

# 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  
技能補佐員 山岸 小百合  
大学院生（博士課程） 李 子晨  
大学院生（博士課程） 田中 望  
大学院生（博士課程） 佐藤 友美  
大学院生（博士課程） 吉本 泰祐(口腔外科)  
研究協力員 Moustafa Sakr

### 【 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、当研究室でクローニングされた最初の膜型 MMP であり、がん細胞・組織に特異的に発現し、浸潤・転移に重要な役割を果たしている。MT1-MMP は、MMP-2 の活性化酵素として同定されたが、後に自らがコラーゲンなどの細胞外マトリックス(extracellular matrix, ECM) 成分を分解することが明らかになった。特に MT1-MMP は細胞のコラーゲングル内での浸潤性増殖をサポートする唯一のコラゲナーゼであることからからも特別視されている。また、MT1-MMP は ECM 成分の分解によるがん微小環境の構築・再構築だけでなく、細胞内・外の多様な分子、とりわけ細胞膜タンパクのシェディングなどにより浸潤・転移・運動・増殖などのがん悪性化形質に関与する。一方、我々は、細胞レベルで MT1-MMP は細胞接着斑のターンオーバーをコントロールすることにより細胞機能の制御に密接に関与することを報告してきた。近年、MT1-MMP がセリンプロテアーゼの阻害因子である HGF Activator Inhibitor-1 (HAI-1)を切断・不活化することを見出した。すなわち、MT1-MMP はがん組織において著しく亢進しているプロテアーゼカスケードをトリガーしていることを明らかにし、プロテアーゼストームという名称を提案した。MT1-MMP に対する DNA アプタマーの開発等により MT1-MMP を標的とした治療法の開発を目指している。

### <2014 年の研究成果、進捗状況と今後の計画>

MT1-MMP によるファイブロネクチン重合と N-カドヘリン接着の制御：

我々はこれまでに MT1-MMP が ECM 分解カスケードの起点となり、ファイブロネクチンの重合・集積によるマトリックス形成を抑制することを報告してきた。HT1080

細胞において MT1-MMP の発現を siRNA でノックダウンするとファイブロネクチンの蓄積・重合が促進されるが、それに伴い N-カドヘリン接着が著しく亢進する。N-カドヘリン接着の亢進はファイブロネクチンの siRNA によって抑制されることから、重合したファイブロネクチンマトリックスが N-カドヘリンを安定化させることが示唆された。また、細胞接着の極めて初期段階を詳細に検討した結果、細胞接着斑の形成、ファイブロネクチン重合、N-カドヘリン安定化のステップに MT1-MMP が関与することを明らかとなった。がん悪性化における MT1-MMP による N-カドヘリン制御の意義を検討中である。

ビンキュリンは MEK/ERK 経路を介して MT1-MMP の転写を負に制御する：

ビンキュリンは細胞接着斑の構成タンパクの一つで、PTEN と結合し安定化することにより PTEN のがん抑制活性を亢進し、結果としてがん抑制因子として働くと考えられている。一方で、ビンキュリンは細胞接着斑の機能を制御する重要な分子であることから、PTEN 安定化以外の機能を検討するために PTEN を欠損している扁平上皮がん由来 HSC-4 細胞を用いてその機能を検討した。HSC-4 細胞のビンキュリン発現をノックダウンしたところ細胞—細胞、細胞—ECM 間の接着が弱まり、MT1-MMP の転写レベルにおける発現亢進が認められた。ビンキュリンノックダウンによる MT1-MMP の発現亢進は ERK 阻害剤でキャンセルされたことから、ビンキュリンは MT1-MMP 転写などのがん悪性化形質を MEK/ERK 経路を介して負に制御していることが示唆された。今後、細胞接着斑構成分子と MT1-MMP との関連を検討する。

膜型セリンプロテアーゼ阻害因子 HAI-1 による MET の誘導：

これまでに MT1-MMP の新規基質として膜型セリンプロテアーゼ阻害因子 HGF Activator Inhibitor-1 (HAI-1) を同定した。上皮系がん細胞では MT1-MMP が HAI-1 を切断することにより、膜型セリンプロテアーゼであるマトリプターゼが活性化され、MT1-MMP とマトリプターゼの協調作用が浸潤性増殖には必須であることを報告した。上皮系がん細胞ではマトリプターゼは EMT に必須である。一方、マトリプターゼを発現しない間葉系細胞 HT1080 細胞に MT1-MMP により切断されない変異型 HAI-1 を発現させると細胞形態、細胞間接着などが上皮系細胞の様相を呈する。従って、HT1080 細胞の発現する未同定のセリンプロテアーゼが間葉系形態の維持に必要であることが示唆された。HT1080 細胞における HAI-1 結合セリンプロテアーゼの同定、および同細胞の悪性化形質との関連を検討中である。

## 【 研 究 業 績 】

### < 発表論文 >

#### 原著論文

(研究室主体)

1. Takino T, Yoshimoto T, Nakada M, Li Z, Domoto T, Kawashiri S, Sato H.  
Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly and  
N-cadherin adhesion. *Biochem Biophys Res Commun.* 450, 1016-1020, 2014.
2. Yoshimoto T, Takino T, Li Z, Domoto T, Sato H  
Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERK pathway.  
*Biochem Biophys Res Commun.* 455, 251-255, 2014.

(共同研究)

1. Sabit H, Nakada M, Furuta T, Watanabe T, Hayashi Y, Sato H, Kato Y, Hamada J.  
Characterizing invading glioma cells based on IDH1-R132H and Ki-67  
immunofluorescence. *Brain Tumor Pathol.* 31, 242-246, 2014.
2. Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Ilya V. Pyko1,4, Takino T,  
Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto K, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase  
kinase 3 $\beta$  sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun  
N-terminal kinase-mediated pathway. *Molecular Cancer Therapeutics.* (in press).
3. Oshima H, Nakayama M, Han T, Ju X, Maeda Y, Robine S, Sato H, Taketo MM, Oshim  
M. TGF $\beta$  suppression in regenerating epithelial cells in an inflammatory  
microenvironment leads to development of invasive gastrointestinal cancer. *Cancer Res.*  
(in press)

### < 学会発表 >

1. 滝野隆久, 吉本泰祐, 佐藤博  
「MT1-MMP による細胞接着斑を介したフィブロネクチンマトリックス形成制御」  
第73回日本癌学会学術総会 (平成26年9月27日 横浜)
2. 芝一休, 遠藤良夫, 佐藤博, 宇都義浩  
「TX-2137 をリード化合物とした Akt 選択的抗転移低酸素サイトトキシシン TX-2  
282 の開発」

第73回日本癌学会学術総会（平成26年9月27日 横浜）

3. 大島浩子, 中山瑞穂, 佐藤博, 武藤誠, 大島正伸  
「慢性炎症と TGF $\beta$  シグナル抑制による消化管腫瘍の浸潤誘導」  
第73回日本癌学会学術総会（平成26年9月25日 横浜）
4. 吉本泰祐, 滝野隆久, 川尻修一, 佐藤博  
「MT1-MMP によるフィブロネクチン重合と N-カドヘリン接着の制御」  
第23回日本がん転移学会学術総会（平成26年7月10日 金沢）

#### <外部資金>

1. 基盤研究 (C) (代表) 佐藤 博  
「膜型マトリックスメタロプロテアーゼによるセリンプロテアーゼ活性化機構の解析」 1,300 千円

#### <共同研究>

1. 坂本 毅治（東京大学医科学研究所）  
がん組織における MT1-MMP の新規機能の解析
2. 望月 早月（慶應義塾大学医学部病理）  
「ヒト型 ADAM28 抗体開発と ADAM28 活性調節機構の解析」
3. 東 昌市（横浜市立大学生命ナノシステム科学研究科）  
「標的 MMPs に対する高特異性阻害剤の分子設計とがん悪性進展抑制の開発」
4. 宇都 義浩（徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部）・遠藤 義男  
「ヒトがん細胞を用いた Akt/MMP-9 阻害性抗転移剤の開発」

## 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

助教：佐々木宗一郎（2014年8月まで博士研究員，9月から助教）

研究補助員：南邦子 東海林美沙恵（2014年12月から）

大学院生： 宋瑤（医薬保健学総合研究科・博士課程）

大学院生： 崔平方（医薬保健学総合研究科・博士課程）

大学院生： Heny Ekowati（医薬保健学総合研究科・博士課程，2014年10月入学）

大学院生： 内藤達志（福井大・医・大学院生）

大学院生： 田辺和（自然科学研究科・修士課程）

### 【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。

### <2014年の成果>

1) 放射線非照射のヌードマウスの骨髄内に Bcr-Abl 遺伝子導入した骨髄前駆細胞を投与して生じる慢性骨髄性白血病モデルでは，白血病細胞などによって産生される CCL3 が白血病発症に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。このモデルにおいても，Bcr-Abl 遺伝子非発現の非白血病細胞も CCL3 を発現していた。正常骨髄においても，特定の細胞集団が CCL3 を恒常的に発現していることを認めた。CCL3 ならびに CCL3 に対するレセプターである CCR1・CCR5 が欠損していると，骨髄移植後の骨髄幹細胞の生着が亢進したことから，CCL3 が骨髄幹細胞に対して抑制的に作用していることが示唆された。

2) 昨年度，マウス乳がん細胞株 4T1 細胞株から乳腺脂肪組織に接種することで，骨に自然転移する 4T1.3 クローンを樹立した。4T1.3 クローンは，親株と比較して，乳腺脂肪組織での増殖速度ならびに短期遊走能アッセイでは有意な差を示さない一方で，幹細胞マーカーである CD44 発現が亢進していて，骨髄内に直接投与した時の増殖能も高く，ケモカイン CCL4・CCL3 の発現が亢進していた。4T1.3 クローンの CCL4 発現を shRNA で抑制すると，CD44 発現にはほとんど影響がないにもかかわらず，骨転移が減弱したことから，CCL4 がこの骨転移過程に必須の役割を果たしていることが示唆された。

3) マウス大腸がん細胞株 colon 26 の盲腸への接種モデルに対して、ケモカイン・レセプターCCR5 に対して拮抗作用を示す Maraviroc を投与すると、腫瘍内線維芽細胞数の減少とともに、腫瘍容積の減弱が起きた。このことから、大腸がんの進展過程において CCR5 発現線維芽細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

4) gemcitabine によって、ヒト膵臓がん細胞株での細胞老化とケモカイン CXCL8/IL-8 産生が、試験管内のみならず担がん個体でも誘導されることを見出した。産生される CXCL8/IL-8 が細胞老化には関与しない一方で、担がん個体では血管新生を誘導することで、gemcitabine の抗がん作用に拮抗することが示唆された。

5) マウス肝臓がん細胞株 BNL を接種されたマウスに、シクロホスファミド (CTX) 投与すると、腫瘍が消失するとともに、BNL を再接種しても拒絶されることから、特異的免疫反応が成立したと考えられた。CTX による BNL によるがん組織消失は、ヌードマウスでは認められず、CD4 抗体投与によっても認められないことから、CD4 陽性 T 細胞に依存して起きると考えられた。CTX 投与直後の腫瘍部位の解析結果から、細胞障害顆粒 CD107a 発現 CD4 陽性 T 細胞が浸潤していたことから、CTX 投与によって、抗原に依存しない、細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞の腫瘍内への浸潤が誘導されたと考えられた。

#### <今後の研究計画>

1) 骨髄内で恒常的に CCL3 を産生している細胞を同定するとともに、恒常的 CCL3 産生の正常造血機構での役割を解明する。

2) 乳がん骨転移過程における CCL4・CCL3 系の役割を、主にマウスモデルで解明し、CCL4 または CCL3 の阻害剤の骨転移治療薬としての可能性を検証する。

3) 大腸がん組織形成過程での、線維芽細胞集積過程への CCL3/CCR5 系の関与を県とするとともに、大腸がん治療法への CCR5 阻害剤の応用の可能性を検証する。

4) CTX 投与によって誘導される、細胞障害性 CD4 陽性 T 細胞の腫瘍内浸潤過程について、細胞・分子レベルで解析を加える。

5) がんの進展過程における腸内細菌叢とケモカイン・システムとのクロストークの解明を目指した研究を始める。

#### 【 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. Hamano R, Baba T, Sasaki S, Tomaru U, Ishizu A, Kawano M, Yamagishi M, and Mukaida N. Ag and IL-2 immune complexes efficiently expand Ag-specific Treg cells that migrate in response to chemokines and reduce localized immune responses. *Eur J Immunol* 2014; 44 (4): 1005–1015. doi: 10.1002/eji.201343434.

2. Sasaki S, Baba T, Shinagwa K, Matsushima K, and Mukaida N. Crucial involvement of the CCL3-CCR5 axis-mediated fibroblast accumulation in colitis-associated carcinogenesis in mice. *Int J Cancer* 2014; 135 (6): 1297-1306. doi: 10.1002/ijc.28779.

他の研究室との共同研究

3. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, and Oshima M. TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 2014; 33 (29): 3820-3829. doi: 10.1038/onc.2013.356.
4. Khan K, Schneider-Poetsch, Ishfaq M, Ito A, Yoshimoto R, Mukaida N, and Yoshida M. Splicing inhibition induces gene expression through canonical NF- $\kappa$ B pathway and extracellular signal-related kinase activation. *FEBS Letter* 2014 March; 588 (6): 1053-1057. doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.018.
5. Kitahara M, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Mukaida N, Matsushima K, and Kaneko S. Efficient generation of highly immunocompetent dendritic cells from peripheral blood of patients with hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int Immunopharmacol* 2014; 21(2): 346-353. doi: 10.1016/j.intimp.2014.05.023
6. Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Shimaoka S, Mukaida N, Takeda Y, Yamada K, Soga T, Furukawa T, and Akiyama S. Thymidine phosphorylase activates NF $\kappa$ B and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells. *Oncotarget* 2014; 5 (21): 10473-10485.
7. Murayama T, Kikuchi M, Miita T, Yamada R, Matsubara K, Sadanari H, and Mukaida N. Human cytomegalovirus replication supported by virus-induced activation of CCL2-CCR2 interactions. *Biochem Biophys Res Commun* (in press).
8. Mazzocca A, Dituri F, De Santis F, Filannino A, Lopane C, Betz RC, Li Y-Y, Mukaida N, Winter P, Tortorella C, Giannelli G, and Sabbà C. Lysophosphatidic acid receptor LPAR6 supports the tumorigenicity of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* (in press).

総説論文ならびに著書(英文論文に限る)

1. Mukaida N. Intestinal microbiota: unexpected alliance with tumor therapy. *Immunotherapy* 2014; 6(3): 231-233. doi:10.2217/IMT.13.170.
2. Mukaida N, Sasaki S, and Baba T. Chemokines in cancer development and progression, and their potentials as targeting molecules for cancer treatment. *Mediators Inflamm* 2014; Article ID 170381, 15 pages, 2014. doi:10.1155/2014/170381.
3. Li Y-Y and Mukaida N. The pathophysiological roles of Pim-3 kinase in pancreas tumor development and progression. *World J Gastroenterol* 2014; 20 (28): 9392-9404. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9392.



<学会発表> (筆頭発表者が分野所属の者に限る)

1. Mukaida N and Baba T. Crucial roles of CCL3 in leukemogenesis and hematopoiesis. *Gordon Research Conference on Chemotactic Cytokines*. Jul. 27 to Aug. 1, 2014, West Dover, VT, USA (招待講演)
2. Baba T. Pathophysiological role of a stem cell inhibitory chemokine, CCL3, in chronic myeloid leukemia. *International Symposium on Tumor Microenvironment*. Nov. 21, 2014, Kanazawa, Japan.
3. 向田直史。ケモカインと Cancer-associated Fibroblast (CAF)。第 79 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 (招待講演)。2014 年 6 月 19 日～20 日。札幌。
4. 向田直史。急性細菌感染における好中球-単球間のクロストークにおけるケモカインの役割。第 51 回日本細菌学会中部支部総会・特別講演 (招待講演)。2014 年 10 月 17 日。金沢。
5. 向田直史, 小松則夫。慢性骨髄性白血病のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) 療法におけるケモカイン CCL3 の関与。第 18 回日本がん分子標的治療学会。2014 年 6 月 25 日～27 日。仙台。
6. 佐々木宗一郎, 馬場智久, 向田直史。マウス乳がん細胞の同所移植による骨転移過程におけるケモカインの役割の解析。第 23 回日本がん転移学会学術集会。2014 年 7 月 10 日～11 日。金沢。
7. 内藤達志, 馬場智久, 中本安成, 向田直史。細胞障害性 CD4<sup>+</sup>細胞はシクロフホスファミドによる細胞障害に抗原非依存的に関与する。第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日～27 日。横浜。
8. 田辺和, 佐々木宗一郎, 馬場智久, 向田直史。大腸がんにおける線維化の蓄積および進展に関する CCL3/CCR5 の役割。第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日～27 日。横浜。
9. Yao Song, Tomohisa Baba, Naofumi Mukaida。Gemcitabine-induced CXCL8 expression and cell senescence in human pancreatic cancer cell lines. 第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日～27 日。横浜。
10. 佐々木宗一郎, 馬場智久, 向田直史。マウス乳がん細胞の骨転移過程におけるケモカインの役割の解析。第 73 回日本癌学会学術集会。2014 年 9 月 25 日～27 日。横浜。

11. 向田直史, 佐々木宗一郎, 馬場智久。 マウス乳がん骨転移株での CC ケモカインの過剰発現とその病態生理学的意義。 第 17 回癌と骨病変研究会。 2014 年 11 月 14 日。 東京。
12. Sasaki S, Baba T, and Mukaida N. Potential roles of CC chemokines, in survival of murine breast cancer cell line in bone marrow. 第 43 回日本免疫学会・学術集会。2014 年 12 月 10 日～12 日。京都。

#### 知的財産

発明者：長野哲雄，中野浩史，長谷川司，斎藤奈英，小島宏建，岡部隆義，向田直史。 発明の名称：キナーゼ阻害剤。 特願2014-025781。2014年2月13日出願。

#### <外部資金>

##### 向田直史

1. 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 2,650 千円，間接経費 795 千円）
2. 二国間交流事業・オープンパートナーシップ共同研究（代表）  
腸内細菌叢とケモカインとのクロストークによるがん病態制御機構の解明  
（直接経費 2,500 千円）
3. 次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム（代表）  
骨髄微小環境内での，ケモカインを介する細胞競合を標的とした治療法の開発  
（直接経費 16,670 千円，間接経費 1,667 千円）

##### 馬場智久

1. 科学研究費・基盤研究（C）（代表）  
慢性骨髄性白血病発症における正常骨髄細胞との相互作用機構の解明  
（直接経費 1,300 千円，間接経費 390 千円）
2. 北陸銀行若手研究者助成  
慢性骨髄性白血病における炎症性ケモカインの分子病態生理学的役割の解明  
（900 千円）
3. 北國がん研究振興財団・研究助成  
慢性骨髄性白血病の増悪に関与する，炎症性ケモカインを介した骨髄内微小環境の構築機序の解明（1,000 千円）
4. かなえ医薬振興財団・研究助成  
炎症性ケモカインを分子標的とした慢性骨髄性白血病の新規治療法の確立  
（1,000 千円）

## <共同研究>

### 学内との共同研究

1. 医薬保健研究域・医学系 飯田宗穂助教  
発がん過程と腸内細菌叢の相互作用の解析
2. 医薬保健研究域・薬学系 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
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 太田嗣人准教授  
メタボリック症候群での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・創薬オープンイノベーションセンター 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. 北陸大学・薬学部 村山次哉教授  
サイトメガロウイルス感染とケモカイン
4. 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
5. 和歌山県立医科大学・医学部 近藤捻和教授  
慢性炎症ならびに発がん過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
6. 和歌山県立医科大学・医学部 井篁一彦教授  
卵巣がん進展過程におけるケモカインの病態生理学的役割の解析
7. 福井大学・医学部 中本安成教授  
ケモカインを標的としたがん免疫療法の開発
8. 順天堂大学・医学部 小松則夫教授  
骨髄増殖性疾患とケモカイン
9. 富山大学・和漢医薬学総合研究所 早川芳弘准教授  
浸潤・転移過程におけるケモカイン
10. 米国国立がん研究所 Giorgio Trinchieri 博士  
発がん過程と腸内細菌叢の相互作用の解析
11. 中国・復旦大学・医学部 李影奕准教授  
Pim-3 の病態生化学的解析

### その他

Associate Editor, Cytokine (Official Journal of International Cytokine Society)

2012年4月～

## 免疫炎症制御研究分野

### <研究スタッフ>

教授 須田 貴司  
助教 木下 健 助教 今村 龍 (~8月)  
博士研究員 張 培培 博士研究員 中嶋 伸介  
大学院生 (博士課程) 串山 裕子  
大学院生 (修士課程) 趙 天祥  
技術補佐員 齋藤 翔子 (~6月) 技術補佐員 櫻井 真由美

### 【研究概要】

細胞死と炎症は共にがん微小環境に大きな影響を及ぼすことから、我々は細胞死と炎症のシグナル伝達の接点で働く蛋白分子群や死細胞から放出される炎症シグナル分子に着目した研究を行っている。現在、1) がん微小環境におけるがん細胞死の役割の研究、2) パイロトーシスの分子機構の研究、3) がん細胞における NLRP3 の役割の研究、4) ビタミン B6 の IL-1 $\beta$  産生抑制作用の研究などを行っている。詳細は以下の通りである。

### <2014年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

#### 1) がん微小環境におけるがん細胞死の役割の研究：

これまで、細胞死はプログラム細胞死であるアポトーシスと非プログラム細胞死であるネクロトーシスの二元論で論じられてきた。ところが近年、アポトーシスの他にパイロトーシスやネクロトーシスなど、分子機構や様態の異なる様々なプログラム細胞死が存在することが明らかになってきた。また、一般にアポトーシスは炎症を誘導しないと言われていたが、我々は炎症を誘導するように仕組みられたアポトーシスも存在することを示してきた。一方、腫瘍組織においては、酸素や栄養の欠乏、免疫応答、がん治療などにより多くの細胞が死ぬが、最近、死細胞からは様々なシグナル分子が放出され、炎症、免疫、細胞増殖、再生など様々な生体応答を制御していることが明らかになりつつある。細胞の死に方が違えば、放出されるシグナル分子のレパートリーも異なると考えられる。そこで、がん細胞の死に方の違いががん微小環境に及ぼす影響を評価する目的で、新しい実験系の構築を進めている。

#### 2) パイロトーシスの分子機構の研究：

パイロトーシスは細菌などに感染したマクロファージで見られる細胞死として発見されたカスパーゼ 1 依存性の炎症誘導性プログラム細胞死である。我々は、カスパーゼ 1 を発現する多くのがん細胞株にパイロトーシスを誘導しうることを見出した。そこで、shRNA ライブラリーを利用したパイロトーシス関連遺伝子の同定を行い、これまでに複数の候補遺伝子を同定した。現在、これらの候補遺伝子が実際にパイロトーシスに重要な分子であるか検証を行うとともに、カスパーゼ 1 との相互作用やカスパーゼ 1 の基質となりうるかなどの検討を行っている。

### 3) がん細胞における NLRP3 の役割の研究：

NLRP3 はカスパーゼ 1 の活性化に働き、細胞死と炎症に重要な役割を果たす細胞質蛋白である。我々は NLRP3 が NF- $\kappa$ B の活性化も誘導しうることを見出し、これまでに各種がん細胞株において NLRP3 をノックダウンすると IL-1 $\beta$  mRNA 発現が減弱すること、また HT1080 線維肉腫細胞株や U87MG グリオーマ細胞株の NLRP3 発現をノックダウンすると MT1-MMP の発現が減弱し、MT1-MMP の基質 (MMP2) 切断活性が抑制されること、*in vitro* での浸潤能が低下することを見いだしている。本年度は NLRP3 下流のシグナル伝達分子を同定することを試み、(1) TNF レセプター下流の NF- $\kappa$ B 活性化に関わる FADD が NLRP3 と結合しうることを、HEK293 細胞を用いた免疫沈降試験で明らかにし、(2) FADD の下流分子 caspase-8 をノックダウンすると U87MG の MMP2 活性化能が減弱することを見いだした。今後は、内在性 NLRP3-FADD 結合試験、ゲノム編集技術を利用した FADD ノックアウト細胞樹立とその *in vitro*, *in vivo* 解析により、NLRP3 による各種遺伝子発現誘導の分子機構とそのがん細胞における役割を明らかにすることを試みる。

### 4) ビタミン B6 の IL-1 $\beta$ 産生抑制作用の研究：

ビタミン B6 はトランスアミナーゼなどの補酵素として働く水溶性ビタミンである。近年、炎症により血中の B6 が減少すること、B6 欠乏と大腸炎、リウマチ関節炎、心血管疾患との関連などが報告されている。また、最近、広島大学の加藤範久教授のグループが炎症誘導性大腸がんの動物モデルでビタミン B6 が発がん抑制効果を示すことを報告した。そこで我々は、加藤教授らと共同で、ビタミン B6 の炎症抑制作用の研究を行っている。我々はこれまでに、ビタミン B6 がマクロファージによる IL-1 $\beta$  などの炎症性サイトカインの産生を強く抑制することを見出し、その分子機構を解析している。

## 【 研究業績 】

### <論文発表>

1. Kinoshita, T., Imamura, R., Kushiyama, H., and Suda, T.: NLRP3 mediates NF- $\kappa$ B activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation. PLoS One. 2015, 10(3):e0119179

### <学会発表>

1. Hiroko Kushiyama, Ryu Imamura, Takeshi Kinoshita and Takashi Suda: HDAC inhibitors induce IL-1 $\beta$  production in human monocytes by activating NLRP3 inflammasome. 第73回日本癌学会学術総会（横浜）2014年9月
2. 木下健, 今村龍, 須田貴司: がん細胞における自然免疫センサー分子 NLRP3 の役割. 第37回日本分子生物学会学術集会（横浜）2014年11月
3. 須田貴司: パイロトーシスの分子機構と役割. 文部科学省科学研究費補助金 新学術領域「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」キックオフシンポジウム（東京）2014年11月
4. Ryu Imamura and Takashi Suda: Role of PYNOD (NLRP10) in the migration of effector T cells to inflamed tissues. 第43回日本免疫学会学術集会（京都）2014年12月
5. Yoshino Miya, Imamura Ryu, Murata Akihiko, Shimoda Yuhki, Hikosaka Mari, Suda Takashi, and Hayashi Shin-Ichi: Migration of skin antigen-transporting cells in PYNOD-deficient mice. 第43回日本免疫学会学術集会（京都）2014年12月

### <外部資金>

1. 須田貴司, 科学研究費補助金 新学術領域研究「細胞死を起点とする生体制御ネットワークの解明」（代表）: パイロトーシスの分子機構と役割. 18,500千円
2. 須田貴司, 武田科学振興財団特定研究助成（分担）: 死細胞応答性マクロファージ制御による臓器虚血の克服. 9,000千円

### <共同研究>

学外

1. 広島大学生物圏科学研究科 加藤 範久 教授  
NLRP3 インフラマソーム活性化におけるビタミン B6 の効果の検討

2. 鳥取大学医学部 林 眞一 教授, 吉野 三也 准教授  
PYNOD 遺伝子が獲得免疫反応に及ぼす影響の検討
3. 東京大学大学院理学研究科 菅 裕明教授  
Fas および Fas リガンドに対するアゴニスト, アンタゴニスト環状ペプチドの開発
4. 東京大学大学院新領域創成科学研究科 鈴木 穰 教授  
shRNA ライブラリーを用いたパイロトーシス関連遺伝子の網羅的同定
5. 東京薬科大学生命科学部 田中 正人 教授, 西躰 元 助教  
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
6. 琉球大学熱帯生物圏研究センター 松崎 吾朗 教授, 梅村 正幸 助教  
BCG の抗癌活性発現における炎症反応および免疫応答の分子基盤の確立
7. 京都府立医科大学大学院医学研究科 鈴木孝禎 教授  
HDAC 阻害剤の IL-1 $\beta$  産生誘導機構の解析

## 腫瘍動態制御研究分野

### <研究スタッフ>

教授	松本 邦夫	助教	今村 龍
助教	酒井 克也		
研究員	足立 恵理		
大学院生	Miao Wenyu	大学院生	平井 智子
大学院生	広川卓也	大学院生	富増 和暉
技術補佐員	丹保 智佳子	技能補佐員	端谷 泉

### 【研究概要】

HGF (hepatocyte growth factor) は Met チロシンキナーゼを受容体とし、主として間葉由来の因子として、上皮組織の 3次元 (3-D) 形態形成、肝臓や神経系をはじめとする組織の再生・保護を担う。一方、HGF はとりわけがん細胞の 3-D 浸潤や細胞の生存を促す生物活性が強く、がん転移に深く関与するとともに、分子標的抗がん剤に対する耐性獲得に関与する。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ならびに組織再生制御における HGF-Met 系の意義とメカニズムの研究を中心に進めており、とりわけがん悪性進展 (浸潤・転移・薬剤耐性) における HGF-Met 系の機能、構造生物学を基盤とする HGF-Met 阻害剤ならびに人工 HGF の創薬研究などを行っている。また、HGF による疾患治療への応用にも力を注いでいる。

良性腫瘍と悪性腫瘍の明確な違いが浸潤性である。がんの 3-D 浸潤性制御の研究から、自律的浸潤性を示す細胞と、非浸潤性細胞に分けられることを観察し、両者の性質の違いを制御するメカニズムの研究を進めた。その結果、ポリコム抑制系複合体を介したエピゲノム制御異常が浸潤性やがんの悪性形質に関わる遺伝子群の発現に関与することを見出した。

### <2014 年の研究成果、進行状況>

#### 1. 人工 HGF の創製

サイトカインや細胞増殖因子のいくつかは、難治性疾患に対する組換えタンパク質医薬として応用されているが、合成化合物に比べ高い製造コストが難点である。分子サイズの小さなものに置き換える試みが長年にわたりされているがその手法は確立されていない。菅裕明教授 (東京大学) と共同で、Rapid Peptide Integrated Display 法により得られた環状ペプチドを基盤に、環状ペプチド性人工 HGF の創製に成功した。Met 高親和性環状ペプチドとして絞込まれた 3 種について、HGF-Met 系阻害作用を調べた結果、HGF-Met 系に対する阻害作用は認められなかった。一方、Met 結合ペプチドを 2 量体化し、複数種のヒト正常細胞 (表皮角化細胞, 尿細管細胞, 血管内皮細胞など) を用いて生物活性を調べた結果、それぞれの 2 量体化環状ペプチドは、増殖促進, 遊走促進, 管腔形成誘導など、Met 受容体を介した特徴的な生物活性を示すとともに、HGF と同等の活性を示した。本技術は人工サイトカイン/増殖



因子を創製する普遍的な技術となると考えられる。HGF タンパク質に置き換わるペプチド性人工 HGF は、再生医療用医薬としての大きな可能性をもっている。

## 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

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。HGF-Met 系を標的分子として、Rapid Peptide Integrated Display 法によって HGF による Met 活性化を阻害する環状ペプチドを見出した。一方、HGF-Met 相互作用を阻害する低分子化合物の創製を並行して進めている。IC<sub>50</sub> 値が 10-20  $\mu$ M のヒット化合物が複数得られているが活性向上に時間を要している。化合物のドッキング構造に基づく分子設計を着実にすべく、糖鎖欠損 HGF や HGF 分子内ドメインの発現・精製・結晶化条件の探索を進めた。

## 3. 悪性黒色腫における Met 発現の階層性と腫瘍形質制御の研究

悪性黒色腫は高い転移性や抗がん剤に対する抵抗性を特徴とし、分子標的薬に対して比較的短期で耐性に至る。高転移性 B16F10 マウスメラノーマ細胞を用いて、転移・薬剤抵抗性における Met 受容体発現の動態と意義を調べた。細胞表面 Met 発現の違いから B16F10 細胞には Met-low/Met-high 両細胞集団が混在し、Met-low ポピュレーションは幹細胞性の遺伝子発現、抗がん剤耐性、マウス移植モデルでの活発な腫瘍成長能を示した。一方、Met-high はメラニン産生に関わる遺伝子発現、肺への高い転移能を特徴とした。両ポピュレーションの動態を調べた結果、Met-low 細胞からは Met-low と Met-high 細胞が生じるのに対して、Met-high からは Met-high 細胞のみが生じた。以上より、Met-low  $\rightarrow$  Met-high の動的な発現転換によって B16F10 細胞集団内に Met 発現の多様性が生じるとともに、Met 発現の相違が、抗がん剤に対する耐性、腫瘍成長能、転移性において多様な細胞集団を生み出す要因の1つと考えられた。

## 4. CBX/ポリコーム抑制系制御異常を介したがん悪性進展制御の研究

ヒト悪性中皮腫細胞を用いて、非浸潤性と浸潤性を区別するメカニズムとして、1) 浸潤に必須の細胞外マトリックス分解酵素の遺伝子発現がポリコーム抑制系複合体 (PRC) によって制御されること、2) PRC 構成分子 CBX のプロテアソーム分解が浸潤関連遺伝子セットの発現抑制の異常/破綻に関与すること、3) ポリコーム抑制系は浸潤性、サイトカイン、血管新生、炎症など、悪性進展に関与する複数の遺伝子群の発現に関与することを明らかにした。CBX のタンパク質分解系制御が新しい治療標的となりうる可能性が考えられる。

### <今後の計画>

1. 悪性黒色腫における Met 発現の階層性と腫瘍形質制御の研究: Met 高発現による Met 含有エクソソーム生成と肺転移、BRAF 阻害剤耐性と Met 発現に関するデータを準備し論文としてまとめる。
2. 人工 HGF の創製と構造解析: 人工 HGF と Met 複合体の構造解析を進め、HGF-Met 系制御の構造基盤を明らかにするとともに、病態モデルを用いて HGF に置き換わる医薬候補分子としての研究を進める。
3. HGF-Met 系阻害剤創製: 環状ペプチド性 HGF-Met 阻害分子の制がん作用の解析、化合物-HGF のドッキング構造解析と分子設計による活性向上を目指す。

## 【 研究業績 】

### <論文発表>

#### 原著

(研究室主体)

1. Ito K<sup>†</sup>, Sakai K<sup>†</sup>, Suzuki Y, Ozawa N, Hatta T, Natsume T, Matsumoto K<sup>§</sup>, Suga H<sup>§</sup>. Artificial human Met agonists based on macrocycle scaffolds. *Nat Commun*, 6: 6373, 2015. (<sup>†</sup>equal contribution; <sup>§</sup>corresponding authors)
2. Adachi E, Hirose-Sugiura T, Kato Y, Ikebuchi F, Yamashita A, Abe T, Fukuta K, Adachi K, Matsumoto K. Pharmacokinetics and pharmacodynamics following intravenous administration of recombinant human hepatocyte growth factor in rats with renal injury. *Pharmacology*, 94: 190-197, 2014.

(共同研究)

1. Oyanagi J, Kojima N, Higashi S, Kikuchi K, Sakai K, Matsumoto K, Miyazaki K. Inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  potentiates fibroblast-dependent tumor cell invasion into collagen matrix by increasing secretion of hepatocyte growth factor from fibroblasts. *Exp Cell Res*, 326: 267-279, 2014.
2. Nakade J, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Sano T, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Matsumoto K, Yonekura K, Yano S, Triple inhibition of EGFR, Met, and VEGF suppresses regrowth of HGF-triggered, erlotinib-resistant lung cancer harboring an *EGFR* mutation. *J Thorac Oncol*, 9: 775-783, 2014.
3. Tanimoto A, Yamada T, Takeuchi S, Ebi H, Kita K, Matsumoto K, Yano S. Receptor ligand-triggered resistance to alectinib and its circumvention by Hsp90 inhibition in EML4-ALK lung cancer cells. *Oncotarget*, 5: 4920-4928, 2014.

#### 総説

1. Matsumoto K, Funakoshi H, Takahashi H, Sakai K. HGF-Met pathway in regeneration and drug discovery. *Biomedicines*, 2: 275-300, 2014.
2. Sakai K, Kinoshita T, Matsumoto K. Hepatocyte growth factor. "Reference Module in Biomedical Research", Elsevier Inc.
3. 酒井克也, 松本邦夫: "Msp と Msp 受容体 (Ron)", 「サイトカイン・増殖因子キーワード事典」, 羊土社, pp. 261-263, 2015.
4. 松本邦夫: "HGF", 「サイトカイン・増殖因子キーワード事典」, 羊土社, pp. 258-259., 2015.
5. 酒井克也: "HGF 受容体", 「サイトカイン・増殖因子キーワード事典」, 羊土社.
6. 酒井克也, 松本邦夫: "MSP と MSP 受容体", 「サイトカイン・増殖因子キーワード事典」, 羊土社, pp. 259-261, 2015.

### <学会発表>

1. 松本邦夫, 酒井克也, 伊藤健一郎, 菅裕明: Met/HGF 受容体を標的とする環状ペプチドの創製. シンポジウム“新たな分子標的と次世代創薬スクリーニング”, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 27 日(横浜)
2. 足立恵理, 酒井克也, 松本邦夫: B16F10 メラノーマの造腫瘍性/転移性における Met 階層的発現の意義. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 26 日(横浜)

3. 宮崎香, 小柳潤, 東昌市, 菊池慶司, 酒井克也, 松本邦夫: 三次元コラーゲンゲル共培養モデルを利用したがん浸潤機構の研究: HGFとTGF- $\beta$ の役割. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月26日(横浜)
4. 平井智子, 酒井克也, 鈴木健之, 矢野聖二, 高橋智聡, 西内巧, 松本邦夫: CBX/PRCのプロテアソーム分解を介したヒト悪性中皮腫細胞の浸潤性制御. 第87回日本生化学会大会, 2014年10月16日(京都)
5. 櫛川舞, 松本邦夫, 酒井芳紀, 原口珠実, 吉田都, 内田享弘: c-Metのダウンレギュレーションを伴わない新規PGI<sub>2</sub>アゴニスト反復投与の血管新生作用. 日本薬学会第133年会, 2013年3月28日(横浜)

#### <外部資金>

1. 松本邦夫: 科学研究費補助金 基盤研究 (B) 「3-D 浸潤性獲得と上皮形態形成制御を基盤とする腫瘍悪性化機構の研究」 6,500 千円
2. 松本邦夫: 次世代がん研究推進プロジェクト「結晶構造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」 3,950 千円
3. 松本邦夫: (独)新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)による「研究開発費補助金(ベンチャー企業への実用化助成事業): 組換えヒト HGF 蛋白質の次世代製造方法の確立」に関わるクリングルファーマ株式会社との産学連携共同研究 1,029 千円

#### <共同研究>

1. 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
2. 東京大学大学院理学系研究科 菅裕明教授: HGF-Met 系を制御する特殊環状ペプチドの創製と作用機作の研究
3. 神戸大学大学院医学系研究科 西田満准教授・南康博教授: 肺がん EGFR 阻害剤に対する耐性獲得における Ror-Met 系の意義とメカニズムの研究
4. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 木浦勝行教授: HGF-Met 系活性化を介した肺がん分子標的薬耐性獲得の研究
5. 九州工業大学情報工学研究院 青木俊介准教授: HGF-Met タンパク質間相互作用を制御するための計算科学的な創薬基盤の確立
6. 千葉県がんセンター細胞治療開発研究部 田川雅敏教授: NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
7. 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 宮崎香教授: がん細胞浸潤における TGF- $\beta$  と HGF の相互作用
8. 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

他