# 好中球による血液循環性腫瘍細胞の変容機構の解明

京都大学ウイルス・再生医科学研究所
助教　水谷 龍明

（共同研究者）
京都大学ウイルス・再生医科学研究所　　助教　竹本 経緯子

## はじめに

転移がんは、いまだに治療困難で、がん関連死亡の主要原因である。研究代表者らは、結核性慢性炎症の機構を研究する中で、好中球が発現するS100A9が「肺における単球の高密度集積」を制御することを先行論文で示した[1]。がん転移プロセスにおいても、転移先臓器における「転移ニッチやコロニー形成」は、重要なステップでありながら、その分子機序がわかっていない。また、乳がんの肺転移を積極的に支持する好中球の役割が近年示されたことで、これまで注目されてこなかった「好中球によるがん悪性化経路」が俄かに脚光を浴びている。そこで本研究では、先行研究から得られた知見を切り口にして、「好中球S100A9に依存したがん転移機序」の解明を目指した。S100A9は、障害を受けた細胞から放出される細胞障害性分子パターン（Damage-associated molecular patterns；DAMPs）に分類される分子であり、様々な病態における予後予測因子として期待されている。実際に、複数のがん種においては、血中S100A9濃度とがんの悪性度に正の相関性があることが分かっており、S100A9とがん悪性化には何らかの因果関係が推定される。しかしながら、S100A9によるがんの悪性化機序は、未だ不明な点が残されている。DAMPsとして細胞外に放出されたS100A9は、同じくS100ファミリーに属するS100A8とヘテロ二量体（calprotectin）を形成し、TLR4やRAGEといった受容体と結合し、周囲の細胞を刺激し、サイトカインやケモカインと類似した活性を有することが知られている。しかしながら、CalprotectinがTLR4のorthosteric siteに結合しないことや、TLR4やRAGEに加えて複数のS100A9受容体が生体内には存在することが分かっている。さらに、S100A9を発現する細胞種は、好中球に加えて、一部のがん細胞においても検出される。従って、S100A9は、細胞レベル（放出する細胞種と受容する細胞種）、分子レベル（多様な受容体）において複雑なネットワークを形成しうる。実際、従来のがん研究においては、がん細胞由来のS100A9に着目した研究が進められてきたが、同じがん腫でさえ表現型が異なる結果が得られており、S100A9のがん悪性化に対する機能解析は混沌としている。

## 結　果

### 【1】S100A9遺伝子欠損マウスを利用したがん転移モデルの解析

S100A9遺伝子欠損マウス（SA9KO）は、研究代表者らが前年までに樹立しており、担がん実験の対照群としては、同週齢（8～10週齢）同性別の野生型マウス（C57BL/6、以下WT）を使用した。マウスがん転移モデルについては、前述のS100A9多機能性を考慮し、S100A9低発現ないし非発現がん腫として知られている悪性黒色腫を用いて樹立した。はじめに、マウス悪性黒色腫株B16F10が、ヒト黒色悪性腫瘍と同じく、*in vitro*（RPMI/10%FBS培養細胞）、*in vivo*（SA9KOに皮下接種2週間後の接種部位がん組織）において、S100A9発現が顕著に低く、Western blottingにおいて検出できないレベルであることを確認した。その後、マウス皮下にB16F10を接種し、3週間後の接種部位（原発巣）及び転移先臓器（肺、肝臓、リンパ節）について病理学的解析を行った。原発巣のがん成長速度は、WTとSA9KO間に有意な差は観察されなかったが、肺への転移イベントがWTに比べてSA9KOで減少した。一方で、肝臓やリンパ節転移に有意な差は観察されなかった。さらに、GFP遺伝子を導入したB16F10$^{GFP}$株を樹立し、上記と同様の転移モデル実験を行ったところ、肺に転移したGFP陽性がん細胞が、SA9KOマウスで顕著に減少した。これらの結果から、S100A9によるB16F10肺転移促進機能が示唆された。

### 【2】血液循環性がん細胞の解析

S100A9によるB16F10肺転移促進の機序解明の端緒として、血液中のがん細胞と好中球に着目した。先行研究[(2)]を参考にして、血管循環性がん細胞の解析を試みたが、技術的障壁により十分な解析結果が得られていない。一方、血中で転移性がん細胞を支持すると考えられる成熟好中球に対する解析は、予定通り、網羅的発現遺伝子解析を実施するに至り、S100A9依存的がん転移制御分子の特定に着手した。

### 【3】好中球S100A9依存的発現遺伝子プロファイルによるがん変容因子の解析

マウス抹消成熟好中球（CD11b+CD11c-F4/80-Ly6G+）は、セルソーターを介さず、生体から迅速に回収する手法を利用したことで、RNAseqに耐えうる高品質RNAを得ることに成功した。野生型とSA9KO成熟好中球を用いたビッグデータ解析は、共同研究者によって実施された。その結果、従来全く知られていなかったS100A9依存性遺伝子群と、それらに関連付けられる生物学的経路が検出された。具体例としては、特定のケモカインファミリーの発現低下がA9KO好中球で見出された。

### 【4】原発巣がん微小環境の解析

RNAseq解析からは、ケモカインファミリー以外にも、好中球特異的機能を制御する分子XがS100A9によって制御されていることが明らかとなった。得られた好中球機能分子X

は、血中のみならず原発巣がん細胞に直接作用しうることが推察されたので、原発巣において分子Xにより転移能が誘導される可能性について追求した。がんが血管内に移行する前の原発巣がん細胞として、B16F10皮下接種後２週間経過した原発巣を、野生型又はSA9KOマウスからそれぞれ分取し、転移に関わる遺伝子群の発現レベルをリアルタイムqRT-PCRを用いて検討した。その結果、SA9KOマウスに接種したがん細胞において、上皮間葉移行（Epithelial mesenchymal transition、EMT）に関連した遺伝子の発現異常が検出された。見出した好中球機能分子XによるEMT制御について現在検討を重ねているが、S100A9依存的に原発巣のがん細胞が転移に適した表現型を獲得する機構があることは明らかとなった。また、RNAseq解析結果から、SA9KO好中球においてケモカイン遺伝子群の発現低下が確認されたことを受け、がんに浸潤した免疫細胞頻度についてフローサイトメトリーを用いて解析した。S100A9高発現好中球やNK細胞のがん浸潤度は、野生型とSA9KO間に統計的有意差は生じなかったが、がん随伴性マクロファージ（Tumor-associated macrophages、TAM）の顕著な浸潤低下がSA9KOで観察された。TAMは、血管新生や免疫抑制、腫瘍の浸潤転移を促進する機能を有する。さらに、B16F10原発巣におけるTAMについて、その発現遺伝子プロファイルを解析したところ、A9KO-TAMでは、IL-10といった抗炎症性サイトカインの有意な発現低下が観察された。

＊上記の結果にかかる図表は、投稿予定の論文に示されるものであり、重複を避けるために掲載を省略した。

## 考　察

好中球によるがんの転移促進機序については、複数の経路が提案されている。例えば、好中球が産生するROSによるがん細胞変容、好中球が産生するBv8, MMP9, VEGFによる血管新生誘導、そしてNETsを介したがん細胞の増殖・転移促進などが挙げられる[(3)]。我々の高純度好中球試料を用いたRNAseqからは、ROS産生経路や血管新生、NETs誘導に関わる因子群は特定できておらず、上記の経路以外で、S100A9により転移が促進されると推察される。今後は、B16F10原発巣のEMTを制御しうる好中球機能分子Xを切り口にして、がんの変容機序解明を目指す。転移初期段階ともいえる原発巣におけるがん変容において、S100A9依存的制御経路の解明は、がん治療戦略に重要な知見をもたらす。

研究代表者の先行研究から、S100A9によるマクロファージ変容機序が分子レベルで示されている（論文投稿中）。本研究では、がんに浸潤したTAMについて、WTとSA9KO間でIL-10産生といった質的変化が観察された。S100A9依存的に誘導されたIL-10産生型TAM誘導と、転移促進機能との結びつきは、今後検証を行う予定であるが、IL-10によるがん助長機能を示した既報などを鑑みると、S100A9によるIL-10産生型TAM誘導が、がん転移と密接な関連にあることが容易に推定できる。さらに興味深いことに、現状までの解析では、

骨髄マクロファージを*in vitro*培養し、様々な刺激を加えたとしても、IL-10産生という観点において、野生型とSA9KO間に顕著な差は得られていない。さらに研究代表者の研究では、好中球とマクロファージの直接的相互作用により、マクロファージの機能が高度に制御される事実を掴んでいる。従って、がん微小環境においても、好中球とTAMの特殊な相互作用が生じることで、TAMの質的変容が生じ、結果として、がん細胞の転移につながる経路が想定される。こうした細胞間ネットワークの分子機序は、がん転移を効果的に抑える薬剤開発にとって、重要な知見となり得る。

## 要　約

研究代表者らは、これまで結核の持続感染の病態解析を通して、肺炎症組織を形成する鍵分子として、S100A9を特定した。結核持続感染とがんの病態アスペクトは複数の一致点があることに研究代表者は着目し、結核研究の成果をがん研究に発展させる可能性を本研究で探った。とりわけ、がん転移に関わる役割を探索した結果、S100A9の役割として、１）マウス悪性黒色腫の肺転移促進機能、２）がん微小環境におけるTAM浸潤度の調節、３）がんの悪性化に寄与する好中球発現遺伝子の制御に関与することが明らかとなった。今後は、S100A9による好中球の質的変化のメカニズムを追求するともに、それによって生じるがんの転移能獲得機序に至る一連の経路を同定することで、上記の１）～３）の連続性を見出し、S100A9を基点とした転移促進機序の全貌を解明する。

## 文　献

1. Y Yoshioka, T Mizutani, S Mizuta, A Miyamoto, S Murata, T Ano, H Ichise, D Morita, H Yamada, Y Hoshino, T Tsuruyama and M Sugita、Neutrophils and the S100A9 protein critically regulate granuloma formation、*Blood Advances*、1：184 − 192、2016
2. BM Szczerba, F Castro-Giner, M Vetter, I Krol, S Gkountela, J Landin, MC. Scheidmann, C Donato, R Scherrer, J Singer, C Beisel, C Kurzeder, V Heinzelmann-Schwarz, C Rochlitz, WP Weber, N Beerenwinkel and N Aceto、Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression、*Nature*、566：553 − 557、2019
3. S Jaillon, A Ponzetta, D Di Mitri, A Santoni, R Bonecchi and A Mantovani、Neutrophil diversity and plasticity in tumour progression and therapy、*Nature Reviews Cancer*、20：485 − 503、2020