

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590828

研究課題名（和文）血管内皮細胞間接着を標的とした動脈硬化治療戦略開発のための基盤研究

研究課題名（英文）Basic research for development of therapeutic strategy against atherosclerosis targeting interendothelial adhesion

研究代表者

力武 良行 (RIKITAKE YOSHIYUKI)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50419488

研究成果の概要(和文):免疫グロブリン様分子 Necl-5 とアクチン結合蛋白質アフアディンは、血管内皮増殖因子による低分子量 G 蛋白質 Rap1-Akt シグナル伝達経路の活性化を調節して、血管内皮細胞の管腔形成、遊走、増殖、生存を制御した。Necl-5 欠損マウスや血管内皮特異的アフアディン欠損マウスでは大腿動脈結紮後の血管新生が減弱した。したがって、血管内皮の Necl-5 とアフアディンは血管新生を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）: Necl-5, an immunoglobulin-like molecule, and afadin, an actin-binding protein, regulated tube formation, migration, proliferation and survival of vascular endothelial cells by controlling VEGF-induced activation of the Rap1-Akt signaling. Angiogenesis following femoral artery excision was reduced in Necl-5-knockout and endothelium-specific afadin-knockout mice. Our study revealed that Necl-5 and afadin in endothelial cells regulate angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2012年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

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：分子血管病態学、動脈硬化、接着分子、血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化は慢性の血管炎症であり、血管内皮細胞間に発現する細胞接着分子は炎症細胞の内皮下への浸潤に重要な役割を果たしている。

(2) 血管内皮細胞は、細胞膜に発現する受容体やインテグリンなどの細胞接着分子を介して、シグナルを細胞内へ伝達するとともに、隣接する血管内皮細胞や炎症細胞と接着し

て相互にシグナルの授受を行い、血管炎症や血管新生を調節している。

(3) 免疫グロブリン様分子 Necl-5 やアクチン結合蛋白質のアフアディンは細胞の接着、運動、増殖、分化など多彩な細胞機能を制御している。

(4) しかし、血管新生や動脈硬化における Necl-5 やアフアディンの役割は不明である。

2. 研究の目的

(1) 個体レベルでの血管内皮の Necl-5 とアフアディンの生理機能の解明。

(2) 動脈硬化形成における血管内皮の Necl-5 とアフアディンの役割の解明。

3. 研究の方法

(1) 血管新生における Necl-5 の役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における Necl-5 の発現

- マウス下肢毛細血管における Necl-5 の発現を免疫染色にて検討した。
- Necl-5 の mRNA と蛋白の発現はそれぞれ qPCR とウエスタンブロットにて検討した。

② Necl-5 ノックアウトマウスの表現型

- 大腿動脈結紮後の下肢血流の回復をレーザードップラー法にて計測した。

③ Necl-5 による培養血管内皮細胞の機能制御

- 特異的 siRNA により Necl-5 をノックダウンし、血管内皮細胞のマトリゲル上でのネットワーク形成、遊走、増殖、生存を検討した。

④ Necl-5 による VEGF シグナルの制御

- Necl-5 や VEGF 受容体のプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。
- 特異的 siRNA により Necl-5 をノックダウンし、細胞内シグナルの活性化を検討した。

(2) 血管内皮細胞における FGD5 の役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における FGD5 の発現

- マウス組織における FGD5 mRNA の発現を in situ hybridization 法により検討した。
- 培養ヒト血管内皮細胞における FGD5 の局在を蛍光免疫染色にて検討した。

② FGD5 による Cdc42 の活性化

- pull-down アッセイにて検討した。

③ FGD5 による培養血管内皮細胞の機能制御

- 特異的 siRNA により FGD5 をノックダウンし、血管内皮細胞のマトリゲル上でのネットワーク形成、透過性、遊走、増殖、生存を検討した。

④ FGD5 による VEGF シグナルの制御

- ERK のリン酸化をウエスタンブロットにて

て検討した。

(3) 血管新生におけるアフアディンの役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における Rap1 依存性のアフアディンの局在制御

- 恒常活性型 Rap1 や Rap1GAP のプラスミドをトランスフェクションし、免疫染色を行った。

② Rap1 とアフアディンによる培養血管内皮細胞の機能制御

- 特異的 siRNA により Rap1 あるいはアフアディンをノックダウンし、血管内皮細胞のマトリゲル上でのネットワーク形成、遊走、増殖、生存を検討した。

③ Rap1 とアフアディンによる VEGF と S1P シグナルの制御

- Rap1 やアフアディンのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、免疫沈降を行った。
- 特異的 siRNA により Rap1 やアフアディンをノックダウンし、細胞内シグナルの活性化を検討した。

④ 血管内皮特異的アフアディンノックアウトマウスの表現型

- Tie2-Cre マウスとアフアディン floxアウトマウスを交配して、血管内皮特異的アフアディンノックアウトマウスを作成した。
- 大腿動脈結紮後の下肢血流の回復をレーザードップラー法にて計測した。
- マトリゲルプラグアッセイにて血管新生を評価した。

(4) 内臓肥厚形成における Necl-5 の役割とシグナル伝達の制御機構

- Necl-5 の発現を蛍光免疫染色にて検討した。

- 総頸動脈を結紮し、結紮後の内臓肥厚形成を HE 染色にて検討した。

4. 研究成果

(1) 血管新生における Necl-5 の役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における Necl-5 の発現

- 免疫染色にて Necl-5 のシグナルはマウス下肢毛細血管の内皮細胞で強く観察されたが、細動脈レベル以上の太い血管ではほとんどシグナルが観察されなかった。
- 大腿動脈結紮により下肢虚血を誘発すると Necl-5 の発現は mRNA レベル、蛋白レベ

ルにて増加した。

- 培養ヒト血管内皮細胞において低酸素下で培養すると、Nec1-5 の発現は増加した。

② Nec1-5 ノックアウトマウスの表現型

- Nec1-5 ノックアウトマウスの血管の発育には異常を認めなかった。
- 大腿動脈結紮による下肢慢性虚血モデルにおいて、Nec1-5 ノックアウトマウスでは、対照の野生型マウスに比べて、下肢血流の回復が遅延しており、血管新生が減弱していた。

③ Nec1-5 による培養血管内皮細胞の機能制御

- Nec1-5 特異的 siRNA により Nec1-5 をノックダウンした血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答したマトリゲル上でのネットワーク形成が減弱していた。
- 同様に、VEGF に応答した細胞の遊走と増殖も減弱していた。反対に、血清飢餓により誘導されるアポトーシスは亢進していた。
- 以上の結果から、Nec1-5 は血管内皮細胞の管腔形成や遊走、増殖、生存を制御していることが明らかになった。

④ Nec1-5 による VEGF シグナルの制御

- Nec1-5 は細胞外領域を介して VEGF 受容体と結合していた。
- VEGF に応答して VEGF 受容体とインテグリン alphaV beta3 との結合は亢進し、細胞内シグナルの活性化を促進する。Nec1-5 ノックダウン血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答した VEGF 受容体とインテグリン alphaV beta3 との結合は抑制されていた。
- VEGF に応答して Rap1-ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ-Akt シグナル伝達経路は活性化される。Nec1-5 ノックダウン血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答した Rap1-ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ-Akt シグナル伝達経路の活性化は抑制されていた。

以上の結果から、血管内皮細胞の Nec1-5 は VEGF による細胞内シグナルの活性化を調節して、血管内皮細胞の管腔形成、遊走、増殖、生存を制御し、血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(2) 血管内皮細胞における FGD5 の役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における FGD5 の発現

- FGD5mRNA はマウス組織のうち、血管の豊

富な組織である肺、腎臓、卵巣に多く発現していた。

- ヒトの培養細胞では、FGD5 の mRNA および蛋白は血管内皮細胞に選択的に発現していた。
- マウス胎児において FGD5mRNA のシグナルは体節間や脳などの血管で強く観察された。
- マウス新生児の網膜において FGD5mRNA のシグナルは静脈優位に血管で観察された。また、網膜周辺の血管新生の盛んな領域でより強いシグナルが観察された。
- 培養ヒト血管内皮細胞において FGD5 は運動先端端に局在していた。

② FGD5 による Cdc42 の活性化

- FGD5 は低分子量 G タンパク質の Cdc42 を活性化したが、TC10 (RhoQ) や TCL (RhoJ) は活性化されなかった。
- FGD5 特異的 siRNA により FGD5 をノックダウンした血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答した Cdc42 の活性化が減弱していた。

③ FGD5 による培養血管内皮細胞の機能制御

- FGD5 をノックダウンした血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答したマトリゲル上でのネットワーク形成が減弱していた。同様に、VEGF に応答した透過性も減弱していた。
- FGD5 ノックダウン血管内皮細胞では、VEGF に応答した細胞の遊走は減弱しており、遊走時の極性形成も障害されていた。
- FGD5 ノックダウン血管内皮細胞では、VEGF に応答した細胞の増殖は減弱していたが、血清飢餓により誘導されるアポトーシスには変化がなかった。
- 以上の結果から、Nec1-5 は血管内皮細胞の管腔形成や透過性、遊走、増殖、極性を制御していることが明らかになった。

④ FGD5 による VEGF シグナルの制御

- VEGF に応答して ERK はリン酸化される。FGD5 ノックダウン血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF に応答した ERK のリン酸化は抑制されていた。
- しかし、Cdc42 をノックダウンしても ERK のリン酸化には変化がなかった。
- 以上の結果から、FGD5 は Cdc42 を介さずに ERK シグナルの活性化を制御していることが明らかになった。

以上の結果から、FGD5 は血管内皮細胞に選択的に発現しており、Nec1-5 は VEGF による細胞内シグナルの活性化を調節して、血管内皮細胞の管腔形成や透過性、遊走、増殖、極性を制御していることが明らかになった。

(3) 血管新生におけるアフアディンの役割とシグナル伝達の制御機構

① 血管内皮における Rap1 依存性のアフアディンの局在制御

- アフアディンは恒常活性型 Rap1 により恒常活性型 Rap1 と細胞膜に共局在した。一方、Rap1 を不活化する Rap1GAP により細胞膜に局在しなくなった。
- 培養ヒト血管内皮細胞において、VEGF やスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) により Rap1 は運動先端端において活性化され、アフアディンは運動先端端で Rap1 と共局在した。

② Rap1 とアフアディンによる培養血管内皮細胞の機能制御

- 特異的 siRNA により Rap1 あるいはアフアディンをノックダウンした血管内皮細胞では、対照の血管内皮細胞に比べて、VEGF や S1P に応答したマトリゲル上でのネットワーク形成が減弱していた。
- 同様に、VEGF や S1P に応答した細胞の遊走と増殖も減弱していた。反対に、血清飢餓により誘導されるアポトーシスは亢進していた。
- Rap1 あるいはアフアディンをノックダウンした血管内皮細胞では、細胞間接着装置のアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションの分子の細胞間への集積は障害されていた。
- 以上の結果から、Rap1 とアフアディンは血管内皮細胞の管腔形成や遊走、増殖、生存、細胞間接着を制御していることが明らかになった。

③ Rap1 とアフアディンによる VEGF と S1P シグナルの制御

- Rap1 あるいはアフアディンをノックダウンした血管内皮細胞では、VEGF や S1P に応答した Akt-eNOS シグナル伝達経路の活性化は減弱していたが、ERK や p38 シグナルの活性化は変化がなかった。
- Rap1 あるいはアフアディンをノックダウンした血管内皮細胞では、VEGF や S1P に応答した VEGF 受容体とホスファチジルイノシトール 3 キナーゼの結合は減弱していた。
- 以上の結果から、Rap1-アフアディン系はホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ-Akt シグナル伝達経路の活性化を調節していることが明らかになった。

④ 血管内皮特異的アフアディンノックアウトマウスの表現型

- 血管内皮特異的アフアディンノックアウト

トマウスを作成したところ、ほとんどのマウスが胎生致死となったが、胎生致死に至らなかったマウスでは、対照マウスに比べて生後の網膜血管網の発育は遅延していた。

- 血管内皮特異的アフアディンノックアウトマウスでは、VEGF や S1P により誘導される血管新生が抑制されていた。
- 大腿動脈結紮による下肢慢性虚血モデルにおいて、血管内皮特異的アフアディンノックアウトマウスでは、対照マウスに比べて下肢血流の回復が遅延しており、血管新生が減弱していた。

このように Rap1-アフアディン系は、ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ-Akt の活性化を調節して様々な血管内皮細胞機能を制御しており、細胞レベルのみならず、個体レベルにおいても血管新生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

(4) 内膜肥厚形成における Necl-5 の役割とシグナル伝達の制御機構

- Necl-5 は、結紮後の肥厚したマウス総頸動脈において発現が上昇していた。Necl-5 のシグナルは、新生内膜と中膜において、脱分化型平滑筋細胞のマーカーである SMem 陽性の平滑筋細胞に強く観察された。
- Necl-5 ノックアウトマウスは、総頸動脈結紮後の内膜肥厚形成が減弱していた。

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 7 件)

①Yusuke Kurogane, Yoshiyuki Rikitake, et al., FGD5 mediates pro-angiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vascular endothelial cells, Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 査読有, 32 巻, 2012 年, pp. 988-996

DOI: 10.1161/ATVBAHA.111.244004

②Kinugasa Mitsuo, Yoshiyuki Rikitake, et al., Necl-5/Poliovirus Receptor Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis, Circulation Research, 査読有, 110 巻, 2012 年, pp. 716-726

DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.111.256834

③Hideto Tawa, Yoshiyuki Rikitake, et al., Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine

1-Phosphate-Induced Angiogenesis,
Circulation Research, 査読有, 106 巻, 2010
年, pp.1731-1742
DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.216747

〔学会発表〕(計16件)

① Fumie Kureha, et al., Nectin-like
Molecule-5 Regulates Formation of Intimal
Thickening in Mouse Carotid Artery and
Phenotypic Reversion of Vascular Smooth
Muscle Cells, Scientific Sessions 2012,
American Heart association, 2012年11月,
Los Angeles, USA

② Mitsuo Kinugasa, et al.,
Nectin-5/PVR/CD155, an Immunoglobulin-like
Cell Adhesion Molecule, Regulates
Vascular Endothelial Growth
Factor-Induced Angiogenesis, ISA2012,
2012年3月25日～29日, Sydney, Australia,

〔図書〕(計1件)

① Yoshiyuki Rikitake, Yoshimi Takai,
Elsevier, Int Rev Cell Mol Biol.,
Directional Cell Migration: Regulation by
Small G Proteins, Nectin-like Molecule-5,
and Afadin, 2011年, pp.97-143

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/sigtra/Signal%20Transduction/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

力武 良行 (RIKITAKE YOSHIYUKI)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：50419488

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者 なし
()

研究者番号：