

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03506

研究課題名(和文) 転移前微小環境における新しい免疫学的血栓形成機構の解明

研究課題名(英文) Novel immunothrombosis on premetastatic niche formation

研究代表者

丸 義朗 (maru, yoshiro)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00251447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はこれまでに、がんの転移には転移する前の段階で、転移前微小環境が形成されることを見いだしてきた。転移前微小環境とはがん微小環境に類似した炎症様の環境であり、TLR4内因性リガンドであるS100A8が引き金となる。本研究では、S100A8のTLR4/MD-2結合領域を標的としたS100A8多価型ペプチドが大腸がんxenograftモデルにて腫瘍増殖を抑制することを見いだした。また、急性呼吸窮迫症候群の発症にS100A8を介したTLR4/MD-2経路が関与することを示唆し、S100A8-TLR4/MD-2経路はがんだけでなく、様々なS100A8が関与する疾患の分子標的となる可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんによる主たる死因は遠隔臓器への転移によるものであり、その戦略的対応策は世界的に大きな課題である。我々はこれまでがん細胞が転移する前の肺(転移前肺)では、がん細胞の存在なしでも、白血球の動員と血管透過性亢進、すなわち炎症が発生していることを世界に先駆けて提唱してきた。その分子機序の一つとしてエンドトキシン受容体であるTLR4/MD-2複合体の内因性リガンドであるS100A8が関与することから、S100A8が関与する転移前微小環境形成の分子の機序を解明することは、転移性がんを標的とした治療薬に発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have so far found that premetastatic niche is formed before cancer metastasis. The premetastatic niche is an inflammation-like environment that mimics the tumor microenvironment and is triggered by the TLR4 endogenous ligand S100A8. In this study, we found that novel multivalent S100A8 inhibitory peptides inhibited tumor growth in a xenograft model, and that TLR4/MD-2 pathway via S100A8 may be involved in the onset of acute respiratory distress syndrome. These results suggested that the S100A8-TLR4/MD-2 pathway may serve as a promising molecular target not only for cancer but also for various S100A8-related diseases.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：転移前微小環境 血管透過性 血液凝固 TLR4 S100A8

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでにがん細胞が転移する前の肺(転移前肺)では、白血球の動員と血管透過性亢進を主徴とする炎症が発生していることを見出した。そのメカニズムは原発巣からの遠隔操作によって転移前肺で S100A8 の産生が亢進すること、S100A8 はエンドトキシン受容体である TLR4/MD-2 複合体の内因性リガンドであること、転移前肺はエンドトキシンを産生する病原体が肺に存在すると誤認し、無菌性炎症が惹起されること、である。近年、自然免疫の防御機構の一様式として免疫学的血栓形成という概念が提言された。これは血液凝固による病原体の拡散防止機構であり、血管内皮細胞の損傷を伴って発動される。転移前肺はこれに類似するが、がん細胞の存在や血管内皮細胞の損傷は無く、エンドトキシンの代わりに S100A8 の発現が亢進している。我々は抗転移要素を解明しようとした試みにより、フィブリノーゲンの分解を促進する第 X 凝固因子を発現する NK 細胞を見出した。免疫学的血栓形成の概念を拡大した上で微生物の代わりに将来的に転移してくるがん細胞や動員される白血球を想定し、エンドトキシン受容体の内因性リガンドと肝臓以外で発現する血液凝固因子の作用様式を転移前微小環境で解明することが必要となっている。

2. 研究の目的

がんによる死因の主な原因は遠隔臓器への転移であるが、今のところ転移性がんに対する有効な治療法が存在せず、転移性がんに対する治療法の確立は急務と考えられる。免疫学的血栓形成機構における凝固関連因子やその分解産物が自然免疫に関与する様式は、抗微生物活性や微生物殺傷能力を持つ白血球の動員に関与する炎症促進活性であるが、転移前微小環境においてはこれがどのような要素であるかは不明である。がん微小環境には、白血球の動員と血管透過性亢進という炎症の本質的要素が存在する。動員される白血球には、がん細胞を殺傷する能力を有する細胞障害性T細胞やNK細胞が含まれ、近年成功をおさめている抗PD-1抗体治療は、それらの細胞の再活性化に立脚している。我々はこれまでに、がん細胞が生着する前の肺(転移前肺)において、白血球動員と血管透過性亢進等、炎症が発生していることを世界に先駆けて提唱した。免疫学的血栓形成機構における凝固関連因子やその分解産物が自然免疫に関与する様式は、抗微生物活性や微生物殺傷能力を持つ白血球の動員に関与する炎症促進活性であるが、転移前微小環境においてはこれがどのような要素であるかは不明である。本研究では、転移前微小環境における免疫学的血栓形成機構における炎症と収束の関与を解明することを目的とする。関連する分子としてS100A8と血栓形成に関与するレクチン様酸化LDL受容体-1 (LOX-1) を主に解析する。

3. 研究の方法

(1) S100A8 多価型阻害ペプチドの単離と活性評価

マウス S100A8 を用いて解析して得られた情報をもとに、ヒト S100A8 に対するアミノ末端側 S100A8, カルボキシル末端側 S100A8 等切断変異体を作製し、ELISA 法により TLR4/MD-2 に対する親和性を評価した。この結果をもとに、結合部位をさらに絞り込むために、S100A8 に対する 5 アミノ酸オーバーラッピングペプチドを合成した。合成されたペプチドを、ELISA 法や免疫沈降法により、TLR4/MD-2 の親和能や、S100A8 と TLR4/MD-2 との競合阻害活性を検証した。さらに、アラニンスキャニングにより、アミノ酸一残基レベルでの S100A8 と TLR4/MD-2 との結合部位の検証を行った。細胞レベルにて、S100A8 によって誘導される NF- κ B 活性化を抑制するペプチドを同定し、この配列を多価型にすることでより低濃度にて競合阻害活性を示すペプチドを作成した。さらに、ヒト大腸がん細胞 SW480 細胞を移植した xenograft モデルにて、候補ペプチドの抗腫瘍活性を評価した。

(2) 急性呼吸窮迫症候群(ARDS)モデルマウスの作出

野生型マウスに気管投与スプレーを用いて、S100A8 またはリポポリサッカライド (LPS) を投与し、所定時間後にマウスの肺を採材し、組織学的解析やフローサイトメトリーにより骨髄由来免疫抑制性細胞の動員数を解析した。

(3) 骨髄マクロファージ培養系におけるS100A8及びSAA3の分泌におけるLOX-1の影響解析

野生型マウスより骨髄細胞を採取し、M-CSF により分化させた骨髄マクロファージ培養系に、LPS と Nigericin を段階的に処理して細胞死パイロトーシスを誘導し、培養上清中への S100A8 及び SAA3 分泌及び細胞ライセートにおける LOX-1 及びパイロトーシス関連分子の発現をウェスタンブロット法により解析した。LOX-1 ノックアウトマウスでも同様の実験を施行し、野生型マウスとの表現型の比較を行った。

(4) LLC 担がんモデルの作製と転移前肺における S100A8 mRNA 発現に及ぼす宿主 LOX-1 の影響解析

野生型マウスあるいは LOX-1 ノックアウトマウスにルイス肺がん LLC 細胞の皮下移植により担がんマウスを作製した。LLC 細胞の移植後 14 日目において皮下腫瘍のサイズを計測すると共に肺を摘出し、S100A8 の mRNA 発現を RT-qPCR 法により解析した。

4. 研究成果

(1) 血管透過性に関わる S100A8 に対する多価型阻害ペプチドの開発

これまでに研究代表者らは、S100A8 は血管透過性を亢進する作用を持つこと (Hiratsuka *et al*, *Nat Commun*, 2013)や S100A8 の受容体である TLR4 阻害薬エリトランにてマウス皮下腫瘍の増殖を顕著に阻害することを見いだしており(Deguchi *et al.*, *Oncogene* 2016)、S100A8 と TLR4 との結合を競合的に阻害することができれば、抗腫瘍活性や血管透過性の抑制できる可能性を示唆した。近年、マウス S100A8 と TLR4/MD-2 との結合には S100A8 のカルボキシル末端側が関与することを見いだしており、この領域を絞込み込むことで競合阻害活性を持つペプチドを単離した。得られたペプチドをアラニンスクヤニングし、TLR4/MD-2 に対し、天然のペプチド配列より結合能が高いペプチド peptide3A5 を単離した。この配列を多価型にすることで、より低濃度で TLR4/MD-2 に対して競合活性を示した。またヒト大腸がん SW480 細胞を移植した xenograft モデルにて抗腫瘍活性を示すことを見いだした。さらに、抗 VEGF 抗体併用により抗 VEGF 抗体による腫瘍増殖抑制を増強することが示唆された(Deguchi, *et al*, *Cancer Gene Ther*, 2023;PCT 出願済)。

(2) 急性呼吸窮迫症候群(ARDS)モデルマウスの作出

新型コロナウイルス感染症重症化例において、S100A8/S100A9 の発現が上昇することが報告されている (Silvin *et al.*, *Cell*, 2020)。ヒトにおける急性呼吸窮迫症候群の定義として、硝子膜の出現が定義されているが、マウスにおいては、ARDS の定義として、硝子膜の出現は必ずしも必須ではない。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 *et al*, *Signal Transduct Target Ther*, 2021)。研究代表者らは、ARDS 発症における S100A8 の関与を検討した。S100A8 リコンビナントタンパク質をマウス気管内投与後、LPS と同様に骨髄由来抑制性細胞が肺に動員されることを見いだした。さらに、硝子膜様の構造変化が LPS、S100A8 投与のどちらの肺において認められたことから、ARDS の発症に S100A8 が TLR4 依存的に関与している可能性が示唆された (Deguchi, *et al*, *FASEB J*, 2021)。

(3) 骨髄マクロファージ培養系におけるS100A8及びSAA3の分泌におけるLOX-1の影響解析

レクチン様酸化LDL受容体-1 (LOX-1)はC型レクチン受容体の一つであり、酸化LDLを認識する。LOX-1は血管内皮細胞、マクロファージ、平滑筋細胞などに発現しており、血管内皮細胞では一酸化窒素(NO)放出の減少や血管透過性の亢進を主徴とする血管内皮不全を、マクロファージでは酸化LDLの細胞内取り込みによる泡沫化の促進を、平滑筋細胞では細胞増殖の亢進による血管平滑筋の肥厚化を、それぞれ引き起こし、動脈硬化の増悪化に関与する。近年、LOX-1はがんの病態への関与が示唆されており、ヒト前立腺がんや大腸がん組織において、LOX-1の高発現が認められ、がん細胞の増殖・浸潤活性の促進へのLOX-1の関与が報告されている。がんの増殖・転移においてはがん細胞のみならず、間質の宿主細胞も重要な役割を担っているが、宿主細胞のLOX-1に着目した解析は未だ施行されていない。そこで本研究ではLOX-1遺伝子欠損 (LOX-1ノックアウト)マウスを用いた解析を行い、宿主細胞の発現するLOX-1の転移前微小環境への関与を調べた。野生型マウス由来の骨髄マクロファージにおいてLPSとNigericinを段階的に処理するとNLRP3インフラマソームを介したカスパーゼ-1の活

性化によりGasdermin Dが分解され、細胞膜上での細孔形成が起こり、パイロトーシスが引き起こされ、培養上清中に活性型IL-1 β が放出されると共にS100A8とSAA3の分泌も亢進していた。さらにLOX-1ノックアウトマウス由来の骨髄マクロファージにおいても野生型と同程度にパイロトーシスが引き起こされ、培養上清中の活性型IL-1 β とS100A8とSAA3分泌量は野生型と比べ差は認められなかった。これらの結果から、宿主LOX-1は骨髄マクロファージにおけるS100A8及びSAA3の分泌には関与しないことが示唆された。

(4) LLC 担がんモデルの作製と転移前肺における S100A8 mRNA 発現に及ぼす宿主 LOX-1 の影響解析

LLC 細胞を移植後、14 日目において野生型マウスでは著しい皮下腫瘍の形成が認められたが、LOX-1 ノックアウトマウスでは皮下腫瘍のサイズが野生型マウスに比べ縮小していた。転移前肺における S100A8 の mRNA 発現を RT-qPCR 法により調べたところ、野生型マウスでは皮下腫瘍の形成に伴い、S100A8 の mRNA 発現が著しく亢進したが、LOX-1 ノックアウトマウスではその mRNA 発現の亢進が認められなかった。これらの結果から、宿主の LOX-1 は LLC 細胞の皮下腫瘍の増殖に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Deguchi A, Watanabe-Takahashi M, Mishima T, Omori T, Ohto U, Arashiki N, Nakamura F, Nishikawa K, Maru Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Novel multivalent S100A8 inhibitory peptides attenuate tumor progression and metastasis by inhibiting the TLR4-dependent pathway.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Gene Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41417-023-00604-3	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 Nakahara E, Shimojima Yamamoto K, Ogura H, Aoki T, Utsugisawa T, Azuma K, Akagawa H, Watanabe K, Muraoka M, Nakamura F, Kamei M, Tatebayashi K, Shinozuka J, Yamane T, Hibino M, Katsura Y, Nakano-Akamatsu S, Kadowaki N, Maru Y, Etsuro Ito E, Ohga S, Yagasaki H, Morioka I, Yamamoto T and Kanno H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Variant spectrum of PIEZO1 and KCNN4 in Japanese patients with dehydrated hereditary stomatocytosis.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Hum Genome Var.	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-023-00235-y	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 Deguchi A, Maru Y.	4. 巻 42
2. 論文標題 Inflammation-associated premetastatic niche formation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Inflamm Regen.	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-022-00208-8	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 Ieguchi K, Funakoshi M, Mishima T, Takizawa K, Omori T, Nakamura F, Watanabe M, Tsuji M, Kiuchi Y, Kobayashi S, Tsunoda T, Maru Y, Wada S.	4. 巻 23
2. 論文標題 The Sympathetic Nervous System Contributes to the Establishment of Pre-Metastatic Pulmonary Microenvironments.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 10652
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms231810652	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, Kato M, Mishima T, Matsunaga Y, Sanjo H, Ito KI, Minagawa K, Matsui T, Oikawa H, Takahashi S, Takao T, Iwai N, Mino T, Takeuchi O, Maru Y, Hiratsuka S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Extracellular mRNA transported to the nucleus exerts translation-independent function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 3655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23969-1	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 Deguchi A, Yamamoto T, Shibata N, 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 deguchi K, Tomita T, Takao T, Omori T, Mishima T, Shimizu I, Tognolini M, Lodola A, Tsunoda T, Kobayashi S, Wada S, Maru Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Analysis of ADAM12-Mediated Ephrin-A1 Cleavage and Its Biological Functions.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 2480 ~ 2480
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22052480	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 Maru Y.	4. 巻 a036897
2. 論文標題 Premetastasis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cold Spring Harb Perspect Med.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/cshperspect.a036897	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3件（うち招待講演 1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 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

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（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Maru Y.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer.	5. 総ページ数 538
3. 書名 Inflammation and metastasis (2nd edition).	

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 S100A8-INHIBITING PEPTIDE AND DISEASE THERAPEUTIC AGENT CONTAINING SAME	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、US17/928,988	出願年 2022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 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

産業財産権の名称 p210 PH結合ペプチドおよび慢性骨髄性白血病治療薬	発明者 西川喜代孝、島崎健 太朗、長田雅也、丸 義朗、塚原富士子他	権利者 学校法人同志 社、学校法人東 京女子医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019 - 1989467	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>東京女子医科大学 薬理学講座 業績ページ https://gyoseki.twmu.ac.jp/twmhp/KgApp?kozac=C1060000000&year=2022 東京女子医科大学 薬理学講座 ホームページ https://www.twmu.ac.jp/yakuri/index.html</p>
--

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