

対象研究テーマ：メタロプロテアーゼを標的とした治療法の開発

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：メタロプロテアーゼ ADAM28 の遺伝子発現機構解析に基づく治療法
開発の基礎研究

研究代表者：慶應義塾大学医学部 専任講師 望月早月

研究成果の概要：ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28)は、ヒト乳癌や非小細胞肺癌で癌細胞特異的に発現し、癌細胞の増殖やリンパ節転移に関与することが知られている。本研究では、癌細胞における ADAM28 遺伝子発現メカニズムを解明するために MDCK イヌ腎上皮細胞株を5種類のがん遺伝子 (v-Src, LMP1, ErbB2, Ha-Ras, c-Fos) で形質転換し、ADAM28 発現の検討を行った。その結果、ADAM28 は v-Src による形質転換で特異的に発現するとともに細胞間接着のない浮遊細胞となった。形質転換細胞株をヌードマウス皮下移植すると、v-Src 形質転換細胞株では最も強い腫瘍形成能があり、その腫瘍形成は抗 ADAM28 中和抗体の局所投与で抑制された。本細胞株では ADAM28 発現が上昇しており、Src kinase 阻害剤(radicicol)でほぼ完全に発現抑制された。PI3 kinase 阻害剤(LY294002)あるいは MAP kinase 阻害剤(PD98059、U0126)では部分的に抑制され、両経路の阻害剤処理で完全消失した。ヒト乳癌、肺癌、卵巣癌、大腸癌細胞株においても ADAM28 発現と Src のリン酸化は正の相関を示し、ADAM28 高発現癌細胞株では、Src kinase、PI3 kinase および MAP kinase の阻害剤処理で発現抑制された。また、ヒト乳癌、肺癌、卵巣癌、大腸癌の免疫組織染色で ADAM28 とリン酸化 Src が癌細胞で共発現していた。以上のことから、v-Src 形質転換細胞株とヒト癌細胞における ADAM28 遺伝子発現には Src の活性化が重要であり、その下流の MEK/ERK と PI3K/mTOR の両経路が関与していることが示唆された。

研究分野：実験病理学、生化学

キーワード：ADAM, 形質転換

1. 研究開始当初の背景

ADAM 分子は、MMP (matrix metalloproteinase) のメタロプロテアーゼドメインを共有する遺伝子ファミリーである。ADAMは、細胞膜上の増殖因子・レセプター・細胞接着分子のshedding、細胞外マトリックスの分解、インテグリンへの結合などによる細胞の接着・運動・増殖に関わる多機能分子であり、MMPと同様に癌細胞の増殖・

浸潤・転移への関与が示唆されている (Cancer Sci 98:621-628, 2007; Nat Rev Mol Cell Biol 8 :245-257, 2007; Curr Pharm Des 15:2349-2358, 2009)。

申請者は、ヒト癌組織におけるADAM分子の遺伝子発現を網羅的にスクリーニングし、ADAM28のヒト乳癌や肺癌細胞での選択的遺伝子発現と癌細胞の増殖との相関を示すとともに、insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3)の分解による乳癌細胞増

殖促進作用を実証してきた (Biochem Biophys Res Commun 315:79-84, 2004; Cancer Res 66:9913-9920, 2006)。また、yeast two-hybrid 法を用いた ADAM28 結合タンパク質の探索から、ADAM28 の基質として connective tissue growth factor (CTGF)を見出し、ADAM28 が CTGF/ vascular endothelial growth factor (VEGF)複合体のうちCTGFを選択的に分解し、遊離したVEGFが血管新生を促進することを証明した (Biochem Biophys Res Commun 402:651-657, 2010)。同様にyeast two-hybrid法によりADAM28 結合タンパク質の候補として von Willebrand factor (VWF)を見出し、癌細胞で発現するADAM28 は血中でのVWF分解を介してVWF誘導性アポトーシスを回避し、癌細胞転移促進に働く可能性を証明した (J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012)。さらに、ADAM28 を検出するELISA法を開発し、肺癌患者の血中ADAM28 レベルは、臨床病期、リンパ節転移、再発と正の相関を示し、本ELISA系が肺癌の診断や病勢のモニター法として有望であることを報告している (Int.J.Cancer 127:1844-1856, 2010)。これら一連の研究により、ADAM遺伝子ファミリー分子の中でも、ADAM28 はヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移に深く関与することを明らかにするとともに、本分子がヒト癌の診断や治療標的となり得ることを示してきた。

2. 研究の目的

本研究では、これまで未解決な癌細胞における ADAM28 遺伝子発現機構と本分子を標的とした治療薬開発の基礎的研究を行った。遺伝子発現機構に関しては、種々の癌遺伝子で形質転換した細胞やヒト乳癌・肺癌細胞株を用いて ADAM28 遺伝子発現に関わる分子の同定と細胞内シグナル伝達機構を解析した。次いで、発現調節において最も重要な分

子に対する阻害剤やヒト型抗 ADAM28 抗体による癌細胞の増殖・浸潤・転移抑制作用を検討し、ADAM28 の発現と活性を標的とする新規治療薬開発のための基礎研究を行った。

3. 研究の方法

MDCK イヌ腎上皮細胞株をがん遺伝子 (v-Src、LMP1、ErbB2、Ha-RAS、C-Fos) で形質転換させた細胞株での ADAM28 発現を RT-PCR 法、イムノブロット法、免疫組織化学染色法で調べ、ヌードマウス皮下移植での腫瘍形成能を検討した。これらの細胞株及び ADAM28 発現・非発現ヒト癌細胞株を Src 阻害剤 (PP-2、Radicicol)、PI3 kinase 阻害剤 (LY294002)、MAP kinase 阻害剤 (PD98059、U0126 など) で処理し、ADAM28 発現に関わる細胞内シグナルを検討した。

4. 研究成果

ADAM28 発現は MDCK 細胞では陰性であり、v-Src で形質転換した細胞株のみで発現がみられた。また、同細胞株では v-Src のリン酸化が上昇しており、マウス皮下での腫瘍形成能が最も高いことが明らかとなり、その作用は抗 ADAM28 抗体処理により抑制された。同細胞株における ADAM28 の発現は、PI3 kinase と MAP kinase の阻害剤で部分的に抑制され、両阻害剤処理で完全消失した。ヒト癌細胞株においては、ADAM28 発現レベルと Src のリン酸化は正の相関を示し、Src、PI3 kinase および MAP kinase の阻害剤で ADAM28 発現は阻害された。以上のデータは、癌細胞における ADAM28 の遺伝子発現は、PI3 kinase と MAP kinase を介して Src が制御していることを示唆している。

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 4 件)

1. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Aya Sasaki, Hiroataka James Okano, Hideyuki Okano, Yasunori Okada : Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand Factor. **J. Natl. Cancer Inst.** 104:906-922 (2012).
2. Jeremy Jowett, Yasunori Okada, Peter Leedman, Joanne Curran, Matthew Johnson, Eric Moses, Harald Goring, Satsuki Mochizuki, John Blangero, Leah Stone, Holly Allen, Chris Mitchell and Vance Matthews: ADAM28 is elevated with the metabolic syndrome and is a sheddase of human tumour necrosis factor. **Immun. Cell Biol.** 90: 966-973 (2012).
3. Miyuki Murata, Kousuke Noda, Junichi Fukuhara, Atsuhiko Kanda, Satoru Kase, Wataru Saito, Yoko Ozawa, Satsuki Mochizuki, Shioko Kimura, Yukihiko Mashima, Yasunori Okada and Susumu Ishida : Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.** 53:4055-4062 (2012).
4. Atsushi Anzai, Toshihisa Anzai, Shigenori Nagai, Yuichiro Maekawa, Kotaro Naito, Hidehiro Kaneko, Yasuo Sugano, Toshiyuki Takahashi, Hitoshi Abe, Satsuki Mochizuki, Motoaki Sano, Tsutomu Yoshikawa, Yasunori Okada, Shigeo Koyasu, Satoshi Ogawa, and Keiichi Fukuda.: Regulatory role of dendritic cells in post-infarction healing and left ventricular remodeling. **Circulation** 125: 1234-1245 (2012).

[学会発表] (計 5 件)

1. 望月早月、副島見事、下田将之、阿部仁、佐々木文、岡野ジェイムズ洋尚、岡野英之、岡田保典 :

ADAM28 の von Willebrand factor 分解による新規癌細胞転移機構

第 101 回日本病理学会総会、東京、2012 年 4 月 28 日

2. 望月早月、副島見事、下田将之、岡田保典: ADAM28 による癌細胞新規転移促進機構

第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会、広島、2012 年 7 月 13 日

3. 望月早月、副島見事、下田将之、阿部仁、佐々木文、岡野ジェイムズ洋尚、岡野栄之、岡田保典 :

メタロプロテアーゼ ADAM28 による von Willebrand factor 分解と癌細胞転移機構

第 17 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、浜松、2012 年 8 月 10 日

4. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, and Yasunori Okada: Novel effect of ADAM28 on promotion of carcinoma cell metastasis

XXIIIrd FECTS and ISMB Joint Meeting, Katowice, 2012 年 8 月 28 日

5. Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada: ADAM28 as a possible molecular target for non-small cell lung carcinoma (NSCLC) and breast carcinoma

第 71 回日本癌学会学術総会、札幌、2012 年 9 月 21 日

[図書] (計 1 件)

1. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada: ADAM28 In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Ed. by Rawlings N.D. and Salvesen G. pp1136-1139 (2013).

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

慶應義塾大学医学部・専任講師 望月早月

(2) 研究分担者

順天堂大学医学部・博士課程大学院生

阿部 仁

慶應義塾大学医学部・教授 岡田保典

(3) 本研究所担当者

細胞機能統御・教授 佐藤 博