

先進がんモデル共同研究センター

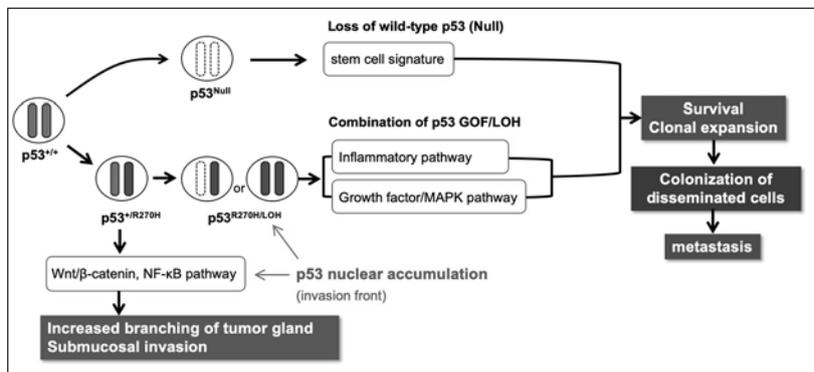
## Division of Genetics

### 腫瘍遺伝学研究分野

Professor	Masanobu Oshima 大島 正伸
Associate Professor	Hiroko Oshima 大島浩子, Mizuho Nakayama 中山瑞穂
Assistant Professor	Dong Wang (WPI-Nano LSI)
Graduate Student	Sau Yee Kok (D4) , Zachary Wei Ern Young (D4) Daisuke Yamamoto 山本 大輔, Toshikatu Tsuji 辻 敏克 (D4) Atsuya Morita 森田 敦也 (D2)
Technical Assistant	Manami Watanabe 渡辺真奈美, Ayako Tsuda 津田理子

#### 【 Abstract 】

Majority of p53 mutations in cancer cells are missense-type, suggesting a gain-of-function (GOF) mechanism of mutant p53 in tumorigenesis. We previously showed that expression of GOF mutant p53 (p53 R270H) induces submucosal invasion of intestinal tumors in *Apc*<sup>4716</sup> mice through activation of Wnt/NF- $\kappa$ B pathways (Nakayama et al, **Oncogene**, 2017). Here, we examined the role of mutant p53 in metastasis process of intestinal tumors using malignant tumor cells (AKTP cells) that carried heterozygous p53 GOF/+ mutation. Notably, AKTP cells that lost wild-type p53 by loss of heterozygosity (p53 GOF/LOH) were enriched in metastasis tumors. These results indicate a role of p53 GOF mutations in combination with LOH for promotion of metastasis. RNAseq analysis indicated that growth factor/MAPK and inflammatory pathways are significantly activated in p53 GOF/LOH cells, suggesting a possible mechanism of p53 GOF/LOH mutations in tumor metastasis (Nakayama et al, **Nat Commun**, 2020). These results provide a novel therapeutic strategy against metastasis by targeting GOF mutant p53.

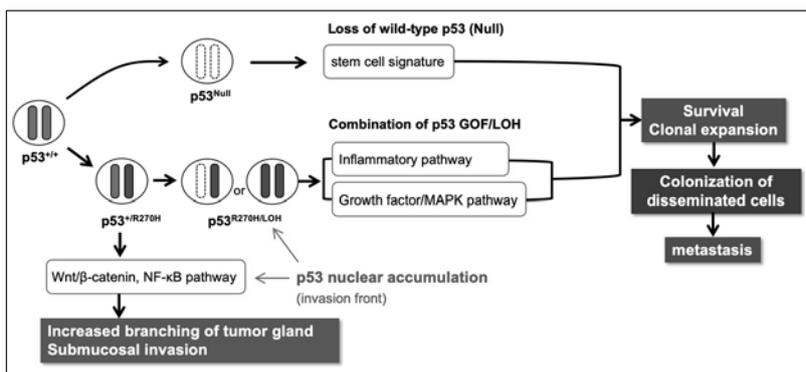


We have also examined a novel concept of polyclonal metastasis mechanism of intestinal tumors. In this model, cancer cell clusters break off from the primary site, disseminated to distant organs, and developed polyclonal metastasis lesion with keeping genetic heterogeneity. AKTP and AP intestinal tumor-derived organoid cells are metastatic and non-metastatic to the liver, respectively, when they are transplanted to the spleen. Importantly, we found that non-metastatic AP cells can metastasize with AKTP cells when they are co-existed in cell clusters and transplanted together. Mechanistically, AKTP cells induce generation of fibrotic metastatic niche through activation of hepatic stellate cells, which support survival and proliferation of non-metastatic AP cells (Kok et al, **Nat Commun**, accepted). These results expand our knowledge about the biological mechanism of metastasis. As a next step, we will evaluate these results by generation of human colon cancer-derived organoids.

## <2020年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

### 1. 大腸がん転移における機能獲得型 p53 遺伝子変異の役割

ヒトがん組織で認められる p53 変異の多くはミスセンス型であり、変異型 p53 が新たに機能を獲得 (gain-of-function, GOF) して悪性化誘導する。これまでに、腸管腫瘍発生モデルの *Apc*<sup>Δ716</sup> マウスに p53 R270H 変異を導入し、GOF 変異 p53 が粘膜下浸潤を誘導することを明らかにした (Nakayama et al, **Oncogene**, 2017)。さらに、高転移性オルガノイド AKTP 細胞を使って、転移実験を実施した結果、GOF 変異に加えて野生型 p53 を LOH により欠損したがん細胞が、転移巣に濃縮することを明らかにした。さらに、GOF/LOH 細胞は、シングルセルにした時の生存や、増殖性が顕著に高くなっており、それが転移性獲得に関与すると考えられた (Nakayama et al, **Nat Commun**, 2020)。今後、GOF/LOH による悪性化誘導機構の解明を目指して研究を推進する。



### 2. 大腸がんポリクローナル転移機構の研究

ポリクローナル転移機構モデルでは、異なる遺伝子変異を持つ細胞集団からなる細胞塊が、原発巣から離脱して遠隔臓器に転移巣を形成する。我々は、腸腫瘍オルガノイドを用いて、ポリクローナル転移機構についての検証実験を行った。その結果、非転移性腫瘍細胞を高転移性がん細胞と共培養して脾臓移植すると、高転移性細胞に混在した転移巣を肝臓に形成することを示した。メカニズムとして、転移性がん細胞が肝星細胞を活性化して形成される線維性微小環境により、非転移性腫瘍細胞の生存と増殖が促進することを明らかにした (Kok et al, **Nat Commun**, accepted)。今後、ヒト大腸がん由来オルガノイドを作製して検証実験を推進する。

### 3. 悪性度の異なる腸管腫瘍細胞表面の物性マッピング解析

Scanning Ion Conductance Microscope (SICM) は、マイクロピペット内外のイオン電流の変化から、細胞表面のトポグラフィ、弾性等の物性変化をナノレベルで計測することが可能である。ナノ生命科学研究所渡辺准教授との共同研究により、腫瘍オルガノイド細胞表面を高速 SICM を用いて計測した結果、転移性腫瘍細胞に特徴的な変化が確認され、新規診断法開発につながる事が期待された (投稿準備中)。今後、ヒトがん細胞を含めた標本数を増やして、検証実験を推進する。

### 4. 胃がん細胞の FOXO3 発現型による分類とがん抑制機構の研究

FOXO3 を発現するヒト胃がん細胞は、FOXO3 を核に蓄積する型と細胞質に分布する型に分けられる。ヒトおよびマウス由来胃がんオルガノイドを用いた解析、および FOXO3 コンディショナル活性化モデルを作製し、FOXO3 細胞質型がん細胞では、FOXO3 が腫瘍抑制因子として作用することを明らかにした (revision 中)。今後、FOXO3 を治療標的としての可能性について検証を進める。

## 【研究業績】

### < 発表論文 >

#### 発表著論文

(腫瘍遺伝学分野主体)

1. Nakayama M, Hong CP, Oshima H, Sakai E, Kim SJ, Oshima M. Loss of wild-type p53 promotes mutant p53-driven metastasis through acquisition of survival and tumor-initiating properties. **Nat Commun**, 11: 2333. 2020.
2. Kok SY, Oshima H, Takahashi K, Nakayama M, Murakami K, Ueda HR, Miyazono K, Oshima M. Malignant subclone drives metastasis of genetically and phenotypically heterogeneous cell clusters through fibrotic niche generation. **Nat Commun**, 12: 863, 2021.

(共同研究)

1. Murakami K, Terakado Y, Saito K, Jomen Y, Takeda H, Oshima M, Barker N. A genome-scale CRISPR screen reveals novel factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, in press.
2. Tan SH, Swathi Y, Tan S, Goh J, Seishima R, Murakami K, Oshima M, Tsuji T, Phuah P, Tan LT, Wong E, Fatehullah A, Sheng T, Ho SWT, Grabsch HI, Srivastava S, Teh M, Denil SLIJ, Mustafah S, Tan P, Shabbir A, So J, Yeoh KG, Barker N. AQP5 enriches for stem cells and cancer origins in the distal stomach. **Nature** 578: 437-443, 2020.
3. Lim KS, Yong ZWE, Wang H, Tan TZ, Huang RY, Yamamoto D, Inaki N, Hazawa M, Wong RW, Oshima H, Oshima M, Ito Y, Voon DC. Inflammatory and mitogenic signals drive interleukin 23 subunit alpha (IL23A) secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells. **J Biol Chem** 295: 6387-6400, 2020.
4. Mohamed MS, Hazawa M, Kobayashi A, Guillaud L, Watanabe-Nakayama T, Nakayama M, Wang H, Kodera N, Oshima M, Ando T, Wong RW. Spatiotemporally tracking of nano-biofilaments inside the nuclear pore complex core. **Biomaterials** 256: 120198, 2020.
5. Fujiwara N, Shibutani S, Sakai Y, Watanabe T, Kitabayashi I, Oshima H, Oshima M, Hoshida H, Akada R, Usui T, Ohama T, Sato K. Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6. **Cancer Sci** 111: 4371-4380, 2020.
6. Cao D, Jia Z, Wu Y, Su T, Zhao D, Wu M, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, Cao X. Demethylation of the RB1 promoter concomitant with reactivation of TET2 and TET3 impairs gastric carcinogenesis in K19-Wnt1/C2mE transgenic mice. **Life Sci** 263: 118580, 2020.
7. Cao D, Zhao D, Jia Z, Su T, Zhang Y, Wu Y, Wu M, Tsukamoto T, Oshima M, Jiang J, Cao X. Reactivation of Atp4a concomitant with intragenic DNA demethylation for cancer inhibition in a gastric cancer model. **Life Sci** 242: 117214, 2020.

## <学会等発表>

(国際学会・シンポジウム)

1. Oshima M. Polyclonal metastasis of intestinal cancer. The 4<sup>th</sup> NanoLSI Symposium / International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa 2020, (金沢) 2020年11月27日.

(国内学会・セミナー)

1. 大島正伸. 「炎症とがん転移」第41回日本炎症・再生医学会, (東京) 2020年7月8日.
2. 大島正伸, 中山瑞穂, Dong Wang, 大島浩子, 渡辺信嗣. 「大腸がんの悪性化進展における炎症性バイオマーカー」第40回日本分子腫瘍マーカー研究会, (広島) 2020年9月30日.
3. Oshima M. How genetic alterations promote malignant progression of colon cancer. 第79回日本癌学会学術総会, 広島, 2020年10月3日.
4. Oshima M. Inflammation and cancer development (Morning Lecture). 第79回日本癌学会学術総会, 広島 (online), 2020年10月1-3日.
5. Nakayama M, Hong CP, Oshima H, Sakai E, Kim SJ, Oshima M. Loss of wild-type p53 promotes colon cancer metastasis that express gain-of-function mutant p53. 第79回日本癌学会学術総会, 広島 (online), 2020年10月1-3日.
6. Oshima H, Kok SY, Takahashi K, Nakayama M, Miyazono K, Oshima M. Polyclonal metastasis of colon cancer subclones through fibrotic niche generation. 第79回日本癌学会学術総会, 広島 (online), 2020年10月1-3日.
7. Yong ZWE, Lim KS, Yamamoto D, Inaki N, Oshima H, Oshima M, Ito Y, Voon DC. Inflammatory and mitogenic cues drive IL23A secretion in intestine epithelial cells via a transcription enhancer complex. 第79回日本癌学会学術総会, 広島 (online), 2020年10月1-3日.
8. Oshima M. Gain-of-function mutation of p53 for malignant progression of cancer. 第43回日本分子生物学会年会, online, 2020年12月3日.

## <外部資金>

1. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん微小転移巣形成機構の理解による新規予防治療戦略の確立」 15,000千円
2. 科研費 基盤研究 (A) [研究代表者: 大島 正伸]  
「大腸がん自然転移・再発モデルの開発による悪性化進展機構の研究」 8,600千円
3. 科研費 挑戦的研究 (萌芽) [研究代表者: 大島 正伸]  
「TGF-beta による大腸がん抑制作用から悪性化誘導へのスイッチ制御機構の解明」 2,500千円

4. 科研費 基盤研究 (B) [研究代表者: 大島 浩子]  
「炎症性・線維性微小環境による大腸がん転移促進機構の解明」 4,500 千円
5. 科研費 基盤研究 (C) [研究代表者: 中山 瑞穂]  
「p53 変異/欠損による大腸がん微小環境ネットワーク形成に関する個体モデル解析」 1,100 千円
6. 科研費 研究活動スタート支援 [研究代表者: Dong Wang]  
「The role of activin signaling in colorectal cancer EMT induction」 1,100 千円

#### <その他>

文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成「先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会開催(実行委員長:大島正伸):2020年9月11日, online 開催(全国から大学院生(修士・博士課程)、および若手研究者約80名参加)

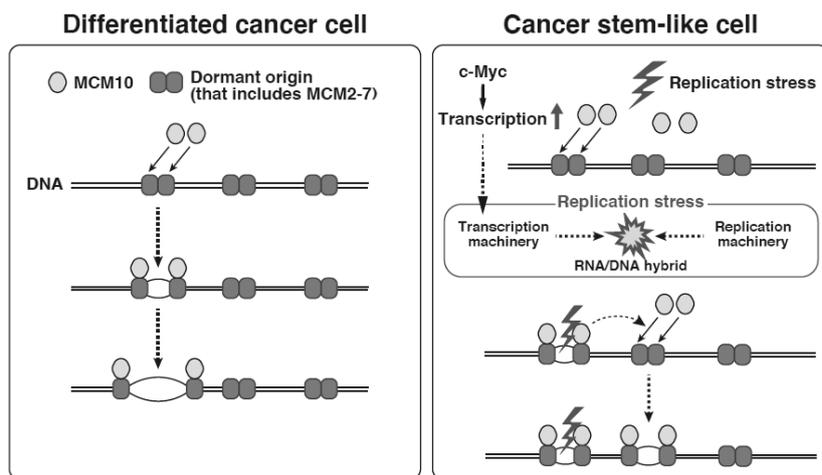
## Division of Cancer Cell Biology

### 分子病態研究分野

Professor	Noriko Gotoh 後藤 典子
Assistant Professor	Tatsunori Nishimura 西村 建徳 Yasuto Takeuchi 竹内 康人 Takahiko Murayama 村山 貴彦 (~2020.3)
Graduate Student	Reheman Yiming (D4), Xiaoxi Chen (D4), Li Mengjiao (D3), SARENQIQIGE (D2), Wang Yuming (D2) Rojas Nichole (M2) (~2020.3) Jin Lee (M2)
Assistant Staff	Kiyoko Take 武 紀代子

#### 【 Abstract 】

Cancer stem-like cells (CSCs) induce drug resistance and recurrence of tumors when they experience DNA replication stress. However, the mechanisms underlying DNA replication stress in CSCs and its compensation remain unclear. Here, we demonstrate that upregulated c-Myc expression induces stronger DNA replication stress in patient-derived breast CSCs than in differentiated cancer cells. Our results suggest critical roles for mini-chromosome maintenance protein 10 (MCM10), a firing (activating) factor of DNA replication origins, to compensate for DNA replication stress in CSCs. MCM10 expression is upregulated in CSCs and is maintained by c-Myc. c-Myc-dependent collisions between RNA transcription and DNA replication machinery may occur in nuclei, thereby causing DNA replication stress. MCM10 may activate dormant replication origins close to these collisions to ensure the progression of replication. Moreover, patient-derived breast CSCs were found to be dependent on MCM10 for their maintenance, even after enrichment for CSCs that were resistant to paclitaxel, the standard chemotherapeutic agent. Further, MCM10 depletion decreased the growth of cancer cells, but not of normal cells. Thus, MCM10 may robustly compensate for DNA replication stress and facilitate genome duplication in cancer cells in the S-phase, which is more pronounced in CSCs. Overall, we provide a preclinical rationale to target the c-Myc-MCM10 axis for preventing drug resistance and recurrence of tumors.



ヒト乳がん由来細胞のスフェロイド培養(がん幹細胞が濃縮される)と接着培養(多くが分化したがん細胞)の条件で RNA を取り出して RNA シーケンスを行った結果、がん幹細胞により強く DNA 複製ストレスが生じていることがわかった。同時に、転写因子 Myc と DNA 複製開始因子 MCM10 の発現がスフェロイドで強いことも見出した。詳細な解析から、がん幹細胞では Myc の発現が上昇して転写活性が上昇した結果、転写を行う RNA ポリメラーゼと複製を行う DNA ポリメラーゼが衝突してしまい、DNA 複製がうまく行われなくなっていることがわかった。この DNA 複製ストレスを回避するため、MCM10 の発現が上昇して、本来複製を開始しない dormant origin からも複製を開始させて S 期を回していることがわかった

### <2020 年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

乳がん注目して新たなマウスがんモデルの作出と、患者乳がん組織由来細胞 (Patient-derived cancer cells, PDC) のスフェロイド及びオルガノイド培養技術を工夫し、Patient-derived xenograft (PDX) モデルの構築とそのカタログ化を行っている。これまでに 250 検体以上の乳がん検体の供与を受け、PDC の培養及び PDX モデルを構築してきた。現在では、PDC の培養はほぼ半数の症例において成功し、PDX モデルは約 1/3 の症例において成功するまでに技術力を高めている。

乳がんは、病理学的には乳腺細胞の過剰増殖から始まり、人では約 30 年の長い月日を経て腫瘍を形成し、発症する。最も初期の異常がどのように腫瘍形成にまで至るのか、そのメカニズムは長い間不明であった。我々は乳腺特異的に ErbB2 を過剰発現するマウスの乳がん自然発症モデルを用いて、これまでに膜結合型アダプター分子 FRS2beta が、慢性炎症性の微小環境の構築に関わることを見出してきた。一方その分子メカニズムは不明であった。今回 FRS2beta が、NFκB を直接活性化する IKK 複合体の構成因子 NEMO と、early endosome 上で多分子複合体を形成することを見出した。この複合体形成により FRS2beta は、ErbB2 依存的に IKK 複合体を活性化し、炎症を惹起するマスター転写因子 NFκB を活性化することがわかった。FRS2beta-NEMO 軸を標的とすれば乳がん発症を超早期に予防できる可能性がある。

## 【 研究業績 】

< 発表論文 >

原 著

(研究室主体)

1. Murayama T, Takeuchi Y, Yamawaki K, Natsume T, Mengjiao L, Marcela N R-C, Nishimura T, Kogure Y, Nakata A, Tominaga K, Sasahara A, Yano M, Ishikawa S, Ohta T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S, Seki M, Suzuki Y, Sugano S, Enomoto T, Tanabe M, Tada K, Kanemaki T M, Okamoto K, Tojo A, Gotoh N.: MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells. *Cancer Sci*, accepted.

(共同研究)

2. Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T, Hayashi T, Kono S, Tsuchida H, Hirata M, Kijima Y, Takao Y, Okada S, Suzuki M, Imaizumi K, Kawada K, Minami H, Gotoh N, Shimono Y.: Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. *Cancer Sci*, on line publication 25, September: 111, p4359, 2020. DOI: 10.1111/cas.14659.
3. Kanamori, A, Saitoh, Y, Fukui, Y, Inoue J-I, Matsubara D, Seiki M, Gotoh N, Murakami Y, Kaneko S, Sakamoto T.: Mint3 depletion restricts tumor malignancy of pancreatic cancer cells by decreasing SKP2 expression via HIF-1. *Oncogene*, on line publication 21, August: 39(39), 6218-6230, 2020. DOI: 10.1038/s41388-020-01423-8.
4. Mitobe Y, Ikeda K, Sato W, Kodama Y, Naito M, Gotoh N, Miyata K, Kataoka K, Sasaki H, Horie-Inoue K, Inoue S.: Proliferation-associated long noncoding RNA, *TMPO-AS1*, is a potential therapeutic target for triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*, on line publication 21, March. 2020; 111(7), 2440-2450, 2020. DOI: 10.1111/cas.14498.
5. Andrade F, Nakata A, Gotoh N, Fujita A.: Large miRNA survival analysis reveals a prognostic four-biomarker signature for triple negative breast cancer. *Genet Mol Biol*, 43(1), e20180269, 2020. DOI: 10.1590/1678-4685-GMB-2018-0269.

総 説

1. Nishimura T, Gotoh N.: Cancer treatments targeting mitochondrial enzymes involved in one-carbon metabolism. *Cytometry Research*, 30(2), in press.
2. 後藤典子. 「乳腺のオルガノイドによるマイ・メディシンーがん幹細胞研究の立場から」 *医学のあゆみ* (医歯薬出版株式会社)、vol. 276(6), 21810-21816, 2020.

3. 村山貴彦、後藤典子. 「微小環境と治療抵抗性メカニズム」 **CANCER BOARD of the BREAST** (メジカルビュー社), vol. 6(2), 102-104, 2020.
4. 後藤典子. 「がん幹細胞とそのニッチ」 **医学のあゆみ** (医歯薬出版株式会社), vol. 273(5): p362-367, 2020.
5. 後藤典子. 「がん幹細胞とその微小環境および治療への展望」 **Life Science Connect** (羊土社、第一三共株式会社), vol. 1, p2-7, 2020.
6. 西村建徳、東條有伸、後藤典子. 「MTHFD2 の酵素活性阻害によるがん治療」 **BIO Clinica** (北隆館), vol. 35(1), 88-91.2020.

<学会発表>

<国際学会>

1. Noriko Gotoh: “The replication factor MCM10 maintains breast cancer stem-like cells that constitutively experience c-Myc-driven replication stress” **AACR Annual Meeting 2020**  
2020年6月22-24日、米国、オンライン

<全国学会>

1. 後藤典子：“乳がん患者由来がん三次元培養からがん幹細胞の不均一性に迫る” **患者由来がんモデル講演会** 2020年10月29-30日、東京、オンライン（招待講演）
2. 後藤典子：“がん幹細胞を標的とした治療戦略” **第24回日本がん分子標的治療学会学術集会 「Year in Review」** 2020年10月7日、徳島（招待講演）
3. 後藤典子：“がん幹細胞標的治療の実現へ具体的な道筋” **第79回日本癌学会学術総会 「International session」** 2020年10月2日、広島（オーガナイザー）
4. 後藤典子：“固形がんの Patient-derived xenograft (PDX)” **第79回日本癌学会学術総会 教育講演** 2020年10月3日、広島（招待講演）
5. 西村建徳、Mengjiao Li、後藤典子：“Identification of subpopulations in patients-derived breast cancer stem-like cells by using RNA sequencing” **第79回日本癌学会学術総会** 2020年10月1-3日、広島（招待講演）
6. 竹内康人、後藤典子：“細胞質アダプタータンパク FRS2beta は乳がん形成を促進する炎症性サイトカインリッチ環境を形成する” **2020 若手支援技術講習会** 2020年9月11日、石川、オンライン
7. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“がん関連線維芽細胞由来の液性因子は乳がん幹細胞様細胞の維持に寄与する” **第79回日本癌学会学術総会** 2020年10

月 1-3 日、広島、オンライン

8. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“がん関連線維芽細胞由来の液性因子は乳がん幹細胞様細胞の維持に寄与する” 第 24 回日本がん分子標的治療学会 2020 年 10 月 6-8 日、オンライン
9. 竹内康人、村山貴彦、西村建徳、後藤典子：“がん関連線維芽細胞由来の液性因子は乳がん幹細胞様細胞の維持に寄与する” 2020 患者由来がんモデル講演 2020 年 10 月 29-30 日、東京、オンライン
10. Mengjiao Li、西村建徳、後藤典子：“Single cell analysis revealed heterogeneity among patient-derived breast cancer stem-like cells” 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 2 日、広島、オンライン
11. Jin Lee、西村建徳、後藤典子：“Inhibition of mitochondrial enzyme MTHFD1L in one carbon metabolism down regulates cancer stem-like cells in breast cancer” 第 24 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2020 年 10 月 6-8 日、徳島、オンライン（ワークショップ）
12. Jin Lee、西村建徳、後藤典子：“One carbon metabolic enzyme MTHFD1L could be a novel molecular target for breast cancer” 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 1-3 日、広島、オンライン
13. Yiming Rehemian、竹内康人、西村建徳、中田飛鳥、後藤典子：“Cancer stem-like traits are up-regulated in gefitinib-resistant lung cancer cells” 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 1-3 日、広島、オンライン

#### <外部資金>

1. 後藤典子，基盤研究 B（一般），2018.4.1-2021.3.31，代表，13,500 千円
2. 後藤典子，AMED 次世代がん医療創生研究事業，2020.4.1-2021.3.21，分担，4,680 千円
3. 後藤典子，新学術領域研究（公募研究），2020.4.1-2022.3.31，代表，5,520 千円
4. 後藤典子，挑戦的萌芽研究，2019.4.1-2021.3.31，代表，6,500 千円
5. 後藤典子，高松宮妃癌研究助成金，2019.4.1-2021.3.31，代表，206,993 円
6. 西村建徳，若手研究，2019.4.1-2021.3.31，代表，4,290 千円
7. 竹内康人，基盤研究 B，2020.4.1-2021.3.31，分担，130 千円

## Division of Epithelial Stem Cell Biology 上皮幹細胞研究分野

Research Professor      Nicholas Barker (シンガポール A-STAR 研究所・主任研究員)  
Assistant Professor      Kazuhiro Murakami 村上 和弘  
Assistant                  Kenji Kita 北 賢二 (共同研究拠点)  
Postdoctoral Researcher Yumi Terakado 寺門 侑美  
Collaborative Researcher Masaki Yamazaki 山崎 雅輝 (中外製薬)  
Assistant Staff          Yoshie Jomen 定免 良枝, Kikue Saitou 齋藤 喜久江

### 【 Abstract 】

Gastric cancer is a complex disease that often arises in a setting of chronic inflammation. For gastric tumorigenesis, *Helicobacter pylori* infection is an important risk factor, and COX-2/PGE2 pathway is induced in the infection-associated chronic gastritis tissues. Despite recent extensive efforts to molecularly classify gastric cancers to try and stratify treatment regimens according to underlying mutational spectra, gastric cancer remains a relatively poorly understood disease with a poor prognosis for most patients.

Cancer stem cells are defined as the unique subpopulation in the tumors that possess the ability to initiate tumor growth and sustain self-renewal as well as metastatic potential. Those tumor-resident cells with stem cell characteristics are thought to be resistant to conventional anti-cancer therapies, allowing them to survive and drive tumor recurrence in many patients.

Recently, we have identified *Lgr5*<sup>+</sup> chief cells in the corpus stomach, which serve as reserve stem cells to effect epithelial renewal following oxyntic atrophy. These reserve stem cells drive spasmodic polypeptide-expressing metaplasia in the stomach following conditional KRasG12D driver mutation, highlighting their likely contribution to gastric cancer initiation *in vivo* (Leushacke, M. *et al.*, *Nature Cell Biology*, 2017).

But still it is not clear whether the *Lgr5*<sup>+</sup> chief cell serves as an origin of gastric cancer cell under the chronic inflammation and how cancer stem cell is induced from *Lgr5*<sup>+</sup> reserve stem cells. To study the effects of chronic inflammation on stem cell-driven cancer formation and progression in the corpus stomach, we are focusing on evaluating a potential cancer stem cell function of *Lgr5*<sup>+</sup> cells present within Wnt-driven inflammation-dependent gastric tumors. We would like to leverage on the extensive knowledge and mouse models available through my collaborator, Professor Masanobu Oshima to study the effects of chronic inflammation on stem cell driven cancer formation and progression in the corpus stomach. This is physiologically relevant because the majority of human gastric cancer is considered to arise in a setting of chronic inflammation caused by infection with *Helicobacter Pylori*.

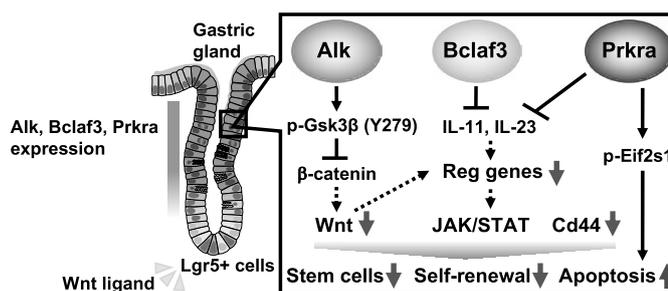
## <2020年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. 新規胃癌マウスモデルの解析

*APC*, *KRas*, *p53* 遺伝子変異を組み合わせることで、悪性度の高い新たな胃癌マウスモデルを得た。これらのマウスよりオルガノイドを樹立し、免疫不全マウスの胃に同所移植を行うことで、生体内の胃癌の浸潤・転移を模倣できる新たな移植モデルを確立した。これらのマウスで薬剤処理を行い *Lgr5* 陽性の胃癌細胞を選択的に除去することで、転移が抑制されることが明らかとなった。このことは、悪性度の高い胃癌の浸潤・転移には *Lgr5* 陽性細胞が必須である事を示唆している。これらの結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会にて発表され、現在、論文として投稿中である。

### 2. 幹細胞制御因子の同定と解析

マウス正常胃オルガノイドと CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウト技術を組み合わせたゲノムワイドスクリーニングを行なった結果、*Alk*, *Bclaf3*, *Prkra* 遺伝子が胃組織幹細胞の分化を制御していることが明らかとなった。さらなる解析により、*Alk* は *Gsk3β* の279番目のチロシンをリン酸化することで *Wnt* シグナルを抑制し、*Bclaf3* と *Prkra* は上皮性のインターロイキンの発現を抑制することで細胞の分化を制御していることが明らかとなった (図)。



この成果は、国際誌である *PNAS* に受理された。

### 3. 胃幹細胞を維持する分子機構の解明

ヒト胃正常および胃癌組織の *Lgr5* 陽性細胞で高発現する遺伝子群を、マウス胃正常オルガノイドを用いて解析を行った結果、いくつかの転写因子を発現させることで、幹細胞の増殖に必須な *Wnt* シグナルの非存在下でも細胞の増殖性が維持されるという結果を得ている。同時にそれらの転写因子は、*Lgr5* 陽性細胞の幹細胞性を亢進させることで、胃癌の悪性化に寄与していることも明らかとなった。特に *Wnt* シグナルの下流因子である転写因子 *Sox9* は胃正常幹細胞の維持に必須であった。加えて胃癌オルガノイドで *Sox9* を発現させると、*Lgr5* 陽性の胃癌幹細胞様細胞の増殖性は低下する一方で、マウス生体内での転移能が亢進するという非常に興味深い結果を得ている。これらの結果は、一群の転写因子が正常組織幹細胞とがん幹細胞様細胞で真逆の使われ方をしていることを強く示唆している。これらの結果は、先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会にて発表された。

## 【 研究業績 】

### < 発表論文 >

原著

1) Murakami K, Terakado Y, Saito K, Jomen Y, Takeda H, Oshima M and Barker N. A Genome-Scale CRISPR screen reveals novel factors regulating Wnt-dependent renewal of mouse gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci*, 118: e2016806118, 2021.

(共同研究)

2. Kok SY, Oshima H, Takahashi K, Nakayama M, Murakami K, Ueda H, Miyazono K, Oshima M. Malignant subclone drives metastasis of genetically and phenotypically heterogenous cell clusters through fibrotic niche generation, *Nature Commun*, 12: 863, 2021.

### < 学会発表 >

**Nick Barker;**

1. ISSCR Virtual 2020 年 23-27 日 (招待講演)

**村上和弘;**

2. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会「転写因子 Sox9 は正常胃組織幹細胞および胃がん幹細胞において幹細胞性を制御する」2020 年 9 月 11 日 Web 開催

**寺門侑美;**

3. 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会「Lgr5 陽性細胞の胃がん幹細胞としての役割の同定」2020 年 9 月 11 日 Web 開催

### < 外部資金 >

1. 基盤研究(C)[研究代表者：村上 和弘]

「オルガノイドを用いた胃がん幹細胞の可視化と効果的な治療法の探索」 130 万円

2. 公益財団法人 武田科学振興財団 2020 年度 医学系研究助成

「胃がん幹細胞に特異的な分子機構の解明と効果的な治療法の探索」 200 万円

3. 若手研究 [研究代表者：寺門 侑美]

「胃がん幹細胞の同定および制御機構の解明」 100 万円