

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09788

研究課題名(和文) S100A8/A9-Emmprin系を介したメラノーマの増殖転移制御に関する研究

研究課題名(英文) The role of S100A8/A9-Emmprin in the metastasis of melanoma cells.

研究代表者

坪井 良治 (TSUBOI, RYOJI)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70221421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：S100蛋白ファミリーのS100A8/A9に対してEmmprinとneuroplastin bは受容体である。Emmprin高発現メラノーマ細胞をS100A9Tgマウスの尾静脈から注入すると皮膚に転移巣を生じた。本研究ではC57/BL6マウスの皮膚にB16F10細胞を注射し、肺に転移するマウスモデルを確立した。しかし、S100A8/A9-Emmprinの結合を抑制する物質は発見できなかった。

研究成果の概要(英文)：The S100 protein family, especially S100A8 and S100A9, mediates the inflammatory reaction and is involved in the proliferation and metastasis of cancer cells. Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer) and neuroplastin b are S100A8/A9 receptors on the surface of keratinocytes. Immunohistological analysis of melanomas revealed that Emmprin was expressed at both the invasive edge of lesions and the adjacent skin. Tail vein-injected, highly Emmprin-expressing melanoma cells (SK-MEL2) metastasized to the skin of epidermis-specific S100A9 transgenic mice. In our recent study, a C57/BL6 mouse model of pulmonary metastasis from primary cutaneous melanoma (B16-F10 cells) was established to assess metastasis quantitatively by MRI. A model using S100A9 transgenic mice will be deployed to analyze metastasis of SK-MEL2 melanoma cells. ELISA screening failed to detect a molecule inhibiting the binding of S100A9 with recombinant Emmprin fixed on a plate.

研究分野：皮膚科学

キーワード：メラノーマ 転移 S100A8/9

1. 研究開始当初の背景

メラノーマ(malignant melanoma)はメラノサイト由来の悪性腫瘍で、日本人には多くないが近年増加傾向にある。悪性度が高く、化学療法も効きにくい。ほかの皮膚悪性腫瘍と比較して転移しやすい性質と免疫学的治療が有効なことから、浸潤・転移の研究モデルとして広く利用されている。また、化学療法の効きにくい悪性腫瘍であり、分子標的薬以外にも、さらに有効な治療法の開発が強く望まれている。

S100 蛋白ファミリーはカルシウム結合性蛋白で、20 種類以上からなるファミリーを形成している。そのなかでも S100A8 と S100A9 は生体内でヘテロダイマーを形成し、炎症性メディエーターとして慢性炎症性疾患や癌細胞において高発現している。様々な癌細胞を用いた転移実験から S100A8/A9 が転移の際の誘導物質として働いていることが示唆されている (Nat. Cell Biol. 2008)。

一方、Emmprin (extracellular matrix metalloproteinase inducer) は basigin (CD147) と呼ばれ、immunoglobulin superfamily に属し、種々のリガンドと結合する。Emmprin を高発現している癌は予後不良であることが知られている。また、悪性腫瘍においては MMP (metalloproteinase) を誘導することが知られている。

我々はこれまでに、S100A8/A9 が培養ケラチノサイトの増殖を促進し、炎症性サイトカインや S100A8/A9 を分泌するポジティブ・フィードバック機構を有することを報告した。その過程で S100A9 が正常皮膚には存在せず、浸潤したメラノーマの周囲皮膚に強く発現することを報告した(図、文献 6, Cancer Res 2013)。また、S100A9 に結合するタンパクを培養ケラチノサイトから分離精製し、LC/MC-MC 解析から Emmprin であることを同定した。さらに、浸潤メラノーマの先端に Emmprin が強く発現していることも確認した(図、Cancer Res 2013)。S100-Emmprin 相互作用による MMP 誘導は siEmmprin により有意に抑制された。さらに、Emmprin 高発現メラノーマ細胞を、皮膚特異的に S100A9 を過剰発現するトランスジェニック(Tg)マウスの尾静脈から注入すると皮膚転移することを確認した(Cancer Res 2013)。

2. 研究の目的

本研究では S100A8/A9-Emmprin 系がメラノーマの増殖・転移に強く関係していると

考えて、ヒト Emmprin 高発現メラノーマ細胞や dominant negative B16 クローン細胞を用いて、増殖・転移に及ぼす影響を種々の方法で定量的に解析する。これらを抑制する薬剤のスクリーニングを ELISA、培養細胞と S100A8/A9Tg マウスを用いた転移実験により実施し、メラノーマに対する新規抗がん剤の開発を目指す。

ヒト Emmprin 高発現メラノーマ細胞や dominant negative B16 クローン細胞を、Wild や S100A8、S100A9Tg マウスの尾静脈から注入して肺転移や皮膚転移を定量的に観察し、S100A8/A9-Emmprin 系の転移における役割を確認する。

ヒト Emmprin 高発現メラノーマ細胞や dominant negative B16 クローン細胞を用いて細胞内の情報伝達経路 (MAPK, NFkB) を解析し、さらに増殖抑制効果を示す薬剤のスクリーニングを行う。

S100A8/A9-Emmprin 系の結合を抑制する薬剤、つまり転移抑制薬のスクリーニングを ELISA、培養細胞と S100A9Tg マウスを用いた転移実験により行う。

3. 研究の方法

細胞：メラノーマ細胞として Emmprin 発現量の異なるヒトメラノーマ細胞株 (SK-MEL2[高発現], SK-MEL5[低発現]) (ATCC) と、Emmprin について dominant negative 効果をもつ B16 melanoma クローン株を使用する。

マウス：Involucrin をプロモーターとして表皮に特異的に S100A9 あるいは S100A8 を過剰発現させたトランスジェニック(Tg)マウスを資生堂リサーチセンターから供与を受け、当院の動物舎で継続飼育する。

ELISA: S100A9-Emmprin 結合阻害スクリーニングのために rS100A9 あるいは rEmmprin をプレートに固相化し、抗 S100A9 抗体や抗 Emmprin 抗体を使用した ELISA 系を作製する。この ELISA を用いて種々の試薬、薬剤、生薬などから S100A9-Emmprin の結合を阻害する候補物質を大規模スクリーニングし、活性の高いものを選別し、転移抑制薬としての可能性を検討する。まず、ヒトメラノーマ細胞(SK-MEL2)を rS100A9 固相化プレートに添加して、上記の候補物質の接着阻害能を確認する。

Emmprin 高発現メラノーマ細胞や dominant negative B16 クローン細胞 (Emmprin) を、Wild マウス、S100A8Tg マウス、S100A9Tg マウスの尾静脈から注入して肺

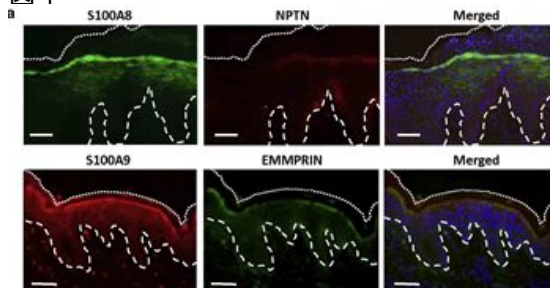
転移や皮膚転移を肉眼的に、また組織学的に（転移数と重量）定量解析して S100A8/A9-Emmprin 系の転移における役割と転移阻害物質の効果を確認する。

4. 研究成果

本実験の研究課程において、S100A8 の新規レセプターとして Emmprin と類似構造を持つ neuroplastin b(NPTN)を同定した。Emmprin と neuroplastin b は培養ケラチノサイトにおいてヘテロダイマーを形成した。それぞれの受容体のノックアウト細胞では増殖が抑制された。さらに細胞内のシグナル伝達についても検討して明らかにした。

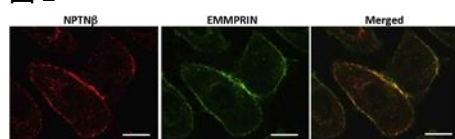
これらのことから正常ケラチノサイトの増殖に関与していることが判明し、悪性腫瘍細胞における働きも予測された（添付論文業績 4）。また、代表的な炎症性疾患であるアトピー性皮膚炎(AD)では S100A8 と S100A9 とともに、それらの受容体である Emmprin と NPTN が、正常皮膚では発現しておらず、AD などの炎症性疾患の表皮に発現していることが判明した（添付図 1）。

図 1



培養したケラチノサイトでは免疫組織染色において Emmprin と NPTN は細胞の膜に一致して co-localize していた。このことはこれら 2 つの受容体が heterodimer を構成していることを示唆した（図 2）。

図 2



当初の計画では、培養ヒトメラノーマ細胞(SK-MEL2)を用いた S100A9-Emmprin の結合阻害物質のスクリーニングや、Emmprin 発現量の異なるヒトメラノーマ細胞株の機能解析を予定していた。しかし、これらの実験よりも難易度の高い皮膚からの転移モデル

を確立することを優先させた。これまでの転移モデルは腫瘍細胞株を尾静脈に注射するものであり、腫瘍細胞が皮膚局所で脈管浸潤し、血流やリンパ流へと流入していく過程を解析できない欠点がある。

そこで、C57/BL6 マウスの耳介に B16F10 メラノーマ細胞を局所注射し、肺へ転移するマウスモデルを確立した（添付論文業績 1）。具体的には B16F10 細胞 1×10^6 個を片方の耳介に注射した。メラノーマの大きさが 8mm になったところで腫瘍と共に耳介を摘除した。細胞の注射から 9 週目に屠殺し、肺転移病変を病理組織学的に観察した。また同時に生きている状態で肺の MRI を撮影し、転移状況の推移が生きたまま観察できた。添付の図 3 は MRI と肉眼観察像、病理組織像を示す。表 1 にあるように 16 例について実験し、6 例について転移を認めた。MRI と肉眼観察像、病理組織像はよく相関していた。

図 3

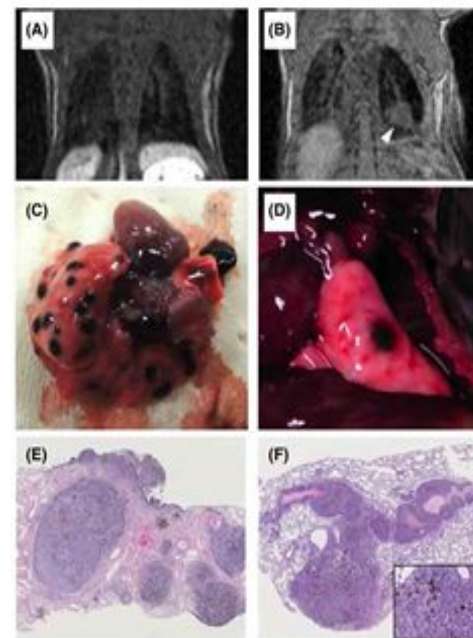


FIGURE 1 Analysis of pulmonary metastasis. (A), (B), (D) and (F) were derived from identical mouse. A, No visible metastasis on MRI of excised pinna. B, Lung metastasis has developed at 4 weeks after excision of pinna. Metastatic nodule is shown as an area of high signal intensity in MRI. Metastatic lesion is indicated by arrow head. C, Multiple lung nodules varying in size were observed macroscopically. D, Large single nest was observed. E, Large nest filled with large atypical cells containing melanin granules (haematoxylin and eosin, original magnifications: $\times 40$). F, A large, solitary basophilic nodule containing melanin granules (HE, $\times 40$). Inset: Proliferation of basophilic cells with nuclear atypia containing melanin granules (HE, $\times 200$)

このモデルの利点は、皮膚局所で増殖した腫瘍細胞が血管もしくはリンパ管へ浸潤し、脈管を經由して肺に到達後に転移巣を形成する多段階転移を解析できる点である。

表 1

No.	Injection	Date of ear excision	Date of die from injection	Date of sacrifice from injection	Long metastases	
					macro-	micro-
1	Subcutaneous	10	31		+	+
2	Subcutaneous	10		40	-	-
3	Subcutaneous	13	32		-	-
4	Subcutaneous	8	32		-	+
5	Subcutaneous	8	39		+	+
6	Subcutaneous	8		63	-	-
7	Subcutaneous	8		63	-	-
8	Subcutaneous	8		63	-	-
9	Subcutaneous	11		63	-	-
10	Subcutaneous	11	41		-	-
11	Subcutaneous	10	33		+	+
12	Subcutaneous	10	58		+	+
13	Subcutaneous	10	58		-	-
14	Subcutaneous	10		66	-	-
15	Subcutaneous	10		66	-	-
16	Subcutaneous	9		40	+	+

我々は Emprin 高発現メラノーマ細胞 (SK-MEL-2) を皮膚転移モデルマウス (C57BL/6) に皮膚内注入して肺転移を生じるか検討した。しかし、残念ながら肺転移を観察できなかった。さらに実験目的の S100A9 トランスジェニックマウスの皮膚内に注入することを検討したが、年度内に終了することができなかった。

当初、転移実験に使用予定であった S100A8、S100A9 トランスジェニックマウスは当大学の動物施設で管理・維持したが、ヘアレス系 HR-1 の維持が難しく A8 マウスは途絶えてしまい、A9 は当大学の動物施設で十分に継代できるようになった。さらに S100A9 ノックアウトマウスも新規に作製し継代できている。そこで今後は、S100A9 トランスジェニックマウスと S100A9 ノックアウトマウスのペアを使って、S100A9 の過不足によって生じるメラノーマの転移の変動を追跡する実験を計画している。

S100A8/A9-Emprin 系の結合を抑制する薬剤、つまり転移抑制候補薬を新規に外部から入手予定であったが、薬剤の権利問題が生じて使用できないことが判明した。また、研究協力者であった日比野利彦研究員が病気のため死去され、類似の薬剤や候補薬剤の探索ができなくなってしまった。使用できる手持ちの候補物質では、固相化した rEmprin の ELISA 系プレートにおいて rS100A9 のプレートへの結合を抑制する物質を発見することはできなかった。したがって、この実験は候補物質を見つけることなく実験を終了として、転移実験に集中することとした。

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 4 件)

1. Numata T, Kiryu S, Maeda T, Egusa C,

Tsuboi R, Harada K. A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging. *Exp Dermatol*. 2017 Jul;26(7):619-621. doi: 10.1111/exd.13327. [査読有]

2. Harada K, Kato Y, Maeda T, Yoshida M, Irisawa R, Nagao T, Tsuboi R. N-Ras mutation in vemurafenib-associated expanding melanocytic nevus. *J Dermatol*. 2017 May;44(5):e101-e102. doi: 10.1111/1346-8138.13670. [査読有]
3. Wakimoto H, Harada K, Arai T, Maeda T, Irisawa R, Tsuboi R. Reduced expression of the ATP2A2 gene in vemurafenib-induced keratoacanthoma-like papules in a melanoma patient. *Int J Dermatol*. 2017 Feb;56(2):e33-e35. doi: 10.1111/ijd.13430. [査読有]
4. Sakaguchi M, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, Murata H, Kinoshita R, Winarsa Ruma IM, Putranto EW, Inoue Y, Morizane S, Huh NH, Tsuboi R, Hibino T. Identification of an S100A8 receptor neuropilin- and its heterodimer formation with EMMPRIN. *J Invest Dermatol*. 2016 Nov;136(11):2240-2250. doi: 10.1016/j.jid.2016.06.617. [査読有]

[学会発表](計 2 件)

1. Numata T, Kiryu S, Maeda T, Egusa C, Tsuboi R, Harada K. A pulmonary metastatic model of murine melanoma assessed by magnetic resonance imaging. The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kochi, Japan 2017.12.15
2. Harada K, Inozume T, Maeda T, Shimada S, Tsuboi R: Aberrant expression of activation-induced cytidine deaminase in the epidermis induces skin cancer. 第 30 回表皮細胞研究会 弘前 2016.11.12

[図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

なし

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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪井 良治 (TSUBOI, RYOJI)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：70221421

(2) 研究分担者

原田 和俊 (HARADA, KAZUTOSHI)

東京医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20324197

前 賢一郎 (MAE, KENICHIROU)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60532257

田中 (山本) 真実 (YAMAMOTO, MAMI)

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：60421062

(3) 連携研究者

阪口 政清 (SAKAGUCHI, MASAKIYO)

岡山大学・大学院医薬学総合研究科 細胞

生物学・准教授

研究者番号：70379840

(4) 研究協力者

前田 龍郎 (MAEDA, TETSUO)

東京医科大学・医学部・技術員

江草 智津 (EGUSA, CHIZU)

東京医科大学・医学部・技術員

日比野 利彦 (HIBINO, TOSHIHIKO)

資生堂リサーチセンター 2016年死去