

## 別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

## 主 論 文 の 要 旨

論文題目 ADAMによる細胞間解離の分子機構に関する研究

氏 名 瀬尾 忠彦

## 論 文 内 容 の 要 旨

ADAM (A Disintegrin and Metalloprotease) ファミリータンパク質は、がんの浸潤転移や喘息など様々な疾患に関係している事が知られているが、ヒト内在性 ADAM の生理的基質や作用機序に関する知見は乏しい。例えば、ヒト ADAM8, 9, 12, 15, 19, 28, 33 は、がんや白血球の浸潤に関わることが示唆されているが、その標的分子や浸潤機構は明らかにされていない。また多くのヒト内在性 ADAM は不活性型前駆体として存在しており、活性型分子の単離やそれを用いた解析は容易ではない。

そこで本研究では、ADAM ファミリータンパク質の中で生理活性を有する活性型のヘビ毒 ADAM (VAPs: Vascular Apoptosis-inducing Proteins) に着目した。このヘビ毒 ADAM は出血性のヘビ毒中に存在しており、出血や血管内皮細胞の細胞間解離を引き起こす。また、ヘビ毒 ADAM は白血球やがんの浸潤に関与するヒト内在性 ADAM と相同性が高く、特に ADAM8 や ADAM28 との相同性が高い。細胞が浸潤するためには細胞間接着を破壊する必要があるが、浸潤に関わるヒト内在性 ADAM とヘビ毒 ADAM はいずれも細胞間接着を破壊し細胞を解離させるという点においても、共通の性質を示す。これらの知見は、ヘビ毒 ADAM の標的分子と細胞間解離の機構解明が、ヒト内在性 ADAM によるがん細胞浸潤の作用機構の解明に繋がる可能性を示唆している。

本研究では、ヘビ毒 ADAM による出血機構と細胞間解離機構の解明を目指して、ヘビ毒 ADAM による細胞応答や出血を引き起こす標的分子の探索を行った。またヒト内在性 ADAM においても同一分子を標的とするか否かについて検討した。まず、ヘビ毒 ADAM により血管内皮細胞に引き起こされる細胞間接着分子の変化について解析した。細胞間接着分子として細胞膜貫通タンパク質 VE-cadherin に着目し、これがヘビ毒 ADAM により分解されるか否かを検討した。その結果、VE-cadherin はヘビ毒 ADAM で分解されないが、細胞接着領域から細胞質に局在性を変化させること、また $\gamma$ -catenin も細胞接着領域から細胞質に局在性を変化させることが観察された。このことは、ヘビ毒 ADAM が VE-cadherin を直接切断するのではなく、なんらかの信号伝達経路を介して VE-cadherin

と $\gamma$ -catenin の局在性を変化させることを示唆している。

$\beta/\gamma$ -catenin の細胞質への局在変化を引き起こす信号伝達経路として Wnt シグナルが知られている。Wnt シグナルの古典的経路では、通常 Wnt がその共受容体である LRP5 または LRP6 に結合する事により、 $\beta/\gamma$ -catenin の細胞質への局在変化を引き起こす。一方で、LRP5/6 はその細胞外ドメインの一部を欠失させた分子を発現させると、Wnt 非存在下でも Wnt シグナルが活性化され、 $\beta$ -catenin の細胞質への移行を引き起こすことが報告されている。そこで、LRP5/6 がヘビ毒 ADAM により特異的切断を受け、それにより Wnt シグナルの活性化が起こるのではないかと考え検討を行った。その結果、LRP5/6 は Wnt シグナルを活性化しうる部位で、ヘビ毒 ADAM により切断を受けることが、LC/MS を用いた解析により判明した。

そこで次に、この切断が細胞間接着や出血に関与するか否かを調べる目的で、LRP6 の切断を阻害する抗体 (LRP6 切断部位ペプチドに対する抗体) を用いて解析したところ、ヘビ毒 ADAM による細胞間解離と出血がこの抗体で抑制されることが判明した。このことは、ヘビ毒 ADAM による LRP6 の特異的切断が細胞間解離と出血を引き起こすことを示唆している。

もし、ヘビ毒 ADAM が LRP5/6 の活性化部位で切断することにより出血を引き起こすのであれば、切断部位に変異または欠失を有する LRP5/6 を持つ動物では、ヘビ毒 ADAM による出血が抑制されることが予想される。そこで、実際にヘビ毒により出血する動物と出血耐性を示す動物を取り上げ、LRP5/6 の切断部位配列と出血耐性との相関性について調べた。その結果、多くの出血耐性動物の LRP5 か LRP6 のいずれかに、ヘビ毒 ADAM による切断部位や、活性化に重要な LDLa ドメインに、変異が生じていることが判明した。多くの出血耐性動物において、LRP5/6 の切断部位に変異が見られるという事実は、出血において LRP5/6 の特異的切断が重要であるという考えを支持している。

次に、ヘビ毒 ADAM と同様に細胞間解離に関わる、浸潤関連ヒト内在性 ADAM である ADAM8 と ADAM12 を取り上げ、それらが LRP6 を切断するか否かを検討した。その結果、これらのヒト ADAM も、ヘビ毒 ADAM が切断する LRP6 切断部位と同一部位を切断することが、LC/MS を用いた消化断片解析で明らかとなった。

本研究により、ヘビ毒 ADAM とヒト内在性 ADAM である ADAM8,12 が LRP5/6 を活性化部位で切断することが示された。そして、その部位での切断は血管内皮細胞の細胞間解離と出血に関与することが示唆された。また本研究により、LRP5/6 の切断活性化を担う酵素を初めて同定することができた。ヒト内在性 ADAM が細胞間解離や細胞浸潤に関与する機構に関しても新しいモデルを提供することができた。これらの発見は、ヘビ毒 ADAM による出血のみならず、白血球やがん細胞の浸潤機構に関しても新しいパラダイムを提供するものであり、ADAM が関わる疾患の診断治療を考える上での一つの突破口となることが期待される。

