

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 17 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14382

研究課題名(和文) がんの転移先臓器親和性を制御する新規生物製剤の開発

研究課題名(英文) exSSSRs-Fc fusion decoys prevent S100A8/A9-mediated cancer metastasis.

研究代表者

阪口 政清 (Sakaguchi, Masakiyo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70379840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：S100A8/A9を吸着し、がん細胞に作用させないデコイタンパク質製剤(受容体細胞外領域(exReceptors)とIgGのFc領域との融合キメラタンパク質)(exEMMPRIN-Fc, exNPTN-Fc, exMCAM-Fc)のCHO細胞による大量調製系を確立した。これらデコイタンパク質の効能を動物転移モデルで検討したところ、メラノーマの肺転移性の顕著な減少が認められた。

研究成果の概要(英文)：It has been compiled growing mass of evidence that S100A8/A9 as a soil signal has significant role in cancer organ specific metastasis through the binding with diverse receptors such as TLR4 and RAGE, as soil sensors. In addition to them, we further succeeded to identify another important receptors, EMMPRIN, NPTN; and MCAM. Hence, these novel molecules might become promising therapeutic targets. In this study, we prepared the extracellular regions of these molecules fused to the IgG-Fc for aiming longer half-life extension and evaluated the anti-metastatic effects of purified proteins on metastatic melanoma cells. The purified proteins suppressed markedly the S100A8/A9-mediated up-regulation of cancer cell metastasis via capturing the exogenous S100A8/A9. We therefore suggest that the developed biologics comes into a valuable appliance to regulate a "seed and soil" tumor metastasis.

研究分野：腫瘍生物学、分子細胞生物学

キーワード：炎症 がん 転移 S100A8/A9 S100A8/A9受容体

1. 研究開始当初の背景

「分泌性 S100A8/A9 タンパク質」と「その受容体」の関係が、がん細胞の肺への遠隔転移に非常に重要であることがわかってきている。EMMPRIN、NPTN、MCAM は、代表者らが独自に見出した新規 S100A8/A9 受容体である。メラノーマをはじめとする多種多様な高転移性のがん細胞で高い発現を示す。S100A8/A9 は、メラノーマを認知した遠隔の肺から過剰に産生分泌され、メラノーマの肺転移を誘導するが、メラノーマにおける EMMPRIN、NPTN、MCAM の機能を阻害すると (EMMPRIN、NPTN、MCAM の細胞質領域を欠失したドミナントネガティブ体をメラノーマに強制発現)、メラノーマは、肺への遠隔転移が全く起こらなくなったのである。このことから、これら受容体は、がん転移の分子標的となるものと考えた。

2. 研究の目的

本計画では、S100A8/A9 を吸着し、がん細胞に作用させないデコイタンパク質製剤 {受容体細胞外領域 (exReceptors) と IgG の Fc 領域との融合キメラタンパク質} の開発を提案した。EMMPRIN、NPTN、MCAM の細胞外領域を利用したデコイタンパク質の CHO 細胞による大量調製系の確立と効能評価を目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞：本研究に使用した細胞は次の通りである。チャイニーズハムスター卵母細胞 (CHO)、マウスメラノーマ細胞株 (B16-BL6)。これらの細胞は、10% FBS を含有する DMEM/F12 培地にて培養した。

(2) 哺乳動物発現コンストラクト：独自に開発した超高効率遺伝子一過性発現プラスミドベクター pIDT-SMART (C-TSC) (Mol Biotech 2014) を安定発現用に改良し、EMMPRIN、NPTN、MCAM の各細胞外領域-Fc 融合遺伝子を当改良ベクターに挿入した。

(3) プラスミドベクターの細胞内導入：高純度精製発現コンストラクトの CHO 細胞へのトランスフェクションは、エレクトロポレーション法により行った。

(4) 細胞走化性アッセイ：ポイデンチャンパー法にて行った。細胞透過膜には、8 μm のポアが形成されている。膜下層の培養液には、S100A8/A9 をそれぞれ 100 ng/mL になるように添加した。評価は、細胞 (5000 cells/insert) を播いて 48 時間後に行った。

(5) 動物実験：メラノーマ細胞株 (1 x 10⁶ cells in 0.25 mL/mouse) をマウスの尾静脈に注入し、2 週間後にマウス肺への転移の検討を行った。

4. 研究成果

(1) exEMMPRIN-Fc, exNPTN-Fc, exMCAM-Fc の CHO 安定発現クローンの作成に成功した。クローンは、セルソーティング後の各細胞クローンの培養上清を用いた発現タンパク質

ELISA check、そして、SDS-PAGE による CBB 染色 check から発現の特に顕著なものを選択した。

(2) これらクローンから高純度大量精製したデコイタンパク質はいずれも、S100A8/A9 結合能、メラノーマの走化、浸潤能の抑制に非常に優れていることが明らかとなった。

(3) 動物転移モデル (マウスのメラノーマ尾静脈投与による肺転移モデル) で、これらデコイタンパク質の効能を検討したところ、exEMMPRIN-Fc, exNPTN-Fc, exMCAM-Fc は、メラノーマの肺転移を顕著に抑制した。

以上、当計画から、EMMPRIN、NPTN、MCAM は、その発現が上昇しているがん種においては、治療の有効な分子標的となりうる可能性が示された。

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 18 件)

Putranto EW, Kinoshita R, Watanabe M, Sadahira T, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Kataoka K, Inoue Y, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Kubo M, Sakaguchi Y, Saito K, Nasu Y, Kumon H, Huh NH, Sakaguchi M. Expression of tumor suppressor REIC/Dkk-3 by a newly improved adenovirus vector with insertion of an hTERT promoter at the 3'-side of the transgene, *Oncol Lett*. 2017. (in press) 査読有

Sakaguchi M, Sadahira T, Ueki H, Kinoshita R, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Nasu Y, Ochiai K, Kumon H, Huh NH, Watanabe M. Robust cancer-specific gene expression by a novel cassette with hTERT and CMV promoter elements, *Oncol Rep*. 2017. (in press) 査読有

Saho S, Satoh H, Kondo E, Inoue Y, Yamauchi A, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Ruma IM, Sumardika IW, Youyi C, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Tomida S, Sakaguchi Y, Saito K, Iioka H, Huh NH, Toyooka S, Sakaguchi M. Active Secretion of Dimerized S100A11 Induced by the Peroxisome in Mesothelioma Cells, *Cancer Microenviron*. 9, 93-105, doi: 10.1007/s12307-016-0185-2. 2016. 査読有

Ohtsuka T, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tomida S, Takata K, Shien K, Hashida S, Miyata-Takata T, Watanabe M, Suzawa K, Soh J, Youyi C, Sato H, Namba K, Torige H, Tsukuda K, Yoshino T, Miyoshi S, Toyooka S. Interaction of cytokeratin

19 head domain and HER2 in the cytoplasm leads to activation of HER2-Erk pathway, *Sci Rep.* 6:39557. doi: 10.1038/srep39557. 2016. 査読有

Sakaguchi M, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, Murata H, Kinoshita R, Ruma IM, Putranto EW, Inoue Y, Morizane S, Huh NH, Tsuboi R, Hibino T. Identification of an S100A8 receptor neuroplastin- and its heterodimer formation with EMMPRIN, *J Invest Dermatol.* 136: 2240-2250, doi: 10.1016/j.jid.2016.06.617. 2016. 査読有

Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, Huang P, Kinoshita R, Futami J, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Yamamoto KI, Nasu Y, Nishibori M, Hibino T, Sakaguchi M. MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- B and ROS formation upon ligand binding, *Clin Exp Metastasis.* 33: 609-627, doi:10.1007/s10585-016-9801-2. 2016. 査読有

Wake H, Mori S, Liu K, Morioka Y, Teshigawara K, Sakaguchi M, Kuroda K, Gao Y, Takahashi H, Ohtsuka A, Yoshino T, Morimatsu H, Nishibori M. Histidine-Rich Glycoprotein Prevents Septic Lethality through Regulation of Immunothrombosis and Inflammation, *EBioMedicine.* 9: 180-194, doi: 10.1016/j.ebiom. 2016. 査読有

Ichiki T, Koga T, Okuno T, Saeki K, Yamamoto Y, Yamamoto H, Sakaguchi M, Yokomizo T. Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products (RAGE), *FASEB J.* 30: 1811-1822, doi: 10.1096/fj.201500117. 2016. 査読有

Futami J, Atago Y, Azuma A, Putranto EW, Kinoshita R, Murata H, Sakaguchi M. An efficient method for the preparation of preferentially heterodimerized recombinant S100A8/A9 coexpressed in *Escherichia coli*, *Biochem Biophys Rep.* 6: 94-100, http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&ArticleListID=-1181512265&_sort=r&_st=13&view=c&md5=c509cf756717bf2426203c2540d30800&searchtype=a 2016. 査読有

〔学会発表〕(計 20 件)

Rie Kinoshita, Development of a novel biologics for suppression of S100A8/A9-induced cancer metastasis 癌転移抑制を目指した新規タンパク質製剤の開発. 第75回日本癌学会学術総会. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市).

Toshihiko Hibino, S100A8 promoted Th1-related gene expression and S100A9 induced Th2 differentiation via activation of GATA-3. 日本研究皮膚科学会 第40回年次学術大会・総会. 2015年12月11日、岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市).

〔図書〕(計 2 件)

阪口政清、木下理恵、村田 等、山本健一、許南浩、日比野利彦 他、ニューサイエンス社、月刊「細胞」(2017年3月号)、2017、39-42

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 遺伝子発現用カセット及びその産生物
発明者: 阪口 政清、西堀 正洋、村田 等、山本 健一、木下 理恵
権利者: 国立大学法人 岡山大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2016/79219
出願年月日: 2016年10月3日
国内外の別: 外国

取得状況(計 1 件)

名称: 好中球活性化に起因する疾患の治療薬、治療方法及び検査方法
発明者: 西堀正洋、森秀治、和氣秀徳、高橋英夫、劉克約、勅使川原匡、阪口政清
権利者: 国立大学法人 岡山大学
種類: 特許
番号: 9504731
取得年月日: 2016年11月29日
国内外の別: 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪口 政清 (SAKAGUCHI Masakiyo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 70379840

(2) 研究分担者

村田 等 (MURATA Hitoshi)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号: 90579096

(3)研究分担者

豊岡 伸一 (TOYOOKA Shinichi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授

研究者番号： 30397880