

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：11401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860182

研究課題名(和文)非Edg型LPA受容体の胎生期血管形成における機能解析

研究課題名(英文)Roles of non-Edg family LPA receptors in embryonic vascular development

研究代表者

安田 大恭 (YASUDA, DAISUKE)

秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70594951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸(LPA)受容体の胎生期血管形成における重要性を明らかにする目的で、非Edg型LPA受容体の二重欠損マウスを作製・解析した。血管内皮細胞に発現しているLPA4とLPA6の二重欠損マウスは全て胎生11.5日までに胎生致死となった。胎生9.5-10.5日のLPA4/LPA6二重欠損マウスの卵黄嚢は血管形成が著しく不良であり、胎仔も頭部や体節間の血管形成不良と背部大動脈の拡張が認められるとともに心嚢浮腫を伴う異常な形態であった。

研究成果の概要(英文)：To reveal novel roles of LPA4 and LPA6 in embryonic blood vessel formation, LPA4-deficient mice were crossed with LPA6-deficient mice to generate the double mutants. Mouse embryos at different developmental stages were macroscopically observed. At embryonic day (E) 9.5-10.5, almost all of the LPA4/LPA6-double deficient mice had some morphological abnormalities, such as severe pericardial effusion, developmental delay, poor vascular network in head and intersomitic regions and enlarged dorsal aorta. Furthermore, the yolk sacs of LPA4/LPA6-double deficient lacked large vessels.. Of note, all double mutants died by E11.5.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Gタンパク質共役型受容体 リゾホスファチジン酸 血管形成

1. 研究開始当初の背景

LPAの受容体は現在までに6つのGタンパク質共役型受容体(GPCR)が報告され、その一次配列の相同性によりEdg型LPA受容体(LPA1, 2, 3)と非Edg型LPA受容体(LPA4, 5, 6)の2つに大別されている。1996年にLPA1が発見されて以降、Edg型LPA受容体欠損マウスの解析は広く進められ、近年、その表現型の報告からLPAの多彩な生理機能がつぎつぎと明らかにされてきた。一方、非Edg型LPA受容体については、我々の研究室でLPA4(Noguchi et al. *J. Biol. Chem.*, 2003)とLPA6(Yanagida et al. *J. Biol. Chem.*, 2009)をLPAによって活性化される新規GPCRとして同定しているが、LPA5を含めてその生理機能は未だ不明な点が多い。

以前に我々の研究室ではLPA4遺伝子欠損マウスを樹立・解析し、LPA4欠損マウスの約35%が胎生10.5日以降に血管形成異常のため死亡することを明らかにした(Sumida et al. *Blood*, 2010)。一方、各種LPA4関連分子の欠損マウスは同様の表現型により全て胎生致死となることが報告されている(図1)。例えばLPA産生酵素であるオートタキシン(ATX)の欠損マウス(Tanaka et al. *J. Biol. Chem.*, 2006)では、卵黄嚢や胎仔の血管形成に異常が観察され、胎生10.5日までに致死となる。また、血管内皮細胞(EC)特異的G₁₃欠損マウス(Ruppel et al. *PNAS*, 2005)やG₁₂ホモ/G₁₃ヘテロ二重欠損マウス(Gu et al. *PNAS*, 2002)、およびRhoの下流シグナル分子であるROCKIとROCKIIの二重欠損マウス(Kamijo et al. *Genes Cells*, 2011)は胎生8.5-11.5日において同様の表現型により胎生致死となることが報告されている。一方、LPA1、LPA2、LPA3の三重欠損マウスは胎生致死にならないことが報告されている(Ye et al. *Biol. Reprod.*, 2008)。このように、LPA受容体を介したシグナルはG_{12/13}-Rho-ROCKシグナルを活性化することで血管形成を制御していると考えられるが、その下流の分子機構の多くは未だ不明のままである(図1)。

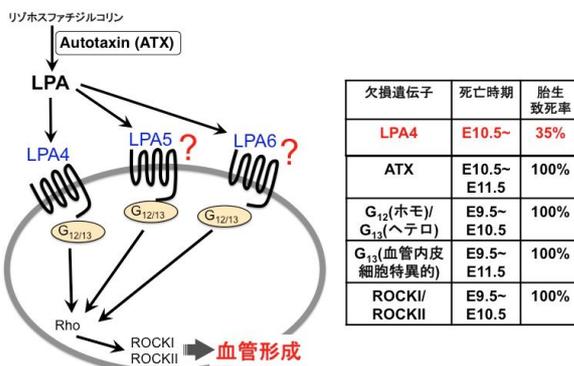


図1: LPA4欠損マウスは約35%が胎生致死となるが、他のLPAシグナルに関連する遺伝子欠損マウスは血管形成異常により全て胎生10.5日前後で致死になる

2. 研究の目的

LPA6は以前よりヒト貧毛症の原因遺伝子として注目され、精力的に研究が進められて

きた。しかしながら、胎生期血管形成におけるLPA6の役割については未だ報告がなく、複数のLPA関連分子の血管形成における役割が明らかにされている中で、そのシグナル伝達の上流で寄与するLPA受容体の同定とその機能解明は重要な課題である。ところで、LPA5もLPA4やLPA6と同様に主にG_{12/13}に共役することから、胎生期の血管形成に重要な役割を果たす可能性がある。そこで本研究では、全ての非Edg型LPA受容体(LPA4、LPA5、LPA6)を研究対象とした胎生期の血管形成に寄与するLPA受容体の同定とそのLPA受容体を介した細胞内シグナル伝達機構の解明を目的とし、血管研究の進展と血管形成関連病態の治療につながる新たな知見の提供を目指す。

3. 研究の方法

(1) 出生におけるLPA5とLPA6の寄与

LPA5とLPA6が出生に重要であるかを調べる目的で、LPA4欠損LPA5ヘテロ欠損マウス、LPA4欠損LPA6ヘテロ欠損マウス、およびLPA6欠損LPA5ヘテロ欠損マウスのそれぞれどうしを交配させ、LPA4/LPA5二重欠損マウス、LPA4/LPA6二重欠損マウス、およびLPA5/LPA6二重欠損マウスがメンデル比に従い出生するかを確認した。遺伝子型は3-4週齢の尾から抽出したゲノムDNAを用いてPCRにより決定した。

(2) 胎生期の血管形成におけるLPA4とLPA6の重要性

LPA4/LPA6二重欠損マウスの胎仔における血管形成異常を実体顕微鏡下で観察した。具体的には、発達遅延、体軸の曲がりや心嚢浮腫、卵黄嚢における血管形成不全を検証した。生死は心臓の拍動を指標に確認した。また、PECAM-1抗体を用いたホールマウント染色により、胎仔頭部や体節間の血管形成や背部大動脈の拡張を観察した。卵黄嚢の断片をHE染色して中胚葉と内胚葉からなる膜構造の異常を観察した。遺伝子型は卵黄嚢または胎仔から抽出したゲノムDNAを用いてPCRにより決定した。

(3) LPA4とLPA6が制御する血管形成分子の探索

qPCR法により胎仔または卵黄嚢のmRNA発現量を定量し、発現変動の見られた血管形成関連遺伝子をリストアップした。さらにLPA4-, LPA6-, LPA4/LPA6-siRNAまたはcontrol-siRNA処理を施したヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をLPAで刺激した際の血管形成関連遺伝子のmRNA発現量を検証した。

4. 研究成果

(1) 胚発生における非Edg型LPA受容体の寄与

LPA6 単独欠損マウスはメンデル比に従い正常に出生し発育したが、LPA4/LPA6 二重欠損マウスは全てが胎生致死となった(図2)。LPA4 欠損 LPA6 ヘテロ欠損マウスや LPA4 ヘテロ欠損 LPA6 欠損マウスの出生率もメンデル比に従わずに低下した。

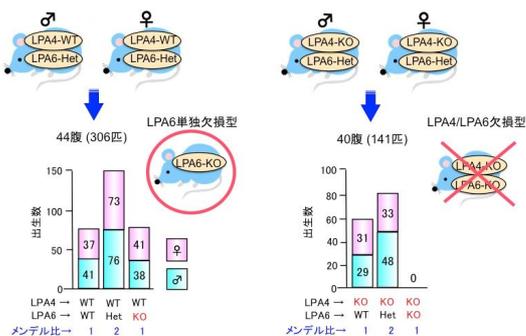


図2: LPA6単独欠損マウスは正常に出生し生育するが、LPA4/LPA6二重欠損マウスは出生しない

また、LPA4/LPA5 二重欠損マウスおよび LPA5/LPA6 二重欠損マウスはメンデル比に従い正常に出生し、発育した。この結果から、LPA5 の出生における寄与は少ないことが示唆された。

(2) LPA4/LPA6 二重欠損マウスの表現型

LPA4 と LPA6 の胎生期における機能を明らかにするために、LPA4/LPA6 二重欠損マウスの卵黄嚢と胎仔の形態異常を観察した。胎生 9.5 日から 10.5 日の LPA4/LPA6 二重欠損型胎仔は野生型胎仔に比べて未熟な形態で、胎生 11.5 日までに全て死亡した。胎生 9.5 日から 10.5 日の卵黄嚢を観察したところ LPA4/LPA6 二重欠損マウスの卵黄嚢は血管形成が著しく不良であり、その表面はオレンジピール様の形態であった(図3)。卵黄嚢の断片の HE 染色による観察から、卵黄嚢を構成する内胚葉と中胚葉が LPA4/LPA6 二重欠損型では野生型に比べて解離していた。しかし、その中に含まれる赤血球は同程度に存在していたことから、造血機能は維持されていることが示唆された(図3)。

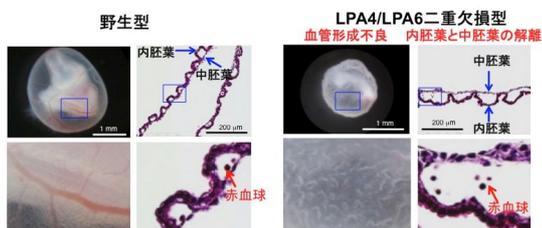


図3: LPA4/LPA6二重欠損マウスの卵黄嚢は血管形成不良で、その内胚葉と中胚葉は解離している

また、LPA4/LPA6 二重欠損型の多くの胎仔に著しい心嚢浮腫や体軸形成異常が見られた(図4)。

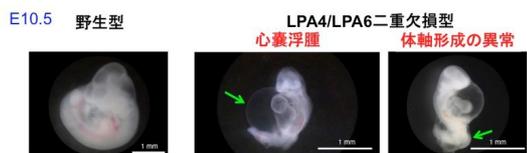


図4: LPA4/LPA6二重欠損マウスの胎仔は著しい心嚢浮腫と体軸形成の異常が観察される

さらに、血管マーカーPECAM-1 抗体を用いた胎仔ホルマウント染色の観察から、LPA4/LPA6 二重欠損マウスでは頭部や体節間の血管形成が不良で、背部大動脈は肥大していた(図5)。

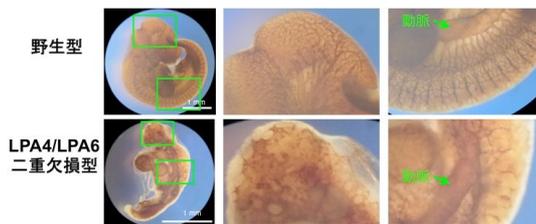


図5: LPA4/LPA6二重欠損型の胎仔は頭部や体節間の複雑な血管網が形成されず、背部大動脈が太い

また、胎仔頸部の環状断切片でも LPA4/LPA6 二重欠損マウスでは血管が拡張していることが観察された(図6)。

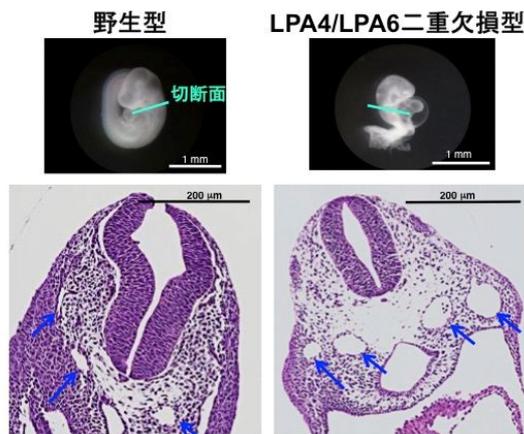


図6: LPA4/LPA6二重欠損型の胎仔は血管が拡張している

これらの LPA4/LPA6 二重欠損マウスの表現型は ATX や G₁₃、ROCKI/ROCKII の各欠損

マウスの表現型と類似していた。以上の結果から、LPA による胎生期の血管形成には LPA4 と LPA6 が重要であることが強く示唆された。

(3) LPA4 と LPA6 が発現制御する血管形成分子

LPA4/6 が制御する血管形成の分子機構解明のために HUVEC を用いた解析を行った。HUVEC には LPA6 が比較的高発現し、さらに LPA1 や LPA4 も発現していた。SRF-RE プロモーターを利用したルシフェラーゼレポーター遺伝子の結果から、HUVEC に発現している LPA4 と LPA6 が LPA 刺激により G_{12/13}-Rho/ROCK シグナルを活性化することが示された (図7)。

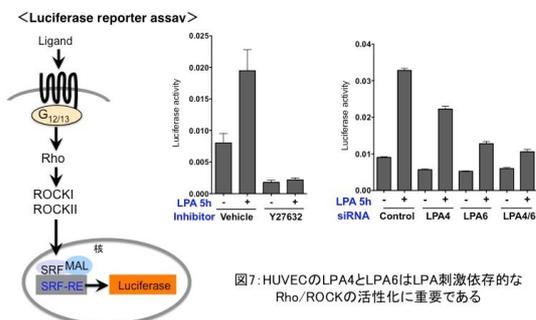


図7: HUVECのLPA4とLPA6はLPA刺激依存的なRho/ROCKの活性化に重要である

次に、LPA4 と LPA6 を介した LPA 刺激により発現変動する既知の血管形成制御遺伝子を HUVEC で検討したところ、一つの候補遺伝子 X が得られた。遺伝子 X は LPA4/LPA6 二重欠損マウスの胎仔や卵黄囊中の mRNA 発現解析からも重要な遺伝子であることが示唆され、さらに遺伝子 X の改変マウスの表現系は LPA4/LPA6 二重欠損マウスのものと類似している。今後は LPA4/6 の細胞内シグナル伝達経路の詳細な解析により、LPA による遺伝子 X の発現制御機構の解明を目指す。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計2件)

1) Igarashi, H., Akahoshi, N., Ohto-Nakanishi, T., Yasuda, D. and Ishii, S. “The lysophosphatidic acid receptor LPA4 regulates hematopoiesis-supporting activity of bone marrow stromal cells” *Sci. Rep.*, 5, 11410 (2015) 査読有
DOI: 10.1038/srep11410

2) Yasuda, D., Imura, Y., Ishii, S., Shimizu, T. and Nakamura, M. “The atypical N-glycosylation motif, Asn-Cys-Cys, in human GPR109A is required for normal cell surface expression and intracellular signaling” *FASEB J.*, 29, 2412-2422 (2015) 査読有
DOI: 10.1096/fj.14-267096

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 大恭 (YASUDA, Daisuke)

秋田大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70594951