

研究課題「眼内血管新生病に対する新規創薬標的分子の探索に向けた基盤研究」

神戸大学大学院医学研究科
植村 明嘉

1 研究の背景と目的

糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などの失明性眼疾患では、無秩序な血管新生が視機能障害の直接的原因となる。このため、正常血管や網膜神経組織に影響を与えずに、血管新生を選択的に阻害する薬剤の開発が待望されている。本課題では、網膜組織において新生血管内皮細胞に限局して発現するシグナル伝達分子を同定し、その生物学的機能を解明することにより、眼内血管新生病に対する新規創薬標的分子を探索することを目的に、下記の研究を実施した。

2 研究方法・研究内容 および 3 研究成果

血管内皮細胞における Arhgef15 遺伝子の発現

血管内皮細胞増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) は、血管内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体 VEGFR2 に結合すると低分子量 G 蛋白質 Cdc42 を活性化するとともに RhoJ を不活化し、糸状仮足の伸長を促進する。一方、セマフォリン 3E (Sema3E) が内皮細胞の PlexinD1 受容体に結合すると、Cdc42 を不活化するとともに RhoJ を活性化し、糸状仮足の伸長を阻害する (Fukushima et al. J Clin Invest. 2011)。本研究では先ず、血管内皮細胞において Cdc42 または RhoJ の活性を制御するグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) を同定することを目的に、血管内皮細胞にて GFP 蛍光蛋白質を発現する Tie2GFP トランスジェニックマウスの網膜からフローサイトメトリー法により GFP 陽性および陰性細胞を分離し、マイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。さらに、統計解析や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、9 個の RhoGEF 遺伝子が網膜血管内皮細胞に発現することを明らかにした。これらの遺伝子について in situ hybridization を施行することにより、Arhgef15 遺伝子が血管内皮細胞に限局して発現することを同定した。

Arhgef15 による Cdc42 の活性化および RhoJ の不活化

培養 293 細胞に Arhgef15 またはその GEF 活性ドメインを発現するプラスミドベクターを導入すると、内在性 Cdc42 が活性化された。また、siRNA により Arhgef15 遺伝子をノックダウンした培養血管内皮細胞では、VEGF による Cdc42 の活性化が抑制された。一方、RhoJ を強制発現させた 293 細胞に Arhgef15 またはその GEF 活性ドメインを発現するプラスミドベクターを導入すると、RhoJ の不活化が誘導された。これらの結果から、Arhgef15 は VEGF の下流で Cdc42 を活性化するとともに RhoJ を不活化することが明らかとなった (図 1)。

Arhgef15 による血管新生の制御

Arhgef15 遺伝子をノックダウンした培養血管内皮細胞では、細胞内アクチン分子の重合が阻害される結果、細胞遊走や管腔形成が障害された (図 2)。また、Arhgef15 遺伝子ノックアウトマウスでは、ホモ型でも出生率や発育に異常を認めないものの、網膜血管発生の遅滞を認めた (図 3)。

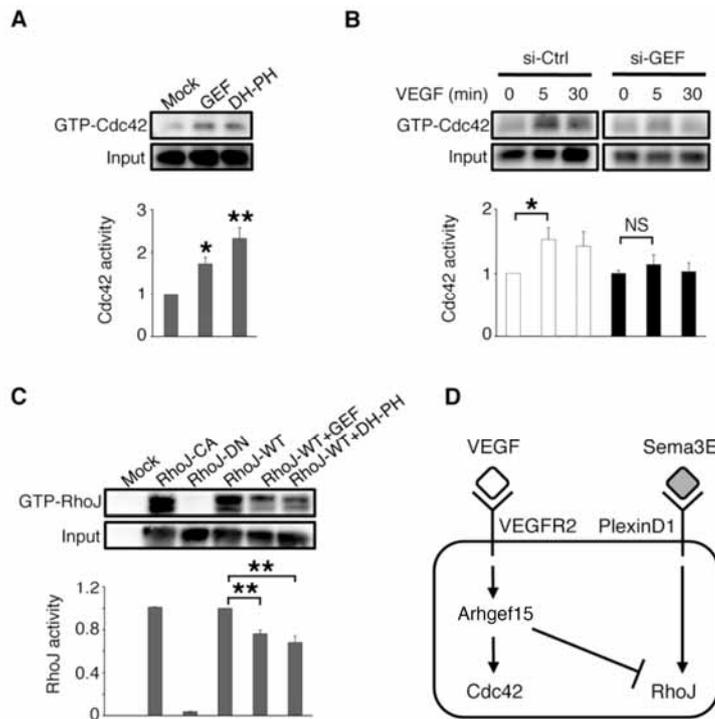


図1 . Arhgef15 による Cdc42 の活性化および RhoJ の不活化

(A) 293T 細胞における pull-down アッセイ。Arhgef15 (GEF) およびその DH-PH ドメインの過剰発現により、内源性 Cdc42 が活性化された。(B) ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) における pull-down アッセイ。Arhgef15 ノックダウン (si-GEF) により、VEGF による Cdc42 の活性化が抑制された。(C) 293T 細胞における pull-down アッセイ。Arhgef15 (GEF) およびその DH-PH ドメインの過剰発現により、共発現させた RhoJ が不活化された。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 。

(D) 内皮細胞におけるシグナル伝達。VEGF がチロシンキナーゼ型受容体 VEGFR2 に結合すると、Arhgef15 が Cdc42 を活性化するとともに RhoJ を不活化する。

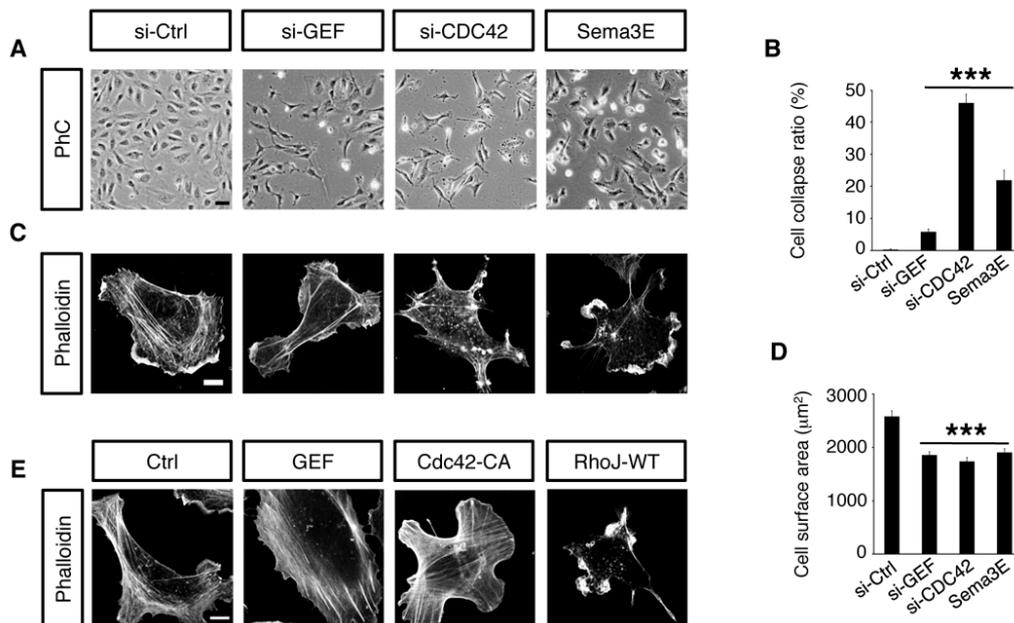


図2 . Arhgef15 による内皮細胞アクチン線維の重合

(A) 培養 HUVEC の位相差顕微鏡写真。Arhgef15 および Cdc42 のノックダウン、さらに Sema3E 蛋白刺激により、HUVEC の収縮が誘導された。(B) A における虚脱細胞の割合。(C) 培養 HUVEC の Phalloidin 染色。Arhgef15 および Cdc42 のノックダウン、さらに Sema3E 蛋白刺激によりアクチン線維の脱重合が誘導された。(D) C における HUVEC の細胞面積。(E) 培養 HUVEC の Phalloidin 染色。Arhgef15 および恒常的活性型 (CA) Cdc42 遺伝子の過剰発現によりアクチン線維の重合が促進された。一方、野生型 (WT) RhoJ 遺伝子の過剰発現により、アクチン線維の脱重合が誘導された。*** $P < 0.001$ 。

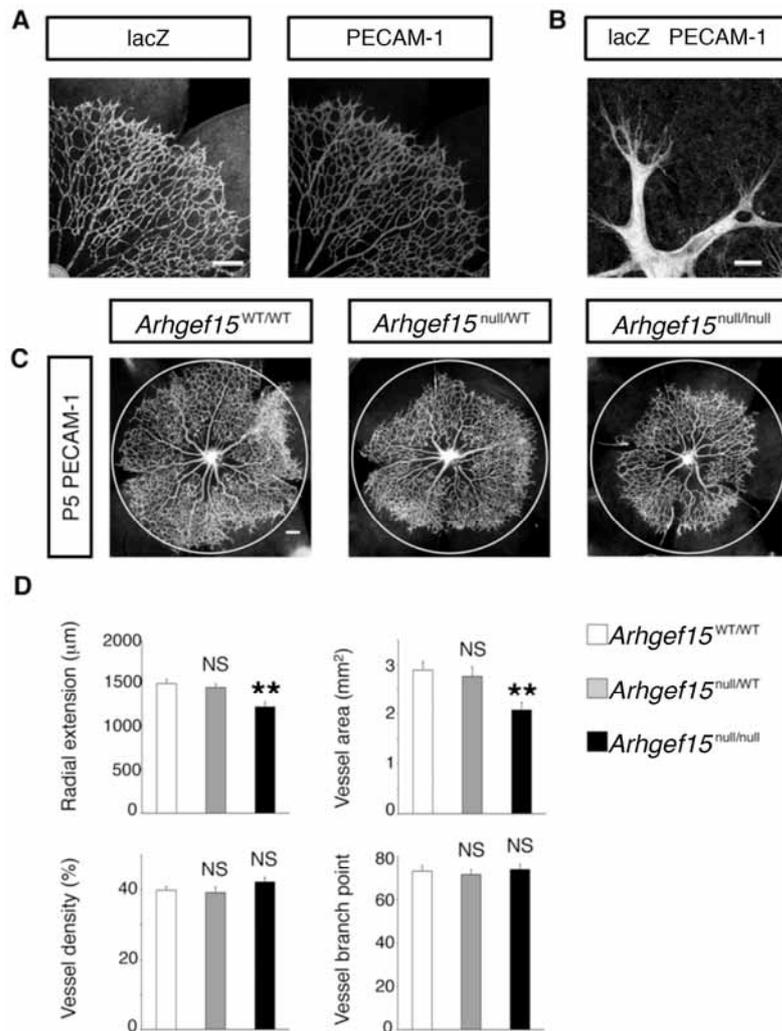


図3 . Arhgef15 ノックアウト (KO) マウスにおける網膜血管発生

(A) 生後 5 日 Arhgef15-KO ホモ型マウス網膜におけるホールマウント免疫染色。Arhgef15 遺伝子座に挿入された lacZ レポーター遺伝子の発現解析により、Arhgef15 が血管内皮細胞 (PECAM-1) に限局して発現することが確認された。(B) 網膜新生血管先端部における免疫染色。(C) 生後 5 日網膜における PECAM-1 免疫染色。円は野生型 (WT) マウスにおける網膜血管の範囲。(D) 生後 5 日網膜血管の定量化。ホモ型マウスでは、野生型マウスと比べて網膜血管網の半径が 18.5% 減少し、網膜血管の総面積が 28.3% 減少した。** $P < 0.01$ 。

4 生活や産業への貢献および波及効果

今後、Arhgef15 を標的としたリード化合物の探索を進め、その安全性・有効性に関する検証を進める。こうした研究が、加齢黄斑変性や糖尿病網膜症などの眼内血管新生病に限らず、癌に対する血管新生阻害療法においても新たな創薬開発につながることを期待される。