

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07636

研究課題名(和文) S100A8/A9が悪性化する原発巣および転移先がん微小環境を制御する治療法

研究課題名(英文) Development of therapeutic antibodies based on the elevated S100A8/A9 in tumor microenvironment

研究代表者

木下 理恵 (Kinoshita, Rie)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：40518297

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)：S100A8/A9タンパク質は、主に好中球や単球などに由来する炎症メディエーターである。我々は、S100A8/A9のモノクローナル抗体をがん転移治療薬として開発した。そしてS100A8/A9が、がん微小環境を制御するメカニズムの解明を目指し、In vitroでは、マクロファージへのS100A8/A9添加により有意に発現が変動する遺伝子をRNA-seqを用いて網羅的に解析した。In vivoでは、複数のがん種由来の細胞株を用いて皮下腫瘍マウスモデルを作製し、最も腫瘍内S100A8/A9濃度が高い膵がんモデルにおいて、開発したS100A8/A9抗体の原発巣における腫瘍縮小効果を評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

開発した抗S100A8/A9抗体は、強力な抗炎症作用をもち、様々な炎症性疾患治療薬として実用化される可能性をもつ。先行してIPF(特発性肺線維症)およびIPF急性増悪について有意な治療効果を示し、ヒト化抗体を作製している。本研究成果により、RNA-seq解析の手法を用いて、S100A8/A9が炎症性疾患を増悪するメカニズムの一端が解明され、マウスモデルの実験データからがん転移治療薬としての開発抗体の可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：S100A8/A9 (S100A8 and A9 heterodimer) is an inflammatory factor engaged in the onset of chronic inflammatory diseases. We analyzed patient plasma of several kinds of cancer and discovered excessive expression of S100A8/A9. Using RNA-seq analysis, we confirmed that stimulation of S100A8/A9 on macrophages induced upregulation of many types of cancer-associated cytokines and chemokines. Therefore, we have developed prominent new anti-human S100A8/A9 monoclonal antibody for treatment of cancer. We confirmed the therapeutic effect of our developed S100A8/A9 neutralizing antibody in subcutaneous pancreatic tumor mouse model. The antibody can terminate the negative spiral of aggravated inflammation induced by S100A8/A9, which in turn alleviates cancer progression.

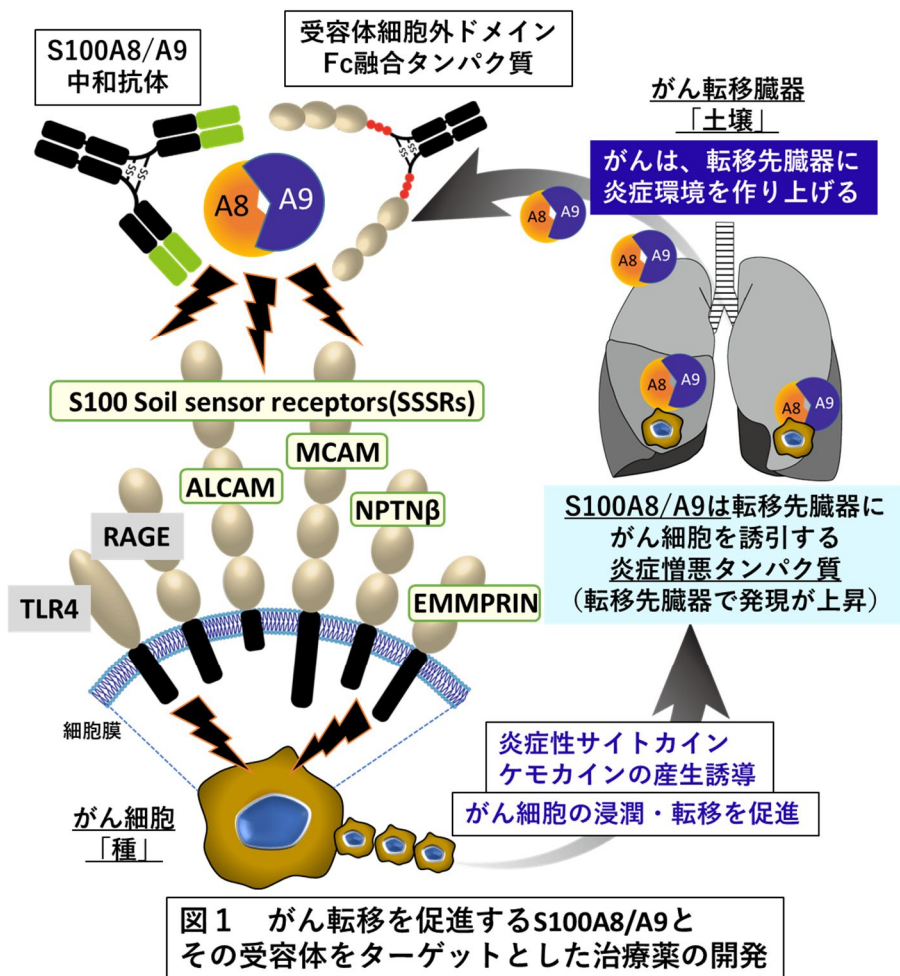
研究分野：タンパク質工学

キーワード：antibody inflammation cancer metastasis

1. 研究開始当初の背景

がん転移を制御することは、がんの克服に直結する重要な課題である。1889年、Paget 博士は、がん細胞を“種”、転移先臓器を“土壌”とし、がん細胞には生着そして増殖するための環境が必要だと提唱した。我々は、カルシウム結合タンパク質である S100A8/A9 タンパク質とその受容体群 (S100 Soil Sensor Receptors (SSSRs)と命名) が、がん細胞の臓器指向性転移において重要な役割をもつと考え研究を進めてきた。そして、S100A8/A9 の受容体として、これまでに報告されていた TLR4 (Toll-like receptor 4) や RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products) 以外に、EMMPRIN (Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer)、NPTN (Neuroplastin- ), MCAM (melanoma cell adhesion molecule)、ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) の4種類の受容体を新規同定した。そしてこれらの受容体が、がん種によって異なる発現パターンを示し、がんの悪性化に伴って発現が上昇し、S100A8/A9 のシグナルに応答してがん細胞を転移に向かわせるメカニズムを証明している。新規同定した受容体群は、メラノーマに過剰発現させると、肺転移を有意に促進し、それら受容体の細胞質ドメインを欠損した変異体は、顕著に肺転移を抑制した(図1)。

我々は、これら受容体の細胞外ドメインと抗体のFc領域を融合させた exSSSRs-Fc fusion protein を作製し、メラノーマの肺転移マウスモデルにおいて、尾静脈投与によりそのがん転移抑制効果を確認した。一方、リガンドである S100A8/A9 に対して中和活性をもつモノクローナル抗体を作製し、同様にメラノーマ肺転移マウスモデルにおいて、顕著ながん転移抑制効果を確認した。



2. 研究の目的

S100A8/A9 とその受容体の連携の遮断は、有望ながん転移治療法であるが、S100A8/A9 の濃度上昇によって、がん微小環境の免疫細胞がどのように変化するのか理解が進んでいなかった。複雑に複数の因子が絡み合う転移先臓器および原発巣のがん微小環境において、免疫細胞は重要な役割を果たす。本研究では、我々の開発した治療薬が、がん微小環境に与える影響を示すため、(1) 炎症環境において、骨髄由来抑制細胞 (MDSC) やマクロファージに対して分泌された S100A8/A9 が及ぼす遺伝子変化を RNA-seq で網羅的に解析する。そして (2) がん患者血清 (肺がん・肝がん・膵がん) および (3) マウス皮下腫瘍モデルの腫瘍中

S100A8/A9 濃度の解析を実施する。(4) 腫瘍内の S100A8/A9 濃度が高い膵がんのマウスモデルにおいて、開発した S100A8/A9 抗体の原発巣における腫瘍縮小効果を評価する。これらの実験により開発した抗体のがん治療薬としての臨床応用の可能性を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) S100A8/A9 により誘起される免疫細胞の炎症シグナルの解析

S100A8/A9 添加 THP-1 (ヒト単球細胞株) およびマクロファージの解析

大腸がん細胞 CT26 細胞株の培養上清(CT26\_CM)を用いて THP-1 細胞を 24 時間培養後、細胞を回収し S100A8 および S100A9 の mRNA 解析を行った。THP-1 細胞および THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージ、Raw264.7 細胞(マウスのマクロファージ細胞株)に対して、S100A8/A9 を添加し、各種炎症性サイトカインの誘導能をリアルタイム PCR により解析した。

網羅的な遺伝子変動解析を行うため、THP-1 細胞から分化誘導したマクロファージへのヒト S100A8/A9 タンパク質を添加し、4 時間後の RNA を回収し RNA-seq 解析を行った。

S100A8/A9 による MDSC 活性化シグナルの解析

健康人の全血から定法により調製した末梢血中単核細胞(PBMC)に、GM-CSF, IL-6 を添加し、MDSC を分化誘導後、CD33(MDSC のマーカーの一つ)陽性細胞を分取する方法で MDSC を単離した。MDSC に対する S100A8/A9 の影響を調べるため、MDSC へ 10  $\mu$ g/mL S100A8/A9 を添加し、4 時間後の RNA を回収し RNA-seq 解析を行った。

#### (2) がん患者血漿中の S100A8/A9 濃度の解析

「岡山大学医療系部局生命倫理審査委員会臨床研究審査専門委員会」に申請書を提出し、承認を受けた後(承認番号: 研 1910-017 号)、健康者およびがん患者(膵がん 3 名、肝がん 10 名、肺がん 15 名)から採取された血清の S100A8/A9 濃度を独自に構築した S100A8/A9 ヘテロダイマー構造特異的な ELISA 系により解析を行った。

#### (3) がん細胞株皮下腫瘍モデルにおける血中・腫瘍内における S100A8/A9 濃度の解析

マウスおよびヒトの肺がん膵がん細胞株について数種類の皮下腫瘍モデルを作製し、皮下腫瘍体積が 200  $\text{mm}^3$  に達した時点で摘出し、腫瘍内の S100A8/A9 濃度を ELISA 法で解析した。

#### (4) 膵がん細胞株(AsPC-1)の皮下腫瘍モデルに対する抗 S100A8/A9 抗体の治療効果

BALB/c-nu/nu マウスにヒト膵がん細胞(AsPC-1)を  $1 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L で皮下移植し、腫瘍体積が 100  $\text{mm}^3$  以上になった時点を Day 0 として 3 群に群分けし、週に 1 回、PBS・抗 S100A8/A9 抗体・Gemcitabine(抗がん剤)を腫瘍内投与した。腫瘍体積・体重・摘出後の腫瘍重量で、治療効果を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) S100A8/A9 により誘起される免疫細胞の炎症シグナルの解析

S100A8/A9 添加 THP-1 (ヒト単球細胞株) およびマクロファージの解析

大腸がん細胞 CT26 細胞株の培養上清(CT26\_CM)を用いてヒト単球を 24 時間培養後、細胞を回収し mRNA 解析を行った結果、D/F(培地)で培養した時と比較して、S100A8 及び S100A9 の発現レベルは 20 倍以上に増大した。この結果は、がん細胞が放出する増悪因子が免疫細胞に作用し腫瘍内の S100A8/A9 濃度を上昇させることを示しており、抗 S100A8/A9 抗体が、マウス腫瘍移植モデルにおいて、抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された。

そして炎症性疾患の病因との関連が強く示唆されるマクロファージにおいて、S100A8/A9 の受容体の発現パターンを確認し、S100A8/A9 が誘導する炎症性サイトカイン・炎症性シグナルを分子レベルで網羅的に明らかにするため RNA-seq を行った。その結果、炎症性サイトカインの発現誘導だけでなく、他のがん悪性化因子や炎症性疾患の増悪因子なども S100A8/A9 の標的遺伝子となることが確認され、受容体の数種類を共有する LPS 刺激とは異なる S100A8/A9 特有の機能も示唆された。さらに RNA-seq 解析の結果を基に実験を実施し、S100A8/A9 は様々な炎症性サイトカインの機能を増強し、単球・マクロファージにおけるインフラマソームの活性化およびそれに伴う細胞死を誘導することを示した。

S100A8/A9 による MDSC 活性化シグナルの解析

MDSC は、主要な免疫抑制細胞であり、S100A8/A9 は MDSC から活発に分泌されオートクライン的に MDSC を活性化させるとの報告がある。そこで PBMC から MDSC を分化誘導後、CD33 陽性細胞を分取する方法で MDSC を単離し、S100A8/A9 が誘導する発現変動遺伝子を

RNA-seqにより網羅的に解析した。発現上昇遺伝子 Top50 を選抜し、リードカウントの値を Z-score で示して、HeatMap にまとめ、そしてこの発現上昇遺伝子について遺伝子オントロジー (gene ontology; GO) 解析を行った。この解析により MDSC において、S100A8/A9 は特に IL-10 シグナルに関連した遺伝子の発現を誘導しており、MDSC の増殖・遊走を制御していることが示唆された。

(2) がん患者血漿中の S100A8/A9 濃度の解析

健康者およびがん患者 (膵がん 3 名、肝がん 10 名、肺がん 15 名) から採取された血漿の S100A8/A9 濃度を独自に構築した S100A8/A9 ヘテロダイマー構造特異的な ELISA 系により解析を行った。その結果、S100A8/A9 は、健康者と比較してがん患者血清中で顕著に濃度が上昇していることを見出した (図 2)。

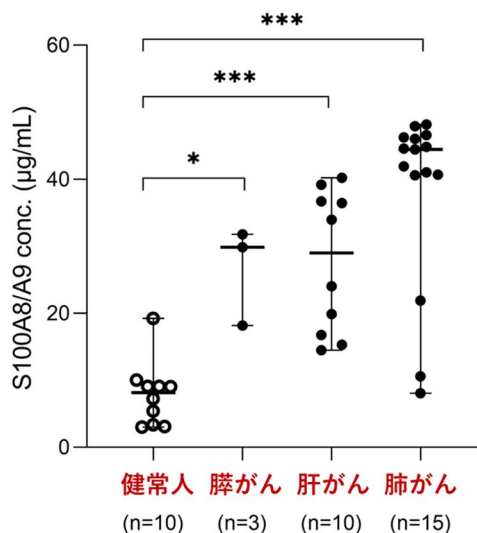


図 2 がん患者血清中の S100A8/A9 濃度

(3) がん細胞株皮下腫瘍モデルにおける血中・腫瘍内における S100A8/A9 濃度の解析

マウスおよびヒトの肺がんと膵がん細胞株数種類の皮下腫瘍モデルを作製し、腫瘍内・血漿中の濃度を比較した結果、血漿中の S100A8/A9 濃度に差はないが、どの細胞株においても膵がんの腫瘍内の S100A8/A9 濃度は、肺がんと比較して 50 倍以上高いことを確認した。S100A8/A9 抗体は、特発性肺線維症の治療薬としても並行して開発を進めており、線維芽細胞の増殖・分化を抑制し、治療効果を発揮することを確認している。これらのデータから、S100A8/A9 抗体は、膵がん腫瘍内への S100A8/A9 の過剰な集積が引き起こすがん微小環境の免疫抑制状態および抗がん剤耐性にも寄与する間質の線維化を抗 S100A8/A9 抗体によって抑制し、がんの進行・転移を阻止することが可能であると考えられる。

(4) 膵がん細胞株 (AsPC-1) の皮下腫瘍モデルに対する抗 S100A8/A9 抗体の治療効果

(3) の実験において、最も腫瘍内 S100A8/A9 濃度が高値を示した AsPC-1 細胞の皮下腫瘍モデルにおいて、S100A8/A9 抗体の原発巣における腫瘍縮小効果を評価した。BALB/c-nu/nu マウスの皮下に AsPC-1 細胞を移植し、腫瘍体積が 100 mm<sup>3</sup> 以上になった時点を Day 0 として 3 群に群分けし、週に 1 回、PBS・抗 S100A8/A9 抗体・Gemcitabine (抗がん剤) を腫瘍内投与した。その結果、開発した S100A8/A9 抗体投与群は、抗がん剤である Gemcitabine 投与群よりも有意な原発巣における腫瘍縮小効果を示した。

今後、これらの成果を基に原発巣の腫瘍縮小および転移抑制効果を示す膵がん治療薬として S100A8/A9 抗体の開発を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Araki Kota, Kinoshita Rie, Tomonobu Nahoko, Gohara Yuma, Tomida Shuta, Takahashi Yuta, Senoo Satoru, Taniguchi Akihiko, Itano Junko, Yamamoto Ken-ichi, Murata Hitoshi, Nishibori Masahiro, Miyahara Nobuaki, Toyooka Shinichi, Sakaguchi Masakiyo	4. 巻 99
2. 論文標題 The heterodimer S100A8/A9 is a potent therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 131 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-020-02001-x	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 Tomonobu Nahoko, Kinoshita Rie, Sakaguchi Masakiyo	4. 巻 13
2. 論文標題 S100 Soil Sensor Receptors and Molecular Targeting Therapy Against Them in Cancer Metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100753 ~ 100753
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2020.100753	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 Tomonobu Nahoko, Kinoshita Rie, Sakaguchi Masakiyo	4. 巻 47
2. 論文標題 exMCAM-Fc, an S100A8/A9-mediated-metastasis blocker, efficiently reduced the number of circulating tumor cells that appeared in the blood flow	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 4879 ~ 4883
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-020-05495-3	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 Nakata Kentaro, Okazaki Mikio, Sakaue Tomohisa, Kinoshita Rie, Komoda Yuhei, Shimizu Dai, Yamamoto Haruchika, Tanaka Shin, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Miyoshi Kentaroh, Yamamoto Hiromasa, Ohara Toshiaki, Sugimoto Seiichiro, Yamane Masaomi, Matsukawa Akihiro, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Functional Blockage of S100A8/A9 Ameliorates Ischemia/Reperfusion Injury in the Lung	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 673 ~ 673
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering9110673	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 Shimizu Dai, Okazaki Mikio, Sugimoto Seiichiro, Kinoshita Rie, Nakata Kentaro, Tanaka Shin, Hashimoto Kohei, Miyoshi Kentaroh, Yamane Masaomi, Matsukawa Akihiro, Sakaguchi Masakiyo, Toyooka Shinichi	4. 巻 629
2. 論文標題 Inhibiting S100A8/A9 attenuates airway obstruction in a mouse model of heterotopic tracheal transplantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 86 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.08.087	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 Tomonobu, N., Kinoshita, R., Wake, H., Inoue, Y., Ruma, I.M.W., Suzawa, K., Gohara, Y., Komalasari, N., Jiang, F., Murata, H., Yamamoto, K.I., Sumardika, I.W., Chen, Y., Futami, J., Yamauchi, A., Kuribayashi, F., Kondo, E., Toyooka, S., Nishibori, M. & Sakaguchi, M	4. 巻 23
2. 論文標題 Histidine-Rich Glycoprotein Suppresses the S100A8/A9-Mediated Organotropic Metastasis of Melanoma Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10300 ~ 10300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms231810300	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 木下 理恵, 荒木 恒太, 佐藤 博紀, 友信 奈保子, 村田 等, 山本 健一, 許 南浩, 豊岡 伸一, 阪口 政清
2. 発表標題 S100A8/A9を標的とした炎症性疾患に対する治療法の開発
3. 学会等名 日本組織培養学会第93会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下理恵、小林和子、荒木恒太、佐藤博紀、友信奈保子、村田等、許南浩、豊岡伸一、阪口政清
2. 発表標題 炎症性疾患に対する抗S100A8/A9抗体療法におけるマクロファージの役割
3. 学会等名 日本組織培養学会第94会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木下 理恵、友信 奈保子、山内 明、二見 淳一郎、近藤 英作、豊岡 伸一、阪口 政清
2. 発表標題 腫瘍微小環境を悪性化する S100A8/A9 を標的としたがん治療薬の開発
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 炎症性肺疾患の予防及び/又は治療剤	発明者 阪口政清、豊岡伸一、木下理恵、荒木恒太	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、TW110110562	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗S100A8/A9抗体とその用途	発明者 阪口政清、豊岡伸一、佐藤博紀、木下理恵、二見淳一郎、他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、US 17/050384	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗S100A8/A9抗体とその用途	発明者 阪口政清、豊岡伸一、佐藤博紀、木下理恵、二見淳一郎、他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、CN201980028619.4	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 抗S100A8/A9抗体とその用途	発明者 阪口政清、豊岡伸一、佐藤博紀、木下理恵、二見淳一郎、他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、EP19792052.3	出願年 2020年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	阪口 政清  (Sakaguchi Masakiyo)  (70379840)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	
研究分担者	小林 和子  (Kobayashi Kazuko)  (20304298)	岡山大学・医歯薬学域・助教   (15301)	

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