

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03149

研究課題名(和文) ZIP10を標的とした癌転移開始細胞の抑制を基盤とした新しい抗転移療法

研究課題名(英文) New therapy method to inhibit cancer metastasis-initiating cell targeting ZIP10

研究代表者

武井 佳史 (TAKEI, YOSHIFUMI)

愛知学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70362233

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌転移開始細胞(以下MIC)は、原発癌に巣喰う微量細胞集団で、癌転移を積極的に仕掛ける。「MICの制圧」は癌転移抑止に必須であるが、MICに関して未解明な点が多い。我々はスキルス胃癌患者の原発癌組織からMICを単離し、そのMICで高発現しているZIP10のノックアウトに成功した(CRISPR/Cas9・ゲノム編集技術による)。ZIP10をノックアウトしたMICでは、細胞増殖能・コロニー形成能・遊走浸潤能が低下することが分かった。ZIP10が癌転移抑止の新たな分子標的であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌転移研究は大変遅れている。その理由に、癌転移の良いモデルがない現状がある。我々は、癌転移でメインプレイヤーとなる癌転移開始細胞(MIC)を、スキルス胃癌患者から成功裡に単離した。その解析から、ZIP10がMICの機能維持に重要で、癌転移抑制に有用な新規標的であることが分かった。癌の死因の大半は癌転移による。故に癌患者の予後において、癌転移抑止医療が大切になる。本成果は、癌転移抑止医療の実現に繋がる社会的意義を有する。

研究成果の概要(英文)：The concept of metastasis-initiating cells (MICs) has been proposed. MICs originate in the primary tumors and are considered special cells to promote cancer metastasis. However, MICs have not been investigated in detail. We successfully isolated MICs from primary cancer tissues of a scirrhous gastric cancer patient, and then knocked out ZIP10 expression via genome editing methods. The ZIP10-deficient MICs showed the decreased proliferation, colony formation activity, and invasion activity compared with the wild-type MICs. ZIP10 is a novel target to inhibit cancer metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトが癌で命を落とす主な要因は「癌の転移」にある。しかし、「癌転移」を抑止する方策やその分子機構の解明がとて遅れている。癌の親玉ともいえる「癌幹細胞」の存在が報告されて久しい。近年、癌転移開始細胞 (Metastasis-initiating cell, 以下MIC) の存在が報告された。MIC は癌原発巣に存在する癌幹細胞のうち、さらに一握りの亜集団で、積極的に転移を仕掛ける。いわば「癌転移のスペシャル細胞」である。しかし、MIC 研究は未だ黎明期にある。MIC を捕捉するための特異的な細胞表面抗原も定まっていない。「まとまった数のMIC を単離する技術の不足」、「単離したMIC について、動物個体レベルで癌転移能を評価するモデルの不足」などがボトルネックとなり、MIC 研究の進展を困難にしている。我々は、その解決に挑むことを目的に本課題を提案する。

2. 研究の目的

癌転移開始細胞 (MIC) は、原発癌に巣食う微量な細胞集団で、癌転移を積極的に仕掛ける。「MIC の制圧」は癌転移抑止に必要不可欠であるが、MIC の特異抗原が不明である等、未解明な点が多い。我々は独自のスキルス胃癌株の正所性移植癌転移モデルの解析から「ZIP10 がMIC特異抗原の候補」である予備知見をこれまでに得てきた。この知見を基に以下を目的に掲げる。

様々な癌種からMIC を単離し、そのZIP10 をゲノム編集でノックアウトし、癌転移におけるZIP10 の生物学的意義を解明する。

ZIP10 がin vivo で癌転移抑止の分子標的と成り得るか否かを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 癌組織からのMIC 単離

癌患者の癌組織を出発材料にMIC を単離した。癌組織をコラゲナーゼ (Worthington Biochemical Corporation 製) で分散させた後、癌幹細胞専用培地 (Cancer Stem Cell Media Premium: ProMab 社, 米国) でsphere 培養後、BALB/c nude mouseに対して正所性に移植した。転移巣からMIC を採取した。正所性に移植したとき、100%の頻度で転移する所まで操作を反復して、MIC の単離完了とした。

(2) ゲノム編集によるZIP10のノックアウト

2ベクタータイプ (Cas9 発現ベクターとsingle-guide RNA 発現ベクター) のゲノム編集実験系 (タカラバイオ社製) を用いた。ヒトZIP10 の塩基配列を調べ、single-guide RNA (以下sgRNA) の候補配列を選び化学合成した。上記(1)で単離に成功したMIC に対して、リポフェクトアミン 3000 (ライフテクノロジーズ社製) でsgRNA を導入した。最終的にCRISPR/Cas9 を導入したMIC について、Puromycin でselection し、ZIP10 のノックアウト細胞を得た。変異導入の有無をT7E1 アッセイ (タカラバイオ社製) とサンガー法によるシーケンシング解析で調べた。

(3) ゲノム編集でZIP10 をノックアウトしたMIC のフェノタイプ解析: in vitro 実験

ZIP10 をノックアウトしたMIC について、細胞の形態変化、増殖能の変化、浸潤能の変化などを調べた。

(4) ゲノム編集でZIP10 をノックアウトしたMIC のフェノタイプ解析: in vivo 実験

ZIP10をノックアウトしたMIC について、ヌードマウスに正所性に移植した。原発癌形成後、ZIP10のノックアウト状態を定量PCR やImmunoblotで確認した。腹膜転移や癌性腹水の貯留も調べた。

4 . 研究成果

(1) 癌組織からのMIC 単離

スキルス胃癌患者の癌組織を基に、MIC の単離に成功した。単離したMIC について、シングルセル化までを行った。ステムネス・マーカーで染色し、陽性が確認できたため、最終単離したMIC は幹細胞性を有していると結論づけた。最終単離したMIC をヌードマウスに正所性に移植すると、検討した全匹において、腹膜転移を起こし、かつ腹水を貯留することが分かった。

(2) ゲノム編集によるZIP10 のノックアウト

上記(1)で単離したMIC では、ZIP10が高発現しており、ゲノム編集実験を組むことで、標的遺伝子ZIP10 のノックアウトを試みた。sgRNA を作製して実験し、効率よくZIP10 をノックアウトできることが分かった。ノックアウトの確認は、定量PCRとImmunoblotで行った。最終的にノックアウト株をPuromycin で選択し、安定発現株として単離した。T7E1 アッセイで変異の導入があることを確認し、シーケンシング解析で変異塩基を決定した。

(3) ゲノム編集でZIP10をノックアウトしたMIC のフェノタイプ解析： in vitro 実験

ZIP10 をノックアウトしたMIC について、細胞の形態が変化した。また、増殖能の有意な低下を認めた。浸潤能も有意に低下していた。

(4) ゲノム編集でZIP10 をノックアウトしたMIC のフェノタイプ解析： in vivo 実験

ZIP10 をノックアウトしたMIC について、ヌードマウスに正所性に移植し、in vivo でのフェノタイプを調べた。原発腫瘍形成後、腫瘍を取り出してZIP10 のノックアウトを確認した。MICのZIP10 をノックアウトすると、腹膜転移が有意に抑制された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 5件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Hara T, Tominaga Y, Ueda K, Mihara K, Yanagihara K, Takei Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Elevated METTL9 is associated with peritoneal dissemination in human scirrhus gastric cancers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2022.101255	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 Hara T, Nomura Y, Hattori M, Mihara K, Yanagihara K, Takei Y.	4. 巻 4
2. 論文標題 Elevated Expression of CELSR1 is Associated with Peritoneal Metastasis in Human Scirrhus Gastric Cancers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 103 ~ 111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpbreports.4.4_103	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 Sugiyama N, Tawada M, Sun T, Suzuki Y, Kinashi H, Yamaguchi M, Katsuno T, Aten J, Vlahu CA, Kuppevelt TH, Takei Y, Ishimoto T, Maruyama S, Mizuno M, Ito Y.	4. 巻 25
2. 論文標題 Low-GDP, pH-neutral solutions preserve peritoneal endothelial glycocalyx during long-term peritoneal dialysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02078-9	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 該当する
1. 著者名 Takei Y, Hara T, Suzuki A, Mihara K, Yanagihara K.	4. 巻 87
2. 論文標題 Long Noncoding RNA HOTAIR Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition and Is a Suitable Target to Inhibit Peritoneal Dissemination in Human Scirrhus Gastric Cancers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 277 ~ 290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508350	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto T, Gotoh M, Koide N, Funahashi Y, Shimizu S, Takei Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 Influence of human adipose stem cells on prostate cancer cell growth	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nagoya Journal of Medical Science	6. 最初と最後の頁 217 ~ 224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18999/nagjms.82.2.217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumura N, Sasaki N, Cho Y, Daimaru Y, Nojima T, Mizuno N, Takei Y, Mihara K.	4. 巻 99
2. 論文標題 Rare primary extramedullary hematopoiesis of the thyroid without intranodular vascularity and mutations in the JAK2, MPL, and calreticulin genes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Hematology	6. 最初と最後の頁 2211 ~ 2213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00277-020-04086-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Iohara K, Zayed M, Takei Y, Watanabe H, Nakashima M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Treatment of Pulpectomized Teeth With Trypsin Prior to Transplantation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells Enhances Pulp Regeneration in Aged Dogs	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioengineering and Biotechnology	6. 最初と最後の頁 983
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fbioe.2020.00983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tawada M, Hamada C, Suzuki Y, Sakata F, Sun T, Kinashi H, Katsuno T, Takei Y, Maruyama S, Honda K, Mizuno M, Ito Y.	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of long-term treatment with low GDP, pH neutral solutions on peritoneal membranes in peritoneal dialysis patients.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 689-699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-018-1679-7.	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 該当する

1. 著者名 Takei Y.	4. 巻 1974
2. 論文標題 siRNA-based medicine targeting human bcl-xL against cancers.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 31-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-9220-1_3.	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 Sun T, Mizuno M, Sakata F, Ishii T, Tawada M, Suzuki Y, Kinashi H, Katsuno T, Takei Y, Maruyama S, Ito Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Excessive salt intake increases baseline peritoneal solute transport rate via local TonEBP induction in subtotal nephrectomized mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nephrology Dialysis Transplantation	6. 最初と最後の頁 2031-2042
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/ndt/gfz045.	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 該当する

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉田弥礼、丸山奈緒美、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移におけるMRC2 (CD280) の役割
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 ヒトスキルス胃癌の転移能におけるメチル基転移酵素METTL遺伝子の重要性
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田あや美、岩砂浩樹、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 Galectin 4 の発現変化とスキルス胃癌の腹膜転移能の関係
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野村祐里、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移で発現増加するCELSR1の役割
3. 学会等名 第67回日本薬学会東海支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田あや美、城谷絵美、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 マンノース添加によるスキルス胃癌細胞の増殖抑制機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤冴弥、丸山奈緒美、渡慶次星、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移を制御する -グルタミルトランスフェラーゼ2の役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 庵原耕一郎、Mohammed Zayed、武井佳史、渡辺秀人、中島美砂子
2. 発表標題 高齢イヌにおける歯髄幹細胞を用いた歯髄再生治療のTrypsin前処理による促進法の開発
3. 学会等名 第52回日本結合組織学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 ヒトスキルス胃がんの腹膜転移に関連する新規シグネチャー遺伝子
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の転移に関わる分子機構の解明
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 牛丸翔平、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃がんの腹膜転移におけるPEG10の機能解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大成遥、丸山奈緒美、原敏文、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃がんの腹膜転移に関連する分子マーカーの探索
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部 総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田あや美、須藤夕稀、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 活性型ビタミンD3がスキルス胃癌の腹膜転移能に与える影響
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浅井秀斗、森田あや美、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移においてGalectin 4が果たす役割の解明
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 ヒトスキルス胃がんの腹膜転移におけるCELSR1の役割
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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	三原 圭一郎 (MIHARA KEIICHIRO) (90363077)	藤田医科大学・国際再生医療センター・教授 (33916)	

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