

博士論文

(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

補助教員 宇根 瑞穂

大学院

薬学 研究科 医療薬学 専攻

申請者氏名 佐藤 拓真

広島国際大学大学院

略語一覽

BAX : Bcl-2-associated X protein

CTZ : clotrimazole

Cyt c : cytochrome c

DPI : diphenyleneiodonium

ECL : enhanced chemiluminescence

GEF : guanine nucleotide exchange factor

HK-II : hexokinase-II

HUVEC : human umbilical vein endothelial cell

NAC : N-acetyl cysteine

NOX : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase

HRP : horseradish peroxidase

Rap1 : Ras-related protein 1

RASGRP2 : Ras guanyl releasing protein 2

RBD : Ras binding domain

ROS : reactive oxygen species

SDS : sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE : SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

Small G : small molecular weight G protein

TERT HUVEC : telomere reverse transcriptase HUVEC

TNF- α : tumor necrosis factor- α

VDAC-1 : voltage-dependent anion-selective channel 1

XRASGRP2 : xenopus ras guanyl releasing protein 2

序論

1. 血管の形成

血管は臓器の恒常性の維持や組織の再生に必要であり、内腔を覆う血管内皮細胞とその周囲を取り囲む壁細胞から構成される[1]。その血管は、血管がない時期に新たな血管が発生する脈管形成の過程を経た後、既存の血管から新たな血管が発生し伸長する血管新生により形成される (Figure 1) [2,3]。これらの過程により血管が形成されるには、血管内皮細胞の増殖が必要である[4]。

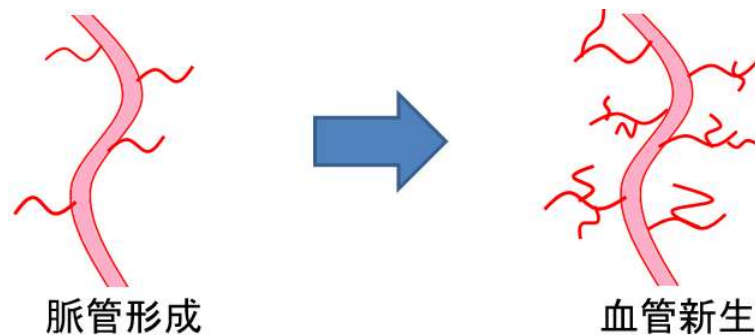


Figure 1 脈管形成と血管新生

2. 血管内皮細胞のアポトーシスによる疾患の増悪

アテローム性動脈硬化症や敗血症等の幾つかの疾患では、血管内皮細胞の細胞死 (アポトーシス) が見られることが報告されており、アポトーシスを引き起こす要因として oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) や endoplasmic reticulum stress (ER stress)、炎症に關与するサイトカインである腫瘍壊死因子- α (tumor necrosis factor- α : TNF- α) や高血糖状態で生成されるジカルボニル化合物の methylglyoxal に加えてグラム陰性菌の外膜の成分である lipopolysaccharide などが挙げられる[5-10]。このことから、血管内皮細胞のアポトーシスは様々な疾患を増悪させることが考えられる (Figure 2)。従って、血管内皮細胞のアポトーシスが要因である疾患の増悪を防ぐためにも血管内皮細胞のアポトーシスの制御機構を解明することは非常に重要であると考えられる。しかしながら、そのアポトーシスの制御機構は解明されていない。

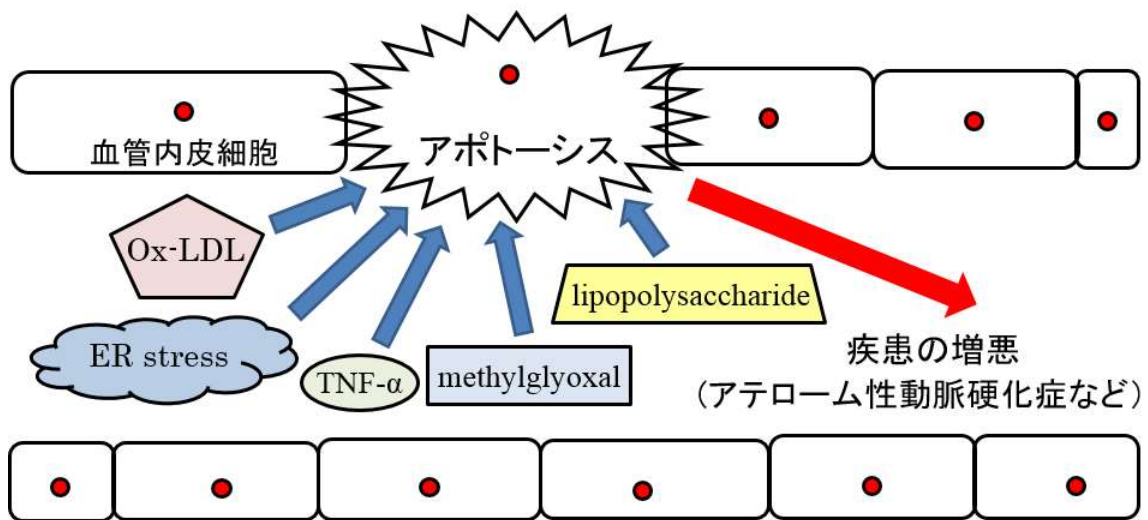


Figure 2 様々な要因が引き起こす血管内皮細胞アポトーシスによる疾患の増悪

3. 血管関連遺伝子 *xenopus ras guanyl releasing protein 2* (*xrasgrp2*) の同定

当研究室では、アクチビン及びアンジオポエチン 2 を共処理したアフリカツメガエルの胚から血管関連遺伝子として *xrasgrp2* を同定し、血管で XRASGRP2 が発現していることも明らかにしている [11-13]。また、XRASGRP2 はヒトにおける RASGRP2 (calcium and DAG-regulated guanine nucleotide exchange factor 1 (Ca/DAG-GEF I) としても知られる) と高い相同性を示すことを明らかにしている [11,12]。加えて、これまでに当研究室においてヒトの血管内皮細胞においても RASGRP2 が発現していることも報告している [14]。しかしながら、血管内皮細胞における RASGRP2 の働きは明らかにされていない。

4. RASGRP2 の構造

RASGRP2 はグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor : GEF) の 1 つであり、N 末端側に GEF として作用する Ras 交換モチーフドメイン (REM) や CDC25 ドメイン、カルシウムの結合に関わる EF-Hand ドメイン、ジアシルグリセロールやホルボールエステル等が結合する C1 ドメインを持つ (Figure 3)。しかし、RASGRP2 の C1 ドメインはアミノ酸配列が他の RASGRP メンバーと一部異なりジアシルグリセロールと結合できないため、細胞膜への移行を示さないといった特徴を持っている [15]。

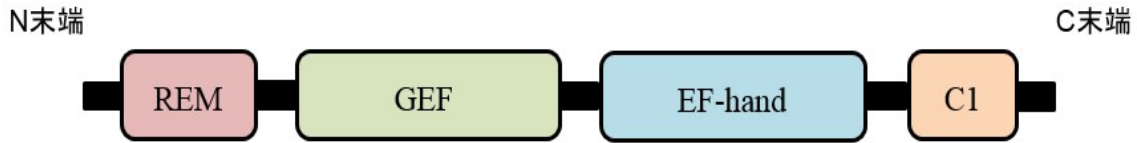


Figure 3 RASGRP2 の構造の模式図

5. RASGRP2 の働き

RASGRP2 は低分子量 G タンパク質 (small molecular weight G protein : Small G) を GDP から GTP へ変換することで Small G を活性化させる[16]。Small G を介した情報伝達経路は、RASGRP2 の様な GEF あるいは GTP を加水分解することで Small G を不活性化させる GTPase activating protein (GAP) により常に調節されている (Figure 4)。RASGRP2 は相互作用解析により、Small G の中でも Ras-related protein 1 (Rap1) 及び R-Ras を活性化させることが知られている[16-18]。

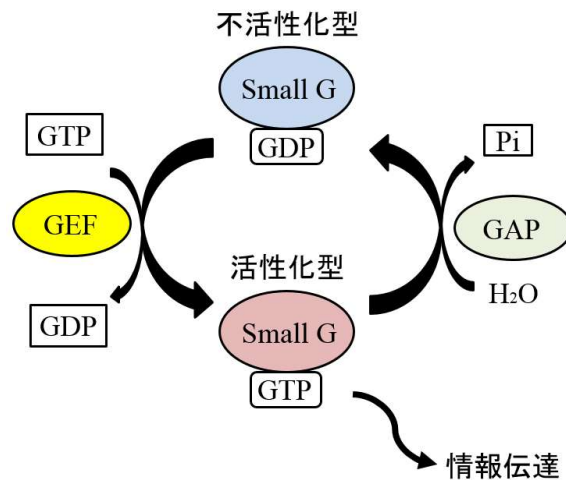


Figure 4 Small G の活性の調節

6. Rap1 の働き

Rap1 は、Ras ファミリーに属しており Ras と最も相同性の高いタンパク質である。しかしながら、Rap1 は Ras とは異なる情報伝達経路で機能し、主に細胞接着及び細胞接合部形成に関与していることが報告されている[19]。メラノーマ細胞における Rap1 は、インテグリンを活性化することで細胞遊走を増加させる[20]。さらに、血管内皮細胞における Rap1 は vascular endothelial cadherin 依存性の細胞接着を増強することでバリア機能を調節する役割を持っている[21-23]。また、これまでに当研究室では血管内皮様の管腔形成能を持つヒト膀胱癌細胞株 ECV304 において、RASGRP2 によって活性化される Rap1 は細胞-基質間接着を増加させることを報告している[24]。加えて、RASGRP2 によ

て活性化される Rap1 は、血小板ではインテグリンを活性化することによって血栓の形成に寄与することも報告されている[25]。しかしながら、血管内皮細胞において RASGRP2 が Rap1 を活性化しているか否か、また、その RASGRP2 により活性化された Rap1 がどのような役割を果たすかは明らかにされていない。

7. R-Ras の働き

RASGRP2 は R-Ras も活性化させることが示されている[17,18]。R-Ras は、古典的な Ras として知られる H-Ras や K-Ras と比べて、プロリンに富む SH3 domain binding site を含むという点で他の Ras メンバーと構造的な違いがある[26]。また、R-Ras は構造だけでなく機能的にも古典的な Ras とは異なり、H-Ras は骨格筋への分化を阻害するのに対し、R-Ras は骨格筋筋芽細胞では分化が促進されて骨格筋の形成に関与する対照的な働きをすることも明らかにされている[27,28]。血管における R-Ras は、分化して成熟化した血管内皮細胞や血管周皮細胞に多く発現されることが知られている[26]。さらに、R-Ras は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) を活性化することにより AKT (Protein Kinase B としても知られる) を活性化させることが報告されている[29]。AKT は、アポトーシス抑制や糖代謝等で細胞の生存に非常に重要な役割を持っている[30,31]。しかしながら、血管内皮細胞において RASGRP2 が R-Ras を活性化し、さらに RASGRP2 により活性化しているか否か、また、その R-Ras がどのような働きを示すかは解明されていない。

8. 研究の目的

本研究では、RASGRP2 が血管内皮細胞においてどのような役割をしているか明らかにするため、RASGRP2 が活性化する Small G を介した細胞増殖及びアポトーシスに関する情報伝達経路について解析し、それらに関する研究の成果を各章に分けて報告する (Figure 5)。

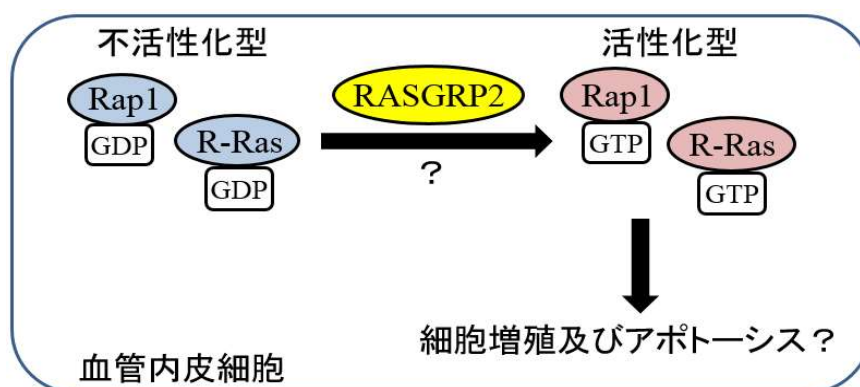


Figure 5 血管内皮細胞における RASGRP2 の働きを予想した想定図

本論

第一章

RASGRP2 過剰発現による細胞生存率への影響

第一節 RASGRP2 による Rap1、R-Ras の活性化

当研究室では、これまでの研究によりアフリカツメガエルの胚から血管関連遺伝子として *xrasgrp2* を同定している[11,12]。また、アフリカツメガエルの胚において、XRASGRP2 は血管形成期から発現増加を示すことや XRASGRP2 過剰発現は異所性の血管の形成を誘導する一方で、その遺伝子ノックダウンは血管発達の遅延を示すことから、XRASGRP2 は初期発生中の血管の形成に重要な役割を果たすことを報告している[13]。血管の形成には、血管内皮細胞の増殖が必要であるため、著者は血管内皮細胞において RASGRP2 が細胞増殖に対して重要な働きをしているという仮説を立てた。一方、以下に述べる通り、血管内皮細胞は増殖だけでなくアポトーシスとも密接に関係していることが報告されている。血管の微小環境下において、血管内皮細胞はインターロイキンなどのサイトカインに曝されており、免疫性の疾患及び炎症時に誘導されるサイトカインによりアポトーシスが引き起こされることも知られている[32]。その中でも、TNF- α は重要な炎症性サイトカインの 1 つであり炎症、感染及びその他のストレスに反応して、マクロファージ、単球及びケラチノサイトを含む多くの細胞によって産生される[33,34]。さらに、血管内皮細胞において TNF- α は活性酸素種 (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と知られている[8,35,36]。しかしながら、血管内皮細胞における RASGRP2 の機能を解析した報告は見られていない。そこで、RASGRP2 が血管内皮細胞においてどのような役割をしているか明らかにするため、本章では血管内皮細胞を用いて、RASGRP2 により活性化される Small G を介した細胞増殖及びアポトーシスについて解析した。

初めに、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cell : HUVEC) 及び不死化した HUVEC (telomere reverse transcriptase HUVEC : TERT HUVEC) の内在性の RASGRP2 の発現を確認した。その結果、HUVEC と TERT HUVEC の両方ともに短時間露光 (1 分) では内在性の RASGRP2 の発現は見られなかったが、長時間露光 (15 分) では内在性の RASGRP2 の発現が確認された (Figure 6)。Figure 6 により、内在性の RASGRP2 の発現が僅かであったことから、HUVEC 及び TERT HUVEC における RASGRP2 の機能を詳細に解析するには困難であると考えられた。そこで、不死化した TERT HUVEC を用いて RASGRP2 の安定的過剰発現株の作製を試みた。その結果、RASGRP2 の安定的過剰発現株 (TERT HUVEC R 細胞株) のクローンを 2 つ

樹立した (Figure 7A)。そして、樹立した TERT HUVEC R 細胞株のクローンを用いて Rap1 の活性を測定した。Rap1 の活性測定には、活性化型の Small G と相互作用する Ras Binding Domain (RBD) のドメインを持つ RalGDS-RBD agarose beads を用いて pull down assay を行った。その結果、total Rap1 は mock 細胞株と TERT HUVEC R 細胞株では差は見られなかった (Figure 7 B)。それに対し、活性化型 Rap1 は mock1 細胞株と比較して、TERT HUVEC R1 細胞株では 4.4 倍、TERT HUVEC R2 細胞株では 5.7 倍に増加した (Figure 7 B)。以降の実験では、mock2 細胞株及び TERT HUVEC R1 細胞株のクローンを使用した。また、両細胞株を用いて RalGDS-RBD agarose beads による pull down assay を行い、R-Ras の活性も測定した。その結果、total R-Ras は mock 細胞株と TERT HUVEC R 細胞株で一定であるのに対し、活性化型 R-Ras は mock 細胞株と比較して、TERT HUVEC R 細胞株では 3 倍に増加した (Figure 8)。

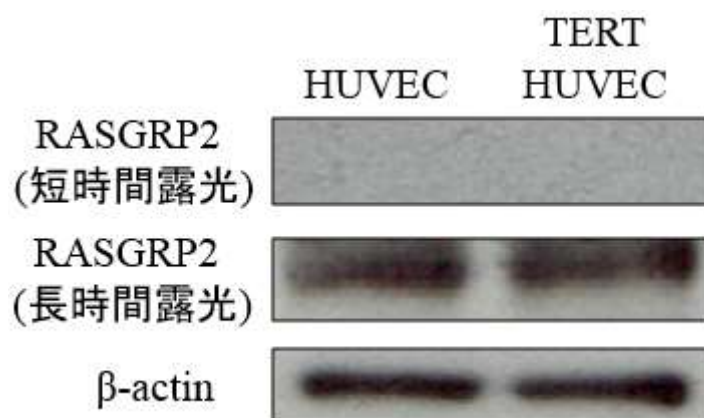


Figure 6 HUVEC 及び TERT HUVEC の内因性 RASGRP2 の発現
ウエスタンブロットの際に X 線フィルムを用いて短時間露光及び長時間露光により内因性 RASGRP2 の発現を検討した。

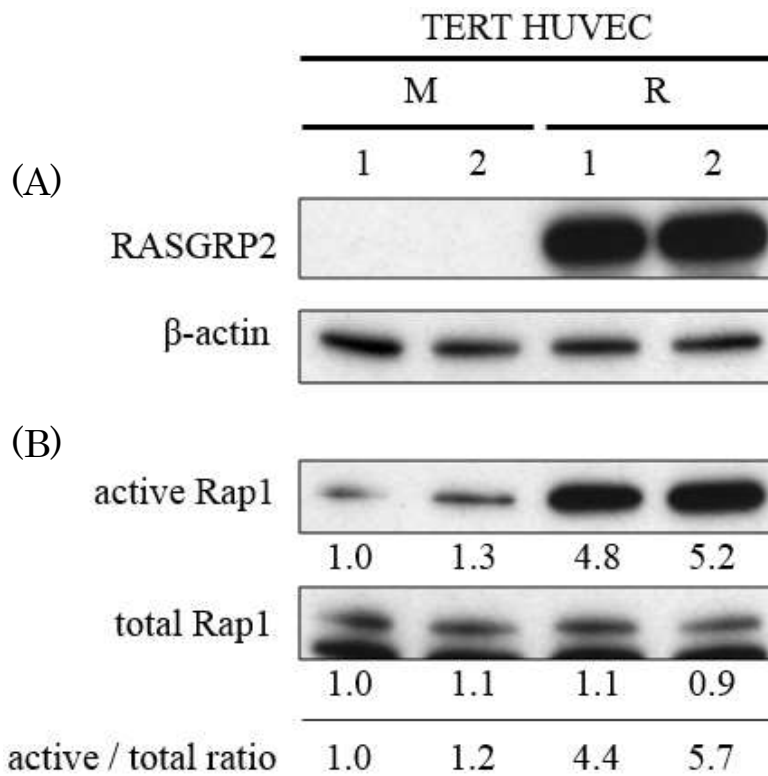


Figure 7 RASGRP2 過剰発現株における Rap1 の活性化

(A) RASGRP2 の安定的過剰発現株と mock 細胞株の RASGRP2 発現量をウエスタンブロット解析 (B) RalGDS-RBD agarose beads を用いて回収した活性化型 Rap1 と total Rap1 のウエスタンブロット解析 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 1 及び 2 : 樹立によって得られた 2 つの各クローン。

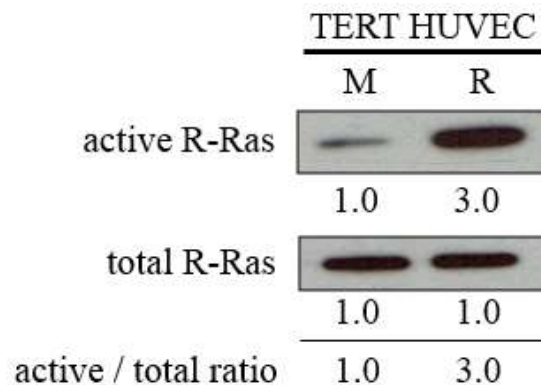


Figure 8 RASGRP2 過剰発現株における R-Ras の活性化

RalGDS-RBD agarose beads を用いて回収した活性化型 R-Ras と total R-Ras のウエスタンブロット解析 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株

第二節 TNF- α が惹起する細胞生存率減少に対する RASGRP2 の関与

前節より、血管内皮細胞において RASGRP2 が Rap1 及び R-Ras を活性化させることを明らかにした (Figure 7 B, 8)。次に、RASGRP2 が細胞増殖に影響しているか調べるため、試薬として WST-8 を用いて測定した。その結果、両細胞株ともに 24 時間後の細胞生存率を 100%とした際、TERT HUVEC R 細胞株では 127% (48 時間)、175% (72 時間)、mock 細胞株は 129% (48 時間)、175% (72 時間) となり、いずれにおいても細胞増殖率に有意な差はなかった (Figure 9)。

次に、RASGRP2 がアポトーシスに影響しているか調べた。血管内皮細胞は、サイトカインの 1 つである TNF- α によりアポトーシスが誘導されることが知られている [7,8,35]。そこで、アポトーシス誘導剤として TNF- α を用いて細胞生存率を検討した。その結果、未処理と比較して TNF- α 刺激により mock 細胞株では細胞生存率が 62%に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では 82%に減少した。しかしながら、mock 細胞株と比較して、TERT HUVEC R 細胞株は TNF- α 刺激による細胞生存率の減少が有意に抑制されていた (Figure 10)。

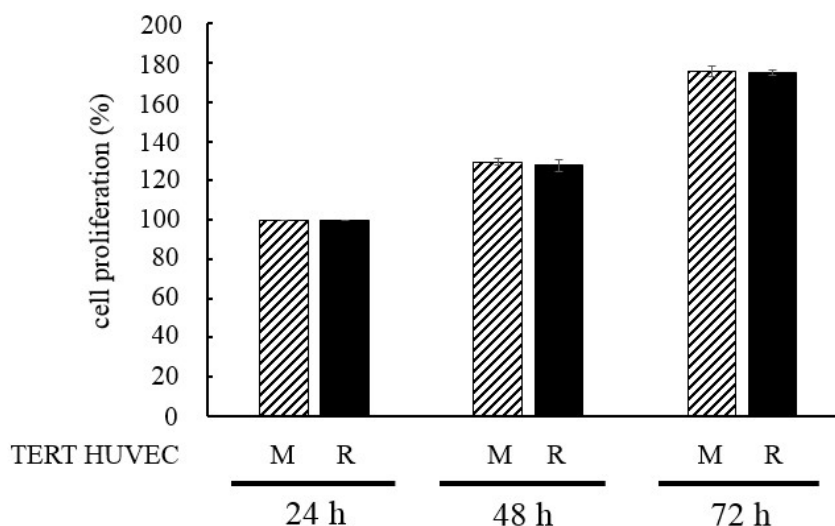


Figure 9 RASGRP2 過剰発現株の細胞増殖率

細胞を播種、24、48 及び 72 時間後に WST-8 を 2 時間処理した。両細胞株とも、24 時間での細胞増殖率を 100%とした。 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3)

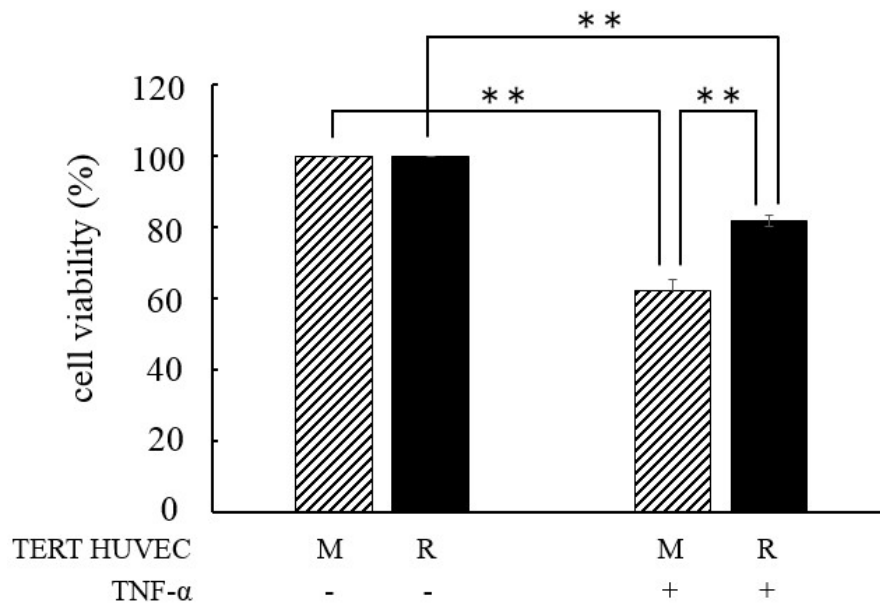


Figure 10 TNF- α 刺激による細胞生存率減少に対する抵抗性
 20 ng/mL TNF- α 刺激下での細胞生存率への影響 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** P < 0.01)

第三節 考察

アフリカツメガエルの胚を用いた実験から、血管内皮細胞では血管形成期から X_{RAS}GRP2 の発現が増加することを当研究室では以前に明らかにしている [11,12]。本実験では、ヒトの血管内皮細胞における RASGRP2 の影響を解析した。その結果、樹立した TERT HUVEC R 細胞株において RASGRP2 は活性化型 Rap1 及び R-Ras を増加させた (Figure 7 B, 8)。このことから、今回著者は、血管内皮細胞において RASGRP2 が Rap1 及び R-Ras を活性化させることを明らかにした。

Rap1 は主に細胞接着に関与していることが報告されている [19]。また、R-Ras は他の Ras ファミリーメンバーとは異なり、細胞増殖能を亢進させる MAPK 情報伝達経路を活性化する機能がないことが知られている [37,38]。実際に、TERT HUVEC R 細胞株と mock 細胞株では細胞増殖率に有意な差は見られず (Figure 9)、これまで報告されていることと矛盾がなかった。さらに、著者は Figure 10 の結果から、RASGRP2 が TNF- α 刺激による細胞生存率の減少に対して抵抗性を示していることも明らかにした。TNF- α はアポトーシスを誘導することが知られており [7,8,35]、RASGRP2 は細胞増殖ではなくアポトーシスに関する情報伝達経路を抑制している可能性が考えられた。

第二章

RASGRP2により活性化された Rap1 を介した アポトーシス抑制機構の解析

第一節 TNF- α が惹起する NOX を介した細胞生存率減少 に対する RASGRP2 の関与

著者は、第一章で血管内皮細胞において RASGRP2 が TNF- α 刺激による細胞生存率の減少に対して抵抗性を示すことを明らかにした (Figure 10)。TNF- α によるアポトーシスは、NADPH oxidase (NOX) を介した ROS 生成経路により誘導されることが報告されている[39]。そこで本章では、TNF- α 刺激によるアポトーシスに関する情報伝達経路に対して、RASGRP2 がどの段階で抑制しているか解析した。

初めに、RASGRP2 が NOX 発現に影響を与えるか確認した。HUVEC では、NOX4 が高い発現を示すことが報告されているため[40]、NOX4 の発現量を検討した。その結果、mock 細胞株と比較して、TERT HUVEC R 細胞株では 1.1 倍であったことから両細胞株の NOX4 発現に変化はなかった (Figure 11)。

次に、TNF- α 刺激による細胞生存率の低下が ROS によるものか確認するため、ROS スカベンジャーとして N-acetyl cysteine (NAC)、NOX 阻害剤として diphenyleneiodonium (DPI) と apocynin を用いて検討した。その結果、NAC、DPI 及び apocynin のそれぞれの単独処理は細胞生存率に変化はなかった。また、TNF- α 単独刺激により mock 細胞株では細胞生存率が約 62%に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では約 82%に減少した (Figure 12)。さらに両細胞株において TNF- α 刺激による細胞生存率の減少は、NAC 処理によってほぼ 100%に回復した (Figure 12 A)。一方、DPI 及び apocynin 処理により TNF- α 刺激による細胞生存率の減少は、mock 細胞株では約 80%に回復したが、TERT HUVEC R 細胞株では細胞生存率は約 81%であり、DPI 及び apocynin 処理では TNF- α 刺激による細胞生存率減少の回復は見られなかった (Figure 12 B, C)。さらに、DPI 及び apocynin 処理による mock 細胞株の細胞生存率の回復は、DPI 及び apocynin 処理した TNF- α 刺激による TERT HUVEC R 細胞株の細胞生存率と同程度であった (Figure 12 B, C)。これらの結果から、TERT HUVEC において RASGRP2 は NOX を阻害することにより、TNF- α 刺激による細胞生存率の減少に対して抵抗性を示していることが考えられた。

次に、DPI 及び apocynin 処理により NOX の活性が完全に抑制されているか調べるため、各 NOX 阻害剤の濃度を検討した。その結果、DPI 処理の濃度を 20 μ M から 40 μ M に増加しても TNF- α 刺激による両細胞株の細胞生存率は約 80%であり、20 μ M 処理と変わらなかった (data not shown)。同様に、apocynin 処理の濃度を 30 μ M から 45 μ M に増加したが、両細胞株の TNF- α 刺激による細

胞生存率は約 80%であり、30 μ M 処理と変わらなかった (data not shown)。

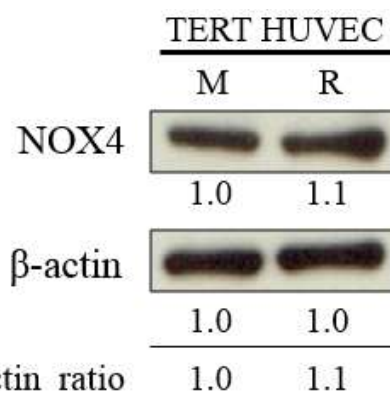


Figure 11 RASGRP2 過剰発現株における NOX4 の発現

TERT HUVEC R 細胞株における NOX4 発現量のウエスタンブロット解析 M: mock 細胞株、
R : TERT HUVEC R 細胞株

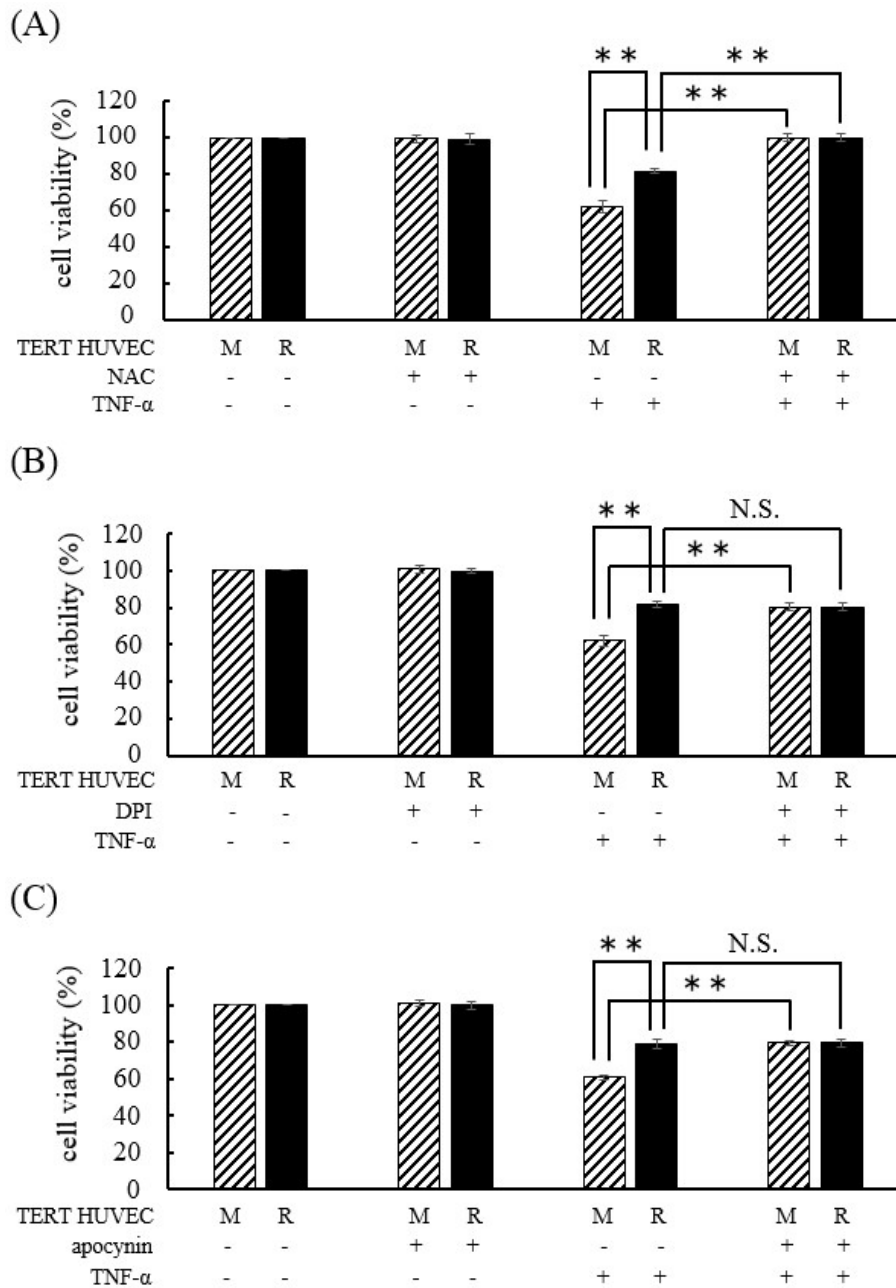


Figure 12 NOX を介する細胞生存率減少に対する RASGRP2 の抵抗性

(A) TNF- α 刺激下での 5 mM NAC 処理の細胞生存率への影響 (B) TNF- α 刺激下での 20 μ M DPI 処理の細胞生存率への影響 (C) TNF- α 刺激下での 30 μ M apocynin 処理の細胞生存率への影響 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** P < 0.01, N.S. : Not Significant)

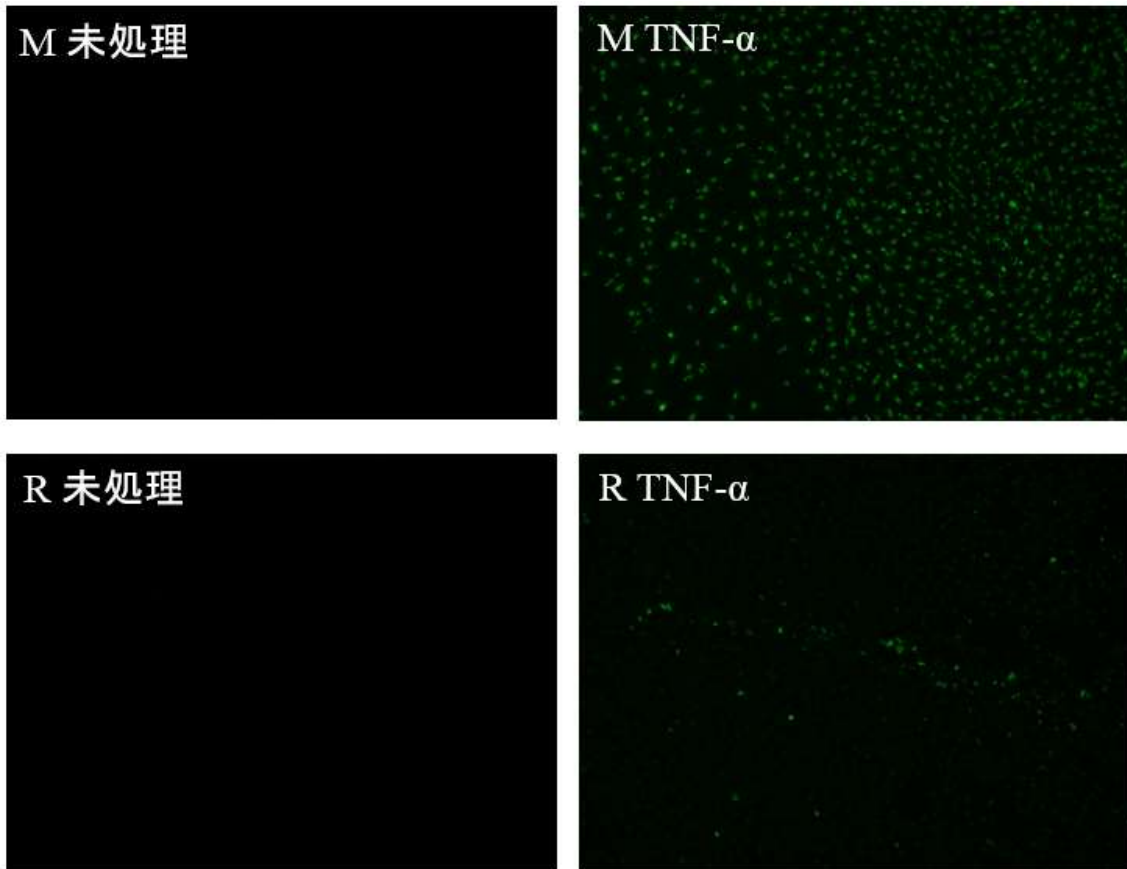
第二節 TNF- α が惹起する ROS 生成とアポトーシス誘導 に対する RASGRP2 の関与

細胞生存率評価の結果から (Figure 10)、RASGRP2 は TNF- α による ROS の生成を抑制することで細胞死、特にアポトーシスを抑制していることが考えられた。そのため、アポトーシスの一般的な指標である caspase-3 の活性化を検出することができる NucView 488 を用いて[41-45]、TNF- α 刺激による細胞生存率の減少がアポトーシスによるものか確認した。その結果、TNF- α 刺激により mock 細胞株に顕著な蛍光の増加が観察され、caspase-3 の活性化が検出された (Figure 13 A 上段)。このことから、TNF- α 刺激による細胞生存率の減少はアポトーシスによるものであることが示された。Figure 13 B は、画像の蛍光を数値化し、未処理との相対比で表した結果である。両細胞株ともに、未処理の蛍光を 1 とした際、TNF- α 刺激により mock 細胞株は約 25 倍に増加したが、TERT HUVEC R 細胞株では約 5 倍の増加に留まった。

次に、RASGRP2 によるアポトーシスの抑制に NOX が関与しているか調べるため、NOX 阻害剤である DPI 及び ROS スカベンジャーである NAC を用いて検討した。その結果、TNF- α 刺激によって増加した蛍光は、mock 細胞株では約 25 倍に増加したが、DPI 処理により約 5.4 倍まで減少した。一方、TERT HUVEC R 細胞株では DPI 処理による影響は見られなかった。さらに、両細胞株とも未処理と同程度までは減少しなかった。一方、TNF- α 刺激によって増加した蛍光は、NAC 処理により両細胞株ともに未処理と同程度まで減少した (Figure 14)。

次に、RASGRP2 により ROS の生成が抑制されているか調べるため、ROS を検出することができる CellROX® Green を用いて[46-50]、TNF- α 刺激による ROS の生成を評価した。その結果、TNF- α 刺激によって mock 細胞株で顕著な蛍光の増加が観察され、ROS が検出された (Figure 15 A 上段)。Figure 15 B は、画像の蛍光を数値化し、未処理との相対比で表した結果である。両細胞株ともに未処理の蛍光を 1 とした際、TNF- α 刺激により mock 細胞株は約 20 倍に増加したが、TERT HUVEC R 細胞株では約 3.7 倍しか増加しなかった。また、TNF- α 刺激によって増加した蛍光は、mock 細胞株では DPI 処理により 4.4 倍まで減少したが、TERT HUVEC R 細胞株では DPI 処理による減少が見られなかった。さらに、DPI を処理しても両細胞株とも未処理と同程度までは減少しなかった。一方、NAC 処理により、TNF- α 刺激によって増加した蛍光は両細胞株ともに未処理と同程度まで減少した。

(A)



(B)

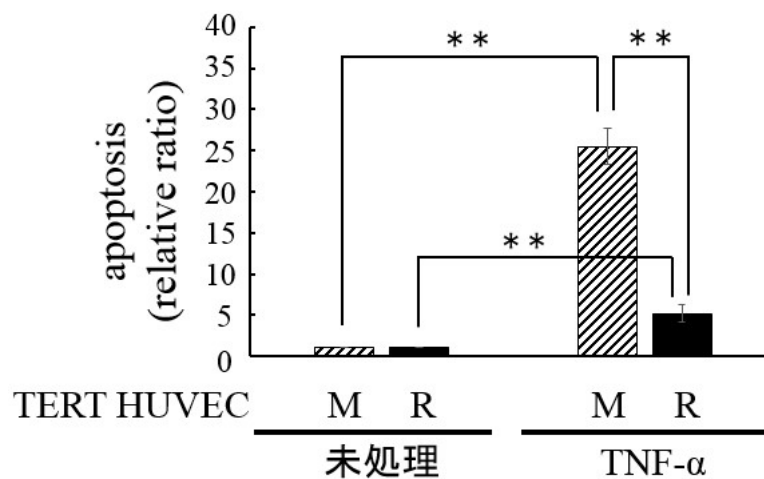


Figure 13 TNF- α 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性

(A) TNF- α 刺激下で取得した蛍光顕微鏡像 (B) 画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化したアポトーシス相対比 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** p < 0.01)

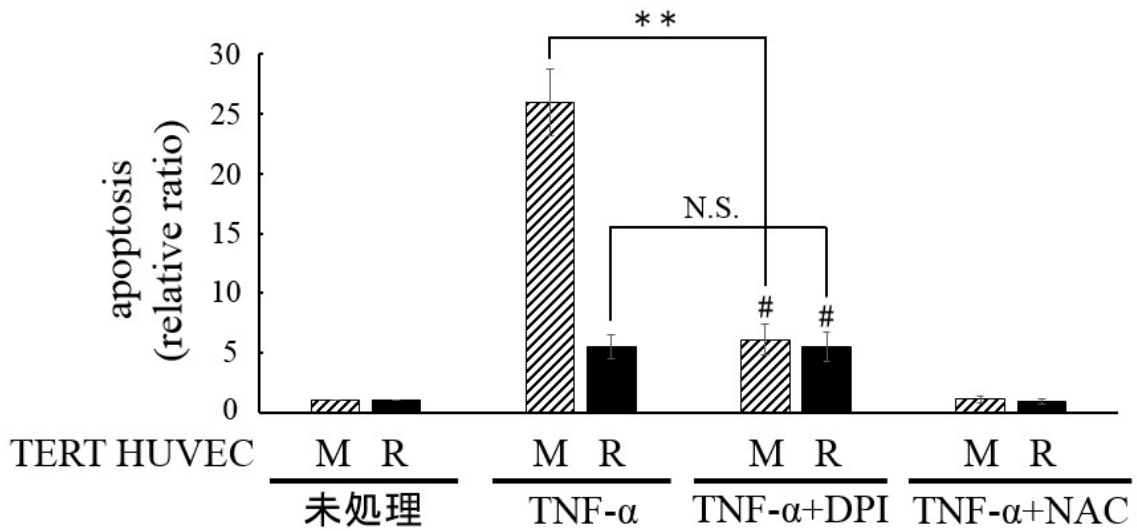
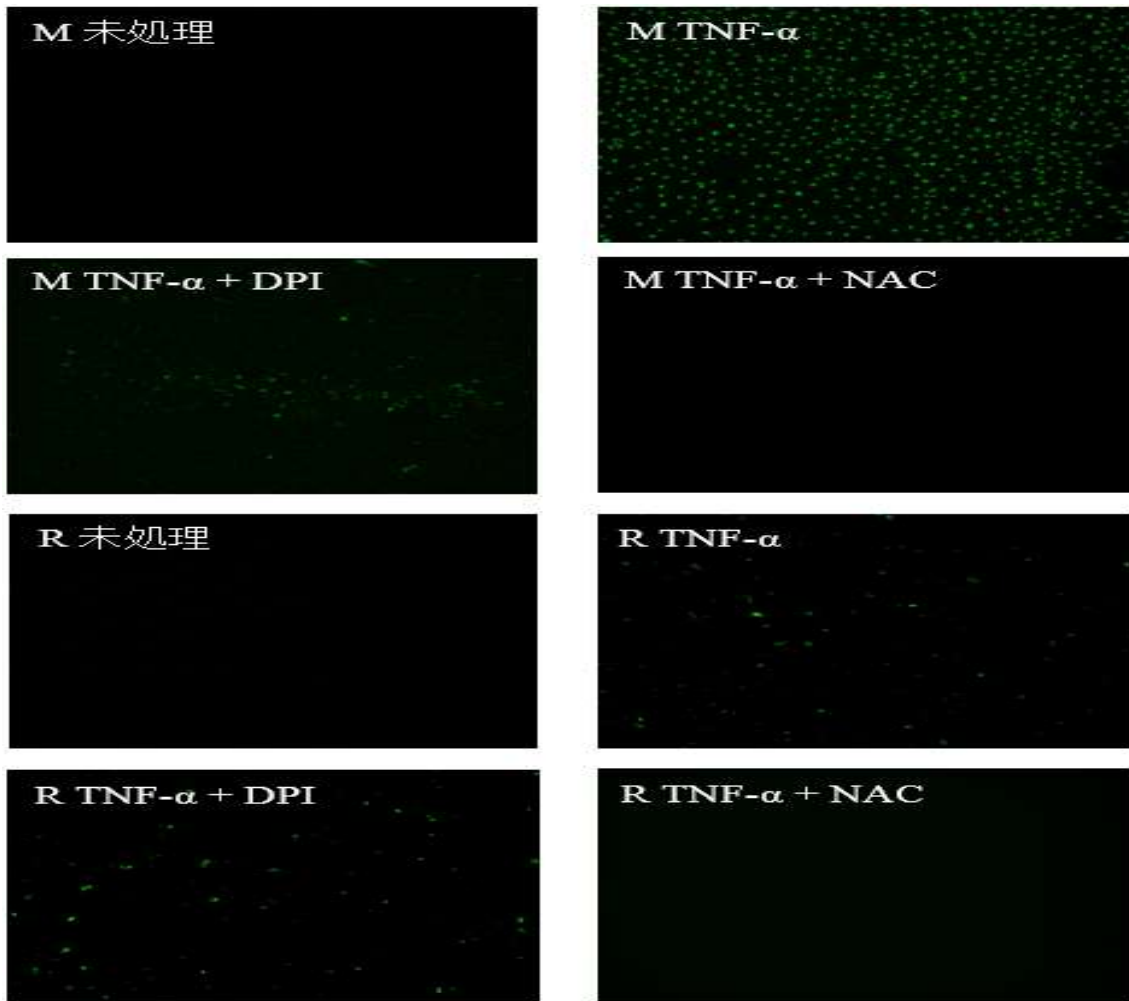


Figure 14 NOX を介するアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性

(A) TNF- α 刺激下での 5 mM NAC 及び 20 μ M DPI 処理で取得した蛍光顕微鏡像 (B) 画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化したアポトーシス相対比 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** p < 0.01, # p < 0.01 未処理 versus TNF- α + DPI, N.S. : Not Significant)

(A)



(B)

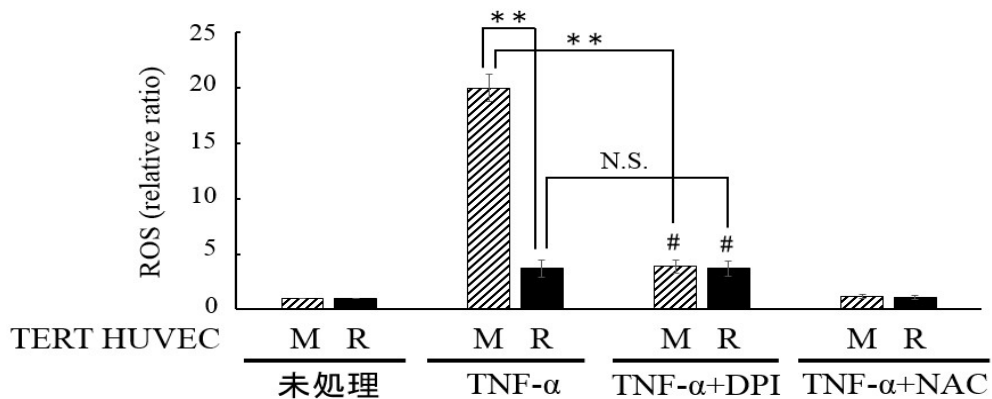


Figure 15 NOX を介する ROS 生成に対する RASGRP2 の抵抗性

(A) TNF- α で刺激下での 5 mM NAC 及び 20 μ M DPI 処理で取得した蛍光顕微鏡像 (B) 画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化した ROS 生成相対比 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** p < 0.01, # p < 0.01 未処理 versus TNF- α + DPI, N.S. : Not Significant)

第三節 TNF- α が惹起するアポトーシスに対する Rap1 の関与

ここまでの結果から、著者は血管内皮細胞において RASGRP2 が Rap1 と R-Ras を活性化することを明らかにした (Figure 7 B, 8)。さらに、RASGRP2 は TNF- α 刺激による NOX を介した ROS の生成を抑制することによって、アポトーシスを抑制することも明らかにした (Figure 14, 15 B)。次に、この ROS の生成及びアポトーシスの抑制が R-Ras 及び Rap1 のどちらかの活性化によるものか検討した。

R-Ras が TNF- α 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性に関与しているか調べるため、R-Ras siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした。その結果、total R-Ras は negative control siRNA を処理した mock 細胞株と比較して、R-Ras siRNA の処理により両細胞株ともに 10 分の 1 に減少し、それに伴って活性化型 R-Ras は両細胞株ともに 5 分の 1 に減少していることを確認できた (Figure 16 A)。次に、R-Ras 遺伝子ノックダウン条件下での TNF- α 刺激による細胞生存率への影響を調べた。その結果、R-Ras をノックダウンしても細胞生存率に変化はなかった (Figure 16 B (a), (b))。また、negative control siRNA を処理した TNF- α 刺激により、mock 細胞株では細胞生存率が約 61% に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では約 76% に減少した (Figure 16 B (c))。さらに、R-Ras siRNA を処理した TNF- α 刺激により、mock 細胞株では細胞生存率が約 55% に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では約 69% に減少した (Figure 16 B (d))。しかしながら、両細胞株ともに、negative control siRNA の処理と比べて R-Ras siRNA を処理により TNF- α 刺激による細胞生存率が有意ではあるが僅かな減少に留まった (Figure 16 B (c), (d))。

次に、Rap1 が TNF- α 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性に関与しているか調べるため、Rap1 siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした。その結果、total Rap1 は negative control siRNA を処理した mock 細胞株と比較して、Rap1 siRNA の処理により mock 細胞株では 10 分の 3 に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では 5 分の 1 に減少し、それに伴って活性化型 Rap1 は mock 細胞株では 10 分の 3 に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では 5 分の 1 に減少していることを確認できた (Figure 16 C)。次に、Rap1 遺伝子ノックダウン条件下での TNF- α 刺激による細胞生存率への影響を調べた。その結果、Rap1 をノックダウンしても細胞生存率に変化はなかった (Figure 16 D (a), (b))。また、negative control siRNA を処理した TNF- α 刺激により、mock 細胞株では細胞生存率約が 60% に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では約 77% に減少した (Figure 16 D (c))。さらに、Rap1 siRNA を処理した TNF- α 刺激により mock 細胞株では細胞生存率が約 56% に減少し、TERT HUVEC R 細胞株では約 54% に減少した (Figure 16 D (d))。Figure 16 D の (c) と (d) を比較すると、TERT HUVEC R 細胞株では、negative control siRNA の処理と比べて Rap1 siRNA を処理により TNF- α 刺激による細胞生存率が有意に減少していた。

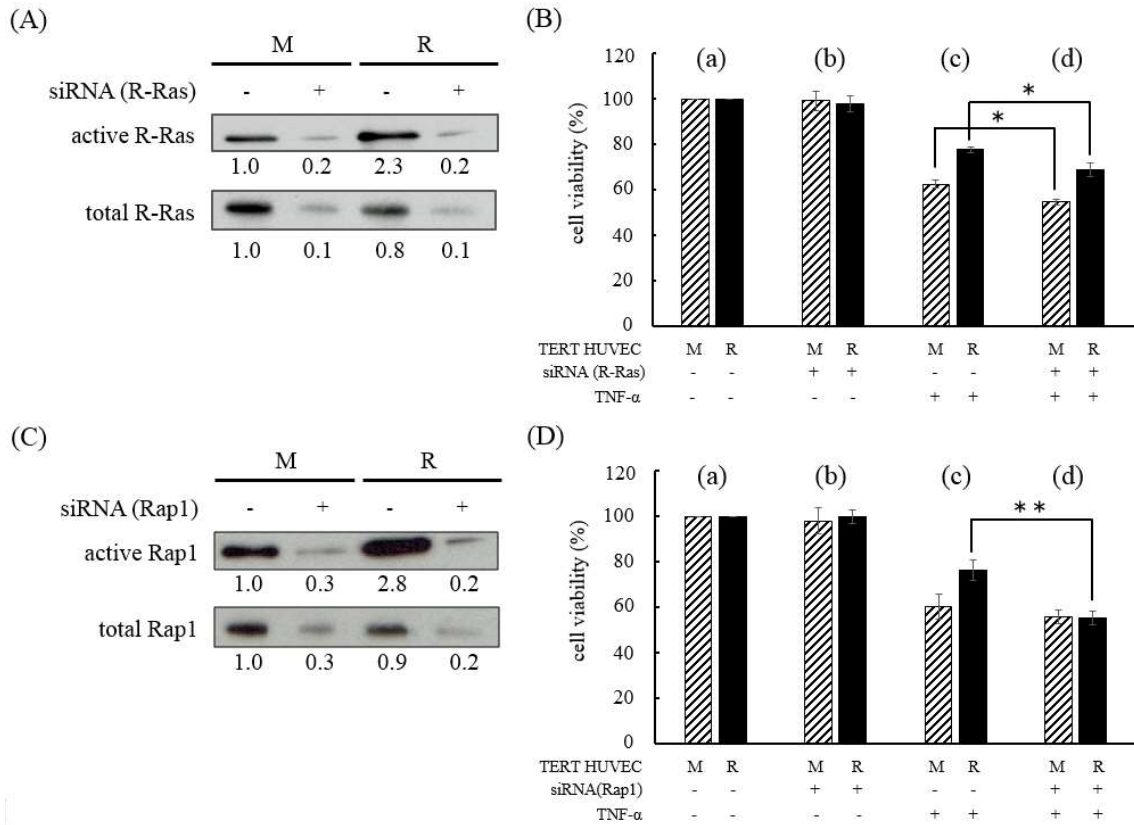


Figure 16 RASGRP2-Rap1 経路による TNF- α が惹起する細胞生存率減少の抑制

(A) R-Ras ノックダウン条件下での RalGDS-RBD agarose beads を用いて回収した活性型 R-Ras と total R-Ras のウエスタンブロット解析 (B) R-Ras ノックダウン条件下での TNF- α 刺激による細胞生存率への影響 (n=3, ** p < 0.01) (C) Rap1 ノックダウン条件下での RalGDS-RBD agarose beads を用いて回収した活性型 Rap1 と total Rap1 のウエスタンブロット解析 (D) Rap1 ノックダウン条件下での TNF- α 刺激による細胞生存率への影響 M : mock 細胞株, R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, * p < 0.05, ** p < 0.01)

第四節 考察

本章では、血管内皮細胞において RASGRP2 は TNF- α が惹起する NOX を介した ROS 産生を阻害し、細胞生存率の減少を抑制することを著者は明らかにした (Figure 12)。また、TNF- α 刺激による細胞生存率の減少がアポトーシスであることも明らかにした (Figure 13 B)。さらに、TNF- α 刺激による細胞生存率の減少は、DPI 及び apocynin の濃度を増加させても回復が見られず、DPI 及び apocynin は NOX の活性を完全に抑制していると確認された (data not shown)。この様な条件下でも TNF- α 刺激による ROS の生成は、TERT HUVEC R 細胞株において完全には抑制されなかった (Figure 15 B)。TNF- α を介して生成される ROS は、NOX の他にホスホリパーゼ A₂ を介した経路 (非 NOX 経路) により生成されることが知られている [51]。これらのことから、RASGRP2 は NOX 経路による ROS の生成を阻害するが、非 NOX 経路を介した ROS の生成及びアポトーシスは抑制しないことが示唆された。

NOX ファミリーは、5 つの NOX メンバー (NOX 1-5) と 2 つの DUOX メンバーからなり、その発現や活性変化により ROS の生成が調節される [39,52-54]。HUVEC は NOX2 及び NOX4 を発現するが、NOX4 の方が高発現している [40]。さらに、NOX4 は TNF- α 刺激により ROS を生成することでアポトーシスを引き起こすことも報告されている [55]。しかしながら、両細胞株では NOX4 の発現に差が見られなかった (Figure 11)。このことから、RASGRP2 は、NOX の発現ではなく活性に影響を及ぼしていると考えられた。

Rap1 は NOX の活性を阻害することで ROS の生成を抑制することが知られている [56]。実際に、Rap1 をノックダウンすることで TERT HUVEC R 細胞株の TNF- α 刺激による細胞生存率の減少に対する抵抗性が減少した (Figure 16 B (c), (d))。このことから、RASGRP2 は Rap1 を活性化させることにより NOX を介した ROS の生成を抑制し、アポトーシスを抑制していることが示唆された。

今回の研究では、アポトーシス誘導剤として TNF- α のみを使用した。しかしながら、transforming growth factor- β (TGF- β) や高血糖でも NOX を介した ROS 生成によりアポトーシスを引き起こすことが明らかにされている [57,58]。これらのことから、RASGRP2 は TNF- α だけでなく他の要因によって誘導されるアポトーシスを抑制する可能性も示唆される。

結論として、TNF- α が引き起こすアポトーシスは NOX 経路及び非 NOX 経路の両者により産生される ROS に依存することが示され、RASGRP2 は Rap1 を介してその NOX 経路の阻害によってアポトーシスの防御因子として働く可能性が示唆された (Figure 17)。以上のことから、著者は血管内皮細胞において RASGRP2 によって活性化された Rap1 がアポトーシスに対して抵抗性を示すことを明らかにした。

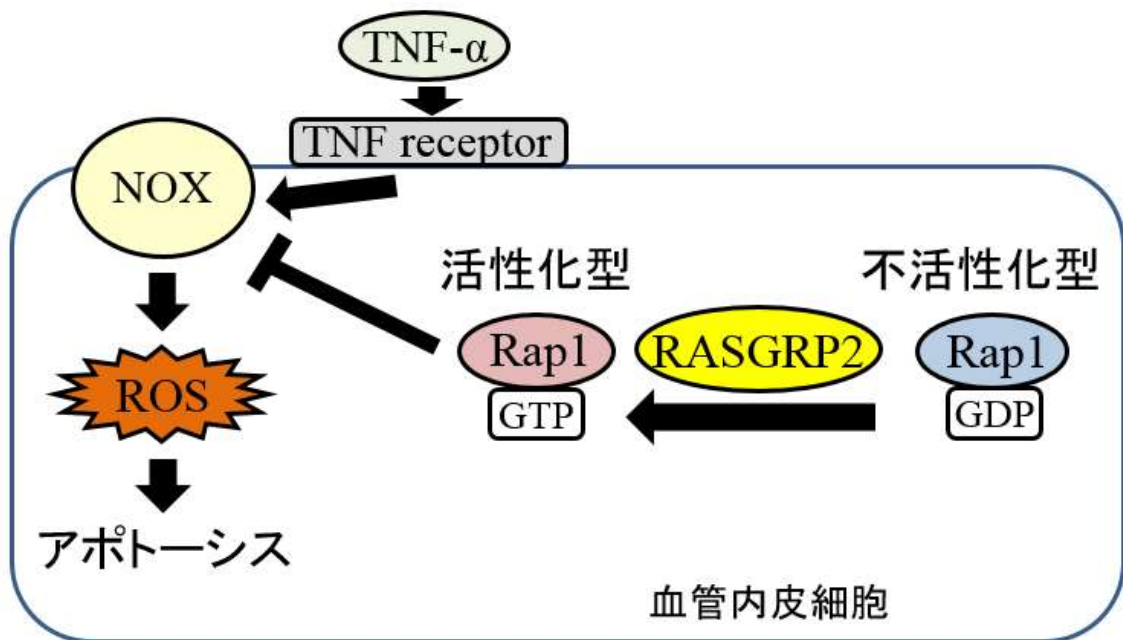


Figure 17 Rap1 を介してアポトーシスを抑制する RASGRP2 の情報伝達経路

第三章

RASGRP2 により活性化された R-Ras を介した アポトーシス抑制機構の解析

第一節 AKT のリン酸化に対する RASGRP2 の関与

著者は、血管内皮細胞において RASGRP2 が R-Ras を活性化させることを明らかにした (Figure 8)。R-Ras は、PI3K との相互作用により AKT をリン酸化して活性化させる [29,38]。一般的に、AKT はアポトーシスの抑制に関与しており、血管内皮細胞において血管の恒常性の維持に関与することが知られている [59,60]。しかしながら、RASGRP2 によって活性化された R-Ras が PI3K-AKT 経路を介してアポトーシスを抑制するのかは明らかにされていない。そこで本章では、RASGRP2 により活性化された R-Ras が AKT を介してアポトーシスを抑制しているか解析した。

初めに、RASGRP2 による AKT のリン酸化の影響を確認した。その結果、473 番目のセリンのリン酸化は両細胞株とも差は見られなかった (Figure 18 A)。一方、308 番目のスレオニンのリン酸化は mock 細胞株と比較して、TERT HUVEC R 細胞株では 1.7 倍に増加した (Figure 18 B)。また、AKT のリン酸化が PI3K を介しているか確認するため、PI3K 阻害剤の LY294002 を用いて検討した。その結果、両細胞株とも AKT のリン酸化が消失した (Figure 18 B)。さらに、この AKT のリン酸化に R-Ras が関与しているか調べるため、R-Ras siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした。その結果、negative control siRNA と比較して、R-Ras siRNA の処理により両細胞株ともに R-Ras の発現が抑制され、さらに AKT のリン酸化が消失した (Figure 18 C)。

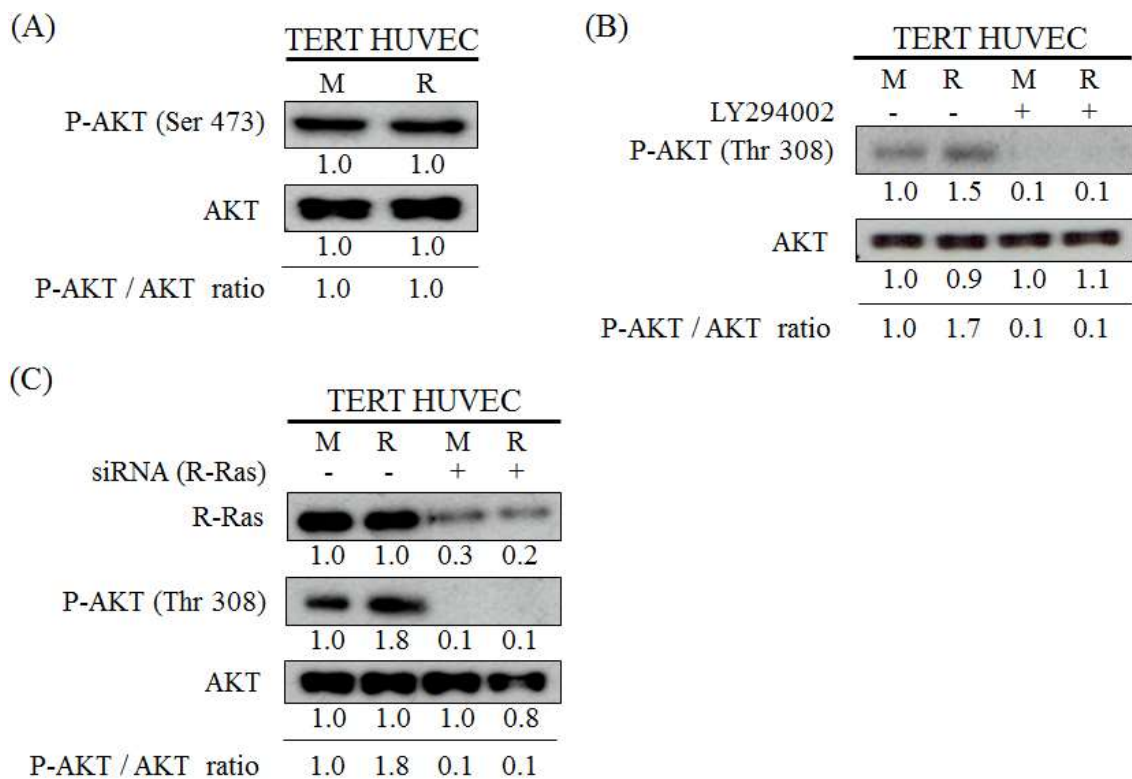


Figure 18 R-Ras を介した AKT の 308 番目のスレオニンリン酸化の増加

(A) セリンのリン酸化 (Ser473) のウエスタンブロット解析 (B) LY294002 処理でのスレオニンのリン酸化 (Thr308) のウエスタンブロット解析 (C) R-Ras ノックダウン条件下でのスレオニンのリン酸化 (Thr308) のウエスタンブロット解析 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株

第二節 BAM7 及び anisomycin が惹起するアポトーシス誘導 に対する R-Ras の関与

第一節において、RASGRP2 が R-Ras を介して AKT の 308 番目のスレオニンのリン酸化を増加させることを明らかにした。このことから、血管内皮細胞において RASGRP2 は、R-Ras-AKT 経路を介してアポトーシスを抑制している可能性が考えられた。AKT により抑制されるアポトーシス誘導因子として Bcl-2-associated X protein (BAX) が知られている[61-63]。BAX は、活性化すると構造変化によりミトコンドリアに移行してアポトーシスを引き起こす[64]。そこで、第二節では、RASGRP2 が BAX の活性化によるアポトーシスに関与しているか解析を行った。

初めに、BAX の活性化による細胞生存率への影響について BAX 活性化剤である BAM7 と anisomycin を用いて検討した[65-68]。その結果、mock 細胞株の細胞生存率は BAM7 刺激では約 62%、anisomycin 刺激では約 57%に減少した。一方、TERT HUVEC R 細胞株では細胞生存率に変化はなかった (Figure 19 A)。次に、mock 細胞株における BAM7 及び anisomycin 刺激による細胞生存率の減少がアポトーシスによるものか確認するため、NucView 488 を用いて検討した。その結果、mock 細胞株では BAM7 及び anisomycin 刺激により顕著な蛍光の増加が観察され、BAM7 及び anisomycin 刺激による細胞生存率の減少はアポトーシスによるものであることが示された (Figure 19 B)。TERT HUVEC R 細胞株では、BAM7 及び anisomycin 刺激はアポトーシスを誘導しないことが確認された。Figure 19 C は、画像の蛍光を数値化し、未処理との相対比で表した結果である。mock 細胞株のアポトーシスは、BAM7 刺激により約 42 倍に増加し、anisomycin 刺激では約 43 倍に増加した。一方、TERT HUVEC R 細胞株では BAM7 及び anisomycin 刺激しても未処理と同程度であった。さらに、BAM7 及び anisomycin 刺激によるアポトーシスが ROS によるものか確認するため、NOX 阻害剤である DPI 及び ROS スカベンジャーである NAC を用いて検討した。その結果、mock 細胞株では NAC 及び DPI の処理を行っても BAM7 及び anisomycin 単独刺激に対する細胞生存率の減少と同程度であった (Figure 20 A, B)。そこで、BAM7 及び anisomycin 刺激による ROS 産生量を CellROX® Green を用いて評価した。その結果、ポジティブコントロールである TNF- α 刺激では両細胞株で ROS による蛍光が観察されたが、BAM7 及び anisomycin 刺激では両細胞株とも蛍光が観察されなかった (Figure 20 C)。

この BAM7 及び anisomycin 刺激における TERT HUVEC R 細胞株のアポトーシスの抑制に Rap1 及び R-Ras のどちらが関与しているか調べた。初めに、Rap1 が BAM7 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性に関与しているか調べるため、Rap1 siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした。その結果、Rap1 をノックダウンしても BAM7 刺激による細胞生存率の減少は見られなかった (Figure 21 A)。次に、RASGRP2 の BAM7 及び anisomycin 刺激によ

り誘導されるアポトーシスの抑制に R-Ras-AKT 経路が関与しているか調べるため、LY294002 を用いて細胞生存率の影響を検討した。その結果、LY294002 単独処理では細胞生存率に変化はなかった。また、BAM7 単独刺激により mock 細胞株では細胞生存率が約 40%に減少したが、TERT HUVEC R 細胞株は減少しなかった。さらに、mock 細胞株において BAM7 刺激による細胞生存率の減少は、LY294002 を処理しても影響はなかったが、TERT HUVEC R 細胞株では約 39%に減少した (Figure 21 B)。加えて、R-Ras が BAM7 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性に関与しているか調べるため、R-Ras siRNA を用いて遺伝子をノックダウンした。その結果、R-Ras をノックダウンしても細胞生存率に変化はなかった。また、negative control siRNA 処理後の BAM7 刺激により、mock 細胞株では細胞生存率が約 39%に減少したが、TERT HUVEC R 細胞株では減少しなかった。さらに、mock 細胞株において BAM7 刺激による細胞生存率の減少は、R-Ras siRNA を処理しても影響はなかったが、TERT HUVEC R 細胞株では約 40%に減少した (Figure 21 C)。

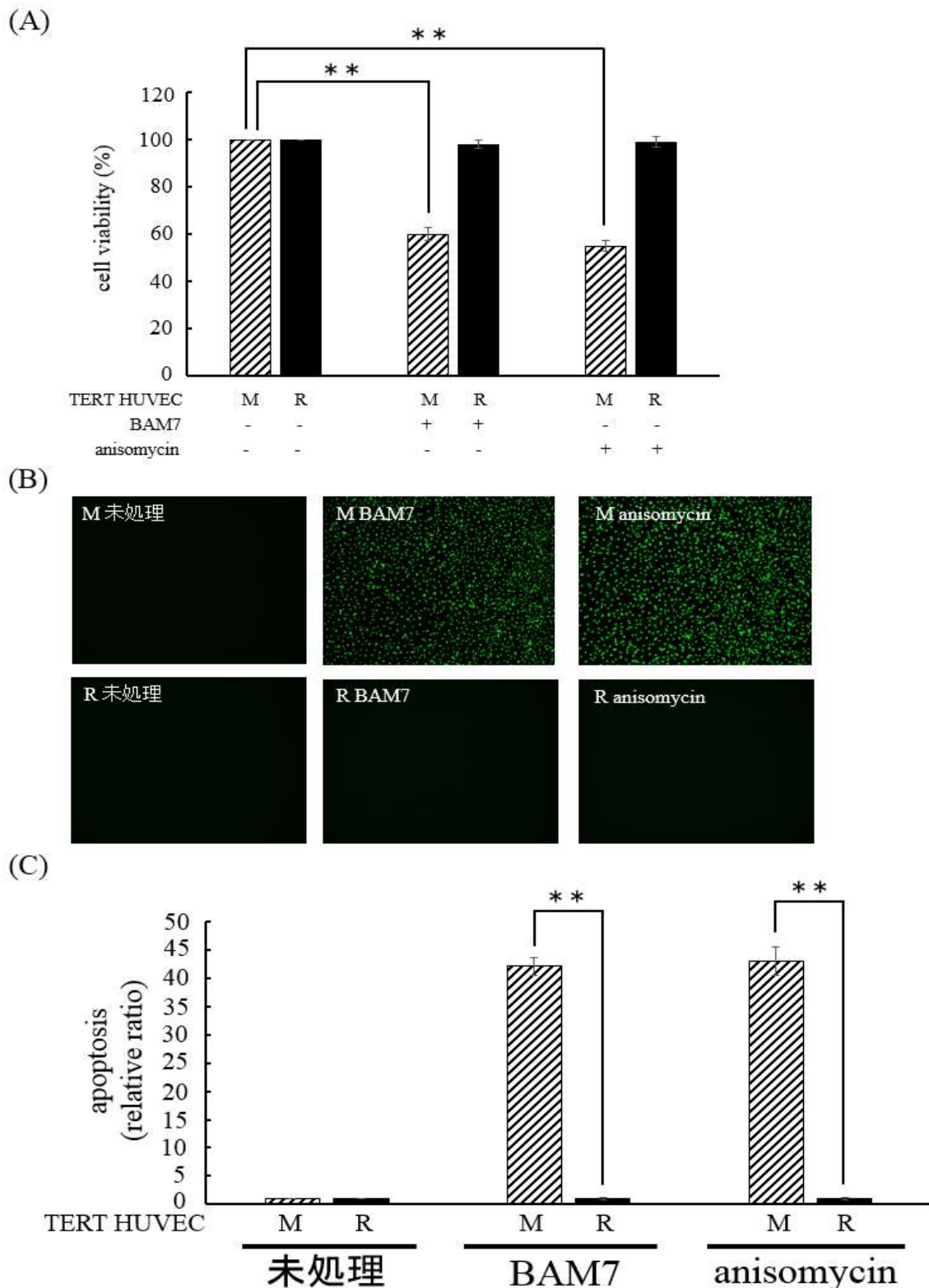
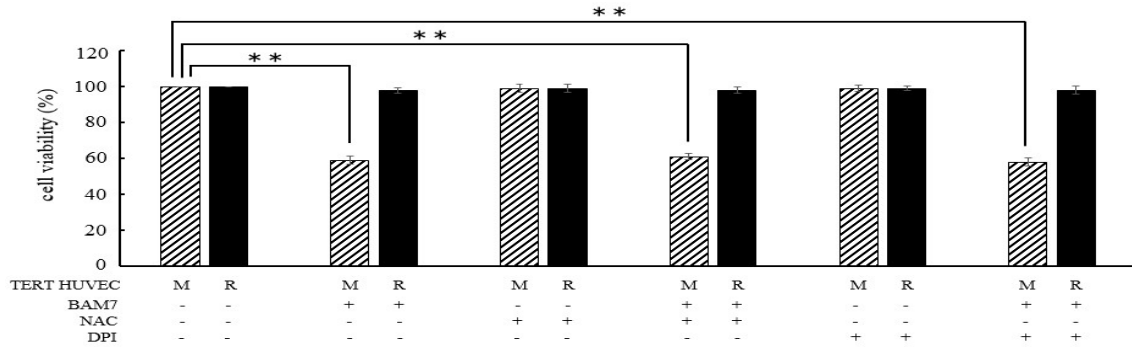
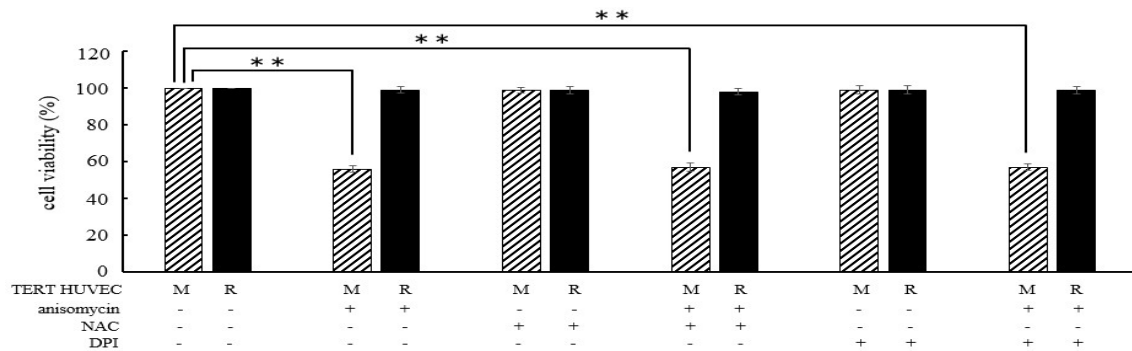


Figure 19 BAM7 及び anisomycin 刺激によるアポトーシスに対する RASGRP2 の抵抗性
 (A) 20 μ M BAM7 及び 1 μ M anisomycin 刺激下での細胞生存率への影響 (B) BAM7 及び anisomycin 刺激下で取得した細胞の蛍光顕微鏡像 (C) 画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化したアポトーシス相対比 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** P < 0.01)

(A)



(B)



(C)

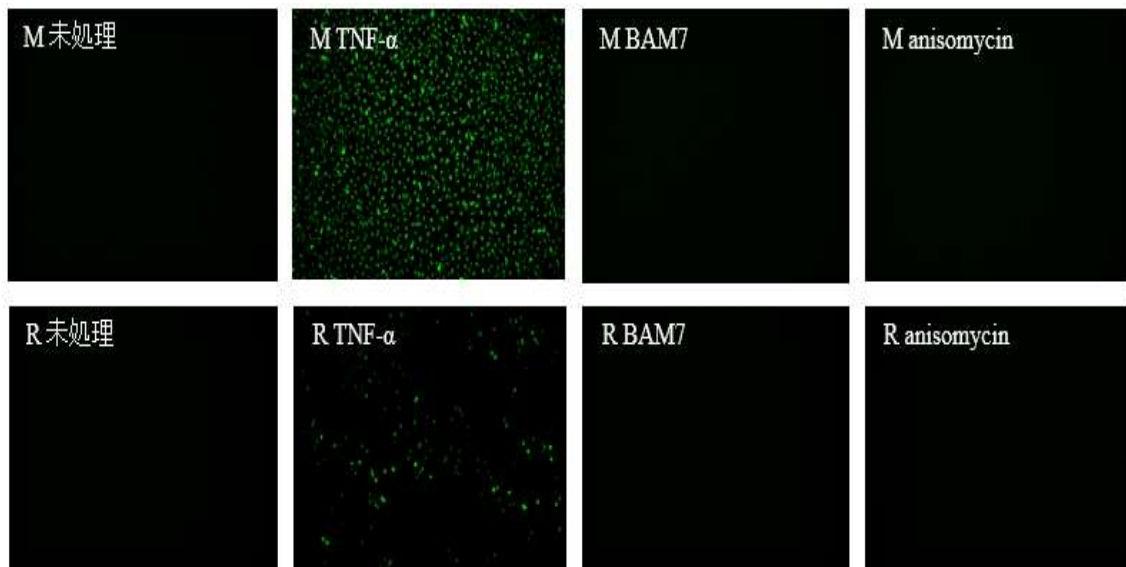
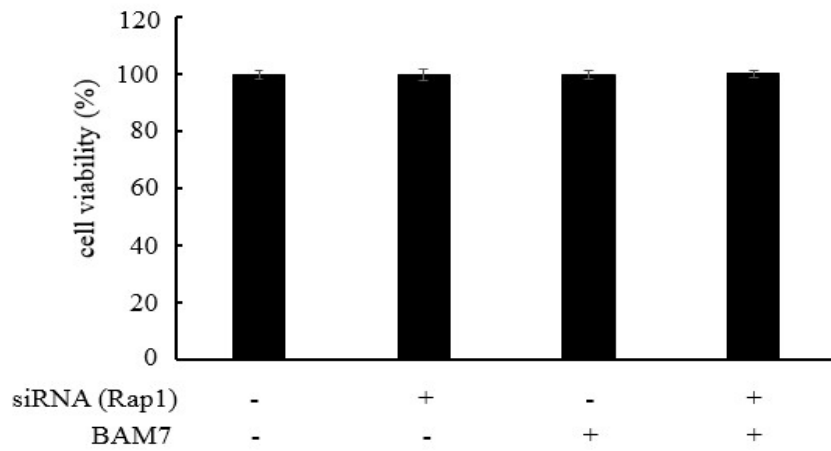


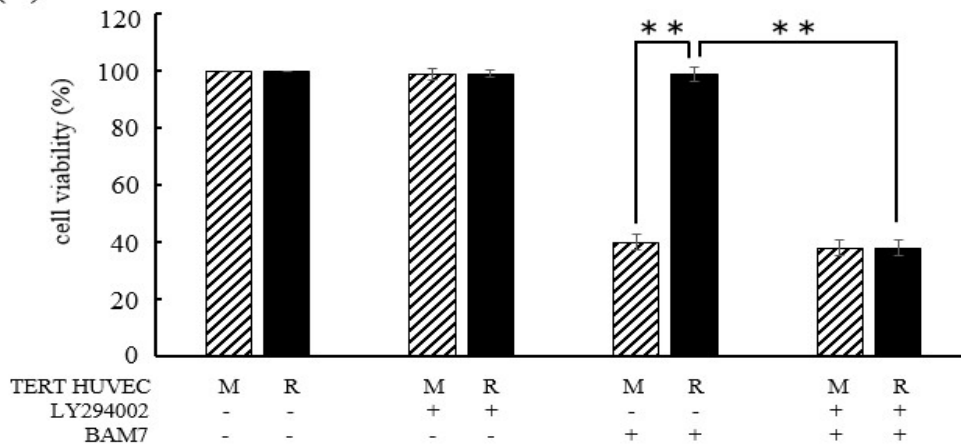
Figure 20 ROS 生成阻害によらない RASGRP2 の抵抗性

(A) BAM7 刺激下での 5 mM NAC 及び 20 μ M DPI 処理の細胞生存率への影響 (B) anisomycin 刺激下での 5 mM NAC 及び 20 μ M DPI 処理の細胞生存率への影響 (C) TNF- α 、BAM7 及び anisomycin 刺激下で取得した細胞の蛍光顕微鏡像 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** P < 0.01)

(A)



(B)



(C)

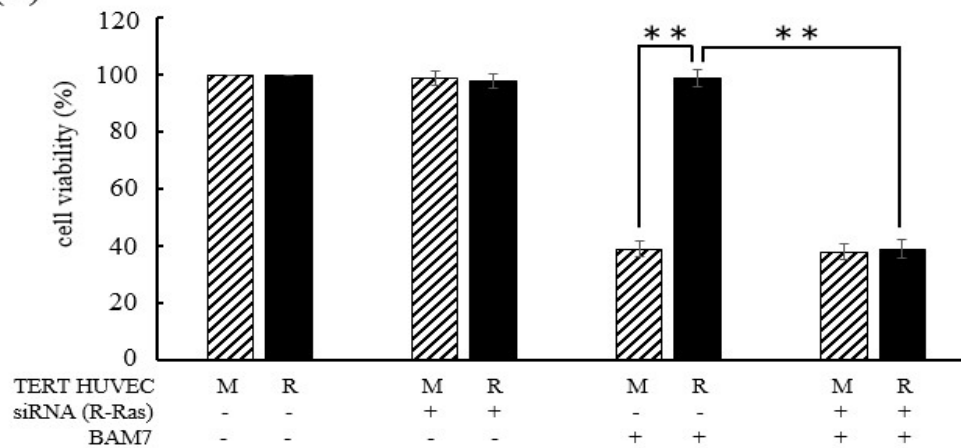


Figure 21 RASGRP2-R-Ras 経路による細胞生存率減少の抑制

(A) TERT HUVEC R 細胞株における Rap1 ノックダウン条件下での BAM7 刺激による細胞生存率への影響 (B) BAM7 刺激下での 10 μ M LY294002 処理の細胞生存率への影響 (C) R-Ras ノックダウン条件下での BAM7 刺激による細胞生存率への影響 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** P < 0.01)

第三節 BAM7 及び anisomycin 刺激による BAX の活性化

アポトーシス及び ROS の解析により、RASGRP2 は ROS の関与がないアポトーシスを R-Ras - AKT 経路によって抑制していることが明らかとなった (Figure 19, 20, 21)。その抑制メカニズムとして、RASGRP2 は BAX の活性化もしくはその下流の経路を抑えていることが推測された。BAX は活性化型になると立体構造が変化して、BAX clone 6A7 抗体によって認識されることが知られている [64]。

そこで、RASGRP2 が BAX の活性化を抑制しているか検討するため、BAX clone 6A7 抗体を用いて免疫沈降を行った。その結果、whole cell の BAX の発現量は両細胞株ともに BAM7 及び anisomycin 刺激をしても変化がなかった。一方、活性化型 BAX (IP/whole ratio) は BAM7 及び anisomycin 刺激を行うと mock 細胞株では 2.2 倍、TERT HUVEC R 細胞株では 2.4 倍となり、両細胞株間で明らかな差は見られなかった (Figure 22)。

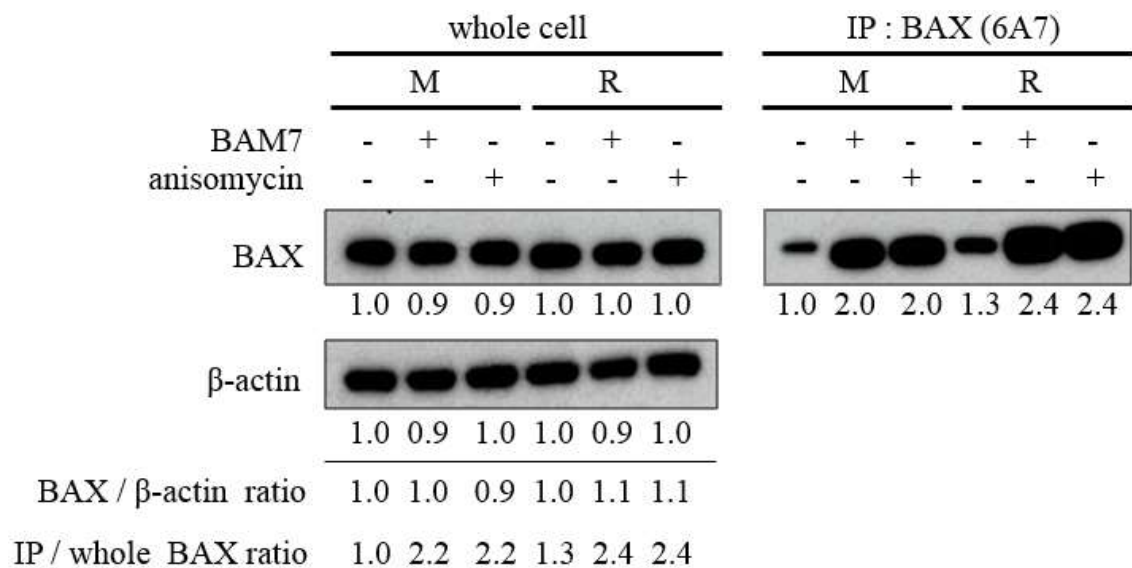


Figure 22 BAM7 及び anisomycin 刺激による活性化型 BAX の増加

BAM7 及び anisomycin で刺激し、BAX (6A7) 抗体を用いて免疫沈降後、ウエスタンブロットにより解析 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株、IP : immunoprecipitation

第四節 BAX のミトコンドリアへの移行に対する RASGRP2 の関与

前節より、RASGRP2 は BAM7 及び anisomycin 刺激によるアポトーシスを抑制していたが、BAX の活性化は抑制していなかった (Figure 19, 22)。このことから、RASGRP2 は BAX の活性化より下流を抑制している可能性が推測された。活性化した BAX はミトコンドリアに移行し、ミトコンドリア内の cytochrome c (Cyt c) を放出してアポトーシスを誘導することが知られている [63,69,70]。また、BAX のミトコンドリアへの移行には、ミトコンドリアに局在する hexokinase-II (HK-II) が抑制的に働くことも報告されている [71-74]。そのため、本節では BAX 活性化の下流の経路の抑制に R-Ras-AKT 経路が関与しているか解析した。

まず初めに、細胞質とミトコンドリアを分画し、RASGRP2 による HK-II、BAX の局在変化及び Cyt c 放出抑制について検討した。その結果、mock 細胞株と比較して TERT HUVEC R 細胞株では BAM7 刺激に関わらずミトコンドリア画分への HK-II の移行が mock 細胞株と比較して約 3.8 倍に増加していた。また、mock 細胞株では BAM7 刺激により、ミトコンドリア画分に BAX が移行しており、さらに細胞質画分に Cyt c が放出されていた。一方、TERT HUVEC R 細胞株では BAM7 刺激をしても BAX 及び Cyt c の局在に変化はなかった。なお、細胞質画分のマーカーとして α -tubulin、ミトコンドリア画分のマーカーとして VDAC-1 を用いた (Figure 23)。

次に、HK-II による BAX のミトコンドリアへの移行の抑制が R-Ras-AKT 経路を介しているか調べるため、R-Ras siRNA を用いた遺伝子ノックダウン及び LY294002 処理を行った。その結果、TERT HUVEC R 細胞株において、R-Ras のノックダウンによりミトコンドリア画分への HK-II の移行が約 5 分の 1 に減少し、さらに BAM7 単独刺激では見られなかった BAX のミトコンドリア移行と Cyt c の放出が見られるようになった (Figure 24 A)。また、LY294002 処理によりミトコンドリア画分への HK-II の移行が 10 分の 1 に減少し、さらに BAM7 単独刺激では見られなかった BAX のミトコンドリア移行と Cyt c の放出が見られるようになった (Figure 24 B)。

さらに、ミトコンドリアから HK-II を解離させることが知られている clotrimazole (CTZ) を用いて [72,73]、TERT HUVEC R 細胞株において BAM7 刺激による BAX のミトコンドリア移行と Cyt c の放出に影響が見られるか検討した。その結果、CTZ 処理によりミトコンドリア画分への HK-II の移行が 10 分の 1 に減少し、BAM7 単独刺激では見られなかった BAX のミトコンドリア移行と Cyt c の放出が見られるようになった (Figure 25 A)。また、BAM7 及び anisomycin 刺激による細胞生存率への CTZ 処理の影響を検討した。その結果、BAM7 単独刺激により mock 細胞株では細胞生存率が約 52% に減少したが、TERT HUVEC R 細胞株では減少しなかった。一方、CTZ 処理により BAM7 刺

激による細胞生存率は、mock 細胞株では BAM7 単独刺激と同様、約 48%に減少したが、TERT HUVEC R 細胞株では BAM7 単独刺激では見られなかった細胞生存率の減少が見られ、約 47%に減少した (Figure 25 B)。また、anisomycin 刺激でも同様の結果が得られた (data not shown)。

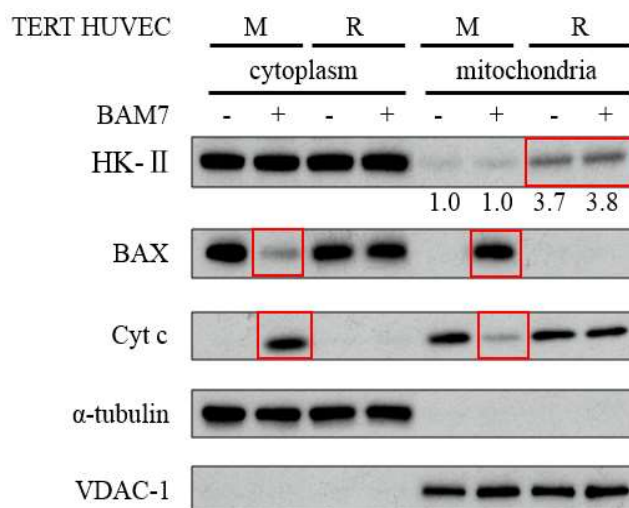


Figure 23 RASGRP2 によるミトコンドリアへの HK-II の移行促進及び BAX の移行抑制
細胞を播種 24 時間後、BAM7 で 16 時間刺激した後、細胞質とミトコンドリアを分画し、ウエスタンブロットにより解析 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株

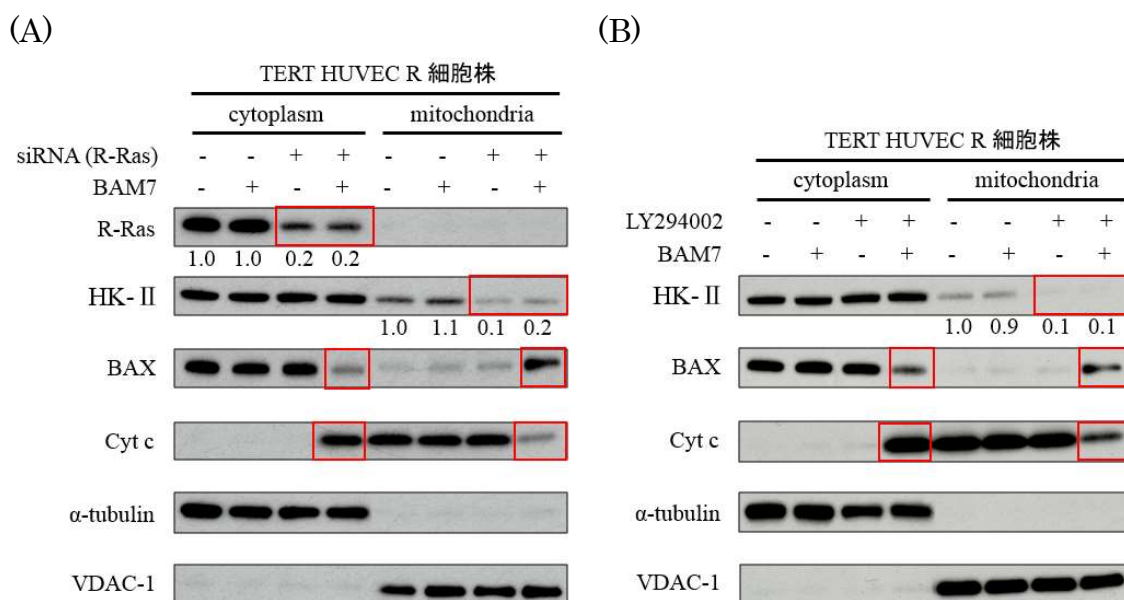
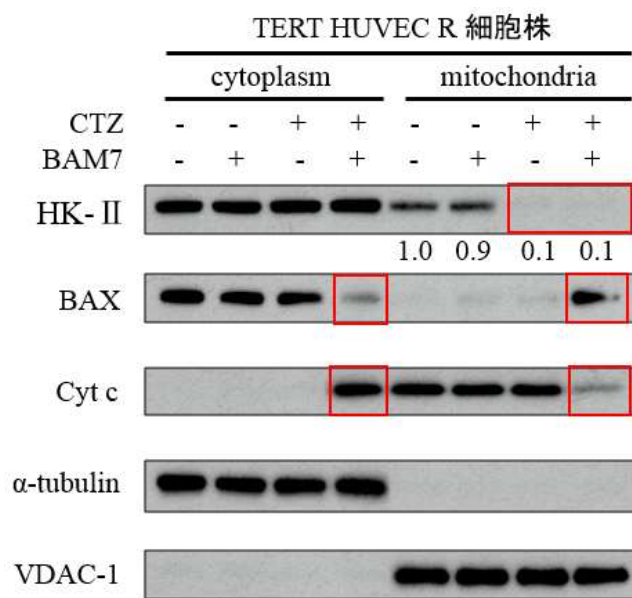


Figure 24 R-Ras-AKT 経路によるミトコンドリアへの HK-II の移行促進及び BAX の移行抑制

(A) R-Ras ノックダウン条件下での BAM7 刺激後、細胞質とミトコンドリアを分画し、ウエスタンブロットにより解析 (B) BAM7 刺激下での 10 μ M LY294002 処理後、細胞質とミトコンドリアを分画し、ウエスタンブロットにより解析

(A)



(B)

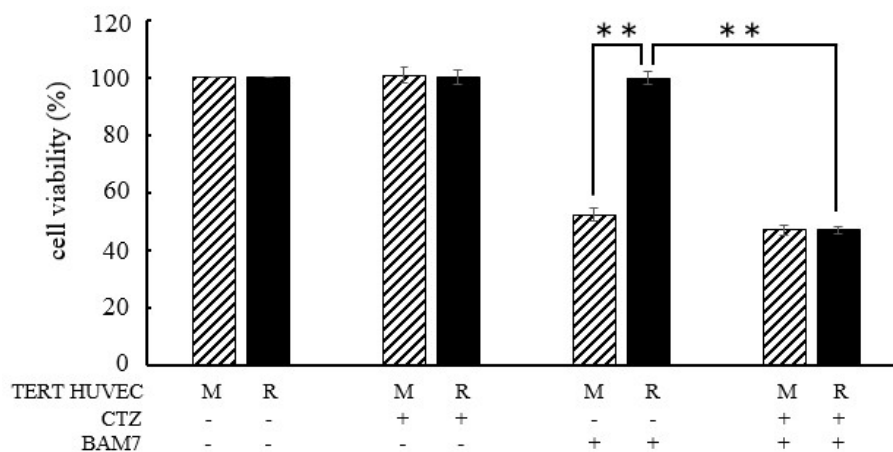


Figure 25 ミトコンドリア局在の HK-II による BAM7 が惹起する細胞生存率減少の抑制

(A) BAM7 刺激下での 20 μ M CTZ 処理後、細胞質とミトコンドリアを分画し、ウエスタンブロットにより解析 (B) BAM7 刺激下での 20 μ M CTZ 処理の細胞生存率への影響 M : mock 細胞株、R : TERT HUVEC R 細胞株 (n=3, ** p < 0.01)

第五節 考察

血管内皮細胞において RASGRP2 によって活性化された R-Ras は AKT の 308 番目のスレオニンリン酸化させる一方で、473 番目のセリンは変化させなかった (Figure 18)。一般的に AKT は、473 番目のセリンや 308 番目のスレオニンのリン酸化により活性化されるが、PDK-1 による 308 番目のスレオニンの集中的なリン酸化はアポトーシスを抑制することが報告されている [75,76]。このことから、RASGRP2 によって活性化された R-Ras は AKT を活性化し、アポトーシスを抑制すると考えられた。

RASGRP2 を過剰発現していない mock 細胞株の細胞生存率は、BAM7 及び anisomycin 刺激により減少し、その減少はアポトーシスによるものであることを明らかにした (Figure 19 A, C)。また、BAM7 及び anisomycin 刺激により誘導されるアポトーシスには、ROS が関与していなかった (Figure 20 C)。

TERT HUVEC R 細胞株では、BAM7 及び anisomycin 刺激をしてもアポトーシスが見られないにも関わらず、BAX は活性化していた (Figure 22)。このことから、RASGRP2 は BAX の活性化よりも下流の経路を抑制し、アポトーシスを抑制していることが考えられた。実際に、RASGRP2 は R-Ras-AKT 経路を介して HK-II のミトコンドリアへの移行を促進し、BAM7 刺激が誘導する BAX のミトコンドリアへの移行を抑制した (Figure 23, 24)。David らは活性化した AKT によりリン酸化された HK-II がミトコンドリアに局在することを報告している [77]。また、Jonathan らは HK-II の過剰発現により HK-II のミトコンドリアへの移行が増加し、さらに BAX のミトコンドリアへの移行が減少することを報告している [71]。これらを考慮すると、RASGRP2 は R-Ras-AKT シグナル経路を介して HK-II のミトコンドリアへの移行を促進することにより、BAX のミトコンドリアへの移行により引き起こされるアポトーシスを抑制していることが示唆された。

結論として、BAM7 と anisomycin は ROS を産生させることなく BAX を活性化してアポトーシスを誘導し、RASGRP2 は R-Ras-AKT 経路を介して HK-II をミトコンドリアに移行させることで、活性化型 BAX のミトコンドリアへの移行を阻害し、アポトーシスの防御因子として働くことが示唆された (Figure 26)。以上のことから、著者は血管内皮細胞において RASGRP2 が活性化する R-Ras の詳細なアポトーシス抑制経路を明らかにした。

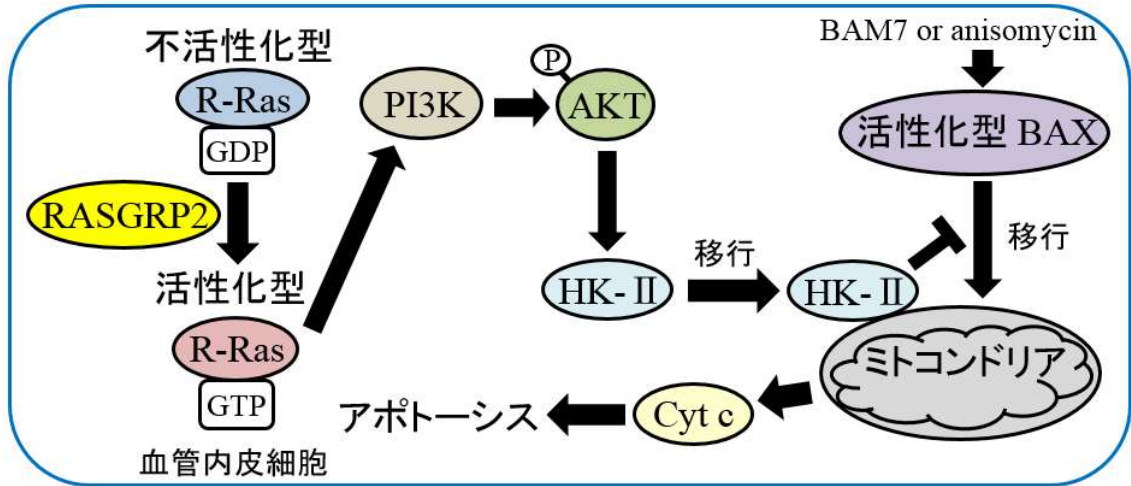


Figure 26 R-Ras を介してアポトーシスを抑制する RASGRP2 の情報伝達経路

総括

これまでの RASGRP2 研究は、主に血球系の細胞で行われており、それらの多くは細胞接着に焦点が当てられている。一方、当研究室ではこれまでにアフリカツメガルの胚を用いた実験から、血管の形成には RASGRP2 が重要であると考へ、血管内皮に焦点を当てている。また、著者らはヒト血管内皮細胞における RASGRP2 の働きの中でも細胞死との関係に着目している。

本研究は、RASGRP2 における Rap1 を介した情報伝達経路及び R-Ras を介した情報伝達経路の影響について検討した。その結果、血管内皮細胞において RASGRP2 は、Rap1 及び R-Ras の両方を活性化し、それぞれがアポトーシスを抑制することを著者は初めて明らかにした。Rap1 を介した情報伝達経路では、RASGRP2 が Rap1 を活性化することで TNF- α 刺激による NOX を介した ROS の生成を抑制し、その結果アポトーシスを抑制した。一方、R-Ras を介した情報伝達経路では、RASGRP2 が R-Ras を活性化することで AKT をリン酸化し、HK-II のミトコンドリアへの移行を増加させた。さらに、HK-II のミトコンドリアへの移行の増加は、活性化された BAX のミトコンドリアへの移行を抑制し、その結果 ROS の生成が関わらないアポトーシスを抑制した。

RASGRP ファミリーの活性は、プロテインキナーゼ A 及びプロテインキナーゼ C によりリン酸化されることで制御されている [16,78]。その中でも RASGRP2 は、プロテインキナーゼ A によって 587 番目のセリンがリン酸化されると Rap1 を活性化する働きが減弱すると報告されている [78]。従って、RASGRP2 の機能をさらに解析するためには、発現レベルだけでなく、RASGRP2 のリン酸化に関与する情報伝達経路を解析することも重要であると考へられる。

血管の微小環境下において、血管内皮細胞は様々な要因によりアポトーシスが誘導され疾患を増悪させる血管障害を引き起こす [5-10]。そのような環境下において、RASGRP2 が実際にヒトの血管の機能にどこまで影響しているかは不明である。しかし、本研究により血管障害の抑制に RASGRP2 が血管内皮細胞の防御因子として働くことで血管の構造の維持に関わる可能性が示された (Figure 28)。今後、RASGRP2 を活性化させる医薬品を開発し、RASGRP2 を防御因子として臨床応用することで血管障害に対する新たな治療薬となることが期待される。そのため、TNF- α だけでなく高血糖や小胞体ストレスなど他の要因による血管障害に対しても、RASGRP2 が防御因子として働くのか、また、それらのメカニズムについてさらなる研究が必要であると考へられる。

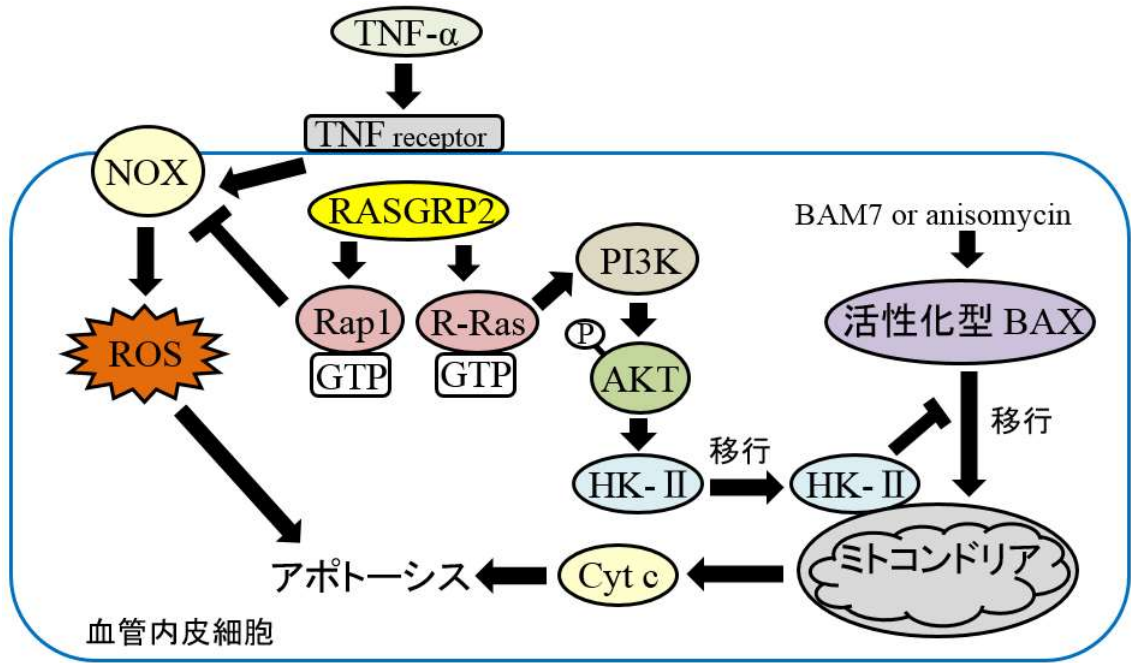


Figure 27 Rap1 及び R-Ras を介してアポトーシスを抑制する RASGRP2 の情報伝達経路

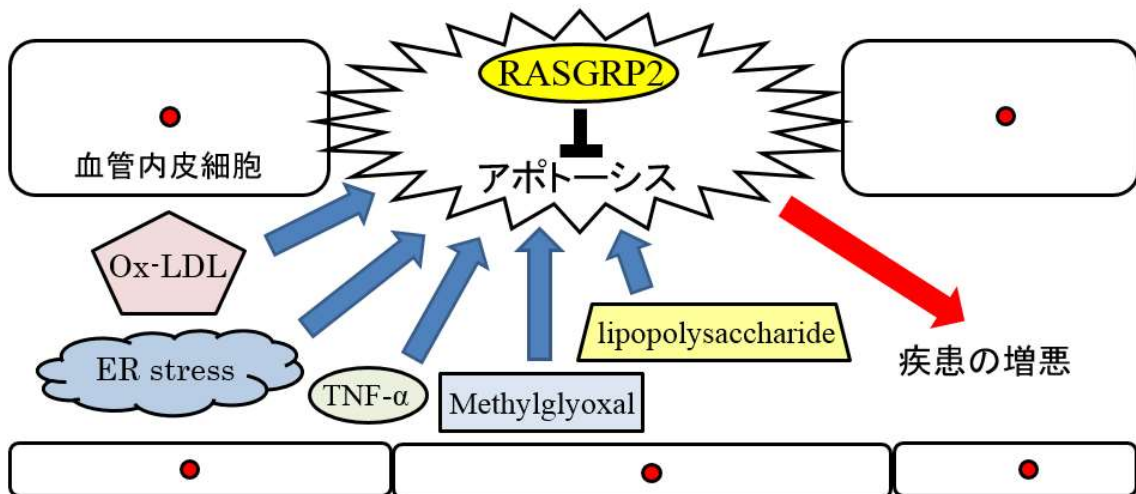


Figure 28 血管内皮細胞アポトーシスによる疾患の増悪に対する RASGRP2 の抵抗性

実験方法

1. 細胞培養と RASGRP2 安定的過剰発現株の作製

TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株は 37°C、5% CO₂ 条件下のインキュベーターで Endothelial Cell Growth Medium (PromoCell, Heidelberg, Germany) を用いて培養した。また、TERT HUVEC R 細胞株の作製には pEB Multi-Hyg (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) のベクターに *rasgrp2* (Wild type) をインサートした pEB Multi-Hyg *rasgrp2*、mock 細胞株の作製には pEB Multi-Hyg を使用した。両細胞株の作製には、トランスフェクション試薬に ViaFect™ Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA) を使用し、 0.5×10^5 cells/mL の密度の細胞を 24 well plate に播種し、一晚増殖させてトランスフェクションを行った。その後、トランスフェクションした細胞を 50 µg/mL の Hygromycin B solution (Nacalai Tesque Inc, Tokyo, Japan) を含んだ Endothelial Cell Growth Medium でセクションを行い、限外希釈法によってシングルセルクローニングを行った。

2. Cell lysate の調製と Western Blot 法

培地を除去した後 PBS (-) で洗浄し、IP Lysis Buffer (Thermo, Waltham, MA, USA) で溶解させて 12000g で 10 分間遠心分離した上清をサンプルとして使用した。回収した cell lysate は sample reducing agent (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含めた LDS sample buffer (Invitrogen) に溶解させ、70°C で 10 分間加熱し、次に SDS-PAGE により分離し、polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore Bedford, MA, USA) に電圧 100 V で 75 分間転写した。電気転写後、PVDF blocking agent for Can Get Signal® (Toyobo, Tokyo, Japan) を用いて、PVDF membrane を 37°C で 60 分間ブロッキングした。次に、0.05% の Tween-20 を含む PBS (PBS-T) で洗浄した後、rabbit anti-RASGRP2 antibody (GeneTex, Irvine, California, USA)、mouse anti-β-Actin antibody (Santa Cruz, USA)、rabbit anti-NOX4 antibody (GeneTex)、rabbit anti-Rap1 antibody (Santa Cruz)、mouse anti-p-AKT (Thr308) antibody (Santa Cruz)、mouse anti-p-AKT (ser473) antibody (Santa Cruz)、mouse anti-AKT antibody (Santa Cruz)、mouse anti-R-Ras antibody (Santa Cruz)、mouse anti-BAX antibody (2D2: Santa Cruz)、rabbit anti-α-Tubulin 4a antibody (GeneTex)、mouse anti-VDAC-1 antibody (Santa Cruz)、mouse anti-cytochrome c antibody (Santa Cruz)、または rabbit anti-Hexokinase-II antibody (GeneTex) を Can Get Signal® Solution 1 (Toyobo) に加えて 60 分間インキュベートした。続いてその PVDF membrane を PBS-T で 4 回洗浄し、anti-rabbit IgG antibody (GeneTex) または anti-mouse IgG antibody (Dako-cytomation, USA) を Can Get Signal® Solution 2 (Toyobo) に加えて 60 分間インキュベートした。その後、PBS-T でさらに 4 回洗浄した後、ECL Quant HRP または ECL Ultra

Sensitive HRP Substrate 及び Amersham Hyperfilm™ ECL (GE HealthCare, NJ, USA) を用いて検出した。検出したバンドは画像解析ソフト ImageJ を用いて数値化し、左端のバンドのシグナル強度を 1 として、相対値で示した。

3. Small G 活性アッセイ

Rap1 及び R-Ras 活性は、RalGDS-RBD Agarose Beads (Cell Biolabs, San Diego, CA) を用いて調べた。cell lysate と RalGDS-RBD Agarose Beads を 4°C で 60 分間穏やかに回転させながらインキュベートした。Rap1 の際は cell lysate を 100 µg と Beads 20 µL、R-Ras の際は cell lysate を 150 µg と Beads 40 µL で行った。次に、Beads を過剰の lysis buffer で 3 回洗浄し、Beads と結合したタンパク質を LDS sample buffer に溶出した。

4. 細胞生存率の測定

TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株を 96 well plate 中に 2.0×10^5 cells/mL の密度で各 well に 100 µL 播種して 24 時間後、20 ng/mL TNF-α (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)、20 µM BAM7 (Adooq BioScience, CA, USA)、または 1 µM anisomycin (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) で 48 時間刺激した。前処理として、5 mM N-acetyl cysteine (NAC) (Wako)、20 µM diphenyliodonium (DPI)、30 µM apocynin (Cayman Chemical, MI, USA)、10 µM LY294002 (Cayman Chemical)、または 20 µM clotrimazole (CTZ) (Cayman Chemical) のいずれかで 2 時間処理した。その後、10 µL/well の WST-8 (Dojindo Laboratory, Kumamoto, Japan) を加えて 2 時間後、450 nm 及び 650 nm で吸光度を測定し、そして未処理の細胞生存率 100 % として細胞生存率を評価した。

5. アポトーシスの測定

TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株を 96 well plate 中に 2.0×10^5 cells/mL の密度で 100 µL 播種し、20 ng/ml TNF-α、20 µM BAM7、または 1 µM anisomycin で 24 時間刺激した。前処理として、5 mM NAC または 20 µM DPI でそれぞれ 2 時間処理した。その後、1 µM NucView 488 (Biotium Inc., Cambridge, UK) で 30 分間処理して蛍光画像を得た後、ImageJ を用いてアポトーシスを評価した。蛍光強度は無作為に選択した 3 つの画像全体 (1360 × 1240 ピクセル) の平均値により示した。

6. ROS の測定

アポトーシスの測定と同様に、TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株を 2.0×10^5 cells/mL の密度で 96 well plate に 100 µL 播種した。その後、20 ng/ml TNF-α、20 µM BAM7、または 1 µM anisomycin で 4 時間刺激した。前処理も同様に、5 mM NAC または 20 µM DPI でそれぞれ 2 時間処理した。その後、5 µM CellROX® Green (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) で 1

時間処理し、蛍光画像を得た後、ROS による蛍光を ImageJ で評価した。蛍光強度は無作為に選択した 3 つの画像全体 (1360 × 1240 ピクセル) の平均値により示した。

7. Small Interfering RNA による Small G のノックダウン

90 nM の Rap1 siRNA (SASI_Hs01_00040403)、R-Ras siRNA (HU-02251-1) または negative control siRNA (SIC-001) (SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA) を製造業者の説明書に従いトランスフェクションした。簡潔に説明すると、細胞を 2.0×10^5 cells/mL で播種して 6 時間後、ヘパリンを含まない 10% FCS Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell) に交換した。その後、MISSION® siRNA Transfection Reagent (SIGMA Aldrich) と siRNA の混合液を 10 分間プレインキュベートし、トランスフェクションを行った。

8. 免疫沈降アッセイ

TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株を 35 mm dish 中に 2.0×10^5 cells/mL の密度で 2 mL 播種し、20 μ M BAM7 または 1 μ M anisomycin で 16 時間刺激した後 cell lysate を回収し、mouse anti-Bax antibody (6A7 : Santa Cruz) 1 μ g と Protein G Mag Sepharose™ (GE Healthcare) 15 μ L を 4 °C で 1 時間インキュベートした。その後、回収した cell lysates (150 μ g) と抗体を反応させた beads の複合体と 4 °C で 1 時間インキュベートした。次に、免疫沈降物を IP Lysis Buffer で 3 回洗浄した。その後、免疫沈降物を LDS sample buffer 溶出させて 70 °C で 10 分間加温した。

9. 細胞質及びミトコンドリア画分抽出

細胞質及びミトコンドリア画分は、cell fractionation kit (Abcam, Cambridge, MA, USA) を用いて製造業者の説明書に従い抽出した。トリプシン処理した TERT HUVEC R 細胞株及び mock 細胞株と培地を回収し、300 \times g で 5 分間遠心分離した。その後、Buffer A に 6.6×10^6 cells/mL でチューブに再懸濁した後、等量の Buffer B を加えて混合し、室温で 7 分間インキュベートした。続いて細胞溶解液を 5000 \times g の 4 °C で 1 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに回収して細胞質画分とした。次に、細胞質画分を除いたチューブに Buffer A を再懸濁し、等量の Buffer C を加えて混合し、室温で 10 分間インキュベートした。その後、細胞溶解液を 5000 \times g の 4 °C で 1 分間遠心分離し、上清を新しいチューブに回収してミトコンドリア画分とした。

10. 統計解析

全ての実験は少なくとも 2 回行った。各実験は本質的に同様の結果をもたらした。データは平均 ± 標準偏差 (SD) として表される。統計学的な有意差は、一元配置分散分析を用いて決定した。P < 0.05 以下を有意な結果として定義した。

引用文献

- [1] Taku W. Hisamichi N. Jun-ichi S. Yang L. Hideya K. Tomohiro I. Tsukasa K. Sachi I. Masaaki F. Kazuhiro T. Fumitaka M. Jia W. Hiroyasu K. Katsuhiko I. Yoshihide H. Kohji N. Mervin C. Y. Nobuyuki T. CD157 Marks Tissue-Resident Endothelial Stem Cells with Homeostatic and Regenerative Properties. *Cell Stem Cell*. vol. 22. no. 3. pp. 384-397. 2018.
- [2] Bruno V. Daniel V. Jean J. F. In Vitro Models of Vasculogenesis and Angiogenesis. *Laboratory Investigation*. vol. 81. no. 4. pp. 439-452. 2001.
- [3] Werner R. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. vol. 386. no. 6626. pp. 671-674. 1997.
- [4] Pascal N. B. Shay S. Martin G. S. Vascular Endothelial Growth Factor Effect on Endothelial Cell Proliferation, Migration, and Platelet-activating Factor Synthesis Is Flk-1-dependent. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 274. no. 43. pp. 31047-31054. 1999.
- [5] Angela P. Giuseppe D. N. Alberico L. C. LOX-1, OxLDL, and Atherosclerosis. *Mediators Inflamm*. vol. 2013. no. 152786. pp. 1-12. 2013.
- [6] Suji K. and Chang-Hoon W. Laminar Flow Inhibits ER Stress-Induced Endothelial Apoptosis through PI3K/Akt-Dependent Signaling Pathway. *Molecules and Cells*. vol. 41. no. 11. pp. 964-970. 2018.
- [7] Kyohei M. Koichi H. Masatoki S. Masahiro W. Naoki T. Shuto K. Yukihiko K. Nobuo M. Mitsuaki H. Establishment of a method for evaluating endothelial cell injury by TNF- α in vitro for clarifying the pathophysiology of virus-associated acute encephalopathy. *Pediatric Research*. vol. 81. no. 6. pp. 942-947. 2017.
- [8] Fan X. Changyuan W. Yue J. Qi L. Qiang M. Kexin L. Huijun S. Luteolin protects HUVECs from TNF- α -induced oxidative stress and inflammation via its effects on the Nox4/ROS-NF- κ B and MAPK pathways. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. vol. 21. no. 8. pp. 768-783. 2014.
- [9] James L. F. Jyotsana S. Samuel R. Sanjay A. Sharad S. S. LR-90 prevents methylglyoxal-induced oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells. *Apoptosis*. vol. 19. no. 5. pp. 776-788. 2014.
- [10] Douglas D. B. Simeon E. G. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *The American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. vol. 284. no. 6. pp. 899-914. 2003.

- [11] Kentaro N. Miho F. Akimasa F. Akira M. Takamitsu H. Makoto A. Blood Cell and Vessel Formation Following Transplantation of Activin-Treated Explants in *Xenopus*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. vol. 30. no. 10. pp. 1856-1859. 2007.
- [12] Kentaro N. Akira M. Makoto A. Takamitsu H. XRASGRP2 expression during early development of *Xenopus* embryos. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. vol. 372. no. 4. pp. 886-8918. 2008.
- [13] Kan S. Shuji T. Yoshikazu H. Yasuko O. Kentaro N. Koji O. Kohei H. Tadashi I. Makoto A. XRASGRP2 is essential for blood vessel formation during *Xenopus* development. *The International Journal of Developmental Biology*. vol. 54. no. 4. pp. 609-615. 2010.
- [14] Kentaro N. Akira M. Takamitsu H. Identification of the Gene Regulatory Region in Human *rasgrp2* Gene in Vascular Endothelial Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. vol. 33. no. 7. pp. 1138-1142. 2010.
- [15] Joanne E. J. Rebecca E. G. Ziwei D. Amir P. Kira V. A. Nadine B. Ghazaleh T. Rosemary B. C. Robert J. K. Differential membrane binding and diacylglycerol recognition by C1 domains of RasGRPs. *Biochemical Journal*. vol. 406. no. 2. pp. 223-236. 2007.
- [16] James C. S. Regulation and Function of the RasGRP Family of Ras Activators in Blood Cells. *Genes Cancer*. vol. 2. no. 3. pp. 320-334. 2011.
- [17] Annette E. Gotz R. A. E. Xuecui G. John W. S. Ras and relatives-job sharing and networking keep an old family together. *Experimental Hematology*. vol. 30. no. 10. pp. 1089-1106. 2002.
- [18] Shigeeko Y. Naoki M. Yusuke O. Minoru T. Yuki O. Hirofumi S. Kazuo N. Michiyuki M. CalDAG-GEFIII Activation of Ras, R-Ras, and Rap1. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 275. no. 33. pp. 25488-25493. 2000.
- [19] Judith H. R. Johannes L. B. Specificity in Ras and Rap Signaling. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 284. no. 17. pp. 10995-10999. 2009.
- [20] Ling G. Yunfeng F. Regina B. Michelle B. Jennifer G. Laurin C. Gerald L. Haibo Z. Lynn A. C. Ras-Associated Protein-1 Regulates Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Migration in Melanoma Cells: Two Processes Important to Melanoma Tumorigenesis and Metastasis. *Cancer Research*. vol. 66. no. 16. pp. 7880-7888. 2006.
- [21] Shigetomo F. Atsuko S. Hideto S. Akiko Y. Satoshi S. Nobuyuki T. Yoshihiko S. Kenji K. Naoki M. Cyclic AMP Potentiates Vascular Endothelial Cadherin-Mediated Cell-Cell Contact To Enhance Endothelial Barrier Function through an Epac-Rap1 Signaling Pathway.

- Molecular and Cellular Biology. vol. 25. no. 1. pp. 136-146. 2005.
- [22] Xavier C. Sunil K. S. Lorna A. Jun-ichi H. Francis W. L. Tanya N. M. Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood*. vol. 105. no. 5. pp. 1950-1955. 2005.
- [23] Kazuomi N. Jianghui Z. Shigetomo F. Satoshi K. Michihiro Y. Naoki M. Vascular Endothelial-Cadherin Stabilizes at Cell-Cell Junctions by Anchoring to Circumferential Actin Bundles through α - and β -Catenins in Cyclic AMP-Epac-Rap1 Signal-activated Endothelial Cells. *Molecular and Cellular Biology. Molecular Biology of the Cell*. vol. 21. no. 4. pp. 584-596. 2010.
- [24] Jun-ichi T. Kentaro N. Takamitsu H. Ras guanyl nucleotide releasing protein 2 affects cell viability and cell-matrix adhesion in ECV304 endothelial cells. *Cell Adhesion & Migration*. vol. 7. no. 3. pp. 262-266. 2013.
- [25] Matthias C. Dorsaf G. Charlotte G. Marie G. Claire P. Nadjim C. Marine G. Hana R. Franck P. Pierre E. M. Noemie S. Xavier P. Alan T. N. François C. Anne P. Timo K. Taco W. K. Marie-Christine A. David-Alexandre T. Human CalDAG-GEFI gene (RASGRP2) mutation affects platelet function and causes severe bleeding. *Journal of Experimental Medicine*. vol. 211. no. 7. pp. 1349-1362. 2014.
- [26] Masanobu K. Erkki R. R-Ras is a global regulator of vascular regeneration that suppresses intimal hyperplasia and tumor angiogenesis. *Nature Medicine*. vol. 11. no. 12. pp. 1346-1350. 2005.
- [27] Melissa B. R. Sally E. J. Michael A. W. Curtis L. A. Stephen F. K. Elizabeth J. T. Signaling through mitogen-activated protein kinase and Rac/Rho does not duplicate the effects of activated Ras on skeletal myogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. vol. 17. no. 7. pp. 3547-3555. 1997.
- [28] Jotaro S. Yoshito K. Hiroshi K. Positive regulation of skeletal myogenesis by R-Ras. *Oncogene*. vol. 19. no. 9. pp. 1138-1146. 2000.
- [29] Lee S. James V. M. Lawrence E. G. Gianluca G. Activation of PI3K and R-Ras Signaling Promotes the Extension of Sensory Axons on Inhibitory Chondroitin Sulfate Proteoglycans. *Developmental Neurobiology*. vol. 74. no. 9. pp. 918-933. 2014.
- [30] Yoko T. Masami H. Jiro K. Kazuyuki A. Kohji F. Cytoprotective effect of sodium orthovanadate on ischemia/reperfusion-induced injury in the rat heart involves Akt activation and inhibition of fodrin breakdown and

- apoptosis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. vol. 311. no. 3. pp. 1249-1255. 2004.
- [31] Sabine D. J. Markus K. Diana M. W. Nora R. F. Thomas W. Hella S. B. Carsten M. Hamid K. Vesa M. O. Thomas B. Jost S. Jens C. B. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nature Cell Biology*. vol. 13. no. 4. pp. 434-446. 2011.
- [32] Robert K. W. John H. The role of endothelial cell apoptosis in inflammatory and immune diseases. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. vol. 3. no. 8. pp. 1815-1825. 2005.
- [33] Narayanan P. Sonika P. Tumor Necrosis Factor- α Signaling in Macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*. vol. 20. no. 2. pp. 87-103. 2010.
- [34] Andreas K. Thomas S. Reinhard K. Agatha U. Patricia P. John C. A. Thomas A. L. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *The Journal of experimental medicine*. vol. 172. no. 6. pp. 1609-1614. 1990.
- [35] Shipra R. Wasia R. Bharat J. Sateesh K. Srikumar P. C. TNF- α response of vascular endothelial and vascular smooth muscle cells involve differential utilization of ASK1 kinase and p73. *Cell Death & Differentiation*. vol. 19. no. 2. pp. 274-283. 2012.
- [36] Ping L. Marcia W. Francis A. E. Daniel H. L. Dengue Virus Infection Differentially Regulates Endothelial Barrier Function over Time through Type I Interferon Effects. *Journal of Infectious Diseases*. vol. 200. no. 2. pp. 191-201. 2009.
- [37] Pablo R. Celine S. Frank M. Signaling Specificity by Ras Family GTPases Is Determined by the Full Spectrum of Effectors They Regulate. *Molecular and Cellular Biology*. vol. 24. no. 11. pp. 4943-4954. 2004.
- [38] Barbara M. M. Pablo R. Stefan W. Patricia H. W. Julian D. R-Ras can activate the phosphoinositide 3-kinase but not the MAP kinase arm of the Ras effector pathways. *Current Biology*. vol. 7. no. 1. pp. 63-71. 1997.
- [39] Bingqing D. Shuanglun X. Jingfeng W. Zhengyuan X. Ruqiong N. Inhibition of Protein Kinase C $\beta 2$ Prevents Tumor Necrosis Factor- α Induced Apoptosis and Oxidative Stress in Endothelial Cells: The Role of NADPH Oxidase Subunits. *Journal of Vascular Research*. vol. 49. no. 2. pp. 144-159. 2012.

- [40] Tetsuro A. Takanari K. Hiroaki O. Teruaki I. Youn H. H. Junichi T. Masanori W. Setsuro I. Hideo U. Mitsuo I. Nox4 as the Major Catalytic Component of an Endothelial NAD(P)H Oxidase. *Circulation*. vol. 109. no. 2. pp. 227-233. 2004.
- [41] Ida A. Aishwarya K. Jeanne G. Q. Gary L. F. The Anti-proliferative Response of Indole-3-carbinol in human melanoma cells is Triggered by an Interaction with NEDD4-1 and Disruption of Wild-type PTEN Degradation. *Molecular Cancer Research*. vol. 12. no. 11. pp. 1621-1634. 2015.
- [42] Igor E. B. Ruslan M. Reduced Secretion of YopJ by *Yersinia* Limits In Vivo Cell Death but Enhances Bacterial Virulence. *PLOS Pathogens*. vol. 4. no. 5. pp. 1-14. 2008.
- [43] Hui C. Fei M. Ida A. Rholinelle J. F. Gary L. F. DEVD-NucView488: a novel class of enzyme substrates for real-time detection of caspase-3 activity in live cells. *FASEB journal*. vol. 22. no. 7. pp. 2243-2252. 2008.
- [44] Graham S. T. S. Janine A. M. V. George H. Monitoring Cleaved Caspase-3 Activity and Apoptosis of Immortalized Oligodendroglial Cells using Live-cell Imaging and Cleaveable Fluorogenic-dye Substrates Following Potassium-induced Membrane Depolarization. *Journal of Visualized Experiments*. vol. 59. no. 13. pp. 1-5. 2008.
- [45] Cindy K. Ioanna K. Christian B. Angelika W. Ewald M. Stefan W. MicroRNA-31 Sensitizes Human Breast Cells to Apoptosis by Direct Targeting of Protein Kinase C ϵ (PKC ϵ). *Journal of Biological Chemistry*. vol. 288. no. 12. pp. 8750-8761. 2013.
- [46] Calli A. D. Sienna M. D. Matthew R. T. Victoria R. Z. Sarah E. C. Justin D. Connor W. Matthew L. Zachary T. S. Antioxidant Enzymes Mediate Survival of Breast Cancer Cells Deprived of Extracellular Matrix. *Cancer Research*. vol. 73. no. 12. pp. 3704-3715. 2013.
- [47] Arun K. K. Shuaiyu W. Sara M. Nikolay K. Anne K. Paola M. David H. Michael J. B. Astrid C. S. Thomas L. Elena I R. Loss of the m-AAA protease subunit AFG3L2 causes mitochondrial transport defects and tau hyperphosphorylation. *EMBO Journal*. vol. 33. no. 9. pp. 1011-1026. 2014.
- [48] Jing Z. Yonju H. Gregory I. L. Graydon B. G. Sylvia B. S. Kathryn E. B. Sigma Receptor Ligand, (+)-Pentazocine, Suppresses Inflammatory Responses of Retinal Microglia. *Investigative ophthalmology & visual science*. vol. 55. no. 6. pp. 3375-3384. 2014.
- [49] Eva S. Ivana C. Miroslav K. Milada C. Petr N. Petr M. Marek K. Barbora

- P. Jan C. Miroslav F. Biologically Active Metabolites Produced by the Basidiomycete *Quambalaria cyanescens*. *PLOS One*. vol. 10. no. 2. pp. 1-12. 2015.
- [50] Ana M. P. Cecilia S. Victor S. Arsenic Increases Pi-Mediated Vascular Calcification and Induces Premature Senescence in Vascular Smooth Muscle Cells. *Toxicological sciences*. vol. 131. no. 2. pp. 641-653. 2013.
- [51] Kathleen M. William J. J. Moumita G. Aideen B. Shyra G. Linda R. Donna L. B. Jihee L. K. Peter H. TNF- α Inhibits Macrophage Clearance of Apoptotic Cells via Cytosolic Phospholipase A2 and Oxidant-Dependent Mechanisms. *Journal of Immunology*. vol. 178. no. 12. pp. 8117-8126. 2007.
- [52] Yin W. Marjorie F. L. The Regulation of NADPH Oxidase and Its Association with Cell Proliferation in Human Lens Epithelial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. vol. 50. no. 5. pp. 2291-2300. 2009.
- [53] Feng C. Yanfang Y. Steven H. John J. Rudolf L. David W. S. David J. R. F. Regulation of NADPH Oxidase 5 by Protein Kinase C Isoforms. *PLOS ONE*. vol. 9. no. 2. pp. 1-10. 2014.
- [54] Jun-Sub K. Becky A. D. Bernard M. B. Ulla G. K. Gary M. B. Regulation of Nox1 Activity via Protein Kinase A-mediated Phosphorylation of NoxA1 and 14-3-3 Binding. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 282. no. 48. pp. 34787-34800. 2007.
- [55] Shyamali B. Sujoy B. Charles W. L. Helena P. Nox4 NADPH oxidase mediates oxidative stress and apoptosis caused by TNF- α in cerebral vascular endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. vol. 296. no. 3. pp. 422-432. 2009.
- [56] Haibo W. Erika W. M. Elizabeth H. The small GTPase Rap1 regulates intracellular ROS generation in RPE. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. vol. 53. no. 14. pp. 4277. 2012.
- [57] Fuxia Y. Yingxu W. Nox4 and redox signaling mediate TGF- β -induced endothelial cell apoptosis and phenotypic switch. *Cell Death & Disease*. vol. 5. no. 1. pp. 1-14. 2014.
- [58] Beili S. Ulvi B. Hyperglycaemia promotes human brain microvascular endothelial cell apoptosis via induction of protein kinase C- β I and prooxidant enzyme NADPH oxidase. *Redox Biology*. vol. 2. pp. 694-701. 2014.
- [59] Ashley L. H. Michel M. O. Ying Y. Radiation-induced signaling pathways

- that promote cancer cell survival (review). *International Journal of Oncology*. vol. 45. no. 5. pp. 1813-1819. 2014.
- [60] Ichiro S. Kenneth W. Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis. *Circulation Research*. vol. 90. no. 12. pp. 1243-1250. 2002.
- [61] Lilit S. Thibaud T. R. Maria J. C. N. Maria J. S. Manuela C. R. Nadine C. Cecile G. Stephen M. Regulation of Bax/mitochondria interaction by AKT. *FEBS Letters*. vol. 590. no. 1. pp. 13-21. 2016.
- [62] Justin K. Ozgur K. Glauber C. B. Tallulah S. A. Brian L. Anthony L. David W. A. Phosphorylation switches Bax from promoting to inhibiting apoptosis thereby increasing drug resistance. *EMBO reports*. vol. 19. no. 9. pp. 1-21. 2018.
- [63] Meiguo X. Xingming D. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 280. no. 11. pp. 10781-10789. 2005.
- [64] Peyerl, F. W. Dai S. Murphy G. A. Crawford F. White J. Marrack P. Kappler J. W. Elucidation of some Bax conformational changes through crystallization of an antibody-peptide complex. *Cell Death and Differentiation*. vol. 14. no. 3. pp. 447-452. 2007.
- [65] Evripidis G. Denis E. R. Joseph A. B. Elizaveta S. L. Loren D. W. Direct and selective small-molecule activation of proapoptotic BAX. *Nature chemical biology*. vol. 8. no. 7. pp. 639-645. 2012.
- [66] Zhiwei Z. Xijian L. Jin W. Jia X. Jing L. Feiyue X. microRNA let-7c is essential for the anisomycin-elicited apoptosis in Jurkat T cells by linking JNK1/2 to AP-1/STAT1/STAT3 signaling. *Scientific reports*. vol. 6. no. 24434. pp. 1-13. 2016.
- [67] Ganju N. Eastman A. Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome c release induced by chemical inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell death and differentiation*. vol. 10. no. 6. pp. 652-661. 2016.
- [68] Fuminori T. Jun S. Yasunori M. Seisuke H. Shigeomi S. Yoshihide T. Katsuji Y. Norihisa M. Yukiko G. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal*. vol. 23. no. 8. pp. 1889-1899. 2004.
- [69] Kuai Z. Hai Y. Y. Peng Y. T. Wei L. Yong J. L. Bin L. Jian Y. Tao J. Jian C. Wei H. C. Jin F. Mitochondrial division inhibitor 1 protects cortical neurons from excitotoxicity: a mechanistic pathway. *Neural regeneration research*. vol. 13. no. 9. pp. 1552-1560. 2018.

- [70] Weihua Y. Xiaodi Z. Jiangzheng L. Xin W. Shuang L. Rui L. Nai L. Tao Z. Chunxu H. Cyclosporine A Suppressed Glucose Oxidase Induced P53 Mitochondrial Translocation and Hepatic Cell Apoptosis through Blocking Mitochondrial Permeability Transition. *International journal of biological sciences*. vol. 12. no. 2. pp. 198-209. 2016.
- [71] Jonathan M. G. Vincent W. David R. P. Andrea H. Zhiyong W. John G. P. Ramon G.B. John H. S. Steven C. B. Hexokinase regulates Bax-mediated mitochondrial membrane injury following ischemic stress. *Kidney International*. vol. 79. no. 11. pp. 1207-1216. 2011.
- [72] Nathan M. Veronique N. Prashanth B. Platina E. C. Jennifer E. S. Kathrin G. Navdeep S. C. Craig B. T. Brooks R. Nissim H. Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Molecular Cell*. vol. 16. no. 5. pp. 819-830. 2004.
- [73] John G. P. Nataly S. Jan B. H. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 277. no. 9. pp. 7610-7618. 2001.
- [74] Nathan M. Veronique N. Brooks R. Nissim H. Akt inhibits apoptosis downstream of BID cleavage via a glucose-dependent mechanism involving mitochondrial hexokinases. *Molecular and Cellular Biology*. vol. 24. no. 2. pp. 730-740. 2004.
- [75] Leonardo R. Ximena G. Gabriel N. Carlos L. Verónica A. F. Alejandra S. G. Gustavo E. S. María E. S. Santiago G. M. AKT/GSK3 β signaling pathway is critically involved in human pluripotent stem cell survival. *Scientific Reports*. vol. 6. no. 35660. pp. 1-15. 2016.
- [76] Ulkan K. Ahmet B. C. Mustafa C. B. Mehmet Y. G. Berrak C. Esra Y. Taha K. Reyhan Z. G. Burak Y. Bayram Y. Bilal E. K. Ertugrul K. Particular phosphorylation of PI3K/Akt on Thr308 via PDK-1 and PTEN mediates melatonin's neuroprotective activity after focal cerebral ischemia in mice. *Redox Biology*. vol. 12. pp. 657-665. 2017.
- [77] David J. R. Valerie P. T. Jeffery M. S. Shigeki M. Akt Phosphorylates HK-II at Thr-473 and Increases Mitochondrial HK-II Association to Protect Cardiomyocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. vol. 288. no. 33. pp. 23798-23806. 2013.
- [78] Hariharan S. Rene P. Z. Albert S. Ulrich W. Gambaryan S. Phosphorylation of CalDAG-GEFI by protein kinase A prevents Rap1b activation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. vol. 11. no. 8. pp. 1574-1582. 2013.

謝辞

本研究は広島国際大学薬学部生化学教室において実施したものです。本研究に関して、御指導ならびに本論文の御校閲を賜りました広島国際大学薬学部生化学教室 堀隆光教授、同研究室の瀧野純一講師に心より感謝致します。また、本研究の御指導ならびに多くの御助言を頂きました広島国際大学医療栄養学部長 嶺憲太郎教授に深く感謝致します。また、本研究の遂行にあたり、**TERT HUVEC** をご提供頂いた近畿大学医学部ゲノム生物学教室 西尾和人教授に心より感謝致します。