

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 24年 5月 21日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780262

研究課題名（和文） 血管新生における Eph/ephrin シグナルの機能解析

研究課題名（英文） Function analysis of Eph/ephrin signals in angiogenesis

研究代表者

石井 万幾 (ISHII MAKI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号：50415535

研究成果の概要（和文）：

本研究は、血管新生時の白血球の血管内皮細胞への接着や血管外浸潤に対するEph/ephrinの機能を解析することを目的とし、in vivoでの機能解析のための基礎データの取得と、血管内皮細胞および血球系細胞を用いた機能解析を行った。まず、生体における血管でのEph/ephrinの発現・局在を確認し、次に、血球系細胞および血管内皮細胞のEphないしephrinへの接着性および細胞内骨格の動態を確認した。これらの結果から、Eph/ephrinシグナルによって、血球細胞側では偽足の形成、血管内皮細胞側では膜退縮による細胞間隙の開大が起こり、血球が血管内皮細胞間を通過する遊走経路を形成することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In this study, it is intended to determine the function of Eph/ephrin in leucocyte-adhesion and inversion in angiogenesis. To require the data, preliminary experiments and functional analyses were conducted. It was determined that Eph/ephrin were expressed in blood vessels, and they adhered to leukocyte/macrophage and endothelial cells with cell processes contained high density actin fiber. These results indicate that the intercellular migration pathway for blood cells is formed by the pseudopodia of blood cells and the dilation of intercellular space by the membrane retraction in endothelial cells.

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	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：Eph, ephrin, 血管新生, マクロファージ, 血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 受容体型チロシンキナーゼ(RTK)である

EphはAとBの2種類に分類される膜タンパクで、RTKの中では最大のファミリーを構成

し、EphA は A1 から A8、EphB は B1 から B6 のサブクラスに分類される。Eph は、リガンドである ephrin と結合することで四量体を形成して自己リン酸化し、Rho や Rac、FAK など種々のシグナルカスケードを介して細胞接着や細胞骨格再編等、細胞の様々な機能を調節する多機能型のタンパクである。Eph/ephrin シグナルは発生期における神経や血管のネットワーク形成といったような組織構築に貢献していることが報告されているが、同時に成体における発現も報告されている。その主なものが腫瘍形成時、炎症時の新生血管での Eph/ephrin の発現である。これらのことから、腫瘍悪性化や腫瘍・炎症時の血管形成に Eph/ephrin が何らかの機能を有していると考えられているものの、その分子機構は未だ不明な点が多い。

(2) 腫瘍形成や炎症でみられる血管の新生は、種々の血管新生促進因子の発現促進あるいは血管新生抑制因子の発現抑制により亢進される。これらの因子の発現は炎症性細胞の浸潤や出血などにより調節が行われていることが知られており、炎症性細胞であるマクロファージも血管新生促進因子を分泌することが分かっている。すなわち、炎症部位や固形腫瘍で TNF- α のような炎症性サイトカインが誘導されると、1) 白血球表面にセレクチンが発現、2) セレクチンを介して白血球と血管内皮細胞が接着、3) 白血球表面にインテグリン、血管内皮細胞表面に ICAM-1 や VCAM-1 が発現、4) 白血球が血管内皮細胞間をすり抜けて血管外へ浸潤、5) 白血球が血管外でマクロファージに分化、6) マクロファージが VEGF などの血管新生促進因子を分泌、という過程を経る。これらの分子については多くの報告があるものの、Eph/ephrin シグナルが、血球の血管外浸潤に与える影響については報告がない。

2. 研究の目的

本研究を遂行するにあたり、現在までに、1) 白血球/マクロファージに Eph/ephrin が発現している、2) 血管内皮細胞株に Eph と ephrin が発現している、3) TNF- α 刺激により血管内皮細胞、マクロファージともに Eph の発現が増加する、4) 腫瘍血管に Eph と ephrin が発現する、5) Eph/ephrin シグナル阻害で血管の管状構造形成が阻害される、ということが明らかになっている。これらのことから、腫瘍形成時や炎症における血管の新生に Eph/ephrin シグナルが何らかの機能を有していることが考えられる。そこで、Eph/ephrin が白血球の血管浸潤に関わる新規の分子として考えられ、腫瘍形成や炎症時の血管新生に関わる白血球の血管内皮細胞への接着と、血管外浸潤についての新たなメ

カニズムを明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) ノックダウン用レンチウイルスベクターの作製と効果の検討：Eph および ephrin 遺伝子について、発現抑制効果があると予測された配列を組み込んだ shRNA を発現する non-viral プラスミドベクターを作成する。培養細胞株 COS-7 に導入し、遺伝子発現抑制効果を検討する。次に、これらの shRNA 配列をレンチウイルスベクターに組み込み、血球系細胞および血管内皮系細胞に感染させる。

(2) Eph/ephrin の発現解析：mRNA の局在の解析として in situ hybridization、タンパクの局在解析として免疫組織染色を、成体マウス心臓血管系組織で確認する。また、J774.1、マウス腹腔マクロファージ、ヒト血管内皮細胞株 HUVEC を用いて、炎症性反応モデルとして TNF- α 刺激を行った際の Eph/ephrin 発現量の変化を RT-PCR で確認する。

(3) Eph/ephrin への血球細胞の接着性の確認：ディッシュ上に縞状に Eph ないし ephrin をコートし、J774.1 あるいはマウス腹腔マクロファージを播種する。細胞の接着性をタイムラプスで観察する。接着した細胞については、ファロイジン染色でアクチン線維を観察する。

(4) Eph/ephrin シグナルによる血管内皮細胞の動態の確認：Eph ないし ephrin を吸着させたビーズを HUVEC に添加して見られる細胞の動態を、タイムラプスで観察する。なお、炎症性反応モデルとして、TNF- α の添加を行う。さらに、アクチン線維についてもファロイジン染色で確認する。

4. 研究成果

(1) RNAi 効果の判定とレンチウイルスの有用性の確認：Eph および ephrin について、RNAi 効果があると予測される配列 3 ヶ所を候補に挙げ、shRNA 発現ベクターである pRNAT-H1 に組み込んだ。これらのベクターを、培養細胞である COS-7 (同時に Eph ないし ephrin を強制的に発現) に導入し、RT-PCR で遺伝子発現抑制効果を判定したところ、いずれの配列についても発現量の減少が見られた (図 1)。特に強くノックダウン効果が見られた配列について、shRNA 発現レンチウイルスベクターに乗せ換え、ウイルス粒子の作製を行った。これらのウイルス粒子を用いて COS-7 や J774.1 などの培養細胞に感染することを確認した後、マウス成体の尾静脈に注入して血

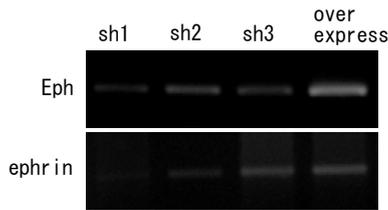


図1 shRNAのノックダウン効果の判定
Ephあるいはephrin遺伝子を強制発現させたもの(over express)と比較して、RNAi 効果があると予測される配列の3候補(sh1, sh2, sh3)で発現量が減少した。

管内皮細胞に感染するかどうかの判定を行った。しかしながらこの手法では、成体組織への有効な感染力が得られず、機能解析することができなかつたため、改善策として、高感染力価のウイルス精製や注入方法の改変等を行っている。レンチウイルスを用いた実験は一般的に *in vitro* での解析に用いた報告しかない。そのため、成体への感染実験は困難であると考えられるが、今後も手法の改善を行い、有用な解析ツールとして確立することを目指す。

(2) Eph/ephrin の発現解析 : *in situ* hybridizationの結果、ephrinはすべてのサブクラスで、Ephについては、一部のサブクラスで管内皮細胞に発現が見られた(図2 上段矢印)。さらに免疫染色で、管内皮細胞のマーカーであるCD31との共染が見られた(図2 下段矢印)。

また、J774.1、腹腔マクロファージ、HUVECについてEphおよびephrinの発現をRT-PCRで確認したところ、特にEphAとephrin-Aの発現が見られ、TNF- α 刺激により、これらの発現量が増加が見られた。

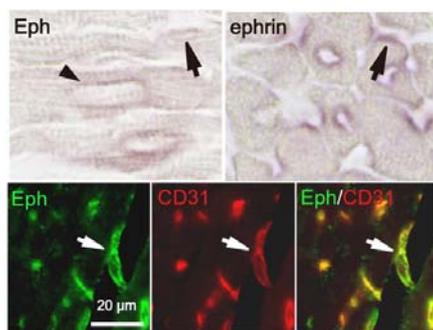


図2 発現局在の確認
in situ hybridization(上段)と免疫染色(下段)。矢印: 管内皮細胞。

(3) Eph/ephrinの細胞接着性: J774.1および腹腔マクロファージにおいて、Ephおよびephrinの両分子に対して高い接着性が観察された(図3)。

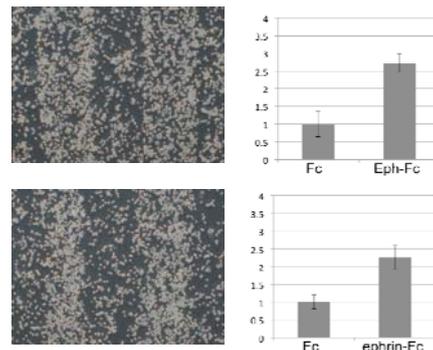


図3 Ephおよびephrinの細胞接着性の確認
Ephあるいはephrinを綿状にコートし、各々に対する細胞の接着性を確認した。各分子がコートされている領域で、高密度で細胞が接着した。

さらにこれらの接着した細胞には、アクチン線維束の芯を有する突起が見られた。これらの突起は、Eph/ephrinシグナルによって形成された血球系細胞の偽足である考えられる。

(4) Eph/ephrinシグナルによる血管内皮細胞の動態: Ephないしephrinを吸着したビーズをHUVECに添加すると、ephrin吸着ビーズにおいて、添加後5分で細胞へのビーズの接着が見られた。しかしながらEph吸着ビーズでは、血管内皮細胞への接着はほとんど見られなかった。さらに、ephrin吸着ビーズの添加後15~20分で、一過性の膜退縮が見られた(図4)。このephrin吸着ビーズにおいてアクチン線維を染色すると、接着したビーズに対応するようにリング状にアクチン線維の構造体が形成されていた。このことから、血管内皮細胞ではEph/ephrinシグナルが発生することで、膜退縮による内皮細胞間に間隙を形成されることが示唆された。

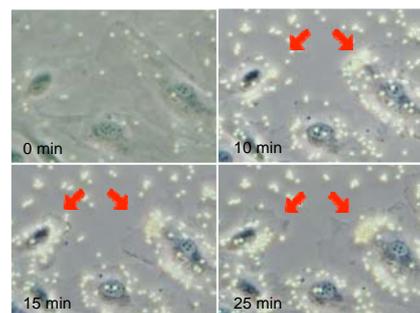


図4 Eph/ephrinシグナルによる細胞の動態
HUVECにEphないしephrinを吸着したビーズを添加し、タイムラプスで観察した。ephrin吸着ビーズ添加で膜退縮が見られた(矢印)。

これらの結果から、成体血管において血管内皮細胞と白血球/マクロファージで発現するEph/ephrinは、炎症性反応等で見られる血管新生時に発現が増強し、Eph/ephrinシグナルを生み出す。このシグナルにより、血球/マクロファージ側では運動性に関与する偽

足の形成を、血管内皮細胞側では白血球/マクロファージが血管外に浸潤するための経路を形成するための膜の退縮を引き起こすことが示唆された。これまで、血管新生における白血球/マクロファージの血管外遊走についての分子メカニズムはほとんど理解されていなかった。本研究の成果は、血管新生時における Eph/ephrin シグナルの新たな機能が明らかになっただけでなく、血管新生時の血球-内皮細胞間の相互作用を新規に解明したものである。

(2) 研究分担者 ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者 ()

研究者番号 :

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 Ishii M, Mueller I, Nakajima T, Pasquale EB, Ogawa K. EphB signaling inhibits gap junctional intercellular communication and synchronized contraction in cultured cardiomyocytes. Basic Res Cardiol. 査読有 106(2011) 1057-1068.
- ② Mueller I, Kobayashi R, Nakajima T, Ishii M, Ogawa K. Effective and steady differentiation of a clonal derivative of P19CL6 embryonal carcinoma cell line into beating cardiomyocytes. J Biomed Biotechnol. 査読有 2010. 380561.
- ③ Nishimura K, Ishii M, Kuraoka M, Kamimura K, Maeda N Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. Neuroscience. 査読有 164(2010) 1535-1547.

[学会発表] (計3件)

- ① 佐伯法学, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重. 単球/マクロファージと血管内皮細胞に発現する EphA2 と ephrin-A1 が接着に及ぼす影響. 第 87 回日本解剖学会近畿支部学術集会. 2011 年 (兵庫)
- ② 佐伯法学, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重. 単球/マクロファージと血管内皮細胞に発現する EphA2 と ephrin-A1. 第 152 回日本獣医学会学術集会. 2011 年 (大阪)
- ③ ミユラー樹, 石井万幾, 中島崇行, 小川和重. 心筋細胞における EphB の活性化とギャップ結合型情報伝達の阻害. 第 150 回日本獣医学会学術集会. 2010 年 (北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 万幾 (ISHII MAKI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・助教

研究者番号 : 5 0 4 1 5 5 3 5