

## 血管内皮 Rho キナーゼシグナリングの新たな制御機構

力武良行

神戸薬科大学 医療薬学研究室

### 【研究の背景】

増殖や遊走、接着、収縮など多彩な細胞機能を制御する Rho キナーゼは、多くの心血管病・脳血管病の病態に関与している。私どもはこれまで細胞接着分子ネクチンの関連分子による心血管機能制御について研究してきた [1,2]。ネクチンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞膜一回貫通型の分子で、細胞内でアクチン結合蛋白質のアファディンと結合する。最近、ネクチン関連分子のネクチン様分子 (Necl)-4 が血管内皮細胞の運動や管腔形成を制御することを見出した。Necl-4 をノックダウンした細胞は紡錘状の形態を示し、ストレスファイバーの形成が亢進していたことから、Rho-Rho キナーゼシグナリングが活性化されていると推測されるが、Necl-4 が Rho-Rho キナーゼシグナリングを調節する分子機構は不明である。一方、アファディンは Rho キナーゼを活性化する Rho の活性化を調節することがすでに報告されているが [3,4]、アファディンによる Rho-Rho キナーゼシグナリング制御機構は不明のままである。

### 【目 的】

本研究の目的は、心血管疾患に対する新規創薬標的の創出を目標に、Necl-4 とアファディンによる Rho キナーゼシグナリングの制御機構を解明することである。

### 【方 法】

培養ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。Necl-4 やアファディン、チロシン脱リン酸化酵素である PTPN13、Rho を不活性化する Rho GAP である ArhGAP29 の特異的 siRNA を Lipofectamine RNAiMAX reagent を用いてトランスフェクションした。ストレスファイバーの形成はファロイジン染色によって、Rho キナーゼの活性化は Rho キナーゼの標的分子の一つである MYPT-1 のリン酸化によって、細胞運動や管腔形成を制御している Rac1 の活性化はプルダウンアッセイによって、細胞運動は創傷治癒アッセイによって、管腔形成はマトリゲルを用いて評価した。培養ヒト胎児腎細胞株(HEK293)に発現プラスミドを Lipofectamine 2000 reagent を用いてトランスフェクションし、共免疫沈降を行ってアファディンと PTPN13 の結合を評価した。

### 【結 果】

#### I. Necl-4 による Rho キナーゼシグナリング制御機構

Necl-4 をノックダウンすると、Rho キナーゼの活性化、ストレスファイバー形成の亢進、血管内皮増殖因子 (VEGF) に応答した Rac1 活性化の抑制、細胞運動の抑制、管腔形成の抑制がみられた。これらはすべて Rho キナーゼ阻害剤の Y-27632 やファスジルにより回復した。さらに、Rho キナーゼ阻害剤の代わりに PTPN13 をノックダウンしても同様に回復した。

#### II. アファディンによる Rho キナーゼシグナリング制御機構

アファディンは ArhGAP29 と結合した。アファディンあるいは ArhGAP29 をノックダウンすると、Rho キナーゼの活性化、VEGF に応答した細胞運動の抑制、管腔形成の抑制がみられた。これらはすべて Rho キナーゼ阻害剤の Y-27632 やフ

ァスジルにより回復した。また、ArhGAP29 をノックダウンすると、ストレスファイバー形成の亢進、運動先端端構造の形成障害がみられた。これらは ArhGAP29 を再度発現させると回復したが、アフアディンと結合しない ArhGAP29 変異体あるいは RhoGAP 領域を持たない ArhGAP29 変異体によっては回復しなかった。

## 【考 察】

本結果から、Necl-4 は PTPN13 による Rho キナーゼの活性化を阻害することにより、VEGF に応答した Rac1 の活性化を促進して、細胞運動や管腔形成を促進することが明らかになった [5]。一方、アフアディンは ArhGAP29 を介して Rho-Rho キナーゼシグナリングを抑制することが明らかになった。ArhGAP29 は PTPN13 と結合する分子として同定されており [6]、PTPN13 が ArhGAP29 を介して Rho-Rho キナーゼシグナリングの活性化を調節している可能性も考えられる。本研究はすべて培養血管内皮細胞を用いて行われたものであり、個体レベルでの血管新生における Necl-4、アフアディン、PTPN13、ArhGAP29 の役割の多くはまだ不明のままであり、今後の検討が必要である。

## 【臨床的意義・臨床への貢献度】

Necl-4、アフアディン、PTPN13、ArhGAP29 が血管新生時の血管内皮細胞における Rho キナーゼシグナリングを調節していることが明らかになった。今後、これらの分子が循環器疾患、がん、炎症、加齢黄斑変性、関節リウマチなどの病態における血管新生にどのように関与しているか検討し、病態の形成・進展における役割が解明されれば、これらの分子を標的とした新規治療法の開発へとつながると期待される。

## 【参考・引用文献】

- [1] Kinugasa M, Amano H, Satomi-Kobayashi S, Nakayama K, Miyata M, Kubo Y, Nagamatsu Y, Kurogane Y, Kureha F, Yamana S, Hirata K, Miyoshi J, Takai Y, Rikitake Y. Necl-5/poliovirus receptor interacts with VEGFR2 and regulates VEGF-induced angiogenesis. *Circ Res.* 110, 716-726, 2012.
- [2] Tawa H, Rikitake Y, Takahashi M, Amano H, Miyata M, Satomi-Kobayashi S, Kinugasa M, Nagamatsu Y, Majima T, Ogita H, Miyoshi J, Hirata K, Takai Y. Role of afadin in vascular endothelial growth factor- and sphingosine 1-phosphate-induced angiogenesis. *Circ Res.* 106, 1731-1742, 2010.
- [3] Miyata M, Rikitake Y, Takahashi M, Nagamatsu Y, Yamauchi Y, Ogita H, Hirata K, Takai Y. Regulation by afadin of cyclical activation and inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA small G proteins at leading edges of moving NIH3T3 cells. *J Biol Chem.* 284, 24595-24609, 2009.
- [4] Birukova AA, Tian X, Tian Y, Higginbotham K, Birukov KG. Rap-afadin axis in control of Rho signaling and endothelial barrier recovery. *Mol Biol Cell.* 24, 2678-2688, 2013.
- [5] Yamana S, Tokiyama A, Mizutani K, Hirata K, Takai Y, Rikitake Y. The Cell Adhesion Molecule Necl-4/CADM4 Serves as a Novel Regulator for Contact Inhibition of Cell Movement and Proliferation. *PLoS One.* 10, e0124259, 2015.
- [6] Saras J, Franzén P, Aspenström P, Hellman U, Gonez LJ, Heldin CH. A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1. *J Biol Chem.* 272, 24333-24338, 1997.