

血管健全性を維持する新規内皮発現分子の病態生理研究

金沢大学 医薬保健研究域医学系・血管分子生理学分野
吉岡 和晃

1. 背景および目的

脂質リン酸化酵素であるホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) は、哺乳類において、3つのクラス (I, II 及び III)、8つのアイソフォームが存在し、その生成物である PI(3)P, PI(3,4)P₂ 及び PI(3,4,5)P₃ を介して細胞内小胞トラフフィッキングやシグナル伝達に関与することによって、細胞内小胞を介した物質輸送、細胞増殖、細胞運動、遺伝子発現の調節など多岐に渡る生理作用を發揮する。PI3K 研究は、特にクラス I 型酵素を中心に癌、免疫、代謝の分野で活発に展開されており、また創薬研究の重要標的分子ともなっている。しかし、クラス I・III 型酵素とは異なり、クラス II 型酵素の機能・役割はほとんど未解明であった。我々は、クラス II α 型 PI3K (C2α) 遺伝子欠損 (KO) マウスを世界で始めて開発した。興味深いことに、全身型 C2α ホモ KO マウスは胎生中期で致死となり、その死因は血管形成の障害であることを突き止めた。また、生存可能なヘテロ欠損マウスは著しい血管バリア機能低下を示した。更に内皮細胞特異的に C2α を欠損するコンディショナル KO マウスも全身型 KO マウスと同様な表現型を呈し、内皮細胞の C2α が血管形成・バリア機能維持に必須であることが判明した (*Nature Medicine* 2012、参考論文 1)。これらの研究成果より、内皮細胞内膜小胞 (エンドソーム等) に局在する C2α 活性産物 PI(3)P レベルを正常にコントロールすることは、有望な抗血管炎症療法開発の選択肢と成り得る。

今日我が国において、他の先進諸国と同様により有効な動脈硬化治療法の開発に対する社会的ニーズは極めて高い。本研究では、内皮細胞特異的 PI3K-C2α 遺伝子欠損による内皮バリア機能障害型“動脈硬化モデル”マウスを確立し、本モデルと従来型の粥状動脈症モデルとの相違を明らかにすることを目的とした。また、内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構をより詳細に明らかにするために、PI(3)P 特異的な脂質ホスファターゼ (Myotubularin-related protein: MTMR) アイソフォームを同定し、更に C2α - MTMR 系による内皮バリア調節機序を明確にすることを試みた。

2. 方法

a) 有効な内皮バリア機能障害型「動脈硬化」発症プロトコルの確立と評価法の開発：

内皮特異的 C2α/全身性 ApoE の二重欠損 (*PI3K-C2α^{flox/flox};Vecad-CreER;ApoE^{-/-}*) マウス (対照群：ApoE 欠損マウス、*PI3K-C2α^{flox/flox};ApoE^{-/-}*) 各群 20 匹 (10 週齢) に高コレステロール飼料 (コレステロール含量：1.25%) を給餌開始後、8 週間、12 週間、16 週間の全マウスに対して、体重の経時的变化および各エンドポイントでの動脈硬化形成をオイルレッド-O 染色により定量評価した。

b) PI(3)P ホスファターゼの同定と内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構の解析：

PI3K-C2α 酵素によって産生される PI-3-リン酸 (PI(3)P) は血管内皮において細胞内小胞 (エンドソーム) 輸送の調節を介して血管新生と血管障壁機能をコントロールしている。しかし、内皮細胞小胞膜の PI(3)P を分解する脂質ホスファターゼの実態は不明であった。本研究では、PI(3)P 特異的ホスファターゼ・ミオチューブラリン様タンパク質 (Myotubularin-related protein: MTMR) ファミリーの中で、PI3K-C2α による PI(3)P レベルを特異的に負に調節している MTMR アイソフォームの同定を試みた。具体的には、ヒト血管内皮細胞モデル・HUVEC 細胞において発現する各 MTMR を RNA 干渉法により特異的にノックダウンし、下記に示す項目 i) - iii) を検討した。

siRNA 導入は、6-cm 径ディッシュ底面に占有率 70~80%まで増殖した HUVEC の培地を EBM-2 から Opti-MEM 培地 (Invitrogen 社) に置換し、Lipofectamin RNAi MAX (Invitrogen 社) 5 μl に混じた

siRNA を添加（培地中濃度 5 nM）した。4 時間後に培地を EBM-2 培地に置換した。siRNA のノックダウン効率は、PI3K-C2 α は抗 PI3K-C2 α 抗体を用いたウエスタンブロット法により、MTMR は定量的 PCR 法による mRNA レベルの測定により確認した。

- i) PI(3)P 特異的蛍光プローブ（GFP 標識 FYVE ドメイン）を用いた蛍光ライブイメージング解析
- ii) 内皮細胞化学走化性因子・スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）に対する細胞遊走及び血管新生能評価
- iii) 抗 VE カドヘリン抗体染色による内皮細胞間接着構造（アドヘレンス結合）の解析

3. 結果 研究成果

a. 内皮バリア機能障害型「動脈硬化」発症プロトコールの確立

高コレステロール飼料（HCD）給餌 8 週間後における全大動脈内腔の動脈硬化プラーク形成は、内皮特異的 PI3K-C2 α 欠損（eCKO）マウスにおいて、野生型（WT）に比して顕著に促進していた（図 1A）。各群 20 匹での統計的解析において、WT 群と比べてプラーク形成が約 2 倍に増加していた（図 1B, $p < 0.0001$, t-test）。同様に、HCD 給餌後 12 週、16 週においても eCKO マウスにおいてプラーク形成の有意な増強がみられたことから、内皮特異的 PI3K-C2 α 欠損マウスは、従来型モデル（ApoE 欠損）マウスと比べ、より有効な動脈硬化モデルマウスであることが示され、当初の目標は十分に達成できた。

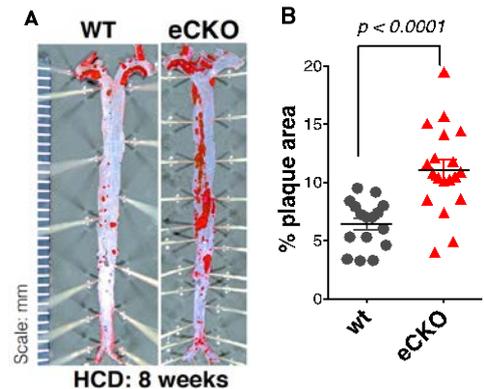


図1 内皮特異的 PI3K-C2 α KO マウスの内皮バリア障害型「動脈硬化」形成

A) 高コレステロール飼料給餌8週間後における全大動脈内腔標本のオイルレッド-O 染色像。
B) 大動脈全域におけるオイルレッド-O 染色陽性領域の割合(%)

b. 内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構の解析

2.1 PI(3)P 特異的ホスファターゼ・MTMR 種の同定および内皮細胞 PI(3)P レベル調節機構の解析：

i) PI3K-C2 α 及び MTMR のノックダウンの細胞内 PI(3)P レベルとその局在に及ぼす効果を検討するために、特異的に PI(3)P に結合する FYVE ドメインと蛍光タンパク質 GFP の融合タンパク質（GFP-2xFYVE）を HUVEC に発現させ、GFP 蛍光のライブイメージング観察を行った。コントロール（si-SC 処理）細胞では、細胞辺縁部の様々なサイズの GFP 蛍光陽性、すなわち PI(3)P 豊富なエンドソームと考えられる小胞が多数観察された。C2 α ノックダウン細胞ではコントロール細胞に比べ細胞辺縁部の GFP 陽性小胞が減少し、核周囲のより大きな GFP-2xFYVE タンパク質凝縮像が観察された。一方、si-MTMR ノックダウン細胞では GFP 蛍光陽性小胞が逆に増加し、小胞のサイズも増大していた。si-C2 α と si-MTMR を二重導入した細胞では、si-C2 α 単独導入細胞に比較して、細胞辺縁部に大きな小胞が増加した。しかし、この細胞辺縁部の小胞増加は si-MTMR 単独導入細胞ほど顕著ではなかった。また si-C2 α 単独導入細胞と同様に、核周囲の GFP-2xFYVE 凝縮像が観察された。

ii) コントロール細胞（si-SC）の S1P に対する最大遊走反応は 100 nM S1P 存在下で観察された。C2 α ノックダウン細胞の遊走反応は、当研究室のこれまでの結果と一致してコントロール群に比べ有意に低下した（# $p < 0.05$, Two-way ANOVA）。MTMR ノックダウン細胞の

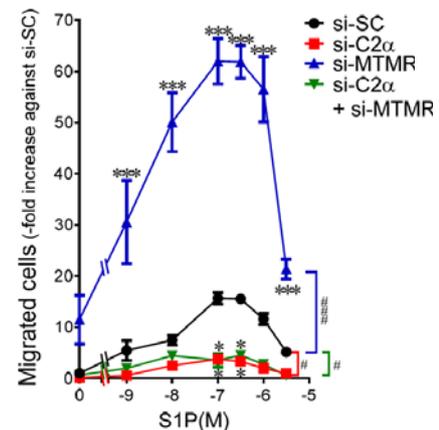


図2 PI3K-C2 α 、MTMRをノックダウンしたHUVEC におけるS1Pによる化学遊走。

各 siRNA を単独もしくは二重導入した HUVEC の細胞遊走（遊走細胞数。S1P 存在下の遊走細胞数は、S1P が存在しない場合の値に対する比率として表示されている。）をボイデンチェンバーで測定した。下槽に種々の濃度の S1P を加えた。

遊走反応は著しい亢進を示した（約60倍の増加、### $p < 0.001$, Two-way ANOVA、図2）。これに対してC2 α 及びMTMR二重ノックダウン細胞では、PI3K-C2 α 単独ノックダウン細胞と同程度に細胞遊走が抑制された（# $p < 0.05$, Two-way ANOVA、図2）。

iii) コントロール HUVEC では、VE-カドヘリンの細胞間接着構造への集積が観察されるが、C2 α ノックダウン細胞においてVE-カドヘリン集積が減弱し、細胞間接着構造が障害された結果、細胞間に多くの間隙が形成された（図3B）。MTMRノックダウン細胞においては、VE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積が傷害されたと共に、細胞内部に局在するVE-カドヘリンが増加していた（図3C）。二重ノックダウン細胞では、各単独ノックダウン細胞で観察されたVE-カドヘリンの細胞間接着部位への集積障害が改善する傾向にあった（図3D）。

以上の結果から、内皮細胞における脂質リン酸化酵素・C2 α と脱リン酸化酵素・MTMRは強調して働き、細胞内膜小胞上でPI(3)Pレベルを調節することによって、血管内皮細胞の恒常性を維持していることが強く示唆された。

4. まとめ

当初の目標のうち、内皮特異的PI3K-C2 α 遺伝子KOマウスを用いた内皮バリア機能障害型動脈硬化マウスの確立に関しては、達成出来た。また、本研究課題として取り組んだ*in vitro*実験系においては、内皮細胞内膜小胞上で脂質リン酸化酵素・PI3K-C2 α により産生されるPI(3)Pを特異的に分解する脱リン酸化酵素・MTMRを同定し、C2 α -MTMR系による強調的PI(3)Pレベル調節システムの存在を見出した。今後、このPI(3)Pレベル調節システムを標的とした全く新しい概念の血管内皮機能改善薬の開発に向けた開発プラットフォーム作りに着手する道筋ができたことは、本研究課題の成果である。

5. 参考文献

- 1) **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 RJ, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams RH, Takakura N, and Takuwa Y. (2012) Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature Med.* **18**(10) 1560-1569.

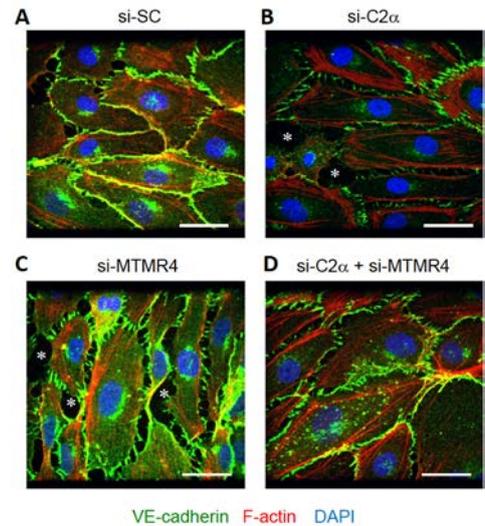


図3 PI3K-C2 α , MTMRをノックダウンしたHUVECにおけるVE-カドヘリン免疫蛍光染色像。各 siRNA を単独もしくは二重導入したHUVECをパラホルムアルデヒド固定後、VE-カドヘリン免疫染色(緑)およびアクチンフィラメント染色(赤)を行った。青:DAPI(核染色)、スケールバー:20 μ m