

哺乳動物発現コンストラクト：CMV イントロンプロモーター (CMVi) を導入した PDNR1r ベクター (プロモーターレスドナーベクター；Clontech 社) を構築し、CMVi の下流に発現融合タンパク質をコードする下記 cDNA 群を挿入した。

- RAGE細胞質領域 (RAGE-cyt) の特異的多量体形成：DmrB - DmrB-RAGE-cyt-HA (図2A)
- RAGE細胞質領域 (RAGE-cyt) の特異的2量体形成：DmrA-DmrB-RAGE-cyt-HA と DmrC-DmrB-RAGE-cyt-FLAG (図2B)
- RAGE細胞質領域 (RAGE-cyt) と DAP10細胞質領域 (DAP10-cyt) 特異的2量体形成：DmrA-DmrB-RAGE-cyt-HA と DmrC-DmrB-DAP10-cyt-FLAG (図2C)

各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正しいことを確認した。

発現タンパク質の人口的2量体形成誘導：遺伝子導入により発現したタンパク質群 (DmrA, DmrB, DmrCドメイン融合タンパク質) の2量体および多量体形成誘導は、iDimerize System (TAKARA 社) のプロトコールに従って行った。DmrB-DmrBドメイン融合タンパク質のホモ多量体の形成は、リガンドB/B Homodimerizerの添加 (50 nM, 1 h) により (図2A)、DmrAとDmrCドメイン融合タンパク質のヘテロ2量体の形成は、リガンドA/C Heterodimerizerの添加 (50 nM, 1 h) により行った (図2B、C)。

プラスミドベクターの細胞内導入：高純度精製発現コンストラクトの細胞へのトランスフェクションは FuGENE-HD (Roche 社) トランスフェクション試薬を用いて行った。36時間後に細胞を回収した。

免疫沈降：HEK293細胞に強制発現させた

tag付加遺伝子産物の免疫沈降には、Monoclonal Anti-HA (clone HA-7) tag-agarose (Sigma-Aldrich社) を使用した。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性bufferにより溶出した。

活性型のRac1とCdc42 (GTP結合型) の検出は、Rac/cdc42 Activation Assay Kit (Millipore社) にて行った。

C. 研究結果

1. RAGE共役受容体DAP10機能の役割 (仮説)：DAP10細胞質領域には、PI3Kがリクルートされる。これが、Aktの効率的活性化につながることで、図1のような仮説を立てるに至った。即ち、RAGEはDAP10と共役することで、Aktの持続的活性化を生み出し、これが細胞の生存能を上昇させるというものである。

2. RAGEとDAP10の特異的2量体形成誘導：図1の仮説を検証するために図2に示した人口システムを構築した。

薬剤の添加によりRAGEホモ多量体化 (図2A)、RAGEホモ2量体化 (図2B)、RAGE-DAP10ヘテロ2量体化 (図2C) が誘導できるシステムである。

3. RAGEとDAP10の特異的2量体形成誘導によるシグナル変動：まず、当構築した人口システムがうまく機能しているかどうかの検討を行った。薬剤誘導により、確かにRAGEどうしの結合、DAP10との特異的結合が誘導されることが確認できた (図3 left: Interaction)。この時、RAGE細胞質領域どうしの相互作用でRAGEのリン酸化上昇が惹起された。これは、TI-RAPとMyD88の結合上昇をもたらした。また、興味深いことにRAGE細胞質領域に結合していたPKC ζ の活性化 (自己リン酸化) が誘導されていた。一方、DAP10との特異的結合では、上記反応は無く、PI3Kの高効率結合が生じていた (図

3 left : Interaction)。

それでは、この条件での細胞内シグナル伝達はどのようになっているだろうか。解析した結果、RAGEのホモ2量体や多量体化誘導では、Aktの活性化レベルは大きく変動していなかったが、アポトーシスに関わるCaspase 8の活性化が顕著であった。一方、DAP10との特異的結合では、Caspase 8の活性化は起こらず、Aktの活性化(リン酸化)が非常に強く誘導されることが明らかとなった(図3 right : Signal)。

D. 考察

我々のRAGE研究では、細胞種に応じた特異的シグナル増幅機構が未解明のまま残されていた。しかし、今回の研究より、本特異性が共役受容体の発現状態に影響されると考えられるデータが得られた。即ち、共役受容体の一つDAP10の発現が高ければ、S100A 8/A 9によるRAGE刺激はAktの活性化につながり、増殖、サバイバル(アポトーシス抑制)シグナル増幅に大きく影響するのである。一方、DAP10の発現が低ければRAGEの重合化が誘導され、Caspase 8の活性化によるアポトーシスの結果となる。

DAP10の発現変動により表皮角化細胞のS100A 8/A 9によるRAGEのレスポンスが大きく異なってくるのが容易に予想され、乾癬発症患部での表皮角化細胞におけるDAP10の発現状態が非常に興味深い。

E. 結論

今回の研究より、我々は、DAP10がRAGE共役受容体としてRAGEのサバイバル能亢進作用に重要な役割を持つことを強く示唆するに至った。この発見は、難解なRAGE作動原理の統合的理解につながる事が期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表(平成24年度)

論文発表

1. Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC/Dkk-3 by down-regulation of BRPK/PINK1. *Oncol Rep.* 27 : 695-699, 2012.
2. Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N. Expression pattern of REIC/Dkk-3 in mouse squamous epithelia. *Clin Exp Dermatol.* 37 : 428-431. 2012.
3. Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC/Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. *Acta Med Okayama.* 66 : 7-16, 2012.
4. Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A 7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett.* 3 : 1149-1153, 2012.
5. Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Kobayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M, Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol.* 41 : 559-564, 2012.
6. Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3 encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 28 : 1645-1652, 2012.
7. Yamamoto K, Murata H, Putranto EW,

Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK 7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep*. 2012. (In press)

8. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A 9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cance Res*. 2012. (In press)

学会発表

1. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Ken-ichi Yamamoto, Ken Kataoka, and Nam-ho Huh ; Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their potential roles in tumor progression、札幌、第71回日本癌学会学術総会、2012年 9 月19-21日。(English Workshop, Oral presentation at Sep. 19)

2. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, and Nam-ho Huh : Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their roles in melanoma metastasis, 国際エンドトキシン自然免疫学会2012 [The 12th International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012)] , National center of sciences building, Tokyo, Japan, 2012年10月23-26日。(Oral presentation at Oct. 25 & poster presentation at Oct. 26)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特願2011-117321、「REIC発現アデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、公文裕巳、許南浩、渡部昌実、2012/ 5 / 25出願

2. 特願2012-085969、「アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、近藤英作、許南浩、手塚克成、2012/ 4 / 4出願

3. 特願2012-165160、「PINK 1 のユビキチンアッセイ及びスクリーニングへの利用」、発明者：村田 等、阪口政清、許南浩、2012/ 7 / 25出願

4. 特願2012-204279、「NPTN β と S100A 8 の結合の阻害を指標とする細胞増殖抑制剤のスクリーニング方法」、発明者：阪口政清、日比野利彦、山本真実、許南浩、2012/ 9 / 18出願

図1 RAGE下流シグナル伝達選択的増幅機構(仮説)

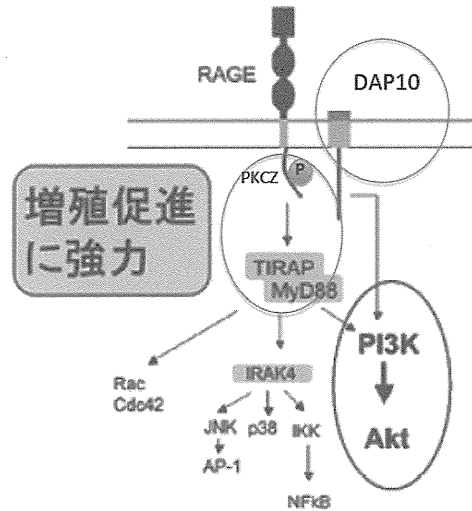


図1 RAGE下流シグナル伝達選択的増幅機構 (仮説)

図2 人口多量体化、2量体化システムをRAGEシグナル伝達機序の解析に応用

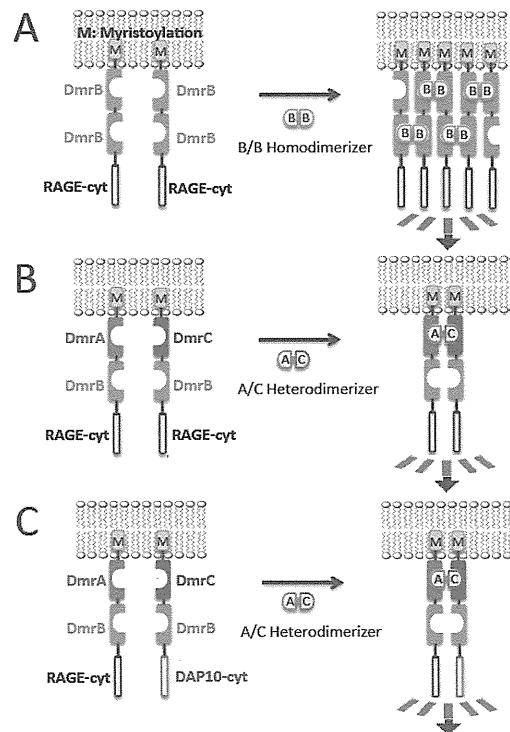
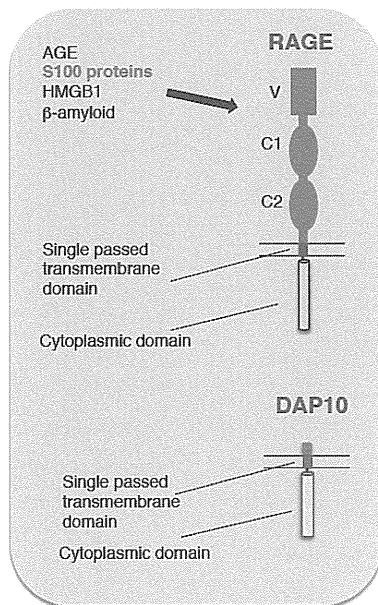
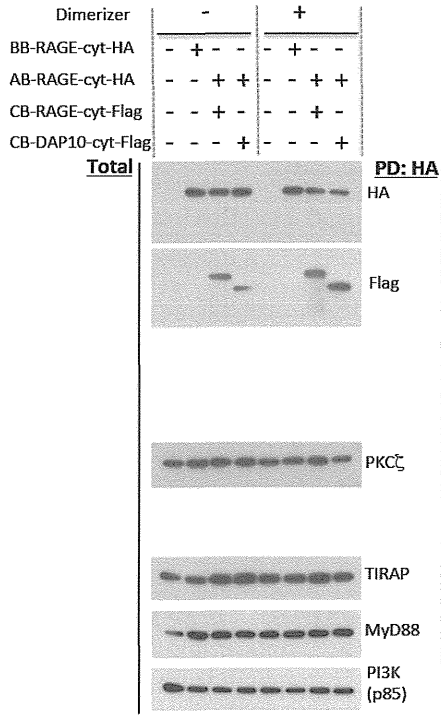


図2 人口多量体化、2量体化システムをRAGEシグナル伝達機序の解析に応用

図3 結果

Interaction



Signal

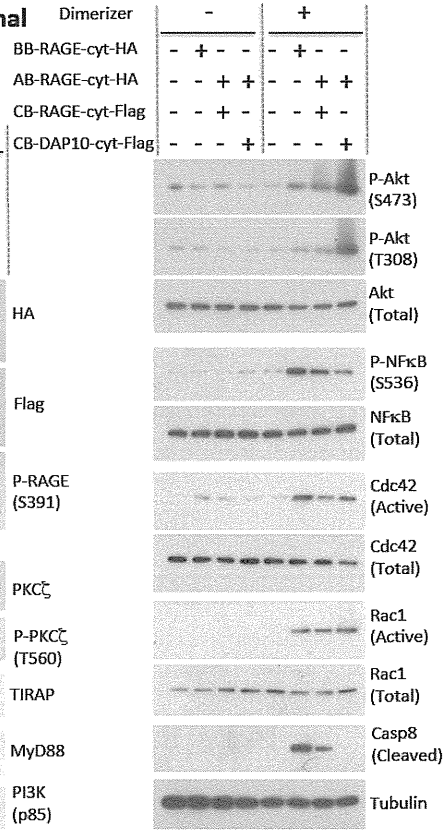


図3 結果

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

膿疱性乾癬の病態解明とその対策に向けて
-S100A 8 および S100A 9 タンパク質の新規受容体の探索とその機能解析(2)-

研究分担者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野 教授
研究協力者 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分野 准教授

研究要旨 我々は、RAGEの共役受容体DAP10を同定し、両者の結合の詳細について報告した。この成果より我々は、RAGE-DAP10結合の意義についてヒト正常角化細胞を用いてさらに検討を深めた。ヒト正常角化細胞を低濃度S100A 8/A 9 (100ng/ml) 刺激するとAktの活性化による増殖促進が起こる一方、高濃度S100A 8/A 9 (10 μg/ml) 刺激では、caspase-8の活性化によるアポトーシスが誘導される。いずれもRAGEを介した細胞応答の結果であるが、このシグナルの違いが、DAP10の存在によることが判明した。即ち、低濃度S100A 8/A 9 刺激では、RAGE-DAP10結合によるAktの活性化が生じ、高濃度S100A 8/A 9 刺激では、RAGEの重合化促進により caspase-8の活性化が生じることが明らかとなった。乾癬病変の表皮角化細胞ではDAP10の発現上昇により高濃度S100A 8/A 9 刺激によるアポトーシス耐性能を獲得している可能性がある。

A. 研究目的

表皮角化細胞におけるRAGE-DAP10受容体複合体情報伝達ユニットの機能を解析することで、S100A 8/A 9による細胞の増殖、死の分子制御メカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

細胞：本研究には、ヒト正常表皮角化細胞NHK (KURABO社)、ヒト不死化表皮角化細胞HaCaT (ドイツ連邦共和国ガン研究センターより分与)、ヒト表皮上皮様細胞癌由来細胞株A431(ATCC社)を使用した。NHKは、増殖添加剤HKGS (KURABO社)を添加したMedium 154S (KURABO社)にて、HaCaTとA431細胞は、10% FBSを含有するDMEM/F12培地 (Gibco社)にて培養した。

抗体：Western blot 解析には以下の抗体を使用した。rabbit anti-RAGE (Santa Cruz Biotechnology社), rabbit anti-EGFR (Cell

Signaling社), mouse phospho-Tyrosine (P-Tyr-100) (Cell Signaling社), rabbit anti-PKC α (Cell Signaling社), phospho-PKC α (T560) (Abcam社), rabbit anti-Akt (Cell Signaling社), rabbit anti-phospho-AKT (S473) (Cell Signaling社), rabbit anti-TI-RAP (Abcam社), rabbit anti-PI 3 K (p85) (Cell Signaling社), mouse anti-cleaved-Caspase 8 (D384) (Cell Signaling社), mouse anti-Tubulin (Sigma-Ardrich社)。また、rabbit anti-phospho RAGE (S391)の作成は、MBL社に委託した。

リコンビナントタンパク質の調製：ヒトS100A 8、S100A 9をGST融合タンパク質として大腸菌で産生させ、グルタチオン共有結合担体によるアフィニティークロマトグラフィーで精製の後、GSTを切断・除去した。

また、リコンビナントサイトカインは以下のものを使用した。EGF (Chemicon社), TGF β 1 (Sigma-Ardrich社), TNF α (Pe-

protech社), IL-17 (Peprotech社), IL-22 (R & D社)。

免疫沈降：内因性RAGEの免疫沈降に関しては、Rabbit anti-human RAGE antibody (Santa Cruz Biotechnolog社) をビオチン標識 (Biotin Labeling Kit-SH; Dojindo Molecular Technologies社) したものを使用した {streptavidin-agarose (Invitrogen社) によりプルダウン}。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

siRNA：ネガティブコントロール siRNA (si-Cont: siGENOME non-targeting siRNA pool #1, D-001210-01)、Human HCST (DAP10) siRNA (siGENOME SMART pool M-005100-02-0005)、は、Thermo Scientific Dharmacon社より購入した。siRNA (最終濃度100 nM) のトランスフェクションには、Lipofectamin RNAiMAX reagent (Invitrogen社) を使用した。

C. 研究結果

1. S100A 8 / A 9 の濃度に依存したシグナルの違い、とNHK、HaCaT、A431細胞間における S100A 8 / A 9 レスポンスの違い：RAGE、Aktの発現量がNHKと比較的同レベルである表皮細胞株を用いて (図 1 A)、これら細胞種間におけるS100A 8 / A 9 レスポンスの違いについて検討した (図 1 B)。S100A 8 / A 9 は、NHKの増殖を誘導できる最適濃度100 ng/mlをlow conc. とし (Nukui T et al., J Cell Biochem. 104: 453-464, 2008)、膿疱性乾癬患者血清中に存在する濃度を参考に10 μ g/mlをhigh conc. として使用した (Aochi S et al., J Am Acad Dermatol. 64: 879-887, 2011)。まず、low conc. のS100A 8 / A 9 で細胞を刺激したところ、NHK, HaCaT, A431のいずれにおいてもAktのリン酸化が亢進した。これは、60 minでmaxとなり長時間 (24 h) の持続的活性化を

示した。この濃度では、Caspase 8の活性化は検討したいずれの細胞においても認められなかった (図 1 B left)。一方、high conc. のS100A 8 / A 9 で細胞を刺激すると、NHKでは、Aktの活性化が短時間 (10 min, 60 min) で弱く誘導されるものの、長期間 (24 時間) での活性化現象が消失している結果となった。この時、Caspase 8の顕著な活性化が認められた。興味深いことに、HaCaT, A431細胞では、high conc. のS100A 8 / A 9 刺激にもかかわらずAktの持続的活性化が検出され、NHKでみられるようなCaspase 8の活性化もかすかにしか起こらなかった (図 1 B right)。

2. RAGE下流Aktの持続的活性化におけるDAP10の存在の意義：DAP10のRAGE下流Akt活性における存在意義を見出すため、DAP10の特異的siRNAを用いて検討した。種々リン酸化酵素の活性化状態を同時に解析することのできるアレイを用いて解析した。長時間でのAktのリン酸化状態を知るため、NHKをlow conc. のS100A 8 / A 9 で24 h刺激した。図 2 Aより、Aktのリン酸化の顕著な上昇が認められたが、この現象は、DAP10 siRNA処理によってほぼ完全に消失した。

さらに詳細に検討するためAktの活性化について経時的に検討した。DAP10 siRNAで処理したところ、low conc. S100A 8 / A 9 によるAktの長期的 (6~24 h) な活性化が顕著に抑制される結果となった。このことは、DAP10がRAGE下流Aktの持続的活性化に重要な役割をもつことを意味している。

3. 高濃度S100A 8 / A 9 刺激によるRAGEの重合促進：次にNHKにおいて、lowとhigh conc. のS100A 8 / A 9 刺激によりRAGEとDAP10の結合がどのように変動するのかについて検討した。図 3 left: Interactionに示した解析結果より、low conc. S100A 8 / A 9 刺激でRAGEはDAP10との

結合が高まり、high conc. でこの結合が消失することが判明した。また、DSS架橋実験より、high conc. では、DAP10結合の消失に伴いRAGEの重合化が促進されることが明らかになった(図3 left: Interaction)。さらに、信号伝達の解析(図3 right: Signal)から、low conc. S100A8/A9刺激でAktの活性化が起こり、high conc. でCaspase 8の活性化が誘導されることが確認できた。即ち、この検討から、

- (1) low conc. S100A8/A9 → RAGE – DAP10結合 → Akt活性化 → サバイバル能亢進、
- (2) high conc. S100A8/A9 → RAGE重合亢進 (DAP10結合消失) → Caspase 8活性化 (Akt活性化の消失) → アポトーシス (サバイバル能低下)、

が明らかとなった。

それでは、high conc. S100A8/A9に耐性のHaCaT、A431細胞ではどうであろうか。上記と同様の検討をこれら細胞において行った。興味深いことに、high conc. S100A8/A9刺激にも関わらずHaCaT、A431細胞ではDAP10のRAGEへの結合が消失せず、重合も起こっていなかった(図4 A left: Interaction)。この条件で信号伝達の解析をしたところ、NHKとは逆の反応(Aktの活性化が保持されており、Caspase 8の活性化もかすかにしか起こらない)が起こっていることを再度確認した(図4 A right: Signal)。DAP10の発現量をNHKと比較したところ、HaCaT、A431細胞では顕著に上昇していることが判明した(図4 B)。

4. HaCaT, A431 におけるDAP10の機能抑制: HaCaTとA431のDAP10発現をsiRNAにより低下させるとNHKと同様な反応を示すかもしれない。我々は次にこの検討を行った。HaCaTとA431をDAP10 siRNAで処理し、high conc. S100A8/A9で24 hの刺激を行った。結果、DAP10の発現低下が、RAGEとの相互作用消失につながり、RAGEの重合

化をもたらした(図5 left: Interaction)。この条件で信号伝達の解析をしたところ、NHKでみられた現象と同様な反応が惹起されることが確認できた(Aktの活性化消失、Caspase 8の顕著な活性化)(図5 right: Signal)。これらの結果より、DAP10の発現状態がRAGE特異的信号伝達制御の鍵要因となることが明らかとなった。

5. DAP10 発現を誘導する因子の探索: さらに我々は、どのような因子がDAP10を強く発現誘導するかについて検討した。乾癬に深く関わるサイトカイン(EGF, TGF β 1, TNF α , IL-17, IL-22)に注目し、これらを用いてNHKへの刺激を行った。その結果、IL-22のみが強力にDAP10の発現を誘導することが明らかとなった(図6)。

D. 考察

我々のRAGE研究では、RAGE特異的信号増幅機構が未解明のまま残されていた。しかし、今回の研究より、表皮角化細胞のS100A8/A9刺激による増殖、生存性(Akt活性化シグナル)と細胞死(Caspase 8)につながる特異的信号伝達が共役受容体DAP10の存在によって制御されるデータが得られたのである。即ち、以下の経路である。

- (1) low conc. S100A8/A9 → RAGE – DAP10結合 → Akt活性化 → サバイバル能亢進、
- (2) high conc. S100A8/A9 → RAGE重合亢進 (DAP10結合消失) → Caspase 8活性化 (Akt活性化の消失) → アポトーシス (サバイバル能低下)、

また、DAP10の発現は、乾癬発症に深く関わるIL-22によって強く誘導されることも判明した。このことより、通常乾癬患者でみられる高い濃度のS100A8/A9においても表皮角化細胞はアポトーシスを起こさず、逆に増殖促進および生存能亢進の結果となることで乾癬発症患部における肥厚につながっているものと考えられた。

E. 結論

今回の研究より、我々は、RAGE共役受容体の一つDAP10の表皮角化細胞における以下の役割を明らかにするに至った。

- (1) DAP10は、RAGEの重合化を抑制する (Caspase 8の活性化によるアポトーシス誘導を回避する)、
- (2) PI3KをリクルートすることでAktの持続的活性化をもたらす (増殖、サバイバル能の亢進につながる)、

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成24年度)

論文発表

1. Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC / Dkk-3 by downregulation of BRPK / PINK1. *Oncol Rep.* 27 : 695-699, 2012.
2. Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N. Expression pattern of REIC / Dkk-3 in mouse squamous epithelia. *Clin Exp Dermatol.* 37 : 428-431, 2012.
3. Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC / Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. *Acta Med Okayama.* 66 : 7-16, 2012.
4. Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A 7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett.* 3 : 1149-1153, 2012.
5. Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Kobayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M,

Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC / Dkk-3 -encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol.* 41 : 559-564, 2012.

6. Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells / Dickkopf-3 -encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 28 : 1645-1652, 2012.
7. Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK 7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 2012. (In press)
8. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A 9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cance Res.* 2012. (In press)

学会発表

1. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Ken-ichi Yamamoto, Ken Kataoka, and Nam-ho Huh : Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their potential roles in tumor progression、札幌、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19-21日。(English Workshop, Oral presentation at Sep. 19)
2. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, and Nam-ho Huh : Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their roles in melanoma metastasis、国際

エンドトキシン自然免疫学会2012 [The 12th International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012)] , National center of sciences building, Tokyo, Japan, 2012年10月23 - 26日 . (Oral presentation at Oct. 25 & poster presentation at Oct. 26)

H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特願2011-117321、「REIC発現アデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、公文裕巳、許南浩、渡部昌実、2012/5/25出願
2. 特願2012-085969、「アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、近藤英作、許南浩、手塚克成、2012/4/4出願
3. 特願2012-165160、「PINK 1 のユビキチンアッセイ及びスクリーニングへの利用」、発明者：村田 等、阪口政清、許南浩、2012/7/25出願
4. 特願2012-204279、「NPTN β と S100A 8 の結合の阻害を指標とする細胞増殖抑制剤のスクリーニング方法」、発明者：阪口政清、日比野利彦、山本真実、許南浩、2012/9/18出願

図1

S100A8/A9 の濃度に依存したシグナルの違い、と NHK、HaCaT、A431 細胞間における S100A8/A9 レスポンスの違い

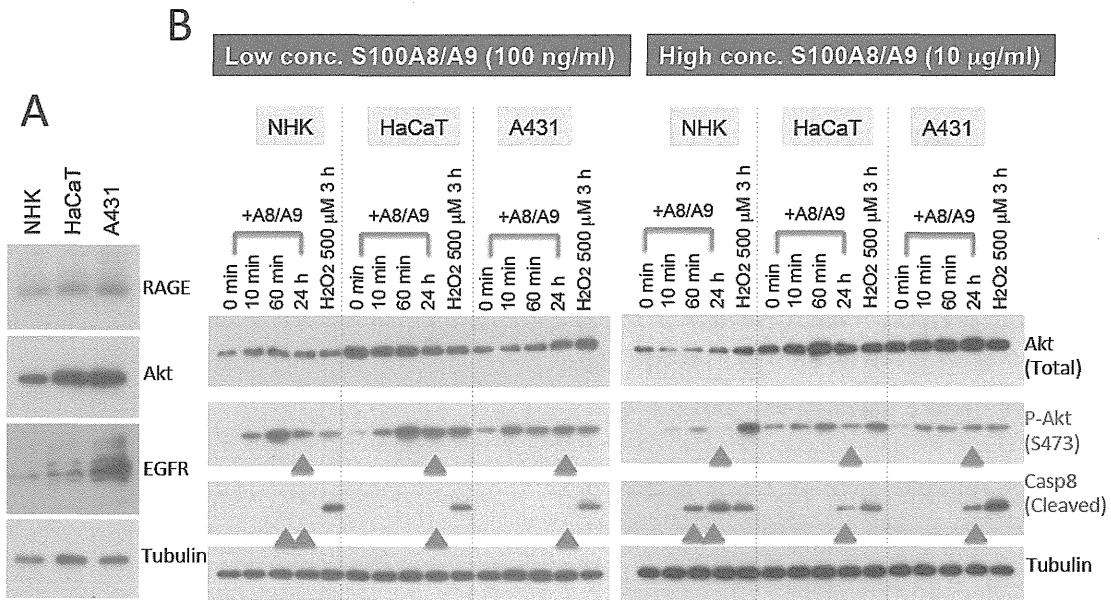


図1 S100A8/A9の濃度に依存したシグナルの違い、と NHK、HaCaT、A431細胞間における A100A8/A9レスポンスの違い

図2

RAGE下流シグナル伝達におけるAktの持続的活性化にDAP10の存在が重要な意味を持つ

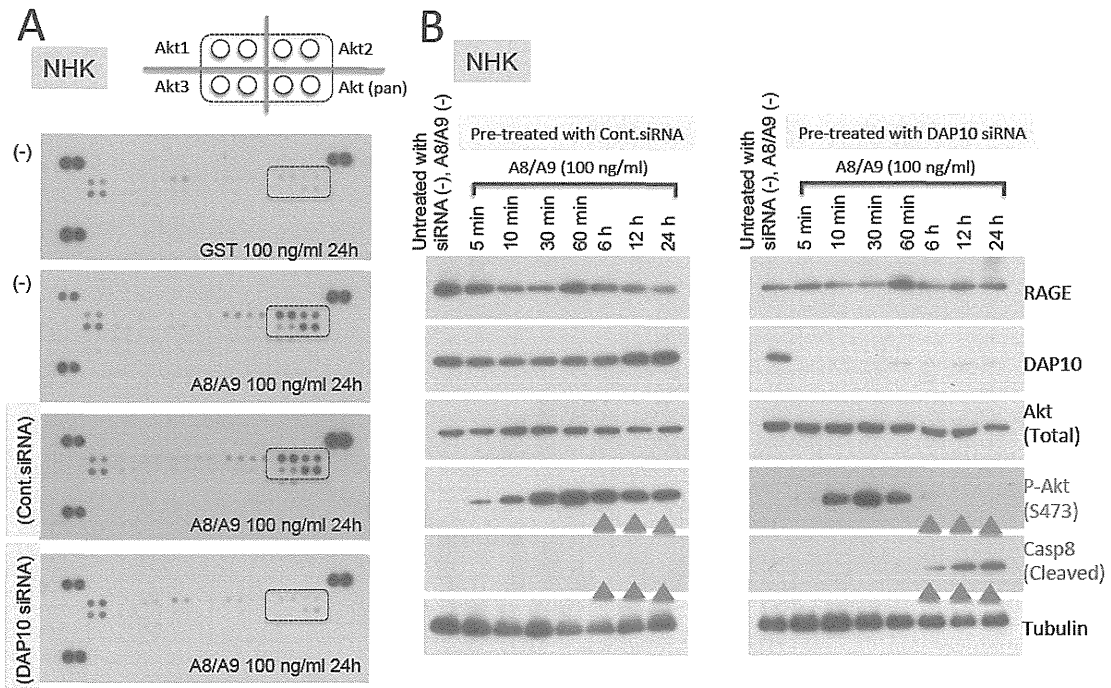


図2 RAGE下流シグナル伝達における Aktの持続的活性化にDAP10の存在が重要な意味を持つ

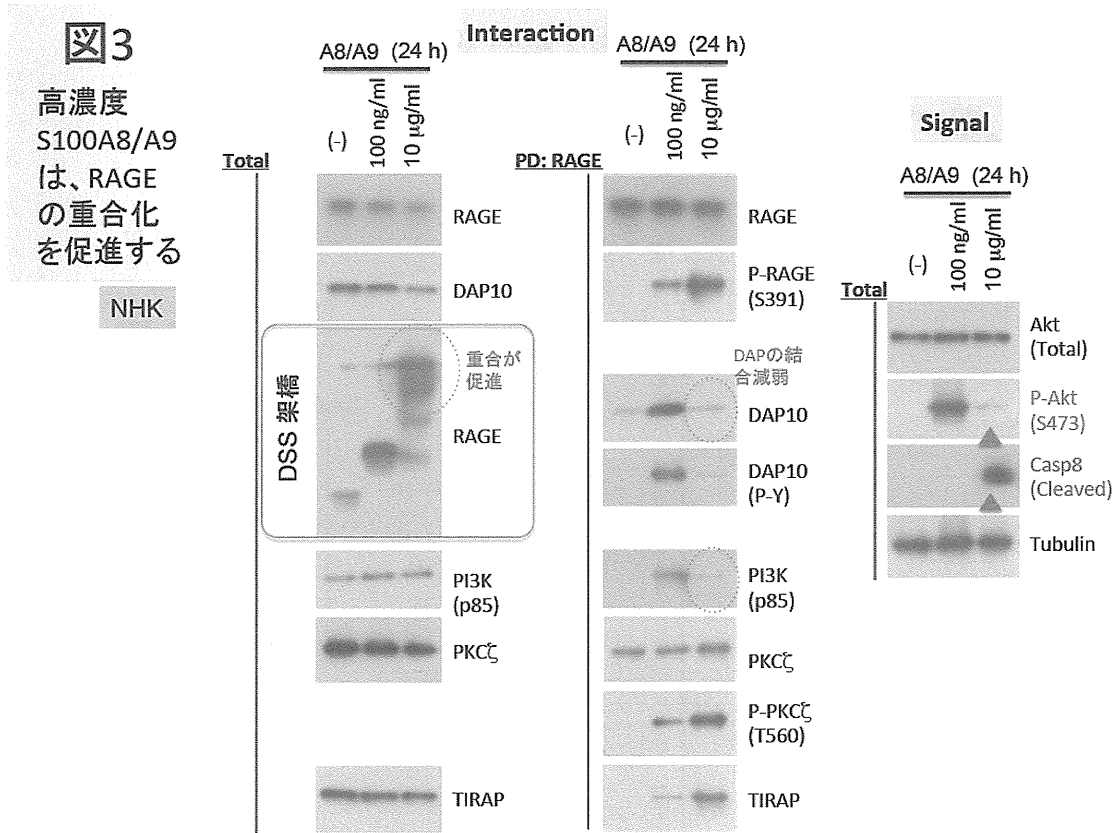


図3 高濃度S100A8/A9は、RAGEの重合化を促進する

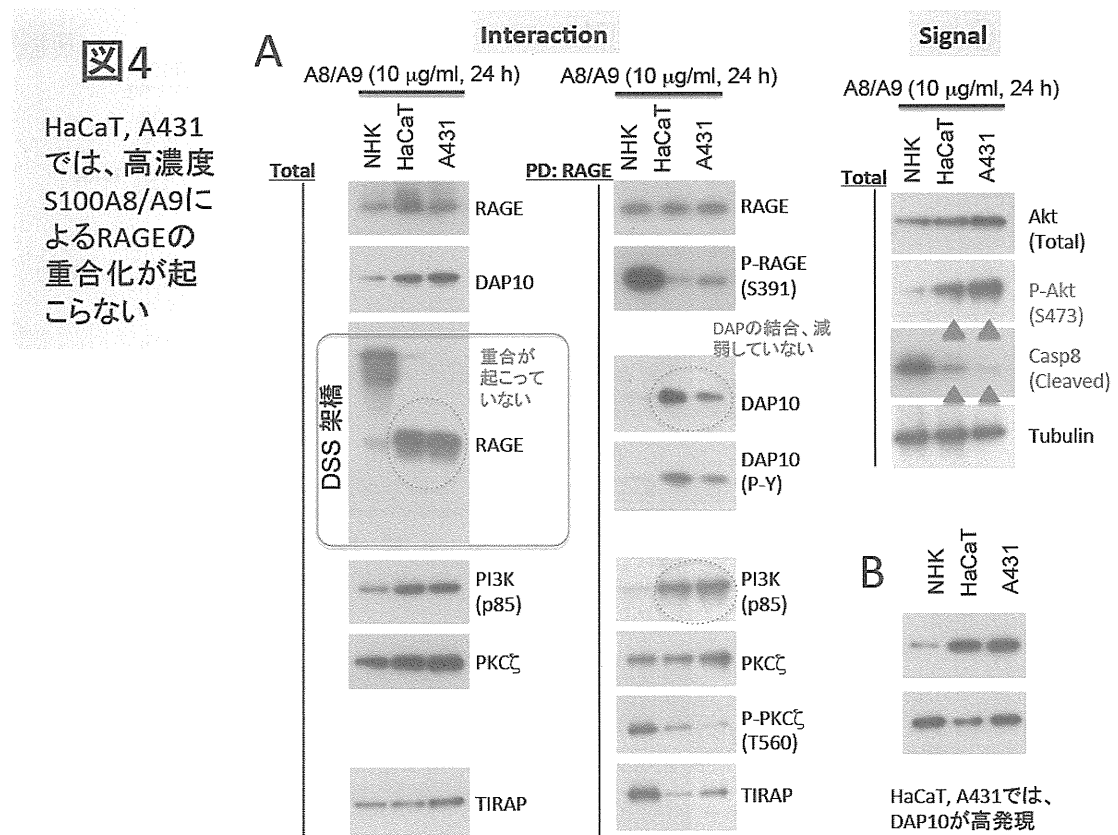


図4 HaCaT、A431では、高濃度S100A8/A9によるRAGEの重合化が起こらない

図5

HaCaT, A431 におけるDAP10の機能抑制

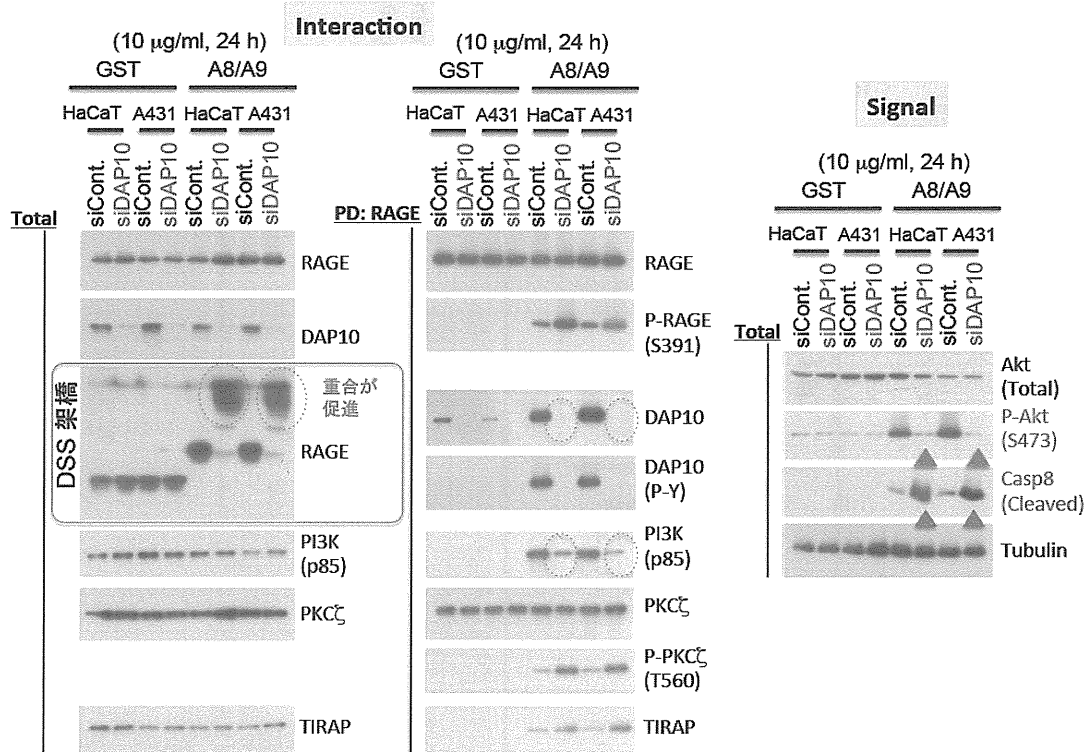


図5 HaCaT、A431におけるDAP10の機能抑制

図6

DAP10 発現を誘導する因子の探索

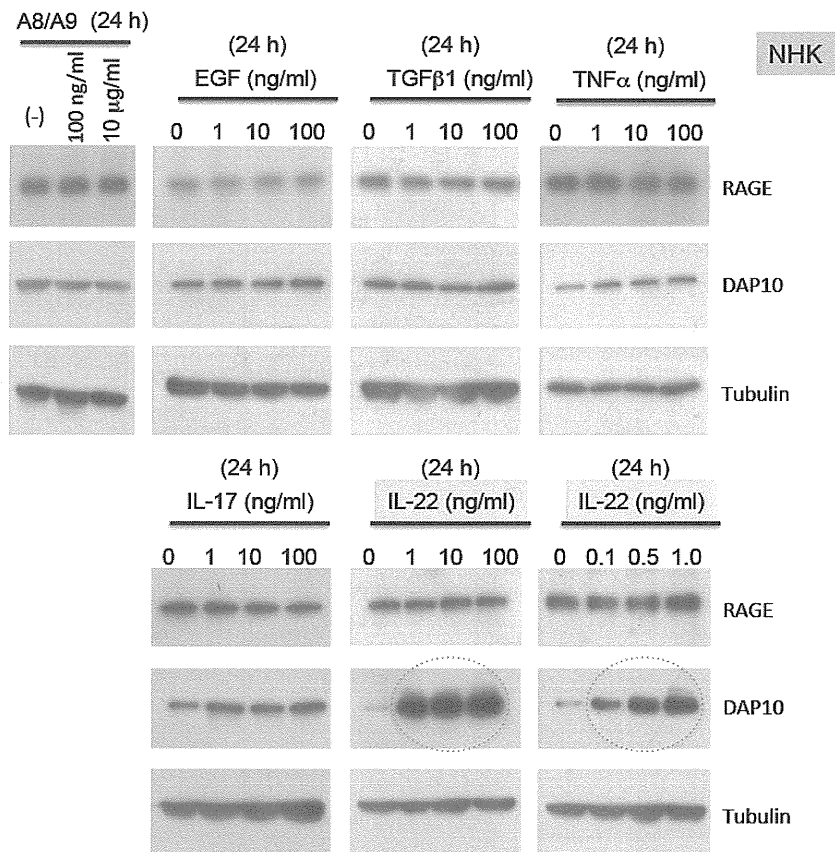


図6 DAP10発現を誘導する因子の探索

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

膿疱性乾癬の病態解明とその対策に向けて
-S100A 8 および S100A 9 タンパク質の新規受容体の探索とその機能解析(3)-

研究分担者 許 南浩 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科細胞生物学分野 教授
研究協力者 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分野 准教授

研究要旨 RAGEの過剰な活性化は細胞死につながるが、適度な活性化は、血管内皮細胞の増殖、遊走性を上昇させる方向に働く。RAGEの膜直下からどのようなシグナルが発動して上記機能発現に関わるかは不明であった。我々は、RAGE細胞質領域に直接結合する small GTPase 活性化因子 (GEF)、Dock 7 を同定することに成功したので報告する。Dock 7 は RAGE 細胞質領域を用いた免疫沈降後、その回収物を MS 解析することで得られた唯一の GEF である。リガンド刺激による RAGE の適度な活性化により仮足形成を伴う運動性の亢進が惹起されるが、これは Dock 7 siRNA の導入により顕著に抑制された。また、RAGE リガンド刺激によって増加していた Cdc42 の活性化も Dock 7 siRNA により抑制されることが判明した。これらの結果より、RAGE 膜直下では、Dock 7 が RAGE 細胞質領域にリクルートされ、Cdc42 を活性化させることで細胞運動制御に関わる事が明らかとなった。

A. 研究目的

細胞種に応じた RAGE 下流信号伝達経路の走化性に関わる特異的増幅機構を明らかにする。

B. 研究方法

細胞：本研究で用いた細胞株 (U-87MG、SH-SY 5 Y、PK-8、HepG 2、Hep 3 B、HeLa、PC-3、LNCaP、DU145、A431、HCT116、DLD-1、KPK 1、Caki-1、Caki-2、MCF 7) は DMEM/F-12 培地に 10% FBS を添加した培地を用いて培養した。

LC-Ms/Ms 解析：資生堂リサーチセンターの日比野利彦先生、本山晃先生の協力により、流量調整 Nanospace SI-2 高性能液体クロマトグラフィからなるナノ流量液体クロマトグラフィ質量分析機器を用いたショットガン型分析法を行った。得られたデータは Sequest algorithm against a non-redundant human protein database (NCBI, 2007 2 月) を用

いて解析を行った。

抗体：Western blot 解析には以下の抗体を使用した。mouse anti-HA tag (clone 6 E 2 : Cell Signaling 社), rabbit anti-human RAGE (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), rabbit anti-human DOCK 7 antibody (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), and mouse anti-human Tubulin antibody (Sigma-Aldrich)。

哺乳動物発現コンストラクト：pDNR-CMV i ベクターは、プロモーターレス pDNR-1 r ベクターに pHCMV-FSR ベクターのプロモーター部位である CMVi (CMV promoter-intron) を挿入して作製した。pIDT-CMV i R ベクターは、pIDT Smart ベクターに CMVi と HTLV 型 1 LTR (RU'5) を挿入して作製した。ヒト型の活性型 HRAS (G12V)、RHOA (G14V)、RAC 1 (G12V)、CDC42 (G12V) の発現ベクターは、N 末端側に GFP

が共発現するよう、pDNR-CMV_iベクターをベースにして作製した。ヒト RAGE 全長 (RAGE WT: 1-404 aa)、RAGE 細胞質領域欠損型 (RAGE DN: 1-364 aa)、RAGE 細胞質領域 (RAGE cyt: 364-404 aa) の発現ベクターは、pIDT-CMV_iR をベースに作製した。これら発現ベクターには C 末端側に Myc-HA-Flag-6 His タグを付加している。ヒト S100B 発現ベクターは、PIDT-CMV_iR をベースに作製した。この発現ベクターには C 末端側に Myc-6 His タグを付加している。各挿入 cDNA の塩基配列は DNA シークエンサーにより正しいことを確認した。

これら一連の発現ベクターの細胞への導入は、リポフェクション法を用いて行った。PC 3 細胞、U-87MG 細胞には HuGENE HD を、MCF 7 細胞には TransIT Keratinocyte を用いた。

siRNA: siRNA は Thermo Scientific Dharmacon のヒト RAGE siRNA (siRAGE: siGENOME SMART pool M-003625-02-0005)、ヒト DOCK 7 siRNA (siDOCK 7: siGENOME SMART pool M-031725-01-0005)、ネガティブコントロール siRNA (siCont: siGENOME non-targeting siRNA pool #1, D-001210-01) を用いた。これら siRNA の細胞への導入は、Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen 社) を用いて行った。導入 siRNA の最終濃度は 100 nM である。

免疫染色: 4% パラホルムアルデヒドで細胞を固定した後、抗 HA 抗体とそれに続く Alexa-594 蛍光標識抗ウサギ抗体により強制発現 RAGE を染色した。

免疫沈降: 内因性 RAGE の免疫沈降に関して、Rabbit anti-human RAGE antibody (Santa Cruz Biotechnology 社) をビオチン標識 (Biotin Labeling Kit-SH; Dojindo Molecular Technologies 社) したものを使用した (streptavidin-agarose (Invitrogen 社) によりプル

ダウン)。沈降してきた担体結合タンパク質は、いずれも酸性 buffer により溶出した。

細胞走化性アッセイ: U-87MG 細胞をポアサイズ 8 μ m のセルカルチャーインサート (24 well) に 5000 cells/insert の細胞密度になる様 DMEM のみの培地で細胞を播き、DMEM + 10% FBS の培地を入れた下層の 24 well プレートに重ねた。37°C、5% CO₂ の条件で 8 時間インキュベート後、細胞をエタノールで固定し、インサート底面の内側に残った細胞を拭い取り、インサート底面の外側に遊走した細胞数を HE 染色してカウントした。

C. 研究結果

1. RAGE 強制発現による過剰な糸状突起の出現: RAGE シグナルによる細胞への影響を調べるため、RAGE 全長型 (RAGE WT) を PC-3 細胞、MCF 7 細胞、U-87MG 細胞に強制発現させて細胞の形態変化を観察した。RAGE WT を強制させた細胞では樹状突起の様な仮足の過形成が見られた。これとは逆に RAGE シグナルを抑制する RAGE 細胞質ドメイン欠損型 (RAGE DN) を強制発現させると、細胞の仮足の伸長性と数が著しく減退する現象が見られた (図 1 A)。この RAGE WT 強制発現による細胞形態変化の原因を特定する為、細胞形態変化に関わる GTPase である Rho ファミリータンパク質の活性化型を PC-3 細胞にそれぞれ強制発現させ、細胞の形態を比較した。その結果、活性化型 Cdc42 を強制発現させた細胞群において RAGE WT 強制発現で見られた様な細胞の形態が見られた (図 1 B)。これにより、RAGE からのシグナルは Cdc42 を活性化させ細胞の形態変化を誘導する事が考えられた。

2. RAGE 下流 Cdc42 活性化につながる因子 GEF の探索 (DOCK 7 の発見): 次に、この RAGE-Cdc42 間のシグナルを繋ぐタンパク質を同定する為、RAGE 細胞質領域 (RAGE cyt) を 293T 細胞に強制発現させた後、抗

HA抗体を用いてこれを回収し、LC-MS/MS解析で結合タンパク質の探索を行った。その結果、GEF機能を持つRAGE細胞質領域結合タンパク質の候補としてDOCK7を同定する事ができた (data not shown)。DOCK7にはGTPaseである、Rac1とCdc42を活性化型に変換するGEFの機能を持つ事が報告されている。DOCK7のRAGE細胞質領域への結合は免疫沈降法により確認する事ができた (図2)。これら結果から、DOCK7を新規RAGE細胞質領域結合タンパク質とし、以降の実験を行った。

3. 種々がん細胞におけるRAGEとDOCK7の発現状態の解析：RAGEとDOCK7の解析を行う為の最適な細胞を選ぶ為、様々ながん細胞におけるRAGEとDOCK7のタンパク質の発現を比較した。その結果、PC-3細胞、MCF7細胞、U-87MG細胞でRAGEとDOCK7の両方の発現が検出できた (図3)。この結果より、これら細胞を本研究で使用する事とした。

4. RAGE強制発現がもたらす糸状突起過形成へのDOCK7 siRNAの影響：RAGE WT強制発現で見られた細胞形態変化がDOCK7を介して誘導されているかを確認するため、RAGE WT強制発現によって仮足の過形成が誘導された細胞にDOCK7のsiRNAを導入して細胞形態変化を観察した。DOCK7 siRNAの効果 (DOCK7の発現を抑制する)の確認は、RT-PCR法にて行った (図4A)。結果、RAGE WT強制発現による仮足の過形成はDOCK7のsiRNAを導入する事で顕著に抑制された (図4B)。

5. S100B-RAGE-DOCK7-Cdc42信号伝達：これまでの結果は強制発現系での解析により得られたものである。従って我々は次に、内在性のRAGEシグナルについても検討を行った。実験には、RAGEリガンドとして高純度S100Bを用いた (図5A)。U-87MG細胞に

S100Bを濃度別に添加すると、濃度依存的にRAGEに集積するDOCK7の増加が見られたが、100 nM添加した条件ではRAGEへのDOCK7の集積は見られなくなった (図5B)。また、S100Bを添加した際の活性化型Cdc42の量も同様に濃度依存的に増加したが、100 nMでは消失していた (図5C)。次に、このCdc42の活性化がDOCK7によるものかを確認するため、U-87MG細胞のDOCK7の発現をsiRNAで抑制し、S100Bの添加を行い検討した。図5Dより、DOCK7の発現抑制がCdc42の活性化抑制に確かにつながることを確認した。これらの結果より、内在性のRAGE-Cdc42シグナルにおいて、DOCK7が重要な役割を担っていることが明らかとなった。

6. RAGE強制発現による細胞遊走能亢進へのDOCK7 siRNAの影響：次に、DOCK7によるCdc42の活性化が細胞形態変化を誘導し、細胞遊走能を亢進させているかどうかを検討した。マイグレーションアッセイを行った結果、U-87MG細胞にRAGEまたはDOCK7のsiRNAを導入することで、遊走する細胞数が有意に抑制されることが判明した (図6A)。また、RAGE WT強制発現により細胞遊走能が亢進した細胞においても、DOCK7 siRNAを導入すると、コントロール群程度にまで遊走する細胞数が抑制された (図6B)。

D. 考察

これまでに、RAGEリガンド刺激による細胞増殖や遊走能亢進が、がんの発生や悪性化に関わることが報告されており、本研究では、そのRAGEシグナルの中でも遊走能亢進に着目して研究を行った。RhoファミリーGTPaseタンパク質はアクチン重合のリモデリングを起こし、細胞の形態や仮足の形状を変化させる。RAGEシグナル下流ではRac1とCdc42が活性化されるが、今回のRAGE WT強制発現によって見られた細胞形態変化は、

Rac 1 よりむしろ Cdc42 によって誘導されているものと理解した。

Hudson らが報告した Dia-1 と RAGE 細胞質領域の結合は Rac 1、Cdc42 の活性化をもたらし、遊走能を亢進させていたが、この Dia-1 による Rac 1 と Cdc42 の活性化機構については不明な点があった。それは、Dia-1 には GEF 機能性構造の存在が認められていないという点である。今回我々は、新規 RAGE 細胞質領域結合タンパク質として DOCK 7 を同定し、これが RAGE 細胞質領域と結合する事を免疫沈降法で確認したが、siRNA を用いて RAGE WT 強制発現細胞の形態変化を観察した際に、DOCK 7 発現抑制群と Dia-1 発現抑制群で仮足の形態変化の抑制が観察できた。このことから、DOCK 7 は単独では無く Dia-1 と複合体を形成し、RAGE 細胞質領域に結合する事も考えられた。

DOCK 7 は DOCK ファミリーに属するタンパク質で、ファミリーの特徴である DHR-2 ドメインを介して Rac 1 または Cdc42 を活性化型に変換することが報告されている。この DOCK 7 の発現はいくつかのがん細胞で確認でき、かつこれらががん細胞が RAGE 強制発現によって細胞形態変化を起こすことから、(RAGE 細胞質領域-DOCK 7 結合-Cdc42 活性化) へと繋がるシグナル経路は種々のがん細胞で機能していることが考えられた。

U-87MG 細胞を用いた siRNA による RAGE 発現抑制群と DOCK 7 発現抑制群の細胞遊走数の比較では、RAGE 発現抑制群でより遊走能の抑制が見られた。この結果は、DOCK 7 の他に遊走能亢進に繋がる RAGE シグナルが存在することを意味する。我々は今回の DOCK 7 の同定に先駆け、RAGE-TIRAP/MyD88 シグナル経路を報告している。この経路は最終的に NF- κ B の活性化を誘導し、炎症反応の誘起に重要な働きを示す。また、最近の報告では、NF κ B が TWIST 転写因子を直接誘導することで EMT の誘導にも関わるといふ。よって、RAGE シグナルに

よる細胞遊走能の亢進は、RAGE-DOCK 7-Cdc42 経路と RAGE-TIRAP/MyD88-NF- κ B の両経路から活性化されることが考えられた。

E. 結論

DOCK 7 は RAGE リガンド刺激によって RAGE 細胞質領域に結合し、下流の Cdc42 を活性化する事で、細胞形態変化や仮足の形状変化を誘導して細胞遊走能を亢進させる事が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表 (平成24年度)

論文発表

1. Jin Y, Murata H, Sakaguchi M, Kataoka K, Watanabe M, Nasu Y, Kumon H, Huh NH. Partial sensitization of human bladder cancer cells to a gene-therapeutic adenovirus carrying REIC / Dkk-3 by down-regulation of BRPK / PINK1. *Oncol Rep.* 27 : 695-699, 2012.
2. Kataoka K, Du G, Maehara N, Murata H, Sakaguchi M, Huh N. Expression pattern of REIC / Dkk-3 in mouse squamous epithelia. *Clin Exp Dermatol.* 37 : 428-431. 2012.
3. Kawauchi K, Watanabe M, Kaku H, Huang P, Sasaki K, Sakaguchi M, Ochiai K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical Safety and Efficacy of in Situ REIC / Dkk-3 Gene Therapy for Prostate Cancer. *Acta Med Okayama.* 66 : 7-16, 2012.
4. Kataoka K, Ono T, Murata H, Morishita M, Yamamoto K, Sakaguchi M, Huh NH. S100A 7 promotes the migration and invasion of osteosarcoma cells via the receptor for advanced glycation end products. *Oncol Lett.* 3 : 1149-1153, 2012.
5. Hirata T, Watanabe M, Kaku H, Ko-

- bayashi Y, Yamada H, Sakaguchi M, Takei K, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. REIC/Dkk-3 encoding adenoviral vector as a potentially effective therapeutic agent for bladder cancer. *Int J Oncol.* 41 : 559-564, 2012.
6. Sugimoto M, Watanabe M, Kaku H, Li SA, Noguchi H, Ueki H, Sakaguchi M, Huh NH, Nasu Y, Kumon H. Preclinical biodistribution and safety study of reduced expression in immortalized cells/Dickkopf-3 encoding adenoviral vector for prostate cancer gene therapy. *Int J Oncol.* 28 : 1645-1652, 2012.
7. Yamamoto K, Murata H, Putranto EW, Kataoka K, Motoyama A, Hibino T, Inoue Y, Sakaguchi M, Huh NH. DOCK 7 is a critical regulator of the RAGE-Cdc42 signaling axis that induces formation of dendritic pseudopodia in human cancer cells. *Oncol Rep.* 2012. (In press)
8. Hibino T, Sakaguchi M, Miyamoto S, Yamamoto M, Motoyama A, Hosoi J, Shimokata T, Ito T, Tsuboi R, Huh NH. S100A 9 is a novel ligand of EMMPRIN that promotes melanoma metastasis. *Cance Res.* 2012. (In press)

学会発表

1. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, Yusuke Inoue, Ken-ichi Yamamoto, Ken Kataoka, and Nam-ho Huh ; Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their potential roles in tumor progression、札幌、第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19-21日。(English Workshop, Oral presentation at Sep. 19)
 2. Masakiyo Sakaguchi, Toshihiko Hibino, Hitoshi Murata, and Nam-ho Huh : Identification of novel receptors for pro-inflammatory S100A 8 / A 9 proteins and their roles in melanoma metastasis, 国際エンドトキシン自然免疫学会2012 [The 12th International Endotoxin & Innate Immunity Society Meeting (IEIIS2012)] , National center of sciences building, Tokyo, Japan, 2012年10月23-26日。(Oral presentation at Oct. 25 & poster presentation at Oct. 26)
- H. 知的所有権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特願2011-117321、「REIC発現アデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、公文裕巳、許南浩、渡部昌実、2012/5/25出願
 2. 特願2012-085969、「アデノウイルスベクターをがん細胞に対して選択的に導入可能なポリペプチドおよび当該ポリペプチドを備えるアデノウイルスベクター」、発明者：阪口政清、近藤英作、許南浩、手塚克成、2012/4/4出願
 3. 特願2012-165160、「PINK 1 のユビキチンアッセイ及びスクリーニングへの利用」、発明者：村田等、阪口政清、許南浩、2012/7/25出願
 4. 特願2012-204279、「NPTN β と S100A 8 の結合の阻害を指標とする細胞増殖抑制剤のスクリーニング方法」、発明者：阪口政清、日比野利彦、山本真実、許南浩、2012/9/18出願

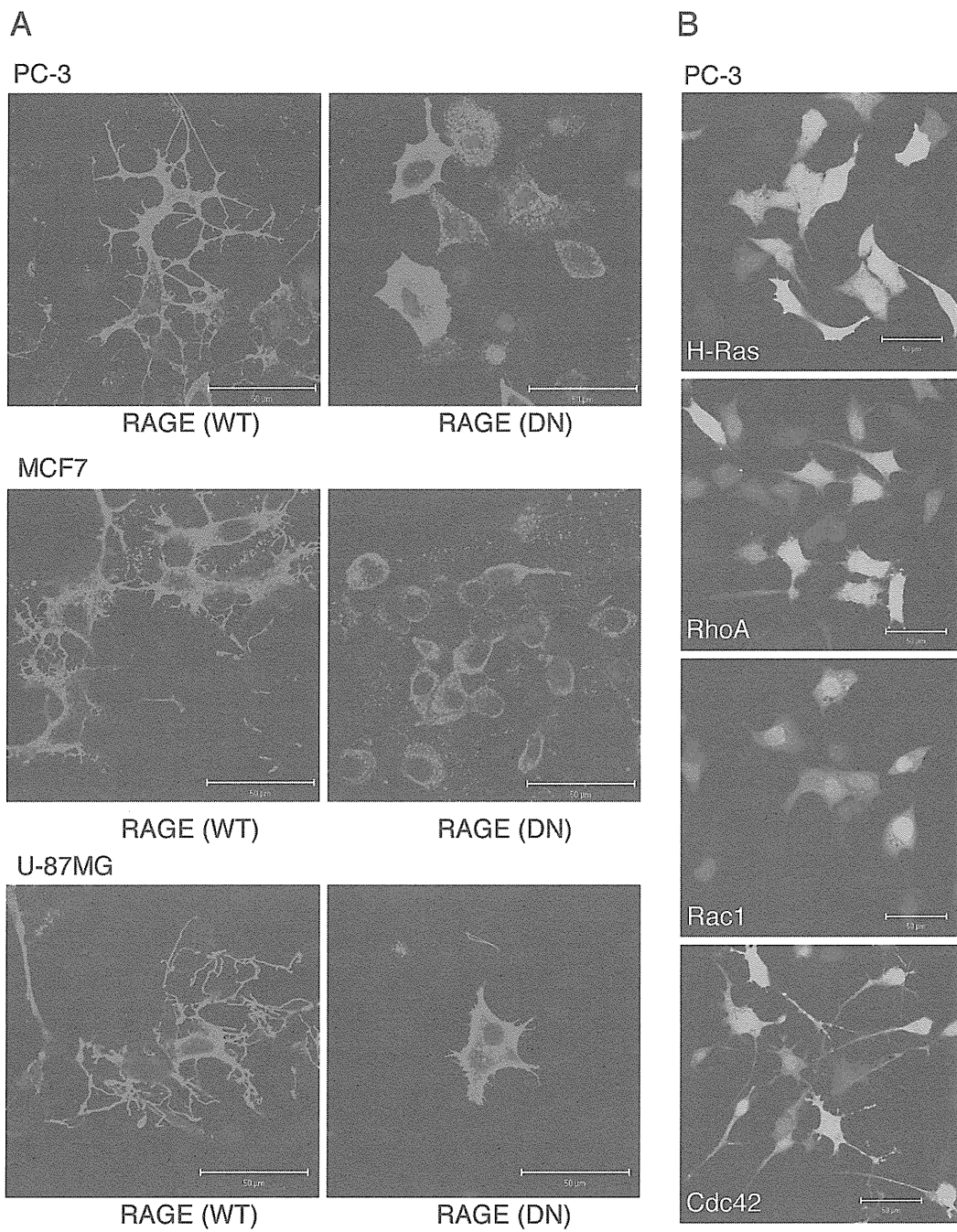


图 1

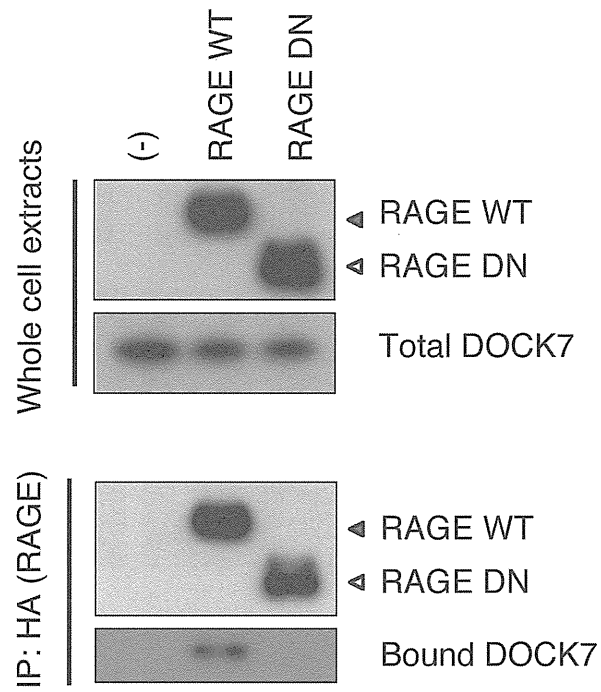


图 2

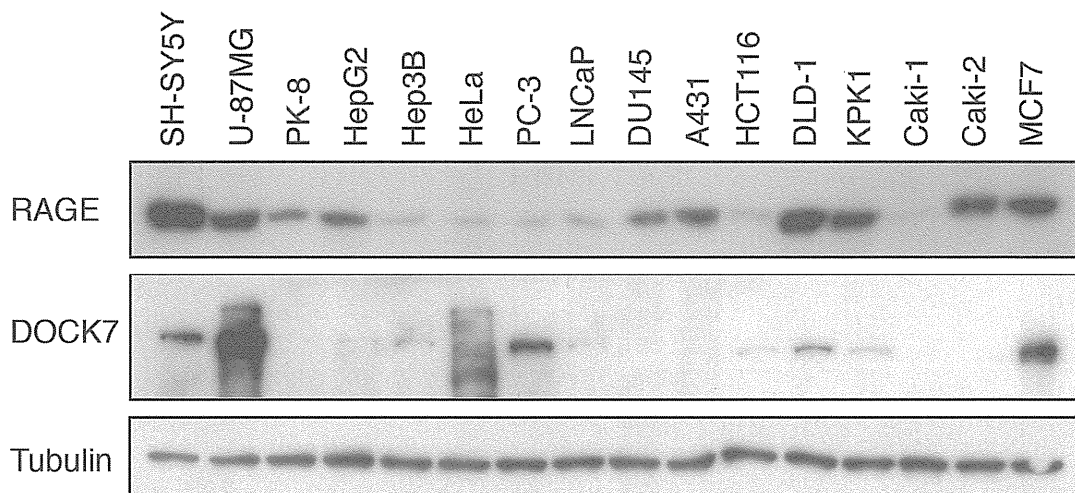


图 3