

109. 転移性肺がんにおける Eph/ephrin の機能解析と治療

家口 勝昭

Key words : 転移, Eph, ephrin, ADAM

東京女子医科大学 医学部 医学科
薬理学教室

緒 言

ephrin-A1 は GPI (Glycophosphatidylinositol) アンカー型の細胞膜に局在する膜タンパク質で、多くのがん細胞において高発現が確認されており、腫瘍の悪性度および予後不良と正の相関関係がある。一方、ephrin-A1 の受容体である EphA1 および EphA2 は受容体型チロシンキナーゼの 1 つで、細胞内では ephrin-A1 などによって活性化され、細胞の運動、神経や血管の発生などの重要な生理機能を調節している。また、EphA1 および EphA2 は先述した生理機能の調節だけでなく、腫瘍の増殖や腫瘍血管新生においても重要な役割を果たしていることが知られており、Eph や ephrin を標的とした抗がん剤の開発が盛んに行われている。しかし、がんの悪性度や予後不良の一因となる転移における Eph/ephrin の分子機構は不明である。我々はこれまでに細胞膜上に GPI でアンカリングされた ephrin-A1 が隣り合った細胞に発現している EphA1 や EphA2 と細胞間隙で結合して細胞接着分子様の機能を担っていることを明らかにした。また、*Epha1* や *Epha2* の遺伝子欠損マウスの解析から肺血管内皮細胞における Eph/ephrin システムの機能破綻ががん転移を促進することが明らかとなった。よって、本研究では Eph/ephrin システムによる肺血管透過性調節の分子機構の解明と Eph/ephrin システムおよび ADAM12 を標的とした肺転移治療および予防ができる薬剤の開発を行った。

方法および結果

ADAM12 による ephrin-A1 切断様式を解明するために、C 末端に FLAG タグを付加し、大腸菌内で GST 融合タンパク質として発現させグルタチオンビーズを用いて精製した。ADAM12 は CHO 細胞に発現させ分泌型 ADAM12 として陽イオンカラムおよび Concanavlin A カラムを用いて精製した。それらのタンパク質を用いて *in vitro* cleavage assay を行った。反応後のサンプルをグルタチオンビーズで精製し、SDS-PAGE を行い C 末端が切断された ephrin-A1 をゲルから切り出した。また、グルタチオンビーズのフロースルー分画を抗 FLAG 抗体アガロースビーズで免疫沈降した。それぞれのサンプルを MALDI/TOF/MS にかけて切断断片を決定した。また、ephrin-A1 の切断箇所に点変異を挿入し *in vitro* cleavage assay を行ったところ、ADAM12 による ephrin-A1 の切断が見られなかった (図 1)。このことから、質量分析によって決定したアミノ酸が ADAM12 による切断面であることが考えられる。

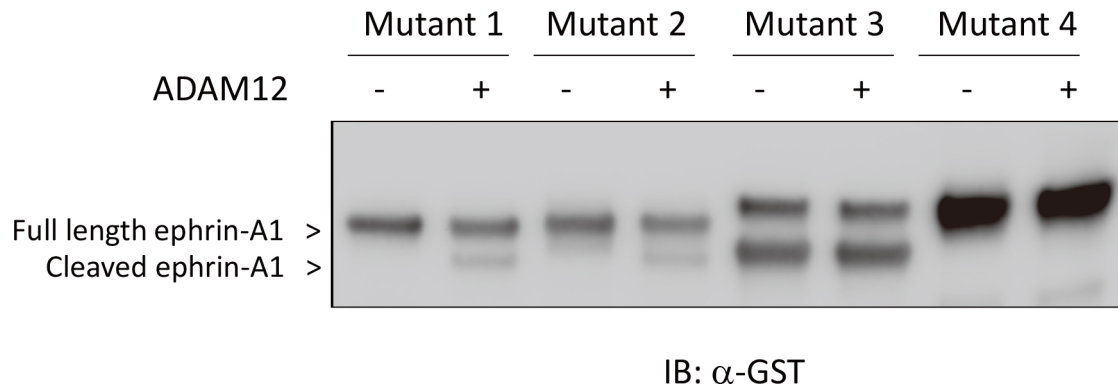
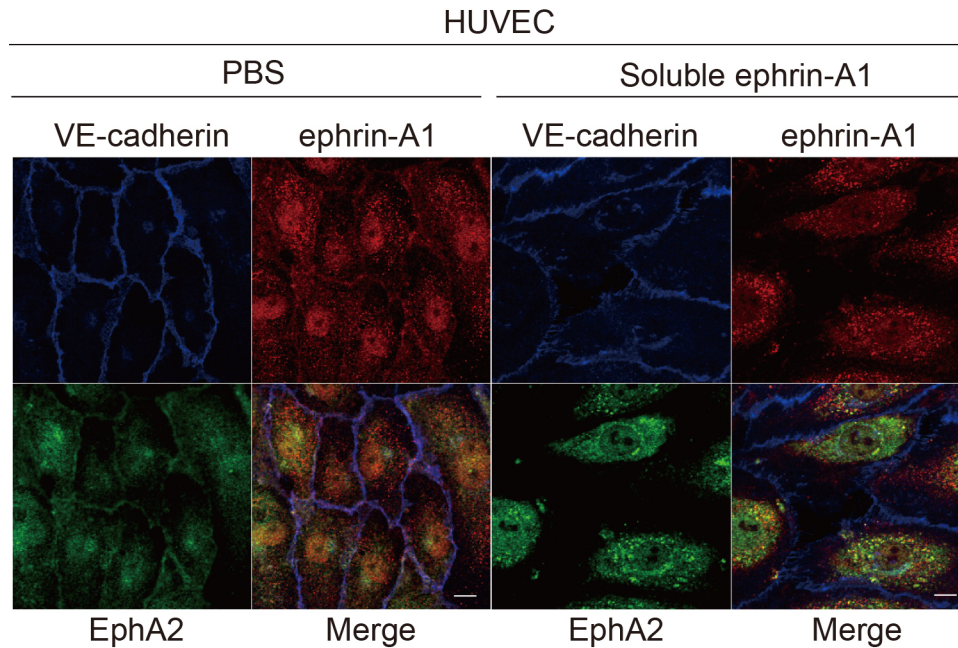


図1. *in vitro*における ADAM12 に ephrin-A1 の切断.

*in vitro*で CHO 細胞から精製した ADAM12 と大腸菌から精製した GST-ephrin-A1-FLAG を混合し、37°Cで一晩インキュベーションしウェスタブロットにて ephrin-A1 の切断を確認した。その結果、変異体4は ADAM12 による切断が阻害された。

ADAM12 によって切断された ephrin-A1 がどのような分子機構で肺血管の透過性を調節しているのかを解明するために、分泌型 ephrin-A1 で血管内皮細胞を刺激しウェスタブロットによる量的変化および免疫蛍光染色により細胞内局在を検討した。分泌型 ephrin-A1 非存在下では EphA2, ephrin-A1, VE-cadherin の3者が細胞膜で共局在して細胞接着を維持しているのに対して、分泌型 ephrin-A1 存在下では EphA2 および ephrin-A1 の細胞内局在は細胞膜から細胞内へ変化し、それに伴って細胞接着がルーズな部分がみられ穴のようなものが散見された(図2 A)。一方、分泌型 ephrin-A1 刺激後30分では VE-cadherin の細胞内局在の変化は見られなかった。しかしながら、ウェスタブロットによる量的変化の検討においては細胞内局在の結果と同様に刺激後30分では分解がほとんど誘導されなかったが、3時間後では VE-cadherin の量が分泌型 ephrin-A1 非存在下と比較して20%程度に下がった(図2 B) ¹⁾。

A



B

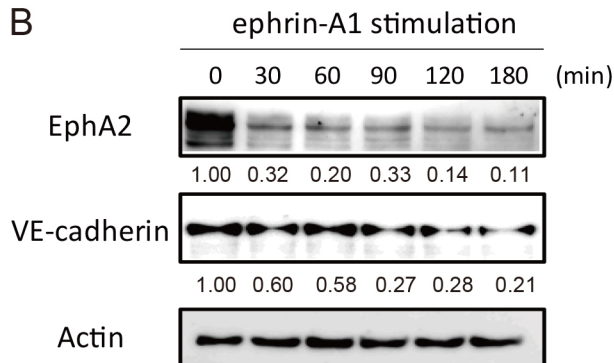


図2. Eph/ephrin システムの破綻による血管透過性の亢進.

A) ヒト臍帯静脈内皮細胞を分泌型 ephrin-A1 により刺激し, EphA2, ephrin-A1, VE-cadherin の細胞内局在を観察した. 細胞間隙でみられた 3 者の共局在が観察できなくなった. B) さらに, ウェスタンブロットにより量的変化も検討した. その結果, EphA2 が分解されたのち, 少し遅れて VE-cadherin が分解された. (参考文献 1) より引用)

ADAM12 の阻害剤による ephrin-A1 切断の抑制の検討については既知の ADAM12 阻害剤である KB-R7785 および CB-12181 の合成を行い, それらの阻害剤が実際に ADAM12 による ephrin-A1 の切断を阻害するかどうか検討した. まず, ephrin-A1 の N 末端にアルカリフォスファターゼタグを付加し HEK293T 細胞で発現させ, 96-well culture dish 上で阻害剤のスクリーニングを行うハイスループットスクリーニング実験系を構築した. 次に, CHO 細胞で発現させた分泌型 ADAM12 と KB-R7785 を細胞に添加し, ADAM12 による ephrin-A1 の切断阻害効果を検討した. その結果, KB-R7785 は ADAM12 による ephrin-A1 の切断を顕著に抑制しただけでなく, HEK293T 細胞由来のプロテアーゼによる ephrin-A1 の切断も顕著に阻害した (図 3).

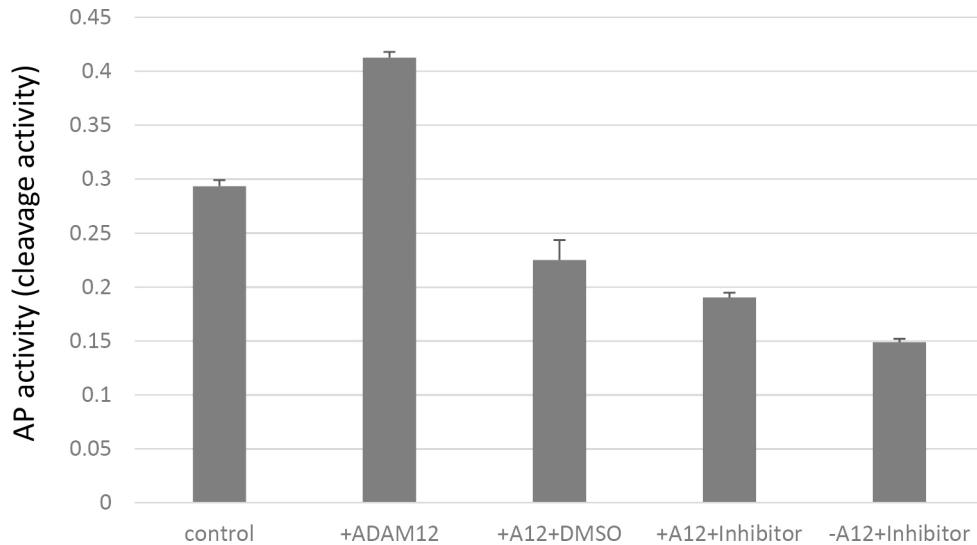


図3. ADAM12による ephrin-A1 切断に対する阻害剤の効果.

アルカリフォスファターゼ標識した ephrin-A1 が発現する安定発現細胞株 (AP-ephrin-A1/HEK293T) を樹立した。96-well plate 上で培養した AP-ephrin-A1/HEK293T 細胞に ADAM12 を阻害剤存在下および非存在下で培養し、ADAM12 による ephrin-A1 の切断をアルカリフォスファターゼ活性でモニターし、阻害剤の効果を検討した。阻害剤は ADAM12 を阻害しただけでなく HEK293T 細胞由来の内在性プロテアーゼも阻害した。

考 察

ADAM12 による ephrin-A1 の切断面が決定したことからその部位に対するモノクローナル抗体の作製に成功すれば、ADAM12 による ephrin-A1 の切断が阻害され循環血液中の分泌型 ephrin-A1 濃度の上昇を抑制することで肺の血管透過性亢進を防ぎ肺転移を抑制できることが考えられる。また、ADAM12 の阻害剤である KB-R7785 も ADAM12 による ephrin-A1 の切断を阻害したことから KB-R7785 も肺転移を抑制できる可能性がある。しかし、HEK293T 細胞由来のプロテアーゼも阻害したことから ADAM12 に特異的に作用せず様々なプロテアーゼ活性を阻害する可能性が示唆された。がん細胞は MMP-9 など多くのプロテアーゼを産生していることが報告されている。それらのプロテアーゼの活性を抑制することで相乗的ながんの増殖や転移を抑制することができる可能性がある一方、特異性の低さは副作用を生じさせる一因となる可能性がある。よって、ADAM12 による ephrin-A1 の認識部位に対するモノクローナル抗体および KB-R7785 の側鎖を変化させた派生物を作製し、構築したスクリーニング系で探索する必要がある。また、分泌型 ephrin-A1 による肺血管の透過性亢進は血管内皮細胞において EphA2 が活性化され細胞内とエンドサイトーシスされ分解されることで VE-cadherin の安定性が低下し分解されることが考えられる¹⁾。

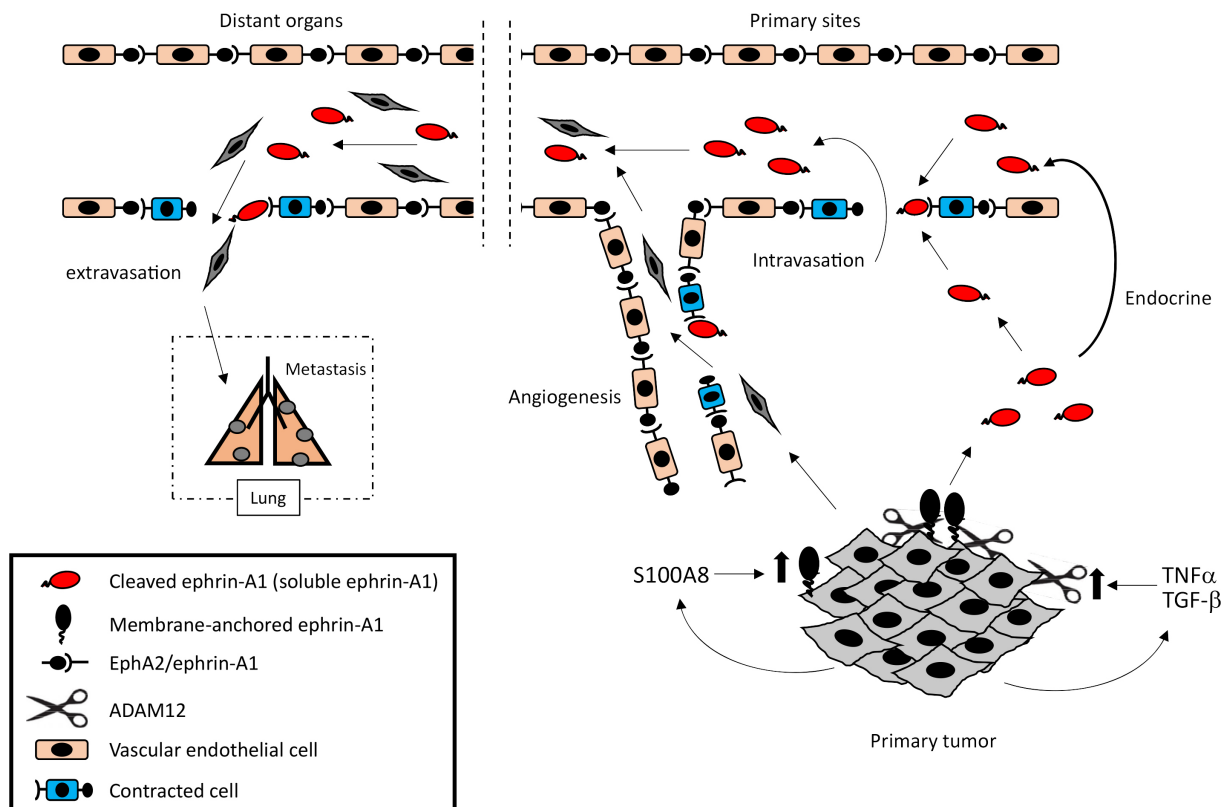


図4. Eph/ephrin システムの破綻による肺転移。

ephrin-A1 は原発巣で ADAM12 によって切断され循環血液中へと放出される。循環血液中の分泌型 ephrin-A1 は肺血管に作用すると、もともと血管内皮細胞間隙で成立していた EphA2/ephrin-A1 複合体に対して競合的に作用し、EphA2 受容体を活性化し EphA2 および VE-cadherin の分解を促進する。その結果、血管の透過性が亢進し肺転移を亢進させていると考えられる。(参考文献2)より引用)

よって、EphA2 の活性化を抑制するような薬剤、例えば、リガンド結合に対して競合的に作用するペプチドで EphA2 を抑制できる可能性がある。今後、多方面からのアプローチにより Eph/ephrin システムの破綻が引き起こす肺転移を抑制する薬剤を開発し、肺転移治療法の確立を目指したい。

文 献

- 1) Ieguchi, K., Tomita, T., Omori, T., Komatsu, A., Deguchi, A., Masuda, J., Duffy, S. L., Coulthard, M. G., Boyd, A. & Maru, Y. : ADAM12-cleaved ephrin-A1 contributes to lung metastasis. *Oncogene*, **33** : 2179-2190, 2014.
- 2) Ieguchi, K. : Eph as a target in inflammation. *Endocrinol. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, **15** : 119-128, 2015.