

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06842

研究課題名(和文) 転移前肝微小環境形成による転移促進の分子機序

研究課題名(英文) Premetastatic niche enhances liver metastasis

研究代表者

出口 敦子 (DEGUCHI, ATSUKO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：10422932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの進展に伴い、がん周辺部には炎症に惹起された微小環境が形成され、がん悪性化に関与することが見いだされている。また、がんが転移する前の段階において、転移能を有するがん細胞は将来の転移先となる遠隔臓器の転移前微小環境を形成することが示唆され、本研究では、転移性がんに対する新たな治療戦略の展開を目指し、大腸がん肝転移における転移前微小環境形成の分子機序を解明することを目的とする。同定した転移前肝微小環境形成因子とS100A8による転移促進の分子機序を解析した。さらに、抗S100A8中和抗体は肝転移を抑制したことから、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が示唆された。

研究成果の概要(英文)：During tumor progression, inflammatory signaling develops tumor microenvironment. Similarly, metastatic tumors can prepare a premetastatic niche at their favorable organs. To establish novel therapeutic strategy against liver metastasis, we investigated the mechanism(s) by which hepatic premetastatic niche factor enhance cancer metastasis. We also examined the effect of S100A8 on liver metastasis in mouse models, and found that S100A8 played a role in liver metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肝転移 微小環境 大腸がん S100A8

1. 研究開始当初の背景

がんによる死亡は主に遠隔臓器への転移によるものであり、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早期予測マーカーの確立や予防法、治療法の開発が望まれている。

がんが進展する過程には、がん細胞自身における遺伝子レベルで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。がん微小環境下に存在する免疫担当細胞は骨髄から動員された免疫抑制細胞を含み、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 *et al.*, *Nat Cell Biol.* 2006, 2008)。

転移前肺微小環境とは、がんが原発巣にとどまっている段階において、液性因子を介し将来の転移先となる臓器に、がん細胞にとって生着しやすくするための環境である。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 Toll 様受容体 4 (TLR4) 内因性リガンドとして働き、血管透過性を亢進させ、がんの肺転移を促進する。さらに、SAA3 は TLR4/MD-2 複合体のうち、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 が肺転移に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 TLR を発現している細胞が主に含まれており、正常な肝臓における感染に対する防御反応として働いている。しかしながら、大腸がんが肝転移する場合でも、肺に存在する転移前微小環境と類似した環境が形成されるかについては、全くわかっていない。

2. 研究の目的

転移性がんに対する有効な治療法や早期予測バイオマーカーを確立するため、今までに同定した肝臓における転移前微小環境形成因子による肝転移促進の分子機序を解明することを目的とする。さらに、肺転移の転移前微小環境形成に関わる因子の一つとして同定した S100A8 の作用機序を明らかにし、肝転移に対しても S100A8 が関与する可能性について、抗 S100A8 抗体を用いて検証する。

3. 研究の方法

(1) S100A8 リコンビナントタンパク質の精製

マウス S100A8 遺伝子は大腸菌発現ベクター pGEX-6P-1 (GE Healthcare) に組み入れたものを 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) 処理することにより、タグ無し S100A8 を大量精製した。また、細胞培養系において、S100A8 の作用を検証するため、テトラサイクリン誘導型 S100A8 高発現細胞由来の S100A8 を精製した。リムルステスト (WAKO) により、精製したタンパク質のエンドトキシンレベルの測定を行い、エンドトキシンレベルが 0.001EU/μg 未満のタンパク質を細胞培養系の実験に使用した。

(2) S100A8 中和抗体の作出

大腸菌由来 S100A8 タンパク質 (His タグマウス S100A8) と完全フロイントアジュバンドのエマルジョンを作成し、日本白色種 JLA:JW 2 羽の背部皮下に接種し、追加免疫後採取した抗血清から S100A8 ポリクローナル抗体を作出した。得られた抗体を S100A8 による走化性アッセイやレポーター細胞を用いて、得られた抗体の中和活性を評価した。

(3) S100A8 と TLR4/MD-2 の結合実験

ELISA プレート (Greiner) に高純度 TLR4/MD-2 タンパク質を固相し、Protein Free Blocking Buffer (Thermo Fisher) によりブロッキング後、様々な濃度の S100A8 リコンビナントタンパク質を反応させた。結合した S100A8 量を抗 S100A8 抗体により定量化した。また、S100A8 由来ペプチドの固相にはペプチド用固相化プレートを用い、TLR4/MD-2 リコンビナントタンパク質と反応させ、抗 TLR4 抗体により S100A8 に結合した TLR4/MD-2 量を定量化した。

(4) 骨髄由来抑制性細胞の解析

担がんマウスから腫瘍塊、肺や肝臓を採取し、コラゲナーゼ・デスパーゼ系消化液にて細胞懸濁液を得た。得られた細胞を抗 CD11b, Ly6C, Ly6G や F4/80 抗体を用いて染色を行い、骨髄由来免疫抑制性細胞 (myeloid-derived suppressor cells; MDSC) や腫瘍随伴マクロファージをフローサイトメーター (ベックマンコールター; FC500) にて解析を行った。さらに末梢血は溶血した後、上記抗体を用いて染色し解析を行った。

(5) 転移前肝微小環境形成因子による転移促進作用の検証

転移前肝微小環境形成因子を野生型マウスに投与後、門脈経由又は尾静脈経由にて蛍光標識した大腸がん細胞を移植した。マウスを採材後、肝臓や肺へのがん細胞の生着をフローサイトメーターにより検証した。

4. 研究成果

(1) S100A8 による TLR4 依存性シグナル伝達 転移前微小環境の組織特異性を検証するため、まず、肺における転移前微小環境とし

て今までに同定した S100 ファミリーの S100A8 の Toll 様受容体 4 依存性転移前微小環境形成の分子機序を検証した。

① S100A8 と TLR4/MD-2 複合体との結合領域の特定

S100A8 の TLR4/MD-2 との結合に必要な部位を特定するために、まずマウス S100A8 アミノ酸配列を三等分割したペプチドを合成し、全長同様に ELISA 法により S100A8 と TLR4/MD-2 の結合を検証したところ、S100A8 のカルボキシル末端側が TLR4/MD-2 との結合に重要であることを見いだした(Deguchi, *et. al. Oncogene* 2016)。

② S100A8 による TLR4 シグナル経路の活性化

また、野生型マウスから採取した腹腔マクロファージを S100A8 にて刺激すると、TNF、IL-6、CCL2 といった炎症性サイトカインやケモカインの発現が誘導されるが、TLR4、MD-2 や MyD88 遺伝子欠失マウスから得られた腹腔マクロファージでは発現上昇が誘導されないことから、S100A8 によるこれらの因子の産生は TLR4 経路依存的であることが示唆された(Deguchi, *et. al. Oncogene* 2016)。

(2) S100A8 によるがん進展の分子機序

① 抗 S100A8 抗体による腫瘍進展の抑制

S100A8 の腫瘍進展に与える影響を検討するため、TLR4 発現マウス肺がん細胞株 LLC 細胞をマウス背部皮下に移植した後、抗 S100A8 抗体を投与した。投与後一定期間後に担がんマウスより腫瘍、肺、末梢血を採材した。その結果、抗 S100A8 抗体投与により皮下腫瘍の増殖が抑制されていた。また、抗 S100A8 抗体を投与したマウスの肺や腫瘍内における CD11b+Ly6C+Ly6G-細胞(単球系 MDSC)や CD11b+Ly6C+Ly6G+細胞(好中球系 MDSC)の動員がコントロール IgG を投与した対照群マウスと比較して減少していた。さらに、TLR4 阻害は腫瘍内の腫瘍血新生を顕著に抑制した。従って、S100A8 は骨髄由来免疫抑制細胞の骨髄からの動員や腫瘍随伴マクロファージの機能を TLR4 依存的に促進し、転移前肺微小環境形成と腫瘍内における腫瘍血管新生を亢進することにより、腫瘍の進展を促進することが示唆された(Deguchi *et al.*, *Oncogene*, 2016)。

② がん細胞における TLR4 発現の意義

担がんマウスにおいて、抗 S100A8 抗体投与により皮下腫瘍の進展が抑制されたことから、S100A8 は転移前微小環境形成だけでなく、がん細胞自身が発現する TLR4 が腫瘍進展に関与する可能性が示唆された。この可能性を検証するために、TLR4 を shRNA 発現ベクターによりノックダウンしたマウス肺がん細胞株を樹立し、皮下移植を行った。また、比較対照細胞として、コントロール

shRNA を導入した細胞株(コントロール細胞)を用いた。その結果、皮下移植した TLR4 ノックダウンがん細胞の増殖はコントロール細胞と比較して遅延していることを見いだした。特筆すべきことに、TLR4 リガンドフリーのプレート培養では、TLR4 ノックダウン細胞とコントロール細胞の増殖に差がないことから、がん細胞に発現する TLR4 は、がん微小環境下において存在する S100A8 など TLR4 リガンドを介して腫瘍の増殖を促進する可能性が示唆された(Deguchi, *et. al. Oncogene* 2016)。がんに進展における S100A8 の作用点を図 1 に示す。

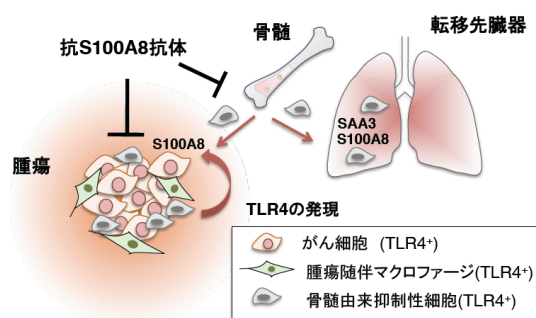


図 1. S100A8 による TLR4 依存性がん進展促進の機序

(3) S100A8 中和抗体投与による肝転移モデルに与える影響

TLR4 内因性リガンド S100A8 は当初肺における転移前微小環境形成因子として同定したが、転移前肝臓でも発現の上昇が認められること、またエンドトキシンフリーグレード S100A8 リコンビナントタンパク質投与により骨髄由来抑制性細胞の動員が肝臓においても引き起こされることから(論文投稿準備中)、作出した抗 S100A8 抗体を用いて、肝転移に与える S100A8 の作用を検討した。その結果、肺転移だけでなく、S100A8 はマウス肝転移にも関与することが示唆された(未発表データ)。

(4) 転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスの作出

転移前肝微小環境形成因子による転移促進への必要性を検証するために、転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスを作製した。まず、候補 guideRNA を設計し pX330 ベクター(Addgene)に候補配列を導入した。候補配列の切断認識活性を検証するために、C57BL6J マウスゲノムから候補 guideRNA 近傍の約 500bp を pCAG-EGxxFP (Addgene)に導入した。HEK293T 細胞にこれら遺伝子を導入し、GFP の蛍光により切断効率を検証した。切断効率の良い候補配列を選出し、転移前肝微小環境形成因子遺伝子欠失マウスの作出を行った。

(5) 転移前肝微小環境因子による転移促進作用

転移前肝微小環境因子リコンビナントタンパク質を野生型マウスに投与し、蛍光標識した細胞を移植したマウスを採材後、フローサイトメトリーにてがん細胞が肝臓や肺に生着するかを検証した結果、肝臓へのがん細胞の生着が有意に上昇することを見いだした(論文投稿準備中)。現在、引き続き、転移前肝微小環境因子による転移促進の詳細な分子機序やS100A8と肝転移との関連性についてさらなる解析を進めている。

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3件)

(1) Deguchi A, and Maru Y. Dickkopf-1 helps metastasis by immune evasion. *Transl Cancer Res* **6**,S1422-1424, 2017 (査読有)

doi:10.21037/tcr.2017.10.43

(2) Deguchi A, Tomita T, Ohto U, Takemura K, Kitao A, Akashi-Takamura, S, Miyake K, and Maru Y. Eritoran inhibits S100A8-mediated TLR4/MD-2 activation and tumor growth by changing the immune microenvironment. *Oncogene* **35**,1445-1456, 2016 (査読有)

doi:10.1038/onc.2015.211

(3) Imai Y, Ohta E, Takeda S, Sunamura S, Ishibashi M, Tamura H, Wang Y, Deguchi A, Tanaka J, Maru Y, and Motoji T. Histone deacetylase inhibitor panobinostat induces calcineurin degradation in multiple myeloma. *JCI Insight* **1**, e85061, 2016. (査読有)

doi:10.1172/jci.insight.85061

[学会発表] (計3件)

(1) 出口 敦子, 丸 義朗. 転移前ニッチ形成を標的とした新規がん治療への展開. 第357回東京女子医科大学学会例会, 平成30年2月, 東京女子医科大学(東京・新宿)

(2) 出口 敦子, 大島 浩子, 大島 正伸, 丸 義朗. 胃がん進展におけるToll様受容体内因性リガンドの作用. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 平成29年10月, 金沢東急ホテル(石川・金沢)

(3) 出口 敦子, 大島 浩子, 大島 正伸, 丸 義朗. 胃がん増悪化におけるToll様受容体内因性リガンドの関与. 金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 平成29年2月, 金沢東急ホテル(石川・金沢)

[図書] (計1件)

(1) Tomita T, Deguchi A, and Maru Y. Metastatic cancer stem cell niche and TLR4-mediated premetastatic microenvironment. *Cancer Metastasis and Cancer Stem Cell/niche*. Bentham Science Publisher, 74-108, 2016 (査読有;部分執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等
東京女子医科大学薬理学教室ホームページ
<http://www.twmu.ac.jp/Basic/yakuri/>

日本経済新聞平成27年7月20日掲載

6. 研究組織

(1) 研究代表者

出口 敦子 (DEGUCHI, Atsuko)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 10422932

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()