

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15010

研究課題名(和文) 周生期母子生存に必須なPI3キナーゼの新規機能

研究課題名(英文) New mechanisms of perinatal cardiovascular regulation by class II PI3K

研究代表者

安藝 翔 (Aki, Sho)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80767210

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膜動現象の作動には形質膜や細胞内小器官膜の適所におけるグリセロリン脂質ホスホイノシタイド (PPI)の産生と分解が必要である。3'リン酸化PPI合成の律速酵素PI3KにはI-III型の3クラスが存在し、クラスII型酵素(PI3K-C2)は、受容体エンドサイトーシスとその後の細胞内受容体シグナリングに必須である。PI3K-C2、PI3K-C2の心筋、平滑筋特異的二重KOマウスを作製したところ、心筋特異的二重KOマウスにおいて新生仔は約半数が心不全により生後1～2日以内に死亡し、平滑筋特異的二重KOマウス母親は子宮平滑筋収縮異常による分娩障害を呈した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PI3Kは3つのクラスが存在し、I型PI3KはPI(3,4,5)P3を産生して細胞遊走や細胞増殖に関与し、III型PI3KはPI(3)Pを産生してオートファジーを制御する。一方II型PI3Kの機能は、申請者のグループがPI3K-C2 KOマウスを報告するまで不明であった。内皮細胞においてPI3K-C2は主としてPI(3,4)P2を産生し、受容体エンドサイトーシスに必須である。II型PI3Kは、I型・III型PI3Kとは異なる、独自の生命維持機能を担っている。II型PI3K機能の類似の研究はなく、周生期適応におけるII型PI3K機能の解明により、PIによる膜動現象制御の理解が進展する。

研究成果の概要(英文)：Class II phosphoinositide3-kinases (PI3Ks), PI3K-C2 and PI3K-C2, are highly homologous and distinct from class I and class III PI3Ks in catalytic products and domain structures. In contrast to class I and class III PI3Ks, physiological roles of class II PI3Ks are not fully understood. We studied the phenotypes of cardiomyocyte or smooth muscle-specific knock-out (KO) mice of PI3K-C2 and PI3K-C2. Cardiomyocyte specific PI3K-C2 and PI3K-C2 double KO(DKO) mice show heart failure due to collapse of the sarcomere structure and abnormally mitochondrial accumulation. In smooth muscle-specific KO mice show that the pup numbers from single PI3K-C2 KO and single PI3K-C2 KO mothers were similar to those of control, but those from double KO(DKO)mothers were smaller compared with control.

研究分野：生理学

キーワード：ホスホイノシタイド PI3キナーゼ エンドサイトーシス 循環調節 平滑筋収縮

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膜動現象の作動には形質膜や細胞内小胞器膜の適所におけるグリセロリン脂質ホスホイノシタイド (PPI)の産生と分解が必要である。3'リン酸化 PPI 合成の律速酵素 PI3K には I-III 型の 3 クラスが存在し、最も研究の進んでいる I 型 PI3K は  $PI(3,4,5)P_3$  を産生して細胞遊走や細胞増殖に関与し、III 型 PI3K-Vps34 は  $PI(3)P$  を産生してオートファジーを制御するなど、PI3-キナーゼ (PI3K)は生存に必須の脂質リン酸化酵素であり、癌、免疫、代謝の分野で活発に研究が展開されており、創薬研究の重要標的分子ともなっている。

申請者らは、PI3K のクラス II  $\alpha$  型酵素(PI3K-C2 $\alpha$ ) が、受容体エンドサイトーシスとその後の細胞内受容体シグナリングに必須であることを明らかにした(Nature Med 2012, J Biol Chem 2013, 2015)。PI3K-C2 $\alpha$  ホモノックアウト(KO)マウスが胎生致死であるのに対し、構造が近縁で酵素産物が同一の類縁酵素 PI3K-C2 $\beta$  のホモ KO マウスは正常であることから、両酵素には独自機能・重複機能両者の存在が示唆される。PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  の心筋、平滑筋特異的二重 KO マウスを作製したところ、新生仔は約半数が心不全により生後 1 ~ 2 日以内に死亡(未発表)し、母親は分娩障害を呈した。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、1) 新生仔の心筋リモデリング、2) 分娩時の子宮筋収縮における PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  の役割とその作用を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  の新生仔心筋リモデリングにおける役割の解明

Nkx2.5-Cre マウスを用い、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  遺伝子を心筋特異的に欠損させ、PI3K-C2 $\alpha$  及び PI3K-C2 $\beta$  の心筋における役割を明らかにする。

- 心臓リモデリング：生後 1 週間までにおこる心臓・大血管の構造変化(動脈管閉鎖、右室肥大の退縮と左室壁の発達)を組織学的に解析する。個々の心筋細胞サイズ(鍍銀染色)、心筋のアポトーシス(Tunel 染色)を評価する。
- 心エコー、心電図など：高解像度小動物用エコーイメージングシステム(Vevo2100)を用いて心室径、心室自由壁、中隔壁厚心筋収縮能を計測する。心電図により心臓興奮伝導の異常の有無を検討する。
- インビボオートファジー活性：PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  マウスを GFP-LC3 トランスジェニックマウス(オートファジーレポーターマウス)と交配し、心臓の部位特異的なオートファジーを経時的に評価する。
- 心筋細胞の微細形態：電子顕微鏡、 $Ca^{2+}$ チャネル(DHPR $\alpha$ )抗体で T 管や筋小胞体の形態、筋フィラメント抗体を用いた免疫染色によりサルコメア構造を検討する。
- 心筋細胞の  $Ca^{2+}$ シグナリング：単離心筋を用いて、生細胞イメージング法により  $Ca^{2+}$  蛍光指示薬で  $[Ca^{2+}]_i$  を測定する。

### ②平滑筋特異的二重 KO 母親マウスの分娩異常の解明

SM22-Cre マウスを用い、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  を平滑筋特異的に欠損させる。母親マウスが SM22-Cre トランスジーンを有する場合にのみ、分娩異常により産仔数が少なかった(胎児数には異常がなく分娩異常)。

- 子宮の形態：HE、アザン染色などの標準的な染色法、電子顕微鏡を用い、妊娠前及び妊娠日齢の進行に伴い変化する子宮内膜、平滑筋層の構造と各層を構成する細胞の微細形態を解析する。妊娠の進行に伴う平滑筋細胞の肥大・増殖・分化を鍍銀染色、平滑筋特異的ミオシン免疫染色で評価する。
- 子宮筋の収縮能と収縮シグナル：摘出子宮筋の自発収縮、オキシトシン誘発収縮、収縮シグナル経路(Rho-Rho キナーゼ-ミオシンホスファターゼ-ミオシン軽鎖リン酸化)を検討する。子宮平滑筋を培養し、FRET イメージング法により、単一平滑筋レベルでの Rho 活性化と細胞内 Rho 活性化部位を評価する。
- 子宮筋の遺伝子・タンパク発現：分娩時の子宮収縮に関与する生理活性因子受容体(オキシトシン、PGE2、PGF2 $\alpha$ )および L 型電位依存性  $Ca^{2+}$  イオンチャネルの妊娠の進行に伴うタンパク発現と遺伝子発現変化を検討する。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 心筋特異的二重 KO マウスの解析

Nkx2.5-Cre マウスを用い、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  を心筋特異的に欠損させ、心筋特異的 C2 $\alpha$ 、C2 $\beta$  二重 KO マウス(C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO)を作出した。C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスの表現系を解析したところ、新生仔は約半数生後 1 ~ 2 日以内に死亡(図 1)し、高解像度小動物用エコーイメージングシステムを用いた心エコー像から、C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスは生後直後に心不全を呈している事が明らかとなった。C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスの心臓及び単離心筋を、電子顕微鏡、Ca<sup>2+</sup>チャネル(DHPR $\alpha$ )抗体で T 管や筋小胞体の形態、筋フィラメント抗体、ミトコンドリア抗体を用いた免疫染色法により評価したところ、C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスでは異常なミトコンドリアの蓄積と心筋の筋節構造の崩壊が観察された(図 2)。コントロール及び C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスと GFP-LC3 トランスジェニックマウスを交配し、インビポオートファジー活性を観察したところ、C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -cmDKO マウスにおいてインビポオートファジー活性が低下しており、その結果ミトコンドリアの蓄積を生じる事が示唆された。

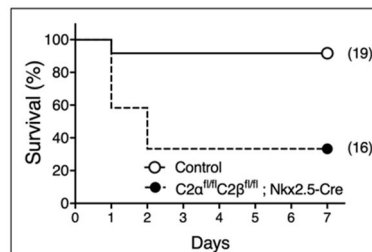


図1. PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$ 心筋特異的の二重KOマウス新生仔の約半数が生後1~2日以内に死亡する

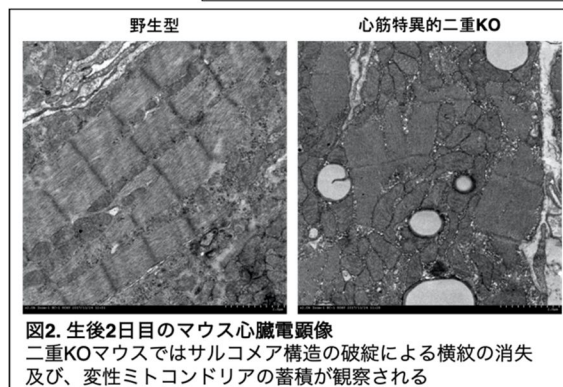


図2. 生後2日目のマウス心臓電顕像  
二重KOマウスではサルコメア構造の破綻による横紋の消失及び、変性ミトコンドリアの蓄積が観察される

#### 4-2. 平滑筋特異的の二重 KO マウスの解析

SM22-Cre マウスを用い、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$  を平滑筋特異的に欠損させ、平滑筋特異的 C2 $\alpha$ 、C2 $\beta$  二重 KO マウス(C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO)を作出した。C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO マウスの表現系を解析したところ、母親マウスが SM22-Cre トランスジーンを有する場合にのみ、分娩異常により産仔数が少なかった(胎児数には異常がなく分娩異常)(図 3)。C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO マウスの子宮を HE、アザン染色などの標準的な染色法を用いて、或いは子宮内膜や平滑筋層の構造など微細形態を観察したところ、正常マウスとの差異は見られなかった。また、C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO 母親マウスの子宮平滑筋を単離し、収縮能を観察したところ、自発収縮、オキシトシン誘発収縮が有意に低下した(図 4)。C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO マウスから単離した平滑筋細胞はオキシトシン刺激による細胞内 Ca<sup>2+</sup>濃度上昇はコントロールマウスと同程度観察されたが、20 kDa ミオシン軽鎖(MLC<sub>20</sub>)リン酸化を抑制し、これはミオシン脱リン酸化酵素の調節サブユニット MYPT1 の Rho キナーゼ依存的なリン酸化の低下を伴った。FRET 法により細胞内の Rho 活性化を可視化すると、オキシトシン刺激による細胞内の Rho 活性化は C2 $\alpha$ /C2 $\beta$ -smDKO マウスにおいて顕著に抑制された。以上から、PI3K-C2 $\alpha$  および PI3K-C2 $\beta$  は子宮平滑筋において代償的に作用し Rho 活性化を介して分娩時の子宮平滑筋収縮に必須の役割を果たす事が明らかとなった。

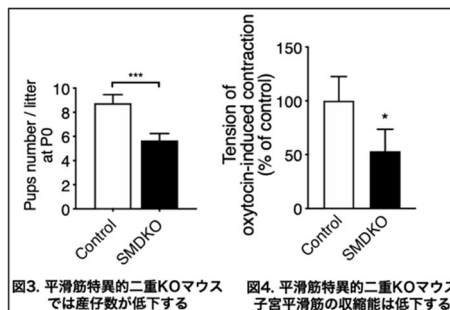


図3. 平滑筋特異的の二重KOマウスでは産仔数が低下する  
図4. 平滑筋特異的の二重KOマウス子宮平滑筋の収縮能は低下する

PI3K-C2 $\alpha$  と構造的に近縁の PI3K-C2 $\beta$  は共に全身に発現し、細胞内局在も類似している。しかし、PI3K-C2 $\alpha$  ホモ KO マウスが胎生致死であるのに対し、PI3K-C2 $\beta$  ホモ KO マウスは正常であることから、両酵素には独自機能、重複機能が存在する可能性がある。本研究課題より、新生仔が生直後に経験する胎児循環から出生後循環への循環適応と分娩時に最大となる子宮収縮能の獲得への PI3K-C2 $\alpha$  および PI3K-C2 $\beta$  の関与が示唆され、周産期の生命維持・適応機構の理解に新たなフレームワークを与える事が期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Aung, K.T., Yoshioka, K., Aki, S., Ishimaru, K., Takuwa, N., Takuwa, Y.	4. 巻 69(2)
2. 論文標題 The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 and PI3K-C2 differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 263-280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12576-018-0644-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sarker MAK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y.	4. 巻 160
2. 論文標題 Class II PI3Ks and Are Required for Rho-Dependent Uterine Smooth Muscle Contraction and Parturition in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology	6. 最初と最後の頁 235 ~ 248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1210/en.2018-00756	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Aki Sho, Yoshioka Kazuaki, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh	4. 巻 31(5)
2. 論文標題 TGF receptor endocytosis and Smad signaling require synaptojanin1?, PI3K-C2 ?, and INPP4B?mediated phosphoinositide conversions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 mbc.E19 ~ 11-0662
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E19-11-0662	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Islam Shahidul, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Ishimaru Kazuhiro, Yamada Hiroki, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh	4. 巻 70
2. 論文標題 Class II phosphatidylinositol 3-kinase and isoforms are required for vascular smooth muscle Rho activation, contraction and blood pressure regulation in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physiological Sciences	6. 最初と最後の頁 18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12576-020-00745-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Zhao J, Okamoto Y, Asano Y, Ishimaru K, Aki S, Yoshioka K, Takuwa N, Wada T, Inagaki Y, Takahashi C, Nishiuchi T, Takuwa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1371/journal.pone.0197604.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Pham HQ, Yoshioka K, Mohri H, Nakata H, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 MTMR4, a phosphoinositide-specific 3'-phosphatase, regulates TFEB activity and the endocytic and autophagic pathways.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1111/gtc.12609.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aung KT, Yoshioka K, Aki S, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 and PI3K-C2 differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 263-280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1007/s12576-018-0644-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sarker MAK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y.	4. 巻 1
2. 論文標題 Class II PI3Ks and Are Required for Rho-Dependent Uterine Smooth Muscle Contraction and Parturition in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Endocrinology.	6. 最初と最後の頁 235-248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1210/en.2018-00756.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa
2. 発表標題 Sequential phosphoinositide conversion is required for transforming growth factor $\beta$ -induced receptor endocytosis and Smad2/3 activation in endothelial cells
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, Hitotsubashi Hall (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuaki Yoshioka, Khin Thuzar Aung, Md Azadul Kabir Sarker, Sho Aki, Kuntal Biswas, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa
2. 発表標題 Differential roles of class II PI3K in endocytosis and endosomal signaling
3. 学会等名 60th International Conference on the Bioscience of Lipids, Hitotsubashi Hall (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藝 翔、吉岡和晃、多久和典子、多久和 陽
2. 発表標題 連続するホスホイノシタイド代謝がTGF 受容体エンドサイトーシス及びSmad2/3 活性化に必須である
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会、北海道大学（札幌）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡和晃、Quynh Hoa Pham、安藝 翔、多久和典子、多久和 陽
2. 発表標題 イノシトールリン脂質3' 脱リン酸化酵素MTMR4 による細胞内クリアランス制御メカニズム
3. 学会等名 第61回 日本脂質生化学会、北海道大学（札幌）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藝 翔
2. 発表標題 脂質リン酸化酵素クラスII型PI3キナーゼ による循環機能制御の新機構
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会(蓼科)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藝 翔、吉岡和晃、Islam Shahidul、多久和典子、多久和 陽
2. 発表標題 連続するホスホイノシタイド代謝がTGF 受容体エンドサイトーシス及びSmad2/3活性化に必須である
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会、横浜パシフィコ（横浜）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡和晃、Quynh Hoa Pham、安藝 翔、多久和典子、多久和 陽
2. 発表標題 細胞膜イノシトールリン脂質脱リン酸化酵素・MTMR4による細胞内クリアランスの制御
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会、横浜パシフィコ（横浜）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa
2. 発表標題 Sequential phosphoinositide conversion is required for TGF -induced receptor endocytosis and endosomal receptor signaling in endothelial cells
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会（大分・別府）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazuaki Yoshioka, Sho Aki, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa
2. 発表標題 Differential roles of class II PI3-kinase-C2 and -C2 in clathrinmediated fluid phase endocytosis in vascular endothelial cells
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会(大分・別府)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sho Aki
2. 発表標題 Sequential phosphoinositide conversion is required for transforming growth factor $\beta$ -induced receptor endocytosis and Smad2/3 activation in endothelial cells
3. 学会等名 FAOPS2019(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藝 翔
2. 発表標題 脂質リン酸化酵素II型PI3キナーゼによる循環機能制御の新機構
3. 学会等名 第5回血管生物若手研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----