

平成 31 年 4 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 170

氏 名 中山 明子

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： Bad Nauheim （国名： Germany ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

血管系における G タンパク質アルファ s の機能解析

3. 派遣期間：平成 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名

Max Planck Institute for Herat and Lung Research, Department of Pharmacology

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意

書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

<研究目的>

Gタンパク質共役受容体(G protein-coupled receptor, GPCR)は7回膜貫通型受容体の一種で、膜タンパク質中最大のスーパーファミリーを形成しており、代謝や感覚系、免疫系、自律神経系の制御など生理的に重要な役割を担っている。またその異常は様々な病態に関わっており、全投薬ターゲットの50-60%をGPCR関連分子が占めることが知られている。

GPCRのシグナル伝達は三量体Gタンパク質を介して行われる。GPCRにリガンドが結合するとその立体構造が変化し三量体Gタンパク質と結合して α サブユニットのGEFとして作用する。すなわち α サブユニットのGDPがGTPと交換される(図1)。これにより α サブユニットは $\beta\gamma$ 二量体とGPCRから分離され、下流のシグナル伝達分子を活性/抑制する(図1)。

α サブユニットには少なくとも20種類が存在し、その相同性から大きく4つのファミリーに分類される。そのうち $G\alpha_s$ はアデニル酸シクラーゼを活性化してセカンドメッセンジャーの環状アデノシンリン酸(cAMP)合成を促進する。

cAMPシグナルの重要性は主にcAMPアナログや活性剤、抑制剤を用いた研究で多く報告されている。しかしながら、血管における $G\alpha_s$ の機能、特に*in vivo*における機能はこれまで解明されてこなかった。また $G\alpha_s$ の血管病変に対する関与は不明であった。

本研究では内皮細胞の $G\alpha_s$ の生理的、病理的機能を解明し、血管新生及び維持に関わる新たな分子メカニズムを明らかにすることを目的として、血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスを作成し解析を行った。

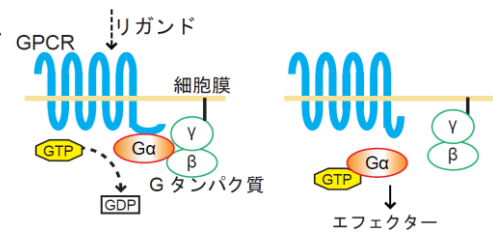


図1. GPCRにリガンドが結合するとその立体構造が変化し α サブユニットのGEFとして作用する。これにより α サブユニットは $\beta\gamma$ 二量体とGPCRから分離されシグナル伝達が行われる。

1. $G\alpha_s$ は病的な血管新生を促進する

$G\alpha_s$ の生理的な血管新生における役割を解明するため、網膜モデルを用いて血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスの解析を行った。その結果、網膜の生理的な血管新生ではコントロールとノックアウトマウスで差が認められなかった(図2上)。

そこで皮下腫瘍モデルを用いて解析を行った。その結果、ノックアウトマウスでは腫瘍が抑制された(図2下)。

皮下腫瘍からFACS (fluorescence-activated cell sorting) により分離した血管内皮細胞を用いて、RNAシーケンサーでトランスクリプトーム解析を行い、マウス皮膚の血管内皮細胞と比較した。その結果、腫瘍の血管内皮細胞でのみ発現が上昇している $G\alpha_s$ 結合型のGPCRが同定された。

現在、同定されたGPCRの血管内皮細胞特異的な誘導型ノックアウトマウス作成を行っている。今後作成されたノックアウトマウスで、網膜の血管新生モデル及び皮下腫瘍モデルを用いて、 $G\alpha_s$ のノックアウトマウスと比較して解析を行う予定である。

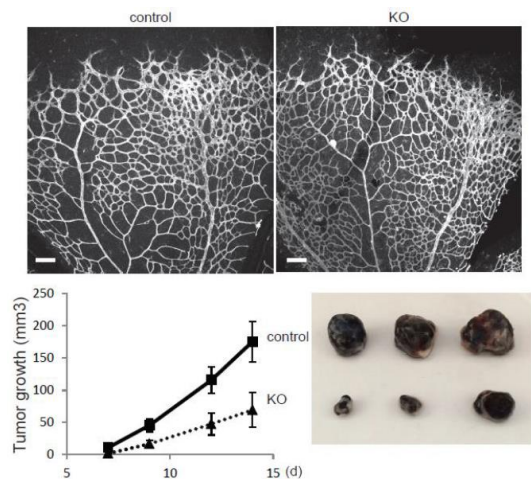


図2. 血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスで、網膜の生理的な血管新生に差は認められなかった。ノックアウトマウスでは腫瘍が抑制された。

2. $G\alpha_s$ は血管内皮細胞における炎症反応を抑制する

血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスをlow density lipoprotein receptor (LDLr) ノックアウトマウスと交配して動脈硬化モデルマウスを作製し、高脂肪食を与えて動脈硬化を誘導した。その結果、血管内皮細胞の $G\alpha_s$ を欠くマウスでは動脈硬化巣の増悪が認められた(図3c)。

そこでヒト臍帯静脈内皮細胞(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)及びbovine aortic endothelial cells (BAEC)を用いて解析を行った。その結果、振動流による炎症反応が、 $G\alpha_s$ をノックダウンした細胞では上昇していた(図3a)。 $G\alpha_s$ の下流のシグナル伝達分子であるprotein kinase A (PKA)を抑制した場合も同様の炎症反応の亢進が認められた。腫瘍壊死因子(Tumor Necrosis Factor, TNF)など他の刺激による炎症反応には差がみられなかった(図3b)。

このことを用いて、スクリーニングにより血管内皮細胞の振動流による炎症反応に関わるGPCRの同定を試みた。具体的にはこれまでに所属研究室で行われた解析に基づいて、HUVEC及びBAECで発現量の多いGPCRのうち、 $G\alpha_s$ と結合する(もしくは結合Gタンパク質が不明の)受容体を逐次ノックダウンし、振動流による炎症反応をコントロール細胞と比較した。その結果、ノックダウンにより、 $G\alpha_s$ ノックダウンと同様な炎症反応上昇を示すGPCRが同定された。

この同定された受容体の血管内皮細胞特異的な誘導型ノックアウトマウスを作成し、LDLrノックアウトマウスと交配して動脈硬化を誘導した。その結果、血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスを用いた時と同様の動脈硬化巣の増悪が認められた(投稿準備中)。

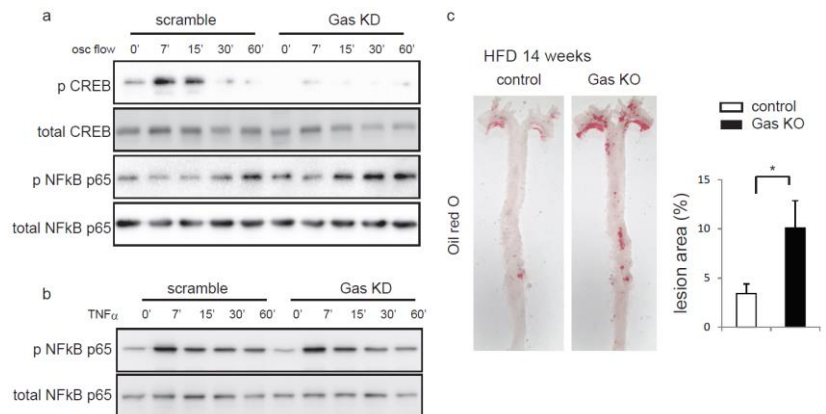


図 3. a, b) 血管内皮細胞の振動流による炎症反応が、 $G\alpha_s$ をノックダウンした細胞では上昇していた。他の刺激による炎症反応には差がみられなかった。c) 血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウスを LDLr ノックアウトマウスと交配し、高脂肪食を与えた結果、血管内皮細胞の $G\alpha_s$ を欠くマウスでは動脈硬化巣の増悪が認められた。

3. $G\alpha_s$ はリンパ管の機能に関わる

内皮細胞(血管内皮及びリンパ管内皮)特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウス(K02)も作製し解析を行った。その結果、内皮細胞特異的なノックアウトマウスでは、タモキシフェン(TAM)によるノックアウト誘導後、著しい体重増加が認められた(図4b)。また、特に皮下に強い浮腫が認められた(図4c)。一方血管内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ の誘導型ノックアウトマウス(K01)においては、ノックアウト誘導後も有意な変化は認められなかった(図4a)。

これらのノックアウトマウスを用いて、Miles Assayにより血管の透過性を確認した。その結果、いずれのノックアウトマウスでも、血管の透過性はコントロールマウスと同等であった(図4d)。

皮膚の免疫組織染色を行なった結果、内皮細胞特異的な $G\alpha_s$ のノックアウトマウスでは、リンパ管(Lyve1+)のジャンクション構造(CD144)が損なわれていた。血管(Lyve1-)のジャンクション構造には大きな差が認められなかった(図4d)。

マウスの皮膚を用いて、FACSによりリンパ管内皮細胞と血管内皮細胞を単離し、RNA シークエンサーでトランスクリプトーム解析を行った。その結果、リンパ管内皮細胞でのみ強く発現している $G\alpha_s$ 結合型のGPCRが同定された。現在、同定されたGPCRの血管内皮細胞特異的およびリンパ管内皮特異的な誘導型ノックアウトマウス作成を行っている。

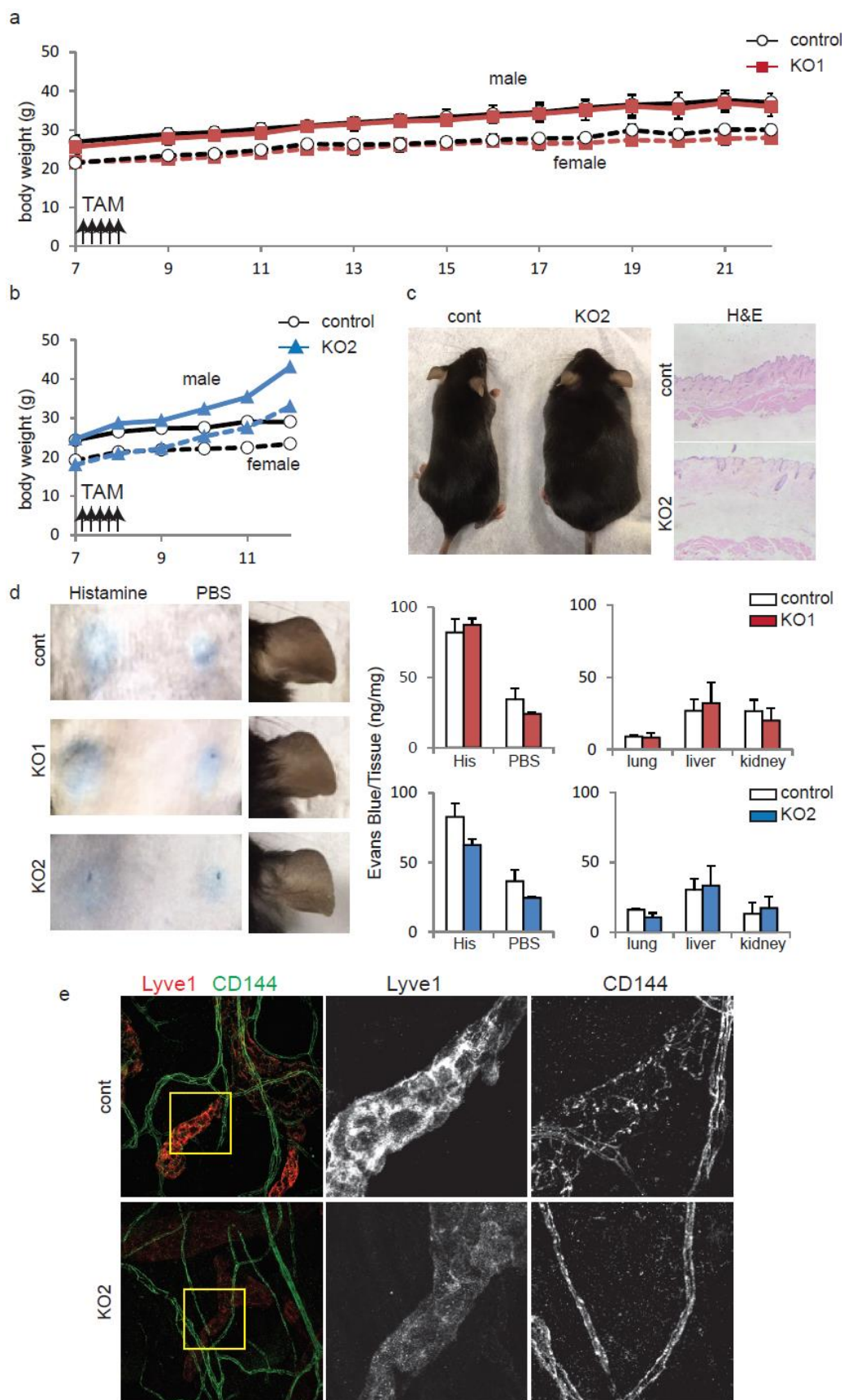


図 4. a, b) 内皮細胞特異的なノックアウトマウス (K02) には著しい体重増加が認められた一方、血管内皮細胞特異的なノックアウトマウス (K01) においては有意な変化は認められなかった。c) K02 では特に皮下に強い浮腫が認められた。d) いずれのノックアウトマウスでも、血管の透過性はコントロールマウスと同等であった。4) K02 ではリンパ管 (Lyve1+) のジャンクション構造 (CD144) が損なわれていた。血管 (Lyve1-) のジャンクション構造には大きな差が認められなかった。