The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Docking protein is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling
Author(s)	塩山, 渉
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58167
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【58】

氏　　名	塩山　渉（しおやま わたる）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４３８０　号
学位授与年月日	平成23年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学　位　論　文　名	Docking protein Gab1 is an essential component of postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling （ドッキング蛋白質Gab1はHGF/c-Metシグナルを介した生後の虚血後血管新生に必須である）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　小室　一成 （副査） 教　授　楽木　宏実　　教　授　澤　　芳樹

論　文　内　容　の　要　旨

〔目的〕

ドッキング蛋白質であるGrb2-associated binder（Gab）は哺乳類でGab1、Gab2、Gab3の3種類が存在する。これらの分子構造は非常に似ているが、Gab1にのみhepatocyte growth factor（HGF）受容体であるc-Metに対するMet binding domainを有しているのが特徴である。Gabは様々な増殖因子の刺激によりチロシンリン酸化を受けて、SH2ドメイン含有シグナル伝達分子の蛋白質脱リン酸化酵素SHP2やPI3-kinaseの調節サブユニットp85と会合し、下流のMAP kinase（ERK1/2、ERK5）やAKTの活性化を調節する。これらの増殖因子とその受容体であるReceptor Tyrosine Kinase（RTK）は血管新生に重要な役割を持つことが知られているが、血管新生におけるGabの役割は不明である。本研究の目的は、生後の血管新生におけるGab1の役割を明らかにすることである。

〔方法ならびに成績〕

Conventional Gab1ノックアウトマウスは胎生致死であるため、Cre-loxPシステムを用いて血管内皮細胞特異的Gab1ノックアウト（Gab1ECKO）マウスを作成した。Gab1ECKOマウスは明らかな血管形成異常は認めなかった。大腿動脈結紮による下肢虚血モデルを作成し、血流および形態学的な評価を行った。3週間の経過でGab1ECKOマウスは全例で下腿壊死を認めたが、コントロールマウスとConventional Gab2ノックアウト(Gab2KO)マウスは1例も下腿壊死を認めなかった。レーザードプラによる血流の評価では、Gab2KOマウスはコントロールマウスとほぼ同じ血流回復を認めたが、Gab1ECKOマウスは両者に比べて血流の回復が有意に低下していた。コントロールマウスでは虚血後に毛細血管密度の増加が見られたが、Gab1ECKOマ

ウスでは見られなかった。さらに下肢血管造影により、コントロールマウスでは側副血行路の発達が見られたが、Gab1ECKO マウスでは見られなかった。以上より生後の虚血後血管新生に Gab1 が重要な役割を担っていることが示唆された。次にヒト臍帯静脈内皮細胞（HUVEC）を用いて、HGF、VEGF、FGF2 による Gab のリン酸化を検討した。HGF 刺激時に最も強く Gab1 および Gab2 のリン酸化が誘導され、SHP2 と p85 が Gab1、Gab2 とそれぞれ会合することがわかった。下流シグナルについては、HGF 刺激時に ERK1/2、AKT、ERK5 のリン酸化が最も強くかつ遷延した。siRNA を用いた Gab1 のノックダウンではこれらのリン酸化は抑制されたが、Gab2 のノックダウンでは逆に増強された。このことより HUVEC においては HGF 刺激による ERK1/2、AKT、ERK5 の活性化に対して Gab1 は正のシグナル調節因子として、逆に Gab2 は負の調節因子として働くことがわかった。次に野生型 Gab1（$Gab1^{WT}$）、SHP2 結合不能変異体 Gab1（$Gab1^{\Delta SHP2}$）、p85 結合不能変異体 Gab1（$Gab1^{\Delta p85}$）の各種アデノウイルスを用いて HGF 刺激時の下流シグナルを検討した。ERK1/2 および ERK5 のリン酸化は $Gab1^{WT}$ により促進され、$Gab1^{\Delta SHP}$ 過剰発現下で抑制された。AKT のリン酸化は $Gab1^{WT}$ で促進され、$Gab1^{\Delta p85}$ 過剰発現下で抑制された。このことから、HGF 刺激依存性の ERK1/2、ERK5 の活性化に Gab1-SHP2 複合体形成が必要であり、AKT の活性化に Gab1-p85 複合体形成が必要であることがわかった。さらにスクラッチアッセイでは HGF 刺激による細胞遊走能が $Gab1^{\Delta SHP2}$ 過剰発現下で最も強く抑制され、Gab1-SHP2 複合体形成が細胞の遊走に必要であることが示唆された。HGF シグナルにより形成される Gab1-SHP2 複合体の下流標的因子を同定する目的で DNA マイクロアレイ解析を行った。HGF 刺激依存性に $Gab1^{WT}$ 過剰発現下で発現が増強し、$Gab1^{\Delta SHP2}$ 過剰発現下で発現が抑制される遺伝子を探索した結果、血管内皮の恒常性維持と血管新生に重要と考えられている Kruppel-like factor 2（KLF2）と Early growth response 1（Egr1）などを含めた 35 個の遺伝子が同定された。KLF2 の発現は MEK5-ERK5 経路を介し、Egr1 の発現は MEK1/2-ERK1/2 経路を介していることがわかった。さらに下肢虚血負荷前後の下腿筋肉の内皮細胞中には KLF2 や Egr1 の発現が有意に低下していることがわかった。最後に、虚血肢に対する HGF プラスミドおよび VEGF プラスミド投与による治療実験を行った。コントロールマウスでは空ベクター投与群に比べ、HGF プラスミドおよび VEGF プラスミド投与群でいずれも有意に血流が改善した。一方、Gab1ECKO マウスでは VEGF プラスミド投与群では血流の回復が見られたが、HGF プラスミド投与群では血流の回復が見られなかった。以上より、in vivo においても HGF 刺激による血管新生に Gab1 が必須であることが示された。

〔総括〕

本研究では Gab1ECKO マウスを作成解析することにより、Gab1 が HGF/c-Met シグナルを介した生後の虚血後血管新生に必須であることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

ドッキング蛋白質Gabは様々な増殖因子のシグナル伝達に重要な役割を担っているが、血管新生における役割は不明である。本研究は、内皮細胞特異的Gab1ノックアウト（Gab1ECKO）マウスを用いて、Gab1が生後の虚血後血管新生に重要であることを初めて示した。内皮細胞では、HGF/c-MetシグナルにGab1が必要であり、さらにHGF/c-Met/Gab1シグナル依存性に血管新生関連遺伝子であるKLF2とEgr1の発現を誘導することがわかった。またGab1ECKOマウスの下肢筋肉の内皮細胞中にはKLF2やEgr1の発現が有意に低下していた。Gab1ECKOマウスの下肢虚血負荷モデルに対するHGFおよびVEGFプラスミド投与による治療実験で、Gab1はVEGF依存性の血管新生よりもHGF依存性の血管新生と深い関連があることが示唆された。

本研究は、HGF/c-Met/Gab1を介するシグナル伝達により、KLF2やEgr1の発現を誘導して血管新生や血管内皮の恒常性維持に関与することを初めて示し、今後の医学の発展に大きく貢献するものと考えられ、学位の授与に値するものと認める。