

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07195

研究課題名(和文) 出血ヘビ毒素を用いたがん浸潤・血管開口機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism on cancer invasion and vascular wall opening by using hemorrhagic snake venom.

研究代表者

荒木 聡彦 (Araki, Satohiko)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：80242808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：「がん細胞や白血球の血管貫通」における血管壁の開口現象の分子機構は、よく分かっていない。血管貫通においては、出血性ヘビ毒ADAMが血管開口を引き起こすことから、ADAMによる血管細胞間解離を解析した。既にLRP6の切断が血管壁開口現象に必要であることを示唆していたが、今回はADAMの結合標的を探索した。その結果ADMBP1細胞膜タンパク質(仮称)がヘビ毒ADAMに結合することを示すと同時に、ADMBP1阻害抗体により細胞間解離等が阻害されることを示し、ヘビ毒ADAMの結合受容体であることを示唆した。また他にADAMに結合する候補タンパク質として、ADAMP2,3,4,5を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヘビ毒による出血やがん・白血球による血管浸潤において、ヘビ毒出血性ADAMやヒトADAMは、血管内皮細胞のLRP6の切断を介して血管細胞間解離を誘導することが示唆されているが、今回その細胞間解離や他のADAM作用に関与する結合分子が見つかった。このことは、この分子によりADAMを細胞に固定することによって切断等の細胞作用を支えていることを示唆している。このことは、血管へのがん・白血球浸潤やヘビ毒出血における血管壁解離を抑制するための新たな医薬標的に、今回見いだされた分子がなることを示唆している。そのような血管浸潤の阻害薬は、がん転移やアレルギーの抑制に利用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of vascular wall opening in diapedeses of cancer cells and leukocytes is unknown. ADAM protease on cancer cell pseudopod and in hemorrhagic snake venom is known to involve with vascular wall opening. We have already suggested cleavable receptor LRP6 and LRP5 are involving with intercellular detachment on vascular endothelial cells. Here, we explored binding receptors of hemorrhagic snake ADAM in vascular endothelial cells. Snake ADAM toxin strongly binds to ADMBP1, which antibody inhibit intercellular detachment on endothelial cells by the toxin. Additionally, we showed the toxin also binds to ADAMP2,3,4 and 5.

研究分野：細胞生物学

キーワード：血管浸潤 遊走 ADAM ヘビ毒 Wnt信号伝達 がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

「がん細胞や白血球の血管貫通」における血管壁の開口現象の分子機構は、よく分かっていない。血管貫通においては、ADAM プロテアーゼが浸潤細胞仮足に出現することや、それを人工的に欠失させることで浸潤能が抑制されることから、ADAM が関与することが考えられていた。申請者らは血管壁を開口させる出血性ヘビ毒 ADAM を用いて受容体を探索し、Wnt 受容体でもある、LRP6 や LRP5 が血管壁開口現象の受容体の一つであることを示唆していた。これらの受容体は、ヘビ毒 ADAM と同様に、ヒトのがん細胞や白血球細胞が持つ ADAM8 および ADAM12 によっても同じ個所を切断できることから、ヒトがん細胞や白血球細胞も、この受容体を使って血管壁開口を起こし、血管を通過する可能性がある。

### 2. 研究の目的

ヒトがん細胞や白血球細胞も、LRP6 等の受容体を使って血管壁開口を起こし、血管を通過する可能性がある。そこで、免疫機構やがん浸潤における血管通過を解明し制御するため、ADAM による血管壁開口の分子機構を明らかにすることを目指した。

ここで、出血性 ADAM は LRP6 や LRP5 を良く切断するが、結合性はそれほど強くない。したがって ADAM が強く結合する結合受容体が存在するはずだと考え、結合受容体を探索した。またそれらが実際に ADAM による細胞間解離に関与するかどうかを調べた。

### 3. 研究の方法

(1) タンパク質結合は表面プラズモン共鳴解析装置 ProteOn™ XPR36 分子間相互作用アレイシステム (BIO-RAD) を使用し解析を行った。リガンドとして 1 回目の実験では各種細胞膜タンパク質細胞外部分リコンビナントを使用した。リガンドは EDC-NHS により架橋しセンサーチップに固定化した。アナライト溶液として EDTA でキレートしたヘビ毒出血 ADAM プロテアーゼ (以降 ApoVAP1 と表記する) を使用した。アナライトを 25  $\mu$ l/min で 60 秒注入し、SPR シグナルを経時的に観察することで、センサーチップ上に固定化したリガンドとの結合のセンサーグラムを取得した。アナライトの注入を終了した後、アナライトを含まない緩衝液を流して、解離のセンサーグラムも取得した。

(2) ADAM の細胞作用に及ぼす抗結合因子抗体の影響を見るために、ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC を用いた。HUVEC の培養には培養液として MCDB 105 medium (SIGMA-ALDRICH) に fetal bovine serum (FBS)(BIOLOGICAL INDUSTRIES) 10% および、Lobb and Fett の精製法 (Lobb and Fett, 1984) に従い精製した FGF 70 ng/ml を添加したものを用いた。HUVEC (Becton Dickinson) は 1%ゼラチンでコートした 4 cm シャーレ培養皿上で、37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>、95% Air の条件下で培養した。HUVEC の培養液を除き、PBS で 1 回洗浄した後、トリプシンを含む PBS を用いて培養皿への細胞の接着をはがし、MCDB 105 medium を再び加えることで細胞を回収した。0.1%ゼラチンでコーティング済みの 48 穴シャーレの各ウェルに 250  $\mu$ l ずつ回収した細胞を加え、一晚培養した。

抗結合因子抗体が ADAM による仮足形成作用に影響するかどうかを観察した実験では、FBS を含まない MCDB 105 medium に培養液を変更し、抗結合因子抗体または Rabbit IgG を 5  $\mu$ g/ml となるように 1 時間プレインキュベートし、その後 VAP1 を 1  $\mu$ g/ml となるように加えて作用させた。VAP1 を作用させてから写真の撮影を開始し、時間ごとの細胞数に対する仮足形成細胞の割合を出した。

抗結合因子抗体が VAP1 による細胞間接着の解離作用、細胞のウェル底面からの剥離誘引作用に影響するか観察した実験でも、同様の手順で観察を行った。細胞間接着の解離作用への影響は、細胞数に対する他の細胞と接着していない単独の細胞の割合を時間ごとに求めることで観察した。剥離の誘引作用に対する影響は、VAP1 作用前の細胞数に対して、時間ごとの底面接着細胞数の割合を求めることで観察した。

仮足については長さ 50  $\mu\text{m}$  以上の仮足を持つものを仮足形成細胞としてカウントした。細胞間接着細胞については長さ 10  $\mu\text{m}$  以上の長さに渡って他の細胞と接触していない細胞を単独の細胞としてカウントした。底面接着細胞については、ウェル底面のゼラチンとの接着が剥がれて浮いている細胞を剥離細胞としてみなし、剥離細胞以外の細胞をウェル底面接着細胞としてカウントした。

浸潤実験には、8  $\mu\text{m}$  の小孔を多数持つ transwell (Falcon)を用いた。まず培養した HUVEC を  $1 \times 10^4$  個 transwell 上に播種し、コンフルエントになるまで培養した。次に培養した THP-1 から 1 ml を 1.5 ml チューブに取り、0.2  $\mu\text{l}$  の 1 mg/ml Hoechst 33342 (同仁化学研究所)で 10 分間染色した。これを 700 $\times$ g で 3 分間遠心し、上清を除いた。次に 10%血清入り MCDB105 を 500  $\mu\text{l}$  加え、700 $\times$ g で 3 分間遠心し、上清を除いた。この洗浄を 3 回繰り返した。  $1.5 \times 10^4$  個の THP-1 を 100  $\mu\text{l}$  の血清無添加 MCDB に懸濁し、transwell の上部に播種した。下部は 700  $\mu\text{l}$  の 10%血清入り MCDB 700  $\mu\text{l}$  で満たした。12 時間後、HUVEC の層及び transwell を貫通して下部に落ちた細胞の数を、倒立型蛍光顕微鏡で撮影して計測した。

培養上澄みを用いた実験では、HUVEC を培養した培養上澄みを回収し、0.22  $\mu\text{m}$  のフィルター(millipore)に通した溶液、もしくはコントロールとしては 10%血清入り MCDB105 を各 700  $\mu\text{l}$  用い、下部を満たして浸潤実験を行った。

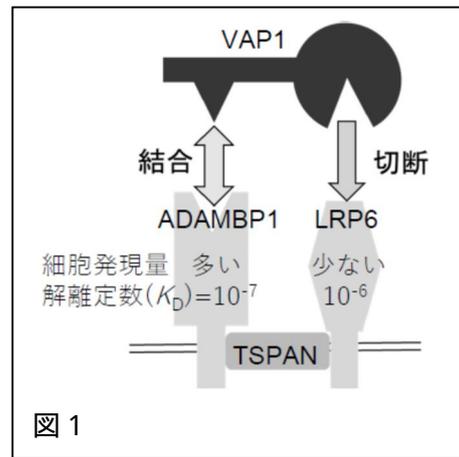
(3)タンパク質切断解析では、反応させた溶液を SDS-PAGE によって分離し、SilverQuestTM Silver Staining Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて銀染色を行った。対象のバンド部分を切り出し、脱染色を行った。続いてゲル片を 100%メタノールに浸し、ゲル片が白くなるまで振盪した。上清を捨て、減圧乾燥機でゲル片を乾燥させた。DTT と iodoacetamide で処理した後、25 ng/ $\mu\text{l}$  のトリプシン、100 mM 炭酸水素アンモニウム中で 37  $^{\circ}\text{C}$ 、overnight インキュベートした。この分解産物を Ultimate3000 liquid chromatogram (Thermo Fisher Scientific)、LTQ-XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)を用いて解析した。LC/MS/MS 解析は、トリプシン消化による切断を想定せずに全ての部位で切断されることを想定、同定基準を expect<0.001、FDR<1%とした。

#### 4 . 研究成果

(1)ADAMBP1( 仮称 )そして ADAMBP1 と同じサブファミリーに属する ADAMBP2( 仮称 )をリガンドとしてチップに固定し、アナライトとして ApoVAP1 をバッファーと共に 80 秒間流し続けたところ、強いレスポンスが得られた。この結果は ApoVAP1 と ADAMBP1, 2 が結合することを示唆している。

ADAMBP1、ADAMP2 と VAP1 の結合解析で得られた結果に対して、理論曲線のフィッティングを行った。実測値にフィッティングする理論曲線から、結合・解離速度定数を算出し、解離定数を求めた。実測値と理論値のずれについては、ADAMBP1 は平均偏差  $\chi^2 = 563.7$ 、ADAMBP2 は  $\chi^2 = 24.6$  であり実測値と比べて十分小さく、よくフィッティングしていることを示した。

ADAMBP1 と VAP1 の結合は、結合速度定数  $k_a=2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数  $k_d=7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ 、解離定数  $K_D=3 \times 10^{-7} \text{ M}$  であった (図 1)。この値は多くの受容体-リガンドの結合の解離定数の値 (例: 抗原受容体 TCR と主要組織適合遺伝子複合体 MHC では、結合速度  $k_a=2 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度  $k_d=1 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ 、解離定数  $K_D=5 \times 10^{-7} \text{ M}$ ) と同程度であり、結合物質と考えるとよいことを示唆している。また、ADAMBP2 と VAP1 間の結合は、結合速度定数  $k_a=4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、解離速度定数  $k_d=1 \times 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、解離定数  $K_D=2 \times 10^{-6} \text{ M}$  であった。そのため、ADAMBP2 よりも ADAMBP1 の方が VAP1 との親和性が高いことが示唆された。



次に、ADAMBP1、2 と VAP1 の結合は、VAP1 を EDTA 処理し VAP1 の構造が変化したために結合した可能性もあるため、VAP1 の触媒部位に結合することでメタロプロテアーゼ活性を阻害する GM6001 を用いて GM6001 処理をした VAP1 をアナライトとして再び解析実験を行った。また、今回は対照として結合が特異的であるかどうかを調べるために、似たドメインや特徴を持つ他のタンパク質を用いて解析を行った。今回実験を行った 6 種のタンパク質全ての場合で VAP1 を流している間、レスポンスの値が上昇している。ADAMBP1 の場合は他の 5 種のタンパク質と比べて高いレスポンスが得られ、また、VAP1 を流し終えた後も時間をかけてレスポンスが減少した。一方で ADAMBP1 以外の 5 種のタンパク質は VAP1 を流している間ほぼ同じレスポンスまで上昇し、また、VAP1 を流し終えた直後にレスポンスの値が 0 になった。リガンドがない場合に行った解析でも同様の現象がみられるため、これは 5 種のタンパク質は VAP1 と結合していないことを示唆している。そのため、対照のタンパク質 5 種では VAP1 と結合しないことが示唆され、ADAMBP1、2 と VAP1 の結合は特異的であることが示唆された。ApoVAP1 の実験では EDTA による変性が起きている可能性があったが、メタロプロテアーゼ阻害剤の実験では EDTA を用いていない状態でも、VAP1 は ADAMBP1 と結合することが示唆された。

また、阻害剤の実験では VAP1 活性部位を GM6001 により塞がれた状態で用いたが、ADAMBP1 と GM6001 処理 VAP1 は結合を示唆したため、ADAMBP1 と VAP1 は活性部位以外で結合することが示唆された (図 1)。

他に ADAMBP1,2 ほど強い結合ではないものの、結合が見られた ADAMBP3, 4, 5 (仮称) も見いだされた。興味深いことに、これらは共通のドメイン構造や共通配列等を持たないため、結合には何か ADAM 特有の未知の要素が存在するのかもしれない。

(2)ADAMBP1 と VAP1 の結合が VAP1 の細胞作用に関わるのであれば、ADAMBP1-VAP1 間結合を阻害する抗 ADAMBP1 抗体の存在下と非存在下で VAP1 細胞作用に差が出る可能性がある。そこで、抗 ADAMBP1 抗体をプレインキュベートすることで、抗 ADAMBP1 抗体を加えていない細胞との間で VAP1 特異的な細胞作用に変化が生じるかどうかを調べた。

まず、抗 ADAMBP1 抗体が ADAMBP1-VAP1 間結合を抑制するかどうかを調べる実験を行った。VAP1 ビーズを作成し、抗 ADAMBP1 抗体存在下と非存在下で ADAMBP1 を加え、VAP1 ビーズへの結合能を指標として調べたところ、抗 ADAMBP1 抗体を含むビーズ画分の ADAMBP1 バンドは、無抗体、あるいは抗 Rabbit IgG 抗体を含むビーズ画分の ADAMBP1 バンドより薄くなった。この結果は、抗 ADAMBP1 抗体が ADAMBP1-VAP1 間結合を阻害していることを示唆している。以降、この抗 ADAMBP1 抗体を ADAMBP1-VAP 間結合阻害抗体と

して用いた。

抗 ADAMBP1 抗体、Rabbit IgG をプレインキュベートした培養細胞に、VAP1 を作用させ、時間ごとの細胞数に対する仮足形成細胞数の割合、時間ごとの細胞数に対する非接着細胞数の割合をそれぞれ調べた。また、ADAMBP1 が VAP1 による細胞死の誘導作用に関与するならば、抗 ADAMBP1 抗体の有無により死細胞がウェルの底面から剥離する現象に差がみられる可能性がある。そのため、VAP1 作用前の生細胞数に対する時間ごとのウェル底面への接着細胞数の割合を調べた。その結果、抗 ADAMBP1 抗体をプレインキュベートした細胞群では、一時的に VAP1 による仮足形成、細胞間接着の解離、ウェル底面からの細胞剥離を抑制することが示唆された。

仮足の形成細胞数は、3 時間後の時点で危険率 5%のもとで有意差に減少した。細胞間接着の解離も、45 分後の時点で危険率 1%のもとで有意に減少した。細胞剥離の誘導についても、底面接着細胞数が、45 分後の時点で危険率 1%のもとで有意に上昇し、細胞剥離を減少させた。

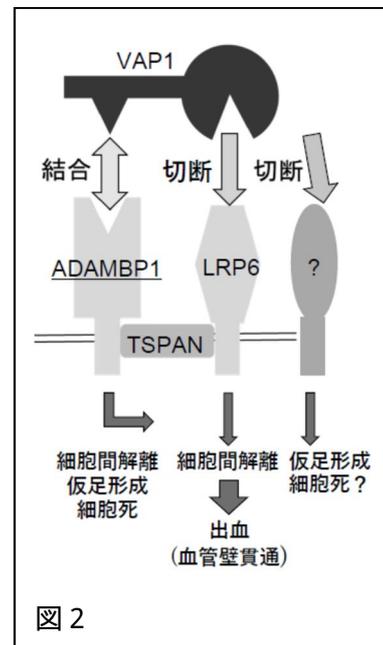
これは、抗 ADAMBP1 抗体が VAP1 の仮足の形成作用や、細胞間接着の解離作用といった VAP1 特異的な細胞作用を抑制することを示唆している。また、抗 ADAMBP1 抗体は細胞剥離を抑制することを示唆した。細胞の剥離現象は VAP1 特異的な細胞作用である断片化による細胞死が起こる前段階でみられる現象なため、抗 ADAMBP1 抗体は VAP1 特異的な断片化による細胞死作用も抑制することを示唆している。

この抗体は ADAMBP1-VAP1 間の結合を阻害する抗体なので、抗 ADAMBP1 抗体は ADAMBP1-VAP1 間の結合を阻害することで VAP1 特異的な細胞作用を抑制している可能性がある。また、ADAMBP1 は VAP1 との結合を阻害されることで、VAP1 特異的な細胞作用に影響が生じるため、ADAMBP1 は VAP1 特異的な細胞作用に関与する結合標的であることが示唆された (図 2)。

(3)VAP1 による複数の細胞作用には切断活性が必要である。LRP6, LRP5 の切断がみられており、ADAMBP1、2 も VAP1 の切断標的である可能性がある。そこで、VAP1 による ADAMBP1、2 の切断実験を行った。ADAMBP1、2 と VAP1 を反応させたところ、100  $\mu\text{g/ml}$  までの濃度において ADAMBP1、2 のバンドの濃さに変化はみられなかった。VAP1 は濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  で 1 時間作用させると細胞は VAP1 特異的な作用を起こすため、ADAMBP1、2 は少なくとも細胞作用を起こす 100 倍の濃度でも切断耐性がある。そのため、ADAMBP1、2 は VAP1 の結合標的ではあるものの、切断標的ではないことが示唆された。

そこで、VAP1 による他の切断標的を探索したところ、ADAMTG3(仮称)を見出した。この切断標的がどのような細胞作用に関わるかや、他の切断標的が存在するかどうかなど、今後調べて行く必要がある。

(4)まとめ：ヘビ毒出血性 ADAM やヒト ADAM は、血管内皮細胞の LRP6 の切断を介して血管細胞間解離を誘導することが示唆されているが、今回その細胞間解離や他の ADAM 作用に関与する結合分子が見つかった。このことは、この分子により ADAM を細胞に固定することによって切断等の細胞作用を支えていることを示唆している (図 2)。このことは、がんや白血球浸潤における血管壁解離を抑制するための新たな医薬標的に、この分子になる可能性を示唆している。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 荒木聡彦	4. 巻 82
2. 論文標題 抗出血性ヘビ毒抗体 ~Wntシグナル活性化を阻害してヘビ毒による出血を抑える	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 バイオテック東海	6. 最初と最後の頁 79-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nakazawa S, Shirae-Kurabayashi M, Sawada H	4. 巻 9
2. 論文標題 The role of metalloproteases in fertilisation in the ascidian <i>Ciona robusta</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Report	6. 最初と最後の頁 1009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-37721-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Modahl CM, Brahma RK, Koh CY, Shioi N, Kini RM.	4. 巻 8
2. 論文標題 Omics Technologies for Profiling Toxin Diversity and Evolution in Snake Venom: Impacts on the Discovery of Therapeutic and Diagnostic Agents.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annu Rev Anim Biosci.	6. 最初と最後の頁 91-116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1146/annurev-animal-021419-083626	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 財津佳史, 堤陸, 四ヶ所亮輔, 小倉彩香, 倉岡功, 塩井(青木)成留実	4. 巻 50
2. 論文標題 クサリヘビ科毒中の主成分プロテアーゼ毒素について	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 福岡大学理学集報	6. 最初と最後の頁 115-126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部美咲、荒木聡彦
2. 発表標題 ヘビ毒ADAM であるVAP1 による細胞間接着解離機構の解明
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 瀬野日向子、荒木聡彦
2. 発表標題 出血性ヘビ毒ADAM であるVAP1 による細胞間接着解離機構に関与する新規因子の探索
3. 学会等名 第66回トキシシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 酒井健有、澤田均、荒木聡彦
2. 発表標題 ADAM-LRP信号伝達経路に関わる新たな因子
3. 学会等名 2018年度日本動物学会中部支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 新井悠太、澤田均、荒木聡彦
2. 発表標題 ヘビ毒ADAMであるVAP1の新たな標的の探索
3. 学会等名 第65回トキシシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部郁也、橋本志津弥、磯和幸延、白江-倉林 麻貴、荒木聡彦、澤田均
2. 発表標題 ホヤ精子アスタシン様金属プロテアーゼの性質と受精における役割
3. 学会等名 第90回日本動物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	塩井 成留実 (青木成留実)  (Shioi Narumi)  (50510187)	福岡大学・理学部・助教    (37111)	
研究分担者	澤田 均  (Sawada Hitoshi)  (60158946)	名古屋大学・理学研究科・教授    (13901)	
研究分担者	松井 太衛  (Matsui Taei)  (90183946)	藤田医科大学・保健学研究科・教授    (33916)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------