

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590490

研究課題名(和文) ADAM28の分子作用機構解明と分子標的治療薬開発の基礎研究

研究課題名(英文) Research and development of human neutralizing antibodies aiming at treatment of non-small cell lung carcinoma

研究代表者

望月 早月 (Mochizuki, Satsuki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80365428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ADAM28 (a disintegrin and metalloproteinase 28)は癌細胞の増殖・転移に重要な役割を果たしている。本研究では、肺癌治療を目指してヒト型抗ADAM28抗体(211-14)を開発した。211-14抗体は、ADAM28高発現ヒト肺腺癌細胞株(PC-9)の細胞増殖を濃度依存的に抑制した。また、PC-9 ffLuc-cp156細胞をマウスの尾静脈内注入3週後に抗体治療を開始した実験では、肺内腫瘍増殖と全身転移の有意な遅延がみられ、平均生存期間も11週延長した。ヒト型抗ADAM28抗体211-14は、ヒト肺癌の分子標的治療薬剤として応用できる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：ADAM28, a member of the ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) gene family, plays an important role in cancer cell proliferation and metastasis. In the present study, we screened Human Combinatorial Antibody Library by phage display panning and obtained antibodies (211-14 and 211-12) against ADAM28. Tumor growth and metastasis of the lung tumors after intravenous injection of PC-9 ffLuc-cp156 lung carcinoma cells were significantly inhibited by the antibody treatment, improving survival rate of the mice. These data indicate that our antibodies 211-14 and 211-12 neutralize ADAM28 activity and antibody 211-14 inhibits cancer cell proliferation and metastasis in vivo. The antibodies could be used as an ADAM28 inhibitor for clinical application to treat the patients with lung or breast carcinoma in the future.

研究分野：癌細胞増殖・転移、メタロプロテアーゼ、細胞外マトリックス

キーワード：ADAM 分子標的 肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 分子は、メタロプロテアーゼドメインを共有する MMP (matrix metalloproteinase) の近縁遺伝子ファミリーである。ヒトでは、21種類の ADAM 分子がクローニングされており、そのうち13種類がメタロプロテアーゼ活性を持つとされている。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、これまでにヒト乳癌組織においてメタロプロテアーゼ型 ADAM 分子を網羅的にスクリーニングし、ADAM28 が癌細胞で選択的に高発現し、癌細胞の増殖と正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 insulin-like growth factor-I (IGF-I) 活性亢進により乳癌細胞増殖を促進することを実証してきた (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 の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最近証明した (Biochem. Biophys. Res. Commun. 402:651-657, 2010)。さらに、ADAM28 を検出する高感度 ELISA 法を開発し、ヒト肺癌患者検体では癌組織・血液・尿で検出され、血中 ADAM28 のレベルが肺癌の臨床病期、リンパ節転移、再発と正の相関を示すことから、本 ELISA 系が肺癌の診断やモニター法として有望であることを見出している (Int. J. Cancer 127:1844-1856, 2010)。一方、

バイオイメージング法を用いた実験的肺転移マウスモデルでの検討から、抗ヒト ADAM28 マウスモノクローナル抗体 (297-2F3) 処理によりヒト肺癌細胞株の肺転移を有意に抑制し、ADAM28 が癌細胞転移に関与する可能性を *in vivo* の実験系で証明してきた (J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012)。これらのことから、ADAM28 は、ヒト癌細胞の増殖・浸潤・転移に深く関与する分子であり、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。

## 2. 研究の目的

これまでの我々の研究から ADAM28 の基質としては、IGFBP-3、CTGF、Von Willebrand factor (VWF) (J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012) が知られている。これらの分子は、肺 cDNA ライブラリーの網羅的スクリーニングによって見出された分子であり、癌組織や癌細胞株を探索した研究はない。ADAM の酵素活性は遺伝子発現のみならず細胞表面での活性化によって制御されている (Curr. Pharm. Des. 15:2349-2358, 2009)、ADAM28 の活性調節因子に関する情報は全くない。先行する MMP 研究分野では、国内外で低分子インヒビターが開発されたにも関わらず臨床応用には到達できなかった。現在、唯一臨床治験に残っている候補はヒト型 MT1-MMP 抗体であり、本抗体インヒビターは膀胱癌などの治療において有望と期待されている。ヒト型抗体は特異性と生体内での持続性において優れており、低分子化合物インヒビターより優位にある。しかし、これまでに ADAM 分子に対するヒト型抗体を開発したとの報告はない。一方、ADAM28 は癌細胞にかなり特異的に発現するが、ヒトの生理的な組織における低レベルな発現も推定され、活性阻害による副作用出現の可能性も考えられることから、生理的組織での発現や機能解析は重要である。

ADAM28 には膜型 ADAM28m と分泌型 ADAM28s から構成されている。他の研究が

ループが報告した結晶構造解析<sup>(EMBO J. 25: 2388-2396, 2006)</sup>や我々の binding assay データ<sup>(Biochem.Biophys.Res.Comm. 402:651-657, 2010)</sup>から、ADAM28 による基質分解には本分子のシステインリッチドメイン(CR)にある hypervariable region (HVR)と基質との結合が重要と考えられている。そこで、本研究では、ADAM28 の HVR との結合を利用したプロテオーム解析技術により、ヒト肺癌組織と癌細胞株における ADAM28 の新規基質と活性調節因子を機能性ナノ磁性微粒子と免疫沈降法でスクリーニングし、候補分子の ADAM28 による分解や活性化への作用を検討する。また、ADAM28 に対する標的治療薬の開発においては、150 億種類のヒト型抗体を Fab の形でファージ表面に提示する抗体ライブラリー-human combinatorial antibody library (HuCAL)をスクリーニング、ADAM28 に対する候補抗体を選択し、特異的に活性を阻害する完全ヒト型抗体を獲得する。さらに、本抗体を用いて肺癌細胞の増殖・浸潤・転移抑制効果を検討し、ADAM28 を分子標的としたヒト肺癌の治療法開発のための基礎的研究を行う。一方、ADAM28 活性抑制による副作用への対処のために、生理的なヒト組織における ADAM28 の発現と機能解析を行う。

本研究での具体的な研究課題は、下記の 2 点にまとめることができる。

- (1) ファージディスプレイ法を用いた完全ヒト型抗ADAM28抗体の作製、特性解析及び肺癌細胞の増殖・浸潤・転移能の抑制効果の検討
- (2) ヒト生理的組織におけるADAM28の発現と機能解析

### 3. 研究の方法

**1. ファージディスプレイ法を用いたヒト型ADAM28 抗体のスクリーニング:** 活性型ADAM28 を抗原として、ヒト型抗体のスクリーニングをジーンフロンティア社に依頼する。これまでに得られた 6 種類の抗体に対し

ては、ADAM28 の認識部位を確認するために、ADAM28 の分割リコンビナントタンパク質の Pro/MP と Dis/CR/Ss を用いてイムノブロット法で検討する。また、本ヒト型抗体が他の ADAM 近縁遺伝子ファミリーの MMPs (MMP-1、2、3、7、9、13)や ADAMs(ADAM9、10、12、15、17)、ADAMTS4、ADAMTS5 との交差反応の有無をイムノブロット法により検討する。

### **2. ヒト型ADAM28抗体によるADAM28酵素活性阻害実験とNOD-SCIDマウスを用いたヒト癌細胞の増殖能・転移能の抑制効果の検討:**

ADAM28 の基質である <sup>125</sup>I- 標識 IGFBP-3<sup>(Cancer.Res.66:9913-9920,2006)</sup> と CTGF<sup>(Biochem.Biophys.Res.Comm. 402:651-657,2010)</sup>を用いて、活性型ADAM28とヒト型抗ADAM28抗体とインキュベーションし、分解抑制効果を検討する。ADAM28活性抑制抗体については、PC-9細胞におけるIGF-I誘導性増殖抑制効果をBrdUの取り込みとMIB-I (Ki-67)の免疫組織染色で検討する。PC-9細胞でルシフェラーゼを恒常的に発現させたPC-9<sup>Venus-Luc</sup>作製による癌転移モデルを確立している<sup>(J. Natl. Cancer Inst. 104:906-922, 2012)</sup>。本転移モデルでのヒト型抗ADAM28抗体もしくはコントロールIgGを腹腔内投与により、IVISを用いて肺転移を経時的にモニターし、両群における肺転移能と転移腫瘍の大きさを比較・検討する。さらに、マウス癌転移組織の病理組織標本を作製し、ADAM28 の発現レベルと癌細胞増殖度(MIB-I陽性インデックス)、浸潤形態の特徴を比較・検討する。

### **3. 正常組織におけるADAM28の発現・局在の検討と機能解析:**

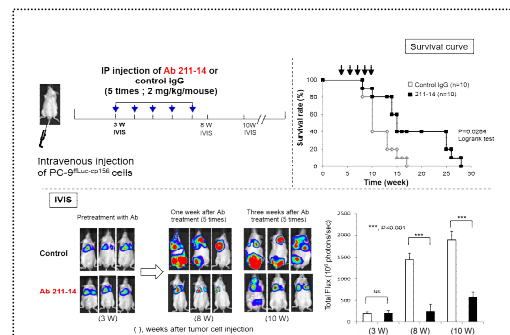
解剖例及び手術検体より正常組織を採取し、パラフィン切片を用いて、分泌型と膜型 ADAM28 発現・局在を抗ADAM28 マウスモノクローナル抗体(297-2F3)<sup>(Int. J.Cancer 118: 263-273,2006)</sup>と抗ヒトADAM28m 抗体(Abcam 社)用いて免疫組織染色により検討する。また、ADAM28 の mRNA

レベルとタンパク質発現レベルを RT-PCR とイムノプロット法により検討する。さらに、ヒト癌組織と正常組織における ADAM28 のタンパク質産生レベルを当研究室で作製した ELISA 法<sup>(Int. J. Cancer.127:1844-1856, 2010)</sup>により解析し、正常組織での発現レベルを乳癌や肺癌組織のそれと比較・検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では、ファージディスプレイ法を用いたヒト型抗体ライブラリー (Human Combinatorial Antibody Library: Hucal)により、6種類のヒト型 ADAM28 候補抗体をスクリーニングし、そのうち 2 個のクローン(211-14 と 211-12)は、ADAM28 を特異的に免疫沈降することを証明した。クローン 211-14 (IgG1) は、イムノプロット法によりリコンビナント ADAM28 を認識し、他の ADAM (ADAM9, 10, 12 and 17), ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS1, 4 and 5) あるいは matrix metalloproteinase (MMP-1, 2, 3, 7, 9 and 13) などとは交差反応しなかった。Epitope mapping 解析により、211-14 抗体のエピトープは ADAM28 のシステインリッチドメインと分泌型特異的ドメインの連結部位 (<sup>517</sup>TELWGPGRRRTP<sup>528</sup>)にあることが明らかとなった。211-14 抗体は、ADAM28 による insulin-like growth factor-binding protein 3 (IGFBP-3)の分解を阻害し、ADAM28 高発現ヒト乳癌細胞株(MDA-MB231 細胞)の IGF-I 誘導性細胞増殖を抑制した。一方、クローン 211-12 (IgG1)は、イムノプロット法には使用できないものの、ADAM28 の IGFBP-3 分解活性と IGF-I 誘導性細胞増殖を抑制した。癌細胞増殖・転移への作用を調べるために、Venus-Luciferase キメラ遺伝子を導入した乳癌と肺癌細胞株 (MDA-MB231<sup>ffLuc-cp156</sup> と PC-9<sup>ffLuc-cp156</sup>)を用いて、NOD/SCID マウス乳房皮下脂肪組織移植による増殖自然転移モデルと尾静脈内注入による肺転移モデルで

の 211-14 抗体の作用を検討した。その結果、MDA-MB231<sup>ffLuc-cp156</sup> 細胞では、抗体処理により局所での癌細胞増殖が有意に抑制された。また、各臓器への転移率を ffLuc-cp156 の RT-PCR で検討したところ、対照 IgG 投与群 (n=10)での肺(50%)、心臓(50%)、肝臓(60%)、腎臓(70%)、脳(10%)への転移率は、211-14 抗体投与群(n=10)においてそれぞれ肺(10%)、心臓(0%)、肝臓(10%)、腎臓(30%)、脳(10%)と抑制された。PC-9<sup>ffLuc-cp156</sup> 細胞尾静脈内注入の肺転移も 211-14 抗体投与により有意に抑制された。また、PC-9<sup>ffLuc-cp156</sup> 細胞を注入 3 週間後の肺転移が進行した状況下で 211-14 抗体を投与すると、肺転移の遅延とマウスの生存期間がコントロール抗体投与群では移植後 17 週ですべて死亡するのに対し、211-14 抗体投与群では 28 週まで延長した(図 1)。以上より、我々が開発したヒト型 ADAM28 活性阻害抗体は、ADAM28 分子標的治療薬剤として応用できる可能性が期待される。



**図 1. PC-9<sup>ffLuc-cp156</sup> 細胞尾静脈注入 3 週後に 211-14 抗体で治療すると全身転移の有意な抑制が見られ、平均生存率期間が 11 週間延長した。**

また、ADAM28 のヒト正常組織における発現と機能解析を行ったところ、ADAM28 は精巣上体、気管支、胃などの上皮細胞に発現していた。一方で、脾臓やリンパ節などのリンパ球には陰性であることが明らかとなった。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 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.** 2015 in press. (査読あり) doi: 10.1002/art.39078.
2. \*Hitoshi Abe, \*Satsuki Mochizuki, Kentaro Ohara, Mari Ueno, Hiroki Ochiai, Yuko Kitagawa, Okio Hino, Hiroshi Sato and Yasunori Okada: Src plays a key role in ADAM28 expression in v-src-transformed epithelial cells and human carcinoma cells. **Am. J. Pathol.** 183: 1667-1678, 2013. (\*Hitoshi Abe and \*Satsuki Mochizuki contributed equally) (査読あり) doi: 10.1016/j.ajpath.2013.07.011.
3. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Aya Sasaki, Hirotaka James Okano, Hideyuki Okano and Yasunori Okada: Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand Factor. **J. Natl. Cancer Inst.** 104:906-922, 2012. (査読あり) doi: 10.1093/jnci/djs232.

〔学会発表〕(計 10 件)

1. 望月早月、岡田保典 : 非小細胞肺癌の分子標的治療を目指したヒト型抗 ADAM28 抗体の作用機構 (**シンポジスト**) 第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、2014 年 7 月 10 日、金沢市文化ホール、石川県、金沢市
2. Satsuki Mochizuki, Hitoshi Abe, Masayuki Shimoda, Noriko Aramaki-Hattori, Yuka Miyamae, Akira Miyakoshi, Kanehisa Kojoh and Yasunori Okada: Selective inhibition of ADAM28 activity by human anti-ADAM28

antibodies suppresses cancer cell proliferation and metastasis. 9<sup>th</sup> Pan Pacific Connective Tissue Societies Symposium, 2013 年 11 月 25 日, Hong Kong, China

3. 望月早月、阿部仁、尾原健太郎、落合大樹、北川雄光、樋野興夫、佐藤博、岡田保典: Src は ADAM28 の発現に重要な役割を果たす。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 4 日、パシフィコ横浜、神奈川県、横浜市

4. 望月早月、岡田保典: ヒト ADAM28 活性阻害抗体の開発とそれによる癌細胞増殖転移抑制作用。第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013 年 7 月 11 日、ホテルエナピスタ、長野県、松本市

5. 望月早月、下田将之、宮越陽、古城周久、岡田保典: ADAM28 による癌細胞転移機構とその制御。第 45 回日本結合組織学会学術大会、第 60 回マトリックス研究会大会合同学術大会、2013 年 6 月 28 日、和歌山県立医科大学、和歌山県、和歌山市

6. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada: Development of human anti-ADAM28 neutralizing antibodies that inhibit cancer cell growth and metastasis. (**Invited speaker**) Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinases, 2013 年 5 月 23 日、Lucca, Italy,

7. 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、2012 年 9 月 21 日、ホテルロイトン札幌、北海道、札幌市

8. Satsuki Mochizuki, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, and Yasunori Okada: Novel effect of ADAM28 on promotion of carcinoma cell metastasis. The XXIIIrd FECTS and ISMB Joint Meeting, 2012 年 8 月 28 日、Katowice, Poland

9. 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、2012 年 7 月 13 日、オリエンタルホテル広島、広島県、広島市

10. 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：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、2012 年 4 月 28 日、京王プラザホテル、東京都、新宿区

〔図書〕(計 1 件)

1. \*Satsuki Mochizuki and \*Yasunori Okada: ADAM28 In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Ed.by N.D.Rawlings and G. Salvesen. Academic Press, pp. 1136-1139, 2013. (\*Satsuki Mochizuki and \*Yasunori Okada are co-correspondence)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：Human antibody against aggrecanase-type ADAMTS species for therapeutics of aggrecanase-related

発明者：Akira Miyakoshi, Mikiko Nakamura, Kanehisa Kojoh, Satsuki Mochizuki, Yasunori Okada

権利者：ジーンフロンティア

種類：特許

番号：61891087

出願年月日：2013 年 10 月 15 日

国内外の別：国内

名称：Anti-ADAM28 antibodies for therapeutics for carcinomas

発明者：Akira Miyakoshi, Rena Matsumoto, Shizue Katoh, Yuki Hayami, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Yasunori Okada

権利者：ジーンフロンティア

種類：特許

番号：61724484

出願年月日：2012 年 11 月 19 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ(慶應義塾大学医学部岡田研究室)

<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・専任講師

研究者番号：80365428

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

岡田 保典 (OKADA, Yasunori)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00115221