

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control
- 研究開発課題名： (日本語) 女性難治がんの PDX モデルを用いたがん微小環境を標的とした
革新的診断治療法の構築
(英語) Development of innovative diagnostic and therapy targeting cancer
microenvironment by using PDX models derived from women refractory
cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 後藤 典子
国立大学法人金沢大学がん進展制御研究所 教授
- 所属 役職 氏名： (英語) Noriko Gotoh
Professor, Cancer Research Institute, Kanazawa University
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 卵巣がん幹細胞由来の卵巣がん PDX モデルを用いた、がん治療抵抗性に関
与する微小環境因子の解析
- 開発課題名： (英語) Analysis of microenvironmental factors involved in resistance to cancer
therapy by using PDX models derived from ovarian cancer stem-like
cells
- 研究開発分担者 (日本語) 岡本 康司
所属 役職 氏名： 国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 がん分化制御解析分野
部長
(英語) Koji Okamoto
Chief, Division of Cancer Differentiation, National Cancer Center
Research Institute

分 担 研 究 (日本語) 乳がん、卵巣がん臨床検体の次世代シーケンサーを用いた包括的発現解析による治療抵抗性因子の同定と解析
開 発 課 題 名 : (英 語) Identification and functional analysis of factors responsible for cancer therapy resistance in clinical breast and ovarian cancers by next-generation sequencing-based comprehensive expression analysis

研究開発分担者 (日本語) 池田 和博
所属 役職 氏名 : 埼玉医科大学ゲノム医学研究センター遺伝子情報制御部門 講師
(英 語) Kazuhiro Ikeda
Assistant Professor, Research Center for Genomic Medicine,
Saitama Medical University

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者の後藤典子教授 (金沢大学がん進展制御研究所) は、治療抵抗性乳がんを根治できる新規分子標的の同定を目的として解析を進めている。PDX モデル由来のがん幹細胞と Cancer Associated Fibroblast (CAF) の共培養系を構築した。がん幹細胞と CAF より RNA を抽出し、研究開発分担者の池田和博講師 (埼玉医科大学) らのグループと共同で、次世代シーケンス解析を行うための準備を行った。GDF15 は、乳がん幹細胞の維持に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、すでに新規治療標的候補として解析を進めている分子 X について解析を進めている。

研究開発分担者の岡本康司分野長 (国立がん研究センター研究所) は、がん性腹水中におけるがん幹細胞の増殖促進機構を解明するため、がん性腹水とがん幹細胞のインビトロ共培養を行い、がん性腹水が卵巣がん幹細胞の増殖促進を促す事、さらにはがん性腹水中のマクロファージ及びその培養上清が増殖促進効果を担う事を明らかにした。

研究開発分担者の池田和博講師 (埼玉医科大学) は、乳がん、卵巣がん、子宮がんの臨床検体ならびに培養細胞の次世代シーケンサーによる解析を行い、発現プロファイルを取得した。卵巣がんの次世代シーケンサーによる RNA シーケンス解析において、最近注目を集めているタンパク質をコードしない非コード RNA に着目して解析を進めた。正常卵巣組織と比較して、卵巣がん組織で発現量の亢進している非コード RNA (OClnc-W) を見出した。OClnc-W は定量的 PCR 法にて複数の卵巣がん培養細胞株でも発現が認められることを確認した。さらに、siRNA による OClnc-W のノックダウンによって細胞増殖は抑制されることが明らかになった。子宮内膜がんにおける miRNA の役割を解析するため、子宮内膜がん細胞株と臨床検体を用いた次世代シーケンサーによる miRNA のシーケンス解析を進めた。その結果、子宮内膜がんにおいて発現量の多い miRNA を同定し、特に、miR-X に着目した。子宮内膜がん細胞において、miR-X をノックダウンすると細胞増殖は有意に抑制されることが明らかになった。一方、miR-X の過剰発現により、細胞増殖が亢進することが確かめられた。次に、in silico 解析を用いて miR-X の候補標的遺伝子を探索し、エピゲノム制御に関わる遺伝子 Y に注目した。遺伝子 Y の mRNA 発現レベルは、miR-X をノックダウンすると有意に上昇し、過剰発現により低下することが確認された。遺伝子 Y の 3' UTR に存在する、miR-X の putative binding site をクローニングし、Luciferase assay を行ったところ、miR-X は、遺伝子 Y の 3' UTR を介して制御していることが示された。さらに、子宮がん

細胞において、miR-Xのノックダウンによって抑制された細胞増殖は、遺伝子Yをノックダウンすることにより有意に上昇し、回復することがわかった。これらの結果から、次世代シーケンサーを用いた解析によって、卵巣がん、子宮がんの治療標的としてなりうる lncRNA および miRNA とその標的遺伝子の組み合わせが明らかになった。

本研究プロジェクトを機会に、「がん三次元培養研究会」（研究会代表：岡本康司）の立ち上げを行った。臨床検体由来がん細胞の *in vitro* スフェロイドやオルガノイド培養系は、疾患メカニズムの解明のみならず、安価であるため、コストが高く労力のかかる PDX を用いる以前の創薬標的の評価系として大変有用である。しかし、スフェロイドやオルガノイド培養は、技術的にはまだ未熟で困難な面もあり、研究者がすぐに開始できるものではない。研究会を通してこの技術を広め、基礎研究ならびにトランスレーショナルリサーチに貢献することを目的としている。

Dr. Noriko Gotoh (Principal investigator of this project, Cancer Research Institute, Kanazawa University)'s group aims at identification of novel therapeutic targets for eradicating refractory breast cancer. They established co-culture system of breast cancer stem-like cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs) derived from human breast cancer tissues. They have prepared for comprehensive RNA sequencing by using next-generation sequencer by collaboration with Dr. Kazuhiro Ikeda (Saitama Medical University). They also have been analyzed novel molecular targets, X and Y.

Dr. Koji Okamoto (A member of this project, National Cancer Center Research Institute)'s group aims at clarifying molecular mechanisms of growth of ovarian cancer stem-like cells in cancer ascites. They cultured cancer ascites and cancer stem-like cells *in vitro*. They clarified that cancer ascites promotes growth of ovarian cancer stem-like cells and that macrophages and the culture supernatant of macrophages have involved in the mechanisms.

Dr. Kazuhiro Ikeda (A member of this project, Saitama Medical University)' group performed RNA sequencing for samples prepared from clinical specimens and cultured cells of breast, ovarian, and endometrial cancers and analyzed expression gene profiles. Based on RNA sequencing data of ovarian cancer, they interested in long noncoding RNAs (lncRNAs), to which much attention has been paid in recent years. They identified one lncRNA, designated as OClnc-W, whose expression is upregulated in ovarian cancer tissues compared with normal ovarian tissues. OClnc-W expression is also observed in several cultured ovarian cancer cell lines. In addition, siRNAs targeting OClnc-W decreased the proliferation of ovarian cancer cells. Moreover, in order to analyze the role of miRNAs in endometrial cancer, they performed short RNA sequencing for endometrial cancer cell lines and clinical specimens. As a result, they identified several miRNAs overexpressed in endometrial cancer and particularly interested in one miRNA, designated as miR-X, for further experiment. Knockdown of miR-X significantly suppressed the proliferation of endometrial cancer cells. On the contrary, overexpression of miR-X enhanced cancer cell proliferation. They next explored candidate target genes for miR-X by *in silico* analysis and identified a potential target Gene-Y, which is known to associate with epigenetic regulation. They showed that mRNA expression level of Gene-Y was significantly elevated by miR-X knockdown whereas decreased by miR-X overexpression. Based on luciferase

assay using a reporter gene including a putative binding site for miR-X derived from the 3' UTR of Gene-Y, they showed that miR-X could regulate Gene-Y expression via its 3' UTR. Furthermore, we found that the miR-X-dependent suppression of endometrial cancer cell proliferation was significantly recovered by the knockdown of Gene-Y. Taken together, the present results based on next-generation sequencing dissected potential therapeutic targets for ovarian and endometrial cancers, including long and short non-coding RNAs together with miRNA target genes.

We established a new research society for the 3-D culture of cancer cells (President Dr. Koji Okamoto). In vitro spheroid or organoid culture system is useful not only for investigating the molecular mechanisms of cancer development but also for evaluating novel molecular targets, since the in vitro culture is low-cost, compared with high-cost and labor-consuming PDX model. However, the in vitro culture system is still technically immature and the culture conditions are not yet adjusted to be generally applicable. Gathering scientists who are doing or interested in the culture system in the research society, we aim at culture condition optimization to be generally applicable and contributing to advancement of basic science and translational research.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 15 件、国際誌 3 件)

1. Yamamoto M, Sakane K, Tominaga K, Gotoh N, Niwa T, Kikuchi Y, Tada K, Goshima N, Semba K, Inoue J-I.: Intratumoral bidirectional transitions between epithelial and mesenchymal cells in triple-negative breast cancer. *Cancer Sci*, in press.
2. Kitajima K, Yoshida A, Kohno S, Suzuki S, Nagatani N, Li F, Nishimoto Y, Sasaki N, Muranaka H, Wan Y, Thai T, Okahashi N, Matsuda F, Shimizu H, Nishiuchi T, Suzuki Y, Tominaga K, Gotoh N, Suzuki M, Ewen M, Barbie D, Hirose O, Tanaka T, Takahashi C.: The RB-IL-6 axis controls self-renewal and endocrine therapy resistance by fine-tuning mitochondrial activity. *Oncogene*, in press.
3. Sasahara A, Tominga K, Nishimura T, Yano M, Kiyokawa E, Noguchi Miki, Noguchi Masakuni, Kanauchi H, Ogawa T, Minato H, Tada K, Seto Y, Tojo A, Gotoh N.: An autocrine/paracrine circuit of growth differentiation factor (GDF) 15 has a role for maintenance of breast cancer stem-like cells. *Oncotarget*, on line publication 11 February 2017. doi: 10.18632/oncotarget.15276.
4. Miyo M, Konno M, Nishida N, Sueda T, Noguchi K, Matsui H, Colvin H, Kawamoto K, Koseki J, Haraguchi N, Nishimura J, Hata T, Gotoh N, Matsuda F, Satoh T, Mizushima T, Shimizu H, Doki Y, Mori M, Ishii H.: Metabolic Adaptation to Nutritional Stress in Human Colorectal Cancer. *Sci Rep*, 6, 38415. 2016. doi: 10.1038/srep38415.

5. Sagara A, Igarashi K, Otsuka M, Karasawa T, Gotoh N, Narita M, Kuzumaki N, Narita M, Kato Y.: Intrinsic resistance to 5-Fluorouracil in a brain metastatic variant of human breast cancer cell line, MDA-MB-231BR. *PLoS One*, on line publication 10 October 2016.
6. Hibiya S, Tsuchiya K, Hayashi R, Fukushima K, Horita N, Nishimura T, Gotoh N, Okamoto R, Nakamura T and Watanabe M.: Long-term inflammation transforms intestinal epithelial cells of colonic organoids. *J Crohns Colitis*, on line publication 11 October 2016.
7. Tominaga K, Shimamura T, Kimura N, Murayama T, Matsubara D, Kanauchi H, Niida A, Shimizu S, Nishioka K, Tsuji E, Yano M, Sugano S, Shimono Y, Ishii H, Saya H, Mori M, Akashi K, Tada K, Ogawa T, Tojo A, Miyano S, Gotoh N.: Addiction to the IGF2-ID1-IGF2 circuit for maintenance of the breast cancer stem-like cells. *Oncogene*, online publication 22 August 2016; doi: 10.1038/onc.2016.293
8. 富永香奈、後藤典子、「乳がん幹細胞性を維持するシグナル伝達の解析細胞」癌幹細胞研究のトピックス、ニューサイエンス社 48(9): p423-426, 2016
9. 後藤典子、「がん幹細胞ニッチ」医学のあゆみ：がん微小環境の病態理解と制御、医歯薬出版 258(1): 41-45, 2016.
10. Yamawaki K, Ishiguro T, Mori Y, Yoshihara K, Suda K, Tamura R, Yamaguchi M, Sekine M, Kashima K, Higuchi M, Fujii M, Okamoto K, Enomoto T. Sox2-dependent inhibition of p21 is associated with poor prognosis of endometrial cancer. *Cancer Sci.* 2017, doi: 10.1111/cas.13196.
11. Ishiguro T, Ohata H, Sato A, Yamawaki K, Enomoto T, Okamoto K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* 2017, doi: 10.1111/cas.13155.
12. Investigations in the possibility of early detection of colorectal cancer by gas chromatography/triple-quadrupole mass spectrometry. Nishiumi S, Kobayashi T, Kawana S, Unno Y, Sakai T, Okamoto K, Yamada Y, Sudo K, Yamaji T, Saito Y, Kanemitsu Y, Okita NT, Saito H, Tsugane S, Azuma T, Ojima N, Yoshida M. *Oncotarget* 2017, doi: 10.18632/oncotarget.15081.
13. Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, Ohata H, Mimata A, Kukimoto-Niino M, Moriyama H, Kashimoto S, Inoue T, Goto N, Okamoto K, Shirouzu M, Sawa M, Yamada T. TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nature Commun.* 2016, 7, 12586, DOI: 10.1038/ncomms12586
14. 岡本康司. 「卵巣がん幹細胞の鍵シグナル」, 月刊「細胞」3月号特集：がん幹細胞の鍵シグナル、ニューサイエンス社、2017, 49(3), 108-11
15. Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S. Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016, 480, 758-764.
16. Yamada Y, Takayama KI, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi S, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S. A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci.* 2017, 108, 32-41.

17. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y. Increased Expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 Is a Negative Prognostic Predictor in Human Prostate Cancer. *Clin Genitourin Cancer*. 2016, 14, 298-303.
18. Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S. Abhydrolase domain containing 2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer*. 2016, 57, 39-49.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Cancer stem-like cells derived from breast cancer or lung cancer、口頭、後藤典子、第33回日本毒性病理学会総会、2017/1、国内
2. Dependence on the mitochondrial MTHFD2-mediated purine synthetic pathway in lung cancer.、口頭、後藤典子、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/2、国内
3. セリン・グリシン代謝経路 MTHFD2 による肺がん幹細胞の維持、口頭、後藤典子、第10回メタボロームシンポジウム：疾患マルチオミクス、2016/10/21、国内
4. Growth factor signaling in cancer stem-like cells and their niche、口頭、後藤典子、The 47th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund : Current Status and Perspective of Cancer Stem Cell Research、2016/1、国内
5. A serine-glycine metabolic enzyme MTHFD2 is a novel molecular target for overcoming resistance in lung cancer、口頭、後藤典子、第75回日本癌学会学術総会シンポジウム：「代謝を標的としたがんの制御」、2016/10/6、国内
6. Novel therapeutic strategies to eradicate tumors by targeting cancer stem-like cells、口頭、後藤典子、第14回日本臨床腫瘍学会学術集会シンポジウム：日本癌学会・日本臨床腫瘍学会合同シンポジウム、2016/7/29、国内
7. 「グリシン-セリン代謝経路の創薬標的 MTHFD2」、口頭、後藤典子、第4回がんと代謝研究会セッション9：創薬、2016/7/8、国内
8. 「乳がん、肺がんのがん幹細胞様細胞の分子標的」、口頭、後藤典子、第20回日本がん分子標的治療学会学術集会ワークショップ：がん幹細胞を標的にした治療、2016/6/1、国内
9. Stem cells, progenitor cells and cancer stem cells in breast tissues、口頭、後藤典子、第89回日本内分泌学会総会シンポジウム「内分泌器官の組織幹細胞と腫瘍幹細胞」、国内、2016/4/22
10. スフェロイド形成による難治がん由来がん幹細胞の培養と特性解析、口頭、岡本 康司、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/2、国内
11. NADPH oxidase による卵巣がん幹細胞の制御機構、ポスター発表、内野 瑠衣、佐藤 愛、石黒 竜也、大畑 宏和、高松信彦、恩田 貴志、加藤 友康、榎本 隆行、岡本 康司、第39回日本分子生物学会年会シンポジウム、2016/12/1、国内
12. Large scale single-cell gene expression analysis for understanding the heterogeneity of colon cancer tissue.、ポスター発表、ニガム ヌプル、塩川 大介、岡本 康司、The 10th International Conference on Single Cell Research、2016/11/17、国内

13. NADPH oxidase と mTOR Complex 1 のフィードバックループ制御は大腸がん幹細胞性の維持に寄与する、口頭、大畑 広和、塩川 大介、岡本 康司、第 75 回日本癌学会、2016/11/6、国内
14. シングルセル遺伝子発現解析により示された Lgr5 陽性大腸がん幹細胞の多様性と Wnt ターゲット遺伝子の発現変化、口頭、塩川 大介、大畑 広和、岡本 康司、第 75 回日本癌学会、2016/11/6、国内
15. ヒトがん幹細胞の *in vitro* 培養系を用いたがん転移制御機構の解析、口頭、岡本 康司、第 4 回がん代謝研究会、2016/7/7、国内
16. 乳癌予後予測因子としての TRIM44 の役割、口頭、川端英孝、池田和博、東浩太郎、杉谷郁子、木脇圭一、藤井丈士、大崎昭彦、佐伯俊昭、堀江公仁子、井上聡、第 17 回ホルモンと癌研究会、2016/6/24-25、国内。
17. Systemic identification of molecular targets involved in acquired resistance to endocrine therapy for hormone-dependent cancers based on functional screening and high-throughput sequencing, ポスター, Ikeda K, Horie K, The 41st Naito Conference on "Cancer Heterogeneity and Plasticity: Relevance to Therapeutic Resistance", 2016/7/5-8, 国内
18. エクソソームを介してがんの免疫エスケープを引き起こす EBAG9 の新しい作用メカニズムと骨における役割, ポスター, 井上聡, 柴祥子, 池田和博, 宮崎利明, 東浩太郎, 田中伸哉, 堀江公仁子, 第 2 回日本骨免疫学会, 2016/7/6-8, 国内。
19. エストロゲン応答遺伝子 EBAG9 欠損マウスは骨密度の低下と細胞傷害性 T 細胞の活性化を呈する, 口頭, 柴 祥子, 池田和博, 井上 聡, 第 34 回日本骨代謝学会, 2016/7/20-23, 国内。
20. マウスの運動持続能と骨格筋におけるエストロゲンの役割の解析, ポスター, 長井咲樹, 池田和博, 堀江公仁子, 長澤さや, 竹田省, 井上聡, 第 2 回日本筋学会学術集会, 2016/8/5-6, 国内。
21. Female mice lacking estrogen receptor-binding fragment-associated antigen 9 display decreased bone mineral density, Shiba S, Ikeda K, Azuma K, Sato W, Miyazaki T, Tanaka S, Horie-Inoue K, Inoue S, ポスター, The Joint Scientific Annual meetings of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology, 2016/8/21-24, 国外。
22. Mitochondrial respiratory supercomplex assembly-promoting factor COX7RP regulates bone metabolism in mice, ポスター, Ikeda K, Shiba K, Horie-Inoue K, Inoue S, The Joint Scientific Annual meetings of the Endocrine Society of Australia and the Society for Reproductive Biology, 2016/8/21-24, 国外。
23. ミトコンドリア呼吸鎖複合体の形成促進因子である COX7RP は糖新生を調節する, 口頭, 柴祥子, 池田和博, 堀江公仁子, 中山哲俊, 田中知明, 井上聡, 第 89 日本生化学会大会, 2016/9/25-27, 国外。
24. shRNA スクリーニングとシーケンス技術によるホルモン不応性がん関連のコード・非コード RNA の同定, 口頭, 堀江公仁子, 池田和博, 井上聡, 第 39 回日本分子生物学会, 2016/11/30-12/2, 国内。
25. エストロゲンは骨格筋におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現を調節し生体での運動持続能を向上させる, 口頭, 池田和博, 長井咲樹, 堀江公仁子, 長澤さや, 竹田省, 井上聡, 第 24 回日本ステロイドホルモン学会, 2016/12/3, 国内。
26. エストロゲンによって誘導され乳がん細胞の増殖・生存を制御する長鎖非コード RNA の同定, ポスター, 水戸部悠一, 池田和博, 堀江公仁子, 井上聡, 第 17 回関東ホルモンと癌研究会, 2017/1/28, 国内。

27. Proteasome subunit PSMD1 participates in p53 degradation and regulates proliferation of breast cancer cells, ポスター, Okumura T, Ikeda K, Sato W, Okamoto K, Horie-Inoue K, Takeda S, Inoue S, AACR Annual Meeting 2017, 2017/4/1-5, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし