

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08643

研究課題名(和文)胆管癌幹細胞に高発現するS100分子群の癌悪性形質維持機構の解明

研究課題名(英文)Functional role of S100 proteins in maintenance of the malignant phenotype in cancer stem cells of cholangiocarcinoma

研究代表者

小嶋 克彦(Kojima, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：80345743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆管癌幹細胞を含むCD274low細胞分画に高発現する分子群として同定されたS100分子群の機能解明を本研究の目的とした。このうち、S100A10がCD274low細胞の幹細胞性、造腫瘍性に必須であることがわかった。また、胆管癌細胞において細胞周期の進行や細胞遊走能の獲得にS100A10が重要であることが判明した。特にS100A10欠損の影響は細胞骨格系に生じ、アクチン骨格形成や中間径フィラメントであるビメンチンの発現に表れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胆管癌幹細胞を含む細胞分画の指標である「CD274low」とはあくまで細胞の表現型であり、癌幹細胞としての機能発現への関わりを示すものではなかった。我々は、本細胞分画に高発現する分子としてS100分子群を同定し、特にS100A10に関する解析から癌幹細胞性維持における重要性を明らかにした。また、この分子が癌細胞の細胞遊走能獲得に関与することを示した。本研究の成果は、S100A10が発癌から転移まで広範囲に機能することを示唆しており新しい治療標的となりうる分子を見出した点で意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：S100 proteins are highly expressed in CD274low cancer stem cell (CSC)-like cells in cholangiocarcinoma. Here we demonstrated S100A10 is indispensable for the tumorigenicity of the CSC-like cells. We also found the indispensable roles of S100A10 on cell cycle progression and cell migration of cholangiocarcinoma cells. S100A10 regulates the integrity of cytoskeletons, including vimentin intermediate filaments.

研究分野：機能生物化学

キーワード：S100A10 胆管癌 転移 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胆管癌は最も予後不良な癌種のひとつであり、外科手術を中心とした治療が選択できない症例は、放射線療法・化学療法を施行しても極めて治療抵抗性が高く、予後不良例が多い。癌の治療抵抗性の元凶のひとつとして、「癌幹細胞」の存在が注目されている。近年、胆管癌細胞のなかで CD274low の分画が胆管癌の癌幹細胞であることが報告された (Tamai, K. et.al, Cancer Science, 105, 667-674, 2014)。しかし、胆管癌幹細胞が示す CD274low とは、あくまで細胞種の表現型であり、その維持、癌幹細胞性を担う分子を同定しなければ真に効果的な治療開発はできない。この目的のため、申請者は CD274low 細胞と正常細胞との比較プロテオミクスを行い、S100 蛋白質と Annexin A2 の蛋白質複合体が胆管癌幹細胞において特異的に発現亢進していることを見出した。さらに、宮城県立がんセンター研究所がん先進治療開発研究部の田中伸幸らは、胆管癌の悪性度とそれらに由来する癌幹細胞内での S100 蛋白質発現に正の相関を明らかにした。これらの結果から、S100 分子群が胆管癌に幹細胞性と悪性化という 2 つの重要な形質を付与していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

上記の仮説とともに、S100 分子群の機能阻害が胆管癌への新規治療に繋がる可能性を検証するため、以下の点について明らかにする。1. 胆管癌における癌幹細胞性と悪性形質発現における S100 分子群の役割を解明する。2. S100 分子群による癌細胞の細胞周期と核異型の制御機構を解明する。3. 分泌型 S100 分子群の微小環境に対する意義解明と診断マーカーとしての有用性の検証。

3. 研究の方法

[1] S100 阻害による癌細胞増殖の抑制と悪性化形質 (遊走・浸潤) の解析: S100 発現阻害による効果を解析するため、shRNA 発現レンチウイルスおよび CRISPR/Cas9 法を用いてヒト培養細胞株に対し S100A10 および A11 のノックダウンおよびノックアウト細胞を作成し、増殖抑制効果の解析を行った。次に悪性度への影響を検証するため、細胞遊走能 (スクラッチアッセイ) と浸潤能 (基底膜破壊に基づく Cell invasion アッセイ) を解析した。

[2] S100 分子群阻害による癌幹細胞性の解析: S100 は胆管癌の癌幹細胞分画から同定されており、幹細胞性における役割は不明である。S100 ノックアウト細胞を用い、以下の癌幹細胞性に関する解析を行った。1) スフェア形成能の低下: スフェア用培地での培養アッセイ。2) 抗癌剤耐性の低下: シスプラチン・ゲムシタピン等による細胞死アッセイ。3) 幹細胞性マーカーの低下: リアルタイム PCR を用いた Nanog 等の多分化能マーカーの比較を行った。さらにマウスを用いた in vivo 移植系を用いて、造腫瘍能、幹細胞性の関連を検証した。

[3] S100 阻害は細胞周期を遅延させるとともに異常な細胞分裂を誘導する可能性がある。この現象をさらに確認するため、誘導型の RNA 阻害レンチウイルスを用いて、S100 ノックダウン誘導による細胞周期の異常を解析した。一方、予備の実験データから S100 阻害は重篤な核異型を誘導する可能性が予想されたことから、均一な染色体分配 (紡錘体チェックポイント) に着目した経時的顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

[1] shRNA 発現レンチウイルスを用いた S100A10 および S100A11 のノックダウンにより、ヒト培養細胞株の増殖速度は共に 60% 程度に低下した。一方、各遺伝子のノックアウトにより、後者では約 50% の増殖低下を認めたのに対し、S100A10 の欠損では数% にまで低下し、両者間で明確な差異が観察された。同様の傾向は細胞遊走能についても見られ、スクラッチアッセイでの間隙閉鎖率は S100A10 ノックアウト細胞の顕著な低下を観察した。

[2] 胆管癌幹細胞を含む CD274low 細胞のスフェア形成能は、S100A10 ノックアウトにより半分程度に低下した。この時、CD44、ABCG2、ABCC2 といったがん幹細胞マーカーや Nanog、Klf4 といった多能性マーカーの発現低下を示した。また、癌幹細胞性を示す CD241low 細胞の NOG マウスへの 1000 または 3000 個の移植系において、S100A10 のノックアウトは造腫瘍性を喪失させた。以上のことから、胆管癌幹細胞の形質獲得における S100A10 の重要性が明らかとなった。

[3] 細胞周期解析から、G1/G0 期細胞の存在比が親細胞株での約 50% から S100A10 ノックアウトにより 80% 以上へと偏ることがわかった。また、経時的顕微鏡観察から、ノックアウト細胞では細胞分裂終期の細胞質分離に失敗し、多核化した細胞が生じる様子が観察された。その直後に細胞死を起こす細胞も多数観察された。

[4] 細胞遊走能の評価結果をもとに S100A10 の細胞骨格系への関わりを精査した。まず、アクチン骨格について、通常プラスチック基材の培養ディッシュ上では親細胞株とノックアウト細胞との間に明確な違いは見られなかったが、コラーゲンやフィブロネクチンでコートしたディッシュ上で両者に顕著な違いが出た。ここで、ノックアウト細胞では、親細胞で観察されるストレスファイバーのサブタイプのうち、dorsal stress fiber と transverse arc 構造がほぼ欠損し、focal adhesion を持つストレスファイバーが細胞辺縁部に凝集していた。この表現型は、

myosin IIB 欠損細胞と類似するものであったが、S100A10 ノックアウト細胞において myosin IIB の細胞内局在等に影響はみられなかった。更に他の細胞骨格系への影響を解析したところ、中間径フィラメントのひとつであるビメンチンの発現が S100A10 発現量と相関していることが判明した。ノックアウト細胞への S100A10 の再導入はビメンチンの発現増強を促すと同時にアクチン骨格系の異常と細胞遊走能の低下をレスキューした。興味深いことに、ビメンチンのみの強制発現ではアクチン骨格異常を解消することはできなかった。癌細胞の転移では、上皮間葉転換 (EMT) と呼ばれる細胞極性と接着機能の喪失と細胞の間葉系化による細胞遊走能の獲得が重要なプロセスであると知られ、特に後者の過程ではビメンチンの発現が特徴のひとつとされている。本研究の成果は、癌細胞で起こる EMT や転移における S100A10 の関与を示唆するものであり、今後はその機能阻害による癌悪性形質抑制を指向しつつ研究を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Amano Yuji, Akazawa Yohei, Yasuda Jun, Yoshino Kazuhisa, Kojima Katsuhiko, Kobayashi Norimoto, Matsuzaki Satoshi, Nagasaki Masao, Kawai Yosuke, Minegishi Naoko, Ishida Noriko, Motoki Noriko, Hachiya Akira, Nakazawa Yozo, Yamamoto Masayuki, Koike Kenichi, Takeshita Toshikazu	4. 巻 17
2. 論文標題 A low-frequency IL4R locus variant in Japanese patients with intravenous immunoglobulin therapy-unresponsive Kawasaki disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatric Rheumatology	6. 最初と最後の頁 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12969-019-0337-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakada Tsutomu, Kashihara Toshihide, Komatsu Masatoshi, Kojima Katsuhiko, Takeshita Toshikazu, Yamada Mitsuhiro	4. 巻 115
2. 論文標題 Physical interaction of junctophilin and the CaV1.1 C terminus is crucial for skeletal muscle contraction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4507 ~ 4512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1716649115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Naoko Ogama, Katsuhiko Kojima, Takayuki Imai, Maki Kobayashi, Kazuto Matsuura, Nobuyuki Tanaka
2. 発表標題 S100A10 regulates proliferation and migration of HNSCC cells through cytoskeleton control
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nishikawaji T, Kojima K, Ogama N, Matsuura K, Tanaka N
2. 発表標題 S100A10 regulates malignant phenotypes of head and neck squamous cell cancer.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kojima K, Amano Y, Tanaka N,, Takeshita T
2. 発表標題 Processing body protein ATXN2L maintains progenitor properties of CML cells
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹下 敏一 (Takeshita Toshikazu) (60212023)	信州大学・学術研究院医学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------