

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22790641
 研究課題名（和文） ナルディライジンおよびADAMによる胃癌細胞の増殖シグナル制御機構の解析
 研究課題名（英文） Roles of nardilysin and ADAM proteases in the regulation of gastric cancer cell growth.
 研究代表者
 米門 秀行 (KOMEKADO HIDEYUKI)
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90452359

研究成果の概要（和文）：ナルディライジン（NRDc）はADAM17をはじめとするADAMプロテアーゼと協同して種々の増殖因子前駆体のエクドメインシエディングを促進する。胃癌組織においてNRDcは癌上皮細胞において高発現していた。NRDcの発現をノックダウンすると胃癌細胞株の増殖が抑制された。その機序として、NRDcは胃癌細胞から分泌されるTNF- α のエクドメインシエディングを促進しており、その結果活性化されたNF- κ BによりIL-6をはじめとするサイトカインの転写及び分泌が亢進し、STAT3の活性化を介して増殖関連遺伝子の発現が維持されていることが解明された。

研究成果の概要（英文）：Nardilysin (NRDc) has been reported to promote ectodomain shedding of the precursor forms of various growth factors in cooperation with ADAM proteins such as ADAM17. NRDc expression was frequently elevated in the cancer epithelium of gastric cancer tissues. After knockdown of NRDc expression, gastric cancer cell growth was suppressed. In gastric cancer cells, NRDc promotes ectodomain shedding of pro-TNF-alpha, leading to the upregulated transcription of various cytokines such as IL-6. As a result, NRDc maintains the expressions of growth-related genes via activated STAT3.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）、胃癌

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器癌の発癌過程において、増殖因子を介する様々なシグナル伝達経路が活性化されることが広く知られている。代表的な

シグナルとして、上皮増殖因子 (epidermal growth factor, EGF) およびその受容体 (EGF receptor) がある。EGF受容体はリガンド (増殖因子) により活性化されると細

胞内における複数のシグナル伝達経路が活性化されるが、その下流で活性化される代表的なシグナルとして、MAP キナーゼ (mitogen-activated protein kinase) 経路、PI3 キナーゼ-Akt 経路、および STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) 経路が有り、細胞の環境などに応じて各々のシグナルが活性化される (Hynes NE 他、Nat. Rev. Cancer 5, 2005)。胃癌において、EGFR シグナルが活性化されていることが以前より知られている。

(2) 増殖因子やサイトカインのうちいくつかは膜結合型蛋白質として合成され、細胞膜上で細胞外ドメインがプロテアーゼによって切断され遊離することにより受容体に結合できるようになる (エクストドメインシェディング)。エクストドメインシェディングに関わるプロテアーゼとして、ADAM17 (別名 tumor necrosis- α converting enzyme, TACE) を始めとする ADAM プロテアーゼ群がある。ADAM17 は胃癌を含む種々の癌において高発現しており、発癌過程や癌細胞の増殖に寄与することが知られている (Murphy G, Nat. Rev. Cancer 8, 2008)。ADAM17 によって切断され活性化される代表的な増殖因子やサイトカインとして、ヘパリン結合性 EGF 様増殖因子 (HB-EGF) や TNF- α が報告されている。

(3) ナルディライジン (nardilysin, NRDe) 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り、HB-EGF と結合することが報告されている (Nishi E 他、EMBO J. 20, 2001)。また、ナルディライジンは ADAM17 や ADAM10 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 (Nishi E 他、J. Biol. Chem. 281, 2006) や TNF- α (Hiraoka Y 他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 370, 2008) 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。また最近、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・髄鞘の形成を司ることも明らかになっている (Ohno 他、Nat. Neurosci. in press)。しかし、ナルディライジンが発癌や癌の進行に関与しているかについては、研究開始当初報告はなかった。

2. 研究の目的

(1) 臨床検体を用いて、胃癌患者におけるナルディライジンの発現を検索する。

(2) 胃癌由来の細胞株を用いて、胃癌細胞の生物学的特性におけるナルディライジンの役割を、細胞生物学的及び生化学的手法を用いて解析する。

(3) ナルディライジンを標的とした治療法が臨床的に応用可能であるか探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 胃癌患者の血清中及び胃癌組織中におけるナルディライジン蛋白質の発現を、それぞれ ELISA 及び免疫組織学的手法を用いて検索した。

(2) 複数の胃癌由来の細胞株において、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し、細胞増殖の変化を *in vitro* で解析した。

(3) ナルディライジンの発現が恒常的にノックダウンされる細胞株を樹立し、DNA マイクロアレイの手法を用いて網羅的な遺伝子発現の変化をコントロール細胞株と比較した。また、増殖因子やサイトカインの培養上清中への分泌量の変化を、抗体アレイの手法を用いて解析を行った。

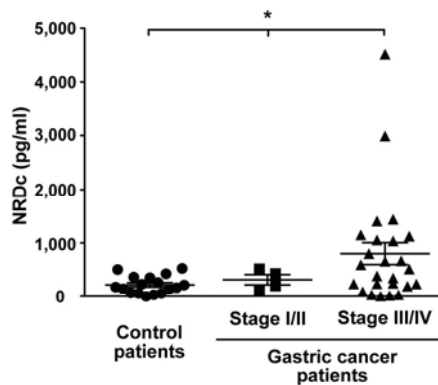
(4) ナルディライジンの下流に位置する細胞内シグナル (TNF- α /NF- κ B シグナル及び IL-6/STAT3 シグナル) を、細胞学および生化学的手法を用いて解明した。

(5) ナルディライジンの発現を恒常的にノックダウンした胃癌細胞株をヌードマウスの皮下に局注し、*in vivo* での増殖の変化をコントロール細胞株と比較した。

4. 研究成果

(1) 胃癌におけるナルディライジンの発現
胃癌患者血清中のナルディライジン蛋白質の発現を ELISA の手法を用いて検討したところ、胃癌患者 (n = 25) では対象患者 (n = 17) と比較して血清中のナルディライジンの濃度が有意に高く、また胃癌の臨床病期が進行している患者で濃度がより高い傾向が認められた (下図)。更に、胃癌組織におけるナルディライジンの発現を免疫組織化学的に解析したところ、解析した全てのサンプル (n = 22) において、ナルディライジンは胃癌上皮細胞で高発現していた。また、胃癌細胞におけるナルディライジンの発現部位を共焦点顕微鏡で解析したところ、ナルディライジンは胃癌細胞の細胞質、細胞膜の両方で発現しており、細胞膜において ADAM17

との共局在が認められた。



(2) ナルディライジンによる胃癌細胞の増殖制御

胃癌由来細胞株である TMK-1、MKN-1、MKN-45 各細胞におけるナルディライジンの発現を、microRNA モチーフをベースとした RNAi コンストラクトを導入することによりノックダウンし、MTS アッセイを用いて細胞増殖の変化を解析したところ、いずれの細胞株においても細胞増殖能の低下が認められた。また、MMP/ADAM 阻害剤である TAPI-1 処理や、ADAM17 もしくは ADAM10 のノックダウンによっても同様に細胞増殖が低下し、ナルディライジンや ADAM プロテアーゼが胃癌の細胞増殖に関与していることが示された。

(3) ナルディライジンノックダウン細胞における増殖因子やサイトカインの発現の変化

TMK-1 胃癌細胞においてナルディライジンの発現が恒常的にノックダウンされる細胞株を樹立し、DNA マイクロアレイにて遺伝子発現の変化を網羅的に解析した。下表に示す通り、ナルディライジンノックダウン細胞では、IL-6、IL-1 α 、CXCL5 などのサイトカインやケモカインの発現がコントロール細胞と比較して低下していた（マイクロアレイの raw data は NCBI GEO データベース（後述）に投稿済）。また、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から培養上清（血清非添加）中に分泌される増殖因子やサイトカインプロファイルの変化を抗体アレイを用いて解析したところ、IL-6 および IL-8 の分泌低下が認められた。更に、EILSA にて培養上清中の増殖因子やサイトカインの濃度を定量的に解析したところ、IL-6 及び IL-8 の濃度の有意な低下が確認された他、ナルディライジンによりシェディングを受けることが知られている、TNF- α 及び HB-EGF に関しても分泌の低下が認められた。以上より、ナルディライジンは胃癌細胞において、TNF- α や HB-EGF の他、

種々のサイトカインの分泌を促進していることが明らかになった。

Table 1. A partial gene list of gene expression analysis

Gene symbol	Description	Fold change ^a
CCNA1	Cyclin A1	-8.262
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) ligand 5	-4.518
NRD1	Nardilysin (N-arginine dibasic convertase)	-2.935
FGF7	Fibroblast growth factor 7	-2.874
IL1A	Interleukin 1, alpha	-2.689
S100A8	S100 calcium binding protein A8	-2.665
IL6	Interleukin 6 (Interferon, beta 2)	-2.638
SPON2	Spondin 2, extracellular matrix protein	2.015
CCL5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	2.110
IRF9	Interferon regulatory factor 9	2.979
TGFBRI	Transforming growth factor, beta receptor I	3.934
IFI6	Interferon, alpha-inducible protein 6	6.328
OCLN	Occludin	8.338

(4) ナルディライジンによる TNF- α /NF- κ B 及び IL-6/STAT3 シグナルの制御機構

①ナルディライジンにより分泌が促進される何らかの液性因子により胃癌細胞の増殖が自律的に促進されていると見え、ナルディライジンの発現を恒常的にノックダウンした TMK-1 細胞及びコントロール細胞から採取した培養上清にて野生型 TMK-1 細胞を処理し、細胞増殖に関わる代表的な細胞内シグナル (MAPK シグナル、Akt シグナル、STAT3 シグナル) の経時的な活性化をリン酸化抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析したところ、ナルディライジンノックダウン細胞由来の培養上清は、STAT3 の活性化能 (リン酸化能) が著しく低下していた。また、ナルディライジンノックダウン細胞由来の核抽出物は、STAT3 コンセンサス配列への DNA 結合能が低下していた。一方で、TMK-1 細胞を IL-6 中和抗体もしくは JAK2 阻害剤 (AG490) 添加下で培養したところ、細胞増殖が有意に抑制された。(3)の結果と合わせ、胃癌細胞ではナルディライジンにより活性化される自律的な IL-6/STAT3 シグナルが細胞増殖に関与していることが示された。

②ナルディライジンによる IL-6 の分泌促進を介在するメカニズムとして、TNF- α /NF- κ B シグナルに着目した。ナルディライジンや ADAM17/10 をノックダウンした細胞では遊離型 TNF- α の分泌が低下していたが、膜貫通型蛋白質である前駆体 TNF- α (pro-TNF- α) の発現は低下しておらず、ナルディライジンによる ADAM プロテアーゼの活性化が、遊離型 TNF- α の効率的な分泌に必要であることが示唆された。更に、ナルディライジンをノックダウンした TNK-1 細胞では、NF- κ B のレポーター遺伝子活性、NF- κ B コンセンサス配列への DNA 結合能のいずれも低下していた。TMK-1 細胞を TNF- α に対する中和抗体添加下で培養すると、IL-6 の転写及び培養上清への分泌や細胞増殖が抑制され、一方、ナルディライジンノックダウン細胞を組換え型 TNF- α 蛋白質で

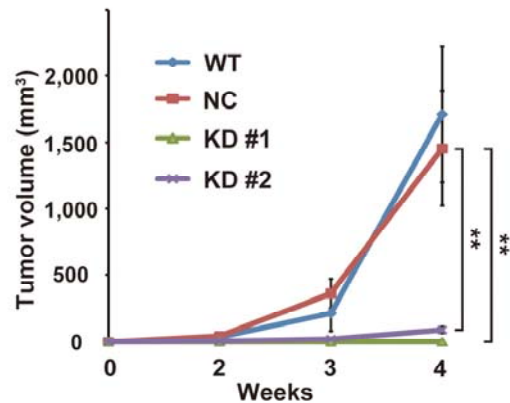
刺激すると、IL-6の分泌、細胞増殖能のいずれも回復を認めた。以上より、ナルディライジン及びADAMプロテアーゼによるTNF- α のエクトドメインシェディングの活性化が胃癌細胞の内因性NF- κ B活性を促進しており、活性化されたNF- κ Bを介してIL-6遺伝子の発現が亢進することが示された。

(5) ナルディライジンによる細胞増殖/抗アポトーシス関連遺伝子の発現促進

癌細胞においてSTAT3やNF- κ Bにより転写が促進されることが知られている、細胞増殖や抗アポトーシスに関連する遺伝子群(cyclin D1, c-Myc, Bcl-2)の発現の変化をqRT-PCRを用いて解析した。ナルディライジンをノックダウンした細胞ではいずれの遺伝子においても発現が低下しており、ADAM17及びADAM10をノックダウンした場合や、TNF- α もしくはIL-6に対する中和抗体の添加下で培養した場合も同様に低下を認めた。以上より、胃癌細胞においてナルディライジン及びADAMプロテアーゼによりTNF- α /NF- κ B及びIL-6/STAT3シグナルが活性化される結果、細胞増殖及び抗アポトーシス関連遺伝子群の転写が誘導されることが細胞増殖を維持する機構の一つであることが示唆された。

(6) xenograftモデルを用いたナルディライジンによるin vivoでの胃癌細胞の増殖制御

ナルディライジンを恒常的にノックダウンしたTMK-1由来の2つの異なった細胞株(KD #1及びKD #2)をヌードマウスの皮下に局注して、腫瘍形成能を4週間まで解析したところ、野生型(WT)及びコントロール(NC)細胞と比較して、いずれの細胞株も腫瘍形成能が著しく抑制された(下図)。更に、ナルディライジンノックダウン細胞由来の腫瘍では、腫瘍抽出物中のヒトIL-6蛋白質の発現および腫瘍細胞におけるリン酸化STAT3の核内での発現が低下していた。以上より、xenograftモデルにおいてもナルディライジンによるIL-6/STAT3シグナルの活性化が腫瘍形成に関与していることが示唆され、ナルディライジン及びADAMプロテアーゼによるTNF- α /NF- κ B及びIL-6/STAT3シグナルの活性化が、胃癌における臨床上的治療標的となりうることが示唆された。



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 1 件)

- ① Keitaro Kanda, Hideyuki Komekado, Tateo Sawabu, Shoko Ishizu, Yuki Nakanishi, Masato Nakatsuji, Reiko Akitake-Kawano, Mikiko Ohno, Yoshinori Hiraoka, Mayumi Kawada, Kenji Kawada, Yoshiharu Sakai, Kyoichi Matsumoto, Makoto Kunichika, Takeshi Kimura, Hiroshi Seno, Eiichiro Nishi, Tsutomu Chiba: Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling via enhanced ectodomain shedding of TNF- α . *EMBO Molecular Medicine* (査読有) vol. 4, issue 5, 2012, p396-411. DOI: 10.1002/emmm.201200216

[学会発表] (計 2 件)

- ① 神田 啓太郎, 米門 秀行, 妹尾 浩, 千葉 勉, 西 英一郎 ナルディライジンはTNF- α のシェディングを促進し内因性サイトカインシグナル経路を活性化して胃癌細胞の増殖を制御する。第70回日本癌学会総会、2011年11月3日、名古屋国際会議場
- ② 神田 啓太郎, 米門 秀行, 妹尾 浩, 千葉 勉, 西 英一郎 ナルディライジンによるIL-6/Stat3シグナルを介した胃癌細胞の増殖制御。第69回日本癌学会総会、2010年9月22日、大阪国際会議場

[その他]

NCBI GEO ホームページ :

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

accession number: GSE29114

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

研究者番号 : 90452359

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし