

新學術創成研究機構 PI・若手 PI

Inflammation and Epithelial Plasticity

上皮可塑性・炎症ユニット

Associate Professor	Dominic Chih-Cheng VOON
Graduate Student	Zachary YONG (D4) (Co-supervisor: Prof. Masanobu Oshima)
	Linxiang GONG (M2) (Co-supervisor: Prof. Chiaki Takahashi)

【 Abstract 】

The link between inflammation and cancer has long been established. A proinflammatory tumor microenvironment is generally regarded as one that promotes carcinogenesis, tumor growth and the suppression of tumor immunity. Although great advances have been made in terms of the cellular composition and immune interaction within a tumor niche, how cell-intrinsic mutations within the epithelium drive this process, through the aberrant secretion of growth factors and cytokines, is under appreciated. We are interested in two specific aspects of this interaction: 1) the role of epithelial-derived IL23A (eIL23A) in modulating immunity during gastrointestinal infection and carcinogenesis; and 2) the increased epithelial plasticity during gastrointestinal inflammation and repair.

< 2020 research achievement and future plan >

During this year, we successfully published our findings on the co-regulation of epithelial cell-derived IL23A by mitogenic and inflammatory signals in intestinal epithelial cells. We made two key observations: Firstly, there is a strong cooperativity between MAPK and canonical NF- κ B pathways in inducing *IL23A*. This stems from the cooperative assembly of a transcription enhancer complex by AP-1/c-Jun and RelA/p65 on the *IL23A* proximal promoter. As AP-1/c-Jun and RelA/p65 are the downstream effectors of MAPK and NF- κ B pathways, respectively, their synergy meant that the inhibition of one pathway would effectively block the other. In our study, we effectively demonstrated this through the use of the MEK inhibitor trametinib and the BAY-11-7082, an IKK α /I κ B inhibitor. Secondly, we showed for the first time the secretion of endogenous IL23A by activated epithelial cells and provided empirical evidence that this was achieved remarkably without IL23A's canonical partner, IL12B.

Our focus now shifts to the detailed characterization of this novel form of IL23A. To this end, we have raised new monoclonal antibodies that would specifically recognize epithelial-derived IL23A/eIL23A. The utility of these new tools in clinicopathological applications will now be assessed. In addition, in depth analyses of eIL23A is underway where we study the collaboration between eIL23A and canonical IL-23 in the induction of Th17-type

response in primary mouse immune cells. Lastly, we observed in a isogenic transplantation model that IL-23/IL23A exerts a pro-tumor immunity effect in immune competent mice. We are deepening this study to evaluate a potential role for eIL23A to influence the tumor immune microenvironment, which may have therapeutic implications in view of recent reports and our earlier findings that trametinib could attenuate the production of eIL23A.

【 Achievements 】

<Publications (Primary)>

1. 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*** (2020) *Inflammatory and mitogenic signals drive interleukin 23 subunit alpha (IL23A) secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells*. J Biol Chem. **295**(19):6387-6400. *Joint Corresponding Author.

<Publications (Collaboration)>

2. Hazawa M*, Sakai K, Kobayashi A, Yoshino H, Iga Y, Iwashima Y, Lim KS, **Voon DC**, Jiang YY, Horike SI, Lin DC, Wong RW* *Disease-specific alteration of karyopherin- α subtype establishes feed-forward oncogenic signaling in head and neck squamous cell carcinoma*. Oncogene. **39**(10):2212-222. *Joint Corresponding Author.

<Symposiums (Oral Presentations)>

1. **Voon DC**. *Understanding how IL23A expression is controlled by inflammation and growth signals in epithelial cells*. 5th InFiniti Symposium. 18th Feb 2020. Kanazawa, Japan.
2. Yong ZWE, Lim KS, 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 IL23A secretion independent of IL12B in intestinal epithelial cells* 79th Annual Meeting of Japanese Cancer Association. 1st-3rd Oct 2020. Hiroshima, Japan.

Cancer-Immune System Interactions

がん-免疫系相互作用ユニット

Associate Professor (11 月 1 日～) Kohsuke Tsuchiya 土屋 晃介

【 Abstract 】

Pyroptosis is a pro-inflammatory form of regulated necrosis caused due to the formation of plasma membrane pores by gasdermin (GSDM) family proteins. Although GSDMs are expressed as inactive forms, they are proteolytically activated by certain proteases, leading to pyroptosis. Caspase-1, an inflammatory caspase, is known to induce pyroptosis by cleaving GSDMD. Recently, we have demonstrated that caspase-1 also serves as an apoptosis-initiating caspase in the absence of GSDMD and that Bid plays a critical role in caspase-1-induced apoptosis. However, an additional mechanism that mediates this cell death independently of Bid has also been suggested. Our study suggests that caspase-7, a substrate of caspase-1, mediates apoptosis induced by caspase-1 in a Bid-independent manner. Caspase-1 also processes pro-IL-1 β into the biologically active cytokine IL-1 β , which is in turn released from macrophages via GSDMD pores. We demonstrated that IL-1 β was released from living macrophages independently of GSDMD during stimulation with mycoplasmal lipoproteins/lipopeptides, suggesting a novel mechanism for IL-1 β release. It has been suggested that caspase-1 activation leads to IL-1 α maturation. However, pro-IL-1 α is not a substrate for caspase-1, and the mechanism of caspase-1-induced IL-1 α maturation remains unclear. We found that GSDMD processed by caspase-1 forms membrane pores that mediate Ca²⁺ influx, resulting in calpain-dependent maturation of IL-1 α .

<2020 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

カスパーゼ-1 誘導性アポトーシスの第二経路を担うシグナル伝達分子としてカスパーゼ-7 を同定した。また, 北大・口腔分子生物学教室との共同研究で, マイコプラズマ由来リポペプチドが GSDMD 非依存的に IL-1 β の放出を誘導することを報告した。さらに, GSDMD 依存的なカルパイン活性化がインフラマソームの下流で誘導される IL-1 α の成熟化に重要な役割を果たすことを明らかにした (投稿中)。今後, これまで行ってきたカスパーゼ誘導性細胞死の研究をさらに発展させるために, パイロトーシスを誘導するプロテアーゼを多様な病的状況から同定し, 病態形成におけるその役割を検討する。

【 研 究 業 績 】

< 発表論文 >

原著（研究室主体）

Mahib M.R., Hosojima S., Kushiya H., Kinoshita T., Shiroishi T., Suda T.*, Tsuchiya K.*. Caspase-7 mediates caspase-1-induced apoptosis independently of Bid. *Microbiology and Immunology*. **64**(2):143-152. (2020).

原著（共同研究）

Saeki A., Tsuchiya K., Suda T., Into T., Hasebe A., Suzuki T., Shibata K.I. Gasdermin D-independent release of interleukin-1 β by living macrophages in response to mycoplasmal lipoproteins and lipopeptides. *Immunology*. **161**:114-122. (2020)

総説（研究室主体）

Tsuchiya K.*. Inflammasome-associated Cell Death: Pyroptosis, Apoptosis, and Physiological Implications. *Microbiology and Immunology*. **64**:252-269 (2020)

< 学会発表 >

1. Kohsuke Tsuchiya, Takashi Suda. Gasdermin D mediates the release and maturation of IL-1 α during inflammasome formation. 第 93 回日本細菌学会総会 2 月 20 日 名古屋市

< 外部資金 >

1. 土屋晃介: 科研費 基盤研究 (C) 「細菌感染治療の分子基盤を自然免疫機構と化学療法との協調的相互作用から理解する試み」(代表) (2018~2020 年) (R2 年度) 直接経費 900 千円
2. 土屋晃介: 科研費 基盤研究 (B) 「パイロトーシス細胞が放出するリステリア増殖抑制因子の解析」(分担) (2020~2022 年) (R2 年度) 直接経費 370 千円
3. 土屋晃介: 北国がん基金 「炎症性がん微小環境の形成におけるカスパーゼ 1 依存的細胞死の役割の解明」(代表) (2020 年) 500 千円

Microenvironment Regulation in Cancer Stem Cells Unit

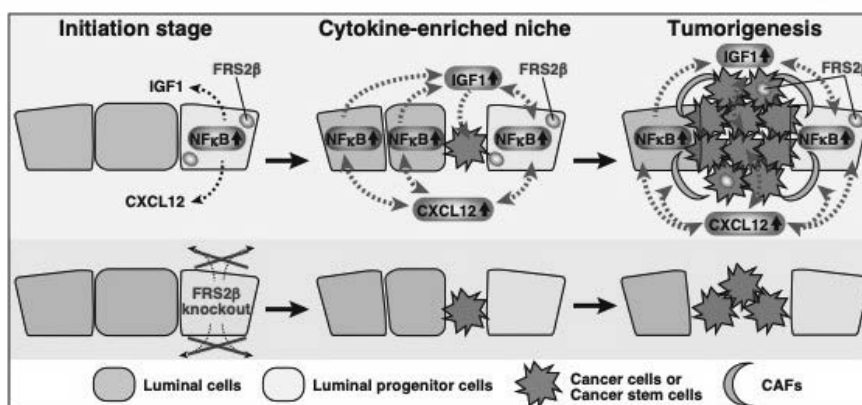
がん幹細胞環境制御ユニット

Assistant Professor Yasuto Takeuchi 竹内 康人

【 Abstract 】

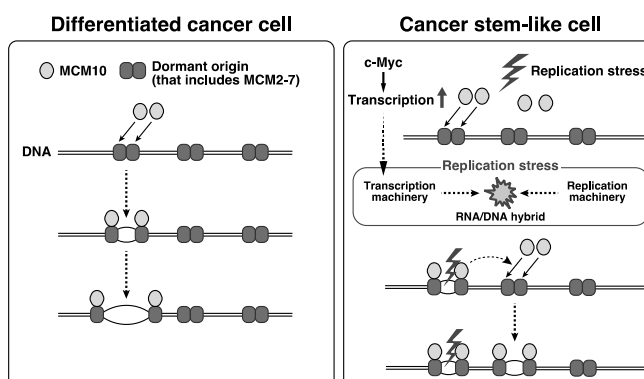
Accumulating evidence indicates the presence of cancer stem-like cells (CSCs) in many types of tumors. They are defined as cell populations which have self-renewal ability and multi-differentiation capacity, and have been thought to contribute to tumor initiation and recurrence. Stem-cell properties are thought to be maintained in the CSC niche that is the tumor microenvironment surrounding CSCs. Therefore, our final goal is to identify key factors regulating the interaction between cancer stem-like cells (CSCs) and their niche.

We demonstrated that FRS2 β was expressed in a small subset of luminal progenitor cells and induced the production of cytokines, including IGF1 and CXCL12, through activation of the NF κ B pathway. IGF1 and CXCL12 amplify NF κ B activation in surrounding mammary cells, leading to the establishment of a cytokine-rich microenvironment. This microenvironment supports the growth of cancer cells and facilitates the migration of stroma cells and immune cells to develop more favorable condition for breast cancer.



<2020 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

2020 年は、乳がん幹細胞の薬剤耐性メカニズムに関する研究で以下の成果を上げた。乳がん幹細胞では、DNA 複製ストレスが強くかかっていることが知られていたが、DNA 複製ストレスがかかったまま、どのように薬剤耐性を獲得しているのか、そのメカニズムは不明であった。一般的に細胞に DNA 複製ストレスが強くかかると、DNA 複製が停止してしまうが、乳がん幹細胞では、MCM10 と呼ばれるタンパク質が、新たな複製起点を活性化し、DNA 複製を進めていることを明らかにした。本研究によって、DNA 複製ストレス下における MCM10 の機能は、がん幹細胞の薬剤耐性にも関与しており、がん幹細胞に対する新たな治療標的を発見した。



今後は、がん幹細胞と、その周囲に存在するがん組織を形成する周囲細胞との相互作用に着目した研究を進めていく。がん幹細胞が周囲細胞によってどのように制御されているのか、そのメカニズムを明らかにしたい。

【 研 究 業 績 】

<発表論文>

1. **Y. Takeuchi**[†], N. Kimura[†], T. Murayama[†], Y. Machida, D. Iejima, T. Nishimura, R. Sakamoto, M. Yamamoto, N. Itano, Y. Inoue, M. Ito, N. Yoshida, J. Inoue, K. Akashi, H. Saya, K. Fujita, M. Kuroda, I. Kitabayashi, A. Tojo, N. Gotoh. The membrane-linked adaptor FRS2b fashions a cytokine-rich inflammatory microenvironment that promotes breast cancer carcinogenesis. [†]Equally contribution. *Proc Natl Acad Sci, USA*, under revision.
2. T. Murayama[†], **Y. Takeuchi**[†], K. Yamawaki, T. Natsume, R. Chaverra, T. Nishimura, Y. Kogure, A. Nakata, K. Tominaga, A. Sasahara, M. Yano, S. Ishikawa, T. Ohta, K. Ikeda, K. Horie-Inoue, S. Inoue, M. Seki, Y. Suzuki, S. Sugano, T. Enomoto, M. Tanabe, K. Tada, M. Kanemaki, K. Okamoto, A. Tojo, N. Gotoh. MCM10 compensates for Myc-induced DNA replication stress in breast cancer stem-like cells. [†]Equally contribution. *Cancer Science*. 2021. Mar;112(3):1209-1224.
3. **Y. Takeuchi**, R. Narumi, R. Akiyama, V. Elisa, T. Shirai, N. Tanimura, K. Kuromiya, S. Ishikawa, M. Kajita, M. Tada, Y. Haraoka, Y. Akieda, T. Ishitani, Y. Fujioka, Y. Ohba, S. Yamada, Y. Hosokawa, Y. Toyama, T. Matsui, Y. Fujita*. Calcium wave promotes cell extrusion. *Current Biology*. 2020. Feb 24;30(4):670-681.

<学会発表>

1. **竹内康人**、村山貴彦、西村建徳、矢野正雄、笹原麻子、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、井上聡、堀江公仁子、岡本康司、東條有伸、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会, オンライン, 2020.10.29-30.
2. **竹内康人**、村山貴彦、西村建徳、矢野正雄、笹原麻子、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、井上聡、堀江公仁子、岡本康司、東條有伸、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, オンライン, 2020.10.6-8.
3. **竹内康人**、村山貴彦、西村建徳、矢野正雄、笹原麻子、田辺真彦、石川聡子、太田哲生、多田敬一郎、池田和博、井上聡、堀江公仁子、岡本康司、東條有伸、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, オンライン, 2020.10.1-3.
4. **竹内康人**、後藤典子：細胞質アダプタータンパク FRS2 β 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, オンライン, 2020.9.11.

<外部資金>

1. 令和2年度 新学術創生研究機構 異分野融合研究推進費 代表
「がん幹細胞の分裂様式決定メカニズムの解明」(1,600,000 円)
2. 令和2年度 戦略的研究推進プログラム 先魁プロジェクト2020 分担
「イオン性材料で革新するライフサイエンス」(500,000 円)

Mitochondrial Dynamics in Stem Cells

ミトコンドリア動態ユニット

Assistant Professor

Atsuko KASAHARA 笠原敦子

【Abstract】

Mitochondria play pleiotropic roles in glucose-amino acids-lipid metabolic pathways, calcium and redox homeostasis, and apoptosis. These diverse mitochondrial functions are reflected by their extremely dynamic morphology, and distribution in the cells. Mitochondrial quality, distribution, size, and motility are excellently tuned by their continuous fusion and fission.

Mitochondrial fusion factor and anti-apoptotic protein OPA1 was up-regulated in gefitinib-resistant lung adenocarcinoma cell line, and down-regulation of OPA1 in these resistant cells restored the gefitinib sensitivity. Likewise, the OPA1 specific inhibitor, developed in the laboratory of Prof. Scorrano (University of Padua) also restored the gefitinib sensitivity in these resistant cells. This effect was mediated by the reduction of OPA1 inhibition of cytochrome c release. We will validate the effect of this drug on xenograft.

ER-mitochondria contacts are important for proper calcium uptake from the ER to the mitochondria, and phospholipids synthesised in both organelles are shuttling at the contacts. ER-mitochondria contacts are less in glioma stem-like cells, while the contacts are more in differentiated glioma cells. Likewise, undifferentiated embryonic stem cells (ESCs) displayed distant two organelles with fewer contacts, while differentiated cardiomyocytes (CM) showed close organelles with more contacts, with up-regulation of MFN2, which is a known tether protein. Since two organelles are closer upon CM differentiation, I hypothesised more phosphatidylserine (PS) goes to mitochondria from the ER, and is converted to phosphatidylethanolamine (PE). PS-PE conversion was low in CM compared to ESCs, and PC was detected instead using ^{14}C serine label trace experiment in a collaboration with Dr Miyata at Kyushu University. Since PE-PC conversion requires methyl group addition, SAM/SAH ratio was measured by Dr Arakawa, Faculty of Pharmacy Institute of Medical, and the ratio was reduced upon CM differentiation. We will perform these experiments using Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) knockdown ESCs. Moreover, we will use the ER-mitochondria synthetic linker construct in order to understand whether the physical contacts without specific protein could influence the stemness/differentiation and phospholipids metabolism.

<2020 年の研究成果, 進捗状況及び今後の計画>

ミトコンドリアは、糖・アミノ酸・脂質代謝、 Ca^{2+} レベル、アポトーシスを制御するプラットフォームであり、細胞最大のパワープラントである、重要なオルガネラである。ミトコンドリアの融合と分裂、細胞骨格、モータータンパク質などが協調し、その特異的な形態、細胞内局在が調整されており、ミトコンドリアの多彩な機能は、随時変化するその形態と細胞内局在に由来する。

これまでに薬剤 (gefitinib) 耐性肺がん細胞で、ミトコンドリア融合因子 OPA1 の発現上昇を見出しており、OPA1 の発現低下によって gefitinib の感受性が回復したが、同様に、Scorrano 研究室 (イタリア) で同定された OPA1 特異的阻害剤が、gefitinib の感

受性を回復させること、OPA1 による cytochrome c の放出阻害を低下させることを確認した。今後は xenograft で、マウス個体でのこの薬剤の効果を評価する。

ミトコンドリアは小胞体との接点を通じて、Ca²⁺を取り込み、リン脂質は両オルガネラ感を行き来している。グリオーマの幹細胞様細胞と分化細胞で見出したミトコンドリアと小胞体の距離、接点の違いを、ES 細胞と ES 細胞から分化させた心筋細胞でも同様に見出した。グリオーマ同様に細胞分化にともなって、ミトコンドリアと小胞体を繋ぐ因子、MFN2 の発現が上昇する。心筋分化にともなって、ミトコンドリアと小胞体は近づき、より多くの接点が生じるので、より PS がミトコンドリアへ移行し、PE へ変換されていると予想していたが、むしろ PS-PE 変換率は ES 細胞の方が高く、一方で、分化心筋細胞では、ES 細胞では検出されない PC が検出された（共同研究・九州大学宮田先生）。PS から変換された PE がさらに小胞体へ戻されて、PC まで変換されていると考えられる。PE-PC 変換には必要なメチル基供与体 S-Adenosyl methionine (SAM) と SAM がメチル基を失った S-Adenosyl-L-homocysteine (SAH) を LC-MS/MS で定量したところ、分化心筋細胞では、ES 細胞に比べ、SAM/SAH が大きく低下していることを確認した（共同研究・薬学系荒川先生）。そこで、今後は PE-PC 変換が関与するメチル化量の変化を調べるために、PE-PC 変換酵素、Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase (PEMT) の発現低下 ES 細胞を用いて実験を行う。また、特異的なタンパク質を介さない物理的なオルガネラの距離・接点とこれら表現型との関連を調べるため、人工的にミトコンドリアと小胞体をつなぐリンカーコンストラクトを用いて実験を行う。

【 研 究 業 績 】

< 発表論文 >

1. 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 18;11(1):1666
2. Ueno M, Tomita T, Arakawa H, Kakuta T, Yamagishi T, Terakawa J, Daikoku T, Hiroke 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. *Communications Chemistry* 2020 3; 183

< 学会発表 >

「幹細胞性におけるミトコンドリア動態の果たす役割について」笠原敦子、第 93 回生化学会大会、2020 年 9 月 14-16 日、『ミトコンドリアでつながる細胞機能』シンポジウム 2S10a

< 外部資金 >

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）基盤研究（C）

「がん幹細胞性におけるミトコンドリア動態の果たす役割を明らかにする」
3,300 千円 3 年間