

血液凝固第IX因子の EGF-1 ドメインはトロンビンの
血管内皮細胞への効果を増強する (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

田村 恵理

修了年 2019 年

指導教員 國分 眞一郎

緒言

受傷時に出血を止めることは生体にとって最優先課題であり、その反応は迅速に行われなくてはならない。組織因子と血液凝固第 VII 因子 (FVII) の結合から始まる血液凝固反応は、ビタミン K 依存性のタンパク分解酵素である血液凝固第 II、VII、IX、X 因子 (FII、FVII、FIX、FX) と、それらの酵素活性を増幅させる因子によって進められる。タンパク分解酵素による反応カスケードでは、一分子のタンパクが多分子の基質タンパクを活性化できるため、反応は増幅される。このような増幅機構が、血液凝固反応の速度や強度を可能にしている [1]。

血液凝固関連因子は血液凝固反応に関与するだけでなく、細胞への効果も示す。例えば、FIIa が血小板を活性化することは古くから知られていたが、近年ではそれ以外の細胞への機能が報告されている [2]。FIIa は血管内皮細胞をはじめとする接着細胞にも働き、動脈硬化症、アルツハイマーなどの神経変性疾患、がん、気管支喘息、造血、腎機能、皮膚のバリア機能障害などに関与する [3-5]。FIIa の主な受容体は PAR1 という G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、FIIa は PAR1 を介して Rho-ROCK (Rho-associated protein kinase) 系シグナル伝達経路を活性化することが知られている。

我々の研究室では、血液凝固因子の一つである FIX の上皮成長因子

(epidermal growth factor ; EGF) ドメインについて研究してきた。FIX 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。FIX の軽鎖には、二つの EGF ドメインがある。EGF ドメインは EGF 様モチーフを有するドメインで、6 個のシステイン残基の配列に特徴がある約 40 個のアミノ酸から構成され、数百種類のタンパクに共有されている [6-9]。EGF 様モチーフの約 25% がカルシウム結合性であり、その多くが CX(D/N)XXXX(F/Y)XCXC のアミノ酸配列を有している。

Kitano らは CX(D/N)XXXX(F/Y)XCXC のアミノ酸配列で定義される EGF 様モチーフのサブファミリーとして CXDXXXXYXCXC のアミノ酸配列を提案した [10]。FIX の第一成長因子 (EGF-1) ドメイン (以下、EGF-FIX) は、このアミノ酸配列に該当する。このモチーフは、他に、FVII、FX のビタミン K 依存性血液凝固因子や細胞外基質タンパク Del1 などに共有されている [9、11]。

CXDXXXXYXCXC 配列を持つ EGF 様ドメインには機能的な特徴がある。EGF-FIX や Del1 の EGF ドメインでは、細胞遊走の亢進、エンドサイトーシス依存性の遺伝子導入効率の改善、細胞膜上の脂質ラフトのクラスター化を起こす作用が確認されている [10、12、13]。エンドサイトーシスは、液性因子とその膜受容体によるシグナル伝達において重要な役割を果たしている [14]。また、脂質ラフトは、特殊な構成の脂質からなる細胞膜の構造で、多くの膜受容体が集

中している [14]。エンドサイトーシスと脂質ラフトは、いずれも膜受容体を介するシグナル伝達の制御に関わっているため、EGF-FIX は他の液性因子のシグナル伝達に影響する可能性がある。

我々は、EGF-FIX が液性因子のシグナル伝達に影響するならば、FIIa など、他の凝固関連因子の細胞への作用を増強するのではないかと仮説を立てた。血液凝固反応が増幅系であるように、血液凝固因子の細胞への機能も増幅系である可能性がある。本研究では培養血管内皮細胞を用いて EGF-FIX が FIIa のシグナル伝達系に及ぼす影響について検討し、凝固系タンパクの接着細胞への作用機序を解明する。

方法

RT-PCR により EGF-FIX をコードする配列を増幅し、発現ベクターである AP-tag4 ベクターに挿入した。作成したプラスミドを Chinese Hamster Ovary (CHO) 細胞に導入してアルカリフォスファターゼ・タグ付きの組み換えタンパクを作製し、実験に用いた。コントロールとなる組み換えタンパクの作成には、何も挿入しない AP-tag4 ベクターを用いた。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養液中に最終濃度が 1 pM になるように EGF-FIX を添加し、細胞染色やウエスタンブロットを用いて EGF-FIX のシグナル伝達を評価した。さらに、

Wound Healing Assay を行い、細胞遊走における EGF-FIX の効果について検討した。

結果

まず、EGF-FIXが HUVEC のアクチン線維に及ぼす影響について検討するために、HUVEC に EGF-FIXを加え、アクチン線維を染色した。EGF-FIXの添加により、Rho-ROCK 系の情報伝達系の亢進を示唆するストレス・ファイバーなどの直線的で太いアクチン線維が増加した。ROCK 阻害剤の添加により、これらの表現型は消失した。

次に、細胞内での ROCK 活性について検討するため、ROCK によりリン酸化される代表的な基質である myosin light chain (MLC) や、リン酸化された MLC (p-MLC) のタンパク量をウエスタンブロットで検出した。EGF-FIXの添加により、p-MLC はコントロールの平均 1.4 倍増加し、Y-27632 の添加により、この反応は抑制された。これらの結果より、EGF-FIXにより Rho-ROCK 系が活性化され、アクチン線維の配列が変わることが判明した。

この Rho-ROCK 系の亢進が EGF-FIXによって起されるのか、それとも EGF-FIXは培養液中に含まれる他の物質による反応を増強するのか検討した。添加物も血清も含まない培養液 (DMEM) を使用して実験を行った。その結果、EGF-

FIXを加えても p-MLC の増加を認めなかった。このことより、EGF-FIX自体に ROCK 活性化の作用があるのではなく、EGF-FIXは他の液性因子の ROCK 活性化作用を強化すると考えられた。これ以降の実験では DMEM を使用した。

続いて、EGF-FIX が、Rho-ROCK 系を活性化させる代表的なリガンドである FII a の効果を増強するかどうか検討した。HUVEC に EGF-FIXと FII a 高濃度 (最終濃度 100ng/ml) を添加し、顕微鏡下で観察した。EGF-FIXを添加したところ、ストレス・ファイバーなどの直線状のアクチン線維が増加した。FII a では、その傾向が強くなり、Rho-ROCK 系の活性が亢進していると思われた。FII a と EGF-FIXを併用すると、FII a 添加時に見られるストレス・ファイバーの発達した細胞に交じり、ROCK の高度活性化を意味するブレブの形成が観察された [17]。ROCK 阻害剤の添加により、これらの表現型は消失した。このことより、EGF-FIXの併用により、FII a 刺激による ROCK 依存性の反応が強化されることが確認された。

さらに、EGF-FIXが細胞の FII a への感受性を上げる可能性について検討した。ウエスタンブロットにおいて、FII a 低濃度 (最終濃度 0.3ng/ml) では、p-MLC の量はコントロールと変わらないが、FII a と EGF-FIXを併用すると、コントロールの 1.4 倍、FII a の 1.3 倍に増加していた。また、PAR1 阻害剤 (SCH79797) 下では、FII a と EGF-FIX併用効果は完全に抑制された。また、

FIIa 低濃度におけるアクチン線維の染色では、低濃度の FIIa による刺激でストレス・ファイバーは目立たなかったが、FIIa と EGF-FIXの併用により細胞内にストレス・ファイバーが発達し高濃度の FIIa 刺激と同様の所見を示した。このことより、EGF-FIXは PAR1 を介して FIIa への感受性を上げると思われた。

次に、EGF-FIX の作用機序について検討した。PAR1 を介する FIIa のシグナル伝達は、PAR1 のエンドサイトーシスを必要とするため、EGF-FIXの FIIa シグナル伝達の増強は、EGF-FIXが PAR1 の受容体エンドサイトーシスを亢進させているのではないかと推察した。まず、エンドサイトーシスの指標として、初期エンドゾームのマーカである EEA1 に対する抗体と抗 PAR1 抗体を用いて免疫細胞化学染色を行った。コントロールと FIIa を添加した細胞では、PAR1 は主に核の周囲に分布したが、EGF-FIXや FIIa と EGF-FIXを併用した細胞では、PAR1 は細胞の辺縁の一部に集積して分布する傾向を示した。EEA1 と PAR1 の共存は、EGF-FIXを用いない細胞では核の周囲に、EGF-FIXを用いた細胞では細胞辺縁部の PAR1 に一致して観察された。PAR1 と EEA1 の共存を計測したところ、FIIa と EGF-FIXの併用により二つのタンパクの共存は 12.7%減少していた。

そこで、エンドサイトーシス後にリサイクル経路を辿るのではないかと考え、抗 PAR1 抗体とリサイクリング・エンドゾームのマーカである Rab11 の抗体

を用いて免疫細胞化学染色を行った。PAR1の一部はRab11と共存していたが、目視上は、共存の量的変化は認められなかった。コントロール、あるいはFIIaで刺激された細胞では、核の周囲で共存が観察された。EGF-FIX、あるいはFIIaとEGF-FIXを併用した細胞では細胞辺縁部のPAR1集積部で共存していた。

EGF-FIXのエンドサイトーシス量への効果を評価するため、EGF-FIX単独刺激によるEEA1とRab11の免疫染色の結果を解析したところ、EEA1もRab11も、免疫細胞化学染色での染色性が有意に減少していた。初期エンドゾームもリサイクリング・エンドゾームも減少していたことから、予想に反してクラスリン依存性エンドサイトーシスはEGF-FIXにより抑制される可能性が示唆された。これらの結果から、仮説とは異なり、PAR1のシグナル増強の理由はエンドサイトーシスの亢進ではないと考えた。

上述のように、FIIaとEGF-FIXで刺激された細胞で、PAR1が細胞の一端に集塊を作っている様子が観察された。この結果は、EGF-FIXにより、細胞に水平方向の極性が出現した可能性を示唆している。Wound Healing Assayを行って遊走中の細胞を免疫染色したところ、細胞の尾部にPAR1が集中しており、エンドサイトーシス後のPAR1の分布が細胞遊走時の極性に関係していると考えられた。

考察

受傷時には、組織の収縮や細胞の遊走が起きて止血や治癒が進む。本研究は、EGF-FIX が、培養内皮細胞への FIIa の効果を増強し、Rho-ROCK 系の活性を亢進させることを示した。Rho-ROCK 系は細胞の収縮や遊走に不可欠な系であり、凝固因子が創傷の治癒において協同的に働いている可能性が示唆された。また、FIIa は様々な疾患の発症や病態に関与すると報告されており、臨床的にも重要な知見と思われる。

結論

EGF-FIXは FIIa の作用を増強し、FIIa による Rho-ROCK 活性化を亢進させた。血液凝固因子は凝固反応のみならず、細胞への効果についても、増幅系の性質を有している可能性がある。

引用文献

- [1] Coughlin SR .Thrombin signalling and protease-activated receptors. Nature 407, 258-264. 2000.
- [2] Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. Cell 64, 1057-1068, 1991.
- [3] Martorell L, Martinez-Gonzalez J, Rodriguez C, Gentile M, Calvayrac O,et al. Thrombin and protease-activated receptors (PARs) in atherothrombosis. Thromb Haemost 99,305-315,2008.
- [4] Wojtukiewicz MZ, Hempel D, Sierko E, Tucker SC, Honn KV . Protease-activated receptors (PARs)--biology and role in cancer invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev 34, 775-796, 2015.
- [5] Isermann B.Homeostatic effects of coagulation proteasedependent signaling and protease activated receptors. J Thromb Haemost,15,1273-128, 2017.
- [6] Winship PR1, Dragon AC. 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. 77(1),102-9,1991.
- [7] Wouters MA1, Rigoutsos I, Chu CK, Feng LL, Sparrow DB, Dunwoodie SL. Evolution of distinct EGF domains with specific functions.Protein Sci ,4,1091-103,2005.
- [8] Stenflo J1, Stenberg Y, Muranyi A. Calcium-binding EGF-like modules in coagulation proteinases: function of the calcium ion in module interactions. Biochim Biophys Acta,1477(1-2),51-63,2000.

- [9] Hidai C. EGF-like domains with a C-x-D-x(4)-Y-x-C motif. *Open Access J Trans Med Res*,2,67–71,2018.
- [10] Kitano H, Hidai C, Kawana M, Kokubun S. An epidermal growth factor-like repeat of Dell1 protein increases the efficiency of gene transfer in vitro. *Mol Biotechnol*,3,179-85,2008.
- [11] Hidai C1, Zupancic T, Penta K, Mikhail A, Kawana M, Quertermous EE, Aoka Y, Fukagawa M, Matsui Y, Platika D, Auerbach R, Hogan BL, Snodgrass R, Quertermous T. Cloning and characterization of developmental endothelial locus-1: an embryonic endothelial cell protein that binds the alphavbeta3 integrin receptor. *Genes*,1,21-33,1998 .
- [12] Kitano H, Mamiya A, Tomomi I, Shinichiro K, Chiaki H. Coagulation factor IX regulates cell migration and adhesion in vitro. *Cell Biol Int*, 10,1162-72, 2015.
- [13] Hidai C, Fujiwara Y, Kokubun S, Kitano H. EGF domain of coagulation factor IX is conducive to exposure of phosphatidylserine. *Cell Biol Int*,4,374-383. 2017.
- [14] Marwali MR1, Rey-Ladino J, Dreolini L, Shaw D, Takei F. Membrane cholesterol regulates LFA-1 function and lipid raft heterogeneity. *Blood*, 102(1),215-22,2003.