

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590782
 研究課題名（和文） 肝細胞内情報伝達系における ADAM の機能と C 型肝炎ウイルスによる抑制機構の研究
 研究課題名（英文） Molecular analysis of the function of ADAM and the mechanism of

研究代表者
 中尾 春壽
 愛知医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：60326139

研究成果の概要：

免疫調節や炎症に関わる TNF- α を活性化する ADAM17 は発癌に関与すると考えられている。肝臓細胞において ADAM17 は Erk1/2 の活性化を増強し、Erk 下流に位置して apoptosis を抑制させる Bad の Ser112 を特異的にリン酸化していた。しかし、C 型肝炎ウイルスの NS5A 蛋白質の存在で ADAM17 の機能は影響を受けず、ADAM17 の機能に対する HCV の NS5A 蛋白質の関与は認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,600,000	480,000	2,080,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：ADAM, EGF, hepatocellular carcinoma, Bad, Erk, apoptosis, HCV, NS5A

1. 研究開始当初の背景

(1) TNF- α は免疫調節や炎症に関わる主要なサイトカインの一つであり、ectodomain shedding (shedding) により活性を持つ細胞外領域が放出され、下流の分子への情報伝達を開始される。この shedding を調節する蛋白質が、ADAM family (ADAMs) の一つである ADAM17 である。ADAMs は、複数の機能ドメインから構成される膜型糖蛋白質であり、細胞の増殖と分化、移動、細胞同士の接着と融合など生理的に重要な生命現象に関与する。また、ADAMs が shedding する基質としては TNF- α だけでなく TGF- α 、TNF- α 受容体、IL-6

受容体など多種多様な分子が報告されている。さらに肝細胞癌を含む複数の癌では ADAMs の発現が亢進しており、発癌に深く関与すると考えられている。ADAMs の細胞内領域には SH3 domain binding site が存在し、一部の ADAMs では SH3 domain binding site が Grb2 や PI3-K p85 subunit などの SH3 domain を持つ蛋白質に結合することで下流の情報伝達系に影響を及ぼすことが知られている。ところが肝細胞に関しては ADAMs に関する報告が乏しく、肝細胞内における ADAMs の機能も不明な点が多い。

(2) 一方、C 型肝炎ウイルス (HCV) の NS5A

蛋白質 (NS5A) は SH3 domain binding site を介して Grb2 や PI3-K p85 subunit に結合し、宿主細胞内の各種情報伝達系に影響を及ぼすことを研究代表者らがこれまでに報告している。HCV 感染細胞においては HCV と同様に SH3 domain binding site を有する ADAMs が関与する細胞内情報伝達系に NS5A がなんらかの影響を及ぼしている可能性があり、その影響が HCV による発癌に関与している可能性も考えられる。しかしながら、ADAMs に対する NS5A の影響を解明するためには、不明な点が多い肝細胞における ADAMs の機能を解析することが必要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝癌細胞における各種情報伝達系に及ぼす ADAMs の機能とその機序を解明するとともに HCV の NS5A による ADAMs の機能への影響を解析することである。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞、PLC/PRF/5 細胞、SKHep 細胞を 3.5cm dish で、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。University of Washington の Dr. Michael Gale Jr. の好意により提供された HCV subgenome を Huh7 細胞内で持続的に複製する HCV レプリコンも同様の条件で培養した。

(2) ウェスタンブロット法と抗体

50 μg の蛋白質を low salt buffer にて処理し、10%ゲルを用いた SDS-PAGE 後にニトロセルロースメンブレンに転写して抗体で処理し enhanced chemiluminescence で可視化した。本研究で用いた抗体はすべて各社で市販されている抗体を用いた。

(3) RNAi 法と transfection

ADAM17 mRNA と相同、かつ特異的な 21 塩基の short interfering RNA (siRNA) を設計した。siRNA の transfection は、37°C、5%CO₂ の条件下で培養し 20-50%confluent の状態の細胞に対して 12 時間毎に 2 回繰り返し行い、24 時間後細胞を回収した。NS5A 発現アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入は同様の条件下で培養した 70-80%confluent の状態の細胞に対して transfection を 1 回施行し 24 時間後細胞を回収した。

(4) 共免疫沈降法

蛋白量として 500 μg に相当する細胞抽出液を low-salt buffer と混合して 500 μl とした後に 2 μg の 1 次抗体を加え 4°C で 2 時間攪拌後、50 μl の 50% protein A agarose あるいは protein G agarose を加えて 4°C でさらに 2 時間攪拌した。15,000rpm で遠心後

にペレットを回収し low-salt buffer にて 3 回洗浄した後に免疫沈降物を 2× SDS サンプルバッファーに溶解した。その後 15,000rpm で遠心上清を回収してウェスタンブロット法で解析した。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞における ADAM17 の発現の確認

本研究以前には肝癌細胞株を用いた ADAMs の発現に関する報告がなかったため、最初にヒト肝癌細胞株である Huh7 細胞、PLC/PRF/5 細胞、SKHep 細胞における ADAM17 の発現をウェスタンブロット法で確認した。Huh7、PLC/PRF/5、SKHep のいずれの細胞でも ADAM17 の発現を認め、shedding を誘導する TNF の刺激後や EGF の刺激後も発現に差異は認めなかった (図 1)。



図1

(2) RNAi 法による ADAM17 の発現抑制

ADAM の機能を抑制する系として ADAM の inhibitor である KB-R7785 が知られているが、ADAM10 および ADAM12 の shedding 機能を強く抑制するものの ADAM17 では有意に抑制をすることができない。そこで我々は ADAM17 の機能を抑制する系として、標的遺伝子機能を特異的かつ効率的に抑制することができる RNAi 法を用いた。ADAM17 の遺伝子に対して構築した siRNA は、PLC/PRF/5 細胞に導入すると ADAM17 の蛋白質発現を著明に抑制した。

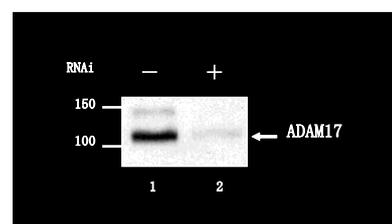


図2

(3) ADAM17 発現と Erk1/2 のリン酸化

EGF 刺激依存性の Erk リン酸化に対する ADAM17 の影響を検討したところ、PLC/PRF/5 細胞では、EGF 刺激により Erk は活性化され、経時的にリン酸化が増強したが、ADAM17 の siRNA を transfection すると Erk1/2 のリン酸化は抑制された (図 3)。また、図には示さないが、negative control siRNA を用いた

場合は Erk1/2 のリン酸化に変化を認めなかった。

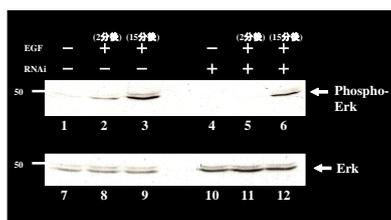


図3

(4) ADAM17 発現と Akt のリン酸化

EGF 刺激により Erk 情報伝達系のみならず PI3K 情報伝達系も活性化されるが, apoptosis を促進する Bad は PI3K-Akt 情報伝達系だけでなく Erk-RSK 情報伝達系を介しても活性化される. ADAM17 が PI3K-Akt 情報伝達系に関与するかを確認するために Akt のリン酸化に対する ADAM17 の影響を検討したところ, PLC/PRF/5 細胞では, EGF 刺激により Akt のリン酸化は経時的に増強したが, siRNA により ADAM17 の発現を抑制しても Akt のリン酸化には全く影響を認めなかった (図示せず). したがって, ADAM17 は PI3K-Akt 情報伝達系の活性化には関与していないと考えられた.

(5) ADAM17 発現と Bad のリン酸化

Bad は, PI3K-Akt 情報伝達系によりセリン (Ser) 136 がリン酸化され, Erk1/2-RSK 情報伝達系を介して Ser112 と Ser155 がリン酸化される. 各々の Ser 残基のリン酸化に及ぼす ADAM17 の影響を検討した. PLC/PRF/5 細胞においては Ser136 のリン酸化は軽度であり, Ser155 はほとんど認めず, ともに ADAM17 の影響も認めなかった (図示せず). しかし Ser112 のリン酸化は EGF 刺激により増強し, ADAM17 の RNAi を導入すると Ser112 のリン酸化が減弱した (図 4).

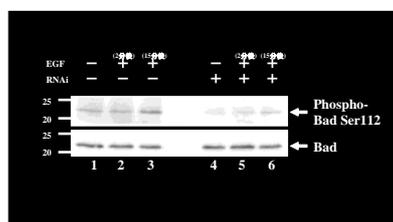


図4

また, Erk1/2 の上流に位置する MEK の inhibitor である PD98059 を用いると, ADAM17 の有無に関わりなく Ser112 のリン酸化は消失した (図 5). ゆえに ADAM17 による Bad Ser112 の活性化は, Erk 情報伝達系特異的であると考えられた.



図5

(5) ADAM17 と NS5A との association

ADAM17 と NS5A はともに SH3 domain binding site を有する. したがって ADAM17 と NS5A が SH3 domain を有する kinase に競争的結合をして kinase の情報伝達系に影響を及ぼす可能性が考えられる. そこで, NS5A と ADAM17 の association の有無を共免疫沈降法で検討したが, NS5A 抗体を用いた場合でも ADAM17 抗体を用いた場合でも ADAM17 と NS5A の結合は認められなかった (図示せず).

(6) NS5A による ADAM17 の機能への影響

① NS5A が ADAM17 の機能にどのような影響を及ぼすかを解析するために, まず HCV レプリコンを用いて NS5A 存在下の Huh7 細胞と negative control の Huh7 細胞の間に Erk1/2 のリン酸化および Bad Ser112 のリン酸化を調べたが, 差異は認めなかった (図示せず).

② 次に, 我々が既に作成した NS5A 発現アデノウイルスベクターを PLC/PRF/5 細胞に導入して NS5A を発現させた細胞および empty vector を発現させた negative control の細胞において EGF 刺激下の Erk1/2 および Bad Ser112 のリン酸化を比較したが両細胞の間に差異は認めなかった. また, 両細胞において ADAM17 特異的 siRNA および negative control siRNA を導入したが, 両細胞間で Erk1/2 および Bad Ser112 のリン酸化の変化に差異は認めなかった (図示せず).

これらの結果より, NS5A の存在は ADAM17 による Erk1/2 の活性化および Bad Ser112 の活性化には影響しないと考えられた.

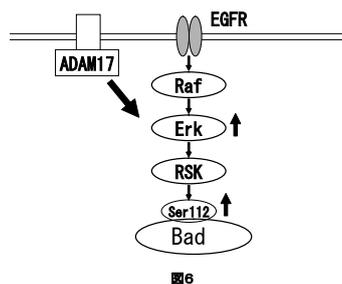
(7) 本研究のまとめと今後の展望

本研究から, 図 6 に示すように ADAM17 は Erk の活性化を増強させて, 下流にある Bad の Ser112 を特異的にリン酸化することによって apoptosis を抑制させるという ADAM17 の肝細胞内情報伝達系に及ぼす機能が明らかとなった.

また, ADAM17 の機能は HCV の NS5A には影響されず, HCV の NS5A が情報伝達系に及ぼす機能は, 肝細胞における ADAM17 の機能と直接的には関係しない可能性が示唆された.

今後は, ADAM17 による Bad Ser112 のリン酸化を介した apoptosis 抑制機構をさらに解析するとともに ADAM17 が Erk を活性化させ

る機序を解明する必要があると考えられた。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 1 件)

1. Senda K, Nakao H., Nojiri S, Joh T, Miyaki T. ADAM17 promotes ERK-mediated phosphorylation of Ser112 in Bad. The American Association for the Study of Liver Diseases 55th Annual Meeting. Boston (USA), Nov 6, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 春壽

愛知医科大学・医学部・准教授

60326132

(2) 研究分担者

折戸 悦朗

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

60204294

米田 政志

愛知医科大学・医学部・教授

30261407

中出 幸臣

愛知医科大学・医学部・助教

40431400