

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293078

研究課題名(和文) RhoJによる内皮細胞運動と血管網パターン形成の制御機構

研究課題名(英文) RhoJ-mediated regulation of endothelial cell movements and vascular patterning

研究代表者

植村 明嘉 (Uemura, Akiyoshi)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30373278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：新生血管における内皮細胞の遊走運動は、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)やセマフォリン3E(Sema3E)などの走化性因子により制御されるが、個々の内皮細胞が多様な外部シグナルを如何にして統合し、運動方向を決定するのかについては不明であった。本研究では低分子量G蛋白質RhoJが、VEGFとSema3Eによる細胞内シグナル伝達を媒介し、内皮細胞の運動方向を制御することを明らかにした。さらにRhoJが、網膜における生理的および病的血管新生のいずれをも制御することを明らかにした。本研究の成果は血管に限らず、軸索誘導による神経ネットワーク構築の理解にも応用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In newly formed blood vessels, migratory behaviors of angiogenic endothelial cells (ECs) are controlled by various attractive and repulsive signals, including vascular endothelial growth factor (VEGF) and semaphorin 3E (Sema3E). However, it remains unclear how individual ECs determine their migratory directions by integrating these extrinsic signals. In this research program, we discovered that a small GTPase RhoJ regulates directional EC movements by mediating intracellular signals downstream of both VEGF and Sema3E. We further identified that RhoJ modulates vascular patterning in developing retinas as well as in oxygen-induced retinopathy. Together, our present results will contribute to the understanding of molecular and cellular mechanisms underlying morphogenetic patterning, not only in vasculature but also in neural networks in which axonal guidance is cooperatively navigated by attractive and repulsive cues.

研究分野：血管生物学、眼科学

キーワード：RhoJ VEGF Sema3E 血管新生 内皮細胞 シグナル伝達 網膜 腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

個体の発生過程では、組織内低酸素に応じて血管内皮細胞が遊走し、高次血管網構造を形成する。一方、癌や糖尿病網膜症にみられる低酸素では、無秩序な血管新生が病態をさらに悪化させる。いずれの状態においても、血管内皮細胞の遊走運動は Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) や semaphorin 3E (Sema3E) などの外部シグナルにより制御される。しかし、個々の内皮細胞が多様な外部シグナルを如何にして統合し、運動方向を決定するのかについては不明であった。

血管内皮細胞では、RhoA, Rac1, Cdc42 などの Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質が外部刺激に応じて細胞骨格や基質との接着を再構成し、遊走運動を制御する。我々は新生血管内皮細胞において、Sema3E が PlexinD1 受容体に結合すると RhoJ を活性化し、細胞内アクチン線維の脱重合を誘導して糸状仮足の形成を抑制することを明らかにしていた (Fukushima et al. J Clin Invest. 2011)。一方、内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ受容体 VEGFR2 に VEGF が結合すると、RhoJ が遊走運動を促進することが報告されていた (Kaur et al. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011)。これらのことから、RhoJ が VEGF および Sema3E シグナルのいずれにおいても内皮細胞の遊走運動を制御する可能性が示唆されていたが、その分子機構は明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

新生血管の内皮細胞において、低分子量 G 蛋白質 RhoJ が遊走運動を制御する仕組みを解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) 内皮細胞における RhoJ の局在

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、細胞外からの刺激に応じて GTP 結合活性型と GDP 結合不活性型を推移することにより、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとしてはたらく。本研究では、培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) における GTP/GDP 型 RhoJ と、VEGFR2 および PlexinD1 の細胞内局在について検討した。

### (2) Sema3E シグナルにおける RhoJ の役割

膜貫通型受容体蛋白質である PlexinD1 の細胞外ドメインは、リガンド非存在下では折りたたまれた構造をとっており、細胞内シグナル伝達を自己抑制している。一方、N 末端の Sema ドメインに Sema3E が結合すると、細胞外ドメインとともに細胞内ドメインのコンフォメーションが変化してシグナルが伝達される。PlexinD1 細胞内ドメインには、2 つの R-Ras GTPase-activating protein (GAP) ドメインに挟まれて Rho-binding

domain (RBD) が存在するが、本研究では RBD 欠失 PlexinD1 変異体 (PD1 ΔRBD) を作成し、Sema3E-PlexinD1 シグナルの下流で RhoJ が活性化される分子機構を解析した。さらに、Sema3E-PlexinD1-RhoJ シグナルが細胞収縮に及ぼす影響を評価するため、培養 HUVEC に PlexinD1 および RhoJ 遺伝子に対する small interfering RNA (siRNA) を導入し、個々の細胞面積を計測した。

### (3) VEGF シグナルにおける RhoJ の役割

VEGFR2 は PlexinD1 および Neuropilin-1 (Nrp1) のいずれとも複合受容体を形成する一方で、PlexinD1 も Nrp1 と複合受容体を形成することから、培養 HUVEC における VEGFR2、PlexinD1、Nrp1 の細胞内局在を解析した。また、VEGFR2 に VEGF が結合すると、エンドサイトーシスにより VEGFR2 が細胞内に取り込まれて MAP キナーゼ経路や PI3 キナーゼ経路などを活性化した後、VEGFR2 蛋白質が分解される。本研究では VEGF 刺激に伴う細胞内シグナル伝達分子の活性化機構における RhoJ の役割について解析した。

### (4) 生理的および病的網膜血管新生における RhoJ の役割

RhoJ 遺伝子欠失マウス (RhoJ-KO マウス) を作成し、新生仔期の網膜血管発生過程を観察した。また、RhoJ コンディショナルノックアウトマウス (RhoJ-cKO マウス) を作成し、これを内皮細胞において Cre 組換え酵素-タモキシフェン受容体融合蛋白質を発現するマウスと交配させ、生後 7 日から 12 日まで高酸素に曝露して酸素誘導網膜症 (oxygen-induced retinopathy, OIR) モデルを作成した。

## 4. 研究成果

### (1) 内皮細胞における RhoJ の局在

野生型 (wild-type, WT) および恒常活性型 (constitutively active, CA) RhoJ 遺伝子を導入した内皮細胞では、RhoJ 蛋白質が核周辺部エンドソームにおいて内在性 PlexinD1 蛋白質と共局在することが認められた。一方、ドミナントネガティブ型 (dominant negative, DN) RhoJ は細胞質および核内において内在性 VEGFR2 と共局在していた。同様に RhoJ、VEGFR2、PlexinD1 遺伝子を導入した 293T 細胞における共免疫沈降実験でも、WT-RhoJ および CA-RhoJ 蛋白質が PlexinD1 蛋白質と複合体を形成するのに対し、DN-RhoJ 蛋白質は VEGFR2 蛋白質と複合体を形成することが確認された。これらの結果から、内皮細胞において RhoJ は GTP 型から GDP 型への変換に伴い、PlexinD1 から VEGFR2 に移行すると考えられた。

(2) Sema3E シグナルにおける RhoJ の役割  
PD1 ΔRBD 遺伝子を導入した 293T 細胞では、RhoJ と PlexinD1 の蛋白質複合体形成が阻害

された。同様に、細胞外ドメインを欠失した PlexinD1 変異体 (PD1 ΔECD) 遺伝子の導入や、Sema3E リガンド刺激でも、RhoJ-PlexinD1 複合体形成が阻害された。これらの結果から、GTP 型 RhoJ は Sema3E 非存在下において PlexinD1 の RBD に結合するが、Sema3E 刺激により細胞内に遊離すると考えられた。また、非特異的 siRNA 導入 HUVEC では、Sema3E 刺激により細胞面積が有意に減少したのに対し、RhoJ ノックダウン HUVEC では Sema3E 存在下でも細胞面積に変化はなかった。一方、PlexinD1 ノックダウン HUVEC では、Sema3E 刺激がなくとも細胞面積が有意に減少したが、これは RhoJ と PlexinD1 の同時ノックダウンにより部分的に回復した。これらの結果から、Sema3E 非存在下では PlexinD1 が RhoJ を捕捉することにより細胞収縮を阻害するのに対し、Sema3E 刺激により PlexinD1-RBD から遊離した RhoJ がアクチン脱重合を介して細胞収縮を誘導すると考えられた。

### (3) VEGF シグナルにおける RhoJ の役割

培養 HUVEC において、VEGF 非存在下では Nrp1 と PlexinD1 はエンドソームにおいて共局在するのに対し、VEGFR2 は主にゴルジ体に局在していた。一方、HUVEC を VEGF で刺激すると、VEGFR2、PlexinD1、Nrp1 が核周辺エンドソームに共局在した。驚くべきことに、RhoJ ノックダウン HUVEC では VEGF 刺激下でも VEGFR2 蛋白質が PlexinD1-Nrp1 複合体と解離して単独でエンドソームに局在した。実際に、共免疫沈降実験でも RhoJ ノックダウンにより、VEGF 刺激に伴う VEGFR2-PlexinD1 蛋白質複合体形成が阻害されることが明らかとなった。RhoJ ノックダウン HUVEC では VEGFR2 蛋白質の分解が加速され、AKT、PLC  $\gamma$ 、ERK1/2 のリン酸化が前倒しになるとともに、その持続時間が短縮した。これらの結果から、内皮細胞における VEGF 刺激では、PlexinD1 に結合する RhoJ が VEGFR2-PlexinD1-Nrp1 複合受容体の形成を促進することにより、細胞内に取り込まれた VEGFR2 蛋白質の分解を防ぎ、シグナル伝達を持続させると考えられた。

### (4) 生理的および病的網膜血管新生における RhoJ の役割

RhoJ-KO マウスでは、網膜血管発生が有意に遅延した。また、内皮細胞特異的 RhoJ-cKO マウスにて OIR モデルを作成し、生後 12 日から連日タモキシフェンを腹腔内投与すると、網膜外に逸脱する異常血管新生が有意に減少した。これらの結果から RhoJ は生理的血管発生および病的血管新生のいずれにおいても重要な役割を持つことが明らかとなった。

### 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 14 件)

1. D'Amato G, Luxán G, del Monte-Nieto G, Martínez-Poveda B, Torroja C, Walter W, Bochter MS, Benedito R, Cole S, Martinez F, Hadjantonakis AK, Uemura A, Jiménez-Borreguero LJ, de la Pompa JL. Sequential Notch activation regulates ventricular chamber development. *Nat Cell Biol.* 18:7-20, 2016. 査読有. DOI: 10.1038/ncb3280.
2. Sugihara K, Nishiyama K, Fukuhara S, Uemura A, Arima S, Kobayashi R, Köhn-Luque A, Mochizuki N, Suda T, Ogawa H, Kurihara H. Autonomy and non-autonomy of angiogenic cell movements revealed by experiment-driven mathematical modeling. *Cell Rep.* 13:1814-1827, 2015. 査読有. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.10.051.
3. Yang WJ, Hu J, Uemura A, Tetzlaff F, Augustin HG, Fischer A. Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis. *EMBO Mol Med.* 7:1267-1284, 2015. 査読有. DOI: 10.15252/emmm.201404922.
4. Kim C, Yang H, Fukushima Y, Saw PE, Lee J, Park JS, Park I, Jung J, Kataoka H, Lee D, Heo WD, Kim I, Jon S, Adams RH, Nishikawa S, Uemura A, Koh GY. Vascular RhoJ is an effective and selective target for tumor angiogenesis and vascular disruption. *Cancer Cell.* 25:102-117, 2014. 査読有. DOI: 10.1016/j.ccr.2013.12.010.
5. Shimizu I, Yoshida Y, Moriya J, Nojima A, Uemura A, Kobayashi Y, Minamino T. Semaphorin3E-induced inflammation contributes to insulin resistance in dietary obesity. *Cell Metab.* 18:491-504, 2013. 査読有. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.09.001.

### [学会発表] (計 14 件)

1. Uemura A: Novel molecular targets for the treatment of diabetic retinopathy. International Conference on Diabetes and Metabolism. 2014年10月18日. イルサン (韓国)
2. Uemura A: RhoJ defines angiogenic endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals. 18<sup>th</sup> International Vascular Biology Meeting. 2014年4月14日. みやこめっせ (京都府・京都市)
3. Uemura A: RhoJ defines endothelial cell motility by integrating VEGF and Sema3E signals. EMBO Workshop. Semaphorin function and mechanism of

action. 2013年10月30日. パリ (フランス)

4. Uemura A: RhoJ defines endothelial cell motility by integrating VEGF and Semaphorin 3E signals. Gordon Research Conference. Angiogenesis. 2013年8月8日. ニューポート (米国)
5. Uemura A: RhoJ integrates VEGF and Semaphorin 3E signals in angiogenic endothelial cells. 26<sup>th</sup> Spring Congress of the Korean Diabetes Association & 1st Korea-Japan Diabetes Forum. 2013年5月10日. 済州島 (韓国)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: METHOD FOR TARGETING VASCULAR RHOJ FOR INHIBITING TUMOR ANGIOGENESIS

発明者: Koh GY, Kim C, Yang H, Heo WD, Kim I, Jon S, Uemura A

権利者: Korea Advanced Institute of Science and Technology (KAIST)

種類: US Patent Application

番号: 20140370079

出願年月日: 2014年5月6日

国内外の別: 国外

[その他]

ホームページ

<http://ncu-ganka.jp/ended-chair>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植村 明嘉 (UEMURA, Akiyoshi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 30373278

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

福嶋 葉子 (FUKUSHIMA, Yoko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 70647031

望月 直樹 (MOCHIZUKI, Naoki)

独立行政法人国立循環器病研究センター

一・細胞生物学部・部長

研究者番号: 30311426

西山 功一 (NISHIYAMA, Koichi)

熊本大学・国際先端医学研究機構・特任准教授

研究者番号: 80398221

三浦 岳 (MIURA, Takashi)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号: 10324617