

研 究 報 告 書
平成 29 年度：A 課題

平成 31 年 2 月 22 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 岡山大学

住 所 岡山市北区鹿田町 2-5-1

研究者氏名 阪口 政清



(研究課題)

がん細胞の転移を加速するがん微小環境内線維芽細胞の新たな役割

平成 30 年 1 月 31 日付助成金交付のあった標記 A 課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

1. 研究成果

はじめに

肺臓がんは治療困難ながんとして周知であり、その特性として多くが間質細胞の増加を伴っている。これによりがん細胞への薬物の到達が制限されることやがん細胞の増殖、浸潤、転移が高まることが指摘されており、間質細胞を標的とした新しい治療手段の確立が求められている。我々は、がん微小環境下で放出される S100A11 が、間質線維芽細胞に作用することで、がん進展を著しく加速することを見出した（がん細胞が出す S100A11 はパラクラインで RAGE を介して間質線維芽細胞に作用する）。しかし、S100A11-RAGE がどのような分子メカニズムで線維芽細胞をがん進展に寄与させているのか完全には解明できていなかった。そこで、当研究では、肺がん進展に重要な間質線維芽細胞の RAGE のまだ未解明な下流信号伝達を解明し、肺がんと間質線維芽細胞のコミュニケーションツールとして重要な RAGE リガンド S100A11 の肺がん進展における役割の理解を目指した。研究成果は以下の通りである。

成果

- (1) S100A11 の分泌： S100A11 は、間質線維芽細胞にも発現が認められるが、分泌は起こらず、肺がん細胞側から活発に分泌されることが判明した。
- (2) 細胞外 S100A11 の作用する細胞： 肺がん細胞から S100A11 は活発に分泌されるが、分泌された S100A11 は受容体 RAGE を介して肺がん細胞（オートクライン）、そして間質線維芽細胞に作用する（パラクライン）ことが考えられる（肺がん細胞、間質線維芽細胞には RAGE の発現が同程度であることを見確認していることから）。組み換え S100A11 タンパク質を両細胞にそれぞれ添加し、増殖がどうなるかの検討を行った。その結果、S100A11 は肺がん細胞には全く効果がなく（添加濃度、作用時間の検討も行った）、線維芽細胞

にのみ増殖促進が引き起こされた。当効果は、他の S100 タンパク質、S100A6、S100A8、S100A9 タンパク質では認められなかった。本検討から、S100A11 は腫がん細胞から分泌され間質線維芽細胞にパラクラインで RAGE を介して作用し、線維芽細胞の増殖を促進することが明らかとなった。

(3) 間質線維芽細胞の増殖を促進する RAGE 下流信号伝達機序： 線維芽細胞の RAGE 下流でどのようなリン酸化酵素が活性化されているのかを知るために、RAGE ノックアウト線維芽細胞 (RAGE-/−細胞) を新規に作成し、リン酸化酵素アレイで解析を行った。その結果、増殖に密接に関与する酵素 p70S6K が RAGE-/−で不活化されていることが判明した。代表者グループは以前の研究から、MyD88 を RAGE 下流信号伝達の key アダプター因子として同定している (Sakaguchi et al. PLOS ONE 2011)。そこで、RAGE 下流で MyD88 が p70S6K の活性化を誘導するかどうかの検討を行った。細胞レベルでの検討、そして試験管内無細胞系での検討から、RAGE は S100A11 により刺激されると、p70S6K が強く活性化されるが、これには MyD88 が極めて重要であることが明らかとなつた。さらに詳しく検討したところ、MyD88 は mTOR を介して p70S6K を活性化していることが判明した (S100A11→RAGE→MyD88→mTOR→p70S6K→増殖誘導)。

(4) 間質線維芽細胞側 RAGE の腫がんの増殖促進における意義： 肿がん細胞と間質線維芽細胞相互作用の腫がん進展における意義を、間質線維芽細胞の RAGE 分子に着目して検討した。マウスに腫がん細胞を線維芽細胞との混合で移植したところ、RAGE-/−線維芽細胞との混合移植では、RAGE+/+線維芽細胞との混合移植に比較して腫瘍増大の顕著な遅延が観察された。この時、RAGE-/−線維芽細胞との混合移植により形成された腫瘍内では、腫瘍間質線維芽細胞の数の顕著な低下が認められた。

(5) 間質線維芽細胞の RAGE 下流で誘導されるがん細胞活性化因子： RAGE

+/+線維芽細胞に比較して RAGE-/-線維芽細胞でどのような液性因子の発現変動が起こっているのか知るために、RNA-seq 解析による遺伝子網羅的発現解析を行った。その結果、RAGE-/-細胞で複数の増殖因子、ケモカインの発現減少が検出され、これらが総合的に肺がん細胞の増殖、転移の活性化に関与しているものと考えられた。

結論

肺がんのほとんどで間質の増大が認められる。間質が増大すると肺がんの治療抵抗性や転移性が増すことが周知であり、間質を標的とした新たな治療法の創成が求められている。このためには、間質増大のメカニズムを理解する必要がある。今回の我々の成果より、肺がん細胞が放出する S100A11 が周囲間質線維芽細胞に RAGE を介して働きかけ、線維芽細胞の増殖を顕著に活性化することで、間質増大を促し、腫瘍増大に繋がっていることを明らかにした。線維芽細胞の RAGE を介した増殖誘導には、MyD88→mTOR→p70S6K の経路が重大に関わっていることも明らかとなった。さらに間質線維芽細胞の RAGE 最下流では、がんを活性化することが報告されている複数の増殖因子やケモカインが誘導されてくることが判明し、これらが、肺がん細胞に働きかけ、肺がん腫瘍の増大を複合的に促進しているものと考えられた。明らかとなった経路を標的とした治療手段は、肺がん間質標的治療に大きく貢献するものと考えられた。

本成果は、Oncology Research に掲載される運びとなっている（以下 2. 論文発表、18. Takamatsu et al. Oncology Research 2019 in press）。

2. 論文発表

1. Sato H, **Sakaguchi M**, Yamamoto H, Tomida S, Aoe K, Shien K, Yoshioka T, Namba K, Torigoe H, Soh J, Tsukuda K, Tao H, Okabe K, Miyoshi S, Pass HI, Toyooka S. Therapeutic potential of targeting S100A11 in malignant pleural mesothelioma, **Oncogenesis**. 7: 11, 2018. DOI 10.1038/s41389-017-0017-3
2. Kataoka K, Maehara N, Ayabe Y, Murata H, Huh NH, **Sakaguchi M**. Tumor necrosis factor- α downregulates the REIC/Dkk-3 tumor suppressor gene in normal human skin keratinocytes. **Mol Med Rep.** 17: 6661-6666, 2018.
3. Sumardika IW, Youyi C, Kondo E, Inoue Y, Ruma IMW, Murata H, Kinoshita R, Yamamoto K, Tomida S, Shien K, Satoh H, Yamauchi A, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Toyooka S, Nishibori M, **Sakaguchi M**. β -1,3-galactosyl-O-glycosyl-glycoprotein β -1,6-N-acetylglucosaminyltransferase 3 increases MCAM stability, which enhances S100A8/A9-mediated cancer motility, **Oncol Res.** 26: 431-444, 2018.
4. Zhong H, Wake H, Liu K, Gao Y, Teshigawara K, **Sakaguchi M**, Mori S, Nishibori M. Effects of Histidine-Rich Glycoprotein on Erythrocyte Aggregation and Hemolysis: Implications for a Role under Septic Conditions, **J Pharm Sci.** 136: 97-106, 2018.
5. Torigoe H, Yamamoto H, **Sakaguchi M**, Youyi C, Numba K, Sato H, Shien K, Soh J, Suzawa K, Tomida S, Tsukuda K, Miyoshi S, Toyooka S. Tumor-suppressive effect of LRIG1, a negative regulator of ErbB, in non-small cell lung cancer harboring mutant EGFR, **Carcinogenesis**. 39: 719-727, 2018.
6. Torigoe H, Shien K, Takeda T, Yoshioka T, Namba K, Sato H, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, **Sakaguchi M**, Tomida S, Tsukuda K, Miyoshi S, Toyooka S. Therapeutic strategies for afatinib-resistant lung cancer harboring HER2 alterations, **Cancer Sci.** 109: 1493-1502, 2018.
7. Ruma IMW, Kinoshita R, Tomonobu N, Inoue Y, Kondo E, Yamauchi A, Sato H, Sumardika IW, Chen Y, Yamamoto KI, Murata H, Toyooka S, Nishibori M, **Sakaguchi M**. Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms, **Cancers (Basel)** 10: pii: E239, 2018. doi: 10.3390/cancers10070239.
8. Saito K, **Sakaguchi M**, Maruyama S, Iioka H, Putranto EW, Sumardika IW, Tomonobu N, Kawasaki T, Homma K, Kondo E. Stromal mesenchymal stem cells facilitate pancreatic cancer progression by regulating specific secretory molecules through mutual cellular interaction, **J Cancer** 9: 2916-2929, 2018.
9. Sato H, Yamamoto H, **Sakaguchi M**, Shien K, Tomida S, Shien T, Ikeda H, Hatano M, Torigoe H, Namba K, Yoshioka T, Kurihara E, Ogoshi Y, Takahashi Y, Soh J, Toyooka S. Combined inhibition of MEK and PI3K pathways overcomes acquired resistance to EGFR-TKIs in non-small cell lung cancer, **Cancer Sci.** 109: 3183-3196, 2018.
10. Nakamura K, **Sakaguchi M**, Matsubara H, Akagi S, Sarashina T, Ejiri K, Akazawa K, Kondo M, Nakagawa K, Yoshida M, Miyoshi T, Ogo T, Oto T, Toyooka S, Higashimoto Y, Fukami K, Ito H. Crucial role of RAGE in inappropriate increase of smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension, **PLoS One.** 13: e0203046, 2018.
11. Murata H, Khine CC, Nishikawa A, Yamamoto KI, Kinoshita R, **Sakaguchi M**. JNK-mediated phosphorylation of SARM1 regulates NAD $^{+}$ cleavage activity to inhibit mitochondrial respiration. **J Biol Chem.** 293: 18933-18943, 2018.
12. Sasaki S, Hara A, **Sakaguchi M**, Nangaku M, Inoue Y. Hepatocyte nuclear factor 4 α regulates megalin expression in proximal tubular cells. **Biochem Biophys Rep.** 17: 87-92, 2018.
13. Sasaki S, Urabe M, Maeda T, Suzuki J, Irie R, Suzuki M, Tomaru Y, **Sakaguchi M**, Gonzalez FJ, Inoue Y. Induction of hepatic metabolic functions by a novel variant of hepatocyte nuclear factor 4 γ . **Mol Cell Biol.** 2018. (in press)
14. Kinoshita R, Sato H, Yamauchi A, Takahashi Y, Inoue Y, Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Araki K, Shien K, Tomida S, Torigoe H, Namba K, Kurihara E, Ogoshi Y, Murata H, Yamamoto

- KI, Futami J, Putranto EW, Winarsa Ruma IM, Yamamoto H, Soh J, Hibino T, Nishibori M, Kondo E, Toyooka S, **Sakaguchi M**. exSSSRs (extracellular S100 Soil Sensor Receptors)-Fc fusion proteins work as prominent decoys to S100A8/A9-induced lung tropic cancer metastasis. **Int J Cancer**. 2018. (in press)
15. Kinoshita R, Sato H, Yamauchi A, Takahashi Y, Inoue Y, Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Araki K, Shien K, Tomida S, Torigoe H, Namba K, Kurihara E, Ogoshi Y, Murata H, Yamamoto KI, Futami J, Putranto EW, Winarsa Ruma IM, Yamamoto H, Soh J, Hibino T, Nishibori M, Kondo E, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Newly developed anti-S100A8/A9 monoclonal antibody efficiently prevents lung tropic cancer metastasis. **Int J Cancer**. 2018. (in press)
16. Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Kinoshita R, Ruma IMW, Sato H, kondo E, Inoue Y, Yamauch A, Murata H, Yamamoto K-I, Tomida S, Shien K, Yamamoto H, Soh J, Futami J, Putranto EW, Hibino T, Nishibori M, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Neuroplastin- β mediates S100A8/A9-induced lung cancer disseminative progression. **Mol Carcinog**. 2019. (in press)
17. Ogoshi Y, Shien K, Yoshioka T, Torigoe H, Sato H, **Sakaguchi M**, Tomida S, Namba K, Kurihara E, Takahashi Y, Suzawa K, Yamamoto H, Soh J, Toyooka S. Anti-tumor effect of neratinib against lung cancer cells harboring HER2 oncogene alterations. **Oncol Lett**. 2019 (in pres)
18. Takamatsu H, Yamamoto K, Tomonobu N, Murata H, Inoue Y, Yamauchi A, Sumardika IW, Youyi C, Kinoshita R, Yamamura M, Fujiwara H, Mitsui Y, Araki K, Futami J, Saito K, Iioka H, Ruma IMW, Putranto EW, Nishibori M, Kondo E, Yamamoto Y, Toyooka S, **Sakaguchi M**. Extracellular S100A11 plays a critical role in spread of the fibroblast population in pancreatic cancers, **Oncol Res**. 2019. (in press)
19. Tomonobu N, Kinoshita R, Sumardika IW, Chen Y, Inoue Y, Yamauchi A, Yamamoto KI, Murata H, **Sakaguchi M**. Convenient methodology for extraction and subsequent selective propagation of mouse melanocytes in culture from adult mouse skin tissue. **Biochem Biophys Rep**. 2019 (in press).