

がん分子標的探索プログラム

分子病態研究分野

<研究スタッフ>

教授 後藤 典子
助教 中田 飛鳥
博士研究員 西村 建徳
博士研究員 伊藤 千秋
技能補佐員 武 紀代子

<大学院生>

博士課程 1年 須賀 淳子
博士課程 1年 苅谷 文子
修士課程 2年 村山 貴彦

【 研究 概 要 】

癌と癌幹細胞に注目し、基礎研究から臨床へと連続する研究の展開を目指している。最先端の分子生物学、細胞生物学的手法、さらにはシステム生物学的理論を組み合わせ、癌の早期発見や個々の患者に最適な治療法を選択するための診断マーカーの抽出、そして新しい抗がん剤開発のための新たな分子標的の発見を試み、トランスレーショナルリサーチへと展開している。

<2014年の研究成果、進捗状況>

1) 乳がん幹細胞の安定性を決定する HER2/3-NFκB-IGF2-ID1 シグナルサーキットへの依存メカニズム

乳がんは、日本女性の罹患数第一のがんであり、近年益々増加傾向にある。現在では日本人女性の20人に一人、米国では8人に一人が一生のうち一回は乳がんを経験するとの統計があり、身近な問題である。ここ数年で、がん組織は、がん幹細胞が元となってその娘細胞が増えた組織であるという考え方が提示され、「がん幹細胞説」として、広く信じられるようになってきている。しかも最近、分化したがん細胞自体ががん幹細胞へ変貌するという可塑性も指摘されている。このように、がん幹細胞的な性質を持った細胞はがん組織内で安定的に存在しやすいことがわかってきているものの、その分子機構は依然不明である。我々は、以前 HER2/3-PI3 kinase-NFκB パスウェイの活性化が、がん幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることを報告した。そこで、このパスウェイの下流にがん幹細胞の安定化にクリティカルな鍵分子があると考え、その候補分子を網羅的に探索することとし、独特のシステムの解析法を編み出して解析した。その結果、約100の候補分子が得られ、増殖因子、サイトカイン、

ケモカインなどの細胞外因子が多く含まれていた。

私どもは、難易度高いとされている乳がん臨床検体の培養系ならびにがん幹細胞性を評価できるスフィア培養系ならびに Patient-derived xenograft モデルの系を立ち上げ、カタログ化している。そこで、この系を用いて、がん幹細胞の安定化を司る候補分子の評価を行った。その結果、HER2/3-PI3 kinase-NFκB パスウェイは、がん幹細胞ニッチとして機能するがん細胞内に、IGF2 サイトカインの産生を促すことがわかった。また、IGF2 の受容体である IGF1 受容体(IGF1R)ががん幹細胞の性質を持った細胞に特異的に発現しており、IGF1R シグナルをがん幹細胞内で活性化、その下流で未分化性のマスター調節因子である ID1 転写制御因子の発現を上昇させ、さらにその下流で IGF2 自身が産生されることがわかった。つまり、ポジティブフィードバックメカニズムにより IGF2-IGF1R-ID1-IGF2 サーキットが回転し、一旦これが回転しはじめるとがん幹細胞はこれに依存し安定化されることが明らかになった。

2) 肺がんの gefitinib 耐性の新たな分子機構：AKT-beta-catenin パスウェイの活性化

Gefitinib 感受性 PC9 細胞より、我々が樹立した gefitinib 耐性亜株 PC9M2 細胞の特性を解析し、AKT-beta-catenin パスウェイの活性化により、耐性が引き起こされることがわかった。Beta-catenin に対する siRNA もしくは beta-catenin の阻害剤を用いると、gefitinib に対する感受性が回復した。親株の PC9 細胞と PC9M2 細胞を、免疫不全マウスの皮下に移植して形成された腫瘍を beta-catenin 抗体を用いて免疫染色を行った。Beta-catenin は、AKT の活性化により、細胞膜から細胞質、そして核へ移行することが知られている。PC9M2 細胞由来の腫瘍は、PC9 細胞由来の腫瘍に比較し、beta-catenin の細胞質ならびに核への局在が強かった。さらに、32 例の gefitinib 使用したヒト肺癌臨床検体の治療前検体を解析した。その結果、gefitinib 奏功例に比較し、gefitinib 耐性例のほうで、有意に beta-catenin の細胞膜の局在が弱く、細胞質へ移行する傾向がみられた。以上より、gefitinib 耐性の症例のなかには、beta-catenin の活性化が、耐性獲得の分子機構になっている症例が存在することが示唆された。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

1. Shima T, Miyamoto T, Kikushige Y, Yoda J, Tochigi T, Yoshimoto G, Kato K, Takenaka K, Iwasaki H, Mizuno S, Goto N, Akashi K.: The ordered acquisition of Class II and Class I mutations directs formation of human t(8;21) acute myelogenous leukemia stem cell. *Exp Hematol*,

42, 955-965, 2014. (共同研究)

2. Hamabe A, Konno M, Tanuma N, Shima H, Tsunekuni K, Kawamoto K, Nishida N, Koseki J, Mimori K, Gotoh N, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Ishii H.: Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial-mesenchymal transition. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 111, 15526-31. (共同研究)
3. Hasegawa S, Eguchi H, Nagano H, Konno M, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Nishida N, Koseki J, Nishimura T, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H.: MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. *Br J Cancer*, 111, 1572-80. (共同研究)
4. Kohsaka S, Hinohara K, Wang L, Nishimura T, Urushido M, Yachi K, Tsuda M, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Gotoh N, Tanaka S.: Epiregulin enhances tumorigenicity activating ERK/MAPK pathway in glioblastoma. *Neuro. Oncol.*, 16, 960-70. (共同研究)
5. Ono K, Kita T, Sato S, O'Neill P, Mak S-S., Paschaki M, It, M, Gotoh N, Kawakami K, Ladher RK.: Fgfr1-Frs2/3 Signalling Maintains Sensory Progenitors during Inner Ear Hair Cell Formation. *PLOS Genetics.*, 10, e1004118, 2014. (共同研究)
6. Li H, Ta, C, Cai Z., Hertzler-Schaefer K, Collins TN, Wang F, Feng G-S, Gotoh N, Zhang X.: Frs2alpha and Shp2 signal independently of Gab to mediate FGF signaling in lens development. *J. Cell Sci.*, 127, 571-582, 2014. (共同研究)

<学会発表>

国際学会

1. Noriko Gotoh : "Novel molecular targets in breast cancer stem cells in patient-derived sphere cells." **Japanese-German Cancer Workshop**, 2014年11月14~16日, ベルリン, ドイツ。
2. Noriko Gotoh : "Novel molecular targets in breast cancer stem cells in patient-derived sphere cells." **The 10th Annual Meeting of Korean Society for Stem Cell Research**, 2014年8月28・29日, ソウル, 韓国。
3. Noriko Gotoh : "Insulin-like growth factor regulates breast cancer stem cell properties." **2014 SNUCRI Cancer Symposium**, 2014年4月15~19日, Mokpo, 韓国。
4. Asuka Nakata : "Novel mechanisms of acquired resistance to EGFR-TKI in lung cancer".

金沢国際シンポジウム, 2014年1月, 金沢市

5. Asuka Nakata, Rui Yamaguchi, Mai Yamauchi, Teppei Shimamura, Seiya Imoto, Masaharu Nomura, Seiji Yano, Satoru Miyano, Noriko Gotoh : "Novel molecular mechanisms of acquired resistance to gefitinib in Non-small lung cancer." **Keystone Symposium, Developmental Pathways and Cancer: Wnt, Notch and Hedgehog**, 2014年2月2~7日, バンフ, カナダ

全国学会

1. 後藤典子 : "Growth factor controls breast cancer stem cells and their niche." 第73回日本癌学会学術総会, 腫瘍別シンポジウム「乳がん研究の新展開: 基礎科学から臨床医学へ」, 2014年9月25~27日, 横浜
2. 後藤典子: 「臨床検体乳がんスフィア培養を用いたがん幹細胞の新規分子標的の探索」第32回日本ヒト細胞学会学術集会, シンポジウム「癌幹細胞」, 2014年8月30~31日, 東京
3. 後藤典子: 「EGF受容体チロシンキナーゼ制御遺伝子による肺癌の予後予測診断と乳癌幹細胞の分子標的」日本薬学会第134回年会, シンポジウム, 2014年3月30日, 熊本
4. 中田飛鳥 : "Development of the prognostic system with gene signature in early stage lung cancer." 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25~27日, 横浜
5. 西村建徳 : "MTHFD2 is a key molecule in EGF receptor tyrosine kinase and regulates lung cancer cell growth." 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25~27日, 横浜
6. 村山貴彦 : "CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties." 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25~27日, 横浜
7. 西村建徳 : "MTHFD2 is a key molecule in EGF receptor tyrosine kinase and contributes to lung cancer cell growth." 第2回がんと代謝研究会, 2014年7月10・11日, 東京
8. 西村建徳 : "EGF受容体チロシンキナーゼ鍵分子MTHFD2は肺がん細胞の増殖を制御する" 第18回日本がん分子標的治療学会, 2014年6月27日, 仙台
9. 村山貴彦 : "CD74-NRG1 is a potential oncoprotein that promotes cancer stem cell properties." 第12回幹細胞シンポジウム, 2014年, 福岡

<外部資金>

1. 後藤典子, 新学術領域研究・研究領域提案型「癌幹細胞」計画研究, 代表, 12,000千円
2. 後藤典子, 挑戦的萌芽研究, 代表, 2,100千円
3. 後藤典子, 次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム, 代表, 11,730千円

4. 中田飛鳥, 若手研究 B (一般), 代表, 1,400 千円

<共同研究>

1. 井上純一郎 東京大学医科学研究所 「悪性乳癌幹細胞維持における転写因子 NF- κ B の役割解明」
2. 河野隆志 国立がん研究センター 「がん幹細胞形質を増強する肺がん遺伝子異常の同定」
3. 石井秀始, 森正樹 大阪大学消化器外科学 「膵臓がんの薬剤耐性に関わる miRNA の同定」
4. 北嶋俊輔, 高橋智聡 金沢大学がん進展制御研究所 「細胞自律的炎症とメタボリック・リプログラミングによるがん幹細胞維持機構」
5. 鈴木穰 東京大学新領域創成科 「臨床検体乳がんスフェア培養細胞のゲノム解析」
6. Anna Akhmanova, Utrecht University, オランダ 「MICAL3 の乳がん幹細胞における役割」
7. 北林一生 (国立がん研究センター), 佐谷秀行 (慶応大学), 赤司浩一 (九州大学) 「乳がん幹細胞の発生機構の解析」
8. Joseph Schlessinger, Yale University, 米国 「FRS2beta を介するシグナル伝達」
9. 東條有伸, 東京大学医科学研究所 「固形がんのがん幹細胞培養系を用いたがん悪性化の分子機構の解析」
10. Mats Nilsson (Stockholm University, スウェーデン), 岡本康司 (国立がん研究センター) 「乳がん幹細胞のシングルセル解析」

シグナル伝達研究分野

<研究スタッフ>

教授 善岡 克次

助教 佐藤 時春

博士研究員 Radnaa Enkhtuya

大学院生（博士課程） Baljinnyam Tuvshintugs（～H26.9.30）

大学院生（博士課程） 宮田 大史 大学院生（博士課程） 石川 桃絵

大学院生（博士課程） 李 蓉 大学院生（博士課程） I Ketut Gunarta

大学院生（博士課程） Dewi Yuliana

大学院生（修士課程） 関 斉 大学院生（修士課程） 高橋 佑斗

大学院生（修士課程） Purvee Erdenebaatar

技術補佐員 猪谷 久世

【 研究 概 要 】

哺乳類 MAP キナーゼ（MAPK）経路は、細胞の増殖・分化・死など細胞の様々な局面において重要な役割を担う細胞内シグナル伝達経路である。このシグナル伝達経路の異常は細胞のがん化と密接に関係しており、多くの MAPK シグナル伝達系分子が原がん遺伝子産物として報告されている。MAPK 経路に関する研究は世界中で精力的に行われているが、シグナル伝達経路間の相互作用を含む MAPK シグナル伝達系全体の制御機構や各シグナル伝達モジュールの *in vivo* における機能については不明な点が多い。本研究分野では、我々が同定した哺乳類 MAPK 経路の足場タンパク質 JSAP1 及び JLP（JSAP1 ファミリーメンバー）を切り口として、シグナル伝達の特異性維持機構、MAPK モジュールの *in vivo* における役割、及び MAPK 経路の時間的・空間的制御機構の解析を行い、最終的には細胞のがん化やがんの悪性化における JSAP1, JLP の役割とその分子機構の解明を目指して研究を行っている。また、足場タンパク質 JSAP1, JLP は、MAPK シグナル伝達系以外にも重要な役割を担っていると考えられる。そこで、JSAP1, JLP の生理的機能の解明に向けた研究にも取り組んでいる。一方、当研究所が共同利用・共同研究拠点に認定されたことを契機として、ヘッジホッグ経路とがん転移に焦点を当てた研究に着手した。

<2014 年の研究成果，進捗状況と今後の計画>

1. 初代培養系を用いた JSAP1, JLP の生理的機能の解析

JSAP1, JLP の生理的機能の解明に向け、JSAP1, JLP 欠失が誘導可能な初代培養系の

構築・解析を行った。その結果、JSAP1, JLP タンパク質は kinesin-1 依存的な物質輸送の制御因子であり、その破綻は細胞死を引き起こすことを見出した (*Cell Death Differ*, in press)。

2. マウスを用いた JSAP1, JLP の生理的機能の解析

Cre-loxP システム及びタモキシフェンを用いて全身で JSAP1, JLP の欠失が誘導可能なマウスを作出した。今後、このマウスを用いた解析を行い、JSAP1, JLP の新たな生理的機能を明らかにする予定である。

3. 細胞質分裂における JSAP1, JLP の役割とその分子機構

これまでの多くの研究から、JSAP1, JLP は哺乳類 MAPK 経路の足場タンパク質やキネシンアダプターとして機能することが報告されている。また最近、我々は JSAP1, JLP タンパク質がキネシン- 微小管相互作用の制御に関わる因子であることを報告した (*Cell Death Differ*, in press)。本年は、JSAP1, JLP 欠失が誘導可能なマウス胚性繊維芽細胞を用いた解析を行い、JSAP1, JLP は細胞質分裂の制御因子として働くという JSAP1, JLP の新たな機能を明らかにした (*Genes Cells*, 2014a)。

4. 紫外線誘導性アポトーシスにおける JLP の役割とその分子機構

JLP 単純ノックアウト (KO) マウスおよび基底細胞特異的 JLP KO マウスの作出・解析を行い、JLP-p38 MAPK シグナル経路は UVB 誘導性アポトーシスにおいて重要な役割を担うことを明らかにした (*Genes Cells*, 2014b)。

5. ヘッジホッグ (Hh) 経路と MAPK 経路のクロストーク

これまでの研究から、Hh 経路は小脳顆粒前駆細胞 (GCP) の増殖・分化制御において重要な役割を担っており、その制御破綻は髄芽腫を引き起こすことが知られている。一方、我々を含む複数のグループの研究により、GCP の増殖・分化制御における Hh 経路と MAPK 経路のクロストークが示唆されている。本年は、本クロストークの解析において、HEK293T 細胞が有用な実験系であることを見出した。今後、さらに解析を進め、Hh 経路と MAPK 経路のクロストークを詳細に検討する予定である。

6. がん転移における転写因子 Gli1 の役割とその分子機構

転写因子 Gli ががんの転移に関与することは知られているが、その詳細については不明な点が多い。我々は、マウスメラノーマ由来の B16 細胞を用いて、Gli1 を安定に高発現する細胞株や Gli1 ノックダウン細胞株の樹立・解析を行っている。本年は、B16-Gli1#8 (Gli1 高発現細胞株) の遺伝子発現プロファイル解析を行い、Gli1 が低酸素応答因子の発現調節に関わることを示唆する結果を得た。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著（研究分野主体）

1. Sato, T., Ishikawa, M., Mochizuki, M., Ohta, M., Ohkura, M., Nakai, J., Takamatsu, N., Yoshioka, K. JSAP1/JIP3 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration. *Cell Death Differ.* (in press, doi:10.1038/cdd.2014.207)
2. Tuvshintugs, B., Sato, T., Enkhtuya, R., Yamashita, K., Yoshioka, K. JSAP1 and JLP are required for ARF6 localization to the midbody in cytokinesis. *Genes Cells* 19: 692-703, 2014.
3. Enkhtuya, R., Sato, T., Wakasugi, M., Tuvshintugs, B., Miyata, H., Sakurai, T., Matsunaga, T., Yoshioka, K. The scaffold protein JLP plays a key role in regulating ultraviolet B-induced apoptosis in mice. *Genes Cells* 19: 350-358, 2014.

< 学会発表 >

1. Sato, T., Tuvshintugs, B., Enkhtuya, R., Yoshioka, K.
Scaffold proteins JSAP1 and JLP are required for cytokinesis by regulating localization of ARF6
第 73 回 日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 27 日, 横浜
2. Sato, T., Ohkura, M., Nakai, J., Takamatsu, N., Yoshioka, K.
JSAP1 and JLP regulate kinesin-1-dependent axonal transport to prevent neuronal degeneration
第 37 回 日本神経科学大会, 2014 年 9 月 13 日, 横浜

< 外部資金 >

平成 26 年度

日本学術振興会・研究拠点形成事業 アジア・アフリカ学術基盤形成型 6,800 千円（分担）

「東アジア地域における B 型肝炎ウイルス関連肝疾患の撲滅を目指した医学系人材の育成」

< 学内外との共同研究 >

1. 共同研究者：福永 理己郎（大阪薬科大学）
「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」
2. 共同研究者：上田 健（広島大学）
「ヘッジホッグシグナルを介した癌転移制御機構」
3. 共同研究者：松永 司（金沢大学）
「紫外線応答における足場タンパク質 JSAP1, JLP の役割とその分子メカニズム」
4. 共同研究者：高松 信彦（北里大学）

「足場タンパク質 JSAP1, JLP の機能解析」

5. 共同研究者：山田 洋一（金沢大学）

「がん転移に関わる遺伝子発現制御ネットワークの情報学的解析」

腫瘍制御研究分野

<研究室メンバー> (2014年現在)

下線は研究指導

教授： 源 利成； 助教(TT)： 堂本貴寛

博士研究員： 廣瀬まゆみ(～3月), Ilia V. Pyko, 堂口裕士(～11月)

大学院博士課程： 金子真美(本学心肺総合外科学), 北村祥貴(本学心肺総合外科学),
下崎真吾(本学整形外科学), 富田泰斗(金沢医科大学一般・消化器外科学)

大学院修士課程： 佐々木規雄(本学保健学系；6月～)

技能補佐員： 浅香敦子； 技能補佐員(ヒトがん組織バンク)： 阿部尚子

共同研究員： 小竹優範(厚生連高岡病院消化器外科)

【研究分野の概要と研究成果】

当研究分野は 1998 年に遺伝子診断の名称で開設されてから一貫して、消化器がんを中心にがんの多様な分子細胞病態と腫瘍外科学的特性について、基礎と臨床を密接に関係づける方向で研究を続けている。そして、その成果を難治がんや希少がんの病態解明と制御に応用することを検討している。川上和之(前准教授)の退職後、大腸がんの分子病理学的特性は外科系大学院の研究課題として継続している。

1. Wnt 経路に関わる新しい分子細胞機構の検討

Wnt 経路の制御破綻が固有のがん化シグナルを誘発する仕組みと、それを修飾する分子細胞機構について β -カテニンを中心に研究している。これまでに、大腸がんの腫瘍-宿主境界の腫瘍環境で活性化される β -カテニンを機軸とするがん化経路の病理作用を明らかにしてきた。そのなかで、 β -カテニンが転写誘導する RNA 安定化因子として我々が同定した CRD-BP(coding region determinant-binding protein; Nature 2006)は c-Myc や IGF-II の mRNA 安定化や発現と相関し、大腸がんのリンパ節転移や病期の分子指標になることを示唆する結果が得られた(論文準備中)。

がんにおける β -カテニン活性化について、その分解複合体の構成因子やユビキチン経路による蛋白質安定性の調節異常を明らかにしてきた。 β -カテニンの核移入は Wnt 経路活性化に必須であるが、分子内に核局在構造を持たない β -カテニンが細胞質と核を行き来する仕組みは明らかではない。本学 Richard Wong 教授の発案で、分子の核移送や排出に機能する核膜孔複合体因子(nucleoporins: Nups)と β -カテニンの発現の関連性、相互作用や機能解析を行い、 β -カテニンの核-細胞質間移送に機能する Nup(s)の検索を始めた。これまでに、大腸がん細胞ではある種の Nup が β -カテニンや Tcf7L2(Tcf-4)の核内発現を調節していることを見出した。少数例の大腸がん症例を対象に、この Nup の発現が病期と逆相関する予備結果が得られ、 β -カテニンの発現や局在との比較解析を開始した。この課題は大腸がんの Wnt 経路の分子病態の理解とともに、個体発生や分化など多様な生命現象の研究へ応用が期待される。

2. glycogen synthase kinase (GSK) 3 β 阻害によるがん治療法の開発と応用

上記の Wnt 経路研究の過程で、大腸がんにおいて発現と活性亢進をしめす glycogen synthase kinase (GSK) 3 β が固有の分子経路を誘導して、がん細胞の生存、不死化、増殖を推進することを発見した(特願 2005-000133)。本学脳神経外科学、整形外科学、金沢医科大学腫瘍内科学・総医研と連携し、この「がん促進作用」は膵がんや膠芽腫、骨肉腫など難治、希少がんでも観察され、腫瘍細胞に高度の浸潤性と治療(抗がん剤、放射線)抵抗性を賦与することを見出した。そして、GSK3 β 阻害の強力かつ特異的な抗腫瘍効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。GSK3 β 阻害作用を示す既存医薬品の転用(repurposing/repositioning)と抗がん剤を併用するがん治療法を共同開発し(特願 2010-185691, 2013-093072)、膠芽腫(本学附属病院脳神経外科)と膵がん(金沢医科大学病院)を対象とする医師主導型臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を試験している(UMIN-CTR 登録)。現在、GSK3 β の病理作用をがんの代謝特性やオートファジーに着目して検討している。そして、がんの原始的な糖代謝(Warburg 効果)における GSK3 β の責任作用を示唆する代謝産物の変化と、解糖系から酸化的リン酸化経路への起点を触媒する代謝酵素に GSK3 β が影響していることを見出した。また、本酵素の阻害による消化管発がん予防や骨転移前立腺がん治療について、本学消化器外科学、同整形外科学、米国カリフォルニア大学サンディエゴ校外科学と共同研究を開始した。国内製薬企業 TM 社が開発した新規阻害剤や、GSK3 β 制御性 micro-RNA の配列をもとに東工大生命理工学科と共同開発するアンチセンスオリゴ核酸のがん治療効果の解析、cell-based ELISA による新規阻害剤スクリーニング技術の開発などを通じて、GSK3 β 経路を標的とするがんの病態解明と治療法開発の基盤を形成する。

3. エピジェネティクスを標的にするがん診断・治療法の開発

大腸がんを対象に、発がん径路をジェネティック・エピジェネティックな変化により説明・細分類し、診断・治療に応用することを目的としている。本課題は川上(前准教授)の指導で、本学心肺総合外科学大学院生と共同研究員が継続中である。

4. ヒト消化管がん組織検体資源化プロジェクト

がんの分子・細胞レベルの変化、代謝変動やがん動物モデルの解析から得られる結果を実際の病巣で具現化してはじめて、がんの臨床に導入できる。医学研究に共通の要請である。この目的で、消化管がん研究や臨床研究の基礎資源として、2008年から本事業を開始した。2010年にこの事業を当研究所ヒトがん組織バンクに継承し、現在に至っている。この組織・バイオバンクをもとに国内外の機関と共同研究により、胃がんや大腸がんにおける Wnt 経路の分子病理特性(Nature 2006, Cancer Res 2009)やレトロポゾン、トレフォイル因子、RUNX3などを対象とするエピジェネティック変化の解析による発がん、進行の分子機構を明らかにしてきた(Oncogene 2014, Gastroenterology 2011, Clin Cancer Res 2010, Gastroenterology 2010)。

【研究業績】

[註] 下線は研究室メンバー，在籍者，研究協力員および共同研究員

論文発表

原著

1. Chikano Y, Domoto T, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto KI, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. *Mol Cancer Ther*, 2015, in press. 2014 Dec 10. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0479. [Epub ahead of print]
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 (3-4): 251-5, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.154. Epub 2014 Nov 6.
3. Kurklu B, Whitehead RH, Ong EK, Minamoto T, Fox JG, Mann JR, Judd LM, Giraud AS, Menheniott TR. Lineage-specific RUNX3 hypomethylation marks the preneoplastic immune component of gastric cancer. *Oncogene*, in press, 2015. 2014 Aug 4. doi: 10.1038/onc.2014.233. [Epub ahead of print]
4. Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, Oshima M. TNF- α /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 33 (29): 3820-9, 2014. doi: 10.1038/onc.2013.356. Epub 2013 Aug 26.
5. 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 (2): 1016-20, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.100. Epub 2014 Jun 26.

著書・総説

6. Minamoto T. Detection and characterization of oncogene mutations in preneoplastic and early neoplastic lesions. *Methods Mol Biol* 1105: 381-98, 2014. doi: 10.1007/978-1-62703-739-6_29.
7. 中田光俊, 源 利成. 脳腫瘍に対するドラッグリポジショニング—GSK3 β を標的とした膠芽腫治療法—. *癌と化学療法* 41 (6): 720-4, 2014.

学会発表

国際学会

1. Toshinari Minamoto. GSK3 β in cancer metabolism. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa(金沢国際がん生物学シンポジウム)& Symposium on Drug Discovery in Academics, January 23rd~24th, 2014, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan.
2. Takahiro Domoto, Mayumi Hirose, Kenjiro Kami, Tomoyoshi Soga, Hiroyasu Esumi, Toshinari Minamoto. Inhibition of GSK3 β rectifies aberrant glucose metabolism in colon cancer cells. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa(金沢国際がん生

物学シンポジウム) & Symposium on Drug Discovery in Academics, January 23rd~24th, 2014, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan.

3. Mayumi Hirose, Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. Therapeutic effect of the cocktail of GSK3 β -inhibiting drugs. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (金沢国際がん生物学シンポジウム) & Symposium on Drug Discovery in Academics, January 23rd~24th, 2014, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan.
4. Takeo Shimasaki, Nobuhiko Ueda, Natsuko Kawada, Tomoe Nomura, Kaho Yamada, Hideto Yamada, Ranji Hayashi, Kazuhiro Matsunaga, Tomoki Fukuyama, Toshimi Otsuka, Masakatsu Nakamura, Nobuyuki Toshikuni, Hisakazu Shiroeda, Takeo Kosaka, Naohisa Tomosugi, Toshinari Minamoto, Tomiyasu Arisawa. Phase I clinical trial of the combination therapy using gemcitabine and GSK3 β inhibiting drugs for gemcitabine-resistant advanced pancreatic cancer patients. Digestive Disease Week (DDW) 2014, May 3rd~6th, 2014, McCormick Place Convention Center, Chicago, Illinois, U. S. A.
5. Shingo Shimozaki, Norio Yamamoto, Hideji Nishida, Hiroaki Kimura, Akihiko Takeuchi, Takashi Kato, Yu Aoki, Takashi Higuchi, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Molecular targeted therapy for osteosarcoma using glycogen synthase kinase-3 beta (GSK-3 β) inhibitors. American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting 2014, May 30th~June 3rd, 2014, McCormick Place, Chicago, Illinois, U. S. A.
6. Akane Moyori, Akiko Kobayashi, Kayo Imamoto, Hidehito Tochio, Toshinari Minamoto, Richard Wong. Diverse function of Rael in cell cycle. The 26th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, October 21st~23rd, 2014, Seoul, Korea.
7. Takuya Furuta, Mitsutoshi Nakada, Hemuragul Sabit, Dong Yu, Katsuyoshi Miyashita, Toshinari Minamoto, Yutaka Hayashi. GSK3 β inhibitory drugs attenuate invasion of glioblastoma cells. 19th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, November 13th~16th, 2014; Loews Hotel South Beach, Miami, Florida, U. S. A.
8. Takeo Shimasaki, Naohisa Tomosugi, Toshinari Minamoto. Identification of the GSK3 β -mediated secretory protein responsible for chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in pancreatic cancer cells. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis: Symposium 4 “New Mechanisms of Cancer Metastasis and Invasion”, November 13th~14th, 2014, Hotel Nikko Fukuoka, Fukuoka, Japan.
9. Yasuto Tomita, Seiko Miura, Jun Fujita, Emi Morioka, Daisuke Kaida, Toshio Oonishi, Yukako Oono, Miki Noguchi, Hiroshi Funaki, Hideto Fujita, Shinichi Kinami, Yasuharu Nakano, Nobuhiko Ueda, Takeo Kosaka, Toshinari Minamoto. Expression and clinical relevance of CRD-BP in colorectal cancer. The 8th International Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis: Symposium 2 “New Frontier in Cancer Genome Research”, November 13th~14th, 2014, Hotel Nikko Fukuoka, Fukuoka, Japan.

国内学会

10. 堂本貴寛, 廣瀬まゆみ, 紙 健次郎, 曾我朋義, 江角浩安, 源 利成. 大腸がんの糖代謝における GSK3 β の機能解析. 第 2 回がんと代謝研究会, 2014 年 7 月 10 日~11 日, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京.

11. 島崎猛夫, 中田光俊, 上田順彦, 有沢富康, 小坂健夫, 源 利成, 友杉直久. GSK3 β 阻害作用を持つ医薬品のリポジショニングによる進行膵癌の新規治療法開発. 第 12 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2014 年 07 月 17 日~19 日, 福岡国際会議場, 福岡.
12. Takahiro Domoto, Kenjiro Kami, Mayumi Hirose, Ilia V. Pyko, Tomoyoshi Soga, Hiroyasu Esumi, Toshinari Minamoto. Involvement of GSK3 β in aberrant glucose metabolism in colon cancer. (堂本貴寛, 紙 健次郎, 廣瀬まゆみ, ピコイリア, 曾我朋義, 江角浩安, 源 利成. 大腸がんの糖代謝における GSK3 β の機能解析) 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜, 横浜.
13. Mayumi Hirose, Takahiro Domoto, Toshinari Minamoto. Repurposing of the GSK3 β -inhibiting drugs for treatment of gastrointestinal cancer. (廣瀬まゆみ, 堂本貴寛, 源 利成. GSK3 β 阻害効果を持つ医薬品の適用転換による消化器がん治療法の検討) 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜, 横浜.
14. Takeo Shimasaki, Naohisa Tomosugi, Tomiyasu Arisawa, Toshinari Minamoto. Gemcitabine triggers epithelial-mesenchymal transition (EMT)-like change and enhances cell motility in pancreatic cancer cells. (島崎猛夫, 友杉直久, 有沢富康, 源 利成. 化学療法による膵がん細胞の EMT 誘導と細胞遊走能への影響) 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜, 横浜.
15. Hiroshi Doguchi. Hyperbaric oxygen therapy (HBOT) has impacted on mouse skin two-stage chemical carcinogenesis. (堂口裕士. マウス皮膚二段階化学発がんに対する高圧酸素療法の影響) 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜, 横浜.
16. 古田拓也, 中田光俊, 淑瑠へムラサビット, 宮下勝吉, 源 利成, 林 裕. GSK3 β 阻害医薬品の膠芽腫浸潤抑制効果 (Attenuation of glioblastoma cell invasion by GSK3 β -inhibitory drugs). 第 73 回日本脳神経外科学会学術総会, 2014 年 10 月 09 日~11 日, グランドプリンスホテル新高輪, 東京.
17. 島崎猛夫, 友杉直久, 源 利成. 膵癌細胞の抗がん剤誘導性上皮間葉転換 (EMT) を誘発する分泌型蛋白質の同定と GSK3 β による制御. 第 25 回日本消化器癌発生学会総会: シンポジウム 4 「がん転移・浸潤の新たなメカニズム」, 2014 年 11 月 13 日, 14 日, ホテル日航福岡, 福岡.
18. 富田泰斗, 三浦聖子, 藤田 純, 森岡絵美, 甲斐田大資, 大西敏雄, 大野由夏子, 野口美樹, 舟木 洋, 藤田秀人, 木南伸一, 中野泰治, 上田順彦, 小坂健夫, 源 利成. 大腸癌における CRD-BP の発現と臨床病理学的因子との関連. 第 25 回日本消化器癌発生学会総会: シンポジウム 2 「がんゲノム研究の新展開」, 2014 年 11 月 13 日, 14 日, ホテル日航福岡, 福岡.
19. 古田拓也, 中田光俊, 淑瑠へムラサビット, 董 宇, 宮下勝吉, 源 利成, 林 裕. 既存薬転用による膠芽腫の GSK3 β 標的療法 (GSK3 β -targeted therapy against glioblastoma by drug repositioning). 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014 年 11 月 30 日~12 月 02 日, シェラトン・グランデ・トウキョウベイ・ホテル, 千葉浦安.

講演, その他

20. 源 利成. がんのエネルギー代謝ーがんは甘いものが大好きー. 石川県立金沢泉丘高等学校 SSH 模擬講義, 2014 年 1 月 17 日, 金沢大学医学類, 金沢.
21. 源 利成. 大腸がん研究から見つけた新しいがん治療法. 金沢大学公開講座: がん研究の最前線, 2013 年 6 月 28 日, 金沢大学サテライトプラザ西町, 金沢.
22. 源 利成. がんの研究と医療・看護の資質向上. 2014 (平成 26) 年度看護師資質向上研修【がん看護】, 2014 年 10 月 10 日, 金沢大学附属病院, 金沢.

外部資金 (2014 年度が含まれる課題)

1. 2014-2015 年度 科学研究費補助金 (研究活動スタート支援): 課題番号 26893096
ピコ イリア (代表)
課題: Development of combined cellular and molecular target-directed therapies for glioblastoma
研究経費: 2,300 千円
2. 2013-2014 年度 科学研究費補助金 (挑戦的萌芽): 課題番号 25670572
源 利成 (代表), 杉山直幸 (連携)
課題: 蛋白質リン酸化特性の網羅的解析による大腸がんの病態解明と制御への応用
研究経費: 3,770 千円
3. 2013-2015 年度 科学研究費補助金 (若手研究 B): 課題番号 25860233
堂本貴寛 (代表)
課題: エネルギー代謝特性に基づく消化器がん病態解明と制御への応用
研究経費: 3,770 千円
4. 2014-2016 年度 科学研究費補助金 (基盤研究 B): 課題番号 26293322
中田光俊 (代表), 源 利成 (連携)
課題: ドラッグリポジショニングによる悪性グリオーマに対する新規化学療法の基盤構築
研究経費: 6,760 千円

奨学寄附金

5. 2014 年 3 月 財団法人石川県予防医学協会 800 千円
6. 2014 年 3 月 財団法人石川県予防医学協会 400 千円

共同研究

1. 2014 年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究 (一般)
島崎猛夫, ほか
課題: 膵がんエキソソームと GSK3 β の交絡的病理作用の解明とがん治療薬スク

リーニングへの応用

2. 2014年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
松田陽子，ほか
課題：Nestin のリン酸化制御による，膀胱癌分子標的治療の開発
3. 2014年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
小坂健夫，富田泰斗，ほか
課題：大腸がんにおける Wnt 経路標的分子 CRD-BP の分子病理学的特性と病態の
解明
4. 2014年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
吉村健太郎，ほか
課題：質量分析型迅速がん診断システムを用いた大腸がんの新規診断法の開発と
発がんメカニズムの解明
5. 2014年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
宮下知治，ほか
課題：GSK3 β 阻害による食道発癌の予防とその機序の解明
6. 2014年度 金沢大学がん進展制御研究所共同研究（一般）
山本憲男，下崎真吾，ほか
課題：骨肉腫の GSK3 β を標的とする新規治療法の開発と分子メカニズム

特許出願

なし

報 道

該当なし

機能ゲノミクス研究分野

<研究スタッフ>

教授： 鈴木健之 助教： 石村昭彦
助教： 寺島農 博士研究員： 丹下正一朗
事務補佐員： 小田原敦子
大学院生（博士課程）： Zanabazar Enkhbaatar Dulamsuren Oktyabri
大学院生（修士課程）： 松本晃汰

【研究概要】

当研究分野では、レトロウイルス感染発がんモデルマウスを用いて、がん関連遺伝子の探索を進め、新しい候補としてヒストンや DNA のメチル化修飾に関する酵素の遺伝子を同定してきた。これらの酵素が引き起こすエピジェネティックな制御の異常は、様々ながんにおいて検出されており、次世代のがん治療の標的として現在注目されている。これまでの解析から、これらの酵素は、がん細胞の増殖ばかりでなく、細胞の運動・浸潤、上皮・間葉転換、薬剤耐性獲得、低酸素応答など、がんの悪性進展のさまざまな過程にも関与することが示唆されており、酵素の新しい役割を明らかにするため、機能解析を継続している。

<今年度の研究成果，進行状況と今後の計画>

1) 上皮-間葉転換 (EMT) におけるヒストン H3 のメチル化制御

ヒストン H3 の 4 番目の Lys (H3K4) の脱メチル化酵素 KDM5B は、様々な種類のがんで高発現が見られ、がん細胞の浸潤および上皮・間葉転換 (EMT) を促進する活性をもつことをこれまでに報告した。しかし、KDM5B の発現をノックダウンしても、TGF- β など外部刺激による EMT の誘導は阻害できないことがわかった。そこで今回、EMT において H3K4 と同様に重要な H3K27 のメチル化制御に関わる酵素の役割を解析した。PRC2 (Polycomb repressive complex-2) は、H3K27 のメチル化を担う酵素複合体であり、EZH2 メチル化酵素および SUZ12, EED, RBBP4/7 のコアコンポーネントから構成される。私達は、これらの構成因子のうち H3K27me3 修飾を認識する EED タンパク質だけが、TGF- β 刺激による EMT プロセスで発現誘導されることを見いだした。EED の発現をノックダウンすると、PRC2 の H3K27 メチル化活性が低下し、転写抑制的クロマチン構造の誘導が阻害されることによって、EMT に重要な E-cadherin や microRNA-200 ファミリー遺伝子の発現抑制が解除され、TGF- β による EMT 誘導がブロックされることが示された (論文 1)。さらに私達は、PRC2 コアコ

ンポーネント以外にも、PRC2 複合体をクロマチンにリクルートする役割を担う JARID2 タンパク質が、TGF- β 刺激による EMT プロセスで顕著に発現誘導されることを見つけた。JARID2 の発現をノックダウンすると、PRC2 の標的遺伝子へのリクルートが阻害されて、標的遺伝子の発現抑制が解除され、TGF- β による EMT 誘導がブロックされることが示された（論文2）。このように、PRC2 によるヒストン H3K27 のメチル化の制御が、TGF- β などの外部刺激による EMT の進行に極めて重要であることが示された。さらに、PRC2 の触媒サブユニットである EZH2 メチル化酵素の阻害剤 GSK126 を用いると、EMT の誘導をブロックできたことから、この阻害剤のがん治療への有用性が示された。また、細胞内で JARID2 を強制発現させただけでは、PRC2 の標的遺伝子へのリクルートや EMT の誘導が起こらないことから、TGF- β 刺激によって誘導あるいは活性化される何らかの因子が PRC2 の機能に必要なことが示唆される。私達は、この新しい制御因子の有力な候補を現在同定しており、その機能を詳細に調べている。

2) がん関連遺伝子候補 JMJD5 の乳癌における機能

候補遺伝子のひとつ JMJD5 の生理機能や発がんにおける役割を解明するために、*Jmjd5* 欠損マウスを作製して解析してきた。その結果、JMJD5 はがん抑制遺伝子産物 p53 のシグナル経路を制御し、正常な個体発生に必須な因子であることがわかった。本年度は、JMJD5 とヒトのがん発症・悪性化との関係を重点的に調べ、悪性度の高い乳癌として知られるトリプルネガティブ型乳癌で顕著に JMJD5 の発現が低下していることや、低酸素刺激後の乳癌細胞株において JMJD5 の発現抑制が起きることを検出した。さらに、乳癌細胞株において JMJD5 の発現をノックダウンすると、癌幹細胞様の性質を有するスフィアの形成能が有意に上昇することを見いだした。こうした結果をふまえて、乳癌の悪性進展過程における JMJD5 の役割と分子レベルでの作用機序について解析を進行中である。

3) DNA の脱メチル化に関与する酵素のがん発症・悪性化における役割

DNA の積極的脱メチル化の第一段階を担う TET1 酵素の発現は、がん細胞株の間で高発現と極端な低発現という二極化の傾向を示し、細胞のゲノムの CpG アイランドメチル化形質(CIMP)と関係性があることをこれまでに見いだしてきた。本年度は、TET1 の発現抑制と CIMP 表現型が、細胞に炎症を誘導するシグナル経路と密接に関係することを見だし、CIMP の誘導と成立のメカニズムを明らかにするきっかけを得ることができたと考える。また、がん細胞において TET1 酵素の発現をノックダウンすると、EMT の誘導が阻害されることが明らかになった。EMT 誘導プロセスにおいては、TET1 が DNA の脱メチル化制御以外の機能を利用している可能性が示唆されており、TET1 の新しい作用機構を解明するため実験を進めている。

【 研 究 業 績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Oktyabri D, Tange S, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 453, 124-130, 2014.
2. Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. JARID2 is involved in Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung and colon cancer cell lines. *PLoS One*, 9(12):e115684, 2014.

< 学会発表 >

国際学会

1. Tange S. KDM5B histone demethylase controls EMT of cancer cells by regulating the expression of microRNA-200 family. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics (金沢 2014 年 1 月)
2. Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Enkhbaatar Z, Hara T and Suzuki T. Physiological role of Jmjd5, a novel p53 signal regulator, in embryonic development. International Symposium in Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics (金沢 2014 年 1 月)
3. Tange S, Enkhbaatar Z, Terashima M and Suzuki T. A role for KDM5B on epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. The 9th International Symposium of Institute Network (大阪 2014 年 6 月)

国内学会

1. Suzuki T, Tange S, Oktyabri D, Terashima M and Ishimura A. Functional characterization of histone demethylases in the process of epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会 (横浜2014年9月)
2. Tange S, Enkhbaatar Z, Terashima M and Suzuki T. A Role for PLU1 on epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ (蓼科2014年9月)
3. Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Terashima M and Suzuki T. Screening of histone modifying enzymes involved in cancer malignancies. 第37回日本分子生物学会年会 (横浜 2014年11月)

4. Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-beta. 第37回日本分子生物学会年会（横浜2014年11月）

<外部資金>

1. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 鈴木健之, 1,200 千円
研究課題名「ウイルス挿入変異法で同定されたエピゲノム制御因子による疾患発症機構の解析」

2. 文部科学省科学研究費補助金, 新学術領域研究 (がん微小環境), 研究分担者 鈴木健之, 1,000 千円

研究課題名「呼吸器悪性腫瘍の微小環境の特性を標的とした新規制御法の開発」

3. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 石村昭彦, 1,300 千円
研究課題名「がん関連遺伝子 Jmjd5 の新しい遺伝子発現制御機構の解析」

4. 文部科学省科学研究費補助金, 若手研究 (B), 研究代表者 丹下正一郎, 1,700 千円

研究課題名「DNA 脱メチル化酵素 TET1 のがん細胞における機能解析」

5. 文部科学省科学研究費補助金, 研究活動スタート支援, 研究代表者 寺島農, 1,100 千円

研究課題名「がん発症, 悪性化における non-coding RNA の新しい役割」

<共同研究>

1. 木村 宏 教授 東京工業大学大学院生命理工学研究科 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

2. 小出 寛 准教授 金沢大学医薬保健研究域医学系 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

3. 中田 光俊 教授 金沢大学医薬保健研究域医学系 神経腫瘍における IDH 酵素と TET 酵素の関係性の解析

4. 仙波 憲太郎 教授 早稲田大学理工学術院先進理工学部 アンプリコン導入乳癌発症モデルにおけるエピゲノム変化の解析