

平成 22 年 6 月 10 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790241

研究課題名（和文）Spred/ Sprouty の血管およびリンパ管新生における機能

研究課題名（英文）Role of Spred/Sprouty in angiogenesis and lymphangiogenesis

研究代表者 加藤 玲子

(KATO REIKO)

国立医薬品食品衛生研究所・療品部・主任研究官

研究者番号：00333469

研究成果の概要（和文）：

Sprouty/Spred ファミリー分子は、増殖因子やサイトカインによる ERK 経路活性化を抑制する調節因子である。このファミリー分子のノックアウトマウスを作製し、解析を行ったところ、Sprouty は血管形成に、Spred はリンパ管形成に重要であることがわかった。Sprouty4 は VEGF-A（血管内皮増殖因子）による ERK 活性化を抑制するが、リンパ管形成に重要な VEGF-C による ERK 活性化は抑制しない。一方 Spred1/2 はリンパ管新生に必要な VEGF-C のシグナルを効率よく抑制することがわかった。Sprouty と Spred の VEGF シグナルにおける差異を明らかにした。また *SPRED1* はヒト神経芽細胞腫 I 型様の疾患の原因遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Sprouty/Spred family proteins negatively regulate ERK signaling activated by growth factors and cytokines. We have analyzed gene knockout mice of this family and found that Sproutys negatively regulate angiogenesis, while Spreds regulate lymphangiogenesis. Sprouty4 inhibits vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) induced ERK activation, while Spred1/2 efficiently inhibit VEGF-C, which is essential for lymphangiogenesis. We have identified the difference between Sproutys and Spreds. in the action of VEGFs signal transduction. We also found that human *SPRED1* is responsible for neurofibromatosis type I like disease.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	0	1,700,000
2009 年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	0	3,300,000

研究分野：

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：

血管 リンパ管 Ras ERK シグナル チロシンキナーゼ プロテインキナーゼ C

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

Ras/MAP キナーゼ (MAPK) 経路は細胞外刺激に応じて細胞増殖、分化を調節する細胞内シグナル伝達経路としてよく知られている。また Ras の恒常的活性型変異は約 30%の癌で見られる。さらにこの経路のシグナル分子や制御因子の家族性の変異が神経繊維腫やヌーナン症候群で発見されている。しかし、Ras/MAP キナーゼ経路の負の制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。このなかで Sprud/Sprouty ファミリーが負の調節因子として注目を集めている。Sprouty はショウジョウバエの Ras/MAP キナーゼ経路を抑制する分子として単離された。また 2001 年に C 末端に Sprouty と相同性を持つ関連分子 Sprud (Sprouty-related protein with EVH-1 domain) が同定され、Sprud/Sprouty は Ras/MAP キナーゼ経路を抑制する新たなファミリーを形成することが明らかとなった (*Nature*, 2001)。哺乳類において、Sprouty は 4 種類、Sprud は 3 種類知られている。最近ヒト家族性優性遺伝を示す神経繊維腫やヌーナン症候群様の家系において *SPRED1* の機能喪失型変異を複数発見された (*Nature Genetics*, 2007)。

Sprud3の発現は主に脳に限局しているが、Sprud1とSprud2は広範な組織で発現が見られ、特に胎仔期では重複して発現が認められる。Sprud1、Sprud2それぞれの単独欠損 (KO) マウスは頭蓋の形成異常や造血系の亢進が認められるが、ともに出生、生殖は可能である。胎仔期においてはSprud1とSprud2の機能的相補が考えられたので、我々はSprud1/Sprud2両ホモ欠損 (DKO) マウスの作製を試みた。その結果、Sprud1/Sprud2 DKO胎仔は著明な出血、浮腫を認め、胎生12.5-15.5日に100%致死であった。出血は主に頸部、腎臓周囲を中心にみられ、リンパ管あるいは血管の異常が予想された。驚いたことに、正常な胎仔では見られないLYVE-1、CD31両陽性の管腔がSprud1/Sprud2 DKO胎仔の頸部において認められた (*Mol Cell Biol*, 2007)。このことはSprud1/Sprud2 DKOマウス胎仔ではリンパ管と血管が分離されていない可能性を示唆している。一方、Sprouty2/Sprouty4 DKO胎仔も胎生12.5日までに血管の異常を認め100%致死であった。これらの結果より、Sproutyは血管新生の、Sprudはリンパ管発生・新生の調節因子として使い分けられている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

- (1) Sprouty4による VEGF-A/VEGFR-2 シグナルの制御様式を明らかにする。
- (2) *Sprouty4* KO マウスの解析を行い、Sprouty4が血管新生制御に重要な役割を果たしていることを証明する。これを虚血モデルの治療に応用できないか検討する。
- (3) Sprouty と Sprud の作用機序の違いを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) ライブイメージングによる PKC 活性化、PIP₂ 産生の測定

リガンドによる MARCKS 及び PKC δ の移動は以前報告があった通りに行った (Kuriyama ら, 2004)。まず VEGFR-2 安定発現 HEK293T 細胞をトランスフェクション前日に 6well プレートに撒き、FuGENE HD を用いて各々のプラスミドをトランスフェクションした。GFP 融合 MARCKS 及び PKC δ プラスミドは齊藤博士 (神戸大学細胞機能制御研究分野) に分与いただいた。トランスフェクションから 6 時間後に細胞を回収し、ガラス底の 35mm ディッシュに撒きなおした。それから 18 時間後に観察した。培養液は血清フリーの HBSS に置換した。GFP 融合タンパクの移動は 25ng/ml の VEGF-A を培養液内に直接投入して惹起させた。GFP 蛍光の観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った (LSM510 invert, Carl Zeiss)。画像はタイムラプスで 10 秒ごとに撮影した。すべての観察は 37 度の条件下で行った。形質膜における蛍光強度の相対変化は $[(I_{mb} - I_{cy}) / (I_{mb} + I_{cy})]$ で計算した。I_{mb} は形質膜の蛍光シグナル強度を、I_{cy} は細胞質の蛍光シグナル強度を表している。

刺激依存性の PIP₂ 加水分解を評価するために、GFP 融合 PH ドメイン (PLC δ -1) ベクターを佐々木雄彦先生 (秋田大学) から分与いただき、MARCKS-GFP 及び PKC δ -GFP と同様に VEGFR-2 安定発現 HEK293T 細胞へトランスフェクションを行い、その挙動を観察した。

その他の生化学的なアッセイは既報に従って行った。

- (2) マウス急性下肢虚血モデル

C57BL/6 マウス (male, 20-25 g) を麻酔後、右鼠径部を切開、右大腿動脈を露出した。大腿動脈起始部を 6-0 絹糸を用いて結紮、さらに膝窩動脈と伏在動脈の分岐部直前で同様に結紮した。結紮後、右大腿動脈を切除・除去した。切開創を縫合閉鎖し手術を終了した。shRNA plasmid は 3ヶ所に分けて筋肉注射した。1. 非投与群、2. pSUPER shGFP (コントロール) 投与群、3. pSUPER shSpry2 と shSpry4 の混合投与群の 3 群において虚血下肢の骨格筋内へ 1 肢あたり 40 μ g 筋注投与し、14 日後の血流をレーザードップラー血流像にて評価を行った。

4. 研究成果

(1) Sprouty4 は PKC 下流のエフェクターを阻害する

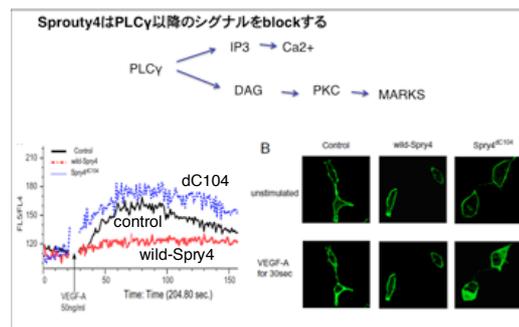
Sprouty4 は VEGF-C ではなく VEGF-A による ERK 活性化を抑制する。まず初めに、Sprouty4 のターゲットを決定するために、VEGFR-2 を安定的に発現した HEK293T 細胞を用いて PKC 下流のエフェクターについて調べた。プロテインキナーゼ D (PKD) は VEGFR-2 シグナルにおいて PLC γ /PKC を介して活性化される Raf-1 のキナーゼであることが報告されている。Sprouty4 の過剰発現により PKD のリン酸化は抑制された。

続いて、PKC の基質としてよく知られている MARCKS の細胞内移動を調べた。MARCKS は無刺激状態では形質膜に局在し、PKC 活性化によって細胞質へ移動することが知られている。GFP を融合させた MARCKS-GFP を導入することによって、MARCKS の移動を共焦点顕微鏡下に生細胞にて観察することが可能である。MARCKS-GFP は VEGF-A 刺激に応じて速やかに形質膜から細胞質へ移動した。しかしこの移動は Sprouty4 の過剰発現により抑えられた。Sprouty^{dC104} は MARCKS の移動を抑えられず、Sprouty^{dN80} は野生型 Sprouty4 と同様の働きを示した。これらの結果より、Sprouty4 はカルボキシ末端 (C 末端) の CR ドメインを介して様々な PKC 下流のシグナル経路を抑制することがいえる。

次に、PKC 活性化に対する Sprouty4 の効果を確かめた。PKC 活性化は細胞内の PKC の移動で測った。PKC 活性化には細胞質から形質膜への移動が必要である。VEGF-A によっておこる PKC δ の移動は Sprouty4 の過剰発現により抑制された。Sprouty^{dC104} は PKC δ の移動を

抑制せず、アミノ末端 (N 末端) の欠損変異体はやはり移動を抑制した。このことから Sprouty4 は C 末端の CR ドメインを介して PKC の上流で作用しているといえる。

PLC γ は PIP₂ に触媒作用を及ぼして、ジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 1,4,5-3 リン酸 (IP₃) を産生する。DAG は PKC を活性化し、IP₃ はカルシウム経路を活性化する。Sprouty4 は膜透過性の DAG アナログである、1,2-ジアクトノイル-sn-グリセロール (DOG) による MARCKS 及び PKC δ の移動は抑制しなかった。また PLC γ 下流のもうひとつのシグナル経路である、IP₃-カルシウム経路を調べたところ、VEGF-A によるカルシウム流動はコントロール細胞において滑らかに惹起されたが、Sprouty4 過剰発現細胞においては強く抑制されていた。これらの結果より、Sprouty4 は DAG より上流で PKC の活性化を抑制しているものと考えられる (下図)。

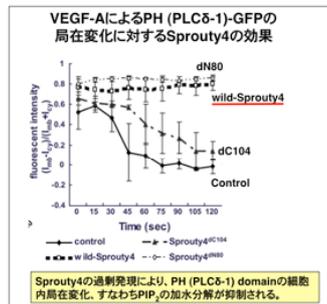


(2) Sprouty4 は VEGF-A による PIP₂ 分解を抑制する

続いて、カルシウム流動の上流のシグナルである、VEGF-A による IP₃ 産生を調べた。HEK293T-VEGFR-2 細胞においても VEGF-A 刺激により IP₃ の蓄積が見られることがわかった。Sprouty4 はこの IP₃ 蓄積を抑制した。Sprouty^{dC104} は VEGF-A による IP 蓄積に対して何も抑制活性を持たず、Sprouty^{dN80} はやはり野生型 Sprouty4 同様抑制効果を示した。

GFP-PLC δ -1 PH ドメインは PIP₂ と IP₃ に選択的に結合することが知られており、PLC 活性化により PLC δ -1 PH ドメインの形質膜から細胞質への解離が惹起される。このことは PIP₂ の加水分解及び IP₃ の細胞質内への放出を意味している。生細胞を用いた系で観察したところ、コントロールの

HEK293T-VEGFR-2細胞においてGFP-PHドメインは VEGF-A 刺激により速やかな形質膜から細胞質への移動を起こした。ところが、Sprouty4 過剰発現細胞ではこの GFP-PH ドメインの移動が強く抑制されていた (右図参照)。Sprouty4 過剰発現は PLC γ -1 の VEGFR-2 への結合に影響を及ぼさないことから、Sprouty4 は PLC γ 活性化を阻害することなく、PIP₂の加水分解を抑制しており、その結果、IP₃と DAG の合成が抑制され、下流のカルシウム流動やPKC活性化がブロックされていたと考えられる。



生理的な Sprouty4 発現レベルにおいて上記の仮説を証明するために、外来の VEGFR-2 を安定発現した Sprouty4 欠損線維芽細胞 (mouse embryonic fibroblast : MEF) を用いた。Sprouty4 欠損 MEF において、VEGF-A による PKC 及び MARCKS の活性化は野生型 (WT) の MEF より亢進しており、かつ遷延していた。また VEGF-A による IP₃ 産生を測定したところ、Sprouty4 欠損 MEF では VEGF-A による IP₃ 蓄積が亢進していた。これらのデータより、Sprouty4 は生理的な発現レベルにおいても PLC γ を介した PIP₂ の分解を抑制していることがわかった。

(3) Sprouty4 は GPCR を介した PIP₂ 分解を抑制する

これまでのデータより、Sprouty4 は PLC γ を介した PIP₂ の分解を抑制することで、下流の PKC 活性化及びカルシウム流動を制御していることが示唆される。Sprouty4 はおそらく CR ドメインを介して PIP₂ と結合し、PLC γ が PIP₂ へアクセスするのを妨害することで PIP₂ 加水分解を抑制していると思われる。この仮説が正しければ、Sprouty4 は成長因子以外の刺激による PIP₂ 分解をも抑制すると考えられる。リソフォスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid: LPA) は G タンパク結合受容体 (G-protein-coupled receptor; GPCR) を介した PLC β/ϵ - IP₃/DAG 経路を活性化することが知られたリガンドである。そこで NIH3T3 細胞を用いて LPA による PLC シグ

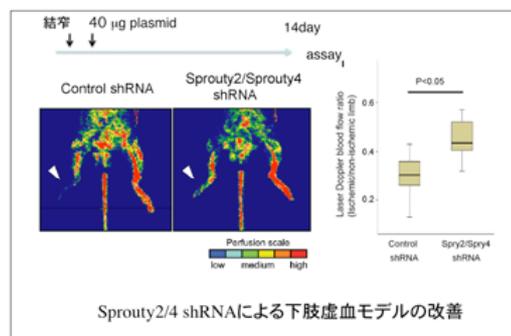
ナルにおける Sprouty4 の効果を調べた。LPA によるカルシウム流動は Sprouty4 の過剰発現により完全に抑制された。同様に、Sprouty4 は LPA による PKC の活性化も抑制した。更に、LPA による PIP₂ 分解も Sprouty4 過剰発現により抑制された。これらの結果から Sprouty4 はチロシンキナーゼによって活性化される PLC γ だけでなく GPCR を介する PLC β/ϵ による PIP₂ の加水分解をも抑制していることが示唆される。

(4) Sprouty4 欠損マウスにおける血管新生の亢進

次に Sprouty4 の個体での機能を明らかにするために、*Sprouty4* KO マウスの血管新生を調べた。*Sprouty4* KO マウス由来の血管内皮細胞では VEGF-A シグナルが過剰に入り、血管密度の増加、血管新生の亢進を認めた。また腫瘍血管の数や虚血モデルにおける新生血管の数も *Sprouty4* KO マウスで多く、Sprouty4 が生理的にも血管形成を負に制御していることが明らかになった。

次に下肢結紮による虚血モデルを施行した。*Sprouty4* KO マウスは WT マウスに比べて結紮による血流低下が優位に少なく、下肢の壊死も少なかった。また結紮後の血管新生も多く、このことが *Sprouty4* KO マウスが虚血に抵抗性を示す原因と思われた。

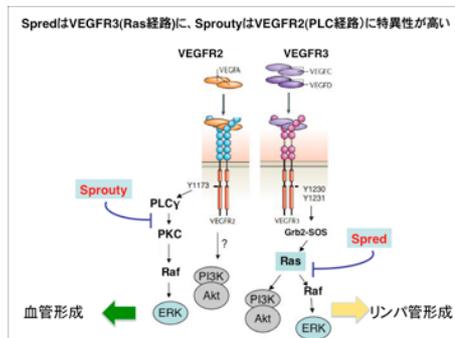
さらにこの現象を治療に応用すべく shRNA を用いて Sprouty2 と Sprouty4 のノックダウン実験を行った。Sprouty2 も Sprouty4 と同様に虚血により発現が上昇するために Sprouty2 も同時にノックダウンすることにした。その結果 *Sprouty2/4* のダブルノックダウンは下肢虚血による血流の低下、下肢の壊死を有為に抑制した。Sprouty の抑制が虚血性疾患の治療法となりうることが示された (下図)。



(5) Sprouty と Spred の差異

我々は Sprouty と Spred の KO マウスや in

in vitro の解析から Sprouty が VEGF-A を介した血管新生の調節に、Spred が VEGF-C を介したリンパ管発生/新生の調節にそれぞれ役割を分担していると考えている。この現象は、VEGFR-3 は Ras 経路を主に使用し、VEGFR-2 は PLC-PKC 経路を主に使用すると仮定するとうまく説明できる。そこで HEK293T 細胞に VEGFR-2 もしくは VEGFR-3 を安定に発現する細胞を調製し、ドミナントネガティブ Ras の効果および PLC, PKC 阻害剤の効果を検証した。その結果 VEGF-A は VEGFR-2 安定発現 HEK293T 細胞において NF- κ B や ERK を活性化した。これらの活性化は PKC 阻害剤である GF109203X で抑制された。更にドミナントネガティブ体の H-Ras (N17) の過剰発現は VEGF-A による NF- κ B や ERK 活性にほとんど影響を及ぼさなかった。これらのことより、HEK293T 細胞において VEGF-A によるシグナルは PKC 依存性であり、Ras-Raf-MEK-ERK 経路は寄与しないことが確認できた。一方 VEGF-C/VEGFR-3 経路はドミナントネガティブ Ras によって著しく阻害を受けた。以上の結果より VEGFR-3 は Ras 経路を主に使用し、VEGFR2 は PLC-PKC 経路を主に使用することが証明された。Spred, Sprouty の作用機序の差異に関する機構を下図に示す。



最近、アフリカツメガエルの消化管形成において、初期の段階では Sprouty が FGF による PLC γ を介したカルシウム流動及び PKC シグナルを抑制するが、ERK 活性化は抑制せず、一方で Spred は ERK 活性化は抑制するものの、カルシウム流出入及び PKC シグナルには影響しないとする報告がなされている (Sivak ら, 2005; Wang ら, 2008)。

構造上、Sprouty は C 末端に高度に保存されたシステインリッチな領域 (CR domain) と変化に富む N 末端から成っている。N 末端領域のチロシン残基 (Sprouty2 では Y55、

Sprouty4 では Y53) をリン酸化できないアミノ酸に置換した Sprouty 変異体は FGF による ERK キナーゼ活性においてドミナントネガティブに働くことがわかっている。そのため、FGF による ERK 活性化を抑制する Sprouty の抑制作用において N 末端のチロシン残基がリン酸化を受けることが必須といえる (Hanafusa ら, 2002; Sasaki ら, 2001)。しかしながら VEGF-A シグナルの場合、Sprouty4 の Y53 を含む N 末端はその抑制作用に必要でなく、むしろ C 末端の CR ドメインが必須である (Sasaki ら, 2003)。したがって Sprouty は FGF と VEGF-A で異なった抑制機構を持つと想像される。

以前の研究で Sprouty2 の CR ドメインは PIP₂ と結合することが報告されている。今回の研究で、おそらく Sprouty4 も CR ドメインを介して PIP₂ と結合し、VEGF-A による PIP₂ の加水分解を抑制していることが示唆された。その結果 Sprouty4 の過剰発現によって PIP₂ の分解に伴うカルシウム流動やさまざまな PKC 下流のシグナル経路が抑制されることがわかった。更に Sprouty4 は LPA による PIP₂ 加水分解をも阻害することがわかった。すなわち Sprouty4 は成長因子のみならず GPCR を活性化するリガンドによって活性化される PLC の抑制因子であるといえる。Sprouty の生理機能は血管新生のみならず形態形成や神経細胞の分化制御など多岐にわたる。今後それぞれの局面での機能解明が待たれる。

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 3 件)

(1) Suppression of Sproutys has a therapeutic effect for a mouse model of ischemia by enhancing angiogenesis. Taniguchi K, Sasaki K, Watari K, Yasukawa H, Imaizumi T, Ayada T, Okamoto F, Ishizaki T, Kato R, Kohno R, Kimura H, Sato Y, Ono M, Yonemitsu Y, Yoshimura A. PLoS One. 2009;4(5):e5467.

(2) Sprouty4 negatively regulates protein kinase C activation by inhibiting phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis.

Ayada T, Taniguchi K, Okamoto F, Kato R,
Komune S, Takaesu G, Yoshimura A.
Oncogene. 2009 Feb 26;28(8):1076-88.

(3) FoxO3a regulates hematopoietic
homeostasis through a negative feedback
pathway in conditions of stress or aging.
Miyamoto K, Miyamoto T, Kato R, Yoshimura A,
Motoyama N, Suda T.
Blood. 2008 Dec 1;112(12):4485-93.

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 玲子 (カトウ レイコ)

国立医薬品食品衛生研究所 療品部 主任研究官

研究者番号 : 00333469

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし