

S100A 分子群による細胞周期制御と悪性化機構の解明

[1] 組織

代表者：田中 伸幸

(宮城県立がんセンター研究所)

対応者：千葉 奈津子

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

小鎌 直子 (宮城県立がんセンター研究所)

Tareg Omer Mohamed

(宮城県立がんセンター研究所)

研究費：物件費30万0千円

[2] 研究経過

明確なドライバー変異を欠く癌において「がん幹細胞」は治療戦略上、特に重要な概念である。我々は癌幹細胞性を担う分子を探索するため、臨床がん検体を超免疫不全マウス NOG に異種移植する PDX を作成し既存の癌幹細胞マーカーをもとに癌細胞を分取してプロテオミクス解析を行った。その結果、幹細胞分画に S100A タンパク質が著明に発現亢進していることを見出した。S100A 分子群は細胞膜結合性を示し、細胞膜外では受容体として働き(細胞外機能)、細胞内ではシグナル伝達を活性化する(細胞内機能)ことが知られている。さらに S100A 分子群が癌細胞の増殖に関わることが示唆されているが、これまで癌細胞の内外に及ぶ S100A 分子群が担う多彩な機能に対する一元的な解析は皆無であり、その意義や機能の全貌はほとんど未解明である。

以上の背景のもと、我々は予備的実験を開始した。S100A 分子のノックダウン細胞を作製したところ、細胞増殖が著明に抑制され細胞周期の遅延が顕著であることに気付いた。次いでヌードマウスにおける造腫瘍性を調べたところ、有意に腫瘍形成が低下していた。これらの事実は S100A が新たな腫瘍制御分子であることを強く示唆している。本研究では癌の悪性形質発現における S100A 分子群の役割を以下の2点に絞って解明する。第1に、細胞周期制御における S100A 分子群の関与を明らかにする。細胞周期(間期・分裂期)における S100A の局在を解析するとともに中心体制御との関連性を探ることで細胞周期制御の本態に迫る。第2の目的は

癌幹細胞性における S100A の貢献の解明である。S100A は単なる幹細胞マーカーではなく、癌幹細胞性と悪性形質における重要な機能分子である可能性が高い。本研究では、S100A 分子群による悪性化の基盤解明を通して新たな癌治療の標的としての妥当性を検証し、腫瘍制御における学術的な新展開を目指すこととした。近年ますますその重要性を増している癌幹細胞制御について、本共同研究では S100A による制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。

方法:S100A 分子群は14遺伝子が知られている。ヒト頭頸部癌細胞株 HPCM2 に対して S100A10 分子のノックダウンおよび CRISPR/Cas9 によるノックアウトを行う。

①S100A10 による細胞周期裂制御の解析:細胞周期を同期させ FACS による細胞周期解析を行い S100A 欠損による異常が生じる可能性を検討。

②S100A による癌幹細胞性制御の解析:スフェア形成、抗癌剤耐性および癌幹細胞マーカーを解析。

③細胞増殖・遊走および浸潤能の阻害: *in vitro* 増殖、超免疫不全マウスにおける造腫瘍能、細胞遊走能(スクラッチアッセイ)、浸潤能(基底膜破壊に基づく Cell invasion アッセイ)を実施。

以下、研究活動状況の概要を記す。本研究に関し、CRISPR/Cas9 技術等を用いたノックアウト細胞株および shRNA を用いた遺伝子ノックダウン細胞が必要となる。このため、加齢医学研究所・千葉奈津子教授と平成29年9月に研究打ち合わせを実施した。さらに、研究打ち合わせを電子メールにより継続的に行うことで本研究の遂行に重要な助言を得た。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

第1に、S100A10 が細胞周期を制御する機能を有することが明らかとなった。S100A10 ノックダウン細胞を用いて Nocodazole 処理を実施し、同除去後の細胞周期を FACS により解析した。その結果、G2/M から G0/G1 への移行が明らかに遅延していた。共焦点顕微鏡観察では細胞分裂の形態異常が一部に認められた。したがって、S100A10 は細胞周期およ

び細胞分裂を制御することが明らかになった。

第2に、S100A10は癌幹細胞性を部分的に制御することが明らかとなった。幹細胞スフェア培養では、S100A10をノックアウトしたHPCM2細胞(S100A10 KO)はコントロール細胞に比較して明らかにスフェア形成数が減少した。さらに、癌幹細胞マーカをFACS解析したところ、CD271およびCD44発現が顕著に低下していた(図)

図. 癌幹細胞マーカ発現

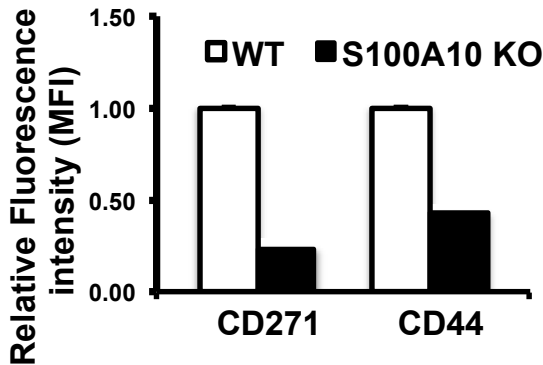


図:FACSにより信号強度をMFIとして計測した。S100A10 KOは癌幹細胞マーカが顕著に低下していた。

一方、癌幹細胞関連遺伝子発現を定量PCR法にて調べた。Sox2, nanogの差はなかったが、Oct3/4およびKif4の発現が増加していた。これらの結果から、S100A10は癌幹細胞性に部分的に寄与していることが明らかとなった。

第3に、細胞増殖のけるS100A10の役割を解析した。その結果、S100A10ノックダウン細胞では、In vitro増殖が抑制された。さらに、S100A10 KOではさらに増殖抑制が顕著であった。一方、Nudeマウスに細胞を移植しin vivoでの腫瘍増殖を調べた。その結果、S100A10 KOは有意に腫瘍が小さかった。

以上の結果からS100A10は、癌細胞の1)細胞周期、2)癌幹細胞性、3)増殖の3点を制御していることが明らかとなった。

(3-2)波及効果と発展性など

本年度の成果において、S100A10の癌制御における機能が明らかになったことは新しい。扁平上皮癌においてS100A10が過剰発現することが報告されていることから、本研究成果は単に癌のバイオロジーの一端を明らかにするのみならず、まったく新し

い癌治療の技術開発に資することが期待される。今後はS100A遺伝子群全体の役割をさらに解明することが重要であり、次年度以降に継続して解析を加えることで新たな学術分野の創生が期待される。さらに、分担研究者として本研究に関わった若手研究者が次世代の癌研究者として育つことも期待される。今後の本研究の発展が大いに期待される。

[4] 成果資料

本共同研究成果が直接掲載された論文はまだない。本研究をもとに、引き続き共同で具体的な研究を進める準備をしている。