

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名 : (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名 : (日本語) がんの転移をターゲットとした新しい治療法の開発
(英語) Innovative approach to prevent cancer metastasis
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・准教授・阪口 政清
(英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Masakiyo Sakaguchi
- 実施期間 : 平成 28 年 9 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) 新規がん転移制御性タンパク質製剤の調製と効能の評価
(英語) Development of innovative biologics on cancer metastasis
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・准教授・阪口政清
(英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Masakiyo Sakaguchi
- 分担研究 開発課題名 : (日本語) 転移先臓器の病理解析による開発製剤の効能評価および生体内正常臓器群
に対する副作用(毒性)の顕微レベルでの解析・評価
(英語) Microscopy of cancer metastasis
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名 : (日本語) 国立大学法人新潟大学大学院 医歯学総合研究科・教授・近藤 英作
(英語) Niigata University Graduate School of Medical and dental
Sciences, Professor, Eisaku Kondo

分担研究 (日本語) がん細胞転移の動物モデルの作成と開発製剤の効能評価
開発課題名: (英語) Cancer metastasis in animal model

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・教授・豊岡 伸一
所属 役職 氏名: (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Professor, Shinichi Toyooka

分担研究 (日本語) がん細胞転移の動物モデルの作成と開発製剤の効能評価
開発課題名: (英語) Cancer metastasis in animal model

研究開発分担者 (日本語) 岡山大学病院・助教・枝園 和彦
所属 役職 氏名: (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Assistant Professor, Kazuhiko Shien

分担研究 (日本語) 炎症性サイトカイン誘導のタンパク質レベルでの解析とデータベース作成
開発課題名: (英語) Analysis of inflammatory cytokines

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科・准教授・富田 秀太
所属 役職 氏名: (英語) Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and
Pharmaceutical Sciences, Associate Professor, Shuta Tomida

分担研究 (日本語) 炎症性サイトカイン誘導の mRNA レベルでの解析とデータベース作成
開発課題名: (英語) Analysis of inflammatory cytokines

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人群馬大学大学院 理工学府・准教授・井上 裕介
所属 役職 氏名: (英語) Division of Molecular Science, Gunma University, Associate
Professor, Yusuke Inoue

分担研究 (日本語) がん細胞浸潤、遊走の in vitro 評価
開発課題名: (英語) Cancer migration and invasion in vitro

研究開発分担者 (日本語) 学校法人川崎医科大学・教授・山内 明
所属 役職 氏名: (英語) Faculty of Medicine, Kawasaki Medical School, Professor, Akira
Yamauchi

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

1. 新規がん転移制御性タンパク質製剤の調製と効能の評価： 先行シーズとして獲得している 10 種の S100A8/A9 中和抗体候補を発現するハイブリドーマを無血清培養へ馴化し、In vitro, In vivo 実験のために大量調製を行った。各クローンの培養上清を回収し、ProteinG カラムにより精製を行いすべてのクローンについて数ミリグラムのタンパク質を調製した。CBB 染色による純度検定を行ったところ、目的タンパク質以外のバンドは全く検出されず、高純度で精製抗体が調製されていることを確認した。5 種の高純度 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) は、既に調製済みである。
2. 転移先臓器の病理解析による開発製剤の効能評価： 転移モデルにおける開発製剤の効能の病理評価に先立って、ヒトメラノーマ、肺がん、乳がんにおける S100A8/A9 受容体群のプロファイリングを行った。ヒトメラノーマでは EMMPRIN と MCAM が、肺がんでは NPTN β が、乳がんでは MCAM が高い発現を示した。
3. がん細胞転移の動物モデルの作成と開発製剤の効能評価： 転移モデルには、マウスにおける肺転移が報告されているがん細胞株として、B16-BL6 (メラノーマ)、A549 (肺がん)、MDA-MB231 (乳がん) を用いた。メラノーマは黒色により転移の有無を容易に判定できたが、A549 と MDA-MB231 細胞は、その判定が困難であったため、GFP 安定発現株を作成した。B16-BL6 細胞の肺転移モデルにおいて、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) は、いずれも優位な転移抑制能を示した。A549 と MDA-MB231 細胞については、論文に記載のある方法で肺転移モデルの作成を進めているが、現時点ではマウス肺転移が認められず、モデル作成にさらなる検討を重ねている。
4. 炎症性サイトカイン誘導の解析： 先行シーズとして獲得している 10 種の S100A8/A9 中和抗体から、S100A8/A9 受容体下流信号伝達を強く抑制する抗体を選抜した。S100A8/A9 により強く炎症性サイトカインが誘導されるヒトケラチノサイトを用いて、各抗体の S100A8/A9 シグナルの抑制効果を炎症性サイトカインの mRNA 発現量を指標に評価した。その結果から特に抑制力の高い抗体 5 種 (S100A8 に反応する抗体 1 種、S100A9 に反応する抗体 2 種、S100A8/A9 複合体にのみ反応する抗体 2 種) を選抜した。これら抗体は、下記 (5) で選抜した抗体と一致した。
5. がん細胞浸潤、遊走の in vitro 評価： 先行シーズとして獲得している 5 種の 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) はいずれも、S100A8/A9 誘導性のがん細胞の遊走を優位に抑制することを確認した。特に exEMMPRIN-Fc と exNPTN β -Fc は、3 種のがん細胞に共通して高い効果を示した。先行シーズとして獲得している 10 種の S100A8/A9 中和抗体に関しても、同様の検討を行い、特に高い効果を示した 5 種 (S100A8 に反応する抗体 1 種、S100A9 に反応する抗体 2 種、S100A8/A9 複合体にのみ反応する抗体 2 種) を選抜した。これら抗体は、下記 (5) で選抜した抗体と一致した。

Establishment of advanced medicines for regulating metastasis is strongly desired because cancer metastasis is the most serious problems for cancer processes. As an interesting feature of cancer metastasis, cancer cells frequently show organ specific metastasis, by which, "seed and soil" theory has been proposed. In this theory, cancer cells stand for "seed" and its favorite distant organ shows "soil". It has been compiled growing mass of evidence that S100A8/A9 as a soil signal has significant role in organ specific metastasis of cancer cells through the binding with diverse receptors such as Toll-like receptor 4 (TLR4) and advanced glycation endproducts (RAGE), as soil sensors. In addition to them, we further succeeded to identify another important receptors, EMMPRIN, NPTN α , NPTN β , MCAM and ALCAM. Among these, we especially focused on EMMPRIN, NPTN β and MCAM, since functional inhibition of them in melanoma cells made cells to lose their metastatic ability headed to lung organ. Hence, these novel molecules might become promising therapeutic targets.

1. Development of innovative biologics on cancer metastasis

We prepared S100A8/A9 inhibitory biologics such as decoy proteins (exEMMPRIN-Fc, exNPTN β -Fc, exMCAM-Fc, exALCAM-Fc and exRAGE-Fc) and 10 kinds of S100A8/A9-neutralizing antibody. We confirmed that the purity of each protein prepared in our project was significantly high by checking protein band in each on the CBB-stained SDS-PAGE gel.

2. Microscopy of cancer metastasis

We studied expression patterns of S100A8/A9 receptors in human cancer specimens. EMMPRIN and MCAM were detected in human melanoma tissues at significant level. NPTN β was detected in metastatic lung cancers. In metastatic breast cancer tissues, MCAM was remarkably stained.

3. Cancer metastasis in animal model

We found that exEMMPRIN-Fc, exNPTN β -Fc, exMCAM-Fc, exALCAM-Fc and exRAGE-Fc showed highly suppressive effects on B16-BL6 melanoma metastasis to lung area. For another cell lines, A549 and MDA-MB231, we are still in establishing reliable metastatic models.

4. Analysis of inflammatory cytokines

Through expression analysis of inflammatory cytokines, IL-6, IL-8 and TNF α , which are induced in human keratinocytes in response to S100A8/A9 stimulation, we determined 5 kinds of S100A8/A9 neutralizing antibody as much effective antibodies to suppress the cytokine-induction from the 10 candidates.

5. Cancer migration and invasion in vitro

The prepared decoy proteins (exEMMPRIN-Fc, exNPTN β -Fc, exMCAM-Fc, exALCAM-Fc and exRAGE-Fc) showed preventive function in all on S100A8/A9-mediated cancer migration. In addition, we found that the selected 5 antibodies showed significantly higher effects on cancer migration. The result was similar to that observed in suppressive effect of inflammatory cytokines.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 14 件)

1. 阪口政清、木下理恵、村田 等、山本健一、許 南浩、日比野利彦, 転移先を感知する受容体群, Topics from special edition, 特集がん幹細胞の鍵シグナル, 月刊「細胞」通巻 648 号, 第 49 巻第 3 号 (2017 年 3 月号)、ニューサイエンス社出版
2. 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)
3. 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)
4. Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Kato R, Oyama A, Nagahara T, Iwamuro M, Horiguchi S, Tsutsumi K, Mandai M, Mimura T, Wada N, Takeuchi Y, Kuwaki K, Onishi H, Nakamura S, Watanabe M, Sakaguchi M, Takaki A, Nouse K, Yagi T, Nasu Y, Kumon H, Okada H. Promising therapeutic efficacy of a novel REIC/Dkk-3 expressing adenoviral vector for hepatocellular carcinoma, *J Gastroenterol Hepatol*. 2017. (in press)
5. Suzawa K, Shien K, Peng H, Sakaguchi M, Watanabe M, Hashida S, Maki Y, Yamamoto H, Tomida S, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Nasu Y, Kumon H, Miyoshi S, Toyooka S. Distant Bystander Effect of REIC/DKK3 Gene Therapy Through Immune System Stimulation in Thoracic Malignancies, *Anticancer Res*. 37: 301-307, 2017.
6. 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, 2016.
7. 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.
8. 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- β and its heterodimer formation with EMMPRIN, *J Invest Dermatol*. 136: 2240-2250, 2016.
9. Sawahara H, Shiraha H, Uchida D, Kato H, Nagahara T, Iwamuro M, Kataoka J, Horiguchi S, Watanabe M, Sakaguchi M, Takaki A, Nouse K, Nasu Y, Kumon H, Okada H. Novel REIC/Dkk-3-encoding adenoviral vector as a promising therapeutic agent for pancreatic cancer, *Cancer Gene Ther*. 23:278-283. 2016.

10. 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- κ B and ROS formation upon ligand binding, Clin Exp Metastasis. 33: 609-627, 2016.
11. Oka T, Kurozumi K, Shimazu Y, Ichikawa T, Ishida J, Otani Y, Shimizu T, Tomita Y, Sakaguchi M, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Date I. A super gene expression system enhances the anti-glioma effects of adenovirus-mediated REIC/Dkk-3 gene therapy, Sci Rep. 6: 33319, doi:10.1038/srep33319, 2016.
12. 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, 2016.
13. 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, 2016.
14. 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, 2016.
15. Suzawa K, Toyooka S, Sakaguchi M, Morita M, Yamamoto H, Tomida S, Ohtsuka T, Watanabe M, Hashida S, Maki Y, Soh J, Asano H, Tsukuda K, Miyoshi S. Antitumor effect of afatinib, as a HER2-targeted therapy, in lung cancers harboring HER2 oncogene alterations, Cancer Sci. 107: 45-52, 2016.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Eisaku Kondo, Ken Saito, Hidekazu Iioka, Masakiyo Sakaguchi. Interaction between Pancreatic cancer cells and MSC for cancer progression 浸潤性膵管癌におけるがん-間質相互反応の増殖・浸潤における役割. 第75回日本癌学会学術総会. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2016年10月6日
2. Hidekazu Iioka, Ken Saito, Masakiyo Sakaguchi, Eiichi Morii, Eisaku Kondo. "The cell polarity regulator Crumbs3 promotes adenocarcinoma metastasis through the regulation of glycolipid dynamics 細胞極性制御因子 Crumbs3 は糖脂質動態を制御することで腺癌の転移を促進する. 第75回日本癌学会学術総会. The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 横浜. 2016年10月6日
3. Rie Kinoshita, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Eisaku Kondo, Nam-Ho Huh, Masakiyo Sakaguchi. 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. 横浜. 2016年10月8日

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願

国際出願 : PCT/JP2016/79219