

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 7 月 2 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08409

研究課題名(和文)細胞膜上でのADAM28活性調節機構の解析

研究課題名(英文)Analysis of ADAM28 activity mechanism on the cell surface

研究代表者

望月 早月(Mochizuki, Satsuki)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・外科学・助教)

研究者番号：80365428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的治療薬開発を目指して、完全ヒト型抗ADAM28特異抗体を開発した。本抗体は、 $IC_{50}=37.5$ nMと低濃度でADAM28活性を阻害し、5種類のNSCLC細胞株におけるIGF-I誘導性細胞増殖抑制とVWF誘導性アポトーシス亢進を示した。マウスを用いた早期肺癌転移モデルにおいては、癌細胞の増殖・転移を抑制するとともに生存期間を延長した。進行期肺癌転移モデルでは、既知の抗癌剤や抗VEGF抗体よりも有意に増殖・転移を抑制し、生存期間を延長した。本抗体をマウスあるいはカニクイザルに過剰投与しても有害事象は認められなかった。本抗体はNSCLC患者の新規治療薬候補として期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a human neutralizing anti-ADAM28 antibody (211-14) from human combinatorial antibody library, and showed that it inhibits ADAM28 activity and IGF-I-induced carcinoma cell proliferation and migration, leading to elongation of survival rate of mice. In addition, combination therapy of antibody 211-14 and docetaxel more effectively improved the survival time than that of bevacizumab and docetaxel. All these data suggest that our neutralizing antibody 211-14 may be a useful ADAM28 inhibitor for treatment of the non-small cell lung carcinoma patients in the future.

研究分野：実験病理学、生化学

キーワード：ADAM28 分子標的薬 肺癌 増殖 転移

1. 研究開始当初の背景

これまでの我々の研究結果から、ADAM28 が癌細胞の増殖・浸潤・転移において重要な役割を果たしていると考えられる。しかしながら、ADAM28 の活性調節機構と癌細胞浸潤に関わる分子機構についてはなお不明な点が多い。MMP に関しては、細胞膜上で潜在型 MMP-2 が MT1-MMP により活性化され、MMP-2/TIMP-2/MT1-MMP による癌細胞の能動的な細胞外マトリックス分解が浸潤・転移に重要であることや潜在型 MMP-7 が細胞表面において CD151 と結合し、この結合により活性化が促進されることが報告されている (Nature 370:61-65,1994; Lab.Invest.85:1489-1506,2005)。ADAM28 の原型は膜型 ADAM28m であるが、スプライシングバリエーションとして分泌型 ADAM28s が存在し(図 2)、両アイソフォームが癌細胞で高発現している。我々のこれまでの予備実験から、分泌型 ADAM28s と膜型 ADAM28m は主に細胞膜上に局在し、ADAM28 が細胞膜上で何らかの分子にアンカリングされていると考えられることから、細胞膜上での ADAM28 活性調節機構研究を着想した

2. 研究の目的

ADAM28 を標的とした癌治療開発に向けてヒト型抗 ADAM28 抗体の開発を行ってきた。その結果、性質の異なる 2 種類の特異的な抗体(211-12 と 211-14)を獲得している。両抗体は、ADAM28 の基質である IGFBP-3 分解活性を阻害し、IGF-I 誘導性乳癌細胞増殖抑制に働くことを認めている。また、211-14 抗体によりヒト肺癌細胞(PC-9 細胞)株の肺転移における増殖と転移を有意に抑制することを明らかにしている(図 3) (論文投稿準備中)。さらに、211-14 抗体は分泌型 ADAM28s を特異的に認識するのに対し、211-12 抗体は分泌型および膜型 ADAM28m の共通領域における 3 次構造を認識し、これら抗体を用いた蛍光抗体法により ADAM28 は主に細胞膜上に局在することを見出している。これ

らのデータに基づいて、本研究では ADAM28 の細胞膜上での活性調節に関わる分子を同定し、活性調節機構を解析するとともに、ADAM28 の X 線結晶構造解析により ADAM28 の立体構造と活性調節分子やヒト型抗 ADAM28 抗体との相互作用と ADAM28 活性阻害機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ADAM28 の細胞膜上での活性調節分子の同定と機能解析を行う。
- (2) ADAM28 の立体構造の決定と活性調節分子及びヒト型抗 ADAM28 抗体との作用機構について検討する。
- (3) ADAM28 による MMP を介した癌細胞浸潤機構を解析する。

4. 研究成果

メタロプロテアーゼ ADAM28 は、乳癌や肺癌組織において癌細胞特異的に高発現し、癌細胞の増殖・転移を促進することから (Cancer Res.66:9913-9920,2006; Int. J.Cancer 127:1844-1856, 2010; J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012) ADAM28 を標的とした完全ヒト型活性阻害抗体の開発を計画した。Human combinatorial antibody library から ADAM28 に反応する抗体 (211-14) を獲得し、本抗体は ADAM28 の insulin-like growth factor binding protein -3 分解活性を阻害し、ADAM28 高発現ヒト肺腺癌細胞株(PC-9)の IGF-I 誘導性細胞増殖と von Willebrand factor 誘導性アポトーシスを濃度依存的に抑制した。次に、Luciferase と Venus 融合遺伝子を導入した PC-9^{ffLuc-cp156} を作製し、マウス尾静脈内注入による肺転移モデルで本抗体の作用を検討した。PC-9^{ffLuc-cp156} 細胞尾静脈内注入翌日から腹腔内へ 211-14 抗体を投与した結果、肺転移は有意に抑制され、生存率の著しい改善とともに 10 匹中 3 匹では腫瘍の完全消失がみられた。また、PC-9^{ffLuc-cp156} 細胞尾静脈内注入 3 週後に抗体治療を開始した

実験では、全身転移の有意な遅延がみられ、50%生存率が1.4倍延長した。本抗体と肺癌に対する既存の抗体医薬(Bevacizumab)と抗癌剤(Docetaxel)との効果を比較検討したところ、本抗体 + Docetaxel 投与群では、Bevacizumab+Docetaxel 投与群より有意なマウス生存率の延長を認めた。さらに、本抗体の副作用を検討するために、マウスADAM28 と反応する抗体を正常マウスに多量投与したところ、10匹中1匹で精巣上体導管の拡張・破壊が見られたが、全身臓器の病理学的異常や血液・血清学的異常は認められなかった。本抗体をマウスあるいはカニクイザルに過剰投与しても有害事象は認められなかった(図1)。

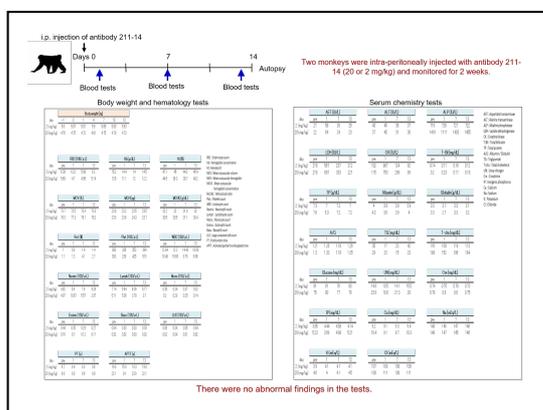


図1.カニクイザルを用いた抗体過剰投与実験

以上のデータから、本ヒト型抗ADAM28抗体は、既存の肺癌に対する抗癌剤や抗体医薬よりも有効な治療効果を有しており、抗体投与による有害事象の可能性も低く、非小細胞肺癌を対象とした新規分子標的治療薬剤としての応用が期待される。

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9件)

1. Miyuki Chijiwa, Satsuki Mochizuki, Tokuhiko Kimura, Hitoshi Abe, Yukie Tanaka, Yutaka Fujii, Hidenori Shimizu, Hiroyuki Enomoto, Yoshiaki Toyama and

Yasunori Okada : CCN1 (Cyr61) is overexpressed in human osteoarthritic cartilage and inhibits ADAMTS4 (aggrecanase-1) activity. **Arthritis Rheum.** 67: 1557-1567, 2015.

doi: 10.1002/art.39078

2. Shigeki Nanjo, Hiromichi Ebi, Sachiko Arai, Shinji Takeuchi, Tadaaki Yamada, Satsuki Mochizuki, Yasunori Okada, Mitsutoshi Nakada, Takashi Murakami and Seiji Yano: High efficacy of third generation EGFR inhibitor AZD9291 in a leptomeningeal carcinomatosis model with EGFR-mutant lung cancer cells. **Oncotarget** 7: 3847-3856, 2016.

doi: 10.18632/oncotarget.6758

3. *Aya Shiraiishi, *Satsuki Mochizuki, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada : Development of human neutralizing antibody to ADAMTS4 (aggrecanase-1) and ADAMTS5 (aggrecanase-2). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 469: 62-29, 2016. (*Aya Shiraiishi and *Satsuki Mochizuki contributed equally)

doi: 10.1016/j.bbrc.2015.11.072

4. Masahide Ota, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Yuka Miyamae, Ken Ishii, Hiroshi Kimura and Yasunori Okada: ADAM23 is down-regulated in side population and suppresses lung metastasis of lung carcinoma cells. **Cancer Sci.** 107: 433-443, 2016. doi: 10.1111/cas.12895

5. *Yuka Miyamae, *Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Kentaro Ohara, Hitoshi Abe, Shuji Yamashita, Saiko Kazuno, Takashi Ohtsuka, Hiroki Ochiai, Yuko Kitagawa and Yasunori Okada : ADAM28 is expressed by epithelial cells in human normal tissues and protects from C1q-induced cell death. **FEBS J.** 283: 1574-1594, 2016. (*Yuka Miyamae and *Satsuki Mochizuki contributed equally)

doi: 10.1111/febs.13693

6. Caroline Rudnicka, Satsuki Mochizuki, Yasunori Okada, Claire McLaughlin, Peter J. Leedman, Lisa Stuart, Michael Epis, Gerard Hoyne, Sherif Boulos,

Liam Johnson, Markus Schlaich and Vance Matthews : Overexpression and knock-down studies highlight that a disintegrin and metalloproteinase 28 controls proliferation and migration in human prostate cancer. *Medicine* (Baltimore). 2016 Oct; 95(40): e5085.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27749584>

7. Lakshini Herat, Caroline Rudnicka, Yasunori Okada, Satsuki Mochizuki, Markus Schlaich and Vance Matthews : The metalloproteinase ADAM28 promotes metabolic dysfunction in mice. **Int. J. Mol. Sci.** 2017.
doi: 10.3390/ijms18040884
8. Hideki Ueno, Eisaku Ito, Yojiro Hashiguchi, Fukuo Kondo, Hideyuki Shimazaki, Satsuki Mochizuki, Yoshiki Kajiwara, Eiji Shinto and Junji Yamamoto: Desmoplastic Pattern at the Tumor front defines poor-prognosis subtype of colorectal cancer. **Am. J. Surg. Pathol.** 41: 1506-1512, 2017.
doi: 10.1097/PAS.0000000000000946
9. Hideki Ueno, Shigeki Sekine, Taihei Oshiro, Yukihide Kanemitsu, Tetsuya Hamaguchi, Dai Shida, Atsuo Takashima, Megumi Ishiguro, Eisaku Ito, Yojiro Hashiguchi, Fukuo Kondo, Hideyuki Shimazaki, Satsuki Mochizuki, Yoshiki Kajiwara, Eiji Shinto, Junji Yamamoto, and Yasuhiro Shimada: Disentangling the prognostic heterogeneity of stage III colorectal cancer through histologic stromal categorization. **Surgery** 163 :777-783, 2017.
doi: 10.1016/j.surg.2017.09.007

[学会発表](計 10件)

1. 望月早月、千々岩みゆき、木村徳宏、阿部仁、藤井豊、清水英徳、岡田保典:
CCN1(Cyr61)は関節軟骨プロテオグリカン分解に必須な ADAMTS4 の活性を阻害する。第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 4 月 30 日
2. Satsuki Mochizuki, Yuka Miyamae, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe and Yasunori Okada: ADAM28 is expressed by epithelial cells in human normal tissues and protects from C1q-induced cell death. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases,

Newry, U.S.A. 2015 年 8 月 4 日

3. 望月早月、白石彩、宮越陽、古城周久、岡田保典:
アグリカナーゼ(ADAMTS4/5)を標的としたヒト型活性阻害抗体の開発。
第 29 回日本軟骨代謝学会、広島、2016 年 2 月 19 日
4. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada :
ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28): Prospective roles in cancer cell proliferation and progression, angiogenesis and epithelial cell maintenance (**Invited speaker**)
2016 TIDRC International Symposium, Seoul, Korea 2016 年 5 月 17 日
5. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada:
Selective inhibition of ADAM28 activity by human anti-ADAM28 antibody suppresses cancer cell proliferation and metastasis of non-small cell lung carcinoma cells (**Invited speaker**)
KSBMB conference 2016, Seoul, Korea 2016 年 5 月 20 日
6. 望月早月、千々岩みゆき、下田将之、宮越陽、古城周久、岡田保典:
ADAMTS/ADAM メタロプロテアーゼの機能解析とヒト型抗体開発研究。
第 48 回日本結合組織学会学術大会、長崎、2016 年 6 月 25 日
7. 望月早月、下田将之、宮越陽、古城周久、上野秀樹、岡田保典 : メタロプロテアーゼ(ADAMTS/ADAM)のヒト型抗体開発研究。
第 1 回エラスチン・関連分子研究会学術集会、東京、2016 年 12 月 2 日
8. 望月早月、下田将之、岡田保典、上野秀樹 :
ADAM28 によるがん組織内微小環境因子代謝を介したがん細胞増殖・転移。第 49 回日本結合組織学会学術大会、津、2017 年 6 月 16 日
9. Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Yasunori Okada and Hideki Ueno:
Regulation of tumor microenvironmentalfactors by ADAM28. Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases, Biddeford, U.S.A. 2017 年 7 月 11 日
10. 望月早月、下田将之、岡田保典、長谷和生、上野秀樹:

メタロテアーゼ ADAM28 を標的とした新規分子標的治療薬開発。第 55 回日本癌治療学会学術集会、横浜、2017 年 10 月 20 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：癌治療のための抗 ADAM28 抗体
発明者：Akira Miyakoshi, Rena Matsumoto, Shizue Katoh, Yuki Hayami, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Yasunori Okada
権利者：ジーンフロンテエイア株式会社・慶應義塾大学
種類：特許
番号：9,845,364
出願年：2017 年 12 月 19 日
国内外の別：アメリカ

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

望月早月 (Satsuki Mochizuki)
防衛医科大学校外科学講座・学内講師
研究者番号：80365428

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)研究協力者

()