

がん分子標的探索プログラム

Division of Molecular Cell Signaling

シグナル伝達研究分野

Professor	Katsuji Yoshioka 善岡 克次
Assistant Professor	I Ketut Gunarta (2019.5.1～)
Graduate Student	Dewi Yuliana (D4), Jambaldej Boldbaatar (D4), Ryusuke Suzuki 鈴木 隆介 (D3), Purvee Erdenebaatar (D3), Ravdandorj Odongoo (D2)
Assistant Staff	Hisayo Inotani 猪谷 久世

【 Abstract 】

We have been studying intracellular trafficking of proteins and organelles, and chromosomal stability, focusing on the MAP kinase (MAPK) signaling scaffold proteins, JSAP1 and JSAP2. In recent years, JSAP2 has been identified as a candidate biomarker for cancer. Increasing evidence indicates that curcumin, a commonly used natural product for antitumor therapy, induces autophagy, MAPK pathway activation, and reactive oxygen species (ROS)-mediated cell death. We explored the role of JSAP2 in curcumin-induced cancer cell death, and found that *JSAP2* knockdown (KD) increases cell death and intracellular ROS levels. Furthermore, *JSAP2* KD impaired lysosomal accumulation around perinuclear regions, which led to the inhibition of autophagosome–lysosome fusion, and attenuated p38 MAPK activation in curcumin-treated cells. The decreases in cell viability and p38 MAPK activation were reversed by expressing wild-type JSAP2 but not a JSAP2 mutant lacking the p38 MAPK-binding domain. In addition, the inactivation of a key gene involved in autophagy increased sensitivity to curcumin-induced cell death. Collectively, these results suggest that JSAP2 mediates the induction of autophagy by regulating lysosomal positioning and p38 MAPK signaling, indicating an overall protective role in curcumin-induced ROS-mediated cancer cell death (Boldbaatar and Gunarta *et al.* BBRC, *in press*).

Chromosome segregation is one important step during mitosis, and errors in this process could lead to abnormal cell division and chromosomal instability, which are frequently observed in cancer cells. In addition, JSAP2 has been reported to interact with PLK1, a key mitotic kinase. To date, however, the role of JSAP in mitosis remains largely unknown. We are attempting to clarify the functions of JSAP1 and JSAP2, using conditional knockout mouse embryonic fibroblasts and mice, and normal human diploid cell line hTERT-RPE-1. Our results may suggest that JSAP1 and JSAP2 are critical and functionally redundant in mitotic chromosome segregation.

<2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. クルクミン誘導性細胞死における JSAP2 の役割とその分子メカニズム

クルクミンはウコンの主要成分であり、抗腫瘍活性を示すことが知られている。またクルクミンは、オートファジーの誘導や MAP キナーゼ (MAPK) 細胞内情報伝達経路の活性化、及び活性酸素 (ROS) を介した細胞死に関与するとの知見も得られている。しかし、クルクミン誘導性のがん細胞死について、その分子メカニズムの詳細は不明である。JSAP2 ノックダウン (KD) 細胞 (HeLa, HCT116 細胞など) の解析、及び野生型あるいは変異型 (p38 MAPK との結合能を欠く) JSAP2 を用いたレスキュー実験を行い、JSAP2-p38 MAPK 経路はクルクミン誘導性細胞死に対して抑制的に働くことを明らかにした。また、JSAP2 KD 細胞では ROS レベルが有意に高く、JSAP2 KD によるクルクミン誘導性細胞死の亢進は、抗酸化剤 NAC によってほぼ完全に抑制されることを見出した。さらに、2種類の蛍光タンパク質 (赤色蛍光タンパク質 mRFP, 緑色蛍光タンパク質 GFP) と LC3 (オートファジーマーカー) の融合タンパク質 mRFP-GFP-LC3 を用いて、クルクミン誘導性オートファジーの解析を行った。その結果、JSAP2 KD 細胞では、クルクミンに応答したリソソームの核周辺への集積が認められず、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害されることを明らかにした。以上の結果から、JSAP2 はオートファジーと p38 MAPK 経路を制御することにより、クルクミン誘導性の ROS を介したがん細胞死を抑制すると考えられる (Boldbaatar *et al*, BBRC, *in press*)。

2. JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御

今年度、我々は、リソソームの細胞内局在に焦点を当てた研究を行い、JSAP2 がリソソーム細胞内局在の新規制御因子として働くことを強く示唆する結果を得た。今後、より詳細な解析を行い、JSAP2 によるリソソームの細胞内局在制御機構を分子レベルで明らかにする。

3. 染色体安定性における JSAP の機能解析

我々は、これまでに、*Jsap1, 2* 二重破壊が誘導可能なマウス胚性線維芽細胞 (MEF) を解析し、JSAP は染色体分配制御に関わる重要な因子であり、JSAP 機能喪失は染色体不安定性を誘導することを示唆する結果を得ている。今年度は、ヒト不死化 RPE-1 細胞 (正常二倍体の染色体数を持つ) についての解析を行った。その結果、*JSAP1, 2* ダブル KD 細胞では、増殖阻害が誘導されることを見出した。また、細胞老化マーカーである酸性 β ガラクトシダーゼ陽性細胞も検出された。異数性が高い細胞は増殖阻害を示すことが知られており、今回得られた結果から、*JSAP1, 2* ダブル KD によって染色体不安定性が誘発された可能性が考えられる。今後、さらに解析を進め、染色体安定性における JSAP の役割とその分子メカニズムを明らかにする。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Boldbaatar J, Gunarta IK, Suzuki R, Erdenebaatar P, Davaakhuu G, Hohjoh H, Yoshioka K. Protective role of c-Jun NH₂-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in curcumin-induced cancer cell death *Biochem Biophys Res Commun*. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.11.154 (in press)
2. Suzuki R, Gunarta IK, Boldbaatar J, Erdenebaatar P, Odongoo R, Yoshioka K. Functional role of c-Jun NH₂-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in lysosome localization and autophagy. *Drug Discov Ther*. doi: 10.5582/ddt.2020.01001 (in press)

< 学会発表 >

1. Gunarta IK. Protective role of JLP-dependent lysosome positioning in reactive oxygen species (ROS)-induced cell death. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2019, 2019年10月29日, 金沢
2. Suzuki R, Yoshioka K. Functional role of JLP in lysosomal positioning. 第42回日本分子生物学会年会, 2019年12月3日, 福岡
3. Gunarta IK, Boldbaatar J, Erdenebaatar P, Suzuki R, Yoshioka K. Role of JLP in reactive oxygen species (ROS)-induced cell death and lysosome positioning. 第42回日本分子生物学会年会, 2019年12月4日, 福岡

< 外部資金 >

1. 科学研究費補助金 若手研究 (B) (研究代表者: I Ketut Gunarta) “Role of kinesin/dynein adaptor JSAP in reactive oxygen species-induced cell death and lysosome positioning” 1,100 千円

Division of Translational and Clinical Oncology

腫瘍制御研究分野

Professor	Toshinari Minamoto 源 利成
Assistant Professor	Takahiro Domoto 堂本貴寛
Postdoctoral Researcher	Ilya V. Pyko ピコ イリア(～2019年8月)
Research Fellow	Kenkei Hasatani 波佐谷兼慶(研究生, 2019年7月～)
Graduate Student	Dilireba Bolidong(D4), Hiroyoshi Nakanishi 中西宏佳(D3), Masahiro Uehara 上原将大(D3), Ryosuke Ota 太田亮介(D2), Yasuto Tomita 富田泰斗(金沢医科大学一般・消化器外科学, ～2019年3月), Kensaku Abe 阿部健作(整形外科学), Satoshi Takenaka 竹中 哲(消化器・腫瘍・再生外科学)
MRT* Program Student	Shuhei Morita 守田周平, Takashi Ishida 石田 岳(2018.12.～)
Assistant Staff	Atsuko Asaka 浅香敦子, Naoko Abe 阿部尚子(組織バンク)

*MRT: Medical research training

【 Abstract 】

The mission of our division centers on laboratory and clinical research to develop the novel strategies and modalities for diagnosis and treatment of the gastrointestinal, refractory and rare cancers including glioblastoma, bone and soft tissue sarcomas. Research projects are based on biological characteristics of individual tumor types that are relevant to their invasive and metastatic potential, resistance to therapy, recurrence and outcome of patients. Our current efforts are focused on (1) research and development of the cancer therapy by targeting aberrant glycogen synthase kinase (GSK) 3 β ; (2) understanding of malignant phenotypes of cancer by investigating pathological metabolic properties (eg., aerobic glycolysis, tumor-promoting autophagy); and (3) biological basis of gastrointestinal and refractory cancers for clinical translation. We have been also establishing the tissue material resources of human stomach and colorectal cancer for our own projects described above as well as for studies collaborating with our institutional and many other research groups. In an immediate couple of years, we have obtained the preliminary results indicating the putative roles of tumor GSK3 β as a molecular hub that connects the pathways responsible for tumor invasion and resistance to therapy, thus enforcing its potential as a major cancer therapeutic target. We are extending this project toward investigation of the putative roles for GSK3 β in promoting esophageal squamous cell carcinoma (ESCC; the major type of esophageal cancer in Asia and Japan) and pancreatic neuroendocrine neoplasms as well as in acquiring chemoresistance in pancreatic cancer. We also have been trying to develop cellular and mouse models predisposing to ESCC by CRISPR-Cas9-based genome editing of the metabolic enzymes including glycogen synthase and GSK3 β .

<2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. glycogen synthase kinase (GSK) 3 β 阻害によるがん治療法の研究、開発

Wnt 経路抑制因子と認識されている GSK3 β が固有の分子経路を介して、がんの悪性形質を推進することを系統的に示してきた。そして、GSK3 β 阻害の強力で特異的ながん治療効果を細胞レベルと担がん動物で実証した。また、学内外の外科系を中心とするグループと連携し、膵がん、膠芽腫や骨軟部肉腫などの難治、希少がんで高活性を示す GSK3 β が、高度の腫瘍浸潤性と治療(抗がん剤、放射線)不応性の悪性形質を連結することを見出した。一連の研究をもとに、GSK3 β 阻害薬品の転用と抗がん剤を併用するがん治療法を開発し、再発膠芽腫(附属病院脳神経外科)と進行膵がん(金沢医科大学病院)を対象とする医師主導臨床研究によりその安全性と抗腫瘍効果を検証した。現在、GSK3 β ががんの根源的特性である糖代謝改変と核分裂機構に共通の促進機能を示すことを示唆する予備成果を得ている。また、GSK3 β のがん促進理論の強化のため、その機能解析を患者由来膠芽腫スフェア(幹細胞)、食道扁平上皮がん、ラット食道発がんモデル、抗がん剤耐性獲得膵がんや整形外科領域の軟部肉腫を対象に進め、2019年は膵内分泌腫瘍(PNET)の共同研究を開始した。

2. がんの代謝特性にもとづく悪性形質の解析研究

GSK3 β は糖代謝の初期段階でグリコーゲン代謝を制御するという観点から、がん固有の糖代謝改変(Warburg 効果)に関わる触媒酵素やがん促進性自食作用に対する GSK3 β の機能解析を進めている。とくに、特定の間代謝産物が解糖経路と自食作用の接点になるという最近の報告をもとに、これらの代謝経路における GSK3 β の機能を統合的に明らかにすることを目的とする。これとはべつに、食道の扁平上皮発がん初期の生物学的特性は細胞内グリコーゲンの減少、消失である。この点に鑑み、患者由来の正常食道扁平上皮細胞とマウスを対象に、グリコーゲン合成酵素と GSK3 β のゲノム編集による食道扁平上皮発がん状態の誘発を試みる研究を2018年に開始し、現在、目的の改変マウスが得られる見込みである。

3. ヒト消化管がん組織バンクを中心とする大腸がんの分子病理学的研究

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、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て現在に至っている。この組織資源の共同利用を促進するために、日本医療研究開発機構ゲノム医療支援ポータルサイト(<http://www.biobank.amed.go.jp/biobank/index.html>)に情報公開した。共同研究者:竹田 扇教授ら(山梨大学)が開発した大気圧イオン化法-質量分析を用いて2014年より、大腸がん迅速診断法開発の基礎検討を開始した。大腸組織検体の質量分析パターンをもとに特有の統計解析と機械学習を組合わせて非がん/がんの判別(診断)アルゴリズムを構築し、90%以上の感度と特異度による判別を可能にした(論文作成予定)。現在、解析症例/検体数を増やすとともに、島津製作所基盤技術研究所と本学消化器外科学と共同で、大腸がんの質量分析-内視鏡診断法を目指して、内視鏡デバイスを考案し、開発に着手した。

【 研究業績 】

[註] 下線は研究室メンバー, 研究生と研究協力員

< 発表論文 >

原著

1. Abe K*, Yamamoto N, Domoto T*, Bolidong D, Hayashi K, Takeuchi A, Miwa S, Inatani H, Aoki Y, Higuchi T, Taniguchi Y, Yonezawa H, Aiba H, Araki Y, Minamoto T, Tsuchiya H. Glycogen synthase kinase 3 β as a potential therapeutic target in synovial and fibrosarcoma. *Cancer Sci*, in press. doi: 10.1111/CAS.14271
2. Niikura R, Nagata N, Yamada A, Honda T, Hasatani K, Isii N, Shiratori Y, Doyama H, Nishida T, Sumiyoshi T, Fujita T, Kiyotoki S, Yada T, Yamamoto K, Shinozaki T, Tanaka M, Mikami K, Hara K, Fujishiro M, Koike K. Efficacy and safety of early versus elective colonoscopy for acute lower gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology* 2019 Sep 26 doi: 10.1053/j.gastro.2019.09.010. Epub ahead of print
3. Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Jiakang Z, Guangtao Z, 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 (1): 10049, 2019. doi: 10.1038/s41598-019-46454-8.
4. Kobayashi S, Hiwasa T, Ishige T, Rahmutulla B, Kano M, Hoshino T, Minamoto T, Shimada H, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Anti-FIR Δ exon2, a splicing variant form of PFU60, autoantibody is detected in the sera of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 110 (6): 2004-13, 2019. doi: 10.1111/cas.14024. Epub 2019 May 20.
5. Hasatani K, Tamamura H, Yamamoto K, Aoyagi H, Miyanaga T, Kaizaki Y, Sawada T. Efficacy of endoscopic evaluation of acute radiation esophagitis during chemoradiotherapy with proton beam therapy boost for esophageal cancer. *Digestion* 2019 May 8.1-9. doi: 10.1159/000500039. Epub ahead of print
6. Ikehara H, Doyama H, Nakanishi H, Hatta W, Gotoda T, Ishikawa H, Yao K. Analysis of factors related to poor outcome after e-learning training in endoscopic diagnosis of early gastric cancer using magnifying narrow-band imaging. *Gastrointest Endosc* 90 (3): 440-7, 2019. doi: 10.1016/j.gie.2019.04.230. Epub 2019 Apr 26.
7. Echizen K, Horiuchi K, Aoki Y, Yamada Y, Minamoto T, Oshima H, Oshima M. NF- κ B-induced NOX1 activation promotes gastric tumorigenesis through the expansion of SOX2-positive epithelial cells. *Oncogene* 38 (22): 4250-63, 2019. doi: 10.1038/s41388-019-0702-

0. Epub 2019 Jan 30.

8. Han TS, Voon DCC, Oshima H, Makayama M, Echizen K, Sakai E, Murakami K, Yu L, Minamoto T, Jenkins BJ, Yang HK, Oshima M. MicroRNA-135b acts downstream of interleukin-1 signaling during inflammation-associated gastric carcinogenesis. *Gastroenterology* 156 (4): 1140-55.e4, 2019. doi: 10.1053/j.gastro.2018.11.059. Epub 2018 Nov 30.
9. Kitamura H, Takemura H, Minamoto T. Tumor p16^{INK4} gene expression and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 41(2): 1367-76, 2019. doi: 10.3892/or.2018.6884. Epub 2018 Nov 26.

<学会発表>

1. Kensaku Abe, Norio Yamamoto, Takahiro Domoto, Katsuhiko Hayashi, Akihiko Takeuchi, Shinji Miwa, Kentaro Igarashi, Takashi Higuchi, Yuta Taniguchi, Hiroataka Yonezawa, Yoshihiro Araki, Toshinari Minamoto, Hiroyuki Tsuchiya. Glycogen synthase kinase-3 β is a new therapeutic target in soft tissue sarcoma: a basic research. American Academy of Orthopaedic Surgeons (AAOS) Annual Meeting 2019, Mar 12 (Wed)-16 (Sat), 2019, Sands Expo Convention Center, Las Vegas, Nevada, U. S. A.
2. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. 病理組織学的に水平断端判定不能であった食道扁平上皮癌 ESD 症例の検討. 第 105 回日本消化器病学会総会, 2019 年 5 月 9 日(木) - 11 日(土), 石川県立音楽堂ほか, 金沢市.
3. 吉村健太郎, Chen Lee Chuin, 二宮 啓, 城野悠志, 堂本貴寛, 源 利成, 竹田 扇. 質量分析内視鏡がん診断システムの開発. 日本質量分析学会 第 67 回質量分析総合討論会, 2019 年 5 月 15 日(水) - 17 日(金), つくば国際会議場, つくば市.
4. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. Narrow band imaging 併用拡大内視鏡を用いた日常診療における表在型食道扁平上皮癌発見割合の検討. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会, 2019 年 5 月 31 日(金) - 6 月 2 日(日), グランドプリンスホテル新高輪/国際館パミール, 東京.
5. 波佐谷兼慶, 青柳裕之, 海崎泰治. 早期胃癌のNBI併用拡大内視鏡観察における組織学的構築と組織型診断の検討. 第 97 回日本消化器内視鏡学会総会: シンポジウム 1-2: 消化管の拡大内視鏡診断の最新の知見 胃, 2019 年 5 月 31 日(金) - 6 月 2 日(日), グランドプリンスホテル新高輪/国際館パミール, 東京.

6. 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 竹内 修, 太田哲生, 源 利成. 膵がん細胞の薬剤耐性化に伴うがん悪性形質と GSK3 β の病理作用. 第 28 回日本癌病態治療研究会:ワークショップ 1-2 がん治療抵抗性の克服:基礎と臨床, 2019 年 6 月 27 日(木), 28 日(金), ウェスタ川越, 川越市.
7. 小泉恵太, 堂本貴寛, 中尾啓子, 源 利成, 中島日出夫. heat shock protein, Fam107B は GSK3 β を介して大腸がん細胞の遊走性を抑制する. 第 28 回日本癌病態治療研究会, 2019 年 6 月 27 日(木), 28 日(金), ウェスタ川越, 川越市.
8. 島崎猛夫, 山本聡子, 林 祐一, 松尾洋一, 源 利成. 膵がん細胞の抗がん剤によるエクソソーム動態変化の解析. 第 50 回日本膵臓学会大会, 2019 年 7 月 12 日(金), 13 日(土), グランドニッコー東京 台場, 東京.
9. 堂本貴寛, 竹中 哲, 宮下知治, 上原将大, 太田哲生, 源 利成. 膵がん細胞のゲムシタビン耐性化において GSK3 β は幹細胞性と浸潤能を増強する. 第 28 回日本がん転移学会学術集会・総会, 2019 年 7 月 25 日(木), 26 日(金), 城山ホテル鹿児島, 鹿児島市.
10. 小泉恵太, 堂本貴寛, 中尾啓子, 源 利成, 中島日出夫. がん温熱療法における Fam107B heat shock protein の機能解析. 日本ハイパーサーミア学会第 36 回大会, 2019 年 9 月 5 日(木)–7 日(土), ウェスタ川越, 川越市.
11. 伊賀祥紘, 岩嶋由紀, 小林亜希子, 安田武嗣, 源 利成, 羽澤勝治, Richard Wong. NUP88 は Nbs1 の核内移行制御を介して相同組み換え修復を活性化する. 2019 年度若手放射線生物学研究会 専門研究会, 2019 年 9 月 7 日(土), 8 日(日), 量子科学技術研究開発機構 放射線医学総合研究所, 千葉市.
12. Takahiro Domoto, Tomoharu Miyashita, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK)3 β links tumor stemness, invasion and acquisition of drug resistance in pancreatic cancer. 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, 太田哲夫, 源 利成. GSK3 β は膵がんの幹細胞性, 浸潤能, 薬剤耐性獲得にそれぞれ関連する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日(木)–28 日(土), 国立京都国際会館, 京都市.
13. Ilya V. Pyko, Takahiro Domoto, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Therapeutic interaction of mesenchymal stem cells with glioblastoma cells by glycogen synthase kinase (GSK)3 β inhibition. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日(木)–28 日(土), 国立京都国際会館, 京都市.

14. Dilireba Bolidong, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Ilya V. Pyko, Tomoharu Miyashita, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Effect of targeting GSK3 β against esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) inducing cell cycle arrest and apoptosis. ディリラバ ボリドン, 堂本貴寛, 上原将大, 奥村知之, 遠藤良夫, イリア ピコ, 宮下知治, 中田光俊, 源 利成. 食道扁平上皮がんの GSK3 β 阻害は細胞周期停止とアポトーシスを誘導する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
15. Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Diliraba Bolidong, Ilya V. Pyko, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Pancreatic cancer depends on aberrant glycogen synthase kinase (GSK)-3 β for acquiring resistance to gemcitabine (GEM). 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ボリドン, ピコ イリア, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. 膵がんのゲムシタビン獲得耐性は glycogen synthase kinase (GSK)-3 β に依存する. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
16. Satoko Yamamoto, Yoichi Matsuo, Yuichi Hayashi, Toshinari Minamoto, Takeo Shimasaki. Influence of gemcitabine on secretion from and surface marker expression of exosomes in pancreatic cancer cells. 山本聡子, 松尾洋一, 林 祐一, 源 利成, 島崎猛夫. 抗がん剤ゲムシタビンによる膵がん細胞のエクソソーム分泌及びエクソソーム表面マーカーへの影響. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
17. Takeshi Sawada, Ryosuke Ota, Hiromu Suzuki, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Hiroyoshi Nakanishi, Eiichiro Yamamoto, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Yasushi Sasaki, Toshinari Minamoto. Methylation analysis of non-ampullary duodenal precancerous and cancerous lesions. 澤田 武, 太田亮介, 鈴木 拓, 津山 翔, 八尾隆史, 中西宏佳, 山本英一郎, 久保田英嗣, 片岡洋望, 佐々木泰史, 源 利成. 非乳頭十二指腸腫瘍における DNA メチル化解析. 第 78 回日本癌学会学術総会, 2019 年 9 月 26 日 (木) – 28 日 (土), 国立京都国際会館, 京都市.
18. Ryosuke Ota, Takeshi Sawada, Hiromu Suzuki, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Eiichiro Yamamoto, Hiroyoshi Nakanishi, Shigetsugu Tsuji, Naohiro Yoshida, Hisashi Doyama, Hiroshi Minato, Kenkei Hasatani, Yasuharu Kaizaki, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Yasushi Sasaki, Toshinari Minamoto. Methylation analysis of non-ampullary duodenal precancerous lesions. 27th United European Gastroenterology (UEG) Week 2019, October 19 (Sat) – 23 (Wed), 2019, Fira Gran Via, Barcelona, Spain.

19. 島崎猛夫, 山本聡子, 林 祐一, 松尾洋一, 源 利成. 膵癌細胞エクソソームの抗がん剤による動態変化とその生物学的意義. 第 30 回日本消化器癌発生学会総会:ワークショップ3. 癌遺伝子・リキッドバイオプシー, 2019 年 11 月 7 日(木), 8 日(金), ホテルメルパルク横浜, 横浜市.
20. 澤田 武, 太田亮介, 鈴木 拓, 津山 翔, 八尾隆史, 中西宏佳, 波佐谷兼慶, 海崎泰治, 吉田尚弘, 辻 重継, 土山寿志, 湊 宏, 山本英一郎, 久保田英嗣, 片岡洋望, 佐々木泰史, 源 利成. 十二指腸非乳頭部腫瘍における遺伝子メチル化と変異解析. 第 30 回日本消化器癌発生学会総会:ワークショップ4. ゲノム・エピゲノム解析とプレシジョン医学, 2019 年 11 月 7 日(木), 8 日(金), ホテルメルパルク横浜, 横浜市.
21. 中西宏佳, 竹村健一, 土山寿志. 高齢者に対する食道扁平上皮癌 ESD の治療成績と予後の検討. JDDW 2019/第 27 回日本消化器関連学会週間, 2019 年 11 月 21 日(木) - 24 日(日), 神戸コンベンションセンター, 神戸市.

<学会開催>

第 49 回日本消化器がん検診学会東海北陸地方会, 2019 年 11 月 30 日(土), 石川県文教会館, 金沢市.

<外部資金> 2019 年が含まれる課題. 下線は研究室メンバーと研究協力員

1. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 課題番号 19H03727
源 利成(代表), Richard Wong, 宮下知治(分担)
課題: 大腸がんの糖代謝改変と細胞核分裂機構を繋ぐ分子経路の解明とがん制御法開発への応用
研究経費: 17,420,000 円(直接経費 13,400,000 円, 間接経費 4,020,000 円)
2. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K07710
堂本貴寛(代表)
課題: GSK3 β によるがん促進的糖代謝特性の解明と制御への応用
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
3. 2019 年 - 2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08367
太田亮介(代表), 澤田 武, 源 利成, ほか(分担)
課題: RNA シーケンスによる大腸鋸歯状腺腫の発癌機構の解明と分子標的治療の基盤確立
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)

4. 2019 年－2021 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 19K08463
澤田 武(代表), 太田亮介, ほか(分担)
課題: 表在性非乳頭部十二指腸腫瘍の発癌機構の解明と, 進展を予測する内視鏡診断体系の確立
研究経費: 4,420,000 円(直接経費 3,400,000 円, 間接経費 1,020,000 円)
5. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金(挑戦的研究 萌芽): 課題番号 18K19577
源 利成(代表), 大黒多希子, ほか(分担)
課題: 代謝酵素ゲノム編集による食道扁平上皮の易発がん状態誘発の試み
研究経費: 6,240,000 円
6. 2018 年－2019 年度 科学研究費補助金(若手研究): 課題番号 18K16553
ピコ イリア(Ilya V. Pyko) (代表)
課題: Investigation of putative roles for GSK3 β in glioblastoma stemness phenotype and the underlying biological mechanisms
研究経費: 4,160,000 円
7. 2018 年－2020 年度 科学研究費補助金(基盤研究C): 課題番号 18K07983
島崎猛夫(代表), 源 利成(連携), ほか
課題: 膵がん細胞の exosome を介した浸潤性伝播の解明とその抑制剤の開発
研究経費: 4,420,000 円
8. 2017 年－2019 年度 科学研究費補助金(基盤研究C): 課題番号 17K08655
Richard Wong(代表), 源 利成(連携), ほか
課題: 核膜孔タンパク質とクロマチン相互作用による大腸がんの病態解明
研究経費: 3,700,000 円

Division of Functional Genomics 機能ゲノミクス研究分野

Professor	Takeshi Suzuki 鈴木 健之
Assistant Professor	Akihiko Ishimura 石村 昭彦, Minoru Terashima 寺島 農
Graduate Student	Sasithorn Wanna-Udom (D3) Hanbing Lyu (D1) Gerelsuren Batbayar (D1) Hyuga Ajichi (M1) 按察日向
Assistant Staff	Atsuko Odawara 小田原 敦子

【 Abstract 】

We have been studying the function of epigenetic regulators such as histone methyl-modifying enzymes and long noncoding RNAs (lncRNAs) in the various steps of the malignant progression of cancer. This year we investigated the role of an RNA methyltransferase METTL3, another type of epigenetic regulators, during TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of lung cancer cells. N6-Methyladenosine (m6A) is the most common internal chemical modification of mRNAs and lncRNAs involved in many pathological processes including various cancers. The m6A RNA modification and the expression of its catalytic enzyme, METTL3, were increased in TGF- β -induced EMT process. Knockdown of METTL3 inhibited TGF- β -induced morphological conversion of the cells, enhanced cell migration potential and the expression changes of EMT-related marker genes such as CDH1/E-cadherin, FN1/Fibronectin and VIM/Vimentin. Mechanistic investigations revealed that METTL3 knockdown decreased the m6A modification, total mRNA level and mRNA stability of JUNB, one of the important transcriptional regulators of EMT. Over-expression of JUNB partially rescued the inhibitory effects of METTL3 knockdown in the EMT phenotypes. This study demonstrates that m6A methyltransferase METTL3 is indispensable for TGF- β -induced EMT of lung cancer cells through the regulation of JUNB. Our findings validated the significance of the regulation for m6A RNA modification in the important step of cancer progression and provided the possibility to develop novel therapeutic strategies for the treatment of cancer metastasis.

<2019 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

1. がん細胞の EMT における RNA メチル化酵素 METTL3 の役割

RNA の A 塩基のメチル化修飾である m6A 修飾は, RNA の安定性や翻訳効率に影響を与え, 個体発生, 細胞分化, エネルギー代謝など多くの生命現象に関与する新しいカテゴリーのエピジェネティック制御である。今年度は, 肺がん細胞の EMT において, m6A 修飾を担う METTL3 酵素が重要な役割を果たすことを見出した。TGF- β 誘導 EMT の過程で, RNA の m6A 修飾と METTL3 の発現は有意に増加する。METTL3 の発現をノックダウンすると, TGF- β による EMT の進行や, 細胞の運動性の上昇がほぼ完全にブロックされ, これは EMT 進行に必要な遺伝子発現プログラムが阻害されることが原因と示唆された。そこで, METTL3 酵素によって m6A 修飾を受ける標的遺伝子候補のうち, EMT 誘導遺伝子発現に関わる転写制御因子を重点的に探索した。これまでに, JUNB 転写制御因子が, その最重要候補であることを見いだした。METTL3 酵素による JUNB の m6A 修飾は, JUNB mRNA の安定化を引き起こし, EMT における JUNB の機能を保証することがわかった。すなわち, がん悪性進展のエピジェネティック制御において RNA の化学修飾は重要な役割を担っており, その機能解明は, 新しいアプローチによるがん治療戦略の開発に貢献できると期待される。

2. がん悪性形質獲得に関与するエピジェネティック制御因子の探索

がん悪性進展の際のエピジェネティック制御の重要性を調べるために, ドライバー遺伝子変異導入がん細胞株の悪性形質獲得に対して協調的に働くエピジェネティック制御因子を CRISPR/Cas9 スクリーニング法によって探索している。今年度は, P53 欠損 MCF7 細胞とヒストン脱メチル化酵素 sgRNA サブライブラリーを用いて, スフィア形成を指標にスクリーニングを行った。その結果, KDM3B と KDM8 酵素が同定された。これらの候補因子は, TCGA 解析でもその発現低下と乳がん悪性度との相関性が確認され, ノックダウン実験によっても乳がん悪性化に寄与することが確認された。現在, 数種類のドライバー変異導入がん細胞株を用いて, 様々な悪性形質獲得(スフィア形成能, 細胞浸潤能, 薬剤耐性能)を指標に探索を進めており, エピジェネティック制御因子とドライバー変異との新しい関係性を調べている。

3. ヒストンメチル化修飾分布に基づく EMT 制御転写因子の探索

これまでに, EMT に関与する遺伝子発現の制御に, ヒストンメチル化制御酵素によるゲノム上の H3K4me3 修飾の再構成が重要であることを示してきた。H3K4me3 修飾は, 細胞の特異性を決定する重要な遺伝子座に, より広範囲にマークされることが報告されている。そこで, EMT 進行をコントロールする新しい因子を同定するために, EMT 誘導の前後で H3K4me3 修飾の ChIP-seq 解析を行い, 誘導後に H3K4me3 修飾範囲が拡大する遺伝子を探索した。得られた候補には, SNAIL や SLUG など既知の EMT を制御する転写因子に加えて, EMT との関係性が未報告の転写因子が 5 種類含まれていた。現在, ノックダウンや過剰発現を用いて, これらの転写因子の EMT への影響を解析しており, がん転移過程における新規 EMT 制御機構の解明を目指している。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(研究室主体)

1. Wanna-Udom S, Terashima M, Lyu H, Ishimura A, Takino T, Sakari M, Tsukahara T and Suzuki T. The m6A methyltransferase METTL3 contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press, 2020.

(共同研究)

2. Fukuda K, Takeuchi S, Arai S, Katayama R, Nanjo S, Tanimoto A, Nishiyama A, Nakagawa T, Taniguchi H, Suzuki T, Yamada T, Nishihara H, Ninomiya H, Ishikawa Y, Baba S, Takeuchi K, Horiike A, Yanagitani N, Nishio M and Yano S. Epithelial-to-mesenchymal transition is a mechanism of ALK inhibitor resistance in lung cancer independent of ALK mutation status. *Cancer Res.*, 79(7):1658-1670, 2019.
3. Yamahana H, Takino T, Endo Y, Yamada H, Suzuki T and Uto Y. A novel celecoxib analog UTX-121 inhibits HT1080 cell invasion by modulating membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.*, pii: S0006-291X(19)31988-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.092., Oct 16, 2019. [Epub ahead of print].

< 学会発表 >

国際学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Long noncoding RNAs contribute to the epigenetic progression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of cancer cells. The 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research. (Hawaii 2019年2月)

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Functional analysis of the epigenetic factors in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第78回日本癌学会学術総会 (京都2019年9月)
2. Ishimura A, Wanna-Udom S, Tange S, Lyu H, Terashima M and Suzuki T. Screening of epigenetic factors related to breast cancer malignancy. 第42回日本分子生物学会年会 (福岡2019年12月)
3. Terashima M, Ishimura A, Nishimura T, Tange S and Suzuki T. Analysis of epithelial-mesenchymal transition-activating transcription factor candidates in cancer cells. 第42回日本分子生物学会年会 (福岡2019年12月)

4. Suzuki T, Terashima M, Wanna-Udom S, Lyu H, and Ishimura A. Functional analysis of the epigenetic factors in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第42回日本分子生物学会年会（福岡2019年12月）
5. Wanna-Udom S, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. The m6A methyltransferase METTL3 is involved in the process of epithelial-mesenchymal transition in non-small-cell lung cancer. 第6回北陸エピジェネティクス研究会（福井2019年10月）
6. Wanna-Udom S. The m6A methyltransferase METTL3 contributes to epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells, HOKURIKU RNA CLUB（金沢2019年12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, 1,300 千円 研究課題名「ゲノムワイドな挿入変異を利用した疾患関連 lncRNA の機能解析」
2. 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, 1,200 千円 研究課題名「がん悪性形質獲得に関係するエピジェネティック制御因子の探索」
3. 文部科学省科学研究費補助金, 基盤研究 (C), 研究代表者 寺島農, 1,000 千円 研究課題名「上皮間葉転換を制御する lncRNA の探索とその機能の解明」
4. 公益財団法人三谷研究開発支援財団 研究助成金, 研究代表者 鈴木健之, 1,500 千円 研究課題名「がんの悪性進展を司るエピジェネティック制御の解明と治療戦略の開発」

<その他>

1. 国立研究開発法人科学技術振興機構グローバルサイエンスキャンパス (GSC), 2017年度~2019年度, 第2 (展開) ステージ, 研究室に配属希望した高校生の研究活動を指導