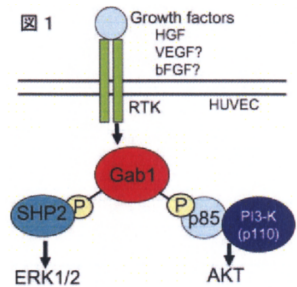


研究テーマ

虚血時の血管新生におけるドッキング蛋白質Gab1の役割の解明

1. はじめに

Grb2-associated binder 1(Gab1)はドッキング蛋白質の1つであり、epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor 2 (FGF2), hepatocyte growth factor (HGF), vascular endothelial growth factor (VEGF)などを初めとする様々な増殖因子の刺激でチロシンリン酸化を受けて、SH2 ドメイン含有シグナル伝達分子の蛋白質脱リン酸化酵素 SHP2 や PI3-kinase の調節サブユニット p85 と会合し、その会合を介して下流の MAP kinase (ERK1/2)や AKT の活性化を調節することが知られるシグナル伝達調節因子である (図 1)。これらの増殖因子とその受容体である Receptor Tyrosine Kinase (RTK)は血管新生において重要な役割を持つ事がこれまで知られているが、血管新生における Gab1 の役割はこれまで不明であった。本研究は、下肢虚血モデルでの血管新生における Gab1 の機能解明を通じて新たな血管新生の分子基盤を解明し、下肢虚血性疾患に対する新規治療法開発に繋げることを目的とする。



2. 方法

①下肢虚血モデルでのGab1内皮特異的ノックアウトマウス(Gab1ECKO)を用いた解析：

conventionalなGab1ノックアウトマウスは、E13.5-17.5の間で胎生致死を呈するため、申請者らはGab1^{lox}マウスと内皮細胞特異的にCreレコンビナーゼを発現するTie2-Creトランスジェニックマウスを交配してGab1内皮特異的ノックアウトマウス(Gab1ECKO; Gab1^{lox/lox} Tie2-Cre)を作成した。Gab1ECKOはメンデル比に従い出生し、出生時に明らかな血管発生異常も認めなかった。そこでコントロールマウス (Gab1^{lox/lox}) とGab1ECKOに対して、右大腿動脈結さつによる下肢虚血ストレス負荷を行った。虚血負荷後day1,3,7,14,21でレーザードップラー血流計による血流評価を行い、day21にはマウスの内転筋を摘出してCD31免疫染色による血管新生の評価を行った。

②ヒト臍帯静脈血管内皮細胞でのGab1の機能解析とその下流標的因子の探索：

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いてGab1のチロシンリン酸化を誘導する血管内皮増殖因子の探索を行ったところHGFが最も強いチロシンリン酸化を誘導することが明らかとなった。更に、Gab1の野生型、変異体 (SHP2結合不能変異体、p85結合不能変異体) を発現するアデノウイルスベクターをHUVECに感染させて、Gab1-SHP2会合体、Gab1-p85会合体の内皮細胞でのHGFシグナルにおける機能解析も行った。Gab1のアデノウイルスベクター感染下でのHGF刺激による遺伝子発現誘導をマイクロDNAアレイにより解析し、HGF/c-Met/Gab1依存性に誘導される標的遺伝子の探索を行った。

③Gab1ECKOにおける虚血耐性低下に関連する因子の同定

②の実験でHGFがGab1依存的に様々な転写因子などの誘導をすることが明らかとなったため、それらの発現状態を虚血負荷後、大腿組織の内皮細胞を抗CD31抗体を用いてMACSシステムで単離精製してreal-time PCRにより発現の解析を行った。

3. 結果、研究成果

①下肢虚血モデルでのGab1内皮特異的ノックアウトマウス (Gab1ECKO)を用いた解析：

コントロールマウス (Gab1^{flx/flx}) と Gab1ECKOに対して、右大腿動脈結さつによる下肢虚血ストレス負荷を行ったところ、右図2のようにコントロールでは1例も下腿壊死が観察されなかったのに対して、Gab1ECKOは全例が3週間の経過中に下腿壊死を呈した(図2)。

ドップラー血流計による血流評価でも上記の結果と一致して、コントロールは3週間後に術前

の48%まで血流回復が見られたのに比して、Gab1ECKOでは術前の約25%までの回復にとどまり有意に血流回復が悪化していた(右図3AB)。また、この結果と一致して術後 day21で摘出した右内転筋のCD31免疫染色による毛細血管密度での評価でも、コントロールで観察される虚血負荷後 day21で毛細血管密度増加は、Gab1ECKOでは有意な増加が見られず血管新生異常の存在が示唆された(右上図3C)。

②HUVECでのGab1の機能解析と下流標的因子探索：

生体における内皮細胞での Gab1 が関与する血管内皮増殖因子シグナルを同定するため、HUVEC を用いて、HGF,VEGF,FGF2で刺激してGab1のチロシン酸化を検討した。その結果、HGFが最も強いチロシン酸化を誘導することが明らかとなった(右図4)。

次に Gab1 の野生型、変異体 (Gab1^{ΔSHP2}、Gab1^{Δp85}) を発現するアデノウイルスベクターをHUVECに感染させてHGF刺激によるERK1/2, AKT,およびERK5の活性化を検討した。その結果、Gab1^{ΔSHP2} 過剰発現下ではHGFによるERK1/2及びERK5の活性化が、一方で

Gab1^{Δp85} 過剰発現下ではHGFによるAKTの活性化が特異的に遮断されていた(図5)。このようなGab1によるSHP2経路及びp85経路依存性のシグナル遮断が可能な系を用いて、HGF依存性に誘導される下流標的遺伝子の探索をマイクロDNAアレイで行った。その結果、HGF刺激

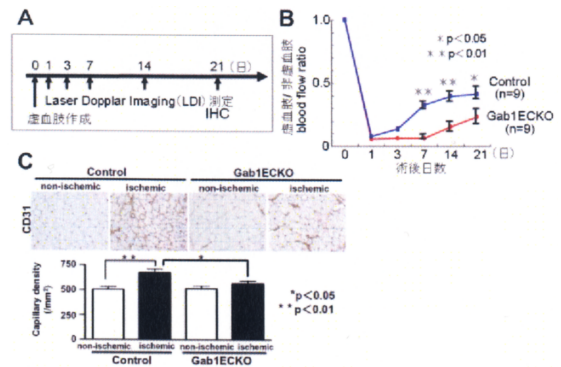


図3 (A) 下肢虚血負荷のプロトコル (B) ドップラー血流計による血流評価 (C) CD31免疫染色での毛細血管密度評価

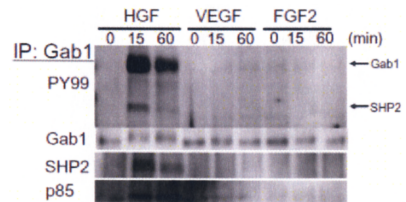
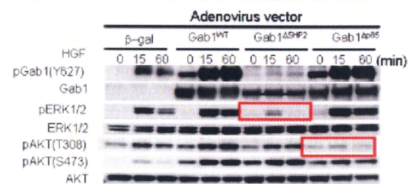


図4 HUVECにおけるGab1のチロシン酸化を誘導する増殖因子はHGFである。

(1) HGFによるERK1/2及びAKT活性化の検討



(2) HGFによるERK5活性化の検討

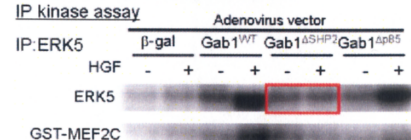


図5 アデノウイルスを用いたGab1-SHP2会合体及びGab1-p85会合体の機能解析

後1時間後では Gab1-SHP2 会合体形成依存的に、転写因子の *early growth response 1(Egr1)* や *Kruppel-like factor 2 (KLF2)*等の upregulation が見られ、4時間後には *KLF2*の標的遺伝子の一つで血管内皮の抗血栓性で重要な役割を持つ *thrombomodulin* 等の upregulation が観察された。HGF 依存性の *Egr1* 発現誘導は MEK1 dominant-negative 体の過剰発現で遮断されたが、一方で *KLF2*発現誘導は MEK5 dominant-negative 体および ERK5 dominant-negative 体の過剰発現により遮断された。

③Gab1ECKOにおける虚血耐性低下に関連する因子の同定
 コントロールマウスと Gab1ECKO に対して下肢虚血負荷を掛けて24時間後に、大腿組織の内皮細胞を抗 CD31 抗体による MACS システムで単離精製して real-time PCR により *KLF2*, *Egr1* などの発現の解析を行った。

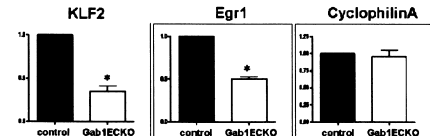


図6 Gab1ECKOでは虚血負荷後24時間でコントロールに比して*KLF2*, *Egr1*などの発現が有意に低下していた(* $p < 0.05$; CyclophilinAは変化しないコントロール)

KLF2, *Egr1*はともに Gab1ECKO においてコントロールに比して有意な発現低下が見られた(図6)。*KLF2*は近年スタチンの標的遺伝子の一つであることも報告されて、内皮保護に重要な役割を有することが知られている因子であるため HGF による Gab1 を介した下肢虚血ストレスに対する耐性は Gab1-MEK5-ERK5-KLF2 シグナル経路でその一翼が担われている可能性が示唆された。

4. 考察、まとめ

本研究により、内皮細胞特異的Gab1欠損マウスは下肢虚血耐性の低下を示し、その原因は内皮細胞でのGab1が伝達するHGF/c-Metシグナル伝達障害に起因する可能性が強く示唆された。Gab1はHGF/c-Met依存性の下流のシグナル、特にERK1/2, ERK5, AKTの活性化に必須であり、内皮細胞にとって重要な役割を有する転写因子の*KLF2*発現誘導にも Gab1-SHP2会合体形成依存的に関与することが明らかとなった(図7)。

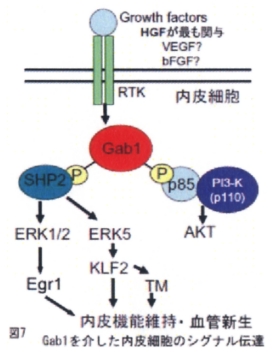


図7 Gab1を介した内皮細胞のシグナル伝達

ERK5は本研究ではHGF/c-Met/Gab1/SHP2経路依存的に活性化され、*KLF2*の発現誘導に関与することが明らかとなった。これまでにERK5はその内皮特異的ノックアウトマウスは血管形成不全をもたらす血管機能維持に必須の*KLF2*の発現調節に重要な役割を持つことが報告されている。我々の結果はこれらの過去の報告と一致する。今後はさらに詳細な解析を進めて、内皮細胞の生命線ともいえるERK5-KLF2経路の活性化機構を解明して、新規の心血管病治療法の開発へ繋げたい。

5. 発表論文

上記の研究結果については現在投稿準備中である。本年度の他の発表論文は以下の通りである。

Nakaoka Y, Shioyama W, Arita Y, Higuchi K, Kunimoto S, Fujio Y, Nishida K, Kuroda T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Hirano T, Komuro I, Mochizuki N. SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene. *J Mol Cell Cardiol.* (accepted)