

課題番号 41

## 新規がん治療標的としてのM16プロテアーゼの研究

### [1] 組織

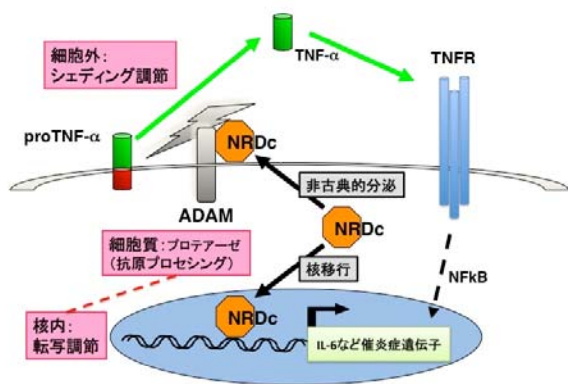
代表者：西 英一郎  
(滋賀医科大学薬理学講座)  
対応者：堀内 久徳  
(東北大学加齢医学研究所)  
分担者：大野 美紀子  
(滋賀医科大学薬理学講座)  
西 清人  
(京都大学 循環器内科)

研究費：物件費 25 万円，旅費 5 万円

### [2] 研究経過

がんの発症進展は多角的に制御されている。中でも細胞外環境、核におけるエピジェネティクス・転写制御は、互いを感じし影響を及ぼしながらがん進展への悪循環を形成していると考えられる。

我々はM16ファミリーのメタロプロテアーゼ、ナルディライジン (NRDC) をHB-EGF結合タンパク質として同定し (EMBO. J, 2001)、NRDCがHB-EGFやTNF $\alpha$ などの細胞外ドメイン切断による活性化を介して細胞外環境を調節すること (JBC, 2006、Nat. Neurosci. 2009 など)、また核内では複数のパートナー分子と協働して転写コレギュレーターとして働いていること (Nat Commun. 2014, Diabetes 2016など) を示し、NRDCが細胞局在に応じた多機能性を有することを明らかにした (下図)。



一方NRDC欠損マウスは、複数の発がんモデル (大腸、胃、肝細胞がんなど) および炎症性疾患モデルにおいて著明な疾患抵抗性を示し (EMBO Mol Med 2012, Sci Rep 2017など)、NRDC抑制ががん治療につながる可能性が示唆された。我々は、NRDCの核内転写調節作用

の少なくとも一部は自身の「プロテアーゼ活性に依存」しており、さらにNRDCのがん細胞増殖作用が「p53の転写活性抑制を介する」(JCI Insight in press) ことを見出し、既存薬ライブラリーなどを用いてNRDCのプロテアーゼ活性阻害薬スクリーニングを行った。その結果、約30000種類の小分子化合物のうち約140種類の陽性化合物同定に成功した。

一方加齢研受け入れ教員の堀内からは、临床上頻用されている既存薬のうち、標的分子が示唆されているものの薬理活性が充分説明できない薬に注目し、ビオチン化合物を用いて標的分子を効率よく同定する方法を開発した。予備実験の結果、薬物XがNRDCに結合することが示唆された。本課題では、①NRDCがいかなる分子機構を介してがん進展を制御しているかを、特にNRDCの酵素活性の役割に注目して解明すること、②薬物の標的分子としてのNRDCの意義を明らかにすることを目的とする。

対応者である加齢医学研究所堀内久徳教授とは、適宜メールにて研究打ち合わせを行っている。さらに2017/11/22には申請代表者が加齢研を訪問し、共同研究についての報告、意見交換を行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

目的① NRDC によるがん進展制御機構の解明 (特にNRDCの酵素活性の役割に注目して)

NRDCのプロテアーゼ活性の個体レベルにおける役割を明らかにするために、酵素活性欠損変異体NRDCノックインマウスのジーンターゲットング法による作製を試みた。複数の陽性ES細胞(TT2細胞)が得られ、野生型胚とアグリゲーション法にて混合、仮親マウスへ移植し、複数のキメラマウスを得ることに成功した。

目的② 薬物の標的分子としてのNRDCの意義解明

これまでに以下1)の結果が得られ、機能アッセイを行うために2, 3)を準備中である。

1) HEK293T細胞溶解液からビオチン化Xビーズを用いてX結合タンパク質を抽出。我々が独自に作製した抗NRDCモノクローナル抗体にて、NRDCがコントロールビーズには結合しないが、Xビーズには明らかに結合していることを確認。

2) NRDC機能アッセイに使用するリコンビナントNRDCタンパク質の作製(バキュロウイルスシステム)

3) TNF $\alpha$  シェディングアッセイの準備 (THP-1 細胞を陽性コントロール: リポポリサッカライドで刺激し、培地中 TNF $\alpha$  量を ELISA を用いて測定)。本アッセイにて、2) で作製したリコンビナント NRDC を加えて、TNF $\alpha$  シェディングの増強を確認する。そこに各濃度の X を投与し、NRDC のシェディング増強に及ぼす効果を検討する。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

NRDC は細胞内外の独立した作用点でがん進展に寄与しているユニークな分子であり、治療標的としての新規性が高い。遺伝子欠損によるがん進展抑制の度合いは高度で、かつ腸管上皮特異的欠損において腸発がんが抑制されるなど細胞自律的に働くこと、p53 機能を顕著に制御すること、さらにヒト手術標本がん部における発現亢進も明らかことから、同阻害薬が治療に有効である可能性は高い。本共同課題では特に、NRDC のプロテアーゼ活性ががん進展にいかに関与しているかに注目して研究を進める (目的①)。特に次年度あるいは次々年度に予定している酵素活性欠損変異体ノックインマウスの解析にて、プロテアーゼ活性の生物学的役割とがん治療標的としての意義をある程度明らかにできると考えている。結果が陽性的場合は、NRDC 酵素活性阻害薬として全く新しいタイプの抗がん薬開発につながる可能性がある。

一方目的②の薬物 X は臨床の場で汎用され、高い有効性が確認されている。これまでに複数の標的分子が示唆されているが、その薬効を充分説明できない可能性がある。受け入れ教員堀内らは、薬物 X の結合タンパク質のひとつとして NRDC を同定した。NRDC 欠損マウスの表現型は、X の薬効と NRDC の機能がリンクする可能性を示唆している。本課題の遂行が X の薬効の分子機構理解に大きく寄与し、さらに有効な薬剤開発につながることを期待される。

#### [4] 成果資料

本共同研究に関連する研究成果が掲載されている主要論文リスト

(1) Yoon WH, Sandoval H, Nagarkar-Jaiswal S, Jaiswal M, Yamamoto S, Haelterman NA, Putluri N, Putluri V, Sreekumar A, Tos T, Aksoy A, Donti T, Graham BH, Ohno M, Nishi E, Hunter J, Muzny DM, Carmichael J, Shen J, Arboleda VA, Nelson SF, Michael F, Wangler MF, Karaca E, Lupski JR, and Bellen HJ

Loss of Nardilysin, a mitochondrial co-chaperone for  $\alpha$ -Ketoglutarate Dehydrogenase, promotes mTORC1 activation and neurodegeneration

*Neuron* 93: 115-131, 2017

doi: 10.1016/j.neuron.2016.11.038

(2) Kimura Y, Ikuta K, Kimura T, Chiba T, Oshima H, Oshima M, \*Nishi E, \*Seno H

Nardilysin regulates inflammation, metaplasia, and tumors in murine stomach

*Sci Rep.* 7: 43052, 2017

doi: 10.1038/srep43052.

(3) Kasai Y, Toriguchi K, \*Hatano E, Nishi K, Ohno M, Yoh T, Fukuyama<sup>a</sup> K, Nishio T, Okuno M, Iwaisako K, Seo S, Taura K, Kurokawa M, Kunichika M, Uemoto S, \*Nishi E

Nardilysin promotes hepatocellular carcinoma through activation of signal transducer and activator of transcription 3

*Cancer Sci.* 108: 910-917, 2017

doi: 10.1111/cas.13204.

(4) Chen PM, Ohno M, Hiwasa T, Nishi K, Saijo S, Sakamoto J, Morita Y, Matsuda S, Watanabe S, Kuwabara Y, Ono K, Imai M, Inoue K, Murai T, Inada T, Tanaka M, Kita T, Kimura T and \*Nishi E

Nardilysin is a promising biomarker for the early diagnosis of Acute Coronary Syndrome

*Int J Cardiol.* 243: 1-8, 2017

doi: 10.1016/j.ijcard.2017.04.047.

(5) Fujii T, \*Nishi E, \*Ito H, Yoshitomi H, Furu M, Okabe N, Ohno M, Nishi K, Morita Yus, Morita Yug, Azukizawa M, Okahata A, Tomizawa T, Kimura T, and Matsuda S

Nardilysin is involved in autoimmune arthritis via the regulation of TNF- $\alpha$  secretion

*RMD Open* 3: e000436, 2017

doi: 10.1136/rmdopen-2017-000436

(6) Morita Y, Ohno M, Nishi K, Hiraoka Y, Saijo S, Matsuda S, Kita T, Kimura T and \*Nishi E

Genome-wide profiling of nardilysin target genes reveals its role in epigenetic regulation and cell cycle progression

*Sci Rep.* 7: 14801, 2017

doi: 10.1038/s41598-017-14942-4.