

# 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
Postdoctoral Researcher	Ryusuke Suzuki 鈴木 隆介
Graduate Student	Dewi Yuliana (D4), Purvee Erdenebaatar (D4), Ravdandorj Odongoo (D3), Yuhei Kishi 岸 勇平 (M1)
Assistant Staff	Hisayo Inotani 猪谷 久世

### 【 Abstract 】

Chromosomes contain all the genetic information required to grow and maintain a living organism. During mitosis, they are replicated and assorted identically into each daughter cell. Aneuploidy, a state of chromosome imbalance, is frequently observed in many types of cancer. JSAP2 (also known as JLP) can bind both kinesin and dynein motor proteins and regulate intercellular cargo trafficking as an adaptor protein. In recent years, overexpression of JSAP2 has been reported in various forms of cancer, and several groups have reported that downregulation of JSAP2 inhibits cancer cell proliferation and invasion. However, it remains unknown whether JSAP2 overexpression has some effects on non-transformed cells. We overexpressed JSAP2 in hTERT RPE1, a non-transformed cell line, and found remarkable increase in the proportion of aneuploid cells. By contrast, JSAP2 deletion mutants lacking kinesin-1 heavy chain-binding domain or dynactin p150<sup>Glued</sup>-binding domain were unable to induce aneuploidy. Collectively, these findings may suggest that JSAP2 regulates chromosome stability through its motor adaptor function and its dysregulation induces aneuploidy.

Curcumin, a major component of turmeric, is known to exhibit antitumor activity. Curcumin has been shown to induce reactive oxygen species, mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation, and cell death. Autophagy has been proposed as one of the protective mechanisms during curcumin-induced cell death. We explored the role of JSAP1 in curcumin-induced cancer cell death. The depletion of JSAP1 by shRNA-mediated knockdown or CRISPR-mediated knockout (KO) increased cell death induced by curcumin. Restoring the JSAP1 protein in the KO cells rescued the phenotype to a similar level of control parent cells. Activation of JNK and p38 MAPK was not largely affected by JSAP1 KO. Furthermore, analysis of autophagy markers showed impairment of autophagosome clearance in JSAP1 KO cells but not in control and rescued cells. These results suggest that JSAP1 protects cells from curcumin-induced cell death by modulating autophagy.

## <2020 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

### 1. 染色体安定性における JSAP2 の機能解析

染色体安定性の維持は 正常な発生や恒常性の維持に必要不可欠であり, その異常はがんの発生・悪性化や先天性疾患などと深く関わっている。これまでの多くの研究から, 染色体の均等分配機構は分子レベルで明らかにされつつある。しかし, 染色体分配に関わる鍵分子のダイナミックな局在変化を制御するメカニズムについては不明な点が多い。我々は, ヒト正常二倍体不死化 RPE1 細胞で JSAP2 タンパク質の発現レベルを上昇させると, 異数性細胞の割合が顕著に増加することを見出した。しかし, キネシン (あるいはダイニン・ダイナクチン) 結合領域を欠失した変異型 JSAP2 では発現亢進による異数性の誘導は認められなかった。これらの結果から, モーターアダプター JSAP2 は染色体の安定性維持において重要な役割を果たすと考えられる。今後, さらに解析を進め, JSAP2 による染色体安定性維持機構を分子レベルで明らかにする。

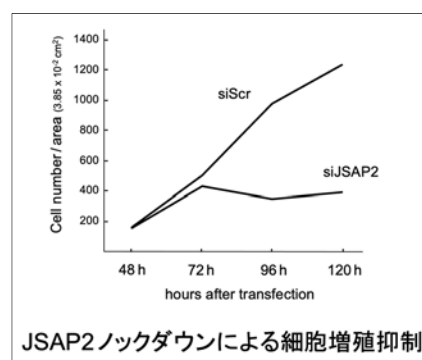
JSAP2 過剰発現による異数性の誘導

hTERT RPE-1	aneuploid cells
Parent	22.1 % (n = 86)
HA-JSAP2_WT	59.7 % (n = 77)
Parent	23.2 % (n = 82)
HA-JSAP2_ΔKBD	28.9 % (n = 90)
HA-JSAP2_ΔDBD	26.4 % (n = 87)

WT, 野生型; ΔKBD, キネシン重鎖結合部位欠失; ΔDBD, ダイナクチン p150<sup>Glued</sup> 結合部位欠失

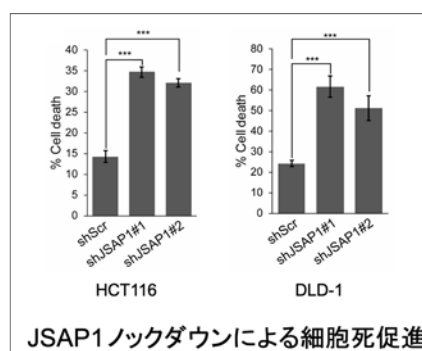
### 2. 細胞周期制御における JSAP の役割

JSAP1, 2 ダブルノックダウン (KD) RPE1 細胞 (shRNA による JSAP1 KD 細胞に JSAP2 に対する siRNA を導入した細胞) では, 増殖阻害が誘導されることを見出した。また, 細胞周期の解析から, この増殖阻害は G1 期停止の誘導によることを示唆する結果を得た。今後, より詳細な解析を行い, 細胞周期制御における JSAP の役割を明らかにする。



### 3. クルクミン誘導性細胞死における JSAP1 の役割とその分子機構

我々は, JSAP2 がリソソームの細胞内局在の新規制御因子として働くこと (Suzuki et al, DDT 2020) 及びクルクミン誘導性細胞死の制御に関与すること (Boldbaatar et al, BBRC 2020) を明らかにした。また, JSAP1 についても解析を行い, JSAP2 と同様, クルクミン誘導性細胞死に対して抑制的に働くことを見出した。しかし, JSAP1 は JSAP2 と異なり, オートファゴソームの分解に関与することが示唆された。さらに研究を進め, クルクミン誘導性細胞死における JSAP1 の役割とその分子機構を明らかにする予定である。



## 【 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 NH<sub>2</sub>-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in curcumin-induced cancer cell death *Biochem Biophys Res Commun*. 522(3): 697-703, 2020.
2. Suzuki R, Gunarta IK, Boldbaatar J, Erdenebaatar P, Odongoo R, Yoshioka K. Functional role of c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase-associated leucine zipper protein (JLP) in lysosome localization and autophagy. *Drug Discov Ther*. 14(1): 35-41, 2020.

(共同研究)

1. Yan Q, Zhu K, Zhang L, Fu Q, Chen Z, Liu S, Fu D, Nakazato R, Yoshioka K, Diao B, Ding G, Li X, Wang H. A negative feedback loop between JNK-associated leucine zipper protein and TGF- $\beta$ 1 regulates kidney fibrosis. *Commun Biol*. 3(1): 288, 2020.
2. Hanata N, Shoda H, Hatano H, Nagafuchi Y, Komai T, Okamura T, Suzuki A, Gunarta IK, Yoshioka K, Yamamoto K, Fujio K. Peptidylarginine Deiminase 4 Promotes the Renal Infiltration of Neutrophils and Exacerbates the TLR7 Agonist-Induced Lupus Mice. *Front Immunol*. 11: 1095, 2020.

### < 学会発表 >

1. 鈴木 隆介, 善岡 克次: Role of JLP in maintenance of chromosome stability. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月 2 日, WEB 配信 (広島)
2. Gunarta IK, Erdenebaatar P, Yuliana D, Yoshioka K. Role of JNK/SAPK-associated protein 1 (JSAP1) in curcumin-induced cell death. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 2 日, オンライン開催
3. Odongoo R, Suzuki R, Enomoto A, Tashiro K, Yoshioka K. Role of JSAP1 and JSAP2 in the regulation of cell proliferation and cell cycle progression. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 3 日, オンライン開催
4. 鈴木 隆介, Odongoo R, 岩淵 禎弘, 橋本 真一, 善岡 克次: Role of the adaptor protein JSAP2 in chromosome stability. 第 43 回日本分子生物学会年会, 2020 年 12 月 3 日, オンライン開催



### <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
2. 科学研究費補助金 研究活動スタート支援 (研究代表者：鈴木隆介) 「モーターアダプターJLPによる染色体安定性の制御機構」 1,100 千円
3. 高橋産業経済研究財団 (研究代表者：善岡 克次) 「国際連携による肝細胞癌の基礎研究」 2,000 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
Graduate Student	Dilireba Bolidong (D4), Hiroyoshi Nakanishi 中西宏佳 (D4), Masahiro Uehara 上原将大 (D4), Ryosuke Ota 太田亮介 (D3), Kensaku Abe 阿部健作 (整形外科; ~2020 年 3 月), 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; ~ 2020 年 3 月)

\*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 $\beta$ ; (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, all 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ . In addition to these projects, we have clarified the genetic and epigenetic characteristics of traditional serrated adenoma and duodenal non-ampullary adenoma and adenocarcinoma.

## <2020 年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

### 1. glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$ 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  のがん促進理論の強化のため、その機能解析を食道扁平上皮がん、ラット食道発がんモデル、腫瘍浸潤とがん幹細胞性を特徴とする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、2020 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  の機能を統合的に明らかにすることを目的とする。これとは別に、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 $\beta$  のゲノム編集による食道扁平上皮易発がん状態の誘発を試みる研究を2018年に開始し、目的の改変マウスを作出して、長期の経過観察を始めた。

### 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現在に至っている。この組織資源の共同利用促進のために、日本医療研究開発機構ゲノム医療支援サイト(<http://www.biobank.amed.go.jp/biobank/index.html>)に情報公開している。山梨大学:竹田 扇らが開発した大気圧イオン化法-質量分析を用いて、大腸がん質量分析診断法開発の共同研究を継続している。大腸組織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、島津製作所基盤技術研究所と共同で、大腸がんの質量分析-内視鏡診断法の内視鏡デバイス開発に着手した。組織バンク検体を利用して、名古屋市立大学(大腸鋸歯状腺腫)、香川大学(大腸がんテロメア解析)と共同研究を開始した。

## 【 研 究 業 績 】

### < 発表論文 >

#### 原著

1. Uehara M, Domoto T, Takenaka S, Bolidong D, Takeuchi O, Miyashita T, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  participates in acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. *Cancer Sci*, in publication. 2020 Sep 28. doi: 10.1111/cas.14668. Online ahead of print.
2. Ota R, Sawada T, Tsuyama S, Yao T, Sasaki Y, Suzuki H, Kaizaki Y, Hasatani K, Yamamoto E, Nakanishi H, Inagaki S, Tsuji S, Yoshida N, Doyama H, Kasashima S, Kubota E, Kataoka H, Tokino T, Minamoto T. Integrated genetic and epigenetic analysis of cancer-related genes in non-ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas. *J Pathol* 252 (3): 330-342, 2020. doi: 10.1002/path.5529. Epub 2020 Sep 12.
3. Bolidong D, Domoto T, Uehara M, Sabit H, Okumura T, Endo Y, Nakada M, Ninomiya I, Miyashita T, Wong RW, Minamoto T. Potential therapeutic effect of targeting glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in esophageal squamous cell carcinoma. *Sci Rep* 10 (1): 11807, 2020. doi: 10.1038/s41598-020-68713-9.
4. Chung Nien Chin S, O'Connor L, Scurr M, Busada JT, Graham AN, Alipour Talesh G, Tran CP, Sarkar S, Minamoto T, Giraud AS, Cidlowski JA, Sutton P, Menheniott TR. Coordinated expression loss of *GKN1* and *GKN2* in gastric cancer via impairment of a glucocorticoid-responsive enhancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 319 (2): G175-G188, 2020. doi: 10.1152/ajpgi.00019.2020. Epub 2020 Jun 15.
5. Nakanishi H, Sawada T, Kaizaki Y, Suzuki H, Yamamoto E, Ota R, Aoki H, Eizuka M, Hasatani K, Takahashi N, Kuno T, Inagaki S, Yamada S, Ebi M, Kubota E, Kataoka H, Takahashi S, Minamoto T<sup>1</sup>, Tokino T, Sugai T, Sasaki Y. Significance of gene mutations in Wnt signaling pathway in traditional serrated adenomas of the colon and rectum. *PLoS One* 15 (2): e0229262, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0229262. eCollection 2020.
6. Ailiken G, Kitamura K, Hoshino T, Satoh M, Tanaka N, Minamoto T, Rahmutulla B, Kobayashi S, Kano M, Tanaka T, Kaneda A, Nomura F, Matsubara H, Matsushita K. Posttranscriptional regulation of BRG1 by FIR $\Delta$ exon2 in gastric cancer. *Oncogenesis* 9 (2): 26, 2020. doi: 10.1038/s41389-020-0205-4.

7. 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 $\beta$  as a potential therapeutic target in synovial and fibrosarcoma. Cancer Sci 111 (2): 429-440, 2020. doi: 10.1111/cas.14271. Epub 2019 Dec 30. \*Equal contribution

#### 著書・総説

8. Abe K\*, Shimozaki S\*, Domoto T, Yamamoto N, Tsuchiya H, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  biology in bone and soft tissue sarcomas. J Cancer Metastasis Treat 6: 51, 2020. doi: 10.20517/2394-4722.2020.117. \*Equal contribution
9. Domoto T, Uehara M, Bolidong D, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in cancer biology and treatment. Cells 9 (6): 1388, 2020. doi: 10.3390/cells9061388.
10. Minamoto T. Detection and characterization of oncogene mutations in preneoplastic and early neoplastic lesions. Methods Mol Biol 2102: 419-37, 2020. doi: 10.1007/978-1-0716-0223-2\_24.

#### <学会発表>

1. 澤田 武, 太田亮介, 津山 翔, 八尾隆史, 波佐谷兼慶, 海崎泰治, 中西宏佳, 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, 鈴木 拓. 非乳頭十二指腸腫瘍における DNA メチル化と遺伝子変異の統合解析. 2020 年 2 月 7 日 (金) – 8 日 (土), 姫路ホテル日航姫路, 姫路市.
2. Takeshi Sawada, Ryosuke Ota, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Yasushi Sasaki, Hiromu Suzuki, Yasuharu Kaizaki, Kenkei Hasatani, Eiichiro Yamamoto, Hiroyoshi Nakanishi, Shigetsugu Tsuji, Naohiro Yoshida, Hisashi Doyama, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Toshinari Minamoto. Integrated genetic and epigenetic analysis of cancer-related genes in non-ampullary duodenal adenomas and mucosal adenocarcinomas. Digestive Disease Week® (DDW) 2020, May 02 (Sat) – 05 (Tue), 2020, McCormick Place, Chicago, Illinois, U. S. A.
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. 質量分析内視鏡を用いたリアルタイムがん診断システムの開発. 日本質量分析学会 第 68 回質量分析総合討論会, 2020 年 5 月 11 日 (月) – 13 日 (水), グランキューブ大阪, 大阪市.

4. Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Osamu Takeuchi, Tomoharu Miyashita, Toshinari Minamoto. GSK3 $\beta$  interconnects tumor invasion and stemness in pancreatic cancer acquiring resistance to gemcitabine. The 7th JCA-AACR Special Joint Conference for the Latest Advances in Pancreatic Cancer Research: From Basic Science to Therapeutics. June 9 (Tue)-11 (Thu), 2020. Kyoto Tokyu Hotel, Kyoto, Japan.
5. 阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林 克洋, 武内章彦, 三輪真嗣, 五十嵐健太郎, 源利成, 土屋弘行. 滑膜肉腫・線維肉腫に対するGSK3 $\beta$ を標的とした新しい分子標的治療. 第93回日本整形外科学会・学術集会, 2020年6月11日(木)－8月31日(月), 福岡市(ウェブ).
6. 堂本貴寛, 宮下知治, Bolidong Dilireba, 上原将大, 竹中 哲, 竹内 修, 太田哲生, 源利成. 膵がん細胞のゲムシタビン耐性化に伴う悪性進展機構の解明とGSK3 $\beta$ の役割. Role of GSK3 $\beta$  in malignant progression of pancreatic cancer associated with gemcitabine resistance. 第29回日本がん転移学会学術集会・総会, 2020年7月16日(木)－17日(金), 神戸国際会議場, 神戸市.
7. 中西宏佳, 吉田尚弘, 土山寿志. NBI併用拡大観察を用いたHelicobacter pylori除菌後胃癌の側方進展診断能の検討. Delineation of early gastric cancer after Helicobacter pylori eradication by using magnifying narrow-band imaging. 第99回日本消化器内視鏡学会総会, 2020年9月2日(水)－3日(木), 国立京都国際会館, 京都市.
8. 阿部健作, 山本憲男, 堂本貴寛, 林 克洋, 武内章彦, 三輪真嗣, 五十嵐健太郎, 樋口貴史, 源 利成, 土屋弘行. GSK3 $\beta$  阻害薬による滑膜肉腫・線維肉腫への新しい分子標的治療. 第53回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会, 2020年9月11日(金)－30日(木), ロイトン札幌, 札幌市(ウェブ).
9. Takahiro Domoto, Tomoharu Miyashita, Satoshi Takenaka, Masahiro Uehara, Dilireba Bolidong, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. GSK3 $\beta$  interconnects cancer stemness and invasive capacity in pancreatic cancer with acquired resistance to gemcitabine. 堂本貴寛, 宮下知治, 竹中 哲, 上原将大, ボリドン ディリレバ, 太田哲生, 源 利成. GSK3 $\beta$  はゲムシタビン耐性獲得膵がん細胞の幹細胞性と浸潤能に関与する. 第79回日本癌学会学術総会, 2020年10月1日(木)－3日(土), リーガロイヤルホテル広島, メルパルク広島, 広島県立総合体育館, 広島市(ハイブリッド).
10. Masahiro Uehara, Takahiro Domoto, Satoshi Takenaka, Diliraba Bolidong, Takeo Shimasaki, Tomoharu Miyashita, Tetsuo Ohta, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  as a new target to overcome acquired resistance to gemcitabine in



- pancreatic cancer. 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ボリドン, 島崎猛夫, 宮下知治, 太田哲生, 源 利成. Glycogen synthase kinase (GSK)-3 $\beta$  を標的とする膵がんのゲムシタビン獲得耐性の克服. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月 1 日(木) – 3 日(土), リーガロイヤルホテル広島, メルパルク広島, 広島県立総合体育館, 広島市(ハイブリッド).
11. Takeshi Sawada, Yasushi Sasaki, Ryosuke Ota, Sho Tsuyama, Takashi Yao, Hiroyoshi Nakanishi, Eiichiro Yamamoto, Eiji Kubota, Hiromi Kataoka, Hiromu Suzuki, Takashi Tokino, Toshinari Minamoto. Integrated genetic and epigenetic analysis in non-ampullary duodenal adenomas and intramucosal adenocarcinomas. 澤田 武, 佐々木泰史, 太田亮介, 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, 鈴木 拓, 時野隆至, 源 利成. 非乳頭十二指腸腺腫, 粘膜内癌におけるゲノム・エピゲノムの統合解析. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月 1 日(木) – 3 日(土), リーガロイヤルホテル広島, メルパルク広島, 広島県立総合体育館, 広島市(ハイブリッド).
  12. Keiko Yamakawa, Yuko Narusawa, Juanjuan Ye, Masanao Yokohira, Keishi Nakamura, Toshinari Minamoto, Yoko Matsuda. Morphological characteristics influence tumor stage in colorectal cancer. 山川けいこ, 成澤裕子, 葉 娟娟, 横平政直, 中村慶史, 源 利成, 松田陽子. 大腸癌の組織学的特徴は病期と関連する. 第 79 回日本癌学会学術総会, 2020 年 10 月 1 日(木) – 3 日(土), リーガロイヤルホテル広島, メルパルク広島, 広島県立総合体育館, 広島市(ハイブリッド).
  13. 阿部健作, 山本憲男, 林 克洋, 武内章彦, 三輪真嗣, 土屋弘行. GSK3 $\beta$  を標的とした滑膜肉腫・線維肉腫に対する新規分子標的治療の解析. 第 135 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会, 2020 年 10 月 9 日(金) – 11 月 10 日(火), 島根県立産業交流会館, 松江市(ウェブ).
  14. 上原将大, 堂本貴寛, 竹中 哲, ディリラバ ボリドン, 竹内 修, 宮下知治, 源 利成. GSK3 $\beta$  は膵がんのゲムシタビン耐性獲得に寄与する. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  participates in acquired resistance to gemcitabine in pancreatic cancer. 第 31 回日本消化器癌発生学会総会, 2020 年 11 月 27 日(金), 大阪国際会議場, 大阪市(ウェブ).
  15. ボリドン ディリレバ, 堂本貴寛, 上原将大, 奥村知之, 遠藤良夫, 中田光俊, 二宮 致, 宮下知治, ウォン リチャード, 源 利成. GSK3 $\beta$  阻害による食道扁平上皮がんの治療効果とメカニズム. Potential therapeutic effect of targeting glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in esophageal squamous cell carcinoma. 第 31 回日本消化器癌発生学会総会, 2020 年 11 月 27 日(金), 大阪国際会議場, 大阪市(ウェブ).

## <外部資金>

1. 2020 年－2022 年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 課題番号 20K09100  
宮下知治(代表), 源 利成, ほか(分担)  
課題: GSK3 $\beta$  を基軸とした食道発癌機構の解明と新規治療戦略の開発  
研究経費: 4,160,000 円(直接経費 3,200,000 円, 間接経費 960,000 円)
  
2. 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)
  
3. 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 $\beta$  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)
  
4. 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)
  
5. 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)
  
6. 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



## 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 (D4) Kusuma Suphakhong (D3) Hanbing Lyu (D2) Risa Takatsuka 高塚理沙 (D2) Gerelsuren Batbayar (D2)
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 in the various steps of the malignant progression of cancer. This year we investigated the roles of new types of epigenetic regulators, an RNA methyltransferase METTL3 and a pioneer transcription factor FOXA1. METTL3 is a catalytic enzyme of N6-Methyladenosine (m6A) modification of RNA. We found that m6A modification and METTL3 expression were increased in TGF- $\beta$ -induced EMT of lung cancer cells. Mechanistic investigations revealed that METTL3 is indispensable for TGF- $\beta$ -induced EMT through the regulation of JUNB mRNA that encodes one of the important transcriptional regulators of EMT. 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. On the other hand, FOXA1 is a pioneering transcription factor that can bind to and open “closed chromatin” and trigger transcriptional events on target genes. In the collaborative study with Dr. Yano, we observed that FOXA1 epigenetically activated the expression of IGF-1R in response to osimertinib (EGFR-TKI) treatment in EGFR mutated non-small cell lung cancer cells. Since activation of IGF-1R signaling pathway contributed to osimertinib resistance, an indispensable role of FOXA1 was demonstrated on the emergence of drug tolerant cells via IGF-1R activation during the EGFR-TKI treatment of lung cancer cells.

### <2020 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 修飾と、それを担う METTL3 酵素の発現は、肺がん細胞の TGF- $\beta$ 誘導 EMT の過程で有意に増加する。ノックダウン実験から、METTL3 酵素が EMT の進行や細胞の運動性の上昇に必須であることが示された。また、m6A 修飾を受ける標的遺伝子候補のうち、JUNB 転写制御因子が METTL3 による EMT 制御に重要であることがわかった。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 の化学修飾が重要な役割を担うことを見いだした。

## 2. 肺がん細胞の EGFR-TKI 耐性獲得に関与するエピジェネティック制御因子

EGFR 変異を持つ非小細胞肺がんのうち、AXL 低発現のがん細胞は、高発現のものに比べてオシメルチニブ (EGFR-TKI) に対する感受性が高いが、それでもやはり薬剤耐性細胞が出現する。この耐性獲得には、薬剤による IGF-1R の発現上昇と活性化が関与する。矢野教授との共同研究により、オシメルチニブによる IGF-1R の発現上昇を誘導するのは、オープンクロマチン構造形成を担うパイオニア転写因子 FOXA1 であることを発見した。FOXA1 ノックダウンが薬剤耐性細胞の出現を著しく抑制することから、薬剤耐性克服のための新しい治療標的として注目される。

## 3. 乳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作用する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 細胞とエピジェネティック制御因子 sgRNA 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、ヒストン脱メチル化酵素である KDM3B, KDM8 とヒストンアセチル化酵素 X 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細胞のスフィア形成能、細胞増殖・浸潤能に寄与することが確認された。今後、これらの酵素が直接的に制御する標的遺伝子を同定し、乳がん悪性進展過程における役割を明らかにする計画である。

## 4. 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

ヒストンの 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の中から EMT 制御転写因子の候補を探索した。選抜された候補には、SNAIL や SLUG など既知の EMT 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。これらの転写因子について、ノックダウンや過剰発現実験を行い EMT への関与を調べて、候補の絞り込みを進めている。今後、候補転写因子の作用メカニズムを解明し、がん転移における EMT 制御機構の理解に貢献したい。

## 【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.*, 524(1): 150-155, 2020.
  2. Wanna-Udom S, Terashima M, Suphakhong K, Ishimura A, Takino T and Suzuki T. KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines. *J Biol. Chem.*, in press.
- (共同研究)
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.*, 521(1):137-144, 2020.
  4. Takino T, Suzuki T and Seiki M. Isolation of Highly Migratory and Invasive Cells in Three-Dimensional Gels. *Curr Protoc Cell Biol.*, 6(1):e103, 2020.
  5. Sakai K, Nishiuchi T, Tange S, Suzuki Y, Yano S, Terashima M, Suzuki T and Matsumoto K. Proteasomal degradation of polycomb-group protein CBX6 confers MMP-2 expression essential for mesothelioma invasion. *Sci Rep.*, 10(1):16678, 2020.
  6. Wang R, Yamada T, Kita K, Taniguchi H, Arai S, Fukuda K, Terashima M, Ishimura A, Nishiyama A, Tanimoto A, Takeuchi S, Ohtsubo K, Yamashita K, Yamano T, Yoshimura A, Takayama K, Kaira K, Taniguchi Y, Atagi S, Uehara H, Hanayama R, Matsumoto I, Han X, Matsumoto K, Wang W, Suzuki T and Yano S. Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer. *Nat Commun.*, 11(1):4607, 2020.
  7. Saifullah, Sakari M, Suzuki T, Yano S and Tsukahara T. Effective RNA knockdown using CRISPR-Cas13a and molecular targeting of the EML4-ALK transcript in H3122 lung cancer cells. *Int J Mol Sci.*, 21(23):e8904, 2020.

### <学会発表>

国内学会

1. Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Functional analysis of the RNA methyltransferase in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第79回日本癌学会学術総会（広島2020年10月）
2. Takino T, Suzuki T and Takatsuka R. TGF-beta1 stimulates MT1-MMP-mediated MMP-9 activation and invasion in oral squamous cell carcinoma cells. 第79回日本癌学会学術総会（広島2020年10月）
3. Ishimura A, Wanna-Udom S, Tange S, Lyu H, Batbayar G, Terashima M and Suzuki T. CRISPR/Cas9 screening of epigenetic factors related to breast cancer malignancy. 第43回日本分子生物学会年会（2020年12月）
4. Terashima M, Ishimura A, Nishimura T, Tange S, Hazawa K, Wong RW and Suzuki T. The mechanism of transcriptional regulations controlling EMT in cancer cells. 第43回日本分子生物学会年会（2020年12月）
5. Suzuki T, Terashima M, Wanna-Udom S, Lyu H, Ishimura A, Sakari M and Tsukahara T. Functional analysis of the epigenetic factors in the transcriptional regulation of epithelial-mesenchymal transition. 第43回日本分子生物学会年会（2020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, 1,100 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, 1,100 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」