

## 【総説】

## 第13回 高安賞優秀論文賞受賞

論文 「Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$ -isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for transforming growth factor  $\beta$ -induced Smad signaling in endothelial cells」  
Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y.  
Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$ -isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for TGF $\beta$ -induced Smad signaling in endothelial cells.  
*J Biol Chem.* 290 : 6086-6105, 2015

「血管内皮細胞においてクラスII型PI3K-C2 $\alpha$ はTGF $\beta$ /Smadシグナル伝達系に必須である」

安藝 翔 (あき しょう)

## 背 景

情報伝達分子ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) は、リン脂質ホスホイノシチドのイノシトール環3位をリン酸化する生存に必須の脂質リン酸化酵素であり、癌、免疫、代謝の分野で活発に研究が展開されており、創薬研究の重要標的分子ともなっている。しかし、PI3K研究の多くは、PI(3,4)P<sub>2</sub>、PI(3,4,5)P<sub>2</sub>を産生するクラスI PI3K酵素に集中しており、近年はオートファジーに関連するPI(3)P産生酵素クラスIII PI3Kの研究も活発になってきた。一方、本研究が課題としているPI(3)P、PI(3,4)P<sub>2</sub>を産生するクラスII PI3K酵素は、機能未解明の分子として取り残されてきた。当研究室では、血管平滑筋収縮における脂質リン酸化酵素PI3KクラスII $\alpha$ 型アイソフォーム (PI3K-C2 $\alpha$ ) の役割の解明<sup>1)</sup>を端緒として、生体におけるPI3K-C2 $\alpha$ 機能を解明するために、PI3K-C2 $\alpha$ ノックアウト (KO) マウスを作成した。PI3K-C2 $\alpha$  KOマウスでは予想に反して内皮機能に顕著な異常が見られ、血管新生障害により胎生致死であった<sup>2,3)</sup>。さまざまな血管新生因子の作用のPI3K-C2 $\alpha$ 依存性を検討したところ、内皮細胞における血管内皮成長因子 (VEGF) やスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) によるエンドソーム上でのシグナリングにPI3K-C2 $\alpha$ が関与していることを見出した。本研究では、チロシンキナーゼ型受容体であるVEGF受容体やGタンパク質共役型受容体であるS1P受容体とは異なる、内皮細胞でのセリン・スレオニンキナーゼ型であるトランスフォーミング成長因子 $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) 受容体のTGF $\beta$ 受容体内在化およびSmad活性化におけるPI3K-C2 $\alpha$ の関与、ならびに動物個体レベルでのTGF $\beta$ 1による血管新生のPI3K-C2 $\alpha$ に依存性を解析した。

## 結 果

RNA干渉法を用いてPI3K-C2 $\alpha$ をノックダウンすると、TGF $\beta$ 1刺激による転写因子Smad2/3のリン酸化及び核移行が顕著に抑制された。一方、TGF $\beta$ スーパーファミリーに属するBMP9によるSmad1/5/8のリン酸化はPI3K-C2 $\alpha$ に依存しなかった。また、PI3K-C2 $\alpha$ とは異なり、クラスII PI3K-C2 $\beta$  やクラスI PI3K、クラスIII PI3KのノックダウンはSmad2/3のリン酸化を抑制しなかった。TGF $\beta$ 1によるSmad2/3のリン酸化は、セリン・スレオニンキナーゼ型のI型TGF $\beta$ 受容体ALK5及びSmad2/3と結合する足場タンパク Smad anchor for receptor activation (SARA) のPI(3)Pに富むエンドソームへの局在を必要とする。PI3K-C2 $\alpha$ ノックダウンは、SARAのエンドソーム局在は阻害しなかったが、TGF $\beta$ 1刺激によるエンドソームへのALK5内在化及びALK5とSARAの共局在を抑制した。さらに、PI3K-C2 $\alpha$ ノックダウンは、エンドソーム上でのSmad2/3とSARAとの複合体形成を阻害した。TGF $\beta$ 1はエンドソームのPI-3-Pレベルには影響しなかったが、細胞膜の葉状仮足部位においてPI3K-C2 $\alpha$ 依存的にPI-3, 4-P<sub>2</sub>レベルを増加させた。また、クラスリン依存的エンドサイトーシスの阻害薬はTGF $\beta$ 1刺激によるALK5内在化、Smad2/3リン酸化及びその核移行を抑制した。したがって、TGF $\beta$ 1によるALK5のクラスリン依存的なエンドソームへの内在化及びエンドソーム上でのSARA依存的なALK5によるSmad2/3リン酸化がPI3K-C2 $\alpha$ に依存した。内皮細胞において、TGF $\beta$ 1はALK5-Smad2/3系を介してVEGF-A産生を促進した。PI3K-C2 $\alpha$ ノックダウンは、TGF $\beta$ 1によるVEGF-A産生促進を強く抑制し、TGF $\beta$ 1による細胞遊走促進及び管腔形成を阻害した。さらに、マトリゲルプラグ内インビボ血管新生アッセイにおいて、野生型及び平滑筋特異的コンディショナルPI3K-C2 $\alpha$  KOマウスでは、TGF $\beta$ 1はマトリゲル内の微小血管数を

著しく増加させたのに対し、内皮特異的PI3K-C2 $\alpha$  KOマウスにおいては血管形成促進が抑制された。また、TGF $\beta$ 1による血管形成促進は、エンドサイトーシス阻害薬、ALK5阻害薬、VEGF受容体阻害薬のいずれによっても強く抑制された<sup>4)</sup>。

以上のことから、血管内皮細胞において、PI3K-C2 $\alpha$ はTGF $\beta$ 受容体のエンドソームへの内在化及びエンドソーム上でのSARA-Smad2/3複合体形成に必要であり、この作用を介してTGF $\beta$ 1-ALK5-Smad2/3シグナル伝達経路を介した血管新生調節に必須な役割をはたすことが明らかになった。また、PI3K-C2 $\alpha$ のこの作用は、TGF $\beta$ スーパーファミリーの中でも、TGF $\beta$ に特異的であることが示唆された。

## 考 察

TGF $\beta$ Rの主要シグナル経路である転写因子Smadのリン酸化は、正常ECでは内在化されたTGF $\beta$ 受容体が局在するエンドソーム上で生ずることが観察され、C2 $\alpha$  KOあるいはKDはこれを完全に抑制した。以上の結果は、1) ECにおいては血管形成に重要な役割を担う3種の受容体、VEGFR2, S1P1, TGF $\beta$ Rはいずれも内在化後に局在するエンドソーム上でシグナルを産生すること、すなわち受容体エンドサイトーシスは従来考えられてきた受容体脱感作のプロセスである他に、ある種の受容体の小胞シグナリングに必要なプロセスであること、2) C2 $\alpha$ は受容体エンドサイトーシスに関与し、その結果小胞シグナリングにも必要であることを示している。このように、クラスII C2 $\alpha$ はクラスIやIII PI3Kと異なる独自の機能をはたすことを明らかにした(図1)。しかしながら、C2 $\alpha$ が関与しエンドサイトーシスを制御する一連のホスホイノシチド依存性機構の全貌や、C2 $\alpha$ と構造上の類

似性が高いクラスII酵素C2 $\beta$ の血管機能調節における役割分担など、未解決の興味深い課題が残っている。

## 結 語

本研究により、血管内皮細胞においてPI3K-C2 $\alpha$ はTGF $\beta$ R内在化促進を介してエンドソームでのSmad2/3活性化およびSmad2/3による遺伝子発現に必要であることを示し、クラスII PI3Kの新規なシグナル伝達における作用を解明した。今後はPI3K-C2 $\alpha$ 依存的な受容体内在化とエンドソームシグナリングに必要な一連のホスホイノシチド代謝プロセスを明らかにするとともに、またマウス個体レベルで血管系におけるPI3K-C2 $\alpha$ および近縁酵素PI3K-C2 $\beta$ の機能を解明し、血管病病態におけるクラスII PI3K酵素の機能解明とクラスII PI3Kを標的とした治療法開発へと研究を展開したい。

## 参 考 文 献

- 1) Seok YM, Azam MA, Okamoto Y, Sato A, Yoshioka K, Maeda M, Kim I, Takuwa Y. (2010) Enhanced Ca<sup>2+</sup>-dependent activation of phosphoinositide 3-kinase class II $\alpha$  isoform-Rho axis in blood vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 5, 934-41
- 2) Yoshioka, K., Yoshida, K., Cui, H., Wakayama, T., Takuwa, N., Okamoto, Y., Du, W., Qi, X., Asanuma, K., Sugihara, K., Aki, S., Miyazawa, H., Biswas, K., Nagakura, C., Ueno, M., Iseki, S., Schwartz, R. J., Okamoto, H., Sasaki, T., Matsui, O., Asano, M., Adams, R. H., Takakura, N., and Takuwa, Y. (2012) Endothelial PI3K-C2 $\alpha$  (a class II PI3K) has an essential role in angiogenesis and vascular function. *Nat. Med.* 18, 1560-1569
- 3) Biswas K, Yoshioka K, Asanuma K, Okamoto Y, Takuwa N, Sasaki T, Takuwa Y. (2013) Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2 $\alpha$  in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells. *J Biol Chem*. 288, 2325-39
- 4) Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y. (2015) Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$ -isoform PI3K-C2 $\alpha$  is required for TGF $\beta$ -induced Smad signaling in endothelial cells. *J Biol Chem*. 290, 6086-10

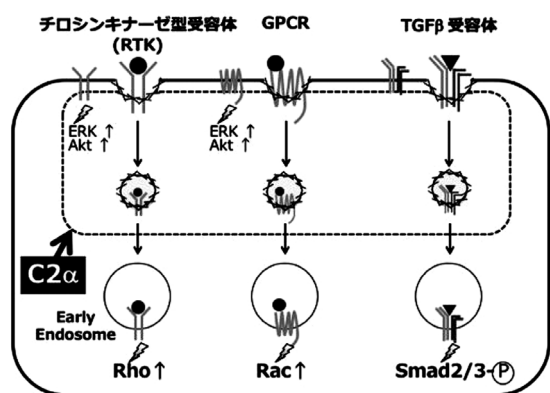


図1. 受容体のC2 $\alpha$ 依存的内在化と小胞でのシグナル産生



### Profile

2015年6月 金沢大学大学院 医学系研究科 医学博士修了  
2015年7月 金沢大学大学院 医薬保健研究域 医学系 血管分子生理学 助教