

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460292

研究課題名(和文)血管内皮機能に必須なPI(3)P代謝酵素によるメンブレン・トラフィック制御

研究課題名(英文) Regulation of membrane trafficking through PI(3)P-metabolizing enzymes in endothelial cells.

研究代表者

吉岡 和晃 (Yoshioka, Kazuaki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80333368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室では、クラスII型PI3K-C2 KO マウスは胎生期の血管形成不全により胎生致死となり、C2 が胎生期血管形成及び生後の血管恒常性維持に必要であることを見いだしていた。本研究では、内皮におけるPI(3)Pレベル調節機構を解析するために、PI(3)P脂質脱リン酸化酵素(MTM)種を同定した。更にMTM-KOマウスを作出して表現型を解析した結果、ホモKOは出生直後24時間以内に全例死亡することを見出した。以上の結果から、内皮における脂質リン酸化酵素C2aと脱リン酸化酵素MTMは強調して働き、膜小胞上でPI(3)Pレベルを調節することによって、内皮の恒常性を維持していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) are the family of lipid kinases responsible for the generation of 3'-phosphoinositides. We have recently reported that class II α -isoform PI3K (C2a) plays a crucial role in developmental and pathological angiogenesis, and is indispensable for the maintenance of the VE-cadherin-mediated EC barrier function and receptor endocytosis. These defects result in impaired vascular homeostasis under the pathophysiological conditions. In this study, we found that among myotubularin-related protein (MTMR) family members, the expression of MTMRx is relatively abundant in ECs. We found that, in HUVECs, MTMRx was localized mainly in the endosomes. Next we analyzed the phenotype of MTMRx global KO mice. MTMRx mice showed normally development but die perinatally. We conclude that C2a regulates vascular homeostasis through controlling PI(3)P+membrane trafficking, cooperating with MTMRx in ECs.

研究分野：生理学

キーワード：PI3キナーゼ ホスフォイノシチド 血管内皮細胞 KOマウス 血管炎症 細胞内小胞輸送

1. 研究開始当初の背景

血管内腔表面は緊密に接着した内皮細胞によって隙間なく蔽われ、血漿成分の漏出や白血球の内皮下浸潤を防ぐバリアが形成されている。血管バリア機能の低下(血管透過性の亢進)は、動脈硬化や動脈瘤といった成人血管病の発症に関与する。血管バリア機能の強化は血管健全性の維持に有効であり、これら成人血管病の予防・治療につながる。

脂質リン酸化酵素であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ(PI3K)ファミリーはクラス I, II, III からなる。これまでの PI3K 研究は、癌、免疫、代謝調節におけるクラス I 型酵素 (p110 α など) の役割の研究が中心であり、クラス I 型 PI3K は創薬研究の重要標的分子となっている。またクラス III 型酵素 Vps34 はオートファジーにおける機能が重要視されている。一方、クラス II 型 PI3K (PI3K-C2 α , -C2 β , -C2 γ) の生理機能はほとんど不明であった。申請者らは、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) において PI3K-C2 α を RNA 干渉法により効率よくノックダウンすると、細胞間接着部位への細胞接着分子 VE カドヘリンの集積が障害され血管透過性が亢進することを見出した。これらの観察に基づいて、マウス個体レベルでの PI3K-C2 α の血管における生理的役割を明らかにするために、全身ノックアウト (KO) および血管内皮特異的コンディショナル KO (eCKO) マウスを作製した。興味深いことに、全身型 KO マウスは、血管内皮細胞の機能不全により血管新生が著しく障害され、胎生中期に致死であった。また、内皮特異的 PI3K-C2 α eCKO マウスも全身型 KO マウスと同様の表現型を呈し、やはり胎生致死であった。一方、ヘテロ (+/-) KO マウスは正常に発育・出生するものの、血管内皮のバリア機能が低下しており、実験的アナフィラキシーショックにおいて血漿漏出が著しく増悪し、血管障害性ペプチドアンギオテンシン II 投与に際して解離性大動脈瘤を高率に発症した。さらに、ApoE 欠損による粥状動脈硬化が悪化すること (未発表) も見出している。これらの結果より、血管内皮の PI3K-C2 α は血管新生に必須であるとともに、血管バリア機能の維持を介して血管健全性維持に重要な役割をはたすことが明らかになった (*Nature Med.* 2012)。

2. 研究の目的

PI3K-C2 α により産生された PI(3)P はホスファターゼによって脱リン酸化されて PI となる。細胞内の PI(3)P レベルは PI3K 活性とともにホスファターゼ活性によっても調節を受ける。したがって、PI(3)P ホスファターゼの同定と調節機構の解析は、血管内皮におけるメンブレン・トラフィック調節機構の解明に重要である。本研究課題では、

- 1) 細胞内の適所に局在して PI(3)P を分解することによりメンブレン・トラフィックを調節している PI(3)P ホスファターゼを同定し、その細胞内局在部位と作用点を明らかにする。このホスファターゼは PI3K-C2 α と協働してメンブレン・トラフィックを制御する。候補 PI(3)P ホスファターゼ分子として、ミオチューブラリン (MTMR) ファミリーの 14 種のホスファターゼを候補として考えた。
- 2) PI3K-C2 α と PI(3)P ホスファターゼ・MTMR による血管内皮細胞におけるメンブレン・トラフィックと細胞機能の調節を明らかにする。

- 3) 当該 PI(3)P ホスファターゼ MTMR の KO マウスを解析し、動物個体レベルでの表現型を解析する。

以上の項目を本研究課題の目的とした。

3. 研究の方法

3.1 PI(3)P ホスファターゼの同定と内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構の解析

本研究では、PI(3)P 特異的ホスファターゼ・ミオチューブラリン様タンパク質 (Myotubularin-related protein: MTMR) ファミリーの中で、PI3K-C2 α による PI(3)P レベルを特異的に負に調節している MTMR アイソフォームの同定を試みた。具体的には、ヒト血管内皮細胞モデル・HUVEC 細胞において発現する各 MTMR を RNA 干渉法により特異的にノックダウンし、下記に示す項目 a) - c) を検討した。siRNA 導入は、6-cm 径ディッシュ底面に占有率 70~80% まで増殖した HUVEC の培地を EBM-2 から Opti-MEM 培地 (Invitrogen 社) に置換し、Lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen 社) 5 μ l に混じた siRNA を添加 (培地中濃度 5 nM) した。4 時間後に培地を EBM-2 培地に置換した。siRNA のノックダウン効率は、PI3K-C2 α は抗 PI3K-C2 α 抗体を用いたウエスタンブロット法により、MTMR は定量的 PCR 法による mRNA レベルの測定により確認した。

- a) PI(3)P 特異的蛍光プローブ (GFP 標識 FYVE ドメイン) を用いた蛍光ライブイメージング解析
- b) 内皮細胞化学走化性因子・スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) に対する細胞遊走及び血管新生能評価
- c) 抗 VE カドヘリン抗体染色による内皮細胞間接着構造 (アドヘレンス結合) の解析

3.2 MTMRx 遺伝子 KO (全身型 MTMRx^{-/-}, コンディショナル型 MTMRx^{lox}) マウスにおける表現型解析

解剖学的所見 (光顕、免疫染色)、遺伝子発現プロファイル (DNA マイクロアレイ、定量的 PCR)、FACS による細胞構成の定量解析、生化学的解析 (ウエスタンブロット (WB) 法等) をもとに、MTMRx のマウス個体レベルでの生理的役割を検討した。

4. 研究成果

4.1 PI(3)P ホスファターゼ・MTMR 種の同定

MTMR ファミリー 14 種のうち、ホスファターゼ活性を有し、かつ HUVEC 細胞に発現している 8 種の MTMR アイソフォームの細胞内局在部位を GFP 法および免疫染色法により調べたところ、ある特定の MTMRx のみ細胞内局在部位が細胞内小胞上に限局していたことから、本研究ではその MTMRx に焦点を当てた。

4.2 内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構の解析

- a) PI3K-C2 α 及び MTMRx のノックダウンの細胞内 PI(3)P レベルとその局在に及ぼす効果を検討するために、特異的に PI(3)P に結合する FYVE ドメインと蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質 (GFP-2xFYVE) を HUVEC に発現させ、GFP 蛍光のライブイメージング観察を行った。コントロール (si-SC 処理) 細胞では、細胞辺縁部の

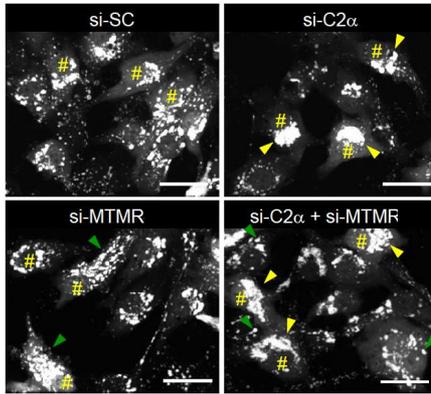


図1 PI3K-C2 α 、MTMRx をノックダウンした内皮細胞における PI(3)P 特異的蛍光プローブ・GFP-2xFYVE の蛍光イメージング観察

スクランブル配列 siRNA (si-SC)、PI3K-C2 α 特異的 siRNA (si-C2 α)、MTMR 特異的 siRNA (si-MTMRx) の各単独、あるいは si-C2 α および si-MTMRx の組合せで内皮細胞に導入し、GFP 蛍光イメージングを行った。

様々なサイズの GFP 蛍光陽性、すなわち PI(3)P 豊富なエンドソームと考えられる小胞が多数観察された(図 1 左上)。PI3K-C2 α ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ細胞辺縁部の GFP 陽性小胞が減少し、核周囲のより大きな GFP-2xFYVE タンパク質凝縮像(図 1 右上、黄色矢頭)が観察された。一方、si-MTMRx ノックダウン細胞では GFP 蛍光陽性小胞が逆に増加し、小胞のサイズも増大していた(図 1 左下、緑色矢頭)。si-C2 α と si-MTMRx を二重導入した細胞では、si-C2 α 単独導入細胞と比較して、細胞辺縁部に大きな小胞が増加した(図 1 右下、緑色矢頭)。しかし、この細胞辺縁部の小胞増加は si-MTMRx 単独導入細胞ほど顕著ではなかった。また si-C2 α 単独導入細胞と同様に、核周囲の GFP-2xFYVE 凝縮像が観察された(黄色矢頭)。

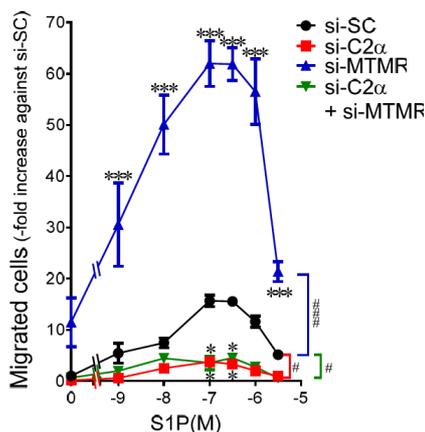


図2 PI3K-C2 α 、MTMR をノックダウンした HUVEC における S1P による化学遊走

各 siRNA を単独もしくは二重導入した HUVEC の細胞遊走 (遊走細胞数、S1P 存在下の遊走細胞数は、S1P が存在しない場合の値に対する比率として表示されている。)をポイデンチェンバーで測定した。下槽に種々の濃度の S1P を加えた。

b) コントロール細胞 (si-SC) の S1P に対する最

大遊走反応は 100 nM S1P 存在下で観察された(図 2)。PI3K-C2 α ノックダウン細胞の遊走反応は、当研究室のこれまでの結果と一致してコントロール群に比べ有意に低下した ($p < 0.05$, Two-way ANOVA)。MTMRx ノックダウン細胞の遊走反応は著しい亢進を示した(約 60 倍の増加、### $p < 0.001$, Two-way ANOVA, 図 2)。これに対して PI3K-C2 α 及び MTMRx 二重ノックダウン細胞では、PI3K-C2 α 単独ノックダウン細胞と同程度に細胞遊走が抑制された ($p < 0.05$, Two-way ANOVA, 図 2)。

c) コントロール HUVEC では、VE-カドヘリンの細胞間接着構造への集積が観察されるが、PI3K-C2 α ノックダウン細胞において VE-カドヘリン集積が減弱し、細胞間接着構造が障害された結果、細胞間に多くの間隙が形成された(図 3B)。MTMRx ノックダウン細胞においては、VE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積が傷害されたと共に、細胞内部に局在する VE-カドヘリンが増加していた(図 3C)。二重ノックダウン細胞では、各単独ノックダウン細胞で観察された VE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積障害が改善する傾向にあった(図 3D)。

4.3 MTMRxKO マウスの作出および表現型解析

MTMRx 遺伝子 KO マウスを作出して表現型を解析した。これまでの予備的検討では、全身性ホモ KO マウスは出生直後 24 時間以内に全例死亡し、肺胞壁と間質細胞過形成を伴う肺発達・成熟の異常による呼吸不全を呈することを見出した。

以上の結果から、内皮細胞における脂質リン酸化酵素・PI3K-C2 α と脱リン酸化酵素・MTMRx は強調して働き、細胞内膜小胞上で PI(3)P レベルを調節することによって、血管内皮細胞の恒常性を維持していることが強く示唆された。

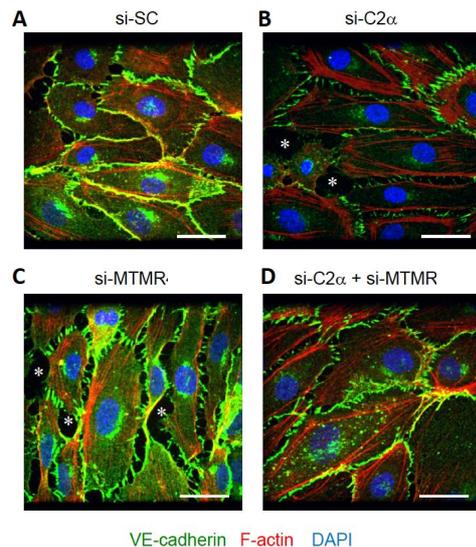


図3 PI3K-C2 α 、MTMRx をノックダウンした HUVEC における VE-カドヘリン免疫蛍光染色像

各 siRNA を単独もしくは二重導入した HUVEC をパラホルムアルデヒド固定後、VE-カドヘリン免疫染色(緑)およびアクチンフィラメント染色(赤)を行った。青: DAPI (核染色)、スケールバー: 20 μ m

本研究課題として取り組んだ *in vitro* 実験系においては、内皮細胞内膜小胞上で脂質リン酸化酵素・PI3K-C2 α により産生される PI(3)P を特異的に分解する脱リン酸化酵素・MTMRx を同定し、PI3K-C2 α -MTMRx 系による強制的 PI(3)P レベル調節システムの存在を見出した。今後、このPI(3)P レベル調節システムを標的とした全く新しい概念の血管内皮機能改善薬の開発に向けた開発プラットフォーム作り着手する道筋ができたことは、本研究課題の成果である。

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 3 件)

1. Mori M, Sakata K, Nakanishi C, Nakahashi T, Kawashiri M, Yoshioka K, Takuwa Y, Okada H, Yokawa J, Shimojima M, Yoshimuta T, Yoshida S, Yamagishi M, and Hayashi K, Early Endothelialization Associated with a Biolimus A9 Bioresorbable Polymer Stent in a Porcine Coronary Model. *Heart and Vessels* 査読有, *in press* (2017).
2. Serafimidis I, Rodriguez-Aznar E, Lesche M, Yoshioka K, Takuwa Y, Dahl A, Pan D and Gavalas A. Pancreas lineage allocation and specification are regulated by sphingosine-1-phosphate signalling. *PLoS Biol.* 査読有 **15**(3) e2000949 (2017). DOI:10.1371/journal.pbio.2000949
3. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y., Takuwa N. and Takuwa Y. Phosphatidylinositol 3-kinase class II α -Isoform PI3K-C2 α is required for transforming growth factor β -induced smad signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 査読有 **290**(10) 6086-6105 (2015). doi:10.1074/jbc.M114.601484.

[学会発表](計 10 件)

1. Khin TA, Aki S, Yoshioka K, Hoa QP, Azadul KS, Islam S, Takuwa N and Takuwa Y, “クラス II 型 PI3K-C2 α 及び PI3K-C2 β は血管内皮細胞におけるピノサイトーシスに必須である” 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28-30 日(浜松) (ポスター発表)
2. Hoa QP, Yoshioka K, Nakamura S, Azadul KS, Khin TA, Islam S, Aki S, Takuwa N and Takuwa Y, “イノシトールリン脂質特異的 3'-ホスファターゼ MTMRx はリソソーム機能・オートファジーを制御する” 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28-30 日(浜松) (ポスター発表)
3. Yoshioka K, Aki S., Takuwa N., Takuwa Y., “Endothelial Class II PI3K-C2 α is necessary for vascular formation and integrity through regulating endocytic membrane trafficking” 第 81 回日本循環器学会学術集会 シンポジウム

「血管内皮をとことん議論する」2017年3月18日(金沢市)(筆頭演者、招待講演)

4. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y, PI3K-C2 α is required for TGF β -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cell, 第 93 回日本生理学会 2016 年 3 月 22-24 日 札幌コンベンションセンター(札幌市)(シンポジウム:血管形成と分化を制御するシグナル機構)
5. Zhao JJ, Okamoto Y, Yoshioka K, Aki S, Hoa PQ, Azadul MD KS, Khin TA, Takuwa N, Inagaki Y, Takahashi C, Wada T, Takuwa Y, Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) inhibits lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and senescence in mice. BMB2015(第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会)2015 年 12 月 1 - 4 日 神戸ポートアイランド(神戸ポートピアホテル 神戸国際会議場 神戸国際展示場 神戸商工会議所)(兵庫県神戸市)(ポスター、口頭)
6. 安藝 翔、吉岡 和晃、岡本 安雄、多久和 典子、多久和 陽 クラス II PI3-キナーゼ PI3K-C2 α はエンドソーム上での TGF β /Smad2/3 シグナリングに必須である 第 62 回 中部日本生理学会 2015 年 11 月 13 日 - 14 日 富山大学 五福キャンパス 黒田講堂(富山県富山市)
7. Takuwa Y, Zhao JJ, Okamoto Y, Yoshioka K and Takuwa N. Role of S1P2 in inflammation and fibrosis 14 th International Conference on Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation, and Related Diseases Plenary Lecture 2015 年 7 月 12 - 15 日 Sofitel Chain Bridge Hotel (ハンガリー ブタペスト)(共同演者)
8. Okamoto Y, Cui H, Yoshioka K, Takuwa N, Takuwa Y, Sphingosine 1-phosphate receptor-2 plays a protective role against anaphylaxis and acute lung injury 第 10 回スフィンゴセラピー(STC)研究会 2015 年 6 月 16 - 18 日 ホテルアローレ(石川県)
9. 安藝 翔、吉岡 和晃、岡本 安雄、多久和 典子、多久和 陽 クラス II α 型 PI3K-C2 α はエンドソーム上での TGF β /Smad2/3 シグナリングに必須である 第 57 回 日本脂質生化学会 2015 年 5 月 28-29 日一橋大学一橋講堂(東京)
10. Okamoto Y, Cui H., Yoshioka K, Takuwa N., Aki S., Zhao JJ., Pham HQ., Sarker MdKS., Koizumi S., Yoh Takuwa. “Sphingosine 1-phosphate receptor-2 plays a protective role against lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury.” 第 92 回 日本生理学会大会 シンポジウム、2015 年 3 月 21-23 日(神戸)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 和晃 (YOSHIOKA, Kazuaki)
金沢大学・医薬保健研究域 医学系・助教
研究者番号：80333368

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

クンタル ビスワス (BISWAS, Kuntal)
安藝 翔 (AKI, Sho)
九田 裕一 (Kuda, Yuichi)
毛利 公美 (MOHRI, Hiromi)
清水 翔太 (SHIMIZU, Shouta)