



The Cell Adhesion Molecule Necl-4/CADM4 Serves as a Novel Regulator for Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation

Yamana, Shota

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6460号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006460>

※ 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。



学位論文の内容要旨

The Cell Adhesion Molecule Necl-4/CADM4 Serves as a Novel Regulator for Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation

細胞接着分子 Necl-4/CADM4 は、細胞の運動と増殖の接触阻害における新たな制御因子として作用する

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)

山名祥太

【背景】

細胞の運動と増殖の接触阻害は、運動・増殖過程の細胞同士間で認められる現象である。この接触阻害は器官形成や組織リモデリングに重要であり、がん細胞では接触阻害が破綻していることが知られている。接触阻害の分子機構を解明するため、これまで細胞の接着、運動および増殖の分子機構を解明する研究が行われてきた。カドヘリン、増殖因子受容体およびインテグリンによる細胞内シグナル制御が接触阻害に関与することが知られているが、接触阻害の分子機構はいまだ完全には解明されていない。

細胞接着分子ネクチンは細胞の接着、運動および増殖を制御することが報告されている。上皮細胞において、運動する細胞同士が接触するとネクチン同士のトランス結合により細胞接着が起こり、カドヘリンをネクチン結合部位へリクルートすることでアドヘレンスジャンクション(AJ)が形成される。ネクチン様分子(Necl)-5は、NIH3T3細胞において、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)とインテグリン $\alpha v \beta 3$ と複合体を形成し、運動先端部に局在する。細胞同士が接触してネクチンと Necl-5がトランスに結合すると、Necl-5は細胞内へ取り込まれる。続いてネクチン同士がトランスに結合すると、カドヘリンがネクチン結合部位にリクルートされて AJ が形成される。Necl-5 が細胞内へ取り込まれることで、Necl-5-PDGFR-インテグリン $\alpha v \beta 3$ 複合体が崩壊し、複合体により制御されていた細胞内シグナルが抑制される。このように Necl-5は細胞の運動と増殖の接触阻害に機能することが報告されているが、他の Neclsの接触阻害における機能は不明である。

Necl-4は TSL2、IGSF4C、SynCAM4、CADM4とも呼ばれている。Necl-4は脱リン酸化酵素でがん抑制因子である PTPN13を介して ErbB2/ErbB3シグナル伝達の活性化を抑制し、がん抑制因子として機能することが報告されている。また、様々なヒトがん細胞では Necl-4の発現が消失あるいは低下している。

これらの知見より、我々は Necl-4が細胞の運動と増殖における接触阻害としての機能を有するのではないかと考え、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する感受性の高いヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)を用いて、Necl-4の機能を検討した。

【目的】

本研究の目的は、細胞の運動と増殖の接触阻害における Necl-4の役割を明らかにすることである。

【方法・結果】

ウェスタンブロット法にて培養マウス内皮細胞および培養ヒト内皮細胞に Necl-4が発現していることを確認し、免疫組織染色実験にてマウス大動脈、冠動静脈および下肢毛細血管の血管内皮に Necl-4が発現していることを確認した。次に HUVECsを用い、Necl-4の局在を評価した。sparseな培養条件下では Necl-4は VEGF 刺激下に運動先端部に局在し、confluentな培養条件下では細胞間接着部位に局在した。さらに Necl-4は sparseな培養条件下に比べ、confluentな培養条件下で発現が増加した。Rap-1およびアフアディンに対する低分子干渉 RNA(siRNA)を導入することで Rap1 およびアフアディンをノック

ダウンして細胞間接着を阻害すると、コンフルエントな培養条件下で Necl-4 の発現はコントロールと比べて抑制された。この結果より Necl-4 は Rap1 およびアフアディンを介し、細胞接着依存性に発現が増加することが明らかとなった。

次に、血管内皮細胞における Necl-4 の機能を明らかにするために、細胞の運動と増殖を制御する VEGF 受容体(VEGFR)と Necl-4 との結合を共免疫沈降実験にて検討した。ヒト胎児腎細胞(HEK293)に FLAG で標識した Necl-4(FLAG-Necl-4)と VEGFR を共発現させ、FLAG モノクローナル抗体を用いた免疫沈降を行った。FLAG-Necl-4 は VEGFR1 および VEGFR2 と共免疫沈降された。細胞内領域を欠失した VEGFR2 変異体とは共免疫沈降されたが、細胞外領域を欠失した VEGFR2 変異体とは共免疫沈降されなかったことから、Necl-4 は細胞外領域を介して VEGFR2 と結合することが明らかになった。HUVECs においても、内在性 Necl-4 は VEGFR2 と共免疫沈降された。

Necl-4 は細胞密度依存性に局在と発現量が変化することより、細胞培養条件をスパースとコンフルエントに分けて、各培養条件下での VEGFR2 活性に対する Necl-4 の影響を検討した。Necl-4 のノックダウンあるいは FLAG-Necl-4 をエレクトロポレーション法で過剰発現させることで Necl-4 の機能を解析した。

まず、コンフルエントな培養条件下での VEGFR2 シグナル伝達における Necl-4 の役割を検討した。コンフルエントな培養条件下では、Necl-4 ノックダウンにより VEGF による VEGFR2 のリン酸化は亢進し、Necl-4 過剰発現により VEGF による VEGFR2 のリン酸化は抑制された。Necl-4 過剰発現により VEGFR2 の下流シグナルである Rac1 の活性化と ERK のリン酸化は抑制された。VEGFR2 のリン酸化を抑制するメカニズムを検討するため、Necl-4 ノックダウンした細胞に PTPN13 を追加ノックダウンし VEGFR2 のリン酸化を評価した。PTPN13 ノックダウン、あるいは Necl-4 と PTPN13 のダブルノックダウンによっても VEGFR2 のリン酸化は同程度に亢進した。これらの結果よりコンフルエントな培養条件下において、Necl-4 は PTPN13 を介して VEGF による VEGFR2 のリン酸化を抑制することが明らかとなった。

次に、スパースな培養条件下での VEGFR2 シグナル伝達における Necl-4 の役割を検討した。スパースな培養条件下では Necl-4 ノックダウンにより VEGF による VEGFR2 のリン酸化は影響を受けず、Rac1 の活性化および ERK のリン酸化は抑制された。Necl-4 ノックダウンにより、ミオシンホスファターゼ調節サブユニット 1 (MYPT1)のリン酸化が亢進し、ROCK の活性化が示された。Necl-4 ノックダウンによる Rac1 の活性化の抑制は、ROCK 阻害剤である Y-27632 と fasudil により回復したが、ERK のリン酸化の抑制は回復を認めなかった。Necl-4 のノックダウンによる ROCK の活性化は、PTPN13 を追加ノックダウンすることで回復した。Necl-4 ノックダウンした HUVECs では、管腔形成、細胞の運動と増殖は抑制され、管腔形成と細胞運動の抑制は ROCK 阻害剤により回復したが、増殖の抑制は回復しなかった。Necl-4 ノックダウンによる管腔形成、細胞運動の抑制は、PTPN13 を追加ノックダウンすることで回復した。これらの結果よりスパースな培養条件下において、

Necl-4 は PTPN13-ROCK 経路を介して VEGFR2 の下流シグナルを活性化させることが明らかとなった。

【考察】

本研究により、Necl-4 はスパースな培養条件下では VEGF 刺激下に運動先端部に、コンフルエントな培養条件下では細胞間接着部位に局在し、細胞密度依存性に発現が増加することが示された。この特性は他の接触阻害に関わる細胞接着分子の性質と異なり、Necl-4 が他の細胞接着分子と異なる性質を持つ可能性が示唆された。我々は、コンフルエントな培養条件下で、Necl-4 が PTPN13 を介し VEGFR2 の活性化を抑制していることを示した。これまでの知見および本研究結果より、細胞接着の分子機構において、まず Necl-4 による PTPN13 を介した VEGFR2 の活性化の抑制による接触阻害が起こり、その後 VE カドヘリンによる DEP-1 を介した VEGFR2 の活性化の抑制により、最終的に接触阻害が完結されるものと推測された。また、スパースな培養条件下では、Necl-4 が PTPN13-ROCK 経路を介して VEGF による細胞運動を促進することを示し、Necl-5 が VEGFR2-PI3K 経路を介して細胞運動を促進するのとは異なることを明らかにした。しかし、Necl-4 が ROCK の活性化を制御するメカニズムとして、PTPN13 を介するものの、どのような分子機構で作用するかは今後の検討課題である。また、Necl-4 は VEGF による ERK のリン酸化を促進するが、PTPN13-ROCK 経路は関与しておらず、その分子機構として、Necl-4 が VEGFR2 の細胞内取り込みを制御することで ERK のリン酸化を制御している可能性が推測される。

今回の研究で、我々は細胞の運動と増殖の接触阻害における Necl-4 の新たな制御メカニズムを示した。スパースな培養条件下では Necl-4 は PTPN13-ROCK 経路を介して細胞運動を促進させ、コンフルエントな培養条件下では Necl-4 は PTPN13 を介して VEGFR2 のリン酸化を抑制することで細胞の運動と増殖の接触阻害をもたらすことが明らかとなった。

【結語】

本研究により、異なる密度での培養条件下において Necl-4 は異なる機能を持つことが明らかとなった。特にコンフルエントな培養条件下では、Necl-4 は PTPN13 を介して VEGFR2 の活性化を制御し、細胞の運動と増殖の接触阻害を調節していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第2524号	氏名	山名 祥太
論文題目 Title of Dissertation	<p>The Cell Adhesion Molecule Necl-4/CADM4 Serves as a Novel Regulator for Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation</p> <p>細胞接着分子Necl-4/CADM4は、細胞の運動と増殖の接触阻害における新たな制御因子として作用する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 匂坂敏朗 Chief Examiner</p> <p>副査 的崎尚 Vice-examiner</p> <p>副査 中村俊一 Vice-examiner</p>		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

【目的】

細胞の運動と増殖の接触阻害は、運動・増殖過程の細胞同士間で認められる現象である。ネクチン様分子(Necl)-5は、細胞の運動と増殖の接触阻害に機能することが報告されているが、他の Necls の接触阻害における機能は不明である。Necl-4は TSL2、IGSF4C、SynCAM4、CADM4とも呼ばれており、様々なヒトがん細胞では Necl-4の発現が消失あるいは低下している。申請者らは細胞の運動と増殖の接触阻害における Necl-4の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

【方法・結果】

HUVECsを用い、Necl-4の局在を評価したところ sparseな培養条件下では Necl-4は VEGF 刺激下に運動先端に局在し、confluentな培養条件下では細胞間接着部位に局在した。さらに Necl-4は sparseな培養条件下に比べ、confluentな培養条件下で発現が増加した。Rap-1およびアファディンに対する siRNAを導入することで Rap1およびアファディンをノックダウンして細胞間接着を阻害すると、confluentな培養条件下で Necl-4の発現はコントロールと比べて抑制された。この結果より Necl-4は Rap1およびアファディンを介し、細胞接着依存性に発現が増加することが明らかとなった。

次に、ヒト胎児腎細胞(HEK293)に FLAGで標識した Necl-4(FLAG-Necl-4)と VEGFRを共発現させ、FLAG抗体を用いた免疫沈降を行った。FLAG-Necl-4は VEGFR1および VEGFR2と共免疫沈降された。

confluentな培養条件下では、Necl-4ノックダウンにより VEGFによる VEGFR2のリン酸化は亢進し、Necl-4過剰発現により VEGFによる VEGFR2のリン酸化は抑制された。さらに、Necl-4過剰発現により VEGFR2の下流シグナルである Rac1の活性化と ERKのリン酸化は抑制された。また、PTPN13ノックダウン、あるいは Necl-4と PTPN13のダブルノックダウンによっても VEGFR2のリン酸化は同程度に亢進した。これらの結果より confluentな培養条件下において、Necl-4は PTPN13を介して VEGFによる VEGFR2のリン酸化を抑制することが明らかとなった。

次に、sparseな培養条件下での VEGFR2シグナル伝達における Necl-4の役割を検討した。sparseな培養条件下では Necl-4ノックダウンにより VEGFによる VEGFR2のリン酸化は影響を受けず、Rac1の活性化および ERKのリン酸化は抑制された。Necl-4ノックダウンにより、ミオシンホスファターゼ調節サブユニット1(MYPT1)のリン酸化が亢進し、ROCKの活性化が示された。Necl-4ノックダウンによる Rac1の活性化の抑制は、ROCK阻害剤である Y-27632と fasudilにより回復したが、ERKのリン酸化の抑制は回復を認めなかった。Necl-4のノックダウンによる ROCKの活性化は、PTPN13を追加ノックダウンすることで回復した。Necl-4ノックダウンした HUVECsでは、管腔形成、細胞の運動と増殖は抑制され、管腔形成と細胞運動の抑制は ROCK阻害剤により回復したが、増殖の抑制は回復しなかった。Necl-4ノックダウンによる管腔形成、細胞運動の抑制は、PTPN

13 を追加ノックダウンすることで回復した。これらの結果より sparse な培養条件下において、Necl-4 は PTPN13-ROCK 経路を介して VEGFR2 の下流シグナルを活性化させることが明らかとなった。

【結論】

これまでの知見および本研究結果より、細胞接着の分子機構において、まず Necl-4 による PTPN13 を介した VEGFR2 の活性化の抑制による接触阻害が起こり、その後に VE カドヘリンによる DEP-1 を介した VEGFR2 の活性化の抑制により、最終的に接触阻害が完結されるものと推測された。また、sparse な培養条件下では、Necl-4 が PTPN13-ROCK 経路を介して VEGF による細胞運動を促進することを明らかにした。

本研究は、Necl-4 は PTPN13 を介して VEGFR2 の活性化を制御し、細胞の運動と増殖の接触阻害を調節していることを明らかにしたものであり、接触阻害の分子メカニズム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。