

# がん微小環境研究プログラム

## Division of Immunology and Molecular Biology

### 免疫炎症制御研究分野

|                     |   |
|---------------------|---|
| Professor           | Takashi Suda 須田 貴司                                |
| Assistant Professor | Takeshi Kinoshita 木下 健,<br>Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介 |
| Graduate Student    | Mahib, Muhammad Mamunur Rashid (D3~D4)            |
| Assistant Staff     | Shoko Hosojima 細島 祥子                              |
| Research Cooperator | Hiroko Kushiyama 串山 裕子                            |

#### 【 Abstract 】

Pyroptosis was discovered as caspase-1-dependent cell death of macrophages that were infected by intracellular pathogens such as *Salmonella Typhimurium*. However, pyroptosis has been observed in other cell types including T cells, intestinal epithelial cells and various cancer cell lines. Morphologically, pyroptosis resembles necrosis rather than apoptosis. Because pyroptotic cells release inflammatory cytokines such as IL-1 $\beta$  and IL-18 as well as intracellular inflammatory substances called DAMPs or alarmins, pyroptosis is inevitably inflammatory cell death as opposed to apoptosis that is often described as non-inflammatory cell death. Recent reports revealed that in addition to caspase-1, caspase-4 and 5 in humans and caspase-11 in mice mediates pyroptosis. Furthermore, it was discovered that these caspases (caspase-1, 4, 5, 11) cleaves a common protein substrate, gasdermin D (GSDMD), and the resulted N-terminal fragments of GSDMD form pores in the plasma membrane to induce pyroptosis.

Interestingly, while the caspase-4/5/11-mediated pyroptosis is highly dependent on GSDMD, we have found that activation of caspase-1 induces cell death in GSDMD-KO cells. Recently, we demonstrated that this caspase-1-mediated and GSDMD-independent cell death is apoptosis dependent on Bid, caspase-9 and 3, but not on caspase-2, 6, 7 and 8. It was previously reported that cortical neurons cultured under oxygen-glucose deprivation (OGD) conditions exhibit caspase-1-dependent apoptosis accompanied with caspase-3 and Bid cleavage. We found that wild-type cortical neurons express caspase-1 but little GSDMD, and Bid-KO neurons as well as caspase-1-KO ones are resistant to OGD treatment. In addition, wild-type bone marrow-derived mast cells, which express GSDMD at very low levels, exhibit Bid-dependent apoptosis in response to caspase-1 activation by LPS + nigericin stimulation. These results revealed that activated caspase-1 induces Bid-dependent apoptosis in both artificially and naturally GSDMD-deficient cells, although the same elicits GSDMD-dependent pyroptosis in GSDMD-sufficient cells (Nat Commun, 2019). Nevertheless, caspase-1 activation induces reduced and delayed apoptosis in GSDMD/Bid-double KO cells compared to GSDMD-single KO cells. We found that caspase-1-mediated apoptosis in GSDMD/Bid-double KO cells is caspase-7 dependent, indicating multiple back up mechanisms for caspase-1-dependent cell death (Microbiol Immunol, 2019).

## <2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. カスパーゼ1によるアポトーシスの誘導の分子機構の解析

細菌感染などで活性化したカスパーゼ1はGasdermin D (GSDMD)を切断することで、マクロファージや腸上皮細胞などにパイロトーシスと呼ばれるネクローシス様のプログラム細胞死を誘導する。しかし、GSDMD 欠損マクロファージはカスパーゼ1依存性細胞死が完全には抑制されず、野生型細胞より遅延して細胞死を起こす。我々はこれまでに、GSDMD 欠損マクロファージや大腸癌細胞株では、カスパーゼ1の活性化により Bid 依存性および非依存性アポトーシスが誘導されることを見出してきた。本年度は、神経細胞やマスト細胞はカスパーゼ1を発現しているが、元来 GSDMD を発現しておらず、野生型マウス由来大脳皮質神経細胞を酸素・グルコース欠乏条件で培養した場合や野生型マウス骨髄由来マスト細胞を LPS+ニゲリシンで刺激した場合に、カスパーゼ1および Bid 依存性にアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Nat Commun, 2019)。また、GSDMD/Bid 二重欠損マウスのマクロファージなどを用い、GSDMD も Bid も存在しない細胞では、カスパーゼ1の活性化によりカスパーゼ7依存性のアポトーシスが誘導されることを見出した (Microbiol Immunol, 2019)。

### 2. 自然免疫応答におけるモーター蛋白 KIF11 の役割の解析

パイロトーシスシグナル伝達関連因子として単離したモーター蛋白 KIF11 が複数の NLR パスウェイを制御する可能性を検証した。蛍光免疫染色と共焦点顕微鏡観察および PLA 法で NLRC4、NOD2、NLRP3 と KIF11 が内在性タンパクレベルで結合することを確認した。NLRC4 と KIF11 の結合が KIF11 インヒビターで減弱することも観察された。また、NLRC4 および NLRP3 刺激で誘導されるカスパーゼ1の活性化が複数の KIF1 インヒビター処理で抑制されること、さらに、NLRP3 刺激で誘導されるアダプター分子 ASC の重合も複数の KIF1 インヒビター処理で抑制されることを示すデータも得た。以上より KIF11 が NLRC4、NLRP3、NOD2 活性化に関与することが示唆された。

### 3. パイロトーシス細胞が放出する低分子化合物の生理活性の解析

我々は、同一細胞株に由来し、同一刺激でアポトーシスを起こす細胞株とパイロトーシスを起こす細胞株の組み合わせを複数樹立してきた。これらの細胞株を用いてアポトーシスを起こした細胞の培養上清中とパイロトーシスを起こした細胞の培養上清中に含まれる低分子化合物を網羅的に解析した結果、パイロトーシス細胞の培養上清中に選択的に放出される物質 A を同定した。また、パイロトーシス細胞の培養上清中にマクロファージに感染した細胞内リステリアの増殖を抑制する活性を見出した。この活性は 3kD カットオフの限外濾過膜を通過し、熱処理 (95°C、5分) に抵抗性を示した。さらに、物質 A が細胞内リステリア増殖を抑制する活性を示したことから、この物質がパイロトーシス細胞の放出する細胞内リステリア増殖抑制活性の責任分子である可能性が高い。現在、物質 A の細胞内リステリア増殖抑制活性の分子メカニズムを解析している。また、今後、生理的な条件でアポトーシスやパイロトーシスを誘導したマクロファージから物質 A が放出されるか、物質 A が動物レベルでリステリア増殖抑制活性を示すかなどを検討する予定である。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Mahib MR, Hosojima S, Kushiya H, Kinoshita T, Shiroishi T, Suda T, and Tsuchiya K. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid. *Microbiol. Immunol.* 2020, 64(2):143-152.
2. Tsuchiya K, Nakajima S, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, Mahib MR, Yamaguchi Y, Miura M, Kinoshita T, Kushiya H, Sakurai M, Shiroishi T, and Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. *Nat Commun*, 2019, 10:2091.
3. Fang R, Uchiyama R, Sakai S, Hara H, Tsutsui H, Suda T, Mitsuyama M, Kawamura I, and Tsuchiya K. ASC and NLRP3 maintain innate immune homeostasis in the airway through an inflammasome-independent mechanism. *Mucosal Immunol.* 2019, 12:1092-1103

(共同研究)

1. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, Yamamoto S, Imamura R, Takasaki I, Hara H, Sasahara M, Arita M, Hida S, Taniguchi S, Suda T, and Takatsu K. Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J.* 2019, 33:11821-11835.
2. Dodo K, Kuboki E, Shimizu T, Imamura R, Magarisawa M, Takahashi M, Tokuhiko T, Yotsumoto S, Asano K, Nakao S, Terayama N, Suda T, Tanaka M, and Sodeoka M. Development of a Water-Soluble Indolylmaleimide Derivative IM-93 Showing Dual Inhibition of Ferroptosis and NETosis. *ACS Med Chem Lett.* 2019, 10:1272-1278.

総説

1. 須田貴司. パイロトーシスの分子機構と役割. *Dojin Bioscience Series 細胞死 その分子機構、生理機能、病態制御.* 三浦正幸、清水重臣編、第 10 章、97-110 ページ

### < 学会発表 >

1. Tsuchiya K, and Suda T: Pyroptosis enhances antibiotic therapy of listeriosis. The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Sapporo, April 23-25, 2019
2. Saeki A, Tsuchiya K, Suda T, Into T, Hasebe A, Suzuki T and Shibata K: How does the mycoplasmal lipopeptide FSL-1 induce IL-1 $\beta$  release by living macrophages? The 92<sup>nd</sup> Annual Meeting of Japanese Society for Bacteriology, Sapporo, April 23-25, 2019
3. Mahib MR, Tsuchiya K, Hosojima S, Nguyen DT, Hattori T, Le TM, Hori O, and Suda T. Caspase-1 initiates Bid-dependent apoptosis in neurons and mast cells. The 28<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Death Research, Tokyo, July 12-13, 2019

4. Tsuchiya K, Mahib MR, and Suda T. Caspase-1 initiates apoptosis in the absence of gasdermin D. The 17<sup>th</sup> International Congress of Immunology (IUIS2019). Beijing China, Oct 22, 2019
5. 木下 健, 土屋 晃介, 須田 貴司: 自然免疫応答におけるモーター分子 Eg5 の役割. 第 42 回分子生物学会年会, 福岡, 12 月 3-6 日, 2019
6. Tsuchiya K, and Suda T: Gasdermin D mediates IL-1 $\alpha$  maturation during inflammasome formation. The 48<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology, Hamamatsu, December 11-13, 2019

#### <外部資金>

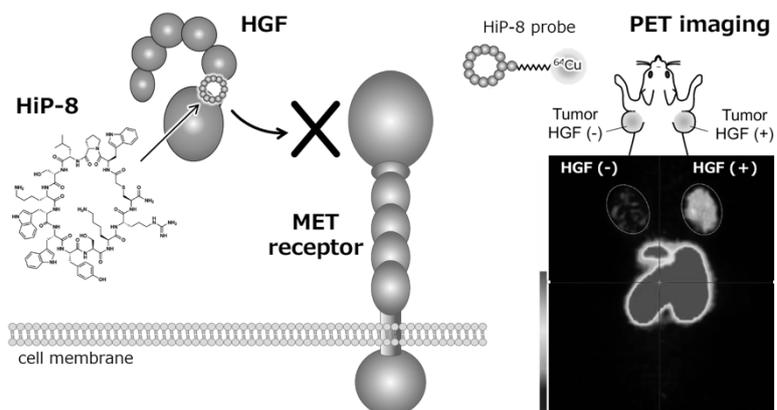
1. 土屋晃介 (研究代表者) 令和元年度 科研費 基盤研究 (C) 「細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法の協調的相互作用から理解する試み」 1,430 千円 (直接経費 : 1,100 千円、間接経費 : 330 千円)
2. 土屋晃介 武田科学振興財団 医学系研究助成 (基礎) 「カスパーゼ-1 による細胞死誘導の分子機序とインフラマソーム関連疾患における役割」 2,000 千円
3. 土屋晃介 琉球大学熱帯生物圏研究センター・2019 年度 共同利用共同研究事業 「肺胞上皮におけるインターロイキン-17F 産生の意義と分子基盤」 250 千円

## Division of Tumor Dynamics and Regulation 腫瘍動態制御研究分野

|                      |  |
|----------------------|--|
| Professor            | Kunio Matsumoto 松本 邦夫  |
| Assistant Professors | Katsuya Sakai 酒井 克也<br>Ryu Imamura 今村 龍<br>Hiroki Sato 佐藤 拓輝 |
| Graduate Student     | Jangphattananont Nawaphat<br>(2019.10 ~ 2020.03 博士研究員)       |
| Assistant Staff      | Yumiko Tahira 田平 裕美子<br>Izumi Hashitani 端谷 泉                 |

### 【Abstract】

HGF (Hepatocyte Growth Factor) and MET receptor as target molecules, our research is focusing on 1) discovery of new physiological function of MET, 2) elucidation of dynamic structural base for MET receptor activation, 3) discovery of cyclic peptides for HGF/MET and application to theranostics (therapeutics and diagnosis by the same molecule). Our research progresses in 2019 are followings. (1) HGF-inhibitory Peptide-8 (HiP-8), a macrocyclic peptide which specifically binds to active two-chain HGF (tcHGF) but not inactive single-chain HGF (scHGF) was identified. HiP-8 could detect tcHGF in cancer patients' tissues and showed an excellent property as a molecular probe for PET diagnosis in cancer model. HGF showed dynamic domain movement in high-speed atomic force microscopy, whereas HiP-8 captured HGF and changed it to be static. HiP-8 seems to be an excellent molecular tool for cancer diagnosis. (2) Localization of tcHGF in the stomach was revealed, by using monoclonal antibody selective for tcHGF. HGF promoted the survival and growth of gastric stem cells, tcHGF and pMET (active MET) localization overlapped with gastric stem cells. The results suggest the importance of tcHGF in the regulation of regeneration and stem cell behavior in the stomach. (3) The significance of MET extracellular mutations are largely unknown. We found that V370D mutation in the MET impairs the functional association with HGF and is therefore a loss-of-function mutation. This mutation changed the dependence of cell growth/survival on signaling molecules, which may promote cancer cell characteristics under certain conditions. (4) MET receptor participates in inflammatory cytokine production and innate immune response upon RNA virus infection independent on its tyrosine kinase activity. MET plays a role in innate immune response upon RNA virus infection. This is new physiological function of MET, which is regulated by non-canonical tyrosine kinase-independent mechanism.



## <2019年の研究成果, 進行状況>

### 1. HiP-8 取得・作用機作・分子イメージング

HGF は前駆体 single-chain HGF (scHGF) として分泌され、がん細胞近傍で活性化 two-chain HGF (tcHGF) に変換される。tcHGF に選択的に結合・阻害する HGF-inhibitory Peptide-8 (HiP-8) を取得した。HiP-8 プローブ ( $^{64}\text{Cu}$ -HiP-8) ならびにヒトがん組織を模倣するヒト HGF ノックインマウスを用いた PET 解析から、HiP-8 は tcHGF ならびに活性化 MET を検出する優れた診断用分子ツールになることを明らかにした。また、高速原子間力顕微鏡 (AFM) 解析により、HiP-8 は HGF のダイナミックな分子動態を強く阻害することを見出した (*Nat Chem Biol*, 2019)。

### 2. tcHGF 生成とがん転移微小環境形成

悪性黒色腫の肺転移モデルを用いて、腫瘍細胞由来因子を介した肺組織血管平滑筋細胞での HGF 産生誘導と scHGF から tcHGF の変換促進、tcHGF の形成・局在に一致する腫瘍細胞の微小転移コロニーの局在を明らかにした。tcHGF の生成は転移性ニッチ形成に重要な役割を果たすと考えられる。

### 3. 胃粘膜恒常性維持や上皮幹細胞制御における tcHGF の役割

scHGF は胃粘膜平滑筋細胞に局在する一方、tcHGF は Lgr5 陽性胃粘膜幹細胞近傍に局在した。また、Lgr5 胃粘膜幹細胞で MET 活性化が認められるとともに HGF はオルガノイド形成を促進したことから、tcHGF の局所的生成を介した MET 活性化は胃粘膜上皮幹細胞の制御に関与することが示唆される (*Int J Mol Sci*, 2019)。

### 4. Non-canonical MET 経路を介した自然免疫制御

(1) RNA ウイルス感染を模倣する 2 本鎖 RNA の細胞内導入により炎症性サイトカイン産生が誘導される自然免疫応答が、MET 欠損で低下すること、(2) 自然免疫応答性は MET 細胞内ドメインが関与するものの MET 受容体チロシンキナーゼ活性に依存しないことを見出した。MET 受容体を介した 2 本鎖 RNA 自然免疫応答は、キナーゼ依存的シグナル経路とは独立であり、MET の新しい生理機能である。

### 5. がん患者で見出された MET 細胞外 SEMA 領域の V370D 変異の解析

MET 受容体の細胞外変異についての機能・意義はほとんど不明である。MET 細胞外 V370D 変異を解析した結果、この変異体は HGF に対する親和性を失った loss-of-function であり、V370D 変異による MET 活性化不全が生存・増殖の代替シグナル依存性に影響し、がん進展に関与する可能性が示唆される (*Cancer Sci*, 2019)。

## <今後の計画>

1. MET 受容体活性化の構造ダイナミクスの研究
2. HiP-8 を分子ツールとするイメージング活用創薬
3. 自然免疫制御における MET の機能に関する研究
4. HGF-MET 系を介したがん転移性ニッチ形成

## 【 研究業績 】

### <論文発表>

原著

(研究室主体)

1. Sakai K, Passioura T<sup>†</sup>, Sato H<sup>†</sup>, Ito K, Furuhashi H, Umitsu M, Takagi J, Kato Y, Mukai H, Warashina S, Zouda M, Watanabe, Yano S, Shibata M, Suga H<sup>§</sup>, Matsumoto K<sup>§</sup>. Macrocyclic peptide-based inhibition and imaging of hepatocyte growth factor. *Nature Chem Biol*, 15: 598-606, 2019. (†equal contribution; §corresponding authors)
2. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Yano S, Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF from its precursor form in developing and repairing stomach. *Int J Mol Sci*, 20: 2944, 2019.
3. Miao W, Sakai K, Sato H, Imamura R, Jangphattananont N, Takagi J, Nishita M, Minami Y, Matsumoto K. Impaired ligand-dependent MET activation caused by an extracellular SEMA domain missense mutation in lung cancer. *Cancer Sci*, 110: 3340-3349, 2019.

(共同研究)

1. Watanabe Y, Nagai Y, Honda H, Okamoto N, Yanagibashi T, Ogasawara M, Yamamoto S, Imamura R, Takasaki I, Hara H, Sasahara M, Arita M, Hida S, Taniguchi S, Suda T, Takatsu K. Bidirectional crosstalk between neutrophils and adipocytes promotes adipose tissue inflammation. *FASEB J*, 33: 11821-11835, 2019.
2. Dodo K, Kuboki E, Shimizu T, Imamura R, Magarisawa M, Takahashi M, Tokuhiko T, Yotsumoto S, Asano K, Nakao S, Terayama N, Suda T, Tanaka M, Sodeoka M. Development of a water-soluble indolylmaleimide derivative IM-93 showing dual inhibition of ferroptosis and NETosis. *ACS Med Chem Lett*, 10: 1272-1278, 2019.

### <総説・著書>

1. Mizutani S, Matsumoto K, Kato Y, Mizutani E, Mizutani H, Shibata K. New insights into human endometrial aminopeptidases in both implantation and menstruation. *Biochim Biophys Acta – Proteins & Proteomics*, 1868, 2019, in press.
2. 佐藤拓輝, 酒井克也, 菅裕明, 松本邦夫. 特殊環状ペプチドによる人工細胞増殖因子・阻害分子の創成と応用. ペプチド創薬の最前線(第22章). シーエムシー出版, 2019.

### <学会発表>

1. 中村希, 岩佐奈実, 川上紗代子, 有森貴夫, 酒井克也, 松本邦夫, 高木淳一. ダイナミックな運動性をもつマルチドメイン蛋白質 HGF の高難度結晶化の試み. 第19回日本蛋白質科学会年会, 2019年6月24日(神戸国際会議場)
2. 酒井克也, 佐藤拓輝, 柴田幹大, 高木淳一, 加藤幸成, 向井英司, 渡辺恭良, 矢野聖二, 菅裕明, 松本邦夫. 環状ペプチドによる HGF 阻害と高速原子間力顕微鏡による分子動態計測. 第92回日本生化学会大会, 2019年9月19日(パシフィコ横浜)

3. Sato H, Sakai K, Passioura T, Imamura R, Mukai H, Watanabe Y, Yano S, Suga H, Matsumoto K. Specific Detection of Active HGF for Diagnosis Reflecting Activation Status of HGF-MET Signaling by Macrocyclic Peptide. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 28 日(京都)
4. 葛西傑, 安本和生, 川島篤弘, 松本邦夫, 矢野聖二, 元雄良治. スキルス胃がん発育進展に特有の CAF が関与する. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 26 日(京都)
5. Nishita M, Matsumoto K, Minami Y. Wnt5a-Ror1 signaling promotes invasion of lung adenocarcinoma cells through Rif-mediated formation of filopodia. 第 78 回日本癌学会総会, 2019 年 9 月 27 日(京都)
6. Mukai H, Warashina S, Sato H, Zouda M, Sakai K, Passioura T, Wada Y, Suga H, Matsumoto K, Watanabe Y. Mature-form hepatocyte growth factor-specific PET imaging in tumor-bearing mice using a macrocyclic peptide probe. World Molecular Imaging Congress. Sept 4 - 7, 2019, Montreal.
7. Nishita M, Kamizaki K, Nishikaku I, Shibuya H, Matsumoto M, Minami Y. Ror1 signaling through Dvl and Rif promotes invasion of lung adenocarcinoma cells. American Society of Cell Biology, Dec 7-11, 2019(ワシントン DC)
8. Tahira Y, Miao W, Sakai K, Sato H, Imamura R, Jangphattananont N, Matsumoto K. 細胞外 SEMA ドメインミスセンス変異に起因するリガンド依存性 MET 活性化の障害. 第 42 回 日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 3 日(福岡)
9. Jangphattananont N, Sato H, Imamura R, Sakai K, Terakado Y, Murakami K, Barker N, Oshima H, Oshima M, Takagi J, Kato Y, Matsumoto K. Distinct localization of mature HGF and precursor form in developing and repairing stomach. 第 42 回 日本分子生物学会年会, 2019 年 12 月 4 日(福岡)

#### <シンポジウム・講演>

1. 松本邦夫. Macrocyclic peptidetargeting HGF and MET. 理化学研究所 生命機能科学研究センターセミナー”Cancer Research and Development Advanced by PET Molecular Imaging” 2019 年 1 月 18 日(神戸).
2. Matsumoto K. Macrocyclic peptide targeting HGF-MET. Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology between SNU-GCRC and KU-CRI. 2019 年 5 月 13 日 (Seoul National University, Korea).
3. Imamura R. Novel biological function of HGF receptor Met in immune response. Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology between SNU-GCRC and KU-CRI. 2019 年 5 月 13 日 (Seoul National University, Korea).
4. 松本邦夫. 金沢大学公開講座「がん研究の基礎. 第 3 回 無限増殖の仕組み - がん分子標的薬誕生の物語. 2019 年 5 月 26 日(金沢大学サテライトプラザ).
5. Matsumoto K. Macrocyclic peptide drug discovery targeting HGF and the receptor. 量子科学技術研究開発機構 関西光科学研究所セミナー. 2019 年 6 月 4 日(関西光科学研究所).
6. Matsumoto K. Macrocyclic Peptides Targeting HGF-MET. 3rd NanoLSI Symposium at UBC in Vancouver - Supramolecular Chemistry and Nanoprobes in Life Sciences. 2019 年 8 月 8 日 (University of British Columbia, Canada).

7. Matsumoto K. SPM application for cancer research. 8th Bio-AFM Summer School. 2019年8月19日(金沢大学).
8. 松本邦夫. 環状ペプチドによる増殖因子制御の創薬. 特殊ペプチドの合成技術と創薬の最新動向. CMC+AndTech FORUM-技術セミナー. 2019年9月4日(東京).
9. Sakai K. Approaches using macrocyclic peptides and atomic force microscopy. International Sessions-7: Cancer medicine created by nano-life science. 78th The Japanese Cancer Association. 2019年9月27日(京都)
10. Matsumoto K. Macrocyclic peptide-based inhibition and nano-imaging of HGF. The 14th International Symposium of the Institute Network for Biomedical Sciences “Frontier in Medical Science and Microbial Diseases”. 2019年10月2日(大阪大学).
11. 松本邦夫. がんを再生をコントロールする分子の話とベンチャーの挑戦. 金沢大学公開講座 ミニ講演. 2019年10月19日(金沢大学サテライトプラザ).
12. 松本邦夫. ゲノム ABC. 北信がんプロ市民公開講座「令和元年 最新のがん医療」2019年10月20日(金沢大学).
13. Matsumoto K. Macrocyclic peptide targeting growth factor and the receptor. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa. Duke-NUS Medical School, Singapore (Duke-NUS) and Kanazawa University Cancer Research Institute (KU-CRI) Joint Symposium. 2019年10月29日(金沢大学).
14. 松本邦夫. 増殖因子受容体制御のナノダイナミック制御と創薬. 大阪大学微生物病研究所 Advanced Seminar Series. 2019年11月1日(大阪大学).
15. 松本邦夫. 環状ペプチド技術と細胞増殖因子研究融合による合成バイオリジクス. 薬物動態懇話会 第42回年会. 2019年11月14日(浜松).
16. 松本邦夫. MET 受容体を制御する高機能環状ペプチドとプロテインエンジニアリング. 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年12月16日(金沢大学).
17. 松本邦夫. 「がんの無限増殖とその生体分子」を観る. 金沢大学公開講座「ナノ生命科学研究所シリーズ: 顕微鏡でみる生命」. 2019年12月22日(金沢大学サテライトプラザ).

#### <外部資金>

1. 松本邦夫: 次世代がん医療創生研究事業 (P-CREATE) 「イメージング活用創薬の視点からの異分野技術融合によるシームレスな薬効評価システムの構築と実施」(分担課題) 「抗 HGF 特殊環状ペプチドのイメージング活用創薬」(分担) 12,038 千円
2. 松本邦夫: 科学研究費補助金 基盤研究 (B) 「高機能環状ペプチド分子技術と融合する転移・薬剤耐性のがん微小環境の研究」(代表) 5,100 千円
3. 佐藤拓輝: 科学研究費補助金 若手研究 「特殊環状ペプチドを診断ツールとする低侵襲的な腫瘍特性解析法の開発」(代表) 1,000 千円

## Division of Tumor Cell Biology and Bioimaging 腫瘍細胞生物学研究分野

Associate Professor            Eishu Hirata 平田 英周  
Assistant Professor            Kojiro Ishibashi 石橋 公二郎  
Technical Assistant            Sayuri Yamagishi 山岸 小百合

### 【 Abstract 】

Lung cancers often metastasize to the brain and present aggressive clinical courses. Epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors show certain effects in the treatment of lung cancers with EGFR mutation, however, the problem of drug resistance still remains to be solved. The treatment strategies become complicated once cancer cells acquire robust drug resistance with additional genetic mutations, therefore we crafted an initiative to target initial resistance rather than acquired resistance to reduce the number of surviving cells, which can be the source of recurrence. Brain metastasis models of PC9 and PC9-BrM3 human lung cancer cells very well respond to gefitinib, an EGFR inhibitor, however, small number of cell survive as minimal residual diseases (MRDs). Intriguingly, we find that the surviving cells have not acquired any intrinsic resistance during the responding phase, suggesting that these cells have been temporally tolerating the drug in the brain microenvironment. We also find that MRDs are surrounded by reactive astrocytes, which are marked with enhanced expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP).

To date, there is no proper system to evaluate cancer cell-astrocyte interaction in vitro because astrocytes lose the original phenotype and plasticity when cultured under conventional conditions. Here we develop a novel system and cultured astrocytes as mixed-glia cells on soft-substrates, where the astrocytes can maintain the plasticity. With this new culture method, we conduct long-term cancer cell-astrocyte co-culture experiments to investigate the mechanisms underlying the drug tolerance against EGFR inhibitors. We identify target molecules in the brain microenvironment to eliminate MRDs to obtain complete cure for lung cancer brain metastasis.

### <2019 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

2019 年 4 月より石橋 公二郎 助教が研究室に加わった。

#### (1) 脳転移休眠がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明

がん脳転移マウスモデルを用いた 1 細胞遺伝子発現解析により、脳微小環境によ

る DNMT1 発現抑制が脳転移がん細胞の生存 (pro-survival) と増殖抑制 (anti-proliferative) の原因となる遺伝子発現を誘導することが明らかとなった。現在、この DNMT1 抑制をトリガーとする脳転移がん細胞のリプログラミングと細胞生存・休眠機構に関する論文を投稿中である。

#### (2) 新規アストロサイト培養法の確立と脳転移がん細胞の薬剤耐性機構の解明

EGFR 変異を有するヒト肺がん細胞株 PC9 および PC9-BrM3 の脳転移巣は EGFR 阻害剤 (ゲフィチニブ) に良好に応答するが、がん細胞は完全には消失しておらず脳組織内に散在する形で微小残存病変 (MRD) を形成する。治療応答段階にある MRD は内因性の薬剤耐性を一切獲得しておらず、脳微小環境によって一時的に薬剤寛容を享受していることが示唆された。この耐性機構を明らかにすべく、これまで困難であったグリア細胞の安定的な長期培養法の確立に成功した。現在、MRD を駆逐しうる微小環境標的分子を同定すべく、新規 in vitro 共培養系を用いた機能解析を行っている。

#### (3) がん脳転移微小環境分子基盤の統合的理解

これまでの研究により、活性化アストロサイトにはがん促進性とがん抑制性の性質を有するものが混在していることを示唆するデータを得た。がん脳転移成立に関わる微小環境分子基盤の統合的理解に向け、現在、脳転移微小環境を構成する細胞群の 1 細胞遺伝子発現解析および薬剤スクリーニングによるアストロサイト・ミクログリアの機能変容解析を行っている。

#### (4) カルボン酸系双性イオン液体の細胞培養への応用

金沢大学理工研究域生命理工学系 黒田 浩介 博士との共同研究により、細胞培養研究において dimethyl sulfoxide (DMSO) の欠点を補いうる新たな溶媒として、ヒスチジン様構造を持つカルボン酸系双性イオン液体の可能性を見出した。現在、同イオン液体の細胞培養への応用に関する論文を投稿中である。

上記の他、金沢大学ナノ生命科学研究所 福間 剛士 博士及び柴田 幹大 博士との共同研究として (5) FRET バイオセンサーの合理的設計手法の開発に関する研究を、京都大学複合原子力科学研究所・近藤夏子博士との共同研究として (6) グリオブラストーマ治療におけるホウ素中性子捕捉療法 (Boron neutron capture therapy : BNCT) 耐性機構に関する研究を、ダブリン大学・Yan Yan 博士およびシンガポール国立大学・Chwee Ming Lim 博士との国際共同研究として (7) ネオアンチゲン搭載型がんナノワクチン療法の開発に関する研究をそれぞれ進めている。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

(共同研究)

1. Wang R, Yamada T, Arai S, Fukuda K, Taniguchi H, Tanimoto A, Nishiyama A, Takeuchi S, Yamashita K, Ohtsubo K, Matsui J, Onoda N, **Hirata E**, Taira S, Yano S. Distribution and activity of lenvatinib in brain tumor models of human anaplastic thyroid cancer cells in severe combined immune deficient mice. *Molecular Cancer Therapeutics*. 18(5):947-956, 2019.

著書・総説

1. **Hirata E** and Kiyokawa E. ERK activity imaging during migration of living cells in vitro and in vivo. *International Journal of Molecular Sciences*. 5;20(3). pii: E679. doi: 10.3390/ijms20030679, 2019.

2. 近藤 夏子、**平田 英周** がん生物学イラストレイテッド 第2版「第9章 6. 脳腫瘍」(編集 渋谷 正史・湯浅 保仁) 483-492 頁 羊土社 (2019)

### < 学会発表 >

(招待講演)

1. **Hirata E**. “Unravel the mysteries of cancer cell dormancy in brain metastasis” The 17th Stem Cell Research Symposium (Awaji, 24-25 May 2019)
2. **平田 英周** 「脳転移がん細胞の休眠維持・破綻機構の解明」アステラス病態代謝研究会 竹中奨励賞受賞講演 (東京 2019年10月19日)

(その他)

1. **平田 英周** 「脳転移休眠がん細胞の謎を解く」 第1回日本医学会連合リトリート (木更津 2019年3月4-5日)
2. **Hirata E**. “DNMT1 suppression and epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells” Joint Symposium on Tumor Microenvironment and Precision Oncology (Seoul, 12-15 May 2019)
3. **Hirata E**. “Epigenetic reprogramming induced by brain microenvironment determines the fate of brain metastatic cancer cells” The 9th KUCRI-FUSCC Joint Symposium (Kanazawa, 3 Sep, 2019)

4. 石橋 公二郎 「脳転移におけるがん抑制性・促進性アストロサイトの同定」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（大阪 2019年10月2-3日）
5. 石橋 公二郎 「転移性脳腫瘍におけるがん抑制性・促進性アストロサイトの制御メカニズム」 NanoLSI 公開セミナー（金沢 2019年11月5日）

#### <知的財産>

特願 2019-90509 「非プロトン性双性イオンを用いた未分化促進剤及び凍結保護剤」  
黒田 浩介、平田 英周

#### <その他>

（セミナー開催）

第1回腫瘍細胞生物学セミナー「発がん細胞競合」東京理科大学 昆 俊亮 先生  
第2回腫瘍細胞生物学セミナー「Mechanism of cancer progression triggered by tissue stiffness」北海道大学 石原 誠一郎 先生

（受賞）

第1回日本医学会連合リトリート・優秀発表賞 [平田 英周]（木更津 2019年3月5日）

#### <外部資金>

1. 基盤研究（C）[研究代表者：平田 英周]  
「脳転移肺がん細胞の薬剤応答と初期耐性のキネティクス解析に基づく新規治療法の開発」 1,950 千円
2. 基盤研究（C）[研究分担者：平田 英周]  
「リプログラミング技術による非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍のエピゲノム解析と治療開発」 65 千円
3. AMED 次世代がん医療創生研究事業 [研究代表者：平田 英周]  
「アストロサイトを標的としたがん脳転移根治療法の開発」 13,000 千円
4. 内藤記念科学奨励金・研究助成 [研究代表者：平田 英周]  
「アストロサイトを標的としたがん脳転移根治療法の開発」 3,000 千円
5. MSD 生命科学財団研究助成・がん領域 [研究代表者：平田 英周]  
「脳転移におけるがん促進性・抑制性アストロサイトの同定」 1,500 千円
6. 研究活動スタート支援 [研究代表者：石橋 公二郎]  
「がん脳転移関連アストロサイトの制御機構の解明」 1,430 千円