

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16723

研究課題名(和文) ADAM9を標的とし、NK細胞傷害活性増強による癌自然免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of anticancer therapy targeting ADAM9 and NK cells in HCC

研究代表者

荒井 潤 (Jun, Arai)

昭和大学・医学部・講師

研究者番号：30766176

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究結果として、2種のロイコトリエン拮抗薬が、MICAの切断酵素であるADAM9の活性を抑制することで、膜型MICAの切断を抑え肝癌細胞上の膜型MICAを増加させることを示した(Cancer Immunol Immunother. 2021)。

さらに拡大した検討により、複数のレチノイドもADAM9を抑制し膜型MICAの切断を抑止すること、さらにはレチノイドの効果発現に関与する受容体であるRXRが膜型MICAの切断に寄与していることも明らかにした(Anticancer Res. 2021)。これらを用いることでADAM9を標的とした肝癌抑制法が開発できる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Natural killer細胞は腫瘍免疫の中心を担い、肝臓組織の約18%を占める。そのため正常な肝臓では癌細胞が発生しても、NK細胞により癌細胞が除去されやすい環境にある。我々はゲノムワイド関連解析によりC型肝炎の肝癌に寄与する感受性遺伝子として抗NK細胞のリガンドであるMHC class I polypeptide-related sequence A (MICA)を同定した。今回新たにLTRAsとレチノイドがMICA切断抑制に寄与することを示した。

今後の肝臓病治療の目標として、肝癌予防法の発癌抑制法を検討すべき時代にさしかかっており、本課題は社会的にニーズの高い領域である。

研究成果の概要(英文)：Background/Aim: The association between MICA and HCC development was identified in our previous genome-wide association study. Decreasing soluble MICA (sMICA) through MICA sheddases suppression facilitates natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. The expression of ADAM9 in HCC has been correlated with poor prognosis, and our recent study showed that its suppression contributes to cancer elimination by decreasing sMICA. Materials and Methods: Human HCC cell line PLC/PRF/5 and HepG2 cells were used. sMICA levels were measured by ELISA. Expression of RXRs and RARs was knocked down by siRNA. Results: In our screening of FDA-approved drugs in vitro, two leukotriene receptor antagonists (LTRAs), and retinoids were found to be efficient ADAM9 inhibitors. Treatment with LTRAs and retinoids reduced MICA shedding in human HCC cells. Conclusion: LTRAs and retinoids can be potential novel agents for HCC treatment.

研究分野：癌免疫

キーワード：MICA NK細胞 肝細胞癌 癌免疫 ロイコトリエン拮抗薬 レチノイド ADAM9 レゴラフェニブ

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはゲノムワイド関連解析により C 型肝炎の肝発癌に寄与する感受性遺伝子として抗腫瘍免疫リガンドである MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) を同定した (Kumar V, *Nat Genet* 2011)。発癌群において可溶性 MICA の血中濃度が上昇していることを示した。MICA は NK 細胞の認識する NK グループ 2D リガンドの一つで、ウイルス感染や癌化等のストレスにより転写発現が誘導され細胞膜上に発現する。NK 細胞がこの癌細胞膜上の MICA を認識することで癌細胞の選択的排除が行われる。細胞膜上の MICA は膜型 MICA と呼ばれ抗腫瘍免疫の重要な制御因子として注目されている。一方、細胞膜上より切り離された可溶性 MICA は NK 細胞を攪乱しその癌細胞への認識機構を阻害することが知られている。これらのことから、肝発癌には膜型 MICA と可溶性 MICA のバランスが関係し、その制御により NK 細胞による抗腫瘍作用を向上させ肝発癌抑止に繋がれると考えた。膜型 MICA の切断を抑止し高発現させた MICA を細胞膜上に留め置かせる手法も、肝発癌制御機構の制御にとって重要である。申請者は膜型 MICA の切断機構に着目し、ヒト肝癌細胞株において ADAM ファミリーと呼ばれる金属要求性蛋白分解酵素群のうち、a disintegrin and metalloprotease9 (ADAM9)、ADAM10、ADAM17 が膜型 MICA 切断に強く関与していることを示した (Arai J, *Int J Cancer* 2018)。

## 2. 研究の目的

肝癌における ADAM9 の高発現が患者の予後不良に関与していることが知られているが、ADAM9 酵素活性抑制により NK 細胞による自然免疫機構のサーベイランスを増強することで、発癌予防法を開発することを最終的な目標とする。

## 3. 研究の方法

### i) ADAM9 活性阻害に寄与する薬剤の探索、活性阻害反応の最適化検証

・ in vitro ADAM9 assay system を利用して ADAM9 の酵素活性を抑制する薬剤を抽出する。rhADAM9, 基質, FDA 承認薬ライブラリーの各薬剤を混合し 37 環境下で反応させ、ADAM9 酵素活性を基質の切断効果として吸光度で測定する。Positive control として ADAM9 酵素活性阻害薬の ilmostat を用いる。

・抽出された候補薬に関して詳細に濃度設定、処理時間の設定を調整し異なった条件下での効果判定を行う。

### ii) 候補薬が ADAM9 抑制を介して MICA 切断阻害に関与しているかの検討

さらにヒト肝癌細胞株 (HepG2、PLC/PRF/5 等) を使用して、候補薬が 実際に肝癌細胞株における MICA の切断阻害に関与するかを明らかにする。具体的には、mMICA の発現量をフローサイトメトリーで評価し切断に及ぼす影響を検証し、さらに切断され細胞上清中に浮遊する可溶性の sMICA を ELISA で評価する。

同時に siRNA で ADAM9 のノックダウン処理をした上で同様の評価を行い、MICA に及ぼされる効果が解消されるかの実証も行う。候補薬が実際に ADAM9 抑制を介して MICA 切断阻害に関与することの proof of concept を得る。

#### 4 . 研究成果

申請者らは安全に投与可能な 2 種のロイコトリエン拮抗薬が、MICA の切断酵素である ADAM9 の活性を抑制することで、Natural Killer 細胞による癌免疫を賦活化させる可能性を示した (*Arai J, Cancer Immunol. Immunother. 2021*).

さらに拡大した検討により、複数のレチノイドも ADAM9 を抑制し膜型 MICA の切断を抑制すること、さらにはレチノイドの効果発現に関与する受容体である RXR が膜型 MICA の切断に寄与していることも明らかにした (*Otoyama Y, Anticancer Res. 2021*). これらを用いることで ADAM9 を標的とした肝発癌抑止法が開発できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jun Arai, Yuu Shimozuma, Yumi Otoyama, Ikuya Sugiura, Yoko Nakajima, et al	4. 巻 19
2. 論文標題 Three cases of histologically proven hepatic epithelioid hemangioendothelioma evaluated using a second-generation microbubble contrast medium in ultrasonography: case reports	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 187-194
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12876-019-1113-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------