

## 血管内皮の特殊オートファジー経路を介したウイルス感染制御機構

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

### 【研究の背景】

これまで当研究室では、クラス II  $\alpha$  PI3 キナーゼ (PI3K-C2  $\alpha$ ) を中心としたイノシトールリン脂質代謝酵素群の生理機能を、KO マウスの表現型解析を基盤とした一連の研究を継続的に進めてきた。その結果、PI3K-C2  $\alpha$  酵素は細胞膜やクラスリン被覆小胞に強局在し、“クラスリン依存性エンドサイトーシス”を精巧に制御する PI3K アイソフォームであることを明らかにした<sup>1-8)</sup>。これまでの研究結果から、PI3K-C2  $\alpha$  は多くの細胞種でクラスリン依存性エンドサイトーシスに必須な因子であることは間違いない。更に、ACE2 受容体エンドサイトーシスあるいは直接ファゴサイトーシスによるウイルス侵入には、クラスリン依存性の膜動現象を利用していることが多数報告されている。従って、我々は「PI3K-C2  $\alpha$  は ACE2 ウイルス受容体のクラスリン依存性エンドサイトーシス経路を制御する新たな因子であり、さらに非古典的オートファジー・LAP・LANDO 経路<sup>9)</sup>を介したウイルス感染防御機構に関与する」仮説を提唱するに至った。

### 【目 的】

新型コロナウイルス (SARS-CoV2) が血管内皮細胞に侵入する際、その受容体である ACE2 に相互作用した後、エンドサイトーシスによってインターナリゼーションすることに着目し、クラスリン依存性エンドサイトーシスに必須なクラス II 型 PI3K アイソフォーム・PI3K-C2  $\alpha$  がどのような機序でウイルス侵入を調節しているかを解析する。特に、ウイルスの血管内皮細胞への侵入阻止を戦略とした新たなターゲット候補としての PI3K-C2  $\alpha$  酵素の特殊なオートファジー制御機構を解明し、ウイルス感染防御への新たな戦略を提示することを究極の目標としている。そこで、本研究では PI3K-C2  $\alpha$  のオートファジー経路における役割について、PI3K-C2  $\alpha$  -flox マウス由来血管内皮細胞を用いた *in vitro* 実験系で解析を試みた。

### 【方 法】

既に樹立している PI3K-C2  $\alpha$  -flox マウス肺より単離した血管内皮細胞を用いて、Cre 発現アデノウイルスによる PI3K-C2  $\alpha$  欠損におけるオートファジー経路の影響を観察した。具体的には、LacZ 発現アデノウイルスを対照群とし、Cre 発現アデノウイルス感染細胞における飢餓ストレスによるオートファジー誘導の程度を免疫染色法とウェストブロット法により評価した。オートファジー誘導には、ウシ胎児血清 FCS 及びグルコース・アミノ酸を含まない Hank's 平衡塩溶液 (HBSS) 中での培養条件下で行った。オートファジー誘導の評価は、リソソーム V-ATPase 阻害剤・Bafilomycin-A1 (BafA1) によるリソソーム阻害有無において行った。オートファゴソーム形成の有無は、抗 WIPI2 抗体、SQSTM1 (p60) 抗体および抗 LC3B 抗体を用いた免疫細胞染色およびウェスタンブロット法により定量的に評価した。

### 【結果および考察】

Cre リコンビナーゼ発現誘導により PI3K-C2  $\alpha$  をノックダウンした血管内皮細胞において、栄養培地環境下での WIPI2 陽性小胞数が顕著に増加していた。この WIPI2 陽性小胞は、BafA1 前処置によるリソソーム活性阻害および飢餓培地下において更に増加傾向にあった。更に、栄養培地培養下での PI3K-C2  $\alpha$  発現抑制細胞において、LC3B 陽性オートファゴソーム

ム小胞数は BafA1 前処置でのみ有意に増加していた。興味深いことに、飢餓培地培養下での LC3B 陽性オートファゴソーム小胞は PI3K-C2 $\alpha$  発現抑制細胞において BafA1 有無に関わらず完全に消失した。これらのことから、PI3K-C2 $\alpha$  欠損血管内皮細胞において、飢餓ストレスによるオートファジー誘導が障害されていることが示唆された。そこで、ウェスタンブロット法により PI3K-C2 $\alpha$  ノックダウン血管内皮細胞におけるオートファジー誘導を検証した。その結果、Cre リコンビナーゼ発現による PI3K-C2 $\alpha$  ノックダウン内皮細胞において、栄養培地環境下での SQSTM1 タンパク発現レベルが有意に上昇していた。この結果は、PI3K-C2 $\alpha$  ノックダウンにより細胞内におけるオートファジー誘導が減弱したことにより、オートファジー基質である SQSTM1 のオートリソソーム・ターンオーバーが障害されていると考えられた。以上の結果より、これまでのオートファジー研究で明らかにされてきたクラス III-PI3K $\cdot$ Vps34 によるホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PI3P) 産生を介したオートファゴソーム形成 (古典的オートファジー) とは異なったオートファジー経路として、クラス II-PI3K アイソフォーム $\cdot$ PI3K-C2 $\alpha$  を介した特殊なオートファジー系の存在が明らかとなった。PI3K-C2 $\alpha$  酵素は細胞膜において、ホスファチジルイノシトール-3,4-ビスリン酸 (PI3,4P2) を産生していることが我々の研究成果を含め明らかにされている<sup>3,8)</sup>。この PI3,4P2 産生は、細胞膜においてクラスリン依存性エンドサイトーシスを惹起する最初のステップに必須であることは既に報告している<sup>4,6,8)</sup>。本研究により明らかにされた研究成果により、これまで想定されていないクラスリン被覆小胞に依存した特殊オートファジー経路の存在が示された。現在、蛍光標識 SARS-CoV-2 スパイク蛋白を用いたウイルス-ACE2 複合体のインターナリゼーション・アッセイ系の構築を行っている。また、血管内皮細胞特異的 PI3K-C2 $\alpha$  コンディショナル KO マウスを用いた in vivo 解析モデルを試みる予定である。

#### 【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまでの研究において、血管内皮における PI3K-C2 $\alpha$  酵素による膜・トラフィック制御を解明することにより、血管機能のみならず、細胞の基本機能としての膜・トラフィック制御機構をより深く理解することを目指してきた。PI3K-C2 $\alpha$  研究は、我々が世界的にこれを先導しており、本研究の成果は、新型コロナウイルス感染症発症の治療薬として期待できる「ウイルス侵入阻害」を作用点とした発症抑制および重篤化の軽減に結びつく新しいターゲットとなる可能性を秘めている。更に、新型コロナウイルス感染症のみならず、血管病の病態の解明と新しい治療法開発においても有用な情報を与えることが期待される。

#### 【参考・引用文献】

1. **Yoshioka K**, et al. Endothelial PI3K-C2 $\alpha$ , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nature Med.* 18(10) 1560-1569 (2012).
2. Biswas K, **Yoshioka K**, et al. Essential role of class II PI3K-C2 $\alpha$  in sphingosine-1-phosphate receptor-1 mediated signaling and migration in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 288(4) 2325-2339 (2013).
3. Aki S, **Yoshioka K**, et al. 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.* 290(10) 6086-6105 (2015).
4. Aung KT, **Yoshioka K**, et al. The class II phosphoinositide 3-kinases PI3K-C2 $\alpha$  and PI3K-C2 $\beta$  differentially regulate clathrin-dependent pinocytosis in human vascular endothelial cells. *J. Physiol. Sci.* 69(2), 263-280 (2019).
5. Islam S, **Yoshioka K**, et al. Class II phosphatidylinositol 3-kinases  $\alpha$  and  $\beta$  isoforms are required for vascular smooth muscle Rho activation, contraction and blood pressure regulation in mice. *J. Physiol. Sci.* 70(18), (2020).
6. Aki S, **Yoshioka K**, et al. TGF $\beta$  receptor endocytosis and Smad signaling require synaptojanin1, PI3K-C2 $\alpha$ -, and INPP4B-mediated phosphoinositide conversions. *Mol. Biol. Cell.* 31(5), 360-372 (2020).
7. Shimizu S, **Yoshioka K**, et al. Class II phosphatidylinositol 3-kinase-C2 $\alpha$  is essential for Notch signaling by regulating the endocytosis of  $\gamma$ -secretase in endothelial cells. *Sci. Rep.* 11(1):5199 (2021).
8. **Yoshioka K**. Class II phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in vesicular trafficking. *Biochem. Soc. Trans.*, 49 (2), 893-901 (2021).
9. Heckmann B.L. et al. LC3-associated endocytosis facilitates  $\beta$ -amyloid clearance and mitigates neurodegeneration in murine Alzheimer's disease. *Cell.* 178(3) 536-551 (2019).