

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590914

研究課題名(和文) ADAMプロテアーゼ活性化分子ナルディライジンを標的とした消化管癌治療法の探索

研究課題名(英文) Therapeutic strategy against gastrointestinal cancers targeting nardilysin

研究代表者

米門 秀行 (Komekado, Hideyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：90452359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタロエンドペプチダーゼ・ナルディライジンが胃・大腸癌に及ぼす影響の解明と新規治療法の開発を目指し、以下の結果を得た。1)ナルディライジンのノックダウンにより、胃・大腸癌細胞株からの炎症性ケモカイン分泌低下、インターフェロン応答シグナルの亢進、細胞周期調節因子の変動をともなって、癌細胞増殖が抑制された。2)ナルディライジンをノックダウンした大腸癌細胞株は抗癌剤によりアポトーシスが誘導され、癌細胞増殖が抑制された。さらに、抗ナルディライジン抗体による癌細胞の増殖抑制も確認した。以上より、ナルディライジンの胃・大腸癌進展における役割を明らかにし、臨床展開へ向けた基礎的知見を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to investigate the effect of nardilysin (NRDc) on gastric or colorectal cancer and to examine the possibility of novel therapeutic strategy targeting NRDc. Knockdown of NRDc suppressed cancer cell growth concomitantly with decreased secretion of inflammatory cytokines, enhanced interferon-response, and impaired cell cycle progression. Knockdown of NRDc also lead enhanced apoptosis and attenuated growth of gastric or colorectal cancer cells when treated with anti-cancer agents. Furthermore, anti-NRDc neutralizing antibody suppressed cancer cell growth. Thus, we demonstrated the role of NRDc during cancer development and obtained the clue to achieve novel therapeutic strategies against gastric or colorectal cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：癌

1. 研究開始当初の背景

生体内において、種々の蛋白質（成長因子、サイトカイン、受容体等）は膜結合型の前駆体蛋白質として合成される。この前駆体蛋白は、ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) ファミリーや MMP (matrix metalloproteinase) ファミリープロテアーゼをはじめとするプロテアーゼ群によって細胞外で切断を受け、機能制御を受ける（エクドメインシェディング）。エクドメインシェディングによるシグナル伝達の制御が、癌をはじめとする種々の病態に關与している。

ナルディライジン (nardilysin, NRDC) は M16 ファミリーに属するメタロエンドペプチダーゼである。また、ナルディライジンは TACE をはじめとする ADAM プロテアーゼ群の活性化因子であり、HB-EGF や TNF-alpha のシェディングを活性化することがそれぞれ報告されている。また、ナルディライジンがニューレギュリン (HB-EGF と同じ EGF ファミリー) のシェディングを介して、マウスの神経軸索・髓鞘の形成を司ることも明らかにされている。本研究を立案するにあたり、研究代表者らは以下の事実に着目した。

1) ヒト手術検体を用いた解析にて、ナルディライジンが胃癌や大腸癌組織中の癌上皮細胞において高発現していた。

2) 複数の胃癌細胞株において、RNAi の手法を用いてナルディライジンの発現をノックダウンすると、いずれの細胞株においても細胞増殖が抑制された。

3) 胃癌細胞においてナルディライジンをノックダウンし、マイクロアレイを用いて遺伝子発現の変化を網羅的に解析したところ、種々の炎症性サイトカインの mRNA の発現が低下していた。

4) ナルディライジンが胃癌細胞の増殖を促進するメカニズムとして、胃癌細胞にお

いてナルディライジンが TNF-alpha のエクドメインシェディングを促進し、分泌増加した TNF-alpha が内因性の NF-kappaB 活性を亢進させた。

5) NF-kappaB は IL-6 などのサイトカインの転写を促進し、IL-6 により内因性の STAT3 活性が亢進し、Cyclin D1、Bcl-2 など細胞増殖や抗アポトーシスに働く遺伝子の転写が活性化された。

さらに、時期を同じくして海外のグループから、乳癌細胞においてナルディライジンが高発現しており、乳癌細胞の増殖を促進していることが報告された。

したがって、これらの結果を総合すると、消化管癌を含む種々の癌細胞においてナルディライジンの発現が何らかの機序で上昇し、癌細胞の増殖維持に重要な役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、「1. 研究開始当初の背景」記載の予備的データを更に発展させ、特に消化管癌における治療標的としてのナルディライジンの役割を、他の癌治療薬との相互作用など、臨床への応用を踏まえた形で解明し、実際の消化管癌治療への導入の可能性を探索しようと考えた。

具体的には、下記の2項目を明らかにすることを目的とした。

1) ナルディライジンによる消化管癌の増殖制御機構：

研究代表者らは、ナルディライジンが IL-6 を中心とした内因性サイトカインシグナルを活性化し、Cyclin D1 など細胞周期を制御する遺伝子の発現を変化させることによって細胞増殖が制御されることを見出した。この増殖シグナル伝達系の中心となるのは、TNF-alpha/NF-kappaB 及び IL-6/STAT3 シグナルである。しかし、マイクロアレイ他の実験結果より、その他の分子がナルディライジンによる増殖制御に

関与している可能性がある。例えば、ナルディライジン（NDRG1）をノックダウンした細胞では IL-8 や CXCL5 などの CXC ケモカインの発現が低下する。このことは、特に *in vivo* の腫瘍形成過程において、ナルディライジンがケモカイン分泌を介し、好中球やマクロファージ等の炎症細胞の腫瘍近傍への遊走を促進し、腫瘍増殖に有利な微小環境の構築を行っている可能性を示唆するものである。そこで本研究では、ナルディライジンによる消化管癌の増殖制御メカニズムを、間質細胞との相互作用も含め、より包括的に解明することを目標とする。

2) 消化器癌の治療標的としてのナルディライジンの役割：

従来の細胞障害性抗癌剤（5-FU 系など）に加え、近年、EGF 受容体シグナル等を標的とした分子標的治療薬が胃癌、大腸癌など消化管癌の治療に導入されている。本研究に先立ち、RNAi を用いてナルディライジン遺伝子をノックダウンすることで複数の胃癌細胞で細胞増殖が抑制されることを確認しているが、ナルディライジンは分泌蛋白質であり、細胞外に分泌された後に細胞表面にてシェディングを促進するメカニズムが提唱されている。そのため、ナルディライジンは抗体療法など臨床応用可能な治療法の標的となり得ると考えられる。実際、ナルディライジンにより正に制御される遺伝子群の中に、Cyclin D1 などの細胞周期制御遺伝子や、Bcl-2 などの抗アポトーシス作用を含む遺伝子が含まれることから、ナルディライジンの機能を抑制することにより、細胞障害性抗癌剤や分子標的治療薬による癌細胞の細胞死が増強される可能性が示唆される。そこで、ナルディライジンの機能抑制による消化管癌細胞の増殖抑制を、消化器癌治療薬との相互作用も含め解析し、更に細胞死に至る分子メカニズムを解明することを目標とする。

3. 研究の方法

1) *in vitro* においてナルディライジンによる消化管癌細胞の増殖及び抗アポトーシス誘導能の分子機序について解明を行う。具体的には、胃癌細胞や大腸癌細胞において RNAi の手法を用いてナルディライジンの発現抑制を行い、NF-kappaB 及び STAT3 シグナルの他に変化が予想される、Wnt シグナル、ケモカイン分泌、インターフェロン応答シグナルなどについて解析を行う。また、癌細胞において、ナルディライジンのプロモーター領域を活性化している転写因子の検討を行う。

2) 消化管癌治療への臨床応用の可能性を探索するため、胃癌細胞や大腸癌細胞に対する抗癌剤や分子標的治療薬などの抗腫瘍効果が、ナルディライジンの機能抑制を行った場合に变化するか解析を行う。また、*xenograft* モデルを用いて、抗ナルディライジン中和抗体の *in vivo* での治療効果につき評価を行う。

4. 研究成果

本研究においては、次のような研究成果を得た。

1) ナルディライジンによる消化管癌細胞の増殖制御機構の解析：

まず、ナルディライジンのヒト消化器癌での意義を確認するために、ヒト胃癌や大腸癌組織中の癌上皮細胞においてナルディライジンが高発現することを、免疫染色および定量的 PCR 法で確認した。さらに、ヒト臨床検体の症例集積により、ナルディライジンの発現が癌患者の癌部だけではなく、血清中でも上昇していることを確認した。

一方、胃癌や大腸癌の細胞株においてナルディライジンの発現を RNAi でノックダウンすると、癌細胞からの IL-8 や CXCL5 などの CXC ケモカインに代表される炎症

性ケモカイン分泌の低下、interferon regulatory factor あるいは interferon inducible protein などインターフェロン応答シグナルの亢進、および細胞周期調節因子の変動をともなって、癌細胞の増殖が抑制されることを確認した。また、胃癌および大腸癌の細胞株においてナルディライジンが TNF-alpha のシェディングを促進し、分泌された TNF-alpha が内因性の NF-kappaB を活性化させることを確認した。さらに、これらの細胞株では、NF-kappaB の下流で IL-6 の発現が亢進しており、オートクライン的に胃癌細胞の STAT3 を活性化することも示すことができた。これらのデータは、胃癌または大腸癌において、癌細胞が自律的に増殖し、癌が進行していくメカニズムの一端を明らかにしたものであり、別項記載のごとくその内容を論文発表することができた（雑誌論文4）。

さらに、これらの効果をナルディライジン・ノックアウトマウスの消化管で検討すると、いかなる炎症惹起刺激によっても、消化管局所への炎症細胞浸潤が有意に抑制されることを見いだした。したがって、in vitro、in vivo の双方で、ナルディライジンの阻害は強い抗炎症作用を持つことが示された。

また、消化癌細胞におけるナルディライジン発現上昇メカニズム解析も試みた。in silico のプロモーター解析によって、ナルディライジンのプロモーター領域には AP-1 など、炎症性刺激によって活性が上昇する転写因子の結合部位が存在することが明らかとなったため、ヒト大腸癌培養細胞株に LPS 刺激を加えた。すると、ナルディライジンの mRNA が増加したことから、ナルディライジンは消化管においては、LPS や炎症環境下などでオートクライン的にその発現を上昇させ、ひいては胃癌、

大腸癌の増大を促進すると推測された。

2) 消化器癌の治療標的としてのナルディライジンの役割

これまでに述べてきたように、RNAi 等を用いてナルディライジンの機能抑制を行うことにより、消化癌細胞の細胞増殖が抑制される。本研究では、将来臨床へ応用可能な手法を用いて in vivo にてナルディライジンの機能抑制を行い、治療効果が得られるかどうかを探索した。具体的には、ナルディライジンをノックダウンした大腸癌細胞株を 5-FU、イリノテカン、ドキシソルピシン等の抗癌剤に暴露し、生存細胞数の経時的な減少をナルディライジン・ノックダウン細胞及びコントロール細胞間で比較し、アポトーシスを解析した。その結果、イリノテカン、ドキシソルピシンなどの抗癌剤処理によって、Bax の変動を伴ってナルディライジン・ノックダウン細胞株でアポトーシスが有意に多く誘導された。同時に p21 などの細胞周期調整にかかわる因子も変動し、ナルディライジン・ノックダウン細胞株で癌細胞の増殖がより顕著に抑制されることを見いだした。

さらに、将来臨床へ応用可能な手法の選択肢を増やすために、ナルディライジンに対する抗体治療の可能性も探った。ナルディライジンに対する複数クローンのモノクローナル抗体は既に樹立されていたため、まず in vitro の細胞増殖アッセイを用いて、ナルディライジンの機能を抑制する抗体クローンを同定するためのスクリーニング実験を行った。その結果、複数の抗体クローンにおいて、in vitro で胃癌や大腸癌などの癌細胞株では、有意に細胞増殖が抑制されていた。さらに、ヒト大腸癌細胞をヌードマウスの皮下に移植した xenograft モデルでも、抗ナルディライジン抗体の局所投与によって、癌細胞の増殖が抑制されることが確認できた。

これら 1) 2) の検討を通じて、ナルディライジンの癌進展における役割を明らかにし、将来的な臨床展開へ向けた基礎的治験を得ることができた。

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)

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T: Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. PLoS One. 査読有、2014 May 21;9(5):e98017. doi: 10.1371/journal.pone.0098017.

2. Nakanishi Y, Seno H, Fukuoka A, Ueo T, Yamaga Y, Maruno T, Nakanishi N, Kanda K, Komekado H, Kawada M, Isomura A, Kawada K, Sakai Y, Yanagita M, Kageyama R, Kawaguchi Y, Taketo MM, Yonehara S, Chiba T: Dcl1 distinguishes between tumor and normal stem cells in the intestine. Nat Genet. 査読有、2013 Jan;45(1):98-103. doi: 10.1038/ng.2481.

3. Kawada M, Seno H, Kanda K, Nakanishi Y, Akitake R, Komekado H, Kawada K, Sakai Y, Mizoguchi E, Chiba T: Chitinase 3-like 1 promotes macrophage recruitment and angiogenesis in colorectal cancer. Oncogene. 査読有、2012 Jun 28;31(26):3111-23. doi: 10.1038/onc.2011.498.

4. Kanda K, Komekado H, Sawabu T, Ishizu S, Nakanishi Y, Nakatsuji M, Akitake R, Hiraoka Y, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Matsumoto K,

Kunichika M, Kimura T, Seno H, Nishi E, Chiba T: Nardilysin promotes gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF-alpha. EMBO Mol Med. 査読有、2012 May;4(5):396-411. doi: 10.1002/emmm.201200216.

〔学会発表〕(計2件)

1. Kanda K, Komekado H, Seno H, Chiba T: Nardilysin maintains gastric cancer cell growth via promoting shedding of TNF-a and intrinsic cytokine signaling. Research Forum, Lecture Presentation. Digestive Disease Week 2012. May, 2012, San Diego, USA

2. 神田啓太郎、妹尾浩、木村勇斗、石津祥子、米門秀行、千葉勉: Nardilysin は TNF-alpha のシェディングを促進し、腸炎を増悪させる 第98回日本消化器病学会総会 2012.04.19 東京 京王プラザホテル

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

〔その他〕

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

米門 秀行 (KOMEKADO, Hideyuki)
京都大学・医学研究科・助教 非常勤講師
研究者番号: 90452359

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし