

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860533

研究課題名(和文)NRDcを標的とした新規大腸癌治療の開発

研究課題名(英文)A novel therapeutic strategy against colorectal cancer focusing on NRDC

研究代表者

神田 啓太郎(Kanda, Keitaro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・医員

研究者番号：30609061

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)：本邦における大腸癌の増加は顕著であり、その病態の理解と治療法の開発は急務である。本研究では、M16ファミリー・メタロプロテアーゼの一種Nardilysin(NRDC)の大腸癌における役割を検討した。その結果、NRDC KOマウスでは腸腫瘍形成が顕著に抑制され、TACE活性、TNF-alphaのシェディング、NF-kappaB活性が低下していた。また、大腸癌患者の血清NRDCは、健常者に比べ上昇していた。さらにNRDCの阻害によりヒト大腸癌細胞株およびxenograftの増殖が有意に抑制された。これらの結果から、NRDCを標的とする大腸癌治療へ向けた基礎的知見を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Frequency of colorectal cancer is increasing in Jaapn, and it is important to find novel therapeutic strategies. For that purpose, we focused on the role of NRDC during colorectal tumorigenesis. In NRDC knockout mice, intestinal tumorigenesis caused by AOM/DSS or insertion of Apc gene mutation was significantly suppressed concomitantly with decreased TACE activity, TNF-alpha shedding, and NF-kappaB activation. In colorectal cancer patients, serum NRDC level was elevated compared to healthy controls, and inhibition of NRDC significantly suppressed the growth of human colorectal cancer cell lines and xenografts. Thus, this study suggest us the potential of NRDC as a therapeutic target against colorectal cancer.

研究分野：消化器内科学

キーワード：癌 大腸

1. 研究開始当初の背景

本邦の死因第一位は癌であり、3人に1人が癌死する時代となった。消化器領域では特に大腸癌の増加が顕著であり、男性の癌死全体の第4位、女性の癌死全体の第1位を占めている。大腸癌に対しては、これまでも早期発見の試みや様々な集学的治療が展開されてきたが、その成績は未だ満足すべきものではない。

近年、癌の微少環境(ニッチ)と癌進展の関連が注目されている。潰瘍性大腸炎に合併する癌では、持続する間質の炎症が癌に寄与する。古典的な多段階大腸癌でも、腸内細菌が微小環境に及ぼす影響が癌の進展を左右する。すなわち癌の局所では、癌細胞ならびにニッチを構成する細胞から分泌される様々なサイトカインや増殖因子が、癌の進展に寄与する。

そこで、研究代表者らはこれら種々のサイトカインや増殖因子を制御する因子の検討を行い、M16ファミリーに属するメタロプロテアーゼである Nardilysin (NRDc) に着目した。NRDc はもともと HB-EGF の結合蛋白として同定された。しかし研究代表者を含む研究グループは、NRDc が癌の進展に大きな影響を与える TNF-alpha や EGF ファミリーの活性を、それら因子の細胞外ドメインのシェディングを介して制御することを明らかにしてきた。

NRDc が癌の進展に重要な役割を果たすか否かを検証するため、研究代表者が今回の研究に先立って予備実験を行ったところ、

(1) 胃癌患者では、患者血清中の NRDc が上昇していた。

(2) 胃癌、大腸癌細胞株における NRDc のノックダウンによって、ADAM プロテアーゼ活性、および TNF-alpha/NF-kappaB や IL-6/STAT3 シグナルが抑制され、胃癌、大腸癌細胞株の増殖が押さえられた。

(3) NRDc ノックアウト (KO) マウス

では、炎症性腸癌モデル (AOM/DSS) でも多段階腸癌モデル (ApcMin マウス) でも、発癌が抑えられる傾向があった。

この様に、研究代表者らは、NRDc が複数のサイトカインや増殖因子を制御する因子であること、少なくとも消化管では細胞株でもマウス発癌モデルでも癌の進展に極めて重要な役割を果たすことを確認してきた。しかし、本研究立案時点では、NRDc が癌の進展を抑制する詳細なメカニズムについては、未だ検討が不十分であった。またヒト大腸癌患者において血清中 NRDc が上昇していることの意義についても、大規模な検討を行えていなかった。そこで本研究では、これらの課題を検討し、NRDc を標的とした新しい抗癌治療法開発に繋がる基礎的知見の獲得を目指したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) NRDc の腫瘍促進メカニズムの解析: 代表的な腸癌モデルである炎症性発癌や多段階発癌において NRDc がどのように影響しているのかを NRDc KO マウスを用いて検討する。

研究代表者は過去 *in vitro* の実験において NRDc が TNF-alpha のシェディングを増強し細胞増殖を促進するという知見を得ており、NRDc のノックアウトマウスを用いた *in vivo* の検討においても腫瘍の退縮効果が得られるかを解析する。また *in vivo* の検討においても TNF-alpha のシェディング、NF-kappaB シグナルの活性化、TACE 活性の変化などが、腫瘍の発生、増大に関与しているかどうか併せて検討する。

これらのマウスでは、TNF-alpha 以外の様々なサイトカイン、増殖因子、転写因子が NRDc により制御されている可能性が高く、サイトカインの変動を網羅的に解析し、NRDc の及ぼす影響を幅広く解析する。

(2) 血清中 NRDc の大腸癌バイオマーカー

ーとしての意義：

研究代表者らは、過去胃癌患者血清ならびに組織において健常者と比較し NRDC の発現が上昇していることを確認しており、大腸癌患者で症例数を増やして検討すると同時に、既存の腫瘍マーカーとの相関、病期ごとの発現解析、予後予測因子としての意義なども検討する。

(3) NRDC を標的とした実現性の高い大腸癌治療法の開発：

研究代表者らは、過去の予備的実験により、ヒト大腸癌細胞株を用いて抗 NRDC 中和抗体のスクリーニングを行い、*in vitro* で癌細胞増殖抑制効果を確認した。したがって、NRDC に対するモノクローナル抗体、さらには NRDC の未知の活性を阻害する小分子化合物のスクリーニング等を視野に入れた研究を行うことによって、有効な抗腫瘍薬の開発へ向けた基礎的知見を得ることも目的とする。

3. 研究の方法

(1) NRDC KO マウスを用いた腸発癌実験ならびに発癌メカニズムの解析：

NRDC が大腸発癌に与える影響を、炎症性発癌モデルや多段階発癌腸腫瘍モデルとの掛け合わせを行い解析する。

(2) NRDC のヒト臨床検体におけるバイオマーカーとしての意義の検証：

本研究に先立つ予備的検討で、胃癌患者にて NRDC の発現が上昇していることを確認済みであったため、大腸癌患者の症例数を増やして既存の腫瘍マーカーとの相関、予後因子、病期ごとの発現など詳細な検討を行う。

(3) NRDC を標的とした新たな大腸癌の予防、治療法の開発：

NRDC に対するモノクローナル中和抗体、および siRNA の送達システムを検討し、大腸癌細胞株の増殖抑制効果やマウスへの投与による NRDC を標的とした腫瘍消退

効果を解析する。

4. 研究成果

本研究においては、次のような研究成果を得た。

(1) 炎症性腸発癌・多段階腸発癌における NRDC の影響：

(1-1) 炎症性発癌モデル

大腸癌の一部は、潰瘍性大腸炎などの慢性炎症を背景として発生し、colitic cancer と称される。そこでこの病態のモデルとして、NRDC KO マウスに発癌物質アゾキシメタンと腸炎誘発物質デキストラン硫酸ナトリウム (AOM/DSS) を投与した。すると、NRDC KO マウスでは WT マウスに比べて、腫瘍の数、サイズが有意に減少していた。興味深いことに、炎症の程度を炎症細胞浸潤 (好中球、マクロファージなど) で評価すると、NRDC KO マウスではほとんど炎症細胞浸潤を認めなかった。

(1-2) 多段階発癌モデル

大腸癌の大部分は多段階発癌の経路をたどるとされ、モデルマウスとして ApcMin マウスが広く用いられる。そこで、ApcMin; NRDC KO マウスの腫瘍数、大きさを評価したところ、NRDC KO マウスでは、炎症性発癌と同様に、ほとんど腫瘍の形成を認めなかった。腫瘍ならびにその背景粘膜における炎症細胞浸潤について、免疫染色で評価検討すると、やはり炎症細胞浸潤に顕著な差を認めた。

これらの結果から、炎症のメインレギュレーターの1つであり、NRDC の制御する因子の一つである TNF-alpha の発現に関して評価した。すると、NRDC KO マウスでは、TACE の活性が顕著に減弱し、TNF-alpha のシェディングも抑制されていた。同時に、soluble-TNF-alpha の発現も減少していた。また、その下流の NF-kappaB の活性も、NRDC KO マウスで

は低下していた。

以上より、腸管では炎症性発癌と炎症がない多段階発癌の双方において NRDC が TNF-alpha/NF-kappaB シグナルの活性化を介し腫瘍増大を促進している可能性が示された。

(2) NRDC の大腸癌バイオマーカーとしての意義：

ヒト血清 NRDC を高感度に検出できる ELISA 系は、本研究に先んじて開発に成功した。そこで、同測定系を用いて大腸癌患者ならびに健常者における NRDC の発現量の差異を評価したところ、既存の腫瘍マーカー(CEA)、および病期との相関傾向が認められた。したがって、NRDC の大腸癌バイオマーカーとしての意義が示された。

(3) NRDC を標的とした新たな大腸癌の予防、治療法の開発：

ADAM 活性の抑制力が高いマウスの NRDC に対するモノクローナル抗体をスクリーニングした結果、得られた2クローンについて、腫瘍 xenograft モデルに投与して効果を検討した。また、NRDC の siRNA を同モデルに直接投与して、その効果を検証した。その結果、NRDC の阻害によって、癌細胞株および xenograft の増殖、増大が有意に抑制された。これらの結果から、NRDC を標的とする大腸癌治療へ向けた、基礎的知見を得ることが出来た。

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2件)

1. Ishizu-Higashi S, Seno H, Nishi E#, Matsumoto Y, Ikuta K, Tsuda M, Kimura Y, Takada Y, Kimura Y, Nakanishi Y, Kanda K, Komekado H, Chiba T: Deletion of nardilysin prevents the development of steatohepatitis and liver fibrosis. PLoS One. 査読有、2014 May

21;9(5):e98017. doi:

10.1371/journal.pone.0098017.

2. Akitake-Kawano R, Seno H, Nakatsuji M, Kimura Y, Nakanishi Y, Yoshioka T, Kanda K, Kawada M, Kawada K, Sakai Y, Chiba T: Inhibitory role of Gas6 in intestinal tumorigenesis. Carcinogenesis. 査読有、2013 Jul; 34(7):1567-74. doi: 10.1093/carcin/bgt069.

〔学会発表〕(計5件)

1. Seno H, Kanda K, Nishi E, Chiba T: The role of Nardilysin in intestinal tumorigenesis. The 4th symposium on TGF-beta family and cancer. January, 12-13, 2015, Tsukuba, Japan.

2. 妹尾浩、神田啓太郎、千葉勉: 腸腫瘍微小環境におけるナルディライジンの役割。平成 25 年度がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動冬期公開シンポジウム 2014.1.31 東京 一橋講堂

3. Kanda K, Kimura Y, Yoshioka T, Seno H, Chiba T: Nardilysin promotes gastric cancer growth by activating intrinsic cytokine signaling. The 4th JCA-AACR Special Joint Conference. December 17-18, 2013. Chiba, Japan, Maihama Bay Hotel Club Resort.

4. Chiba T, Kanda K, Seno H, Nishi E: Nardilysin and ADAM proteases promote gastric cancer cell growth by activating intrinsic cytokine signaling. Singapore Gastric Cancer Consortium. 6th Annual Scientific Meeting. July 25, 2013. Singapore, NUHS Tower Block Auditorium

5. Seno H, Kanda K, Nishi E, Chiba T: The role of Nardilysin in intestinal tumorigenesis. GI Research Academy 2013. June 28, 2013, Kyoto, Japan, Hotel Granvia Kyoto

〔図書〕(計0件)
該当なし

〔産業財産権〕
該当なし

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

神田 啓太郎 (KANDA, Keitaro)

京都大学・医学研究科・医員

研究者番号：30609061

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし