



Afadin Facilitates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Network Formation and Migration of Vascular Endothelial Cells by Inactivating Rho-Associated Kinase Through ArhGAP29

Tagashira, Toru

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2018-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7256号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007256>

※ 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

Afadin Facilitates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Network Formation and Migration of Vascular Endothelial Cells by Inactivating Rho-Associated Kinase Through ArhGAP29

afadin は ArhGAP29 を介した ROCK の不活化により VEGF 刺激による血管内皮細胞のネットワーク形成と遊走を誘導する

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)

田頭 達

【背景】

血管新生は生理学的にも病理学的にも重要な役割を担っている。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)のVEGF受容体2への結合は血管内皮細胞の毛細血管様ネットワーク形成や遊走、増殖といった血管新生の主要な段階を調節する鍵となっている。我々はアクチングリメント結合蛋白である afadin が VEGF による血管新生において重要な役割を果たしていることをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験で明らかにした。afadin は VEGF による Rap1 の活性化を調節して血管新生を制御していることを報告したが、その分子機構はまだ完全には解明できていなかった。

RhoA やその下流のエフェクター蛋白である Rho-associated kinase (ROCK) は細胞の運動やネットワーク形成において重要な接着斑やストレスファイバーの形成を制御している。RhoA を含めた small G 蛋白の活性化は guanine nucleotide exchange factors や GAPs (GTPase-activating proteins) によって調節されている。

【目的】

今回我々は afadin をノックダウンした HUVEC で見られる ROCK の活性化に RhoGAP の一つである ArhGAP29 が重要な役割を果たしていると考え、ArhGAP29 の作用機構を解析した。

【方法と結果】

afadin をノックダウンした HUVEC では、ROCK の標的蛋白である MYPT1 のリン酸化が亢進しており、ROCK が活性化していることが明らかになった。afadin をノックダウンした HUVEC では、マトリグレル上でのネットワーク形成が減弱したが、ROCK 阻害剤である Y-27632 やファスジルの存在下では部分的にネットワーク形成が回復した。さらに、afadin をノックダウンした HUVEC では、創傷治癒アッセイにおける細胞遊走が低下したが、ネットワーク形成と同様に、Y-27632 やファスジルの存在下では部分的に回復した。ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC で同様の実験を行ったところ、afadin をノックダウンした HUVEC と同様の結果が得られた。以上の結果から、afadin や ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC におけるネットワーク形成と細胞遊走の減弱には、ROCK の活性化が関与していることが明らかになった。

ラメリポディアやフィロポディア、ラッフルといった細胞膜突出構造の形成は細胞遊走に必要である。afadin や ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC では、細胞膜突出構造の形成が顕著に抑制されていたが、Y-27632 やファスジル存在下では再び形成されるようになった。以上の結果から、afadin や ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC における細胞膜突出構造形成の抑制には、ROCK の活性化が関与していることが明らかになった。

Rap1 の恒常活性型変異体である Rap1-CA をトランスフェクションした HUVEC では、細

胞膜の突出部分に afadin と ArhGAP29 が共局在したが、afadin をノックダウンした HUVEC では ArhGAP29 を細胞膜上に認めなかった。同様に、VEGF で刺激した HUVEC でも、細胞膜の突出部分に afadin と ArhGAP29 の共局在を認めたが、Rap1 を不活化する Rap1GAP をトランسفエクションした HUVEC では VEGF で刺激しても細胞膜突出構造は形成されず、afadin も ArhGAP29 も局在しなかった。afadin をノックダウンした HUVEC でも同様の結果が得られた。NIH3T3 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、コントロールの野生型 NIH3T3 細胞では ArhGAP29 は Rap1-CA と共に局在したが、afadin をノックダウンした NIH3T3 細胞では ArhGAP29 は Rap1-CA と共に局在しなかった。しかし、afadin をトランسفエクションした細胞では Rap1-CA と afadin、ArhGAP29 の共局在が見られた。以上の結果から、細胞膜運動先導端への ArhGAP29 の誘導は Rap1-afadin axis に依存していることが明らかになった。

HEK293 細胞に FLAG-afadin と HA-ArhGAP29 を共発現させて共免疫沈降実験を行ったところ、FLAG-afadin と HA-ArhGAP29 のどちらからでも他方が共免疫沈降された。HUVEC の細胞溶解液を抗 afadin モノクローナル抗体で免疫沈降したところ、ArhGAP29 も共免疫沈降されたことから、内因性の ArhGAP29 も afadin と結合することが実証された。afadin と ArhGAP29 の結合は、GFP-Rap1-CA や GFP-Rap1-GAP を共発現させても共免疫沈降量が変化しなかったことから、afadin と ArhGAP29 の結合には Rap1 は関与しないことが明らかになった。

ArhGAP29 との afadin の結合部位を明らかにするために、様々な afadin の変異体と HA-ArhGAP29 を HEK293 細胞に共発現させて共免疫沈降実験を行った。その結果、afadin-RA と afadin-PDZ 以外の変異体は HA-ArhGAP29 と共に免疫沈降したことから、ArhGAP29 と結合するには afadin の 2箇所以上の領域が必要であると考えられた。反対に、afadin との ArhGAP29 の結合部位を明らかにするために、ArhGAP29 の変異体と FLAG あるいは GFP を附加した afadin を HEK293 細胞に共発現させて共免疫沈降実験を行った。その結果、ArhGAP29-NT/RBF は afadin と結合したが、ArhGAP29-NT や RBF、△NT/RBF は結合しなかったことから、ArhGAP29 が afadin と結合するには ArhGAP29 の N 末端と RBF 領域が必要であることが明らかになった。

afadin と ArhGAP29 の結合が機能的に重要であることを明らかにするために HUVEC の免疫染色を行った。VEGF 刺激によって運動先導端が形成されたが、ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC では運動先導端の形成が抑制され、ストレスファイバーの形成が促進された。siRNA のターゲット部位 (1106-1112aa) を持たない 3つの ArhGAP29 変異体 (HA-ArhGAP29-△CT、HA-ArhGAP29-△CT/GAP、HA-ArhGAP29-MP/GAP) を発現させて VEGF で刺激したところ、HA-ArhGAP29-△CT/GAP でのみ運動先導端の形成が回復し、ストレスファイバー形成も減弱した。HA-ArhGAP29-△CT/GAP は afadin と結合するが RhoGAP 領域を持っておらず、HA-ArhGAP29-MP/GAP は RhoGAP 領域を持つが afadin と結合しない変異体であり、今回の結果から、Rho-ROCK シグナル伝達の抑制には afadin と RhoGAP

活性をもつた ArhGAP29 との相互作用が必要であることが明らかになった。

【考察】

今回我々は、afadin をノックダウンした HUVEC では ROCK が活性化することを示したが、これは最近の afadin と RhoA 活性の関係について解析した報告と一致する結果であった。

我々は以前に、NIH3T3 細胞では afadin は RhoGAP の一つである ARAP1 と結合して RhoA を不活化することを報告したが、内皮細胞では afadin によってどのように RhoA の活性化が制御されているのかは不明であった。最近、血管内皮細胞では ArhGAP29 が Rap1 の下流で RhoA の活性化を制御していると報告されたことから、我々は ArhGAP29 が afadin と結合して RhoA の活性化を抑制しているのではないかと考えた。本研究において、afadin あるいは ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC では、ROCK が活性され、ネットワーク形成や細胞遊走が減弱し、この減弱が ROCK 阻害剤で回復したため、afadin や ArhGAP29 によるネットワーク形成や細胞遊走には ROCK が重要であることを明らかにした。

さらに、コントロールの HUVEC では、活性化した Rap1 は afadin だけでなく、ArhGAP29 も HUVEC の細胞膜に誘導したが、afadin をノックダウンした HUVEC では誘導されないことを明らかにした。同様に afadin は VEGF によって HUVEC の運動先導端に ArhGAP29 を誘導するので、ArhGAP29 は Rap1-afadin axis の下流で RhoA や ROCK を負に制御している。これらの結果から、血管新生には RhoA や ROCK が重要であり、afadin が Rap1 依存性の ArhGAP29 の細胞膜への誘導を調節していることを明らかにした。

しかし、今回の我々の結果を含めたこれらの報告とは矛盾した報告も複数ある。一つは ROCK 阻害剤で血管新生が減弱するという報告である。例えば、Y-27632 は VEGF によるネットワーク形成や細胞遊走を抑制すると報告されている。この報告に関しては、細胞の種類や実験条件によっては、こうした相反する表現型が出ることはありうる。実際、我々は過去に RhoA の活性化と不活化の繰り返しが運動先導端を周期的にターンオーバーさせることを報告している。したがって、血管新生には ROCK の周期的な活性化と不活化の繰り返しが必要であり、ROCK の過剰な活性化や不活化は血管新生を抑制しうると考える。もう一つは RhoA が細胞間で活性化されるという報告である。今回の細胞免疫染色では ArhGAP29 は運動している細胞の運動先導端で afadin と共に局在したが、細胞間には存在しなかった。これは、内因性の afadin と ArhGAP29 の結合を HUVEC で示したものの、その結合は僅かであり、運動細胞の一部分のみに局在するためと考えられる。

今回我々が使用した ROCK 阻害剤はクモ膜下出血や緑内障の治療にすでに使われており、心血管病の次世代治療薬としても長く期待されているが、未だ実用化されていない。ROCK 阻害剤以外にも、ArhGAP29 のような RhoA の調節因子も RhoA が関わる血管病の治療標的として期待できるのかもしれない。

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 2801 号	氏名	田頭 達
論文題目 Title of Dissertation	<p>Afadin Facilitates Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Network Formation and Migration of Vascular Endothelial Cells by Inactivating Rho-Associated Kinase Through ArhGAP29</p> <p>afadin は ArhGAP29 を介した ROCK の不活化により VEGF 刺激による血管内皮細胞のネットワーク形成と遊走を誘導する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 勾坂 敏朗</p> <p>副査 Vice-examiner 余木 駿</p> <p>副査 Vice-examiner 中村 俊一</p>		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

目的

我々はアクチンフィラメント結合蛋白である afadin が血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) による血管新生において重要な役割を果たしていることをヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた実験で明らかにしたが、その分子機構はまだ完全には解明できていなかった。今回我々は afadin をノックダウンした HUVEC で見られる RhoA のエフェクター蛋白である Rho-associated kinase (ROCK) の活性化に、RhoA を不活化する RhoGAP の一つである ArhGAP29 が重要な役割を果たしていると考え、ArhGAP29 の作用機構を解析した。

方法・結果

afadin をノックダウンした HUVEC では、ROCK が活性化し、マトリグル上でのネットワーク形成が減弱したが、ROCK 阻害剤である Y-27632 やファスジルの存在下では部分的に回復した。さらに、創傷治癒アッセイにおける細胞遊走が低下したが、同様に、Y-27632 やファスジルの存在下では部分的に回復した。また、afadin や ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC では、細胞遊走に必要な細胞膜突出構造の形成が顕著に抑制されていたが、Y-27632 やファスジルの存在下では再び形成されるようになった。

Rap1 の恒常活性型変異体である Rap1-CA をトランスフェクションした HUVEC では、細胞膜の突出部分に afadin と ArhGAP29 が共局在したが、afadin をノックダウンした HUVEC では ArhGAP29 を細胞膜上に認めなかつた。同様に、VEGF で刺激した HUVEC でも、細胞膜の突出部分に afadin と ArhGAP29 の共局在を認めたが、Rap1 を不活化する Rap1GAP をトランスフェクションした HUVEC では VEGF で刺激しても細胞膜突出構造は形成されず、afadin も ArhGAP29 も局在しなかつた。afadin をノックダウンした HUVEC でも同様の結果が得られた。NIH3T3 細胞を用いて同様の検討を行ったところ、コントロールの野生型 NIH3T3 細胞では ArhGAP29 は Rap1-CA と共に局在したが、afadin をノックダウンした NIH3T3 細胞では ArhGAP29 は Rap1-CA と共に局在しなかつた。しかし、afadin をトランスフェクションした細胞では Rap1-CA と afadin、ArhGAP29 の共局在が見られた。

HEK293 細胞に FLAG-afadin と HA-ArhGAP29 を共発現させて共免疫沈降実験を行つたところ、FLAG-afadin と HA-ArhGAP29 のどちらからでも他方が共免疫沈降された。HUVEC の細胞溶解液を抗 afadin 抗体で免疫沈降したところ、ArhGAP29 も共免疫沈降された。Rap1-CA や Rap1-GAP を共発現させても共免疫沈降量が変化しなかつた。

ArhGAP29 との afadin の結合部位を明らかにするために、様々な afadin の変異体と ArhGAP29 の変異体を HEK293 細胞に共発現させて共免疫沈降実験を行った。その結果、afadin-RA と afadin-PDZ 以外の変異体は HA-ArhGAP29 と共に免疫沈降されたことから、afadin が ArhGAP29 と結合するには afadin の 2箇所以上の領域が必要であると考えられた。反対に、ArhGAP29-NT/RBF は afadin と共に免疫沈降されたが、ArhGAP29-NT や RBF、 Δ NT/RBF は共免疫沈降されなかったことから、ArhGAP29 が afadin と結合するには ArhGAP29 の N 末端と RBF 領域の両方が必要であると考えられた。

afadin と ArhGAP29 の結合が機能的に重要なことを明らかにするために、免疫染色を行った。ArhGAP29 をノックダウンした HUVEC では VEGF 刺激による運動先導端の形成が抑制され、ストレスファイバーの形成が促進された。この細胞に、siRNA のターゲット部位 (1106-1112aa) を持たない 3つの ArhGAP29 変異体 (HA-ArhGAP29- Δ CT、HA-ArhGAP29- Δ CT/GAP、HA-ArhGAP29- Δ MP/GAP) を発現させて VEGF で刺激したところ、afadin と結合し RhoGAP 領域を持つ HA-ArhGAP29- Δ CT でのみ、運動先導端の形成が回復した。

結論

afadin は ArhGAP29 と結合し、ROCK を不活化することによって、VEGF 刺激による血管内皮細胞のネットワーク形成と遊走を誘導している。

本研究は、VEGF 刺激による血管内皮細胞のネットワーク形成と遊走における afadin と ArhGAP29 の相互作用の役割を研究したものであるが、初めて VEGF 刺激による血管内皮細胞のネットワーク形成と遊走における ArhGAP29 の役割を明らかにし、血管新生における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。