

主論文

Extracellular S100A11 plays a critical role in spread of the fibroblast population in pancreatic cancers

(膵がん細胞から分泌される S100A11 は、周囲の線維芽細胞に働きかけ、その増殖を促進する)

[緒言]

膵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。当問題に際し我々は、がん細胞が放出する 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現象を見出した。即ち、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。私の研究成果から、膵がん細胞により分泌される S100A11 が線維芽細胞上 RAGE に働きかけ、その下流で MyD88-mTOR-p70S6K の経路を介し、線維芽細胞の増殖を正に制御していることが明らかとなった。当研究で明らかとなった経路の標的化は、膵がんの治療（間質増大の制御）に有効となる可能性があるものと考えている。

[材料と方法]

[細胞株]

細胞株 HEK293T と PK-8 は理研バイオリソース研究センターより購入した。細胞株 A-431、PL45、AsPC-1、PANK-1、BxPC-3 は ATCC より購入した。Wild-type (WT)、RAGE^{-/-}マウス胎児線維芽細胞 (MEF s) は金沢大学・山本靖彦教授より提供された。MyD88^{-/-}マウス線維芽細胞は MyD88^{-/-}ノックアウトマウスをオリエンタルバイオサービスより購入し肺より単離した。

マウス線維芽細胞 (WT、RAGE^{-/-}、MyD88^{-/-}) は、性質を一定にするため、継続培養による自然不死化を行った。これらの細胞はすべて Thermo Fisher Scientific より購入した D/F 培地に FBS を 10% 添加したもので培養した。

[組み換えタンパク質]

S100A11 タンパク質は、岡山大学・二見淳一郎准教授より提供されたものを使用した。

[試薬]

p70 S6K、mTOR 阻害剤として、Cayman Chemical より購入した p70 S6K 阻害剤(PF-4708671)、Merck より購入した rapamycin を使用した。phospho-MAPK array kit は R&D System より購入した。ウサギ抗ヒト S100A11 抗体は当研究室で精製した。マウス抗ヒト S100A11 抗体は MBL、ウサギ抗 S100A6 抗体は Cell signaling、ウサギ抗 Calagranulin A (S100A8) 抗体およびウサギ抗 Calagranulin B (S100A9) 抗体は Santa Cruz、マウス抗 RAGE 抗体は R&D Systems、マウス抗 tubulin 抗体は Sigma-Aldrich、マウス抗線維芽細胞抗体は EMD Millipore、マウス抗 alpha-smooth muscle actin 抗体は DAKO、ウサギ抗 phospho-p70 S6K 抗体、ウサギ抗 p70 S6 kinas 抗体、ウサギ抗 phospho-S6 抗体、マウス抗 S6 抗体、マウス抗 HA 抗体は Cell signaling、ヤギ抗 GST 抗体は GE Healthcare Bio-Sciences より購入した。

[発現プラスミド]

cDNA をクローニングし pIDT-SMART (C-TSC) vector に挿入したものを使用した。

[ウェスタンブロッティング]

ウェスタンブロッティングに使用した抗体は[試薬]項の通りである。

[定量的リアルタイム PCR]

培養細胞を PBS で洗浄し、RNA をニッポンジーンより購入した ISOGEN II Isolation Reagent を用いて抽出した。逆転写は TOYOBO より購入した ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて行った。リアルタイム PCR は Roche Applied より購入した FastStart SYBR Green Master と特異的なプライマー (S100A11, forward primer: tctccaagacagagttcctaagc; reverse primer: atcatgcggtcaaggacac; TBP (internal cont.), forward primer: gaacatcatggatcagaacaaca; reverse primer: atagggattccgggagtcac; Rps6kb1, forward primer: taaaggggctatggaaagg; reverse primer: ttaagcaccttcatggcaaa; Rps6kb2, forward primer: cctggagtgcctcagtgg; reverse primer: atggcccagggctagtgt; Tbp (internal cont.), forward primer: gggagaatcatggaccagaa; reverse primer: gatgggaattccaggagtca) を Roche Applied の LightCycler 480 system II 上で解析した。

[免疫組織染色]

ヒト膵管腺がん組織を 10%ホルマリン溶液で固定化した。パラフィン包埋は取り除き、電子レンジで抗原修復を行った。37°C1 時間で 1 次抗体を反応させ、2 次抗体の Alexa594-結合ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Science) または Alexa488-結合ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Science) も同様に反応させた。この実験は共同研究として川崎医科大学で行われた。

[細胞増殖アッセイ]

EdU 染色ではガラスカバーを敷いた 6well プレートに細胞を 2×10^5 播種し、 37°C 10%FBS 条件下で 24 時間培養後、0%FBS の培地に交換し 24 時間スターブ処理を行った。その後、培地を 0.5%FBS のものと交換し S100A11 を最大 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し 6 時間培養を行った。細胞を回収する 1 時間前に EdU を加えた。EdU 染色は Click-iT™ EdU Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて行い、プロトコルも付随のものを遵守した。

MTS アッセイでは CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega Biosciences) を使用し、96well プレートに 0.5%FBS 条件下で細胞を 1×10^4 播種し、24 時間後最大 $10 \mu\text{g/ml}$ の濃度になるように S100A11 を加え 6 時間培養した。その後のプロトコルは付属のものを遵守した。

[フローサイトメトリー]

$10 \mu\text{M}$ Cell Trace Violet (CTV) (Thermo Fisher Scientific) でマウス線維芽細胞を標識した。

プロトコルは付属のものを遵守した。GFP 高発現 PK-8 クローンを 1×10^5 、標識したマウス線維芽細胞を 1×10^5 共培養し、最大 48 時間後まで培養を続けた。フローサイトメトリーは MACS Quant Analyzer (Miltenyi Biotec GmbH) を用いて行い、ソフトウェアは MACS Quantify Software Ver. 2.5 (Miltenyi Biotec GmbH) を使用した。

データ解析は FlowJo software (FlowJo, LLC, BD Biosciences) を使用した。

[結果]

[膵管腺がんは S100A11 を活発に分泌する]

膵管腺がんを用いて免疫染色を行い、がん組織中で S100A11 の発現が、間質と比べがん細胞で高いことが分かった。

細胞株を用いて定量的リアルタイム PCR を行ったところ、ヒト膵管腺がん株 (PK-8、PL45、AsPC-1) で S100A11 の発現が顕著であった。また、ヒト正常線維芽株 OUMS-24 においても HEK293T と比べ高い発現を示した。ウェスタンブロッティングにおいても同様に膵管腺がん株で S100A11 の高発現を示したが、細胞外への分泌においてはヒト線維芽細胞 OUMS-24 では見られない結果となった。また、他の膵管腺がんで発現亢進の報告のある S100 タンパク質 (S100A6、S100A8、S100A9) についても検討したが、これらはいずれも顕著な分泌を示さなかった。また S100A11 の受容体として知られる RAGE の発現は、ヒト膵管腺がん株とヒト線維芽細胞間で大きな変化が認められなかった。

次のがん組織中間質線維芽細胞への細胞外 S100A11 の作用を調べるため、次の実験を行った。組み換え S100A11 タンパク質を用いて線維芽細胞を刺激し、MTS アッセイを行ったところ濃度依存的増殖能の増強が観察された。EdU 染色を行ったところ、 $10 \mu\text{g/ml}$ 、6 時間の条件で最も高い DNA 合成の結果となった。当結果は、別の線維芽細胞株 NIH/3T3 でも同様となるこ

とが確認された。さらに、他の S100 タンパク質 (S100A6、S100A8、S100A9) と比較したところ、S100A11 が最も高い増殖誘導能を示すことも明らかとなった。一方、S100A11 による増殖誘導は、膵管腺がん株に対しては観察されなかった。従って、我々は、膵管腺がんによって分泌される S100A11 が、がんを取り巻く線維芽細胞上の RAGE を介した増殖のトリガーになっているのではないかという仮説を立てた。

[線維芽細胞における S100A11-RAGE 経路は、線維芽細胞の増殖促進を介して膵管腺がんの進展に寄与する]

膵管腺がんと間質の進展における線維芽細胞の S100A11-RAGE 経路の役割を調べるため、野生型マウス線維芽細胞 (WT fibroblast) または RAGE ノックアウトマウス線維芽細胞 (RAGE^{-/-} fibroblast) を PK-8 と 1:1 の比で混ぜてマウスの皮下に移植した。線維芽細胞単独で移植したものは増殖せず、PK-8 単独で移植したものは極めて遅い増殖の結果となった。しかし線維芽細胞と PK-8 を混ぜて移植した腫瘍は活発に増殖することが判明した。次に、膵管腺がんの増大における線維芽細胞上の RAGE の役割を調べるため同様の実験を行った。結果、線維芽細胞上の RAGE の有無によって腫瘍サイズに変化があり、RAGE^{-/-}のものでがんの進展の遅延が生じた。興味深いことに、免疫組織化学染色にて摘出腫瘍を染色したところ、腫瘍中の線維芽細胞の数が、WT との比較において RAGE^{-/-}で顕著に減少していることが明らかとなった。

次に、線維芽細胞の増殖が S100A11-RAGE 経路によって増強されるかどうか確かめるために、マウス線維芽細胞 (WT、RAGE^{-/-}) と PK-8 親株あるいは S100A11 を過剰発現させた PK-8 との共培養を行った (PK-8 はいずれも GFP で標識)。当実験系で線維芽細胞の正確な増殖活性を測定するため、共培養を行う前に線維芽細胞を Cell Trace Violet (CTV) で標識した。このことから、フローサイトメトリーによる分裂状況のモニタリングが可能となった (細胞が分裂ごとに CTV の蛍光が減少するため、細胞分裂が盛んなほど低い蛍光を示す)。標識した線維芽細胞と PK-8 クローンは CTV と GFP の蛍光によって区別された。実験開始 2 日後、線維芽細胞 (WT) は、S100A11 過剰発現 PK-8 と共培養することで、GFP 過剰発現 PK-8 との共培養と比べて明らかに増殖が活発となっていた。一方、RAGE^{-/-}線維芽細胞では分裂が減少していた。

[線維芽細胞の S100A11-RAGE シグナルは MyD88 を介して持続的に p70 S6K を活性化する]

どのように S100A11 が、RAGE を介して線維芽細胞の増殖を制御しているのか調べるため、重要キナーゼのスクリーニングを、アレイ解析により行った。結果、p70 S6K のリン酸化が WT マウス線維芽細胞で増加していることに気が付いた。以前の我々の研究で TIRAP と MyD88 タンパク質が RAGE の細胞質領域にリクルートされ、RAGE の多様なシグナル伝達の制御を行なっていることを見出し報告した。そこで、MyD88 が p70 S6K の活性化に重要かどうかを検討するため、3 種類のマウス線維芽細胞 (WT、RAGE^{-/-}、MyD88^{-/-}) を準備した。マウス線維芽細胞 3 種を S100A11 で刺激した結果、刺激後 3 時間から 24 時間の間 WT で p70 S6K の持続的リン酸化がみられた。一方 RAGE^{-/-}では 3 時間では、リン酸化が観察されたが、それ以降見られなかった (活性化の持続性がないことが判明)。MyD88^{-/-}では、p70 S6K のリン酸化がほとんど誘導されなかった。また、p70 S6K 遺伝子 (Rps6kb1、Rps6kb2) の発現状態を定量的リアルタイム

ム PCR で確認したが、S100A11 刺激の有無にかかわらず WT、RAGE^{-/-}で変動がなかった。

S100A11-RAGE による p70 S6K の活性化制御への MyD88 の重要性を確認するため、MyD88^{-/-}細胞に MyD88 を再導入する回復実験の検討を行なった。結果、MyD88^{-/-}細胞では S100A11 刺激でリン酸化が誘導されなかったが、MyD88 を発現させた細胞においては、これを回復することが可能となった。

[MyD88 は線維芽細胞増殖を引き起こす mTOR-p70 S6K のカスケードの活性化に寄与する]

MyD88 と p70 S6K 間の関係を補足するため、in vitro kinase アッセイを行った。この結果、S6K によってリン酸化を受ける S6 リボソームのリン酸化が、添加した MyD88 タンパク質濃度依存的に増加した。またこれらのリン酸化反応は p70 S6K 阻害剤、mTOR 阻害剤 (rapamycin) によって減少した。これらの結果から、MyD88-p70 S6K シグナルの流れの中に mTOR が存在していることが示された。

最後に、線維芽細胞の増殖における S100A11-RAGE-MyD88-mTOR-p70 S6K 経路の重要性を検討した。当検討では、EdU 染色法 (DNA 合成を評価) を用いた。WT 線維芽細胞では S100A11 刺激によって DNA 合成が活発となるが、RAGE^{-/-}線維芽細胞ではこの反応が消失していた。さらに、MyD88^{-/-}線維芽細胞では S100A11 の刺激の有無に関わらず DNA 合成の消失が引き起こされた。さらに、WT 線維芽細胞を p70 S6K 阻害剤、あるいは、mTOR 阻害剤で処置したところ、S100A11 による DNA 合成の活性化が顕著に抑制される結果となった。

[考察]

膀胱線がんでよく見られる間質増大現象は、がん治療を考える上で非常に重要である。薬の治療抵抗性を産むこと (膀胱線がんを治療する際に薬の輸送を妨げる)、がんの転移促進に働くこと、等が指摘されている。そこで当研究では、膀胱線がんの間質において約 90% を占める線維芽細胞増殖のメカニズムに焦点を当てた。我々は以前に S100A11 ががん細胞 (扁平上皮がん、中皮腫、膀胱線がん) から活発に分泌され、細胞膜上に存在する RAGE を介して扁平上皮がんと中皮腫の増殖を上昇させる結果を得た。しかし、当時の研究では、がん細胞から周囲の間質、特に線維芽細胞への S100A11 の作用については検討していなかった。今回の実験から、S100A11 は線維芽細胞を、RAGE を介して刺激し、増殖促進に働く現象をはじめて明らかにすることができた。そのメカニズムには、RAGE 下流 TIRAP/MyD88-mTOR-p70S6K のカスケードが大きく関係していた。MyD88 は、PI3K をリクルートし、AKT を活性化することが知られている。我々も以前の研究からそれを証明するに至っている。このことから、MyD88 は AKT を介して mTOR-p70S6K のカスケードを活性化しているものと考えられた。

我々のデータで、S100A11 過剰発現 PK-8 と共培養した線維芽細胞 WT 群では、GFP 過剰発現 PK-8 (コントロール) との群に比べ分裂が活発に行われたにもかかわらず、RAGE^{-/-}群では増殖能が大きくは減少しなかった。これは、RAGE^{-/-}線維芽細胞でも S100A11 による p70S6K の活性化が、一過性ではあるが、誘導されたことによるものと考えている。では、RAGE の他に S100A11 に反応する受容体が存在するのだろうか? 我々はこれまで、他の S100 ファミリータンパク質である S100A8、S100A9 のヘテロ二量体 S100A8/A9 と反応する受容体群 (MCAM、

ALCAM、EMPRIN、NPTN) の同定に成功している。興味深いことに、RAGE^{-/-}細胞で MCAM の発現が顕著に増加している現象を見出した。当知見から MCAM が RAGE の代替経路として働いている可能性を考えている。

当研究において、膵管線がんにおける線維芽細胞のソースとしての間葉系幹細胞の存在も忘れてはいけない。最近の我々の研究で、膵管線がん細胞から amphiregulin (AREG) の分泌が、間葉系幹細胞との共培養で顕著に増加することを報告した。S100A11 は、RAGE を介して AREG を誘導し、さらに AREG は S100A11 を誘導する (我々の以前の成果)。これらのことから、間葉系幹細胞の働きより膵管線がんでは、分泌 S100A11 と AREG 間でのオートクラインフィードバックループが形成されるのではないかと考えている。このように間葉系幹細胞も、膵管線がんの S100A11 の分泌と誘導の役割を担って線維芽細胞を次々に増殖活性化状態にしているものと考えている。

最後に、膵管線がんの治療標的として今回我々が同定したパラクライン経路について論じる。経路の中で特に mTOR を標的とすることは、膵管線がん細胞、そして、その周囲の線維芽細胞の増殖を同時に抑制するという意味で良いかもしれない。①S100A11-RAGE 経路以外のリガンド-受容体によって引き起こされる複数のシグナルカスケードが mTOR の活性化につながり、がん細胞の増殖促進に働くことが知られていること、さらに、②大腸がんでの例ではあるが、大腸がん間質線維芽細胞の増殖促進に mTOR 分子が大きな働きを持つことが報告されていること、そして、実際に、③mTOR 阻害が、動物モデルの実験系において線維症を抑えるのに有効であったことが報告されていること、が理由である。これらをまとめて、mTOR 阻害が、治療困難な膵管線がんへの有効な手立てになるものと考えられた。

[結論]

今回の我々の結果から、膵管線がんによって分泌される S100A11 が周囲間質線維芽細胞の RAGE-MyD88-mTOR-p70 S6K 経路を活性化することで、線維芽細胞の増殖を促し、がん間質増大を誘導しているものと考えられた。S100A11-RAGE 経路を標的とすることで、治療困難な膵管線がんの新たな対策を打ち立てることが可能となってくるものと期待している。