

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2009～2013

課題番号：21117008

研究課題名(和文) 癌細胞の転移を制御する内因性リガンドと病原体センサーの役割

研究課題名(英文) Endogenous TLR4 ligands in tumor metastasis.

研究代表者

丸 義朗 (Maru, Yoshiro)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00251447

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 112,300,000円、(間接経費) 33,690,000円

研究成果の概要(和文)：TLR4の内因性リガンドとして(1)存在証明：SAA3ペプチドと受容体TLR4/MD-2の結合部位の決定。(2)ホメオスタシスへの寄与：SAA3発現クララ細胞の癌肺転移への影響。(3)癌以外の病態の解析：DNA結合タンパク質C1DはTLR9の新規内因性リガンド。慢性骨髄性白血病の分子標的薬耐性にTLR4が関与。(4)臨床応用への試み：低分子化合物セラストラマイシン結合タンパク質(mTOC)の同定。ヒトSAA3特異的抗体によるSAA3濃度測定。ADAM12の阻害剤(KB-R7785)と誘導体の転移実験。(5)ホメオスタシス解明の為に上記欠損マウスの樹立。の結果を得た。

研究成果の概要(英文)：We focused on five points (1)endogenous ligands for TLR4 (2)homeostasis inflammation (3)pathological condition (4)translational research, and (5)generation of knockout mice. We showed conclusion as below.

(1)We showed binding between TLR4/MD-2 and peptide SAA3 (20-86). Binding site of S100A8 was center domain of TLR4. (2)Bronchial Clara cells contribute to lung metastasis by amplifying SAA3. (3)We found that C1D, a DNA-binding protein, is a novel endogenous ligand for TLR9. We found that TLR4 signaling plays a role in resistance to BCR-ABL kinase inhibitor, imatinib, in Chronic myeloid leukemia. (4)We identified mTOC as a Cerastramycin binding protein. We created human SAA3 ELISA system to quantitate SAA3 protein in culture media. We are investigating whether KB-R7785, an ADAM12 inhibitor, effect on lung metastasis by reduction of cleaved form of ephrin-A1. (5)To examine the homeostasis inflammation related to S100A8 and SAA3, we are trying to establish knockout mouse system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：分科：基礎医学 細目：病態医化学

キーワード：TLR4 SAA3 S100A8 CCL2 ephrinA1 自然免疫 がん転移

### 1. 研究開始当初の背景

病原体センサーのプロトタイプである Toll 様受容体 (TLR) は、病原体成分ばかりでなく、自己由来内因性リガンドにも応答する可能性が示されている。特に組織破壊に伴って内因性リガンドが TLR を活性化することは知られており、Danger Signal という概念で理解されている。しかしながら、一般的な組織破壊とは異なる状況においても TLR が活性化されることがわかり始めており、本領域では、自然炎症という、Danger Signal よりさらに広い概念を提案している。

### 2. 研究の目的

本研究計画においては、癌細胞の転移における TLR、特に TLR4 の役割に焦点を絞って、解析を進めてゆく。我々はすでに、原発巣から肺への癌細胞の転移に、S100A8、血清アミロイド A3 (SAA3) という分子群が重要な役割を果たしていることを報告している (Nat. Cell Biol. 2006、2008)。これらのリガンドは TLR4/MD-2 に作用することで、癌細胞の転移を促進するが、まだ作用機序については不明な点が多い。そこで、これまでの解析結果を踏まえて、内因性リガンドと病態の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 転移予定臓器である肺の細胞を分画して単離し、種々の因子で刺激後の細胞や培養上清を解析する。cDNA マイクロアレイも利用し、パラクラインシステムの全体像を明らかにする。

(2) S100A8 および SAA3 のプロモータ領域を解析し、転写因子とその制御系を特定する。

(3) SAA3 をはじめとする遊走因子、TNF などの増殖因子、およびこれらの受容体、以上のノックアウトマウスと野性型マウスの間で相互に骨髄移植を施行し、この骨髄移植

マウスで転移実験を施行することによって、骨髄由来細胞と転移予定臓器それぞれにおけるこれら分子の役割を明らかにする。

(4) 本申請領域研究者が新規内因性リガンドを発見した場合、上記の(1)および(3)をこれに関して施行し、最終的に転移の生物系にかけてその意義を明らかにする。

(5) 精製した TLR4/MD-2 複合体と SAA3、S100A8 ないしこれら由来ペプチドの結晶構造解析を試みて結合様式を明らかにする。

(6) 総括班で抗 SAA3、抗 S100A8 モノクローナル抗体を作成し、転移成立前後の担癌マウス、臨床検体として癌患者由来の血清などを用いて、バイオマーカーとしての意義の有無を検討する。担癌マウスの系ではこの結果を踏まえて転移阻止における抗体治療その他の模索を行う。

(7) 上記の(1)および(3)の結果を参考にし、臓器特異的細胞集団で骨髄由来細胞と分泌分子の相互作用が可能なものを探索することで、臓器特異的転移機構を明らかにする。本実験は肺で最初に施行し、成功すれば脳、肝、腹腔なども転移系を樹立し実験を予定する。

### 4. 研究成果

TLR 4 の内因性リガンドとしてがん促進活性をもつ S100A8 と SAA3 を中心に、(1)存在証明、(2)ホメオスタシス(恒常性維持機能)への寄与、(3)癌以外の病態の解析、(4)臨床応用への試み、(5)ホメオスタシス解明の為の上記欠損マウスの樹立の5点を目標とし研究を行った。

(1) SAA3 とその受容体 TLR4/MD-2 の結合様式を SAA3 ペプチドを用いて調べ、

SAA3(20-86)は MD-2 に結合することが分かった。また東京大学分子細胞生物学研究所の北尾教授の協力により、S100A8 は TLR4 の中央ドメインと MD-2 に結合した状態が

最もエネルギー的に安定であることが分かった。

(2) 癌の肺転移を成立させる生体の反応については、SAA3 を発現する肺のクララ細胞が、癌肺転移に影響を与えていることを明らかにした。

(3) 他の内因性リガンドとして、DNA 結合タンパク質 C1D が TLR9 の新規内因性リガンドであることを見出した (投稿準備中)。また慢性骨髄性白血病において、原因蛋白 BCR-ABL の分子標的薬による抑制効果は、TLR4 刺激によって阻害されることを見出した (投稿準備中)。

(4) 計画班班員である東北大学薬学部・倉田祥一郎教授との共同研究で肺転移を抑制する低分子化合物セラストラマイシン結合タンパク質 (mTOC) を同定した (投稿中)。また SAA3 の遺伝子解析を行い、ヒト特異的配列に対し抗体を作成し、培養細胞上清での SAA3 濃度を測定した (投稿中)。担癌マウスの血清中の切断型 ephrin-A1 の上昇の発見により、ephrin-A1 の切断酵素である ADAM12 の阻害剤 (KB-R7785) と誘導体の転移抑制効果を検討中である。

(5) SAA3 と S100A8 の遺伝子欠損マウスを複製し、癌形成時の宿主側の炎症様変化の関与を解析中である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 17 件)

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, 33(17), 2179-2190, 2014

Hatakeyama T, Dai P, Harada Y, Hino H, Tsukahara F, Maru Y., Otsuji E, Takamatsu T.

Connexin43 Functions as a Novel Interacting Partner of Heat Shock Cognate Protein 70 .

Sci Rep. 3, 2179, 2013

Hiratsuka S, Ishibashi S, Tomita T, Watanabe A, Tamura 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

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 activates p38 and NF- $\kappa$ B pathway in a MyD88-dependent manner.

J Immunol. 2013, 191, 4, 2013, 1856-1864, 2013

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(4), 623-629, 2013

Maru Y.

Molecular biology of chronic myeloid leukemia.

Cancer Sci. 103, 9, 1601-1610, 2012

Maru Y.

Endogenous ligand-induced activation of TLR4 in Pre-metastatic phase is both downstream and upstream of TNF signaling. Adv Exp Med Biol. 691, 261-268, 2011

Hiratsuka S, Goel S, Kamoun WS, Maru Y, Fukumura D, Duda DG, Jain RK. Endothelial focal adhesion kinase mediates cancer cell homing to discrete regions of the lungs via E-selectin up-regulation. Proc Natl Acad Sci USA. 108, 3725-3730, 2011

Tomita T, Sakurai Y, Ishibashi S, Maru Y. Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. Oncogene. 30, 3429-3439, 2011

Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, Tai I, Shinmyozu K, Tsukahara F, Maru Y, Nakayama K, Nakayama KI, Suda T. p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. Cell Stem Cell 9, 247-261, 2011

Li G, Liu J, Abu-Asab M, Shibuya M, Maru Y. XPB induces C1D expression to counteract UV-induced apoptosis. Mol Cancer Res. 8, 885-895, 2010

Maru Y. Pre-metastatic milieu explained by TLR4 agonist-mediated homeostatic inflammation. Cell and Mol Immun. 7, 94-99, 2010

Tsukahara F, Maru Y. Bag1 directly routes immature BCR-ABL for proteasomal degradation.

Blood. 116, 3582-3592, 2010

Maru Y. The tumor suppressor LZTS2 functions through the cellular samurai Katanin. Cent Eur J Biol. 4, 1-10, 2009

Yamazaki T, Masuda J, Omori T, Usui R, Akiyama H, Maru Y. EphA1 interacts with integrin-linked kinase and regulates cell morphology and motility. J Cell Sci. 122, 243-255, 2009

Maru Y. Logical structures extracted from metastasis experiments. Cancer Sci. 100, 2006-2013, 2009

Maru Y. A Concept of Homeostatic Inflammation Provided by Endogenous TLR4 Agonists that Function Before and After Danger Signal for Metastasis. Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry. 8, 337-347, 2009

〔学会発表〕(計 47 件)

Maru Y: S100A8 amyloid A3 and TLR4 in tumor metastasis. 4th International Muenster Meeting on Danger Signaling in Autoinflammation, Muenster, Germany, 2012/04

その他 46 件

〔図書〕(計 16 件)

丸 義朗: がん転移先微小環境を「見直す」。細胞 8-11, ニューサイエンス社, 東京, 日本, 2012.4

その他 15 件

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

東京女子医科大学医学部 薬理学教室

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/yakuri/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

丸 義朗(Maru, Yoshiro)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号：00251447

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中村 佐千枝(Nakamura, Sachie)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60313087

塚原 富士子(Tsukahara, Fujiko)

東京女子医科大学・医学部・講師

研究者番号：40119996

富田 毅(Tomita, Takeshi)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：20302242

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

家口 勝昭(Ieguchi, Katsuaki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90586348

瀧田 守親(Takita, Morichika)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533455