



## Necl-5/Poliovirus Receptor Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis

Kinugasa, Mitsuo

---

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2014-09-10

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3259号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003259>

※ 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

Necl-5/Poliovirus Receptor Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis

Necl-5/ポリオウイルス受容体は血管内皮細胞増殖因子受容体2と結合し、血管内皮細胞増殖因子による血管新生を制御する

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)

衣笠 允雄

Necl-5/ポリオウイルス受容体は血管内皮細胞増殖因子受容体2と結合し、血管内皮細胞増殖因子による血管新生を制御する

### 【背景】

血管新生は、既存の血管から新たに血管が形成される現象であり、生理的にも病的にも重要な役割を果たしている。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は主にVEGF受容体2(VEGFR2)と結合することにより血管新生を誘導する。VEGFR2の活性はニューロビリンやVEーカドヘリン、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ などの細胞表面蛋白との相互作用により調節される。特に、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ との相互作用は遊走、増殖、生存を制御している。しかし、VEGFR2とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の相互作用の制御機構は不明である。

ネクチン様分子(Necl)は免疫グロブリン様細胞接着分子で、Necl-1～Necl-5からなるファミリーを形成している。このうち、Necl-5は、ヒトではポリオウイルス受容体/CD155として、齧歯類ではTage4として同定されている。齧歯類では各臓器に広範に分布しているが、その発現レベルは非常に低く、癌細胞や再生肝において発現が上昇していることが報告されている。

マウス胎児由来線維芽細胞であるNIH3T3細胞において、Necl-5は血小板由来増殖因子受容体とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と複合体を形成しており、細胞の運動や増殖を制御していることが報告されている。しかし、血管内皮細胞におけるNecl-5の役割については、Necl-5が内皮細胞間接着部位に局在しており単球の経内皮遊走を調節している事が報告されているのみであり、生体内での内皮機能におけるNecl-5の役割は未だ不明である。

### 【目的】

本研究の目的は、VEGF刺激に応答した血管新生におけるNecl-5の役割を明らかにすることである。

### 【方法、結果】

#### 1. ノックアウトマウスにおける検討

オス8週齢の野生型(WT)マウスとNecl-5ノックアウト(KO)マウスの右大腿動脈を結紮した。結紮前、1、3、7、14、28日後の下肢血流を評価したところ、下肢血流の回復はNecl-5 KOマウスにおいて遅延した。WTマウスの右大腿動脈を結紮し、結紮前、1、7、14日後に採取した下肢の筋肉におけるNecl-5の発現をリアルタイムPCR法、ウェスタンブロッティング法にて評価したところ、WTマウスの大軽動脈結紮後の下肢筋肉におけるNecl-5の発現は1、7、14日後において結紮していない下肢筋肉と比べ上昇した。WTマウスとNecl-5 KOマウスを用いてマトリゲルプラッギングアッ

セイを行ったところ、血管新生は Necl-5 KO マウスでは WT マウスと比べて低下していた。WT マウスを低酸素状態にし、低酸素前、1、7、14 日後の下肢筋肉を用いて Necl-5 の発現をウェスタンプロッティング法にて評価したところ、低酸素前、1、7、14 日後の下肢筋肉の Necl-5 の発現は変化がなかった。

## 2. 培養内皮細胞における検討

ヒト臍帯静脈血内皮細胞 (HUVECs) を用い、VEGF により誘導される管腔形成、遊走、増殖、生存に対する Necl-5 ノックダウンの影響を評価した。Necl-5 をノックダウンした HUVECs では、管腔形成、遊走、増殖は低下しており、細胞死は増加した。また、ビトロネクチン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスにおける細胞接着は、Necl-5 をノックダウンすることにより増加した。ヒト胎児腎細胞 (HEK293) に Necl-5 と VEGFR をトランسفエクションして、両者の結合を共免疫沈降反応にて検討した。VEGFR1 とは結合せず、VEGFR2 と Necl-5 の細胞外領域を介して結合していることが確認された。HUVECs を用い、VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の結合に対する Necl-5 ノックダウンの影響を共免疫沈降反応にて検討した。Necl-5 をノックダウンした HUVECs では、VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の結合は低下した。HUVECs における VEGF により誘導される血管新生、生存に関わるシグナル分子のリン酸化に対する Necl-5 のノックダウンの影響をウェスタンプロッティング法にて検討した。Necl-5 をノックダウンした HUVECs では、VEGF により誘導される VEGFR2、Akt、eNOS のリン酸化は低下し、Rap1 の活性は抑制されたが、Src、ERK、p38 のリン酸化は変化しなかった。また、Necl-5 のノックダウンによりアポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 が増加した。さらに、Necl-5 のノックダウンにより VEGFR2 の Y951 のリン酸化は低下したが、Y1175 のリン酸化は変化しなかった。

## 【考察】

これまでの研究により Necl-5 は切除後の肝臓や癌細胞など、病的な状況において、発現が上昇していることが明らかになっている。Necl-5 KO マウスにおいて血管形成に異常が見られないことから、Necl-5 は血管形成には必須ではないが、大腿動脈結紮後の血流の回復を制御していることが明らかになった。

本研究では、HUVECs において Necl-5 のノックダウンは細胞遊走を抑制したが、インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  のリガンドであるビトロネクチン、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックスに対する接着は亢進した。この結果は Necl-5 のノックダウンがインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  の接着活性を増進することを示している。HUVECs に

おいて Rap1 が VEGF による遊走を制御すると報告されているが、本研究では Necl-5 をノックダウンすることにより VEGF による Rap1 の活性が低下した。しかし、ERK 経路の活性は低下しなかった。この結果と合致して、Necl-5 のノックダウンでは、VEGFR2 の ERK の経路の上流にある Y1175 のリン酸化に影響を与えたなかった。インテグリン  $\alpha_v \beta_3$  は VEGFR2 以外に、他の成長因子レセプター（血小板由来増殖因子受容体、線維芽細胞増殖因子受容体、インスリン様成長因子受容体など）と相互作用することが報告されており、これらの受容体が血管新生を制御していることも報告されている。NIH3T3 細胞において Necl-5 が血小板由来増殖因子受容体とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  と相互作用していることが報告されている。そこで、私どもは HUVECs において血小板由来増殖因子による遊走と運動先導端の形成に対する Necl-5 のノックダウンの効果を検討したところ、ともに抑制された。私どもは Necl-5 が VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  との相互作用を介して Rap1-Akt シグナル伝達経路を制御することにより、VEGF による血管新生を制御していることを示した。c-Src が VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  のクロストークに重要な役割を果たしていることが報告されている。しかし、本研究では Necl-5 のノックダウンは c-Src の VEGF によるリン酸化を阻害しなかった。この結果は Necl-5 が独立して VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  のクロストークを制御している可能性を示唆している。

本研究では、私どもは Necl-5 が VEGF による血管新生を制御していることを示した。この結果は、Necl-5 が、血管新生が重要な役割を果たす癌の治療の有望な標的分子である可能性を示唆している。さらに末梢血管疾患を含む血管疾患における新たな治療標的となりうる可能性も示唆する。しかしながら、血管新生と関連する様々な病気と Necl-5 の関連は不明であり、更なる解析が必要である。

## 【結論】

本研究により、Necl-5 は VEGFR2 とインテグリン  $\alpha_v \beta_3$  との相互作用に必要で、VEGFR2 からのシグナル伝達を制御することにより、血管新生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	乙 第 2133 号	氏名	衣笠 允雄
論文題目 Title of Dissertation	<p>Necl-5/Poliovirus Receptor Interacts With VEGFR2 and Regulates VEGF-Induced Angiogenesis</p> <p>Necl-5/ポリオウイルス受容体は血管内皮細胞増殖因子受容体2と結合し、血管内皮細胞増殖因子による血管新生を制御する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 鈴木 伸尚</p> <p>副査 Vice-examiner 坂口 敏郎</p> <p>副査 Vice-examiner 中木 俊一</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

血管新生は生理的にも病的にも重要な役割を果たしている。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)は主に VEGF 受容体 2 (VEGFR2) と結合することにより血管新生を誘導する。VEGFR2 とインテグリン $\alpha_1\beta_3$ との相互作用は遊走、増殖、生存を制御している。しかし、VEGFR2 とインテグリン $\alpha_1\beta_3$ の相互作用の制御機構は不明である。Necl-5 は、ヒトではポリオウイルス受容体/CD155 として、齶歯類では Tage4 として同定されている。齶歯類では各臓器に広範に分布しており、癌細胞や再生肝において発現が上昇していることが報告されている。マウス胎児由来線維芽細胞において、Necl-5 は血小板由来増殖因子受容体とインテグリン $\alpha_1\beta_3$ と複合体を形成しており、細胞の運動や増殖を制御していることが報告されている。しかし、生体内での内皮機能における Necl-5 の役割は未だ不明である。

このような背景から、申請者は、VEGF 刺激に応答した血管新生における Necl-5 の役割を明らかにすることを目的に研究を行った。まず、オス 8 週齢の野生型(WT)マウスと Necl-5 ノックアウト(KO)マウスの右大腿動脈を結紮し、下肢血流を評価したところ、下肢血流の回復は Necl-5 KO マウスにおいて遅延した。WT マウスの右大腿動脈を結紮し、下肢の筋肉における Necl-5 の発現を評価したところ、大腿動脈結紮後の下肢筋肉における Necl-5 の発現は、結紮していない下肢筋肉と比べ上昇した。WT マウスと Necl-5 KO マウスを用いてマトリグルプラッギングアッセイを行ったところ、マトリグル内の血管新生は Necl-5 KO マウスでは減弱していた。次に、ヒト胎児腎細胞に Necl-5 と VEGFR2 の cDNA をトランスフェクションして、両者の結合を検討したところ、Necl-5 は細胞外領域を介して VEGFR2 と結合した。また、ヒト臍帯静脈血内皮細胞を用い、VEGF により誘導される管腔形成、遊走、増殖、生存における Necl-5 の役割を解明するため、siRNA を用いて Necl-5 のノックダウンをおこなった。Necl-5 のノックダウンにより、管腔形成、遊走、増殖は低下し、細胞死は増加した。VEGF により誘導される血管新生、生存に関わるシグナル伝達機構における Necl-5 の役割を検討した。Necl-5 のノックダウンにより、VEGF により誘導される VEGFR2 とインテグリン $\alpha_1\beta_3$ との結合は低下し、VEGFR2、Akt、eNOS のリン酸化は抑制されたが、Src、ERK、p38 のリン酸化は変化しなかった。アポトーシスのマーカーである cleaved caspase-3 が増加した。

本研究は、Necl-5 が VEGFR2 とインテグリン $\alpha_1\beta_3$ との相互作用に必要で、VEGFR2 からのシグナル伝達を制御することにより、血管新生を調節していることを明らかにしたものであり、Necl-5 が、血管新生が重要な役割を果たす癌や末梢血管疾患などの血管病における新たな治療標的となりうる可能性を示した価値ある研究であると認める。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。