

新學術創成研究機構若手 PI

卓越研究員

分子標的治療開発ユニット Molecular Cancer Therapeutics

<研究スタッフ>

准教授 衣斐 寛倫

【研究概要】

本研究プロジェクトは、臨床的知見から得られる問題点とシグナル伝達解析の手法を融合させることにより、現在のところ分子標的治療が確立されていない腫瘍に対し、新たな治療戦略を同定・開発することを目的としている。

<2016年の研究成果, 進捗状況>

1. KRAS 遺伝子変異腫瘍に対する新規治療開発

KRAS 変異腫瘍において変異 KRAS タンパクの直接阻害は困難であることから、下流シグナルの抑制による治療が試みられている。しかし、早期臨床試験の結果から、KRAS 変異肺がんに対する MEK キナーゼ阻害薬の効果は限定的であることが明らかとなった。我々は、MEK 阻害薬投与が、フィードバック機構を介して受容体キナーゼを活性化し、活性化した受容体により MAPK シグナルが再活性化されることを明らかにした。さらに、活性化される受容体は腫瘍の上皮間葉移行状態に依存しており、上皮型腫瘍では ERBB3, 間葉型腫瘍では FGFR1 が関与していた。それぞれの受容体阻害薬と MEK 阻害薬の併用療法の有効性をマウスモデルおよび患者検体由来ゼノグラフトモデルで実証した。

2. FGFR 遺伝子増幅肺がんに対する FGFR 阻害薬の治療効果予測に関する研究

FGFR 遺伝子増幅を有する肺がん細胞株および検体を解析し、遺伝子増幅とタンパク発現にかい離が認められる事を同定した。FGFR 阻害薬は、遺伝子増幅とタンパク発現の両者を認める腫瘍において有効であり、タンパク発現の低い腫瘍では他の受容体が過剰発現していることを示した。

<今後の計画>

1. MAPK シグナル変異腫瘍（主に KRAS, BRAF 変異腫瘍）の分子生物学的背景の理解とこれらの変異腫瘍に対する新規治療開発
2. FGFR1 遺伝子増幅腫瘍に対する FGFR 阻害薬の治療効果を改善する因子の同定

【研究業績】

<発表論文>

原著論文（研究グループ主体のみ）

1. Kitai H, Ebi H. Key roles of EMT for adaptive resistance to MEK inhibitor in KRAS mutant lung cancer. *Small GTPases*. 2016 Jul 8:1-5. [Epub ahead of print]

2. Kitai H*, Ebi H***, Tomida S, Floros KV, Kotani H, Adachi Y, Oizumi S, Nishimura M, Faber AC, Yano S**. Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. *Cancer Discov.* 6:754-69, 2016. (*; Co-First Author, **; Co-Corresponding Author)
3. Kotani H*, Ebi H***, Kitai H, Nanjo S, Kita K, Huynh TG, Ooi A, Faber AC, Mino-Kenudson M, Yano S**. Co-active receptor tyrosine kinases mitigate the effect of FGFR inhibitors in FGFR1-amplified lung cancers with low FGFR1 protein expression. *Oncogene* 35:3587-97, 2016. (*; Co-First Author, **; Co-Corresponding Author)

著書・総説

1. 衣斐寛倫 呼吸器疾患—最新の薬物療法—1 悪性腫瘍 免疫チェックポイント阻害薬 p81-95 (分担執筆) 克誠堂出版
2. 衣斐寛倫, 矢野聖二 Pocket Drugs 2016, 68 抗悪性腫瘍薬(分子標的治療) p490-507 (分担執筆) 医学書院
3. 衣斐寛倫 RAS-RAF シグナル異常を示す腫瘍に対する治療開発と展望—基礎腫瘍内科 Vol. 17, No. 5, p544-548, 2016
4. 衣斐寛倫, 矢野聖二 消化器がんにおける分子標的治療: バイオマーカーと個別化治療 臨床消化器内科 Vol. 31, No. 7, p38-42, 2016

<学会発表>

1. 衣斐寛倫 Feedback mechanism as a cause of resistance and therapeutic targets in molecular targeted therapy). 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会 インターナショナルシンポジウム 10 2016年7月 神戸
2. 衣斐寛倫 Targeting RAS/RAF mutant cancers: Regulation of MAPK signaling is the key 第14回日本臨床腫瘍学会学術集会 インターナショナルシンポジウム 18 2016年7月 神戸
3. 衣斐寛倫 EMT defines feedback activation of RTK signaling included by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜
4. Ebi H. Combinatorial Approach Targeting KRAS Mutant Lung Cancers. Kanazawa University /Duke-NUS Joint Cancer Symposium 2016年2月 Singapore
5. Ebi H. Epithelial-to-mesenchymal transition defines feedback activation of receptor tyrosine kinase signaling induced by MEK inhibition in KRAS mutant lung cancer. 6th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology 2016年9月 Shanghai, China

6. Ebi H. EMT defined combinatorial strategy for treating KRAS mutant lung cancer.
Hokkaido Univ-Kanazawa Univ International Cancer Forum for Young Scientists 2016
年 11 月 Sapporo, Japan

<知的財産>

衣斐寛倫, 矢野聖二, 北井秀典: 間葉系 KRAS 変異型がん治療剤

国際出願番号: PCT/JP2016/083921 国際出願日: 2016 年 11 月 16 日

<外部資金>

1. 日本医療研究開発機構 次世代がん医療創生研究事業 研究分担者 衣斐寛倫
MAPKシグナル抑制が誘導するフィードバック機構の不均一性解明と制御に基づ
くKRAS/BRAF変異腫瘍に対する新規治療開発 12,692千円
2. 日本医療研究開発機構 革新的がん医療実用化研究事業 研究分担者 衣斐寛倫
産学連携全国がんゲノムスクリーニング事業SCRUM-Japanで組織した遺伝子ス
クリーニング基盤を利用した, 多施設多職種専門家から構成されたExpert Panelに
よる全国共通遺伝子解析・診断システムの構築および研修プログラムの開発
3,000千円
3. 基盤研究 (C) 日本学術振興会 研究代表者 衣斐寛倫
上皮間葉移行状態に基づいたKRAS変異肺がんに対する治療開発 1,500千円
4. 国立がん研究センター研究開発費 研究分担者 衣斐寛倫
がんゲノム情報を用いた全国レベルでのprecision medicine体制構築に関する研究
250千円
5. 金沢大学附属病院臨床研究助成金 研究代表者 衣斐寛倫
KRAS変異肺がんに対するFGFR阻害薬耐性とMEK阻害薬の併用療法 2,000千円

<共同研究>

1. バイオインフォマティクスの手法を用いた新規治療開発
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 富田秀太
2. 遺伝子多型と化学療法の治療効果予測
愛知県がんセンター研究所遺伝子医療研究部 松尾恵太郎, 伊藤秀美
3. 各種臓器由来腫瘍に対する分子標的治療開発
Virginia Commonwealth University Anthony C Faber
4. KRAS 変異腫瘍に対する新規治療開発
Hudson Institute of Medical Research Brendan J. Jenkins

Inflammation and Epithelial Plasticity

上皮可塑性・炎症ユニット

<Research Team>

Associate Professor

Dominic Chih-Cheng VOON

Graduate student (Year 1)

Sauyee KOK (Co-supervisor: Prof. Oshima)

【 Abstract 】

Despite great advances in the past several decades in understanding the etiology of gastric cancer, it is still the third most lethal cancer globally, taking more than 700,000 lives annually. Atrophic gastritis caused by the chronic infection of *Helicobacter pylori* is widely held as the single greatest causal factor. We are interested in two aspects of gastric cell biology that play important roles during gastric carcinogenesis: 1) altered immune signaling during *H. pylori* infection; and 2) increased cellular plasticity during gastric inflammation and repair.

< 2016 research achievement and future plan >

(1) Biochemical and functional characterization of a novel IL23A complex

We previously reported the production of the cytokine IL23A by gastric epithelial cells (Hor and Voon *et al.*, 2014, Cell Reports). This is strongly increased by *H. pylori* and inflammatory signals important in gastric pathogenesis, namely TNF α , IL-1 α/β and NOD-1. Importantly, we showed that this induction is exquisitely dependent on the gastric tumor suppressor RUNX3 and its relative, RUNX1. We further observed that IL23A is secreted in a form distinct from canonical IL-23, which is a heterodimer of IL23A and IL12B. To deepen our analysis, we have generated clonal gastric cell lines that secrete high levels of epithelial-derived IL23A complex for the purpose of its purification. Specifically, we aim to study its biochemical composition and its ability to interact with IL23 Receptor (IL23R). IL23R has been implicated in numerous human autoinflammatory conditions, such as psoriasis and IBD. Canonical IL-23 is crucial for the effector functions of Th17 helper T cells, which are central coordinators of inflammation at the mucosa surfaces. We will study the immunological effects of epithelial IL23A complex in the differentiation and function of Th17 cells using human peripheral blood T cells.

(2) Epigenetic mechanisms underlying EMT-associated gastric cellular plasticity and stemness

In earlier studies, we observed that *Runx3*-deficient gastric epithelial cells undergo spontaneous Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT), which is accompanied by increased

cellular plasticity and stemness, marked by the expression of the stem cell markers *Lgr5* and *Hmga2* (Voon and Wang *et al.*, 2012, Stem Cells). Of note, *Hmga2* is induced by TGF- β and Egfr/Ras pathway, growth factor pathways frequently targeted during gastric carcinogenesis (Voon and Wang *et al.*, 2013, PLOS ONE). *Hmga2* is a non-histone component of the chromatin and is proposed to maintain the chromatin in an opened conformation accessible to transcriptional factors and epigenetic modifiers. Therefore, we undertake the genome-wide chromatin immunoprecipitation-sequencing (ChIP-Seq) analysis of *Hmga2* to interrogate the epigenetic changes underlying EMT-associated plasticity and tumorigenicity. This will be complemented by histone ChIP-Seq to reveal chromosomal regions with activating and repressing histone marks; and to correlate that with *Hmga2*-marked regions. Through this approach, we will gain insight into why EMT is associated with cellular plasticity and tumorigenicity.

【 Achievements 】

< Publications (Collaboration) >

1. Matsuo J, Kimura S, Yamamura A, Koh CP, Hossain MZ, Heng DL, Kohu K, Voon DC, Hiai H, Unno M, So JB, Zhu F, Srivastava S, The M, Yeoh KG, Osato M, and Ito Y. Identification of Stem Cells in the Epithelium of the Stomach Corpus and Antrum of Mice. **Gastroenterology**, 152: 218-231, 2017.
2. Roy RK, Hoppe MM, Srivastava S, Samanta A, Shama N, Tan KT, Yang H, Voon DC, Pang B, The M, Murata-Kamiya N, Hatakeyama M, Chang YT, Yong WP, and Ito Y. CECAM6 is upregulated by Helicobacter pylori CagA and is a biomarker for early gastric cancer. **Oncotarget**, 7(34):55290-55301, 2016.

< Symposiums >

(International presentations)

1. Voon DC. A Role for RUNX3 in Gastric Immunity and Plasticity. 6th FUSCC-CRIKU Joint Symposium on Tumor Biology. 7 September 2016, Fudan University; Shanghai, China.
2. Voon DC. MicroRNA-135b as a node of convergence for multiple oncogenic pathways in gastrointestinal carcinogenesis. 21 Dec 2016, Harry Perkins Institute of Medical Research, Perth, Australia.

< 2016 research funds >

1. 北國がん基金 [研究代表者 : Dominic Voon]

「胃がん上皮細胞から産生される IL-23A の新規複合体同定と機能解析」 1,000 千円

< Collaborations >

(Overseas)

Yoshiaki Ito (Cancer Science Institute of Singapore)

「*Characterization of epithelial IL23A Complex*」

< Others Contribution >

The Kanazawa University Cancer Research Institute International Symposium 2016. 15
November, 2016, Kanazawa; Joint coordinator.

ミトコンドリア動態ユニット Mitochondrial Dynamics in Stem Cells

<研究スタッフ>

若手PI (助教) 笠原敦子

【研究概要】

ミトコンドリアは、エネルギー供給、アポトーシス、Ca²⁺制御など非常に多岐にわたる生命現象に深く関わり、細胞の生死を握るオルガネラである。ミトコンドリアの多面的な機能は、その非常に動的な形態・構造に由来しており、絶えず融合・分裂を繰り返すことで、その品質管理、細胞内局在、サイズ、運動性を細かく調節している。絶え間ないミトコンドリアの融合と分裂が、その複雑なネットワーク構造を作り出しており、その形態は細胞の生理状態、細胞腫によって大きく変化する。幹細胞は、分化能、自己複製能を備えた特殊な細胞集団で、組織再生に関わる正常幹細胞に加え、がん細胞にも同様の細胞集団が存在する。この幹細胞のミトコンドリアは、一般的に分化した細胞に比べ、未成熟なネットワーク構造であり、またクリステ構造も発達していない。正常、がん細胞両者の幹細胞の特別な性質の獲得、維持、また分化過程において、ミトコンドリア動態がどのように関わっているのか、以下のようなプロジェクトを推進することで解明していきたい。

- 1) 胚性幹細胞からの神経細胞分化におけるミトコンドリア融合因子の果たす役割
- 2) グリオブラストーマ幹細胞集団におけるミトコンドリア動態特性の同定、またミトコンドリア形態をターゲットとした薬剤スクリーニング
- 3) 幹細胞の維持、また分化・発達で必要不可欠なNotch1シグナルのカルシニューリンによる活性化機構の解明
- 4) 薬剤耐性肺がん細胞におけるミトコンドリア動態特性の同定、既存薬剤 (gefitinib)との併用治療による根治は可能か

【研究業績】

<論文発表>

Bassoy EY*, Kasahara A*, Chiusolo V, Jacquemin G, Boydell E, Zamorano S, Riccadonna C, Pellegatta S, Hulo N, Dutoit V, Derouazi M, Dietrich PY, Walker PR, Martinvalet D. ER-mitochondria contacts control GSC surface glycan expression and sensitivity to killer lymphocytes. **EMBO J.** 2017 (Mar 10. pii: e201695429 doi: 10.15252/embj.201695429) *contributed equally to this work

<学会発表>

Kohno S., Nakata A., Gotoh N., Kohno T., Hirao A., and Kasahara A.
“Mitochondrial Dynamics and functions in lung adenocarcinoma cells”
EMBO meeting Translational Research in Cancer Metabolism 4-6 Oct 2016 Bilbao Spain, Poster presentation

<外部資金>

資金名：公益財団法人 武田科学振興財団 医学系研究奨励

研究題目：悪性神経膠腫（グリオーマ）におけるミトコンドリア動態の果たす役割の解明

総額：2,000（千円）

開始年度：平成28年度，期間：指定なし

<共同研究>

学内

後藤典子，高橋智聡，河野晋

「薬剤耐性肺がん細胞におけるミトコンドリア特性について」

学外

Luca Scorrano, Marta Giacomello

“Exploring the role of mitochondrial calcium dynamics in lung cancer cells”

Luca Scorrano, Ildico Szabo, Andrea Urbani, Keitaro Shibata

“Exploring the role of mitochondrial dynamics in neural differentiation from mouse embryonic stem cells”

がん-免疫系相互作用ユニット

Cancer-Immune System Interactions

<研究スタッフ>

若手 PI：土屋 晃介

【研究概要】

近年注目される免疫チェックポイント阻害療法は宿主の抗腫瘍免疫によるがん細胞排除に期待した治療法であるが、がん細胞が様々な機序（免疫抑制分子の発現や CTL への抵抗性の亢進など）でこれに耐性を獲得することは想定される。また、免疫チェックポイント阻害はがん微小環境内のシグナルネットワークにも大きな影響を与え、がん細胞のシグナル状態を劇的に変化させる可能性がある。本プロジェクトは、がん細胞が免疫チェックポイント阻害療法への耐性を獲得する機序を探索することで同療法の改善につながる新規治療標的の発見を目指す。特にがん微小環境内シグナルネットワークが治療抵抗機序の亢進に関わる可能性を検討し、関連するシグナル因子を同定する。本年は治療耐性化関連シグナル因子を生体内でスクリーニングするためのシステム構築に向けて準備的実験（ノックダウンがん細胞プールの作製など）を行った。今後、治療耐性化関連シグナル因子の候補を絞り込むために治療処置前後でのがん細胞遺伝子発現プロファイルの比較や全ゲノム規模 CRISPR/Cas9 システムを用いた CTL 抵抗性因子の探索などを行う予定である。

【研究業績】

<発表論文・著書>

（原著論文・プロジェクト主体）

なし

（原著論文・共同研究）

1. Zhang P, Tsuchiya K, Kinoshita T, Kushiyama H, Suidasari S, Hatakeyama M, Imura H, Kato N, Suda T. Vitamin B6 Prevents IL-1 β Protein Production by Inhibiting NLRP3 Inflammasome Activation. *J Biol Chem.* **291**:24517-24527. (2016)
2. Kochi Y, Miyashita A, Tsuchiya K, Mitsuyama M, Sekimizu K, Kaito C. A human

pathogenic bacterial infection model using the two-spotted cricket, *Gryllus bimaculatus*. *FEMS Microbiol Lett.* **363**: fnw163. doi: 10.1093/femsle/fnw163. (2016)

(日本語総説)

土屋晃介. “パイロトーシスの分子機構と意義” *実験医学* (羊土社), 34: 1037-1044, 2016.

<学会発表>

土屋晃介 (筆頭演者) “Involvement of the redox master regulator Nrf2 in host defense against *Listeria monocytogenes* infection” 中国免疫学会第十一届全国免疫学学术大会, 2016年11月7日, 中華人民共和国安徽省 (国外)

土屋晃介 (筆頭演者) “A role for the redox master regulator Nrf2 in host defense against *Listeria monocytogenes* infection” 第45回日本免疫学会学術集会, 2016年12月7日, 沖縄県宜野湾市 (国内)

<平成 26 年度 外部資金>

土屋晃介 (研究代表者) 科研費 基盤研究 (C) 「インフラマソーム構成タンパクを介した新たな感染防御機構の発見およびその機序の解明」 1,560 千円 (直接経費 : 1,200 千円、間接経費 : 360 千円)

<共同研究>

須田貴司 金沢大学がん進展制御研究所
「カスパーゼ-1 依存的細胞死の機序解明」

方仁東 西南大学・中華人民共和国重慶市
「肺炎球菌感染におけるインフラマソーム構成タンパクの役割」

がん治療標的探索ユニット Cancer Genes and Genomes

<研究スタッフ>

助教 武田 はるな

研究補佐員 片岡 志帆

【研究概要】

がんゲノム解読の研究により、がん組織が保持する数多くの遺伝子変異が同定された。同時に、がん組織は多様な遺伝子変異を有するサブクローンが混在する遺伝学的に不均一な組織であることが明らかにされた。しかしながら、変異のある遺伝子にはパッセンジャー遺伝子とドライバー遺伝子が混在しており、両者の区別をつけることが困難な状態であるためドライバー遺伝子の全体像は不明確な状態となっている。どの遺伝子変異が真にがん形成に寄与しているか、そしてどのようにがん形成に関与しているかについては、いまだ不明な点が多い。がん組織の遺伝学的不均一性は、腫瘍細胞の悪性化や治療抵抗性獲得の過程で最も適応度が高いクローンが選択される適者生存のプロセスに寄与すると考えられているが、多様なサブクローンを生体内で作出しクローン間の競合をモデルできる系は限られているため、がん化のどのような環境がどのような遺伝子変異をもつ細胞を選択し悪性化していくのかを解明する研究は進んでいない。ドライバー遺伝子の全体像を明らかにすることで、がん化に関わるシグナリング経路や生物学的機能を包括的に明らかにすることにつながり、ドライバー遺伝子がどのような環境で機能するかを解明することは遺伝学的不均一性を理解し新たな治療標的の開発に結びつく。

これまでの研究において、消化管におけるがんドライバー候補遺伝子を網羅的に抽出することを目的とし、**Sleeping Beauty (SB)**トランスポゾンを用いた挿入変異誘発により腫瘍形成に関与する遺伝子同定を行ってきた。このシステムは、多様な遺伝子変異を有する不均一なサブクローン集団を作成し、マウス生体内で競合させることで悪性度の異なる腫瘍形成に寄与した遺伝子の同定が可能である。

そこで本研究では、(1) **SB** 挿入変異誘発法により同定した大腸がん形成に関与する候補遺伝子について、がん化能検証と機能解析を行うこと、(2) 大腸がん転移に焦点を当て、遺伝学的に不均一ながん細胞集団がどのようなメカニズムで悪性化するかについて、マウスモデルを樹立し責任遺伝子の網羅的な同定により明らかにすることを目的とする。

< 発表論文 >

Haruna Takeda, Alistair G. Rust, Jerrold M. Ward, Christopher Chin Kuan Yew, Nancy A. Jenkins, and Neal G. Copeland

***Sleeping Beauty* transposon mutagenesis identifies genes that cooperate with mutant *Smad4* in gastric cancer development**

PNAS 113 (14) :E2057-2065, 2016

< 学会発表 >

1. 第 75 回日本癌学会学術総会 「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」 2016 年 10 月 6-8 日 横浜・パシフィコ横浜
2. 第 2 回 AMED がん若手研究者ワークショップ 2016 年 11 月 29-30 日 東京・晴海グランドホテル「Sleeping Beauty (SB)トランスポゾンによる大腸がん形成に関与する遺伝子の同定」
3. ALBERTA-JAPAN Agency For Medical Research And Development (AMED) Workshop For Medical Innovation, 2017 年 2 月 24-25 日カルガリー, カナダ ・ハイアットホテル「Sleeping beauty transposon identifies genes involved in colon cancer development」

< 外部資金 >

1. 武田はるな ; 卓越研究員事業 H28-H32 年度
2. 武田はるな ; 文部科学省科学研究費補助金 若手研究 (B)「胃がん形成に関わる遺伝子の同定と機能評価」 H28.4-H29.3, 2,080 千円
3. 武田はるな ; ノバルティス ファーマ研究助成 「腸上皮オルガノイド培養系を用いた大腸がん抑制遺伝子の機能評価」 H28.4-H29.3, 500 千円
4. 武田はるな ; 次世代がん医療創生研究事業 若手育成枠 「マウスモデルを用いた消化器がんと脳腫瘍の悪性化に関わる遺伝子の同定と機能評価」 H28-H29 年度 7,000 千円