



令和3年度金沢大学がん進展制御研究所

共同利用・共同研究拠点 研究成果報告会

日時：2022. 2.17 (木)

[場所]
オンライン
(Zoom)

プログラム・発表抄録集



金沢大学がん進展制御研究所
Cancer Research Institute Kanazawa University



金沢大学
KANAZAWA
UNIVERSITY

令和3年度がん進展制御研究所
共同利用・共同研究拠点研究成果報告会

日 時：令和4年2月17日（木）

場 所：オンライン（Zoom）

プログラム

13:00～13:10 開会のあいさつ 金沢大学理事（研究・社会共創担当）和田 隆志

【共同研究成果報告1】 ————— 座長：金沢大学がん進展制御研究所 土屋 晃介

13:10～13:40 Interleukin-11 産生間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明
東邦大学医学部生化学講座 病態生化学分野 仁科 隆史・・・1

13:40～14:10 がん悪性化に関わる増殖因子シグナルの制御機構
大阪大学微生物病研究所 発癌制御研究分野 梶原 健太郎・・・2

14:10～14:40 Bcl11a は PU.1 標的遺伝子の抑制を介して AML の発症・悪性化を促進する
公益財団法人がん研究会がん研究所 発がん研究部 角南 義孝・・・3

コーヒーブレイク（14：40～15：00）

【共同研究成果報告2】 ————— 座長：金沢大学がん進展制御研究所 中山 瑞穂

15:00～15:30 転移性大腸がん幹細胞の可塑性・未分化性に関するシグナル経路の解析
愛知県がんセンター研究所 がん病態生理学分野 青木 正博・・・4

15:30～16:00 代謝フラックス解析から見えてきた好氣的解糖のメリット
大阪大学大学院情報科学研究科 バイオ情報計測学講座 岡橋 伸幸・・・5

16:00～16:30 患者由来 xenograft (PDX) モデルを用いた難治性乳がんの治療標的の探索
東京医科歯科大学 システム発生再生医学分野 栗本 遼太・・・6

16:30～17:00 希少ドライバー遺伝子異常を有する肺がんにおける治療抵抗性機構の解明と克服
京都府立医科大学 呼吸器内科 谷村 恵子・・・7

17:00～ 閉会のあいさつ 金沢大学がん進展制御研究所所長 松本 邦夫

Interleukin-11 産生間質線維芽細胞を介した大腸がん形成機構の解明

東邦大学医学部生化学講座 病態生化学分野・仁科 隆史
金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍遺伝学研究分野・大島 正伸

大腸がんの発生や進展において、がん細胞の周囲に存在する間葉系組織の重要性が示唆されている。そのため、がん細胞だけでなく、がん細胞周囲の細胞の特徴や役割を明らかにし、これらの細胞を介したシグナルネットワーク機構を明らかにすることが、新たな治療戦略を創出する上で重要であると考えられる。

Interleukin (IL)-11 は、IL-6 サイトカインファミリーに属するサイトカインである。大腸がん患者の腫瘍部では IL-11 の産生が認められ、腫瘍マウスモデルを用いた解析から IL-11 が腫瘍形成を促進していることが報告されている。しかしながら、生体における IL-11 産生細胞や産生機構については依然として不明な点が多い。我々は、IL-11 産生を *in vivo* でモニタリングするために、IL-11 遺伝子のレポーターマウスを新たに樹立した。樹立したレポーターマウスを用いて大腸がんモデルマウスおよび大腸炎モデルマウスを作出し解析した結果、大腸がん形成や大腸炎に伴い、間質に存在する線維芽細胞より IL-11 が産生されることを見出した。IL-11 産生線維芽細胞の特性を明らかにするために、IL-11 産生線維芽細胞で高発現している遺伝子を解析した結果、組織修復や管腔形成などに関わる遺伝子を特徴的に高く発現しており、これらの遺伝子の多くは、ヒト大腸がん間質においても発現が認められ、その一部は大腸がんの予後の悪さと相関していた。また、大腸がん形成に働く IL-11 は、がん細胞ならびに線維芽細胞自身に作用するだけでなく、大腸炎に伴って産生される IL-11 は、大腸炎減弱に寄与しており、この IL-11 産生はミエロイド系細胞によって制御されていることが明らかとなった。

すなわち、大腸がん形成に関わる線維芽細胞は、他の細胞との相互作用によってその働きが制御されており、IL-11 産生線維芽細胞を介した細胞間ネットワーク機構を明らかにすることは、大腸がんの形成機構の理解のためには重要であると考えられる。

参考文献

1. Nishina T, Deguchi Y, Ohshima D, Takeda W, Ohtsuka M, Shichino S, Ueha S, Yamazaki S, Kawauchi M, Nakamura E, Nishiyama C, Kojima Y, Adachi-Akahane S, Hasegawa M, Nakayama M, Oshima M, Yagita H, Shibuya K, Mikami T, Inohara N, Matsushima K, Tada N, Nakano H. Interleukin-11-expressing fibroblasts have a unique gene signature correlated with poor prognosis of colorectal cancer. *Nat. Commun.*, 12, 2281, 2021.

がん悪性化に関わる増殖因子シグナルの制御機構

大阪大学微生物病研究所 発癌制御研究分野・梶原 健太郎
金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍動態制御研究分野・松本 邦夫

がん細胞は周囲から様々な増殖因子を受取ることで様々な悪性形質を獲得する。その一連の悪性化メカニズムの理解と制御に向けた様々な研究が進められている。しかし、がんの悪性化を促す増殖因子のシグナル伝達は非常に複雑であり、その全貌解明に向けた多角的な研究が展開されている。我々は、腎臓の恒常性維持において肝細胞増殖因子 (HGF) 受容体 Met と協調的に機能し、細胞内シグナル伝達を制御するタンパク質 CDCP1 を見いだした (1)。その解析の過程で、CDCP1 の過剰発現によって細胞内シグナル伝達が異常に活性化し、がん細胞様の形態変化を示すことを見いだした。しかし、がん細胞の HGF-Met シグナルにおける CDCP1 の関与は不明であった。

そこで我々は、乳がん細胞をモデルとして CDCP1 の機能解析を行なった。その結果、CDCP1 は高浸潤性の乳がん細胞で高発現していること、CDCP1 は Met と協調的に機能することで HGF 刺激によるがん細胞の浸潤に促進的に機能すること、HGF-Met シグナルの下流に RAC1 経路を介するシグナル経路が存在することを明らかにした (2)。これらの結果から、CDCP1 は HGF によるがん細胞の悪性化に関わる因子であることが示唆された。

その一方で、CDCP1 の過剰発現は一部の低浸潤性のがん細胞でも認められており、CDCP1 はがんの発生過程にも関与している可能性が考えられる。そこで、がんの初期過程を模倣して正常細胞層に CDCP1 を過剰発現させる細胞を混合させると、その細胞は細胞競合を逃れ、一部は浸潤した (3)。この浸潤は CDCP1 と Met の相互作用を阻害することで抑制された。また、同様の現象はがん細胞スフェロイドでも観察された。すなわち、CDCP1 はがんの発生過程にも関与している可能性が示唆された。

以上の結果から、CDCP1 は受容体タンパク質と協調的に機能することで細胞内シグナル伝達を制御し、がんの発生から悪性化までひろく関与していると考えられる。今後はその詳細な分子メカニズムを理解し、がん抑制に向けた研究を展開したい。

参考文献

- 1) CDCP1 promotes compensatory renal growth by integrating Src and Met signaling, Kajiwarra *et al.*, *Life Sci Alliance* (2021).
- 2) CDCP1 promotes HGF-induced cell migration/invasion of breast cancer cells via the ARHGEF7-RAC1 axis, Kawase *et al.*, *in revision*.
- 3) Src activation in lipid rafts confers epithelial cells with invasive potential to escape from apical extrusion during cell competition, Kajiwarra *et al.*, *bioRxiv* (2021).

BCL11A は PU.1 標的遺伝子の抑制を介して AML の発症・悪性を促進する

公益財団法人がん研究会がん研究所 発がん研究部・角南 義孝
金沢大学がん進展制御研究所 機能ゲノミクス研究分野・鈴木 健之

Bcl11a/Evi9/Ctip1 は、C₂H₂ 型の zinc finger 蛋白質をコードする転写抑制因子である。これまでに慢性リンパ性白血病や非ホジキンリンパ腫といった B 細胞性腫瘍の発症に関わることや B 細胞分化に必須であることが知られており、胎児型から成人型ヘモグロビンへのグロビン遺伝子スイッチングに必須であることが報告されている。一方、Bcl11a は当初マウス骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML) の原因遺伝子として同定されたにも関わらず、AML における役割は明らかでなかった。

本研究で、私たちは最初に AML 原因遺伝子である Trib1 の過剰発現により発症したマウス AML のレトロウイルス共通挿入部位を探索し、Trib1 の協調遺伝子として Bcl11a を同定した。さらに、Bcl11a 自身は AML 発症能を有さないものの、Trib1 による AML 発症を促進させることを明らかにした。そこで Trib1 単独、あるいは Trib1/Bcl11a を発現させた AML 細胞株を樹立し、Bcl11a が細胞増殖を亢進させ骨髄生着の促進を介して、AML の発症に寄与することを発見した。次に、Trib1/Bcl11a 発現 AML 細胞を用いて、ChIP-seq 解析とマイクロアレイ解析を行い、Bcl11a が好中球分化に必須の転写因子である PU.1 と相互作用し、Clec5a や Fcgr3 といった PU.1 標的遺伝子発現を抑制させることを見出した。さらに Bcl11a/PU.1 の新たな標的遺伝子として、細胞骨格や細胞間相互作用を制御する E3 ユビキチンリガーゼ Asb2 を同定し、Bcl11a が Asb2 を介して AML の悪性化に関わっていることを明らかにした。また Bcl11a はコリプレッサー複合体をリクルートすることが知られているが、LSD1 や HDAC などの複合体構成分子をノックダウンすることで、Bcl11a/PU.1 標的遺伝子の発現を回復させること、さらには LSD1/HDAC 阻害剤の併用が、Bcl11a 依存的な増殖抑制・白血病発症抑制効果を示すことを示した。最後に、AML 患者において BCL11A の高発現と予後不良が相関し、BCL11A が高発現しているヒト AML 細胞株の HL-60 細胞で、BCL11A をノックダウンすると PU.1 標的遺伝子の発現が回復し、この時に細胞増殖と骨髄生着が抑制されることを明らかにした。以上より、BCL11A はヒト AML においても、PU.1 の転写活性阻害を介して発症・悪性を促進させていることが強く示唆された。

参考文献

1. Sunami Y, Yokoyama T, Yoshino S, Takahara T, Yamazaki Y, Harada H, Nakamura T. BCL11A promotes myeloid leukemogenesis by repressing PU.1 target genes. Blood Adv. 2021, in press.

転移性大腸がん幹細胞の可塑性・未分化性に関与するシグナル経路の解析

愛知県がんセンター研究所 がん病態生理学分野・青木 正博
金沢大学がん進展制御研究所 遺伝子・染色体構築研究分野・平尾 敦

要旨

転移を伴う大腸がんの予後は未だに不良であり、新機軸の治療戦略が望まれている。一方、がん幹細胞の存在とその可塑性が、がん組織の不均一性に寄与し、転移や再発、治療抵抗性等に深く関与することが示されている。大腸がんについてもいくつかのがん幹細胞マーカーが提唱され、それらを高発現する症例は転移・再発のリスクが高く予後不良であることが報告されているが、大腸がんの幹細胞性がどのように制御されているかについてはほとんど不明である。

我々は最近、腸管上皮細胞に *Ctnnb1* (β -catenin をコード)、*Kras*、*Tp53*、*Smad4* の変異を散発的に誘導することにより、100%の個体が腸管に悪性度の高い腺がんを発症して約 20%の個体が肝転移を生じる、新しい転移性大腸がんマウスモデル (CKPS マウス) を開発した。転移に関与する分子を同定する目的で、CKPS マウスの転移性大腸がん原発巣と、*cis-Apc/Smad4* マウスに発症する非転移性大腸がんとの比較プロテオーム解析を実施したところ、ALCAM (CD166)、PROM1 (CD133) など大腸がん幹細胞マーカーの発現が CKPS マウスの腫瘍で上昇していた。そこで免疫染色を行ったところ、CKPS マウスの原発巣浸潤先端および肝転移巣では、大腸がん原発巣の管腔側と比較して ALCAM の発現が顕著に亢進していた。また、CKPS マウス由来の大腸がん細胞株 (CKPS 細胞) を 2 次元培養からスフェロイド培養に移すと ALCAM の発現が大きく上昇し、その発現上昇は *Smad4* の強制発現によって強く抑制された。さらに、CKPS 細胞の *Alcam* 遺伝子をノックアウトしたところ、スフェロイド形成能、および脾注肝転移モデルにおける肝転移巣形成が著しく低下した。これらの結果は、ALCAM が大腸がん幹細胞の可塑性および転移開始能に重要な役割を果たすことを示唆する。

現在、CKPS マウスの実験系を用いて、ALCAM の発現を制御するシグナル経路、および大腸がん幹細胞の未分化性維持に関与するシグナル経路の詳細について解析を進めている。本報告会ではそれらの役割と治療標的としての可能性について議論したい。

代謝フラックス解析から見えてきた好氣的解糖のメリット

大阪大学大学院情報科学研究科 バイオ情報計測学講座・岡橋 伸幸
金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍分子生物学研究分野・高橋 智聡

がん細胞が好気環境でも解糖系を用いるワールブルク効果が報告されて久しい。このような代謝を行うのは、解糖系は細胞前駆体を供給するのに有利である、TCA サイクルの酵素遺伝子変異のため解糖系を使わざるを得ない、などの説が提唱されている一方、定量的な観点に立った代謝解析は十分ではない。我々は、代謝計測技術とコンピュータシミュレーションを用いて、がん細胞が好氣的解糖を行う利点の解明に取り組んだ。

まず、由来臓器や種類が様々な 12 細胞株を選択し、代謝の流れを定量的に解析できる ^{13}C 代謝フラックス解析法を適用した。その結果、グルコース取り込み速度や乳酸排出速度には細胞の由来や種類ごとの特徴は見られなかったが、いずれの細胞も取り込んだグルコースの 71~100%を乳酸として排出するワールブルク効果が観測された。またグルコース取り込み速度は、細胞前駆体要求速度の 500 倍以上であり、細胞増殖よりも大過剰な炭素を取り込んでいることが分かった。一方、残るグルコース由来の炭素やグルタミンは TCA サイクルで代謝されており、酸化的リン酸化による ATP 再生が活発に行われていた。酸化的リン酸化は解糖系に比べて ATP 再生効率が良いことから、がん細胞が強いて解糖系を用いることの意義は、これまでの説では説明しがたい。

そこで我々はコンピュータ上で代謝状態を計算する代謝シミュレーション法を用いて、実測された代謝状態を再現するのに重要な要因を探索した。がん細胞は ATP 再生を最大化する代謝状態を取るという仮定の下でシミュレーションを行った場合、すべてのグルコース由来の炭素は TCA サイクルで酸化的に代謝されるという実験事実とはかけ離れた結果となった。これはシミュレーションで考慮されていない TCA サイクルを制約するなんらかの要因が存在し、それが観測される代謝を再現するのに重要な要素であることが予想された。そのような要因を探索したところ、我々は代謝に伴う熱の産生量を実験値に固定することで、実験的に得た代謝フラックス分布を精度よく再現できることが分かった。酸化的リン酸化は ATP 再生効率がよい反面、大量の代謝熱を産生してしまうため、代謝熱の発生を一定に保った状態で ATP 再生を最大化するためには、代謝熱の発生が少ない解糖系を利用せざるを得ない状況にあると考えられる。実際に培養温度を 37°C から 36°C に変更した場合、グルコース取り込みは一定のまま乳酸の排出が減少し、TCA サイクルに流入する炭素が増加し、熱産生の多い代謝にシフトした。これは、好氣的解糖を形成する要因の一つに代謝熱が関わっていることを示唆している。

患者由来 xenograft (PDX) モデルを用いた難治性乳がんの治療標的の探索

東京医科歯科大学 システム発生再生医学分野・栗本遼太、内田雄太郎・浅原 弘嗣
金沢大学がん進展制御研究所 分子病態研究分野・後藤 典子

乳がんは日本人女性が最も多く罹患するがんである。中でもトリプルネガティブ乳がん (TNBC) は乳がん全体の約 20%を占め、ホルモン療法や分子標的薬といった他の乳がんサブタイプで用いられるホルモン療法や分子標的薬などの明確な治療法がなく、抗がん剤による薬物療法が試みられているものの非常に予後が悪いことで知られる。このような治療抵抗性を説明する上で非常に重要ながん細胞集団が乳がん幹細胞集団である。がん幹細胞研究において Musashi-2 や NSAP1 など疾患に特異的な RNA 結合タンパク質による RNA 階層での発現制御ががん幹細胞の幹細胞性維持に関わっていることが既に報告されている (Ito et al, *Nature*. 2010, Kharas et al, *Nat. Med.* 2010)。しかしながら、乳がん幹細胞における RNA 階層での制御機構については未解明である。

そこで我々はまず、三症例の TNBC 患者由来細胞をマウスに皮下移植したサンプルに対して scRNAseq 解析を行った。その結果として、既知の乳がん幹細胞集団マーカーを発現する細胞集団 (CD44+, NRP1+, ZEB1+, CD24-) が大きく二つの亜集団に分かれる様子が明らかとなった。この二つの亜集団の腫瘍形成能を比較するため、両亜集団をソーティングし NOG マウスに再移植することで腫瘍形成能を比較したところ、新規分子マーカーによって標識される腫瘍形成能を強く示す新規乳がん幹細胞亜集団の存在が確認された。さらに、このがん幹細胞亜集団において特異的に発現する RNA 結合タンパク質をスクリーニングしたところ、機能未知の RNA 結合タンパク質である RBPU の同定に成功し、TNBC 患者由来細胞に対してこの RBPU をノックダウンすると腫瘍形成能が大きく減少した。またこのノックダウン細胞に対して scRNAseq 解析を行ったところ、RBPU のノックダウンによって新規乳がん幹細胞亜集団が減少することが判明した。この RBPU の RNA 階層における分子制御機構を解析するために、ノックダウン細胞に対する RNA-Seq 解析、および標的 mRNA を Transcriptome wide に同定する CLIP (Crosslinking Immunoprecipitation) 解析を行ったところ、RBPU が乳がん幹細胞性を特徴づけるような遺伝子の mRNA の 3' 非翻訳領域に特異的に結合することでこれらの遺伝子の発現を安定化させることが判明した。現在この RBPU による発現制御機構を詳細に解明するために解析を継続している。

希少ドライバー遺伝子異常を有する肺がんにおける治療抵抗性機構の解明と克服

京都府立医科大学 呼吸器内科・谷村 恵子
金沢大学がん進展制御研究所 腫瘍内科研究分野・矢野 聖二

要旨 RET 融合遺伝子は肺腺がんのおよそ 1-2%で同定されるドライバー遺伝子異常の一つである。近年開発された新規 RET 阻害薬である selpercatinib と pralsetinib は、未治療例での全奏効率が 70%以上に達するという非常に良好な治療成績を示しており、2021 年 8 月には selpercatinib が本邦でも承認された。

一方で、EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK 融合遺伝子を有する肺がんに対し分子標的治療薬が高い治療効果を示すものの、初期抵抗性を示す例が存在し、一旦奏効しても最終的には獲得耐性へと至り、完治に至ることは非常に稀である。分子標的治療薬への初期治療抵抗性については、近年注目が集まり、数多くの研究成果が発表されている。EGFR 遺伝子変異陽性肺がんでは、AXL シグナルを介した治療抵抗性に対し、AXL 阻害薬を EGFR-TKI 治療と併用することで治療抵抗性細胞の出現を抑制し、耐性化を予防する治療法について、金沢大学と京都府立医科大学の共同研究で明らかにされてきた。この研究結果から、ALK 融合遺伝子陽性肺がんにおいても同様に、バイパスシグナル活性化による ALK-TKI に対する初期治療抵抗性が示唆され、我々は ALK-TKI への曝露による HER3 シグナルの活性化、さらに HER-family 阻害薬の afatinib を ALK-TKI に併用することで、この治療抵抗性を克服しうることを in vitro、in vivo の検討で見出した。また、この治療抵抗性に EMT 関連の転写制御因子である ZEB1 が関与していることや、治療前の段階で間葉系の性質を示す腫瘍では ALK-TKI への感受性が低く、afatinib との併用治療によって抗腫瘍効果を増強することを示した。

今回の共同研究では、RET 肺がんに対する治療抵抗性のメカニズム解明を行うため、RET-TKI : selpercatinib、pralsetinib に曝露させた RET がん細胞株の細胞内シグナル伝達の変化を、蛋白レベルで解析した。その結果、EGFR を初めとする HER ファミリーのリン酸化レベルが亢進しており、siRNA 法による EGFR 遺伝子抑制を行うと、RET-TKI への感受性が増強することが示された。また、第一世代の EGFR-TKI である erlotinib を RET-TKI に併用することで、同様の抗腫瘍効果の増強が得られ、RET がんにおける EGFR シグナルの活性化による初期治療抵抗性が示唆される結果が得られた。今後は、より詳細なメカニズムの解析や、バイオマーカーについての検討を行う予定である。