

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23249020

研究課題名(和文) 生後の血管新生、神経新生を制御する分子メカニズムと病態形成

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of postnatal angiogenesis and neurogenesis

研究代表者

高橋 雅英 (Takahashi, Masahide)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：40183446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,400,000円、(間接経費) 11,220,000円

研究成果の概要(和文)：1.Girdinの神経系特異的コンディショナルノックアウトマウス(Girdin cKOマウス)を作製し、Girdinのnestin系列細胞での発現が生体内での生理機能にとって重要であることを示した。
2.酸素誘発網膜症モデルを用いて、GirdinのAktによるリン酸化が病的血管新生において重要な役割を果たしていることを明らかにした。また自家静脈グラフトモデルで誘導される内膜肥厚にもGirdinが関与していることを示した。
3.Girdinファミリー蛋白であるDapleがWntシグナルのnon-canonical経路において、Dvlと相互作用することにより、細胞運動を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To identify the cellular population responsible for the phenotype of girdin KO mice, newly generated girdin flox mice were crossed with nestin-promoter driven Cre-transgenic mice to obtain girdin conditional knockout mice. Our findings suggested that girdin expression in nestin cell lineage is responsible for the phenotype of girdin KO mice.
We used a mouse model of pathological ocular neovascularization: oxygen-induced retinopathy. Pathological neovascularization was decreased in S1416A knockin mice. The results demonstrate that girdin and its phosphorylation play an important role in neonatal vascular development and in pathological neovascularization in the retina. We also found that depletion of girdin attenuated venous smooth muscle cells migration and proliferation in vitro and intimal hyperplasia in vein grafts in vivo.
Moreover, we demonstrated that a girdin family protein, Dishevelled-associating protein Daple, controls the non-canonical Wnt/Rac pathway and cell motility

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：Girdin Akt 細胞運動 神経新生 血管新生

1. 研究開始当初の背景

細胞が増殖因子や細胞外マトリックスとの接着などにより刺激を受けると、アクチン線維や微小管などの細胞骨格分子の構造が変化し、細胞運動が促進される。細胞運動は発生過程における形態形成、組織修復、免疫反応、血管新生や癌細胞の浸潤・転移といった様々な生理的、病理的現象に重要な役割を果たしている。近年われわれはセリン・スレオニンキナーゼ Akt の新規基質分子として「Girdin (ガーディン)」と名付けたアクチン結合蛋白を同定し、その機能解析を行ってきた (Dev. Cell 2005; Nature Cell Biol. 2008; Cancer Res. 2008; Neuron 2009)。Girdin は生体内では未熟な血管内皮細胞、周皮細胞や海馬の神経細胞、嗅球の形成に重要な rostral migratory stream (以下 RMS) を構成する神経細胞で強く発現していた。Girdin のノックアウトマウスは生後直後においては野生型の間に明瞭な肉眼的な変化を認めないものの、組織学的には生後形成される網膜および大脳の血管ネットワークと海馬および嗅球の構造異常が認められた。この結果は、Girdin は胎生期における脈管形成 (vasculogenesis) や器官形成 (organogenesis) においてではなく、生後の血管新生と神経発生 (postnatal angiogenesis and neurogenesis) において重要な役割を果たす分子であることを示した (Nature Cell Biol. 2008; Neuron 2009)。血管新生には VEGF による Akt 活性化とそれに引き続く Akt による Girdin のリン酸化が重要であった (Nature Cell Biol. 2008)。一方、神経細胞では Girdin が統合失調症や双極性障害 (躁うつ病) の脆弱因子として最近注目されている DISC1 (Disrupted in Schizophrenia 1) と分子複合体を形成し、海馬における新生ニューロンの移動と分化を制御していることを示す結果を得た (Neuron 2009)。生後の血管新生については腫瘍血管の形成、糖尿病性網膜症などにおける網膜血管の増生、創傷治癒過程における血管新生などの病態に関与する。一方神経新生については、長年哺乳類の中枢神経系の神経細胞は再生しないと教科書に記載されてきたが、近年発生を終えた生後の中枢神経系でも幹細胞から神経細胞が新生することが明らかにされた。特に成体における神経新生は「adult neurogenesis」とよばれ、その異常は精神・神経疾患の病態に関与する可能性が考えられる。このような生後の血管新生、神経新生の分子メカニズムを解明することは、様々な病態の理解につながるとともに、新たな治療法の開発研究に寄与するものである。

2. 研究の目的

出生後の血管新生、神経新生は様々な疾患の病態形成、再生医療あるいは精神・記憶の形成機序などの観点から多方面の研究者から注目されている。われわれが発見した Akt キ

ナーゼの基質でアクチン結合蛋白である Girdin は、血管内皮細胞、神経細胞、線維芽細胞、がん細胞などの細胞運動能に関与する極めて重要な分子であり、Girdin のノックアウトマウスの解析から、特に生後における血管新生、神経新生に重要であることが明らかになってきた。本研究の目的は Girdin およびその結合蛋白の解析を通じて、生後における血管新生、神経新生の分子機構の解明と様々な病態形成における役割を明らかにすることにある。同時に Girdin のファミリー分子 (Daple, FLJ00354) の機能解析を進め、ファミリー分子の機能多様性を明らかにする。これらの解析を通じて、生後の血管新生、神経新生を制御する分子ネットワークおよび細胞内シグナル伝達機構の解明につなげたい。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子改変動物の作成とその表現系解析: Girdin ノックアウトマウスの表現系をより詳細に解析する他、成体において時期を選んで発現制御が可能なコンディショナル遺伝子改変マウスを作成し、postnatal angiogenesis および adult neurogenesis における Girdin の機能を解析する。

(2) Girdin ファミリー分子 DAPLE および FLJ00354 の機能解析: ヒトゲノム中には Girdin のファミリー分子が少なくとも 2 種類 (Daple および FLJ00354) 存在している。これら 2 つ遺伝子の機能について、細胞生物学的解析と遺伝子改変動物作成による表現系解析を行う。

4. 研究成果

(1) 神経特異的 Girdin コンディショナルマウスの作成

Girdin^{+/+}-マウスの LacZ 染色による全身における Girdin の発現を検索した。その結果、中枢神経系、自律神経系、腸管神経系を含む広範な神経細胞、一部の血管、腱や心臓弁などに Girdin の発現が強く見られた。そこで神経系における Girdin の発現の意義をさらに明らかにするため、Girdin flox: nestin Cre マウスを用いた神経系特異的コンディショナルノックアウトマウス (Girdin cKO マウス) を作製した。Girdin cKO マウスでは歯状回顆粒層神経細胞の分散や rostral migratory stream (RMS) の拡大を伴う嗅球の低形成が見られ、生後 1 か月以内に全例が死亡するという Girdin KO マウスとほぼ同じ表現型を示した。この結果は Girdin の nestin 系列細胞での発現が生体内での生理機能にとって重要であることを証明した。

(2) 酸素誘発網膜症モデルにおける病的血管新生におけるリン酸化 Girdin の役割

新生仔期マウスを 75% 程度の高濃度酸素状況下に 5 日間曝露し、さらに通常環境下で 5 日間飼育した。その後経時的に網膜を摘出し、異常血管新生の程度を野生型と Akt によるリ

ン酸化部位セリン 1416 をアラニン置換したマウス (S1416A マウス) の両群で比較した。S1416A マウスでは異常血管新生の程度は有意に低下しており、Girdin の Akt によるリン酸化が病的血管新生において重要な役割を果たしていることを明らかにした。さらに VEGF を網膜に過剰発現するトランスジェニックマウスにおける病的血管新生についても、S1416A マウスと交配することにより、有意に低下することが判明した。

(3) 自家静脈グラフトモデルで誘導される内膜肥厚における Girdin の役割
閉塞性動脈硬化症の臨床例に類似した静脈グラフトモデルを用いて内膜肥厚における Girdin の役割を検討した。内膜肥厚は静脈グラフト後約 1 週間で明瞭になり、4 週頃にピークに達する。肥厚した内膜における Girdin の発現を免疫染色法およびウェスタンブロット法にて検討したところ、グラフト後 7 日目で有意に増強し、2 週間頃に発現がピークに達し、その後減少した。蛍光抗体法により肥厚した内膜で増殖している平滑筋細胞において Girdin の発現が増強していることが明らかになった。静脈グラフトより血管平滑筋を分離培養し、siRNA で Girdin の発現をノックダウンすると、培養平滑筋細胞の増殖能、運動能ともに有意に低下し、Girdin がその増殖能、運動能に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(4) Girdin ファミリー蛋白である Daple の機能解析

Daple は Wnt シグナルに重要な役割を果たす Dishevelled (Dvl) の結合蛋白として同定されていた (図 1)。本研究においてわれわれは Daple が non-canonical Wnt シグナルに重要な役割を果たすことを明らかにした。すなわち、Daple は Wnt シグナルの non-canonical 経路において、Dvl と相互作用することにより、Dvl と aPKC の結合を増強し、aPKC 活性化を誘導することが明らかになった。aPKC 活性化は Tiam1 などの RacGEF を活性化を介して Rac 活性を増強し、細胞運動を促進することが示唆された。(図 2)

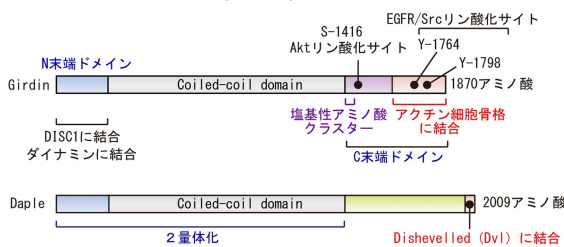


図1 GirdinおよびDapleの構造

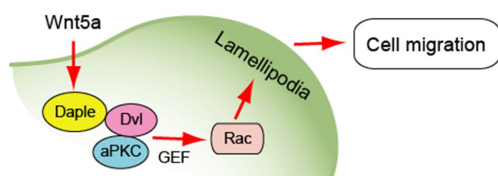


図 2: Wnt シグナルによる Daple を介した Rac の活性化とラメリポディア形成機構

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 11 件) すべて査読有り

1. Nishimae K., Tsunoda, N., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Iwakoshi, A., Takahashi, M. and Nagiono, M.

The impact of Girdin expression on recurrence-free survival in patients with luminal-type breast cancer.

Breast Cancer (2014) in press

2. Miyachi, H., Mii, S., Enomoto, A., Murakumo, Y., Kato, T., Asai, N., Komori, K. and Takahashi, M.

Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of siRNA for vein failure.

J. Vasc. Surg. (2014) in press.

3. Ota, H., Hikita, T., Nishioka, T., Matsumoto, M., Ito, J., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M., Kaibuchi, K., Sobue, K. and Sawamoto, K.

Proteomic analysis of Girdin-interacting proteins in migrating new neurons in the postnatal mouse brain.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 442: 16-21 (2013).

4. Ito, T., Komeima, K., Yasuma, T., Enomoto, A., Asai, N., Iwase, S., Takahashi, M. and Terasaki, H.

Girdin and its phosphorylation dynamically regulate neonatal vascular development and pathological neovascularization in the retina.

Am. J. Pathol. 182: 586-596 (2013).

5. Mao, J.-Z., Jiang, P., Cui, S.-P., Ren, Y.-L., Zhao, J., Yin, X.-H., Enomoto, A., Liu, H.-J., Hou, L., Takahashi, M. and Zhang, B.

Girdin locates in centrosome and midbody and plays an important role in cell division.

Cancer Sci. 103: 1780-1787 (2012).

6. Asai M., Asai, N., Murata, A., Yokota, H., Ohmori, K., Mii, S., Enomoto, A., Murakumo, Y. and Takahashi, M.

Similar Phenotypes of Girdin germ-line and conditional knockout mice indicate a crucial role for Girdin in the nestin lineage.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 426: 533-538 (2012).

7. Ishida-Takagishi, M., Enomoto, A., Asai, N., Ushida, K., Watanabe, T., Hashimoto, T., Kato, T., Weng, L., Matsumoto, S., Asai, M., Murakumo, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A. and Takahashi, M.

The Dishevelled-associating protein Daple controls the non-canonical Wnt/Rac

pathway and cell motility.
Nature Commun. May 29 3: 859 (2012).

8. Ohara, K., Enomoto, A., Kato, T., Hashimoto, T., Isotani-Sakakibara, M., Asai, N., Ishida, -Takagishi, M., Weng, L., Nakayama, M., Watanabe, T., Kato, K., Kaibuchi, K., Murakumo, Y., Hirooka, Y., Goto, H. and Takahashi M.
Involvement of Girdin in the determination of cell polarity during cell migration.
PLoS One, 7: e36681 (2012).

9. Natsume, A., Kato, T., Kinjo, S., Enomoto, A., Toda, H., Shimato, S., Ohka, F., Motomura, K., Kondo, Y., Miyata, T., Takahashi, M. and Wakabayashi, T.
Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells.
Oncogene 31: 2715-2724 (2012).

10. Wang, Y., Kaneko, N., Asai, N., Enomoto, A., Isotani-Sakakibara, M., Kato, T., Asai, M., Murakumo, Y., Ota, H., Hikita, T., Namba, T., Kuroda, K., Kaibuchi, K., Ming, G., Song, H., Sawamoto, K. and Takahashi, M.
Girdin is an intrinsic regulator of neuroblast chain migration in the rostral migratory stream of the postnatal brain.
J. Neurosci. 31: 8109-8122 (2011).

11. Miyake, H., Maeda, K., Asai, N., Shibata, R., Ichimiya, H., Isotani-Sakakibara, M., Yamamura, Y., Kato, K., Enomoto, A., Takahashi, M. and Murohara, T.
The actin-binding protein Girdin and its Akt-mediated phosphorylation regulate neointima formation after vascular injury.
Circ. Res. 108: 1170-1179 (2011).

[学会発表](計6件)

1. Takahashi, M., Enomoto, A. and Asai, N.
Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.
International Symposium on Nanomedicine (Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya)
January 13-14, 2014.

2. Takahashi, M.
Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis.
Joint meeting of the Medical School of Nagoya University and the University of Adelaide (The University of Adelaide, Adelaide, Australia)
May 27, 2013

3. Takahashi, M.
Roles of the Akt substrate Girdin in cell motility
1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation

of Signaling (The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo)
February 1-2, 2013

4. Takahashi, M.
Roles of the Akt substrate Girdin in tumor progression, angiogenesis and neurogenesis.
Joint meeting of the Medical School of Nagoya University and the Medical University of Vienna (Center for Brain Research, Medical University of Vienna, Vienna, Austria)
January 28, 2013

5. Takahashi, M.
Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression, angiogenesis and Neurogenesis.
Global Center of Excellence (COE) Program, The 4th International Symposium: Global COE symposium on Neuro-Tumor Biology and Medicine (West in Nagoya Castle, Nagoya)
November 15-16, 2012.

6. Takahashi, M.
Roles of the Akt substrate Girdin in cancer progression and angiogenesis
Global Center of Excellence (COE) Program, The 3rd International Symposium: New trends in basic and clinical cancer research for innovative Therapy (Midland Hall, Nagoya)
December 8-9, 2011.

[その他]
ホームページ:
<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 40183446

(2)研究分担者

榎本 篤 (ENOMOTO ATSUSHI)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 20432255
浅井 直也 (ASAI NAOYA)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 80273233
村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)
2013年3月まで
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 40324438

(3)連携研究者: 無