

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15427

研究課題名(和文)大腸癌を「内と外から」制御する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Nrd1 as a novel therapeutic target against colorectal cancer

研究代表者

妹尾 浩(Seno, Hiroshi)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：90335266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：Nrd1は、細胞外でADAMプロテアーゼを活性化し、核内でNCoR/SMRT複合体と協調してHDAC活性を制御する。本研究では、Nrd1が癌細胞の「内と外」で大腸癌を進展させるメカニズムを検討した。そのため、(1)Nrd1 KO、Nrd1 floxed KOマウスの腸腫瘍における上皮間質相互作用や、TNF- $\alpha$ 、EGFファミリーを中心とするサイトカイン・増殖因子の活性化を包括的に解析した。(2)ヒト大腸癌細胞株とスフェロイド培養系を用いて、Nrd1、HDAC、p53の機能的関連を検討した。これらの検討により、新たな大腸癌治療シースとしてのNrd1の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Nrd1 activates extracellular ADAM proteases, and regulates the nuclear activity of HDAC in coordination with NCoR/SMRT. In this study, we investigated the mechanisms in which Nrd1 promotes colorectal cancer. First, we determined the expression of various growth factors and cytokines in the intestinal tumors in Nrd1 KO and Nrd1 floxed mice. Next, we also examined functional association among Nrd1, HDAC, and p53 in human colon cancer cells and tumor spheroids. These experiments suggest that Nrd1 may be a novel therapeutic target against colorectal cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸癌

## 1. 研究開始当初の背景

癌はゲノムの変異、エピゲノムの変化が積み重なって生じ、免疫応答や血管新生など、癌微小環境の影響を受けながら進展する。しかし、臓器ごとにドライバーとなる変異や変化は異なり、炎症を含めた免疫応答の役割も多彩である。このように多くの原因および修飾因子が「負のループ」を形成する癌に対しては、複数の因子を一括して制御する分子を治療標的として、「負のループ」を随所で断ち切る工夫が必要である。本研究では、そのような治療標的の候補として、新規メタロプロテアーゼ Nardilysin (以下 Nrd1) に着目した。Nrd1 は ADAM プロテアーゼ (とくに ADAM10/17) の「過剰な活性化」をもたらし、TNF-alpha や EGF ファミリーなど、癌進展に関わる複数の重要な因子を活性化する (JBC, 31164-, 2006; Nat Neurosci, 1506-, 2009)。さらに最近、Nrd1 が核内にも存在し、PGC-1alpha や NCoR/SMRT 複合体を介してヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の活性を制御することが明らかとなった (JBC, 10089-, 2012; 科研報告書: 20390255)。PGC-1alpha の強制発現はマウス腸発癌を抑制し (PNAS, 6603-, 2011)、HDAC 阻害剤は癌治療を目指して多数の臨床試験が行われている。研究代表者らの予備検討では、大腸癌患者では癌組織で Nrd1 が高発現し、Nrd1 ノックアウト (KO) マウスでは、炎症性発癌モデル (azoxymethane/dextran sulfate sodium; AOM/DSS) でも、多段階発癌モデル (Apc<sup>Min</sup> マウス) でも、腸腫瘍形成が非常に顕著に抑えられる傾向にあった。すなわち、Nrd1 は、大腸癌進展過程で細胞外と細胞核内の双方で機能するユニークな因子と考えられた。

## 2. 研究の目的

細胞外と細胞核内の双方で機能するユニークな因子である Nrd1 が、大腸癌進展過程で果たす役割を検討する。すなわち、(1) 細胞外で Nrd1 が活性化するサイトカイン・増殖因子の相互ネットワーク、(2) 核内での Nrd1 によるヒストン修飾を中心とする転写制御機構を解析する。さらに、新規の大腸癌治療法開発へ向けたシーズとして Nrd1 の可能性を検証する。

## 3. 研究の方法

Nrd1 が癌細胞の「内と外」で複数の因子を制御し、大腸癌を進展させるメカニズムを明らかにする。また、臨床応用へ向けたシーズとしての Nrd1 の意義を確かめる。そのため、以下のふたつの項目を検討することとした。

(1) 癌微小環境で Nrd1 が活性化するサイ

トカイン・増殖因子ネットワークの解明: Nrd1 KO、Nrd1 floxed KO マウスの腸腫瘍における上皮間質相互作用や、TNF-alpha、EGF ファミリーを中心とするサイトカイン・増殖因子の活性化を包括的に解析する。  
(2) 核内での Nrd1 によるヒストン修飾を中心とする転写制御機構の解明: マウス腸腫瘍とヒト大腸癌スフェロイド培養系を用いて、Nrd1 と NCoR/SMRT との関係、とくにクラス I HDAC に焦点をあて、その活性と下流因子の解析を行う。

## 4. 研究成果

本研究課題において、Nrd1 が癌細胞の「内と外」で複数の因子を一括制御して大腸癌を進展させるメカニズムを検討し、同時に大腸癌の新規治療シーズとしての Nrd1 の意義検証を行い、以下のような研究成果を得た。

(1) 癌微小環境で Nrd1 が活性化するサイトカイン・増殖因子ネットワークの解明: ヒト胃癌、大腸癌細胞株を用いた実験では、Nrd1 のノックダウンで癌細胞自身の TNF-alpha のシェディングが抑制されることにより、癌細胞増殖も抑制されていた。さらに Nrd1 KO マウスを用いた検討でも、マウス腸管における TNF-alpha のシェディングが抑制され、それとともに、2% DSS の 7 日間連続投与によるマウス実験的腸炎が顕著に抑制された。また、AOM を投与し、その後 2% DSS の週 5 日間連続投与を隔週 3 クール反復する実験系で、Nrd1 KO マウスの炎症性腸腫瘍形成が著明に減弱した。そこで、サイトカイン・増殖因子の活性化、ネットワークを包括的に検討することとした。Nrd1 KO マウスではほとんど腫瘍が生じないため、本研究に先立って作出した腸管上皮特異的 Nrd1 トランスジェニックマウスを用い、DSS 投与、AOM/DSS 投与および Apc<sup>Min</sup> マウスとの交配による表現型を検討した。すると、Nrd1 KO マウスとは正反対に、DSS 腸炎は増悪、AOM/DSS 投与による腸腫瘍形成は促進、Apc<sup>Min</sup> マウスの腸腫瘍形成も促進された。さらに、これら上皮を中心とする Nrd1 の gene dosage 依存性に示された顕著な炎症、腫瘍形成に関わる効果の主体が上皮か間質かをより詳細、かつ最終的に決定するために、Nrd1 コンディショナル KO マウスによる腸炎、腸腫瘍形成実験を行った。新たに作出した Nrd1 floxed KO マウスと Villin-cre、LysM-cre 等の cre マウスとの複合変異マウスを用いて、DSS 投与による腸炎を検討したところ、Villin-cre; Nrd1 floxed KO マウスでは腸炎が有意に抑制され、その抑制の程度は Nrd1 全身 KO マウスとほぼ同程度に近いものであった。その一方、LysM-cre; Nrd1 floxed KO マウスでは腸炎はほとんど抑制さ

れず、野生型コントロールマウスとほぼ同程度であった。また、*Apc<sup>Min</sup>* マウスとの交配も行い、非炎症環境下での腸腫瘍形成に及ぼす *Nrd1* の影響を解析したところ、*Apc<sup>Min</sup>; Villin-cre; Nrd1 floxed KO* マウスで有意に腸腫瘍形成は抑制される一方、*Apc<sup>Min</sup>; LysM-cre; Nrd1 floxed KO* マウスでは、コントロール *Apc<sup>Min</sup>* マウスとほぼ同等の腸腫瘍形成を認めた。これらの *Apc<sup>Min</sup>* マウスを用いた実験系では、腸腫瘍局所で TNF-alpha、Cxcl1、Ccl2 などの炎症性サイトカイン産生に、*Nrd1* の有無による有意な差が認められなかった。したがって、炎症の有無にかかわらず、上皮細胞の *Nrd1* の有無が腸腫瘍形成に決定的な役割を果たしていることが示された。

(2) 核内での *Nrd1* によるヒストン修飾を中心とする転写制御機構の解明:

上述の(1)で、炎症環境下でも非炎症環境下でも、上皮細胞の *Nrd1* が炎症、腫瘍形成に必要なことが示されたため、上皮細胞内での *Nrd1* の役割をより仔細に検討することとした。まず *Apc<sup>Min</sup>* マウスの腸腫瘍の細胞増殖、アポトーシスを調べたところ、細胞増殖には有意な差を認めなかったが、アポトーシスについては *Apc<sup>Min</sup>; Nrd1* トランスジェニックマウスにおいて有意に減少していることが判明した。そこでいくつかのアポトーシス関連蛋白の発現を調べたところ、Bax、p53、p21、PARP、cleaved Caspase 3 などに差を認めた。すなわち、*Nrd1* 欠損の場合はそれら蛋白が増加する一方、*Nrd1* 過剰発現の場合はそれら蛋白が減少していた。これらのアポトーシス関連蛋白の変動は、ヒト大腸癌細胞株を用いた *Nrd1* ノックダウン実験でも同様に確認された。さらに、これらの効果は大腸癌細胞株における p53 のノックダウンによって消失することも確認した。そこで研究代表者らは、p53 の発現がアセチル化修飾によって安定化し、その調節には HDAC による脱アセチル化酵素が重要な役割を果たすことに着目した。in situ proximity ligation assay では *Nrd1* とクラス I HDAC、とくに HDAC1 は大腸癌細胞株で核内に共存することが確認された。大腸癌細胞株で *Nrd1* のノックダウンを行うと、HDAC による脱アセチル化が減少し、p53 のアセチル化が亢進して、その発現が安定化することが明らかとなった。すなわち、*Nrd1* の減少とともに p53 発現が安定化、上昇することでアポトーシスが誘導され、その結果大腸がんの発症・進展が抑制される可能性が示唆された。実際、大腸癌細胞株を用いた検討で、p53 のプロモーターに *Nrd1* が HDAC1 とともに結合することも明らかとなった。これらの結果は、*Apc<sup>Min</sup>* マウスの腸腫瘍から樹立したオルガノイド

培養系の増殖が、HDAC 阻害剤 trichostatin A、MDM2 阻害剤 nutlin 3a の投与によって著明に抑制を受けたことから支持された。

これらの研究を通じて、*Nrd1* を中心とした多岐にわたるサイトカイン・増殖因子ネットワークの活性化機構を明らかにし、ヒストン修飾を中心とする *Nrd1* が p53 の脱アセチル化を通じて、大腸癌進展をもたらすメカニズムを学術的に探究した。本研究は、*Nrd1* のもつ空間的、機能的多面性を明らかにし、ヒト大腸癌に対する個別化医療への展開も視野にいれ、新規の大腸癌治療法開発に直結するシーズとしての *Nrd1* の可能性を強く示唆するものと考えられた。

## 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)

[雑誌論文](計 10 件)

Shiokawa M, Kodama Y, Kuriyama K, Yoshimura K, Tomono T, Morita T, Kakiuchi N, Matsumori T, Mima A, Nishikawa Y, Ueda T, Tsuda M, Yamauchi Y, Minami R, Sakuma Y, Ota Y, Maruno T, Kurita A, Sawai Y, Tsuji Y, Uza N, Matsumura K, Watanabe T, Notohara K, Tsuruyama T, Seno H, Chiba T. Pathogenicity of IgG in patients with IgG4-related disease. Gut. 査読有 2016 Aug;65(8):1322-32.

Takada Y, Fukuda A, Chiba T, Seno H. Brg1 plays an essential role in development and homeostasis of the duodenum through regulation of Notch signaling. Development. 査読有 2016 Oct 1;143(19):3532-39.

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. 査読有 2017 Feb 23;7:43052.

Kou T, Kanai M, Yamamoto Y, Kamada M, Nakatsui M, Sakuma T, Mochizuki H, Hiroshima A, Sugiyama A, Nakamura E, Miyake H, Minamiguchi S, Takaori K, Matsumoto S, Haga H, Seno H, Kosugi S, Okuno Y, Muto M. Clinical Sequencing Using a Next-Generation Sequencing-Based Multiplex Gene Assay in Patients with Advanced Solid Tumors. Cancer Sci. 査読有 2017 Jul;108(7):1440-1446.

Goto N, Ueo T, Fukuda A, Kawada K, Sakai Y, Miyoshi H, Taketo MM, Chiba T, Seno H. Distinct roles of Hes1 in normal stem cells and tumor stem-like cells of the intestine. *Cancer Res.* 査読有 2017 Jul 1;77(13):3442-3454.

Yoshioka M, Ohashi S, Ida T, Nakai Y, Kikuchi O, Amanuma Y, Matsubara J, Yamada A, Miyamoto S, Natsuzaka M, Nakagawa H, Chiba T, Seno H, Muto M. Distinct effects of EGFR inhibitors on epithelial- and mesenchymal-like esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 査読有 2017 Aug 1;36(1):101.

Matsumoto T, Takai A, Eso Y, Kinoshita K, Manabe T, Seno H, Chiba T, Marusawa H. Proliferating EpCAM-positive ductal cells in the inflamed liver give rise to hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 査読有 2017 Nov 15;77(22):6131-6143.

Eso Y, Uza N, Yamagishi H, Imada K, Kimura Y, Masui T, Kodama Y, Seno H. Utility of KRAS mutational analysis in the preoperative diagnosis of synchronous pancreatic cancer and intrahepatic cholangiocarcinoma. *Medicine (Baltimore).* 査読有 2017 Dec;96(50):e9217.

Matsumoto T, Seno H. Updated Trends in Gallbladder and Other Biliary Tract Cancers Worldwide. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 査読有 2018 Mar;16(3):339-340.

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, Seno H. Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation. *JCI Insight.* 査読有 (in press)

[学会発表](計 14 件)

Tsuda M, Fukuda A, Chiba T, Seno H. Brg1 Plays an Important Role in Acinar Cell-Derived PanIN Formation Through Regulation of SOX9 Expression. *Digestive Disease*

Week 2016 2016.5.22 San Diego  
妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、福田晃久  
「消化器腫瘍における腫瘍幹細胞標的治療」第 75 回日本癌学会総会  
2016.10.6 横浜

妹尾浩 Cell of origin and tumor stem cells in mouse digestive organ tumors. 第 47 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 2016.11.10 東京

妹尾浩、丸野貴久、津田喬之、福田晃久  
Hierarchy in mouse digestive organ tumor. 第 39 回日本分子生物学会年  
2016.12.1 横浜

妹尾浩 「下部消化管疾患における臨床と研究の融合」日本消化器病学会近畿支部教育講演 2017.2.25 大阪

生田耕三、福田晃久、妹尾浩 「代謝、炎症、発癌を制御する因子 Nardilysin の可能性」第 103 回日本消化器病学会総会内 第 1 回消化器臓器間ネットワーク附置研究会 2017.4.21 東京

Ikuta K, Fukuda A, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Kimura Y, Matsumoto Y, Takada Y, Yoshioka T, Maruno T, Takaori K, Uemoto S, Nishi E, Seno H. Nardilysin functions as a tumor suppressor in pancreatic ductal adenocarcinoma through maintaining acinar cell differentiation and suppressing pancreatitis. *Digestive Disease Week 2017* 2017.5.6 Chicago

妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、福田晃久  
Plasticity and stemness in gastrointestinal tumorigenesis. 第 15 回幹細胞シンポジウム 2017.5.27 東京

Goto N, Ueo T, Fukuda A, Chiba T, Seno H. The role of Hes1 in the normal and tumor stem cells of the intestine. *GI Research Academy 2017* 2017.6.9 東京

木村佳人、福田晃久、丸野貴久、津田喬之、生田耕三、高田裕、丸野貴久、千葉勉、妹尾浩 「Arid1A は膵管細胞からの IPMN と IPMN 由来膵癌の発生を抑制する」第 48 回日本膵臓学会大会 2017.7.14 京都

生田耕三、福田晃久、小川智、増尾謙志、後藤規弘、平松由紀子、津田喬之、木村佳人、松本善秀、吉岡拓人、丸野貴久、西英一郎、妹尾浩 「ナルディライジンは膵外分泌細胞の維持、膵炎の抑制を介して、膵発癌を抑制する」第 48 回日本膵臓学会大会 2017.7.14 京都

妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、福田晃久  
「消化器がんモデルマウスを用いたがん幹細胞と階層性の検討」第26回がん転移学会学術集会・総会 2017.7.27 大阪

生田耕三、福田晃久、津田喬之、丸野貴久、神田啓太郎、西英一郎、妹尾浩 「ナルディライジンは膵炎の自然発生制御を介して、膵発癌を制御する」第76回日本癌学会学術総会 2017.9.29 横浜  
妹尾浩、丸野貴久、後藤規弘、津田喬之、木村佳人、福田晃久 Plasticity and stemness in pancreatic cancer development. 第76回日本癌学会総会 2017.9.30 横浜

該当なし

〔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  
<https://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~gastro/gastro.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

妹尾 浩 (SENO, Hiroshi)  
京都大学・医学研究科・教授  
研究者番号：90335266

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者