

博士論文要旨

(年 月 日 提出)

論文題目 血管内皮細胞における RASGRP2 の
アポトーシス抑制機構に関する研究

The study on the mechanism of apoptosis suppression by
RASGRP2 in vascular endothelial cells

指導教員 堀 隆光 (印)

補助教員 宇根 瑞穂 (印)

大学院

薬学 研究科 医療薬学 専攻

申請者氏名 佐藤 拓真 (印)

広島国際大学大学院

2019 年度 博士論文要旨

学生番号 G15-401	氏 名 佐藤 拓真
題 目 血管内皮細胞における RASGRP2 のアポトーシス抑制機構に関する研究 英文題目 The study on the mechanism of apoptosis suppression by RASGRP2 in vascular endothelial cells	
<p> 本研究は、血管の形成のメカニズムを解明するためにヒトの血管の細胞内における ras guanyl releasing protein 2 (RASGRP2) の影響について検討し、さらに RASGRP2 による細胞死 (アポトーシス) 抑制への影響について検討したものである。当研究室では、これまでにアフリカツメガエルの胚から血管の関連遺伝子として <i>xenopus rasgrp2</i> (<i>xrasgrp2</i>) を同定しており、ヒト相同遺伝子である RASGRP2 もヒトの血管内皮細胞で発現していることを報告している。RASGRP2 は、グアニンヌクレオチド交換因子の一つであり、相互作用解析において低分子量 G タンパク質の Ras-related protein 1 (Rap1) や R-Ras と相互作用してそれらを活性化させることが報告されている。また、RASGRP2 は、血球系の細胞において広く研究されており血小板では血栓の形成や好中球では細胞遊走の役割が知られている。しかしながら、ヒトの血管内皮細胞における RASGRP2 の機能に関しては未だに明らかにされていない。血管の形成には、血管内皮細胞が増殖することが必要であるが、増殖だけでなくアポトーシスも密接に関連している。また、微小環境下において血管内皮細胞は炎症や免疫性の疾患などで様々なサイトカインに曝されており、その中でも重要な炎症性サイトカインの一つである腫瘍壊死因子-α (TNF-α) は、炎症や感染及びその他のストレスに反応してマクロファージやリンパ球など多くの細胞によって産生され、血管内皮細胞における活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) の生成、透過性亢進及びアポトーシスに関与することが報告されている。アポトーシスを引き起こす誘導因子として Bcl-2-associated X protein (BAX) が知られており、BAX はミトコンドリアに移行することでアポトーシスを誘導させるが、細胞の生存に関与する AKT の活性化によりそのアポトーシスは抑制される。 </p> <p> そこで、まずヒトの臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の内在的な RASGRP2 の発現を確認したが、その発現は僅かであり RASGRP2 の影響を詳細に検討するには困難であると予測されたため、不死化された HUVEC (TERT HUVEC) を用いて RASGRP2 の安定的な過剰発現株 (TERT HUVEC R 細胞株) 及び対照細胞として mock 細胞株を作製した。樹立した TERT HUVEC R 細胞株は mock 細胞株と比べ、Rap1 と R-Ras の活性が顕著に増加していたため、血管内皮細胞における RASGRP2 は Rap1 と R-Ras の両方の活性化に関与していることが示された。次に、RASGRP2 の過剰発現が細胞増殖に影響しているかどうか調べるために細胞増殖能を測定したが、両細胞株に違いは見られなかった。 </p> <p> RASGRP2 による影響が細胞増殖能において見られなかったので、細胞の生存能に影響が見られるか TNF-α 刺激を行った。その結果、mock 細胞株と比較して TERT HUVEC R 細胞株では TNF-α 刺激による細胞生存率の減少が有意に抑制され、RASGRP2 は細胞の生存能に影響していることが示された。また、この細胞生存率の減少がアポトーシスによるものであり、さらにそのアポトーシスが ROS の生成により誘導されているか検討した結果、mock 細胞株と比較して TERT HUVEC R 細胞株ではその ROS の生成とアポトーシスの誘導が両方とも有意に抑制されていた。これらの抑制のメカニズムを解析した結果、血管内皮細胞における RASGRP2 は、Rap1 の活性化により TNF-α 刺激による NADPH oxidase を介した ROS の生成を抑え、アポトーシスの誘導を抑制することを明らかにした。 </p>	

一方、もう一つの低分子量Gタンパク質である R-Ras は、AKT をリン酸化して活性化させる。そのため、AKT のリン酸化を検討した結果、TERT HUVEC R 細胞株では mock 細胞株に比べて AKT のリン酸化が顕著に増加しており、実際にこの AKT のリン酸化の増加に R-Ras の活性が関与していた。このことから、RASGRP2 は R-Ras を介して AKT を活性化させることが示された。さらに、活性化された AKT は解糖系に関わる hexokinase-2 のミトコンドリアへの局在を増加させることが報告されており、実際に TERT HUVEC R 細胞株では mock 細胞株に比べ、hexokinase-2 のミトコンドリア移行が増加していた。この AKT の活性化が BAX により誘導されるアポトーシスに影響しているか調べるため、BAX を選択的に活性化させる BAM7 刺激による影響を検討した。その結果、両細胞株で BAX の活性化が見られたが、TERT HUVEC R 細胞株においてはアポトーシスの誘導が完全に抑制されていた。このことから、RASGRP2 により活性化される R-Ras-AKT 経路は、BAX の活性化に関与していない経路によりアポトーシスの誘導を抑制することが示された。次に、RASGRP2 が BAX の活性化よりも下流の経路である BAX のミトコンドリアへの移行を抑制しているか検討した。その結果、TERT HUVEC R 細胞株では BAM7 の刺激による BAX のミトコンドリアへの移行が抑制されていた。これらのメカニズムを解析した結果、血管内皮細胞における RASGRP2 は R-Ras-AKT 経路を介して hexokinase-2 をミトコンドリアに移行させ、それに伴って BAX のミトコンドリア移行を抑制させることでアポトーシスの誘導を抑制していることを明らかにした。

結論として、血管内皮細胞における RASGRP2 は Rap1 を介したシグナル経路及び R-Ras を介したシグナル経路により、アポトーシスを抑制させることを初めて明らかにした(下図参照)。血管形成の解析モデルとしてゼブラフィッシュの胚を用いた実験において、血管内皮細胞のアポトーシスが血管の欠損を起こすことが報告されているため、本研究により RASGRP2 はアポトーシスを抑制することで形成された血管の維持に関与している可能性が示された。

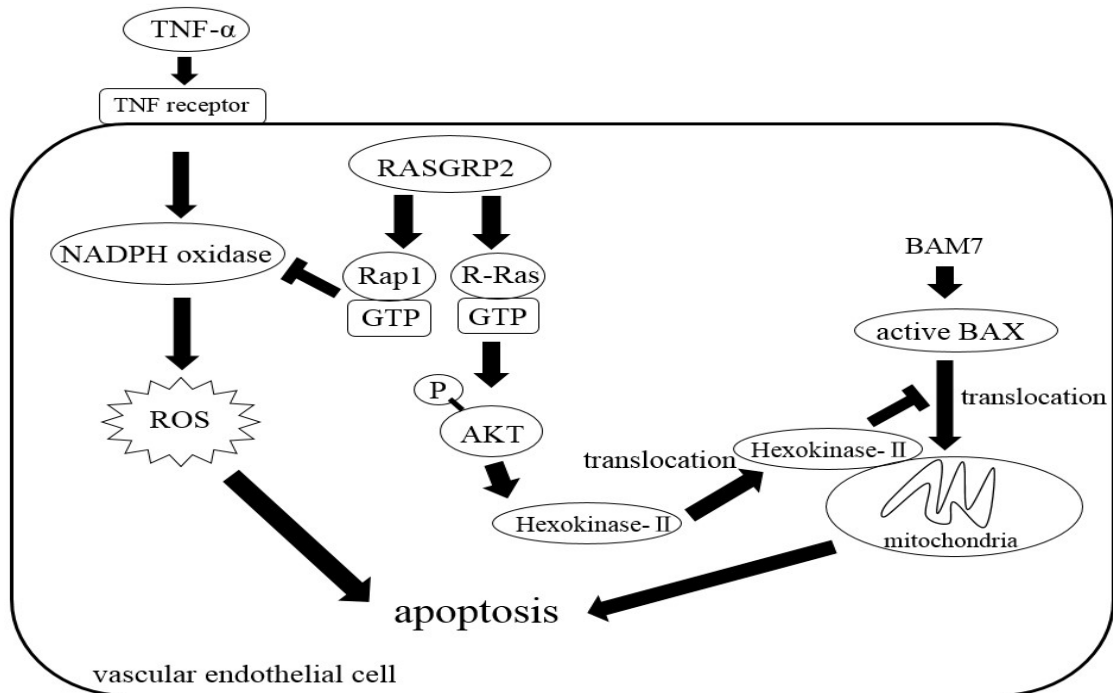


図. 血管内皮細胞における RASGRP2 を含むシグナル伝達経路