

エンドソーム膜受容体シグナリングを標的とする難病血管病治療薬の開発

吉岡和晃

金沢大学医薬保健研究域 医学系血管分子生理学分野

【研究の背景】

リガンドの膜受容体への結合によって、形質膜シグナリングが開始されるとともに、受容体エンドサイトーシスが起る。この受容体エンドサイトーシスは脱感作を引き起こすのみならずエンドソーム膜での受容体シグナリングによりシグナル多様性に貢献している。細胞膜を構成する主要な脂質のうち、イノシトール含有グリセロールリン脂質・ホスホイノシタイド(PI)は、細胞内小胞輸送(メンブレン・トラフィック)、とりわけエンドサイトーシス/エキソサイトーシス、オートファジー、細胞遊走などの膜ダイナミクスを制御する。PIの中でも特にイノシトール環3位にリン酸基の付加されたPI(3)P、PI(3,4)P₂、PI(3,5)P₂、PI(3,4,5)P₃を合成する脂質リン酸化酵素PI3-キナーゼ(PI3K)はPI生合成の律速酵素であり、3つのクラス(クラスI~III)から成る。クラスI(p110 α , β , γ , δ)はチロシンキナーゼ型受容体により活性化されPI(3,4,5)P₃を産生して細胞増殖シグナル経路を活性化する。クラスIII(Vps34)はPI(3)Pを産生してオートファジーを制御する。これらクラスI、IIIとは異なり、クラスII PI3K(α , β , γ)の機能は不明であったが、我々はクラスII PI3K α 酵素(PI3K-C2 α)ノックアウト(KO)マウスを作製し、PI3K-C2 α が血管新生に必須であることを見出した(*Nature Med.* 2012)。また、PI3K-C2 α KOマウスでは血管の健全性(障壁機能)が損なわれ、i) 解離性大動脈瘤の発症、ii) アナフィラキシーショックの重症化、iii) 腫瘍血管新生の抑制、を呈した。さらに、PI3K-C2 α の細胞内作用を解析し、PI(3)及びPI(3,4)P₂を主に産生し、血管内皮成長因子(VEGF)、スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)、TGF β)の血管新生因子受容体のエンドサイトーシスを促進し、エンドソーム膜でのこれら受容体のシグナリングに必要であった(*J. Biol. Chem.* 2013, 2015)。

【目 的】

本研究では、治療困難な血管難病(虚血肢血管新生、大動脈瘤、アナフィラキシー)を対象とする新規治療の開発を目的として、リン酸化PI産生酵素・クラスII型PI3キナーゼ“PI3K-C2 α ”の発現安定化を標的としたmiRNA核酸医薬および、PI3K-C2 α の酵素産物・PI(3)Pに対する脱リン酸化酵素(PIホスファターゼ)を探索・機能解析を行い、エンドサイトーシスにおけるPI3K-C2 α の機能調節機構の解明を目的とした。

【方 法】

a) PI3K-C2 α をターゲットとしたmiRNAの探索および機能解析:

本研究では、まず血管病変部位で誘導されるmiRNAのスクリーニングを行った。血管病態モデルとして、内皮特異的C2 α /全身性ApoEの二重欠損(PI3K-C2 α ^{flox/flox};Vecad-CreER;ApoE^{-/-})マウス(対照群:ApoE欠損マウス、PI3K-C2 α ^{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、体重の経時的変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。miRNA qPCR探索スクリーニングプレートを用いて、各種miRNA発現レベルを網羅的に調べた。

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-C2 α 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。本研究では上記 a と平行して、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-C2 α 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。

- 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

【結 果】

a) PI3K-C2 α をターゲットとした miRNA の探索および機能解析:

まず当初の計画通り、血管病変部位で誘導される miRNA のスクリーニングを為し、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た。次に、両マウスの病変部より mRNA を生成し、qPCR により miRNA の発現プロファイルを解析した結果、両者の間で優位な変化が見られなかった。

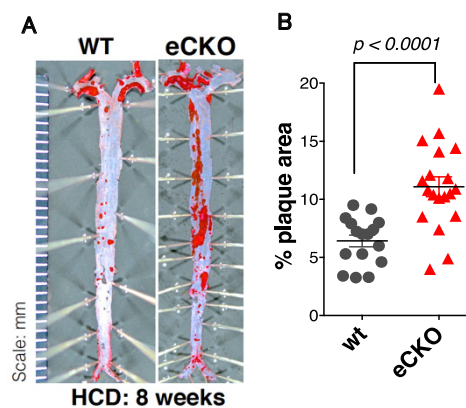


図 1 内皮特異的 PI3K-C2 α KO マウスの内皮バリア障害型「動脈硬化」形成

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) 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:

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-MTMR4 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-MTMR4 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 100nM 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)。MTMR4 ノックダウン細胞の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)。

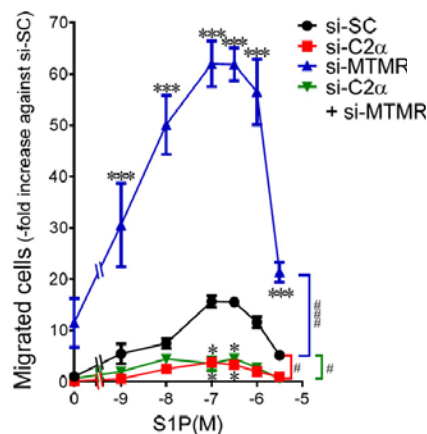


図 2 PI3K-C2 α 、MTMR4 をノックダウンした HUVEC における S1P による化学遊走。

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。

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)。MTMR4 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・MTMR4 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。

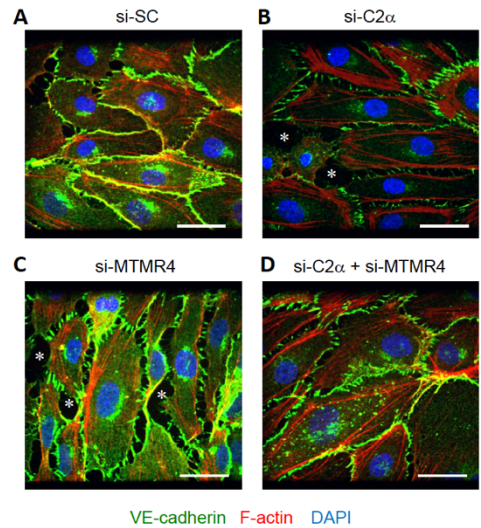


図3 PI3K-C2 α , MTMR4をノックダウンしたHUVEC におけるVE-カドヘリン免疫蛍光染色像。

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

【考 察】

当初の目標のうち、血管病変部位で誘導される miRNA のスクリーニングに関しては、ポジティブな結果が得られず現在も継続中である。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 -MTMR4 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。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

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着手する道筋ができたことは、本研究課題の成果である。

【参考・引用文献】

Yoshioka K, et al. (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.

Biswas K, Yoshioka K, et al. (2013) Essential role of class II PI3K-C2 α in sphingosine-1-phosphate receptor-1 mediated signaling and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 288(4) 2325-2339.

Aki S, Yoshioka K, et al. (2015) Phosphatidylinositol 3-kinase class II α -Isoform PI3K-C2 α Is required for transforming growth factor β -induced smad signaling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 290(10) 6086-6105.