



Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1

金村，星余

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2009-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4792

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004792>

※ 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 金村 星余
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4792 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 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1
(RA-GEF-1 欠損マウスの卵黄嚢と尿膜における胎生期血管形成不全)

審 査 委 員

主 査 教 授 寺島 俊雄
教 授 古瀬 幹夫
教 授 匝坂 敏朗

緒言

Ras ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質である Rap1 は細胞間接着に関与し、その活性化はグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)によって制御されている。Rap1 特異的 GEF である RA-GEF-1 は Ras/Rap1 結合ドメインを介して活性型 M-Ras や Rap1 と結合することで細胞内局在や活性が制御されている。当研究室におけるこれまでの研究で、*RA-GEF-1* 遺伝子ノックアウトマウス (*RA-GEF-1*^{-/-}マウス) は胎生 9.5 日で致死となった。胎生 9.5 日の *RA-GEF-1*^{-/-}マウスでは、背側大動脈、脳血管、体節間血管などにおいて重篤な血管形成の異常が認められた。一方 *RA-GEF-1*^{+/+}マウスは正常であった。脊椎動物における血管系の構築は、胎生前期の脈管形成 (vasculogenesis) とそれに引き続く血管新生 (angiogenesis) 、およびさまざまな血管のリモデリングによって担われている。本研究では、胎生 8.5 日のマウス尿膜を培養し *in vitro* での胎生初期の血管形成における RA-GEF-1 の役割を解析した。

学位論文の内容要旨

Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1

RA-GEF-1 欠損マウスの卵黄嚢と尿膜における
胎生期血管形成不全

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻
分子生物学分野
(指導教官：片岡 徹 教授)

金村 星余

実験方法と結果

1. 尿膜培養系での血管形成と VE-カドヘリンの発現

胎生 8.5 日のマウス尿膜を単離し、培養開始直後と 24 時間培養後に内皮細胞マーカーである Flk-1 の抗体で免疫染色した。培養開始直後の野生型マウスの尿膜では内皮細胞が線上に配向したネットワークが観察され、*RA-GEF-1*^{-/-}マウスでも同様のネットワークが確認され、両者の間で顕著な違いは認められなかった。一方 24 時間培養後では野生型マウスの尿膜において内皮細胞のネットワーク構築が更に促進されたのに対して、*RA-GEF-1*^{-/-}マウス尿膜では血管形成が著しく阻害されており、最も顕著に表現型が観察される個体では内皮細胞同士の集合塊が観察されるだけで血管形成が全く認められなかつた。24 時間培養後の *RA-GEF-1*^{+/+}マウス尿膜内皮細胞の接着面には VE-カドヘリンの局在が観察されるのに対して、*RA-GEF-1*^{-/-}マウスではその局在が消失していた。また、定量的 PCR で、VE-カドヘリンの mRNA レベルに有意な減少が認められた。

2. 卵黄嚢での血管形成と VE-カドヘリンの発現

血管内皮細胞に特異的に発現する PECAM-1 に対する抗体で胎生 9.0 日目の卵黄嚢を免疫染色した。野生型マウスでは卵黄動静脈などの中小の血管形成が認められるが、*RA-GEF-1*^{-/-}マウスでは拡張した原始血管叢のみからなっており、血管リモデリングの異常が観察された。更に接着面における VE-カドヘリンの消失も認められ、無秩序に配向した細胞の重層が観察された。

3. 尿膜培養系での Rap1 の活性化

in vitro 尿膜培養系での Rap1 の活性化状態を検討するために、Rap1 のエフェクター分子である RalGDS の Rap1 結合ドメインをプローブとして、活性型 Rap1 を *in situ* で可視化した。*RA-GEF-1*^{-/-}マウスでは尿膜培養開始直後、24 時間培養後ともに活性型 Rap1 が検出された。一方 *RA-GEF-1*^{-/-}マウスの尿膜ではいずれの時期においても活性型 Rap1 は著しく減少していた。

4. 恒常的活性型 Rap1 の発現による VE-カドヘリンの発現と血管伸長の回復
野生型マウス尿膜を I 型コラーゲンゲル中で三次元培養すると、PECAM-1 陽性細胞からなる血管様突起の伸長が観察された。一方、*RA-GEF-1*^{-/-}マウスの尿膜ではその伸長現象が著しく阻害されていた。*RA-GEF-1*^{-/-}マウス尿膜にレンチウィルス発現システムにより活性型 Rap1 を導入し三次元培養すると、PECAM-1 陽性細胞からなる突起の伸長が回復した。また野生型の尿膜細胞を OP9 ストローマ細胞上で 7 日間培養すると尿膜細胞同士が集まり、その接着面における VE-カドヘリンの局在が観察された。一方、*RA-GEF-1*^{-/-}マウス尿膜細胞では接着面での VE-カドヘリンの局在が消失していた。そこで *RA-GEF-1*^{-/-}マウスの尿膜細胞に活性型 Rap1 を導入し OP9 細胞上で培養すると、細胞間接着面における VE-カドヘリンの集積が回復した。

考察

本研究により、マウス胎生期の血管形成が RA-GEF-1 と Rap1 により制御されていることが示された。これまでに、*Rap1A*^{-/-}マウスの解析でマトリグル・プラグアッセイでの塩基性線維芽細胞増殖因子(bFGF)による血管新生の応答の抑制や、後脚虚血後の血管新生を抑制したとの報告がある。また培養細胞系を用いた実験では Rap1A が E-カドヘリンや VE-カドヘリン依存性の

細胞接着を制御していることが報告されている。Rap1B に関しても *in vivo* と *in vitro* で類似の機能が認められており、Rap1A、Rap1B とともに成体期における血管新生を制御していることが知られている。また Rap1-GEF である C3G や DOCK4, Epac1 などが Rap1 を介した内皮細胞同士の接着に機能していることがすでに報告されている。本研究により、マウス胎生期においても Rap1 の活性化が血管形成に重要であるが初めて示されるとともに、この時期における Rap1 を介した血管形成は、RA-GEF-1 によって特異的に制御されていることが示唆された。更に、*RA-GEF-1*^{-/-}マウス尿膜と卵黄嚢での VE-カドヘリンの mRNA レベルが有意に減少していることがわかった。その減少は 30% 程度であり、細胞間接着面における VE-カドヘリンの局在が著しく消失していることから、タンパク質レベルでも調節されていると考えられる。また Rap1 が E-カドヘリンのエンドサイトーシスを負に制御しているという報告があることから、RA-GEF-1 によって制御される Rap1 が VE-カドヘリンのエンドサイトーシスを制御している可能性もある。今後は、血管の発生過程において RA-GEF-1 を介して活性化される Rap1 による、VE-カドヘリンの調節機構を検討する必要がある。しかし *RA-GEF-1*^{-/-}マウスは胎生致死となるため、そのメカニズムを解明することは困難である。そこで RA-GEF-1 欠損 ES 細胞から分化誘導した血管内皮細胞を用いて、VE-カドヘリンの転写調節因子の活性やタンパク質レベル、接着面への輸送等について詳細に検討する予定である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2055 号	氏名	金村 星余
論文題目 Title of Dissertation	<p>Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1</p> <p>(RA-GEF-1 欠損マウスの卵黄囊と尿膜における胎 生期血管形成不全)</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 岩瀬俊輔印</p> <p>副査 Vice-Examiner 古瀬幹夫印</p> <p>副査 Vice-Examiner 勾坂敏朗印</p>		
審査終了日	平成21年 9月 16日		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質の一員である Rap1 は細胞間接着の調節に関与し、その活性化はグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) によって制御されている。Rap1 特異的 GEF である RA-GEF-1 は、Ras/Rap1 結合 (RA) ドメインを介して活性型 M-Ras や Rap1 と結合することで、細胞内局在や活性の制御を受けている。これまでの研究から、RA-GEF-1 遺伝子ノックアウトマウス (RA-GEF-1-/マウス) は胎生 9.5 日 (E9.5) 致死性を示すことがわかつていて。E9.5 の RA-GEF-1-/マウスは、背側大動脈、脳血管、体節間血管などの発生に顕著な異常を呈した。一方、RA-GEF-1+/-マウスは正常であった。胎生期の血管系の発生は、血管内皮細胞の分化と集合による原始血管叢の形成（脈管形成）に始まり、原始血管叢のリモデリングによる成熟した血管網の形成（血管形成）が起こる。本研究では、E8.5 のマウス尿膜の器官培養系を用いて、胎生期血管形成における RA-GEF-1 の役割を解析した。

E8.5 の野生型マウスと RA-GEF-1-/マウスから尿膜を単離し、培養開始直後と 24 時間培養後に血管内皮細胞マーカー Flk-1 の免疫染色を行った。培養開始直後では、原始血管叢と考えられる内皮細胞のネットワークが観察され、両者で顕著な違いは認められなかつた。一方、24 時間培養後では、野生型マウスの尿膜では内皮細胞のネットワーク構築が更に促進されたのに対して、RA-GEF-1-/マウス尿膜ではネットワーク構築が著しく阻害されていた。また、24 時間培養後の RA-GEF-1+/-マウスの尿膜における血管内皮細胞の接着面には VE-カドヘリンの局在が観察されるのに対して、RA-GEF-1-/マウス尿膜では認められなかつた。また、RA-GEF-1-/マウスでは、定量的ポリメラーゼ連鎖反応によって VE-カドヘリンの mRNA レベルの有意の低下が認められた。尿膜は E8.5 以降退縮して解析ができないので、E8.5 から E9.5 における血管形成は卵黄囊において解析した。血管内皮細胞マーカー PECAM-1 の免疫染色を行ったところ、E8.5 では原始血管叢の形成に有意な差は認められなかつたが、E

9.0 では、野生型マウスでは太い血管を含む成熟した血管網が形成されるのに対し、RA-GEF-1-/-マウスでは原始血管叢の状態に留まっていた。この結果より RA-GEF-1-/-マウスでは血管リモデリングの異常があることが示唆された。さらに、RA-GEF-1-/-マウスの卵黄嚢においても、血管内皮細胞間の接着面における VE-カドヘリンの消失、内皮細胞のサイズの低下、形態の球状化や不規則な配列が観察された。また、VE-カドヘリンの mRNA レベルの有意な減少も認められた。In vitro 尿膜培養系での Rap1 の活性化状態を検討するために、Rap1 のエフェクター分子である RalGDS の Rap1 結合ドメインをプローブとして、活性型である GTP 結合型 Rap1 を *in situ* で可視化した。RA-GEF-1+/-マウス尿膜では、培養開始直後、24 時間培養後ともに、血管内皮細胞において Rap1 の活性化が検出されが、RA-GEF-1-/-マウス尿膜では、いずれの時期においても Rap1 の活性化は著しく低下していた。RA-GEF-1-/-マウスの尿膜にレンチウイ ルスペクター系を用いて、恒常的活性型変異を持つ Rap1 変異体 (Rap1G12V) を発現させると、血管様突起の伸長が回復し、VE-カドヘリンの細胞間接着面への局在が回復した。以上の結果から、マウス胎生期において Rap1 の活性化が血管形成に重要であり、RA-GEF-1 がこの時期に Rap1 を活性化する主要な GEF であることが示された。

本研究は Rap1 およびそのグアニンヌクレオチド交換因子である RA-GEF-1 の血管形成に関する研究であるが、従来ほとんど行われてこなかった胎生期における RA-GEF-1 による Rap1 の活性化が血管形成に重要であることを示したものとして価値ある集積であると認める。よって本研究者は博士（医学）の学位を取得する資格があると認める。