

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501321

研究課題名(和文) Toll様受容体を介した肝特異的転移前微小環境の構築

研究課題名(英文) Toll-like receptor-mediated hepatic premetastatic microenvironment

## 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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんが転移する場合には、あらかじめ転移先臓器に、転移前微小環境を形成する可能性が示唆されている。大腸がんの場合には、主に肝臓優位に転移することが知られているが、分子機序は不明である。肝臓特異的な転移前微小環境形成の分子機序を解明するために、担癌マウスの転移前フェーズにおける肝臓から抽出したRNAを用いてマイクロアレイ解析を行った。顕著に発現が上昇する遺伝子群の中から、ケモカイン様タンパク質に注目し、TLR依存性の転移前肝微小環境の形成について解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Primary tumor developed a pre-metastatic niche in distant organs such as liver, lung, or lymph node. In the case of colorectal cancer, liver is one of favorable organs for distant metastasis. To identify molecules that play an important role in development of hepatic premetastatic niche, we performed microarray analysis using RNA obtained from liver at premetastatic phase. Among these up-regulated genes, we have focused on a chemokine-like protein as a candidate for the establishment of premetastatic niche. We suggest that the molecule can function as a TLR ligand, and it plays a crucial role in the establishment of premetastatic niche in liver.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 肝転移 微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんは日本人の男女ともに増加傾向が著しいがんであり、がんによる死因の多くは、遠隔臓器への転移によって引き起こされる。そのため、転移がんの治療が臨床重要な課題となっているが、完治が望める化学療法は確立されていない。そのため、転移がんにおける早期予測や治療法の開発は急務である。がんの転移には、がん細胞自身における遺伝子上の変異とともに、がん周辺部に存在する炎症を伴った微小環境が関与していることが考えられている。大腸がんの主な転移先と考えられている肝臓には自然免疫の防御反応を担う Toll 様受容体 (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。所属する東京女子医科大学薬理学教室では、マウス肺癌 (LLC) 細胞を用いた同種移植肺転移マウスモデルを用いて、転移先となる肺においてがん細胞が転移する前から肺に存在するマクロファージや血管内皮細胞が NF- $\kappa$ B を介した免疫応答シグナル伝達系を介し、TLR4 のリガンドとなる S100A8 や血清アミロイドタンパク質 3 (SAA3) を誘導し、肺転移を促進することを見出し、転移前微小環境の存在を世界に先駆けて提唱した (Hiratsuka *et al.*, *Nat Cell Biol.* 2006, 2008)。しかしながら、肝転移する場合の転移前微小環境の形成についてはほとんどわかっていない。さらに、肝臓においても、肺微小環境形成の場合と同様に、SAA3-S100A8-TLR4 のシグナル伝達系が転移を促進するかについてはわかっていない。

大腸がんの肝転移の転移前微小環境形成の解析により、転移がんの分子機序を解明することは、転移がんに対する早期予測、新たな予防法や治療法の確立につながると考えられる。

## 2. 研究の目的

大腸がん転移に対する有効な治療標的因子を特定するために、大腸がん肝転移におけるケモカイン様分子を介した転移前微小環境の形成の分子機序を解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸がん同所移植モデルを用いた転移前肝微小環境形成に関わる候補因子の探索

ヒト大腸がん細胞株を蛍光標識した細胞を樹立し、この細胞を免疫不全マウスに麻酔下にて盲腸壁へ移植後、肝内に存在するがん細胞の数を経時的に qPCR 法や免疫組織学的に検証した。これらの解析により、まず、転移前フェーズを決定した。さらに、マウス大腸がん細胞を用いて同所移植肝転移マウスモデルを樹立し、同様に転移前フェーズを決定した。

大腸がん細胞移植をした担癌マウスより、転移前フェーズにおいて肝臓を採取した後、RNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析を行

った。このときの陰性対照として、がん細胞を移植していないマウス肝臓から RNA を調製したものを用いた。調製した RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行い、高転移株の担癌マウスにおいて転移前肝臓で発現の変化した遺伝子群の抽出を行った。また、転移を促進することが知られている未分化骨髄由来細胞の肝臓への動員は、anti-CD11b 抗体を用いて免疫組織学的染色を行った。

### (2) 血清アミロイド A3 の TLR4 結合領域の特定

以前、当該研究室において、転移前肺における転移前微小環境形成に関わる因子として、血清アミロイド A3 や S100A8 タンパク質を同定しているが、これら分子が TLR4 リガンドとして働く分子機序については明らかにされていない。本研究にて解析する肝微小環境との相違があるかを検証するため、SAA3 タンパク質の TLR4/MD-2 の活性化や TLR4/MD-2 結合様式を詳細に解析することとした。

#### ① SAA3 による p38 キナーゼ、NF- $\kappa$ B の活性化

TLR4 はリポ多糖の受容体であるため、大腸菌由来のタンパク質はエンドトキシンの混在により、擬陽性として TLR4/MD-2 シグナル経路の活性化を引き起こす可能性がある。この可能性を否定するために、合成ペプチドや培養細胞 (テトラサイクリン誘導型 SAA3 高発現 HEK293 細胞) 由来の高純度、エンドトキシンフリー SAA3 を作製した。SAA3 ペプチドまたはエンドトキシンフリー SAA3 にて RAW264.7 細胞を刺激し、経時的に p38 や NF- $\kappa$ B の活性化をウェスタンブロッティング法により解析を行った。

#### ② SAA3 断片を用いた TLR4/MD-2 結合部位の解析

結晶化グレード TLR4/MD-2、SAA3 ペプチド、点変異型 SAA3 ペプチドを表面プラズモン共鳴解析 (ProteON; Bio-rad) により解析を行った。この時、レセプターである TLR4/MD-2 を固相し、リガンドとして SAA3 ペプチドを濃度依存的に反応させた。SAA3 が TLR4/MD-2 コンプレックスのどちらに結合するかを検証するため、同様に高純度精製した MD-2 リコンビナントタンパク質を用いて検証した。

#### ③ 血清アミロイド A タンパク質による TLR4/MD-2 活性化の解析

マウスでは、血清アミロイド A タンパク質は SAA1、SAA2、SAA3、SAA4 が存在する。このうち、どの血清アミロイド A タンパク質が TLR4/MD-2 シグナル経路を活性化するかについて、TLR4/MD-2 感受性 NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼレポーター細胞を用いて、解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 大腸がん同所移植肝転移モデルマウスを用いた転移前肝微小環境の形成

###### ① 転移前肝微小環境の形成に関わる候補因子の同定

大腸がん細胞を移植した担がんマウスより、転移前フェーズにおいて肝臓を採取した後、RNA を調製し、DNA マイクロアレイ解析を行った。このときの陰性対照として、がん細胞を移植していないマウス肝臓から RNA を調製したものを用いた。調製した RNA を用いて、マイクロアレイ解析を行い、高転移がん細胞株を用いた担がんマウスにおいて、転移前肝臓で発現の変化した遺伝子群の抽出を行った。発現が顕著に上昇していた因子の中にはケモカイン様タンパク質などが含まれていた。特筆すべきことに、発現が顕著に変化した遺伝子群は、炎症に関わる遺伝子が多く含まれているものの、これまでに解析を行った肺転移前微小環境形成に関わる遺伝子群と相異なっており、肝臓に形成される転移前微小環境は肺の微小環境とは異なっており、転移先臓器を決定している可能性が示唆された。

###### ② 転移前肝臓の骨髄由来 CD11b 陽性細胞の集簇

転移を促進することが知られている未分化骨髄由来細胞の肝臓への動員は、anti-CD11b 抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、解析を行った。図 1 に示すように、転移前フェーズ（2 週目）の肝臓において、未分化骨髄由来細胞の動員が、正常マウス肝臓と比較して増加することを見いだした。

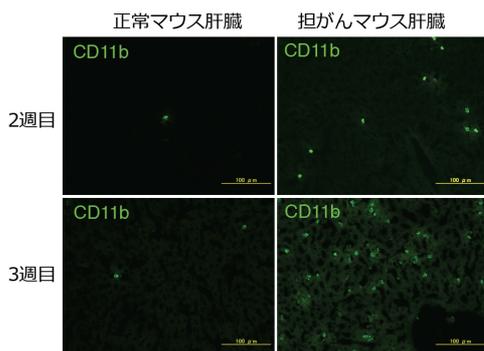


図 1 転移前肝臓において骨髄由来 CD11b 陽性細胞が集簇する

##### (2) ケモカイン様タンパク質による転移における影響

チャイニーズハムスター卵巣由来細胞 (CHO) 細胞に、ケモカイン様タンパク質をコードしたプラスミドを導入し、ハイグロマイシン耐性細胞を樹立した。リガンドを高発現した細胞上清より、ケモカイン様タンパク質を精製した。

リコンビナントタンパク質リコンビナン

トタンパク質を腹腔内に投与し、一週間後に門脈経路にて大腸がん細胞を移植したところ、肝臓への大腸がん細胞の生着が優位に認められた。一方、肺へのがん細胞の生着はケモカイン様タンパク質の投与の有無により影響を受けなかった。また、ケモカイン様タンパク質が TLR 依存性 NF- $\kappa$ B 活性を上昇させることを見いだした。これらの結果により、注目したケモカイン様タンパク質は、TLR シグナルを介して肝転移を促進する可能性を示唆した。

##### (3) ケモカイン様タンパク質に対する中和抗体の作出

転移前肝微小環境形成に関わる候補因子を *in vivo* で解析するには、遺伝子欠失マウスもしくは阻害剤、中和抗体が必要となる。大腸菌由来ケモカイン様分子リコンビナントタンパク質をウサギに感作し、ポロクロナル抗体を作製した。その結果、中和活性を有する抗体が得られた。この抗体は、免疫組織学的解析、ウェスタンブロッティング法に対しても使用可能であることがわかった。

##### (4) 血清アミロイド A3 を介した TLR4 活性化による転移前肺微小環境の形成

###### ① SAA3 による p38 キナーゼ、NF- $\kappa$ B の活性化

SAA3 ペプチドで RAW264.7 細胞を刺激すると、p38 キナーゼや NF- $\kappa$ B の活性が上昇することがわかった。同様の結果は野生型マウス腹腔マクロファージを SAA3 ペプチド刺激により得られたが、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を用いた場合では、p38 キナーゼや NF- $\kappa$ B の活性化は誘導されなかったことにより、SAA3 は TLR4/MD-2 を介して、p38 キナーゼや NF- $\kappa$ B の活性を制御していることが示唆された。

###### ② SAA3 断片を用いた TLR4/MD-2 結合部位の解析

SAA3 の TLR4/MD-2 に対する結合様式について解析を行った。SAA3 の TLR4/MD-2 活性化には、MD-2 が必須であり、SAA3 (43-57) 領域が TLR4/MD-2 との結合に関与していることを見いだした。また、SAA3 (43-57) ペプチドをマウスに尾静脈経路で投与すると、肺における CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>陽性細胞の集簇が亢進することを示唆した。転移前肺微小環境に関わる SAA3 の TLR4/MD-2 に対する結合領域を特定し、転移前微小環境における臓器決定能の検証のための新たな知見が得られた。

###### ③ 血清アミロイド A タンパク質による TLR4/MD-2 活性化の解析

TLR4/MD-2 感受性 NF- $\kappa$ B ルシフェラーゼレポーター細胞を、SAA1、SAA2、SAA3、SAA4 リコンビナントタンパク質にて刺激し、8 時間後のリポーター活性を測定したところ、血清

アミロイドAタンパク質のうち、SAA3が顕著にTLR4/MD-2の活性化を誘導することがわかった(図2)。この時、LPSを陽性コントロールとして用いた。これらの結果により、血清アミロイドAタンパク質は、急性炎症マーカーであるが、SAA3が、TLR4/MD-2の内因性リガンドとして働く可能性を示唆した。

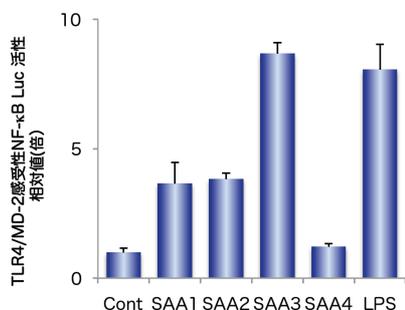


図2 マウス SAA3 は TLR4/MD-2 感受性 NF-κB 活性を上昇させる

## 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 6 件)

① 出口 敦子, 丸 義朗. がんの転移前ニッチ, 実験医学増刊「がん微小環境と標的治療」155-159, 2015 (部分執筆)

② Deguchi A. Curcumin targets in inflammation and cancer. *Endocrine Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, in press

③ Maru Y, Tomita T, Deguchi A., Ieguchi K, Takita M, Tsukahara F, Takemura K, Kitao A, and Gusovskysy F. Drug targeting based on a new concept-----Targeting against TLR4 as an example. *Endocrine Metabolic and Immune Disorders-Drug Targets*, in press

④ Ieguchi K, Tomita T, Omori T, Komatsu A, Deguchi A., Masuda J, Duffy SL, Coulthard MG, Boyd A, and Maru Y. ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene* **33**, 2179-2190, 2014  
doi: 10.1038/onc.2013.180.

⑤ Deguchi A., Tomita T, Omori T, Komatsu A, Ohto U, Takahashi S, Tanimura N, Akashi-Takamura S, Miyake K, and Maru Y. Serum amyloid A3 binds MD-2 to activate p38 and NF-κB pathways in a MyD88-dependent manner. *J Immunol.* **191**:1856-1864. 2013  
doi: 10.4049/jimmunol.1201996.

⑥ Ieguchi K, Omori T, Komatsu A, Tomita T, Deguchi A., and Maru Y. Ephrin-A1

expression induced by S100A8 is mediated by the toll-like receptor 4. *Biochem Biophys Res Commun.* **440**:623-629. 2013  
doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.119.

[学会発表] (計 3 件)

① Deguchi A., Tomita T, and Maru Y. Involvement of TLR4 endogenous ligands in premetastatic microenvironment. 第 73 回日本癌学会学術総会, 平成 26 年 9 月, パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)

② 出口 敦子, 大腸癌肝転移に伴う転移前肝微小環境の形成. 第 349 回東京女子医科大学学会例会, 平成 26 年 2 月 22 日, 東京女子医科大学 (東京・新宿)

③ Deguchi A., Tomita T, and Maru Y. Synthetic peptide of SAA3 activates TLR4 signaling. 第 71 回日本癌学会学術総会, 平成 24 年 9 月, ロイトン札幌 (北海道・札幌)

[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/paper.html>

新学術領域「自然炎症」ホームページ  
<http://shizen-enshow.jp>

## 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