



# Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival

神崎, 至幸

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4482

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004482>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	神崎 至幸
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4482 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival  
(血小板由来増殖因子による細胞生存におけるネクチン - アファディン複合体の役割)

審 査 委 員

主 査	教 授	南 康博
	教 授	饗場 篤
	教 授	平田 健一

ネクチン-アフジン複合体はアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションといった細胞接着の形成に関与している。ネクチンは細胞外領域に免疫グロブリン様ループを3つ持つ一回細胞膜貫通型の接着分子であり、ネクチン-1~4の4つのメンバーでファミリーを構成している。一方アフジンはネクチンの細胞内領域のC末端に結合している細胞内裏打ちタンパク質であり、アドヘレンスジャンクションにおけるカドヘリン-カテニン機構などをネクチンと結び付けている。アフジンノックアウトマウスは、胚形成期における細胞接着部位の形成不全による不適切な分化・誘導の結果、胎児期に死亡することが知られている。しかし、なぜアフジンの欠損が細胞のアポトーシスに影響を与えるのかは解明されていない。

そこで我々はまずアフジンをノックダウンした胚性幹細胞（ES細胞）よりえられた胚様体（EBs）において、ワイルドタイプのES細胞よりえられたEBsよりアポトーシスを起こしている細胞が増加していることをTUNEL染色法により確認した。このことからアフジンは胚形成期において細胞のアポトーシスを抑制しており、細胞の生存に関与していることが示唆された。

アポトーシスを抑制する経路として、PI3K-Akt経路が知られている。我々は血小板由来増殖因子（PDGF）刺激により引き起こるPI3K-Akt経路を介したアポトーシス抑制機構とアフジンの関係を解明するために、アフジンをノックダウンしたNIH3T3細胞（マウスの胎児皮膚から分離した培養細胞）を作製した。ワイルドタイプ、ノックダウンのNIH3T3にPDGF刺激を加えると、ともに活性型Akt(p-Akt)は経時的に増加したが、ノックダウン細胞ではAktのリン酸化が明らかに抑制されていた。次に、飢餓やFas ligandによる刺激によりアポトーシスを誘発した場合の活性型カスパーゼ3の上昇をPDGFと上皮増殖因子（EGF）の刺激のもとで定量したところ、PDGF刺激を加えたノックダウン細胞では刺激が無い場合と同じくらいの活性型カスパーゼ3の上昇を認めたが、EGF刺激を加えたほうの上昇はわずかであった。また、TUNEL法を用いてアポトーシスを起こした細胞を数えたところ、PDGF刺激を加えたほうが、EGF刺激を加えたほうより多量のTUNEL陽性細胞が存在した。これらのことから、アフジンはPDGF刺激からのPI3K-Akt経路を介して細胞のアポトーシスを抑制していることが確認された。

次に我々はネクチン-アフジン複合体とアポトーシスの関係を解明するため、まずアフジンノックダウン細胞にfull-lengthのアフジンと、ネクチンとの結合領域であるPDZドメインを欠損したアフジン $\Delta$ PDZを戻すことにより、細胞のアポトーシスに影響を及ぼすか調べた。するとアフジン $\Delta$ PDZを戻してもAktのリン酸化の低下は回復せず、またTUNEL染色法にてTUNEL陽性細胞は

full-lengthのアフジンを戻したもののよりも増加し、活性型カスパーゼ3の低下も認められなかった。さらに、ネクチンノックダウンNIH3T3を作製しPDGF刺激を加えるとアフジンノックダウンの場合と同様にAktのリン酸化が抑制され、TUNEL陽性細胞の増加を認めた。以上のことからネクチン-アフジン複合体がPDGF刺激によるPI3K-Akt経路を介したアポトーシス抑制に必要であると考えられた。

さらに、ネクチン-アフジン複合体がPDGF刺激によるAktのリン酸化に関わる分子メカニズムについて検討した。Aktのリン酸化にはPDGF受容体の下流でPI3Kが作用していることが知られている。そこで、ネクチン、アフジンが、PI3Kのキナーゼ活性に影響を及ぼすかどうか調べた。PIP<sub>2</sub>を基質にして、PI3Kのキナーゼ活性を測定したところ、ワイルドタイプのNIH3T3細胞ではPDGF刺激によりPIP<sub>3</sub>の産生量が増加したが、ネクチンまたはアフジンをノックダウンしたNIH3T3細胞では、ワイルドタイプの細胞と比較して、PIP<sub>3</sub>の産生量が抑制された。また、HEK293細胞（ヒト胎児腎細胞）を使用し、免疫沈降実験にてアフジンとPI3Kのp85サブユニットがインタラクションしていることを確認した。すなわちPDGF刺激によるPI3K活性にはアフジンが促進的にはたらき、そして下流のAkt活性にも影響を与えていると考えられた。

最後に我々はネクチン-アフジン複合体とPDGF受容体（PDGFR）の結合様式について調べた。まず、NIH3T3細胞においてPDGFRとネクチン-3の両者は細胞間接着部位で共局在することを免疫染色法にて確認し、ビーズアッセイでも同様にPDGFRとネクチン-3が集積した。しかし、アフジンとPDGFRの共局在は認められなかった。次にPDGFRとネクチンとのインタラクションを確かめるために、HEK293細胞を用いて免疫沈降実験を行った。PDGFRとFLAGタグのついたネクチン-1~4のそれぞれを細胞にトランスフェクションして抗FLAG抗体で免疫沈降すると、ネクチン-3のみがPDGFRと共免疫沈された。また、FLAGタグしたネクチン-3の細胞内・外領域のみのモデルであるFLAGネクチン-3 $\Delta$ EC $\cdot$  $\Delta$ CPを作製し免疫沈降実験を行ったところ、PDGFRはFLAGネクチン-3 $\Delta$ CPとのみ共免疫沈された。以上より、ネクチン-アフジン複合体はネクチン-3の細胞外領域でPDGFRとインタラクションしていることが確認された。

今回我々には以上のような実験を経て、ネクチン-3とアフジンの複合体は、細胞間接着部位の細胞膜上ではネクチン-3がPDGFRと、細胞内ではアフジンがPI3Kとインタラクションし、PDGF刺激により引き起こるPI3K-Akt経路を介した細胞生存シグナルに促進的に働きかけていることを解明した。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 1973 号	氏 名	神崎 至幸
論 文 題 目 Title of Dissertation	血小板由来増殖因子による細胞生存における ネクチン・アフアジン複合体の役割 Involvement of the nectin-afadin complex in PDGF-induced cell survival		
審 査 委 員 Examiner	主 査 南 康博 Chief Examiner 副 査 饒 場 篤 Vice-examiner 副 査 平 田 健一 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

はじめに
ネクチン-アフアジン複合体はアドヘレンスジャンクションやタイトジャンクションといった細胞接着の形成に関与している。ネクチンは細胞外領域に免疫グロブリン様ループを3つ持つ一回細胞膜貫通型の接着分子であり、ネクチン-1～4の4つのメンバーでファミリーを構成している。一方アフアジンはネクチンの細胞内領域のC末端に結合している細胞内裏打ちタンパク質であり、アドヘレンスジャンクションにおけるカドヘリン-カテニン機構などをネクチンと結び付けている。アフアジンノックアウトマウスは、胚形成期における細胞接着部位の形成不全による不適切な分化・誘導の結果、胎児期に死亡することが知られている。本研究の目的はネクチン-アフアジン複合体が細胞のアポトーシスにどのような影響を及ぼしているのかを解明することである。
材料と方法、および結果
1)アフアジンノックアウトマウス由来の胚性幹細胞（ES細胞）より得られた胚様体（EBs）において、ワイルドタイプのES細胞よりえられたEBsよりアポトーシスを起こしている細胞が増加していることをTUNEL染色法により確認した。
2)アフアジンをノックダウンしたNIH3T3細胞（マウスの胎児皮膚から分離した培養細胞）を作製し、ワイルドタイプ、ノックダウンのNIH3T3に血小板由来増殖因子（PDGF）刺激を加えた。すると、ともに活性型Akt(p-Akt)は経時的に増加したが、ノックダウン細胞ではAktのリン酸化が明らかに抑制されていた。次に、飢餓やFas ligandによる刺激によりアポトーシスを誘発した場合の活性型カスパーゼ3の上昇をPDGFと上皮増殖因子（EGF）の刺激のもとで定量したところ、PDGF刺激を加えたノックダウン細胞では刺激が無い場合と同じくらいの活性型カスパーゼ3の上昇を認めたが、EGF刺激を加えたほうの上昇はわずかであった。また、TUNEL法を用いてアポトーシスを起こした細胞を数えたところ、PDGF刺激を加えたほうが、EGF刺激を加えたほうより多量のTUNEL陽性細胞が存在した。
3)アフアジンノックダウン細胞にfull-lengthのアフアジンと、ネクチンとの結合領域であるPDZドメインを欠損したアフアジンΔPDZを戻すことにより、細胞のアポトーシスに

影響を及ぼすか調べた。するとアフアジンΔPDZを戻してもAktのリン酸化の低下は回復せず、またTUNEL染色法にてTUNEL陽性細胞はfull-lengthのアフアジンを戻したものでよりも増加し、活性型カスパーゼ3の低下も認められなかった。さらに、ネクチンノックダウンNIH3T3を作製しPDGF刺激を加えるとアフアジンノックダウンの場合と同様にAktのリン酸化が抑制され、TUNEL陽性細胞の増加を認めた。
4) PIP <sub>2</sub> を基質にして、PI3Kのキナーゼ活性を測定したところ、ワイルドタイプのNIH3T3細胞ではPDGF刺激によりPIP <sub>3</sub> の産生量が増加したが、ネクチンまたはアフアディンをノックダウンしたNIH3T3細胞では、ワイルドタイプの細胞と比較して、PIP <sub>3</sub> の産生量が抑制された。また、HEK293細胞（ヒト胎児腎細胞）を使用し、免疫沈降実験にてアフアジンとPI3Kのp85サブユニットがインタラクションしていることを確認した。
5) NIH3T3細胞においてPDGFRとネクチン-3の両者は細胞間接着部位で共局在することを免疫染色法にて確認し、ビーズアッセイでも同様にPDGFRとネクチン-3が集積した。しかし、アフアジンとPDGFRの共局在は認められなかった。次にPDGFRとネクチンとのインタラクションを確かめるために、HEK293細胞を用いて免疫沈降実験を行った。PDGFRとFLAGタグのついたネクチン-1~4のそれぞれを細胞にトランスフェクションして抗FLAG抗体で免疫沈降すると、ネクチン-3のみがPDGFRと共免沈された。また、FLAGタグしたネクチン-3の細胞内・外領域のみのモデルであるFLAGネクチン-3ΔEC・ΔCPを作製し免疫沈降実験を行ったところ、PDGFRはFLAGネクチン-3ΔCPとのみ共免沈された。
考察ならびに結語
アフアジンは細胞のアポトーシスを抑制していると考えられたが、それはアフアジン単独でなくネクチン-アフアジン複合体であり、PDGF刺激からのPI3K-Akt経路を介して抑制していた。PI3K-Akt経路へは細胞内でアフアジンがPI3Kとインタラクションし促進的にはたらき、そして下流のAkt活性に影響を与えていると考えられた。また、細胞外ではネクチン-3の細胞外領域がPDGFRとインタラクションしていることが確認された。
本研究は、細胞接着部位におけるネクチン-アフアジン複合体の役割について研究したものであるが、従来解明されていなかったPDGF刺激により引き起こるPI3K-Akt経路を介した細胞生存シグナルに及ぼすネクチン-アフアジン複合体の影響について、重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。