

令和 5 年 2 月 18 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07245

研究課題名（和文）転移前肝微小環境形成因子による臓器決定性と腫瘍クロストーク

研究課題名（英文）Liver tropism by premetastatic niche formation and tumor-niche crosstalk

研究代表者

出口 敦子（DEGUCHI, ATSUKO）

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10422932

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：がんに対する治療法は近年新しい治療薬が見いだされるものの、転移性がんに対する治療方法は限られており、新たな治療法の確立が望まれている。本研究では、転移性がんに対する治療法の分子標的として、転移前微小環境形成因子を考えており、担がんモデルマウスを用いて、これまでに同定した肝指向性転移前微小環境形成因子による転移促進の分子機序の解明をすることを目的としている。転移前肝微小環境形成因子欠失マウス、転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスを作成し、転移前肝微小環境形成因子欠失マウスでは肝転移を抑制し、転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスでは肝転移を促進することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんによる死亡の主な原因は遠隔臓器への転移とされており、もし転移を抑制する有効な治療法の確立や早期転移予測による治療法の選択が可能となれば、我が国の健康増進につながると考えられる。がんが転移する前段階における転移前微小環境形成の解明は、転移抑制療法や早期予測診断への分子標的を見いだすことにある。また、転移先に依存しない転移前微小環境形成因子であるS100A8は新型コロナウイルス感染症の重症化例において発現上昇が認められている。現在までに開発したS100A8を標的とした阻害ペプチドはがん疾患だけでなく、S100A8が関連した他の疾患に対しても適応できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：To establish novel therapeutic strategy against aggressive colorectal cancers, we previously identified several candidates for liver-premetastatic niche factors. we found that knockout of a candidate suppressed liver metastasis, and that liver metastasis significantly occurred in liver-specific premetastatic niche factor-transgenic mice when compared to wild type mice. These results suggest that identified liver-premetastatic niche factor can be one of therapeutic targets against liver cancer metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝転移 がん微小環境 転移

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡の主な原因は遠隔臓器への転移によるものが多く、転移性がんに対する有効な治療法が望まれているが、現在までのところ、有効な治療法は確立されていない。従って、転移性がんに対する予防法や治療法の開発、早期予測マーカーの確立が望まれている。

がんが進展する過程において、がん細胞自身における遺伝子上の変異に伴った異常な活性化とともに、がん周辺部に存在する炎症様の微小環境が存在することが見いだされている。がん微小環境下に骨髄から動員された免疫抑制性細胞を含み、がんの増悪化に関与することがわかってきた。このように、炎症に惹起された微小環境が重要な役割を果たすことが示唆されている中、我々は、転移前肺微小環境の存在を提唱した(Hiratsuka S, *et al.*, *Nat Cell Biol.* 2006, 2008)。

転移前肺微小環境とは、腫瘍が原発巣にとどまっている段階において、原発巣由来の液性因子を介し将来の転移先となる肺に、がん細胞にとって生着しやすくするための環境として定義し、担がんマウスを用いて肺転移における転移前肺微小環境形成因子として同定した S100A8 は S100 ファミリータンパク質の一つであり、Toll 様受容体 4 (TLR4) 内因性リガンドとして働き、血管透過性を亢進する作用を持つ。これまでに、TLR4 阻害薬エリトランや抗 S100A8 中和抗体を用いた解析により、肺転移における転移前微小環境形成には TLR4/MD-2-S100A8 経路が関与し、TLR4 阻害薬エリトランや抗 S100A8 中和抗体により転移前肺微小環境形成が抑制されることを見いだした(Deguchi A, *et al.*, *Oncogene* 2016)。さらに、マウス転移前肺において発現上昇した因子として同定した血清アミロイド A3(SAA3) はマウス TLR4/MD-2 複合体の MD-2 に直接結合し、MD-2 依存性に肺への CD11b 陽性細胞の集簇を誘導することを見いだした (Deguchi *et al.*, *J. Immunol* 2013)。しかしながら、S100A8 や SAA3 が肺特異的な転移前微小環境形成因子であるのかは不明である。

大腸がんの主な転移先と考えられている肝臓においては自然免疫の防御反応を担う TLR4 をはじめ、TLR を発現する細胞が多く含まれており、肝臓における感染に対する恒常的な防御反応として働いていると考えられている。しかしながら、大腸がんが肝臓に転移する場合でも、転移前肺で上昇した因子が上昇し転移前肺微小環境と類似した環境が形成されるかについては不明である。我々はごく最近、同種同所移植肝転移モデルマウス、異種同所移植肝転移モデルマウスを用いて抗 S100A8 中和抗体によって肝臓転移を抑制することを見いだしており、S100A8 は転移先に依存しない転移前微小環境形成因子であることを示唆した。

2. 研究の目的

転移性がんは転移先に依存せず、転移前微小環境が形成されるだろうかという問いに対し、これまでに、大腸がん同所移植肝転移モデルマウスを用いて、転移前肝臓にて発現が変動する遺伝子のプロファイリングを行ってきた。特筆すべきことに、転移前肝臓において発現の変動する遺伝子群は炎症に関連する因子が多く含まれているが、転移前肺にて変動する遺伝子群とは相異なっており、転移先に応じて転移前微小環境が形成され、転移先を支配している可能性が示唆された。本研究は、これまでに同定した肝指向性転移前微小環境形成因子による免疫逃避機構と腫瘍クロストークによる転移促進の分子機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) S100A8 リコンビナントタンパク質の精製

ヒト S100A8 遺伝子を大腸菌発現ベクター pGEX-6P-3 (GE Healthcare) に組み入れたものを大腸菌株 Clear Coli (Lucigen) に形質転換し、IPTG 誘導により、GST タグ S100A8 を得た。さらに PreScission Protease (GE Healthcare) 処理により、タグ無しヒト S100A8 タンパク質を得た後 Buffer 交換した。His タグ S100A8 タンパク質は大腸菌発現ベクター pET-30a (Novagen) に組み入れたものを Clear Coli に形質転換し、0.1 mM IPTG 添加により目的のタンパク質を誘導後、大腸菌タンパク質抽出液を TALON Metal Affinity Resin (Clontech) にて精製し、300 mM イミダゾールにて溶出したものを Buffer 交換した。また、細胞培養系に用いる実験においては、テトラサイクリン誘導型 S100A8 発現誘導細胞由来の S100A8 を使用した。精製したタンパク質はリムスカラー KY テスト (WAKO) を用いて、エンドキシンレベルの測定を行い、0.005 EU/μg 未満のタンパク質を実験に用いた。エンドキシン濃度が高い場合には、Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel (Thermo Fisher) を用いて、エンドキシンを除去後、リムステストを行い、0.005 EU/μg 未満を確認後、以下の実験に使用した。

(2) S100A8 と TLR4/MD-2 との結合評価

固相プレート (Maxisorp, Thermo Fisher) にあらかじめ S100A8 タンパク質を固相化した後、非特異的結合をブロックするために Protein Free Blocking Buffer (Thermo Fisher) によりブロッキング後、PBS-Tween20 にてプレートを 3 回洗浄した。洗浄後、TLR4/MD-2 リコンビナントタンパク質と候補ペプチドや化合物を各ウェルに添加し、37°C にて反応させた。反応後各ウェルを PBS-Tween20 にて洗浄し、抗 TLR4 抗体、抗ウサギ IgG-HRP 標識抗体と反応させ、TLR4 結合量を TMB を基質として定量化した。

(3)腫瘍、肝臓における免疫応答細胞の解析

野生型マウス、遺伝子組換えマウスにマウス大腸がん細胞を移植し、所定時間後に担がんマウスの腫瘍塊、肺や肝臓を採取し、コラゲナーゼ・デスパーゼ・DNase 系の組織消化液にて単一細胞懸濁液を得た。得られた細胞懸濁液を抗 CD11b, Ly6C, Ly6G, F4/80, CD45 等の細胞表面マーカーの蛍光標識抗体にて多重染色し、骨髄由来抑制性細胞や腫瘍随伴マクロファージ等をフローサイトメトリーにて解析した。

(4)急性呼吸窮迫症候群モデルマウスを用いた検証

麻酔下において野生型マウスに S100A8 又は LPS を気管内スプレーにより投与し、所定時間後にマウス末梢血、組織を採取し、フローサイトメトリー (CytoFLEX S: ベックマンコールター)を用いて骨髄由来抑制性細胞等を解析した。また肺組織を免疫組織学的に解析した。全ての動物実験は所属する機関の動物倫理委員会に計画書を提出し、審査後承認済である。

4. 研究成果

(1) 転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスを用いた解析

先行研究にて作出した転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスにマウス大腸がん細胞を移植したところ、肝臓への転移が抑制されたことから、転移前肝微小環境形成因子は肝転移を促進することが示唆された(論文投稿準備中)。さらに、マウス大腸がん細胞を同所移植した野生型マウスの肝臓と比較して、マウス大腸がん細胞を同所移植した転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスの肝臓において変動する免疫応答細胞を同定した。

(2) 転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスを用いた解析

① 転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスの作成

これまでに同定した転移前肝微小環境形成因子の遺伝子欠失マウスは先行研究にて作出済みであり、本研究においてさらに、転移前肝微小環境形成因子の必要性を検証するため、肝特異的転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスを所属機関実験動物研究所との共同研究にて作成することとした。トランスジーンが導入されたクローンからそれぞれゲノム DNA を抽出後、サザンブロッティング法にてコピー数を算出し、3 ラインに絞り込んだ。さらに野生型マウスと比較して、血中転移前肝微小環境形成因子の発現量が顕著に上昇したマウスを選出した。

② 転移前肝微小環境形成因子による転移促進

野生型マウス、転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスに蛍光標識したマウス大腸がん細胞を移植し、所定時間後の肝転移数を測定したところ、野生型マウスと比較して、転移前肝微小環境形成因子トランスジェニックマウスにおいて顕著に肝転移数が上昇したことから、転移前肝微小環境形成因子欠失マウスによる肝転移抑制の効果と合致して、転移前肝微小環境形成因子の高発現が肝転移を促進する作用を持つことが示唆された(論文投稿準備中)。

(3) 肝転移シグニチャー因子の同定

高率に肝転移する細胞の特徴を得るために、遺伝子発現解析を行い、肝転移シグニチャー候補因子の同定を行なった。これまでに同定した肝転移シグニチャー候補因子のうち、転移前微小環境形成因子によって発現が顕著に上昇する液性因子を特定した。

(4) S100A8 阻害薬候補の単離

これまでに、肺転移における転移前微小環境形成に関わる因子として S100A8 を同定してきたが、転移前段階での肝臓においても S100A8 の発現上昇が認められた。また、マウス肺がん LLC 細胞を皮下移植した担がんマウスモデルにおいて、抗 S100A8 中和抗体投与により、皮下腫瘍の増殖を顕著に抑制することを見出している(Deguchi A *et al.*, *Oncogene*, 2016)。さらに、マウス S100A8 は S100A8 のカルボキシル末端側を介し TLR4/MD-2 に結合することを見いだしており(Deguchi A *et al.*, *Oncogene*, 2016)、本研究においては、進行性がんに対する治療薬候補を探索するため、マウス TLR4/MD-2 とマウス S100A8 にて得られた構造情報をもとに、まず、結合領域を絞り込み、さらに、ヒト TLR4/MD-2 とヒト S100A8 との結合を阻害する多価型のペプチドや化合物スクリーニングを行った。数種得られた S100A8 阻害ペプチド候補のうち、ヒト大腸がん SW480 細胞を皮下移植した Xenograft モデルマウスにおいて抗腫瘍活性を示す S100A8 阻害ペプチドを同定した(論文リバイス中、PCT 特許出願中)。今回得られた S100A8 阻害ペプチドは当該配列を多価型の形状をした阻害ペプチドであり、単価型よりも TLR4/MD-2 に対して強い競合阻害活性を示すことが明らかとなった。今後肝転移モデルマウスにおいても、S100A8 阻害ペプチドの効果を検証する。

(5) TLR4 内因性リガンドによる急性呼吸窮迫症候群様の誘導

未だに収束にいたっていない新型コロナウイルス感染症の重症化例において、S100A8/S100A9 の発現が上昇することが報告されている (Silvin A, *et al.*, *Cell* 2020)。

ヒトにおける急性呼吸窮迫症候群の定義には硝子膜の出現が定義されているが、マウスにおいては、

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS)の定義として、硝子膜の出現は必須条件ではない。ごく最近、ヒト ACE2 トランスジェニックマウスにおいて SARS-CoV-2 感染により、硝子膜様の変化が報告とされている (Hong W, *et al.*, *Signal Transduct Target Ther.* 2021)。S100A8 の ARDS への関与を調べるために、LPS または、S100A8 を気管内スプレーし急性呼吸窮迫症候群様の病態が発症するかを検討した。TLR4 内因性リガンドを気管内スプレー後、所定時間後に骨髄由来抑制性細胞の肺への動員、肺血管内皮細胞の肥厚や硝子膜様の構造変化が LPS 又は S100A8 投与のどちらの場合にも認められたことから、ARDS 発症における肺の病態が転移前微小環境に類似していること、ARDS の病態の進行の過程において TLR4 受容体を介したシグナル伝達に関与する可能性が示唆された (Deguchi A, *et al.* *FASEB J*, 2021, 日経産業新聞 2021/8/25 掲載, 朝日新聞 DIGITAL 医療専門サイト 朝日新聞アピタル 2021/10/28 掲載, 朝日新聞 2021/11/9 掲載)。これまでに我々は S100A8 をがんの標的としてとらえてきたが、S100A8 が炎症が関連する様々な疾患においても関与することが報告されていることから、S100A8 の機能を阻害するペプチドや化合物が S100A8 が関与するその他疾患においても効果を示す可能性を示唆した。

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 2件）

1. 著者名 Deguchi A, Yamamoto T, Shibata T, Maru Y	4. 巻 35
2. 論文標題 S100A8 may govern hyper-inflammation in severe COVID-19.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 e21798
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.202101013	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 Tomita T, Ieguchi K, Deguchi A, Takita M, Tsukahara F, Hiratsuka S, Maru Y.	4. 巻 144
2. 論文標題 Lung Tumor Cell Recruitment Assay	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Vis Exp	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/53172	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 出口 敦子、丸 義朗	4. 巻 265
2. 論文標題 がん転移と自然免疫	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1271-1275
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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 出口敦子、西川喜代孝、丸義朗
2. 発表標題 S100A8を標的とした新規がん微小環境改善薬の開発
3. 学会等名 日本医療研究開発機構革新的医療技術創出拠点令和3年度成果報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 丸義朗、出口敦子
2. 発表標題 転移前微小環境形成による転移促進
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 出口敦子
2. 発表標題 転移前肝ニッチ形成因子による肝転移促進の分子機序
3. 学会等名 アステラス病態代謝研究会第51回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 出口敦子、丸義朗
2. 発表標題 喫煙による転移前微小環境形成の促進と血清アミロイドA3の意義
3. 学会等名 喫煙科学研究財団第35回令和2年度助成研究発表会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 S100A8阻害ペプチドとこれを含む疾患治療薬	発明者 丸義朗、出口敦子、 高橋美帆、西川喜代 孝、大戸梅治	権利者 学校法人東京女 子医科大学、学 校法人同志社
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/020095	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 S100A8阻害ペプチドとこれを含む疾患治療薬	発明者 丸義朗、出口敦子、 高橋美帆、西川喜代 孝、大戸梅治	権利者 東京女子医科大 学、同志社
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-096367	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東京女子医科大学薬理学講座ホームページ
<http://www.twmu.ac.jp/yakuri/index.html>
東京女子医科大学業績データベース
<https://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kyoinId=ymdygegyggk>
日経産業新聞 2021/8/25 掲載
朝日新聞DIGITAL 医療専門サイト 朝日新聞アピタル 2021/10/28掲載
朝日新聞 2021/11/9掲載

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