

活性化血液凝固第 IX 因子は EGF ドメインを  
介してアポトーシスを誘導する（要約）

日本大学大学院医学研究科博士課程  
生理系分子細胞生理学専攻

石川 友美

修了年 2016 年

指導教員 國分 眞一郎

## 第一章 緒言

### 第1節 背景

#### 1. アポトーシス

アポトーシスは、プログラムされた細胞死を指す。アポトーシスを起こしている細胞には、細胞に対する侵襲が原因となるネクローシスの細胞から区別される形態上の特徴がある[1]。

アポトーシスの情報伝達経路には、ミトコンドリアが関与する内因性と、Fasをはじめとする細胞死受容体を介する外因性の二種類がある[2]。内因性経路でも外因性経路でも、エフェクターカスパーゼであるカスパーゼ3や7の活性化がアポトーシスの誘導のための共通経路となっている[3]。

#### 2. EGFモチーフ

上皮成長因子 (EGF) モチーフは、約40個のアミノ酸から構成されるモチーフである[4, 5, 6]。このモチーフは600以上の細胞外タンパクにより共有される。EGFモチーフの約25%がカルシウム結合性である。カルシウム結合性EGFモチーフの多くがCX(D/N)XXXX(F/Y)XCXCのコンセンサスシーケンスを有している (Xは任意のアミノ酸残基を表す)。

KitanoらはCX(D/N)XXXX(F/Y)XCXCのアミノ酸配列で定義されるEGFモチーフのサブファミリーとしてCXDXXXXYXCXCを提案している[7]。彼らは、凝固第IX因子 (以下、F9と呼ぶ) の第一EGFドメインには、遺伝子導入効率を改善する機能以外に、細胞接着を抑制する作用があると報告した[9]。凝固第VII因子と第X因

子のEGFドメインも同様な活性を示した。これらの結果はCXDXXXXYXCXCがアミノ酸配列のみならず機能的にもファミリーを構成することを示唆している。

### 3. 凝固第IX因子 (F9)

F9は、N末端側の軽鎖、C末端側の重鎖と、それらをつなぐ活性化ペプチドから構成されている。F9の軽鎖は三つのドメインから構成される。軽鎖のC末端側には二つのEGFドメインが並ぶ。第一EGFドメインはCKDDISSYECWCのアミノ酸配列を含み、前述のCXDXXXXYXCXC配列を持つEGFモチーフに該当する。第一EGFドメインの異常は重鎖のタンパク分解酵素活性の低下を引き起こし、F9の凝固因子としての活性に必須である[10]。また、Glaドメインの安定性にも寄与している[11]。

## 第2節 本研究の目的

本研究の目的は、F9の第一EGFドメインの細胞への機能を明らかにすることである。特にアポトーシス誘導能について検討を加える。さらに、CXDXXXXYXCXCのアミノ酸配列を持つEGFドメインの医学的意味について考察する。

## 第二章 対象と方法

### 第1節 細胞と培養

実験にはヒト扁平上皮癌細胞由来のA431NS細胞を用いた。培養には64培養液を使用した。64培養液は、Opti-MEM I Reduced Serum培養液とLHC-8培養液を6 : 4に混合して作製した。

### 第2節 試薬

マウスF9欠失変異体のcDNA (アミノ酸残基47-471、47-236、47 - 191、97 - 130) を RT-PCRにより作製し、発現ベクターであるAP-tag4 ベクターに挿入した。これらのプラスミドをCHO細胞に導入し、培養することにより、組み換えタンパクを作成した。Kitanoらの報告を参考とし、十分な反応をえられる濃度として100 nMの組み換えタンパクを細胞培養液に添加して実験を行った[7, 8]。

### 第3節 細胞接着の評価

細胞基質間接着の強度を評価するために以下の実験を行った。A431NS細胞に、F9・活性化F9・47-471・47-236・47-191・EGF-F9を其々添加した。タンパク添加後に振盪し、浮遊細胞数を計測した。

### 第4節 アネキシンV染色

アポトーシスをおこした細胞数を知るため、アネキシンV染色を行った。EGF-F9添加後、アネキシンV AlexaFluor 568を加え、phalloidin-AlexaFluor488でアクチンの染色を行った。アネキシンV染色陽性細胞数を数え、アネキシンV染色陽性細胞数の割合を計算した。

## 第5節 ウェスタンブロット法によるEGF-F9の影響の評価

細胞が産生するタンパク量を評価するためウェスタンブロットを行った。A431NS細胞にEGF-F9で処理し、サンプルを作製した。得られたバンドの定量化はJust TLC softwareで行った。

## 第6節 カスパーゼ3阻害剤存在下でのアネキシンV染色

EGF-F9によるアポトーシスのカスパーゼ3依存性について検討するために、アネキシンVで染まる細胞数を測定した。A431NS細胞をカスパーゼ3阻害剤で処理後、第4節と同様に進めた。

## 第7節 統計分析

Mann-WhitneyのU検定を行い、検定結果の指標はp値を用いた。95%信頼区間の場合は  $p < 0.05$  、99%信頼区間の場合は  $p < 0.01$  をもって有意差があるとした。結果は平均±標準偏差とした。

## 第三章 結果

### 第1節 細胞接着への影響

EGF-F9の細胞接着に関する機能が凝固反応とどのように関係しているか検討するため、F9タンパク、活性型F9タンパクおよびF9の欠失変異体を用いて実験を行った。タンパクを添加後振とうし、剥がれてきた細胞数を血球計算盤で計測した。コントロールでは細胞はほとんど剥がれなかった。ヒト血漿由来F9タンパクおよびマウスF9全長組み換えタンパクによる処理では細胞の剥離は誘発されなかったが、ヒト血漿由来活性型F9タンパクによる細胞剥離が観察された。F9の欠失変異体を用いた実験では、活性化ペプチドを含むタンパクには活性がなかったが、軽鎖あるいはEGF-F9には活性があった。

### 第2節 アポトーシスの誘導

EGF-F9が、ホモロジーのあるDe11の第三EGFドメイン同様にアポトーシスを誘導するか検討した。細胞死の指標としてアネキシンVで免疫染色、活性型カスパーゼ3タンパク量をウェスタンブロットで検出した。アネキシンV染色陽性細胞は、EGF-F9添加後では約8.9倍に増加した。活性型カスパーゼ3はEGF-F9投与後約2.7倍になった。

### 第3節 情報伝達のカスパーゼ3依存性

活性型カスパーゼ3の増加は、EGF-F9によるアポトーシスがカスパーゼ3依存性であることを示唆していた。それを確認するために、カスパーゼ3阻害剤を用いた実験を行った。アネキシンV染色陽性細胞の割合はインヒビターVによりEGF-F9に比べ約 $73 \pm 36.3\%$ 抑制された。しかしインヒビターVIIは、それ自体に

細胞表面へのアネキシンVの結合を増やす作用があるため評価できなかった。

EGF-F9の投与は10分以内に細胞接着を減弱する。この結果は、EGF-F9によるアポトーシスが接着阻害によって誘発されるアノイキスである可能性を示唆した。そこで、細胞接着の減弱とカスパーゼ3活性化の関係について検討するため、カスパーゼ3活性化の時間経過について調べた。ウェスタンブロットで、活性化カスパーゼ3とカスパーゼ3は刺激後5から10分で増加が認められた。通常、アポトーシス誘導時のカスパーゼ3の活性化は30分から数時間かけて起こる[20, 21]。

この早期のカスパーゼ3活性化が細胞脱接着の上流で働いている可能性を考え、カスパーゼ3阻害剤を用いた実験を行った。EGF-F9により誘発される細胞接着の減弱化はインヒビターVとインヒビターVIIによりそれぞれ約 $72 \pm 22\%$ と約 $92 \pm 10\%$ 抑制された。



## 第四章 考察

本研究において、活性化F9は凝固因子として働くのみならず、ヒト扁平上皮癌細胞株に対して脱接着作用を示すことが確認された。活性化F9は細胞基質間接着を減弱化し、その活性は第一EGFドメイン（EGF-F9）に局在した。EGF-F9の活性は、Kitanoらが報告しているように、凝固反応に伴う活性化ペプチドの除去により生じると推察された[9]。またEGF-F9には、CXDXXXXYXCXC配列を持つDe11の第三EGFドメイン同様に、アポトーシスの誘導活性があると判明した。

### 第1節 EGF-F9の情報伝達路

EGF-F9により誘導されたアポトーシスに先行してカスパーゼ3の活性化が観察された。アポトーシス、脱接着は2種類のカスパーゼ3阻害剤により部分的に抑制された。これらの結果は、EGF-F9によるこれらの反応がカスパーゼ3依存性である可能性を示唆している。もしカスパーゼ3活性化の下流に脱接着が位置するなら、通常のアノイキスとは逆のシグナル伝導路の存在が考えられる[14, 15]。

EGF-F9によるカスパーゼ3の活性化は刺激後30分以内に観察された。このような早期のカスパーゼ3活性化についての報告はあまり多くない。Borutaiteらはランゲンドルフ法を用いて心筋虚血モデルを作成し、カスパーゼ3の活性を検討した[16]。その結果、還流を止めてから30分後にカスパーゼ3の活性が増加した。また、ショウジョウバエを用いた実験では、ハエの幼生に針で外傷を与えると30分以内に腸管上皮でカスパーゼ3が活性化された[17]。この結果よりカスパーゼ3の活性化は外傷ストレスからの回復に必須と思われた。In vitroの実験系を用いた研究では、Rosadoらの報告がある[18]。血小板ではトロンビンの刺激から1分でカスパーゼ3活性が上昇した。血小板はやや特殊な細胞と言えるが、彼



らは膵臓の細胞でもCCK-8の刺激から1分でカスパーゼ3活性の上昇を認めた。外傷に対する凝固反応や、食事に対する消化酵素の分泌は分単位の反応であり、カスパーゼ3の迅速な活性化は生体の素早い反応に共通して起こる可能性が考えられる。本研究ではカスパーゼ3の総タンパク量も早期から増加していた。刺激から短時間で起こるカスパーゼ3活性の亢進は、生理的な反応において重要な役割を果たす可能性がある。

## 第2節 EGF-F9の医学的意味

次に、凝固因子の一つであるF9が細胞接着を減弱化したりアポトーシスを誘発したりする医学的意味について考察する。

第一に、凝固反応が外傷部で生じることから考えると、障害を受けた組織にアポトーシスを誘導し、エンドサイトーシスによるデブリードメントを容易にする可能性がある。第二に、細胞の脱接着は創の周辺組織からの創内への細胞の遊走に必要である。通常、創傷の治癒には創の周囲組織から、上皮細胞、線維芽細胞、内皮細胞、マクロファージなど多種の細胞が動員される。これらの細胞が元の位置から離れて創内に遊走するのにEGF-F9が役立つ可能性がある。

第三に、F9は創傷治癒に必要な細胞分化や増殖に関わっている可能性がある。ヒドラ、カエル、ハエなどの下等動物では、組織再生の過程でアポトーシスが観察されている[19, 20, 21]。哺乳類の場合、いくつかの系列でカスパーゼ3の活性化が細胞分化に必須である。OkuyamaらはNotchからカスパーゼ3に至る情報伝達路が皮膚角化細胞の分化を制御していると報告した[22]。さらに、カスパーゼ3のノックアウトマウスでは皮膚や肝臓での組織の再生が抑制された[23]。

### 第3節 アミノ酸配列CXDXXXXYCXC

本研究においてEGF-F9のアポトーシス誘導作用が確認されたため、アミノ酸配列CXDXXXXYCXCを持つDe11とF9のEGFドメインは、アポトーシスの誘導という共通の機能を持つことが明らかになった。CXDXXXXYCXCが特定の機能を持つ新規のファミリーを構成する可能性が高まったと言える。また、CXDXXXXYCXC配列による細胞脱接着やアポトーシスは動脈硬化等の血管病変に関わっている可能性がある。これまで、血栓症の治療薬は凝固能を指標に用いられてきた。凝固因子の細胞に対する機能の発見は、動脈硬化症やそれに伴う血栓症の予防や治療における新たなターゲットの発見と考えられる。

## 第五章 まとめ

本研究ではEGF-F9がアポトーシスを起こすことを示した。EGF-F9の活性化は凝固反応と同様のプロセスによると思われた。EGF-F9のアポトーシス誘導作用の一部は、カスパーゼ3活性化を介するシグナル経路の関与が示唆された。

CXDXXXXYCXCのアミノ酸配列は凝固第VII因子と第X因子にも共通するため、凝固因子としての系以外に、細胞に対する機能に関わる新たな生理学的な系が存在する可能性がある。細胞接着やアポトーシスは創傷の治癒、組織の再生、血管病の発症、がん治療などに関与しており、CXDXXXXYCXCのアミノ酸配列は様々な分野で重要な研究対象になると考えられる。

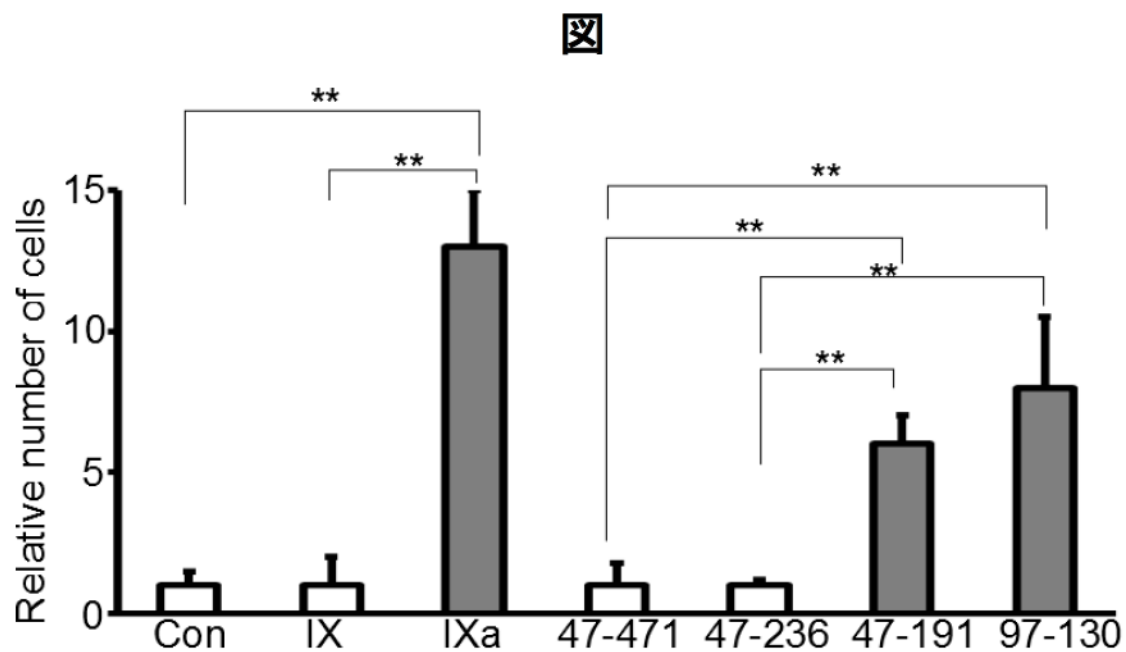


図 1 EGF-F9 による細胞の脱接着

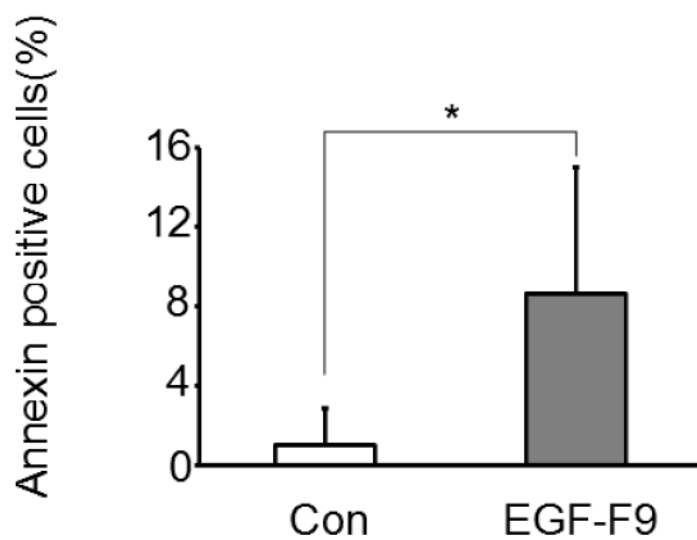


図 2 EGF-F9 によるアポトーシスの誘導

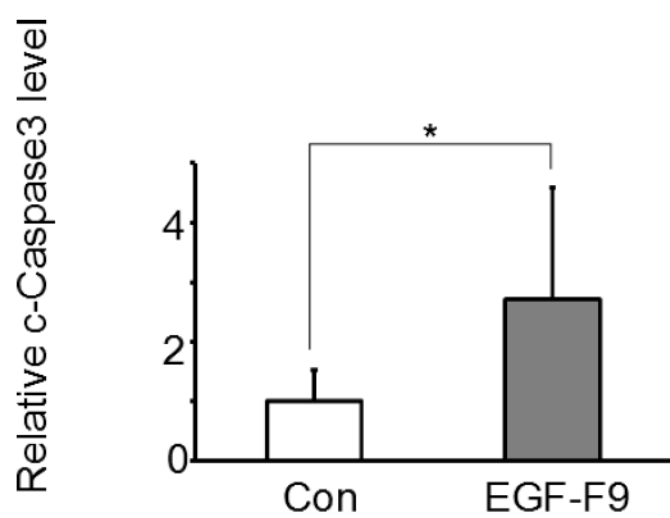


図 3 EGF-F9 によるアポトーシスのカスパーゼ 3 依存性

## 図説

### 図1 EGF-F9による細胞の脱接着

脱接着細胞の測定。横軸の数値はF9変異体のアミノ酸残基数を示す。47-471がF9全長、97-130がEGF-F9に相当する。n=6。

### 図2 EGF-F9によるアポトーシスの誘導

8時間後のアネキシンV染色陽性細胞の割合。n=6。

### 図3 EGF-F9によるアポトーシスのカスパーゼ3依存性

30分後の活性化カスパーゼ3 (c-Caspase3) のウェスタンブロットの発光強度を測定した。n=3。

## 引用文献

- [1] ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 2007; 35: 495-516.
- [2] PORTT L, NORMAN G, CLAPP C, GREENWOOD M and GREENWOOD M T. Anti-apoptosis and cell survival: a review. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1813: 238-259.
- [3] SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S and KUMAR S. Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death Differ* 2015; 22: 526-539.
- [4] WINSHIP P R and DRAGON A C. Identification of haemophilia B patients with mutations in the two calcium binding domains of factor IX: importance of a beta-OH Asp 64----Asn change. *Br J Haematol* 1991; 77: 102-109.
- [5] WOUTERS M A, RIGOUTSOS I, CHU C K, FENG L L, SPARROW D B, et al. Evolution of distinct EGF domains with specific functions. *Protein Sci* 2005; 14: 1091-1103.
- [6] STENFLO J, STENBERG Y and MURANYI A. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1477: 51-63.
- [7] KITANO H, HIDAI C, KAWANA M and KOKUBUN S. An epidermal growth factor-like repeat of Dell protein increases the efficiency of gene transfer in vitro. *Mol Biotechnol* 2008; 39: 179-185.
- [8] KITANO H, KOKUBUN S and HIDAI C. The extracellular matrix protein Dell induces apoptosis via its epidermal growth factor motif. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 393: 757-761.



- [9] KITANO H, MAMIYA A, ISHIKAWA T, KOKUBUN S and HIDAI C. Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. *Cell Biol Int* 2015; 39: 1162-1172.
- [10] HEIT J A, THORLAND E C, KETTERLING R P, LIND T J, DANIELS T M, et al. Germline mutations in Peruvian patients with hemophilia B: pattern of mutation in AmerIndians is similar to the putative endogenous germline pattern. *Hum Mutat* 1998; 11: 372-376.
- [11] GREEN P M, BENTLEY D R, MIBASHAN R S, NILSSON I M and GIANNELLI F. Molecular pathology of haemophilia B. *EMBO J* 1989; 8: 1067-1072.
- [12] OWENS T W, VALENTIJN A J, UPTON J P, KEEBLE J, ZHANG L, et al. Apoptosis commitment and activation of mitochondrial Bax during anoikis is regulated by p38MAPK. *Cell Death Differ* 2009; 16: 1551-1562.
- [13] CHWA M, ATILANO S R, REDDY V, JORDAN N, KIM D W, et al. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47: 1902-1910.
- [14] FRISCH S M and RUOSLAHTI E. Integrins and anoikis. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9: 701-706.
- [15] PAOLI P, GIANNONI E and CHIARUGI P. Anoikis molecular pathways and its role in cancer progression. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1833: 3481-3498.
- [16] BORUTAITE V, JEKABSONE A, MORKUNIENE R and BROWN G C. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome c release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 2003; 35: 357-366.

- [17] TAKEISHI A, KURANAGA E, TONOKI A, MISAKI K, YONEMURA S, et al. Homeostatic epithelial renewal in the gut is required for dampening a fatal systemic wound response in *Drosophila*. *Cell Rep* 2013; 3: 919-930.
- [18] ROSADO J A, LOPEZ J J, GOMEZ-ARTETA E, REDONDO P C, SALIDO G M, et al. Early caspase-3 activation independent of apoptosis is required for cellular function. *J Cell Physiol* 2006; 209: 142-152.
- [19] CHERA S, GHILA L, DOBRETZ K, WENGER Y, BAUER C, et al. Apoptotic cells provide an unexpected source of Wnt3 signaling to drive hydra head regeneration. *Dev Cell* 2009; 17: 279-289.
- [20] GALLIOT B. Injury-induced asymmetric cell death as a driving force for head regeneration in *Hydra*. *Dev Genes Evol* 2013; 223: 39-52.
- [21] TSENG A S, ADAMS D S, QIU D, KOUSTUBHAN P and LEVIN M. Apoptosis is required during early stages of tail regeneration in *Xenopus laevis*. *Dev Biol* 2007; 301: 62-69.
- [22] OKUYAMA R, NGUYEN B C, TALORA C, OGAWA E, TOMMASI DI VIGNANO A, et al. High commitment of embryonic keratinocytes to terminal differentiation through a Notch1-caspase 3 regulatory mechanism. *Dev Cell* 2004; 6: 551-562.
- [23] LI F, HUANG Q, CHEN J, PENG Y, ROOP D R, et al. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Sci Signal* 2010; 3: ra13.