

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460491

研究課題名(和文) 糖尿病血管障害発症における血管安定性制御システム破綻の病態的意義に関する研究

研究課題名(英文) Study regarding pathophysiological significance of failure of vessel stability-induced system in diabetes mellitus-associated microvasculopathy

研究代表者

鬼丸 満穂 (Onimaru, Mitsuho)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00380626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮細胞が発現するチロシンキナーゼ型受容体Tie-1の可溶型変換システムの糖尿病病態における意義を明らかにするため、Tie-1可溶型変換のTie-1とTie-2の機能的相互作用に及ぼす影響を検討した。結果として、糖鎖修飾の異なる2種類のTie-1は、それぞれ固有の生化学的特性を背景にangiopoietin(Ang)/Tie 連関のシグナル制御分子としての役割を担い、中でもTie-1可溶型変換機構はTie-1、Tie-2活性バランスを環境依存性に变化させ、血管新生過程において重要な制御システムとして機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigate the biological/biochemical role of Tie-1 shedding in the angiopoietin (Ang)/Tie system in human endothelial cells. Experimental data obtained through this study suggest that the two types of glycosylation-dependent full length Tie-1 play biologically/biochemically different roles in the Ang/Tie system, and PKC-dependent rapid Tie-1 shedding might act as an angiogenic switch via a change of signal balance between Tie-2 and Tie-1. Failure of the PKC-dependent Tie-1/Tie-2 system, based on increase in level of endothelial PKC activation in diabetes mellitus, may facilitate inducing microvasculopathy.

研究分野：血管病理学

キーワード：tie angiopoietin 血管新生 糖尿病 微小血管障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チロシンキナーゼ型受容体の1つである Tie (Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains) ファミリーは、Tie-1 および Tie-2 からなる。血管系において、両者は血管内皮細胞特異的に発現しており、胎生期における血管形成、血管新生や、成体での血管新生において、制御因子としての重要な役割を担っている。*tie-1* 遺伝子欠損マウスでは、血管透過性の異常亢進を示す血管網が形成され、E13.5 で胎生致死することが報告されており、新生血管の機能制御を担う必須分子の一つである。Tie-1 のリガンドは未だ同定されておらず、具体的な Tie-1 機能は不明な点が多いものの、近年、Tie-2 活性依存性に Tie-1 が活性化されること (Tie-1 トランス活性化) や、Tie-1、Tie-2 がお互いの細胞内ドメインや細胞外ドメインを介し複合体を形成するとの報告がなされた。一方、Tie-1 が可溶型に変換される現象は以前から知られていたものの、その変換機序や生物学的意義は不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、Tie-1 可溶型変換機構の血管生物学的・病態生理学的意義を解明するため、Tie-1 と Tie-2 の機能的相互作用との関連性を中心に検討を行った。

3. 研究の方法

培養系血管内皮細胞が発現する Tie-1、Tie-2 やそれら可溶型を ELISA、ウエスタンブロット法にて検出した。各種試薬は、製造業者の定める適切なプロトコールに従い使用した。

4. 研究成果

Ang/Tie 連関における Tie-1 の生物学的意義に関して、本研究で明らかとなった事項は、1) ヒト血管内皮細胞に発現する fTie-1 は糖鎖修飾の異なる2種類存在し、そのうち分子

量の大きい HM-fTie-1 は PKC 活性依存性に即時に可溶型変換される一方で、分子量の小さい LM-fTie-1 は可溶型変換されず、糖鎖修飾の違いにより生化学的機能が異なること、2) 可溶型変換を受けない LM-fTie-1 は細胞膜表面に発現する機能的受容体であり、Ang-1/Tie-2 連関依存性 Tie-1 トランス活性化は、HM-fTie-1 と比べて LM-fTie-1 に優位に誘導されること、3) 細胞外ドメインを介した Tie-1/Tie-2 複合体形成に關与するのは可溶型変換を受ける HM-fTie-1 のみであること、4) PKC は、Ang-1/Tie-2 連関依存性に誘導される Tie-1 トランス活性化の活性レベルを制御する重要な細胞内シグナル関連分子であり、その制御メカニズムの本質に、PKC 活性依存性 HM-fTie-1 可溶型変換機構が關与する可能性があること、である。本研究におけるこれらの結果を統合すると、血管内皮細胞における Tie-1 可溶型変換の生物学的意義は、血管構造安定化維持と血管新生開始時における血管構造の不安定化誘導を制御する Ang/Tie 連関において、生体内環境変化の刺激で Tie-1 と Tie-2 のシグナルバランスを即時に変化させ、環境変化に応じた血管反応を誘導する即時応答システムとして機能することにあると考えられる。

可溶型変換機構は、細胞の遊走、増殖、アポトーシスといった細胞生物学的機能の制御を担うシステムのひとつである。可溶型変換は、細胞表面において膜結合蛋白の細胞外ドメインがタンパク分解酵素により切断されることにより起こり、その結果、切断された細胞外ドメインは細胞外へ放出される。膜結合蛋白が、膜型受容体である場合、切断放出された細胞外ドメインは、いわゆる「おとり」受容体としてリガンドと結合し、リガンド機能を抑制する効果を惹起する。また、場合によっては細胞膜の受容体発現量を有意に減少させ、リガンド・受容体連関が惹起する効果を抑制する。本研究で着目したチロシンキナ

ーゼ型受容体であるTie-1は、Tie-1 に結合するリガンドが未だ同定されておらず、可溶型に変換された可溶型Tie-1が「おとり」受容体として生体で機能しているかどうかは不明であり、少なくとも現在、「おとり」受容体としての機能解析を行うことは困難である。よって、本研究では、Tie-1可溶型変換に伴う細胞膜上のfTie-1の発現変化に着目した。Tie-1可溶型変換に関する現象論的論文はすでに報告があるものの、限られた研究グループのからの報告であることを鑑み、そこで報告されているTie-1可溶型変換に関するデータの信憑性を検証する必要があると考えた。そして検証の結果、血管内皮細胞膜上に、糖鎖修飾の違いにより分子量の異なる 2 種類の fTie-1 が発現しており、分子量の大きい HM-fTie-1 (145 kDa) のみがPKC活性依存性に即時かつ極めて効率的に可溶型に変換され、分子量の小さい LM-fTie-1 (135 kDa) は可溶型に変換されないことを示す実験結果を得た。この検証実験を通じて見いだした新たな知見は、発現する 2 種類のfTie-1の分子量が、過去の報告と異なることであったが、非常に興味深い知見として注目した。というのも、分子量の大きさから考えて、糖鎖修飾を受けたfTie-1が、可溶型変換に関し異なる生化学的特性をもつ 2 種類のfTie-1として細胞膜上に発現し、機能している可能性を推測させたからである。そして、Tie-1可溶型変換に関する報告がなされた時代(1990年代)とは異なり、現在はでは、「Ang-1/Tie-2連関依存性Tie-1トランス活性化」や「Tie-1/Tie-2複合体形成」などのTie-1、Tie-2相互作用に関する研究が進捗しており、この「Tie-1、Tie-2相互作用」という観点から、可溶型変換の生物学的意義を解明できる可能性が考えられた。そして、2種類のTie-1がトランス活性化を受ける機能的受容体であり、分子量の小さいLM-fTie-1の方が、相対的に優位な活性亢進を誘導されることが明らかとなった。加えて、複合体形成に関し、可溶型変換

を受けるHM-fTie-1のみがTie-2と複合体形成しているという興味深い知見を得た。ここまでのエビデンスから、Tie-1可溶型変換の生化学的意義に関し、「Tie-1とTie-2の細胞外ドメイン同士の結合は、Ang-1とTie-2との結合を阻害する可能性があり、Tie-1可溶型変換は、Ang-1のTie-2への結合親和性を高め、Tie-2活性化促進に寄与する」との推測がたつ。実際、Tie-1可溶型変換の意義に関し、この容易に推測可能な仮説を検証した論文が過去に一報のみ報告されており、そこでは、Tie-1可溶型変換がTie-2のAng-1に対する感受性を亢進するとされ、推測通りの結果が報告されている。しかし、この報告では、可溶型に変換されない機能的Tie-1(LM-fTie-1)の存在は認識されておらず、Tie-1可溶型変換に伴うTie-1活性への影響に関しては当然触れられていない。本研究では、Tie-1可溶型変換がTie-2のAng-1に対する感受性を高めるのであれば、Tie-2活性化促進に伴い、LM-fTie-1トランス活性化レベルも亢進するとの推測をし、この仮説を支持するエビデンスを得るために第四章の実験が行われたが、結果は意外にも、Tie-2の活性化レベルに特段の変化はなく、LM-fTie-1のトランス活性化レベルが低下するというものであった。この結果は予想外であったものの、Ang-1/Tie-2連関依存性Tie-1がトランス活性化機構において、Tie-2とTie-1が活性レベルにおいて連動しない場合があることが示されたこととなり、非常に興味深い結果であった。そして、この「連動の阻害」にPKC活性が関与し、PKC活性の下流にあるTie-1可溶型変換機構が、この「連動の阻害」の本質的なメカニズムとしての役割を担っている可能性が強く示唆されるものであった。

この「PKC活性に依存したTie-1可溶型変換に伴うTie-2とTie-1の活性連動の阻害」は血管生物学的にいかなる意義を持つのかを考察した場合、非常に合理的な現象であることが考えられる。血管内皮細胞におけるPKC関連細

胞内シグナルは、血管内皮細胞の増殖、遊走を促進する血管内皮細胞活性化シグナルであるが故、PKC活性亢進に伴い即時に誘導されるTie-1可溶型変換の機能は、血管の不安定化誘導（血管新生開始）に関係するものであると考えるのが妥当である。一方、血管構造の安定性制御に深く関与するAng/Tie連関の関連遺伝子改変マウスの表現系を基礎に据えらると、Tie-1, Tie-2両者の十分なシグナルが同時に血管内皮細胞に伝達されることは、結果的に血管安定化を維持、ないし誘導することになるため、なんらかの機序でこのTie-1, Tie-2活性を低下させる、ないし、両者の活性バランスを変化させることが、血管新生開始のシグナルとして重要であることが考えられる。そして、Tie-2活性を低下させる機序が、よく知られたAngs/Tie-2連関、すなわち、Tie-2のアンタゴニストAng-2のAng-1に対する競合的拮抗によるTie-2活性抑制効果である。一方、Tie-1, Tie-2両者の活性バランスの変化に関する研究報告はこれまで皆無であり、そのような意味で、本研究の知見である「PKC活性に依存したTie-1可溶型変換に伴うTie-2とTie-1の活性連動の阻害」は、血管新生開始を誘導する新規メカニズムと考えるに合理性があり、未だ明らかでないAng-1/Tie-2連関依存性Tie-1トランス活性化のメカニズムを解明する鍵となる可能性もあり、非常に意義深い知見と考える。

本研究においてTie-1可溶型変換誘導に用いたPKC活性化試薬であるPMAは、人工試薬であり、生体内には存在しない。過去の報告では、VEGF-A、TNF- α 、IL-1 β など、血管新生や炎症に関与するサイトカインがTie-1を可溶型に変換するとされ、本研究においても、第一章でVEGF-AがTie-1可溶型変換を誘導することが確認された。VEGF-AはRas非依存的にPKCdelta経路を介してp42/44 mitogen activated protein kinase (MAPK)経路活性化し、血管内皮細胞の増殖・遊走を促進することが知られて

いる。一方、VEGF-A依存性Tie-1可溶型変換はPKC非依存性と報告されており、本研究においてもVEGF-A依存性Tie-1可溶型変換は、PKC阻害剤で抑制されなかった。このことは、PKC依存性Tie-1可溶型変換が、PKCdelta以外のPKCアイソフォーム依存性に誘導されること示唆することに加え、血管内皮細胞のVEGF-A依存性増殖・遊走活性亢進経路とは別の経路を用いて（増殖活性シグナルと連動しない）可溶型変換を誘導する機構の背景には、VEGF-AとAng/Tie連関との相互作用において、未知の血管生物学的意義が存在することを推測させ興味深い。VEGF-AとAngs/Tie-2連関との相互作用に関してのこれまでの報告によると、VEGF-Aは、Ang-2の遺伝子発現を、MAPK系を介して亢進し、加えて血管内皮細胞質内のWeibel-Palade小体と呼ばれる顆粒内に蓄積されたAng-2をPKC活性依存性に即時かつ一過性に大量放出することが知られている。このことは、血管新生誘導過程において、その開始過程におけるVEGF-A依存性の即時かつ一過性かつ強力なTie-2活性抑制と、その後の増殖・伸張過程におけるVEGF-A依存性Ang-2遺伝子発現亢進に伴うTie-2活性抑制という2つの抑制メカニズムによって、経時的に程度の異なるTie-2活性抑制効果を惹起するものと考えられる。さらに、本研究の知見を考え合わせると、VEGF-Aは、即時の一過性かつ強力なTie-2活性抑制を惹起し（ペリサイトの解離を誘導）すると同時に、PKC非依存性の即時のTie-1可溶型変換に伴うTie-2、Tie-1活性連動阻害を誘導することで、Tie-2活性が経時的に回復する際、Tie-2関連シグナル優位の状態を誘導し、増殖・伸長過程における血管内皮細胞の活性化維持に貢献するものと考えられる。伸長・進展過程におけるTie-2シグナルの重要性に関する報告は多くなされており、その意味では、VEGF-AによるAng-2遺伝子発現亢進を介したTie-2活性抑制メカニズムは、Tie-2シグナルの行き過ぎを防ぐフィード

バックの意味合いが強いものと考えられる。
今後、VEGF-Aがどのような細胞内シグナル経路を介し、Tie-1可溶型変換を誘導するのかも含め、PKC非依存性のTie-1変換機構の生物学的意義を解明する研究を展開していきたい。

II型糖尿病における微小血管障害は、三大合併症である糖尿病性神経障害、糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症、さらには、創傷治癒不全など、多くの関連疾患の本質的基礎病態とされ、これまでに、微小血管障害の病態解析に関する多くの研究がなされている。現在PKCは、この微小血管障害の病態に深く関わる細胞内シグナル分子として注目されており、血管内皮細胞における糖代謝障害に基づいたPKC活性異常と、それに伴うPKC依存性機能の亢進が、微小血管障害の分子病態学的機序の一つとの見方がある。よって、本研究で見いだしたPKC活性依存性Tie-1可溶型変換機構も、PKC活性異常に伴い機能亢進している可能性がある。このことは、結果として血管の構造的不安定化を誘導するシグナルが環境非依存性に維持されることとなり、既存の血管の構造的不安定化誘導はもとより、新生血管の構造的安定化誘導を阻害することが推測される。このようなPKC活性異常に伴うAng/Tie関連の破綻が、糖尿病微小血管障害の分子メカニズムの一つである可能性は高いと思われる。今後、本研究でなしえなかったTie-1可溶型変換を実行するプロテアーゼの同定や、糖尿病微小血管障害におけるTie-1可溶型変換の病態生理学的意義を明らかにしていくことで、糖尿病治療薬の開発をも視野にいたした研究展開が期待できると考える。

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)
第105回 日本病理学会総会

チロシンキナーゼ型受容体 Tie-1 の可溶型変換機構の意義に関する分子細胞学的研究
上里 梓、鬼丸 満穂、他

〔図書〕(計 0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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼丸 満穂 (Onimaru Mitsuho)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：00380626

(2) 研究分担者

米満 吉和 (Yonemitsu Yoshikazu)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：40315065

(3) 連携研究者

池田 康博 (Ikeda Yasuhiro)
九州大学・医学研究院・准教授
研究者番号：20380389