

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15394

研究課題名（和文）胃癌におけるANXA10関連の新規治療標的探索

研究課題名（英文）Elucidation of ANXA10-related new therapeutic target in Gastric cancer

研究代表者

石川 洸（Ishikawa, Akira）

広島大学・医系科学研究科（医）・助教

研究者番号：70876143

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：我々は胃癌におけるAnnexin A10 (ANXA10)に関連した新規治療標的探索を行なった。胃癌細胞株の一つであるMKN-74に対し、CRISPR-Cas9システムを用いたゲノム編集を行い、ANXA10のノックアウトを行った。ノックアウトによるANXA10タンパク発現低下をウエスタンブロットにより確認したのちに、RNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析ではノックアウトによりMAPKに関連した分子などが変動しており、CLDN1, KRT80, RBCK1, SLC7A5といった下流分子が同定され、それらの分子は公共データベース解析において胃癌の予後不良因子であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は胃癌におけるAnnexin A10 (ANXA10)発現により、その下流においてCLDN1, KRT80, RBCK1, SLC7A5などの分子と関連していることを明らかにした。さらにそれら4つのタンパクは公共データベースにおいて胃癌の予後不良因子であることも明らかにした。胃癌は依然として不均一性の高い癌腫であり、その病態は非常に複雑である。そして胃癌が発生して進行するとその不均一性から化学療法耐性化が起こりやすい。その中で、これらの成果は胃癌の病態の一端を明らかにするとともに、新たな治療標的薬を創生する基盤となる知見である。

研究成果の概要（英文）：We explored novel therapeutic targets related to Annexin A10 (ANXA10) in gastric cancer. We performed genome editing using the CRISPR-Cas9 system to knockout ANXA10 in MKN-74, a gastric cancer cell line. The knockout-induced decrease in ANXA10 protein expression was confirmed by Western blotting, followed by microarray analysis. Microarray analysis identified downstream molecules such as CLDN1, KRT80, RBCK1, and SLC7A5, which were identified as poor prognostic factors for gastric cancer in public database analysis.

研究分野：人体病理学

キーワード：バイオマーカー 分子病理 人体病理 ANXA10

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において、胃癌は国民病として非常に罹患頻度の高い悪性腫瘍である。胃癌の克服は我が国の公衆衛生上の課題である。胃癌は **MUC5AC** または **MUC6** 陽性の胃型胃癌、**MUC2** または **CD10** 陽性の腸型胃癌に大別され、胃癌の発生および進展における遺伝子・分子異常を含めた **pathogenesis** は両者で大きく異なることが知られている (**Oue et al. Int J Clin Oncol 2019**)。

Annexin family タンパクはカルシウムリン酸結合タンパク質の一つであり、生体内で細胞分化や細胞増殖などの機能を有している。申請者は **ANXA10** が胃癌組織・胃癌細胞株・胃癌オルガノイドにおいて、**Pancreatic duodenal homeobox-1(PDX1)**の発現を介して胃型形質を誘導することや正常胃粘膜オルガノイドに対して **ANXA10** を **knockdown** することで幹細胞様の形態変化を惹起することを報告してきた (**Ishikawa et al. Oncology Reports 2020**)。さらに胃癌病理組織検体を用いて、**ANXA10** の発現消失が胃癌の早期から予後不良と相関していること (**Ishikawa et al. Acta Histochemica et Cytochemica 2020**)を報告してきた。しかしながら、**ANXA10** が胃癌の進展に対して関連する分子についての検討はなされていない。本研究によって **ANXA10** と関連する新しい分子が発見されれば胃癌の病態解明のみならず、新規治療標的への応用に新しい展開をもたらすものと期待される。

2. 研究の目的

これまで胃癌における **ANXA10** の発現とその予後に関する検討は行われてきたが、**ANXA10** が関連する治療標的候補となるタンパク質またはノンコーディング **RNA** については知られていなかった。胃癌における **ANXA10** の役割と分子間相互作用を明らかにすることによって、胃癌の進展メカニズムを解明し、新たな治療標的を発見することが本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

胃癌細胞株に **CRISPR/Cas9** システムを用いて **ANXA10 knockout** 胃癌細胞株を樹立する。ここでの遺伝子編集の方法としては **pX459** プラスミドベクターを用いる。**ANXA10** のエクソン特異的な **sgRNA** を **pX459** 組み込んで作成し、それらを胃癌細胞株にトランスフェクションし、**Puromycin** による薬剤選択を行う。それらをシングルセルクローニングし、**DNA** およびタンパク質を抽出し、**DNA** のサンガーシーケンスおよびタンパクのウエスタンブロットにより遺伝子編集を確認して、**ANXA10 knockout** 胃癌細胞株を樹立する。

樹立した細胞株の遺伝子プロファイルの網羅的な発現比較を行う。網羅的発現解析にはサーモフィッシャーサイエンティフィック社の遺伝子発現解析用マイクロアレイ GeneChip®を用いた受託解析サービスを利用する。**ANXA10** に関連した特異的発現変化が確認された分子につい

て癌患者のパラフィン包埋サンプルを用いて病理形態学的解析や樹立した細胞に細胞生物学的検討を行い、**ANXA10**の機能および治療標的候補遺伝子を明らかにする。

4. 研究成果

我々は胃癌における **Annexin A10 (ANXA10)**に関連した新規治療標的探索を行なった。胃癌細胞株の一つである **MKN-74** に対し、**CRISPR-Cas9** システムを用いたゲノム編集を行い、**ANXA10**のノックアウトを行った。ノックアウトによる **ANXA10** タンパク発現低下をウエスタンブロットにより確認したのちに、**RNA** を抽出してマイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析ではノックアウトにより **MAPK** に関連した分子などが変動しており、**CLDN1, KRT80, RBCK1, SLC7A5** といった下流分子が同定され、それらの分子は公共データベース解析において胃癌の予後不良因子であった。

更なる検討のため、進行胃癌症例を約 **130** 例集積し、免疫組織化学的検討を行っている。胃型粘液形質マーカーである **MUC5AC, MUC6** や腸型粘液形質マーカーである **CD10, MUC2** による粘液形質に基づいた胃癌の分類を試みている。また、**The Cancer Genome Atlas (TCGA)**により提唱された分類法では胃癌を **4** 種類に分類しており、免疫組織化学的に検討可能なサロゲートマーカーによる擬似分類を試みている。具体的にはゲノムの守護神とも言われる **p53** や細胞接着に関わる **CDH1**、マイクロサテライト不安定性に関わる **MLH1** について検討を行っている。

本研究成果は胃癌における **Annexin A10 (ANXA10)**発現により、その下流において **CLDN1, KRT80, RBCK1, SLC7A5** などの分子と関連していることを明らかにした。さらにそれら **4** つのタンパクは公共データベースにおいて胃癌の予後不良因子であることも明らかにした。胃癌は依然として不均一性の高い癌腫であり、その病態は非常に複雑である。そして胃癌が発生して進行するとその不均一性から化学療法耐性化が起こりやすい。その中で、これらの成果は胃癌の病態の一端を明らかにするとともに、新たな治療標的薬を創生する基盤となる知見である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akira Ishikawa, Kazuya Kuraoka, Junichi Zaitzu, Akihisa Saito, Atsushi Yamaguchi, Toshio Kuwai, Takeshi Sudo, Naoto Hadano, Hirota Tashiro, Kiyomi Taniyama, Wataru Yasui	4. 巻 37
2. 論文標題 High Annexin A10 expression is correlated with poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology	6. 最初と最後の頁 243-250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-397	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 ISHIKAWA AKIRA, KURAOKA KAZUYA, ZAITSU JUNICHI, SAITO AKIHISA, KUWAI TOSHIO, TAZAWA HIROFUMI, SUZUKI TAKAHISA, TASHIRO HIROTAKA, TANIYAMA KIYOMI, YASUI WATARU	4. 巻 42
2. 論文標題 Transcriptomic Analysis of Annexin A10 and Chemosensitivity in Gastric Adenocarcinoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 1707 ~ 1717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15647	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 Ishikawa Akira, Fujii Hiroki, Fukui Takafumi, Kido Aya, Katsuya Narutaka, Sentani Kazuhiro, Kuraoka Kazuya, Tazuma Sho, Sudo Takeshi, Serikawa Masahiro, Oka Shiro, Oue Naohide	4. 巻 241
2. 論文標題 Expression of kinesin family member C1 in pancreatic ductal adenocarcinoma affects tumor progression and stemness	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154277 ~ 154277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2022.154277	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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