

平成22年 5月10日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2008～2009

課題番号：20013005

研究課題名(和文)がん細胞遊走因子オートタキシンの血管形成促進機構の解明とその意義

研究課題名(英文) The functions of autotaxin in the regulation of blood vessel formation

研究代表者 青木 淳賢 (Aoki Junken)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20250219

研究成果の概要(和文)：これまでのノックアウトマウスを用いた解析により、オートタキシンは発生段階の血管形成過程に重要な役割を有することが明らかになっている。しかしながらその詳細な作用機構は明らかでなかった。この問いに答えるために我々はゼブラフィッシュに着目した。ゼブラフィッシュは分子レベルでも哺乳類と血管形成過程が類似していることが示されている。我々は、オートタキシンが、ゼブラフィッシュにも高度に保存されていること、および、*in vitro*で発現させたとき、リゾホスファチジン酸産生活性(リゾホスホリパーゼD活性)を示すことを確認した。さらにオートタキシンに対するアンチセンスオリゴ(MO)を投与することでオートタキシンの機能抑制を行ったところ、ゼブラフィッシュにおいても顕著な血管形成異常が観察された。今後は各LPA受容体、並びにオートタキシンの基質産生酵素候補遺伝子に関して、血管形成異常を指標として機能的関連性を明らかにし、オートタキシンの血管形成過程における役割を分子レベルで明らかにされることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Recent studies of autotaxin deficient-mice revealed critical roles of autotaxin in blood vessel formation in mice, although the precise effect of autotaxin has been still elusive. In this study we utilized zebrafish to study the physiological roles of autotaxin in vasculogenesis. Significant lysoPLD activity was observed in the zebrafish homologue of autotaxin. We further suppressed the functions of autotaxin in zebrafish embryos by injecting antisense morpholino against autotaxin, and clarified that autotaxin has important roles in the blood vessel formation in zebrafish.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
年度			
年度			
年度			
総計	18,000,000	0	18,000,000

研究分野：ライフサイエンス

科研費の分科・細目：がん特性B01(がん細胞の接着・運動)・450

キーワード：オートタキシン、血管新生、リゾホスファチジン酸、ゼブラフィッシュ

## 1. 研究開始当初の背景

リゾホスファチジン酸 (LPA) は非常に単純な構造を有するリゾリン脂質であるが、様々な細胞応答・生理作用を有する生理活性脂質である。LPA は細胞膜上の特異的 G タンパク質共役型受容体(LPA1-6)を介して作用を発揮することが知られていたが、一方でその産生機構はほとんど明らかになっていなかった。我々は LPA 産生酵素としてオートタキシン (ATX) を世界で初めて同定した。ATX は、リゾホスホリパーゼ D 反応により、LPA を産生する。その後、我々は ATX のノックアウトマウスを作製したところ、ATX ホモ欠損マウスは、血管形成異常を伴う胎生致死となることを明らかにした。しかしながら、ATX が発生段階の血管形成過程にどのように関与しているかと言うことに関しては未だ明らかでなかった。

## 2. 研究の目的

魚類の代表的なモデル生物 (ゼブラフィッシュ) を用い、ATX の発生段階における血管形成を評価する系を構築する。

## 3. 研究の方法

データベースサーチによりゼブラフィッシュ ATX ホモログを見出し、クローニング、および培養細胞に発現させその酵素活性を評価する。また、血管特異的プロモーター支配下に EGFP を発現させることにより血管を非侵襲的に可視化できるゼブラフィッシュを用い、その個体内で ATX の機能を抑制した時の血管形成への影響を観察する。

## 4. 研究成果

### (1) ゼブラフィッシュATXホモログのクローニング、およびその酵素活性の確認

マウスおよびヒト ATX を元にゼブラフィッシュのゲノムデータベースをサーチしたところ、相同性が約 65%のゼブラフィッシュ ATX ホモログ候補遺伝子を見出した。この遺伝子をクローニングし、培養細胞に発現させたところ、その細胞培養上清中に顕著なリゾホスホリパーゼ D 活性を検出した。また、ヒトあるいはマウス ATX の活性中心に相当するゼブラフィッシュ ATX の 205 番目のスレオニンをアラニンに置換した変異体では、全く酵素活性が見られなかった。以上の結果は、ゼブラフィッシュ ATX もヒトあるいはマウスと同様にリゾホスホリパーゼ D 反応により LPA を産生しうることを示す。

### (2) ゼブラフィッシュATXの血管形成過程における役割に関する解析

ゼブラフィッシュ個体内における ATX の機能を解析するために、ATX の機能を抑制する溜めに必要なアンチセンスモルフォリノ (MO) を作製した。作製した MO は、正常なスプライシングを阻害することにより異常な mRNA が合成され、その結果として正常な ATX の発現を抑制する。作製した MO を投与したゼブラフィッシュ胚由来の total RNA に対して、*atx* に関する RT-PCR を行ったところ、異常な mRNA の産生が確認された。ATX の機能抑制時に観察される血管の発生過程への影響を解析するために、血管特異的プロモーター支配下に EGFP を発現させることにより血管を非侵襲的に可視化できるゼブラフィッシュを用意し、その胚へ MO の投与を行った。その結果 ATX に対する MO を投与した胚では、血管形成過程が顕著に乱れており、ATX はゼブラフィッシュにおいても、マウスと同様に、発生期の血管形成に重要であることが示された。また、ATX の血管形成過程における役割の解析にゼブラフィッシュが有用であることが示された。

## 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 13 件)

1. Okudaira S, Yukiura H, Aoki J. Biological roles of lysophosphatidic acid signaling through its production by autotaxin. *Biochimie, in press*, 2010. 査読有

2. David M, Wanneq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O. Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One* 5, e9741, 2010. 査読有

3. Hama K, Aoki J. LPA<sub>3</sub>, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res. in press*, 2010. 査読有

4. Shinkuma S, Akiyama M, Inoue A, Aoki J, Natsuga K, Nomura T, Arita K, Abe R, Ito K, Nakamura H, Ujiie H, Shibaki A, Suga H, Tsunemi Y, Nishie W, Shimizu H. Prevalent LIPH founder mutations lead to loss of P2Y5 activation ability of PA-PLA1alpha in autosomal recessive hypotrichosis. *Hum Mutat. in press*, 2010. 査読有

5. Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Aoki J, Ueda H. Evidence for de novo synthesis of

lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther.*, 333, 540-546, 2010. 査読有

6. Otani K, Kitayama J, Yasuda K, Nio Y, Iwabu M, Okudaira S, Aoki J, Yamauchi T, Kadowaki T, Nagawa H. Adiponectin suppresses tumorigenesis in Apc(Min)(+) mice. *Cancer Lett.* 288, 177-182, 2010. 査読有

7. Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battefeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Bräuer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R. Synaptic PRG-1 modulates excitatory transmission via lipid phosphate-mediated signaling. *Cell*, 138, 1222-1235, 2009. 査読有

8. Ma L, Uchida H, Nagai J, Inoue M, Chun J, Aoki J, Ueda H. Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: an initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Mol Pain.* 5-64. 2009. 査読有

9. Iwasawa Y, Fujii T, Nagamatsu T, Kawana K, Okudaira S, Miura S, Matsumoto J, Tomio A, Hyodo H, Yamashita T, Oda K, Kozuma S, Aoki J, Yatomi Y, Taketani Y. Expression of autotaxin, an ectoenzyme that produces lysophosphatidic acid, in human placenta. *Am J Reprod Immunol.*, 62, 90-95, 2009. 査読有

10. Nouh MA, Wu XX, Okazoe H, Tsunemori H, Haba R, Abou-Zeid AM, Saleem MD, Inui M, Sugimoto M, Aoki J, Kakehi Y. Expression of autotaxin and acylglycerol kinase in prostate cancer: association with cancer development and progression. *Cancer Sci.*, 100, 1631-1638, 2009. 査読有

11. Endo T, Kano K, Motoki R, Hama K, Okudaira S, Ishida M, Ogiso H, Tanaka M, Matsuki N, Taguchi R, Kanai M, Shibasaki M, Arai H, Aoki J. Lysophosphatidylmethanol is a pan lysophosphatidic acid receptor agonist and is produced by autotaxin in blood. *J Biochem.*, 146, 283-93, 2009. 査読有

12. Nakamura K, Ohkawa R, Okubo S, Yokota H, Ikeda H, Yatomi Y, Igarashi K, Ide K, Kishimoto T, Masuda A, Yamamoto T, Tsuji S, Saito N, Kurokawa M, Okudaira S, Aoki J. Autotaxin enzyme immunoassay in human cerebrospinal fluid samples. *Clin Chim Acta.*, 405, 160-162, 2009. 査読有

13. Makide K, Kitamura H, Sato Y, Okutani M, Aoki J. Emerging lysophospholipid mediators, lysophosphatidylserine, lysophosphatidylthreonine, lysophosphatidylethanolamine and lysophosphatidylglycerol. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, 89, 135-139. 2009. 査読有

[学会発表] (計 36 件)

1. 奥平 真一, 青木 淳賢, 肺線維症におけるオートタキシンの機能解析, 日本薬学会第 130 年会, 平成 22 年 3 月 30 日, 岡山
2. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, 血中におけるリゾホスファチジルコリン産生機構の解明, 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム, 平成 21 年 11 月 23 日, 名古屋
3. 中永 景太, 青木 淳賢, ATX-LPA シグナルの S1P シグナル抑制機構, 次世代を担う若手ファーマ・バイオフィォーラム, 平成 21 年 11 月 23 日, 名古屋
4. 青木 淳賢, 肺線維症におけるリゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの機能解析, 第 6 回東京呼吸器リサーチフォーラム, 平成 21 年 11 月 7 日, 東京
5. 菅野 究, 青木 淳賢, Baculovirus を用いたオートタキシンの大量発現系の確立, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
6. 雪浦 弘志, 青木 淳賢, オートタキシントランスジェニックマウスの解析, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
7. 小川 貴子, 青木 淳賢, トリプシンによって切断される Autotaxin の性状解析, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
8. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, 血中におけるリゾホスファチジルコリン産生機構の解明, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
9. 中永 景太, 青木 淳賢, ゼブラフィッシュを用いたオートタキシンの血管形成メカニズムの解析, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
10. 有馬 直明, 青木 淳賢, コンディショナルノックアウトマウスを用いたオートタキシンの機能解析, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
11. 奥平 真一, 青木 淳賢, 肺線維症におけるリゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの機能解析, 第 82 回日本生化学大会, 平成 21 年 10 月 23 日, 神戸
12. 小川 貴子, 青木 淳賢, トリプシンによって切断される Autotaxin の性状解析, 第 48 回日本薬学会東北支部大会, 平成 21 年 10 月 18 日, 仙台

13. 中永 景太, 青木 淳賢, リゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの血管形成過程における役割, 第15回小型魚類研究会, 平成21年9月12日, 名古屋
14. 奥平 真一, 青木 淳賢, 肺線維症におけるリゾホスファチジン酸産生酵素オートタキシンの機能解析, 第51回日本脂質生化学会, 平成21年7月31日, 名古屋
15. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, 血中におけるリゾホスファチジルコリン産生機構の解明, 第6回東北大学バイオサイエンスシンポジウム, 平成21年6月16日, 仙台
16. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, 血中におけるリゾホスファチジルコリン産生機構の解明, 日本生化学会東北支部第75回例会, 平成21年5月9日, 仙台
17. 奥平 真一, 青木 淳賢, Roles of Autotaxin in Pulmonary Fibrosis, Bioactive Lipids in Cancer, Inflammation and Related Disease, 11th International Conference, 平成21年10月25日, メキシコ カンクン
18. 青木 淳賢, Pathways for LPA production and their path-physiological roles, FASEB Summer Research Conference "Lysophospholipid Mediators in Health and Disease", 平成21年6月28日, アメリカ アリゾナ
19. 奥平 真一, 青木 淳賢, Roles of Autotaxin in Pulmonary Fibrosis FASEB Summer Research Conference "Lysophospholipid Mediators in Health and Disease", 平成21年6月28日, アメリカ アリゾナ
20. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, Physiological roles of Autotaxin during late pregnancy, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), 平成21年5月28日, 東京
21. 奥平 真一, 青木 淳賢, Roles of Autotaxin in Pulmonary Fibrosis, 4th International Conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators (PLM2009), 平成21年5月28日, 東京
22. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, Physiological roles of Autotaxin during late pregnancy, The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 平成21年5月26日, 東京
23. 青木 淳賢, Two pathways for LPA production and their path-physiological roles, The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 平成21年5月26日, 東京
24. 奥平 真一, 青木 淳賢, Roles of Autotaxin in Pulmonary Fibrosis, The 5th Takeda Science Foundation Symposium on PharmaSciences, 平成21年5月26日, 東京
25. 小野 めぐみ, 青木 淳賢, 血中におけるリゾホスファチジルコリン産生機構の解明, 第129年会日本薬学会, 平成21年3月26-28日, 京都
26. 青木 淳賢, 細がん細胞の運動・増殖性促進因子オートタキシンは血管新生を促進する, 日本癌学会 シンポジウム, 平成20年12月30日, 名古屋
27. 中永 景太, 青木 淳賢, VE-カドヘリンの接着抑制に関わる内皮細胞上のLPA受容体の解析, BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 平成20年12月9-12日, 神戸
28. 可野 邦行, 青木 淳賢, Role of autotaxin in lysophosphatidic acid-induced hypertension in murine plasma, BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 平成20年12月9-12日, 神戸
29. 小川 貴子, 青木 淳賢, 肝障害時における血中autotaxin発現変動の解析, BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 平成20年12月9-12日, 神戸
30. 奥平 真一, 青木 淳賢, 創傷治癒におけるリゾホスファチジン酸産生酵素autotaxinの機能解析, BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会, 平成20年12月9-12日, 神戸
31. 青木 淳賢, 生理活性リゾリン脂質の生体内機能・リゾリン脂質メディエーターの生理・病態機能 -, 第30回東北薬学セミナー 特別講演, 平成20年12月5日, 仙台
32. 大上 満, 青木 淳賢, コンディショナルノックアウトマウスを用いたリゾホスファチジン酸産生酵素 オートタキシンの機能解析, ファーマ・バイオフォーラム 2008, 平成20年11月29-30日, 東京
33. 青木 淳賢, メディエーターとしての生体膜脂質の機能・リゾリン脂質メディエーターの生理・病態機能 -, 生体パーオキシド研究会 特

別講演, 平成 20 年 8 月 30 日, 仙台

34. 青木 淳賢, リゾホスファチジン酸産生酵素オ  
ートタキシンの初期炎症過程における機能,  
平成 20 年 6 月 5-6 日, 徳島

35. 青木 淳賢, 生理活性リゾリン脂質 -新しいド  
ラッグターゲット-, 東北大学バイオシンポジ  
ウム, 平成 20 年 6 月 6 日, 東京

〔図書〕 (計 1 件)

井上飛鳥/青木淳賢, 羊土社, 実験医学, 「情  
報伝達をつかさどる生理活性物質 脂質メ  
ディエーターの機能」 vol 27, 2059-2067,  
2009

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seika/H21/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 淳賢 (Aoki Junken)

東北大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 20250219

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者: なし