

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670650

研究課題名(和文) ADAM10機能阻害ペプチドによる脳腫瘍幹細胞撃退の試み

研究課題名(英文) Development of peptide inhibitors targeting ADAM10 to eradicate brain tumor-initiating cells

研究代表者

井澤 一郎 (IZAWA, Ichiro)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号：20311441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、悪性グリオーマの治療に応用することを目指して、膜結合型プロテアーゼであるADAM10の機能を阻害するペプチドを開発することを試みた。ADAM10は3つのドメインでテトラスパニンTspan14と結合しており、この結合様式のために細胞膜上で折れ曲がって存在している可能性が示唆された。そして、これらのドメインをグリオーマ細胞株(U251MG細胞)の細胞培養液に加えると、ADAM10の活性を部分的に抑制できることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, to utilize for the therapeutic methods of malignant gliomas, we tried to develop peptide inhibitors targeting ADAM10, a membrane-bound protease. We found that ADAM10 binds Tspan14, a member of TspanC8 subgroup of tetraspanin membrane proteins, via three domains, leading to the bending of the extracellular portions of ADAM10. We observed that the recombinant GST fusion proteins of these three domains of ADAM10 which were exogenously added to the culture media might be able to inhibit the activity of ADAM10 in the U251MG cell culture.

研究分野：分子医学

キーワード：ADAM10 テトラスパニン

1. 研究開始当初の背景

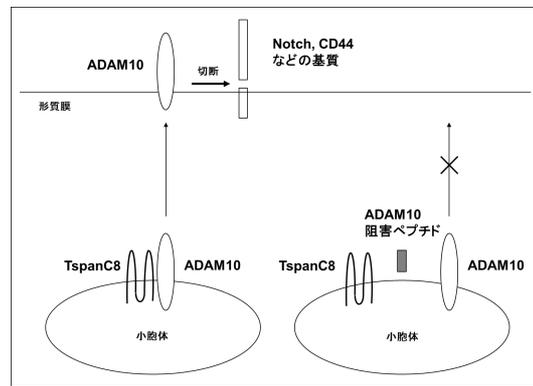
悪性神経膠腫（悪性グリオーマ）は化学療法や放射線治療に対する顕著な抵抗性を示すが、その原因のひとつが腫瘍内に存在する腫瘍幹細胞にあることが判明し、腫瘍幹細胞をターゲットとする治療法の開発が急務となっている。最近、ADAM10 が、悪性グリオーマの腫瘍幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが報告されたが、その分子メカニズムの詳細は現在のところ不明である。

ADAM10 (A disintegrin and metalloprotease 10) は、ADAM ファミリーに属する膜結合型プロテアーゼで、Notch、CD44、HER2、betacellulin、amyloid precursor protein (APP)、N-cadherin、L1 などを形質膜近傍で切断する働きをもち、いくつかのがん、炎症、アルツハイマー病などへの関与が報告されている。ADAM10 は、ヒトグリオーマでその発現が増加しており、N-cadherin、L1 などの切断を介して、グリオーマの運動性を高めている。そして、ADAM10 はがんの治療のターゲットとして注目され始めており、現在その阻害薬として、batimastat や GI254023X などがあるが、これらの薬剤は、他のプロテアーゼの機能を阻害したり、ADAM10 が制御する多種の基質への作用をすべてブロックしてしまう点など、その特異性に問題を有している。

一方、テトラスパニン C8 (TspanC8) サブファミリーに属する分子群が、ADAM10 と直接結合し、ADAM10 が小胞体より形質膜に移行するのに必須の役割を果たしていることが最近報告された (Dornier et al., J. Cell Biol., 2012; Haining et al., J. Biol. Chem., 2012)。すなわち、これらの TspanC8 サブファミリーの発現をノックダウンすると、ADAM10 がその機能を発揮する場である形質膜に局在できなくなることが明らかとなった。

2. 研究の目的

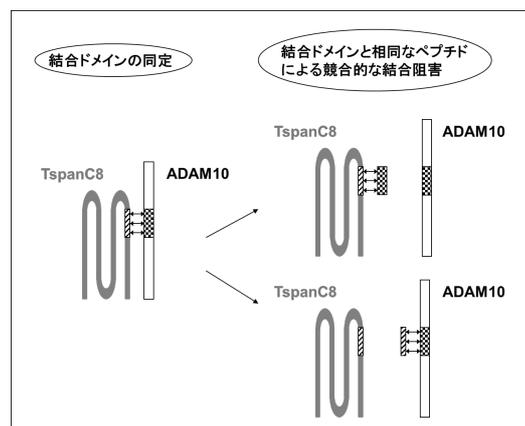
腫瘍幹細胞は、長い休眠期をもつこと（ドーマンシー）や高い薬剤排出能および DNA 修復能を示すことなどにより、抗がん剤や放射線治療に抵抗性を示すことがわかってきた。悪性グリオーマを筆頭とする脳腫瘍においても腫瘍幹細胞をいかに撃退するかが治療の鍵となるが、まだ有効な方策は得られていない。本研究で私共は、腫瘍幹細胞を撃退するためのターゲットとして ADAM10 に着目し、ADAM10 の機能を特異的に阻害するペプチドの開発に挑む。このために、まず、ADAM10 と TspanC8 サブファミリー蛋白質の結合に関与するドメインを同定する。そのドメインは、ADAM10 と TspanC8 サブファミリー蛋白質の結合を競合的に阻害して ADAM10 の形質膜移行を妨げ、ADAM10 の機能を特異的に阻害するペプチドとして使用できると考えられる（右上図参照）。



本研究で ADAM10 に対する阻害ペプチドを同定できれば、次のステップとして、今回同定した結合ドメインを用いて ADAM10 と TspanC8 サブファミリーの結合を阻害する低分子量化合物のスクリーニングを行うことが可能となる。ADAM10 機能阻害ペプチドおよび開発が期待できる新阻害薬は、悪性グリオーマだけでなく、ADAM10 が関与するがん、炎症やアルツハイマー病の研究にも応用でき、広範囲の研究分野に貢献できる可能性がある。

3. 研究の方法

テトラスパニンは、4 回膜貫通蛋白質で、TspanC8 サブファミリーには、Tspan5、Tspan10、Tspan14、Tspan15、Tspan17、Tspan33 という 6 種類の分子が属し、これらの分子群が ADAM10 と直接結合することが報告されている (Dornier et al., J. Cell Biol., 2012; Haining et al., J. Biol. Chem., 2012)。ADAM10 の機能を特異的に阻害するペプチドを開発するために、ADAM10 と TspanC8 サブファミリーの結合ドメインを探索する（下図参照）。



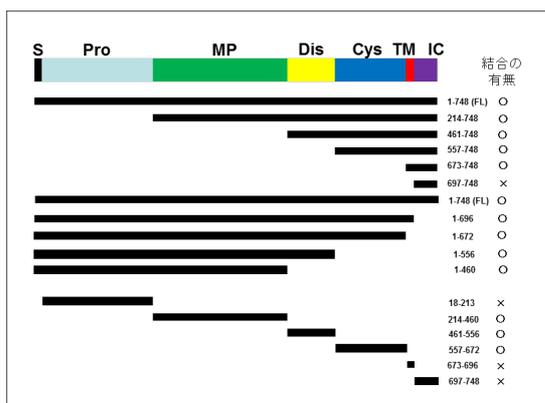
ADAM10 は、prodomain、metalloprotease domain、disintegrin domain、cysteine-rich domain、transmembrane domain、および intracellular domain より構成されるが、これらのどのドメインとテトラスパニンが結合するかを、COS7 細胞を用いた細胞強制発現系で検討する。そして、同定された結合ドメインが、実際に ADAM10 の機能を障害しう

るかをヒトグリオーマ細胞株 (U251MG) を用いて検証する。

4. 研究成果

(1) ADAM10 とテトラスパニンの結合ドメインの同定

まず、ヒト ADAM10 の cDNA を用いて、種々の ADAM10 のドメインを培養細胞で強制発現させるための種々のコンストラクトを作製した。すなわち、N 末端から削っていったシリーズ、C 末端から削っていったシリーズ、そして、それぞれのドメインを単独で発現するシリーズを作製した。これらの ADAM10 の発現タンパク質の C 末端には、GFP あるいは HA タグを付加した。一方、テトラスパニンは、ヒト Tspan14 の全長を発現するものを作製したが、こちらはその C 末端に myc タグを付加した。これらの ADAM10 および Tspan14 発現ベクターを COS7 細胞に共発現させ、抗 myc 抗体で Tspan14 を免疫沈降して、その免疫沈降物に ADAM10 の種々の変異体が含まれるかをウエスタンブロットで確認した。発現ベクターの選定、免疫沈降実験の条件検討などの試行錯誤を重ね、最終的に、ADAM10 は Tspan14 と、metalloprotease domain、disintegrin domain、および cysteine-rich domain で結合していることが明らかとなった(下図参照)。

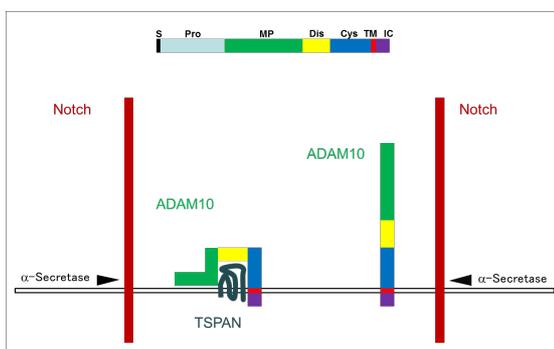


(2) ADAM10 ドメインによる ADAM10 活性の阻害作用の検討

上記で同定したテトラスパニンとの結合に必要な ADAM10 のドメインが、内在性の ADAM10 とテトラスパニンとの結合を阻害し、ADAM10 の活性を減弱できるかを検証した。ADAM10 はヒトグリオーマ細胞である U251MG 細胞において、N-cadherin を切断することが知られているので、ADAM10 の活性化状態を、N-cadherin の細胞内ドメインの量をウエスタンブロットで観察することで評価した。ADAM10 の metalloprotease domain、disintegrin domain、および cysteine-rich domain を GST との融合蛋白質として作製して、ヒトグリオーマ細胞である U251MG 細胞の培養液に加えたところ、これらのドメインは ADAM10 の活性を部分的に阻害できることを

認めた。

これらの結果は、ADAM10 が基質の切断を行う際に、その活性部位である metalloprotease domain が細胞膜直上に位置できるように、ADAM10 は Tspan14 と複数箇所て結合して折れ曲がるように存在していることを示唆する(下モデル図参照)。そして、ADAM10 とテトラスパニンの結合に参与するドメインが、ADAM10 の活性を阻害できることが示されたので、これらの成果をもとに、今後さらに、ADAM10 の機能を阻害する低分子化合物のスクリーニングや機能阻害抗体の作製に向けて研究を進めていきたいと考えている。



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 2 件)

Izawa I., Goto H., Kasahara K., Inagaki M. Current topics of functional links between primary cilia and cell cycle. *Cilia*. 4: 12, 2015. 査読有.
DOI: 10.1186/s13630-015-0021-1.

Tanaka H., Goto H., Inoko A., Makiyama H., Enomoto A., Horimoto K., Matsuyama M., Kurita K., Izawa I., Inagaki M. Cytokinetic failure-induced tetraploidy develops into aneuploidy, triggering skin aging in phosphovimentin-deficient mice. *J. Biol. Chem.* 290: 12984-12998, 2015. 査読有.
DOI: 10.1074/jbc.M114.633891.

[学会発表](計 5 件)

稲垣昌樹, 井澤一郎. 細胞周期とがん. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 10 日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市中区)
田中宏樹, 後藤英仁, 猪子誠人, 牧原弘幸, 榎本篤, 井澤一郎, 稲垣昌樹. ビメンチンリン酸化不全マウスの皮膚線維芽細胞は染色体異常性を呈し、皮膚の早期老化を示す. 第 74 回日本癌学会

学術総会，2015年10月8日，名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

牧原弘幸，田中宏樹，後藤英仁，猪子誠人，榎本篤，後藤満雄，栗田賢一，井澤一郎，稲垣昌樹．ピメンチンリン酸化不全変異マウスにおける染色体不安定性と老化．第67回日本細胞生物学会大会，2015年6月30日，タワーホール船堀（東京都江戸川区）

田中宏樹，後藤英仁，猪子誠人，井澤一郎，稲垣昌樹．分裂期ピメンチンリン酸化不全マウスは染色体異数性と老化を引き起こす．第73回日本癌学会学術総会，2014年9月27日，パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Tanaka H., Goto H., Inoko A., Makihara H., Izawa I., and Inagaki M. Phosphorylation-deficient vimentin mutant mice develop premature aging via aneuploidy and cellular senescence. Gordon Research Conference - Intermediate Filaments. June 15-20, 2014. West Dover, VT, USA.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤一郎 (IZAWA, Ichiro)

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍医化学部・室長

研究者番号：20311441

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：