

## 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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290039

研究課題名(和文) 転移先臓器を感知する受容体群の分子制御機構の解明とその応用

研究課題名(英文) Critical role of newly identified S100A8/A9 receptors in lung specific 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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本計画では、同定できた新規S100A8/A9受容体群EMMPRIN, NPTN, NPTN, MCAM, ALCAMについて、メラノーマの肺転移における重要性について検討した。結果、EMMPRIN, NPTN, MCAMが、肺から分泌されるS100A8/A9に反応して、メラノーマの肺転移を強く誘導する事が判明した。EMMPRIN, NPTN, MCAMが治療の有効な分子標的となる可能性が示されたのだ。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to uncover that the functional receptors for S100A8/A9 were not restricted to RAGE and TLR4. Our advanced study showed that EMMPRIN also played a pivotal role in cancer metastasis in response to S100A8/A9. This discovery further spurred us to identify the unknown receptors, resulting in novel findings, NPTNa; NPTNb; MCAM and ALCAM receptors, we then named the collection of receptors "S100 Soil Sensor Receptors, shortly termed SSSRs" in our context of studies. We figured out that these novel receptors, especially EMMPRIN, NPTNb; MCAM were cooperatively acting with each other at specific stages such as epithelial-methenchymal transition (EMT), floating, adhesion, and invasion, and in the elaborate cancer metastatic processes. Our ongoing studies will help us to achieve better understanding of cancer behaviors and also the establishment of an innovative method for the prevention of cancer 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

がん細胞は体のどの部分にも同様に広がって不思議はないのに、実際には肺や肝臓など特定の臓器に転移が現れやすい。がん細胞は植物の種のようにふるまい、風に乗って遠くに飛んでいくが、相性のよい土に落ちたときだけ成長できるのではないだろうか。転移がんの定着場所を決定しているのが本当に“種”や“土”の特徴なのか、現在に至るまで研究が続いてきたが、その両方とも重要な役割を果たしている証拠が得られつつある。

東京女子医科大学の丸義朗教授グループは、がん細胞が遠く離れた肺の細胞と、病原体に対する免疫応答に関係するシグナル伝達機構によって情報を交換し、そこへ転移することを明らかにした。丸教授らはメラノーマを健康なマウスに注射すると、がん細胞から分泌された因子が肺に炎症反応を引き起こすことを発見した。がん細胞が肺に移動する以前からこの反応が生じており、この反応により、肺胞マクロファージと肺胞内皮細胞が、S100ファミリーであるS100A8/A9タンパク質コンプレックスを過剰に産生、放出するようになる。これが、がん細胞のToll様受容体4 (TLR4) に作用して、がん細胞を肺に引き寄せるのである。即ち、肺のなかで炎症によって誘導されたS100タンパク質はがん細胞の目指す目印となり(ホットスポット)がん細胞を呼び寄せる役割を担っていた。そして、がん細胞のS100探知レーダーの一つとしてTLR4の重要性が示されたのである(Nat Cell Biol, 2006 & 2008)。

一方、我々は、炎症細胞あるいはがん細胞自身からも放出されるS100タンパク質群が、がん細胞に作用した時にどのような影響をもたらすのかについての細胞生物学的解析を行ってきた。我々が特に注目したのは、もう一つの受容体RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts)である。その研究成果として、

- (1) S100A11 はがん細胞から活発に分泌され自身のRAGEに作用し増殖を促進し、がん進展に関わること (Mol Biol Cell, 2008; Amino Acids, 2011)
- (2) S100A8/A9 は分泌されて細胞増殖、炎症性サイトカイン、ケモカインの産生誘導に働くこと (J Cell Biochem, 2007)
- (3) 炎症性サイトカイン、ケモカイン誘導には、今まで謎であったRAGE膜直下作動機構が重大な役割を担っていること (PLoS ONE, 2011)
- (4) 培養がん細胞にS100タンパク質群を加えただけで、がん細胞に浸潤突起が生じ、移動の準備が進んだこと、そして、RAGEが働かないようにすると、がん細胞の浸潤、走化性が劇的に抑制されたこと(未発表)等がある。

これら一連の成果より、S100タンパク質群のRAGEを介したシグナルも、がん細胞の増殖促進および転移を誘発し、がん進展に重大に

寄与する結論に至った。

上記研究成果を受け、RAGEおよびTLR4の信号伝達阻害のさらなる検討から、S100A8/A9が働く受容体はTLR4とRAGEのみでないことが判明してきた(PLoS ONE, 2011)。そこで我々は、S100A8、S100A9タンパク質のそれぞれに対する特異的受容体の新規同定を目指した。その結果、S100A8/A9結合タンパク質の解析から新規受容体としてEMMPRIN、NPTN、NPTN、MCAM、ALCAMを見出すことに成功した。予備的検討から、これらの受容体が、がん転移に深く関与することが明らかとなりつつあり、RAGE、TLR4に加えて、これら新規受容体群も、がん細胞の炎症部位(S100A8/A9発現ホットスポット)への転移能獲得に重要な役割を担っているものと期待された。このような分子機構の解明は、がんを標的とした有効な治療法を開発する上で大きな意義を有すると考えた。

### 2. 研究の目的

本計画では、S100A8/A9の新規受容体EMMPRIN、NPTN、NPTN、MCAM、ALCAMの作動原理を理解し、本成果を利用した新しいがん治療法への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。研究期間内には、以下のことを目指した。

- (1) 新規受容体群の下流信号伝達の分子機構を明らかにすることで受容体からの信号伝達のがん細胞の浸潤、走化性に果たす役割を解明する。
- (2) がん細胞(メラノーマ)の肺転移に新規受容体群が果たす役割を動物実験により見出す。

### 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。ヒト胎児腎細胞株(HEK293)、ヒトメラノーマ細胞株(WM115, WM266-4)、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) Tag認識抗体: Western blot 解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (clone 6E2: Cell Signaling社)、mouse anti-Myc tag (clone 9B11: Cell Signaling社)

(3) 哺乳動物発現コンストラクト: CMVイントロンプロモーター(CMV<sub>i</sub>)を導入したPDNR1rベクター(プロモーターレスドナーベクター; Clontech社)を構築し、CMV<sub>i</sub>の下流にヒトS100A8、S100A9、(C末にMyc-6His tagが付加)、EMMPRIN、NPTN、NPTN、MCAM、ALCAM (C末にMyc-6His tagあるいはHA-6His tagが付加)をコードするcDNAを挿入した。各挿入cDNAの塩基配列はDNAシーケンサーにより正しいことを確認した。

(4) 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細胞へのトランスフェクションはFuGENE-HDトランス

フェクション試薬を用いて行った。36 時間後に細胞を回収した。

(5) 免疫沈降：HEK293 細胞に強制発現させた tag 付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose、 monoclonal anti-Myc tag (clone 1G4) agaroses を使用した。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

(6) 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、S100A9、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。

(7) 動物実験：メラノーマ細胞株 (1 × 10<sup>6</sup> 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) 新規受容体群と S100 タンパク質の結合：各 S100 タンパク質 (S100A4, A7, A8, A9, A11, B) を強制発現させた HEK293 細胞より培養上清 (分泌された S100 タンパク質を含有) をそれぞれ回収し、受容体群 (EMMPRIN, NPTN, NPTN) を強制発現させた HEK293 細胞の培養系に添加した。細胞を回収し、強制発現させた受容体群の免疫沈降の後に、結合性 S100 タンパク質群を WB により解析した。結果、NPTN は、S100A8 に対する親和性が高い事、NPTN は、EMMPRIN と同様に S100A9 に強い結合性を示すことが判明した。RAGE、MCAM、ALCAM に関しては S100A8/A9 に対する結合を別の実験系で検討した。MCAM と ALCAM はどちらも RAGE と同等に S100A8/A9 に親和性を示した。

(2) NPTN と EMMPRIN の 2 量体形成：次に我々は、RAGE, NPTN, NPTN, EMMPRIN の 4 者間で、どのような 2 量体形成が起こるのかについて検討した。HEK293 細胞に EMMPRIN + (RAGE or NPTN or NPTN or EMMPRIN) のコンビネーションで各二種類の受容体ペアを強制発現させた。NPTN + (RAGE or NPTN or NPTN or EMMPRIN), NPTN + (RAGE or NPTN or NPTN or EMMPRIN) に関しても上記と同様に行った。各受容体 (NPTN, NPTN, EMMPRIN) の免疫沈降の結果、NPTN, NPTN, EMMPRIN はそれぞれホモダイマー形性能 (NPTN/NPTN, NPTN/NPTN, EMMPRIN/EMMPRIN) があること、そして、NPTN/NPTN, NPTN/EMMPRIN, NPTN/EMMPRIN のヘテロダイマー形成も可能であることが判明した。また、NPTN, NPTN, EMMPRIN はいずれも RAGE との結合性を示さなかった。

(3) 新規受容体群の下流信号伝達：NPTN と

EMMPRIN の細胞質領域には、TRAF 結合モチーフが存在する。TRAF は Rac/Cdc42 や NFκB を活性化し、細胞走化性誘導や炎症性サイトカイン誘導を引き起こす。そこで、TRAF2 と TRAF6 に関して、NPTN と EMMPRIN の細胞質領域への結合能を検討した。NPTN あるいは EMMPRIN の細胞質領域と各アダプタータンパク質 (TRAF2, TRAF6) を HEK293 に同時トランスフェクションし、NPTN あるいは EMMPRIN の細胞質領域を免疫沈降した。結合性アダプタータンパク質を WB により解析したところ、EMMPRIN と NPTN に共通して TRAF2 が結合性を示すことが判明した。TRAF2 は EMMPRIN、NPTN に S100A8/A9 が結合すると、それら受容体の細胞質領域にリクルートされ、下流エフェクタータンパク質 Rac/Cdc42、そして NFκB 転写因子の活性化に関わっていた。MCAM と ALCAM に関しては、まだアダプタータンパク質を捉えることが出来ていないが、同様に Rac/Cdc42、そして NFκB 転写因子の活性化が、S100A8/A9 刺激によって MCAM と ALCAM から引き起こされることが判明した。

(4) In vitro 走化性アッセイ：EMMPRIN、NPTN、NPTN、MCAM、ALCAM の S100A8/A9 結合による活性化が、細胞遊走能を亢進させているかどうかを調べる為にポイデンチャンパー法によるマイグレーションアッセイを行った。メラノーマ細胞にそれぞれの受容体の siRNA を導入すると遊走する細胞数はいずれも有意に抑制された。また、ドミナントネガティブ体でも同様の結果となった。

(5) 動物モデルによる転移実験：これら受容体が共通して発現しているメラノーマの細胞株を用いて尾静脈投与によるマウス肺転移実験を行った。その結果、EMMPRIN、NPTN、MCAM を移植がん細胞に過剰発現させることにより、肺転移性が顕著に増加し、逆にこれらのドミナントネガティブ体 (機能阻害) の過剰発現により肺転移性が顕著に減少した。NPTN と ALCAM のドミナントネガティブ体は抑制効果が認められなかった。当動物実験より、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あることが示された。

そこで、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} がブロック製剤として有効となるものと考えた。独自に作成した exEMMPRIN-Fc, exNPTN-Fc, exMCAM-Fc は、メラノーマの走化、浸潤能の抑制に優れていることが判明した。

#### 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 24 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, Torigoe 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 neuropilin- 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](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

Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, Ruma IM, Inoue Y, Sakaguchi Y, Yamamoto KI, Kinoshita R, Futami J, Kataoka K, Iwatsuki K, Huh NH. DNAX-Activating Protein 10 (DAP10) Membrane Adaptor Associates with Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) and Modulates the RAGE-triggered Signaling Pathway in Human Keratinocytes, *J Biol Chem*. 289: 23389-23402, doi: 10.1074/jbc.M114.573071. 2014. 査読有

Jaiswal JK, Lauritzen SP, Scheffer L, Sakaguchi M, Bunkenborg J, Simon SM, Kallunki T, Jäättelä M, Nylandsted J. S100A11 is required for efficient plasma membrane repair and survival of invasive cancer cells, *Nat Commun*. 5: 3795. doi:10.1038/ncomms4795. 2014. 査

読有

Sakaguchi M, Watabe M, Kinoshita R, Kaku H, Ueki H, Futami J, Murata H, Inoue Y, Li SA, Huang P, Putranto EW, Ruma IMW, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene. Mol Biotech. 56: 621-630, doi: 10.1007/s12033-014-9738-0. 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 30 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

渡部 昌実 (WATANABE Masami)  
岡山大学・大学病院・教授  
研究者番号：70444677