

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08795

研究課題名（和文）胆管癌の浸潤転移能獲得におけるS100A10の機能解明と治療戦略への展開

研究課題名（英文）Functional elucidation of S100A10 in the acquisition of invasive and metastatic abilities of cholangiocarcinoma and its development into therapeutic strategies

研究代表者

小嶋 克彦 (Kojima, Katsuhiko)

信州大学・学術研究院医学系・講師

研究者番号：80345743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：胆管癌細胞に発現するS100A10のノックアウトが導く細胞遊走能の低下の要因のひとつとして上皮間葉転換（EMT）マーカーであるビメンチンの発現低下を見出している。しかし、他のEMTマーカーの発現変化は見られず、S100A10がビメンチンおよびアクチン骨格の細胞内動態に機械的に介在する役割を持つと考えられた。S100A10に対する低分子阻害剤やスクリーニングにより得たVHH抗体の細胞内導入により、細胞遊走能の低下やアクチン骨格異常がノックアウト実験同様に再現され、ビメンチンの凝集による機能不全が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最も治療抵抗性、予後不良を示す癌腫である胆管癌の悪性形質のひとつである「浸潤転移」に関する解析は乳癌や大腸癌と比較して不十分であった。本研究は、S100A10が細胞遊走につながる細胞骨格の細胞内動態を機械的に制御する重要な分子であることを明らかにした点で学術的意義を持つ。また、スクリーニングから得た抗S100A10-VHH抗体の胆管癌由来細胞内における発現が、細胞骨格異常を誘導し細胞遊走能を低下させることを見出した。この結果は、胆管癌の浸潤転移を抑制する分子標的薬につながるものと期待できる点で社会的意義を持つと考えている。

研究成果の概要（英文）：One of the factors leading to the decreased cell motility caused by the knockout of S100A10, which is expressed in cholangiocarcinoma cells, is the observed reduction in the expression of vimentin, an epithelial-mesenchymal transition (EMT) marker. However, no changes were observed in the expression of other EMT markers, suggesting that S100A10 plays a mechanical role in the intracellular dynamics of vimentin and the actin cytoskeleton. The introduction of low molecular weight inhibitors against S100A10 or VHH antibodies obtained through screening into the cells reproduced the decreased cell motility and actin cytoskeleton abnormalities similar to the knockout experiments, and dysfunction due to vimentin aggregation was observed.

研究分野：機能生物化学

キーワード：S100A10 胆管癌 転移 腫瘍微小環境

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CD274low を表現型とする胆管癌幹細胞で特異的に発現増強する分子として S100A10 が発見された。我々は、この分子の胆管癌由来細胞でのノックアウトが細胞遊走の顕著な低下を引き起こすことを見出した。S100A10 ノックアウト細胞では、細胞遊走に必要なアクチン繊維の細胞体部での逆行性流動が不全を来し、アクチン繊維は細胞周縁部に蓄積していた。更に細胞骨格を中心にノックアウトの影響を精査したところ、中間径フィラメント成分ビメンチンが顕著に発現減少することを発見した。興味深いことに、ノックアウト細胞へのビメンチンの強制発現は細胞遊走能やアクチン骨格の細胞内動態を回復させることはできず、ビメンチンフィラメント自体も核近傍で凝集して正常な細胞内分布を示すことができなかった。これらの結果から、S100A10 が胆管癌に対し幹細胞性と同時に浸潤転移能という重大な悪性形質の付与に關与する分子であることが明らかとなった。

2. 研究の目的

胆管癌は悪性度が高く治療抵抗性がありながら、未だ有効な分子治療薬は開発されていない。この原因として癌としての生物学的な解析が不十分であり、幹細胞性や浸潤転移能などの基盤解明が遅れているためである。この観点から本研究では、1. 胆管癌の浸潤転移における S100A10 の役割の解明、2. S100A10 が関わる上皮間葉転換とその分子機構の解明、3. 分泌型 S100A10 の腫瘍微小環境に対する生理的役割の解明、更には、4. 新規胆管癌治療法に向けた S100A10 を標的とする阻害抗体の探索、を研究の目的とした。

3. 研究の方法

[1] 胆管癌の浸潤転移における S100A10 の役割：マウス盲腸-肝臓転移モデルを用いた S100A10 阻害が癌転移に及ぼす影響の解析。具体的には、マウス直腸癌由来 CT26 細胞をマウス盲腸へ同所性移植系を用いた。CT26 細胞の S100A10 はレンチウイルスベクターにより shRNA を導入、ノックダウンした。

[2] S100A10 が関わる上皮間葉転換 (EMT) とその分子機構：ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞での TGF- β や TNF- α による EMT 誘導と、S100A10 発現の相関を解析した。

[3] 分泌型 S100A10 の腫瘍微小環境に対する生理的役割：S100A10/Annexin A2 複合体形成を阻害する A2ti-1 や [4] において得た抗 S100A10-VHH 抗体を CT26 細胞、HuCCT-1 細胞に投与し、基底膜マトリクスによりコートしたトランスウエルアッセイ、及び蛍光ラベルゼラチンコートプレートにより浸潤遊走能に対する影響を解析した。

[4] S100A10 を標的とした阻害薬の開発：まず酵母表面発現ライブラリー法を用い抗 S100A10-VHH 抗体のスクリーニングを行った。得られた VHH 抗体を細胞内導入し、細胞骨格の細胞内動態を生細胞イメージングを適用して、細胞遊走能に対する影響をスクラッチアッセイによりそれぞれ解析した。

4. 研究成果

[1] 1×10^6 個の CT26 細胞を C57BL/6 マウス盲腸に移植し、3 ~ 4 週間後の肝臓転移を判定した。S100A10 ノックアウト細胞ではほぼ転移率はみられなかったが、野生型細胞においてさえ転移効率は約 4 割と低かった。そこで転移巣からハーベストした細胞を繰り返し移植することで高転移効率細胞のセレクションを試みた。しかし、選択 3 ラウンドまでに転移効率はむしろ低下し成功しなかった。

[2] ビメンチンも含め、N-カドヘリンと Slug を間葉系マーカーとして、E-カドヘリンとラミニニン 1 を上皮系マーカーとして EMT を評価した。野生型 HCT116 細胞と比較して、S100A10 ノックアウト細胞では定常状態においてビメンチンのみの発現減少を認めた。一方、TGF- β と TNF- α による EMT 誘導では、ビメンチン以外で EMT マーカーの変動に違いはみられなかった。この時、ビメンチンは野生型細胞に及ばないものの有意な発現上昇がみられた。この結果から、S100A10 の EMT 誘導への直接的な関与の可能性は低く、アクチン繊維とビメンチンの細胞内動態を機械的に介在している分子であると考えられた。

[3] S100A10 ノックアウト細胞ではトランスウエルアッセイでの細胞浸潤はほぼ抑制されていた。また、A2ti-1 と抗 S100A10-VHH 抗体の投与量依存的に浸潤細胞数の減少と蛍光ラベルゼラチンコートの分解面積の減少を観察した。これらの結果から細胞膜上の S100A10 が ECM 分解に關与している可能性が示唆された。

[4] 大腸菌発現系より S100A10 を精製し更に蛍光ラベルした。これを細胞表面に VHH 抗体を発現する酵母ライブラリーに供することで S100A10 に結合する VHH 抗体を濃縮していった。選択 5 ラウンド後に特に濃縮された 2 クロウンを続く実験に用いた。抗 S100A10-VHH 抗体遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入した HCT116 細胞はスクラッチアッセイから細胞遊走能が顕著に低下していることが判明した。この時、細胞内のビメンチンは核周囲に凝集しており、生細胞イメージングよりアクチン繊維の動態に異常が生じていることが明らかとなった。こ

これらの結果は、抗 S100A10-VHH 抗体が胆管癌の浸潤転移を抑制する分子標的薬となる可能性を示唆するものである。

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 1件）

1. 著者名 Kobayashi Maki, Kojima Katsuhiko, Murayama Kazutaka, Amano Yuji, Koyama Takashi, Ogama Naoko, Takeshita Toshikazu, Fukuhara Tatsuro, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 112
2. 論文標題 MK 6, a novel not IL 2, elicits a potent antitumor activity by improving the effector to regulatory T cell balance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4478 ~ 4489
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15127	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小山 昂志、小嶋 克彦、前田 昂樹、竹下 敏一、森田 英嗣、田中 伸幸
2. 発表標題 TYRO3はGAS6を介してフォスファチジルセリンに結合することでエクソソームを取り込む
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小山 昂志、小嶋 克彦、前田 昂樹、竹下 敏一、森田 英嗣、田中 伸幸
2. 発表標題 Tyro3-Gas6およびTyro3-Protein S複合体は、リン脂質結合によりCD63陽性エクソソームを細胞内に取り込む
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoko Ogama, Katsuhiko Kojima, Nobuyuki Tanaka
2. 発表標題 S100A10 regulates proliferation and migration of HNSCC cells through cytoskeleton control
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 Maki Kobayashi, Naoko Ogama, Katsuhiko Kojima, Tatsuro Fukuhara, Nobuyuki Tanaka
2. 発表標題 A novel non-a IL-2 elicits potent anti-tumor activity in mice by improving the effector to regulatory T cell balance
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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	竹下 敏一 (Takeshita Toshikazu)	信州大学・学術研究院医学系・教授	削除：2023年3月24日
	(60212023)	(13601)	

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