

平成 22 年 4 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790528  
 研究課題名 (和文) 肺高血圧の病態における Angiopoietin-1/Tie2 シグナルの役割解明  
 研究課題名 (英文) The role of Angiopoietin-1/Tie2 signaling pathway in pulmonary arterial hypertension.  
 研究代表者  
 黒田 忠 (TADASHI KURODA)  
 大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教  
 研究者番号：60403078

## 研究成果の概要 (和文)：

肺動脈性肺高血圧症 (PAH) では、angiopoietin-1 (Ang1) とその受容体 Tie2 によるシグナルがその病態に重要であるとこれまで報告されている。我々は Ang1/Tie2 シグナルにおける Gab ファミリードッキング蛋白質の役割を内皮細胞で検討した。Ang1 刺激後の MAP キナーゼ ERK1/2 と AKT の両者の活性化は Gab1 と Gab2 が相補的に担うことが明らかとなった。また、生体の PAH 発症過程で肺動脈内皮細胞の Gab1/Gab2 の機能を解析する目的でタモキシフェン誘導性に内皮細胞で Gab と Gab2 の二重欠損が誘導されるマウスの系を作成した。

## 研究成果の概要 (英文)：

It has been reported that angiopoietin-1 (Ang1)/Tie2 signaling pathway has an essential role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH). Here, we investigated the role of Gab family proteins in the Ang1/Tie2 signaling pathway. We found that both Gab1 and Gab2 have redundant roles for activation of ERK1/2 and AKT downstream of Ang1/Tie2 pathway in the endothelial cells. In addition, we have created the inducible endothelium-specific Gab1/Gab2 double knockout mice through crossing *Gab1<sup>flox/flox</sup> Gab2<sup>-/-</sup>* mice with *VE-CadCreERT2* mice.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：angiopoietin-1 (Ang1), Tie2, Gab ファミリー蛋白質、肺高血圧症、MAP キナーゼ、AKT, シグナル伝達、相補性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺動脈性肺高血圧症 (PAH) は重症化す

ると在宅酸素療法や prostacyclin 製剤の持続静注療法が必要となり、患者の QOL は

著しく低下する。PAH の治療法は近年著しい進歩が見られるが、これらの新たな治療法の適応やその予後改善効果についてはさらなる検討が必要であり、未だその予後は極めて不良な疾患である。また、現存の多くの PAH の治療法は対処療法域を脱しておらず、肺移植が唯一根本的治療法であり、その原因と病態に基づいた治療法の開発が望まれている。

(2) PAH の発症に至る病態として、遺伝子異常や膠原病との合併を初めとする様々な要因が報告されている。しかしながら、大多数の PAH は未だ原因不明であり、最も研究が進んでいる Bone Morphogenetic Protein (BMP)-type II 受容体 (BMPRII) の遺伝子異常でさえ、familial PAH の約 40%、idiopathic PAH の 15% 以下に報告されているにすぎない。また、これらの遺伝子異常の疾患浸透率は一般に非常に低いことが知られており、BMPRII の遺伝子異常は PAH の発症に十分条件ではなく、いわゆる '2-hit' さらには 'multiple-hit' が必要であるという概念が広まっている (*Circulation*, 111:534, 2005)。

(3) 'multiple-hit' の中で最近注目されているのが、肺微小血管内皮細胞での Angiopoietin-1 (Ang1) とその受容体 Tie2 によるシグナルである。一つは、Ang1 の発現増強が血管周囲の平滑筋細胞の増殖/分化を促進し、肺高血圧症の原因であるという説である (*Proc Natl Acad Sci USA*, 100:12331, 2003, *New Engl J Med*, 348:500, 2003)。

(4) 一方で、Ang1 には肺動脈血管内皮細胞に対して保護作用があり (*Circ Res*, 98:1014, 2006)、低酸素や monocrotaline (MCT) により誘導された PAH を Ang1 が改善したとの報告もあり、さらには PAH 患者における Ang1 の発現は正常人と比べて決して高くないとも報告されていた (*Chest*, 126:633S, 2005)。このように Ang1/Tie2 シグナルの PAH 発症における役割に関しては増悪因子・保護因子として正反対の機能の報告がなされ、結論をみていない状況であった。

## 2. 研究の目的

ドッキング蛋白質である Gab ファミリー蛋白質は近年、レセプター型チロシンキナ

ーゼのシグナル伝達において重要な役割を担うことがこれまで報告されている。一方で、Gab ファミリー蛋白質が Ang1/Tie2 シグナルでどのような役割を担うか、そして PAH の病態でどのような役割を担うかはこれまで明らかではない。

そこで本研究では、

- (1) ヒト内皮細胞で Ang1/Tie2 シグナルにおいて Gab ファミリー蛋白質が果たす役割
  - (2) タモキシフェン誘導性に Gab ファミリー蛋白質を内皮細胞で欠損するマウスを作成し、in vivo の内皮細胞での Gab ファミリー蛋白質の果たす役割
- の 2 点の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) Ang1/Tie2 シグナルにおける Gab ファミリー蛋白質の in vitro 実験系での解析：

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) とヒト大動脈内皮細胞 (HAEC) の mRNA を用いて RT-PCR により Gab1, Gab2, Gab3 の発現検討を行った。

また、HUVEC を用いて、Ang1 刺激後の Gab1 及び Gab2 のチロシンリン酸化について検討した。Gab2 の野生型、及び変異型アデノウイルスベクターを作成して、Gab2 過剰発現をアデノウイルスベクターの感染により行って、ERK1/2 と AKT の活性化に対する影響を検討した。さらに Gab1 と Gab2 の siRNA を用いて HUVEC でのノックダウン実験を行い、Ang1 依存性の ERK1/2 と AKT の活性化に対する役割を検討した。

(2) Gab ファミリー蛋白質の in vivo 実験系での解析：

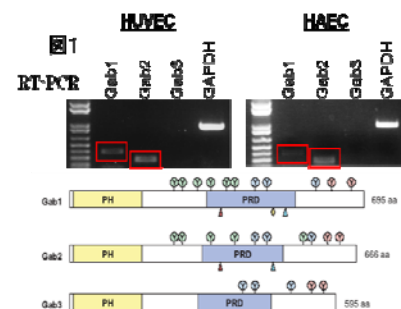
Gab1<sup>fllox</sup>マウスと Gab2 ノックアウトマウス (Gab2<sup>-/-</sup>) を交配し、さらに内皮細胞特異的に働く VE-Cadherin プロモーターの下流に薬剤 (タモキシフェン) 誘導性に Cre の活性化が起こる CreERT2 遺伝子を発現するマウスを交配して、タモキシフェン誘導性内皮細胞特異的 Gab ファミリー欠損マウスを作成した。

## 4. 研究成果

(1) Ang1/Tie2 シグナルにおける Gab ファミリー蛋白質の in vitro 実験系での解析：

### ①内皮細胞における Gab ファミリー蛋白質の発現の解析

HUVEC 及び HAEC より mRNA を回収して、RT-PCR による Gab ファミリー蛋白質の発現を検討した。その結果、HUVEC, HAEC ともに Gab1 及



び Gab2 の発現が見られたが、Gab3 の発現は見られなかった (図 1)。

## ②内皮細胞における Gab1 と Gab2 のチロシンリン酸化の検討

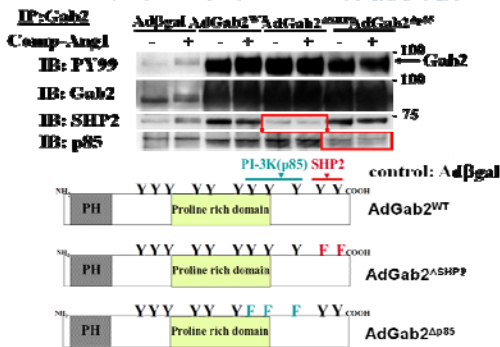
HUVEC で

Ang1 の活性増強体である Comp-Ang1 刺激をして、Gab1 及び Gab2 のチロシンリン酸化及び、主要な会合相手分子の SHP2 及び p85 との会合を検討した。

Comp-Ang1 刺激により、Gab1 と Gab2 とともに 15 分をピークとしてチロシンリン酸化が観察され (図 2 赤枠)、同時に SHP2 及び p85 との会合も観察された (図 2)。

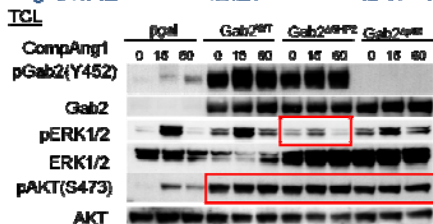
## ③内皮細胞での Gab2 野生型、変異型アデノウイルスベクターを用いた解析

### 図3 Gab2アデノウイルスの確認実験



Gab2 の Ang1/Tie2 シグナルにおける役割を明らかにする目的で Gab2 野生型、SHP2 結合不能変異体、p85 結合不能変異体を発現するアデノウイルスベクターを作成した。HUVEC に感染させて血清除去したうえで Comp-Ang1 刺激したところ、SHP2 結合不能変異体、p85 結合不能変異体ではそれぞれ SHP2 および p85 との会合不能であることが観察・確認された。一方で、野生型 Gab2 過剰発現下では SHP2 および p85 と恒常的に会合していることが明らかとなった。

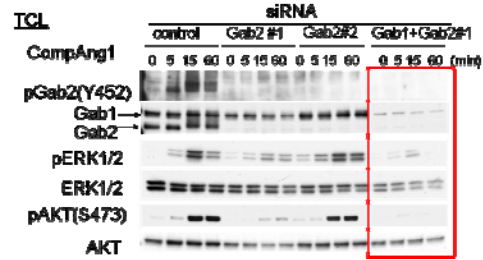
### 図4 Ang1依存性のERK1/2活性化にGab2は必須である



SHP2 結合不能変異体 Gab2 の過剰発現下では Comp-Ang1 依存性の ERK1/2 の活性化が遮断されていた。一方、AKT 活性化については野生型といずれの変異体の過剰発現下でも増強されていた (図 4)。

## ④内皮細胞での Gab1 及び Gab2 特異的 siRNA を用いたノックダウンによる ERK, AKT 活性化への影響の検討

### 図5 : Comp-Ang1依存性のERK1/2及びAKT活性化にはGab1とGab2が相補的に働く



③の Gab2 アデノウイルスベクターでの結果に基づき、Gab2 特異的 siRNA によるノックダウン実験と Gab1 特異的 siRNA によるノックダウンを組み合わせを行った。

その結果、HUVEC においては Gab2 siRNA のトランスフェクションによる Gab2 ノックダウンで 50-60%前後の ERK1/2 及び AKT の活性化低下が見られ、Gab1, Gab2 の両者のノックダウンにより ERK1/2 及び AKT の活性化は 90%前後低下することが明らかとなった。

(2) Gab ファミリー蛋白質の in vivo 実験系での解析 :

上記より、Ang1/Tie2 シグナルにおいて Gab1 と Gab2 は相補的に機能することが示唆されたため、Gab1 と Gab2 を内皮細胞で薬剤誘導性に二重欠損するマウスの作成を試みた。Gab1<sup>flox</sup> マウスと Gab2 ノックアウトマウス (Gab2<sup>-/-</sup>) を交配し、VE-Cadherin-CreERT2 マウスを交配して、タモキシフェン誘導性内皮細胞特異的 Gab ファミリー欠損マウスの作成が完了した (図 6)。

### 図6 Gab1/Gab2内皮特異的欠損マウスの作成

1. Gab1<sup>flox/flox</sup> Gab2<sup>+/+</sup>
2. Gab1<sup>flox/flox</sup> Gab2<sup>+/+</sup> VE-Cad-CreERT2
3. Gab1<sup>flox/flox</sup> Gab2<sup>-/-</sup>
4. Gab1<sup>flox/flox</sup> Gab2<sup>-/-</sup> VE-Cad-CreERT2

## 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 2 件)

- ① SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene. Nakaoka Y, Shioyama W, Kunimoto S, Arita Y,

Higuchi K, Yamamoto K, Fujio Y, Nishida K, Kuroda T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Komuro I, Mochizuki N. *J Mol Cell Cardiol*. 2010 Mar 11. [Epub ahead of print] 査読有り

- ② Clinical significance of plasma endothelin-1 level after bosentan administration in pulmonary arterial hypertension. Hiramoto Y, Shioyama W, Higuchi K, Arita Y, Kuroda T, Sakata Y, Nakaoka Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K. *J Cardiol*. 2009 Jun;53(3):374-80. Epub 2009 Feb 20. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

- ① Shioyama W, Higuchi K, Hiramoto Y, Arita Y, Kuroda T, Fujio Y, Sanada F, Taniyama Y, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Hori M, Mochizuki N, and Nakaoka Y. Docking Protein Gab1 is Essential for HGF-dependent Endothelial Signaling and Angiogenesis after Hindlimb Ischemia. (第73回日本循環器学会学術集会 平成21年3月21日 大阪)
- ② Shioyama W, Higuchi K, Okamoto K, Arita Y, Sanada F, Taniyama Y, Morishita R, Kuroda T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Mochizuki N, Nakaoka Y. Scaffolding Docking Protein Gab1 is Essential for HGF-dependent Endothelial Signaling and Angiogenesis after Hindlimb Ischemia. American Heart Association Scientific Sessions 2008 (Nov.12, 2008, New Orleans)
- ③ 中岡良和、樋口香織、塩山渉、岡本紀太郎、有田陽、黒田忠、眞田文博、谷山義明、森下竜一、藤尾慈、瀧原圭子、平野俊夫、望月直樹：ドッキング蛋白質 Gab1 は下肢虚血ストレス後の血管新生に必須である 第12回 Molecular Cardiovascular Conference (平成20年9月5日北海道余市郡赤井川村)
- ④ 黒田 忠、角辻暁、小谷順一、橘公一、辻井健一、南都伸介. Accuracy and efficiency of a novel diagnostic method for non-invasive coronary angiography using 64-slice multi-slice computed tomography (第17回心血管インターベンション学会、平成20年7月3日、名古屋国際会議場)

- ⑤ Okamoto K, Shioyama W, Higuchi K, Kuroda T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Hori M, Koh GY, Mochizuki N, Nakaoka Y. Essential role of Gab2 for Angiopoietin-1/Tie2-dependent Signaling and Cytoprotection in the Endothelial Cells (第72回日本循環器学会学術集会 平成20年3月28日 福岡)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/cardiology/27research/2784res.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒田 忠 (TADASHI KURODA)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：60403078

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：