慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	バイオイメージングを用いた癌細胞由来ADAM28の生体内機能解析
Sub Title	Functional analysis of ADAM28 on cancer cells by bioluminescence imaging
Author	望月, 早月(Mochizuki, Satsuki) 岡田, 保典(Okada, Yasunori)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	ADAM28の癌細胞転移への関与を調べるために、ルシフェラーゼとVenus融合タンパク質(ffLuc-cp156)を恒常的に発現する肺癌と乳癌細胞株(PC-9ffluc-cp156とMDA-MB231ffluc-cp156)を作製し、マウスの尾静脈内注入による肺転移モデルと乳房皮下脂肪組織移植による自然転移モデルを用いて癌転移を解析した。バイオイメージングを用いた解析法によりPC-9ffluc-cp156細胞の肺転移は、shRNAによるADAM28の発現抑制とADAM28に対する中和抗体処理により有意に抑制された。また、MDA-MB231ffluc-cp156細胞でもshRNAによるADAM28発現抑制で局所での癌細胞の増殖が抑制され,ffLuc-cp156に対するプライマーを用いたRT-PCRの解析から、各臓器(肺、心臓、肝臓、腎臓、脳など)への転移が有意に抑制された。さらに、PC-9ffluc細胞のマウス尾静脈内注入後におけるマウス血漿中VWFの分解は、mock群に比べてshADAM28群で抑制されていた。以上のことから、癌細胞に発現するADAM28はVWFを血中で分解し、VWF誘導性アポトーシスの回避により癌細胞転移促進に働く可能性が示唆された。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21590421 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
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21590421seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21590421
研究課題名（和文）バイオイメージングを用いた癌細胞由来 ADAM28 の生体内機能解析
研究課題名（英文）Functional analysis of ADAM28 on cancer cells by bioluminescence imaging
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

研究成果の概要(和文):ADAM28 の癌細胞転移への関与を調べるために、ルシフェラーゼと Venus 融合タンパク質(ffLuc-cp156)を恒常的に発現する肺癌と乳癌細胞株(PC-9$^{ffluc-cp156}$ と MDA-MB231$^{ffluc-cp156}$)を作製し、マウスの尾静脈内注入による肺転移モデルと乳房皮下脂肪組織移植による自然転移モデルを用いて癌転移を解析した。バイオイメージングを用いた解析法により PC-9$^{ffluc-cp156}$ 細胞の肺転移は、shRNA による ADAM28 の発現抑制と ADAM28 に対する中和抗体処理により有意に抑制された。また、MDA-MB231$^{ffluc-cp156}$ 細胞でも shRNA による ADAM28 発現抑制で局所での癌細胞の増殖が抑制され, ffLuc-cp156 に対するプライマーを用いた RT-PCR の解析から、各臓器（肺、心臓、肝臓、腎臓、脳など）への転移が有意に抑制された。さらに、PC-9^{ffluc} 細胞のマウス尾静脈内注入後におけるマウス血漿中 VWF の分解は、mock 群に比べて shADAM28 群で抑制されていた。以上のことから、癌細胞に発現する ADAM28 は VWF を血中で分解し、VWF 誘導性アポトーシスの回避により癌細胞転移促進に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): To explore the molecular mechanism of ADAM28/VWF-mediated metastasis, we established PC-9 lung carcinoma cells and MDA-MB231 breast carcinoma cells expressing Venus and luciferase (PC-9$^{ffLuc-cp156}$ and MDA-MB231$^{ffLuc-cp156}$ cells), and used them in the mouse models of lung metastasis, and primary tumor growth and spontaneous metastasis. Inhibition of ADAM28 expression with shRNA or siRNA and its inactivation with the neutralizing anti-ADAM28 antibody significantly reduced lung metastasis of PC-9$^{ffLuc-cp156}$ cells and enhanced apoptosis of the cells within blood vessels. The primary tumor growth of ADAM28-shRNA transfectants after orthotopic implantation of MDA-MB231$^{ffLuc-cp156}$ cells was significantly slower than that of mock-transfectants. By RT-PCR analysis for the expression of ffLuc-cp156 transcripts, metastasis in the lung, heart, liver, kidney and brain was reduced in the mice received ADAM28-shRNA transfectants as compared with mock-transfectants. Plasma samples from mice with injection of mock-transfected PC-9$^{ffLuc-cp156}$ cells showed decreased amount of large VWF multimers as compared with those from mice which received ADAM28-shRNA transfectants or no cells. All these in vivo and in vitro data suggest that ADAM28 derived from carcinoma cells cleaves and inactivates pro-apoptotic endogenous agent VWF, thereby promotes the carcinoma cell survival within the blood stream and ultimately enhances their metastasis

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：ADAM

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. Phram. 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)**。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ることが明らかとなってきた。

２．研究の目的：本研究課題では、癌細胞由来ADAM28の癌細胞増殖・浸潤・転移における生体内での機能を解明する目的で下記の2点に絞って解析する。

（1）Bioluminescence imagingを用いたマウス実験的肺癌転移モデルと自然増殖転移モデルによるADAM28の癌細胞浸潤・転移作用機構の解析

（2）ADAM28のvon Willebrand factor (VWF)分解による癌細胞浸潤・転移への関与の検討

３．研究の方法：(1)**<u>Bioluminescence imaging (BLI)を用いたマウス実験的肺転移モデルと自然転移モデルによるADAM28の癌転移促進作用の解析：</u>**

ADAM28高発現肺癌細胞株と乳癌細胞株（PC-9とMDA-MB231）にレンチウイルスを用いてVenusとルシフェラーゼを恒常的に発現させる安定細胞株(PC-9$^{ffLuc\text{-}cp156}$,MDA-MB231$^{ffLuc\text{-}cp156}$)を作製する。また、PC-9$^{ffLuc\text{-}cp156}$をshRNAでADAM28の発現を恒常的にノックダウンさせた細胞を作製し、それらの細胞をNOD/SCIDマウスの尾静脈から注入しマウス肺への癌転移能をバイオイメージング法により検討する。また、MDA-MB231$^{ffLuc\text{-}cp156}$とshRNAでADAM28の発現をノックダウンした細胞を準備し、マウス乳房皮下の脂肪組織に移植し、バイ

オイメージング法で細胞の肺転移能、転移腫瘍の大きさを比較検討する。

(2) **PC-9$^{ffLuc\text{-}cp156}$ 細胞尾静脈注入後のマウス血中における VWF 分解の検討**：PC-9$^{ffLuc\text{-}cp156}$ 細胞及び ADAM28 を shRNA で発現を抑制した細胞をマウスの尾静脈から注入し、2 日後に腹部大動（静）脈から採血する。クエン酸採血法により遠心して血漿を分離し、1%アガロースゲルを用いたマルチマーアッセイで VWF の分解を検討する。

(3) **マウス肺組織における癌細胞アポトーシスの検討**：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アポトーシス(cleaved caspase-3, Tunnel 染色)、浸潤形態を病理学的に解析する。また、マウス癌転移肺組織よりタンパク質を抽出し、イムノブロット法により cleaved caspase-3 の発現を検討する。

(4) **ヒト癌細胞における VWF 誘導アポトーシスの検討：** ヒト肺癌細胞株(PC-9,Calu-3)、ヒト乳癌細胞株(MDA-MB231, MCF-7)、ヒト腎癌細胞株(Caki-2, 769P), ヒト肝癌細胞株(HepG2)を VWF(3ug/ml)で 48 時間刺激し、細胞のアポトーシスを DNA fragmentation アッセイ(Roche 社)で検討する。

４．研究成果：PC-9$^{ffluc\text{-}cp156}$ 細胞の肺転移は、shRNA による ADAM28 の発現抑制と ADAM28 に対する中和抗体処理により有意に抑制された。MDA-MB231$^{ffluc\text{-}cp156}$ 細胞でも shRNA による ADAM28 発現抑制で局所での癌細胞の増殖が有意に抑制された（図 1）。また、ffLuc-cp156 に対する RT-PCR により各臓器での転移率を検討したところ、mock 群(n=10)では肺(50%)、心臓(20%)、肝臓(70%)、腎臓(70%)、脳(20%)で転移陽性なのに対し、shADAM28 群(n=10)では肺(10%)、心臓(10%)、肝臓(30%)、腎臓(20%)、脳(0%)と転移の抑制が認められた。

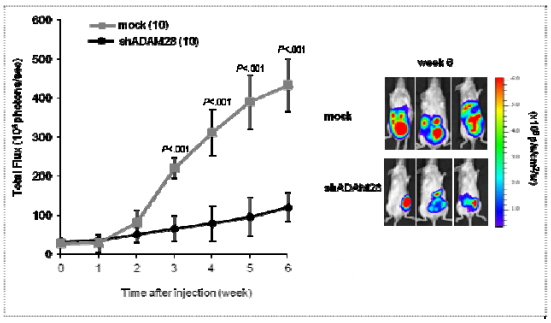

図 1. ADAM28 発現を shRNA で恒常的に抑制すると癌細胞の局所での増殖が有意に抑制される（MDA-MB231$^{ffLuc\text{-}cp156}$ 細胞の乳房皮下脂肪組織移植による自然増殖転移モデル）**(J. Natl. Cancer Inst. 2012, in press.)**。

PC-9$^{ffluc\text{-}cp156}$ 細胞のマウス尾静脈内注入後におけるマウス血漿中 VWF の分解は、mock 群に比べて shADAM28 群で抑制されていた。PC-9^{ffluc} 細胞注入後のマウス肺組織においては PC-9$^{ffluc\text{-}cp156}$ 細胞は、約 90%が肺血管内に存在し、shADAM28 群の癌細胞の多くは cleaved caspase-3 陽性であり、癌組織での DNA 断片化と cleaved caspase-3 のタンパク質発現は、mock 群に比較して亢進していた(図 2)。

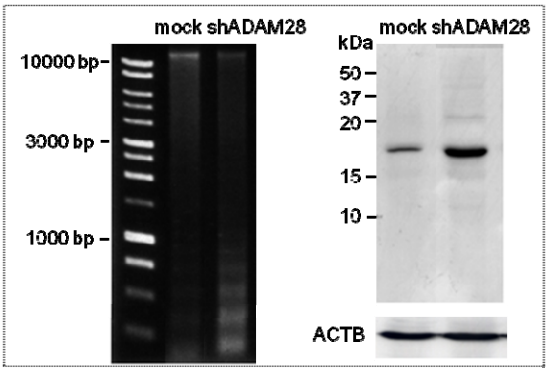

図 2. PC-9^{ffluc} 細胞注入後のマウス肺組織では、shADAM28 群の癌細胞の多くは cleaved caspase-3 陽性であり(右)、癌組織での DNA の断片化が促進している（左）**(J. Natl. Cancer Inst. 2012, in press.)**。

ADAM28 非発現細胞株に VWF を添加すると癌細胞のアポトーシスが誘導され、ADAM28 発現癌細胞株では、VWF の分解により VWF

誘導性アポトーシスを回避した。以上のことから、癌細胞に発現する ADAM28 は VWF を血中で分解し、VWF 誘導性アポトーシスの回避により癌細胞転移促進に働く可能性が示唆された。

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, Kenji Soejima, Masayuki Shimoda, Hitoshi Abe, Aya Sasaki, Hirotaka James Okano, Hideyuki Okano, Yasunori Okada: Effect of ADAM28 on Carcinoma Cell Metastasis by Cleavage of von Willebrand Factor. **J. Natl. Cancer Inst.** (2012) in press.（査読有）

2. 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** (2012) in press.（査読有）

3. Satsuki Mochizuki and Yasunori Okada: ADAM28 In: **Handbook of Proteolytic Enzymes**. Ed. by Rawlings N.D. and Salvesen G. (2012) in press.（査読有）

4. Hiroki Fukuda, Satsuki Mochizuki, Hitoshi Abe, Hirotaka James Okano, Chikako Hara-Miyauchi, Hideyuki Okano, Noriko Yamaguchi, Mitsuo Nakayama, Jeanine D'Armiento and Yasunori Okada : Host-derived MMP-13 exhibits a protective role in lung metastasis of melanoma cells by local endostatin production. **Br. J. Cancer** 105: 1615-1624 (2011).（査読有）

5. Masashi Okubo, Tokuhiro Kimura, Yoshinari Fujita, Satsuki Mochisuki, Yasuo Niki, Enomoto H, Yasunori Suda, Yoshiaki T and Yasunori Okada: Semaphorin 3A is expressed in human osteoarthritic cartilage and antagonizes vascular endothelial growth factor 165-promoted chondrocyte migration. **Arthritis Rheum**. 63: 3000-3009 (2011).（査読有）

6. Satsuki Mochizuki, Rena Tanaka, Masayuki Shimoda, Junko Onuma, Yutaka Fujii, Hiromitsu Jinno and Yasunori Okada: Connective tissue growth factor is a substrate of ADAM28. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 402: 651-657 (2010).（査読有）

7. Hiroaki Kuroda, Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Miyuki Chijiiwa, Kazunori Kamiya, Yotaro Izumi, Masazumi Watanabe, Hirohisa Horinouchi, Masahumi Kawamura, Koichi Kobayashi and Yasunori Okada : ADAM28 is a serological and histochemical marker for non-small-cell lung cancers. **Int. J. Cancer** 127: 1844-1856 (2010).（査読有）

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 望月早月、下田将之、岡田保典：ADAM28 による癌細胞転移機構
弟 9 回日本エラスチン研究会学術集会、東京、2011 年 12 月 2 日

2. Satsuki Mochizuki, Rena Tanaka, and Yasunori Okada:ADAM28 may promote VEGF165-induced angiogenesis in breast carcinomas by the CTGF digestion in the CTGF/VEGF165 complex.
Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinase, Smithfield, 2011 年 8 月 10 日

3. 望月早月、田中伶奈、岡田保典：ADAM28 の CTGF 分解を介した CTGF/VEGF165 複合体からの VEGF165 の遊離と血管新生促進作用
第 20 回がん転移学会学術集会・総会、浜松、2011 年 6 月 30 日

4. 望月早月、田中伶奈、岡田保典：結合組織増殖因子 (Connective tissue growth factor, CTGF)は、ADAM28 の新規基質である
第 43 回日本結合組織学会学術大会、第 58 回マトリックス研究会大会合同学術集会、別府、2011 年 6 月 11 日

5. 望月早月、岡田保典:ADAM28 のヒト癌細胞増殖・転移への関与と肺癌診断への応用
第 42 回日本結合組織学会学術大会、第 57 回マトリックス研究会大会合同学術集会、秋田、2010 年 8 月 19 日

6. 望月早月、下田雅之、岡田保典:癌細胞転移における ADAM28 の役割
第 19 回日本がん転移学会学術集会・総会、

金沢、2010 年 6 月 16 日

7. 望月早月:
ADAM28 による von Wiilebrand factor の分解と癌細胞転移
第 17 回プロテオグリカンフォーラム、東京、2010 年 2 月 27 日

8. 望月早月、下田雅之、岡野洋尚、岡田保典:ADAM28 は VWF 誘導性のアポトーシスを抑制し、癌細胞の浸潤・転移促進に働く
第 68 回日本癌学会学術総会、横浜、2009 年 10 月 2 日

9. Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Kenji Soejima, Hirotaka James Okano, Osahiko Tsuji, and Yasunori Okada: ADAM28 is involved in the invasion and metastasis of cancer cells by escaping from apoptosis through the cleavage of von Willebrand factor.
Gordon Research Conference on Matrix Metalloproteinase, Les Diablerets, 2009年9月2日

10. Satsuki Mochizuki, Masayuki Shimoda, Kenji Soejima, Rena Tanaka, Hirotaka James Okano, Osahiko Tsuji and Yasunori Okada :The role of ADAM28 in cancer cell proliferation and progression .
8th Pan-Pacific Connective Tissue Society Symposium, Yokosuka, 2009 年 6 月 5 日

〔図書〕（計 1 件）
1. 望月早月、岡田保典
第 1 章 MMP/TIMP　pp66-68,　第 6 章　線維化 pp458-460「日本血管生物医学事典」朝倉書店 2011 年発行

〔産業財産権〕
○出願状況（計 0 件）
○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等: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・講師
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

(3)連携研究者
なし