

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04697

研究課題名(和文) 癌転移開始細胞におけるCD280の生物学的役割の解明と癌転移診断や治療への応用

研究課題名(英文) Biological role of CD280 in cancer metastasis-initiating cell

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) 12,300,000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」は癌転移抑制に必須であるが、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CD280のKOに成功した(ゲノム編集)。CD280をKOしたMICでは、細胞増殖能・コロニー形成能・遊走浸潤能が低下した。抗癌剤耐性能も低下した。CD280は癌転移抑制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、CD280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、癌転移抑制医療が大切になる。本成果は、癌転移抑制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 CD280 expression via genome editing methods. The CD280-deficient MICs showed the decreased proliferation, colony formation, and invasion activity compared with CD280 wild-type MICs. CD280 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 スキルス胃癌 腹膜転移 分子標的 癌治療

## 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が、ごく最近、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。「ある程度のまとまった数の 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、原発癌に巣喰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「CD280 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 CD280 をゲノム編集でノックアウトし、癌転移における CD280 の生物学的意義を解明する。

CD280 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) 各種癌組織からの MIC 単離

4つの癌種 (スキルス胃癌、前立腺癌、結腸癌、膵癌) について、各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 (6-weeks-old, SLC) 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 CD280 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 CD280 の塩基配列を調べ、single-guide RNA (以下 sgRNA) の候補配列 7 個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、CD280 のノックアウト細胞 (stable clone) 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 CD280 をノックアウトした MIC のフェノタイプ解析: *in vitro* 実験

CD280 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 (MTT アッセイと Ki-67 染色)、浸潤能の変化 (マトリゲル invasion アッセイ, BD 社製)、抗癌剤耐性能の変化 (イリノテカン等) を調べた。

#### (4) ゲノム編集で CD280 をノックアウトした MIC のフェノタイプ解析: *in vivo* 実験

CD280 をノックアウトした MIC について、ヌードマウス (BALB/c nude mouse, 6-weeks-old, SLC) に正所性に移植した。移植細胞数を  $1 \times 10^4$  個/部位とした。原発癌形成後、CD280 のノックアウト状態を定量 PCR や Immunoblot (自作抗体による) で確認した。癌転移が想定される臓器 (骨髄・肝・肺・腹膜等) について、パラフィン切片を作り、病理組織学的に癌転移の有無を調べた。癌性腹水の貯留も調べた。正所性移植の手法は、我々の既報に準じた (引用文献 1-3)。

### 4. 研究成果

#### (1) 各種癌組織からの 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。細胞の分散に必要なコラゲナーゼについては、各社で性能差があり、何社かを検討して最適化を図りながら実験を進めた。単離した MIC について、シングルセル化までを行った (セルソーター SH800S: ソニー社製を使用)。

ステムネス・マーカーとして、Oct3/4, Nanog, Sox-2 の各抗体で染色し、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。他の癌種の MIC も追隨して検討した。

#### (2) ゲノム編集による CD280 のノックアウト

上記(1)で単離した MIC では、CD280 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 CD280 のノックアウトを試みた。7 種の sgRNA について実験し、2 種の sgRNA 配列が効率よく CD280 をノックアウトすることが分かった。ノックアウトの確認は、定量 PCR と Immunoblot (自作抗体による)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、シングルセル化までを行った。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 CD280 をノックアウトした MIC のフェノタイプ解析: in vitro 実験

CD280 をノックアウトした MIC について、細胞の形態が変化した。形態変化の分子機構については、現在解析中である。また、MTT アッセイと Ki-67 染色により、増殖能の有意な低下を認めた。マトリゲル invasion アッセイにより、浸潤能も有意に低下した。抗癌剤イリノテカン(CPT-11) に対して、その耐性が低下していることが分かった。つまり、CD280 をノックアウトした MIC では、抗癌剤イリノテカンが効きやすくなる効果が顕れた。

#### (4) ゲノム編集で CD280 をノックアウトした MIC のフェノタイプ解析: in vivo 実験

CD280 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 CD280 のノックアウトを確認した。MIC の CD280 をノックアウトすると、腹膜転移が有意に抑制され、かつ肺と肝臓への転移も抑制されることが分かった。癌性腹水の貯留量も有意に減少した(癌性腹水の貯留量: CD280 KO MIC, 平均 0.9 ml; CD280 wild-type MIC, 平均 3.7 ml)。

#### <引用文献>

1. Takei Y\*, Shen G, Hara T, Mihara K, Yanagihara K. (\*, corresponding author). MicroRNAs regulating epithelial-mesenchymal transition can be targeted to inhibit peritoneal dissemination in human scirrhous gastric cancers. Pathobiology, 85: 232-246 (2018).
2. 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).
3. Takei Y\*, Takigahira M, Mihara K, Tarumi Y, Yanagihara K. (\*, corresponding author). The metastasis-associated microRNA miR-516a-3p is a novel therapeutic target for inhibiting peritoneal dissemination of human scirrhous gastric cancer. Cancer Research, 71:1442-1453 (2011).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Kinashi H, Ito Y, Sun T, Katsuno T, Takei Y.	4. 巻 19
2. 論文標題 Roles of the TGF- $\beta$ -VEGF-C pathway in fibrosis-related lymphangiogenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 E2487
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms19092487.	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 Takei Y, Yuan Y, Suzuki A, Mihara K.	4. 巻 6
2. 論文標題 Combined anti-metastasis therapy of an siRNA-based medicine and ABT-263 in orthotopically xenografted prostate cancer model mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Takei Y, Shen G, Morita-Kondo A, Hara T, Mihara K, Yanagihara K.	4. 巻 85
2. 論文標題 MicroRNAs regulating epithelial-mesenchymal transition can be targeted to inhibit peritoneal dissemination in human scirrhus gastric cancers.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 232-246
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000488801.	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 Kariya T, Nishimura H, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Maruyama S, Takei Y, Ito Y.	4. 巻 314
2. 論文標題 TGF- $\beta$ -VEGF-A pathway induces neoangiogenesis with peritoneal fibrosis in patients undergoing peritoneal dialysis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Renal Physiology	6. 最初と最後の頁 F167-180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajprenal.00052.2017.	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 Sakata F, Ito Y, Mizuno M, Sawai A, Suzuki Y, Tomita T, Tawada M, Tanaka Akio, Hirayama A, Sagara A, Wada T, Maruyama S, Soga T, Matsuo S, Imai E, Takei Y.	4. 巻 97
2. 論文標題 Sodium chloride promotes tissue inflammation via osmotic stimuli in subtotal-nephrectomized mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Laboratory Investigation	6. 最初と最後の頁 432 ~ 446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/labinvest.2017.4	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 Mihara K, Yoshida T, Takei Y, Sasaki N, Takihara Y, Kuroda J, Ichinohe T.	4. 巻 10
2. 論文標題 T cells bearing anti-CD19 and/or anti-CD38 chimeric antigen receptors effectively abrogate primary double-hit lymphoma cells	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Hematology & Oncology	6. 最初と最後の頁 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13045-017-0488-x	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 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.	4. 巻 7
2. 論文標題 Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06824-6	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 Takei Y, Suzuki A, Mihara K, Yanagihara K.	4. 巻 5
2. 論文標題 The microRNA miR-516a-3p regulates the Wnt pathway by targeting extracellular sulfatase 1 in human scirrhou gastric cancers: Anti-metastatic therapy via miRNA-based medicine	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Research Archives	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 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.	4. 巻 11
2. 論文標題 Vascular endothelial cell injury is an important factor in the development of encapsulating peritoneal sclerosis in long-term peritoneal dialysis patients.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0154644
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0154644	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 Makino Y, Hamamura K, Takei Y, Bhuiyan RH, Ohkawa Y, Ohmi Y, Nakashima H, Furukawa K, Furukawa K.	4. 巻 1860
2. 論文標題 A therapeutic trial of human melanomas with combined small interfering RNAs targeting adaptor molecules p130Cas and paxillin activated under expression of ganglioside GD3.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects	6. 最初と最後の頁 1753-1763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2016.04.005	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 Mihara K, Yoshida T, Ishida S, Takei Y, Kitanaka A, Shimoda K, Morishita K, Takihara Y, Ichinohe T.	4. 巻 6
2. 論文標題 All-trans retinoic acid and interferon- increase CD38 expression on adult T-cell leukemia cells and sensitize them to T cells bearing anti-CD38 chimeric antigen receptors.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Blood Cancer Journal	6. 最初と最後の頁 e421
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/bcj.2016.30	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 Yoshida T, Mihara K, Takei Y, Yanagihara K, Kubo T, Bhattacharyya J, Imai C, Mino T, Takihara Y, Ichinohe T.	4. 巻 5
2. 論文標題 All-trans retinoic acid enhances cytotoxic effect of T cells with an anti-CD38 chimeric antigen receptor in acute myeloid leukemia.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Clinical & Translational Immunology	6. 最初と最後の頁 e116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/cti.2016.73	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12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Mihara K, Takei Y.
2. 発表標題 Patterns of IgH rearrangement predicts prognosis of diffuse large B-cell lymphoma in association with CDC25A overexpression.
3. 学会等名 2018 ASH (American Society of Hematology) Meeting on Lymphoma Biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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わる長鎖非コードRNAシグネチャーの解析
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 原敏文、柳原五吉、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃がんの腹膜転移に伴い発現変動するlncRNAの同定とその機能解析
3. 学会等名 第20回日本RNA学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 原敏文、服部真晃、花井檀、森田あや美、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の転移に伴い発現変動する遺伝子シグネチャーの同定とそれら遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第82回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 花井檀、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関わる遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部真晃、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機構の解明に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森田あや美、吉見一志、原敏文、武井佳史
2. 発表標題 スキルス胃癌の腹膜転移制御におけるGalectin 4の役割
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 武井佳史、原敏文、落谷孝広、柳原五吉
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年



1. 発表者名 Ito Y, Tomita T, Mizuno M, Suzuki Y, Sakata F, Takei Y, Maruyama S.
2. 発表標題 Apoptosis inhibitor of macrophage ameliorates fungus-induced peritoneal injury model in mice.
3. 学会等名 American Society of Nephrology, Kidney Week 2017 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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網羅的転写解析による新たな転移シグネチャーの抽出
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木亜希子、三原圭一朗、柳原五吉、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代謝酵素の解析
3. 学会等名 第89回日本生化学会大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Takei Y.
2. 発表標題 Metabolic reprogramming-associated microRNA is a new target to repress peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancers.
3. 学会等名 10th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association: Breakthroughs in Cancer Research: From Basic to Therapeutics (国際学会)
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----