

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461137

研究課題名(和文) 血管内皮細胞における細胞間シグナル伝達因子の発現制御機構

研究課題名(英文) Regulation of vascular endothelial cells by signaling molecules

研究代表者

林 寿来 (Hisaki, Hayashi)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：30533715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：多細胞生物において各細胞間では様々なシグナル分子によってコミュニケーションが取られている。その破綻が細胞機能障害、やがては各種疾患発症につながる。本研究では三量体G蛋白結合蛋白AGS8がどのように細胞間シグナルに関与して、血管形成を制御するのかについて研究を行った。血管内皮細胞においてAGS8分子の発現を実験的に抑制すると、内皮細胞が有する機能(細胞増殖・移動・管腔形成)が抑制された。さらなる詳細な解析の結果、AGS8は血管内皮細胞増殖因子受容体の新しい制御分子である可能性が示唆された。以上の結果は、AGS8分子を制御することで、血管新生が関与する病態を制御できる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：In multicellular organisms, communication between the cells is taken with a variety of signal molecules. Its collapse causes cell dysfunction, eventually leading to a variety of disease. Here, we conducted a study about how to control the blood vessel formation, including angiogenesis, by regulating the cell-to-cell signaling with a new trimeric G-protein-binding protein, AGS8. When expression of AGS8 molecules in vascular endothelial cells was suppressed, basic functions of the endothelial cells (cell growth, movement, lumen formation) was inhibited. Further detailed analysis finally suggested that AGS8 is a new regulatory molecules of VEGF signaling, mainly via acting an appropriate VEGF receptor localization by transporting it from cytosol to cell membrane.

研究分野：血管生物学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 VEGFシグナル G蛋白

### 1.1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において各細胞間では様々なシグナル分子によって細胞間コミュニケーションが取られている。その破綻が細胞機能障害、やがては各種疾患発症につながる。本研究で着目する三量体 G 蛋白情報伝達系はリガンドにより活性化される 7 回膜貫通型細胞受容体 (G-protein-coupled receptor : GPCR)、G 蛋白、およびその下流の効果機 (Effector) から構成される。古典的なモデルでは、G 蛋白の活性化は GPCR のみによって活性化を受けるとされてきた。しかし近年、リガンド受容体とは独立して G 蛋白の活性調節を行う分子、G 蛋白活性調節因子 (Activator of G-protein Signaling : AGS) が存在することが明らかとなった。G 蛋白活性調節因子は、直接 G 蛋白を制御し、今まで知られていなかったシグナルを引き起こすことが明らかになりつつある。さらに、この研究分野の発展とともに、G 蛋白活性調節因子が各種の病態形成に関与するという報告が続いているものの、一方で血管形成における機能はこれまで報告されていなかった。

### 2. 研究の目的

申請者の所属する研究グループでは、以前血管新生を伴うラット狭心症モデルから、新規 G 蛋白活性調節因子 AGS8 を同定した。この手術は、間歇性虚血により術後に虚血心筋アポトーシスが誘導されるとともに側副血行路が著明に発達することから、低酸素下での血管新生のモデルでもある。そのため、発達した血管においても AGS8 が重要であることが十分予想された。私たちのこれまでの研究で、心筋細胞における AGS8 の機能は非常に重要であることが分かってきたが、血管における AGS8 の機能はまだ十分に解明されていなかった。以上のことから、本課題では血管形成における AGS8 の機能を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

・AGS8 分子ノックダウン細胞における血管内皮細胞の解析 : AGS8 を siRNA によってノックダウンした培養血管内皮細胞において、VEGF が誘導する Matrigel 上で管腔形成、細胞増殖、細胞移動度を測定した。

・AGS8 ノックダウンにおける VEGF が惹起する細胞内シグナル活性化への影響 : VEGF 受容体および下流シグナル分子のリン酸化をウエスタンブロット法で解析した。また、VEGFR-2、AGS8、G $\beta$  の結合を免疫沈降/ウエスタンブロット法で解析した。

・VEGFR-2 の細胞局在の解析 : 細胞膜表面局在および細胞質内局在をそれぞれ、フローサイトメーターおよび細胞免疫染色法によって解析を行った。

### 4. 研究成果

siRNA の導入によって、臍帯静脈由来 (HUVEC)、網膜微血管由来 (HRMVEC) の各種培養血管内皮細胞において AGS8 発現をノックダウンすると、血管内皮増殖因子 (VEGF) が誘導する管腔形成が顕著に抑制されることが明らかになった (図 1 参照)。HUVEC ではさらに VEGF が誘導する細胞増殖、細胞移動が抑制された。そこで、VEGF が伝達するシグナル伝達に対する影響を調べたところ、AGS8 ノックダウンでは VEGF 2 型受容体 (VEGFR2) における Tyr996, Tyr1059, Tyr1175 においてリン酸化いずれもほぼ完全に抑制されており、同様にその下流の p38, ERK1/2 のリン酸化も顕著に抑制されていることが判明した。細胞表面の VEGFR2 が 40% 程度に減少していること、その減少は VEGFR2 のエンドサイトーシスによるものではないことが Flow Cytometer 解析や阻害剤を用いた実験により明らかになった。VEGFR2 の細胞内局在を免疫蛍光染色によって解析したところ、明らか VEGFR2 は細胞質 (ゴルジおよび初期エンドソーム) 局在が増加していることが判明した。さらに、VEGFR-2 は AGS8 分子 C 末端および G $\beta$  と結合することが明らかになった。

以上のことからAGS8-Gβ複合体は細胞質から細胞膜へのVEGFR-2の輸送を行うことでVEGFシグナルを制御して血管新生を調節していることが明らかになった(図2参照)。

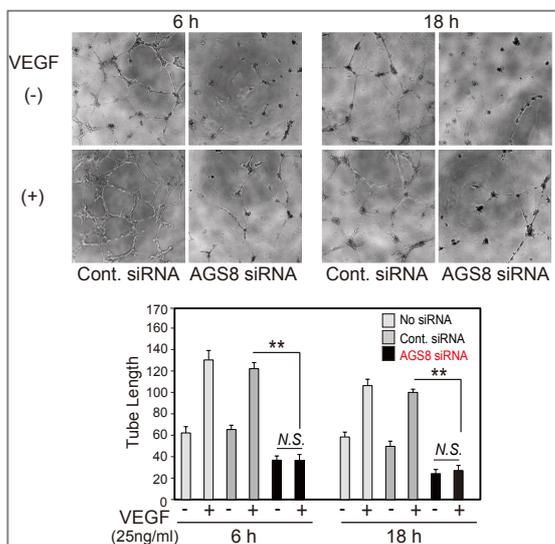


図1 AGS8 knockdownはVEGFが誘導する管腔形成を阻害する

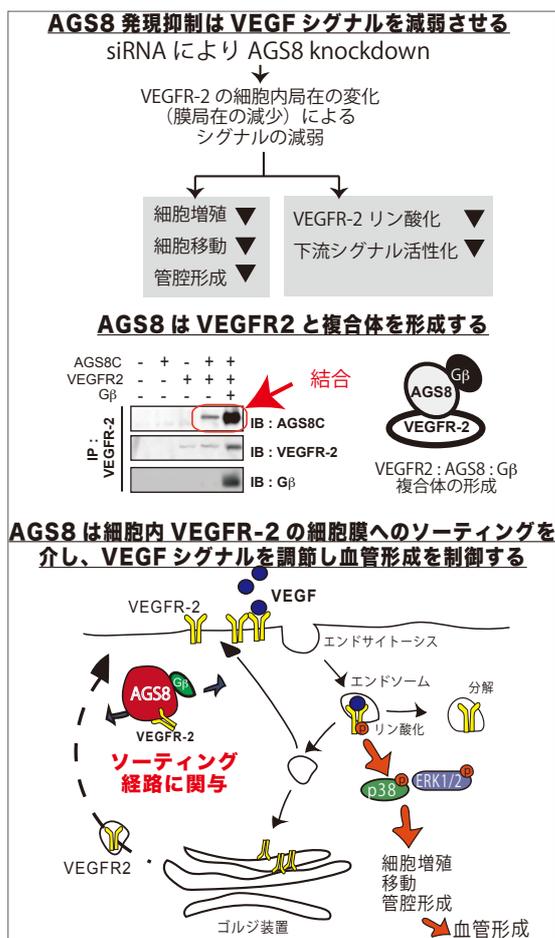


図2 血管内皮細胞におけるAGS8の分子機能

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 1 件)

① Activator of G-protein signaling 8 is involved in VEGF-mediated signal processing in angiogenesis. Hayashi H, Mamun AA, Sakima M, Sato M. J. Cell Sci. 2016. 129: 1210-1222, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

① 三量体 G 蛋白質関連分子による血管新生の調節 林寿来、マムンアブドゥラ、佐喜真未帆、矢ヶ崎莉菜、中原努、佐藤元彦  
 平成28年3月11日、日本薬理学会年会、ポスター発表 横浜

② Regulation of angiogenesis by accessory protein for heterotrimeric G-protein Hayashi H, Mamun A, Sakima M, Takeyama M, Zako M, Yagasaki R, Nakahara T, Sato M 平成28年3月23日 日本生

理学会年会 シンポジウム口演発表 札幌  
 ③ Regulation of endothelial cells by activator of g-protein signaling 林寿来、マムンアブドゥラ、佐喜真未帆、佐藤元彦、平成27年12月3日 日本分子生物学会年会 ポスター発表 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
 ○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 寿来 (HISAKI HAYASHI)  
愛知医科大学 医学部 生理学講座 講師  
研究者番号：30533715

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：