

S100タンパク質に着眼したがん転移機構の解明とその制御

阪口政清

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学

キーワード：S100タンパク質, 受容体, がん, 転移, 生物製剤

Basic studies on S100-mediated cancer metastasis based on the development of innovative biologics to aim at its effective prevention

Masakiyo Sakaguchi

Department of Cell Biology, Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences

緒言

以前から“がん”の種類によっては、“転移先臓器”が高い確率で決まることが知られており、“種”と“土”に例えられてきた。この種と土のクロストークの機構を分子レベルで解明できれば、より精密で効果的ながん転移抑制の戦略を構築することが可能と考えられる。近年、「臓器が発する S100タンパク質* : soi signal」と「がん細胞側の S100受容体 : soil sensor」の関係が、この種と土のクロストーク機構の解明に重要であるとされ、多くの注目を集めている。本書では、筆者が S100タンパク質に着目するに至った経緯、S100タンパク質群の新規受容体群を見出すに至った経緯、そして、これまでの S100-S100受容体研究の集大成といえるがん転移をターゲットとした新しい効果的転移制御製剤（がん転移における「臓器」と「がん細胞」のクロストークの遮断）の開発に至った経緯について述べさせて頂く。

* S100タンパク質：ヒトでは20種ファミリー（S100A1～A16, B, G, P, Z）が知られている。いずれも Ca 結合性（EF-hand モチーフにより Ca をトラップ）の低分子量タンパク質（約10kDa）である。興味深いことにこれらタンパク質群は、細胞内で機能する一方、古典的な分泌シグナルを持たないにも関わらず細胞外にも分泌され、サイトカインやケモカイン、あるいは増殖因子様の機能を有する¹⁾。

S100タンパク質への着眼

筆者が S100タンパク質に最初に出会ったのは大学院博士課程での研究である。ヒト細胞の不老化、がん化に伴って発現変動するタンパク質として S100A11を見出した²⁾。S100A11は既知タンパク質であるものの当時論文数が10編ぐらいとほとんどその本態がわかっていないことから、S100A11の研究を進めることで様々な新しい発見が得られてくることに胸を躍らせた。研究開始初期は S100A11が細胞外に分泌されるとは全く考えておらず、細胞内での機能解明にいそしんだのを覚えている。結果、S100A11が細胞質から核へ移行することが正常ヒト細胞の増殖の抑制に重要であることを明らかにした³⁻⁵⁾。一方、様々ながん細胞や組織で S100A11の発現が上昇しているという報告があり、上記のように S100A11がひたすら細胞増殖抑制にのみ働いているのであれば説明しにくいことである。

平成30年8月21日受理

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話：086-235-7395 FAX：086-235-7400

E-mail：masa-s@md.okayama-u.ac.jp

◆プロフィール◆



平成7年 徳島文理大学薬学部卒業
 平成9年 徳島文理大学院薬学研究所修士課程修了
 平成13年 岡山大学大学院医学研究科博士課程修了
 平成13年 日本学術振興会特別研究員 (PD)
 平成16年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 助手
 平成17年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 助手
 平成19年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 助教
 平成20年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 准教授
 平成26年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 独立准教授
 平成30年 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 教授

筆者はこの問題に取り組み、S100A11が細胞から分泌もされ、細胞をオートクライン機構で刺激し、細胞増殖を正に制御することを明らかにした。この機構が、がん細胞で亢進していることが判明したのである⁶⁻⁸⁾。

受容体 RAGE の研究

上述の細胞外に分泌された S100A11が細胞に作用するためには S100A11に対する何らかの受容体が必要と考えられる。さらなる研究の結果、他の S100タンパク質研究で報告のあった終末糖化産物受容体 (receptor for advanced glycation endproducts: RAGE) (遺伝子名 *AGER*) が S100A11に対しても受容体として機能することを明らかにした⁹⁾。

受容体 RAGE は1992年に既に発見されていたもの⁹⁾、これまでその作動分子原理が未解明であった。そのため筆者は、これまで滞っていた解析が困難であった壁を乗り越え、RAGE 膜直下の信号伝達機構の解明に成功した。2011年のことである。解析から、S100-RAGE 結合により、RAGE の391Ser が PKC・によりリン酸化を受け、TIRAP/MyD88をリクルートすることで下流にがん進展に関わる様々なシグナルを伝達できるのである¹⁰⁾。この発見は、RAGE とそこから派生する多様なシグナル経路を結ぶ分子機構の理解につながった。しかし、当成果からはまだ、RAGE の選択的シグナル増幅機構については説明できていない。これについては、2014年に RAGE 共役受容体 DAP10を新規に同定することで説明することが可能となった。即ち、RAGE 下流のサバイバル能に特化した信号伝達の選択および増強が共役する DAP10の機能によって制御されることがはじめて明らかとなった¹¹⁾。この DAP10の発見を起点に現在、国内外の研究からも他の共役受容体が見出されてきており^{12,13)}、多様な RAGE 信号伝達経路 (走化性、増殖、細胞死等につながる多様なシグナル経路) の中から特定の信号伝達経路の選択および増強に働く機構の全容が明らかにされつつある¹⁴⁾。

RAGE 研究から発展した新規 S100タンパク質受容体群の発見

一方、S100A11による RAGE を介さない信号伝達も存在することが自身の研究からわかってきた。この課題を明らかにするため、筆者らは、S100A11よりも炎症性がん疾患への関わりが深く RAGE との結合が古

くから知られている S100タンパク質、S100A8/A9タンパク質 (S100A8と S100A9のヘテロダイマー) に着目し、これに対する RAGE 以外の特異的受容体の新規同定を試みた。S100A8/A9の結合タンパク質の解析から新規受容体として EMMPRIN (遺伝子名 *BSG*) を見出すことに成功した¹⁵⁾。この発見から筆者は、他にもまだ似たような受容体が存在するものと強く考えるようになった。EMMPRIN に似た構造をもつ膜タンパク質がそれに当てはまるものと仮定し、EMMPRIN のアミノ酸配列を常時眺めたり EMMPRIN 配列全長のホモロジー検索を行ったりしていた。しかし、これといった候補がなかなかマッチしてこない。そこで戦略を変更し、ドメイン別にホモロジー検索をかけようと考えた。配列全体ではなく部分的であればヒットしてくる確率が高くなり、それらの中から膜タンパク質が見つければ、それらが候補となってくる可能性がある。細胞外領域、膜貫通領域ともに、高いホモロジーを示すものが見当たらなかったが、期待していなかった細胞質領域での検索から、EMMPRIN と極めて類似した一回膜貫通型膜タンパク質 NPTN (遺伝子名 *NPTN*) を発見することができたのである¹⁶⁾。NPTN には2つのアイソフォーム α (Np55) と β (Np65) が存在する。さらに EMMPRIN と NPTN の関係を調べていくとこれらが構造上大きく類似しており、しかもパラログの関係にあることがわかった。この関係を知ったことが後のさらなる受容体発見のブレイクスルーとなったのである。このことから、EMMPRIN を調べると NPTN の他にもう1つ EMBIGIN (遺伝子名 *EMB*)¹⁷⁾ が、RAGE を調べると MCAM (遺伝子名 *MCAM*) と ALCAM (遺伝子名 *ALCAM*)、そして BCAM (遺伝子名 *BCAM*) が新たに見つかった¹⁸⁾。後の S100A8/A9 との結合解析、細胞生物学的解析から、S100A8/A9 に対する機能性新規受容体として MCAM, ALCAM, EMMPRIN, NPTN (α & β) に強い関心を抱くようになった (EMBIGIN と BCAM は S100A8/A9 との結合性が認められなかった)。このように筆者らは、S100A8/A9 にレスポンスのある新規受容体群を同定する幸運に恵まれた。

新規 S100タンパク質受容体群の臓器指向性遠隔転移への重要性

がんの多臓器遠隔転移は従来、原発部位からの血行性あるいはリンパ行性ルートという流路の解析で捉え

られ、がんの系統による転移臓器の特定という“生着”の側面、即ち、特定の“がん系統”により、特定の“転移先臓器”が高い確率で決まるといいうわゆる、“種”と“土”に例えられてきたが¹⁹⁾(図1)、その側面の分子機構の解析は十分に進んでいなかった。緒言で述べたように、S100タンパク質、特にS100A8/A9とその受容体の関係は、“種”と“土”のがんの臓器指向性転移を解く重要な鍵因子として近年注目されている。注目されるに至った大きな要因は、東京女子医科大学の平塚佐千枝先生、丸義朗先生のグループの研究による。S100A8/A9に対するセンサー分子としてがん側の受容体としてToll様受容体4 (TLR4) が機能することが見出された^{20,21)}。後に、SahaらによってRAGEも同様な機能をするが見出されたのである²²⁾。そのため筆者らは、①見出した新規受容体が従来のTLR4やRAGEに比較してがん転移に本当に意味のあるものなのか、②各新規受容体群のがん細胞種あるいは悪性のグレードにおける発現パターンはどうなのか、そして、③新規受容体下流の転移動力供給のシグナル分子機構はどうなのか、について深く理解していこうと考えた。その一連の成果から、④S100-受容体を標的とする最善の転移制御法の創生が実現可能となってくるかもしれない。

上記①の検討には、見出した全ての新規受容体群の発現のあるメラノーマ(マウスメラノーマ株 B16-BL6)を選択し、確立されている肺転移のマウスモデルを用いることとした。この場合、メラノーマが“種”であり、転移先臓器の肺が“土”となる。異物としてのがん細胞が身体の中にあると、それを肺が感知して肺臓器内に炎症反応が惹起され、炎症細胞によるS100A8/A9の産生分泌が充進する。この時、臓器“土”が発するS100A8/A9が“土シグナル (soil signal)”となり、メラノーマ“種”側のS100A8/A9受容体群が“土センサー (soil sensor)”となる。各ドミナントネガティブ受容体を発現させる内因性受容体機能阻害実験から、メラノーマの肺転移には、MCAM, EMMPRIN, NPTN β が重要であることが判明した¹⁸⁾。これら受容体群のがん種、悪性度に応じた発現プロファイリング②と未解明な下流信号伝達③に関しては現在、両解析ともほぼ完了し、どのようながん細胞種にどの受容体が強く発現するか、その発現は悪性度に応じてどのように変動するかが明らかとなってきた。また、転移動力供給に働く未解明であった分子メカニズムもようやく明らかとなってきたのである。論文投稿中であることから、その詳細については別の機会に述べさせて頂きたい。

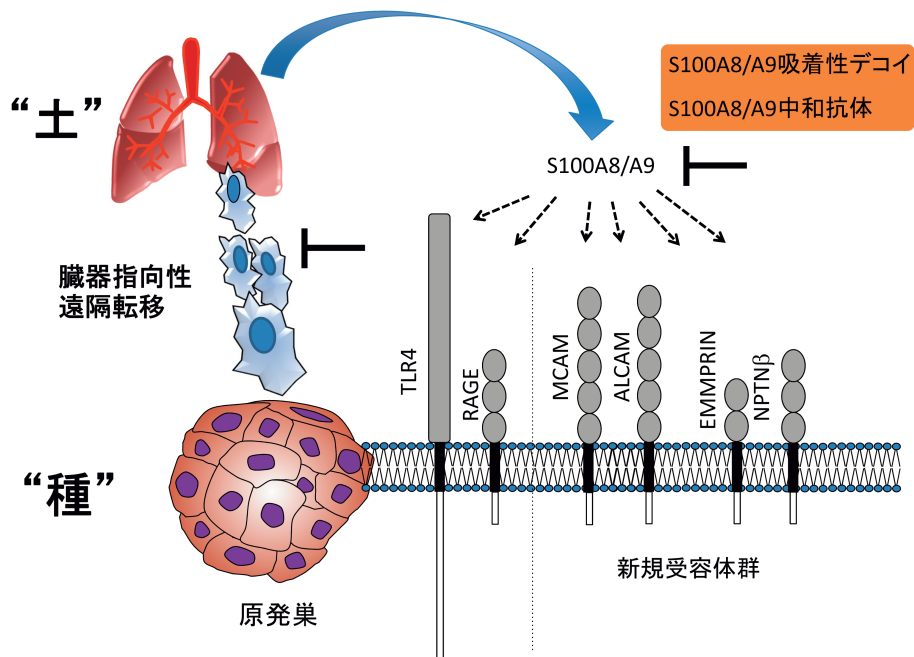


図1 S100-受容体群を標的としたがんの転移抑制

S100-受容体群を標的としたがんの転移抑制

最後に筆者らが現在取り組んでいる S100A8/A9-新規受容体群の連携を遮断する新しい転移制御剤の開発④について紹介する(図1)。新規受容体群の細胞外領域は S100A8/A9の吸着性デコイとして有効である。そこで、血中での安定性を上昇させるためイムノグロブリン IgG2の Fc 部分とそれぞれを融合させたデコイ製剤を開発した(exEMMPRIN-Fc, exNPTN β -Fc, exRAGE-Fc, exMCAM-Fc, exALCAM-Fc)。一般に融合用に用いられているのは、IgG1の Fc であるが、これだと免疫細胞の Fc 受容体に結合し、細胞を刺激することで炎症が強引起こされる(炎症はがんの進展を増強する)かもしれない。そのため Fc 受容体への結合能の極めて低い IgG2の Fc を使用した。さらに、S100A8/A9ヘテロダイマーの選択的認識中和抗体も開発した(クローン AB45:親和性,細胞アッセイ,動物モデル評価を経て最良のものを選択)。開発剤の肺遠隔転移抑制評価に B16-BL6(マウスメラノーマ)と MDA-MB231(ヒト乳がん)を使用した結果、B16-BL6細胞に関して、デコイ製剤では exMCAM-Fc が、そして S100A8/A9抗体(AB45)が非常に強力な転移抑制を示した。一方、MDA-MB231細胞では、S100A8/A9抗体(AB45)よりも S100A8/A9吸着性デコイタンパク質製剤(exEMMPRIN-Fc, exNPTN β -Fc, exMCAM-Fc, exRAGE-Fc, exALCAM-Fc)が、いずれも有意な転移抑制能を示したが、中でも exMCAM-Fc が最も強力な転移抑制効能を示した。さらに4T1(マウス乳がん)を追加して肺転移評価を行ったが、同様に、デコイ製剤では exMCAM-Fc が、そして S100A8/A9抗体(AB45)が強力な転移抑制を示したのである。

転移先臓器の肺で、これら有効な転移遮断剤処理により何が起きているかを検討するため、次世代シーケンサーを用いたマウス肺組織の遺伝子発現網羅解析(RNA seq)を行った。これにより、肺が S100A8/A9によりがん細胞を誘引する相加あるいは相乗的分子メカニズムや転移先臓器の転移しやすい環境作りの分子メカニズムと転移遮断剤によるそれらの抑制現象にも迫ることが可能と考えたからである。この解析には、マウス肺組織における純粋な遺伝子変動を解析するために、マウス B16-BL6や4T1ではなくヒト MDA-MB231を投与した時のマウス肺を用いた。検討

の結果、炎症性サイトカイン、ケモカイン群、それら受容体群の発現抑制が、各遺伝子変動にバリエーションがあるものの効果のあったデコイ製剤 exMCAM-Fc で認められた。興味深いことに、免疫抑制に働く分子の発現抑制も認められた。結論として、メラノーマと乳がんの転移抑制には、S100A8/A9抗体(AB45)と exMCAM-Fc デコイ製剤が有望であることを見出すに至った。

おわりに

未だ有効な治療法の確立していないがんの転移制御にとって、当計画のデコイ製剤、抗体製剤は、これまでの我々の研究成果よりイノベーションに繋がる製剤候補として今後大きく注目されるものと期待している。なぜなら、炎症増悪の負のフィードバックも効率的かつ持続的に遮断するため、他の製剤との組み合わせにより治療成績が格段に向上するものと考えられるからである。また、S100A8/A9の関わる疾患は、がんの転移のみならず、乾癬、アトピー性皮膚炎、神経変性疾患、2型糖尿病、など、広範にわたる。本研究により開発できたデコイ製剤、抗体製剤は、これらの広範な炎症性疾患に対する共通の対策を提供する有用性の高い製剤として今後活躍していくものと期待している。

文 献

- 1) Sakaguchi M, Huh NH : S100A11, a dual growth regulator of epidermal keratinocytes. *Amino Acids* (2011) 41, 797-807.
- 2) Sakaguchi M, Miyazaki M, Inoue Y, Tsuji T, Kouchi H, et al. : Relationship between contact inhibition and intranuclear S100C of normal human fibroblasts. *J Cell Biol* (2000) 149, 1193-1206.
- 3) Sakaguchi M, Miyazaki M, Takaishi M, Sakaguchi Y, Makino E, et al. : S100C/A11 is a key mediator of Ca(2+)-induced growth inhibition of human epidermal keratinocytes. *J Cell Biol* (2003) 163, 825-835.
- 4) Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, Kashiwagi M, Ohba M, et al. : PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J Cell Biol* (2004) 164, 979-984.
- 5) Sakaguchi M, Sonogawa H, Nukui T, Sakaguchi Y, Miyazaki M, et al. : Bifurcated converging pathways for high Ca $^{2+}$ - and TGF β -induced inhibition of growth of normal human keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2005) 102, 13921-13926.
- 6) Sakaguchi M, Sonogawa H, Murata H, Kitazoe M, Futami

- J, et al. : S100A11, an dual mediator for growth regulation of human keratinocytes. *Mol Biol Cell* (2008) 19, 78–85.
- 7) Saho S, Satoh H, Kondo E, Inoue Y, Yamauchi A, et al. : Active Secretion of Dimerized S100A11 Induced by the Peroxisome in Mesothelioma Cells. *Cancer Microenviron* (2016) 9, 93–105.
- 8) Sato H, Sakaguchi M, Yamamoto H, Tomida S, Aoe K, et al. : Therapeutic potential of targeting S100A11 in malignant pleural mesothelioma. *Oncogenesis* (2018) 7, 11.
- 9) Neeper M, Schmidt AM, Brett J, Yan SD, Wang F, et al. : Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* (1992) 267, 14998–15004.
- 10) Sakaguchi M, Murata H, Yamamoto K, Ono T, Sakaguchi Y, et al. : TIRAP, an adaptor protein for TLR2/4, transduces a signal from RAGE phosphorylated upon ligand binding. *PLoS One* (2011) 6, e23132.
- 11) Sakaguchi M, Murata H, Aoyama Y, Hibino T, Putranto EW, et al. : 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* (2014) 289, 23389–23402.
- 12) Slowik A, Merres J, Elfgen A, Jansen S, Mohr F, et al. : Involvement of formyl peptide receptors in receptor for advanced glycation end products (RAGE) — and amyloid beta 1–42—induced signal transduction in glial cells. *Mol Neurodegener* (2012) 7, 55.
- 13) Ichiki T, Koga T, Okuno T, Saeki K, Yamamoto Y, et al. : Modulation of leukotriene B4 receptor 1 signaling by receptor for advanced glycation end products (RAGE). *FASEB J* (2016) 30, 1811–1822.
- 14) Sakaguchi M, Kinoshita R, Putranto EW, Ruma IMW, Sumardika IW, et al. : Signal diversity of receptor for advanced glycation end products. *Acta Medica Okayama* (2017) 71, 459–465.
- 15) Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, et al. : S100A9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cancer Res* (2013) 73, 172–183.
- 16) Sakaguchi M, Yamamoto M, Miyai M, Maeda T, Hiruma J, et al. : Identification of an S100A8 receptor neuropilin- β and its heterodimer formation with EMMPRIN. *J Invest Dermatol* (2016) 136, 2240–2250.
- 17) Ruma IMW, Kinoshita R, Tomonobu N, Inoue Y, Kondo E, et al. : Embigin Promotes Prostate Cancer Progression by S100A4-Dependent and-Independent Mechanisms. *Cancers (Basel)* (2018) 10, pii : E239.
- 18) Ruma IM, Putranto EW, Kondo E, Murata H, Watanabe M, et al. : MCAM, as a novel receptor for S100A8/A9, mediates progression of malignant melanoma through prominent activation of NF- κ B and ROS formation upon ligand binding. *Clin Exp Metastasis* (2016) 33, 609–627.
- 19) Paget S : The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *Cancer Metastasis Rev* (1989) 8, 98–101.
- 20) Hiratsuka S, Watanabe A, Aburatani H, Maru Y : Tumour-mediated upregulation of chemoattractants and recruitment of myeloid cells predetermines lung metastasis. *Nat Cell Biol* (2006) 8, 1369–1375.
- 21) Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, Akashi-Takamura S, Ishibashi S, et al. : The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat Cell Biol* (2008) 10, 1349–1355.
- 22) Saha A, Lee YC, Zhang Z, Chandra G, Su SB, et al. : Lack of an endogenous anti-inflammatory protein in mice enhances colonization of B16F10 melanoma cells in the lungs. *J Biol Chem* (2010) 285, 10822–10831.