

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15063

研究課題名(和文)がん細胞やがん組織の中に存在する微量金属の網羅的定量とその医学的応用

研究課題名(英文)Comprehensive metalomics of cancer cells and tissues

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞や癌組織中の微量金属元素を網羅的に定量する系をICP-MS(誘導結合プラズマ質量分析計)で立ち上げた。ICP-MS前に実施するトリクロル酢酸処理法(脱タンパク質法)も最適化した。確立した測定系により、スキルス胃癌の腹膜転移細胞株では、ルビジウム(原子番号37)含量が、その対応する親株に比して有意に高いことが分かった。ルビジウムの細胞内濃度は、カリウム濃度と類似していた。癌の腹膜転移とルビジウム濃度との関連性について、今後の研究課題として取り組むための手掛かりを得た。以上、細胞中の微量金属元素含量を網羅的に測定する系を確立し、癌転移で有意に変動する微量金属元素群を特定する成果を得た。

研究成果の概要(英文)：We successfully established to comprehensively measure the amounts of trace metals in cancer cells/tissues via ICP-MS method. Prior to ICP-MS, we performed deproteinization by trichloroacetic acid treatment. Using our method, we showed rubidium (atomic number 37) contents were significantly high in metastatic cell line from human scirrrous gastric cancers compared with the non-metastatic parental cell line. As the next experimental project, we obtained a precious cue to research the relationship between cancer metastasis and rubidium contents.

研究分野：生化学

キーワード：癌転移 微量金属 質量分析 癌組織 脱タンパク質法

## 1. 研究開始当初の背景

「地球上のすべての生き物の中には、すべての元素が含まれている」という「拡張元素普存説」が約 10 年前に提唱された。この説をもとに「生体内に（微量）存在する個々の金属元素が、積極的に個体の生命活動を調節しているのではないか？ またその調節機構の破綻が疾患の原因になり得るのではないか？」という新しい発想を抱いた。

しかし、当時の元素の網羅的計測技術（感度や精度）が不十分だったため、その学説の実験的証明が進まなかった。その後、その学説を証明するために必要な「元素計測技術」が飛躍的に進歩してきた。

## 2. 研究の目的

細胞の中のすべての金属元素の含量を測定した報告はこれまでに全くない。そこで我々は癌細胞や癌組織中の微量金属元素を網羅的に定量する測定系を ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析計）で立ち上げることを立案した。現状保有する ICP-MS 機器を生命科学で扱う検体（細胞や生体組織検体）用に改良し、我々が独自に樹立したスキルス胃癌の腹膜転移細胞株内の元素測定に挑むことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養

ヒトスキルス胃癌細胞株について、常法にて培養を行った。培地に RPMI 1640、ウシ血清を 10%濃度で添加し、用いた。

### (2) 細胞可溶液の調製

各種細胞について、RIPA バッファー液（サーモ・サイエンティフィック社）にて、細胞可溶液を調製した。すなわち、細胞を冷却した PBS で数回洗浄、RIPA バッファー液を滴下した後、セルスクレーパーで細胞を掻いて集め、ピペッティング操作にて細胞を破碎した。氷中で 10 分間置いた後、遠心分離して上清を回収し、細胞可溶液とした。タンパク質濃度を BCA Protein assay（サーモ・サイエンティフィック社）にて測定した。

### (3) ICP-MS（誘導結合プラズマ質量分析計）

サーモ・サイエンティフィック社製の型番 iCAP RQ ICP-MS を用いた。連携研究者（東京大学・平田岳史教授）のご指導のもと、実験を進めた。がん細胞抽出液やがん組織抽出液を測定する仕様にするため、機器装置の一部を改変して実験に用いた。ICP-MS 用の金属混合標準液は、関東化学株式会社製の金属類混

合標準液 I~（各 100 ml）を用いた。ICP-MS で同定・測定した微量金属の測定値について、元の細胞可溶液のタンパク質濃度で補正・標準化して最終的な測定値とした。

## 4. 研究成果

(1) RIPA バッファー液やチューブ類における微量金属含有量（不純物量）の測定実験に用いる RIPA バッファー液やチューブ類における微量金属含有量（不純物量）をあらかじめ ICP-MS で調べた。結果、なるべく測定値に影響しない溶液や材料を選定することができた。サーモ・サイエンティフィック社の RIPA バッファー液は、不純物となる金属が少なく、優れていた。

(2) ICP-MS に掛ける検体の前処理法の検討 RIPA バッファーによる細胞抽出液について、塩酸処理やトリクロロ酢酸処理（脱タンパク質処理）を検討し、どちらの前処理法でも、タンパク質と結合している金属を解離させることができた。今後、脱タンパク質処理として一般的なトリクロロ酢酸処理法を採用して実験系を組むこととした。

(3) 確立した我々の測定系を用いた予備的な測定検討

我々が確立した測定系を用いて、以下の 2 種の細胞（HEK293, MDA-MB-231）について、細胞可溶液を調製し、測定してみた。検討した双方の細胞において、想定していたほぼすべての金属元素が測定できた。測定値のバラツキについて、想定よりも小さく、また細胞ごとにその金属含有量がある程度定まることが分かった。測定値の標準化の仕方について、再確認して測定系を成功裡に完成させた。

(4) 本課題で確立した独自の測定系を用いたスキルス胃癌転移細胞株における微量金属の測定

確立した測定系を用いて、スキルス胃癌の腹膜転移細胞株の抽出液を網羅的に測定した。スキルス胃癌の腹膜転移株では、ルビジウム（原子番号 37；質量数 85）の含量が、その対応する親株（腹膜転移をほとんどしない株）に比して有意に高いことが分かった。ルビジウムの細胞内濃度は、カリウム濃度と類似した傾向にあった。

### 【総合考察】

本課題の遂行によって、癌の腹膜転移とルビジウム濃度との関連性について、まったく新規な知見を見出すことができた。今後、この萌芽的研究の成果を足掛かりに、多くの実験を重ねていくことで、我々の研究をさらに発展させていくことが可能と考えられた。

## 【結論】

本課題において、細胞中の微量金属元素の量を網羅的に測定する方法論を具体的に確立すると共に、癌転移において有意に変動する金属元素群を特定する成果を得た。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Takei Y\*, Suzuki A, Mihara K, Yanagihara K. (\*, corresponding author).  
The microRNA miR-516a-3p regulates the Wnt pathway by targeting extracellular sulfatase 1 in human scirrhous gastric cancers: Anti-metastatic therapy via miRNA-based medicine.  
Medical Research Archives, 5: 1-19 (2017).  
査読有り  
<https://journals.ke-i.org/index.php/mra/article/view/1379>
2. Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Tomita T, Tawada M, Tanaka A, Hirayama A, Sagara A, Wada T, Maruyama S, Soga T, Matsuo S, Imai E, Takei Y.  
Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in sub-total-nephrectomized mice.  
Laboratory Investigation, 97: 432-446 (2017).  
査読有り  
DOI: 10.1038/labinvest.2017.4.
3. Mihara K, Yoshida T, Takei Y, Sasaki N, Takihara Y, Kuroda J, Ichinohe T.  
T cells bearing anti-CD19 and/or anti-CD38 chimeric antigen receptors effectively abrogate primary double-hit lymphoma cells.  
Journal of Hematology & Oncology, 10: 116 (2017).  
査読有り  
DOI: 10.1186/s13045-017-0488-x.
4. Tomita T, Arai S, Kitada K, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Nakano D, Hiramoto E, Takei Y, Maruyama S, Nishiyama A, Matsuo S, Miyazaki T, Ito Y.  
Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice. Scientific Reports, 7: 6450 (2017).  
査読有り  
DOI: 10.1038/s41598-017-06824-6.
5. Tawada M, Ito Y, Hamada C, Honda K, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Terabayashi T, Matsukawa Y, Maruyama S, Imai E, Matsuo S, Takei Y.  
Vascular endothelial cell injury is an important factor in the development of encapsulating peritoneal sclerosis in long-term peritoneal dialysis patients.  
PLoS One, 11: e0154644 (2016).  
査読有り  
DOI: 10.1371/journal.pone.0154644
6. Mihara K, Yoshida T, Ishida S, Takei Y, Kitanaka A, Shimoda K, Morishita K, Takihara Y, Ichinohe T.  
All-trans retinoic acid and interferon- $\alpha$  increase CD38 expression on adult T-cell leukemia cells and sensitize them to T cells bearing anti-CD38 chimeric antigen receptors.  
Blood Cancer Journal, 6: e421 (2016).  
査読有り  
DOI: 10.1038/bcj.2016.30.
7. Makino Y, Hamamura K, Takei Y, Bhuiyan RH, Ohkawa Y, Ohmi Y, Nakashima H, Furukawa K, Furukawa K.  
A therapeutic trial of human melanomas with combined small interfering RNAs targeting adaptor molecules p130Cas and paxillin activated under expression of ganglioside GD3.  
Biochimica Biophysica Acta - General Subjects, 1860:1753-1763 (2016).  
査読有り  
DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.04.005
8. Yoshida T, Mihara K, Takei Y, Yanagihara K, Kubo T, Bhattacharyya J, Imai C, Mino T, Takihara Y, Ichinohe T.  
All-trans retinoic acid enhances cytotoxic effect of T cells with an anti-CD38 chimeric antigen receptor in acute myeloid leukemia.  
Clinical & Translational Immunology, 5: e116 (2016).  
査読有り  
DOI: 10.1038/cti.2016.73.
9. Yuan Y, Makita N, Cao D, Mihara K, Kadomatsu K, Takei Y\*. (\*, corresponding author).  
Atelocollagen-mediated intravenous siRNA delivery specific to tumor tissues orthotopically xenografted in prostates of nude mice, and its anticancer effects.  
Nucleic Acid Therapeutics, 25:85-94 (2015).  
査読有り  
DOI: 10.1089/nat.2014.0526.
10. Terabayashi T, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Kinashi H, Sakata F, Tomita T, Iguchi D, Tawada M, Nishio R, Maruyama S, Imai E,

Matsuo S, Takei Y.  
Vascular endothelial growth factor receptor-3 is a novel target to improve net ultrafiltration in methylglyoxal-induced peritoneal injury. Laboratory Investigation, 95:1029-1043 (2015).  
査読有り  
DOI: 10.1038/labinvest.2015.87.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 武井佳史、原敏文、落谷孝広、柳原五吉  
スキルス胃癌患者由来のリンパ行性転移細胞株の樹立とその抗転移療法への応用  
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年)
2. 原敏文、柳原五吉、武井佳史  
ヒトスキルス胃癌の網羅的転写解析による新たな転移シグネチャーの抽出  
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年)
3. Ito Y, Tomita T, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Takei Y, Maruyama S.  
Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice.  
American Society of Nephrology, Kidney Week 2017 (2017).
4. 鈴木亜希子、三原圭一郎、柳原五吉、武井佳史  
スキルス胃癌の腹膜転移を制御する代謝酵素の解析  
第 89 回日本生化学会大会 (2016 年)
5. Takei Y.  
Metabolic reprogramming-associated microRNA is a new target to repress peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancers. 10th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Breakthroughs in Cancer Research: From Basic to Therapeutics (2016).
6. 武井佳史、柳原五吉  
上皮間葉変換を制御する miRNA を標的としたスキルス胃癌の腹膜転移抑止  
第 74 回日本癌学会学術総会 (2015 年)
7. 武井佳史、鈴木亜希子、三原圭一郎、柳原五吉  
スキルス胃癌の代謝を調節する microRNA を新規標的とした抗腹膜転移療法  
第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2015) (2015 年)

8. Takei Y.  
Metabolomic reprogramming involving with peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancers. AACR-SNMMI Joint Conference: State-of-the-Art Molecular Imaging in Cancer Biology and Therapy (2015).
9. Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Terabayashi T, Tomita T, Tawada M, Maruyama S, Imai E, Takei Y, Matsuo S.  
Sodium Chloride Promotes Tissue Inflammation via Osmotic Stimuli in Subtotal Nephrectomized Mice.  
American Society of Nephrology, Kidney Week 2015 (2015).
10. Tawada M, Ito Y, Hamada C, Honda K, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Maruyama S, Takei Y, Matsuo S.  
Vascular endothelial cell damage is an important factor in the development of encapsulating peritoneal sclerosis.  
American Society of Nephrology, Kidney Week 2015 (2015).

〔図書〕(計 1 件)

1. 武井佳史  
先端治療技術の実用化と開発戦略(核酸医薬、免疫療法、遺伝子治療、細胞医薬品)株式会社 技術情報協会編(全 480 頁)  
第 5 章 がん領域における医療技術の現状と課題 第 6 節 がん転移抑止へ向けた核酸医薬を基盤とした分子標的薬の研究動向とその評価(335 頁~350 頁)  
(2017 年)

6. 研究組織

(1) 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

(3) 連携研究者

平田 岳史 (HIRATA, Takefumi)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

研究者番号: 10251612