慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	血管内皮増殖因子受容体に対する低分子量基底膜蛋白質AZ-1の阻害機構
Sub Title	Inhibitory action of a matricellular protein AZ-1 on vascular endothelium growth factor-receptor
Author	向井, 邦晃(Mukai, Kuniaki) 三谷, 芙美子(Mitani, Fumiko) 西本, 紘嗣郎(Nishimoto, Koshiro)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	低分量基底膜蛋白質であるAZ-1は、血管基底膜の構成因子として構造的細胞外マトリックス蛋白質、血管内皮増殖因子、同受容体、インテグリン群との結合能を持つ多価相互作用因子であることが判明した。この相互作用が血管内皮細胞の接着、増殖、管腔形成などを制御することにより、血管内皮増殖因子による細胞の活性化が抑制されて血管内皮の恒常性が維持されうることが示唆された。
Notes	研究種目：基盤研究(C) 研究期間：2009～2011 課題番号：21510229 研究分野：複合新領域 科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21510229seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2009～2011
課題番号：21510229
研究課題名（和文）　血管内皮増殖因子受容体に対する低分子量基底膜蛋白質ＡＺ－１の阻害機構
研究課題名（英文）　Inhibitory action of a matricellular protein AZ-1 on vascular endothelium growth factor-receptor
研究代表者
向井　邦晃（MUKAI KUNIAKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80229913

研究成果の概要（和文）：低分量基底膜蛋白質である AZ-1 は、血管基底膜の構成因子として構造的細胞外マトリックス蛋白質、血管内皮増殖因子、同受容体、インテグリン群との結合能を持つ多価相互作用因子であることが判明した。この相互作用が血管内皮細胞の接着、増殖、管腔形成などを制御することにより、血管内皮増殖因子による細胞の活性化が抑制されて血管内皮の恒常性が維持されうることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：A low-molecular-weight basement membrane protein AZ-1 was demonstrated to be a multivalent factor which interacted with structural extracellular matrix proteins, vascular endothelium growth factor (VEGF), VEGF-receptors, and integrins. The multivalent interactions allowed to modulate adhesion, growth, and tubular formation of endothelial cells. The processes may inhibit activation of the cells by VEGF and play a role for homeostasis of vascular endothelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総　計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：複合新領域
科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学
キーワード：細胞・組織、生理活性、蛋白質

１．研究開始当初の背景

細胞外因子による細胞表面受容体を介した細胞機能の制御に関して、受容体の細胞膜外側領域における調節機構は十分には知られていない。従来、細胞外因子の作用は、細胞外因子が表面受容体への結合することを以て、一義的に受容体の活性化を起こすことと理解されてきた。そのため、受容体の活性化以降、細胞内シグナル伝達の一連の過程が詳細に研究されてきたが、受容体の細胞外領域による調節に関する研究は十分ではない。

近年、細胞表面受容体の細胞外領域において、細胞機能を調節する新しいカテゴリーの細胞外因子群“マトリセルラー蛋白質（MCP）”が知られるようになった。MCP は、従来の細胞外因子の２つのカテゴリー、すなわち増殖因子などの可溶性因子、細胞外マトリックス(ECM)蛋白質などの不溶性･構造的因子のどちらにも属さない。MCP は低分子量でありながら ECM に局在して細胞機能の調節を行う。MCP には、SPARC、osteopontin、Cyr61 などが知られる。

Adrenocortical zonation factor-1 (AZ-1) は、副腎皮質の層機能分化に関与する因子と

して同定された。我々の近年の研究によりAZ-1は、副腎皮質だけでなく哺乳動物の全身の血管基底膜に局在して、インテグリンのリガンドとして血管内皮細胞(VEC)の接着・進展活性を示す一方、血管内皮増殖因子VEGFによる血管内皮細胞への効果を阻害することが判明した。

内皮細胞の機能制御においては、主要な２つの細胞外因子である血管内皮増殖因子(VEGF)とECM蛋白質が、これらの細胞表面受容体を巻き込んで内皮細胞の機能調節を行う。研究代表者は、AZ-1がVEGF受容体、構造ECM蛋白質、インテグリンのいずれとも相互作用する能力を持った細胞外シグナルモジュレーターとして機能すると考えた

２．研究の目的

本研究では、VEGF、構造ECMという細胞外因子と、インテグリンαVβ3 および VEGF-R2の細胞外領域が関与する複合体形成に対して、AZ-1 が引き起こす構造的的変化を各蛋白質のドメイン構造のレベルで解析することを目的とした。さらに、AZ-1の特徴的な発現が明らかになった哺乳動物初期発生における局在、構造ECM及びインテグリンとの相互作用の解析を行った。

３．研究の方法

受容体の細胞外領域が形成する複合体に対してAZ-1が引き起こす構造機能変化を、蛋白質間結合、細胞接着、細胞増殖、管腔形成アッセイにより捉え、VEGF刺激に対するAZ-1の細胞応答阻害を蛋白質複合体の活性機能相関に結びつける。AZ-1による複合体形成への機能調節による分子基盤を明らかにするため、AZ-1変異体を作製した。

４．研究成果

(1) 血管内皮細胞(VEC)はin vitroにおいて、固相化された構造的な細胞外マトリクスを足場として細胞膜上のインテグリンを介して接着する。VECは、精製AZ-1蛋白質を固相化するとインテグリン(α2β1，α6β1，αVβ3)に依存した接着を示した。固相化フィブロネクチン(FN)への接着におけるインテグリンα5β1依存性と異なることから、AZ-1の接着促進活性は特異的であった。この結果はAZ-1が、他の細胞外因子なしでも単独でインテグリン(α2β1，α6β1，αVβ3)と結合して、接着を促進することを示す(図１)。

ところが固相化コラーゲン Ⅰ (Col-Ⅰ)が示すVEC接着促進活性は、AZ-1を固相化Col-Ⅰに結合させると、AZ-1濃度依存的に阻害された(図２)。

同様に、Col-Ⅰ上でのVEGFに依存したVECの増殖は、AZ-1を固相化Col-Ⅰに結合させると阻害された(図３)。

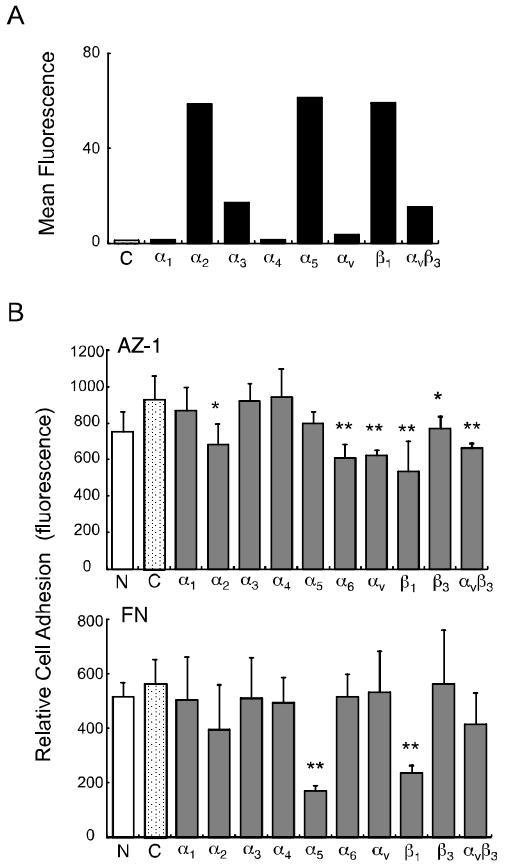


図１　血管内皮細胞が固相化AZ-1に接着する際のインテグリンサブタイプ依存性は、固相化フィブロネクチンに接着する際と異なる。(A)血管内皮細胞に検出されたインテグリンサブユニット、(B)固相化AZ-1(上)と固相化フィブロネクチン(下)への血管内皮細胞の接着に対する抗インテグリンサブユニット抗体による阻害効果。

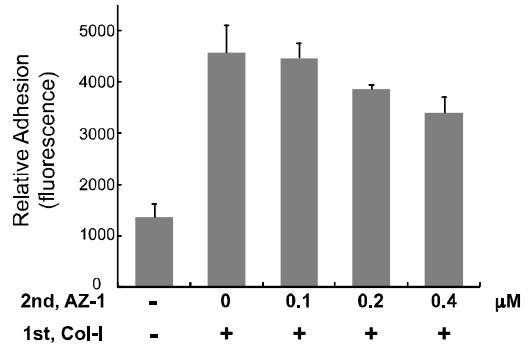
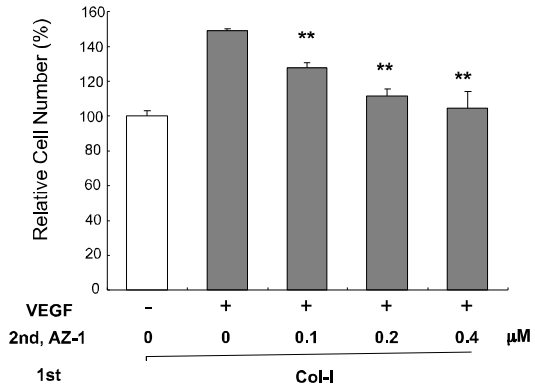


図２　内皮細胞の接着に対するコラーゲンⅠの促進活性は、AZ-1がコラーゲンⅠへ結合することにより抑制される。

すなわち、２つの細胞過程 (1)構造的細胞外因子Col-Ⅰとその受容体インテグリンの相互作用によるVECの接着促進、(2)可溶性細胞外因子VEGFとVEGF受容体2の相互作用によるVECの増殖促進において、AZ-1は阻害能を

示した。

図３　内皮細胞の VEGF 依存的な増殖に対するコラーゲ



ン I の促進効果は、AZ-1 がコラーゲン I へ結合することにより抑制される。

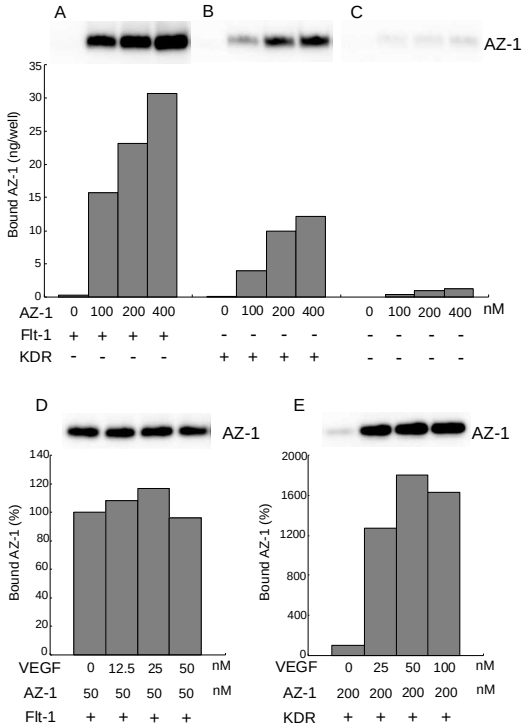
以上の結果から、AZ-1 は、2 種の細胞外因子「可溶性因子」及び「構造的因子」がそれぞれの細胞表面受容体と相互作用するとき、両方の過程に関与することによって細胞機能をモジュレートすることが示唆された。

(2) VEGF 受容体１（Flt-1）あるいは VEGF 受容体 2（KDR）と AZ-1 の相互作用について解析した。精製された Flt-1 と KDR の細胞外領域を固相化して蛋白質間結合アッセイを行ったところ、精製 AZ-1 は濃度依存的に固相化 Flt-1 と KDR に結合した。これらの結合に対する可溶性因子 VEGF の影響を調べたところ、Flt-1 への AZ-1 の結合は VEGF により変化しないが、KDR-1 への AZ-1 の結合は VEGF の存在に顕著に増加した(図４)。

この結果は、Flt-1 へ VEGF が結合しても Flt-1 は構造変化しないが、KDR へ VEGF が結合すると KDR は構造変化して、AZ-1 との結合能を高めることを示唆する。KDR は内皮細胞において、インテグリンαVβ3 と細胞表面上で複合体を形成して、VEGF に対する内皮細胞の接着・伸展、増殖などの応答性に重要な役割を持つことが判明している。これまでに AZ-1 はインテグリン及びインテグリンのリガンドである細胞外マトリックスとの結合能により、内皮細胞の接着・伸展を制御することが判明している。上記結果は、これらの因子に加えて、AZ-1 は VEGF 依存的に VEGF-KDR 複合体へ結合する因子であることを示す。

これらの結果から、AZ-1 は、多価相互作用能を持つ細胞外因子として、VEGF-KDR-インテグリンαVβ3 細胞外マトリックス蛋白質から構成される複合体へ参加することによって、新たな細胞外因子として細胞応答を制御することが示唆された。ここで推定された細胞の応答制御のスキームは、コラーゲンゲルにおいて内皮細胞が VEGF 依存的に管腔形成する現象に対して、AZ-1 が阻害効果を示したことをよく支持する。

図４　AZ-1 は VEGF 濃度依存的に KDR に結合する。



(A)AZ-1 は濃度依存的に Flt-1 に結合する。(B)AZ-1 は濃度依存的に KDR に結合する。(C)AZ-1 の非特異的結合。(D)AZ-1 は VEGF 濃度に依存せずに Flt-1 に結合する。(E)AZ-1 は VEGF 濃度に依存して KDR に結合する。

(3) リガンド・細胞表面受容体複合体モデルにおける AZ-1 の相互作用様式の検証を目的として、AZ-1 蛋白質変異体の調製を行った。全長の組換え AZ-1(466 アミノ酸残基)については、効率良く発現・精製することが可能であった。AZ-1 ドメイン欠損変異体として、3 ドメインの内１つまたは２つ欠いた変異体の発現を試みた。しかしフィブロネクチン N 端 70k 等との融合蛋白質の作製を含めて種々の工夫を試みたが、一部の変異体について十分量発現させることが困難であった。そのため、ドメインごとの機能評価が困難であったため複合体との相互作用に関与する AZ-1 の機能ドメインの特定に至らなかった。

AZ-1 の低分子量基底膜蛋白質としての新しい機能を示す結果が、マウス胚を用いた実験から得られた。マウス初期胚において AZ-1 mRNA が特徴的に増加することが従来知られていた。この過程における AZ-1 蛋白質の局在を免疫組織化学法により検討したところ、着床直前胚において、AZ-1 は栄養外胚葉の胞胚腔側内側に検出された。着床後には、AZ-1 はライヘルト膜の重要な成分であるラミニンと局在が同一であること、さらに免疫沈降実験により、AZ-1 とラミニンは相互作用していることが判明した。この結果から、AZ-1 はライ

ヘルト膜の新規な構成分子であることが判明した。一方、子宮側における AZ-1 の局在を解析した結果、子宮内膜上皮細胞および血管内皮細胞の基底膜に局在することが判明した。特に、胚周囲の子宮側においてはインテグリン群と共局在しており、免疫沈降実験により、AZ-1 とインテグリン群との相互作用が判明した。

これらの結果、AZ-1 は哺乳動物の初期発生においても、胚側においては少なくとも構造的細胞外マトリックス蛋白質(ラミニンなど)と相互作用していること、一方子宮側においては少なくとも細胞表面受容体（インテグリン群）と相互作用していることを示す。従って AZ-1 は多価結合性因子として細胞機能の調節に関与することが示唆された。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計５件）

① Nishimoto, K., Rigsby, C. S., Wang, T., Mukai, K., Gomez-Sanchez, C. E., Rainey, W. E., Seki, T. (2012) Transcriptome analysis reveals differentially expressed transcripts in rat adrenal zona glomerulosa and zona fasciculata. Endocrinology *153*, 1755-1763 査読有.

② 西本 紘嗣郎、中川 健、大家 基嗣、柴田洋孝、伊藤 裕、林 雄一郎、荻島 正、末松 誠、向井 邦晃 (2010) 原発性アルドステロン症の新しい病理学、内分泌外科,27(4),241-247 査読無.

③ Tajiri, Y., Igarashi, T., Li, D., Mukai, K., Suematsu, M., Fukui, E., Yoshizawa, M., and Matsumoto, H. (2010) Tubulointerstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in the uterus and binds with integrins in decidualized endometrium during postimplantation in mice. Biol Reprod. 82, 263-270 査読有.

④ Nishimoto, K., Nakagawa, K., Li, D., Kosaka, T., Oya, M., Mikami, S., Shibata, H., Itoh, H., Mitani, F., Yamazaki, T., Ogishima, T., Suematsu, M., and Mukai K. (2010) Adrenocortical zonation in humans under normal and pathological conditions. J. Clin. Endocrinol. Metab. 95, 2296-2305 査読有.

⑤ Igarashi, T., Tajiri, Y., Sakurai, M., Sato, E., Li, D., Mukai, K., Suematsu, M,, Fukui, E,, Yoshizawa, M,, Matsumoto, H. (2009) Tubulo-interstitial nephritis antigen-like 1 is expressed in extraembryonic tissues and interacts with laminin 1 in the Reichert membrane at postimplantation. Biol Reprod. 81, 948-955 査読有.

〔学会発表〕（計１１件）

① 向井 邦晃、原発性アルドステロン症（ＰＡ）における CYP11B2 の組織局在とその意義、第 19 回日本ステロイドホルモン学会、2011 年 11 月 26 日、福岡.

② 向井 邦晃　ヒト副腎皮質における自律的アルドステロン産生細胞クラスター、第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都.

③ Yan Bao, Kuniaki Mukai, Takako Hishiki, Tomomi Matsuura, Yoshiko Nagahata, Makoto Suematsu. Glycolysis in human colon cancer cells was further up-regulated in G1 phase 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 23 日、京都.

④ 西本 紘嗣郎、中川 健、大家 基嗣、向井 邦晃、非腫瘍性原発性アルドステロン症に対する新たな病理学的確定診断法、第 99 回日本泌尿器学会総会、2011 年 4 月 22 日、名古屋.

⑤ 西本 紘嗣郎、三谷 芙美子、荻島 正、向井 邦晃、ヒト副腎皮質における自律的アルドステロン産生細胞クラスター、第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会 BMB2010、2010 年 12 月 10 日、神戸.

⑥ Yan Bao, Kuniaki Mukai, Takako Hishiki, Tomomi Matsuura, Yoshiko Nagahata, Makoto Suematsu Dependence of cellular energy production on glycolysis increased in G1 phase of human colon cancer cells. 第 83 回日本生化学会大会、第 33 回日本分子生物学会年会・合同大会 BMB2010、2010 年 12 月 10 日、神戸 .

⑦ 西本 紘嗣郎、中川 健、大家 基嗣、向井 邦晃、アルドステロン (Aldo) 産生細胞の検出による新たな疾患概念 subclinical hyperaldosteronism、第 22 回日本内分泌外科学会、2010 年 6 月 12 日、大阪.

⑧ 西本 紘嗣郎、中川 健、大家 基嗣、荻島 正、末松 誠、向井 邦晃、Discovery of aldosterone-producing cell clusters in human adrenal cortex. 第98回日本泌尿器学会、2010年4月27日、盛岡.

⑨ 西本 紘嗣郎，李 丹，三谷 芙美子，山崎岳，荻島 正，末松 誠，向井 邦晃、正常及び病態におけるヒト副腎皮質の組織構築と機能分化：新たなZonationとアルドステロン合成、第82回日本生化学会大会、シンポジウム「シトクロムP450と医療との接点」、2009年10月21日、神戸.

⑩ 西本 紘嗣郎、中川 健、菊地 英次、宮嶋 哲、大家 基嗣、三上 修治、荻島 正、向井 邦晃、アルドステロン及びコルチゾル産生細胞の同定による副腎皮質病理診断、第21回日本内分泌外科学会、2009年5月29日、岡山.

⑪ 西本 紘嗣郎、中川 健、大家 基嗣、三上 修治、荻島 正、末松 誠、向井 邦晃、アルドステロン産生細胞の同定による副腎皮質病理診断法の改良、第97回日本泌尿器学会、2009年4月16日、岡山.

〔図書〕（計１件）

① 西本 紘嗣郎、向井 邦晃 (2011)アルドステロン合成酵素の免疫染色による原発性アルドステロン症の病理学的確定診断法（原発性アルドステロン症診療マニュアル第２版（成瀬光栄、平田結喜緒編）、診断と治療社、p.158-160.

〔産業財産権〕
○出願状況（計０件）
○取得状況（計０件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.gasbiology.com/

６．研究組織
(1)研究代表者
向井　邦晃（MUKAI　KUNIAKI）
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号：80229913

(2)研究分担者
三谷　芙美子（MITANI　FUMIKO）
慶應義塾大学・医学部・講師（非常勤）
研究者番号：60041852

西本　紘嗣郎（NISHIMOTO KOSHIRO）
慶應義塾大学・医学部・共同研究員
研究者番号：00365363

(3)連携研究者
なし