

内皮細胞特異的 GAP による血管新生制御機構の解明

神戸大学大学院 医学研究科 血管生物学分野
植村 明嘉

1. はじめに

Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質は、Guanine nucleotide Exchange Factor (GEF) により活性化、GTPase Activating Protein (GAP) により不活化され、細胞内シグナル伝達の分子スイッチとしてはたらく。生体内で Rho 蛋白質は細胞の運動・増殖・分化を制御することにより、正常組織の発生や恒常性維持に加え、種々の病態の進展において重要な役割をもつ¹⁾。約 20 種の Rho 蛋白質に対して GEF・GAP とも約 80 分子が同定されており、近年では GEF や GAP を標的とした創薬開発が期待されている²⁾。本課題では新生血管の内皮細胞に特異的に発現する RhoGAP 分子を同定し、その生理活性を明らかにすることにより、糖尿病網膜症や癌に対する血管新生阻害薬の開発に展開することを目的に、以下の研究を実施した。

2. 方法

マウス網膜血管内皮細胞の網羅遺伝子発現解析

内皮細胞において GFP レポーター遺伝子を発現する Tie2-GFP マウス³⁾の網膜から、フローサイトメトリー法にて GFP 陽性および GFP 陰性細胞を分離し、各分画から RNA を精製してマイクロアレイ遺伝子発現解析 (Affymetrix MGU74v2) を行った⁴⁾。さらに統計学的解析およびバイオインフォマティクス解析を組み合わせることにより、網膜新生血管の内皮細胞に発現する遺伝子を同定した。

マウス網膜の組織学的解析

Arhgap25 遺伝子領域に lacZ レポーター遺伝子が挿入された Arhgap25-lacZ マウスから網膜ホルマウント標本を作製してβ-galactosidase 染色を行った。

RT-PCR および Western blotting

培養ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト胎児腎細胞 (HEK293)、HeLa 細胞における Arhgap25 の発現を RT-PCR 法および Western blotting 法により同定した。

遺伝子ノックダウン

培養HUVECにヒトArhgap25に対するStealth RNAi™ siRNA (Life Technologies) を導入し、48時間後にtime lapse撮影により細胞運動、scratch-woundアッセイにより遊走能、抗Ki67抗体 (Abcam) 染色により細胞増殖を評価した。

3. 結果

血管内皮細胞における Arhgap25 遺伝子の発現

新生血管内皮細胞に特異的に発現する遺伝子を同定することを目的に、我々は生後 8 日 Tie2GFP マウス網膜から内皮細胞および非内皮細胞をフローサイトメトリー法により分離し、RNA を精製して

マイクロアレイ網羅遺伝子発現解析を行った⁴⁾。さらに、成熟血管の遺伝子発現と比較するため、成体 Tie2GFP マウス網膜の内皮細胞からも RNA を精製し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、Arhgap25 遺伝子の発現が新生血管内皮細胞にて上昇し、成体血管では低下することを見出した(図 1A)。

Arhgap25 は pleckstrin homology (PH) ドメイン、GAP ドメイン、coiled-coil (CC) ドメインをもつ RhoGAP 蛋白質である。ヒト培養細胞では、HUVEC で Arhgap25 遺伝子および蛋白質の発現が同定されたが、HEK293 および HeLa 細胞では確認できなかった。また、Arhgap25 遺伝子領域に lacZ レポーター遺伝子が挿入されたマウスでは、新生仔期の網膜血管発生において、内皮細胞に β -galactosidase 活性が強く認められた(図 1B)。

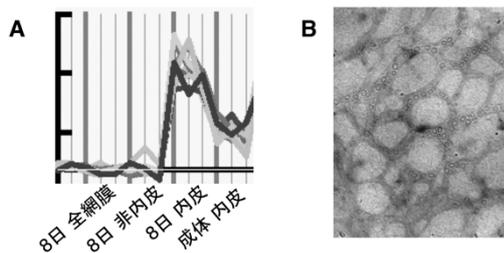


図 1 網膜血管内皮細胞における Arhgap25 の発現
 A. マイクロアレイ遺伝子発現解析
 B. 生後 7 日 Arhgap25-lacZ マウス網膜における X-gal 染色

Arhgap25 による内皮細胞の運動および増殖の制御

我々は Arhgap25 の標的となる Rho 蛋白質を探索していたが、同時期にハンガリーのグループから、Arhgap25 が Rac を不活化することが報告された⁵⁾。この論文ではさらに、Arhgap25 が好中球の貪食能を制御することが報告された。そこで我々は、血管内皮細胞における Arhgap25 の機能を明らかにするため、培養 HUVEC において Arhgap25 遺伝子をノックダウンし、細胞運動をタイムラプス撮影にて観察した。その結果、Arhgap25 ノックダウン HUVEC では、運動速度が有意に低下することが明らかとなった(図 2A)。また、HUVEC を用いた scratch-wound アッセイでも Arhgap25 ノックダウンによる遊走能の低下が確認された(図 2B)。さらに、Arhgap25 ノックダウン HUVEC では Ki67 陽性細胞が有意に減少しており(図 2C)、Arhgap25 が内皮細胞の増殖を促進すると考えられた。

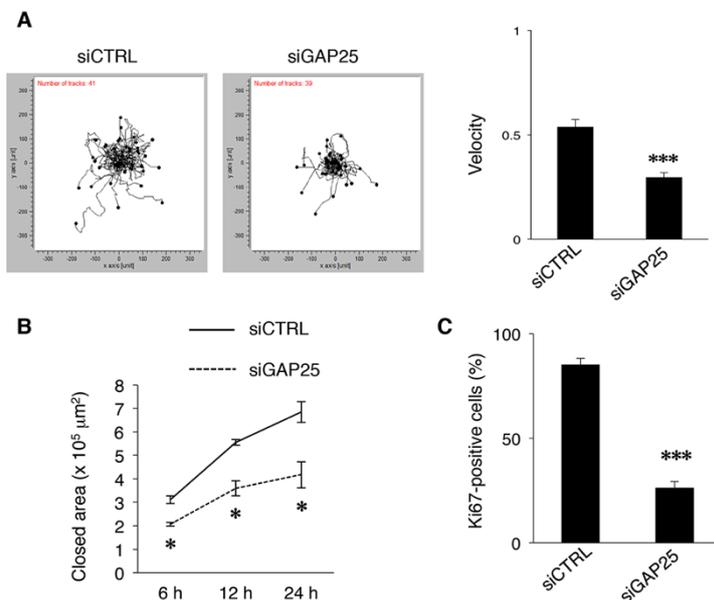


図 2 HUVEC における Arhgap25 ノックダウン

- A. 運動トラッキング.
- B. scratch-wound アッセイ.
- C. 増殖アッセイ.

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ (t test) .

4. 考察

先進国の主要失明原因である加齢黄斑変性や糖尿病網膜症などの眼内血管新生病に対して、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) を標的とした薬剤の眼内投与療法が全世界で普及している⁶⁾。しかし抗 VEGF 療法では治療効果が不十分であることに加えて、高額な薬剤費が問題となっており、次世代血管新生阻害薬の開発に対する社会的要請が高まっている。本研究ではマウス網膜において、Arhgap25 が新生血管内皮細胞に強く発現することを同定した。さらに、培養 HUVEC を用いた研究により、Arhgap25 が内皮細胞の遊走運動および増殖を促進することを明らかにした。今後さらに Arhgap25 遺伝子欠損マウスの解析により、網膜血管新生における Arhgap25 の機能を明らかにすることを予定している。同時に、腫瘍血管新生における Arhgap25 の機能についても評価することにより、Arhgap25 を標的とした新たな血管新生阻害療法の可能性について検証する。

5. 参考文献

- 1) Heasman SJ & Ridley AJ. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:690-701, 2008.
- 2) Bos JL, et al. *Cell.* 129:865-877, 2007.
- 3) Motoike T, et al. *Genesis.* 28:75-81, 2000.
- 4) Kusuvara S, et al. *PLoS One.* 7:e45858, 2012.
- 5) Csépanyi-Kömi R, et al. *Blood.* 119:573-582, 2012.
- 6) Kim LA & D'Amore PA. *Am J Pathol.* 181:376-379, 2012.