

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16714

研究課題名（和文）S100A11-RAGEシグナルを標的とした膵臓がん微小環境の解析とその治療

研究課題名（英文）Upregulation of mobility in pancreatic cancer cells by secreted S100A11 through activation of surrounding fibroblasts.

研究代表者

山本 健一（Yamamoto, Kenichi）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：00711798

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、膵臓がん進展に重要な間質線維芽細胞の線維化を伴う増殖メカニズムと、がん細胞とのクロストーク機構によるがん細胞の浸潤・転移亢進メカニズムを解明することを目標に研究を行った。

膵臓がん細胞から分泌されるS100A11は受容体であるRAGEを介して下流のp70S6kinaseを活性化することで間質線維芽細胞の増殖を促進させていた。また、この増殖シグナルとは別に間質線維芽細胞のTPL2が活性化することでPEG2が分泌され、がん細胞の浸潤・転移を亢進させていた。これら結果より、S100A11を介した膵臓がん細胞と周囲間質線維芽細胞とのクロストークによるがん悪性化機構の一旦が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの増殖・浸潤・転移には多くの要因が関係しており、近年ではがん周囲の間質細胞が積極的に関与することが報告されている。特に膵臓がんでは間質細胞の増加を伴う事で治療が難しくなるなどの影響も見られ、間質細胞とがんの関係を明らかにすることはがんの病態解明、新たな治療方法の開発を目指す上でも重要である。本研究により、膵臓がん細胞から分泌されるS100A11はRAGEを介してがん周囲の間質線維芽細胞に作用してその増殖を促進させること、またPEG2を分泌することでがん細胞の浸潤・転移を促進させることが明らかとなった。これら知見ががん微小環境内コミュニケーションへのより深い理解へと繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the extracellular role of S100A11 in crosstalking between pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) cells and surrounding fibroblasts in PDAC progression.

An abundant S100A11 promoted stromal fibroblast proliferation by activating downstream p70S6kinase through RAGE. Furthermore, activation of TPL2 in stromal fibroblasts led to secretion of PEG2, which enhanced invasion and metastasis of cancer cells. These results indicate that a novel role of the secretory S100A11 in PDAC disseminative progression through activation of surrounding fibroblasts triggered by the S100A11-RAGE-TPL2-COX2 pathway. These findings will contribute to therapeutic target to suppress PDAC progression through preventing PDAC-associated fibroblast proliferation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：S100A11 RAGE 間質線維芽細胞 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは進行が早いことも知られている。この原因としては膵臓に頻繁に見られる繊維化を伴った間質反応が考えられており、多くの膵臓がん研究者もこの間質を標的とした膵臓がん治療を研究報告している。腫瘍周囲の間質には線維芽細胞をはじめ血管内皮細胞、免疫細胞など様々な細胞が存在している。このうち線維芽細胞はがん感化型線維芽細胞 (Cancer associated fibroblast) と呼ばれており、がんの悪性化と密接な関係を持っていることが報告されている。がんに感化された線維芽細胞は増殖が盛んになり、炎症性サイトカインや増殖因子を分泌するようになり、がん細胞の増殖等を促す働きを行うようになる。膵臓がん組織においてもこのがん感化型線維芽細胞は多く見られ、がん感化型線維芽細胞から分泌される因子ががん細胞の増殖・浸潤・転移や薬剤耐性、免疫抑制をもたらしている。S100 タンパク質ファミリーは 10 kDa ほどの小さなタンパク質で、その構造内に EF-hand モチーフを有しており、カルシウムと結合することが特徴である。この S100 タンパク質はモノマーやホモダイマー、ヘテロダイマーを形成して細胞の内外で機能する。細胞外へ分泌された S100 タンパク質は主に RAGE (終末糖化産物受容体) のリガンドとして働く。申請者は独自の検証から膵臓がん細胞では DAMPs の 1 つである S100A11 の発現と分泌が亢進していることや、膵臓がん細胞から分泌された S100A11 が線維芽細胞上の RAGE を介して線維芽細胞の増殖を亢進させていることを見出した。

2. 研究の目的

本研究では S100A11-RAGE を基軸として、がん感化型線維芽細胞から分泌されるがん悪性化因子を同定し、膵臓がん周囲の微小環境下で起きる現象を解き明かすことを目的とする。また、このがん悪性化機構に対し、独自で作製した抗 RAGE 抗体を用いて腫瘍周囲の線維化の抑制と抗腫瘍効果の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 線維芽細胞とがん細胞を共培養し、さらに S100A11 刺激をすることで線維芽細胞とがん細胞の間にクロストークが存在することを確認した。遊走能の測定はチャンバーアッセイ法で行い、RAGE 抗体 (1 µg/ml) を加えることで遊走能が抑制できるかの確認も行った。

(2) マウス皮下に膵臓がん細胞 (PK-8) 単独、または膵臓がん細胞と線維芽細胞を混合させて移植し、RAGE 抗体 (100 µg/100 µl / mouse) を投与した場合の腫瘍成長の変化を検証した。抗体は 1 週間毎に腫瘍周囲に皮下投与した。

(3) 膵臓がん細胞の順化培地で線維芽細胞 (野生型/RAGE 欠損型) を培養し、線維芽細胞内の発現が上昇した遺伝子の解析を行った (RNA-seq)。また、線維芽細胞 (野生型) に S100A11 刺激を行った際の遺伝子発現の確認も行った (Real time PCR)。

(4) 線維芽細胞の RAGE 下流のシグナル解析から TPL2 が活性化されていることを確認したことから PGE2 分泌に着目し (がんなどにおいて、活性型線維芽細胞: myofibroblast では TPL2-COX2-PGE2 が亢進していることが報告されている)、S100A11 刺激下でがん細胞の遊走能との関連を検証した。

4. 研究成果

(1) 膵臓がん細胞と線維芽細胞をチャンバーアッセイ法で共培養すると、膵臓がん細胞の遊走能が亢進した。また、この時、膵臓がん細胞に S100A11 を刺激しただけでは遊走能の亢進が見られなかったことから、膵臓がん細胞から分泌される S100A11 が線維芽細胞に働きかけて遊走能を活性化させる因子の分泌を誘導していると推察される (図 1)。さらにこの線維芽細胞への刺激は RAGE 抗体を添加すると抑制されていた (図 1)。

(2) マウス皮下に細胞を移植し、腫瘍形成とその成長速度を観察した。膵臓がん細胞単独移植よりも線維芽細胞と混ぜて移植する方が腫瘍の成長が増進されていた。この腫瘍成長の増進は RAGE 抗体を投与することで抑制された (図 2)。また、線維芽細胞単独の移植では腫瘍形成は起きず、膵臓がん細胞単独移植のものより膵臓がん細胞と線維

図 1: 線維芽細胞とがん細胞の共培養によって亢進する遊走能は RAGE を介して活性化される

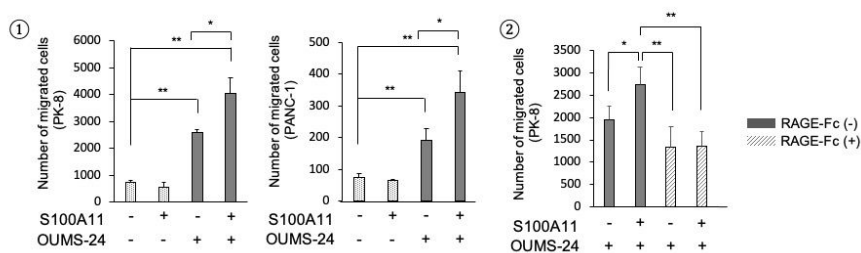
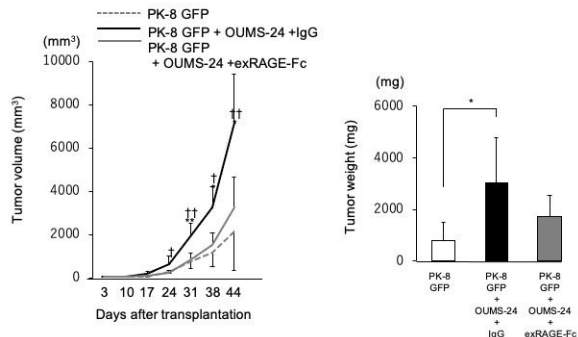


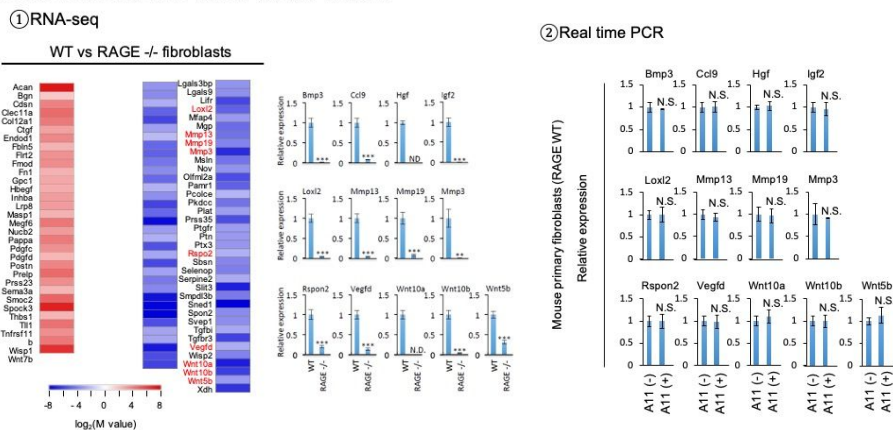
図 2: in vivo でも RAGE シグナルは腫瘍成長を増進させる



芽細胞を混合させて移植した腫瘍は硬質な腫瘍を形成していた。

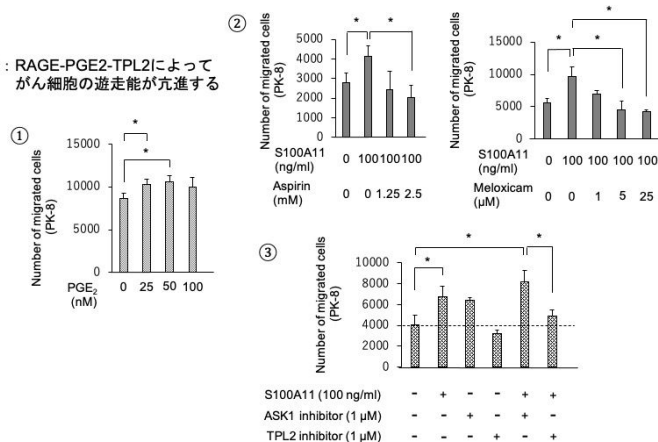
(3) 膵がん細胞の遊走能促進と腫瘍成長の増進を誘導する因子を特定するため、膵がん細胞の順化培地で線維芽細胞（野生型・RAGE 欠損型）を培養し、遺伝子発現の変化を解析した。RNA-seqの結果から野生型と RAGE 欠損型で 2 倍以上の発現差がある分泌タンパク質を候補として選んだ（図 3）さらに、それら候補について S100A11 刺激で変化が見られるものを Real time PCR で確認した（図 3）。この結果、有意な差が見られるものは見つからなかった。

図 3 : RAGEの発現によって変化する遺伝子群の解析



(4) 線維芽細胞の分泌因子を調べるため、RAGE 下流シグナルの解析を行った。RAGE 細胞膜領域に結合する因子の解析を行った結果、以前同定した p70S6kinase 以外に TPL2 と ASK1 が結合候補として確認した。炎症疾患で活性化された線維芽細胞（myofibroblast）の TPL2 シグナルについては、既に TPL2-COX-2-PGE2 と繋がるシグナルが報告されている。これらシグナル候補が膵がん細胞とのクロストークに関与しているか調べるため、それぞれの阻害薬を用いてその検証を行った。非選択的 COX 阻害薬としてアスピリン、選択的 COX-2 阻害薬として meloxicam、TPL2 の阻害薬として vemurafenib を添加すると、線維芽細胞と共培養しながら S100A11 刺激をした時に見られた膵がん細胞の遊走能亢進は抑制された。しかし、ASK1 の阻害薬として selonsertib を添加しても抑制されなかった。これにより、S100A11 刺激によって RAGE 下流の TPL2 が活性化することで PGE2 が線維芽細胞から分泌し、膵がん細胞の増殖と遊走能の亢進に寄与していることが考えられる。

図 4 : RAGE-PGE2-TPL2によってがん細胞の遊走能が亢進する



引用文献

Oncology Research. 2019;27(6):713-727.

Oncology Research. 2019;27(8):945-956.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamamoto Ken-ichi et al.	4. 巻 27
2. 論文標題 Extracellular S100A11 Plays a Critical Role in Spread of the Fibroblast Population in Pancreatic Cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 713 ~ 727
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096504018X15433161908259	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Mitsui Yosuke et al	4. 巻 27
2. 論文標題 Upregulation of Mobility in Pancreatic Cancer Cells by Secreted S100A11 Through Activation of Surrounding Fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 945 ~ 956
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3727/096504019X15555408784978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ken-ichi Yamamoto
2. 発表標題 膵臓がんにおける腫瘍周囲微小環境機構の解析
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	光井 洋介 (Mitsui Yosuke)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	阪口 政清 (Sakaguchi Masakiyo)		
研究協力者	木下 理恵 (Kinoshita Rie)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関