Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine 1-Phosphate-Induced Angiogenesis

多和，秀人

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2010-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲5042
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005042

※ 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	多和　秀人
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学　位　記　番　号	博い第 5042 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 22 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine 1-Phosphate-Induced Angiogenesis(血管内皮増殖因子及びスフィンゴシン 1 リン酸誘発性血管新生におけるアファディンの役割)

審　査　委　員

主　査　　教　授　匂坂　敏朗
　　教　授　平島　正則
　　教　授　横崎　宏

学位論文の内容要旨

Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine 1-Phosphate-Induced Angiogenesis

血管内皮増殖因子及びスフィンゴシン１リン酸誘発性血管新生におけるアファディンの役割

神戸大学大学院医学系研究科医科学専攻

循環器内科学

（　指導教員：平田　健一　）

多　和　　秀　人

血管新生は発生や創傷治癒などの生理的な状態だけではなく、動脈硬化やがんの転移、糖尿病性網膜症などの様々な病的な状態においても重要である。血管内皮における細胞間接着は血管の形態保持や機能維持に必要不可欠であり、複雑なシグナル伝達機構によって制御されている。例えば、内皮細胞のアドヘレンスジャンクションの主要な接着分子の一つであるVEカドヘリンは、血管内皮の形態保持、増殖、成長、血管新生を制御しており、細胞膜蛋白質やシグナル伝達分子、血管内皮増殖因子（VEGF）受容体-2（VEGFR2）などの増殖因子受容体と相互作用して数多くのシグナル伝達に関与している。中でも、VEGFR2の相互作用は、血管ネットワークの再構築に不可欠であるVEGFR2を介したホスファチジルイノシトール３キナーゼ（PI3K）－Aktシグナル伝達経路の活性化に重要であると報告されている。

Rasファミリー低分子量G蛋白質に属するRap1は、これまでに、細胞の接着や極性、運動、増殖など様々な機能を制御していることが明らかになっている。Rap1にはRap1AとRap1Bの二つのアイソフォームがあるが、血管内皮細胞においてRap1AまたはRap1Bをノックダウンすると血管新生に重要な機能である細胞遊走、増殖が抑制され、Rap1Aノックアウトマウスおよび Rap1Bノックアウトマウスでは、増殖因子刺激による血管新生が抑制されていると報告されている。また、Rap1AとRap1Bのどちらが欠失しても、細胞増殖因子により誘導される血管新生に重要なERKやp38、Racといったシグナル伝達分子の活性化が抑制されることも報告されている。Rap1の直接の下流の標的蛋白質としてRAPLやRIAMなどが報告されているが、血管新生においてRap1の下流のシグナル伝達の詳細な分子機構については明らかになっていない。

アクチン結合蛋白質であるアファディンは、免疫グロブリン様細胞接着分子ネクチンとPDZ領域を介して細胞内で結合して、ネクチンをアクチン線維と連結する一方で、N末端にあるRA領域を介してRap1と結合することが知られている。ネクチンとアファディンは協調して細胞間接着や運動、増殖、生存、極性など様々な機能に関連している。近年、我々は線維芽細胞において、Rap1とネクチンに結合していないアファディンが血小板由来増殖因子（PDGF）により誘導される細胞運動に重要な役割を果たしていることを見出している。しかし、アファディンが血管内皮細胞においてどのように血管新生を制御しているか、その詳細な分子機構については明らかではなかった。

以上の事実から、今回、我々はRap1およびアファディンが血管内皮細胞においても細胞機能を調節し、血管新生に重要な役割を果たしているのではないかと考え、これらの分子がどのように血管新生を制御しているのか、その詳細な分子機構について検討した。

ヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVECs）をVEGF及びスフィンゴシン１リン酸（S1P）により刺激すると、細胞膜においてRap1の活性化が促進された。免疫染色実験を行ったところ、アファディンは、細胞間接着を形成していない場合には細胞膜に集積しなかったが、細胞間接着を形成している場合には細胞膜に集積した。恒常活性型変異体であるRap1(Rap1-CA)を強制発現させると、コントロールと比べてアファディンはより強く細胞膜へ集積した。反対に、Rap1GAPを過剰発現させてRap1を不活化させると、アファディンの細胞膜への集積はコントロールと比べて減少した。Rap1-CAを強制発現させてもRap1との結合に必要

な RA 領域を欠失したアファディンは細胞膜に集積しなかった。VEGF または S1P により刺激すると、細胞は濃度勾配に従って高濃度側に運動先導端を形成し、Rap1 とアファディンは運動先導端に共局在したが、Rap1GAP を過剰発現させて Rap1 を不活化させると運動先導端の形成と共局在は認められなかった。このように、VEGF または S1P によって活性化された Rap1 は血管内皮細胞の細胞膜におけるアファディンの局在を制御していた。

RNA 干渉法を用いて Rap1 またはアファディンをノックダウンすると、催血管新生作用としての細胞の運動、増殖、毛細血管様ネットワーク形成が抑制され、血清除去により誘導される細胞のアポトーシスが亢進した。

Rap1 およびアファディンは VEGF または S1P 刺激下でのネクチン-2 や VE カドヘリンといったアドヘレンスジャンクション蛋白質及び JAM-A やクローディン-5 といったタイトジャンクション蛋白質の細胞間接着部位への集積に必要であった。Rap1 またはアファディンのノックダウンは細胞の形態にも影響を与えた。

コントロールの HUVECs では VEGF または S1P 刺激によって Akt および eNOS のリン酸化が亢進したが、Rap1 またはアファディンをノックダウンした細胞ではリン酸化が抑制されていた。また、Rap1 またはアファディンをノックダウンしても ERK や p38 のリン酸化はコントロールの細胞と同様に亢進しており、Rap1 とアファディンは Akt－eNOS シグナル伝達経路を選択的に制御していた。

VEGF または S1P によって活性化された Rap1 はアファディンと PI3K の p85 調節サブユニットとの相互作用およびアファディン－PI3K 複合体の運動先導端への誘導を促進していた。したがって、Rap1 およびアファディンは VEGF および S1P それぞれの受容体と PI3K の相互作用を制御することで、PI3K－Akt シグナル伝達経路の活性化を調節していた。

Rap1 は、RA 領域を介してアファディンと結合することによって正のフィードバック調節を受けてその活性化が維持されていた。

アファディンノックアウトマウスは胎生致死であるため、Cre-loxP システムを用いて血管内皮特異的アファディンノックアウトマウスを作製し、*in vivo* におけるアファディンの血管新生における役割について検討した。血管内皮特異的アファディンノックアウトマウスの大部分は胎生致死であり、血管内皮におけるアファディンは胎生期の発育に不可欠であった。出生後の血管内皮特異的アファディンノックアウトマウスの網膜血管新生、下肢虚血モデルにおける血管新生およびマトリゲルプラグアッセイを用いて評価した VEGF または S1P 誘発性の血管新生は、すべて野生型マウスに比べて有意に減弱していた。

今回の研究により、VEGF または S1P によって活性化された Rap1 はアファディンと PI3K の相互作用を促進させると同時に、活性化した受容体が局在する運動先導端にアファディン－PI3K 複合体をリクルートする。PI3K はそれぞれの受容体と結合し、PI3K－Akt シグナル伝達経路を活性化させ、血管形成および血管新生を制御していることが明らかになった。アファディンは *in vivo* においても血管形成および血管新生において重要な役割を果たしていることがわかった。VEGF および S1P が Rap1 を活性化するメカニズムに関しては、Rap1 のグアニンヌクレオチド交換因子である C3G やその制御因子である Crk の関与が強く予測されているものの、これまでに直接に関与を証明した報告はない。また、アファディンが Rap1 を制御するメカニズムとしては、①Rap1 または Rap1-GAP のいずれかと、または両者と直接に結合することによって Rap1 の不活化を抑制する。②細胞間接着形成時は、ネクチンおよび VE カドヘリン依存性の細胞間接着を促進させることで Rap1 の活性を制御する、の２つが考えられる。

血管内皮におけるアファディンの発現を制御することが可能となれば、血管新生に関連のある疾患の治療の標的分子としての臨床応用が期待される。しかし、各疾患における Rap1 やアファディンの作用機序はほとんど明らかにはなっていないため、今後はまず、糖尿病や動脈硬化といった動物モデルでの血管内皮における Rap1 およびアファディンの発現や活性、その作用メカニズムなどを解析していく必要があると考えられる。

神戸大学大学院医学系研究科（博士課程）

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2124号	氏　名	多和 秀人
論文題目 Title of Dissertation	Role of Afadin in Vascular Endothelial Growth Factor- and Sphingosine 1-Phosphate-Induced Angiogenesis 血管内皮増殖因子及びスフィンゴシン１リン酸誘発性血管新生におけるアファディンの役割		
審査委員 Examiner	主　査 Chief Examiner 副　査 Vice-examiner 副　査 Vice-examiner	匂坂 敏朝 平島 正則 横崎 宏	

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

目的

血管新生は、発生や創傷治癒などの生理的な状態だけではなく、動脈硬化や癌の転移、糖尿病性網膜症などの様々な病的な状態においても重要である。低分子量G蛋白質Rap1は血管構造の維持や血管新生を制御しているが、血管新生を制御する下流のシグナル伝達は不明である。また、免疫グロブリン様接着分子ネクチンをアクチン細胞骨格に連結させ、活性化したRap1と結合するアファディンが血管新生に果たす役割も不明である。本研究では血管内皮のアファディンがどのように血管新生を制御しているのか検討した。

方法

血管内皮増殖因子（VEGF）及びスフィンゴシン１リン酸（S1P）刺激下で、RNA干渉法を用いてRap1またはアファディンをノックダウンしたヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて、免疫染色実験、*in vitro*での血管新生の評価、共免疫沈降実験を行った。Cre-loxPシステムを用いて内皮特異的アファディンノックアウトマウスを作製し、*in vivo*の血管新生を評価した。

結果

VEGF及びS1PによりHUVECsを刺激すると、細胞膜においてRap1が活性化された。アファディンは、恒常活性型Rap1(Rap1-CA)を遺伝子導入するとより強く細胞膜へ集積し、反対にRap1を不活化するRap1-GAPを遺伝子導入すると細胞膜へ集積しなくなった。また、Rap1との結合領域であるRA領域を欠失させたアファディンはRap1-CAを遺伝子導入しても細胞膜に集積しなかった。濃度勾配をつけてVEGF、S1Pにより刺激すると、細胞は高濃度側に運動先導端を形成し、Rap1とアファディンは運動先導端に共局在したが、Rap1-GAPを用いてRap1を不活化すると共局在しなかった。Rap1またはアファディンをノックダウンすると、細胞運動、増殖、毛細血管様のネットワーク形成は抑制され、血清成分除去により誘導されるアポトーシスは亢進し、ネクチン-2やVEカドヘリンといったアドヘレンスジャンクション蛋白質及びJAM-Aやクローディン-5といったタイトジャンクション蛋白質の細胞間接着部位への集積は抑制された。Rap1またはアファディンのノックダウンにより、VEGF、S1PによるAkt、eNOSのリン酸化は抑制された。しかし、ERKやp38のリン酸化は抑制されなかった。VEGF、S1Pによって活性化されたRap1はアファディンとPI3キナーゼのp85調節サブユニットとの相互作用を促進し、アファディン－PI3キナーゼ複合体を運動先導端へ誘導して、その結果、VEGFおよびS1Pそれぞれの受容体とPI3キナーゼの相互作用を促進することにより、PI3K-Aktシグナル伝達経路の活性化を促進した。内皮特異的アファディンノックアウトマウスの網膜血管新生、虚血下肢モデルにおける血管新生、マトリゲルを用いたVEGFまたはS1P誘発性血管新生は野生型マウスに比べて有意に減弱していた。

結論

VEGF、S1Pによって活性化されたRap1はアファディンとPI3キナーゼの相互作用を促進すると同時に、活性化した受容体が局在する運動先導端にアファディン－PI3キナーゼ

複合体を誘導する。PI3 キナーゼはそれぞれの受容体と結合し、Akt シグナル伝達経路を活性化させ、血管形成、血管新生を制御しているということが明らかになった。

以上、本研究は、アファディンが PI3 キナーゼ-Akt シグナル伝達経路の活性化を調節することにより、血管新生を制御することを明らかにしたものであり、血管新生におけるアファディンの機能を明らかにする上で重要な示唆を与えるものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。