

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 24 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590347

研究課題名(和文) 転移性肺がんにおける酸化LDL受容体とTLR4シグナリングのクロストーク

研究課題名(英文) Roles of oxidized LDL receptor and TLR4 signaling in lung metastasis

研究代表者

富田 毅 (Tomita, Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：がんが肺へ転移する際に、がん細胞の肺への生着の可能性を高めるような反応が引き起こされることにより、いわゆる転移前土壌が形成される。本研究では、肺における転移前土壌形成に関する分子の相互作用について解析した。転移前土壌の形成により肺での発現が亢進するS100A8、SAA3タンパク質が血管内皮細胞や上皮細胞に発現する酸化LDL受容体やTLR4/MD-2複合体に結合するかどうかを調べたところ、SAA3はTLR4ではなくアクセサリータンパク質であるMD-2に結合することが明らかとなった。また一部のSAA3バリエーションが酸化LDL受容体に結合することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Tumor metastasis happens results of various steps including formation of pre-metastatic phase. In the pre-metastatic lungs, accumulations of myeloid derived suppressor cells and upregulations of S100A8 and SAA3 expressions have been observed, but detailed molecular mechanisms are not fully understood. This study focused on oxidized LDL receptor and TLR/MD-2 complex, both express in lung endothelial cells and epithelial cells in relation with their potential endogenous ligands, S100A8 and SAA3. By using purified proteins and overexpression systems, the research identified that SAA3 binds MD-2 but not TLR4. In addition certain SAA3 variant binds oxidized LDL receptor.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：血清アミロイドA3 酸化LDL受容体 TLR4

1. 研究開始当初の背景

がんの中でも、転移性肺がんは症例数が多いにもかかわらず、有効な診断法・治療法が確立されていない。基礎研究の立場から転移性肺がんを俯瞰すると、転移性肺がんには有効な診断法・治療法を開発するためには、腫瘍細胞と肺との相互作用の詳細を理解することが必要である。すなわち、腫瘍原発巣から進出してきた腫瘍細胞がどのようにして肺に誘導されるのか、そのとき肺ではどのような反応が起こっているのか、肺へ到達した腫瘍細胞はどのようなふるまいをするのか、といった一つ一つの過程を分子レベルで解明することが必須である。本研究代表者の所属研究室では、肺特異的がん転移における転移前状態について、特に S100A8-血清アミロイド A3-TLR4 カスケードに注目した研究を行ってきた。つまり、腫瘍細胞の転移先である肺では、転移が実際に起こるはるか以前から、このカスケードによる様々な反応が引き起こされ、その結果肺へとがん細胞の転移を誘発する土壌が形成されているというのである。これまでの研究結果から、腫瘍原発巣からのサイトカインシグナル (TNF α , TGF- β , VEGF-A) は肺胞マクロファージ・肺胞血管内皮細胞に作用し、S100A8、血清アミロイド A3 の発現を誘導し、それらのケモカイン様分子が、血中を循環する腫瘍細胞を肺へと誘導することが明らかにされている。また、このときの血清アミロイド A3 の発現上昇は自然免疫の中心的存在であるレセプター分子、Toll 様レセプター 4 (TLR4) に依存的であることも明らかにされた。これらの研究結果を踏まえ、申請者は肺での転移前状態形成には肺特異的細胞が関与しているとの仮説を立て、細気管支上皮細胞であるクララ細胞に注目した研究を行った。いくつかの培養細胞やマウス肺初代培養細胞および腫瘍移植マウスを用いたモデル系での実験結果から、クララ細胞がオートクライン的に血清アミロイド A3 を分泌することで S100A8-血清アミロイド A3-TLR4 カスケードの増幅起点となっていることと、さらに肺胞上皮細胞が血清アミロイド A3 の刺激によって TNF α を産出していることを明らかにした。一連の研究の焦点となった分子である血清アミロイド A3 はこれまでにほとんど研究がされていない分子であり、炎症時に肺組織中に放出される分子という程度の認識しかなく、また、レセプターの TLR4 は LPS 等の菌体内毒素を認識するパターン認識分子として自然免疫の分野でよく研究されているが、最近までは内因性のリガンドの存在は知られていなかった。しかし最近数年間は S100A8・血清アミロイド A3 の他に、HMGB1、HSP70、ヒアルロン酸等 TLR4 の内因性リガンドの候補分子が次々と発表されており、TLR4 の内因性リガンド研究は急速な広がりを見せている。そ

れと同時に、TLR4 に内因性リガンドが結合することの生理意義が問われるようになってきた。その後 S100A8-血清アミロイド A3-TLR4 のシグナリングが転移前状態の形成に寄与しているという、癌研究と免疫学を結びつける新たな視点が提示されており、注目を集めている。転移前状態における血清アミロイド A3 や TNF α の発現レベル上昇は LPS 刺激による発現レベルの上昇に比べると非常に低レベルに留まっているが、その上昇期間は LPS 刺激による一過性のものとは異なり、長期間にわたって持続すると考えられている。この低レベルではあるが持続的な炎症様の反応には、外来異物による炎症反応とは全く違うタイプの情報伝達経路が関与している可能性が考えられる。予備的実験で血清アミロイド A3 の関与する情報伝達経路が TLR4 以外にないかどうかを検討したところ、酸化 LDL 受容体が関与することを示唆するデータが得られた。酸化 LDL 受容体は血中の酸化 LDL を感知し、細胞内へ取り込ませる生理機能を持つため、動脈硬化との関係で研究がなされているが、腫瘍転移との関わりについては全く研究されていない。そこで酸化 LDL 受容体と S100A8-血清アミロイド A3-TLR4 シグナリングがどのように相互作用しているかを明らかにする研究計画を立案するに至った。

2. 研究の目的

酸化 LDL 受容体とがん転移との関係性について転移アッセイによって調べる。S100A8、血清アミロイド A3、酸化 LDL 受容体、TLR4/MD-2 複合体を精製し、それぞれの結合および細胞内情報伝達について調べる。

3. 研究の方法

高転移株 (3LL) を用いた転移アッセイ
高転移株 (3LL) を 2mm 角のブロック状に切ったものをマウス背部皮下に移植する。1-3 週後に採血および気管支肺胞洗浄液を採取した後、肺を取り出し、(A) コラゲナーゼ処理により肺から細胞を抽出し、フローサイトメトリーによる CD11b 陽性細胞の計測 (B) タンパク質抽出液中 (50mM HEPES, pH 7.9, 0.15M NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% sodium cholate) でホモジナイズし遠心分離後上清を得る (C) 凍結切片を作成し、HE 染色像から転移した腫瘍の数を計測、を行った。血清、気管支肺胞洗浄液、組織抽出液中の TNF α 、S100A8、SAA3 を ELISA 法により定量した。

組み換えタンパク質の発現系の構築と精製

実験に用いる試料のうち、TLR4/MD-2 複合体はエンドトキシンの受容体であるため、エンドトキシンの混入を避けるために、大腸菌での発現系を用いないタンパク質発現・精製システムの構築が必要である。酸化 LDL 受容体

と TLR4 については、細胞外ドメインのみを発現させたものを精製した。酸化 LDL 受容体は HEK293T 細胞で過剰発現させたものから His タグを利用して精製したものが共同研究者より供与されたので、それを用いることとした。TLR4/MD-2 複合体は昆虫細胞で過剰発現させたものからプロテイン A のタグを利用して精製したものをを用いた。S100A8 と血清アミロイド A3 については、HEK293T 細胞で過剰発現させたものより FLAG タグを利用して精製したが、収量が他のタンパク質よりも大幅に低かった。

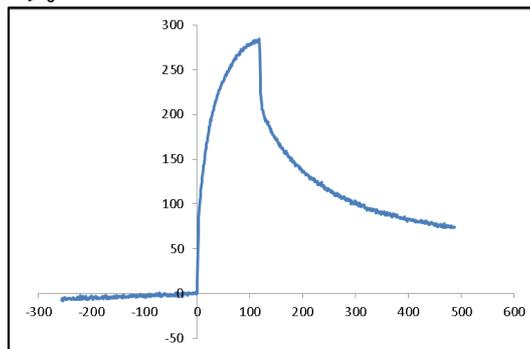
4. 研究成果

担がんモデルマウスとコントロールマウスの肺から、血清、気管支肺胞洗浄液、組織抽出液を採取し、S100A8、血清アミロイド A3、TNF α を計測した結果をまとめると、担がん状態で S100A8、血清アミロイド A3 が増加していることが明らかとなったが、このうち S100A8 は血清だけに見られた。血清アミロイド A3 は血清だけでなく、組織抽出液にも気管支肺胞洗浄液にも見られた。一方 TNF α は血清中には見られず、組織抽出液および気管支肺胞洗浄液中に見られたが、担がん状態による上昇は見られなかった。S100A8 は血管内皮細胞や好中球のような血球成分に局限した発現分布を示すのに対し、血清アミロイド A3 や TNF α は肺胞上皮細胞でも発現が見られるためであると考えられる。

次に酸化 LDL ノックアウトマウスおよびコントロール野生型マウスに 3LL 細胞を移植し肺へのがん転移を観測したところ、酸化 LDL 受容体ノックアウトマウスでは転移の数が減少していることが観測された。しかしながらこの減少は、他のノックアウトマウスでの結果で見られるほどではない。担がんマウスに蛍光ラベルした LLC 細胞を尾静脈より注入して肺への集積をみるアッセイでもこのアッセイと同様の結果が得られた。これらの実験結果に詳細については、学術論文にまとめて報告するつもりである。

組み換えタンパク質を用いた研究では S100A8 および血清アミロイド A3 を昆虫細胞および動物細胞で過剰発現させたものを調製することができた。昆虫細胞で発現させた TLR4/MD-2 と血清アミロイド A3 のプルダウンアッセイ (MD-2 にプロテイン A のタグがついており IgG セファロースでプルダウンを行い、血清アミロイド A3 の C 末端に付加した FLAG タグをウェスタンブロットにより検出した) で TLR4/MD-2 複合体と血清アミロイド A3 との結合を示した。この結合は TLR4 を加えない系でも同様に観測された。すなわち血清アミロイド A3 は MD-2 と結合していると考えられる。さらに血清アミロイド A3 の N 端側のシグナルペプチドに相当するアミノ酸残基と C 末端側を除いた 67mer の合成ペプチドを新たに用意し、これをアナライトとして

TLR4/MD-2 または MD-2 を固定した基板上に流し表面共鳴プラズモンを観測することによりそれぞれの場合の結合定数を求めた。酸化 LDL 受容体を基板上に固定した場合、この合成ペプチドの添加によるセンサーグラムの変化は観測されなかったが、別のバリエーション由来の合成ペプチドをアナライトとして用いた場合には結合に由来する変化が観測された。結果の一例を下図に示す。図中で横軸は時間 (s) を縦軸はレスポンス (RU) を示す。



この結果に関しては、現在学術論文に投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. Ieguchi K., Omori T., Komatsu A., TOMITA T., Deguchi A., Maru Y.; Ephrin-A1 expression induced by S100A8 is mediated by the toll-like receptor 4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 440, 623-629 (2013)
2. Deguchi A., TOMITA T., Omori T., Komatsu A., Ohto U., Takahashi S., Tanimura N., Akashi-Takamura S., Miyake K., Maru Y.; Serum amyloid A3 binds MD-2 to activate p38 and NF- κ B pathways in a MyD88-dependent manner. *J. Immunol.* 191, 1856-1864 (2013)
3. Ieguchi K., TOMITA T., Omori T., Komatsu A., Deguchi A., Masuda J., Duffy S., Coulthard M., Boyd A., Maru Y.; ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene* in press (2014)
4. Hiratsuka S., Ishibashi S., TOMITA T., Watanabe A., Akashi-Takamura S., Murakami M., Kijima H., Miyake K., Aburatani H., Maru Y.; Primary tumours modulate innate immune signalling to create pre-metastatic vascular hyperpermeability foci. *Nat. Commun.* 4:1853 (2013)

〔学会発表〕(計 4 件)

Tomita T. “Imbalance of Clara-cell mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis” 第 13 回 TNF 国際会議・2011 年 5 月 15-18 日・淡路市

富田 毅、丸 義朗 “lung metastasis and homeostatic inflammation mediated by lung epithelial cells” 第 70 回日本癌学会学術総会・2011 年 10 月 3-5 日・名古屋

富田 毅、平塚 佐千枝、丸 義朗 “肺転移での転移前土壌形成における自然免疫の役割” 第 72 回日本癌学会学術総会・2013 年 10 月 3-5 日・横浜

家口 勝昭、富田 毅、丸 義朗 “肺転移における ephrin-A1 と ADAM12 の機能解析” 第 72 回日本癌学会学術総会・2013 年 10 月 3-5 日・横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 毅 (TOMITA Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242