

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02701

研究課題名（和文）癌幹細胞性と微小環境を制御するS100A10の分子基盤解明による革新的治療戦略

研究課題名（英文）S100A10 on Cancer Stem Cell and Microenvironment: Towards therapeutic application

研究代表者

田中 伸幸（TANAKA, NOBUYUKI）

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター（研究所）・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号：60280872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：癌幹細胞は効果的な治療標的であるが、標的遺伝子が未解明であるため有効な治療法開発に結びついていない。プロテオミクス解析により、我々はS100A10が癌幹細胞に特異性が高いことを見出した。本研究ではS100A10が果たす機能を明らかにする研究を展開し以下の結果を得た。1）S100A10は偽足形成に重要であり、細胞遊走と浸潤に大きな役割を果たす。2）S100A10は造腫瘍性を正に制御する。3）癌幹細胞性遺伝子の発現には必須ではない。4）細胞骨格維持に重要であり、S100A10を欠失させると明確な形態異常を起こす。以上の結果よりS100A10は悪性度の高い癌の治療標的として妥当であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性度の高い癌の多くはドライバー遺伝子が発見されず、免疫チェックポイント阻害薬が無効な症例も多いことから新たな創薬が求められている。本研究の成果は、悪性度の高い癌に対するS100A10標的治療が有効である可能性を示しており、今後の創薬に繋がる可能性がある。学術的な特徴は、S100A10が細胞骨格制御を担う重要分子であることを明らかにした点にある。S100蛋白質は約20種存在することから、これらの分子ネットワークが支える細胞生物学的役割の解明に繋がる可能性が出てきた。このような点から本研究の学術的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Cancer stem cells are promising therapeutic targets for cancer therapy. In this regard, identifying specific genes for cancer stem cells can be a key for therapy development. Through proteomic analyses, we identified S100A10 expression enhanced in cancer stem cells and many malignant tumors. We examined the properties of S100A10 and revealed their roles in cancer cells. First, S100A10 contributes to cancer cell migration and invasion. Second, it supports tumor formation in vivo. Third, S100A10 is not necessary for stem cell-related transcription factors. Fourth, S100A10 supports cytoskeleton organization. Taken together, S100A10 is a valid therapeutic target for cancers.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん 細胞骨格

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん幹細胞(Cancer Stem Cell)は自己複製により同一の未分化形質を維持しながら、大多数の非がん幹細胞を生み出している。癌幹細胞は、造腫瘍性・治療抵抗性・浸潤転移能という3つの悪性形質を併せ持つ細胞群であることから、癌幹細胞を根絶する治療技術の確立が急務となっている。これまで複数の癌幹細胞マーカーが同定されてきたが、有効な治療には繋がっていない。明確なドライバー変異がほとんどない癌において「がん幹細胞」は重要な概念である。癌幹細胞性を担う分子を同定することは、潜在的な治療標的を明らかにすることに繋がるため、研究対象として重要である。

(2) 我々は、臨床がん検体をセルソーターで分取して超免疫不全 NOG マウスに異種移植することでヒト腫瘍の幹細胞分取を開始した。頭頸部癌から得られた腫瘍は移植によって継代が可能な PDX となり、in vitro 培養が可能となった。この結果、細胞株 HPCM2 を得た。

(3) がん幹細胞に発現が亢進している分子をプロテオミクス探索した結果、S100A10 を同定した。S100A10 は約 20 種の S100 分子ファミリーに属する。Ca 結合性部位に変異を有する点で、他の大多数の分子と異なっており、がんにおける働きやがん幹細胞との関連性は未解明であった。

### 2. 研究の目的

本研究課題では S100A10 が癌幹細胞性と悪性形質を誘導する分子基盤を解明するため、癌幹細胞維持・運動性・細胞外機能の3作用点を明らかにする。S100A10 機能を補完する分子を同定することで S100A 分子群による細胞内機能を解き明かし、さらに細胞外機能、特に腫瘍微小環境における抗腫瘍免疫制御を明らかにする。これらの学術的成果を応用して、S100A10 を標的とする新たな癌治療に向けた基盤技術を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞株：S100A10 が癌幹細胞性を維持する分子基盤の解明には、HPCM2 株を用いる。PDX を用いた in vivo 解析において HPCM2 細胞は一定割合で癌幹細胞を含有する。さらに、ヒト S100A10 配列をもとにターゲティングベクターを構築し、S100A10 をノックダウンおよびノックアウト (KO) した細胞を作成した。

(2) マウス：造腫瘍性の解析のため、nude マウスを購入し使用した。動物実験は宮城県立がんセンターの動物実験委員会の承認を得たプロトコールに従って実施し、倫理面に配慮した。

(3) 細胞遊走・細胞浸潤の解析：ダブルチャンバーシステム(Matrigel invasion chamber 等)を用いて解析した。

### 4. 研究成果

(1) 細胞増殖における S100A10 の働き：S100A10 が細胞増殖に与える影響を解析した。HPCM2

と HPCM2-S100A10-KO 細胞を比較したところ、in vitro 培養において後者の増殖速度が有意に低下していた。細胞分裂像を観察したところ、一部細胞分裂において異常像が得られた。したがって、S100A10 の細胞増殖における役割の一部は細胞分裂異常に起因する可能性が考えられる。

(2) 細胞の運動性における S100A10 の働き : S100A10 ノックアウト細胞 (HPCM-S100A10-KO) では、細胞遊走能が有意に低下した。次に浸潤能を調べたところ、同様に癌細胞の浸潤能が低下していた。さらに、S100A10 のノックダウン細胞を樹立し、同様に細胞運動性を解析したところ、細胞遊走と細胞浸潤能が低下していることが確かめられた。細胞運動性は癌の悪性形質であるため、S100A10 阻害は癌の浸潤と転移を抑制する可能性があると考えられる。

(3) がん幹細胞性の維持における S100A10 の働き : S100A10 ががん幹細胞性に与える役割を明らかにするため、in vitro スフェア形成能を解析した。S100A10 ノックアウト細胞はスフェア数の低下を示した。がん幹細胞性に関する山中遺伝子の発現を定量 PCR 法により調べたところ、転写因子の発現に一定の明らかな変化を認めなかった。がん幹細胞では抗がん剤耐性があるため、薬剤排出関連遺伝子の発現を解析した。これらポンプ遺伝子の一部が高まることがわかったが、全体を統括的に制御する事象は確認できなかった。以上の結果をまとめると、S100A10 はがん幹細胞性の一部機能に影響を与えるものの、幹細胞性の発揮に必須な因子ではないと結論づけられた。

(4) 微小環境における S100A10 の役割 : 腫瘍微小環境では腫瘍と間質細胞、血管内皮細胞、さらに免疫細胞などからなる複雑な細胞コミュニティーが醸成されている。これまで S100A10 は細胞内および細胞膜で機能すると考えられてきたが、S100A10 が細胞外に分泌される可能性を想定し、解析を行った。細胞上清を 10,000xG で超遠心し、ペレット分画における S100A10 の含有を調べたところ、微量の S100A10 が検出された。この分画を TSG101 でウエスタンブロットしたところ、強いシグナルが得られた。したがって、S100A10 はエクソソームに含有される可能性があると考えられた。S100A10 は細胞間コミュニケーションに関与する可能性があると考えられる。

(5) 細胞骨格系の維持における S100A10 の役割 : S100A10 の運動性解析において、S100A10 ノックアウト細胞の形態異常が認められた。細胞骨格異常の異常を疑い、アクチンの可視化を行った。その結果、一部の線維の走行が乱雑化することが明らかとなった。これらの結果から、S100A10 は正常な細胞骨格系の維持に必須であることが明らかとなった。今後、S100A10 が制御する骨格系異常の原因を探求することが必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kimura Sakika, Maeda Koki, Nagashima Ryuichi, Miura Koya, Arakawa Masashi, Ebina Hiroataka, Tanaka Nobuyuki, Morita Eiji	4. 巻 39
2. 論文標題 Efficient immunogenic peptide antigen delivery to dendritic cells using an ESCRT-mediated extracellular vesicle formation method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccine	6. 最初と最後の頁 2976 ~ 2982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.vaccine.2021.04.021	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中伸幸
2. 発表標題 S100A11はYAP活性化を通して非小細胞肺癌の悪性化を維持する
3. 学会等名 第2回がんウイルス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小竹夏未、小鎌直子、田中伸幸
2. 発表標題 新規アラミンS100Aによる自然免疫賦活と腫瘍微小環境制御
3. 学会等名 第73回 日本細菌学会東北支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 N.Tanaka, N.Kodake
2. 発表標題 S100A proteins play immune regulatory roles in tumor microenvironment
3. 学会等名 AACR2019(米国癌学会総会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西川路武人、小鎌直子、小嶋克彦、松浦一登、田中伸幸
2. 発表標題 S100A10 promotes the cell migration and invasion 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 西川路武人、小鎌直子、小嶋克彦、松浦一登、田中伸幸
2. 発表標題 Doxycycline regulated shRNA dictated knockdown of S100A11 reduced the migratory and invasive capacity of H1975 cells
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 小竹夏未、小鎌直子、小嶋克彦、小林真紀、西川路武人、竹下敏一、田中伸幸
2. 発表標題 新規アラミンS100Aによる自然免疫賦活と腫瘍微小環境制御
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林真紀、福原達郎、田中伸幸
2. 発表標題 A novel not-alpha IL-2 elicits potent anti-tumor activity in mice by improving the effector to regulatory T cell balance.
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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	長島 隆一  (NAGASHIIMA RYUICHI)  (20783707)	地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・研究技師   (81303)	

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
---------	---------