

課題番号 58

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)

岩崎 広高 (滋賀医科大学薬理学講座)

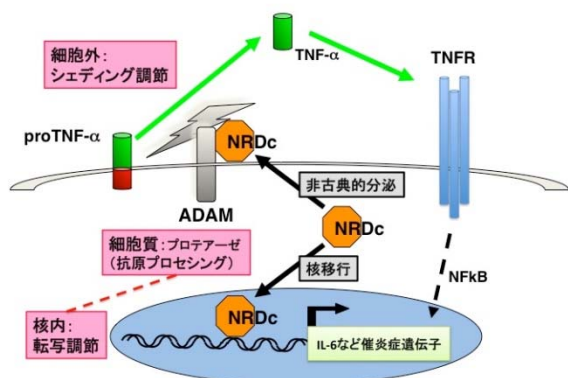
今井 隆行 (滋賀医科大学消化器内科)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

がんの発症進展は多元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、互いを感知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 α 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 2018) 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らは、臨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、適宜メールあるいは電話にて研究打ち合わせを行っている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

目的① NRDC によるがん進展制御機構の解明

1) 大腸がんにおける NRDC の役割：マウス大腸がんモデル (Apc-Min マウス：多段階発がんモデル) において、全身で NRDC を欠損させるとポリープ形成は著明に抑制された。次に腸管上皮特異的 NRDC 欠損マウス (Apc^{Min}, Villin-cre, Nrdc^{fl/fl} マウス) を作製したところ、全身欠損マウスと同様にポリープ形成は抑制され、腸管上皮細胞の NRDC がポリープ形成に重要であることが分かった。さらに NRDC は大腸がん細胞においてアセチル化調節を介して p53 の安定化を制御し、アポトーシスを調節することで腫瘍増殖を制御していることを明らかにした (JCI Insight 2018)。本年度は Apc^{Min}, Villin-cre, Nrdc^{fl/fl} マウスにおいて、腸管上皮透過性が亢進している可能性を見出し、腸炎症制御における NRDC の役割について検討を進めた。

2) 膵臓がんにおける NRDC の役割：膵臓特異的に NRDC を欠損させたマウスが、前がん状態と考えられている腺房導管化生 (Acinar-ductal metaplasia: ADM) と類似した表現型を呈し、さらに炎症細胞の浸潤、線維化を認めたことから、慢性膵炎様所見を呈していることを示した。また変異型 Kras を発現させて膵がん発症を誘導したところ、膵臓特異的 NRDC 欠損マウスにおいて膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) 形成

の明らかな増加を認めた。この結果は、これまで他のがんで示してきた結果とは逆に、NRDCを抑制することで膵炎、膵がんの発症進展が促進することを示した(GUT 2019)。

3) 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イング法による作製を試みホモ変異型マウスを得たが、生後間もなく死亡することが明らかになった。

目的② 薬物の標的分子としてのNRDCの意義解明

以下1), 2)を完了し、3)を施行中である。

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 α 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 α 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 α 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とにおける発現亢進も明らかなことから、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を明らかにするために、酵素活性欠損変異体ノックインマウスを作製したが、BL6マウス: ホモ変異型は生後間もなく死亡することが明らかとなり、現在遺伝背景の異なるマウスとバッククロスを行っている。

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) Kanda K, Sakamoto J, Matsumoto Y, Ikuta K, Goto N, Morita Y, Ohno M, Nishi K, Eto K, Kimura Y, Nakanishi Y, Ikegami K, Yoshikawa T, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Ito A, Yoshida M, Kimura T, Chiba T, *Nishi E and *Seno H

Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation
JCI Insight 2018; 3(8): e91316

(2) Ikuta K, *Fukuda A, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Kimura Y, Matsumoto Y, Kimura Y, Maruno T, Kanda K, Nishi K, Takaori K, Uemoto S, Takaishi S, Chiba T, Nishi E and Seno H
Nardilysin inhibits pancreatitis and suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma initiation in mice
GUT 2019; 68: 882-892

(3) Ito Y, Nakamura S, Shigemori T, Sugimoto N, Kato Y, Ohno M, Sakuma S, Ito K, Kumon H, Hirose H, Okamoto H, Nogawa M, Iwasaki M, Kihara S, Fujio K, Matsumoto T, Higashi N, Hashimoto K, Sawaguchi A, Harimoto KI, Nakagawa M, Yamamoto T, Handa M, Watanabe N, Nishi E, Arai F, Nishimura S, *Eto K
Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production
Cell 2018; 174(3): 636-648

(4) Yoh T, *Hatano E, Kasai Y, Fuji H, Nishi K, Toriguchi K, Sueoka H, Ohno M, Seo S, Iwaisako K, Taura K, Yamaguchi R, Kurokawa M, Fujimoto J, Kimura T, Uemoto S, and *Nishi E
Serum nardilysin, a surrogate marker for epithelial-mesenchymal transition, predicts prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical resection
Clin Cancer Res 2019; 25:619-628. (Featured in Highlights of This Issue)