

主論文の要旨

Girdin/GIV regulates transendothelial permeability by controlling VE-cadherin trafficking through the small GTPase, R-Ras

Girdin/GIV は small GTPase の R-Ras を介して VE-cadherin の細胞内輸送を調節し、血管内皮細胞の透過性を制御する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

一宮 仁

【緒言】

血管透過性は血管内皮細胞の細胞間の結合機構によって制御される。血管透過性の亢進はさまざまな病的状態に関与していると言われている。しかし、細胞外の刺激がどのようにして内皮細胞間の結合を制御するのかは明らかではない。血管内皮細胞間の結合は、adherens junction(AJ)と tight junction(TJ)という少なくとも2つの異なる構造により制御されている。VE-cadherin は血管内皮細胞に限局して発現しているカドヘリン・ファミリーの分子であり AJ の形成に重要である。血管透過性亢進因子に曝露されている時だけではなく、静止状態にある内皮細胞でも、AJ は持続的にリモデリングしていることが判明している。このリモデリングには、VE-cadherin のエンドサイトーシスとリサイクリングが関与していると考えられている。

アクチン結合タンパクである Girdin は、多量体化に関与する N 末端ドメインと長大な coiled-coil 領域、及び細胞膜とアクチン細胞骨格に結合する C 末端ドメインから構成されており、細胞膜と結合するアクチンの網目構造のリモデリングに必要なアクチン線維を架橋するクロスリンカーとなると考えられている。Girdin は未成熟な血管内皮細胞に多く発現し、VEGF 依存性の細胞遊走、血管ネットワークの構築、生後の血管新生に重要な役割を果たしている。しかし、Girdin は未成熟な血管内皮細胞だけでなく、様々な組織において成熟した血管ネットワークにも存在するが、成熟した血管内皮細胞での Girdin の機能は解明されていない。

今回の研究では、アクチン結合分子 Girdin の VE-cadherin の細胞内輸送を介した血管透過性の制御機能について検討した。

【結果】

VE-cadherin のエンドサイトーシスと血管内皮細胞の透過性への Girdin の関与(Fig.1)

VEGF 刺激した HUVEC で VE-cadherin の免疫染色を行い、AJ の解離を評価した。Girdin のノックダウンにより AJ の解離は抑制された(Fig.1A)。また、VEGF 刺激後の HUVEC にて抗 VE-cadherin 抗体で免疫沈降を行った。VEGF 刺激後の p120-catenin と VE-cadherin の結合の減弱は Girdin のノックダウンにより抑制されたが、 β -catenin と VE-cadherin の結合への影響は認められなかった(Fig.1B)。細胞表面の VE-cadherin をラベリングした後に VEGF 刺激を行い、エンドサイトーシスを受けた VE-cadherin の免疫染色を行った。コントロールでは細胞内に VE-cadherin を含む顆粒が認められ、その一部は Girdin と共局在したが、Girdin をノックダウンすると細胞内に取り込まれる VE-cadherin は有意に減少した(Fig.1C,D)。VEGF 刺激後に細胞表面の VE-cadherin をトリプシン処理で除去した細胞からタンパクを抽出してウエスタンブロットを行った。Girdin のノックダウンにより細胞内に取り込まれる VE-cadherin は減少した(Fig.1E)。さらに、HUVEC で VEGF 刺激により亢進する FITC-dextran の透過性は、Girdin のノックダウンで有意に抑制された(Fig.1F)。

以上より、HUVEC において Girdin は VE-cadherin のエンドサイトーシスや細胞内輸送を制御することにより AJ の制御に関与し、VEGF 刺激後の血管透過性亢進に関与す

ることが判明した。

活性型 R-Ras と Girdin の相互作用(Fig.2)

HEK293 で Girdin と R-Ras の活性型である R-Ras 38V、もしくは不活性型である R-Ras 43N をそれぞれ外因性に発現させて免疫沈降を行った。Girdin は活性型の R-Ras 38V と共沈した(Fig.2A)。VEGF 刺激下の HUVEC で Raf の RBD ドメインで活性型の R-Ras をプルダウンすると、VEGF 刺激 5 分後から R-Ras の活性型が増加しており、20 分は持続した(Fig.2B)。HUVEC で抗 Girdin 抗体を用いた免疫沈降を行うと、VEGF 刺激後のみで、内因性の R-Ras と Girdin の共沈が認められた(Fig.2C)。

以上より、VEGF 刺激後の血管内皮細胞において Girdin は活性型 R-Ras と複合体を形成することが判明した。

R-Ras の存在下での Girdin と VE-cadherin の複合体形成(Fig.3)

HUVEC を VEGF 刺激し、経過時間毎に抗 Girdin 抗体で免疫沈降を行った。Girdin と VE-cadherin の共沈は時間とともに増加し、15 分で最大となった(Fig.3A)。R-Ras をノックダウンすると、Girdin と VE-cadherin の相互作用は減弱した。R-Ras43N の過剰発現でも、同様の結果を得た(Fig.3B,3C)。

以上より、R-Ras は VEGF 刺激下での Girdin と VE-cadherin 含有顆粒との複合体形成を制御することが判明した。

R-Ras を介した VE-cadherin の細胞内取り込みと内皮細胞の透過性の調節への Girdin の関与(Fig.4)

HUVEC にて FITC-dextran の透過性を検討した。R-Ras のノックダウンにより亢進した透過性は、Girdin を同時にノックダウンすることにより減弱した(Fig.4A)。細胞表面の VE-cadherin をラベリングした後に、VEGF 刺激で VE-cadherin のエンドサイトーシスを誘導した。細胞表面に残存した VE-cadherin のラベリングを除去した後に、growth medium で培養して、VE-cadherin のリサイクリングを観察した。R-Ras の活性型である R-Ras38V の過剰発現下では、細胞間接着部位に、リサイクリングしたと思われる VE-cadherin の存在を認めたが、control と R-Ras43N の過剰発現下では認められなかった。また、リサイクリングされた VE-cadherin は、Girdin のノックダウンにより減少した(Fig.4B,4C)。

以上より、Girdin は活性型 R-Ras を介して VE-cadherin 含有顆粒の細胞膜へのリサイクリングに関与すると考えられた。

【考察】

今回の研究で、Girdin は少なくとも部分的に R-Ras を介して VE-cadherin の細胞内輸送を促進し、血管内皮細胞の透過性を制御することを明らかにした。VEGF 刺激により R-Ras は活性化され、Girdin と結合し、細胞間結合部位周囲のエンドソームのよ

うな細胞内顆粒での Girdin と VE-cadherin の相互作用を制御すると考えられた。また、R-Ras と Girdin の複合体は VE-cadherin を含む顆粒の細胞膜への輸送に関与すると推測された。

これまでの研究では、Girdin は dynamin2 の GTPase 活性化タンパクとして機能し、clathrin 依存性のエンドサイトーシスを制御して、MDCK 細胞でも E-cadherin のエンドサイトーシスを制御することが報告されている。今回の研究では、Girdin のエンドサイトーシスの制御因子としての生物学的意義の一つが示されたと思われる。Girdin は R-Ras を介して VE-cadherin の細胞内輸送、内皮細胞の透過性を制御することが判明したが、この結果は R-Ras が腫瘍血管の統合性を制御するという報告とも一致する。これまでの研究では、外因性に発現させた R-Ras の活性型である R-Ras38V は VE-cadherin のセリン 665 のリン酸化の減弱により VE-cadherin の細胞内輸送を抑制し、血管内皮細胞のバリア機能を強化することが示されている。Girdin が VE-cadherin のリン酸化に関与するかどうかは明らかではないが、今回の研究では Girdin は活性化された R-Ras と相互作用して、R-Ras のエフェクターとして血管の統合性の制御や生後の血管新生に影響することが示唆された。

【結語】

今回、Girdin は R-Ras を介して VE-cadherin の細胞内輸送に関与し、血管内皮の透過性を制御することが明らかとなった。これまでの研究では、VE-cadherin の制御不全や AJ の崩壊が動脈硬化病変形成の初期に起こることが示されており、R-Ras と Girdin は病的な血管透過性亢進や動脈硬化を含む様々な血管病の治療に有効な標的になり得る可能性が示唆された。