

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659170

研究課題名（和文）PI3KクラスII α 酵素欠損マウスにおける血管健全性の破綻研究課題名（英文）Disruption of vascular integrity by deficiency of PI3K class II α isoform in mice

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

研究成果の概要（和文）：ホスファチジルイノシトール(phosphatidylinositol; PI) 3-キナーゼ (PI3K) クラスII α 型酵素 PI3K-C2 α は、血管内皮細胞において経小胞輸送に必須の役割をはたす。PI3K-C2 α ノックアウトマウスでは、アナフィラキシーメディエーター投与後の血管透過性亢進が著しく増強し、アンジオテンシン II の投与により解離性大動脈瘤が高頻度に生じた。PI3K-C2 α はクラスI PI3K とは異なる独自の機構により血管バリア機能制御に必須であり、血管病に対する新しい治療標的となる可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：Class II α isoform of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K-C2 α) plays the essential role for vesicular trafficking in vascular endothelial cells. In PI3K-C2 α -deleted mice, vascular permeability increase after administration of edematogenic mediator was exaggerated compared with wild-type mice. PI3K-C2 α -deleted mice also showed a higher frequency of the formation of dissecting aortic aneurysms. Thus, PI3K-C2 α is crucial for maintaining vascular integrity through the distinct action from that of class I PI3K, and suggested to be a potential useful therapeutic target for vascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：血管分子生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、PI 3-キナーゼ、小胞輸送、血管恒常性、血管障壁機能、血管透過性、動脈瘤、アナフィラキシー

1. 研究開始当初の背景

PI3K はイノシトールリン脂質のイノシトール環の3位をリン酸化する8種の脂質キナーゼから成るファミリーであり、細胞膜リン脂質 PI, PI-4,5-P₂などをリン酸化して、PI-3-P や PI-3,4,5-P₃を産生する。これらの3-リン酸化PIは、PI3K サブタイプの細胞内局在に応じて形質膜や細胞内小器官膜において産生され、さまざまな細胞内タンパク質

を局所にリクルートし、細胞増殖・生存や細胞運動に関わるシグナル伝達経路の活性化や、細胞内小胞輸送やアクチン骨格制御にかかわる。PI3K は、活性化機構や基質特異性に基づいて3つのクラスI, II, IIIに分類される。この内、主にPI-3,4,5-P₃を産生するクラスI酵素は細胞の増殖や遊走における役割が確立され、PI-3-Pを産生するクラスIII酵素は小胞輸送やオートファジーを調節してい

る。一方、クラス II 酵素はクラス III と同様に主として PI-3-P を産生することが明らかにされていたが、その機能は不明の点が多かった。筆者らは、平滑筋収縮において Ca²⁺ が Rho を活性化する経路の存在をつきとめ、このシグナル経路にクラス II PI3K-C2 α が関与していることを発見した。そこで、動物個体レベルでの PI3K-C2 α の機能を明らかにするために、PI3K-C2 α 酵素ノックアウト (KO) マウスを作成し、表現型を解析した。その結果、ノックアウトマウスではむしろ内皮細胞間接着を含む内皮機能に異常が生じて血管新生が著しく障害され胎生致死となること、ヘテロ KO マウスは生存可能であった。

2. 研究の目的

全身性 PI3K-C2 α +/-マウス (全身 KO マウス)、内皮特異的 PI3K-C2 α +/-マウス (EC-KO マウス)、EC-/-KO マウスは周産期に死亡)、条件付き内皮特異的 PI3K-C2 α +/-マウス (cEC-KO マウス)、平滑筋特異的 PI3K-C2 α -/-ホモマウス (SM-KO マウス) を用いて、三種の KO マウスにおける、血管狭窄、大動脈瘤、血管透過性異常の有無を解析することにより、内皮と平滑筋のいずれの PI3K-C2 α 欠損が各血管異常の原因であるかを解明する。さらに、内皮細胞間接着構造、血管における遺伝子発現、浸潤細胞、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の解析などにより、PI3K-C2 α KO マウスにおける血管異常の分子機構を解明する。

3. 研究の方法

EC-KO マウスは Tie2-Cre マウスとの交配、cEC-KO マウスは VEcadherin-Cre/ER マウスとの交配、SM-KO マウスは SM22-Cre マウスとの交配により得た。cEC-KO マウスにはタモキシフェンを投与して PI3K-C2 α 遺伝子を欠失させた。これら PI3K-C2 α -KO マウスと適当なコントロールマウスの表現型を比較した。アナフィラキシー実験では、アナフィラキシー誘発メディエーターである血小板活性化因子 (PAF) を静脈内投与、動脈瘤形成実験ではポンプを用いて昇圧ホルモンアンジオテンシン II (AngII) を慢性投与した。

4. 研究成果

培養内皮細胞において PI3K-C2 α が AJ 形成に必要であったことから、PI3K-C2 α はインビボでは血管障壁 (バリア) 機能に必要であると推察された。全身 KO マウスでは、PAF を投与後の血管透過性亢進は著しく増強し、死亡率が高かった。AngII の慢性投与は血圧上昇とともに血管透過性亢進を引き起こすことが知られている。全身 KO マウスおよび cEC-KO マウスでは、野生型ではほとんど見ら

れない解離性大動脈瘤形成が高頻度に生じ、これらのマウスの多くは大動脈瘤破裂により死亡した。KO マウスでは、血管壁へのマクロファージ浸潤が増加しており、コラーゲンや弾性線維を分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) -2 及び-9 の活性が亢進していた。これらの機構により血管内皮の PI3K-C2 α 欠損は血管壁を脆弱にした。

生体レベルでの機能がこれまで不明であったクラス II PI3K サブファミリーの PI3K-C2 α が血管内皮細胞において、細胞内小胞輸送の制御を介してさまざまな積荷分子の経小胞輸送に必須の役割をはたすこと、また PI3K-C2 α は細胞膜受容体内在化と内在化受容体による小胞膜シグナリングにも必要であり、このエンドソームシグナルは細胞遊走、細胞間接着に重要であることを見出している。これらの機能により、PI3K-C2 α は生理的および病的な血管形成と血管障壁機能に必須であることを解明した。血管内皮細胞におけるこれらの PI3K-C2 α の機能は、PI-3-P を産生し細胞内小胞に局在する PI3K-C2 β やクラス III Vps34 とは明らかに異なる。PI-3,4,5-P₃ を産生するクラス I PI3K が Akt や Rac を活性化し、血管形成において重要な役割をはたすことはすでに確立されている。本研究により、クラス II PI3K-C2 α がクラス I とは異なる独自の機構により血管形成と血管バリア機能・恒常性維持に必須であることが示された。PI3K-C2 α は、さまざまな血管病に対する新しい治療標的となる可能性が期待される。

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 7 件)

1. Biswas K, Yoshioka K, Asanuma K, Okamoto Y, Takuwa N, Sasaki T, Takuwa Y. Essential role of class II PI3K-C2 α in sphingosine-1-phosphate receptor-1 mediated signaling and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 査読有 288(4):2325-2339 2013. doi:10.1074/jbc.M112.409656
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 J.R, Okamoto H,

- Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams H.R, Takakura N, Takuwa Y. Essential role of endothelial class II PI3K-C2 α in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature med.* 査読有 18(10): 1560–1569, .2012. doi:10.1038/nm.2928
3. Takuwa Y, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa N. Sphingosine-1-phosphate signaling in physiology and diseases *BioFactors* 38(5):329-337 2012 doi: 10.1002/biof.1030
 4. Takuwa N, Okamoto Y, Yoshioka K, Takuwa Y. G Protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptors: potential molecular targets for angiogenic and anti-angiogenic therapies. *Biomed Rev.* 査読有 22:15-29. 2011 <http://www.eurochicago.com/wp-content/uploads/2012/03/BMR-22-2011.pdf#page=22>
 5. Takuwa N, Du W, Kaneko E, Okamoto Y, Yoshioka K Takuwa Y. Tumor-suppressive Sphingosine-1-phosphate Receptor-2 Counteracting Tumor-promoting Sphingosine-1-phosphate Receptor-1 and Sphingosine Kinase 1-Jekyll Hidden behind Hyde. 査読有 *Am J Cancer Res.* 1(4):460-481.2011 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3186046/?tool=pubmed>
 6. Takagi T, Okamoto Y, Tomita S, Sato A, Yamaguchi S, Takuwa Y, Watanabe G. Intraradial administration of fasudil inhibits augmented Rho kinase activity to effectively dilate spastic radial artery in coronary artery bypass grafting surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 査読有 142(2):e59-65. 2011 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2011.01.055>
 7. Seok YM, Choi YW, Kim GD, Kim HY, Takuwa Y, Kim IK. Effects of gomisin A on vascular contraction in rat aortic rings *Naunyn-Schmiedeberg Archives of Pharmacology* 査読有 383(1):45-56. 2011 DOI: 10.1007/s00210-010-0571-0
- [学会発表] (計 9 件)
1. 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 α はメンブレン・トラフィック調節を介する血管形成及び恒常性維持に必須である 第 90 回日本生理学会 2013 年 3 月 27–29 日 タワーホール船堀 (東京都) (招待講演)
 2. Yoh Takuwa Endothelial PI3K-C2a, a class II PI3K in angiogenesis and vascular barrier function Gordon Research Conference Vascular Cell Biology 2013 年 1 月 27 日-2 月 1 日 Four Points Sheraton / Holiday Inn Express Express Ventura, (U.S.A) (招待講演)
 3. Yoshioka K, Yoshida K, Biswas K, Takuwa Y, et al. Endothelial PI3K-C2a, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. Gordon Research Conference Vascular Cell Biology 2013 年 1 月 27 日-2 月 1 日 Four Points Sheraton / Holiday Inn Express Express Ventura, (U.S.A)
 4. Kuntal Biswas, Kazuaki Yoshioka, Yasuo Okamoto, Noriko Takuwa and Yoh Takuwa ClassII PI3-kinase, PI3K-C2alpha, mediates S1P-induced endothelial cell migration through

endosomal Rac1 activation Gordon
Research Conference Vascular Cell
Biology 2013年1月27日-2月1日
Four Points Sheraton / Holiday Inn
Express Ventura, (U.S.A)

5. Kuntal Biswas, 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和 典子, 多久和 陽 クラス II 型 PI3 キナーゼ C2 α はエンドソーム上での Rac1 活性化を制御してスフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) による血管内皮細胞遊走・管腔形成を調節する。 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日-14 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県)
6. 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 α は血管形成・血管恒常性維持に必須である 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日-14 日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県) (招待講演)
7. 吉岡 和晃, 岡本 安雄, 多久和 典子, 多久和 陽 クラス II α 型 PI3 キナーゼ C2 α は血管形成に必須である 第 54 回日本脂質生化学会 2012 年 6 月 6-8 日 九州大学医学部百年講堂(福岡県)
8. 多久和 陽 血管平滑筋収縮における新しい Ca²⁺ 標的-ミオシン軽鎖ホスファターゼ 第 27 回スパズム・シンポジウム 2011 年 7 月 30 日 国立京都国際会館 (京都府) 招待講演
9. Kazuaki Yoshioka, Kotaro Yoshida, Hong Cui, Xun Qi, Tomohiko Wakayama, Noriko Takuwa, Yasuo Okamoto, Kazushi Sugihara, Sho Aki, Kuntal Biswas, Masahide Asano, Yoh Takuwa. Endothelial class II PI3K-Ca2a has an essential role for

physiological and pathological
angiogenesis. 日本分子生物学会第 11
回春季シンポジウム ポスター2011 年
5 月 25-26 日 石川県立音楽堂(石川県)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 血管内皮関門障害に関連した疾患又は
症状を予防及び/又は治療するための候補物
質のスクリーニング方法

発明者: 多久和 陽

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2013-033893

出願年月日: 2013年02月11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

(2) 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