

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670162

研究課題名(和文)PI-3-PホスファターゼMTMの制御による血管バリア機能の防御

研究課題名(英文)Control of vascular barrier integrity by MTM family of phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞膜上では、産生されたPI-3-Pはホスファターゼによる脱リン酸化を受け、PI-3-Pレベルは適正に調節される。内皮において小胞輸送を制御するPI3K-C2 のカウンターパート分子であるMTMメンバーを同定してその機能を明らかにした。内皮に発現するMTMファミリーメンバーを同定し、GFPタグを付加した分子を発現させて、エンドソームに発現していることを確認した。このホスファターゼ分子はPI-3-Pレベルを負に調節し、PI3K-C2 とともに小胞運動の調節に関与していた。この機能を介して内皮細胞の遊走、細胞間接着および形態形成に重要な役割を果たすと示唆された。

研究成果の概要(英文)：We studied phosphatidylinositol 3-phosphate (PI-3-P) phosphatase in vascular endothelial cells. Among 14 isoforms of MTM family members, we identified one isoform which was relatively abundantly expressed in endothelial cells. Fluorescent imaging showed the expression of GFP-tagged phosphatase in endosomes. The phosphatase negatively regulated cellular PI-3-P level and was involved in the regulation of endosomal movement. The PI-3-P phosphatase controlled migration, cell-cell adhesion and morphogenesis of endothelial cells through regulating PI-3-P level.

研究分野：血管医学、病態医化学、生理学、細胞生物学、脂質生化学

キーワード：ホスホイノシチド ホスファターゼ PI3-キナーゼ 小胞 血管 内皮

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞では、ホルモンなどの分泌とこれら細胞外シグナルの受容、細胞の遊走や分化による組織・器官の形成、さらには上皮細胞や血管内皮の極性の形成・維持に、トランスゴルジ網 (TGN)、初期及び後期エンドソーム、リサイクリング・エンドソームから成るポストゴルジ・タンパク質輸送ネットワークが関わっている。各種の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、TGN から形質膜への小胞輸送などのメンブレン・トラフィック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、PI-4-P や PI-4,5-P<sub>2</sub> などとともに、メンブレン・トラフィックにおいてそれぞれ特異的な機能を果たす。本研究担当者は、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 PI3K-C2α が血管平滑筋収縮に必要であることを発見し、PI3K-C2α ノックアウトマウスを作成した。PI3K-C2α は、胎児期にはむしろ血管内皮細胞 (EC) に強く発現しており、PI3K-C2α ノックアウトマウスは血管新生が障害されるために胎生致死であった。PI3K-C2α は EC の TGN、初期エンドソーム、クラスリン被覆小胞に発現し、PI3K-C2α ノックダウンによりこれらの細胞内小器官膜の PI-3-P レベルの低下、細胞内小胞運動の顕著な低下、特に接着分子 VE-カドヘリンの TGN から細胞間接着結合部位への輸送障害、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。PI3K-C2α ノックアウトマウスは生存可能であったが、血管障壁 (バリア) 機能が低下し、血管壁の炎症・傷害が生じて高率に動脈瘤を形成した。PI3K-C2α は小胞輸送の正常な機能発現に必須の役割を担う PI-3-P の産生酵素であり、血管病の新規治療標的となる可能性が示唆される。

## 2. 研究の目的

小胞上では、産生された PI-3-P はホスファターゼによる脱リン酸化を受け、PI-3-P レベルは適正に保たれると考えられる。小胞輸送制御に関わる PI-3-P ホスファターゼの候補として、ミオチュブラリン (MTM) ・ファミリーの 14 種 (MTM1 及び MTMR1~13) が想定されるが、実際に PI3K-C2α が機能する細胞内分画で機能する PI-3-P ホスファターゼは未同定である。本研究において、EC において小胞輸送を制御する PI3K-C2α のカウンターパート分子である MTM メンバーを同定してその機能を明らかにし、血管病の病態における PI-3-P ホスファターゼの役割を解明する。

## 3. 研究の方法

血管内皮細胞を用いて、PI3K-C2α ノックダウンにより惹起される細胞内小胞の PI-3-P レベルの低下及び細胞遊走抑制のレスキュー効果を指標として、候補である 14 種の MTM ファミリーホスファターゼ分子から、siRNA 法による選択的ノックダウンにより、PI3K-C2α が産生する PI-3-P プール (細胞内小胞プール) の脱リン酸化を担う MTM ホスファターゼを同定する。同定したホスファターゼの、小胞を介する VE カドヘリン輸送や血管新生因子シグナリングにおける役割を解明する。PI3K-C2α ノックアウトマウスに見られる大動脈瘤形成、粥上動脈硬化増悪、急性血管透過性亢進といった血管異常が当該ホスファターゼの欠失 (PI3K-C2α とホスファターゼの二重ノックアウト) によりレスキューされるか否か、さらにレスキュー作用の分子機構を解明する。本研究により、血管ホメオスターシス維持と血管疾患における PI-3-P ホスファターゼの役割を解明する。

## 4. 研究成果

PI(3)P ホスファターゼの候補として、ミオチュブラリン (MTM) ファミリーの 14 種 (MTM1 及び MTMR1~13) が想定される。定量的 PCR を用いて、内皮に発現する MTM ファミリーメンバーを絞り込んだ。そのうちの 1 つ (MTMR-x と仮称) は、内皮細胞エンドソームに発現していた。RNA 干渉法による MTMR-x 発現の抑制が血管内皮機能にどのような影響を及ぼすかを検討した。MTMR-x ノックダウンは、細胞内小胞の増加と巨大化を引き起こした。MTMR-x ノックダウンは、PI3K-C2α ノックダウンの効果とは異なり、血管新生因子スフィンゴシン 1-リン酸による細胞遊走の著しい亢進を引き起こした。一方、VE カドヘリンの細胞間接着部位への集積やマトリゲル上でのチューブ様構造形成に対しては、MTMR-x ノックダウンは PI3K-C2α ノックダウンと同様に抑制作用を及ぼした。

MTMR-x 遺伝子座に LacZ (β-ガラクトシダーゼ) をノックインしたマウスの全身組織を LacZ 活性染色 (X-gal 染色) し、MTMR-x 発現組織を検討した。さまざまな組織で発現が観察されたが、特にいくつかの組織において高発現が観察された。

MTMR-x のノックアウトマウス表現型の解析を開始している。MTMR-x ノックアウトマウスを PI3K-C2α ノックアウトマウス (全身性ヘテロノックアウトマウス及びホモコンディショナルノックアウトマウス) と交配し、PI3K-C2α ノックアウトマウスの表現型がどのように影響を受けるかを検討している。

## 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 5 件)

1. Aki S, Yoshioka K, Okamoto Y, Takuwa N, Takuwa Y. Phosphatidylinositol 3-kinase Class II  $\alpha$ -Isoform PI3K-C2  $\alpha$  Is Required for Transforming Growth Factor  $\beta$ -induced Smad Signaling in Endothelial Cells. J Biol Chem. 査読有 2015 290(10):6086-6105 Jan 22. pii: jbc.M114.601484.
2. 吉岡 和晃 多久和 典子 岡本 安雄 多久和 陽 クラス II  $\alpha$  型 PI-キナーゼの血管内皮細胞における新しい生理機能 生化学 85 (9) 査読無 2013
3. 吉岡 和晃 吉田 耕太郎 多久和 典子 岡本 安雄 多久和 陽 細胞内小胞輸送制御を介して血管新生を促進するクラス II 型 PI3 キナーゼ BIO Clinica 28 (5) 22-28 査読無 2013
4. 多久和 陽 血管新生の基礎と臨床 Bio Clinica 28 (5) 16-17 査読無 2013
5. 吉岡 和晃 吉田 耕太郎 多久和 典子 岡本 安雄 多久和 陽 PI3 キナーゼ・ファミリーの血管における生理機能: クラス II  $\alpha$  型 PI3 キナーゼ C2 $\alpha$  による新たな血管恒常性維持機構 血管 36 (2) 53-61 査読無 2013

[学会発表] (計 9 件)

1. Yoh Takuwa Essential role of PI3K class II  $\alpha$  for endosomal signaling of S1P1 and other receptors 6th international conference on Phospholipase A2 and Lipid Mediators 2015 年 2 月 10-12 日 京王プラザホテル(東京都新宿区) (国際)(招待講演) Intracellular lipid signaling
2. Yoshioka, K. Novel role of class II PI 3-kinase in in tumor angiogenesis” International Symposium on Tumor

Microenvironment. -Crosstalk between host and malignant cells - 2014 年 11 月 21 日金沢大学・自然研図書館・AV ホール(Kanazawa, Japan), (国際)(招待講演)

3. 安藝翔, 吉岡和晃, 多久和 典子, 岡本安雄, 多久和陽 クラス II 型 PI3 キナーゼ-C2  $\alpha$  による TGF  $\beta$  血管内皮作用の調節機構 第 61 回中部日本生理学会 2014 年 11 月 6-7 日 名古屋市立大学桜山キャンパス(愛知県名古屋市) (口頭)
4. 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 ALK5 内在化及び足場タンパク SARA のエンドソームへの動員を制御し TGF $\beta$ 1-Smad2/3 を介した血管新生を調節する 第 56 回 日本脂質生化学会 2014 年 6 月 6-7 日 近畿大学東大阪キャンパス(大阪府東大阪市) (口頭)
5. 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和 典子, 多久和 陽 クラス II 型 PI3K-C2  $\alpha$  はメンブレン・トラフィック調節を介して血管バリア機能を制御する 第 91 回日本生理学会大会 2014 年 3 月 15-18 日 鹿児島大学 郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市) シンポジウム「心血管系の形態・機能研究の最前線」
6. 安藝 翔, 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和 典子, 多久和 陽 クラス II 型 PI3K-C2  $\alpha$  は SARA のエンドソームへの動員を制御し TGF $\beta$ 1-Smad2/3 シグナル伝達系を介した血管新生を調節する 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸国際会議場/神戸国際展示場/神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市) (ポスター)
7. 吉岡 和晃, 多久和 典子, 岡本 安雄, 多久和 陽 クラス II  $\alpha$  型 PI3 キナーゼ-C2  $\alpha$  による血管新生・バリア機能調節メカニズム 第 21 回日本血管生物医

学会 2013年9月26-28日 千里阪急ホテル（大阪府豊中市）シンポジウム「血管機能を抑制するシグナリング機構」

8. 安藝 翔、吉岡 和晃、多久和 典子、岡本 安雄、多久和 陽 TGF $\beta$ 1-Smad2/3 シグナル伝達系を介した血管新生調節におけるクラス II  $\alpha$  PI3 キナーゼ PI3K-C2 $\alpha$  の機能的役割 第21回日本血管生物医学会 第21回日本血管生物医学会 2013年9月26-28日 千里阪急ホテル（大阪府豊中市）（口頭）
9. Yoh Takuwa Phosphatidylinositol 3-kinase class II  $\alpha$ -isoform controls vesicular trafficking in endothelial cells to serve the essential role in angiogenesis and vascular barrier integrity 第45回動脈硬化学会 2013年7月18-19日 京王プラザホテル（東京都新宿区）（招待講演）

〔図書〕（計 1件）

1. 宮園浩平 多久和 陽他 サイトカイン・増殖因子キーワード 羊土社 2015 総ページ 420（342-344）

〔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

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

吉岡 和晃 (YOSHIOKA, Kazuaki)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：80333368