

新規がん治療標的としてのM16プロテアーゼの研究

[1] 組織

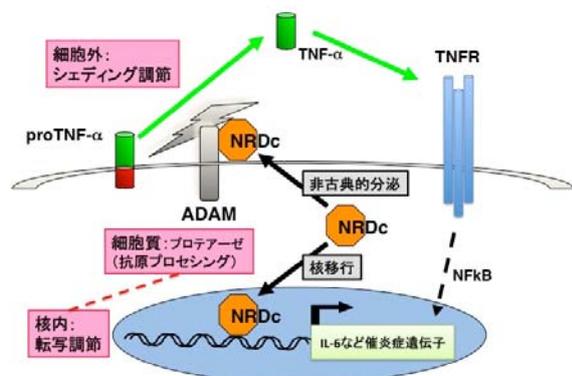
代表者：西 英一郎
(滋賀医科大学薬理学講座)
対応者：堀内 久徳
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：大野 美紀子
(滋賀医科大学薬理学講座)
岩崎 広高
(滋賀医科大学薬理学講座)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

がんの発症進展は多角的に制御されている。中でも細胞外環境、核におけるエピジェネティクス・転写制御は、互いを感知し影響を及ぼしながらがん進展への悪循環を形成していると考えられる。

我々はM16ファミリーのメタロプロテアーゼ、ナルディライジン (NRDC) をHB-EGF結合タンパク質として同定し (EMBO.J,2001)、NRDCがHB-EGFやTNF α などの細胞外ドメイン切断による活性化を介して細胞外環境を調節すること (JBC,2006、Nat. Neurosci. 2009など)、また核内では複数のパートナー分子と協働して転写コレギュレーターとして働いていること (Nat Commun.2014, Diabetes 2016など)を示し、NRDCが細胞局在に応じた多機能性を有することを明らかにした (下図)。



一方NRDC欠損マウスは、複数の発がんモデルおよび炎症性疾患モデルにおいて著明な疾患抵抗性を示し (EMBO Mol Med 2012, Sci Rep 2017など)、NRDC抑制ががん治療につながる可能性が示唆された。我々は、NRDCの核内転写調節作用の少なくとも

一部は自身の「プロテアーゼ活性に依存」しており、さらにNRDCのがん細胞増殖作用が「p53の転写活性抑制を介する」(JCI Insight 2018) ことを見出し、既存薬ライブラリーなどを用いてNRDCのプロテアーゼ活性阻害薬スクリーニングを行った。その結果、約30000種類の小分子化合物のうち約140種類の陽性化合物同定に成功した。

一方加齢研受け入れ教員の堀内らは、臨床上頻用されている既存薬のうち、標的分子が示唆されているものの薬理活性が充分説明できない薬に注目し、ピオチン化合物を用いて標的分子を効率よく同定する方法を開発した。予備実験の結果、薬物XがNRDCに結合することが示唆された。本課題では、①NRDCがいかなる分子機構を介してがん進展を制御しているかを、特にNRDCの酵素活性の役割に注目して解明すること、②薬物の標的分子としてのNRDCの意義を明らかにすることを目的とする。

対応者である加齢医学研究所堀内久徳教授とは、適宜メールあるいは電話にて研究打ち合わせを行っている。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

目的① NRDCによるがん進展制御機構の解明

1) 大腸がんにおけるNRDCの役割：マウス大腸がんモデル (Apc^{Min} マウス：多段階発がんモデル) において、全身でNRDCを欠損させるとポリープ形成は著明に抑制された。次に腸管上皮特異的NRDC欠損マウス (Apc^{Min}, Villin-cre, Nrdc^{fl/fl} マウス) を作製したところ、全身欠損マウスと同様にポリープ形成は抑制され、腸管上皮細胞のNRDCがポリープ形成に重要であることが分かった。次に腸管上皮特異的NRDC過剰発現マウス (Apc^{Min}, Villin-Nrdc マウス) を作製したところ、対照マウスと比較してポリープはより多く形成された。さらにNRDCは大腸がん細胞においてアセチル化調節を介してp53の安定化を制御し、アポトーシスを調節することで腫瘍増殖を制御していることを明らかにした (JCI Insight 2018)。

2) 膵臓がんにおけるNRDCの役割：膵臓特異的にNRDCを欠損させたマウスが、前がん状態と考えられている腺房導管化生 (Acinar-ductal metaplasia: ADM) と類似した表現型を呈し、さらに炎症細胞の浸潤、線維化を認めたことから、慢性膵炎様所見を呈していることを示した。また変異型 Kras を発現させて

膵がん発症を誘導したところ、膵臓特異的 NRDC 欠損マウスにおいて膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) 形成の明らかな増加を認めた。この結果は、これまで他のがんで示してきた結果とは逆に、NRDC を抑制することで膵炎、膵がんの発症進展が促進することを示した (GUT 2018)。

3) NRDC のプロテアーゼ活性の個体レベルにおける役割を明らかにするために、酵素活性欠損変異体 NRDC ノックインマウスのジーンターゲット法による作製を試み、ヘテロマウスを得た。

目的② 薬物の標的分子としての NRDC の意義解明

これまでに以下 1) の結果が得られ、機能アッセイを行うために 2, 3) を準備中である。

1) HEK293T 細胞溶解液からビオチン化 X ビーズを用いて X 結合タンパク質を抽出。我々が独自に作製した抗 NRDC モノクローナル抗体にて、NRDC がコントロールビーズには結合しないが、X ビーズには明らかに結合していることを確認。

2) NRDC 機能アッセイに使用するリコンビナント NRDC タンパク質の作製 (バキュロウイルスシステム)

3) TNF α シェディングアッセイの準備 (THP-1 細胞を陽性コントロール: リポポリサッカライドで刺激し、培地中 TNF α 量を ELISA を用いて測定)。本アッセイにて、2) で作製したリコンビナント NRDC を加えて、TNF α シェディングの増強を確認する。そこに各濃度の X を投与し、NRDC のシェディング増強に及ぼす効果を検討する。

(3-2) 波及効果と発展性など

NRDC は細胞内外の独立した作用点でがん進展に寄与しているユニークな分子であり、治療標的としての新規性が高い。遺伝子欠損によるがん進展抑制の度合いは高度で、かつ腸管上皮特異的欠損において腸発がんが抑制されるなど細胞自律的に働くこと、p53 機能を顕著に制御すること、さらにヒト手術標本がん部における発現亢進も明らかなことから、同阻害薬が治療に有効である可能性は高い。本共同課題では特に、NRDC のプロテアーゼ活性ががん進展にいかに関与しているかに注目して研究を進める。酵素活性欠損変異体ノックインマウスの作製は進んでおり、次年度に予定しているがんモデルにおける解析にて、プロテアーゼ活性の生物学的役割とがん治療標的としての意義をある程度明らかにできると考えている。結果が陽性の場合、NRDC 酵素活性阻害薬として全く新しいタイプの抗がん薬開発につながる可能性がある。

一方目的②の薬物 X は臨床の場で汎用され、高い有効性が確認されている。これまでに複数の標的分子が示唆されているが、その薬効を充分説明できない可能

性がある。受け入れ教員堀内らは、薬物 X の結合タンパク質のひとつとして NRDC を同定した。NRDC 欠損マウスの表現型は、X の薬効と NRDC の機能がリンクする可能性を示唆している。本課題の遂行が X の薬効の分子機構理解に大きく寄与し、さらに有効な薬剤開発につながることを期待される。

[4] 成果資料

本共同研究に関連する研究成果が掲載されている主要論文リスト

(1) 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 and *Seno H

Nardilysin controls intestinal tumorigenesis through HDAC1/p53-dependent transcriptional regulation
JCI Insight 2018; 3(8): e91316

doi: 10.1172/jci.insight.91316

(2) Ikuta K, *Fukuda A, Ogawa S, Masuo K, Goto N, Hiramatsu Y, Tsuda M, Kimura Y, Matsumoto Y, Kimura Y, Maruno T, Kanda K, Nishi K, Takaori K, Uemoto S, Takaishi S, Chiba T, Nishi E and Seno H

Nardilysin inhibits pancreatitis and suppresses pancreatic ductal adenocarcinoma initiation in mice
GUT in press

doi: 10.1136/gutjnl-2017-315425

(3) Ito Y, Nakamura S, Shigemori T, Sugimoto N, Kato Y, Ohno M, Sakuma S, Ito K, Kumon H, Hirose H, Okamoto H, Nogawa M, Iwasaki M, Kihara S, Fujio K, Matsumoto T, Higashi N, Hashimoto K, Sawaguchi A, Harimoto KI, Nakagawa M, Yamamoto T, Handa M, Watanabe N, Nishi E, Arai F, Nishimura S, *Eto K

Turbulence activates platelet biogenesis to enable clinical scale ex vivo production

Cell 2018; 174(3): 636-648

doi: 10.1016/j.cell.2018.06.011

(4) Yoh T, *Hatano E, Kasai Y, Fuji H, Nishi K, Toriguchi K, Sueoka H, Ohno M, Seo S, Iwaisako K, Taura K, Yamaguchi R, Kurokawa M, Fujimoto J, Kimura T, Uemoto S, and *Nishi E

Serum nardilysin, a surrogate marker for epithelial-mesenchymal transition, predicts prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma after surgical resection

Clin Cancer Res 2019; 25:619-628. (Featured in Highlights of This Issue)

doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-0124