

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2013

課題番号：21790715

研究課題名(和文)新規Akt基質Girdinの血管恒常性制御機構の解明

研究課題名(英文)The role of Girdin, a new Akt substrate, in vascular homeostasis

研究代表者

前田 健吾 (Maeda, Kengo)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80456673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：我々が新規にその機能を解明したAkt基質Girdinは血管内皮細胞と血管平滑筋細胞に発現している。血管内皮細胞ではGirdinの発現とAktによるリン酸化は血管新生に関与しているが、すでに構築されている毛細血管ではGirdinはR-Rasと結合し、VE-cadherinの細胞内輸送の調節に関与していた。この機能は血管透過性の調節に重要であると判明した。また血管平滑筋細胞ではGirdinの発現とAktによるリン酸化は細胞遊走と細胞分裂を制御し、血管損傷後の新生内膜形成過程に重要な役割を果たしていることが確認された。

研究成果の概要(英文)：The expression of Girdin is found in endothelial cells and vascular smooth muscle cells. We previously found that the expression of Girdin and its Akt-mediated phosphorylation at serine 1416 regulated the chemotaxis of endothelial cells and played an essential role in angiogenesis. We also found that Girdin formed a complex with R-Ras in mature endothelial cells, where Girdin regulated the intracellular trafficking of VE-cadherin. The results suggest that Girdin regulates transendothelial permeability in synergy with R-Ras and VE-cadherin. We additionally investigated the function of Girdin in vascular smooth muscle cells. The expression of Girdin and its Akt-mediated phosphorylation were involved in the chemotaxis and cytokinesis of vascular smooth muscle cells. Both knockdown of Girdin and knock-in of alanine at serine 1416 attenuated the neointima formation after vascular injury. The results suggest that Girdin is essential for neointimal formation after vascular injury.

研究分野：医歯薬学

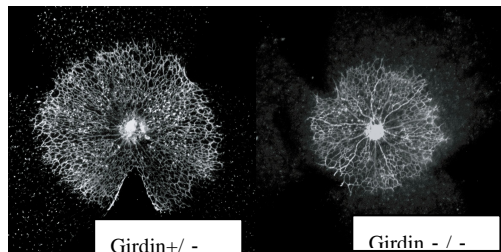
科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：Girdin

1. 研究開始当初の背景

個体での心血管系の恒常性 (vascular homeostasis) は血管を構成する細胞の増殖、apoptosis、遊走能などの生物学的機能の変化、及びその結果として生じる血管の透過性やトーンの変化、適切な血管新生制御などを通して維持されている。このメカニズムが破綻すると、脳卒中、虚血性心疾患、動脈瘤などの動脈硬化性疾患を生じたり、異常な血管透過性亢進の結果、糖尿病性網膜症や ARDS を生じたりして重篤な結果となる。これまでも様々な増殖因子や転写因子の機能が不活性化されることで、発生段階の血管形成が障害され胎生致死にいたることが報告されている。しかし、これらの下流での分子メカニズムや、出生後に特異的な vascular homeostasis 維持の分子機構の解明はまだ十分ではない。

我々が注目する分子、Girdin は yeast-two-hybrid screening により同定された Akt の新規基質で、その機能はアクチン線維同士の間架橋、及びアクチン線維と細胞膜との結合であり、細胞膜と Girdin との結合が Akt によるリン酸化で制御されることが示されている。さらに、Girdin はアクチン細胞骨格再構築に重要であり siRNA を用いた Girdin のノックダウンにより線維芽細胞などで細胞運動が障害される (Enomoto et al, Developmental Cell, 2005)。我々は、生体内では Girdin が小血管では血管内皮と pericyte の両方に発現しており、Girdin をノックダウンすることで血管内皮細胞の VEGF によって誘導される chemotaxis が障害され、血管新生 (angiogenesis) が著明に抑制されることを *in vitro*、*in vivo* で示した (Nature Cell Biology, 2008)。対照的に、筋層を有する比較的大きな血管では、Girdin の発現は中膜層の平滑筋細胞に局限していた。我々が作成した Girdin ノックアウトマウスは出生時には各臓器に肉眼的な異常を認めないが、体重増加が不良であり生後 25 日目までにはすべて死亡する。このマウスでは出生時の心血管系には異常を認めないが、生後に血管新生を生じる網膜や大脳皮質で、血管網の発達不全を認めた (下図)。



これらの事実から、Girdin は血管の構造によりその発現パターンが異なり、血管新生を含み生後の血管系の homeostasis 維持に重要な役割を果たしている、その機能の解析は、種々の血管疾患の新たな治療法の発見につながると思われる。

2. 研究の目的

虚血性心疾患、動脈瘤、脳卒中など動脈硬化性疾患は今日の日本人の主要な死因の一つとなっている。また、脳卒中後の脳浮腫や糖尿病性網膜症に認められる血管透過性の異常な亢進の制御や悪性腫瘍の血行性転移時の血管内への侵入過程の抑制なども、近年治療ターゲットとするべく研究が進められている。今回注目する Girdin は血管系に広く発現するが、血管の大きさにより発現する細胞のパターンが異なり、血管の機能によって異なった生物学的意義を持っていると考えられる。また、Girdin の機能を治療のターゲットとすれば、さまざまな疾患モデルでの応用が期待される。今回の研究では培養血管内皮細胞、血管平滑筋細胞を用いた Girdin の分子生物学的な機能解析から、Girdin の変異体ノックインマウスや組織特異的ノックアウトマウスを用いた疾患モデルの作成、解析までを行い、Girdin を血管疾患の治療ターゲットとできる可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) Girdin の vascular permeability 調節機能の *in vitro* での解析

Girdin は新生過程にある血管だけではなく、既に構築されている毛細血管内皮細胞でも発現しているが、その機能は不明である。微小循環を構築している血管内皮細胞の重要な機能の一つに、血管透過性の調節がある。Girdin が血管内皮細胞層の透過性に与える影響を評価した。また、血管透過性の制御には VE-cadherin の homophilic な結合で形成される adherens junction が重要であると知られている。adherens junction は VE-cadherin の endocytosis や recycling によりさまざまなシグナル伝達の下流で制御されていることが報告されているので、Girdin が adherens junction の維持や VE-cadherin の細胞内輸送に与える影響も評価した。同時に Akt によってリン酸化されるセリン 1416 をアラニンに置換した SA form や細胞膜結合領域を deletion した delta-PB form を発現させた場合と表現型を比較検討し、Girdin の血管内皮透過性調節における意義を検討した。

(2) Girdin の血管平滑筋細胞 (VSMC) での機能解析

前述のように、筋層を有する比較的大きな血管では Girdin は中膜の血管平滑筋細胞で発現を認めた。培養ヒト大動脈平滑筋細胞で、siRNA を用いた Girdin のノックダウンを行い VSMC の増殖、アポトーシス、細胞運動に Girdin が与える影響を評価した。

(3) ラット頸動脈内膜擦過モデルでの Girdin による遺伝子治療の検討

冠動脈での血管形成術後、ステント留置後に生じる再狭窄は臨床上、いまだ大きな問題である。血管形成術後の再狭窄は主として中膜

層の平滑筋層細胞が内膜面に遊走・増殖した結果として形成される新生内膜が主因として生じると考えられている。この過程における Girdin の役割を検討するために、我々は血管形成術後ラット頸動脈内膜擦過モデルを用いた。balloon injury 作成時に総頸動脈をクランプし、Girdin に対する shRNA を発現するアデノウイルスベクターを注入し、内膜の擦過部にアデノウイルスを曝露させ、中膜平滑筋細胞で Girdin をノックダウンした。得られた組織標本で新生内膜厚をコントロール群と比較した。同様にコントロールとして EGFP を発現するアデノウイルスベクターと Girdin wild type、SA form を発現するアデノウイルスベクターを用いて擦過後の頸動脈中膜平滑筋で Girdin wild type、SA form を過剰発現させる。新生内膜厚を計測し比較した。さらに、得られた標本で、PCNA の免疫染色や TUNEL 染色を行い、in vivo での細胞の増殖、アポトーシスの変化を検討した。

Girdin のセリン 1416 の Akt によるリン酸化が新生内膜形成に与える影響を評価するために、セリン 1416 をアラニンに置換した GirdinS1416A ノックインマウスを作製した。このマウスの大腿動脈を用いて wire injury モデルを作成して、ラット頸動脈モデルと同様の解析を行った。

(4) 組織特異的 Girdin ノックアウトマウスの作成と解析

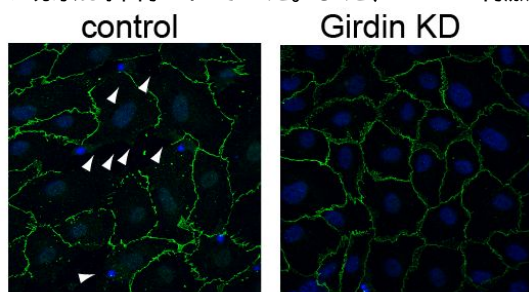
Girdin は血管内皮細胞、平滑筋細胞に発現しているが、血管の大きさにより発現の分布が異なる特徴を持つ。すでに作成されている general なノックアウトマウスや、作成中の複数の Girdin 変異体ノックインマウスに加えて、血管内皮特異的、平滑筋特異的なノックアウトマウスを作成することで機能・大きさの異なる血管での Girdin の機能を検討した。

4. 研究成果

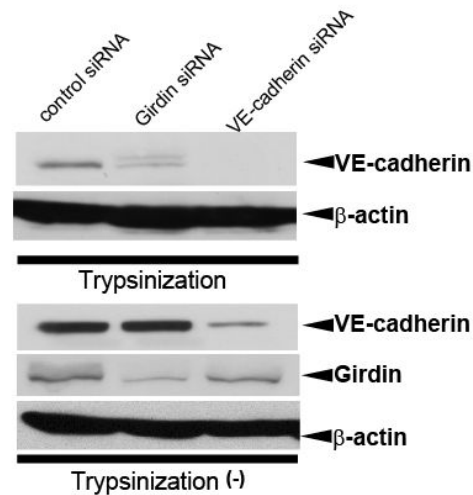
1. 血管内皮透過性調節における Girdin の機能解析

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を confluent に培養し、血管内皮細胞の monolayer を作成して実験を行った。

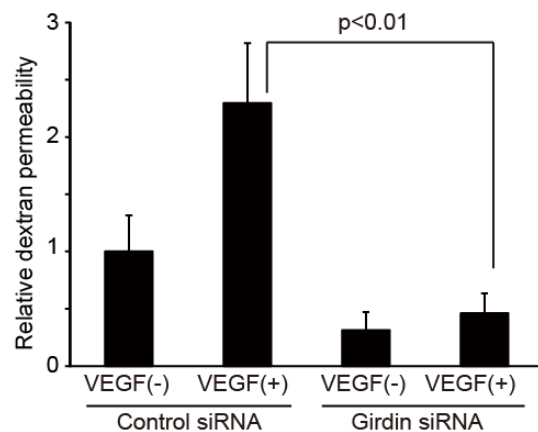
VEGF 刺激を行い、VE-cadherin の免疫染色を検討した。下図のようにコントロールでは adherens junction の解離が認められたが、Girdin をノックアウトした HUVEC ではこの現象は抑制されていた。また、VEGF 刺激



後の HUVEC をトリプシン処理したのちにタンパクを回収して Western blot を行い、VEGF 刺激により細胞内に取り込まれた VE-cadherin の量を比較した。コントロールに比べて、Girdin をノックダウンした HUVEC では下図に示すように、VE-cadherin の総量は変化していなかったが、細胞内に存在する VE-cadherin は著明に減少していた。

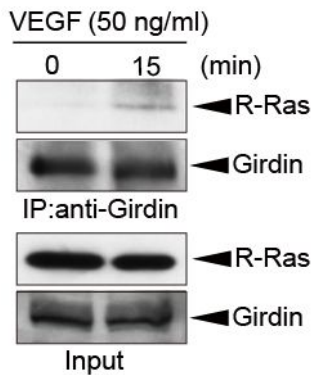


これらの事実から、Girdin は HUVEC の monolayer では VEGF 刺激によって生じる VE-cadherin の細胞内輸送に必要であり、adherens junction の制御に関与していると考えられた。この結果を受けて、HEVEC の monolayer での FITC-デキストランの透過性の変化を検討した。下図に示すように Girdin をノックダウンした HUVEC では FITC-デキストランの透過性が有意に低下していた。

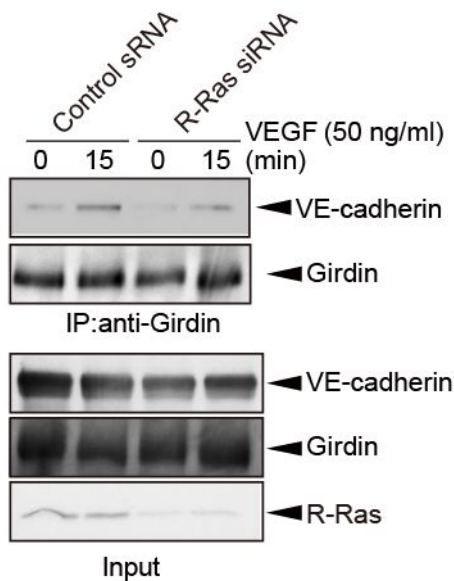


Girdin のセリン 1416 のリン酸化を生じない変異体である Girdin S1416A、Girdin delta-PB の外因性の発現でもデキストランの透過性亢進は部分的に抑制されていた。これらの結果から、Girdin は VE-cadherin の輸送を制御することで、血管内皮透過性の制御に関与していると考えられた。

この現象のメカニズムを解析するために、



我々は血管内皮細胞の安定性に重要な役割を果たしている small GTPase の R-Ras に注目した。左の図に示すように Girdin は VEGF 刺激依存性に、細胞内で R-Ras と複合体を形成していた。コントロールの HUVEC では Girdin は細胞の辺縁に局在していたが、R-Ras をノックダウンするとその局在は消失した。さらに、下図に示すように VEGF 刺激後にコントロールの HUVEC では Girdin と VE-cadherin は複合体を形成していたが、R-Ras をノックダウンするとこの複合体形成は認められなくなった。



FITC-デキストランの透過性に関して検討を行ったところ、R-Ras のノックダウンで認められる血管内皮透過性の亢進は Girdin を同時にノックダウンすることで消失した。これらの結果から、Girdin は血管内皮細胞で R-Ras の標的分子として働いており、VE-cadherin の細胞内輸送を制御することで血管内皮透過性を制御していることが判明した。

(2) Girdin の血管平滑筋細胞 (VSMC) での機能解析

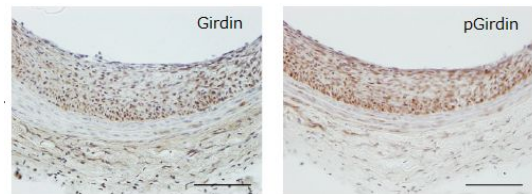
まず培養ヒト大動脈血管平滑筋細胞 (VSMC) で siRNA を用いて Girdin をノックアウトして、細胞の増殖性、遊走能、アポトーシスを検討した。Girdin は血管平滑筋細胞でも PDGF やアンジオテンシン による刺激で、PI3-kinase-Akt の下流でセリン 1416 がリン酸化され、細胞内ではストレスファイ

バーやラメリポディアなど、アクチン線維で形成される構造に局在していることが判明した。また、Girdin をノックダウンすることでこれらの構造は消失し、Girdin はアクチン線維の構成に重要であることが判明した。

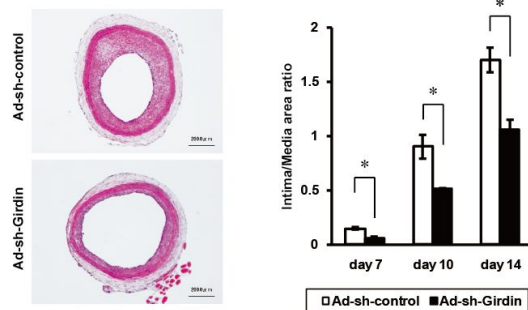
Girdin のノックアウトで、VSMC の増殖能、遊走能は有意に低下していたが、アポトーシスには有意な変化は認められなかった。増殖能、遊走能の低下は、Girdin S 1416 A マウスから単離した血管平滑筋細胞でも同様に認められた。

(3) ラット頸動脈内膜擦過モデルでの Girdin による遺伝子治療の検討

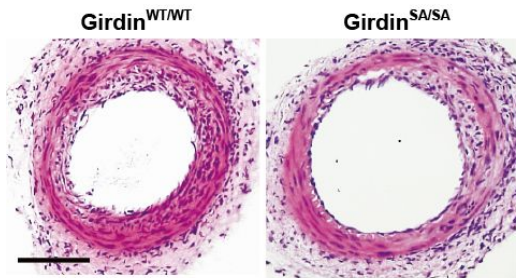
次いで、ラットの頸動脈バルーン擦過モデルでの Girdin のノックダウンの効果を検討した。バルーン擦過後の頸動脈では Girdin の発現は経時的に増加しており、セリン 1416 のリン酸化も増強していることが確認された。免疫染色では下図に示すように Girdin は主として新生内膜で発現していた。



下図に示すように、Girdin のノックダウンでは新生内膜厚は有意に減少していた。TUNEL 染色では新生内膜の細胞におけるア



ポトーシスに有意な変化は認められなかったが、PCNA 染色では Girdin のノックダウン群では PCNA 陽性細胞数は有意に減少していた。エバンスブルー注入により、障害血管の再内皮化の差異を検討したが、コントロール群、Girdin 群で有意差を認めなかった。これらの結果から、Girdin の中膜層の平滑筋細胞でのノックダウンは再内皮化の過程に影響せず、平滑筋細胞の遊走能、増殖能を抑制して新生内膜厚を減少させると考えられた。さらに、Akt によりリン酸化を受けるセリン 1416 をアラニンに置換した変異体を発現する Girdin S1416A マウスの大腿動脈 wire injury モデルでも同様の検討を行った。次ページの図に示すように Girdin S1416A マウスでは新生内膜厚の有意な減少が認められた。



以上の結果から、Akt-Girdin 経路は血管損傷後の新生内膜形成に重要な役割を果たしており、治療のターゲットとして有望であると考えられた。

(4) 組織特異的 Girdin ノックアウトマウスの作成と解析

血管内皮細胞、血管平滑筋細胞に特異的な Girdin ノックアウトマウスは、通常成育下では特に異常を示さなかった。現在、腫瘍移植モデルや心筋梗塞モデルでの表現型を検討中である。

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 10 件)

1. The significance of measuring body fat percentage determined by bioelectrical impedance analysis for detecting subjects with cardiovascular disease risk factors. Yamashita K, Kondo T, Osugi S, Shimokata K, Maeda K, Okumura N, Matsudaira K, Shintani S, Muramatsu T, Matsushita K, Murohara T. *Circ J.* 2012;76(10):2435-42. 査読有

2. Efficacy and safety of the losartan-hydrochlorothiazide combination tablet in patients with hypertension uncontrolled by angiotensin II receptor antagonist therapy: the Aichi Research on Combination therapy for Hypertension (ARCH) Study. Maeda K, Adachi M, Kinoshita A, Koh N, Miura Y, Murohara T. *Intern Med.* 2012;51(10):1167-75. 査読有

3. Impact of low levels of vascular endothelial growth factor after myocardial infarction on 6-month clinical outcome. Results from the Nagoya Acute Myocardial Infarction Study. Matsudaira K, Maeda K, Okumura N, Yoshikawa D, Morita Y, Mitsuhashi H, Ishii H, Kondo T, Murohara T; Nagoya Acute Myocardial Infarction Study (NAMIS) Group. *Circ J.* 2012;76(6):1509-16. 査読有

Circ J. 2012;76(6):1509-16. 査読有

4. Comparison between valsartan and amlodipine regarding cardiovascular morbidity and mortality in hypertensive patients with glucose intolerance: NAGOYA HEART Study.

Muramatsu T, Matsushita K, Yamashita K, Kondo T, Maeda K, Shintani S, Ichimiya S, Ohno M, Sone T, Ikeda N, Watarai M, Murohara T; NAGOYA HEART Study Investigators.

Hypertension. 2012 Mar;59(3):580-6. 査読有

5. Smoking and smoking cessation in relation to all-cause mortality and cardiovascular events in 25,464 healthy male Japanese workers.

Kondo T, Osugi S, Shimokata K, Honjo H, Morita Y, Maeda K, Yamashita K, Muramatsu T, Shintani S, Matsushita K, Murohara T. *Circ J.* 2011;75(12):2885-92. 査読有

6. Metabolic syndrome and all-cause mortality, cardiac events, and cardiovascular events: a follow-up study in 25,471 young- and middle-aged Japanese men.

Kondo T, Osugi S, Shimokata K, Honjo H, Morita Y, Yamashita K, Maeda K, Muramatsu T, Shintani S, Matsushita K, Murohara T. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil.* 2011 Aug;18(4):574-80. 査読有

7. The actin-binding protein Girdin and its Akt-mediated phosphorylation regulate neointima formation after vascular injury.

Miyake H, Maeda K, Asai N, Shibata R, Ichimiya H, Isotani-Sakakibara M, Yamamura Y, Kato K, Enomoto A, Takahashi M, Murohara T.

Circ Res. 2011 May 13;108(10):1170-9. 査読有

8. Protective role of Gipiie, a Girdin family protein, in endoplasmic reticulum stress responses in endothelial cells.

Matsushita E, Asai N, Enomoto A, Kawamoto Y, Kato T, Mii S, Maeda K, Shibata R, Hattori S, Hagikura M, Takahashi K, Sokabe M, Murakumo Y, Murohara T, Takahashi M.

Mol Biol Cell. 2011 Mar 15;22(6):736-47. 査読有

9. Rationale and design of the NAGOYA HEART Study: comparison between valsartan and amlodipine regarding morbidity and mortality in patients with hypertension

and glucose intolerance.

Matsushita K, Muramatsu T, Kondo T, Maeda K, Shintani S, Murohara T; NAGOYA HEART Study Group.

J Cardiol. 2010 Jul;56(1):111-7. 査読有

10. Pitavastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, ameliorates endothelial function in chronic smokers.

Yoshida O, Kondo T, Kureishi-Bando Y, Sugiura T, Maeda K, Okumura K, Murohara T.

Circ J. 2010 Jan;74(1):195-202. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Actin binding protein Girdin/Ccdc88a regulates vascular permeability via interaction with Rras.

Kengo Maeda, Hitoshi Ichimiya¹, Hiroshi Miyake, Atsushi Enomoto, Masahide Takahashi, Toyooki Murohara

日本循環器学会総会 パシフィコ横浜 横浜市 2011.8.3

2. Akt/PKB Substrate Girdin Has an Impact on the Neointimal Formation by Regulating Migration and Proliferation of VSMCs.

Hiroshi Miyake, Kengo Maeda, Tomoya Kitamura¹, Rei Shibata¹, Atsushi Enomoto, Masahide Takahashi, Toyooki Murohara

日本循環器学会総会 京都国際会議場 京都市 2010.3.7

3. 新規 Akt 基質 Girdin による血管新生の制御

前田 健吾

第 50 回日本脈管学会総会 シンポジウム 2 循環器内科系 内皮と脈管疾患 2009.10.29

ハイアットリージェンシー東京 東京都

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 健吾 (MAEDA Kengo)

名古屋大学医学部附属病院・助教

研究者番号：80456673

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし