

【総説】

第11回 高安賞最優秀論文賞受賞

論文 「Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function」
Nature Medicine
第18巻第10号 1560頁～1569頁 2012年10月掲載
Kotaro Yoshida

クラスII α 型phosphatidylinositol 3キナーゼは、血管内皮細胞において小胞輸送の制御を介して血管新生及び血管バリア機能に必要である

吉田耕太郎 (よしだ こうたろう)

I. はじめに

胎生期の発生, 生後の組織修復及びリモデリング, 腫瘍増殖において, 「脈管形成 (Vasculogenesis)」及び「血管新生 (Angiogenesis)」からなる血管形成プロセスは必須である。脈管形成により形成された未成熟な原始血管網は, その後の血管分岐, 壁細胞 (血管平滑筋及び周皮細胞) の動員・会合による血管安定化, 動静脈分化などを経て, 階層構造を持つ成熟血管組織へと発達していく¹⁾。静止期の安定化された血管においては, 強固なバリア機能が保たれて血漿は血管外に漏出せず, 健全な循環機能が維持される。一方, 腫瘍のような病的な組織においてバリア機能の発達は不十分であり, 腫瘍血管は漏れやすい。また, 過剰なアンジオテンシンII (AngII) などにより誘発される血管障害などでは, 炎症性白血球の血管壁への浸潤をとまなう血管透過性の亢進がみられ, 血管壁の重大な障害をもたらす。したがって, 血管バリア機能の維持および血管の安定化は, 血管および組織の恒常性の維持において必須である。

ホスファチジルイノシトール (phosphatidylinositol : PtdIns) 3-キナーゼ (PI3K) はイノシトールリン脂質のもつイノシトール環3位の水酸基をリン酸化する酵素であり, リン酸化されたホスファチジルイノシトールを介し, 細胞分裂, 増殖, 分化, 遊走, アポトーシスの制御やがん化, 細胞内小胞輸送など, 多岐にわたる細胞応答に関与している。PI3Kは哺乳類において, ドメインの構造や薬理学的な特性の違いにより, 3つのクラス, 8つのアイソフォームに分類されている。クラスI型PI3Kの触媒サブユニットはp110 α , p110 β , p110 γ , p110 δ の4つのアイソフォームからなり, これらは多くのチロシンキナーゼ型受容体やGタンパク質共役受容体の刺激により活性化され, 細胞膜においてPtdIns 3,4,5-P₃を産生し下流にシグナルを伝達する。血管内皮細胞において, クラスI型PI3K, とくにp110 α は増殖, 分化, 生存, 遊走,

形態形成を制御し発生期の血管新生を担う必須のシグナル分子である^{2),3)}。クラスIII型PI3KであるVps34はPtdIns 3-Pを産生し, 細胞内小胞輸送やオートファジーに関与することが知られている。一方, クラスII型PI3Kについては, 哺乳類ではPI3K-C2 α , PI3K-C2 β , PI3K-C2 γ の3つのアイソフォームの存在が知られているが, これらの活性化の機序および生理機能はほとんど不明であった⁴⁾。最近の報告では, PI3K-C2 α は細胞においてホスファチジルイノシトールを主要な基質としPtdIns 3-Pを産生していることが示されている^{5),6)}。

II. クラスII α 型PI3K-C2 α による血管新生及び血管バリア機能の調節1) PI3K-C2 α の血管新生における役割

全身型のPI3K-C2 α ホモノックアウトマウスは胎生8.5日目から発育不全となり, 胎生10.5日目から胎生11.5日目のあいだに血管形成の不全により胎生致死となった。血管内皮のマーカーである抗CD31抗体を用いた胎生11.5日目のマウス胎仔のホールマウント染色において, PI3K-C2 α ホモノックアウトマウスは全身にわたり正常胎仔で観察される階層的な血管網の形成が障害されていた (図1)。このCD31免疫染色像やノックアウトマウス胎仔の子宮内死亡の時期から, 血管形成の血管新生過程が著しく障害されていると考えられた。

この表現型がどの細胞に発現するPI3K-C2 α に依存しているのか明らかにするため, 各種細胞において特異的にPI3K-C2 α を欠損するコンディショナルノックアウト (CKO) マウスを作製した。平滑筋細胞に特異的なPI3K-C2 α CKOマウスあるいは心筋細胞に特異的なPI3K-C2 α CKOマウスは正常に発育しメンデルの法則にしたがって出生したのに対し, 血管内皮細胞に特異的なPI3K-C2 α CKOマウスは全身性PI3K-C2 α ホモノックアウトマウスと同様に, 血管形成の不全を含む多臓器の障害により胎

生致死であった。また、血管壁の平滑筋及び周皮細胞の集積が不良であった。これらのことから、血管内皮細胞に発現するPI3K-C2 α は正常な血管新生および個体の発生に必須であることが示された。

血管内皮細胞に特異的なPI3K-C2 α CKOマウスは胎生致死であったことから、生後マウスにおけるPI3K-C2 α の機能解析を行うため、エストロゲン受容体作動薬であるタモキシフェンの投与によりPI3K-C2 α 遺伝子欠失が誘導されるPI3K C2 α コンディショナルノックアウト(C2 α ^{iΔEC})マウスを用いた。血管内皮細胞に特異的なVE-カドヘリン(VEcad)遺伝子プロモーターの下流でタモキシフェンの結合により活性化されるCreリコンビナーゼ-エストロゲン受容体融合タンパク質を発現するトランスジェニックマウスと、PI3K-C2 α 遺伝子内にCreリコンビナーゼ認識配列のloxPを有するPI3K-C2 α ^{flax/flax}を交配して得られたVEcad-Cre/ER; PI3K-C2 α ^{flax/flax}マウスにタモキシフェンを投与して血管内皮細胞においてのみPI3K-C2 α を欠損するC2 α ^{iΔEC}マウスを作製した。生後における血管新生を研究するすぐれたモデルである網膜血管新生モデルを用いた。生後3日目にタモキシフェンを投与し、生後6日目までの網膜血管新生を観察したところ、C2 α ^{iΔEC}マウスでは既存血管からの新生血管の発生(発芽的血管新生)並びに周皮細胞集積が著しく低下していた。以上のことから、血管内皮細胞に発現するPI3K-C2 α は胎仔における発生期血管新生および生後における生理的血管新生の両過程に必須のPI3Kのアイソフォームであることが明らかになった。

2) 内皮細胞内シグナル伝達系におけるPI3K-C2 α の役割

RNA干渉法によりPI3K-C2 α 発現をノックダウンしたヒトの臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)において、血管内皮増殖因子VEGF-Aによるマトリゲル上での管腔構造の形成が阻害された。しかし、他のPI3Kアイソフォーム(C2 β , p110 β , Vps34)のノックダウンはVEGF-Aによる管腔形成に影響しなかった。さらに、PI3K-C2 α をノックダウンした細胞ではVEGF-Aによる細胞遊走も著しく抑制さ

れた。しかし、PI3K-C2 α をノックアウトした血管平滑筋細胞ではPDGFによる細胞遊走能にまったく変化のみられなかったことから、PI3K-C2 α は血管内皮細胞に特異的に役割をもつことが示唆された。

PI3K-C2 α をノックダウンしたHUVECでは、VEGF-AによるVEGF受容体のチロシンリン酸化、および、受容体下流の細胞内シグナル伝達経路であるAkt, ERK, PAK2, NO合成酵素のリン酸化はまったく影響されなかった。これらのVEGFシグナル伝達経路はクラスI型PI3Kであるp110 α に強く依存していることがよく知られている。興味深いことに、PI3K-C2 α をノックダウンした細胞において、VEGF-Aにより活性化されるミオシン脱リン酸化酵素調節サブユニットMYPT1のリン酸化が抑制された。このMYPT1は低分子量Gタンパク質RhoAにより活性化されるリン酸化酵素Rhoキナーゼの直接の標的基質であることから、VEGF-Aの刺激によるRhoAの活性化について調べたところ、PI3K-C2 α のノックダウンによりRhoAの活性化の著しい減弱が観察された。ドミナントネガティブ変異をもつRhoAをアデノウイルスを用いてHUVECに導入しRhoAを不活性化したところ、VEGF-Aによるマトリゲル上での管腔形成は顕著に抑制された。これらの結果から、PI3K-C2 α はRhoAを介した血管内皮細胞の形態形成に必須の役割をもつことが示された。

3) PI3K-C2 α の内皮細胞内小胞輸送における役割

細胞でのエンドソーム輸送におけるPI3K-C2 α の役割を明らかにするため、まず、PI3K-C2 α の代謝産物であるPtdIns 3-Pに特異的に結合するHrsタンパク質のFYVEドメインと赤色蛍光タンパク質RFPの融合タンパク質(mRFP-2xFYVEドメイン)をHUVECに導入し、生細胞イメージング法によりPtdIns 3-Pの細胞内局在を可視化した。正常なHUVECにおいてPtdIns 3-Pはおもにエンドソームに局在していた。しかし、PI3K-C2 α をノックダウンした細胞ではmRFP-2xFYVE陽性のエンドソームの減少とエンドソームの運動性低下がみられた。しかし、

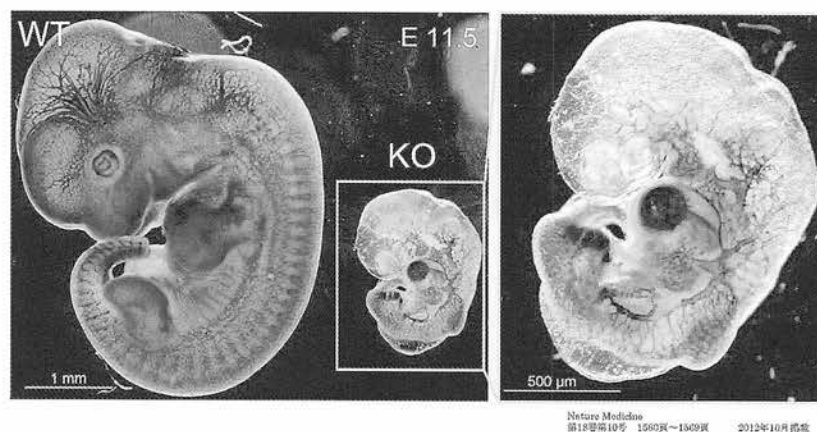


図1. 全身型PI3K-C2 α ノックアウトマウス胎仔における血管形成の障害

野生型(WT)マウス及び全身型KOマウス胎仔(E11.5)の抗CD31ホルマウント免疫染色像。KOマウス胎仔は野生型(WT)マウスと比較して著しく小さく、頭部や体節に沿った広範な血管形成(血管新生)の異常が認められる。

p110 α あるいはVps34をノックダウンした細胞ではエンドソームの変化は全くみられなかった。この観察と一致して、GFPにより標識したPI3K-C2 α は主に、初期エンドソーム、クラスリン被覆小胞、トランスゴルジネットワークに局限していたことから、PI3K-C2 α はエンドソーム膜におけるPtdIns 3-Pの産生とエンドソーム輸送に必須であると考えられた。

血管内皮細胞において重要な役割をはたしている接着分子VE-カドヘリンのエンドソームによる輸送を観察するため、GFPにより標識したVE-カドヘリンを発現させたHUVECにおいて生細胞イメージングを行った。HUVECは、トランスゴルジネットワークと細胞間接着部位の間で活発に小胞を介したGFP-標識VE-カドヘリン輸送をおこなっていた。PI3K-C2 α をノックダウンすると、このVE-カドヘリンの輸送が著しく阻害された。この小胞を介したVE-カドヘリン輸送におけるRhoAの関与を調べる目的で、まずRhoAの蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)プローブであるRaichu-RhoAを用いた生細胞イメージングにより細胞内でのRhoA活性化部位を可視化した。正常なHUVECにおいて、VEGF-Aは細胞内小胞膜および細胞間接着部位においてRhoAを強く活性化した。このRhoA活性化がみられた細胞内小胞のかなりの部分は、mRFP-2xFYVE及び初期エンドソーム抗原陽性を示すエンドソームであり、PI3K-C2 α のノックダウンによりエンドソームおよび細胞間接着部位におけるRhoAの活性化はほとんど消滅した。このことは、PtdIns 3-Pに陽性のエンドソームおよび細胞膜におけるRhoA活性化にPI3K-C2 α が必須であることを示していた。さらに、エンドソームにおけるRhoAの活性化の上流イベントであるVEGF受容体2の内在化に着目した。VEGF-Aの刺激によるVEGF受容体2(VEGFR2)のPtdIns 3-P陽性エンドソームへの内在化は、PI3K-C2 α のノックダウンにより消失した。興味深いことに、VEGF-A刺激後2分でみられる細胞膜におけるVEGFR2のリン酸化はPI3K-C2 α ノックダウン細胞においても正常細胞と同様に観察されたが、刺激後30分でみられるリン酸化VEGFR2のエンドソームへの内在化はPI3K-C2 α ノックダウンにより抑制された。さらに、ダイナミン依存性エンドサイトーシスの阻害剤であるDynasoreの前処置により、VEGF-A刺激によるRhoA活性化、細胞間接着部位へのVE-カドヘリンの集積、及びマトリゲル上管腔形成は減弱した。これらの結果から、PI3K-C2 α は活性化したVEGFR2のエンドソームへの内在化と、その後のRhoAの活性化を含むエンドソームにおけるシグナル伝達、ならびにVE-カドヘリンのエンドソームによる輸送とその細胞間接着部位への集積に必須であると考えられた。

4) PI3K-C2 α の血管バリア機能における役割

PI3K-C2 α をノックダウンしたHUVECの単層培養における透過性をFITCデキストラン法により評価したところ、対照となる細胞と比べ、無刺激およびVEGF-A刺激

のいずれの条件においても透過性は有意に亢進していた。エバンスブルー色素静脈内投与方法による*in vivo*における血管透過性の評価モデル(Milesアッセイ)においても、PI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスにおいてVEGF-A皮下投与により誘発されるエバンスブルー色素の血管外漏出は、野生型マウスに比べ有意に亢進していた。また、アナフィラキシーのメディエーターである血小板活性化因子(PAF)を全身投与した場合の血管透過性亢進もPI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスで増強していた。すなわち、野生型マウスへの影響はほとんどみられない低容量のPAF投与により、PI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスは投与後40分以内にすべて死亡した。その際、PI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスのヘマトクリット値は血漿の血管外漏出亢進により野生型マウスに比べ上昇し、肺組織における血管透過性の亢進が観察されたことから、インビボにおいてPI3K-C2 α の欠損は血管バリア機能の低下をもたらすことが示唆された。

Ang IIの慢性投与による大動脈および冠動脈の血管透過性の亢進は、野生型マウスに比べPI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスにおいて有意に増強していた。このとき、抗VE-カドヘリン抗体を用いた大動脈の*en face*ホルマウント免疫染色により、PI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスでは内皮細胞間接着の傷害が観察された。驚いたことに、Ang IIの慢性投与により、PI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスにおいて野生型マウスではみられない解離性大動脈瘤形成が高頻度に観察された(図2)。Ang IIの投与後3日からPI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスにおいてのみ解離性大動脈瘤の破裂による出血死がみられ、投与後2週間以内に約50%が死亡した。タモキシフェン投与による内皮細胞特異的PI3K-C2 α ノックアウトマウスでも同様に、Ang IIの慢性投与による解離性

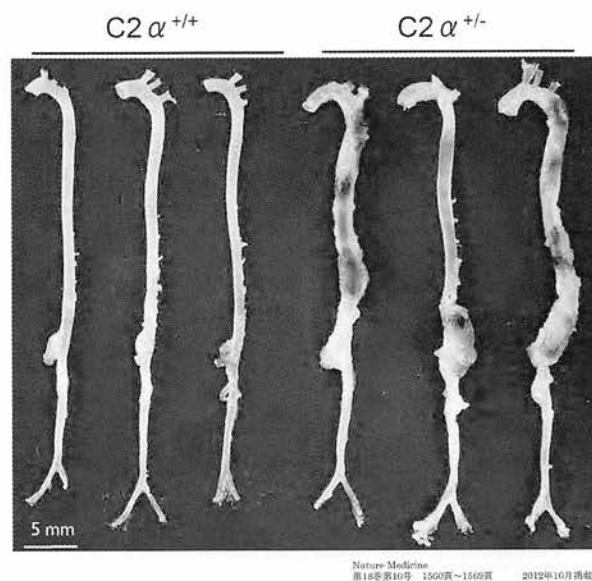


図2. アンジオテンシンII慢性投与による解離性大動脈瘤形成。アンジオテンシンII慢性投与(1.0mg/kg/day, 2週間)により、ヘテロKO型(C2 α ^{+/-})では胸部や腹部の大動脈に解離に伴う壁内血腫と動脈瘤形成が認められる。

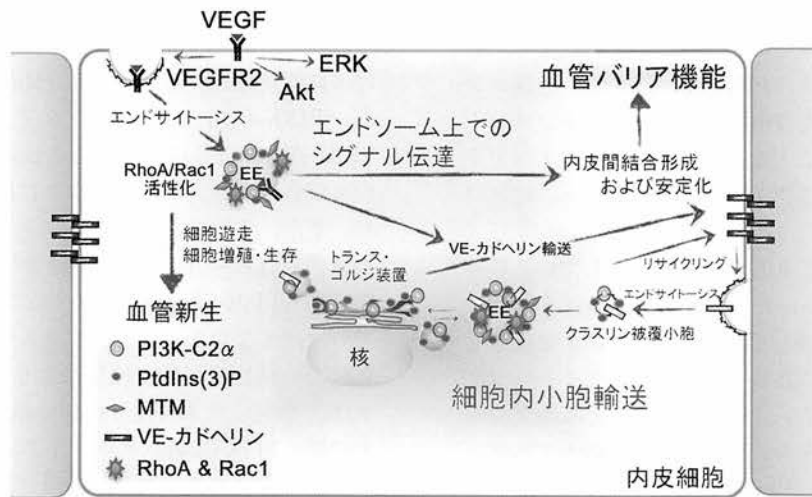


図3. PI3K-C2 α の血管内皮細胞における役割

PI3K-C2 α は、トランスゴルジ装置、エンドソーム、クラスリン小胞に存在し、PtdIns 3-Pを産生する。PtdIns 3-Pは細胞内小胞輸送に必須であり、特にVEカドヘリンのトランス・ゴルジ装置から細胞間接着部位への輸送やクラスリン依存的なエンドサイトーシスおよびリサイクリングを調節することにより、血管バリア機能を調節する。またエンドソーム上でのシグナル伝達を制御し、血管新生を調節する。

大動脈瘤の発症がみられたことから、血管内皮細胞におけるPI3K-C2 α 欠損が血管壁の構造を著しく脆弱にしているものと考えられた。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)-2及び-9の活性化は動脈瘤の形成の原因のひとつと考えられているが、Ang IIの慢性投与によりPI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスの血管壁におけるこれら酵素の活性は野生型マウスに比べ増大していた。さらに、MMP-2及びMMP-3を産生するMac3陽性炎症性マクロファージの血管壁への浸潤がPI3K-C2 α ヘテロノックアウトマウスにおいて顕著に増加していた。

Ⅲ. おわりに

本研究により、内皮細胞に高発現するクラスII型PI3K-C2 α は発生期における血管新生、および、生後の安定な血管における血管バリア機能の維持に欠かすことのできない重要な役割をもつことが明らかになった。血管内皮細胞においてPI3K-C2 α は、その代謝産物であるPtdIns 3-Pを介し細胞内小胞輸送を制御し、ゴルジ装置と形質膜間の膜タンパク質の輸送、受容体分子などのエンドサイトーシスとリサイクリング、エンドソームにおけるシグナル伝達に関与していた(図3)。血管内皮細胞におけるこのPI3K-C2 α の機能が血管新生および血管バリア機能の維持をささえているものと考えられた。

クラスII型PI3K-C2 α とクラスI型PI3Kは、血管内皮細胞においてまったく異なる細胞内機序により血管内皮の機能を制御していた。すなわち、クラスI型PI3KはAktの活性化を介して血管内皮細胞の増殖、生存、遊走に深く関与しているが、細胞内小胞輸送の制御やVE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積には関与しない。したがって、この研究から明らかになったPI3K-C2 α の生理機能は、血管生物学におけるPI3Kファミリーの新たな作用を見出したものであり、血管バリア機能の障害により

惹起される多くの血管疾患に対する新しい治療標的となることが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導とご助言を頂いた金沢大学大学院医学系研究科血管分子生理学 多久和陽教授、岡本安雄准教授、吉岡和晃助教に感謝の意を表します。またこのような研究の機会を与えていただいた、金沢大学大学院医学系研究科経血管診療学(放射線科)松井修前教授、蒲田敏文教授、放射線科の教室員の皆様から感謝いたします。

文 献

- 1) Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 464-478.
- 2) Vanhaesebroeck B, Guillermet-Guibert J, Graupera M et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 329-341.
- 3) Graupera M, Guillermet-Guibert J, Foukas LC et al. Angiogenesis selectively requires the p110 α isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* 2008; 453: 662-666.
- 4) Falasca M, Maffucci T. Role of class II phosphoinositide 3-kinase in cell signalling. *Biochem. Soc. Trans* 2007; 35: 211-214.
- 5) Falasca M, Hughes WE, Dominguez V et al. The role of phosphoinositide 3-kinase C2 α in insulin signaling. *J Biol Chem* 2007; 282: 28226-28236.
- 6) Biswas K, Yoshioka K, Asanuma K et al. Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2 α in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells. *J Biol Chem* 2013; 25: 2325-2339.

Profile

所 属：金沢大学放射線科

2003年：金沢大学医学部医学科卒業

2013年：金沢大学大学院医学系研究科修了

