

国際共同研究事業
スイスとの国際共同研究プログラム
平成 30 年度実施報告書

平成 31 年 3 月 31 日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

共同研究代表者

所属機関・部局 北海道大学・遺伝子病制御研究所

(ふりがな)

職・氏名 教授・^{ふじた}藤田 ^{やすゆき}恭之

1. 事業名 国際共同研究事業スイスとの国際共同研究プログラム
2. 研究課題名 (和文) 正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合の統合的研究—新規癌予防薬開発を指して
(英文) Exploring cell competition between normal and transformed epithelial cells as a novel cancer preventive mechanism
3. 共同研究実施期間 (全採用期間)
平成 29 年 3 月 1 日 ~ 平成 32 年 2 月 29 日 (3 年 0 ヶ月)
4. 研究参加者 (代表者を含む)
(1) 日本側参加者 6 名 (2) スイス側参加者 11 名
5. 主要な物品購入状況 (単価 (一品又は一組) 若しくは一式の価格が 50 万円以上のものを購入した場合は記載)

物品名	仕様 型・性能等	数量	単価(円)	金額(円)	設置研究機関名		備考
ダイレクトヒート型マルチガス インキュベーター一式	SMA-30D 30L アステック	1	548,640	548,640	北海道大学		

備考：本事業の委託費と他の経費とを合算使用する際は、合算使用した旨を備考欄に記載した上で、金額は本事業の委託費によるもののみ計上してください。

8. 研究実施状況

※ 申請書の内容及び当該年度実施計画書の「5. 本年度実施計画の概要」と対応させつつ、当該年度の研究の実施状況を簡潔に日本語にて記入してください。

本研究では、哺乳類における細胞競合研究のパイオニアである藤田と様々なマウスモデルを用いて世界のがん研究をリードする Huelksen が強力なタグを組み、密接な共同研究にて細胞競合研究を統合的に推進することによって、がんの超初期段階で正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合現象を解明し、世界初のがんの予防的治療薬の開発の実現に向けて十分なシーズを得ることを目標とする。

平成30年度は、以下の4つの研究計画を遂行した。

1) スクリーニングで同定された細胞競合制御分子の機能解析

日本側は、これまでファージ抗体ディスプレイ法などによるスクリーニングを行い、複数の細胞競合制御分子の同定に成功している。中でも、Collagen 17A1 に焦点を当てて研究を進めた。Collagen 17A1 は、MDCK 細胞において RasV12 発現に伴って形質膜における発現が亢進することが分かっていた。平成30年度は、以下の点について、その分子メカニズムなどを詳細に解析した。

i) RasV12 発現によって、Collagen 17A1 の形質膜局在が増加する分子メカニズム

まず、RasV12 発現による Collagen 17A1 の発現上昇が転写レベルではなく、post-translational な制御を受けていることが分かった。さらに様々な阻害剤の効果を検証することにより、Ras 変異細胞では Collagen 17A1 のエンドサイトーシスを介したリソゾームでのタンパク質分解が抑制されていることが明らかになった。

ii) Collagen 17A1 の発現によってフェノタイプが変化するか

Ras 発現する上皮細胞が多層構造を定することは以前から知られていたが、アピカル側に逸脱した Ras 変異細胞において Collagen 17A1 の発現が強く上昇していることが明らかになった。さらに、Collagen17A1 をノックアウトした Ras 変異細胞では多層構造の形成が強く抑制されることがわかった。このことから、Collagen17A1 が Ras 変異細胞の多層構造形成を正に制御する因子であることが明らかになった。

iii) 細胞密度による発現の変化があるか、また細胞に物理的な刺激を加えた時に、発現が変化するか

非常に興味深いことに、Collagen17A1 の細胞間接着部位における集積は細胞密度が高くなるに従って減弱することが分かった。さらに、上皮細胞層をストレッチすると Collagen17A1 の細胞間接着部位への集積が亢進した。これらのデータは、Collagen17A1 がメカノセンサーとして上皮細胞にかかる物理的環境に応答してその発現、局在を変化させるという新たな機能を示している。

iv) Collagen17A1 の結合タンパク質の同定

さらに、免疫沈降法によって、Collagen17A1 の新規結合タンパク質として EPS15 を同定した。現在、EPS15 ノックアウト細胞を樹立することなどによって、EPS15 と Collagen17A1 結合の機能的意義を解析している。

2) ハイスループットスクリーニングによる細胞競合を促進する低分子化合物の探索

日本側は、すでに細胞競合による変異細胞排除を促進する低分子化合物のハイスループットスクリーニング系の確立に成功し、北海道大学創薬科学研究教育センター及び東京大学創薬機構と連携してスクリーニングを進めている。20万を超える低分子化合物ライブラリーのスクリーニングを終え、同定した低分子化合物の機能解析を進めている。同定された化合物の中でも特に PLX4720 についての機能解析を進めた。PLX4720 は ZAK1 キナーゼを阻害することによって、上皮細胞層からの Ras 変異細胞の排除を促進していることが分かった。今後はさらなる分子メカニズムの解析を進めるとともに、in vivo における PLX4720 の効果を検証していく。

3) 細胞競合マウスモデルの開発とそれを用いた解析

正常上皮細胞と変異細胞間に生じる細胞競合現象を解析するため、少量のタモキシフェンの投与によって正常上皮細胞層に Ras 変異がモザイク様に誘導される細胞競合マウスモデルの作成のため、Lox/Stop/Lox-kRasV12-IRES-eGFP マウスと Villin-CreERT2 (または CK19-CreERT) マウスをかけ合わせた。そして、そのマウスを用いて、様々な上皮組織において、Ras 変異細胞が上皮層の管腔側に排除されることを見出した。特に、肺では Ras 変異細胞が基底膜側へ逸脱するとともに、免疫細胞や線維芽細胞を周囲に集積させたり、周辺の正常上皮細胞の増殖を亢進させることが分かった。この知見はがんの超初期段階においても、がん微小環境様の現象が生じうるという新たな概念を新たに提示している。今後、上記した細胞競合制御分子の機能解析や、低分子化合物の効果の検証を進めていく。

4) 2国間交流の推進および若手研究者養成への貢献

平成30年度は、スイス側から若手研究者としてエレニ バリが北海道大学に3週間滞在し、細胞競合に関わる技術を習得するとともに、研究代表者であるヨーク ヒュースケンが数日滞在し、共同研究について濃厚なディスカッションを行なった。これによって、新たな技術の習得に取り組むとともに、異文化を経験することによって国際感覚・コミュニケーション能力の向上を図ることができた。

9. 研究発表（平成30年度の研究成果）

【雑誌論文】 計 (2) 件 うち査読付論文 計 (2) 件

通番	共著の有無*	著者名	論文標題			
		Yako, Y., Hayashi, T., Takeuchi, Y., Ishibashi, K., Kasai, N., Sato, N., Kuro miya, K., Ishikawa, S. and Fujita, Y.	ADAM-like Decysin-1 (ADAMDEC1) is a positive regulator of Epithelial Defense Against Cancer (E DAC) that promotes apical extrusion of RasV12-transformed cells.			
①	無	雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		<i>Scientific Reports</i>	有	8	2 0 1 8	9639. doi: 10.1038/s41598-018-27469-z.
②	無	著者名	論文標題			
		Takagi, M., Ikegawa, M., Shimada, T., Ishikawa, S., Kajita, M., Maruyama, T., Kamasaki, T. and Fujita, Y.	Accumulation of the myosin-II-spectrin complex plays a positive role in apical extrusion of Src-transformed epithelial cells.			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
		<i>Genes to Cells</i>	有	23	2 0 1 8	974-981
③		著者名	論文標題			
		雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁

【学会発表】 計 (0) 件 うち招待講演 計 (0) 件

通番	発表者名		発表標題	
①				
	学会等名	発表年月日	発表場所	

【図書】 計 (0) 件

通番	共著の有無*	著者名	出版社		
①		書名	発行年	総ページ数	

* 相手国研究代表者との共著がある場合は○、相手国研究代表者との共著であり論文内に事業名を明記している場合は◎と記入した上で、明記されている箇所（頁、巻頭、巻末等）を記入。

* 足りない場合は適宜行を追加して下さい。

1. この報告書は、最終年度を除く毎年度提出してください。
2. 本会の事業報告等に記載するための適当な写真がありましたら、説明を付して添付してください。
3. この報告書の1.～5. 及び8.～9. は、本共同研究の成果として本会ホームページに掲載するほか、報告書全てを閲覧用に公開します。また、この報告書を本会の事業報告として刊行する場合、内容に影響しない範囲で修正を行うことがあります。