因子と比較解析し、CRD-BP ががん病態の分子指標になるかを検討した。</p> <p>金沢大学がん進展制御研究所ヒトがん組織バンクに登録された大腸がん 35 例を対象とした。切除標本の腫瘍および正常粘膜の新鮮組織検体から cDNA を調製し、定量的 RT-PCR により CRD-BP、β-TrCP1、c-myc、IGF-II と Gli-1 の発現を測定した。これらの分子の発現解析には大腸がん細胞株 SW480 を陽性対照として使用し、各 cDNA 検体の GAPDH 発現量を検量し相対的に定量した。CRD-BP と各分子同士の発現および臨床病理学的因子との関係を統計学的 (スピアマンの順位相関係数・Mann-Whitney U 検定) により解析した。その結果、大腸がんにおいて CRD-BP と c-myc の発現は有意に相関し (p=0.0024)、IGF-II の発現とも相関傾向 (p=0.0791) があつた。CRD-BP と βTrCP1、IGF-II あるいは GLI1 の発現には相関はみられなかった。臨床病理学的因子との比較では、CRD-BP 発現が高い症例はリンパ節転移の頻度が有意に高く (p= 0.0066)、病期がより進行していた。また、c-myc の発現はリンパ管侵襲の程度 (p=0.035) と有意な相関を示した。</p> <p>以上の結果より、大腸がんにおいて β-catenin の活性化により誘導される CRD-BP は、c-myc や IGF-II の発現を介して腫瘍の増殖やリンパ行性転移を促進すると考えられた。そして、原発腫瘍における CRD-BP の発現はリンパ節転移や病期の分子指標となることが示唆される。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 舟木 洋, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫: Conversion Gastrectomy を施行した Stage IV 胃癌の治療成績の検討, 癌と化療, 12:1615-1617, 2013. 2. M. Noguchi, E. Morioka, Y. Ohno, M. Noguchi, Y. Nakano, T. Kosaka: The changing role of axillary lymph node dissection for breast cancer, Breast Cancer., 20:41-46, 2013. 3. 大西敏雄, 木南伸一, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大野由夏子, 富田泰斗, 野口美樹, 舟木 洋, 藤田秀人, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫: Docetaxel+S-1 療法が奏効し腹膜転移のコントロールが得られた原発性空腸癌の1例, 癌と化療, 12:1717-1719, 2013. 4. 上田順彦, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 富田泰斗, 大西敏雄, 野口美樹, 舟木洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 小坂健夫, 湊 宏, 高村博之: 直腸神経内分泌腫瘍 (NET) による異時性多発肝転移の1切除例, 癌と化療, 12:1840-1842, 2013. 5. 藤井頼孝, 木南伸一, 上田順彦, 黒澤史門, 小田美菜子, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 富田泰斗, 大西敏雄, 野口美樹, 舟木 洋, 藤田秀人, 中野泰治, 小坂健夫: Brunner 腺過形成に併存した早期十二指腸癌の1例, 北陸外科会誌, 32:21, 2013. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 富田泰斗, ほか, 小坂健夫, 源 利成. 大腸癌における β-catenin の転写標的 CRD-BP の発現と臨床病理学的因子との比較検討. 第 79 回大腸癌研究会研究会, 2013 年 7 月 5 日, 梅田スカイビル タワーウエスト, 大阪. <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	アミノレブリン酸投与後の腫瘍特異的ポルフィリン蓄積メカニズムの細胞レベルでの解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	東京工業大学生命理工学研究科・准教授・小倉俊一郎
研究分担者	所属・職名・氏名	東京工業大学フロンティア研究機構・特任准教授・田島健治
	所属・職名・氏名	東京工業大学生命理工学研究科・大学院生・平野智久
	所属・職名・氏名	東京工業大学生命理工学研究科・大学院生・伊藤謙介
	所属・職名・氏名	東京工業大学生命理工学研究科・大学院生・林麻衣子
受入担当教員	職名・氏名	准教授・遠藤良夫
【研究目的】	<p>がん患者にアミノレブリン酸(ALA)を投与すると、腫瘍特異的にポルフィリンが蓄積されることが知られており、この現象を利用したがんの蛍光診断・がんの光線力学治療が臨床で用いられている。しかしながら、腫瘍特異的なポルフィリン蓄積の分子メカニズムは未だ解明されていない。そこで本研究は ALA 投与後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積メカニズムの解明を目的とし、特異的なポルフィリン蓄積に関わる生体内物質を同定する。本研究で得られる知見は、ポルフィリン蓄積能を指標としたがんの個性診断を可能とするものであり、光線力学治療の効果を予測できるバイオマーカーを提供し、光線力学治療のオーダーメイド化を実現するものである。</p>	
【研究内容・成果】	<p>種々のがん細胞株に対して、ポルフィリン蓄積に関与していると予想される分子のたんぱく質の発現量ならびにその mRNA の発現量の解析を行った。その結果、PEPT1 ならびに ABCG2 の発現が変化している細胞が腫瘍特異的なポルフィリン蓄積に関与していることが示唆されている。</p> <p>そこで本年度は PEPT1 の過剰発現株ならびに ABCG2 発現抑制株を樹立し、その機能解析を行った。その結果、PEPT1 の過剰発現株ならびに ABCG2 発現抑制株ではポルフィリン蓄積能が飛躍的に向上した。PEPT1 は ALA の取り込みに関与しており、ABCG2 はポルフィリンの排出に関与しているため、これらのトランスポーターの役割の重要性が証明できた。</p> <p>さらに ALA を用いた光線力学治療における耐性株においてもこれらのトランスポーターの発現異常が観察された。以上のことから ALA を投与した後の腫瘍特異的なポルフィリン蓄積には PEPT1 ならびに ABCG2 が重要な因子であることが明らかとなった。</p> <p>また、膀胱癌検体を採取し、PEPT1 ならびに ABCG2 の mRNA 発現量を調べた。その結果、腫瘍部位において PEPT1 の発現亢進、ならびに ABCG2 の発現抑制が観測された。このことからこれらのトランスポーターが腫瘍特異的なポルフィリン蓄積に大きく関与していることが分かった。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Yuichiro Hagiya, Hideo Fukuhara, Kentaro Matsumoto, <u>Yoshio Endo</u>, Motowo Nakajima, Tohru Tanaka, Ichiro Okura, Atsushi Kurabayashi, Mutsuo Furihata, Keiji Inoue, Taro Shuin, <u>Shun-ichiro Ogura</u> Expression levels of PEPT1 and ABCG2 play key roles in 5-aminolevulinic acid (ALA)-induced tumor-specific protoporphyrin IX (PpIX) accumulation in bladder cancer, <i>Photodiagnosis and Photodynamic Therapy</i>, 2013, 10, 288-295.</p> <p>【学会発表】</p> <p><u>遠藤良夫</u>、<u>小倉俊一郎</u>、米村豊、木村仁: ジピリダモールによる 5-アミノレブリン酸を用いるがんの光線力学的療法の効果増強 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 9 月 (横浜)</p> <p><u>遠藤良夫</u>、<u>小倉俊一郎</u>、米村豊: ABCG2 阻害剤による 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強 日本薬学会第 134 年会 2014 年 3 月 (熊本)</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	

研究区分		一般共同研究
研究課題		がんの悪性進展過程におけるヒストンの翻訳後修飾変化の解析
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学大学院生命機能研究科・准教授・木村宏
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>近年、ヒストンの翻訳後修飾やその反応を担う酵素の異常が、発がんステップに関与していることが頻繁に報告されている。本研究では、がんに関わるヒストンのメチル化・脱メチル化酵素群の細胞生物学的機能を解析し、エピゲノム異常によるがんの発症と悪性化の分子機構を解明することを目的とする。そのために、我々が開発したヒストンの翻訳後修飾特異的、修飾部位特異的なモノクローナル抗体を用いて、エピゲノム解析と個々の細胞レベルでのグローバルなヒストン翻訳後修飾の動態解析を行う計画である。特に、上皮・間葉転換（EMT）など、がん細胞の悪性進展過程における新しいエピジェネティックな制御機構を明らかにすることを目指している。</p>	
【研究内容・成果】	<p>ヒストンH3のメチル化修飾部位のうち、遺伝子の発現制御に重要な4番目のLys残基(K4)、およびK9、K27、K36、K79について、それぞれのメチル化修飾の状態を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体の作製を遂行した。作製した抗体を用いて、正常細胞とがん細胞、あるいは悪性度の異なるがん細胞を比較しながら、ヒストンのメチル化修飾のダイナミクスを解析した。特に、がんの悪性進展過程に重要な上皮・間葉転換（EMT）のプロセスにおいて、個々の細胞レベルでのグローバルなヒストンのメチル化修飾の変化を調べ、その分子メカニズムを解析することを試みた。</p> <p>ヒストンH3の重要なメチル化修飾Lys残基について、種々の修飾状態を認識する特異性の高いモノクローナル抗体の作製に成功した。また、アセチル化、リン酸化など他の翻訳後修飾とメチル化修飾が併存する状態を認識する抗体についても開発を完了した。がん細胞の悪性進展過程のモデルとして、A549肺がん細胞株がTGF-beta処理によって、上皮・間葉転換（EMT）を誘導される実験系に着目した。これらの特異的修飾認識抗体を用いて、EMT誘導の前後の個々の細胞レベルでのヒストンH3の翻訳後修飾の変化を調べた。その結果、特にH3K27のトリメチル化（me3）レベルの著しい上昇を検出することができた。この結果は、H3K27脱メチル化酵素JMJD3のノックダウンがEMTを誘導するという機能ゲノミクス研究分野の実験結果とも合致する。さらに、しかし、H3K27メチル化レベルが変化するけれども、このメチル化修飾を担う酵素群PRC2およびPRC1複合体の各構成要素の発現そのものは、TGF-beta処理によってほとんど変化しないことを突き止めた。すなわち、PRC2およびPRC1複合体の細胞内の動態（複合体構成、細胞内局在、翻訳後修飾など）を調べることが重要であることを示唆する結果であり、この解析を通じて、EMTプロセスにおける動的クロマチン構造制御の分子基盤を解明していきたいと考える。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <p>Hayashi A, Yamauchi N, Shibahara J, Kimura H, Morikawa T, Ishikawa S, Nagae G, Nishi A, Sakamoto Y, Kokudo N, Aburatani H, and Fukayama M. (2014). Concurrent activation of acetylation and tri-methylation of H3K27 in a subset of hepatocellular carcinoma with aggressive behavior. PLoS One 9, e91330.</p> <p>Ideno H, Shimada A, Kamiunten T, Imaizumi K, Nakamura Y, Kimura H, Araki R, Abe M, Nakashima K, and Nifuji A. (2014). Search for conditions to detect epigenetic marks and nuclear proteins in immunostaining of the testis and cartilage. J Histology 2014, 658293.</p> <p>Sato Y, Mukai M, Ueda J, Muraki M, Stasevich TJ, Horikoshi N, Kujirai T, Kita H, Kimura T, Hira S, Okada Y, Hayashi-Takanaka Y, Obuse C, Kurumizaka H, Kawahara A, Yamagata K, Nozaki N, and Kimura H. (2013). Genetically encoded system to track histone modification in vivo. Sci Rep 3, 2436.</p> <p>Sadaie M, Salma R, Carroll T, Tomimatsu K, Chandra T, Young AR, Narita M, Pérez-Mancera, Bennett DC, Chong H, Kimura H, and Narita M. (2013). Uneven alterations in the lamin B1 genomic profile regulate heterochromatin formation and gene expression during senescence. Genes Dev 27, 1800-1808.</p> <p>【学会発表】</p> <p>なし</p> <p>【その他特筆事項】</p> <p>なし</p>	



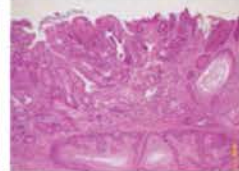
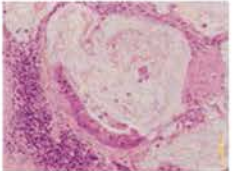
研究区分		一般共同研究																														
研究課題		分子標的薬耐性を克服する治療の安全性の前臨床評価																														
研究代表者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科・特任准教授・西原広史																														
研究分担者	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科・特任助教・王磊																														
	所属・職名・氏名	北海道大学大学院医学研究科・研究員・毛利普美																														
受入担当教員	職名・氏名	教授・矢野聖二																														
【研究目的】	<p>分子標的治療薬の登場はこれまでの癌の薬物療法の概念を大きく変えたが、薬剤耐性の出現と同時に、その副作用の出現が問題となっており、これらの薬剤耐性並びに副作用の克服は重要かつ喫緊の課題となっている。本研究では、分子標的治療薬による重篤な消化管障害の発生が生じる可能性がないか、ということを実験に検証・予測するために、薬剤投与マウスの病態、臓器障害の程度や可逆性などについて、組織病理学的に検討を行い、客観的な評価を行う。その結果、分子標的薬併用における薬効と同時に安全性を前臨床研究として評価することができれば、治療抵抗性の腫瘍に対する革新的治療法の開発につながることを期待される。</p>																															
【研究内容・成果】	<p>【研究内容】 腫瘍内科研究分野にて、上記の細胞株にて Xenograft を作成したマウスに、Afatinib、WZ4002 と Crizotinib の併用治療を行ったマウスから既に摘出され、ホルマリン固定されて保管されている臓器（腫瘍本体、肺、肝臓、腎臓、消化管）を郵送してもらい、受け取った臓器の切り出し・包埋作業を行い、組織ブロックを作成した。HE 標本及び、必要な特殊染色・免疫染色を行い、腫瘍細胞の Viability, 増殖能の評価を行うと同時に、各臓器における組織障害の程度を評価する。評価項目は以下の通り。</p> <p>【結果】 1. Afatinib (BIBW2992; EGFR/HER1 と HER2 阻害薬) と Crizotinib (ALK/Met 阻害薬) 同時投与における臓器障害の評価 ・ control、BIBW 単独投与、Crizotinib 単独投与、BIBW+Crizotinib 同時投与群 n=9 2. WZ4002 (EGFR L858R と EGFR L858R/T790M の変異体選択 EGFR キナーゼ阻害剤) と Crizotinib 同時投与における臓器障害の評価 ・ WZ4002 単独投与、Crizotinib 単独投与、WZ4002+Crizotinib 同時投与群 n=5 ⇒上記投与マウスにおいて、肺、消化管、脾臓、腎の HE 標本を作成し臓器障害の有無及び障害の程度の評価を行った。各種阻害薬投与（単独・同時）において下部消化管を中心に消化管粘膜障害が認められ、特に併用群で悪化していることが証明された（下図）。特に MET 過剰発現による Gefitinib 耐性克服のために Crizotinib を使用する場合には注意が必要と考えられた。</p> <table border="1"> <caption>Injury Score Data from Chart</caption> <thead> <tr> <th>Treatment Group</th> <th>Small intestine (Black)</th> <th>Large intestine (White)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Control</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Crizotinib (10)</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Crizotinib (25)</td> <td>0</td> <td>1.8</td> </tr> <tr> <td>Afatinib (25)</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Afatinib (25) + Crizotinib (10)</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>Afatinib (25) + Crizotinib (25)</td> <td>1.5</td> <td>2.8</td> </tr> <tr> <td>WZ4002 (25)</td> <td>0</td> <td>0.8</td> </tr> <tr> <td>WZ4002 (25) + Crizotinib (10)</td> <td>0.5</td> <td>0.5</td> </tr> <tr> <td>WZ4002 (25) + Crizotinib (25)</td> <td>0.5</td> <td>0.8</td> </tr> </tbody> </table>		Treatment Group	Small intestine (Black)	Large intestine (White)	Control	0.5	0.5	Crizotinib (10)	0.5	0.5	Crizotinib (25)	0	1.8	Afatinib (25)	0.5	0.5	Afatinib (25) + Crizotinib (10)	0.5	0.5	Afatinib (25) + Crizotinib (25)	1.5	2.8	WZ4002 (25)	0	0.8	WZ4002 (25) + Crizotinib (10)	0.5	0.5	WZ4002 (25) + Crizotinib (25)	0.5	0.8
Treatment Group	Small intestine (Black)	Large intestine (White)																														
Control	0.5	0.5																														
Crizotinib (10)	0.5	0.5																														
Crizotinib (25)	0	1.8																														
Afatinib (25)	0.5	0.5																														
Afatinib (25) + Crizotinib (10)	0.5	0.5																														
Afatinib (25) + Crizotinib (25)	1.5	2.8																														
WZ4002 (25)	0	0.8																														
WZ4002 (25) + Crizotinib (10)	0.5	0.5																														
WZ4002 (25) + Crizotinib (25)	0.5	0.8																														
【成果等】	<p>【主な論文発表】 Nanjo S, Yamada T, Nishihara H, Takeuchi S, Sano T, Nakagawa T, Ishikawa D, Zhao L, Ebi H, Yasumoto K, Matsumoto K, Yano S. Ability of the Met kinase inhibitor crizotinib and new generation EGFR inhibitors to overcome resistance to EGFR inhibitors. PLoS One. 2013 Dec 26;8(12):e84700. doi: 10.1371/journal.pone.0084700. eCollection 2013.</p> <p>【学会発表】 なし</p> <p>【その他特筆事項】 なし</p>																															

研究区分	一般共同研究	
研究課題	グリオーマ幹細胞を標的とした既存薬剤のスクリーニング	
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・助教・中田光俊
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・大学院生・董宇
	所属・職名・氏名	金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・大学院生・北林朋宏
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾敦
【研究目的】	<p>脳原発悪性腫瘍である悪性グリオーマは依然根治不能であり、本疾患の克服は医学上の重要課題である。とりわけ悪性グリオーマの予後を改善させるにはグリオーマ幹細胞を標的とした新たな化学療法の確立が重要である。新規薬物治療開発においてはドラッグリポジショニングの手法が浸透してきている。これは、ヒトでの安全性と体内動態が確認されている既存薬の新しい薬効を発見し、その薬品を別の疾患治療に適応拡大する研究手法である。本研究では、ドラッグリポジショニングによるグリオーマの新規治療の確立を目標に、グリオーマ幹細胞に対して殺細胞効果を示す既存の薬剤を見出すことを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>保有している複数のグリオーマ幹細胞を用いて、約 1,300 種類の既存薬剤の効果をスクリーニングした。手順は下記のごとくである。</p> <p>①スクリーニング：グリオーマ幹細胞の増殖能を阻害する既存薬剤の探索 1,301 種類の既存薬剤による 2 種類のグリオーマ幹細胞 (Proneural type, Mesenchymal type) の増殖抑制効果を調べる方法として非接着 384 穴プレートを用いた WST 増殖アッセイを行った。384 穴プレートへの細胞と薬物のデリバリーには多機能・卓上ピペットステーション：EDR-384SII (BioTec, Tokyo) を使用した。増殖能の計測は Infinite 200 Pro (TECAN, Kanagawa) で行った。陽性コントロールとして PI3K/mTOR 阻害剤である NVP-BEZ235 を使用した。薬剤ライブラリー内にある既存薬剤は 3 種類の濃度で振って増殖アッセイを行い濃度依存性の効果を確認した。</p> <p>②薬剤の抽出と効果の確認 上記により、グリオーマ幹細胞に対して有効と考えられる既存薬剤の抽出を試みた。低濃度で殺細胞効果が高く新規性の高い薬剤を選択した。またサブタイプ別に効果が異なる場合は、臨床上難治度の高い Mesenchymal type に有効な薬剤を優先させた (下図)。</p> <p>成果 1,301 種類の薬剤のうち 89 種類の薬剤がいずれかの細胞あるいは両者に様々な程度の増殖抑制効果を示した。ウェブ検索により、このうち過去にグリオーマに対して薬剤効果を示した報告がある薬剤が 53 種類あったため 36 種類に対して確認実験を行い最有力候補薬剤 2 種類が残った。今後は保有している他の 7 種類のグリオーマ幹細胞 (Mesenchymal type: 30R, 1123M, Proneural type: 528P, 146NS) を候補薬剤で処理し同様の効果を示すか観察する。 また一般的なグリオーマ細胞株 5 種類 (U87, U251, T98G, SNB19, U138) に対して、抽出した候補薬剤が同様の抗腫瘍効果を示すことを WST 増殖アッセイ, in vitro 遊走・浸潤アッセイで確認し、グリオーマ幹細胞株、グリオーマ細胞株に普遍的に有効な薬剤を抽出する。</p>	



【成 果 等】	<p>【主な論文発表】</p> <p><u>Nakada M</u>, Kita D, Watanabe T, Hayashi Y, Hamada JI. The mechanism of insensitivity against tyrosine kinase inhibitors in malignant glioma. <i>Brain Tumor Pahol</i> [Epub ahead of print] Jan 8. 2014</p> <p>Furuta T, <u>Nakada M</u>, Misaki K, Sato Y, Hayashi Y, Nakanuma Y, Hamada JI. Molecular analysis of a recurrent glioblastoma treated with bevacizumab. <i>Brain Tumor Pathology</i> 31: 32-39, 2014</p> <p>Teng L, <u>Nakada M</u>, Furuyama N, Sabit H, Furuta T, Hayashi Y, Takino T, Dong Y, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Berens ME, Zhao SG, Hamada JI. Ligand-dependent EphB1 signaling suppresses glioma invasion and correlates with patient survival. <i>Neuro-Oncology</i> 15: 1710-1720, 2013</p> <p>Pyko IV, <u>Nakada M</u>, Sabit H, Teng L, Furuyama N, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedulau AS, Hamada JI. Glycogen synthase kinase 3β inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O6-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation via c-Myc signaling. <i>Carcinogenesis</i> 34: 2206-2217, 2013</p> <p><u>Nakada M</u>, Nambu E, Furuyama N, Yoshida Y, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Sai Y, Tsuji T, Miyamoto KI, <u>Hirao A</u>, Hamada JI. Integrin α3 is overexpressed in glioma stem-like cells and promotes invasion. <i>Br J Cancer</i> 108: 2516-2524, 2013</p>
	<p>【学会発表】 なし</p>
	<p>【その他特筆事項】 なし</p>

研究区分	一般共同研究	
研究課題	ケモカインCCL2 をはじめとする大腸発がん促進性炎症分子を誘導するヒト腸内細菌叢の同定	
研究代表者	所属・職名・氏名	金沢大学大学院医薬保健学総合研究科・助教・飯田宗穂
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・助教・北村和哉
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>本研究では、大腸腫瘍患者の便中にある特定の腸内細菌が、大腸における CCL2 などの炎症性分子の発現を増加させることによって大腸腫瘍発生を促進していることを仮説とする。本研究は、過去の報告より大規模な大腸腫瘍患者の便中腸内細菌叢の解析を行う点、ヒトの便を移植したヒト化マウスにおける大腸腫瘍発生を観察することによってヒト腸内細菌と腫瘍発生の因果関係の実証を試みる点、ヒト化マウスにおいて CCL2 をはじめとした炎症分子の発癌における役割を検討する点において新しい研究であると言える。</p>	
【研究内容・成果】	<p>抗菌薬カクテルを内服したマウスでは、皮下に接種した腫瘍内の炎症反応が減弱することが以前からの研究にて判明していた。このうち、腫瘍内炎症に関与する細菌を同定するためにバンコマイシン、イミペネム、アンピシリン、ネオマイシンの各種抗菌薬を内服したマウスから便中細菌 DNA を採取し次世代シーケンサーにより網羅的に 16SrDNA のアンプリコンシーケンシングを行った。その結果、腫瘍内で発現する炎症性分子 TNF は腸内細菌 <i>Alistipes</i> と正の相関があり、また <i>Lactobacillus fermentum</i> は負の相関があることを見出した。これらのことを踏まえてヒトの便中細菌と発癌に関与する炎症の関連を調べるために、金沢大学消化器内科通院中の症例で、全結腸内視鏡もしくは小腸内視鏡を施行した症例の 30 例から便を採取した。そのうち 15 例は炎症性腸疾患（クローン病または潰瘍性大腸炎）の患者であった。炎症性腸疾患は大腸における発癌頻度が高いことが知られており、腸内細菌が大腸発癌に関与するメカニズムを解明するうえで適当な症例であると考えられた。また健常者コントロール 10 例からも採便を得た。各々の症例便から DNA を抽出し、メタゲノム解析のためのシーケンシングの準備を整えた。また無菌マウス 6 匹を無菌アイソレータに搬入し、繁殖を開始した。無菌マウスは産出仔数が少ないことが知られているが、出産を確認できた。得られた無菌マウスはアイソレータから搬出し、得られた炎症性腸疾患患者または健常者の便の移植を経口的に行った。移植した細菌叢の安定化を 16SrDNA の PCR にて確認した。ヒト便移植を行ったマウスの 2 匹は安楽死の後に、大腸、小腸組織を採取し、RNA 抽出、粘膜の細菌 DNA 抽出、組織標本作成を行った。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	飯田宗穂、Giorgio Trinchieri, 金子周一. 抗菌薬飲用マウスのマイクロバイオーム解析による炎症関連細菌の推定. 第 8 回ゲノム微生物学会. 2014 年 3 月.
	【その他特筆事項】	なし

研究区分		一般共同研究
研究課題		GSK3β 阻害による食道発癌の予防とその機序の解明
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・太田哲生
研究分担者	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・医員・宮下知治
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健研究域医学系・准教授・藤村隆
	所属・職名・氏名	金沢大学附属病院・助教・田島秀浩
	所属・職名・氏名	金沢大学医薬保健学総合研究科・大学院生・松井大輔
受入担当教員	職名・氏名	教授・源利成
【研究目的】	<p>近年、食生活の欧米化に伴い本邦でも大腸癌や乳癌とともにバレット食道（前癌病変）や食道（バレット）腺癌の発生が増加している。当教室が開発したラット食道発癌モデルは発癌剤を投与せずに十二指腸液あるいは胃液との混合液を食道に逆流させる手術を行うと、約40週後に食道腺癌が発生する画期的なモデルである。また、このモデルで発生する腫瘍はヒトの食道腺癌と非常に類似した遺伝子変化が認められることも報告されている。一方、GSK3βの発現や活性の亢進が大腸癌の増殖に関与していることが注目されていることから、食道の扁平上皮癌よりはむしろ食道腺癌の発生過程に関与していることがおおいに予想される。そこで本研究では、この食道発癌に対する GSK3β 阻害による化学予防の可能性を基礎と臨床の両面から解析、評価するために共同実験を行うこととした。</p>	
【研究内容・成果】	<p>今年度の研究では、SD ラットに順次、下部食道離断と下部食道空腸端側吻合術により、胃十二指腸液の混合逆流モデルを作成した。その後、これらのラットを2群に分け、対照群には DMSO を、治療群には DMSO に溶解した GSK3β 阻害剤の AR-A014418 (2mg/kg 体重) を、それぞれ週2回、40週間にわたって皮下注射した。本報告の段階では、まだ一部のラットの治療を継続中であり、治療実験は完了していない。</p> <p>これまでに屠殺した固体の観察により、対象群では食道空腸吻合部に食道腺癌が高頻度に発生し、その近位側の食道壁は拡張、肥厚とバレット食道が観察された（図 2a-c）。一方 GSK3β 阻害剤投与群では肉眼的には食道腫瘍の発生は観察されず、食道壁の病的所見は認められないうか軽微であった（図 1）。以上の結果より、GSK3β 阻害は食道の慢性炎症に伴う食道腺癌発生を抑制することが示唆される。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;">     </div> <p>図 1. GSK3β 阻害剤投与群（吻合部は明瞭で下部食道の拡張も認めず、粘膜面は平滑である）</p> <p>図 2a. 対照群（吻合部に腫瘍が散在し、下部食道は拡張し、粘膜も粗造である）</p> <p>図 2b. バレット食道</p> <p>図 2c. 腺癌</p> <p>今後はすべてのラットの屠殺時期に応じて、食道病変組織を対象に病理組織学的検査、免疫組織学的検査、分子生物学的検査や、全身主要臓器の検査による GSK3β 阻害剤のがん化学予防効果や有害効果の解析を順次行う。</p>	
【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

研究区分	一般共同研究	
研究課題	DNA の積極的脱メチル化に関わる酵素群の幹細胞およびがん細胞における役割の解析	
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・准教授・小出寛
受入担当教員	職名・氏名	教授・鈴木健之
【研究目的】	<p>エピジェネティクス修飾のひとつであるゲノム DNA のメチル化の制御は、遺伝子発現の重要な調節機構である。本研究では、胚性幹細胞（ES 細胞）とがん細胞株を対象として、DNA の脱メチル化経路に関連する酵素群の発現様式と発現調節機構を解析し、ES 細胞の未分化性維持や多分化能、がん細胞の増殖や悪性化における DNA 脱メチル化関連酵素群の役割を明らかにすることを目的とする。両細胞を比較しながら解析することで、がん細胞の幹細胞的性質と DNA 脱メチル化経路との関係性を見だし、がん幹細胞を標的とする新しいエピジェネティック医薬の開発の可能性を検討することも目標のひとつとする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>未分化胚性幹細胞（ES 細胞）および特定の細胞系列に分化誘導した ES 細胞、マウス胚線維芽細胞（MEF）、様々ながん細胞株を対象として、DNA 脱メチル化に関連した酵素群（ヒドロキシラーゼ、デアミナーゼ、グリコシラーゼ）の遺伝子発現を定量 RT-PCR 法で測定した。特徴的な発現変化を示した酵素については、shRNA によるノックダウンなどを用いて、細胞の増殖、未分化性、運動能などの表現型に与える影響を調べることを開始した。また、TET1 ヒドロキシラーゼ遺伝子の発現制御に関して、その遺伝子発現を制御する DNA 領域のメチル化状態との関連を解析することにした。</p> <p>DNA の積極的脱メチル化経路の第一段階を担う TET ファミリー酵素（TET1, TET2, TET3）のうち、TET1 の発現は、未分化 ES 細胞で極めて高く、神経系や筋肉への分化誘導を行うことで、その発現が著しく低下することが確認された。また、TET1 の発現状態は、他のいくつかの細胞においても、細胞の増殖状態等に応じて、ダイナミックに変化することがわかった。これら TET ファミリー酵素のヒトのがんでの重要性を確認するために、ヒト大腸がん細胞株由来の cDNA を用いて定量 PCR を行い、その発現量を調べたところ、TET2 と TET3 は細胞株間での発現量に著明な変化はなかったが、TET1 の発現は、細胞株間で高発現と極端な低発現という二極化の傾向を示した。大変興味深いことに、TET1 低発現を示したがん細胞株は、ゲノム DNA 中の CpG アイランドの高頻度なメチル化をもつ CpG アイランドメチル化形質（CIMP）を示す傾向があることを見いだした。CIMP 表現型は、特にがんでは、がん抑制遺伝子の DNA メチル化による発現抑制と関わっていることが知られている。また、CIMP は、がん患者の予後と深く関係していることが報告されているが、CIMP が誘導され成立するメカニズムは、ほとんど解明されていない。そこで、CIMP 表現型や TET1 遺伝子の発現抑制を導く分子メカニズムについて、さらに解析を進めていくことにした。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Tada Y, Yamaguchi Y, Kinjo T, Song X, Akagi T, Takamura H, Ohta T, Yokota T, Koide H. The stem cell transcription factor ZFP57 induces IGF2 expression to promote anchorage-independent growth in cancer cells. <i>Oncogene</i>. 2014 in press 2. Fujii Y, Kakegawa M, Koide H, Akagi T, Yokota T. Zfp296 is a novel Klf4-interacting protein and functions as a negative regulator. <i>Biochem Biophys Res Commun</i>. 2013 Nov 15;441(2):411-7. 3. Uranishi K, Akagi T, Sun C, Koide H, Yokota T. Dax1 associates with Esrrb and regulates its function in embryonic stem cells. <i>Mol Cell Biol</i>. 2013 May;33(10):2056-66. <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yuhki Tada, Yukari Yamaguchi, Hiroyuki Takamura, Tadayuki Akagi, Tetsuo Ohta, Takashi Yokota, Hiroshi Koide : Identification of an ES-specific gene Zfp57 as a novel oncogene ; 第 11 回幹細胞シンポジウム 2013 年 5 月 東京 2. 田多祐喜, 山口 紫, 赤木紀之, 高村博之, 太田哲生, 横田 崇, 小出 寛 : 癌細胞の増殖における ES 細胞特異的分子 Zfp57 の機能解析 ; 日本生化学会北陸支部第 31 回大会 2013 年 5 月 金沢 3. 田多祐喜, 山口 紫, 赤木 紀之, 高村 博之, 太田 哲生, 横田 崇, 小出 寛:ES 細胞特異的遺伝子 Zfp57 は HT1080 細胞において癌遺伝子として機能する ; 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月神戸 <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	mTORC1によるオートファジー選択的基質 p62 のリン酸化制御	
研究代表者	所属・職名・氏名	公益財団法人東京都医学総合研究所・副参事研究員・小松雅明
研究分担者	所属・職名・氏名	公益財団法人東京都医学総合研究所・主席研究員・一村義信
受入担当教員	職名・氏名	教授・平尾 敦
【研究目的】	<p>オートファジー障害ないしは p62 遺伝子発現上昇により p62 タンパク質が過剰に蓄積すると、p62 が Nrf2 を分解へと導く Keap1 に結合し、生体防御転写因子 Nrf2 が活性化する。ヒト肝細胞がん細胞においては、過剰な p62 に蓄積により Nrf2 が恒常的に活性化しており、これががん細胞の増殖に寄与する。重要なことに、この機構の律速は p62 の Keap1 結合領域のリン酸化であり、このリン酸化が Keap1 との結合を増強させることを見出した。つまり、p62 のリン酸化制御は、肝細胞がんの創薬ターゲットとなり得る。本研究では、p62 と相互作用するキナーゼ mTORC1 ないしは ULK1/2 が p62 のリン酸化、Nrf2 の活性化に関与するか否かを検証する。</p>	
【研究内容・成果】	<p>受入担当教員である金沢大学がん進展制御研究所・がん幹細胞プロジェクトの平尾敦教授らにより作成された mTORC1 複合体のサブユニット Raptor cKO および ULK1/2 ノックアウト MEFs を利用し mTORC1 および ULK1/2 の p62 のリン酸化の関与を検討した。具体的には</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. mTORC1 特異的阻害剤 (Rapamycin や Torin) を用いて、p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 2. Raptor cKO MEFs に 4-hydroxytamoxifen を添加し、Raptor を欠損させた後、p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 3. ULK1、2 欠損、ULK1/2 二重欠損 MEFs における p62 リン酸化の有無をウエスタンブロットにて検証した。 4. 精製 mTOR キナーゼおよび p62 ドメインを用いた in vitro リン酸化アッセイ系を構築し、直接的なリン酸化か否かを検討した。 <p>これらの実験から、ストレスに応じて mTORC1 が直接に p62 の 351 番目のセリン残基をリン酸化すること、その結果、Keap1 と p62 との相互結合が著しく増強され Nrf2 が活性化することが明らかになった。このリン酸化は p62 がオートファジー選択的基質 (変性タンパク質凝集体、異常ミトコンドリア、細胞内侵入細菌) に移行した時に起こり、リン酸化 p62 および Keap1 はオートファジー選択的基質とともに分解された。一方、ULK1/2 は S351 のリン酸化には関与しなかった。さらに、肝細胞がん細胞においては恒常的に p62 の 351 番目のセリン残基がリン酸化され Nrf2 が活性化していることも明らかにした。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Ichimura Y, Waguri S, Sou YS, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, Saito T, Yang Y, Kouno T, Fukutomi T, Hoshii T, Hirao A, Takagi K, Mizushima T, Motohashi H, Lee MS, Yoshimori T, Tanaka K, Yamamoto M, and Komatsu M. Phosphorylation of p62 Activates the Keap1-Nrf2 Pathway during Selective Autophagy. <i>Mol Cell</i> 51: 618-631 (2013) 2. Ishimura R, Tanaka K, and Komatsu M. Dissection of the role of p62/Sqstm1 in activation of Nrf2 during xenophagy. <i>FEBS Lett.</i> 588: 822-828 (2014) <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Komatsu M. "Liver Autophagy" <i>Asian Pacific Association for the Study of the Liver</i> Brisbane, Australia, 2014, 3.12-15. 2. Komatsu M. "Coupling of the Keap1-Nrf2 system to autophagy" <i>The Environmental Response 2014</i> Sendai, Japan, 2014, 2.28-3.2. <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分		一般共同研究
研究課題		胃がん発症モデルマウスを用いたがん幹細胞維持機構の解明
研究代表者	所属・職名・氏名	大阪大学微生物病研究所・教授・高倉伸幸
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	本研究の目的は、がん幹細胞が共通して利用する機能分子を用いて可視化すること、そしてその分子の機能を抑制した際にがんの増殖にどのような影響を与えるのかを解析し、がん幹細胞へのどのような影響が、がんの進展にどのような影響を与えたかを明確に定義することである。	
【研究内容・成果】	大島教授が確立された、K19 遺伝子プロモーター制御下に胃粘膜上皮で Wnt シグナルおよび PGE2 経路を誘導させた K19-Wnt1/C2mE マウス (100%の効率で胃がん発生) マウスと SLD5 遺伝子の一方のアリルが LacZ で置換されたマウス (SLD5 ^{LacZ/+}) を交配させて、SLD5 の遺伝子の発現を胃がんの中で可視化できるマウスを作製した。50 週齢前後の上記マウスより胃がん部を採取して、LacZ に関しては LacZ 染色を用いて、がん細胞中の SLD5 陽性細胞の局在を観察した。その結果、胃がん部位のすべてのがん細胞に SLD5 が発現するのではなく、腺管構造の一部の細胞に SLD5 が発現していることが確認された。この細胞のがん幹細胞性の解析を試みたが、細胞数が少なく困難であったため、幹細胞性の解析は中止した。一方、SLD5 ^{LacZ/+} と交配したマウスに関しては、SLD5 の遺伝子発現が正常マウスの半分であり、野生型マウスで発症した胃がんとの腫瘍サイズを比較したところ、SLD5 の遺伝子の半欠損は腫瘍の増大を抑制する事が判明した。以上、SLD5 は正常組織では、幹細胞により強く発現する分子であり、がん幹細胞においても機能している事が予想された。	
【成果等】	【主な論文発表】	Mohri T, Ueno M, Nagahama Y, Gong ZY, Asano M, Takakura N. Requirement of SLD5 for Early Embryogenesis. PLoS One 8 e78961, 2013
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

研究区分	一般共同研究	
研究課題	悪性乳癌幹細胞維持における転写因子 NF-κB の役割解明	
研究代表者	所属・職名・氏名	東京大学医科学研究所・教授・井上純一郎
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	研究代表者はこれまでに乳癌細胞株を用いて Basal-like サブタイプ乳癌特異的に NF-κB-JAG1-NOTCH 経路ががん幹細胞の維持に関与していることを見出している。本研究では、この経路によるがん幹細胞の制御が臨床検体に由来する乳癌細胞にも適応できるか否かを解明することを目的とする。	
【研究内容・成果】	<p>研究倫理に関する審査委員会の承認後に、臨床検体を用いて、まず初めにがん細胞の培養条件を検討した。約1グラムの検体をメスで細片にし、さらにミンチ状にした後コラゲナーゼ処理をした。その後弱い遠心により組織片を沈殿させ、上清にあるがん細胞を培養した。3日間培養後、一部に細胞から RNA を抽出し、real time RT-PCR から遺伝子発現解析によりサブタイプを検討した。このがん細胞においては Basal-like と Claudin-low サブタイプに発現する FOXC1 が発現しているのに対して、Luminal-like サブタイプに特異的に発現する ESR1 及び FOXA1、ERBB2-enriched サブタイプに特異的に発現する ERBB2 及び GRB7 は発現していなかった。したがって遺伝子発現解析からは Basal-like または Claudin-low サブタイプと推定された。さらに CD44, CD24, EpCAM で染色し FACS で解析したところその発現パターンは、Claudin-low サブタイプの細胞株で共通に見られるものと全く異なり、Basal-like サブタイプの細胞株で共通に見られるものと酷似していた。したがって、この腫瘍は Basal-like サブタイプ乳がんであると考えられた。このがん細胞を TNFα で刺激したところ、NF-κB の活性化及び JAG1 の発現誘導が起こりさらにがん幹細胞集団が増加した。また、がん細胞を JAG1 を過剰発現させた MEF と共培養させるとがん幹細胞集団が顕著に増加した。これらの結果はまだ1例ではあるが Basal-like サブタイプ乳癌では in vivo のがんであっても NF-κB-JAG1-NOTCH 経路ががん幹細胞の維持に関与していることを強く示唆している。今後は検体を増やし、サブタイプ依存性について詳細に解析する予定である。</p>	
【成果等】	<p>【主な論文発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Yamamoto, M., Taguchi, Y., Ito-Kureha, T., Semba, K., Yamaguchi, N. and Inoue J. NF-κB non-cell-autonomously regulates cancer stem cell populations in the basal-like breast cancer subtype. <i>Nat. Commun.</i> 4:2299 doi: 10.1038/ncomms3299 (2013). 2. Yamaguchi, N., Oyama, M., Kozuka-Hata, H. and Inoue, J. Involvement of A20 in the molecular switch that activates the non-canonical NF-κB pathway. <i>Sci. Rep.</i> 3, 2568; DOI:10.1038/srep02568 (2013). <p>【学会発表】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 井上 純一郎 翻訳後修飾による NF-κB 活性化シグナルの制御と疾患発症との関連 第 65 回日本細胞生物学会大会 2. 井上 純一郎 転写因子 NF-κB の活性制御機構とその破綻によるがんの悪性化 愛媛大学プロテオサイエンスセンター 第 1 回学術シンポジウム <p>【その他特筆事項】 なし</p>	

研究区分	一般共同研究	
研究課題	慢性骨髄性白血病患者におけるケモカイン CCL3 発現量の経時解析	
研究代表者	所属・職名・氏名	順天堂大学医学部・教授・小松則夫
受入担当教員	職名・氏名	教授・向田直史
【研究目的】	<p>慢性骨髄性白血病の初期段階では、多数の正常骨髄細胞からなるニッチの中で、ごく少数の白血病幹細胞が出現する。その後、徐々にその数が増加し、白血病を発症すると考えられている。向田らのグループは、モデルマウスを用いた検討で、ケモカインのひとつである CCL3 の発現が白血病発症初期において顕著に上昇し、主な CCL3 産生細胞が BCR-ABL 陽性細胞白血病細胞であることを見出した。</p> <p>本研究では、モデルマウスで認められた CCL3 の発現が、慢性骨髄性白血病患者においても認められるかについて検討するとともに、チロシンキナーゼ阻害薬による治療の過程における CCL3 発現の経時変化を解析し、その臨床的意義を解明することを目的とする。</p>	
【研究内容・成果】	<p>順天堂大学医学部 血液内科学講座にて保管されている慢性骨髄性白血病患者 12 名の骨髄より採取した total RNA を対象として、初発時（未治療時）とチロシンキナーゼ阻害薬による投薬治療開始後 3 ヶ月経過時点での CCL3 発現量と BCR-ABL 発現量を定量した。CCL3 発現量定量には$\Delta\Delta Ct$法を用い、内在性コントロールとして GAPDH を用いた。BCR-ABL 発現量定量は定量的 RT-PCR 法を用い、ABL を内在性コントロールとして検体間の差を標準化した。結果として、全ての検体においてチロシンキナーゼ阻害薬投薬に伴う BCR-ABL 発現量の低下を認めたが、CCL3 発現量は上昇した。これは、チロシンキナーゼ阻害薬により成熟した白血病細胞が優先的に排除される一方で、CCL3 を発現する初期段階の白血病細胞がチロシンキナーゼ阻害薬に抵抗性である可能性を示唆するものであり、チロシンキナーゼ阻害薬による治療と併せて、CCL3 高発現への対処が慢性骨髄性白血病の治療戦略に有効である可能性が考えられた。</p> <p>また、今回検討した慢性骨髄性白血病患者 12 例のうち、チロシンキナーゼ阻害薬の効果が特に高かった 2 例において CCL3 発現量の上昇率が他の 10 例と比較して低いことが明らかとなった。この結果をより詳細に考察するためには、チロシンキナーゼ阻害薬治療に伴う BCR-ABL と CCL3 の発現量のさらなる経時的な追跡が必要であると考えられた。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	Baba T, Naka K, Morishita S, Komatsu N, Hirao A, and Mukaida N. MIP-1alpha/CCL3-mediated maintenance of leukemia initiating cells in the initiation process of chronic myeloid leukemia. Journal of Experimental Medicine 210: 2013; 2661-2673.
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	なし

研究区分		一般共同研究
研究課題		胃がんおよび周辺組織における DNA 付加体の研究
研究代表者	所属・職名・氏名	浜松医科大学医学部医学科・教授・梶村春彦
研究分担者	所属・職名・氏名	浜松医科大学医学部医学科・助教・倉部誠也
	所属・職名・氏名	浜松医科大学医学部医学科・准教授・松島芳隆
	所属・職名・氏名	浜松医科大学・技術職員・鈴木雅子
	所属・職名・氏名	浜松医科大学大学院医学系研究科・大学院生・杜春平
受入担当教員	職名・氏名	教授・大島正伸
【研究目的】	<p>大島教授のグループの作成した、inflammation mediated gastric carcinogenesis の優れたモデルの検体を使用して、ヒト胃がんにおける以下の変化との比較を行った。</p> <p>胃がんおよび、非腫瘍部の DNA を検索して、Cytosine の修飾を、LC-MS/MS と、放射性同位元素を使って合成した標準品を使って定量的に測定し、胃がんの発生の起源となる DNA 変化を、ヒトの場合と比較しながら明らかにしていく。</p>	
【研究内容・成果】	<p>モデルマウスの胃腫瘍部、非腫瘍部の組織両者から DNA を、DNA は proteinase K, RNase A で消化したのち、酸化防止剤 deferoxamine mesylate 存在下でタンパクを除去した。5 microgram DNA について、DNaseI (New England Biosystems)処理、alkaline phosphatase 処理をし、標準品として [D₂]-5-hmC を加えて、除タンパクをして以下の LC-MS/MS 解析に移った。4000Q trap mass spectrometer は Aquity™ ultra performance LC system (AB SCIEX Instruments)を用い、カラムに、Acquity UPLC HSS T3 を用いた。deoxycytidine,5-methyldeoxycytidine, 5-hydroxymethylcytidine (5-hmC), 5-formyldeoxycytidine, 5-carboxycytidine をそれぞれの条件で elute し、positive ion mode で multi-reaction monitoring をおこなった。</p> <p>モデルマウスの胃腫瘍では、5 pair(腫瘍部と非腫瘍部)の検索の範囲では下の図のように 5-hmC の腫瘍部における減少が一部に観察された。症例数が少ないため統計学的に有意には至らなかった。</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>(a)</p> <p>5-mC (per 10⁴ C base)</p> <p>Normal Tumor</p> <p>P=0.977 n=5</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(b)</p> <p>5-hmC (per 10⁴ C base)</p> <p>Normal Tumor</p> <p>P=0.375 n=5</p> </div> </div>	
【成果等】	【主な論文発表】	投稿準備中
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	本研究費についての謝辞を記載

研究区分		一般共同研究
研究課題		がん幹細胞形質を増強する肺がん遺伝子異常の同定
研究代表者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・分野長・河野隆志
研究分担者	所属・職名・氏名	国立がん研究センター研究所・ポスドク研究員・中奥敬史
受入担当教員	職名・氏名	教授・後藤典子
【研究目的】	<p>肺がんでは、RET、ALK、ROS、NRG1等の受容体型チロシンキナーゼ遺伝子や関連遺伝子の融合が生じ、融合遺伝子はマウス線維芽細胞の形質転換能を持つことを明らかになっている。しかし、これらの遺伝子融合による発がん過程を理解し、それを標的とした治療を効率よく行うためには、がん幹細胞形質の獲得へのかかわり、当該形質を抑制する治療法の開発が必要である。そこで、本共同研究では、NRG1融合遺伝子cDNAを強制発現させた際のヒトがん細胞株のがん幹細胞形質に影響を与えるか否かを検討した。本研究の成果は、融合遺伝子を標的とした肺がん治療法開発に大きな意義を持つ。</p>	
【研究内容・成果】	<p>1. 肺腺がんの全RNAシーケンス、全エクソンシーケンスデータから、EGFR、KRAS、HER2、BRAF変異、RET、ALK、ROS1融合陰性の症例に複数みられる遺伝子融合を、頻度、遺伝子機能、治療標的の可能性を鑑み抽出した。具体的には、悪性度の高い浸潤性粘液腺がん6%程度に見られるCD74-NRG1融合を選択した。本解析は、研究倫理審査委員会の承認のもと行った。</p> <p>2. CD74-NRG1融合遺伝子cDNAを発現するレンチウイルスプラスミドベクターを構築した。この際、研究施設の規定を遵守して、遺伝子組換え実験を行った。作成したベクターは、サンガーシーケンシングによりその配列が適正であることを確認した。</p> <p>3. ヒト乳がん培養細胞から、スフェア形成能の評価に再現性のよい結果をもたらしているBT20細胞株を選出した。レンチウイルスプラスミドベクターをもとにレンチウイルスを作成し、BT20細胞株に感染し、CD74-NRG1融合タンパク質を恒常的に発現する細胞株を樹立した。ウェスタンブロット解析により、CD4-NRG1融合タンパク質の発現が確認された。CD74-NRG1融合タンパク質を恒常的に発現する乳がん細胞株では、スフェア形成能が有意に上昇することが確認できた。</p> <p>以上の結果は、CD74-NRG1融合遺伝子のがん幹細胞形質を上昇させる力を持つことを示している。今後、肺がん細胞株を用いて、同様の実験を行うことで、肺がん化への寄与について調べる必要がある。また、CD74-NRG1タンパク質はHER2:HER3ダイマーを介したシグナル伝達を活性化することが予想されることから、HER2キナーゼ阻害薬が治療薬候補となる。そこで、スフェア形成における同阻害薬の阻害効果についても検討を進める必要がある。</p>	
【成果等】	【主な論文発表】	なし
	【学会発表】	なし
	【その他特筆事項】	本研究はH27年度より特定共同研究に発展させて頂くことが決定した。

金沢大学がん進展制御研究所
がんの転移・薬剤耐性に関わる先導的研究拠点 2013年度

[発行] 金沢大学がん進展制御研究所

〒920-1192 石川県金沢市角間町 TEL:076-264-6700(代) FAX:076-234-4527

URL <http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/>