



FGD5 Mediates Pro-angiogenic Action of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Vascular Endothelial Cells

鏡, 佑介

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲5610

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005610>

※ 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。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

FGD5 Mediates Pro-angiogenic Action of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Vascular Endothelial Cells

FGD5 はヒト血管内皮細胞における血管内皮増殖因子の血管新生誘導活性を伝達する

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
循環器内科学
(指導教員：平田健一教授)

鎌 佑介

FGD5 Mediates Pro-angiogenic Action of Vascular Endothelial Growth Factor in Human Vascular Endothelial Cells

FGD5 はヒト血管内皮細胞における血管内皮増殖因子の血管新生誘導活性を伝達する

【背景】血管新生は個体発生や創傷治癒、動脈硬化、癌の発育・転移など、生理的にも病的にも重要な役割を果たしている。Rho、Rac、Cdc42 といった Rho ファミリーの低分子量 G 蛋白質は血管内皮細胞内のシグナル伝達を制御して、極性形成、遊走、接着、増殖、アクチン細胞骨格の再編成などを調節しており、血管内皮細胞の機能制御に重要な役割を担っている。低分子量 G 蛋白質の活性化は guanine nucleotide exchange factor (GEF) と GTPase-activating protein (GAP) によって調節されているが、血管内皮細胞における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の制御機構についてはまだ充分には解明されていない。我々は最近、Cdc42 の GEF の 1 つである FGD5 が血管内皮細胞に選択的に発現していることを見出した。本研究では、血管内皮細胞における FGD5 の機能について検討した。

【方法・結果】RT-PCR 法によりマウスにおける FGD5 の組織発現分布を検討したところ、FGD5 は主に肺、腎臓、脾臓、卵巣に発現していた。また、RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により各種ヒト培養細胞における FGD5 の発現を検討したところ、大動脈内皮細胞、冠動脈内皮細胞、臍帯静脈内皮細胞、皮膚微細静脈内皮細胞などの血管内皮細胞に特異的に発現を認めたが、平滑筋細胞、白血球、リンパ球、巨核芽球性細胞、上皮細胞には発現は認められなかった。胎生期 9.5 日のマウスを用いて in situ hybridization 法を行い、FGD5 の mRNA の発現を検討したところ、体節間の血管、大動脈の遠位部、脳動脈に発現を認めた。また、出生後 4 日および 8 日のマウスの網膜における FGD5 の mRNA の発現を in situ hybridization 法にて検討したところ、出生後 4 日において FGD5 の mRNA は特に血管が伸展する辺縁部において強い発現を認めたが、8 日においては 4 日に比べ、発現は減弱していた。蛍光免疫染色法によりヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における FGD5 の細胞内局在について検討したところ、細胞辺縁に形成されるラッフル膜及び核の周囲に FGD5 のシグナルを認めた。また、アクチンとの二重染色にてラッフル膜に共局在を認めた。核の周囲において小胞体マーカーであるカルネキシン、ゴルジ体のマーカーである GM130、およびエンドソームのマーカーである EEA1 と部分的に共局在を認めた。他の FGD ファミリー分子は Cdc42 の GEF であるので、FGD5 も Cdc42 の GEF であるか検討した。ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) に FGD5 の遺伝子導入を行い、GST-PAK-CRIB をプローベに用いてプルダウン法を行い、そのサンプルを用いてウェスタンブロット法を施行したところ、FGD5 の全長の導入により Cdc42 の活性化を認めた。この結果、FGD5 は Cdc42 の GEF であることが示された。FGD5 の血管内皮細胞における役割について検討するため、HUVEC において siRNA を用いて FGD5 のノックダウンを行った。血管内皮増殖因子 (VEGF) による Cdc42 活性化に対する FGD5 の役割について検討するため、HUVEC を VEGF により刺激し、

GST-PAK-CRIB をプローベに用いてプルダウン法を行った。コントロール siRNA 群において VEGF により Cdc42 は活性化されたが、FGD5 のノックダウンにより Cdc42 の活性は抑制された。これにより、FGD5 は VEGF による Cdc42 の活性化を制御していることが示された。FGD5 をノックダウンすると、VEGF による内皮細胞のマトリゲル上でのネットワーク形成や透過性、遊走、増殖は有意に抑制された。さらに、細胞遊走時の極性形成も有意に抑制された。蛍光免疫染色法により、HUVEC の monolayer において細胞接着間で VE-カドヘリンの局在を認めたが、FGD5 のノックダウンにより細胞接着間の VE-カドヘリンの発現は抑制されなかった。アネキシン V を用いて細胞を標識してフローサイトメトリー法によりアポトーシスについて検討したところ、FGD5 のノックダウンによる細胞死には影響がなかった。FGD5 の下流シグナル分子の活性化に対する FGD5 のノックダウンの影響について検討した。HUVEC を VEGF により刺激し、リン酸化 ERK 抗体を用いてウェスタンブロット法を施行したところ、FGD5 のノックダウンにより ERK のリン酸化は抑制され、FGD5 は下流シグナルにおいて ERK の活性を制御していることが示された。FGD5 を介した ERK の活性に Cdc42 が関与しているか検討するため、HUVEC において siRNA を用いて Cdc42 のノックダウンを行った。Cdc42 のノックダウンにより VEGF による ERK のリン酸化は抑制されず、FGD5 は Cdc42 の活性とは非依存的に ERK の活性化を制御することが示された。

【結語】本研究により、FGD5 は VEGF による Cdc42 及び ERK の活性を制御し、内皮細胞の管腔形成、透過性、遊走、増殖、細胞遊走時の極性形成を制御していることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2260号	氏名	鎮 佑介
論文題目 Title of Dissertation	FGD5 mediates pro-angiogenic action of vascular endothelial growth factor in human vasucular endothelial cells FGD5 はヒト血管内皮細胞における血管内皮増殖因子の血管新生誘導活性を伝達する		
審査委員 Examiner	主 査 古瀬 幹夫 Chief Examiner 副 査 中村 俊一 Vice-examiner 副 査 片岡 徹 Vice-examiner		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

血管新生は個体発生や創傷治癒、動脈硬化、癌の発育・転移など、生理的にも病的にも重要な役割を果たしている。Rac、Cdc42 といった Rho ファミリーの低分子量 G 蛋白質は血管内皮細胞内のシグナル伝達を制御して、極性形成、遊走、接着、増殖、アクチン細胞骨格の再編成などを調節しており、血管内皮細胞の機能制御に重要な役割を担っている。低分子量 G 蛋白質の活性化は guanine nucleotide exchange factor (GEF) によって調節されているが、血管内皮細胞における Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質の制御機構についてはまだ充分には解明されていない。我々は最近、Cdc42 の GEF の 1 つである FGD5 が血管内皮細胞に選択的に発現していることを見出した。本研究では、血管内皮細胞における FGD5 の機能について検討した。

RT-PCR 法およびウェスタンブロット法により各種ヒト培養細胞における FGD5 の発現を検討したところ、血管内皮細胞に特異的に発現を認めたが、平滑筋細胞、血球系の細胞、上皮細胞には発現は認められなかった。蛍光免疫染色法によりヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) における FGD5 の細胞内局在について検討したところ、細胞辺縁に形成されるラッフル膜及び核の周囲に FGD5 のシグナルを認めた。また、アクチンとの二重染色にてラッフル膜に共局在を認めた。他の FGD ファミリー分子は Cdc42 の GEF であるので、FGD5 も Cdc42 の GEF であるか検討した。ヒト胎児腎臓細胞 (HEK293) に FGD5 の遺伝子導入を行い、GST-PAK-CRIB をプローベに用いてプルダウン法を行い、そのサンプルを用いてウェスタンブロット法を施行したところ、FGD5 の全長の導入により Cdc42 の活性化を認めた。この結果、FGD5 は Cdc42 の GEF であることが示された。FGD5 の血管内皮細胞における役割について検討するため、HUVEC において siRNA を用いて FGD5 のノックダウンを行った。血管内皮増殖因子 (VEGF) による Cdc42 活性化に対する FGD5 の役割について検討するため、HUVEC を VEGF により刺激し、GST-PAK-CRIB をプローベに用いてプルダウン法を行った。コントロール siRNA 群において VEGF により Cdc42 は活性化されたが、FGD5 のノックダウンにより Cdc42 の活性は抑制された。これにより、FGD5 は VEGF による Cdc42 の活性化を制御していることが示された。FGD5 をノックダウンすると、VEGF による内皮細胞のマトリゲル上でのネットワーク形成や透過性、遊走、増殖は有意に抑制された。さらに、細胞遊走時の極性形成も有意に抑制された。FGD5 の下流シグナル分子の活性化に対する FGD5 のノックダウンの影響について検討した。HUVEC を VEGF により刺激し、リン酸化 ERK 抗体を用いてウェスタンブロット法を施行したところ、FGD5 のノックダウンにより ERK のリン酸化は抑制され、FGD5 は下流シグナルにおいて ERK の活性を制御していることが示された。FGD5 を介した ERK の活性に Cdc42 が関与しているか検討するため、HUVEC において siRNA を用いて Cdc42 のノックダウンを行った。Cdc42 のノックダウンにより VEGF による ERK のリン酸化は抑制されず、FGD5 は Cdc42 の活性とは非依存的に ERK の活性化を制御することが示された。以上の結果から、FGD5 は VEGF による Cdc42 及び ERK の活性を制御し、内皮細胞の管腔形成、透過性、遊走、増殖、細胞遊走時の極性形成を制御していることが明らかになった。

本研究は、血管新生のメカニズムについて、血管内皮細胞内のシグナル伝達を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった血管内皮細胞に特異的に発現する Rhoファミリーの低分子量 G 蛋白質活性化タンパク質 FGDS の解析により、その機能とシグナル伝達機構について重要な知見を得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）の学位を得る資格があると認める。