

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 】

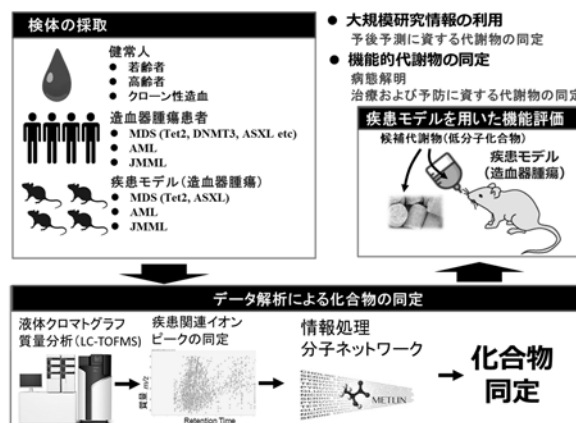
Diet is the most common, physiological and long-term stimulus influencing tissue homeostasis. Recent studies have revealed that obesity induced by consumption of a fat-rich diet triggers abnormal hematopoiesis that can compromise immune system function. We previously discovered an important mechanism by which hematopoietic stem cells (HSCs) are protected against the ill effects caused by the dysbiosis (microbial imbalance) of gut microbiota induced by a high fat diet (HFD) (Tadokoro et al., Cell Stem Cell 2018). We have investigated the nature of the "pathological" microenvironments regulating HSCs (HSC niche) created by diet-related metabolites to understand how diet affects hematopoiesis. To see roles of HFD in leukemogenesis, we established several leukemia models driven by mutant genes, including NF1, Cbl, BCR-ABL, NPM1, and DNMT3a, and found importance of RAS-MAPK-ERK pathways in response to HFD for abnormal behavior of HSC and progenitor cells. By multiple metabolomics analyses, we found that several microbiota derived metabolites which are remarkably down- or up-regulated by HFD, followed by further investigation of functions of the candidate metabolites. Interestingly, we found that a microbiota derived metabolite suppressed abnormality of HSC/Progenitor cells in vivo and in vitro. We are currently investigating mechanisms of the functional metabolite and if the compound contributes to prevention or treatment of diet-induced hematopoietic diseases.

We also aim to identify critical metabolic pathways controlling malignant properties. By functional screening based on CRISPR/Cas9 library, we found importance of nicotinamide metabolism and its metabolite, 1-methylnicotinamide (1-MNA), as a unique pathway for therapy resistance. Collaborative research with chemists of NanoLSI, we successfully generated a sensor molecule that specifically recognizes 1-MNA in biological samples (Ueno et al., *Commun. Chem* 2020). Since this metabolite is up-regulated in cancer tissues from patients, the sensing method may be useful as a diagnostic tool. We have started further collaboration with SPM imaging group. This interdisciplinary collaboration will lead to the development of a unique metabolite imaging system at the single cell level, contributing to a deep understanding of cancer malignancy and establishment of novel methods for clinical cancer diagnosis.

<2020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原因となる造血幹細胞や多能性前駆細胞の異常な自己複製と発がんのメカニズムの解明を進めている。まず、遺伝子異常を造血幹細胞に導入することで、様々な白血病モデルを作製し、その後、高脂肪食負荷による影響を解析した結果、RAS-MAP-ERK 経路と高脂肪食の特異的な関係が存在することが判明した。そのメカニズムの理解を目的のため、約 200 種の代謝物を対象としたメタボローム、さらに未解析代謝物解析のためのアンターゲットメタボロームを実施し、食餌によって優位に変動する代謝物を同定、その代謝物を白血病モデルに投与することで、機能を有する化合物の同定を試みた。その結果、腸内細菌由来代謝物の中に、高脂肪食によって惹起される造血幹細胞や前駆細胞の異常を抑制する化合物が存在することが判明した。現在、更なる候補代謝物の特定や幹細胞制御メカニズムの解析を進めている。さらに、本研究を発展させ、分析化学を専門とする共同研究者と共に、ヒト検体とマウスモデルを用いた網羅的代謝解析系の構築を進めている(図)。本研究の成果が、幹細胞制御や発がん機構の解明、また疾病の予防や治療に寄与できることが期待される。



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

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、がんの悪性化制御に関与する代謝調節制御機構解明のため、①白血病幹細胞の分化制御分子の特定、②脳腫瘍細胞系譜転換現象(Proneural/Mesenchymal Transition)の解明、③分子標的治療抵抗性分子の特定と治療薬開発を中心に研究を進めている。本年は、がんの進展や悪性化に関与していることが明らかになっているニコチンアミド *N*-メチル基転移酵素(nicotinamide *N*-methyltransferase: NNMT)の機能解析、阻害剤探索とともに、ナノ生命科学研究所との共同研究にてバイオセンサーの開発を進めた。その結果、超分子化合物である水溶性ピラー[6]アレーン(P6A)は1-MNAと特異的に結合することを見いだした(Ueno et al., *Commun. Chem* 2020)。今後、様々ながん患者診断や治療を目指した研究開発を進める予定である。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著

(分野主体)

1. Ueno M, Tomita T, Arakawa H, Kakuta T, Yamagishi T, Terakawa J, Daikoku T, Horike S, Si S, Kurayoshi K, Ito C, Kasahara A, Tadokoro Y, Kobayashi M, Fukuwatari T, Tamai I, Hirao A*, Ogoshi T*. Pillar[6]arene acts as a biosensor for quantitative detection of a vitamin metabolite in crude biological samples. *Commun. Chem.* 3:183, 2020 (*co-correspondence)
2. Nomura N, Ito C, Ooshio T, Tadokoro Y, Kohno S, Ueno M, Kobayashi M, Kasahara A, Takase Y, Kurayoshi K, Si S, Takahashi C, Komatsu M, Yanagawa T, Hirao A. Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner. *Sci. Rep.* 2021, in press

(共同研究)

3. Jiapaer S, Furuta T, Dong Y, Kitabayashi T, Sabit H, Zhang J, Zhang G, Tanaka S, Kobayashi M, Hirao A, Nakada M. Identification of 2-Fluoropalmitic Acid as a Potential Therapeutic Agent Against Glioblastoma. *Curr Pharm Des* 26(36):4675-4684, 2020.
4. Tanabe Y, Kawamoto S, Takaku T, Morishita S, Hirao A, Komatsu N, Hara E, Mukaida N, Baba T. Expanding senescent megakaryocyte-lineage cells maintain stemness in CML: The role of BCR-ABL-induced senescence in CML. *Blood Adv*, 4 (24): 6175–6188, 2020

著書・総説

田所優子, 平尾敦: Spred1 による造血幹細胞制御と白血病化 医学の歩み 382-388, Vol.273, No.5, 2020

田所優子: Spred1 は造血幹細胞の自己複製能を制御する 動画企画 Focus on young investigator (Janssen Pro), 2020

< 学会発表 >

1. Hirao A: Critical role of metabolic regulation in self-renewal of hematopoietic stem cells and leukemogenesis 第 82 回日本血液学会学術集会 2020 年 10 月 10-11 月 8 日 Web 開催
2. Kobayashi M, Hirao A: Investigation of the roles of OLIG2 in stemness property of glioblastoma 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 1 日, 広島
3. Kurayoshi K, Ueno M, Hirao A : Development of a novel approach inducing differentiation in leukemic stem cells by targeting FOXOs-downstream genes 第 79 回日本癌学会学術

総会, 2020年10月1-3日, 広島

4. Kurayoshi K, Ueno M, Takase Y, Huse K, Ohta K, Tadokoro Y, Hirao A : Development of a novel approach inducing differentiation in LSCs by targeting FOXOs-downstream genes, 第82回日本血液学会学術集会, 2020年10月10-11月8日, Web開催

<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」16,509千円
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2年度 日本血液学会 研究助成「食餌性ストレスによる FLT3-ITD 変異陽性白血病の悪性進展機構の解析」300千円
5. 上野将也 : 基盤研究 (C) R2~R4年度「がん特異的な栄養代謝経路におけるニコチンアミド代謝の機能解析」1,100千円
6. 小林昌彦 : 基盤研究 (C) R2~R4年度「悪性脳腫瘍の不均一性と治療抵抗性に働く細胞系譜転換の分子基盤」1,500千円
7. 司沙 : 若手研究 (B) R1~R2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
8. 倉吉健太 : 若手研究 R1~2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」1,600千円

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	Susumu Kohno 河野 晋, Mitsuhiro Tomosugi 友杉 充宏 (~2020.12.31)
Graduate Students	Li Fengkai 李 鳳凱(~2020.5.12), Paing Linn (~2020.10.7), Kulathnga Liyana Arachchillage Nilakshi, Sheng Jindan 盛 金 丹, Zhang Zhiheng 張 智恒, Yu Hai 余 海, Gong Linxiang 龔 麟祥, Kana Teranishi 寺西 夏菜 (2020.4.1~) Zhang Yuanyuan 張 園園 (2020.10.1~) , Zhang Zixue 張 子雪 (2020.10.1~)
Technical Assistant	Naoko Nagatani 永谷 直子

【 Abstract 】

All cancers maintain or lost RB1 function. Synthetic CDK4/6 inhibitors are applicable to RB1-intact cancers. In HR⁺;HER2⁻ breast cancers, the combination of CDK4/6 inhibitors together with endocrine therapy actually doubled DFS. These reagents keep RB1 in unphosphorylated form for extended time, causing cellular senescence, apoptosis and enhanced immunogenicity, and are in clinical trials for many types of solid tumor. We invented CDK4/6 inhibitor combination therapies to treat RB1-intact HCC and K-Ras mutated lung and colon cancers. We are investigating if we can apply our strategy to other RB1-intact cancers especially K-Ras mutated ones. On the other hand, we have been long time investigating therapeutic targets in RB1-intact cancers. We so far proposed Ras, LOX, IL6, CCL2, CCL5, SCD1 and ELOVL6 as possible ones. We recently invented drugs that target *RB1-SUCLA2* genomic deletion frequently occurring in advanced prostate cancers (Figure). One of these, thymoquinone, has no known molecular target. We are trying

molecular expansion and converting it to probe forms in an aim to identify

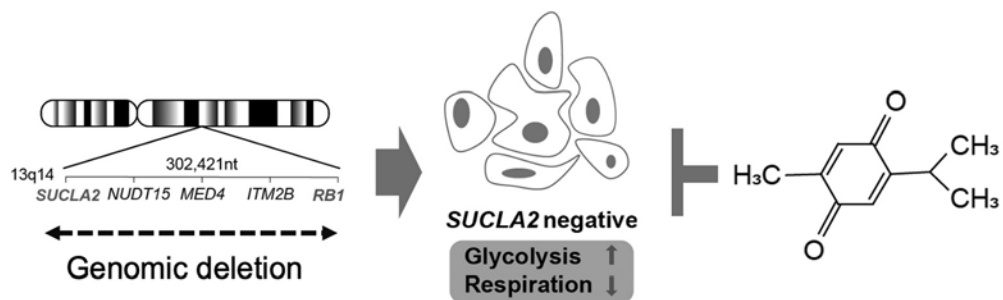


Figure: Thymoquinone targets *SUCLA2*-deficiency in advanced prostate cancer.

binding molecules. We are also running a large-scale re-screening on P1 facility base to find better effective compounds. We are still investigating the role of RB1-PGAMs axis in differentiation control in cancers. We identified anti-tumor effect of ELOVL6 inhibition, thus are trying to obtain its POC. We found ceramides and PI3K/AKT/mTOR signals are mechanistically involved in the tumor suppression. To contribute to preventive medicine, we clarified the role of fatty acid signaling in mammary carcinogenesis.

<2020年の成果、進行状況と今後の計画・展望>

すべてのがんは 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 を保持するがんの治療法のひとつに合成 CDK4/6 阻害剤がある。本邦では、ホルモン受容体陽性 HER2 受容体陰性進行乳がんに対し保険適用があり、著しい治療効果を示している。合成 CDK4/6 阻害剤は RB1 を長期に亘って無リン酸化状態に置くため、細胞老化、細胞死、免疫原性亢進等を誘導する。今後様々ながん種に適応拡大が予想され、耐性出現を睨んだ併用療法のラショナルレを探索している（リバイス中）。肝細胞がんや K-Ras 変異肺がん、大腸がんに対する併用療法を提案した（特願 2020-180429）。現在、さらに K-Ras 変異胆管がん、膵がんへの適応拡大も目指しており、代謝研究者、前臨床モデル、人体病理、臨床科を含む研究チームの編成を行っている。一方で、我々は、長く、RB1 機能を喪失ないし遺伝子を欠失したがんの克服に取り組んできた。近年、CHK1, PLK, Aurora-A, B 等の阻害の合成致死性が報告されている。我々は、Ras, LOX, IL6, CCL2, CCL5, SCD1, ELOVL6 等を、RB1 機能を喪失したがんの新規治療標的として報告してきた。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 にも注目した。この異常は進行前立腺がん症例の 10 から 30%に存在すると予測、慈恵会医大泌尿器科が日本人症例においてその検証を行っている。SUCLA2 欠失細胞には一定の代謝脆弱性が認められた。これは進行前立腺がんのアキレス腱かもしれない。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ている(*Oncogene* 2020) (図)。うち 2-isopropyl-5-methylbenzo-1,4-quinone (特願 2019-228526)の構造展開を試み、金沢大薬学系においてプローブ化し、釣り竿法による分子標的の同定を試みている。有明がん研 JFCR39 や理研における酵母を用いた化学遺伝学的アプローチによる標的推定、あるいは、P1 レベルの大規模再スクリーニングを実施している。RB1 と ELOVL6 の関係を解明し、がん化シグナルによる脂質代謝制御機構解明の端緒を開いた。ELOVL6 阻害が強いがん抑制効果を示すこと、その機構にセラミドが関与する事、ELOVL6 阻害への AKT シグナルを介する内在的耐性機構も判明し、ELOVL6 阻害剤開発のための POC 取得を急いでいる。RB1 の代謝機能の探索にも長く取り組んできた。RB1 の正の標的として見いだした PGAM1,2 を介する解糖系の制御は未発表であるが当研究分野の重要課題の一つである。大阪大学との共同研究により、代謝シミュレーションを用い、Warburg 効果の真の意味の理解にも挑戦している。予防医学的な取り組みとして、脂肪酸シグナルを介した乳がんの発がん・進展機構の解明も行った (*Cancer Sci.* 2020)。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

1. Kulathunga N, Kohno S, Linn P, Nishimoto Y, Horike S, Zaraiskii M, Kumar S, Muranaka H and Takahashi C. Peripubertal High Fat Diet Promotes c-Myc Stabilization in Mammary Gland Epithelium. *Cancer Sci.*, 111(7): 2336-2348, 2020.
2. Kohno S*, Linn P*, Nagatani N, Watanabe Y, Kumar S, Soga T and Takahashi C. Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying *RBI-SUCLA2* deletion. *Oncogene*, 39: 5690-5707, 2020.

* equal contribution

(共同研究)

1. 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*, 6:1: eaay2432, 2020.
2. Seliverstov RY, Zaraiskiy MI, Tyurin RV, Naryshkin AG, Valerko VG, Semiglazov VV and Takahashi C. MicroRNA in monitoring of the evolution of glial cerebral tumors. *Siberian Journal of Oncology*, 19:47-53, 2020.
3. Murata T, Kohno S, Ogawa K, Ito C, Itoigawa M, Ito M, Hikita K and Kaneda N. Cytotoxic activity of dimeric acridone alkaloids derived from citrus plants toward human leukemia HL-60 cells. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2020. (in press)
4. Murata T, Yamaguchi M, Kohno S, Takahashi C, Watanabe R, Hatori K, Hikita K and Kaneda N. Regucalcin enhances adipocyte differentiation and attenuates inflammation in 3T3-L1 cells. *FEBS Open Bio.*, July 21 2020. (online)
5. Nomura N, Ito C, Ooshio T, Tadokoro Y, Kohno S, Ueno M, Kobayashi M, Kasahara A, Takase Y, Kurayoshi K, Si S, Takahashi C, Komatsu M, Yanagawa T, Hirao A. Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner. *Sci. Rep.*, 2020. (in press)

(著書・総説)

1. 河野晋. 実験医学 News and Hot Paper Digest 「グルタミントランスポーターの謎」 Vol.38 No.6 p966, 2020 小川佳宏, 伊東宏晃 編, 羊土社刊
2. 高橋智聡, 河野晋. 『RB1 によるがん幹細胞の制御 Control of undifferentiated behavior of cancer cells by RB1』医学のあゆみ Vol.273 No.5 p410-414, 2020 「治療標的としてのがん幹細胞」伊藤貴浩編

3. 高橋智聡, 河野晋. 『がん細胞社会における細胞間相互作用 Which intercellular interaction should be targeted in cancer therapy?』医学のあゆみ Vol.274 No.5 p469-473, 2020 「細胞競合による生体制御とがん」井垣達吏編
4. Kitajima S, Li F, Takahashi C. Tumor Milieu Controlled by RB Tumor Suppressor. *Int J Mol Sci.*, 2020 Apr1;21(7). doi: 10.3390/ijms21072450
5. 李鳳凱. がん抑制遺伝子 RB1 の不活性化は CCL2 を介してがんを促進する微小環境を構築する. 金沢大学十全医学会雑誌, 129: 2, 37- 39, 2020.
6. Takahashi C and Kato J. Synthetic inhibitors of CDK4/6 activities and tumor suppression: a preface to the special issue. *Oncology*, 2020. (in press)

<学会発表>

1. 張智恒, 村中勇人, 友杉充宏, 河野晋, 高橋智聡. 脂肪酸伸長酵素 ELOVL6 の阻害によるがん制御. 第 14 回スフィンゴセラピー研究会 2020 年 1 月 25 日 (加賀市/ホテルアローレ 1/23-25)
2. 河野晋. 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 2 回金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所若手研究発表会 2020 年 1 月 12 日 (和倉町/ホテル海望 1/28-29)
3. 河野晋. 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 1 回日本癌学会若手の会 2020 年 2 月 12 日 (熱海市/大月ホテル和風館 2/11-13)
4. Susumu Kohno, Paing Linn, Tomotoshi Soga, Chiaki Takahashi. Pharmacologically targetable metabolic vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion. Keystone symposia tumor metabolism 2020 年 3 月 10 日 (Banff, AB, Canada / Fairmont Banff Springs 3/8-12 ; CANCELED)
5. Susumu Kohno, Pain Linn, Tomoyoshi Soga, Chiaki Takahashi. Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion. 2020 年 3 月 25 日 (Melbourne, VIC, Australia / Manta Bell City 3/23-25; POSTPONED)
6. 河野晋, Paing Linn, 曾我朋義, 高橋智聡. RB1-SUCLA2 欠損による代謝脆弱性を標的とした前立腺がん治療法の探索. 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 3 日 (広島市/リーガロイヤルホテル広島 10/1-3 口頭)
7. 岡田宣宏, 辻本剛己, 吉川清次, 高橋智聡. 乳がん悪性化機構における NFYA スプライシングバリエーションの機能解析. 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 3 日 (広島市/リーガロイヤルホテル広島 10/1-3 ポスター)
8. 辻本剛己, 高橋智聡, 岡田宣宏. NFYA による糖新生促進が引き起こす腫瘍抑制効果の検討. 第 79 回日本癌学会学術総会 2020 年 10 月 3 日 (広島市/リーガロイヤルホテル広島 10/1-3 ポスター)

9. 高橋智聡, Paing Linn, 曾我朋義, 河野晋. 進行前立腺がんにおける RB1-SUCLA2 遺伝子欠失を標的とする新規治療. 第 58 回日本癌治療学会学術総会 2020 年 10 月 23 日 (京都市/国立京都国際会館 10/22-24 口頭)
10. 盛金丹, 高橋智聡, 河野晋, 岡田宣宏. キナーゼ阻害剤と組み合わせた CDK4/6 阻害剤による HCC の新しい併用療法. 第 43 回日本分子生物学会年会 2020 年 12 月 4 日 (オンライン開催 12/2-4 ポスター)
11. 植木ちひろ, 辻本剛己, 河野晋, 高橋智聡, 岡田宣宏. 脂肪酸合成制御を介した NFYA による乳がん悪性化機構への影響. 第 43 回日本分子生物学会年会 2020 年 12 月 4 日 (オンライン開催 12/2-4 ポスター)

<知的財産>

特願 2020-180429 : R B 1 陽性癌の治療用医薬組成物及びキット

発明者 : 高橋智聡、河野晋、盛金丹

出願日 : 2020 年 10 月 28 日

<外部資金> (2020 年度/R2 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) R2~R5 年度「RB がん抑制遺伝子の代謝制御機能」(代表) 3,600 千円
4. 科学研究費補助金 基盤研究 (C) R1~R3 年度「関接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 欠失によって生じる代謝脆弱性を標的とする新規創薬研究」(代表) 2,500 千円
6. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) R2~R4 年度「閉経後ホルモン依存性子宮体癌の発症・進展の新たな分子機構-男性ホルモン作用の解析と臨床応用-」(分担) 500 千円

河野晋

1. 学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) R2~R4 年度「晩期再発乳がんにおける休眠トリガーと分子機構の解明」(代表) 1,700 千円
2. 革新的がん医療実用化研究事業 (AMED) R2~R4 年度「閉経後ホルモン依存性子宮体癌の発症・進展の新たな分子機構-男性ホルモン作用の解析と臨床応用-」

(分担) 500 千円

友杉充宏

1. 学術研究助成基金助成金 基盤研究 (C) R2~R4 年度「RB によるコレステロール代謝制御と前立腺がんの去勢抵抗性」(代表) 1,300 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 (D4)
Technical Assistance	Kuniko Minami	南邦子

【 Abstract 】

1. Megakaryocytosis in chronic myeloid leukemia (CML) pathogenesis

Transplantation of BCR-ABL-expressing hematopoietic stem/progenitor cells caused CML in mice with an increase in bone marrow BCR-ABL⁺ leukemic megakaryocyte-lineage (MgkL) cells, which exhibited enhanced senescence markers with increased expression of TGF- β 1, and p16 and p21, key molecules that are crucially involved in senescence. Moreover, knockout of p16 and p21 genes reduced both BCR-ABL-induced abnormal megakaryopoiesis and the maintenance of CML cell leukemogenic capacity. TGF- β 1 inhibition attenuated CML cell leukemogenic capacity both *in vitro* and *in vivo*. Thus, BCR-ABL induced the expansion of senescent leukemic MgkL cells, which supported CML leukemogenesis by providing TGF- β 1.

2. Cytoplasmic DNA accumulation-induced cell death of myeloid leukemia cells

At hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) to mouse myeloid leukemia models, double-stranded (ds)DNAs were constitutively secreted in the form of extracellular vesicles (EVs) from myeloid leukemia cells, and were transferred to the donor cells to dampen their hematopoietic capabilities. Autophagy regulated cytoplasmic dsDNA accumulation and subsequent redistribution into EVs, and accumulated cytoplasmic dsDNAs activated STING pathway, thereby reducing leukemia cell viability through reactive oxygen species (ROS) generation. Autophagosome formation inhibition induced cytoplasmic DNA accumulation to trigger cytoplasmic DNA sensing pathways to exert cytotoxicity preferentially in leukemia cells.

3. A transcription factor, Nfe2, in murine breast cancer metastasis to bone

We previously established 4T1.3 clone with a high capacity to metastasize to bone, from a murine triple-negative breast cancer (TNBC) cell line, 4T1.0. Comprehensive gene expression analysis detected enhanced *Nfe2* mRNA expression in 4T1.3 grown in a bone cavity. *Nfe2* gene transduction into 4T1.0 cells enhanced their capability to form intraosseous tumors. Moreover, *Nfe2* shRNA treatment reduced tumor formation arising from intraosseous injection of 4T1.3 clone as well as another mouse TNBC-derived TS/A.3 clone with an augmented intraosseous tumor formation ability. Furthermore, NFE2 expression was associated with *in vitro* growth advantages of these TNBC cell lines under hypoxic condition as well as Wnt pathway activation.

4. GPR56/ADGRG1 in breast cancer metastasis to bone

An adhesion G-protein coupled receptor, GPR56/ADGRG1, was expressed selectively in 4T1.3 grown in bone cavity while fibroblasts present in bone metastasis sites expressed its ligand, type III collagen. Consistently, GPR56/ADGRG1 proteins were detected in tumor cells in bone metastasis foci of human breast cancer. Intraosseous injection of GPR56/ADGRG1-deficient 4T1.3 cells reduced markedly intraosseous tumor formation, whereas that of GPR56/ADGRG1-transduced mouse and human breast cancer cell lines exhibited enhanced tumor formation. Moreover, the cleavage at the extracellular region was indispensable for GPR56/ADGRG1-induced increase in breast cancer cell growth upon its intraosseous injection.

<2020年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

1. 慢性骨髄性白血病 (CML)における巨核球増多の役割

BCR-ABL遺伝子導入骨髄幹/前駆細胞により起こるCMLでは、細胞老化形質を示し、TGF- β 1発現と細胞老化に必須の役割を果たしているp16・p21の発現亢進を示すBCR-ABL発現巨核球が骨髄内で増加していた。P16・p21重複欠損により、巨核球増加が消失するとともに、CML細胞の白血病発症能も低下した。さらに、TGF- β 1抑制によって、CML細胞の白血病発症能が低下することから、CMLにおいて増加している巨核球が供給するTGF- β 1によってCML細胞の白血病発症能が維持されていると考えられた。

2. 細胞室内DNA蓄積に伴う骨髄性白血病細胞の細胞死

マウス骨髄性白血病への骨髄幹細胞移植時に、レシピエントの白血病細胞が細胞外小胞 (EV) として恒常的に分泌する二重鎖(ds)DNA が、ドナー細胞に取り込まれ、ドナー細胞の増殖能を抑制した。オートファジーにより制御されている、細胞質内 dsDNA の蓄積と EV への移行によって起きる、STING 経路の活性とそれに伴う ROS 産生が白血病細胞の細胞死を誘導した。オートファゴソーム形成阻害によって、細胞質内 DNA の蓄積を介して、白血病細胞選択的な細胞死が生じた

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

マウス乳がん細胞株 4T1.0 株から樹立した、同所接種後に高率に骨へ転移する亜株 4T1.3 株の包括的遺伝子発現解析の結果、骨内の 4T1.3 株では Nfe2 の発現が亢進していた。Nfe2 遺伝子導入した 4T1.0 株では骨内投与による腫瘍形成が増強したが、Nfe2 発現を抑制した 4T1.3 株と TS/A.3 株 (高骨転移能を示す別のマウス乳がん細胞株) の骨内投与では腫瘍形成が減弱した。Nfe2 発現は、Wnt 経路の活性化を通して、骨内微小環境で認められる低酸素状態での増殖能の亢進に関与していることも示唆された。

4. 接着依存性 G タンパク会合型レセプター、GPR56/ADGRG1 と乳がん骨転移

GPR56/ADGRG1 が骨内で増殖している 4T1.3 株に選択的に発現していて、リガンドである III 型コラーゲンは骨転移巣の線維芽細胞に発現していた。GPR56/ADGRG1 はヒト乳がんの骨転移巣のがん細胞でも発現していた。GPR56/ADGRG1 遺伝子を欠損させた 4T1.3 株の骨内投与時の腫瘍形成は減弱したが、GPR56/ADGRG1 遺伝子導入した乳癌細胞株の骨内投与時の腫瘍形成能は亢進していた。さらに、細胞外領域での切断が GPR56/ADGRG1 による骨転移能亢進に関与していた。

【 研究業績 】

< 発表論文 >

原著論文

(研究室主体)

1. Zhang D, Iwabuchi S, Baba T, Hashimoto S, Mukaida N and Sasaki S. Involvement of a transcription factor, Nfe2, in breast cancer metastasis to bone. *Cancers* 2020, 12 (10): 3003. doi:10.3390/cancers12103003
2. Tanabe Y, Kawamoto S, Takaku T, Morishita S, Hirao A, Komatsu N, Hara E, Mukaida N, and Baba T. Expansion of senescent megakaryocyte-lineage cells maintains CML cell leukemogenesis. *Blood Adv* 2020, 4 (24): 6175–6188. doi: 10.1182/bloodadvances.2020003117.

(共同研究)

1. 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* 2020, 126: 154862. doi: 10.1016/j.cyto.2019.154862 .
2. Nosaka M, Ishida Y, Kimura A, Kuninaka Y, Taruya A, Ozaki M, Tanaka A, Mukaida N, and Kondo T. Crucial involvement of IL-6 in thrombus resolution in mice via macrophage recruitment and the induction of proteolytic enzymes. *Front Immunol* 2020, 10: 3150. doi: 10.3389/fimmu.2019.03150.
3. Ishida Y, Kuninaka Y, Yamamoto Y, Nosaka M, Kimura A, Furukawa F, Mukaida N, and Kondo T. Pivotal involvement of the CX3CL1-CX3CR1 axis for the recruitment of M2 tumor-associated macrophages in skin carcinogenesis. *J Invest Dermatol* 2020, 140 (10): 1951-961.e6. doi: 10.1016/j.jid.2020.02.023.
4. Ishida Y, Kuninaka Y, Nosaka M, Kimura A, Taruya A, Furuta M, Mukaida N, and Kondo T. Prevention of CaCl₂-induced aortic inflammation and subsequent aneurysm formation by the CCL3-CCR5 axis. *Nature Commun* 2020, 11: 5954. doi: 10.1038/s41467-070-19763-0.

総説論文・著書

1. Mukaida N, Sasaki S, and Baba T. Two-faced roles of tumor-associated neutrophils in cancer development and progression. *Int J Mol Sci* 2020; 21 (10): 3457. doi: 10.3390/ijms21103457.
2. Mukaida N, Zhang D, and Sasaki S. Emergence of cancer-associated fibroblasts as an indispensable cellular player in bone metastasis process. *Cancers* 2020; 12 (10): 2896. doi:10.3390/cancers12102896.
3. Mukaida N, Sasaki S, and Baba T. CCL4 signaling in the tumor microenvironment. In *Tumor microenvironment : The Role of Chemokines — Part A*. (Birbrair A eds.) *Adv Exp Med Biol* 2020, 1231, 23-32. doi: 10.1007/978-3-030-36667-4_3.

<学会発表> (筆頭発表者が分野所属の者に限る)

1. Zhang D, Sasaki S, Baba T, and Mukaida N. The crucial roles of transcription factor Nfe2 in murine triple negative breast cancer metastasis to bone. 第78回日本癌学会学術総会。2020年10月1日～3日。広島。
2. Sasaki S, Zhang D, Baba T, and Mukaida N. Crucial contribution of the Gpr45/Adgrg1 in the regulation of bone metastasis in murine breast cancer model. 78回日本癌学会学術総会。2020年10月1日～3日。広島。
3. Tanabe Y, Baba T, and Mukaida N. BCR-ABL-induced senescence-associated autophagy bring about maintenance of CML stemness. 78回日本癌学会学術総会。2020年10月1日～3日。広島。
4. 馬場智久, 向田直史. 慢性骨髄性白血病のTKI治療に対するオートファジー阻害剤の併用効果。第24回日本がん分子標的治療学会学術集会。2020年10月6日～8日。徳島。

<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) 「ウイルス・発がんを統合的に制御する新規B型肝炎分子免疫治療の開発」 (直接経費 2,600千円, 間接経費 780千円)

馬場智久

1. 科学研究費・基盤研究(C) (代表) 「ドナー細胞由来白血病の発症にかかわる細胞外小胞の病態生理学的役割の解明」 (直接経費 1,100千円, 間接経費 330千円)

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 1,000千円, 間接経費 300千円)