

がん幹細胞研究プログラム

Division of Molecular Genetics

遺伝子・染色体構築研究分野

Professor	Atsushi Hirao 平尾 敦
Assistant Professor	Yuko Tadokoro 田所優子, Masahiko Kobayashi 小林昌彦, Masaya Ueno 上野将也, Si Sha 司沙 (Nano-LSI)
Postdoctoral Researcher	Chiaki Ito 伊藤千秋 (学振 PD), Kenta Kurayoshi 倉吉健太
Graduate Student	Jing Young Wei, Pharm Thi Loc, Chen Xi
Assistant Staff	Kazue Sawa 澤和恵, Yukiko Takai 高井由紀子

【 Abstract 】

Nutrients, such as amino acid, sugar, lipid and vitamin, are critical determinants of cell survival, proliferation and differentiation processes in normal and malignant tissues. Recent studies have revealed critical roles of metabolic control in stem cell properties, so called "stemness", which contribute to malignant progression of cancers. Our group aims to elucidate molecular mechanisms underlying metabolic control of normal and malignant stemness.

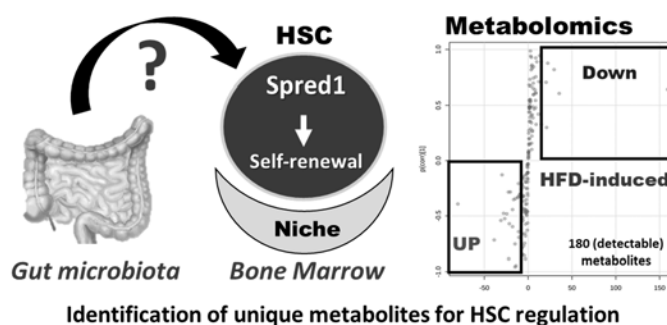
Hematopoietic stem cells (HSCs) maintain hematopoietic homeostasis by both self-renewing and differentiating into mature blood cells. We previously reported that loss of *Spred1* causes abnormality of self-renewal and malignancy by high-fat diet (HFD). To identify critical mediators between HFD and HSC regulation, we performed metabolomics analysis of HFD fed mice. We found that several candidate metabolites which are remarkably down- or up-regulated by HFD. Interestingly, we found that *Spred1* deficient mice exhibited leukemia development by administration of a candidate metabolite that is up-regulated with HFD, indicating that the metabolite may be a critical mediator for leukemogenesis in response to HFD. On the other hand, we found several metabolites that are remarkably downregulated by HFD. Thus, we currently aim to identify functional metabolites, which contribute to prevention or treatment of diet-induced hematopoietic diseases.

We also aim to identify critical metabolic pathways controlling malignant properties. To identify functional downstream molecules of FOXO or mTOR, which are both involved in metabolic regulations in malignancy, we performed sgRNAs library screening of molecules responsible for malignant properties of leukemias. As a result, we identified a critical cis-element for induction of molecule for blockage of leukemia differentiation in FOXO downstream. Therefore, we currently pursue to develop new drugs based on the FOXO downstream molecule. Also, we have identified critical metabolic pathways, including vitamin metabolisms, for cell survival under chemotherapeutic condition. Importantly, mice genetically lack the vitamin enzyme can survive normally (*Manuscript preparation*), indicate that the pathway is specifically essential for tumorigenesis. We believe that investigation of molecular functions in these pathways will lead to the development of successful therapeutics.

<2019年の研究成果，進捗状況及び今後の計画>

1. 高脂肪食摂取による造血幹細胞の異常と白血病発症機構の解明

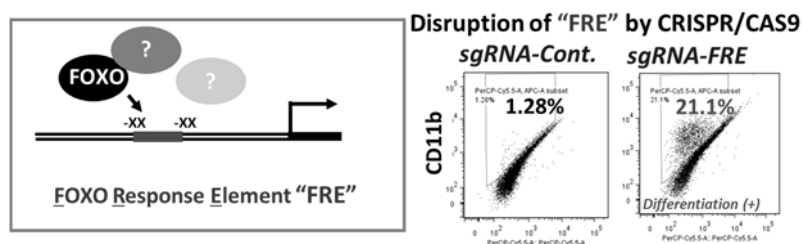
近年，高脂肪食など異常な全身的栄養環境の変化は，がんの発生・悪性化に深く関与していることが知られるようになってきた。我々は，高脂肪食の長期摂取が，腸内細菌叢の変化を介して，*Spred1* 欠損マウスにおいて造血幹細胞の異常な自己複製と発がんの起因となることを見いだした。そこで，高脂肪食や加齢による造血幹細胞の自己複製の異常，つまり、臓器間（腸管／骨髄），細胞間（ニッチ／幹細胞）コミュニケーションを司るメディエーターを明らかにする目的のためメタボローム解析を実施した。その結果，高脂肪食によって上昇あるいは低下する複数の低分子代謝物を特定した。その中で高脂肪食により上昇する代謝物のひとつを普通食の *Spred1* 欠損マウスに投与することにより，高脂肪食と同様の病態を示すことを見出した。現在，「ステムネスを制御するメタボライト」の制御メカニズムを理解することにより，予防や治療に寄与できるよう研究を進めている。



2. がん特異的代謝制御分子の特定と悪性化制御メカニズム

個体や細胞レベルでの栄養状態は，体内のアミノ酸，糖，脂質など，様々な栄養素の量や質に影響し，がん細胞の動態に影響を与える。我々は，ステムネスと治療抵抗性を制御する代謝経路の特定のため，①栄養飢餓で活性化するストレス応答因子 FOXO の下流分子および②mTOR 経路の下流分子を対象とした CRISPR/CAS9 ライブラリースクリーニングを実施した。

①として，白血病細胞分化を阻害する分子を同定し，発現制御機構の解明に取り組んだ。その結果，白血病細胞を分化誘導するためのシスエレメントを同定した。そこで，その



Deletion of FOXO binding element (FRE) leads to leukemia cell differentiation

機能を阻害するペプチドを作製し新たな治療薬の開発を目指して研究を進めた。

②として，ビタミン代謝経路ががんの増殖・生存に必須であること，さらに，分子標的治療（チロシンキナーゼ阻害剤：TKI）の感受性に寄与することを見いだした。ビタミン代謝のがん特異的役割を解明するとともに，その治療法の開発を進めている。

このように，本研究では，バイオマーカー，予防，治療のために寄与する標的分子や代謝物を通して，がんの本態解明と将来の社会還元を目標としている。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Hasegawa T, Kikuta J, Sudo T, Matsuura Y, Matsui T, Simmons S, Ebina K, Hirao M, Okuzaki D, Yoshida Y, Hirao A, Kalinichenko VV, Yamaoka K, Takeuchi T, Ishii M Identification of a novel arthritis-associated osteoclast precursor macrophage regulated by FoxM1. **Nat. Immunol.** 20:1631-1643, 2019
2. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Hayashi Y, Kobayashi M, Domoto T, Minamoto T, Hirao A, Nakada M Identification of GSK3 β inhibitor kenpaullone as a temozolomide enhancer against glioblastoma. **Sci. Rep.** 9: 10049 2019
3. Imanishi T, Unno M, Kobayashi W, Yoneda N, Matsuda S, Ikeda K, Hoshii T, Hirao A, Miyake K, Barber GN, Arita M, Ishii KJ, Akira S, Saito T. Reciprocal regulation of STING and TCR signaling by mTORC1 for T-cell activation and function. **Life Sci Alliance.** 2, 2019.

著書・総説

上野将也, 平尾敦: がん幹細胞 進化するがん創薬 化学同人 266-273, 2019

< 学会発表 >

1. Hirao A: Critical roles of gut microbiota in self-renewal of hematopoietic stem cells and leukemogenesis 2nd Japan-German symposium Oct.3rd, 2019, Kanazawa
2. Hirao A: The nutrient signals in self-renewal of hematopoietic stem cells and tumorigenesis 2019 US-Japan Symposium on Normal/Malignant Hematopoiesis and Novel Therapies for Hematologic Malignancies, Feb. 19, 2019, Hawaii, USA
3. Hirao A: Metabolic Regulation of Stemness in Malignant Hematopoiesis. Eleventh AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Biology to Precision Medicine. Feb.12 2019. Hawaii, USA
4. 平尾敦 : Critical regulation of metabolites for hematopoietic homeostasis and leukemogenesis 第42回日本分子生物学会年会 2019年12月5日、福岡
5. 平尾敦 : Critical role of nutrient signals in hematopoietic stemness and malignancy 第92回日本生化学会大会 2019年9月20日、東京
6. 平尾敦 : 幹細胞 第12回 研修医のための血液学セミナー 2019年7月6日
7. 平尾敦 : 造血幹細胞自己複製の制御と腸内細菌叢 北海道大学「感染・免疫・がん・炎症」シンポジウム 2019年3月27日、東京

8. Tadokoro Y, Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites. Joint symposium on tumor microenvironment and precision oncology between SNU-GCRC and CRI, May 13, 2019, Seoul
9. 田所優子, 平尾敦: 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞機能制御 第15回血液学若手研究者勉強会(麒麟塾) 2019年7月6日, 東京
10. 田所優子, 平尾敦: 腸内細菌由来代謝物による造血幹細胞の機能制御 第92回日本生化学会大会 2019年9月18日, 横浜
11. Tadokoro Y, Hirao A: Regulation of hematopoietic stem cell fate by gut microbiota-derived metabolites. International symposium on tumor biology in Kanazawa/Duke-NUS and KU-CRI joint symposium, Oct. 29, 2019, Kanazawa
12. Ueno M, Takase Y, Kurayoshi K, Ohta K, Fuse K, Nishida Y, Kojima K, Hirao A: Identification of FOXOs-mediated differentiation block pathway in LSCs 第81回日本血液学会学術集会, 令和元年10月11-13日, 東京
13. Ueno M, Takase Y, Kurayoshi K, Hirao A: Identification of critical downstream molecules of FOXO for targeting leukemic stem cells 第17回幹細胞シンポジウム, 令和元年5月24-25日, 兵庫
14. Kobayashi M, Hirao A: Construction of a reporter system of undifferentiated cells to characterize patient-derived glioma-initiating cells 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月28日, 京都
15. Kobayashi M, Vu HT, Hegazy AM, Jing Y, Chen X, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Hirao A: Identification of molecular targets in autophagy pathway to achieve efficient therapy of malignant gliomas 第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム 2019年10月2-3日, 大阪

<外部資金>

1. 平尾敦: 基盤研究(A) R1~R4年度「代謝調節によるがんステムネス制御の分子基盤」8,500千円
2. 平尾敦: 次世代がん医療創生研究事業 R1~R3年度「代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発」16,846千円
3. 田所優子: 基盤研究(C) R1~R3年度「栄養環境変化による造血幹細胞恒常性維持機構の解明」1,100千円
4. 田所優子: 令和元年度 日本血液学会 研究助成「アクチン重合調節による造血幹細胞の自己複製能制御技術の開発」1,000千円
5. 上野将也: 基盤研究(C) H29~H31年度「mTOR複合体2による白血病の治療耐性制御機構の解明」1,100千円
6. 小林昌彦: 基盤研究(C) H29~H31年度「エネルギー調節と未分化性制御の協調的相互関係の分子基盤」700千円

7. 伊藤千秋：特別研究員奨励費 H28～H31 年度「選択的オートファジーによる白血病幹細胞制御機構の解明」1,040 千円
8. 司沙：若手研究（B）H31～R1 年度「アクチン動態制御による造血幹細胞の自己複製調節機構の解明」1,600 千円
9. 倉吉健太：若手研究 令和 1~2 年度「ゲノム編集技術を用いた白血病幹細胞の分化制御に関わる因子の同定と機能解析」1,700 千円

Division of Oncology and Molecular Biology

腫瘍分子生物学研究分野

Professor	Chiaki Takahashi 高橋 智聡
Assistant Professors	Shamma Awad シャムマ アワド (～2019.6) , Susumu Kohno 河野 晋, Mitsuhiro Tomosugi 友杉 充宏 (2019.6.1～)
Graduate Students	Yuki Nishimoto 西本 裕希 (～2019.3.31) , Li Fengkai 李 鳳凱, Paing Linn, Kulathnga Liyana Arachchillage Nilakshi, Sheng Jindan 盛 金丹, Zhang Zhiheng 張 智恒, Yu Hai 余 海 (2019.10.1～) , Gong Linxiang 龔 麟祥 (2019.10.1～)
Technical Assistant	Naoko Nagatani 永谷 直子

【 Abstract 】

We innovate *in vitro* and *in vivo* cancer model systems that can be readily analyzed by molecular biology techniques; this aims to find pathways critical for carcinogenesis, malignant progression, metastasis, drug resistance and stem cell-like behaviors in cancer cells. In recent years, we have been trying to find effective targets of cancer therapy in the retinoblastoma tumor suppressor gene 1 (RB1) inactivated signature. Our efforts highlighted pivotal roles of RB1 gene in tumor metabolism, tumor microenvironment, apoptosis and epigenetics. In addition, we are attempting to develop new drugs targeting cancer-specific genomic abnormalities in metabolic genes.

<2019 年の成果、進行状況と今後の計画・展望>

コモンタイプのがんにおける RB1 不活性化は、イニシエーション時ではなくプログレッション時においてより頻繁に起こる。悪性進展の様々なコンテキストにおいて RB1 不活性化シグナチャーを決定するアプローチによって見えてきたのは、RB1 の多様な代謝制御機能とサイトカイン・ケモカイン発現誘導を介する微小環境への影響であった。

RB1 の機能喪失によってがん細胞の未分化性が亢進するコンテキストにおいて、解糖系酵素の中でほぼ唯一 HIF や Myc による転写制御を受けない PGAM1,2 が RB1 によって転写活性化されることを見出している。本年度は、PGAM1 の発現低下が胃がん細胞の未分化性を亢進することを見出した。これを突破口に、がんの未分化性制御において解糖系が果たす役割を探索する (河野、永谷、大阪大学との共同研究)。

同様のコンテキストにおいて、RB1 不活性化が CCL2 の分泌促進を介して Treg, MDSC, マクロファージ等の免疫細胞をリクルートすることを見出した。RB1 不活性化によって乳腺の過形成を誘導する系を CCR2 欠損背景に導入したところ、病変はほぼ完全に抑制された。RB1 が CCL2 の発現を制御する機構を探索し、AMPK、脂肪酸酸化や JNK がこれを介在することを明らかにした (李ら *Cancer Res.*、龔)。RB1 が

AMPK の活性を制御する機構は非常に興味深いところであるので、次年度も探索を続ける。

RB1 の標的遺伝子として同定した ELOVL6 にも注目している。ELOVL6 は脂肪酸の鎖長延長を司る。乳がんや肺がんで発現が高く、予後にも関与する。乳がんにおける ELOVL6 の不活性化は、セラミドの顕著な蓄積とスフィンゴリエリンの低下、そして、G1 停止を誘導した（張、友杉、筑波大学島野仁教授、小野薬品工業との共同研究）。ELOVL6 阻害剤と組み合わせた時に効果を発揮する抗がん剤を探索している。RB1 はまたコレステロール生合成経路の制御にも関与する。前立腺がんにおいてこの臨床的意義を探索している（友杉）。

がんは RB1 機能を保持しているか喪失しているかに分類できる。RB1 を保持しているがんの治療法として CDK4/6 阻害剤があげられ、本邦では、HR⁺;Her2 進行乳がんに対し保険適応がある。今後適応拡大が予想され、耐性出現も問題になると思われる。CDK4/6 阻害剤には RB1 依存的・非依存的な作用機構があり、我々は、RB1 依存的な機能に対する耐性に興味を持った。肝細胞がんは、RB1 変異は頻度が少ないものの、D-type cyclin の増幅や HCV タンパクによる RB1 不活性化など、RB1 経路の異常が高頻度に起こる。Trp53^{-/-}; Rb^{flox}; p107^{-/-}; p130^{flox} マウス肝にハイドロダイナミックス法によって cre recombinase を導入したところ AFP 陽性肝がんの発生を認めた。つまり、RB1 経路の破綻は肝がんを発症させる。CDK4/6 阻害剤の RB1 依存的な機能を探索するために、RB1 陽性肝がん細胞株 HepG2 において RB1 の恒常的活性化変異体である 7LP を導入したところ、部分的な細胞死と細胞老化を認めた。これらを増強する化合物をスクリーニングしたところ、IKKβ阻害剤がヒットした。7LP を導入した細胞では、IKKβあるいはその下流の NF-κB の活性が亢進していた。この原因を探索したところ、RB1 の活性化によって核酸の合成が低下し、DNA 損傷応答が誘導されたことが判明した。CDK4/6 阻害剤によっても IKKβは活性化した。免疫不全マウスに移植した HepG2 の増殖は、CDK4/6 阻害剤の単独投与によっては抑制できなかったが、IKKβ阻害剤を併用することによって完全に抑制された（盛、河野）。

一方、RB1 陰性がん細胞に対する治療として、Chk1, PLK, Aurora-A, B 等の阻害が提案されている。我々は、進行前立腺がんにおいて頻繁にホモ欠失する RB1 の近傍に位置し RB1 欠失に伴って欠失する SUCLA2 に注目した。SUCLA2 とそのアイソザイムである SUCLG2 の両欠失は、合成致死性を示さなかった。しかし、SUCLA2 欠失細胞には一定の代謝脆弱性が認められたため、SUCLA2 欠失細胞を選択的に傷害する薬剤をスクリーニングし、二つのヒット化合物を得た。このうちの一つは、抗がん活性が知られ、フェーズ I の臨床試験を通過している。この化合物は、免疫不全マウスへの投与が可能であり、しかも、移植した SUCLA2 欠失前立腺がん細胞において高度の細胞死を誘導した。しかし、現在得られている IC₅₀ は薬理的に十分ではないのと分子標的が未同定のため、釣り竿法による標的的同定も目指し構造展開を開始している。現在までに 13 種類の類縁体を試験したが、もとのヒット化合物を超える活性を見いだせなかった。AMED 次世代がんの支援も得て、新規合成による構造展開を目指している。JFCR39 アッセイによる標的推定も進行している。あるいは、スクリーニングのスケールを大きくすることによって活性を同じくする異なる化合物の取得も目指している（河野、Linn、永谷、余、共同研究者多数、特願 2019-228526）。

最後に、予防医学的な取り組みとして、前思春期に限定した高脂肪食摂取が乳腺に及ぼす影響を解析している。同処置は Trp53^{-/-}マウスの乳腺上皮において c-Myc を安定化させた（Kulathunga, 河野、西本）。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

1. Li E, Kitajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie D A, Mukaida M and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Research*, 79:3903-3915, 2019. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3604.

(共同研究)

1. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Kita K, Horike S, Saitoh K, Kato K, Kaori I, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida M, Yano S, Soga T, Tojo A and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene*, 38:2464-2481, 2019. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1
2. Thumkeo D, Katsura Y, Nishimura Y, Kanchanawong P, Tohyama K, Ishizaki T, Kitajima S, Takahashi C, Hirata T, Watanabe N, Krummel MF and Narumiya S. mDia1/3-dependent actin polymerization spatiotemporally controls LAT phosphorylation by Zap70 at the immune synapse. *Science Advances* 2019 (in press)

(著書・総説)

1. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「p53 によるがん抑制はメバロン酸経路を介して行われる」 Vol.37 No.6 p916-917, 2019 富田泰輔 編, 羊土社刊

< 学会発表 >

1. Takahashi C. RB tumor suppressor functions in metabolic regulation. VI International conference "Modern biotechnology for science and practice" 2019年4月26日 (サンクトペテルブルク/サンクトペテルブルク国立第一医科大学: 4/26-27)
2. 河野晋, Paing Linn, 曾我朋義, 高橋智聡. RB 欠損に付随する代謝遺伝子欠損を標的とした治療法の探索. 第7回がんと代謝研究会 2019年8月2日 (仙台市/東北大学医学部星稜会館: 8/1-2)
3. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced cytokine and chemokine secretion. 第9回中国復旦大学上海がんセンタージョイントシンポジウム 2019年9月3日 (金沢市/金沢大学)

4. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment. 世界展開カロシ
ア シンポジウム (Russia-Japan Medical symposium) 2019年9月13日 (サンク
トペテルブルク/サンクトペテルブルク国立第一医科大学 : 9/11-16)
5. Li F, Kitajima S and Takahashi C. RB inactivation enhances protumoral microenvironment
by elevating CCL2 expression. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都
市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
6. Kulathunga N, Kohno S, Muranaka H and Takahashi C. High Fat Diet Exposure Induces
c-Myc Stabilization in Mammary Gland Epithelium. 第78回日本癌学会学術総会
2019年9月28日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
7. Paing Linn, Kohno S and Takahashi C. Therapeutic Vulnerability of RB1-SUCLA2
co-deleted Prostate Cancer. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月28日 (京都市
/国立京都国際会館 : 9/26-28)
8. 河野晋, 高橋智聡. RB-KDM5Aによる代謝制御機構の解明. 第78回日本癌学会学
術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
9. 三木貴雄, 高橋智聡, 野田亮. RBに着目したがんと概日リズムの連関の解析. 第
78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
10. 岡田宣宏, 村中勇人, 吉川清次, 妹尾昌治, 高橋智聡. 乳がん治療薬抵抗性獲得機
構におけるNFYAの機能解明. 第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京
都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
11. Kitajima S, Takahashi C and Barbie DA. STING signaling in KRAS-driven lung cancer.
第78回日本癌学会学術総会 2019年9月26日 (京都市/国立京都国際会館 : 9/26-28)
12. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced
CCL2 secretion. 2019 International RB Conference 2019年9月30日 (チャールスト
ン USA : 9/29-10/2)
13. Takahashi C. RB1 inactivation induces a protumoral microenvironment. International
Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019 2019年10月29日 (金沢 : 10/29)
14. 河野晋. RB欠失による脆弱性を標的とした前立腺がん新規治療法の探索. 第3回
がんと代謝研究会・若手の会 2019年11月13日 (熊本市/熊本大学発生医学研究
所 : 11/13-14)
15. Paing Linn, Kohno S and Takahashi C. Pharmacologically targetable vulnerability in
prostate adenocarcinoma carrying RB1-SUCLA2 deletion. 第42回日本分子生物学会
年会 2019年12月6日 (福岡市/福岡国際会議場 : 12/3-6)
16. 村田富保, 河野晋, 高橋智聡, 疋田清美, 金田典雄. リポポリサッカライドによっ
て惹起される炎症反応に対する regucalcin の抑制効果. 第42回日本分子生物学会
年会 2019年12月4日 (福岡市/福岡国際会議場 : 12/3-6)

<知的財産>

2019年12月18日 特願 2019-228526: 「SUCLA2 遺伝子欠失前立腺がんを特異的に死滅させる化合物」 発明者: 高橋智聡、河野晋、Paing Linn

<その他>

金沢大学公開講座

高橋智聡. がん遺伝子～がんを起こす遺伝子・がんを止める遺伝子～ 2019年5月11日 (金沢市/サテライト・プラザ)

<外部資金> (2019年度/H31年度・R1年度が含まれる課題)

高橋智聡

1. 次世代がん医療創生研究事業 (AMED) R1～R2年度「SUCLA2 遺伝子欠失によって生じる代謝脆弱性を標的とする新規がん治療法探索」(代表) 8,000 千円
2. 革新的先端研究開発支援事業 (AMED-CREST) H27～R2年度「脂肪酸の鎖長を基軸とした疾患の制御機構と医療展開に向けた基盤構築」(分担) 8,000 千円
3. 科学研究費補助金 基盤研究 (B) H29～H31年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」(代表) 4,700 千円
4. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) R1～R3年度「関節リウマチ滑膜の上皮間葉移行の新規制御分子 DIP2C の解析と治療作用点の検討」(分担) 200 千円
5. 学術研究助成基金助成金 挑戦的研究 (萌芽) R1～R2年度「SUCLA2 欠失によって生ずる代謝脆弱性を標的とする新規創薬研究」(代表) 2,500 千円

Division of Molecular Bioregulation

分子生体応答研究分野

Professor	Naofumi Mukaida 向田直史
Associate Professor	Tomohisa Baba 馬場智久
Assistant Professor	Soichiro Sasaki 佐々木宗一郎
Graduate Students	Yamato Tanabe 田辺和 (D4) 、 Di Zhang 張迪 (D3) Olga Namakanova (モスクワ大学大学院からの特別研究生、2019年9月~11月)
Technical Assistance	Kuniko Minami 南邦子

【 Abstract 】

1. Pathogenic role of leukemia cell-derived extracellular vesicles (EVs) in donor cell-derived leukemia (DCL) after bone marrow (BM) transplantation

Hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is widely used for various hematologic malignancies as a curative strategy. We demonstrated that the transplantation with normal BM cells after sublethal irradiation could induce chronic myeloid leukemia-bearing mice to develop several types of hematopoietic malignancies arising from donor cells, the condition which mimics DCL. We further proved that replication nuclear damage-mediated stimulator of interferon genes (STING) pathway activation induced leukemia cells to load dsDNA into EVs, which can initiate leukemogenesis by interacting with intracellular DNA sensor signaling pathway in adjacent normal hematopoietic cells.

2. BCR-ABL-induced senescence and senescence-associated secretory phenotype (SASP)

Transplantation of BCR-ABL-expressing hematopoietic stem/progenitor cells caused CML in mice with an increase in bone marrow BCR-ABL⁺CD41⁺CD150⁺ leukemic megakaryocyte-lineage (MgkL) cells, which exhibited senescence-associated β -galactosidase activities and increased expression of p16 and p21, the molecules crucially involved in senescence. Moreover, deficiency of p16 and p21 gene depressed BCR-ABL-induced abnormal megakaryopoiesis and reduced CML cell stemness. The expression of TGF- β 1, a representative molecule of SASP, was enhanced in leukemic MgkL cells, and TGF- β 1 inhibition attenuated the replication capacity of CML cells. Furthermore, BCR-ABL-expressing MgkL cells displayed enhanced autophagic activity and autophagy inhibition reduced bone marrow MgkL cell number and prolonged the survival of CML mice, which transiently received a tyrosine kinase inhibitor, imatinib, beforehand. Thus, BCR-ABL-induced expansion of senescent leukemic MgkL cells can promote CML progression by providing TGF- β 1, a mediator which is crucially involved in CML cell stemness maintenance.

3. The roles of transcription factors in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model

We previously established 4T1.3 clone with a high capacity to metastasize to bone after orthotopic injection, from a murine triple-negative breast cancer cell line, 4T1.0. Comprehensive gene analysis revealed that 4T1.3 cells at bone metastasis sites exhibited the enhanced expression of three transcription factors, Lmo2, Nfe2, and Myb, compared with its parental clone, 4T1.0. Among these transcription factors, the gene transduction of Nfe2 but not that of other factors conferred higher capacity to grow in bone cavity on 4T1.0 cells, when the cells were injected into bone cavity, suggesting the contribution of Nfe2 to bone metastasis formation.

<2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. ドナー由来白血病 (DCL) 発症過程での白血病細胞由来細胞外小胞 (EV) の役割

骨髄幹細胞移植は、種々の血液系の悪性腫瘍の根治的治療法として広く用いられている。慢性骨髄性白血病 (CML) マウスに対して、放射線照射後に骨髄移植を行うと、DCLに類似した、ドナー細胞由来の種々の骨髄系の悪性疾患が発症するモデルを樹立した。このモデルにおいて、核の複製障害によって、simulator of interferon genes (STING) 経路が活性化された白血病細胞が生成した二重鎖DNAを含むEVが、隣接の正常骨髄細胞に伝播され、DNA感知経路を活性化することによって、正常骨髄細胞を白血病化することを明らかにした。

2. BCR-ABLによる細胞老化と細胞老化関連分泌形質(SASP)

BCR-ABL 発現骨髄幹/前駆細胞を移植すると、CML が発症するとともに、 β -galactosidase (SA- β -gal) 活性を示すとともに、細胞老化に密接に関与している p16・p21 が発現している BCR-ABL 陽性 CD41 陽性 CD150 陽性の巨核球様白血病細胞 (MgkL) が骨髄内で増加した。BCR-ABL 発現 p16・p21 の重複欠損骨髄幹/前駆細胞の移植では、MgkL の増加は認められず、CML 細胞の幹細胞能も低下した。SASP の一つである TGF- β 1 の発現が MgkL 細胞で亢進していて、TGF- β 1 抑制で CML 細胞の複製能も低下した。BCR-ABL 発現 MgkL 細胞はオートファジー活性が上昇し、CML マウスに対してオートファジーを抑制すると骨髄内 MgkL 細胞数が減少するとともに、チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブ投薬後の生存率も改善することを認めた。したがって、BCR-ABL によって増加した MgkL 細胞は、CML 細胞の幹細胞能の維持能を示す TGF- β 1 を産生することで、CML の進行に関与していると考えられた。

3. 骨転移巣乳がん細胞に選択的に発現亢進している転写因子の役割

マウス triple-negative 乳がん細胞株 4T1.0 株から、免疫不全の認められない BALB/c マウスの乳房脂肪組織への同所接種後に、高率に骨へ転移する亜株 4T1.3 株を樹立した。包括的遺伝子発現解析の結果、骨内の 4T1.3 株では、Lmo2・Nfe2・Myb の3つの転写因子が、4T1.0 株に比べて、発現が亢進していた。これらの転写因子のうち、Nfe2 を 4T1 株に遺伝子導入した株のみが、コントロール株に比べて、骨内接種した時の腫瘍形成が亢進していたことから、Nfe2 が骨内転移巣形成に密接に関与していることが示唆された。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(共同研究)

1. Nishimura T, Nakata A, Xiaoxi C, Nishi K, Meguro-Horike M, Sasaki S, Horike S, Saitoh K, Kato K, Igarashi K, Murayama T, Kohno S, Takahashi C, Mukaida N, Yano S, Soga T, Tojo A, and Gotoh N. Cancer stem-like properties and gefitinib-resistance are dependent on purine synthetic metabolism mediated by the mitochondrial enzyme MTHFD2. *Oncogene* 2019, 38 (14): 2464–2481. doi: 10.1038/s41388-018-0589-1.
2. Li F, Kiajima S, Kohno S, Yoshida A, Tange S, Sasaki S, Okada N, Nishimoto Y, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Masuda S, Thai TC, Nishiuchi T, Tanaka T, Barbie DA, Mukaida N, and Takahashi C. RB inactivation induces a protumoral microenvironment via enhanced CCL2 secretion. *Cancer Res* 2019, 79 (15): 3903-3915. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-3604.
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Furuta M, Kimura A, Taruya A, Yamamoto H, Shimada E, Akiyama M, Mukaida N, and Kondo T. CCL2-mediated reversal of impaired skin wound healing in diabetic mice by normalization of neovascularization and collagen accumulation. *J Invest Dermatol* 2019, 139 (12): 2517-2527.e5. doi: 10.1016/j.jid.2019.05.022.
4. Ji DX, Yamashiro LH, Chen KJ, Mukaida N, Kramnik I, Darwin KH, and Vance RE. Type I interferon-driven susceptibility to *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by IL-1Ra. *Nature Microbiol* 2019, 4 (12): 2128-2135. doi: 10.1038/s41564-019-0578-3.
5. Song Y, Ji B, Jianga C-X, Chen Z-M, Yao N-H, Mukaida N, and Huang H. IL17RB expression might predict prognosis and benefit from gemcitabine in patients with resectable pancreatic cancer. *Pathol Res Pract* 2019, 215 (12): 152650. doi: 10.1016/j.prp.2019.152650.
6. Thiel G, Mukaida N, and Rössler O. Regulation of stimulus-induced interleukin-8 gene transcription in human adrenocortical carcinoma cells – role of AP-1 and NF-κB. *Cytokine* (in press) doi: 10.1016/j.cyto.2019.154862.
7. Yoshimura T, Nakamura K, Li C, Fujisawa M, Shiina T, Imamura M, Li T, Mukaida N, and Matsukawa A. Cancer cell-derived granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is dispensable for the progression of 4T1 murine breast cancer. *Int J Mol Sci* (in press)

総説論文.

1. Mukaida N, Nosaka T, Nakamoto Y, and Baba T. Lung macrophages: multifunctional regulator cells for metastatic cells (Invited review). *Int J Mol Sci* 2019; 20 (1): 116. doi: 10.3390/ijms20010116. Special issue on “Tumor microenvironment”

<学会発表> (筆頭発表者が分野所属の者に限る)

1. 佐々木宗一郎, 向田直史。骨転移巣特異的に乳がん細胞で発現が亢進する転写因子の解析。第23回日本がん分子標的治療学会学術集会。2019年6月12日～14日。大阪。
2. 佐々木宗一郎, 向田直史。骨微小環境特異的にマウス乳がん細胞株で発現が亢進する転写因子を介した骨転移制御機構の解析。第28回日本がん転移学会学術集会・総会。2019年7月25日～26日。鹿児島。
3. Baba T and Mukaida N. Crucial contribution of leukemia-derived extracellular vesicles to the development of donor cell-derived leukemia. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
4. Zhang D, Sasaki S, Baba T, and Mukaida N. The role of transcription factors, Lmo2, Nfe2l3, Myb, in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
5. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. The pathological role of BCR-ABL-induced senescence in chronic myeloid leukemia. 第77回日本癌学会学術総会。2019年9月26日～28日。京都。
6. 馬場智久, 向田直史。ドナー細胞由来白血病における白血病細胞由来細胞外小胞の病態生理学的役割。金沢大学がん進展制御研究所・北海道大学遺伝子病制御研究所ジョイントシンポジウム2019。2019年12月16日。金沢。

<学術雑誌の編集>

向田直史

1. Associate Editor, Cytokine, An official Journal of International Cytokine and Interferon Society.
2. Guest Editor, Int J Mol Sci, Special issue on “Tumor Microenvironment”.

<外部資金>

向田直史

1. AMED 肝炎等克服実用化研究事業(分担) 「獲得免疫反応の賦活化により核内HBV cccDNAを排除する方法の開発」(直接経費 1,385千円, 間接経費 415千円)

佐々木宗一郎

1. 科学研究費・基盤研究(C) (代表) 「新規乳がん骨転移モデルの解析を通じた, 新規標的分子の探索」(直接経費 1,600千円, 間接経費 480千円)
2. AMED 創薬ブースター (代表) 「骨転移したがん細胞の増殖を選択的に抑制するメカニズムの標的検証」(直接経費 4,545千円, 間接経費 456千円)