

がん微小環境研究プログラム

細胞機能統御研究分野

<研究スタッフ>

教 授 佐藤 博
准教授 滝野 隆久
特任助教 淑瑠 ヘムラサビット
技能補佐員 山岸 小百合
大学院（博士）堂本 貴寛、郭 魯決、田中 望

<研究概要>

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ-1(MT1-MMP)はがんの浸潤・転移・運動・増殖など様々ながん悪性化形質に関与している。MT1-MMPはMMP-2の活性化に加えて、コラーゲンなどの細胞外マトリックス成分、膜たんぱく・リガンド分子などを切断・不活化する。MT1-MMP以外のMMPについては、転移促進活性と共にがん抑制因子としての活性も報告されている。特異性のないMMP阻害薬剤による全てのMMPの阻害が治験の失敗原因のひとつと考えられている。したがってMT1-MMP特異的な阻害剤が期待されている。我々はMT1-MMPのがん悪性化に果たす役割を明らかにするとともにMT1-MMPを標的とした制御法の開発を目指している。

<2011年度の研究成果・今後の計画>

MT1-MMPによるファイブロネクチンの重合と集積抑制：

ファイブロネクチンは細胞外マトリックスの重要な構成成分であり、重合・集積し線維化することにより、細胞外マトリックスとしての機能を果たしている。糖質コルチコイドであるデキサメサゾンとはヒト線維肉腫HT1080細胞におけるファイibroネクチンの産生を亢進するが、その重合・集積は起こさない。デキサメサゾンと共にMMP阻害剤あるいはMT1-MMPに対するsiRNAを併用処理することによりHT1080細胞の周囲にファイibroネクチンの重合・集積を引き起こすことを見出した。ファイibroネクチンの集積にはカドヘリンを介した細胞接着が必須であり、MT1-MMPはHT1080細胞の発現するN-カドヘリンを切断することによりファイibroネクチンの集積を制御していることが明らかとなった。HT1080細胞の3次元コラーゲングル培養にデキサメサゾンとMMP阻害剤を添加するとファイibroネクチンの著しい重合・集積が起こり、細胞浸潤は強く抑制されたが、細胞増殖はMMP阻害剤による抑制がデキサメサゾン添加ではむしろ回復した。発育鶏卵およびヌードマウス移植HT1080細胞においてもデキサメサゾンとMMP阻害剤の併用では、MMP阻害剤単独よりも増殖抑制は弱かった。すなわち線維化したファイibroネクチンは浸潤を強く抑制するものの細

胞生存シグナルを誘導することが明らかとなった。

MT1-MMP による HAI-1 切断は Protease Storm を引き起こす：

昨年度、MT1-MMP の新規基質として膜型のセリンプロテアーゼ阻害因子 HGF Activator Inhibitor-1 (HAI-1)を同定したことを報告した。HAI-1 は膜型セリンプロテアーゼであるマトリプターゼの Cognate Inhibitor である。マトリプターゼはがんの悪性度と密接に関わる uPA (urokinase-type Plasminogen Activator)やHGFを活性化するなど、がんの悪性化に広く関与している。実際に扁平上皮がん由来 HSC-4 細胞をコラーゲンゲル3次元培養すると、MT1-MMP の活性化に伴い HAI-1 の切断・シェディングが起こりマトリプターゼの活性化が確認された。HSC-4 細胞のコラーゲンゲル内の浸潤性増殖には MT1-MMP と共にマトリプターゼも必須であった。このようにマトリプターゼが活性化された HSC-4 細胞は uPA を活性化する。uPA はプラスミンを活性化することにより一連のセリンプロテアーゼカスケードを活性化し得る。さらにこれらのセリンプロテアーゼは MMP-9 などの多くの MMP を活性化する。すなわち MT1-MMP による HAI-1 切断がトリガーとなりセリンプロテアーゼ・MMP カスケードが一斉に活性化される Protease Storm が起こり得ることを提唱した。現在、HAI-1 のプロテアーゼ阻害以外の機能を検討中である。

悪性脳腫瘍における MT1-MMP, PTEN, IDH1 その他関連分子の発現と悪性化の解析：

これまでにグリオーマにおける MT1-MMP 発現と悪性度の関連を報告してきた。最近、グリオーマにおける MT1-MMP のユニークな制御機構を見出し、その詳細なメカニズムを解析中である。また、近年グリオーマの初期にイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (Isocitrate dehydrogenase-1:IDH1)の変異が生じることが発見され、IDH 特異的抗体を使用した免疫染色により浸潤グリオーマ細胞を同定することが可能となった。そこで IDH1 免疫染色により浸潤グリオーマ細胞の性質を病理学的に調べ、MT1-MMP および関連因子との関係を検討している。

<発表論文>

<原著論文>

研究室が主体となったもの：

Domoto T, Takino T, Guo L, Sato H. Cleavage of Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor-1 by Membrane-Type MMP-1 Activates Matriptase. Cancer Sci. (in press)

Takino T, Nagao R, Manabe R, Domoto T, Sekiguchi K, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly to promote cell motility. FEBS Lett. 2011;3378-84.

<学会発表>

Luyang Guo, Takahiro Domoto, Takahisa Takino, Hiroshi Sato. 「Cleavage of KIM-1 by MT1-MMP」2011 年 日本分子生物学会第 11 回春季シンポジウム-金沢国際がん生物学シンポジウム（金沢）

堂本 貴寛、滝野 隆久、佐藤 博

「MT1-MMP による HAI-1 切断を介したセリンプロテアーゼ系の制御」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成 23 年 6 月 30－7 月 1 日 浜松）

Guo Luyang、滝野 隆久、佐藤 博

「MT1-MMP による免疫グロブリンファミリー膜タンパク KIM-1 の切断」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成 23 年 6 月 30－7 月 1 日 浜松）

滝野隆久、堂本 貴寛、佐藤 博

「MT1-MMP によるフィブロネクチンの重合と集積抑制」
第 20 回日本がん転移学会総会（平成 23 年 6 月 30－7 月 1 日 浜松）

堂本 貴寛、滝野 隆久、佐藤 博

「MT1-MMP activates matrilysin through the cleavage of its inhibitor HAI-1」
第 70 回日本癌学会学術総会（2011 年 10 月 3－5 日 名古屋）

滝野 隆久、堂本 貴寛、佐藤 博

「MT1-MMP regulates fibronectin assembly」
第 70 回日本癌学会学術総会（2011 年 10 月 3－5 日 名古屋）

<外部資金>

基盤研究（B）450 万円（代表）佐藤博 （分担）滝野隆久、中田光俊

「膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 のがん悪性化形質に果たす役割の解析」

基盤研究（C）110 万円（代表）滝野隆久

「細胞外微小環境変化と細胞運動誘導」

<共同研究>

中田 光俊 （金沢大学医学系研究科 脳外科）

「グリオーマにおける MT1-MMP 制御機構の解析」

関口 清俊 （大阪大学蛋白質研究所）

「MT1-MMP によるファイブロネクチン重合の制御機構の解析」

分子生体応答研究分野

<研究スタッフ>

教授：向田直史

助教：馬場智久

博士研究員：佐々木宗一郎

技能補佐員：南邦子

<研究概要>

- ① 炎症性サイトカイン・ケモカインの発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。
- ② 前がん〜がん病変で発現が亢進しているセリン／スレオニン・キナーゼ **Pim-3** の発がん・がんの進展過程での役割の解析に基づく、治療法の開発。

<2011 年度の進捗状況>

- 1) アゾキシメタンとデキストラン硫酸塩との投与によって生じる大腸がんモデルにおいて、従来報告してきた腫瘍壊死因子やケモカインである **CCL2** 以外に、別のケモカイン **CCL3** がシクロオキシゲナーゼ (**COX**) -2 を発現している顆粒球の大腸組織への浸潤を制御することで、大腸がん発症に関与していることを明らかにした。
- 2) 胸腺皮質に選択的に存在する **Sirpα**陽性の樹状細胞亜群が血中由来の抗原の胸腺での取り込みを行い、**Negative selection** または抑制性 T 細胞への分化を誘導する機構が腫瘍免疫にも作用している可能性を示唆する結果が得られた。
- 3) **IL-1 receptor antagonist** 遺伝子欠損マウスにおいて自然発症する多発性関節炎に対して、内因性の **CCL2** が破骨細胞の生成を制御することによって抑制的に働く一方で、薬理量の **CCL2** を投与すると関節炎が悪化することを認めた。
- 4) 医薬保健研究域薬学系の石橋弘行教授との共同研究で開発した、**Pim-3** キナーゼ活性を抑制する置換フェナントレン化合物が、ヒト膵臓がん細胞株の試験管内での増殖を抑制するのみならず、ヒト膵臓がん細胞株を接種されたマウスに投与すると、明らかな副作用を引き起こさずに、腫瘍を退縮することを明らかにした。

<今後の計画>

- 1) ケモカイン関連遺伝子欠損マウスを用いて、種々の発がんモデル・転移モデルにおける病態を分子・細胞レベルで解析して、腫瘍部位に存在する腫瘍細胞・骨髄系細胞・線維芽細胞に対する、各々のケモカインの病態生理学的作用を明らかにする。
- 2) 現在までに得られている置換フェナントレン化合物に対して種々の修飾を加えた化合物の抗がん作用を検討する。さらに、**Pim-3** 活性の阻害作用を指標として、抗がん作用を保有する低分子化合物のスクリーニングを行うとともに、**Pim-3** の病態生理学的作用を分子レベルにて解析する。

研究業績

(所属研究者は下線で示した)

原著論文

分野主体の研究論文

1. Fujii H, Baba T, Ishida Y, Kondo T, Yamagishi M, Kawano M, and Mukaida N. Ablation of *Ccr2* gene exacerbates polyarthritis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Arthritis Rheum* 63 (1): 96-106, 2011.
2. Wang Y-Y, Taniguchi T, Baba T, Li Y-Y, Ishibashi H, and Mukaida N. Identification of a phenanthrene derivative as a potent anti-cancer drug with Pim kinase inhibitory activities. *Cancer Sci* (in press).

他の研究室との共同研究

1. Nakamoto Y, Mizukoshi E, Kitahara M, Arihara F, Sakai Y, Kakinoki K, Fujita Y, Marukawa Y, Arai K, Yamashita T, Mukaida N, Matsushima K, Matsui O, and Kaneko S. Prolonged recurrence-free survival following OK432-stimulated dendritic cell transfer into hepatocellular carcinoma during transarterial embolization. *Clin Exp Immunol* 163 (2): 165-177, 2011.
2. Inui M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Mukaida N, and Kondo T. Protective roles of CX3CR1-mediated signals in toxin A-induced enteritis through the induction of heme oxygenase-1 expression. *J Immunol* 186 (1): 423-431, 2011.
3. Shimizu K, Furuichi K, Sakai N, Kitagawa K, Matsushima K, Mukaida N, Kaneko S, and Wada T. Fractalkine and its receptor, CX3CR1, promote hypertensive interstitial fibrosis in kidney. *Hypertension Res* 34 (6): 747-752, 2011.
4. Chen Y, Chen L, Li J, Mukaida N, Wang Q, Yang C, Yin WJ, Zheng XH, Jin W, and Shao ZM. ER β and PEA3 co-activate IL-8 expression and promote invasion of breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 11 (5): 497-511.
5. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Mukaida N, and Kondo T. Absence of IFN- γ accelerates thrombus resolution through enhancing MMP-9 and VEGF expression in mice. *J Clin Invest* 121 (7): 2911-2920, 2011.
6. Liu G, Lu P, Li L, Jin H, He X, Mukaida N, and Zhang X. Critical role of SDF-1 α -induced progenitor cell recruitment and macrophage VEGF production in the experimental corneal neovascularization. *Mol Vis* 17: 2129-2138, 2011.
7. Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Inui M, Matsushima K, Mukaida N, and Kondo T. Pivotal role of CCL5-CCR5 axis for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *J Clin Invest* (in press).

総説論文(英文論文に限る)

1. Mukaida N, Wang Y-Y, and Li Y-Y. Roles of Pim-3, a novel survival kinase, in tumorigenesis. *Cancer Sci* 102 (8): 1437-1442, 2011.

2. Mukaida N, Sasaki S, and Popivanova BK. Tumor necrosis factor and chemokines in colitis-associated cancer. *Cancers* 3: 2811-2826, 2011.
3. Mukaida N and Baba T. Chemokines in tumor development and progression. *Exp Cell Res* 318: 95-102, 2012.

学会発表（筆頭発表者が分野所属の者に限る）

1. Mukaida N, Lu P, Li L, Liu G, and Zhang X. Critical contribution of TNF- α to experimental corneal neovascularization by enhancing VEGF and iNOS expression by infiltrating macrophages. 13th International TNF Conference. May 15 to May 18, 2011, Awaji, Japan.
2. Mukaida N. Roles of chemokines in tumor development and progression. 第32回日本炎症・再生医学会。2011年6月2日、3日、京都。（招待講演）
3. 向田直史。新規のPimキナーゼ阻害剤によるヒト膵臓がん細胞株増殖抑制効果。第15回日本がん分子標的治療学会学術集会。2011年6月22日~24日、東京。
4. Wang Y-Y, and Mukaida N. Inhibition of in vitro growth of human pancreatic cancer cell lines by a novel Pim-3 kinase inhibitor. 第70回日本癌学会学術集会。2011年10月3日~5日、名古屋。（English Oral Session）
5. 佐々木宗一郎、馬場智久、楊秀峰、向田直史。炎症誘発腫瘍形成マウスモデルにおけるCCL3ケモカインの関与。第70回日本癌学会学術集会。2011年10月3日~5日、名古屋。（Japanese Oral Session）
6. 佐々木宗一郎、馬場智久、楊秀峰、向田直史。マウス大腸がん発がんモデルにおけるCCL3の重要性。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。
7. 馬場智久、向田直史。胸腺perivascular DCによる血中抗原取り込みと制御性T細胞の分化誘導。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。
8. 浜野良子、馬場智久、川野充弘、山岸正和、向田直史。抗原特異的制御性T細胞は抗原へ有意に集積する。第40回日本免疫学会学術集会。2011年11月27日~29日、千葉。

知的財産

特願2011-121088（平成23年5月30日出願）

発明者： 向田直史、石橋弘行、谷口剛史。

発明名称： 置換フェナントレン化合物を有効成分とするがんを予防および／または治療するための医薬組成物。

外部資金

向田直史

1. 科学研究費・基盤研究（B）（代表）

「炎症を基盤とするがん化過程における腫瘍壊死因子・ケモカインの役割の解析」

(直接経費 4,600 千円、間接経費 1,380 千円)

2. 戦略的創造研究推進事業 CREST「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究領域(分担)「慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤」

(直接経費 3,000 千円、間接経費 900 千円)

馬場智久

1. 科学研究費・若手研究(B)

「胸腺 Sirpα+樹状細胞による自己免疫寛容の新規誘導メカニズムの解明」

(直接経費 1,700 千円、間接経費 510 千円)

学内との共同研究

1. 医薬保健研究域・薬学系 石橋弘行教授、谷口剛助教

Pim-3 キナーゼ阻害活性を指標とした、新規の抗がん剤の開発

2. 医薬保健研究域・医学系 金子周一教授

免疫樹状細胞療法の開発

3. 医薬保健研究域・医学系 和田隆志教授

腎疾患におけるケモカインの病態生理学的役割の解析

4. 医薬保健研究域・医学系 川野充弘講師

関節リウマチにおけるケモカインの病態生理学的役割の解析

5. 医薬保健研究域・医学系 加畑多文助教

骨折におけるケモカインの病態生理学的役割の解析

6. フロンティアサイエンス機構 太田嗣人助教

メタボリック・シンдрームにおけるケモカインの病態生理学的役割の解析

学外との共同研究

1. 東京大学・薬学系研究科 岡部隆義教授

Pim-3 活性阻害作用を指標とした低分子化合物のスクリーニング

2. 東京大学・医学系研究科 松島綱治教授

慢性炎症・がん化過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析

3. 神奈川歯科大学・歯学部 畑隆一郎教授

ケモカイン BRAK/CXCL14 のがん病態での病態生理学的役割の解析

4. 和歌山県立医科大学・医学部 近藤捻和教授

慢性炎症時の組織修復過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析

5. 米国国立がん研究所 J.J. Oppenheim 博士

慢性炎症・がん化過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析

6. 中国・蘇州大学・医学部 陸培英准教授

新生血管形成過程の分子病理学的解析

7. 中国・復旦大学・医学部 李影奕准教授

Pim-3 の病態生化学的役割の解析

免疫炎症制御研究分野

<研究スタッフ>

教授	須田 貴司	
助教	今村 龍	木下 健
大学院生	王 強 (D4)、串山 裕子(D2)	
技術補佐員	劉 璟壬	

<研究概要>

がん組織においては血流不足による低酸素、低栄養や抗がん剤の影響で多くの細胞が死ぬ。これまでの我々や他の研究から、死につつある細胞や死細胞から様々な炎症誘導シグナルが発せられることが明らかになってきた。我々は、死細胞が発する炎症シグナルががん微小環境に影響を与え、がんの消長や悪性化に影響を及ぼすと考え、細胞死と炎症のシグナル伝達の接点で働く蛋白質に着目した研究を行っている。最近、特に自然免疫応答や細胞死の誘導・制御に働く NLR ファミリー に属する細胞質蛋白とそのシグナル伝達因子 ASC に着目した研究を行っている。

<2011 年度の研究成果及び今後の研究計画>

1) トリコスタチン A の IL-1 β 産生誘導機構の解析: ヒストン脱アセチル酵素 (HDAC) 阻害剤は抗がん剤の候補として開発が進められている。我々は、HDAC 阻害剤のプロトタイプであるトリコスタチン A が PMA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) で前処理したヒト単球様白血病細胞株 THP-1 に細胞死と炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を誘導することを見出した。この IL-1 β の産生は近年インフラマゾームの構成蛋白として注目されている NLRP3、ASC およびカスパーゼ 1 に依存した応答であり、NADPH オキシダーゼ阻害剤で抑制されることを明らかにした。また、トリコスタチン A 処理により THP-1 の活性酸素レベルが上昇したことから、トリコスタチン A は活性酸素の生成を誘導することで NLRP3 の活性化を誘導し、IL-1 β の産生を誘導すると考えられる。今後は、同様の作用が他の HDAC 阻害剤でも誘導されるか、また同様の応答が他の腫瘍細胞や正常なヒト単球細胞でもみられるか検討する予定である。

2) PYNOD の機能解析: NLR ファミリーのメンバーで、ASC とカスパーゼ 1 の阻害蛋白として我々が同定した PYNOD のノックアウトマウスを樹立し、解析を行っている。現在 B6 への戻し交配中であるが、今年度はその途中で作製した PYNOD 欠損マウスを用いて野性型マウスとのプレリミナリーな比較検討を行った。その結果、PYNOD

欠損マウスから調整したケラチノサイトは野性型に比べ UVB 刺激後の TNF α 産生が低いことを見出した。今後、自然免疫系の応答をさらに詳細に比較検討するとともに、獲得免疫系などにも異常がないか検討する予定である。また、当研究所の大島教授らが開発した胃がんモデルマウス（Gan マウス）の胃病変部において PYNOD の発現が著明に増加していることを発見した。今後は PYNOD 欠損 Gan マウスを樹立し、胃がんの発症率や悪性度に変化がないか検討する予定である。さらに、当研究所の源教授との共同研究により、ヒトの胃がんや大腸がん病変部における PYNOD の発現についても検討する予定である。

3) ヒト線維肉腫 HT1080 細胞株の IL-1 β 産生機構の解析：我々はこれまでにがん細胞で発現している NLRP3 が NF- κ B 活性化、IL-1 β mRNA の産生に寄与していることを示唆する知見を得ている。一方、多くの NLRP3 発現がん細胞では IL-1 β mRNA を発現しているにも関わらず IL-1 β 前駆体蛋白を検出できていない。そこで代表的な細胞内蛋白質分解系であるプロテアソーム、オートファジーの各阻害剤を試したところ、オートファジー阻害剤3-MA 処理によって、さらにはオートファジー誘導因子 Beclin-1 のノックダウンによって HT1080 細胞内の IL-1 β 前駆体量が増加する事を見いだした。同様の結果をメラノーマ細胞株 SK-MEL28 でも得た。興味深いことに Beclin-1 ノックダウンによって NLRP3 も増加していた。これらからがん細胞 IL-1 β 産生は NLRP3-NF- κ B 経路による促進とオートファジー分解による抑制のバランスで制御されていることが示唆された。今後はがん細胞の NLR 経路、オートファジー誘導分子のノックダウンとその解析により、がん細胞 IL-1 β 産生を制御する機構の解明を目指す。また、ヒト胃がんおよび大腸がんの臨床検体サンプルの NLR, オートファジー関連因子、IL-1 β の発現レベルについても解析し、がん進行度、悪性度との相関を検証する予定である。

研究業績

<論文発表>

原著

当研究室主体の発表論文

1. Motani, K., Kushiya, H., Imamura, R., Kinoshita, T., Nishiuchi, T., and Suda, T.: Caspase-1 protein induces apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)-mediated necrosis independently of its catalytic activity. *J. Biol. Chem.* 2011, 286(39):33963-33972

共同研究による発表論文

2. Harashima, N., Inao, T., Imamura, R., Okano, S., Suda, T., and Harada, M.: Roles of the PI3K/Akt pathway and autophagy in TLR3 signaling-induced apoptosis and growth arrest of human prostate cancer cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 2012, in press
3. Furuichi, K., Kokubo, S., Hara, A., Kitajima, S., Toyama, T., Okumura, T., Suda, T., Mukaida, N., Kaneko, S. and Wada, T.: Fas ligand has greater impacts on apoptosis and inflammation in ischemic acute kidney injury than TNF- α . *Nephron Extra* 2012, in press.

<学会発表>

1. Motani, K., Kushiyaama, H., Imamura, R., Kinoshita, T., and Suda, T.: Caspase-1 induces ASC-mediated necrosis independently of its catalytic activity. 13th International TNF Conference, (Awaji) May 18, 2011
2. Imamura, R., Kinoshita, T., Wang, Q., Kushiyaama, H., and Suda, T.: Anti-inflammatory activity of PYNOD and its mechanism in humans and mice. 日本分子生物学会 第 11 回 春季シンポジウム・金沢国際がん生物学シンポジウム (金沢) 2011 年 5 月
1. 須田貴司: 細胞死の様態を決定する新しい分子機構. 第 20 回日本 Cell Death 学会 学術集会 シンポジウム, (東京) 2011 年 7 月
2. Kushiyaama, H., Imamura, R., Suda, T.: Trichostatin A induces macrophage IL-1 β production by activating NLRP3 inflammasome. 2011 年日本免疫学会学術集会 ワークショップ, (幕張) 2011 年 11 月
3. Suda, T., NLRs: cytoplasmic stress sensors mediating inflammation and cell death. 第 34 回日本分子生物学会年会 シンポジウム, (横浜) 2011 年 12 月
4. Kinoshita, T., Imamura, R., and Suda, T.: NLRP3 mediates NF- κ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. 第 34 回日本分子生物学会年会, (横浜) 2011 年 12 月

<外部資金>

1. 須田貴司、科学研究費 基盤研究 (B) (代表): 炎症抑制型 NLR 蛋白 PYNOD の生理的・病理的役割の解明. (直接経費 6,000 千円、間接経費 1,800 千円)
2. 今村 龍、科学研究費 基盤研究 (C) (代表): 皮膚における ASC および PYNOD の機能の解明. (直接経費: 700 千円, 間接経費: 210 千円)
3. 今村 龍、科学研究費 新学術領域「発がんスパイラル」(公募) (代表): 胃がん および大腸がんの発症における細胞質病原体センサー蛋白の役割の解明. (直接経費: 4,500 千円, 間接経費: 1,350 千円)

4. 木下 健、科学研究費 基盤研究（C）（代表）：自然免疫ストレスセンサーNLRPの新機能とその分子機構解明。（直接経費：2400 千円，間接経費：720 千円）

<共同研究>

学外

1. 島根大学医学部・原田 守 教授、原嶋 奈々江 助教
Toll 様レセプター刺激により誘導される前立腺癌細胞の細胞死メカニズムの解明
2. 小澤 岳昌（東京大学理学系研究科化学専攻・教授）
ネクロシス細胞の可視化技術の開発
3. 千葉大学大学院医学研究院・神戸 直智 准教授
ASC が関わる炎症とプログラム細胞死のクロストーク解明
4. 早稲田大学理工学術院・合田 亘人 教授
理化学研究所植物科学研究センター・及川 彰 研究員
プログラムネクロシス細胞のメタボローム解析

学内

1. 医薬保健研究域医学系 和田 隆志 教授、古市 賢吾 准教授
虚血性急性腎障害における Fas リガンドの役割
2. 医薬保健研究域薬学系・太田 富久 教授、川畑 哲郎 助教
ASC を活性化する海洋微生物由来天然物の探索

所内

1. 腫瘍遺伝学研究分野 大島 正伸 教授
胃がん発症モデルマウスにおける PYNOD の役割の検討
2. 腫瘍制御研究分野 源 利成 教授
ヒト消化器がんにおけるインフラマゾーム関連遺伝子発現の解析

腫瘍動態制御研究分野

<研究スタッフ>

教授： 松本邦夫
助教： 中村隆弘 酒井克也
研究協力員： 鈴木芳典
大学院生： Quig Xu（徐慶） 道越洸允 学生： 横山茉梨
技術補佐員： 丹保智佳子 技能補佐員： 端谷 泉

<研究概要>

がんは修復に至らない傷（wound that do not heal）に例えられる。組織傷害を引き金とする炎症から組織修復につながるメカニズムが、がんの微小環境の形成や微小環境を介したがんの悪性進展に関与する。HGF（hepatocyte growth factor）は Met チロシンキナーゼを受容体とし、主として間葉因子として上皮組織の 3 次元（3-D）形態形成、肝臓をはじめとする組織の再生を担う。一方、HGF は増殖因子の中でとりわけがん細胞の 3-D 浸潤を促す生物活性が強く、がん転移に深く関与する。加えて、HGF は抗がん剤に対する耐性獲得に関与することが明らかにされた。HGF-Met 系を介した組織修復の仕組みは悪性腫瘍の生物学的特性に深く関与すると考えられる。

私達はがん微小環境を介したがん悪性化（浸潤・転移・薬剤耐性）ならびに組織再生制御における HGF-Met 系の意義の研究を中心に進めており、とりわけ HGF に対する応答性を左右する Met 受容体活性化抑制機構、HGF による 3-D 上皮-間葉転換と形態形成のダイナミクス、HGF-Met 系を介した肝再生制御の研究などを行っている。また、研究成果を疾患の治療につなげることも研究の完成に向けた取り組みである。構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 阻害剤の創薬研究、HGF タンパク質医薬による難治性疾患の治療法開発にも力を注いでいる。

良性腫瘍と悪性腫瘍の明確な違いは、悪性腫瘍は活発に組織内を浸潤することであり、活発な浸潤性はがん転移につながる。がんの 3-D 浸潤性制御の研究から、自律的に 3-D 浸潤性を示す細胞と、たとえ HGF などの増殖因子が存在しても浸潤性を示さない非浸潤性細胞に分けられることがわかった。3-D 浸潤性獲得のメカニズムについての研究もスタートした。また、当初、Krigle ドメインをもつ受容体様分子として Kremen が発がんや幹細胞維持に関与する Wnt/ β -catenin シグナル制御分子であることから、がん組織における Kremen の生理機能の研究も進めている。これらの研究を発がんやがんの浸潤・転移制御に関わる新たな展開を目指す研究として進めている。

<2011 年度の主な成果と今後の計画>

1. 構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 系阻害剤創製研究

バイオインフォマティクス技術やタンパク質構造解析の研究者と協力し、HGF と Met 受容体相互作用を阻害する低分子創薬研究を進めている。前年までに HGF-Met 系に対する阻害活性をもつリード化合物を数個見いだした。これらリード化合物は HGF によるがん細胞の 3-D 浸潤を阻害し、IC₅₀ は数 μ M～数 10 μ M であった。また、リード化合物と HGF-Met タンパク質との共結晶構造の解析に成功し、リード化合物

が HGF-Met 相互作用ポケットにドッキングする構造を明らかにした。

2. HGF-Met 系を介した肝再生制御の研究

HGF に対する応答性は傷害の有無によって制御されている。Met 受容体 OFF 機構の 1 つとして、Met 受容体 juxtamembrane 領域 Ser985 リン酸化に着目している。肝細胞培養系において Met-Ser985 のリン酸化が Met 受容体の細胞膜局在を減少させ HGF による Met チロシンリン酸化を抑制することを明らかにした。肝再生過程で Met 受容体 Ser985 リン酸化とチロシンリン酸化が相反的に制御されることから、傷害の有無によって HGF に対する応答性を制御するメカニズムの 1 つと考えられる。

3. がん細胞 3-D 浸潤性ならびに上皮 3-D 形態形成のダイナミクスの研究

各種ヒトがん細胞はコラーゲンゲル内での 3-D 培養系において、(たとえ HGF 存在化でも) 浸潤性を示さないものと自立的浸潤性を示すがん細胞に分けられる。非浸潤性と浸潤性を区別するメカニズムとして細胞外マトリックス分解酵素の遺伝子のヒストン/DNA メチル化の詳細を明らかにした。

4. 低分子 IP 受容体アゴニストによる HGF 発現誘導を介した肝傷害抑制

プロスタグランジン I₂ (PGI₂) や PGE_{1/2} は組織傷害を抑制する作用をもつことが知られているがそのメカニズムの多く不明である。PGI₂ 受容体 (IP 受容体) アゴニスト作用をもつ化合物 (ONO-1301) を用いて、ONO-1301 は強い HGF 発現誘導活性をもち、HGF 発現誘導を介して急性肝傷害を強く抑制することを明らかにした。

5. 肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルと Kremen (Krm) の機能の研究

ヒト肺がん細胞を用いて Krm の発現が Wnt/β-catenin シグナルを抑制すること、肺がん細胞やヒト肺がん組織で Krm の発現が著しく低下していることを明らかにした。Krm の発現が失われることが肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルの抑制機能の低下につながると考えられる。

<今後の展望>

1. がん細胞 3-D 浸潤性ならびに 3-D 上皮形態形成のダイナミクス: 上記の成果に続き、非浸潤性 vs 浸潤性に関与する遺伝子セットの ON-OFF 制御の詳しい機構を明らかにする。一方、乳腺上皮細胞は HGF により 3-D 管腔構造を形成する。分化転換の可視化を用いることで、上皮-間葉転換のダイナミクスと 3-D 上皮形態形成機構の解明を進める。上皮は乳がん、肺がん、前立腺がんなどのルーツであり、上皮組織化機構の研究はがん微小環境を介した悪性化の理解につながる。
2. 構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 系阻害剤創製研究: 化合物-HGF 複合体の結晶構造解像度を高めることによる分子設計の精度を高めること、化学合成チームの協力を得て化合物数を増やすことによって、数十倍～100 倍の活性向上を目指す。
3. 肺がんにおける Wnt/β-catenin シグナルと Kremen の機能の研究: In vitro/in vivo 腫瘍形成に対する Kremen の阻害活性を解析しており、上記と合わせて論文報告する。

研究業績

<論文>

1. Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Imizu T, Matsumoto K. 3-D collagen- and MT1-MMP-dependent MMP-2 activation in human malignant mesothelioma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 412: 98-103, 2011.
2. Xu Q, Nakayama M, Suzuki Y, Sakai K, Nakamura T, Sakai Y, Matsumoto K. Suppression of acute hepatic injury by a synthetic prostacyclin agonist through hepatocyte growth factor expression. *Am J Physiol*, 302: G420-G429, 2012.

<総説>

1. Nakamura T, Sakai K, Nakamura T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor twenty years on: much more than a growth factor. *J Gastroenterol Hepatol*, 26: 188-202, 2011.
2. Sakai K, Nakamura T, Kinoshita T, Nakamura T, Matsumoto K. HGF-antagonists: structure, activities, and anti-cancer approach. *Current Signal Transduction Therapy*, 6: 191-199, 2011.
3. Sakai K, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Significance, mechanisms, and progress of anticancer drugs targeting HGF-Met. In “*Cancer Treatment*”, InTech Open Access Publisher, pp. 313-332, 2011.

<共同研究による論文>

1. Komamura K, Tatsumi R, Tsujita-Kuroda Y, Onoe T, Matsumoto K, Nakamura T, Miyazaki J, Horio T, Sugimachi M. Cellular injury of cardiomyocytes during hepatocyte growth factor gene transfection with ultrasound-triggered bubble liposome destruction. *J Drug Delivery*, 2011: 1-8, 2011.
2. Azuma H, Isaka Y, Nomi H, Inamoto T, Li XK, Hōunig T, Takabatake Y, Ichimaru N, Ibuki N, Matsumoto K, Ubai T, Katsuoka Y, Takahara S. Induction of donor-specific tolerance using superagonistic CD28 antibody in rat renal allografts: Regulatory T-cell expansion before engraftment may be important. *Transplantation*, 90: 1328-1335, 2011.
3. Mizuno S, Ikebuchi F, Fukuta K, Kato T, Matsumoto K, Adachi K, Nakamura T. Recombinant human HGF, but not rat HGF, elicits glomerular injury and albuminuria in normal rats via an immune complex-dependent mechanism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 38: 192-201, 2011.
4. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res*, 17: 2260-2269, 2011.
5. Yasui T, Ohuchida K, Zhao M, Cui L, Onimaru M, Egami T, Fujita H, Ohtsuka T, Mizumoto K, Matsumoto K, Tanaka M. Adenoviral therapy is more effective in gemcitabine-resistant pancreatic cancer than in gemcitabine-sensitive cells. *Anticancer Res*, 31: 1279-1287, 2011.
6. Taiyoh H, Kubota T, Fujiwara H, Matsumura A, Murayama Y, Okamoto K, Ichikawa D, Ochiai T, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. NK4 gene expression

enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis of murine colon cancer cells. *Anticancer Res.*, 31: 2217-2224, 2011.

7. Li Q, Wang W, Yamada T, Matsumoto K, Sakai K, Bando Y, Uehara H, Nishioka Y, Sone S, Iwakiri S, Itoi K, Utsugi T, Yasumoto K, Yano S. Pleural mesothelioma instigates tumor-associated fibroblasts to promote progression via a malignant cytokine network. *Am J Pathol*, 179: 1483-1493, 2011.
8. Ueshima K, Kitaoka K, Nakase J, Xu Q, Matsumoto K, Tsuchiya H. Promotion of rabbit ligament healing by local delivery of hepatocyte growth factor. *J Orthopaedic Sci*, 16: 451-457, 2011.
9. Hirata Y, Soeki T, Yamada H, Shiota A, Shimabukuro M, Sakai Y, Nakayama M, Matsumoto K, Igarashi T, Sata M. A synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, ameliorates ventricular remodeling after acute myocardial infarction via upregulation of HGF in rat. *Biomed Aging Pathol*, 1:90-96, 2011.
10. Yamada T, Takeuchi S, Kita K, Bando H, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. Hepatocyte growth factor induces resistance to anti-epidermal growth factor receptor antibody in lung cancer. *J Thoracic Oncol*, 7: 272-280, 2012.
11. Hirata Y, Shimabukuro M, Uematsu E, Soeki T, Yamada H, Sakai Y, Nakayama M, Matsumoto K, Igarashi T, Sata M. A synthetic prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity, ONO-1301, protects myocardium from ischemia/reperfusion injury. *Eur J Pharmacol*, 674: 352-358, 2012.

<著書>

1. 酒井克也、松本邦夫: “細胞増殖因子”、「ものづくり技術からみる再生医療」田畑泰彦編集、pp. 48-56、シーエムシー出版、2011.

<国内学会発表>

1. Xu Qing, Mizuho Nakayama, Yoshiki Sakai, Kunio Matsumoto. プロスタサイクリンアゴニストによる HGF 発現誘導を介したマウス急性肝傷害の抑制. 第 10 回日本再生医療学会、2011 年 3 月 1 日(京王プラザホテル、東京)
2. Katsuya Sakai, Seiji Yano, Kunio Matsumoto. Epigenetic dysregulation of matrix metalloproteinase-2 expression confers mesothelioma cell invasion. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日(金沢)
3. Takahiro Nakamura, Xu Qing, Kunio Matsumoto. Functional analysis of the Kremen in lung cancer cells through Wnt/ β -catenin signaling pathway. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日(金沢)
4. Xu Qing, Mizuho Nakayama, Yoshinori Suzuki, Katsuya Sakai, Takahiro Nakamura, Yoshiki Sakai, Kunio Matsumoto. Suppression of acute hepatic injury by prostacyclin agonist through enhancing hepatocyte growth factor expression in mice. 日本分子生物学会第 11 回春期シンポジウム、2011 年 5 月 26 日(金沢)

5. Kazusa Sano, Tomoko Sugiura, Noritaka Nakamichi, Kunio Matsumoto, Yukio Kato. Physiologically-based pharmacokinetic model for hepatocyte growth factor. 日本薬物動態学会年会、2011 年 11 月 16 日 (広島)
6. 若山友彦、仲田浩規、松本邦夫、井関尚一: セルトリ細胞特異的な肝細胞増殖因子受容体欠損による精子形成障害. 第 26 回日本生殖免疫学会、2011 年 12 月 2 日 (名古屋)
7. 道越洸充、中村隆弘、松本邦夫、松郷誠一: ヒト肺がん細胞に対するリポ酸の増殖抑制作用とそのメカニズム. 日本生物工学会 2011 年度大会、2011 年 9 月 27 日 (東京都小金井市)
8. Atsuhiko Nakamura, Noritoshi Nagaya, Hiroaki Obata, Yoshiki Sakai, Kaoru Hamada, Mizuho Nakayama, Kunio Matsumoto, Hiroshi Kimura. Oral administrations of a novel long-acting prostacyclin agonist ameliorate pulmonary arterial hypertension in Rats. American Thoracic Society 2011 International Conference, May 13-18, 2011 (Denver, Colorado, USA).
9. 竹内伸司、Wei Wang、Qi Li、山田忠明、Ivan Donev、小泉瞳、中村隆弘、松本邦夫、西岡安彦、曾根三郎、上仲俊光、矢野聖二: Met/VEGFR-2 阻害剤 E7050 は変異型 EGFR 肺癌において HGF による EGFR-TKI 耐性誘導を克服する. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 3 日 (名古屋)

<外部資金>

1. 中村隆弘: 科学研究費補助金 基盤研究 (若手) 「cMet/HGF 受容体 ON-OFF 機能変換を介した再生・病態・発癌制御の研究」 2,860 千円
2. 酒井克也: 科学研究費補助金 基盤研究 (若手) 「3-D 上皮組織化モデルにおける動的細胞分化転換と形態形成の研究」 2,600 千円
3. 松本邦夫: 地域産学官連携化学技術振興事業費補助金 ほくりく健康創造クラスター「医工融合による動脈硬化の診断と治療の先導的研究／血管病変部位の治療」 1,500 千円
4. 松本邦夫: 受託研究 (小野薬品工業株式会社) 「プロスタグランジン類の再生薬理作用における HGF の役割とメカニズムの研究」 3,412 千円
5. 松本邦夫: 三谷研究開発助成金「結晶構造を基盤とするがん転移阻止のための HGF-Met 阻害剤の創薬開発」 1,000 千円
6. 酒井克也: 北國銀行若手研究者助成金「3 次元組織形成を支える組織幹細胞の分化動態と染色体数異常形成の研究」 650 千円
7. 松本邦夫: 共同研究 (クリングルファーマ株式会社) 「難治性神経疾患に適應できる組換え HGF 蛋白質の新規製剤の開発」 630 千円
8. 松本邦夫: 次世代がん研究推進プロジェクト「結晶構造解析を基盤とするリード化合物の最適化による低分子 HGF-Met 阻害剤の創製研究」 4,000 千円

＜学内外との共同研究＞

1. 金沢大学大学院医学系研究科（整形外科）土屋弘行教授: HGF による骨延長治療の基礎研究
2. 金沢大学大学院医学系研究科（組織発達構築学）井関尚一教授・若山友彦准教授: 精巣機能における HGF-Met 系の役割についての研究
3. 金沢大学理工研究域自然システム学系 松郷誠一教授: リポ酸の抗腫瘍作用とそのメカニズムに関する研究
4. 金沢工業大学ゲノム生物工学研究科 松田武久教授: In situ 成熟型人工血管技術のための血管内皮前駆細胞の増殖・分化制御の研究
5. 大阪府立大学大学院理学系研究科構造生物学 木下誉富准教授: 結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
6. 大阪大学大学院工学研究科構造物理化学 井上豪教授: 結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
7. 千葉県がんセンター細胞治療開発研究部 田川雅敏博士: NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
8. 東邦大学医学部消化器外科学講座 島田英昭教授: NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
9. 新潟大学大学院医歯薬総合研究科内部環境医学（呼吸器内科） 小屋俊之助教: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した喘息治療の研究
10. 岡山大学大学院医歯学総合研究科腎・免疫・内分泌代謝内科学 槇野博史教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した慢性腎不全治療の研究
11. 奈良県立医科大学内科学第二講座（呼吸器・血液内科）木村弘教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した肺線維症・肺高血圧症治療の研究
12. 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 佐田政隆教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した心筋梗塞・拡張型心筋症治療の研究
13. 京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科 稲垣暢也教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した膵島移植・糖尿病治療の研究
14. 和歌山県立医科大学呼吸器・アレルギー内科 一ノ瀬正和教授: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した COPD 治療の研究
15. クリングルファーマ株式会社: HGF-Met 系制御による疾患治療の基礎研究と臨床開発
16. 小野薬品工業株式会社: プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した組織再生治療の基礎研究