

## 血管内皮細胞間接着を制御するシグナル伝達機構

福原 茂 朋,\* 望月 直 樹

## Signaling Mechanism Involved in Regulation of Endothelial Cell-Cell Junctions

Shigetomo FUKUHARA\* and Naoki MOCHIZUKI

Department of Cell Biology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute,  
5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan

(Received June 15, 2010)

Endothelial cells lining blood vessels are in tight contact with each other, thereby maintaining vascular integrity. Compromising vascular integrity leads to an increase in vascular permeability, which is associated with chronic inflammation, edema, and tumor angiogenesis. Vascular endothelial (VE)-cadherin is an endothelium-specific cell-cell adhesion molecule involved in endothelial barrier functions. We previously reported that cyclic AMP-elevating agonists such as prostaglandins and adrenomedullin potentiate VE-cadherin-dependent cell adhesion by inducing activation of Rap1 small GTPase through Epac. We further investigated the mechanism whereby Rap1 potentiates VE-cadherin-dependent cell adhesion, and found that Rap1 induces the formation of circumferential actin bundles along the cell-cell junctions. Although it has been believed that  $\alpha$ - $\beta$ -catenins anchor cadherin to the actin cytoskeleton to stabilize cadherin at cell-cell junctions (classical model), Nelson's and Weis' groups have recently suggested a new dynamic model in which  $\alpha$ - $\beta$ -catenins do not stably connect actin to cadherin. However, our study clearly indicated that the circumferential actin bundles anchor VE-cadherin to the cell-cell junctions through  $\alpha$ - $\beta$ -catenins. Thus Rap1 potentiates endothelial cell-cell junctions through the mechanism based on the static model.

**Key words**—endothelial permeability; vascular endothelial-cadherin; Rap1; actin;  $\alpha$ -catenin

## 1. はじめに

全身に張り巡らされた血管は、全身の臓器や筋肉に酸素や栄養を供給する重要な役割を担っている。血管の内腔面には、内皮細胞のシートが存在し、さらにその周囲を血管平滑筋細胞やペリサイトといった壁細胞が覆うことで、安定な血管構造が維持されている。内皮細胞間接着によって構築される内皮細胞シートは、血液成分が血管外へ漏れ出さないようなバリアとして機能している。通常、血管透過性はこのバリアによって非常に低い状態に保たれている。しかし、炎症の際に炎症細胞が血管外へ遊出するときや、血管新生が誘導されるときなどには、この血管バリア機能は一時的に弱まり、血管透過性が亢進する。<sup>1)</sup> このように血管のバリア機能は、非常にダイナミックに、しかし厳密に制御されており、

この制御機構の破綻は、敗血症、ネフローゼ、肺水腫、蕁麻疹、糖尿病性網膜症、がん、アレルギー性疾患（アトピー性皮膚炎、気管支喘息、アレルギー性鼻炎など）など様々な疾患の発症と密接に関連している (Fig. 1).<sup>1)</sup>

血管透過性を規定する内皮細胞間接着は、上皮細胞と同様にタイトジャンクション (TJ) とアドヘレンスジャンクション (AJ) の2つのタイプの接着装置により形成されている。<sup>2,3)</sup> AJを構成する接着分子 Vascular endothelial-cadherin (VE-cadherin) は、血管内皮細胞に特異的に発現し血管透過性制御

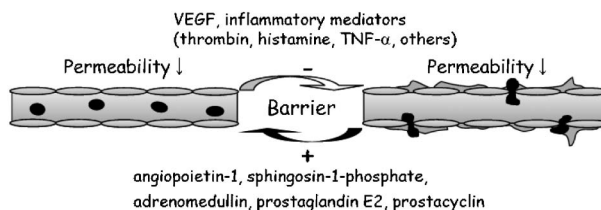
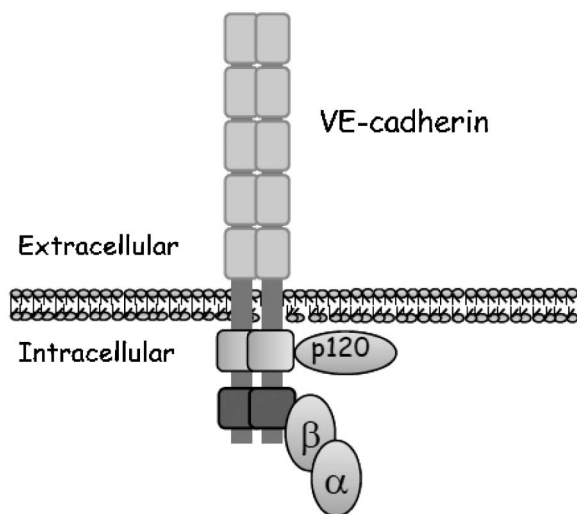


Fig. 1. Regulation of Endothelial Permeability by the Factors That Enhance or Decrease Endothelial Barrier Function

国立循環器病研究センター研究所細胞生物学部 (〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1)

\*e-mail: fuku@ri.ncvc.go.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S52 で発表したものを中心に記述したものである。



p120: p120-catenin,  $\beta$ :  $\beta$ -catenin,  $\alpha$ :  $\alpha$ -catenin

Fig. 2. Structure of VE-cadherin Adhesion Complexes

に係わる重要な接着分子である。VE-cadherin は、カルシウム存在下でシスのホモフィリック二量体を形成し、さらに隣り合う細胞のシス二量体とトランス結合することで、細胞間接着に貢献している (Fig. 2)。VE-cadherin の細胞外領域には、5つの cadherin ドメイン、細胞内領域には p120-catenin 及び  $\beta$ -catenin 結合ドメインが存在し、VE-cadherin に結合した  $\beta$ -catenin は、さらに  $\alpha$ -catenin と相互作用する。VE-cadherin 接着は様々なシグナルによって正・負の制御を受け、それにより内皮細胞間接着及び血管のバリア機能をダイナミックに制御している。<sup>2,3)</sup> 本総説では、血管透過性制御における VE-cadherin の役割を概説し、さらに VE-cadherin を介した内皮細胞間接着がどのような分子メカニズムで制御されているのか、われわれのこれまでの知見を含めて紹介する。

## 2. サイクリック AMP による VE-cadherin 接着の増強とそれによる血管透過性の低下

これまでに細胞内セカンドメッセンジャーであるサイクリック AMP (cAMP) の産生が、内皮細胞間接着を亢進し、血管透過性を低下させることが知られている。臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を、アデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin で刺激すると、basal 及び炎症性メディエータである Thrombin による血管透過性の亢進が優位に低下する。<sup>4)</sup> Forskolin 刺激と同様に、内皮細胞を adrenomedullin, prostaglandin E2, prostacyclin などの

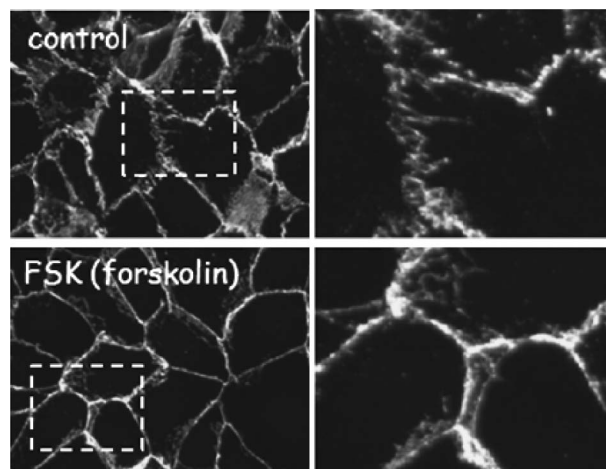


Fig. 3. Forskolin Induces Accumulation of VE-cadherin at Cell-Cell Junctions

HUVECs were stimulated with either vehicle (control) or forskolin for 30 min, and stained with anti-VE-cadherin antibody.

cAMP 産生活性を有する G タンパク質共役型受容体アゴニスト (GPCR) で処理すると、血管透過性の低下がみられる。また、adrenomedullin 欠損マウスは、内皮細胞間接着及び内皮細胞の細胞間マトリックスへの接着異常により、胎生致死になることから、cAMP による内皮細胞間接着制御が生体でも機能していることが示唆されている。<sup>5)</sup> そこでわれわれは、cAMP が血管透過性を低下させるメカニズムの解析を行った。まず、VE-cadherin 接着における cAMP シグナルの効果を検討したところ、コンフルエントの HUVEC において forskolin は VE-cadherin を細胞間接着部位に集積させることが分かった (Fig. 3)。また、VE-cadherin の細胞外領域とイムノグロブリン Fc の融合タンパク質を用いて VE-cadherin 接着活性を測定したところ、forskolin は VE-cadherin 接着を増強させることが分かった。以上の結果から、cAMP は VE-cadherin 接着を増強することで血管透過性を制御していることが示された。<sup>4)</sup>

cAMP は、protein kinase A (PKA) と Exchange factor directly activated by cAMP (Epac) の2つのエフェクターを介して下流にシグナルを伝達する。<sup>6)</sup> そこで、cAMP の血管透過性制御にどちらのシグナル分子が関与するのか検討した。HUVEC を、PKA 及び Epac をそれぞれ特異的に活性化する cAMP アナログ、N6-benzoyladenine-3',5'-cAMP (6-BnZ) 及び 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP (007) で刺

激したところ、007で刺激した細胞では、血管透過性の低下及びVE-cadherin接着の増強がみられたが、6-Bnzで刺激した細胞ではそのような効果はみられなかった。このことから、cAMPはEpacを介してVE-cadherin接着を増強することが示された。<sup>4)</sup>

Epacは、Rasファミリーに属する低分子量Gタンパク質、Rap1のグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)である。Rap1は、もともとRasのアンタゴニストとして同定されたが、その後integrin接着を増強する効果があることが報告されている。そこで、EpacはRap1を介してVE-cadherin接着を制御しているのか知るため、Rap1のGTP加水分解促進因子であるRap1GAPの効果を検討した。Rap1GAPを、アデノウイルスを用いてHUVECに発現させると、basalのRap1活性及びforskolinによるRap1活性の亢進がほぼ完全に抑制された。さらに、このような条件では、forskolinはVE-cadherin接着の増強及び血管透過性の低下を惹起しないことが分かった。さらに、Rap1の活性化型変異体をHUVECに発現させると、VE-cadherin接着の増強と血管透過性の低下が観察された。以上の結果から、cAMPはEpac-Rap1経路を介してVE-cadherin接着を増強し、それにより血管透過性を抑えていることが明らかとなった(Fig. 4)。<sup>3,4)</sup>

### 3. VE-cadherin 接着による Rap1 の活性化とそれによる VE-cadherin 接着の成熟化

われわれはさらに、VE-cadherin 接着における Rap1 の機能を詳細に理解するため、Rap1 が内皮細胞の“いつ・どこで”活性化されるのか検討し

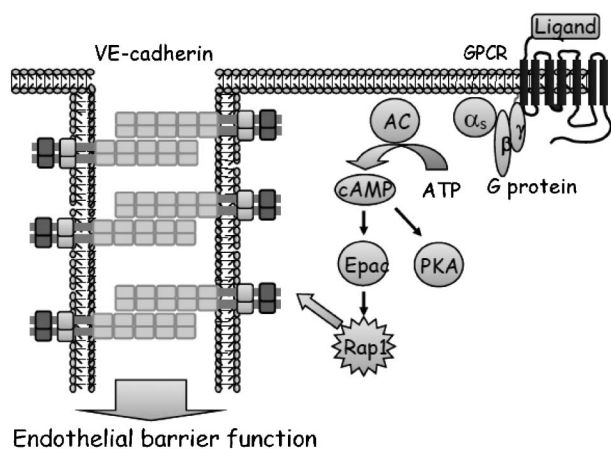


Fig. 4. The Mechanism Whereby Cyclic AMP Potentiates VE-cadherin-mediated Endothelial Cell-Cell Junctions

た。<sup>7)</sup> 具体的には、蛍光共鳴エネルギー移動の原理を基に開発された Rap1 活性を可視化するバイオセンサーを内皮細胞に発現させ、生きた内皮細胞における Rap1 活性をタイムラプスイメージングにより観察した。<sup>8)</sup> その結果、興味深いことに、内皮細胞間接着が形成される初期の接着部位で、Rap1 の活性が上昇することが分かった。<sup>7)</sup> さらに、この細胞間接着依存的な Rap1 の活性化は、EGTA による細胞外遊離カルシウムのキレート及び siRNA による VE-cadherin のノックダウンにより阻害されることが分かった。このことから、VE-cadherin 接着は細胞間接着部位で Rap1 の活性化を惹起することが示された。<sup>7)</sup>

次に、VE-cadherin 接着が細胞間接着部位で Rap1 の活性化を惹起する分子メカニズムの解析を行った。これまでに、上皮細胞においてアダプタータンパク質である MAGUK with inverted domain structure-1 (MAGI-1) が、 $\beta$ -catenin を介して E-cadherin 接着部位にリクルートされること、また MAGI-1 が、Rap1 の GEF である PDZ-GEF1 と相互作用することが知られている。<sup>9)</sup> そこで、VE-cadherin 接着による Rap1 活性化に MAGI-1 が関与するか検討した。まず、HUVEC における MAGI-1 の局在を調べたところ、MAGI-1 は  $\beta$ -catenin を介して VE-cadherin と相互作用し、それにより細胞間接着部位に局在することが分かった。MAGI-1 は 5 番目の PDZ ドメインを介して  $\beta$ -catenin と相互作用するが、この PDZ ドメインを過剰発現した HUVEC では、細胞間接着依存的な Rap1 の活性化がみられなかった。また、siRNA による MAGI-1 のノックダウンは、細胞間接着依存的な Rap1 の活性化を阻害した。以上の結果から、MAGI-1 は、 $\beta$ -catenin を介して VE-cadherin に結合することで PDZ-GEF を細胞間接着部位にリクルートし、それにより細胞間接着部位で Rap1 の活性化を惹起することが示された。<sup>7)</sup>

さらに、VE-cadherin 接着による Rap1 活性化の生理的な意義を解明するため、MAGI-1 のノックダウン実験を行った。Control 及び MAGI-1 の siRNA を導入した HUVEC に EGTA を添加し、VE-cadherin 接着を破壊した後、再度カルシウムを添加し、VE-cadherin 接着を再形成させたところ、MAGI-1 をノックダウンした細胞では、VE-cadhe-

rin 接着再形成の遅延が観察された。また、MAGI-1 をノックダウンした細胞では、integrin 接着はコントロール細胞と比べて変化がなかったのに対し、VE-cadherin の接着活性が優位に低下していた。以上の結果から、MAGI-1 による VE-cadherin 接着部位での Rap1 の活性化は、VE-cadherin 接着の成熟化に関与することが明らかとなった。<sup>7)</sup>

#### 4. Angiopoietin-1/Tie2 シグナルによる VE-cadherin 接着制御

Angiopoietin-1 (Ang1) は、血管内皮細胞に発現するチロシンキナーゼ型受容体 Tie2 を介して、血管構造の安定化と血管新生の相反する機能を制御している。<sup>10)</sup> 最近われわれは、Ang1/Tie2 シグナルがこれら相反する機能を制御するメカニズムについて解析し、Ang1/Tie2 シグナルは細胞間接着によって空間的・機能的に制御されていることを明らかにした。<sup>11-13)</sup> 細胞間接着を有する内皮細胞では、Ang1 は細胞間接着部位で Tie2 のトランス結合を形成し、血管安定化シグナルを選択的に活性化する。一方、細胞間接着非存在下では、Ang1 は細胞外基質に結合し、そこに Tie2 をアンカーすることで血管新生シグナルを活性化することが明らかとなった。

われわれは、さらに VE-cadherin 接着における Ang1/Tie2 シグナルの効果を検討したところ、Ang1 は VE-cadherin を細胞間接着部位に集積させるとともに、VE-cadherin 接着活性を増強することが分かった (Fig. 5)。またその結果として、Ang1 は、定常状態の血管透過性及び thrombin によって亢進した血管透過性を優位に低下させた。さらに、HUVEC において Ang1 は Rap1 を活性化すること、また Ang1 による VE-cadherin 接着の亢進、血管透過性の低下が Rap1GAP によって抑制されることが分かった (Fig.5)。以上の結果から、Ang1/Tie2 シグナルは Rap1 を介して VE-cadherin 接着を増強し、血管構造を安定化していることが示唆された (未発表)。

#### 5. Rap1 が VE-cadherin 接着を増強する分子メカニズム

これまでの実験から、Rap1 が VE-cadherin 接着の増強に重要であることが示されたので、われわれはさらにその分子メカニズムについて解析を行った。VE-cadherin 分子のダイナミズムを観察するため、VE-cadherin の C 末端に緑色蛍光タンパク質 (GFP)

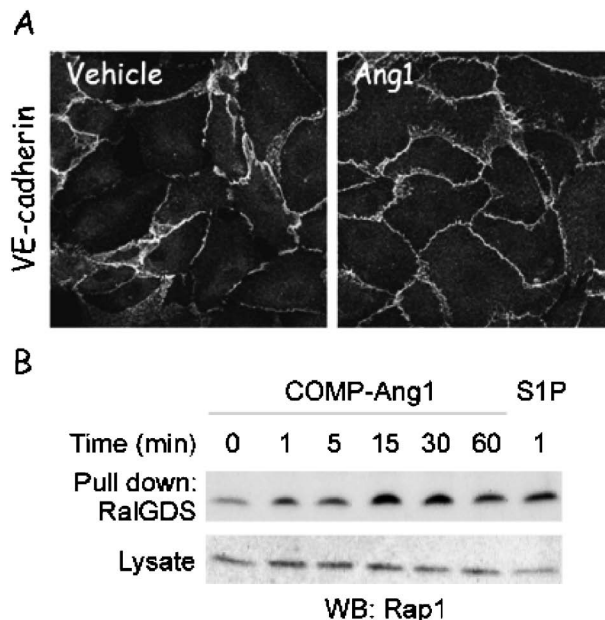


Fig. 5. Angiopoietin-1 Enhances VE-cadherin-dependent Cell Adhesion through Activation of Rap1

(A) HUVECs were stimulated with either vehicle or COMP-Ang1, a potent activator for Tie2 (Ang1), for 30 min. Then, the cells were stained with anti-VE-cadherin antibody. (B) HUVECs were stimulated with COMP-Ang1 or sphingosine-1 phosphate (S1P) for the indicated time period. Then, Rap1 activity in each cell lysate was measured by performing pull-down assay using RalGDS.

を融合した VEC-GFP をコードするプラスミドを作製した。このプラスミドを HUVEC に導入したところ、VEC-GFP は、内因性の VE-cadherin と同様に、細胞間接着部位でジッパー状の局在を示した。また、forskolin 刺激によって VEC-GFP は、細胞間接着部位に集積し、直線状の局在を示した。さらに共免疫沈降実験から、VEC-GFP は、 $\alpha$ -及び  $\beta$ -catenin と相互作用する能力を保持していることが分かった。これらの知見は、VEC-GFP が内因性の VE-cadherin と同じ挙動を示していることを示しており、VEC-GFP をイメージング解析すれば内因性の VE-cadherin のダイナミズムを知ることができると考えられる。

そこで、細胞間接着部位における“VE-cadherin 分子の動き易さ”を測定するため、VEC-GFP を発現した HUVEC を用いて、光退色後蛍光回復 (Fluorescence Recovery After Photobleaching: FRAP) 実験を行った。その結果、コンフルエントの HUVEC の細胞間接着部位には、可動性の高い VE-cadherin と可動性の非常に低い VE-cadherin が存在しており、それぞれ全体の 75% 及び 25% 存在する

ことが分かった。そこで、cAMP-Epac-Rap1 経路が細胞間接着部位における VE-cadherin の可動性に与える効果を検討したところ、forskolin あるいは 007 刺激によって可動性の VE-cadherin 量が約 55% まで低下し、6-BnZ 刺激では変化がみられなかった。<sup>14)</sup> この知見は、cAMP-Epac-Rap1 シグナルによって、細胞間接着部位で VE-cadherin が安定化することを示唆している。

AJ の形成と維持には、アクチン細胞骨格系が重要であることが知られている。そこで、Rap1 シグナルによる細胞間接着部位における VE-cadherin の安定化に、アクチン細胞骨格系が関与しているか検討した。まず、無刺激の HUVEC におけるアクチン細胞骨格系をファロイジン染色により観察したところ、細胞質に VE-cadherin 接着部位を起点としたストレスファイバーが多数存在することが分かった。興味深いことに、forskolin 刺激によって、この細胞質に局在するストレスファイバーがほぼ完全に消失し、逆に細胞間接着部位で直線状のアクチン線維の束が形成された。また、VE-cadherin 分子がこのアクチン線維の束に集積することが分かった。同様な効果は、007 刺激によっても観察できたが、6-BnZ 刺激ではみられなかった。さらに、この細胞間接着部位におけるアクチン束形成が、Rap1 による VE-cadherin の安定化に寄与しているか知るため、アクチン重合阻害剤である latrunculin A (LatA) の効果を調べた。その結果、Rap1 シグナルによる細胞間接着部位における VE-cadherin の安定化は、LatA によって阻害されることが分かった。以上の結果から、Rap1 シグナルは、細胞間接着部位でアクチン線維の束を形成することで、細胞間接着部位における VE-cadherin の安定性を向上させていることが示された。<sup>14)</sup>

それでは、アクチンは、どのようにして細胞間接着部位における VE-cadherin の安定性を亢進しているのだろうか。Cadherin の細胞内領域には  $\beta$ -catenin が結合し、さらに  $\beta$ -catenin は  $\alpha$ -catenin と結合する。 $\alpha$ -catenin は、直接あるいは間接的にアクチンと結合することから、Cadherin は、細胞間接着部位で Cadherin/ $\beta$ -catenin/ $\alpha$ -catenin/アクチンからなる複合体を形成し、これにより細胞間接着部位で安定化すると考えられてきた (このモデルを古典的モデルという)。しかし最近、Nelson 及び Weis ら

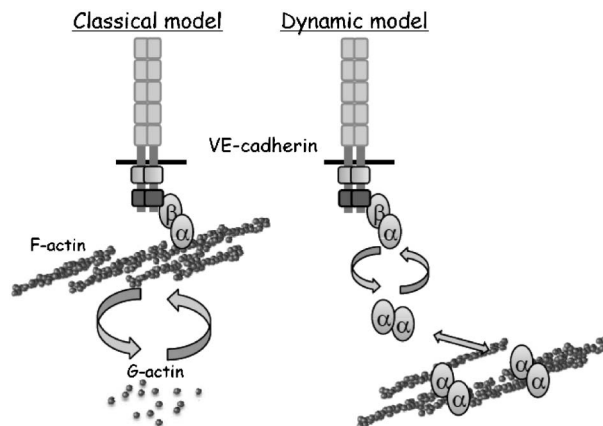


Fig. 6. Role of  $\alpha$ -Catenin in Cadherin-dependent Cell Adhesion

Left, classical model; Right, dynamic model.

のグループは、*in vitro* 実験系を用いて、 $\alpha$ -catenin が同時に Cadherin/ $\beta$ -catenin 複合体とアクチンに結合できないことを示し、古典的モデルを否定する論文を発表した (Fig. 6).<sup>15,16)</sup> 彼らは、 $\alpha$ -catenin の新たな役割としてダイナミックモデルを提唱している。古典的モデルと同様に、 $\alpha$ -catenin は、 $\beta$ -catenin を介して cadherin 接着部位にリクルートされるが、その後  $\beta$ -catenin から解離し、細胞間接着部位近傍でホモ二量体を形成する。ホモ二量体  $\alpha$ -catenin は、枝分かれ状のアクチン線維を作る Arp2/3 複合体を抑制し、逆に直線状のアクチン線維を束化することで、細胞間接着部位におけるアクチン細胞骨格系の再構成を惹起するというモデルである。そこで Rap1 が、古典的モデルとダイナミックモデルのどちらのモデルに基づいた機構を介して VE-cadherin 接着を安定化しているのか検討した。もし、Rap1 が古典的モデルに基づいた機構を介して VE-cadherin 接着を制御しているのであれば、 $\alpha$ -catenin 非存在下では、Rap1 は細胞間接着部位で VE-cadherin を安定化できない。逆に、ダイナミックモデルに依存しているのであれば、Rap1 は  $\alpha$ -catenin 非存在下では、細胞間接着部位でアクチン線維を形成できない。そこで、siRNA を用いて  $\alpha$ -catenin をノックダウンした HUVEC を forskolin で刺激したところ、control siRNA を導入した細胞と同様に細胞間接着部位でアクチン線維の束が形成された。同様に、VE-cadherin や  $\beta$ -catenin をノックダウンした細胞でも、forskolin 刺激は細胞間接着部位でアクチン線維の束を形成した。しかし、 $\alpha$ -catenin ノッ

クダウン細胞を forskolin で刺激しても, VE-cadherin は細胞間接着部位に集積できなかつた. これらの知見から, Rap1 は VE-cadherin 接着非依存的に細胞間接着部位でアクチン線維の束を形成し, それにより VE-cadherin 接着を細胞間接着部位で安定化していることが示唆された.<sup>14)</sup> すなわち, Rap1 は古典的モデルに基づいた機構を介して VE-cadherin 接着を制御していると考えられる.

上の仮説を検証するため, VEC-GFP の変異体を作製し, forskolin 刺激によるこれら分子の局在変化を蛍光免疫染色法により解析した. VEC-GFP は, forskolin 刺激によって細胞間接着部位で形成したアクチン線維の束と共局在したのに対し, VE-cadherin の細胞内領域を欠損した VEC $\Delta$ cyto-GFP 変異体や  $\beta$ -catenin 結合サイトを欠損した VEC $\Delta$  $\beta$ Cat-GFP 変異体は, アクチン線維に集積できなかつた. しかし, VE-cadherin の細胞内領域を  $\alpha$ -catenin に置換した VEC $\Delta$ cyto $\alpha$ Cat-GFP 変異体は, forskolin によって形成したアクチン線維の束に集積することができた. これら知見は, VE-cadherin は,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin を介してアクチン線維に結合していることを示唆している. さらに, これら変異体の細胞間接着部位における安定性を FRAP 解析により検討した. 上述したように VEC-GFP は, forskolin 刺激により細胞間接着部位で安定化したのに対し, VEC $\Delta$ cyto-GFP の接着部位における安定性は, forskolin 刺激によって全く影響を受けなかつた. しかし, VEC $\Delta$ cyto $\alpha$ Cat-GFP の細胞間接着部位における安定性は, forskolin 刺激によって優位に亢進した. 以上の結果から, Rap1 は細胞間接着部位でアクチン線維の束を形成し, VE-cadherin はそのアクチン線維に  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin を介して結合することで細胞間接着部位で安定化することが示唆された (Fig. 7).<sup>14)</sup>

VE-cadherin と同様に, platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM1) も血管内皮細胞に発現する細胞間接着分子である. しかし, VE-cadherin とは異なり PECAM1 は, 細胞内領域を介してアクチンに結合しない. そこで, アクチン線維への結合が VE-cadherin の接着部位での安定化に重要であることを確認するために, 細胞間接着部位における PECAM1 の安定性を FRAP 解析により検討した. PECAM1 の C 末端に GFP を融合した PECAM1-

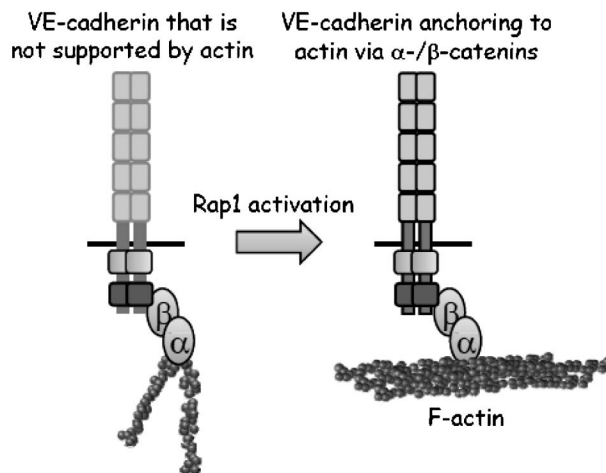


Fig. 7. The Mechanism Whereby Rap1 Stabilizes VE-cadherin-dependent Cell Adhesions

Rap1 signal induces formation of circumferential actin bundles along the cell-cell junctions, which anchor and stabilize VE-cadherin through  $\alpha$ - $\beta$ -catenins.

GFP を HUVEC に発現させたところ, PECAM1-GFP は forskolin 刺激によって形成したアクチン線維の束に集積できず, 細胞間接着部位でブロードに局在することが分かった. また, forskolin 刺激は細胞間接着部位における PECAM1-GFP の安定性を亢進しなかつた. しかし, PECAM1 の細胞内領域を  $\alpha$ -catenin に置換した PECAM1 $\Delta$ cyto $\alpha$ Cat-GFP 変異体, PECAM1 の細胞内領域を VE-cadherin の細胞内領域に置換した PECAM1 $\Delta$ cytoVECCyto 変異体は, 細胞間接着部位のアクチン線維に集積することができ, また, forskolin 刺激によって細胞間接着部位で安定化することが分かった. 以上の結果から, VE-cadherin 接着の安定化には,  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin を介したアクチン線維への結合が重要であることが証明された.<sup>14)</sup>

## 6. 生体内の血管バリア機能における Rap1 シグナルの役割

*In vitro* 実験系で観察された Rap1 による VE-cadherin 接着の亢進と血管透過性の抑制が, 生体内でも機能しているかどうか, Miles アッセイにより検討した. Evans Blue を静脈注射したマウスの皮膚に血管透過性亢進活性を有する vascular endothelial growth factor (VEGF) を投与すると, 血管内から Evans Blue の漏出が観察された. しかし, VEGF と同時に Epac の活性化剤である 007 を投与すると, VEGF による Evans Blue の漏出がほぼ完

全に抑制された。<sup>4)</sup> さらに, Miles アッセイの変法により, マウスの耳における血管透過性を測定した. Evans Blue を静脈注射し, 耳における Evans Blue の漏れ出しを測定したところ, コントロールマウスではほとんど Evans Blue の漏れ出がみられなかったが, 強力に血管透過性を亢進するマスタードオイルを耳に塗ると, Evans Blue の漏れ出が劇的に亢進した. しかし, 007 をあらかじめ静脈注射したマウスでは, マスタードオイルによる Evans Blue の漏れ出しがほぼ完全に抑制された (未発表). 以上の結果から, 生体内でも cAMP-Epac-Rap1 シグナル伝達経路の活性化は, VE-cadherin 接着を亢進することで, 血管透過性を低下させることが示唆された.

## 7. おわりに

本研究では, 血管内皮細胞間接着のダイナミズムを制御するメカニズムについて解析を行い, Rap1 低分子量 G タンパク質が VE-cadherin 接着の亢進に重要な働きを持つことを明らかにした. また, Rap1 が VE-cadherin 接着を増強するには, 細胞間接着部位におけるアクチン線維の束化が重要であり, VE-cadherin は  $\alpha$ -catenin,  $\beta$ -catenin を介してアクチン線維に結合することで, 細胞間接着部位で安定化することが分かった. さらに, この Rap1 による VE-cadherin 接着制御機構が, 生体内でも機能している可能性が示唆された.

現在のところ, Rap1 が細胞間接着部位でアクチン線維の束を形成するメカニズムは不明である. Rap1 のアクチン細胞骨格系制御メカニズムについては, いくつかの機構が示唆されている. しかし, どの機構が Rap1 による細胞間接着部位におけるアクチン線維の束化を制御するかについては解明されていない. 最近 Glading らは, Rap1 の結合因子である K-Rev interaction trapped gene-1 (KRIT-1) が, Rap1 による血管透過性の抑制に重要であることを報告した.<sup>17)</sup> 内皮細胞で Rap1 が活性化すると, KRIT-1 は細胞間接着部位に移動し, そこで VE-cadherin 接着構成タンパク質と相互作用することを示した. また, siRNA を用いて KRIT-1 のノックダウンを行うと, 細胞間接着部位におけるアクチン線維の束が消失し, 細胞質でアクチンストレスファイバーが形成されることを示した. これらの知見は, KRIT-1 が Rap1 による細胞間接着部位におけるアクチン線維の束化に関与することを示唆しており,

今後さらなる検討が期待される. また, Rap1 が低分子量 G タンパク質 Rac の GEF である Vav2 や Tiam1 と結合し, Rac の活性を制御することが報告されている.<sup>18)</sup> Rac は, Rho ファミリーメンバーに属し, アクチン細胞骨格系を制御することから, Rap1 が Rac を介して細胞間接着部位におけるアクチン線維の束化を制御している可能性が考えられる. さらに, ショウジョウバエにおいて AF-6 のホモログである canoe が, Rap1 の下流で E-cadherin を介したアドヘレンスジャンクションの形成を制御することが知られている.<sup>19,20)</sup> よって今後, 内皮細胞における Rap1 によるアクチン線維の束化に, AF-6 が関与するか検討していく必要がある. さらに, Rap1 がどのような機構で, アクチン線維の束化を細胞間接着部位に限局して誘導するのか明らかになっていない. われわれの研究から, Rap1 は VE-cadherin 接着非依存的に細胞間接着部位でアクチン線維の束化を惹起することが分かっている. したがって, VE-cadherin 以外の細胞間接着分子が, アクチン線維の束化を誘導する場所を規定しているのかもしれない. その候補として, nectin, claudin, JAM ファミリー分子などが考えられるが, 今後のさらなる検討が必要である.

内皮細胞間接着の破綻による血管透過性の亢進は, 様々な疾患の発症と密接に関連している. そこで, VE-cadherin 接着を増強し血管バリア機能を亢進するような薬剤が開発できれば, これら疾患を治療できるかもしれない. 今回われわれは, Epac の特異的な cAMP アナログである 007 が, *in vivo* における血管透過性を優位に低下させることを示した. したがって将来, 007 をリード化合物として, 血管バリア機能を亢進する薬剤を開発することができると期待される. 今後の研究が期待される場所である.

## REFERENCES

- 1) Dejana E., Tournier-Lasserre E., Weinstein B. M., *Dev. Cell*, **16**, 209–221 (2009).
- 2) Dejana E., Orsenigo F., Lampugnani M. G., *J. Cell Sci.*, **121**, 2115–2122 (2008).
- 3) Fukuhara S., Sakurai A., Yamagishi A., Sako K., Mochizuki N., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 132–139 (2006).
- 4) Fukuhara S., Sakurai A., Sano H., Yamagishi

- A., Somekawa S., Takakura N., Saito Y., Kangawa K., Mochizuki N., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 136–146 (2005).
- 5) Shindo T., Kurihara Y., Nishimatsu H., Moriyama N., Kakoki M., Wang Y., Imai Y., Ebihara A., Kuwaki T., Ju K. H., Minamino N., Kangawa K., Ishikawa T., Fukuda M., Akimoto Y., Kawakami H., Imai T., Morita H., Yazaki Y., Nagai R., Hirata Y., Kurihara H., *Circulation*, **104**, 1964–1971 (2001).
  - 6) Bos J. L., *Trends Biochem. Sci.*, **31**, 680–686 (2006).
  - 7) Sakurai A., Fukuhara S., Yamagishi A., Sako K., Kamioka Y., Masuda M., Nakaoka Y., Mochizuki N., *Mol. Biol. Cell*, **17**, 966–976 (2006).
  - 8) Mochizuki N., Yamashita S., Kurokawa K., Ohba Y., Nagai T., Miyawaki A., Matsuda M., *Nature*, **411**, 1065–1068 (2001).
  - 9) Kawajiri A., Itoh N., Fukata M., Nakagawa M., Yamaga M., Iwamatsu A., Kaibuchi K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **273**, 712–717 (2000).
  - 10) Fukuhara S., Sako K., Noda K., Nagao K., Miura K., Mochizuki N., *Exp. Mol. Med.*, **41**, 133–139 (2009).
  - 11) Fukuhara S., Sako K., Minami T., Noda K., Kim H. Z., Kodama T., Shibuya M., Takakura N., Koh G. Y., Mochizuki N., *Nat. Cell Biol.*, **10**, 513–526 (2008).
  - 12) Fukuhara S., Sako K., Noda K., Zhang J., Minami M., Mochizuki N., *Histol. Histopathol.*, **25**, 387–396 (2010).
  - 13) Sako K., Fukuhara S., Minami T., Hamakubo T., Song H., Kodama T., Fukamizu A., Gutkind J. S., Koh G. Y., Mochizuki N., *J. Biol. Chem.*, **284**, 5592–5601 (2009).
  - 14) Noda K., Zhang J., Fukuhara S., Kunimoto S., Yoshimura M., Mochizuki N., *Mol. Biol. Cell*, **21**, 584–596 (2010).
  - 15) Drees F., Pokutta S., Yamada S., Nelson W. J., Weis W. I., *Cell*, **123**, 903–915 (2005).
  - 16) Yamada S., Pokutta S., Drees F., Weis W. I., Nelson W. J., *Cell*, **123**, 889–901 (2005).
  - 17) Glading A., Han J., Stockton R. A., Ginsberg M. H., *J. Cell. Biol.*, **179**, 247–254 (2007).
  - 18) Arthur W. T., Quilliam L. A., Cooper J. A., *J. Cell. Biol.*, **167**, 111–122 (2004).
  - 19) Boettner B., Govek E. E., Cross J., Van Aelst L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9064–9069 (2000).
  - 20) Boettner B., Harjes P., Ishimaru S., Heke M., Fan H. Q., Qin Y., Van Aelst L., Gaul U., *Genetics*, **165**, 159–169 (2003).