

受賞対象論文

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 K, Futami J, Putranto EW, Ruma IMW, 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* (2019) 145, 569-575.

木下理恵

Rie Kinoshita



岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学

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

<プロフィール>

昭和52年生まれ

平成12年3月 岡山大学工学部生物機能工学科卒業

平成14年3月 岡山大学大学院自然科学研究科物質生命工学専攻修了

平成14年4月 大阪大学大学院理学研究科 研究員

平成17年4月 株式会社ビークル 研究員

平成21年10月 桃太郎源株式会社 研究員

平成27年3月 岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻博士課程修了

平成27年4月 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 細胞生物学 助教

現在に至る

研究の背景と経緯

近年、免疫チェックポイント阻害剤をはじめとする画期的ながん治療薬が開発されているが、残念ながら高齢化社会の到来とともに、世界中のがん死亡者数は増加している。その大きな原因の1つが、すべての固形がんに起こりうるがんの転移である。1889年、Paget博士は、がん細胞を“種”，転移先臓器を“土壌”とし、がん細胞には生着そして増殖するための環境が必要だと提唱した¹⁾。がん細胞の転移には臓器指向性があるとしたこの説は、「seed and soil 説」と呼ばれる。そして我々の細胞生物学教室では、阪口政清教授を中心にカルシウム結合タンパク質であるS100タンパク質とその受容体群が、がん細胞の臓器指向性転移において重要な役割をもつと考え、研究を進めてきた。S100タンパク質はヒトでは20種類 (S100A1-A16, B, G, P, Z) が報告されており、様々ながん種において発現の亢進・がんの進展への関与が報告されている。我々の研究室においても昨年度、S100A11タンパク質が膵臓がん²⁾・悪性中皮腫³⁾、S100A8/A9タンパク質 (S100A8とS100A9のヘテロダイマー) がメラノーマ⁴⁾・肺がん⁵⁾を進展させる分子メカニズムについて発表した。特にS100A8/A9に関しては、阪口教授が新規同定

した受容体群 (S100 soil sensor receptors (SSSRs) と命名) に基づいたがん転移のメカニズムの解明を進めている^{6,7)}。新規同定した受容体群は、メラノーマに過剰発現させると、肺転移を有意に促進し、それら受容体の細胞質ドメインを欠損した変異体は、顕著に肺転移を抑制した。我々は、その中でも高い効果を示したEMMPRIN, NPTN β , MCAM, ALCAMの4種類が、がん細胞を転移に向かわせる機能を有する受容体であると考え、これら受容体の細胞外ドメインと抗体のFc領域を融合させたexSSSRs-Fc fusion proteinを作製し、メラノーマ・乳がん細胞のマウス肺転移モデルにおいて、尾静脈投与によりそのがん転移抑制効果を確認した⁸⁾ (図)。

一方、本研究では、S100A8/A9抗体を作製し、S100A8/A9とその受容体群との結合の遮断によるがん転移をターゲットとした治療方法の開発について研究を進めた (図)。

研究成果の内容

1. S100A8/A9抗体のスクリーニング

炎症反応に誘起されて好中球や単球から分泌されるS100A8/A9は、生体内では主にヘテロダイマーとして

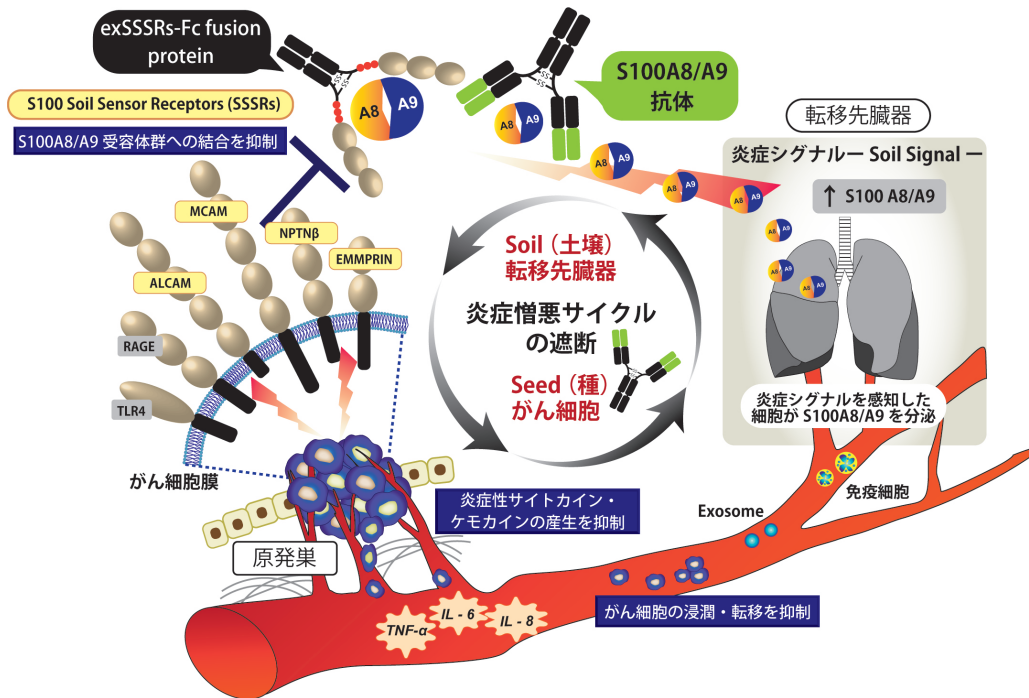


図 がんの転移をターゲットとした治療モデル

機能する。そこで我々は、ヘテロダイマー構造特異的な抗体の取得を目指した。大腸菌内でS100A8, S100A9を同時に発現させることで、モノクローナル抗体の抗原として最適な高純度のヘテロダイマー構造タンパク質を精製した⁹⁾。

高純度S100A8/A9タンパク質は抗原としてマウスに免疫し、得られたS100A8/A9抗体産生ハイブリドーマ160種類の培養上清を用いて、S100A8, S100A9, S100A8/A9のそれぞれのタンパク質に対する親和性の評価を行った。次に培養上清より精製した抗体を用いて、中和抗体のスクリーニングを行った。以前のS100A8/A9と乾癬の研究において、S100A8/A9はヒトケラチノサイトに作用して、炎症性サイトカイン(TNF- α , IL-6, IL-8)の発現を強く促進することを確認している¹⁰⁾。そこでケラチノサイトにS100A8/A9タンパク質と精製S100A8/A9抗体を同時に添加して、炎症性サイトカインの発現をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、10種類の抗体が、高親和性で顕著に炎症性サイトカインの発現を抑制していることを確認した。

2. S100A8/A9中和抗体のin vitro評価(がん細胞走化性の測定)

スクリーニングした10種類の抗体の中和活性について、S100A8/A9が促進するがん細胞の走化性を指標に

検討した。評価に用いたTAXIScan法は、新しいがん細胞走化性測定技術であり、垂直方向のみを評価するボイデンチャンバー法とは異なり、水平方向のがん細胞の移動、方向を評価することが可能である¹¹⁾。我々は、メラノーマ・乳がん細胞・肺がん細胞について検討し、特に走化性を抑制する機能の高い抗体5種類を選抜した。

3. S100A8/A9中和抗体のin vivo評価(マウス肺転移モデル)

In vitroの実験において高い効果を示した5種類の抗体について、ヌードマウスを用いたマウス肺転移モデルでがん転移抑制能を評価した。マウス尾静脈より、マウスメラノーマ細胞(B16-BL6)をS100A8/A9中和抗体50 μ gと同時に投与し、2週間後にCTスキャンにより肺転移を確認した。その結果、In vitroと相関性の高い結果が得られ、特にNo.45の抗体が顕著に肺転移を抑制した。

4. キメラ抗体の作製と評価(マウス肺転移モデル)

中和活性の高いNo.45の抗体について、ヒトIgG2とのキメラ抗体を作製した。CHO細胞において抗体発現量の高い安定発現株を取得し、精製抗体についてマウス肺転移モデルを用いて評価した。キメラ抗体においても有意に肺転移を抑制することを確認し、この抗体のがん転移治療薬としての可能性を示した。

研究成果の意義

2015年、がん細胞の臓器指向性転移について興味深い論文が発表された。がん細胞は、転移先臓器の標的細胞に取り込まれるための目印（インテグリン）を含んだエクソソームを分泌し、転移先の環境を整えており、インテグリンの種類によってその転移先臓器を変化させる。そして、エクソソームが到達した転移先臓器では、各種S100タンパク質の発現が上昇している¹²⁾。別のグループからは、エクソソームにはS100A8/A9の受容体であるMCAMやS100タンパク質が含まれているとの報告もある¹³⁾。近年、がん細胞が転移先臓器に生着する前に、S100A8/A9の主要な供給源の一つである好中球の転移先臓器への集積やそれによるがん転移の促進についても報告があり、S100タンパク質とその受容体との関係はがん転移の過程において重要であるとの報告が蓄積されている。

本研究で作製したS100A8/A9ヘテロダイマー構造特異的な抗体は、治療薬としては、投与のタイミングやヒト化抗体の作製など未だ検討課題も多いが、我々は、分泌タンパク質をターゲットとした新規がん転移治療薬として有用であると期待している。

今後の展開や展望

S100A8/A9は、様々な炎症性疾患との関連が報告されており、我々の研究室においても膿疱性乾癬患者におけるS100A8/A9の血中濃度の上昇とその発症メカニズムについて報告している。このようにS100A8/A9抗体は、汎用性の高さにおいても治療薬として開発を進める強い根拠がある。今後、複数の炎症性疾患モデルについても検討を進め、がん転移および炎症性疾患を対象とした単独および併用生物製剤として開発を進める予定である。

文 献

- 1) Paget S: The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. *Cancer Metastasis Rev* (1989) 8, 98-101.
- 2) Takamatsu H, Yamamoto KI, Tomonobu N, Murata H, Inoue Y, et al.: Extracellular S100A11 plays a critical role in spread of the fibroblast population in pancreatic cancers. *Oncol Res* (2019) Mar 8. doi: 10.3727/096504018X1543316

1908259. [Epub ahead of print].

- 3) 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.
- 4) Chen Y, Sumardika IW, Tomonobu N, Winarsa Ruma IM, Kinoshita R, et al.: Melanoma cell adhesion molecule is the driving force behind the dissemination of melanoma upon S100A8/A9 binding in the original skin lesion. *Cancer Lett* (2019) 452, 178-190.
- 5) Sumardika IW, Chen Y, Tomonobu N, Kinoshita R, Ruma IMW, et al.: Neuropilin- β mediates S100A8/A9-induced lung cancer disseminative progression. *Mol Carcinog* (2019) 58, 980-995.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) Kinoshita R, Sato H, Yamauchi A, Takahashi Y, Inoue Y, et al.: exSSSRs (extracellular S100 soil sensor receptors)-Fc fusion proteins work as prominent decoys to S100A8/A9-induced lung tropic cancer metastasis. *Int J Cancer* (2019) 144, 3138-3145.
- 9) Futami J, Atago Y, Azuma A, Putranto EW, Kinoshita R, et al.: An efficient method for the preparation of preferentially heterodimerized recombinant S100A8/A9 coexpressed in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res* (2016) 6, 94-100.
- 10) Nukui T, Ehama R, Sakaguchi M, Sonogawa H, Katagiri C, et al.: S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem* (2008) 104, 453-464.
- 11) Yamauchi A, Yamamura M, Katase N, Itadani M, Okada N, et al.: Evaluation of pancreatic cancer cell migration with multiple parameters in vitro by using an optical real-time cell mobility assay device. *BMC Cancer* (2017) 17, 234.
- 12) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, et al.: Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* (2015) 527, 329-335.
- 13) Greening DW, Ji H, Chen M, Robinson BW, Dick IM, et al.: Secreted primary human malignant mesothelioma exosome signature reflects oncogenic cargo. *Sci Rep* (2016) 6, 32643.

令和元年5月7日受稿

〒700-8558 岡山市北区鹿田町2-5-1

電話: 086-235-7397 FAX: 086-235-7400

E-mail: rie-k@okayama-u.ac.jp