

Title	Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin
Author(s)	村松, 史隆
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/61605">https://hdl.handle.net/11094/61605</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;大阪大学の博士論文について&lt;/a&gt;</a> 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

論文内容の要旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	村松 史隆
論文題名 Title	Plakoglobin maintains the integrity of vascular endothelial cell junctions and regulates VEGF-induced phosphorylation of VE-cadherin (ブラコグロビンは血管内皮細胞の細胞間結合を安定化し、VEGF刺激によるVEカドヘリンのリン酸化状態を制御する)
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕 血管内皮細胞は接着結合分子Vascular Endothelial (VE) -cadherinを介して血管内腔を覆う一層の細胞シートを形成し、血液内の物質輸送を制御している。接着結合の破たんにより、炎症細胞や癌細胞の浸潤、内容物の漏出などが誘発されるため、内皮細胞の接着と透過性の安定化は組織への適切な物質輸送に重要である。 plakoglobinは別名 $\gamma$ -cateninとも言われるとおり、 $\beta$ -cateninと高いアミノ酸相同性を有し、VE-cadherinと相互作用する。 $\beta$ -cateninは、VE-cadherinと細胞骨格とをつなぎ留め、Wntシグナル伝達系を活性化することで接着安定性を保つと報告されているが、plakoglobinの詳細な機能はよくわかっていない。そこで、本研究では培養血管内皮細胞を用いて、plakoglobinが細胞接着制御にどのような機能を有しているか解析した。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVECs)にplakoglobinに対するsiRNAをトランスフェクションし、その発現をノックダウンし機能解析を行った。その結果、plakoglobinの発現抑制は、内皮細胞の増殖や遊走能には影響を与えず、マトリゲル上でのチューブ形成能の低下と内皮細胞間の透過性亢進を引き起こした。細胞免疫染色を行うと、plakoglobinはVE-cadherinと共局在し、細胞間接着の発達に応じてその発現量が上昇することが明らかとなった。plakoglobinの発現抑制により、細胞―細胞間膜状に存在するVE-cadherinの局在が低下しており、内皮細胞の均一な形態を保ったシート構造の崩壊が認められた。このVE-cadherinの膜局在低下の原因として、VE-cadherin-細胞骨格タンパク質との結合不全が認められるかを、細胞免疫染色および免疫沈降法にて解析した。plakoglobinの発現が抑制された細胞では、中間系フィラメントタンパク質vimentinの密度低下が認められたが、アクチン繊維の分布や密度には影響は認められなかった。免疫沈降法にて、VE-cadherinと結合するvimentin量の評価を行ったが、plakoglobinの発現抑制による、VE-cadherinとvimentinとの結合低下は認められなかった。したがってplakoglobinはVE-cadherinの膜局在を安定化するが、VE-cadherinと細胞骨格タンパク質との結合には影響を与えないことが明らかとなった。 次に、我々は培養内皮細胞にVEGF(vascular endothelial growth factor)刺激を行い、細胞間の透過性が亢進される際におけるplakoglobinの機能解析をおこなった。VEGF受容体を介したシグナル経路は、VE-cadherin分子のリン酸化を引き起こし、細胞間接着を減弱させるため、ウェスタンブロッティング法でリン酸化VE-cadherinを評価した。plakoglobinの発現が抑制されたHUVECsでは、VEGF刺激によるVE-cadherinのリン酸化が減弱し、早期の脱リン酸化が認められた。細胞免疫染色では、plakoglobinの発現低下は、VEGF依存的な細胞接着の減弱を早期に抑制させることが明らかとなった。さらに、我々はplakoglobinのノックダウンは内皮細胞特異的フォスファターゼであるVE-PTPのmRNAの発現を亢進させることをqRT-PCRにより明らかとした。以上のことから、plakoglobinはVE-PTPの発現を抑制することで、内皮細胞におけるVEGFシグナルの強度を保つことが明らかとなった。	
〔総括(Conclusion)〕 plakoglobinは内皮細胞の活性状態に応じて、細胞接着を多面的に調節することが明らかとなった。すなわち、定常状態の内皮細胞ではVE-cadherinを細胞間膜に局在化させることで、強固な接着結合を形成させるが、VEGF刺激により活性化した内皮細胞ではVE-cadherinを介した接着を長期に減弱させる。plakoglobinはVE-PTPの発現を抑制することで、VEGFシグナル伝達を促進させうる。以上のことから、plakoglobinをターゲットとすることで、血管透過性の過剰な低下・亢進を抑制し、安定した血管を構築させることが可能となると考えられる。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 村松 史隆			
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学教授	高倉 伸平
	副 査	大阪大学教授	原 英二
	副 査	大阪大学教授	岡田 雅人

論文審査の結果の要旨

血管内皮細胞は接着結合分子Vascular Endothelial (VE) -cadherinを介して血管内腔を覆う一層の細胞シートを形成し、血液内の物質輸送を制御している。接着結合の破綻により、炎症細胞やがん細胞の浸潤、内容物の漏出などが誘発されるため、内皮細胞の接着と透過性の安定化は組織への適切な物質輸送に重要である。

ブラコグロビン（ $\gamma$ カテニン）はVE-cadherinと相互作用するが、その詳細な機能は不明であった。本論文では定常状態の内皮細胞において、ブラコグロビンがVE-cadherinの細胞膜表面への局在化に関与することを明らかとした。また、VE-PTPの転写を抑制することで、血管透過性刺激であるVEGFシグナルを増強させることも見出した。これらの結果から、ブラコグロビンは内皮細胞の活性状態に応じて、VE-cadherinを介した細胞接着を調節することが明らかとなった。

本研究は血管内皮細胞における物質の透過制御機構を知る上で重要な発見である。よって、本研究結果は博士の学位に値すると考える。