

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590404

研究課題名（和文）ADAM28 による von Willebrand factor 分解と癌細胞転移

研究課題名（英文）ADAM28 cleaves von Willebrand factor and induces cancer cell metastasis

研究代表者

望月 早月 (Satsuki Mochizuki)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80365428

研究成果の概要：ADAM28 は乳癌や肺癌組織で高発現する分子であるが、その機能はよくわかっていない。本研究では、酵母 two hybrid 法を用いて ADAM28 の新規基質として von Willebrand factor (vWF) を見出した。さらに癌細胞で高発現する ADAM28 が血中で vWF と結合し分解することにより、癌細胞は vWF 誘導のアポトーシスから回避され癌細胞浸潤転移が促進することが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：MMP, ADAM, vWF, 癌転移

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、これまでにヒト乳癌組織や乳癌細胞株において 12 種類のプロテアーゼ型 ADAM 分子のスクリーニングにより、ADAM28 が癌細胞で選択的に高発現し癌細胞増殖と正の相関

を示すとともに、ADAM28 による IGFBP-3 の分解により乳癌細胞増殖を促進することを実証してきた。さらに、ADAM28 を検出する高感度 ELISA 系を確立し、ヒト肺癌患者検体では、癌組織・血中・尿で検出され肺癌の診断や病

勢のモニター法として有望であることを見出している。また、我々の研究グループでは、肺癌での ADAM28 発現レベルは癌細胞増殖のみならず、転移と正の相関を示すことを証明しており、現在までにクローニングされた ADAM 分子のうちでも、特に ADAM28 がヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移に深く関与することが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞増殖・浸潤・転移への関与が注目されている ADAM 分子の中でも ADAM28 にターゲットを絞り、ADAM28 新規基質候補分子の分解とその意義について生化学・分子生物学的に検討し、癌細胞増殖・浸潤・転移における ADAM28 の機能を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ADAM28 と vWF の特異的結合の証明:

精製したヒト血漿由来 vWF をプレート上に固相化し、ヨードラベルした ADAM28 との結合アッセイにより、ADAM28 と vWF の結合を決定する。またこの結合が抗 vWF 抗体や非標識 ADAM28 との処理により、阻害されるのか検討し、結合の特異性を証明する。

### (2) ADAM28 による vWF 分解と切断部位

**決定:** 精製したヒト血漿由来 vWF と活性型 ADAM28 を 37、20 時間で反応後、還元状態で電気泳動 (SDS-PAGE; 5-20% グラジエントゲル) を行い、vWF マルチマーが低分子化するかどうか検討する。その後、分解産物の N 末アミノ酸シーケンスにより切断部位を決定する。

**(3) ADAM28 処理・未処理 vWF による肺癌細胞株 (PC-9) のアポトーシス誘導の検討:** ADAM28 を高発現する肺癌細胞株 (PC-9) を種々濃度の vWF 存在下・非存在下で培養し、細胞死検出 ELISA キット (Roche 社) でアポトーシス細胞を検出する。

### (4) vWF 誘導性癌細胞アポトーシスのメカニズム解析:

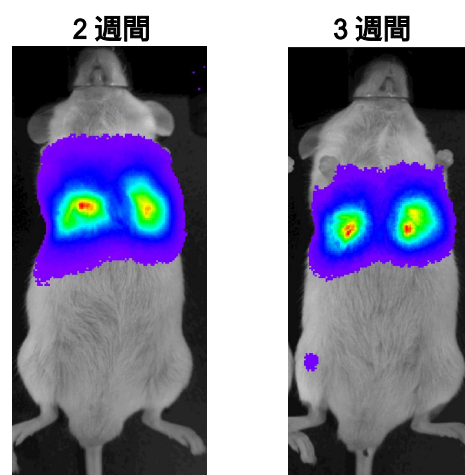
vWF 誘導性の PC-9 細胞のアポトーシスが、癌細胞上にある  $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 3 インテグリンを介しているのか検討するために、インテグリン ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 3) 抗体やインテグリン ( $\alpha$ IIb $\beta$ 3,  $\alpha$ v $\beta$ 3) の siRNA を用いてアポトーシスが抑制されるのか検討する。また、vWF により p53 のリン酸化や caspase-3 の活性をイムノプロットで検討する。

**(5) マウス癌転移モデルにおける ADAM28 の癌転移促進作用の検討:** PC-9 細胞にレンチウイルスを用いてルシフェラーゼを恒常的に発現させる安定細胞株 (PC-9<sup>Luc</sup>) を作製す

る。その細胞を NOD/SCID マウスの尾静脈から注入後、2 週間と 3 週間後にルシフェリンを投与し、癌細胞転移を IVIS imaging system を用いてモニターする。また、PC-9<sup>Luc</sup> 細胞を shRNA で ADAM28 の発現を恒常的にノックダウンさせた細胞 PC-9<sup>Luc/ADAM28</sup> 細胞を作製し、マウスの尾静脈から注入する。PC-9<sup>Luc</sup> 細胞と PC-9<sup>Luc/ADAM28</sup> 細胞における肺転移能、転移腫瘍の大きさを比較・検討する。

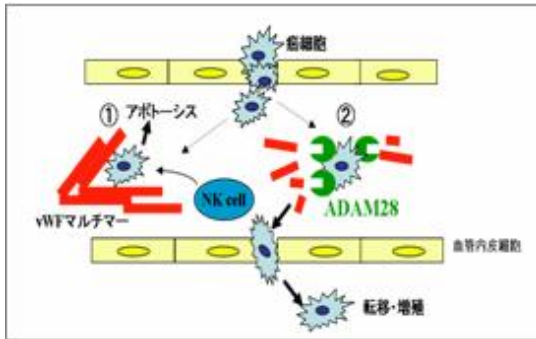
## 4. 研究成果

ADAM28 の浸潤・転移に関わる分子をクローニングするために酵母 two-hybrid system を行ったところ ADAM28 結合蛋白質の候補として vWF (von Willebrand factor) を見出した。我々の実験結果から、proADAM28 と vWF は結合するのみならず、活性型 ADAM28 は vWF マルチマーを低分子化することが明らかとなった。vWF の分解酵素として ADAMTS13 が知られているが、N 末アミノ酸シーケンスの結果、ADAM28 は vWF を ADAMTS13 とは別の部位で切断していた。ADAM28 高発現肺癌細胞株 (PC-9) を vWF で処理したところ、アポトーシスは観察されないが、ADAM28 の発現や活性を抑制するため、細胞をあらかじめ合成 ADAM の阻害剤 (KB-R7785) や ADAM28 の中和抗体、ADAM28sRNA 処理により、vWF 誘導性アポトーシスが促進した。また、vWF で処理した PC-9 培養上清で vWF 分解が促進していたが、同様に ADAM の阻害剤 (KB-R7785) や ADAM28 の中和抗体、ADAM28sRNA 処理により、vWF の分解が抑制された。さらに、ADAM28 の癌細胞浸潤・転移への関与を in vivo で証明するためにルシフェラーゼを恒常的に発現させた ADAM28 高発現安定細胞株 (PC-9<sup>Luc</sup>) をマウスの尾静脈から注入し、ルシフェリン投与後その発光を体外から計測して癌細胞の浸潤・転移を経時的、定量的にモニタリングを行ったところ、2 週間で肺に 3 週間では大腿骨に癌細胞の集積が観察された (図 1)。



**図1 . ADAM28 高発現細胞株 PC-9<sup>Luc</sup>の癌転移像:**恒常的にルシフェラーゼを発現させた ADAM28 高発現安定細胞株(PC-9<sup>Luc</sup>)をマウスの尾静脈から注入すると2週間、3週間後に肺と大腿骨での集積が見られる。

さらに、ADAM28の発現を恒常的にノックダウンした細胞(PC-9<sup>Luc/ADAM28</sup>)をマウスに注入すると癌転移が80%-90%抑制された。以上のことから、ADAM28は癌細胞の浸潤・転移において重要な役割を果たしており、ADAM28は血中でvWFと結合すると癌細胞表面でvWFを分解し、vWF誘導性のアポトーシスを回避することで癌細胞浸潤・転移促進に働く可能性が示唆された(図2)。



**図2. ADAM28によるvWF分解を介した癌転移機構:**vWFマルチマーは血中で癌細胞と結合してアポトーシスや免疫系の細胞を介してクリアランスに作用する。しかし、ADAM28高発現癌細胞ではADAM28がvWFを分解し、癌転移を促進することが予想される。

## 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7件)

1. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada. ADAM28 as therapeutic target.

*Curr. Pharm. Design.* (2009) In press

(査読あり)

2. Shuji Mikami, Ken-ichi Katsube, Mototsugu Oya, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoada, Ryuichi Mizuno, Masaru Ishida, Tohru Ikeda, Makio Mukai, and Yasunori Okada. RANKL

expression in clear cell renal cell carcinomas and its association with bone metastasis and cancer cell migration.

*J. Urology.* (2009) In press.

(査読あり)

3. Taku Yatabe, Satsuki Mochizuki, Masayuki Takizawa, Miyuki Chijiwa, Aiko Okada, Tokuhiro Kimura, Yoshinari Fujita, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama and Yasunori Okada. Hyaluronan inhibits expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic chondrocytes. *Ann. Rheum. Dis.* 68: 1051-1058 (2009).

(査読あり)

4. Masayuki Takizawa, Taku Yatabe, Aiko Okada, Miyuki Chijiwa, Satsuki Mochizuki, Peter Ghosh and Yasunori Okada. Calcium pentosan polysulfate directly inhibits enzymatic activity of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in osteoarthritic chondrocyte.

*FEBS Lett.* 582: 2945-2949 (2008).

(査読あり)

5. Aiko Okada, Satsuki Mochizuki, Taku Yatabe, Tokuhiro Kimura, Takayuki Shiomi, Yoshinari Fujita, Hideo Matsumoto, Atsuko Sehara-Fujisawa, Yukihide Iwamoto, Yasunori Okada. ADAM-12 (meltrin- $\alpha$ ) is involved in chondrocyte proliferation via cleavage of insulin-like growth factor binding protein 5 in osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum.* 58: 778-789 (2008)

(査読あり)

( 査読あり )

6. Masayuki Shimoda, Gakuji Hashimoto, Satsuki Mochizuki, Eiji Ikeda, Norihiro Nagai, Susumu Ishida and Yasunori Okada. Binding of ADAM28 to P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances P-selectin mediated leukocyte adhesion to endothelial cells.

**J. Biol. Chem.** 282: 25864-25874 (2007).

( 査読あり )

7. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada. ADAMs in cancer cell proliferation and progression.

**Cancer Sci** 98: 621-628 (2007)

( 査読あり )

[ 学会発表 ] ( 計 6 件 )

1. 望月早月、下田雅之、副島見事、岡田保典

ADAM28 による癌細胞の増殖・浸潤・転移.

第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2008), 神戸, 2008 年 12 月 10 日

2. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada.

ADAM28 may promote cancer cell metastasis by preventing apoptosis through cleavage of von Willebrand factor.

The 6<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Research and Therapy, Tokyo, 2008 年 11 月 22 日

3. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada.

Analysis of ADAM28-interacting protein that may be related to cancer cell invasion and metastasis: ADAM28 directly binds to and cleaves von Willebrand factor.

FECTS XXIst Meeting, Marseille, 2008 年 7 月 13 日

4. 望月早月、副島見事、下田将之、岡田保典

癌細胞の浸潤・転移に関わる ADAM28 の結合蛋白質及び新規基質の探索.

第 40 回日本結合組織学会学術大会・第 55 回マトリックス研究会大会合同学術集会、東京、2008 年 5 月 29 日

5. Taku Yatabe, Satsuki Mochizuki, Masayuki Takizawa, Miyuki Chijiwa, Aiko Okada, Tokuhiko Kimura, Yoshinari Fujita, Hideo Matsumoto, Yoshiaki Toyama and Yasunori Okada.

High molecular weight hyaluronan inhibits ADAMTS4 (aggrecanase-1) expression through the CD44 signaling pathway in human osteoarthritic chondrocytes.

7th Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, Cairns, 2007 年 10 月 30 日

6. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda and Yasunori Okada.

ADAM28 binds to and cleaves von Willebrand factor.

Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinase, Italy, 2007 年 6 月 6 日

[ 図書 ] ( 計 2 件 )

1. 望月早月

分解の機構、MMP 「エラスチンー構造・機能・病理」(日本エラスチン研究会) 2008 年 3 月 3 日発行 p194-203

2. 望月早月、岡田保典

TIMP-1, MMP-1,  $\alpha 2M$  とは「日本医事新報」(日本医事新報社) 2007 年 4 月 28 日発行 p92-94

〔その他〕

慶應義塾大学 COE プログラム「幹細胞医学と免疫学の基礎・臨床 体型拠点」での研究成果（下記 URL）

[http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/ember/y\\_mochizuki.html](http://www.coe-stemcell.keio.ac.jp/jp/ember/y_mochizuki.html)

岡田研究室ホームページ（研究内容下記 URL）

<http://keio-okada-lab.jp/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

望月 早月 (MOCHIZUKI SATSUKI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80365428

### (2)研究分担者

岡田 保典 (OKADA YASUNORI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00115221