

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16265

研究課題名(和文) 小児肝がん細胞において分子標的となりうる膜蛋白ADAM32の制御機構の解明

研究課題名(英文) ADAM32 plays an oncogenic role in hepatoblastoma

研究代表者

深澤 賢宏 (Fukazawa, Takahiro)

広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：80734285

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)：小児がんは治療成績が向上してきているが、未だに難治な症例も少なくなく、治療にも治療後の晩期障害も大きな問題です。そこで、詳細な分子機構に基づく、安全で治療効果の高い新たな分子標的薬の開発が望まれています。最近、膜蛋白質ADAMファミリーは、様々なヒトがん腫において発現変動が報告されていることから、患者検体における解析を行った結果、肝芽腫において特異的に発現亢進する分子としてADAM32を見出しました。そして、ADAM32の細胞機能を、肝芽腫細胞株を用いて解析した結果、細胞遊走・浸潤、幹細胞性、また抗がん剤に対し抵抗性を有することが明らかになり、がん治療の分子標的となる可能性が示されました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫に対する分子標的治療法は未だ開発されていないため、より治療効果が高く副作用の少ない分子標的治療法開発が望まれています。本研究では、肝芽腫におけるADAM32の機能を検討した結果、ADAM32が細胞遊走・浸潤、幹細胞性などの、がん遺伝子としての機能を有していることが明らかとなりました。ADAM32のがんにおける機能を初めて明らかにした本研究は、肝芽腫だけでなく、ADAM32が関与する他のがん種においても、新たな分子機構解明や分子標的薬開発に貢献すると考えられます。

研究成果の概要(英文)：The treatment results for pediatric cancer including hepatoblastoma have improved, but cases of refractory disease still occur. Therefore, there is a demand for the development of a novel molecular target drug that is safe and has a higher therapeutic effect based on a detailed molecular mechanism. From the analysis of patient specimens, we found expression level of ADAM32 particularly high in hepatoblastoma. And it was found that the ADAM32 has a role in cell migration / invasion, stemness, and anticancer activity. We conclude that ADAM32 plays a crucial role in progression of hepatoblastoma and other cancers, so it might be a promising molecular target in anticancer therapy.

研究分野：分子生物学

キーワード：ADAM32 肝芽腫 ノックダウン CDDP アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小児がんは治療成績が向上してきているが、未だに難治な症例も少なくなく、また治療にも治療後の晩期障害も大きな問題です¹⁾。そこで、詳細な分子機構に基づく、安全でより治療効果の高い新たな分子標的薬の開発が望まれています。ADAMファミリーは発生過程において器官形成の制御をしていることが知られています²⁾。一方、様々なヒトがん腫において発現変動が報告されており、がん細胞の増殖及び浸潤・転移で重要な役割をしていることが明らかとなりつつあります³⁾。そこで、我々は肝芽腫におけるADAMファミリーの発現をマイクロアレイで解析した結果、肝芽腫において特異的に発現亢進する分子としてADAM32を見出しました。しかしながら、ADAM32のがんにおける機能や同分子の発現制御機構に関してはほとんど明らかになっていませんでした。

2. 研究の目的

ADAM32の機能や発現制御機構の解明、さらには肝芽腫における治療効果の診断法開発、効果的な治療法開発をめざして、本研究を立案しました。

3. 研究の方法

(1) ADAM32発現細胞の作製、shRNAベクター作製

ADAM32のがんにおける機能の検討を行うために、テトラサイクリン誘導システムを用いてADAM32の発現を調節できる肝芽腫細胞株HepG2の樹立を行った。また、ノックダウン実験のために、shRNAベクターの作製を行った。

(2) ADAM32の細胞機能解析

ADAM32を強発現、またはノックダウンさせて、肝芽腫細胞株の細胞増殖、コロニー形成能、細胞遊走・浸潤能を検討した。

(3) ADAM32のシスプラチン感受性変化の検討

ADAM32を強発現、またはノックダウンして、肝芽腫患者の治療において標準的に使用されるシスプラチン(CDDP)を作用させて、TUNEL染色、ウェスタンブロッティングによりCaspase-3の活性を解析することで、ADAM32発現変動のアポトーシスへの影響を検討した。

(4) ADAM32の抗アポトーシス作用の機序解明

ADAM32の発現が低下することで、細胞死が引き起こされる詳細なメカニズムを検討するために、内因性アポトーシスシグナルを、変異型p53を発現させることにより阻害させて、Caspase-3の活性、死細胞数の検討を行った。また、外因性アポトーシスシグナルをCaspase-8に特異的な阻害剤であるZ-IETD-FMKを使用して阻害させて、同様に検討を行った。

(5) ADAM32発現制御機構の解明

固形がんの微小環境である低酸素に着目して、ADAM32の発現制御機構解明を試みた。

低酸素暴露によるmRNA発現変動:肝芽腫細胞株HepG2を1%O₂に曝露させて、24-96時間のタイムポイントで細胞を回収し、mRNAの発現レベルをリアルタイムPCR法で解析した。

プロモーター活性の検討:転写開始点より2kbほどの上流までの塩基配列をPCRにて増幅し、pGL4.26ヘサブクロニングした。このルシフェラーゼレポーターを用いて検討した。

mRNA安定性の検討:Actinomycin Dを用いて転写阻害させてmRNAの安定性を検討した。

4. 研究成果

(1) 細胞機能の検討

ADAM32を強発現すると、肝芽腫細胞株のコロニー形成能、細胞遊走・浸潤能が明らかに亢進、細胞増殖が軽度亢進することが分った。一方、ADAM32を一過性にノックダウンするとコロニー形成能、細胞遊走・浸潤能、細胞増殖が明らかに低下することが分った(図1、表1)。

表1. 細胞機能のまとめ

細胞機能	強制発現	ノックダウン
増殖能	亢進	低下
コロニー形成能	亢進	低下
遊走能	亢進	低下
浸潤能	亢進	低下

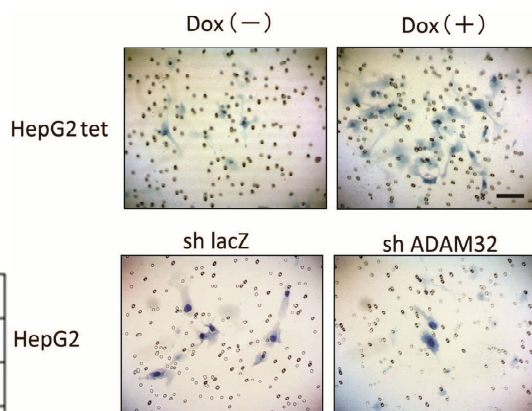


図1. 細胞浸潤能の評価

(2) ADAM32 発現変動によるシスプラチン感受性変化

ADAM32 の発現をノックダウンさせて、肝芽腫患者の治療において標準的に使用されるシスプラチン (CDDP) を作用させた結果、有意に TUNEL 陽性細胞が増加していた (図 2)。また、ノックダウン群で Cleaved Caspase-3 の発現が強くなり、アポトーシスシグナルの活性化が引き起こされていることが分かった (図 3)。

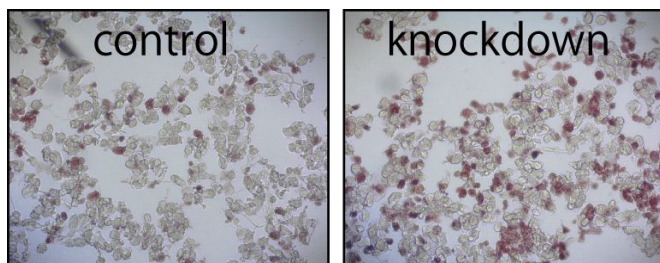


図 2 . TUNEL 染色

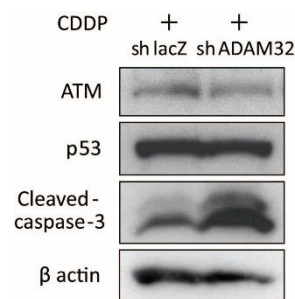


図 3 . ウェスタンブロッティング

(3) ADAM32 の抗アポトーシス作用の機序解明

変異型 p53 を発現させることで内因性アポトーシスシグナルを阻害したが、ADAM32 ノックダウン群で TUNEL 陽性細胞が増加する傾向に変化はなかった。次に、caspase-8 特異的阻害剤である Z-IETD-FMK を用いて検討した結果、ADAM32 ノックダウン群で観察された TUNEL 陽性細胞増加が著しく抑制された (図 4)。

以上のことから ADAM32 は、外因性アポトーシスシグナルを制御することで、シスプラチンへの感受性に関与していることが考えられた。

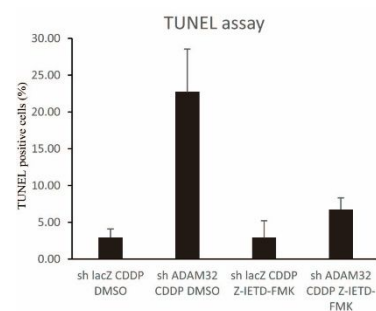


図 4 . TUNEL 陽性細胞数

(4) ADAM32 の発現制御機構の解明

肝芽腫細胞株 HepG2 を 1%O₂ に 48 時間曝露させた結果、ADAM32 の mRNA 発現が高くなることが明らかとなった。

プロモーター活性の検討

ADAM32 のプロモーター領域を組み込んだルシフェラーゼレポーターを作製し検討した結果、低酸素環境下で ADAM32 のプロモーター活性が軽度亢進していた。

mRNA 安定性の検討

mRNA の安定性を Actinomycin D を用いて検討した結果、低酸素環境下で ADAM32 mRNA の半減期が 2 倍程度延長し、ADAM32 mRNA の安定性が高くなっていった (図 5)。

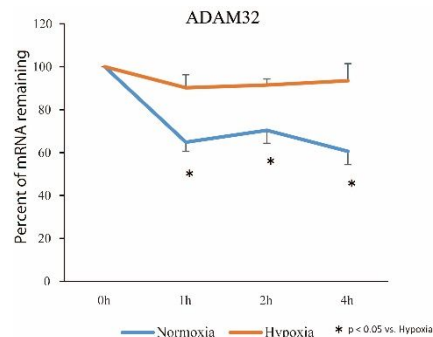


図 5 . ADAM32 mRNA 安定性

以上のことから、低酸素により引き起こされる ADAM32 の発現亢進は、プロモーター活性、mRNA 分解抑制、両方の機序により制御されている可能性が考えられた。

(5) まとめ

本研究の結果から、ADAM32 はがん治療の分子標的となる可能性が示唆された。さらなる研究により、抗がん剤の感受性変化など腫瘍進展に関わる機能や ADAM32 が高発現となるメカニズムの詳細が明らかになれば、治療抵抗性を示す群に対する抗体医薬や核酸医薬などの新たな分子標的治療法開発や診断法開発に繋がると考えられる。

<引用文献>

- Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K et al. Resectability and tumor response after preoperative chemotherapy in hepatoblastoma treated by the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT)-2 protocol. J Pediatr Surg. 2016; 51: 2053-2057.
- Blobel CP. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005; 6: 32-43.
- Mochizuki S, Okada Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. Cancer Sci. 2007; 98: 621-628.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤賢宏、谷本圭司、山岡絵美、金輪真佐美、廣橋伸之、檜山英三
2. 発表標題 肝芽腫において高発現するADAM32発現制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深澤賢宏、谷本圭司、山岡絵美、金輪真佐美、廣橋伸之、檜山英三
2. 発表標題 小児肝がんにおいて高発現する膜蛋白ADAM32の分子機能および治療標的としての検討
3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 深澤賢宏、谷本圭司、山岡絵美、金輪真佐美、廣橋伸之、檜山英三
2. 発表標題 小児肝がん細胞において高発現する膜蛋白ADAM32の意義
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	檜山 英三 (Hiyama Eiso)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・教授 (15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	谷本 圭司 (Tanimoto Keiji)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教 (15401)	