

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04673

研究課題名(和文)細胞内脂質シグナル分子による小胞輸送制御を介した血管細胞機能の調節

研究課題名(英文) Regulation of vascular cell function through control of membrane traffic by cellular lipid signaling

研究代表者

多久和 陽 (Takuwa, Yoh)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60171592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：機能が未解明のクラスII型PI3-キナーゼ(PI3K)に属するPI3K-C2とPI3K-C2の機能と機能差異を二重KOマウスを作成して解析した。両酵素の組織特異的単独KOマウスは生存し表現型に異常はみられなかった。しかし、両酵素の2種類の組織特異的二重KOマウスは各組織の異常を示した。クラスII型PI3Kの産生するPI-3-Pを分解するホスファターゼPI3PaseのKOマウスを作成した。組織特異的ホモKOマウスは異常を示し、細胞内小胞輸送が障害された。さらに、スフィンゴ脂質代謝酵素スフィンゴシンキナーゼ(SphK)のKOマウスは血管病変の悪化を示し、小胞輸送の異常が見られた。

研究成果の概要(英文)：We studied the functions of class II phosphoinositide 3-kinase (PI3K) isoforms and their functional difference, by analyzing PI3K-C2<sup>-/-</sup> and PI3K-C2<sup>-/-</sup>PI3K-C2<sup>-/-</sup> knockout (KO) mice. Single KO mice of either gene apparently exhibited normal phenotypes whereas the PI3K-C2<sup>-/-</sup> / PI3K-C2<sup>-/-</sup> double KO mice showed abnormalities in two different tissues. We also generated KO mice of the degrading enzyme, PI3Pase, of the class II PI3K product PI-3-P. Tissue-specific homozygous KO mice of PI3Pase showed the similar phenotypes to global KO mice, and the analyses of PI3Pase-deficient cells demonstrated abnormalities in membrane traffic. Homozygous KO mice of sphingolipid metabolizing enzyme, sphingosine kinase, showed exacerbation of vascular lesions. This was mediated by impaired membrane traffic.

研究分野：生理学、細胞分子生理学、病態生理学、病態医化学

キーワード：イノシトールリン脂質 PI3-キナーゼ スフィンゴ脂質 スフィンゴシンキナーゼ 細胞内小胞輸送  
エンドソーム エンドサイトーシス シグナル伝達

## 1. 研究開始当初の背景

イノシトールリン脂質は、エンドサイトーシス、エキソサイトーシスなどのメンブレン・トラフィック (小胞輸送) に必須の役割を果たす。イノシトール環 3 位にリン酸基を有するホスファチジルイノシトール(PI)-3-リン酸(PI-3-P)は、クラス II 及び III の PI3K により産生され、メンブレン・トラフィックにおいて重要な機能を果たす。私たちは、3つのクラスから成る PI3K の中で機能が不明であったクラス II に属する PI3K-C2 $\alpha$ が血管平滑筋収縮に必要であることを発見し、PI3K-C2 $\alpha$ ノックアウト (KO) マウスを作成した。PI3K-C2 $\alpha$ <sup>-/-</sup>マウスは血管新生が障害され胎生致死であった。PI3K-C2 $\alpha$ は血管内皮細胞 (EC)の初期エンドソーム、クラスリン被覆小胞などに発現し、ノックダウンにより細胞内小器官膜の PI-3-P レベルの低下、細胞内小胞の数と運動の顕著な低下、VEGF 受容体エンドサイトーシスの低下とエンドソーム上での低分子量 G タンパク質シグナリングの障害が生じる結果、EC の遊走・細胞間接着・生存が損なわれた。産生された小胞膜 PI-3-P はホスファターゼ (PI3Pase) による脱リン酸化を受け、PI-3-P レベルは低下する。適正なタイミングで適正な部位で起こる PI-3-P の生成と分解は正常な小胞交通に必須である。応募者は PI3Pase の候補分子を網羅的にノックダウンすることにより、EC において小胞輸送制御に関わる PI3Pase を同定した。PI3Pase KO マウスを作成したところ、ホモ KO 胎仔は胎生致死であった。また、PI3K-C2 $\alpha$ の属するクラス II PI3K には PI3K-C2 $\beta$ が存在し、PI3K-C2 $\alpha$ とともに多くの細胞に発現するが、その機能は全く不明である。さらに、イノシトールリン脂質とは別個のクラスの膜脂質スフィンゴ脂質代謝経路と PI-3-P 経路との関連は不明である。

## 2. 研究の目的

PI3K-C2 $\alpha$ 経路を負に制御する PI3Pase の細胞内小胞輸送とマウス疾患モデルにおける役割を、細胞特異的な PI3K-C2 $\alpha$  KO マウス、PI3Pase KO マウス、PI3K-C2 $\alpha$  / PI3Pase 二重 KO マウスについて解明する。PI3K-C2 $\beta$  のマウス個体レベルでの役割を解明する。さらに、PI3K-C2 $\alpha$ と PI3K-C2 $\beta$ 機能的な差異を解明する。スフィンゴ脂質の膜レベルを調節する要

の酵素スフィンゴシンキナーゼ (SphK) の KO マウスにおける小胞輸送及び血管機能を解析する。

## 3. 研究の方法

組織特異的遺伝子改変マウスの個体生物学、疾患モデル、マウスからの単離細胞やモデル細胞の細胞生理学、細胞生物学等の幅広い技術を用いる。

## 4. 研究成果

PI3K-C2 $\alpha$ と PI3K-C2 $\beta$ の機能的相違を解明するために、PI3K-C2 $\alpha$ -単独 KO マウス、PI3K-C2 $\beta$ -単独 KO マウス及び PI3K-C2 $\alpha$  / PI3K-C2 $\beta$ 二重 KO マウスを作成し、その表現型を解析した。組織 A 特異的な KO マウスについては、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$ のいずれか一方の単独 KO マウスは正常であったが、二重 KO マウスは複数の臓器機能に異常を認めた。ある器官の機能異常については、マウス個体での機能の他に摘出臓器の機能、単離細胞のインビトロ解析により、個体での異常表現型の原因を分子レベル解析し、異常を見出した。一方、組織 B 特異的な KO は、生後 2 週間以内に約半数のホモ KO マウスが死亡することが明らかとなった。当該器官は超音波解析により機能低下を示した。電子顕微鏡解析により細胞内小器官および細胞内フィラメント構造の顕著な異常が認められた。PI3Pase の KO マウスは、ある臓器の異常が顕著であり、この臓器の機能異常により出生直後に死亡した。この臓器の細胞種特異的なコンディショナル KO マウスでは、異常が軽度であり生存が可能であった。また、モデル細胞を用いて、siRNA 法を用いてこの PI3Pase をノックダウンしたところ、エンドサイトーシス・オートファジー経路の異常が認められた。スフィンゴ脂質代謝酵素スフィンゴシンキナーゼ SphK の KO マウスを用いて疾患モデルを作成し、コントロールマウスとの病態の差異を認めた。KO マウスで認められる異常は、細胞内小胞動態の異常をともなった。SphK のトランスジェニックマウスと KO マウスを交配したところ、異常が是正された。

## 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 8 件)

- ① Zhao J., Okamoto Y., Asano Y., Ishimaru K., Aki S., Yoshioka K., Takuwa N., Wada T., Inagaki Y., Takahashi C., Nishiuchi T., Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate receptor-2 facilitates pulmonary fibrosis through potentiating IL-13 pathway in macrophages. PLOS ONE 2018 査読
- ② Lee J-Y, Han S-H, Par M-H, Baek B, Song I-S, Choi M-K, Takuwa Y. Ryu H, He X, Schuchman E, Bae J-S, Jin H-K, Kim S-H. Neuronal SphK1 acetylates COX2 and contributes to pathogenesis in a model of Alzheimer's Disease. Nat Commun 査読有 2018 Impress.
- ③ Okumura K, Yoshida K, Yoshioka K, Aki S, Yoneda N, Inoue D, Kitao A, Ogi T, Kozaka K, Minami T, Koda W, Kobayashi S, Takuwa Y and Gabata T Photoacoustic imaging of tumour vascular permeability with indocyanine green in a mouse model. Eur Radiol Exp 査読有 (2018) 2:5 DOI 10.1186/s41747-018-0036-7 2018/2/27
- ④ Funaki M, Kitabayashi J, Shimakami T, Nagata N, Sakai Y, Takegoshi K, Okada H, Murai K, Shirasaki T, Ota T, Takuwa Y. Honda M , and Kaneko S Peretinoin, an Acyclic Retinoid, Inhibits Hepatocarcinogenesis through Suppression of Sphingosine Kinase 1 Expression in Vitro and in Vivo. Sci Rep 査読有 2017 7(1):16978. doi: 10.1038/s41598-017-17285-2. 2017/12/5
- ⑤ Ohkura S, Usui S, Takashima S, Takuwa N, Yoshioka K, Okamoto Y, Inagaki Y, Sugimoto N, Kitano T, Takamura M, Wada T, Kaneko S, Takuwa Y Augmented sphingosine 1 phosphate receptor-1 signaling in cardiac fibroblasts induces cardiac hypertrophy and fibrosis through angiotensin II and interleukin-6. PLOS ONE 査読有 2017 12(8): e0182329 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182329> 2017/8/3
- ⑥ Mori M, Sakata K, Nakanishi C, Nakahashi T, Kawashiri MA, Yoshioka K, Takuwa Y. Okada H, Yokawa JI, Shimojima M, Yoshimuta T, Yoshida S, Yamagishi M, Hayashi K Early endothelialization associated with a biolimus A9 bioresorbable polymer stent in a porcine coronary model. Heart and Vessels. 査読有 2017 ;32(10):1244-1252 doi: 10.1007/s00380-017-0992-5. 2017/10 [Epub ahead of print] 2017/5/17
- ⑦ Serafimidis I, Rodriguez-Aznar E, Lesche M, Yoshioka K, Takuwa Y. Dahl A, Pan D, Gavalas A. Pancreas lineage allocation and specification are regulated by sphingosine-1-phosphate signalling. PLOS Biology 査読有 2017 15(3):e2000949. doi: 10.1371/journal.pbio.2000949. eCollection 2017.
- ⑧ Zhao J, Okamoto Y, Takuwa Y. Sphingosine-1-phosphate receptor type 2 (S1P2) inhibits bleomycin-induced cellular senescence in murine lung fibroblasts. J Zuzen Med Soc 査読有 2016 125 (1) 2-13 有 In press.

〔学会発表〕 (計 20 件)

- ① Aung Thuzar Khin, Yoshioka Kazuaki, Aki Sho, Pham Quynh Hoa, Sarker Kabir Azadul, Islam Shahidul, Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh Class II phosphoinositide 3-kinase isoforms PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  play essential roles in pinocytosis in vascular endothelial cells 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サポートホール高松、高松シンボルタワー
- ② Sarker Kabir Azadul, Sho Aki, Yoshioka Kazuaki, Kuno Koji, Okamoto Yasuo, Aung Thuzar Khin, Pham Quynh Hoa, Islam Shahidul, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh Indispensable role of  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms of class II phosphoinositide 3-kinases (PI3K) in the uterine smooth muscle contraction during labor 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サポートホール高松、高松シンボルタワー
- ③ Pham Quynh Hoa, Yoshioka Kazuaki, Azadul Sarker Kabir, Aung Thuzar Khin, Islam Shahidul, Aki Sho,

- Ishimaru Kazuhiro, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh Myotubularin-related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3'-phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in human lung alveolar epithelial A549 cells 第 95 回日本生理学会大会 2018 年 3 月 28-30 日 サンポートホール高松、高松シンボルタワー
- ④ Quynh Hoa Pham, Kazuaki Yoshioka, Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Shahidul Islam, Sho Aki, Sato Nakamura, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa Myotubularin - related protein 4 (MTMR4), a phosphoinositide 3' - specific phosphatase, regulates endolysosome integrity and autophagy flux in A549 human lung carcinoma cells 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 7-9 日 神戸ポートアイランド
- ⑤ 多久和 典子、石丸 和宏、岡本 安雄、多久和 陽 抗がん剤による臓器障害におけるスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) 情報伝達系の関与 第 27 回日本病態生理学会大会 2017 年 8 月 18-20 日 国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター 教育研修棟
- ⑥ Khin Thuzar Aung, Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Pham Hoa Quynh, MD Azadul Kabir Sarker, Islam Shahidul, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa. Phosphatidylinositol 3-kinase Class II isoforms, PI3K-C2a and PI3K-C2b are necessary for Pinocytosis in Endothelial Cells 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28-30 日 アクトシティ浜松
- ⑦ Pham Quynh Hoa, Kazuaki Yoshioka, Sato Nakamura, MD Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Shahidul Islam, Sho Aki, Noriko Takuwa and Yoh Takuwa Phosphoinositide-specific 3'-phosphatase, myotubularin-related protein 4 (MTMR4), regulates lysosomal activity and autophagy 第 94 回日本生理学会大会 2017 年 3 月 28-30 日 アクトシティ浜松
- ⑧ Kazuaki Yoshioka, Sho Aki, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa Endothelial Class II PI3K-C2 $\alpha$  is Necessary for Vasucular Formation and Integrity through Regulating Endocytic Membrane Trafficking Topic 3 「Endothelium, Health and Diseases」 第 81 回日本循環器学会学術集会 2017 年 3 月 17-19 日 金沢都ホテル
- ⑨ Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa, Pham Hoa Quynh, MD Azadul Kabir Sarker, Khin Thuzar Aung, Islam Shahidul, Yoh Takuwa Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2  $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日 パシフィコ横浜
- ⑩ Yasuo Okamoto, Hong Cui, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Toshishige Shibamoto, Yoh Takuwa S1P<sub>2</sub>, A Receptor for the Lysophospholipid Mediator Sphingosine 1-phosphate, Protects Against Vascular Barrier Disruption International Shock Congress Symposium "Microcirculation and endothelial damage in sepsis and shock" 2016 年 10 月 3-5 日 東京ドームホテル
- ⑪ 岡本安雄、杜娃、崔弘、吉岡和晃、多久和典子、多久和陽 S1P<sub>2</sub> による血管新生と血管障壁機能の制御 第 58 回日本脂質生化学会 2016 年 6 月 9-10 日にぎわい交流館 AU (あう) (シンポジウム: リゾリン脂質による血管新生制御)
- ⑫ Sho Aki, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa and Yoh Takuwa Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$  isoform PI3K-C2  $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 第 2 回春期特別日本

- 血管生物医学会シンポジウム 2016 年 6 月 3 日 大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂 (招待講演)
- ⑬ JuanJuan Zhao, Yasuo Okamoto, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Takashi Wada, Yutaka Inagaki, Chiaki Takahashi, Yoh Takuwa Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) aggravates lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and cellular senescence in mice 日本生化学会北陸支部第 3 4 回大会 2016 年 5 月 28 日 金沢大学宝町キャンパス 医学部記念館
- ⑭ Juanjuan Zhao, Yasuo Okamoto, Yoh Takuwa. The announcement title: Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P2) inhibits lung fibrosis through altering alveolar macrophage polarization and senescence in mice Gordon research conference “Glycolipid and Sphingolipid Biology” 2016 年 3 月 6-11 日 Renaissance Tuscany Il Ciocco (Lucca (Barga), Italy) (国際)
- ⑮ Aki Sho, Yoshioka Kazuaki, Okamoto Yasuo, Takuwa Noriko, Takuwa Yoh PI3K-C2 $\alpha$  is required for TGF $\beta$ -induced receptor endocytosis and endosomal signaling in endothelial cells 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 (シンポジウム: 血管形成と分化を制御するシグナル機構) (招待講演)
- ⑯ Juan Juan Zhao Yasuo Okamoto Kazuaki Yoshioka Sho Aki Pham Quynh Hoa Azadul MD Kabir Sarker Khin Thuzar Aung Noriko Takuwa Yutaka Inagaki Chiaki Takahashi Takashi Wada Yoh Takuwa Deletion of sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor-2 (S1P-2) 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 神戸ポータルアイランド (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)
- ⑰ 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 $\alpha$  はエンドソーム上での TGF $\beta$ /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
- ⑱ Yasuo Okamoto, Hong Cui, Kazuaki Yoshioka, Noriko Takuwa, Yoh Takuwa 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
- ⑲ Yoh Takuwa Juanjuan Zhao, Yasuo, Okamoto, Kazuaki Yoshioka and Noriko Takuwa. 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 ハンガリーアカデミーオブサイエンス (ハンガリー ブタペスト) (国際)(招待講演)
- ⑳ 安藝 翔、吉岡 和晃、岡本 安雄、多久和 典子、多久和 陽 クラス II  $\alpha$  型 PI3K-C2 $\alpha$  はエンドソーム上での TGF $\beta$ /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
- [図書] (計 4 件)
- ① 多久和 典子 多久和 陽, 南山社, なるほどなっとく! 解剖生理学, 2017/4/10, 297, (1-288) ISBN:978-4-525-12161-7
- ② 坂井建雄、河原克雅 多久和 陽, 日本医事新報社, 第 8 章 内分泌 (536-573) 人体の正常構造と機能 改定第 3 版, 2017/1/27, 904, ISBN: 978-4-7849-3180-4
- ③ Yokomizo T & Murakami M (eds.), Springer Japan, (237-252) Vascular endothelial S1P2 receptor limits tumor angiogenesis

and hyperpermeability.

Takuwa N, OkamotoY, Yoshioka K and  
Takuwa Y., Bioactive Lipid Mediators:  
Current Reviews and Protocols.,  
2015/10/27, 426,

- ④ 宮園浩平, 秋山 徹, 宮島 篤, 宮澤恵  
二／編, 羊土社, S1P (342-344) 多久和  
陽, サイトカイン・増殖因子キーワー  
ド, 2015/4/1, 422,

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 1 件)

名称：非ヒトノックアウト動物、並びにこの  
用途およびその作製方法

発明者：吉岡和晃 多久和 陽

権利者：金沢大学

種類：特許

番号：第 5692677 号 (特願 2010-090078)

取得年月日：平成 27 年 2 月 13 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://physiology1.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多久和 陽 (TAKUWA, Yoh)

金沢大学・医学系・教授

研究者番号：60171592