

令和元年6月28日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08575

研究課題名(和文)血管形成の必須因子であるリゾホスファチジン酸の作用機序

研究課題名(英文)Lysophosphatidic acid receptors mediate novel angiogenesis mechanism

研究代表者

安田 大恭 (Yasuda, Daisuke)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70594951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：リゾホスファチジン酸受容体LPA4とLPA6が血管新生に果たす役割と、その分子機序の解明を目的に研究を行った。血管内皮細胞特異的LPA4/LPA6二重欠損マウスは、コントロールマウスと比較して新生仔網膜の血管新生が損なわれており、この異常はNotch阻害剤であるDAPT投与で改善した。また、LPA刺激により核内に移行したYAPは、Aktが促す $\beta$ -カテニンとNotch細胞内ドメインによるDLL4遺伝子発現を抑制した。以上の結果から、血管内皮細胞のLPA-LPA4/LPA6シグナルはYAP/TAZの核内移行を促し、DLL4遺伝子の発現を制御することにより正常な血管新生に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DLL4は悪性腫瘍などの血管関連病態の発症に密接に関わる原因遺伝子として注目されている。本研究により明らかにされた血管内皮細胞におけるLPA-LPA4/LPA6シグナルが促すYAP/TAZ活性化と、その新規DLL4発現制御の分子機構は、血管形成の基礎的理解の進展にとどまらず、加齢黄斑変性症や悪性腫瘍などの病態解明とLPA受容体を標的とした治療薬開発のための有用な情報提供が期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Lysophosphatidic acid (LPA)-G<sub>12/13</sub> signaling plays an important role in embryonic vascular development. However, the responsible LPA receptors and underlying mechanisms are poorly understood. Here, we show a critical role of LPA4 and LPA6 in developmental angiogenesis. In mice, Lpa4;Lpa6 double knockout (DKO) embryos were lethal due to global vascular deficiencies, and endothelial cell (EC)-specific Lpa4;Lpa6 DKO retinas had impaired sprouting angiogenesis. Mechanistically, LPA activated the transcriptional regulators YAP and TAZ through LPA4/LPA6-mediated G<sub>12/13</sub>-Rho-ROCK signaling in ECs. YAP/TAZ knockdown increased  $\beta$ -catenin- and Notch intracellular domain (NICD)-mediated endothelial expression of the Notch ligand delta-like 4 (DLL4). Overall, these results suggest that the G<sub>12/13</sub>-coupled receptors LPA4 and LPA6 synergistically regulate endothelial DLL4 expression through YAP/TAZ activation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：LPA GPCR 血管新生 YAP/TAZ DLL4 Notch

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

LPA 受容体は、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 3 割が胎生 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。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、卵黄嚢や胎仔自身の血管形成に異常が観察され、胎生 10.5 日まで致死となる。また、血管内皮細胞 (EC) 特異的  $G_{13}$  欠損マウス (Ruppel et al. *PNAS*, 2005) や  $G_{12}$  ホモ/ $G_{13}$  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 ROCK1 と ROCK2 の二重欠損マウス (Kamijo et al. *Genes to 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。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 (図 1)、その下流の分子機構の多くは未だ不明のまま残されている。特に、EC において  $G_{12/13}$  に共役して血管形成を制御する GPCR は未だ同定されていない。

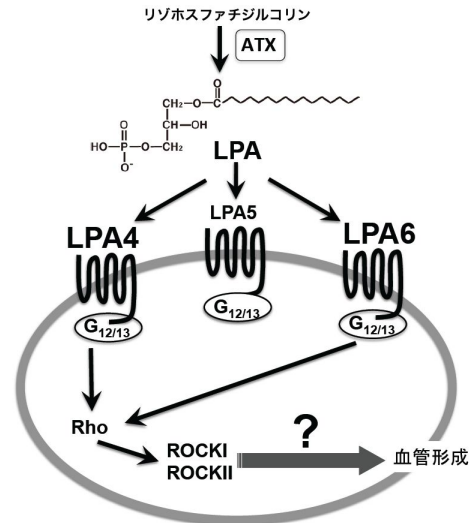


図1. LPA-非Edg型LPA受容体- $G_{12/13}$ シグナルと血管形成

これまで我々は、LPA4/LPA5 二重欠損マウスや LPA5/LPA6 二重欠損マウスは正常に出生し、生育するが、LPA4/LPA6 二重欠損マウスは胎生 9.5-11.5 日に心嚢液の貯留と血管形成不全を示し、LPA4 単独欠損マウスと異なり全てが胎生致死となることを明らかにした。これらの知見は、LPA6 が LPA4 と共に胎生期における血管形成に重要な役割を果たすことを強く示唆している。

既存の血管から新しい血管が形成される過程は血管新生と呼ばれる。出生後に生じる血管形成は既存の血管から血管分岐が発芽、伸長する発芽的血管新生 (sprouting angiogenesis) により誘導される。がんや慢性炎症性疾患などの病変部位では過剰な血管の増生が病態悪化の原因となっており、これらの疾病は血管異常症とも呼ばれ血管新生制御による病態改善を目的とした治療薬の開発が行なわれている。

### 2. 研究の目的

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 受容体の血管新生における役割とその新規の血管新生制御機構の解明は非常に重要な課題である。そこで我々は、EC に発現する LPA4 と LPA6 が、生体で sprouting angiogenesis に果たす役割を明らかにすること、およびそれらの LPA 受容体が細胞内において sprouting angiogenesis を制御する分子機構の解明を目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

#### 1) フィブリンゲルピース sprouting 解析

各種 siRNA を処理したヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を培養担体マイクロビーズ (Cytodex 3) と共に内皮細胞増殖培地に懸濁し、細胞非接着性の dish 上で一晚培養した。細胞に覆われたマイクロビーズを内皮細胞増殖培地で洗い、2 mg/ml フィブリノーゲン、0.15 U/ml アプロチニン、2% FBS 含有の内皮細胞増殖培地と混合した。さらに VEGF-A、DAPT および ROCK 阻害剤である Y27632 を添加し、24-well plate 上で 0.625 U/ml トロンピンと混合した。フィブリンゲル化した後 (1 時間後) に内皮細胞増殖培地を上層し、さらにマウス由来線維芽細胞である C3H10T1/2 を播種した。4-7 日間の培養後に個々のマイクロビーズからの sprouting の長さや数を観察し、Image J で定量化した。

#### 2) 新生仔網膜の血管新生解析

血管研究でよく知られる新生仔網膜の血管新生解析は、胎生致死となる遺伝子欠損マウスでは行えない。そこで、*Cdh5-PAC-Cre-ER<sup>T2</sup>* マウスと *Lpa4<sup>flox/flox</sup>* および *Lpa6<sup>flox/flox</sup>* マウスを交配させ、タモキシフェン投与と依存的かつ EC 特異的に LPA4/LPA6 を二重欠損するマウスを作製し、網膜の血管新生解析を進めた。具体的には、出生後 1-3 日目までの新生仔に 1 日 1 回タモキシフェンを投与して、EC 特異的に LPA4/LPA6 の欠損を誘導し、出生後 5 日目の網膜を固定して、isolectin B4 を用いて血管を特異的に染色させた。その新生血管における伸張の程度、血管分岐

数、ECの面積、血管先端細胞(Tip細胞)の数、filopodia(糸状仮足)の平均長と数を解析し、遺伝子欠損によりどのような違いがあるかを確かめた。さらにNotch阻害剤であるDAPTを出生後3日目、4日目に皮下投与することにより、遺伝子欠損により誘導された血管新生の異常が改善されるかを確かめた。

#### 4. 研究成果

##### 1) DLL4発現の解析

HUVECにLPAを刺激して発現変動する分子をスクリーニングしたところ、LPAが有意に発現を抑制する分子としてNotch受容体のリガンドで主要な血管新生制御分子であるDelta-like ligand 4(DLL4)を同定した。このLPAの効果は、LPA4/LPA6のsiRNAやRho阻害剤C3 transferase、ROCK阻害剤Y27632、およびアクチン重合阻害剤latrunculin Aの前処理により阻害された。また、ECにおいてLPAはLPA4/LPA6を介して転写共役因子であるYAP/TAZを脱リン酸化して核に移行させた。さらに、YAP/TAZのsiRNAやYAP阻害剤ivermectinもDLL4発現を顕著に増加させた。以上の結果から、LPAはECに発現するLPA4とLPA6を活性化して、三量体Gタンパク質G12/13、低分子量Gタンパク質Rho、ROCKの活性化とそれに引き続くアクチン重合と転写共役因子YAP/TAZの核局在を誘導し、その核内YAPがDLL4の発現を抑制することが示唆された。

##### 2) フィブリンゲルピース sprouting 解析

DLL4はsprouting angiogenesisの主要な制御因子として知られている。そこでin vitroでsprouting angiogenesisを評価する代表的な実験法であるフィブリンゲルピース sprouting 解析を行った。LPA4/LPA6、G12/13、YAP/TAZの各siRNA処理やY27632処理はsproutingの長さや数を有意に低下させた。それらの培地中にDAPTを共存させるとsproutingの長さや数は増加し、上記siRNAや阻害剤の効果は有意に抑制された。以上の結果から、LPA4/LPA6、G12/13、YAP/TAZはDLL4の過剰な発現を抑制することにより、ECのsproutingを亢進させることが示唆された。

##### 3) 新生仔網膜の血管新生解析

In vivoでsprouting angiogenesisにおけるLPA4/LPA6の役割を明らかにする目的で、新生仔網膜の血管新生解析を行った。EC特異的なLPA4/LPA6二重欠損マウス(*Lpa4;Lpa6<sup>ΔEC</sup>*)は、Controlマウスの網膜と比べて、新生血管における伸張の程度、血管分岐数、ECの面積、Tip細胞数、filopodiaの平均長と数が有意に低下した。さらに、*Lpa4;Lpa6<sup>ΔEC</sup>*の網膜の血管先端領域では、Cre陰性のControlマウスの網膜と比べてDll4発現が有意に増加し、YAPの核内移行が低下した。これらの異常はNotchシグナル阻害剤DAPTのP3とP4の皮内投与で改善した。以上の結果から、血管内皮細胞のLPA4とLPA6は新生仔網膜の血管新生に必須であり、血管先端領域のYAPの核内移行と正常なDll4発現に重要な役割を果たすことが示唆された。

##### 4) Aktリン酸化、β-cateninおよびNotch intracellular domain(NICD)の解析

YAP/TAZのDLL4発現制御の分子機構を明らかにする目的で、Aktリン酸化が促すβ-catenin/NICD複合体がDLL4発現を誘導する報告に着目した(Zhang et al. *J. Biol. Chem.*, 2011)(Shah et al. *Nat. Commun.*, 2017)。Vascular endothelial growth factor(VEGF)やangiopoietin-1(Ang-1)、fetal bovine serum(FBS)などの主要な血管制御因子でYAP/TAZのsiRNA処理HUVECを刺激したところ、Aktリン酸化の程度がControl siRNA処理細胞に比べて増加していた。さらに、β-cateninのsiRNAおよびAkt阻害剤であるMK2206、NICD産生阻害剤であるDAPTのそれぞれの前処理は、YAP/TAZのsiRNA処理によるDLL4発現の増加を顕著に抑制した。以上の結果から、ECのLPA-LPA4/LPA6シグナルはYAP/TAZの核内移行を

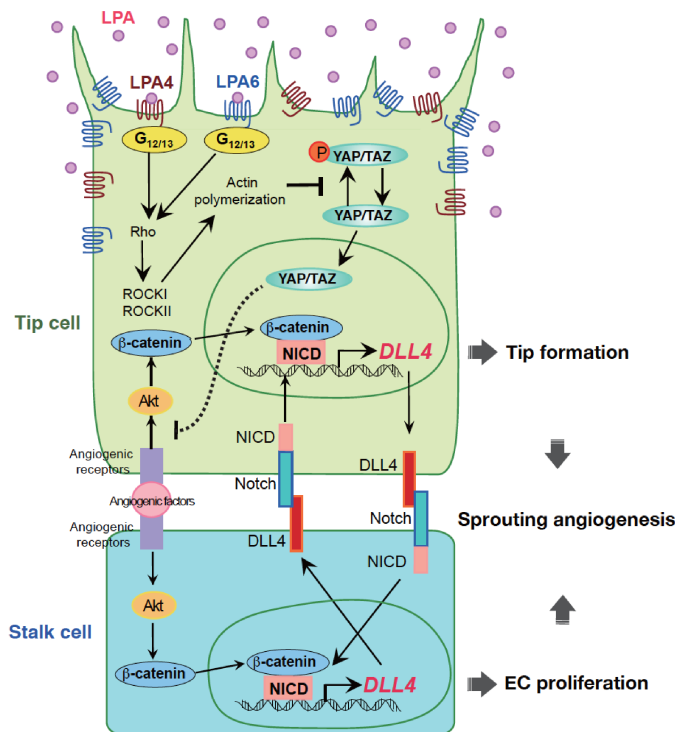


図2, LPA-LPA4/LPA6シグナルのYAPを介したDLL4発現制御機構

促し、Akt のリン酸化を抑えることにより、 $\beta$ -catenin と NICD が促す DLL4 遺伝子の発現を制御して正常な血管新生に寄与することが示唆された (図 2)。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件) 下記論文は全て査読有

1) Yanagida, K. Igarashi, H., Yasuda, D., Kobayashi, D., Ohto-Nakanishi, T., Akahoshi, N., Sekiba, A., Toyoda, T., Ishijima, T., Nakai, Y., Shojima, N., Kubota, N., Abe, K., Kadowaki, T., Ishii, S., and Shimizu, T. The  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -coupled receptor, LPA4 limits proper adipose tissue expansion and remodeling in diet-induced obesity. *JCI Insight*, 3:e97293. (2017)

2) Takara, K., Eino, D., Ando, K., Yasuda, D., Naito, H., Tsukada, Y., Iba, T., Wakabayashi, T., Muramatsu, F., Kidoya, H., Fukuhara, S., Mochizuki, N., Ishii, S., Kishima, H., and Takakura, N. Lysophosphatidic acid receptor 4 activation augments drug delivery in tumors by tightening endothelial cell-cell contact. *Cell Rep.*, 20, 2072–2086. (2017)

〔学会発表〕(計 6 件)

1) 安田大恭、石井聡 「G12/13 共役型リゾホスファチジン酸受容体が調節する血管新生の分子機構」2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017 年 12 月 (神戸)

2) 安田大恭、石井聡 「血管新生に働くリゾホスファチジン酸シグナルの分子機構」第 3 回生体調節研究所内分泌代謝シンポジウム 2017 年 11 月 (群馬)

3) Daisuke Yasuda and Satoshi Ishii ” $\text{G}\alpha_{12/13}$ -coupled LPA receptors mediate novel angiogenesis mechanism” FASEB Summer Research Conferences; Lysophospholipid and Related Mediators: From Bench to Clinic, August 2017 (New Orleans, Louisiana)

4) 安田大恭、石井聡 「血管形成を制御するリゾホスファチジン酸受容体」第 59 回 日本脂質生化学会 2017 年 6 月 (京都)

5) 安田大恭、石井聡 「リゾホスファチジン酸による血管新生調節機序」第 89 回 日本生化学会大会 2016 年 9 月 (仙台)

6) 安田大恭、石井聡 「リゾホスファチジン酸受容体の血管形成における役割」第 58 回 日本脂質生化学会 2016 年 6 月 (秋田)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.med.akita-u.ac.jp/~bougyo/Home.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。